

Kisspeptin ve nörokinin genlerinin puberte tedavisindeki potansiyel rollerinin değerlendirilmesi

Evaluation of the potential roles of kisspeptin and neurokinin genes in puberty treatment

Hale ÖKSÜZ ÜÇKAYABAŞI¹ (ID), Ali ÜÇKAYABAŞI² (ID), Nermin Seda ILGAZ¹ (ID), Halil İbrahim ÖKSÜZ³ (ID), Semiha DOĞAN⁴ (ID), Seda AKBOLAT⁴ (ID), Mehmet Bertan YILMAZ¹ (ID)

ÖZET

Amaç: Kisspeptin (KP) ve nörokinin (NK), hipotalamik nöronal aktivite ve pulsatilitesini düzenleyerek üreme endokrin eksenini yöneten nöropeptitlerdir. Üreme sağlığındaki kritik rolleri ilk olarak, KP veya NK sinyalinin kodlayan genlerin mutasyonlarına bağlı olarak fonksiyonunu yitirmesi sonrası, konjenital hipogonadotropik hipogonadizm ve pubertal gelişim anomalilerinin gösterilmesi ile tanımlanmıştır. Bu çalışmada, puberteye girişte etkili rol oynayan KP ve NK'in mezenkimal kök kücre (MKH) temelli tedavideki etkinliğini araştırılmış ve bu genlerin ekspresyonlarının pasaj sayısı ile ilişkisi incelenmiştir.

Yöntem: Çalışmamızda, üç adet erişkin sıçan (*Rattus norvegicus*) kullanılmıştır. Sıçanların kemik iliği ve adipoz dokusundan MKH elde edilmiştir. Daha sonrasında yüzey belirteçleri kullanılarak akım sitometrisinde MKH analizi yapılmış ve RNA (ribonükleik asit) izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Gerçek zamanlı polimeraz zincir

ABSTRACT

Objective: Kisspeptin (KP) and neurokinin (NK) are neuropeptides that govern the reproductive endocrine axis through regulating hypothalamic neuronal activity and pulsatile. Their critical role in reproductive health was first described by the demonstration of congenital hypogonadotropic hypogonadism and pubertal developmental anomalies following loss of function due to mutations in genes encoding the KP or NK signaling. This study aimed to investigate the efficacy of KP and NK, in mesenchymal stem cell (MSC)-based treatment of different origin, and examine the relationship of the expression of these genes with the passage number.

Methods: Three adult rats (*Rattus norvegicus*) were used in our study. MSCs were obtained from bone marrow and adipose tissue of rats. The MSCs were analysed by flow cytometry using surface markers and RNA (ribonucleic acid) isolation was performed. Gene expressions of KP, NK and their receptors were investigated by real-time

Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FYL-2019-12326 numaralı proje ile desteklenmiş olup Çukurova Üniversitesi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

¹Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD., Adana, Türkiye

²İstanbul Kent Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji AD., İstanbul, Türkiye

³Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik AD., Adana, Türkiye

⁴Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji AD., Adana, Türkiye



İletişim / Corresponding Author : Mehmet Bertan YILMAZ
Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD., Adana - Türkiye
E-posta / E-mail : mehmetbertanyilmaz@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 23.11.2023
Kabul Tarihi / Accepted : 05.02.2024

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2025.57355

Öksüz Üçkayabaşı H, Üçkayabaşı A, Ilgaz NS, Öksüz Hİ, Doğan S, Akbolat S, Yılmaz MB. Kisspeptin ve nörokinin genlerinin puberte tedavisindeki potansiyel rollerinin değerlendirilmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2025; 82(1): 3 - 12

reaksiyonu (RT-PCR) ile KP, NK ve reseptörlerinin gen ifadeleri araştırılmış olup ve pasaj sayısı ile ilişkisi karşılaştırılmıştır. Her bir genin kendi içerisindeki farklı pasajlardaki ekspresyonlarının karşılaştırılmasında Welch paired t-testi kullanılmıştır. İstatistiksel önem düzeyi 0,05 olarak kabul edilmiştir ($p \leq 0,05$).

Bulgular: Kültürü yapılan kemik iliği ve adipoz dokuya ait hücrelerin MKH oldukları tespit edilmiştir. Kemik iliği kaynaklı MKH'lerin Real-time PCR sonuçları değerlendirildiğinde, dördüncü pasaja kıyasla altıncı pasajda kisspeptin reseptör gen ifadesinin 14, yedinci pasajda ise 29 kat artışı gözlemlenmiştir ($p \leq 0,05$). Taşikinin geninde dördüncü pasaja kıyasla beşinci pasajda gen ifadesinin neredeyse tamamen baskılandığı tespit edilmiştir ($p \leq 0,05$). Taşikinin reseptör geninde, beşinci pasaj baz alındığında ise altıncı pasajda gen ifadesinin tamamen indüklendiği belirlenmiştir. Adipoz doku kaynaklı MKH'lerin RT-PCR sonuçları değerlendirildiğinde ise, dördüncü pasaja kıyasla beşinci pasajda taşikinin reseptör gen ifadesinin 15, taşikinin gen ifadesinin 30 kat, yedinci pasajda ise KP reseptör gen ifadesinin üç kat artışı tespit edilmiştir ($p \leq 0,05$).

Sonuç: Kemik iliği ve adipoz doku gibi bulunması kolay olan bir dokudan MKH elde edebilmenin ileri ki dönemler için tıp dünyasına bir ışık tutacağı düşünülmüştür. Ayrıca puberte dönemine geçişte çok önemli göreve sahip olan KP ve NK genlerinin ifadelerini incelerken pasaj sayılarına dikkat edilmesi, kullanılacak pasajdaki gen ifadeleri göz önünde bulundurularak pasaj sayısının seçilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Hücre kültürü, kisspeptin, mezenkimal kök hücre, nörokinin, puberte, RT-PCR

polymerase chain reaction (RT-PCR) and their relationship with the passages number was compared. Welch paired t-test was used to compare the expression of each gene at different passages. Statistical significance was accepted as 0.05 ($p \leq 0.05$).

Results: The cultured bone marrow and adipose tissue cells were determined to be MSCs. When real-time PCR results of bone marrow-derived MSCs were evaluated, it was observed that kisspeptin receptor gene expression increased 14-fold in the sixth passage and 29-fold in the seventh passage compared to the fourth passage ($p \leq 0.05$). In the tachykinin gene, it was found that gene expression was almost completely suppressed in the fifth passage compared to the fourth passage ($p \leq 0.05$). In the tachykinin receptor gene, it was determined that gene expression was completely induced in the sixth passage, compared to the fifth passage ($p \leq 0.05$). When adipose tissue-derived MSC RT-PCR results were evaluated, it was observed that tachykinin receptor gene expression increased 15-fold, tachykinin gene expression increased 30-fold in the fifth passage, and KP receptor gene expression increased three-fold in the seventh passage compared to the fourth passage ($p \leq 0.05$).

Conclusion: MSCs can be obtained from an easily available tissue such as bone marrow and adipose tissue is thought to shed light on the medical science for the future. In addition, it was concluded that the number of passages should be considered when analyzing the expressions of KP and NK genes, which have a very important role in the transition to puberty, and the number of passages should be selected by considering the gene expressions in the passage to be used.

Key Words: Cell culture, kisspeptin, mesenchymal stem cell, neurokinin, puberty, RT-PCR

GİRİŞ

MKH; mezoderm tabakasından köken almakla birlikte vücudun çeşitli bölgelerinde nöral krista kaynaklı mezenkimal dokudan da gelişen hücrelerdir (1).

Kemik iliği, adipoz doku, göbek kordonu, kordon kanı, karaciğer, beyin, diş pulpası, deri ve fetal dokularda bulunan farklılaşmamış, çoğalma kapasitesi yüksek, kendini farklılaşmadan yenileyebilme özelliğine sahip, mezoderm farklılaşma yetisi çok fazla olan

MKH'ler kemik, kıkırdak, kas gibi farklı hücre tiplerine dönüşüm kapasitelerinin yanında ürettikleri birçok büyüme faktörü ve sitokinler nedeni ile immün baskılayıcı ve trofik etki potansiyeline de sahiptir (2,3). MKH'ler kemik iliği, deri, yağ dokusu, tendon, sinovyal membran, periodontal ligament ve sinir sistemi gibi birçok dokudan kolaylıkla elde edilebilir (2). Özellikle kemik iliği kökenli MKH'lerin pluripotensi özellikleri nedeni ile tıpta doku rejenerasyonu çalışmalarında kullanıldığı bilinse de hücre sayısının, proliferasyonun ve yaşla farklılaşma kapasitesinin azalmasından dolayı klinik uygulanabilirliği sınırlıdır (4,5). Bu nedenle, kemiğe alternatif olarak plasenta, adipoz; fetal akciğer, göbek kordon kanı gibi dokular araştırılmıştır (4). Bunlardan özellikle adipoz dokunun elde edilebilirliğinin kolay olması, kemik iliğine kıyasla daha fazla kök hücre üretebilmesi, ayrıca adipoz doku kökenli kök hücrelerin plastisitesinin yüksekliğinin hücre içi ve hücre dışı çalışmalarda kanıtlanması ile birlikte, adipoz doku kökenli MKH'ler ve jeneratif doku mühendisliği alanında birçok tıp branşının dikkatini çekmiştir (6). Yapılan çalışmalarda, MKH'lerin farklılaşma yeteneklerinin fazla olması, migrasyon özellikleri, hasarlı doku tamirine katkı sağlamaları, hasarlı olan hücrelerle füzyon yeteneklerinin olması, genetik geçmişlerinin kararlı olması, tümör oluşturma riskinin diğer kök hücre türlerine göre az olması gibi özellikleri ile puberte bozuklukları dahil olmak üzere birçok hastalık modeli ile ilişki oldukları gösterilmiştir (7-17). Yetişkin cinsiyet özellikleri ve üreme yeteneğinin kazanıldığı, çok çeşitli fizyolojik değişikliklerle karakterize bir gelişimsel dönem olan pubertenin başlangıcının temel endokrinolojik özelliği hipotalamustan pulsatil gonadotropin salıcı hormon (GnRH) salgılanması olup buradaki aksaklıklar puberteye geçişi engellemektedir (18,19). Hipotalamik GnRH salgılayan nöronlar, cinsiyete özgü hormonların sentezini kontrol eden karmaşık bir nöroendokrin ağı merkezinde yer almaktadır (19,20). Genetik, çevresel ve yapısal faktörler bu süreci kontrol etmektedir (19). Embriyolojik dönemdeki gelişim, enerji homeostazında rol oynayan hormonlar,

nöropeptidler, nörotransmitterler, transkripsiyon faktörleri, nöronal etkileşimler ve sinyal yolları gibi pek çok faktör GnRH salgı ve pulsatilesinin düzenlenmesinde görev alır ve bu yollarda meydana gelen aksaklıklar, erken puberte, hipogonadotropik hipogonadizm veya konstitüsyonel büyüme ve puberte gecikmesi gibi patolojilere neden olur (18,19). GnRH nöronlarının düzenleyicileri arasında en önemlileri kisspeptin (KP), nörokinin (NK) B ve dinorfindir (20). KP ve reseptörü (GPR54), GnRH salgılanmasında kilit role sahiptir. Ayrıca, diğer taşıyıcılar; NK B (TAC3), reseptörü (TACR3) ve dinorfinin de bu yolda görev aldığı bilinmektedir (18). Bu çalışmada da kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı MKH'lerin pubertal bozuklukların tedavisine destek olup olmayacağı araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızda, sıçan kemik iliği ve adipoz dokudan elde edilen MKH'lerin hücre kültürleri yapılmış olup farklı pasajlarda KP, NK ve reseptörlerinin gen ekspresyonları incelenerek tedaviye yönelik kullanım potansiyelleri araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Deney hayvanlarının temini ve bakımı

Çalışmamızda Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen üç adet erişkin sıçan (*Rattus norvegicus*) kullanılmış, asepsi-antisepsi kurallarına uygun olarak normal oda koşulları altında (22 °C sıcaklık, %30-70 nem, aydınlık/karanlık döngüsü 12/12 saat) ad libitum olarak beslenmiş ve eter ile bayıltılarak deney öncesinde servikal dislokasyonla sakrifiye edilmişlerdir.

Yağ dokudan MKH eldesi ve hücre kültürü

Anestezi altında böbrek arkasındaki yağ dokudan MKH eldesi sağlanmıştır (21). Öncelikle çıkartılan yağ dokusu herhangi bir kontaminasyona karşı birçok kez antibiyotik içeren fosfat tamponunda yıkanmıştır. Yağ dokusu küçük parçalar şeklinde kesilerek %0,075 tip 1 kollajenaz / 10 mL Ca⁺² içermeyen fosfat tamponu içinde bir orbital çalkalayıcı cihaza sabitlenerek 37 °C'de 60-90 dakika inkübatörde bekletilmiştir.

İnkübasyon sonunda tüpler dokunun iyice parçalanması için çalkalanmış, üzerine eşit miktarda fosfat tamponu eklenmiş ve homojenize edildikten sonra 1800 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant (yağ hücreleri ve yıkama sıvısı) uzaklaştırılmıştır. Elde edilen hücreler 70 µm'lik steril süzgeçten geçirilmiştir. Süzgeçten geçen hücreler ve doku parçaları; α-minimum esansiyel ortam (α-MEM), %15 fetal bovine serum (FBS), %0,1 penisilin-streptomisin içeren hücre kültür ortamında, 25 cm² yüzeyli kültür kabına aktarılmıştır. 72 saat sonra kullanılmış ortam değiştirilmiştir. Hücrelerin üremesine göre kültür kabının %75'i kaplandıktan sonra pasaj yapılmıştır. Hücreler %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin içeren MEM (fenol kırmızısı içermeyen) besiyerinde 37 °C ve %5 CO₂'li ortamda inkübe edilmiştir. KP ve NK inhibitörleri ile ayrı ayrı veya kombinasyonları ile muamele edilmiştir. Daha sonra bu hücreler petri kabında %70'lik yayılma gösterdikten sonra 24 saat boyunca besiyerinde (serum içermeyen) tutularak muameleleri gerçekleştirilmiştir.

Kemik iliğinden MKH eldesi ve hücre kültürü

Femur ve tibiadan MKH eldesi sağlanmıştır (22). Kemikler kas tabakasından olabildiğince temizlenmiştir. Fosfat tamponu içeren başka bir kaba aktarılmıştır. İnsülin enjektörleri hücre kültür ortamı ile doldurularak hazırlanmıştır. Kemiklerin sırasıyla epifiz uçları kesilmiştir. Epifiz ucu kesilen kemikten iç boşluktan insülin enjektörü içerisindeki hücre kültür ortamı basınçla akıtılmıştır. Tüm kemik ilikleri aynı tüpe toplanmış, 1000 rpm'de +4 °C'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 15 adet 25 cm² yüzeyli kültür kabına 2,5 mL olacak şekilde aktarılmıştır. Üzeri ortam ile 5 mL'ye tamamlanmış ve 37 °C'de %5 CO₂'li %99 oranında nem sağlayan inkübatöre kaldırılmıştır.

Akım sitometrisi ile MKH analizi

Hücre ortamı atılıp fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandıktan sonra yoğunluğu %85'e ulaşıncaya tripsin ile kaldırılmıştır. Hücre ortamı eklenerek tripsin

inaktive edilmiştir. Hücreler süspansiyon şeklinde santrifüj tüpünde toplanmış ve 5 dakika 300-400 g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra hücre pelleti fosfat tamponu ile durulanmış ve yeniden pellet haline getirilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet fosfat tamponunda tekrar süspansiyon edilmiştir. Hücre sayımı yapılmış ve ardından hücreler soğuk fosfat tamponu içinde 10⁶-10⁷ hücre olacak şekilde seyreltilmiştir. Seyreltilmeden sonra 100 µL hacimde 10⁵-10⁷ hücre olacak şekilde floresan aktive hücre ayırma tüpüne (FACS) alınmıştır. Antikor eklenmiş ve karanlıkta 30-60 dakika 4 °C'de inkübe edilmiştir. Hücreler santrifüjlenmiş ve soğuk fosfat tamponu ile yıkanmıştır. Hücreler 100-200 µL FACS solüsyonu ile yeniden süspansiyon hale getirilmiş, karanlıkta 4 °C'de saklanmış ve 24 saat içinde analizi yapılmıştır. Örnekler akım sitometrisi cihazı ile MKH yüzey belirteçleri açısından analiz edilmiştir. Pozitif marker olarak CD90, CD29 ve negatif marker olarak CD45 seçilmiştir.

RNA izolasyonu, cDNA eldesi ve gen ekspresyonu

Total RNA izolasyonu TRizol (Sigma-Aldrich, Waltham, ABD) reaktifi kullanılarak sağlanmıştır (23). cDNA eldesi için 10XRT Buffer (2 µL), dNTP (0.8 µL), primer (2 µL), enzim (1 µL), deiyonize su (4,2 µL)'dan oluşan bir karışım hazırlanmış ve ependorf tüplere dağıtıldıktan sonra RNA eklenmiştir. Daha sonra örnekler termal cycler cihazına yüklenmiştir. İki mikrolitre cDNA ve Taqman master mix (ThermoFisher, Waltham, ABD) kullanılarak gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ABI 7500 PCR sisteminde (AppliedBiosystems, Waltham, ABD) MKH'lerin KP, NK ve reseptörlerinin ekspresyon seviyeleri tespit edilmiştir. Reaksiyon 50 °C'de 2 dk ve 95 °C'de 10 dk, takiben 40 döngü olarak gerçekleştirilmiştir. 95 °C'de 15 sn ve 60 °C' 1 dk olarak inkübe edilmiştir. Kalıp ve enzim içermeyen kontroller kullanılarak genomik DNA varlığı ve reaksiyon özgüllüğü kontrol edilmiştir.

İstatistiksel analiz

Gen ifadelerinin analizi, üç bağımsız tekrarlı deneyin sonucunda elde edilen Ct (döngü eşik)

değerlerinin ortalaması alınarak yapılmıştır. Bu çalışmada β -actin geni referans gen olarak kullanılmıştır. Öncelikle araştırılmak istenen ilgili genin Ct değeri, referans genin Ct değerinden çıkartılarak normalize edilmiş ve delta Ct (Δ Ct) değeri hesaplanmıştır. Sonrasında kontrol grubunun Δ Ct değerleri, deney grubunun Δ Ct değerlerinden çıkartılarak $\Delta\Delta$ Ct değeri bulunmuştur. Gen ifadelerinin kat cinsinden artan ya da azalan değerleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ olarak hesaplanmıştır. Gen ekspresyon bulgularımızın istatistiksel analizi "StatView 5.0" istatistik program paketi (SAS Institute, Cary NC, USA) kullanılarak yapılmıştır. Her bir genin kendi içerisindeki farklı pasajlardaki ekspresyonlarının karşılaştırılmasında Welch paired t-testi kullanılmıştır. Anlamlılık $\alpha=0,05$ ve $\beta=0,20$ olarak kabul edilmiştir. Şekil 1 ve Şekil 2'de mRNA değerleri ortalama \pm SEM (Standart error mean: standart hata ortalaması) olarak ifade edilmiştir (n=3).

Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Hayvan Deneyleri

Yerel Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih:04.11.2019, Karar no: 3).

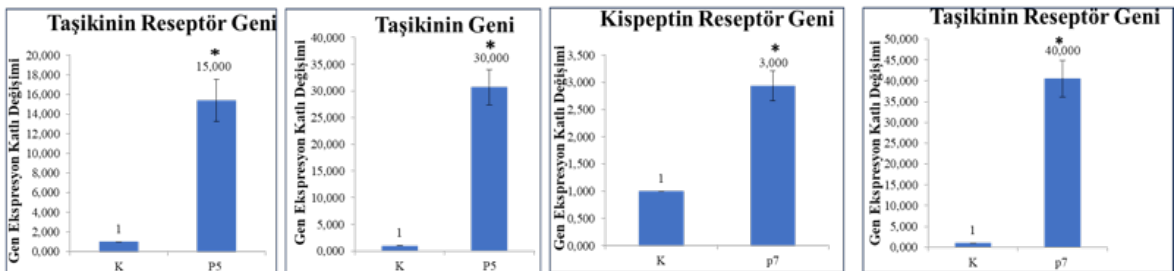
BULGULAR

Kültürü yapılan kemik iliği ve adipoz dokuya ait hücrelerin side scatter/ forward scatter (SSC/FSC) akım sitometri analizleri gerçekleştirilerek pozitif (CD29 ve CD90) ve negatif (CD 45) yüzey belirteçleri ile MKH oldukları tespit edilmiştir (Şekil 3a, 3b).

Kemik iliği kaynaklı MKH'lerin Real-time PCR sonuçlarını değerlendirdiğimizde, dördüncü pasaja kıyasla altıncı pasajda KP reseptör gen ifadesinin 14 kat, yedinci pasajda ise 29 kat artışı gözlemlenmiştir ($p \leq 0,05$). Taşikinin geninde dördüncü pasaja kıyasla beşinci pasajda gen ifadesinin neredeyse tamamen baskılandığı gözlemlenmiştir ($p \leq 0,05$). Taşikinin reseptör geninde, beşinci pasaj baz alındığında ise altıncı pasajda gen ifadesinin tamamen indüklendiği gözlemlenmiştir ($p \leq 0,05$) (Şekil 1).



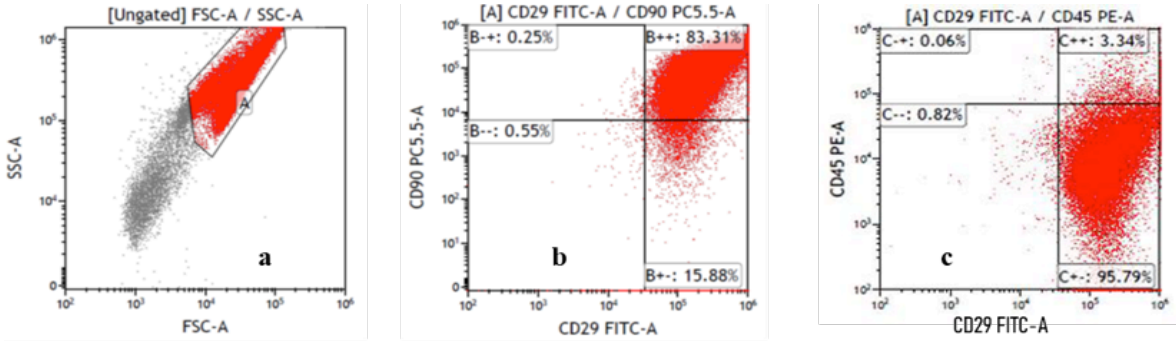
Şekil 1. Kemik iliği kaynaklı MKH'lerin Real-time PCR sonuçlarının değerlendirilmesi (* $p \leq 0,05$ Welch paired testi. Veriler ortalama \pm SEM olarak ifade edildi (n=3).



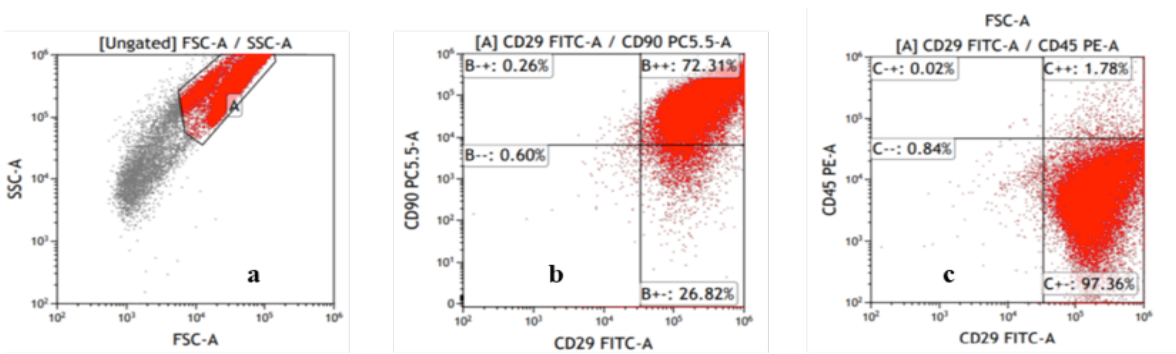
Şekil 2. Adipoz doku kaynaklı MKH'lerin Real-time PCR sonuçlarının değerlendirilmesi (* $p \leq 0,05$ Welch paired testi. Veriler ortalama \pm SEM olarak ifade edildi (n=3).

Adipoz doku kaynaklı MKH' Real-time PCR sonuçlarını değerlendirdiğimizde, dördüncü pasaja kıyasla beşinci pasajda taşikinin reseptör gen ifadesinin 15 kat, taşikinin gen ifadesinin 30 kat, yedinci pasajda ise KP reseptör gen ifadesinin üç

kat artışı gözlemlenmiştir ($p \leq 0,05$). Beşinci pasaja kıyasla ise yedinci pasajda taşikinin reseptör gen ifadesinin 40 kat artışı gözlemlenmiştir ($p \leq 0,05$) (Şekil 2).



Şekil 3a. Granülitesi SSC ve büyüklüğü FSC olarak kemik iliği orjinli MKH'lerin genel popülasyonunun değerlendirilmesi (a), kullanılan pozitif yüzey belirteçlerinin (CD90, CD29) MKH olduğunun tespiti (b), kullanılan CD45 ve CD29 yüzey belirteçlerinin yoğunluğu (c).



Şekil 3b. Granülitesi SSC ve büyüklüğü FSC olarak adipoz doku orjinli MKH'lerin genel popülasyonunun değerlendirilmesi (a), kullanılan pozitif yüzey belirteçlerinin (CD90, CD29) MKH olduğunun tespiti (b), kullanılan CD45 ve CD29 yüzey belirteçlerinin yoğunluğu (c).

TARTIŞMA

Mezenkimal stromal hücreler olarak da bilinen MKH'ler, osteoblastlar, kondrositler, miyositler ve adipositler dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilen multipotent stromal hücrelerdir (24). MKH'lerin puberte anomalileri dahil çeşitli hastalıklarla ilişkisi gösterildikten sonra bu alandaki çalışmalar hız kazanmıştır (7-17). Ancak ne dünyada ne de ülkemizde hem kemik iliği hem de adipoz doku

kaynaklı MKH'lere ait KP ve NK genlerinin birlikte araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Özellikle bu genlerin araştırılmasının nedeni KP ve NK'nın, üreme ve sinir sistemi de dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik süreçlerde rol oynayan sinyal molekülleri olmalarıdır. Bu çalışmada, kemik iliği ve adipoz doku hücrelerinden izole edilen MKH'lerin KP ve NK genlerini ve reseptörlerini eksprese etmeleri ve bu genlerin puberte, hipogonadizm gibi üreme sistemi üzerindeki anahtar rolleri nedeniyle üreme

sisteminde meydana gelen hastalıklar ile muhtemel ilişkisi araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda, hem kemik iliği hem de adipoz doku orjinli MKH'lere ait KP gen ifadesi hiçbir pasaj grubunda ifade olmasa da KP reseptör gen ifadesi ise pasaj sayısı ile korele bir şekilde artmıştır. Yapılan çalışmalarda da KP ve reseptörlerinin puberte ile ilişkisi araştırılmış olsa da (25-27) doğrudan pasaj sayısı ile ilişkisi irdelenmemiştir. Gottsch ve ark. (25), fareler üzerinde yapmış oldukları çalışmada; gonadotropin salgısının düzenlenmesinde KP'lerin rolünü araştırmıştır. Araştırmacılar KiSS-1 mRNA dağılımının haritasını çıkarmışlar ve KiSS-1 mRNA'nın anteroventral periventriküler çekirdek, periventriküler çekirdek ve kavisli çekirdek dahil olmak üzere gonadotropin salgılanmasının nöroendokrin düzenlenmesinde yer alan hipotalamus alanlarında eksprese edildiğini gözlemişlerdir. Ayrıca, bu çalışmada Kisspeptin-54 veya Kisspeptin-10'un intraserebroventriküler (ICV) olarak verildiğinde, luteinleştirici hormon (LH) ile folikül uyarıcı hormon (FSH) salınımını uyardığı gösterilmiştir (25). Diğer nöropeptidler için tam doz-yanıt eğrilerini ve bunların yetişkin erkek farede LH salgılanması üzerindeki etkilerini gösteren, doğrudan karşılaştırılabilir hiçbir çalışma literatürle paylaşılmamıştır. Başka bir çalışmada ise, Voigt ve ark. (26), yüksek üreme yeteneğine sahip dişi Damaraland köstebek farelerinde KP ve RFamid gen ifadesini incelemişlerdir. RFamid peptidi, KP ve RFamid ile ilgili peptid-3 (RFRP -3) gonadotropin salınımının güçlü düzenleyicileri olarak kabul edilmektedir. Araştırmacılar bu çalışmalarında Kiss1 ekspresyonu anlamlı derecede yüksek bulmuştur (26). Yapılan başka bir çalışmada ise anne sütünden elde edilen MKH'lerin erkek sıçanlardaki Kisspeptin/Kiss1r-GnRH/GnIH sistemi üzerindeki etkisi araştırılmıştır (27). Her üç çalışmada KP ve reseptörlerinin nöroendokrin üreme eksenini yöneten hipotalamik devrenin bir parçası olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak, bu çalışmaların hiçbirinde pasaj sayılarıyla ilişkileri araştırılmamış, ayrıca NK geni ya da reseptörleriyle

de birlikte değerlendirilmemiştir.

Çalışmamızda, kemik iliği kökenli MKH'lerin NK ve reseptörlerinin gen ifadelerinin pasaj sayısı ile birlikte korele bir şekilde azaldığı, adipoz doku kökenli MKH'lerin ise NK reseptörlerinin korele bir şekilde arttığı sonucuna ulaşılmıştır. Voigt ve ark. (28), Damaraland köstebek fareleri üzerinde yaptıkları bir diğer çalışmada; reproduktif sistemle ilgili dinorfin ve Tac3 geni tarafından kodlanan NK B'nin gen ifadeleri incelenmiştir. Hipotalamustan normal GnRH sekresyonunun bozulması LH hormonunun yetersiz salgılanmasına neden olmaktadır. Dolayısıyla gebelik engellenir. Dinorfin ve NK B, KP ile birlikte eksprese edilir. Bu nöron popülasyonu KNDy nöronları olarak adlandırılır. Araştırmacılar dinorfin ekspresyonunun azaldığını ve Tac3 ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir. Her iki nöropeptidin de Damaraland köstebek farelerinde üremenin düzenlenmesinde rol oynadığı bildirilmiştir. KNDy nöron ağından dinorfin salınımı, GnRH salınımını durdurma sinyali olarak işlev görmektedir. Çalışma sonuçları, üremeyen dişilerde normal pulsatil GnRH salınımının bozulduğunu, bunun nabız genliğini, frekansını veya her ikisini birden etkileyebileceğini göstermiştir. Bu çalışma nöropeptidlerin pubertal bozuklukların gelişim süreçlerindeki etkilerinin ne kadar önemli olduğunu vurgulamıştır (28). Çalışmamızda da benzer şekilde üremenin düzenlenmesinde ve puberte bozukluklarında öne çıkan genlerin MKH'de ifadesi araştırılmıştır.

Jeon ve ark. (29), 2016 yılında yaptıkları çalışmada ise insan kemik iliği, plasenta ve yağ dokusu dahil olmak üzere farklı kaynaklardan gelen MKH'leri fenotip, yüzey antijen ekspresyonu, farklılaşma yeteneği, proteom referans haritası ve kan akışı geri kazanımı açısından karakterize etmişlerdir. MKH'lerin benzer fenotipik ve yüzey antijeni ekspresyonuna sahip olmalarına rağmen hücresel kaynağa bağlı olarak ayırt edici farklılaşma potansiyellerine sahip olduklarını belirtmişlerdir. Bu çalışmada, hücre kültürü aşamasında üçüncü ve dördüncü pasajlar kullanılmışken, çalışmamızda ise dördüncü, beşinci ve

altıncı pasajlar kullanarak MKH elde edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, flow sitometride CD73, CD90, CD105, CD44 ve CD45 yüzey antijenleri kullanılmışken, çalışmamızda CD90, CD45 ve CD29 yüzey antijenlerini kullanarak flow sitometrisinde elde ettiğimiz kök hücrenin MKH olup olmadığı tespit edilmiştir. Yusop ve arkadaşları 2017 yılında yaptıkları çalışmada sıçan kemik iliğinden ve kompakt kemik hücrelerinden MKH izole etmişler ve osteojenik/adipojenik dokuya farklılaşmasını incelemişlerdir (29). Araştırmacılar MKH'lerin yüzey belirteçlerini agoroz jelde görüntülemişken, bizim yaptığımız çalışmada ise yüzey belirteçleri flowsitometride incelenmiştir.

Patki ve ark. (30), da farklı dokulardan elde edilen MKH'lerin multipotent özellikte olup olmadığını araştırmışlardır. Davies ark., (31) ise 2015 yılında adipoz ve kemik iliği MKH'lerinin izolasyonu, osteojenik ve adipojenik farklılaşma kapasitelerini değiştirmesi üzerine bir çalışma yapmışlardır. Ghorbani ark., (32) yaptıkları başka bir çalışmada, enzimatik yöntem kullanmadan adipoz dokudan MKH izole etmişlerdir. MKH'lerin pluripotente ve adiposite ve osteoblasta farklılaşma potansiyeli sergilediğini göstermişlerdir. Enzimatik yöntemin maliyetli, zaman alıcı olması ve heterojen bir hücre popülasyonu ile sonuçlanması nedeniyle tercih etmemişlerdir. Ayrıca hücre kültüründe DMEM'i kullanmışlardır. Çalışmamızda; enzimatik yöntem kullanarak adipoz dokudan MKH elde edilmiş ve hücre hasarı ya da kontaminasyon gözlenmemiştir. Ayrıca hücre kültüründe α -MEM'i tercih edilmiştir. Bu çalışmalarda da flowsitometri kullanılsa da herhangi bir gen ekspresyonuna bakılmamıştır.

Yapılan bir diğer çalışmada ise 43 yetişkin donörden alınan kemik iliği ve adipoz doku kültürlerinin ardışık pasajlarda immünofenotiplendirmesi yapılmıştır (33). Erken pasajlarda (ikinci, üçüncü pasaj veya 14-15 gün), kemik iliği ve adipoz dokudan türetilen MKH kültürlerinin çoğalma hızını da karşılaştırmışlardır. Kemik iliğinden elde edilen MKH'lerin üçüncü-dördüncü pasajdan sonra yaşlanmaya girdiğini, adipoz dokudan elde edilen MKH'lerin çoğunun ise

altıncı-sekizinci pasaja kadar yaşlanma özellikleri göstermediğini tespit etmişlerdir (33). Kemik iliği ve deri altı yağ dokusu, terapötik uygulamalar için olası MKH kaynakları olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, aynı hastanın farklı dokularından elde edilen MKH'nin fonksiyonel özellikleri ve terapötik etkinliği hala yeterince araştırılmamıştır. Bu sonuçlar, MKH'lerin çoğaltılması ve değerlendirilmesi açısından uygulamada özel protokoller geliştirmek ve optimize etmek için farklı kaynaklardan gelen MKH'nin de belirli özelliklerinin her zaman dikkate alınması gerektiğini göstermektedir.

Farklı orjinli MKH'lere ait KP ve NK gen ekspresyonlarının pasaj sayısı ile ilişkisinin incelendiği ilk çalışma özelliği taşıyan çalışmamız sonucunda dikkat çekici sonuçlara ulaşılmıştır. Kemik iliğinden elde edilen MKH'lere ait KP reseptör gen ifadesi incelendiğinde referansımızı pasaj (P) P4 olarak P6 ve P7 ile kıyaslandığında pasaj sayısının arttıkça gen ifadesinin de arttığı sonucuna ulaşılmıştır. Taşikinin geninde ise P4 grubu referans alındığında P5 neredeyse tamamen baskılanmıştır. Taşikinin reseptör geninde ise P5 grubu referans alındığında P6 örnekleri tamamen baskılanmıştır. Çalışmamızın sonuçları taşikinin ve reseptörünün korele bir şekilde azaldığını göstermiştir. Adipoz dokudan elde edilen MKH'lere ait KP reseptör geni için P4 referans alındığında P7 grubunun gen ifadesinin üç kat arttığı sonucuna ulaşılmıştır. Taşikinin geninde ise P4 grubu referans alındığında P5 grubunun gen ifadesinin 30 kat arttığı belirlenmiştir. Taşikinin reseptör geninde ise P4 grubu referans alındığında P5 grubu gen ifadesinin 15 kat; P5 grubu referans alındığında P7 grubu gen ifadesinin 40 kat indüklendiğini gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar da KP reseptör geni, taşikinin ve taşikinin reseptör genlerinin ilerleyen pasajlardaki ifadelerinin korele bir şekilde arttığını göstermiştir. Hem kemik iliği hem de adipoz yağ doku orjinli MKH'lere ait KP geni ise çalışılan hiçbir grupta eksprese olmamıştır. Çalışmamızı kısıtlayan en önemli nokta MKH'ye ait farklı bir gen ifadesine bakılmaması ve ayrıca bu genler protein düzeyinde çalışılmasını düşündürmüştür.

Sonuç olarak; kemik iliği ve adipoz doku gibi bulunması ve elde edilmesi kolay olan dokulardan MKH elde edebilmenin ileriki dönemler için tıp dünyasına bir ışık tutacağı düşünülmüştür. Ayrıca puberte dönemine geçişte çok önemli göreve sahip

olan KP ve NK genlerinin ifadelerini incelerken pasaj sayılarına dikkat edilmesi, kullanılacak pasajdaki gen ifadeleri göz önünde bulundurularak pasaj sayısının seçilmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı destekleyen Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederiz (Proje Numarası: FYL-2019-12326).

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih:04.11.2019, Karar no: 3).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Ateş U. Kök hücreyi tanıyalım. FNG & Bilim Tıp Transp Derg, 2016; 1(1): 19-28.
2. Ghorbani A, Jalali SA, Varedi M. Isolation of adipose tissue mesenchymal stem cells without tissue destruction: a non-enzymatic method. Tissue Cell, 2014; 46(1): 54-8.
3. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. Stem Cells, 2006; 24(5): 1294-301.
4. Jeon YJ, Kim J, Cho JH, Chung HM, Chae JI. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, placenta, and adipose tissue as sources of cell therapy. J Cell Biochem, 2016; 117(5): 1112-25.
5. Hao J, Zhang Y, Jing D, Shen Y, Tang G, Huang S, et al. Mechanobiology of mesenchymal stem cells: perspective into mechanical induction of MSC fate. Acta Biomater, 2015; 20: 1-9.
6. Gündeşlioğlu ÖA, Karaçor Z, İnce B, Dadacı M, Aktan M, Duman S. Yağ doku kökenli kök hücreler ve plastik cerrahide uygulama alanları. Türk Plastik Rekonst Estetik Cer Derg, 2013; 21(3): 1-10.
7. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. Blood, 2007; 110(10): 3499-506.
8. Yang M, Chen J, Chen L. The roles of mesenchymal stem cell-derived exosomes in diabetes mellitus and its related complications. Front Endocrinol (Lausanne), 2022; 13: 1027686.
9. Lin Z, Wu Y, Xu Y, Li G, Li Z, Liu T. Mesenchymal stem cell-derived exosomes in cancer therapy resistance: recent advances and therapeutic potential. Mol Cancer, 2022; 21(1): 179.
10. Long Z, Zhang M, Zhang T, Zeng L, Yang K, Yang T, et al. The effectiveness and safety of mesenchymal stem cells in the treatment of osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis of 28 randomized controlled trials. Stem Cells Int, 2022; 2022: 6151866.
11. Merimi M, El-Majzoub R, Lagneaux L, Moussa Agha D, Bouhtit F, Meuleman N, et al. The therapeutic potential of mesenchymal stromal cells for regenerative medicine: current knowledge and future understandings. Front Cell Dev Biol, 2021; 9: 661532.

12. Kadri N, Amu S, Lacobaeus E, Boberg E, Le Blanc K. Current perspectives on mesenchymal stromal cell therapy for graft versus host disease. *Cell Mol Immunol*, 2023; 20: 613-25.
13. Wang C, Zhou H, Wu R, Guo Y, Gong L, Fu K, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes and non-coding RNAs: regulatory and therapeutic role in liver diseases. *Biomed Pharmacother*, 2023; 114040.
14. Gonçalves RGJ, Vasques JF, da Silva-Junior AJ, Gubert F, Mendez-Otero R. Mesenchymal stem cell- and extracellular vesicle-based therapies for Alzheimer's disease: progress, advantages, and challenges. *Neural Regen Res*, 2023; 18(8): 1645-51.
15. Wang Y, Liu J, Wang H, Lv S, Liu Q, Li S, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorate diabetic kidney disease through the NLRP3 signaling pathway. *Stem Cells*, 2023; 41(4): 368-83.
16. Ghasemi M, Roshandel E, Mohammadian M, Farhadhosseinabadi B, Akbarzadehlaleh P, Shamsasenjan K. Mesenchymal stromal cell-derived secretome-based therapy for neurodegenerative diseases: overview of clinical trials. *Stem Cell Res Ther*, 2023; 14(1): 122.
17. Yin T, Liu Y, Ji W, Zhuang J, Chen X, Gong B, et al. Engineered mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: a state-of-the-art multifunctional weapon against Alzheimer's disease. *Theranostics*, 2023; 13(4): 1264-85.
18. Ata A, Özen S. Pubertal zamanlamadaki değişkenliklerin genetik düzenlenmesi. In: Ersoy B, ed. *Puberte ve Bozuklukları*. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri, 2021: 8-14.
19. Erbaş İM, Abacı A. Pubertenin nöroendokrin kontrolü. In: Ersoy B, ed. *Puberte ve Bozuklukları*. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri, 2021: 1-7.
20. Anderson RA, Millar RP. The roles of kisspeptin and neurokinin B in GnRH pulse generation in humans, and their potential clinical application. *J Neuroendocrinol*, 2022; 34(5): e13081.
21. Özen A, Gül Sancak İ, Ceylan A, Özgenç Ö. Isolation of adipose tissue-derived stem cells. *Turk J Vet Anim Sci*, 2016; 40: 137-41.
22. Boregowda SV, Krishnappa V, Phinney DG. Isolation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol*, 2016; 1416: 205-23.
23. Huang S, Xu L, Sun Y, Wu T, Wang K, Li G. An improved protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *J Orthop Translat*, 2014; 3(1): 26-33.
24. Caplan AI. Mesenchymal stem cells: time to change the name! *Stem Cells Transl Med*, 2017; 6(6): 1445-51.
25. Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF, et al. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology*, 2004; 145(9): 4073-7.
26. Voigt C, Bennett NC. Reproductive status-dependent kisspeptin and RFamide-related peptide (Rfrp) gene expression in female Damaraland mole-rats. *J Neuroendocrinol*, 2018; 30(3): e12571.
27. Khamis T, Abdelalim AF, Abdallah SH, Saeed AA, Edress NM, Arisha AH. Early intervention with breast milk mesenchymal stem cells attenuates the development of diabetic-induced testicular dysfunction via hypothalamic Kisspeptin/Kiss1r-GnRH/GnIH system in male rats. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2020; 1866(1): 165577.
28. Voigt C, Bennett N. Reproductive status-dependent dynorphin and neurokinin B gene expression in female Damaraland mole-rats. *J Chem Neuroanat*, 2019; 102: 101705.
29. Jeon YJ, Kim J, Cho JH, Chung HM, Chae JI. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, placenta, and adipose tissue as sources of cell therapy. *J Cell Biochem*, 2016; 117(5): 1112-25.
30. Patki S, Kadam S, Chandra V, Bhone R. Human breast milk is a rich source of multipotent mesenchymal stem cells. *Hum Cell*, 2010; 23(2): 35-40.
31. Davies OG, Cooper PR, Shelton RM, Smith AJ, Scheven BA. Isolation of adipose and bone marrow mesenchymal stem cells using CD29 and CD90 modifies their capacity for osteogenic and adipogenic differentiation. *J Tissue Eng*, 2015; 6: 2041731415592356.
32. Ghorbani A, Jalali SA, Varedi M. Isolation of adipose tissue mesenchymal stem cells without tissue destruction: a non-enzymatic method. *Tissue Cell*, 2014; 46(1): 54-8.
33. Dmitrieva RI, Minullina IR, Bilibina AA, Tarasova OV, Anisimov SV, Zaritskey AY. Bone marrow- and subcutaneous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: differences and similarities. *Cell Cycle*, 2012; 11(2): 377-83.