T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

TEZ BAŞLIĞI
MENSTRUAL KANDAN İZOLE EDİLEN KÖK HÜCRELERİN METFORMİN UYGULAMASINA CEVABI VE İNFERTİLİTE İLE İLİŞKİSİ

Aslınur AKTAŞ

Danışman
Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER

MANİSA–2025

T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

MENSTRUAL KANDAN İZOLE EDİLEN KÖK HÜCRELERİN METFORMİN UYGULAMASINA CEVABI VE İNFERTİLİTE İLE İLİŞKİSİ

Aslınur AKTAŞ

Danışman

Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER

MANİSA–2025

TAAHHÜTNAME

Bu tezin Manisa Celal Bayar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalında akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını, tamamen kendi çalışmam olduğunu, her alıntıya kaynak gösterdiğimi, tezin yazımında akademik ve etik kurallara aykırı herhangi bir yapay zeka ve program kullanmadığımı beyan ederim.

Aslınur AKTAŞ

1. ÖZET

Yüksek Lisans

Aslınur AKTAŞ
Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Danışman:
Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER

İkinci Danışman:
Dr. Araş. Gör. Hilal KABADAYI ENSARİOĞLU

Giriş ve Amaç: Açıklanamayan infertilite sebebi belli olmayan, kadın veya erkeğe ait infertilite sebeplerinin tespit edilemediği bir durum olması nedeni ile günümüzde en önemli araştırma konularındandır. Diyabet hastalığı için kullanılan metforminin bu mekanizma üzerinde etkisi olduğu bilinmektedir. Çalışmada menstrual kandan izole edilen endometrial kaynaklı kök hücreler, sebebi açıklanamayan hastalar da olduğu gibi infertilite sebebini oluşturabilecek mekanizmaların çalışılabileceği bir kaynak olarak seçilmiştir. Bu doğrultuda infertil ve fertil hastalardan alınan menstrual kan örneklerinden kök hücre elde edilmesi, kültürü ve 30 gün metformin uygulaması sonrasında değişikliklerin immunositokimyasal analizlerle incelenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Fertil ve infertil hastalardan alınan menstrual kan örneklerinden kollajenaz I ve ficoll protokolleri ile kök hücreler (MenKH) elde edildi. Hücreler kültür vasatında (DMEMF12, %5 fötal sığır serumu, %1 Penisilin-streptomisin) kültüre edildikten sonra kök hücre karakterizasyonları CD34 ve CD44 indirekt immunoperkosidaz boyaması ve adipojenik, kondrojenik ve osteojenik soylara farklılaşma potansiyelleri sırasıyla Oil Red, Alcian Blue ve Alizarin Res S boyamaları ile gerçekleştirildi. Fertil ve infertil hastalardan elde edilen MenKH'lerin kontrol (grup 1 ve grup 2, sırasıyla) ve metformin uygulanan grup olarak (grup 3 ve grup 4, sırasıyla) ayrıldı. Metformin insanda kullanılan tedavi dozu (800 mg/gün) ve uygulama süresi (30 gün) dikkate alınarak uygulandı (9×10^{-7}gr/ml). Tüm gruplarda OCT2, OCT3/4, MATE1, αVβ3 integrin, MUC1, LIF ve IGF-1 dağılımları indirekt immunositokimyasal analiz ile değerlendirildi.

Bulgular: Ficoll ve kollajenaz I protokolü sonrasında kollajenaz I ile elde edilen hücrelerin kültürün 1. haftasında %85-90 konfluent olması, artan pasaj sayısında fibroblast benzeri özelliklerini koruduklarının izlenmesi üzerine MenKH'lerin eldesinde bu protokolün uygun olduğuna karar verildi. MenKH'lerde CD44 immunoreaktivitesi orta şiddette pozitif, CD34 immunoreaktivitesi ise negatif idi. MenKH'lerin 21 gün süren farklılaşmasında, Kollajenaz I protokolüyle elde edilen MenKH'lerde 7. gününde Oil Red ile pozitif boyanma saptanır iken, kondrojenik ve osteojenik farklılaşma boyamaları 14. günde az olmakla birlikte, 14. ve 21. günlerde saptandı. MATE1 immunoreaktivitesi grup 1 (fertil, kontrol) ve grup 4'de (infertil metformin uygulanan) kuvvetli (+++) şiddette pozitif iken, grup 2 (infertil, kontrol) ve

grup 3’te (fertil, metformin uygulanan) orta (++) şiddette idi. OCT-2 immunoreaktivitesi grup 1 ve grup 3’te orta (++) şiddette, grup 2 ve grup 4’te ise kuvvetli (+++) şiddette idi. OCT3/4 immunoreaktivitesi grup 1, grup 2 ve grup 4’te negatif (-) iken grup 3’te zayıf (+) şiddette idi. IGF1 immunoreaktivitesinin grup 1 ve grup 3’te negatif (-) iken grup 2’de orta (++) şiddette, grup 4’te ise zayıf (+) şiddette idi. LIF immunoreaktivitesi grup 1 ve grup 2’de negatif (-) iken, grup 3 ve grup 4’te zayıf (+) şiddette idi.

Tartışma: Kollajenaz I protokolü ile fertil ve infertil hasta örneklerinden elde edilen hücrelerin ficoll ile elde edilen hücrelere göre daha stabil ve morfolojik olarak daha tutarlı olması, MenKH elde edilmesinde uygun olan protokol olduğunu göstermektedir. MenKH’lerin hem mezenkimal kök hücre kaynağı olarak hem de infertil hastalarda kullanılan ilaç ile deneme çalışmalarında kullanılabilecek hücre kaynağı olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Menstrual kan kök hücresi, infertilite, fertilite, metformin, kollajenaz I

2025, 62 sayfa

2. ABSTRACT

M.Sc. Thesis

Aslınur AKTAŞ

Manisa Celal Bayar University
Graduate School of Education
Department of Histology And Embryology

Supervisor:
Professor Dr. H. Seda VATANSEVER

Co-Supervisor:
Dr. Hilal KABADAYI ENSARIOGLU

Introduction and Aim: Unexplained infertility is one of the most important research topics today because it is a condition in which the cause of infertility is not clear and the causes of female or male infertility cannot be determined. Metformin used for diabetes is known to have an effect on this mechanism. In this study, endometrial-derived stem cells isolated from menstrual blood were chosen as a source to study the mechanisms that may cause infertility as in patients with unexplained infertility. Accordingly, it was aimed to obtain and culture stem cells from menstrual blood samples obtained from infertile and fertile patients and to examine the changes after 30 days of metformin administration by immunocytochemical analysis.

Methods: Stem cells (MenSC) were derived from menstrual blood samples obtained from fertile and infertile patients by collagenase I and ficoll protocols. After the cells were cultured in culture medium (DMEMF12, 5% Fetal bovine serum, 1% Penicillin-streptomycin), stem cell characterization was performed by CD34 and CD44 indirect immunopercosidase staining and differentiation potential to adipogenic, chondrogenic and osteogenic lineages was performed by Oil Red, Alcian Blue and Alizarin Res S staining, respectively. MenSCs obtained from fertile and infertile patients were divided into control (group 1 and group 2, respectively) and metformin treated group (group 3 and group 4, respectively). Metformin was administered at the same therapeutic dose (800 mg/day) and duration of administration (30 days) as used in humans (9 x 10-7g/ml). OCT2, OCT3/4, MATE1, αVβ3 integrin, MUC1, LIF and IGF-1 distributions in all groups were evaluated by indirect immunocytochemical analysis.

Results: After the Ficoll and Collagenase I protocol, it was decided that Collagenase I protocol was appropriate for obtaining MenSCs since the cells obtained with collagenase I were 85-90% confluent in the 1st week of culture and maintained their fibroblast-like properties with increasing passage number. CD44 immunoreactivity was moderately positive and CD34 immunoreactivity was negative in MenSC. In the differentiation of MenSCs lasting 21 days, positive staining with Oil Red was detected on the 7th day in MenSCs obtained with Collagenase I protocol,

while chondrogenic and osteogenic differentiation staining was less on the 14th day, but was detected on the 14th and 21st days. MATE1 immunoreactivity was strongly (+++) positive in group 1 (fertile, control) and group 4 (infertile, metformin treated), while it was moderate (++) positive in group 2 (infertile, control) and group 3 (fertile, metformin treated). OCT-2 immunoreactivity was moderate (++) in group 1 and group 3 and strong (+++) in group 2 and group 4. OCT3/4 immunoreactivity was negative (-) in group 1, group 2 and group 4 and weak (+) in group 3. IGF1 immunoreactivity was negative (-) in group 1 and group 3, moderate (++) in group 2 and weak (+) in group 4. LIF immunoreactivity was negative (-) in group 1 and group 2, but weak (+) in group 3 and group 4.

Conclusion: The fact that the cells obtained from fertile and infertile patient samples with the Collagenase I protocol were more stable and morphologically more consistent than the cells obtained with ficoll indicates that it is the appropriate protocol for obtaining MenSCs. It was concluded that MenSCs can be used both as a source of mesenchymal stem cells and as a cell source that can be used in trial studies with drugs used in infertile patients.

Key words: Menstrual blood stem cell, infertility, fertility, metformin, collagenase I

2025, 62 page

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmamın her aşamasında değerli katkı ve desteğini yol göstericiliği ile esirgemeyen saygıdeğer Danışmanım Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER'e,

Çalışmam boyunca bilgi ve tecrübesiyle bana bıkmadan yol gösteren, her zaman sorularıma cevap veren değerli, Dr. Araş. Gör. Hilal KABADAYI ENSARİOĞLU'na,

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bana katkı sağlayan Manisa Celal Bayar Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalındaki Prof. M. Kemal ÖZBİLGİN, Prof. Dr. M. İbrahim TUĞLU, Prof. Dr. Elgin TURKÖZ ULUER, Doc. Dr. Erdoğan KOCAMAZ'a

Bana tecrübeleriyle destek veren Manisa Celal Bayar Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim dalındaki çalışma arkadaşlarıma,

Her zaman olduğu gibi tez aşamasında da yanımda olan ve desteğini hiç esirgemeyen babam Birol AKTAŞ ve annem Ayla AKTAŞ ve kardeşlerime,

Tez aşamasında bana destek olan arkadaşım Egemen İLHAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi 2022-068 Yüksek Lisans tez projesi ile desteklenmiştir. Katkılarından dolayı Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Aslınur AKTAŞ

Manisa, 2025

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AMPK: AMP ile Aktive Olan Protein Kinaz

BM-MKH: Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Stromal Kök Hücreleri

BMP-2: Bone Morphogenetic Protein

BSP: Osteokalsin ve Kemik Sialoprotein

COMP: Kıkırdak Oligomerik Protein

Coll1a1: Kollajen Tip A-1

EKH: Embriyonik Kök Hücreler

E2: Estradiol-17β

FGF: Fibroblastik Büyüme Faktörü

FSH: Folikül Uyarıcı Hormon

IGF1: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü

IGF-1R: IGF-1 Reseptörü

IVF: İn Vitro Fertilizasyon

NIDDM: İnsüline Bağımlı Olmayan Diabetes Mellitus

LH: Luteinleştirici Hormon

LIF: Lösemi İnhibitör Faktör

MATE1: Çoklu İlaç ve Toksin Taşıyıcısı

MenKH: Menstrual Kan Kök Hücre

MKH: Mezenkimal Kök Hücre

MIS: Müllerian İnhibitör Faktör

mTOR: Rapamisinin Protein kompleksinin Memeli Hedefi

MUC1: Musin 1

OCT: Organik KatyonTaşıyıcıları

OKH: Osterix

P4: Progesteron

PKOS: Polikistik Over Sendromu

Runx2: Runt ile İlişkili TF-2

SHH: Sonik Hedgehog

TGF: Dönüştürücü Büyüme Faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1 Östojen varlığı, testesteron ve MIS yokluğunda dişi ve erkek gelişimi 4
Şekil 1. 2 Uterus Anatomisi 5
Şekil 1.3 Uterusun histolojik tabakaları 6
Şekil 1.4 Endometrium tabakaları 8
Şekil 1.5 Mentruasyon gerçekleşirken endometrium kalınlığı 9
Şekil 1.6 Menstrual döngü sırasında hormonal, ovaryum ve endometriumda meydana gelen değişiklikler 10
Şekil 1.7 Endometrium kaynaklı kök hücre belirteçleri 16
Şekil 1.8 Metformin ile AMPK pathway arasındaki ilişki 23
Şekil 3.1 Menstrual kandan ficoll (A) ve kollajenaz I (B) yöntemi ile elde edilen Menstrual kan kök hücrelerinin kültürün 1. günü. Ölçek: 100 µm 36
Şekil 3.2 Menstrual kandan ficoll (A, B) ve kollajenaz I (C,D) ile elde edilen menstrual kan kök hücrelerinin kültürün 3. günü (A, C) ve 1. haftadaki (B, D) görüntüleri. Ölçek: 100 µm 36
Şekil 3.3 Menstrual kandan kollajenaz I protokolü ile elde edilen MenKH'lerde CD44 (A), CD34 (B) ve kontrol (C) immünositokimyasal boyama görüntüleri. Ölçek: 20 µm 37
Şekil 3.4 Menstrual kandan Ficoll protokolü ile elde edilen MenKH'lerde CD44 (A), CD34 (B) ve kontrol (C) immünositokimyasal boyama görüntüleri. Ölçek: 20 µm 38
Şekil 3.5 Fertil hasta örneğinden ficoll ile elde edilen MenKH'lerin farklılaşma protokolünün 7. Gün (A, B, C), 14. gün (D, E, F) ve 21. Gün (G, H, I) kültürü sonrası Oil Red (A, D, G), alcian blue (B, E, H) ve alizarin red S (C, F, I) boyama görüntüleri. Ölçek: 10 µm 39
Şekil 3.6 Fertil (A, C ve E) ve infertil (B, D ve F) hasta örneklerinden kollajenaz I ile elde edilen MenKH'lerin farklılaşma protokolünün 7. gün kültürü sonrası Oil Red (A, B), alcian blue (C, D) ve alizarin red S (E, F) boyama görüntüleri. Ölçek: 5 µm 40
Şekil 3.7 Fertil (A, C ve E) ve infertil (B, D ve F) hasta örneklerinden kollajenaz I ile elde edilen MenKH'lerin farklılaşma protokolünün 14. gün kültürü sonrası Oil Red (A, B), alcian blue (C, D) ve alizarin red S (E, F) boyama görüntüleri. Ölçek: 5 µm 41
Şekil 3.8 Fertil (A, C ve E) ve infertil (B, D ve F) hasta örneklerinden kollajenaz I ile elde edilen MenKH'lerin farklılaşma protokolünün 21. Gün kültürü sonrası Oil Red (A, B), Alcian Blue (C, D) ve Alizarin Red S (E, F) boyama görüntüleri. Ölçek: 5 µm 42
Şekil 3.9 Fertil hastalardan elde edilen MenKH'lerde kontrol (grup 1) ve metformin (grup 3) uygulaması sonrasında MATE1(A, B), OCT2 (C, D), OCT3/4 (E, F), IGF1 (G, H), LIF (I, J), MUC1 (K, L) ve integrin αVβ3 (M, N) ve kontrol immunohistokimya (O, P) görüntüleri. Ölçek:10 µm 46
Şekil 3.10 İnfertil hastalardan elde edilen MenKH'lerde kontrol (grup 2) ve metformin (grup 4) uygulaması sonrasında MATE1(A, B), OCT2 (C, D), OCT3/4 (E, F), IGF1 (G, H), LIF (I, J), MUC1 (K, L) ve integrin αVβ3 (M, N) ve kontrol immunohistokimya (O, P) görüntüleri. Ölçek: 10 µM 48

Şekil 3.11 Çalışma gruplarında Kruskal Wallis testi kullanılarak antikorlara ait yoğunlukların istatistiksel karşılaştırma sonuçları 49

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. Fertil hastaların klinik verileri 29
Tablo 2.2. Infertil hastaların klinik verileri 29
Tablo 2.3 MenKH'lerin 24 gözlü kültür kabında uygulama sonrası immunusitokimyasal analiz için antikor dağılımları 33
Tablo 3.1 Fertil (Grup 1 Ve Grup 3) ve infertil (Grup 2 Ve Grup 4) hastalardan elde edilen MenKH'lerde immunohistokimya analizi sonrası antikor yoğunlukları 44

İÇİNDEKİLER

1. ÖZET II
2. ABSTRACT IV
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ VII
ŞEKİLLER DİZİNİ VIII
TABLOLAR DİZİNİ X
İÇİNDEKİLER XI
GİRİŞ VE AMAÇ 1
1. GENEL BİLGİLER 3
1.1. Uterus 3
1.1.1. Uterus Gelişimi 3
1.1.2. Uterus Anotomisi 5
1.1.3. Uterus Histolojisi 6
1.1.3.1. Perimetriyum 6
1.1.3.2. Miyometrium 7
1.1.3.3. Endometrium 7
1.2. Menstrual Siklus 8
1.2.1. Menstrual Siklus Sırasında Uterus 9
1.2.1.1. Proliferasyon Fazı 10
1.2.1.2. Sekretuar Fazı 11
1.2.1.3. Mentrual Faz 11
1.2.2. Menstrual Siklus Sırasında Ovaryum 12
1.2.2.1. Foliküler Faz: 12
1.2.2.2. Ovulasyon 12
1.2.2.3. Luteal Faz 13
1.3. Kök Hücre 13
1.3.1. Mezenkimal Kök Hücre 14
1.3.2. Endometiral Kök Hücre 15
1.3.3. Menstrual Kan Kök Hücre (MenKH) 16
1.3.4. MenKH'lerin Karakterizasyonu 18
1.3.4.1. Osteojenik Farklılaşma 18
1.3.4.2. Kondrojenik Farklılaşma 19
1.3.4.3. Adipojenik Farklılaşma 20

1.4. Metformin Etki Mekanizması 20
1.5. Çalışmada Bakılması Hedeflenen Proteinler 24
1.5.1. OCT2 ve *Slc47a-1* 24
1.5.2. Çoklu İlaç ve Toksin Çıkaran Proteinler 1 (Multidrug and Toxin Extrusion Protein 1) (MATE1) 25
1.5.3. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1 (IGF1) 25
1.5.4. İntegrin αVβ3 26
1.5.5. Mucin 1 (MUC1) 26
1.5.6. Lösemi İnhibitör Faktör (LIF) 26
2. GEREÇ VE YÖNTEM 28
2.1. Çalışmaya Ait Grupların Oluşturulması 28
2.2. MenKH Eldesi ve Kültürü 30
2.3. MenKH'lerin Karakterizasyonu 30
2.4. MenKH Farklılaşması 31
2.4.1. Osteojenik Farklılaşma Protokolü 31
2.4.2. Kondrojenik Farklılaşma Protokolü 32
2.4.3. Adipojenik Farklılaşma Protokolü 32
2.5. Çalışma Grupları ve Uygulamalar 32
2.6. İstatistiksek Analiz 34
3. SONUÇLAR 35
3.1. MenKH Eldesi ve Kültürü 35
3.2. MenKH Karakterizasyonu 37
3.3. MenKH Farklılaşması 38
3.2. Çalışma Grupları ve Uygulamalar 42
4. TARTIŞMA 50
5. KAYNAKLAR 57

GİRİŞ ve AMAÇ

Açıklanamayan infertilite, anormal bulgulara rastlanmayan çiftlere verilen dışlama tanısıdır ve bildirilen prevalans %6-58 arasında değişmektedir. Endometirum, açıklanamayan infertilite de sorumlu tutulan bir dokudur. İnsan endometriumu siklik değişiklikler gösteren bir yapıya sahiptir. Bu siklik değişiklikler epitelial ve stromal hücrelerin proliferasyonu, farklılaşması, sekresyonu ve apoptozu ile kontrol edilir. Farklı erişkin dokulardan elde edilebilen mezenkimal kök hücreler hem etik problem oluşturmaması hemde kendi kendine yenileme potansiyelinin olması nedeniyle araştırmalarda en çok kullanılan kök hücre kaynağıdır. Menstrual kan kök hücreleri (MenKH) morfolojik ve işlevsel olarak doğrudan endometriumdan elde edilen hücreler olup, mezenkimal ve embriyonik hücre belirteçlerini içermesi ile diğer mezenkimal kök hücrelerden ayrılmaktadır. MenKH, in vitro ortamda çoğalması ve farklılaşması üzerine olan çalışmalar sonucunda hem çoğalma hem de farklılaşma potansiyellerinin iyi olması, menstrual kan toplanması ve hücrelerin eldesinin de etik problem oluşturmaması nedeniyle hem endometriumun değerlendirilmesi hem de farklılaşma çalışmaları için kullanılma potansiyeli olan önemli bir hücre kaynağıdır.

Metformin (dimetilbiguanid), insüline bağımlı olmayan diabetes mellitus (NIDDM) hastalarında kan glukoz düzeylerini düşürmek için kullanılan bir ilaçtır. İnsülin duyarlılığını artırır ve böylece NIDDM'de yaygın olan insülin direncini azaltır. Metforminin, NAD+, ATP ve trikarboksilik asit ara ürünlerinin yanı sıra epigenom modifikasyon enzim aktivitesini etkileyen AMPK (AMP-activated protein kinase)'nın hücresel seviyelerini etkilediği, yaşlanma karşıtı etki oluşturduğu da bilinmektedir. Metforminin endometrial kanser hücrelerinde progesteron gibi benzer etki göstererek endometrial epitel kalınlığında azalma, endometrial bez yoğunluğunda azalma ile epitelial kalınlığın normal boyutlarda kalmasını sağladığı gösterilmiştir. Böylelikle diyabet durumunda östrojene bağlı endometrial hücre proliferasyonunu azalttığı gösterilmiştir.

Metforminin hücre içine alımında OCT (Organic Cation Transporters) ailesi üyeleri rol oynarken, salınımda Mate (Multidrug and Toxin Extrusion) ailesi proteinleri rol oynadığı bilinmektedir. İnsan endometrial epitelial ve stromal hücrelerde OCT2, OCT3, MATE1 ve MATE2 ekspresyonu varken, OCT1'in sadece stromal hücrelerde eksprese edildiği gösterilmiştir. Metformin inflamasyon ile ilişkili sitokinleri, lokal östrojen sentezini ve ötopik stromal hücre proliferasyonu azalttığı için endometriotik

lezyonların kontrolünde kullanılmaktadır. Ancak metforminin endometrial kök hücreler ve menstrual kök hücreler üzerine etkisi net değildir. Metforminin mezenkimal kök hücre farklılaşmasını AMPK aktivasyonu yolu ile sağladığı hipotezi metforminin birçok kanser türünde görülen etkisi ile öne sürülmüştür. Endometriozis üzerine metforminin etkisininde de endometrial MKH üzerine olası etkilerinden dolayı olabileceği de bildirilmiştir. Metforminin *Oct4, Sox2 ve Nanog* gibi kök hücre ile ilişkili genler üzerindeki etkileri ile menstrual kandaki kök hücreler ile ilişkili olabileceği hipotezi doğrultusunda tez önerisi hazırlanmıştır.

Bu bilgiler doğrultusunda çalışmada menstrual kandan izole edilmesi planlanan MenKH'ler, sebebi açıklanamayan hastalar da olduğu gibi infertilite sebebini oluşturabilecek mekanizmaların çalışılabileceği bir kaynak olarak seçilmiştir. Bu doğrultuda infertil ve fertil hastalardan alınan menstrual kan örneklerinden kök hücre elde edilmesi, kültürü ve metformin uygulaması sonrasında değişikliklerin incelenmesi amaçlanmıştır.

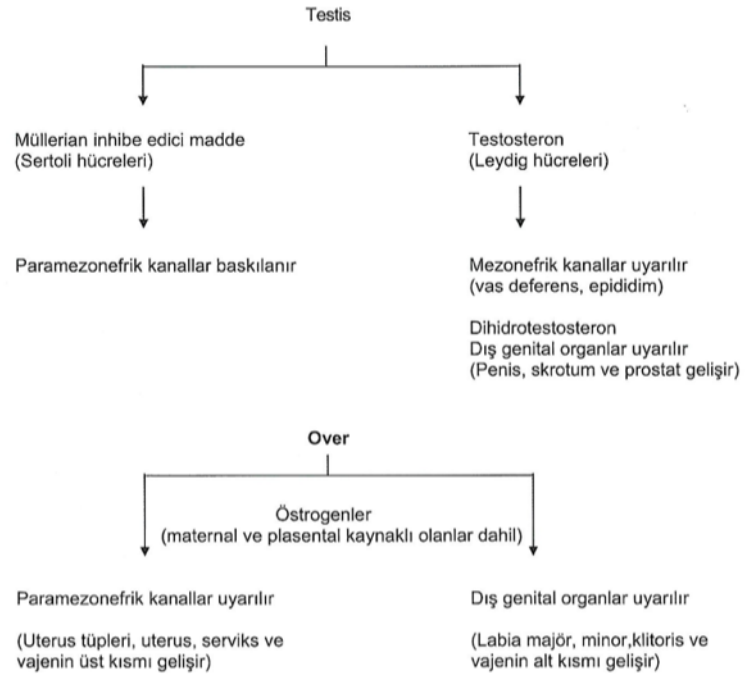
1. GENEL BİLGİLER

1.1.Uterus

1.1.1. Uterus Gelişimi

Embriyo gelişiminde 7. haftaya kadar gonadlar erkeğe veya dişiye ait morfolojik özelliklere sahip değillerdir. Primordial germ hücreleri epiblasttan köken alarak primif çizgi boyunca göç ederek üçüncü haftada yolk kesesinde, endoderm hücrelerinin arasına konumlanırlar. Dördüncü haftada son bağırsağın mezenterinde ilerler ve beşinci haftada primitif gonadlara ulaşırlar. Primordial germ hücreleri gonadlara ulaşmadan önce epitel hücrelerin altındaki mezenkim içerisine girerek düzensiz kordonlar oluştururlar (Sadler, 2018; Carlson, 2019).

Müllerian inhibitör faktör (MIS) ve testosteron salgısı dişi gonadlarda olmadığından mezonefrik duktus gerileyecek, paramezonefrik duktus ise dişi üreme sisteminini oluşturmak üzere ileri farklılaştırma gerçekleştirecektir (Şekil 1.1). Paramezonefrik duktus karın boşluğunun kranial ucuna açılır, mezonefrik duktusu önden çaprazladıktan sonra kaudomediyal yönde büyümeye devam eder. İki paramezonefrik duktus birleşerek uterus kanalını oluşturur ve duktusların kaudal ucu, ürogenital sinusun arka duvarında küçük bir şişlik oluştur. Wnt-7a, tüm paramesonefrik kanallar boyunca epitelde ifade edilir ve normal gelişimleri için gereklidir. Gelişimin ilerleyen dönemlerinde, Wnt-7a ekspresyonu uterus epiteli ile sınırlıdır. Wnt-7a, dişi üreme sistemi boyunca yayılan bir dizi *Hox* geninin (*Hoxd-10* ile *Hoxd-13* ve Hoxa paralogları) ekspresyonunun sürdürülmesinde rol oynar. Hoxa-9, uterus tüplerinde; *Hoxa-10*, uterusta; *Hoxa-11*, uterus ve servikste; ve *Hoxa-12*, üst vajinada ifade edilir (Carlson, 2019).



Şekil 1.1 Östojen varlığı, testesteron ve MIS yokluğunda dişi ve erkek gelişimi (Sadler, 2018)

Başlangıçta her paramezonefrik duktusta tanımlanabilir üç bölüm vardır:

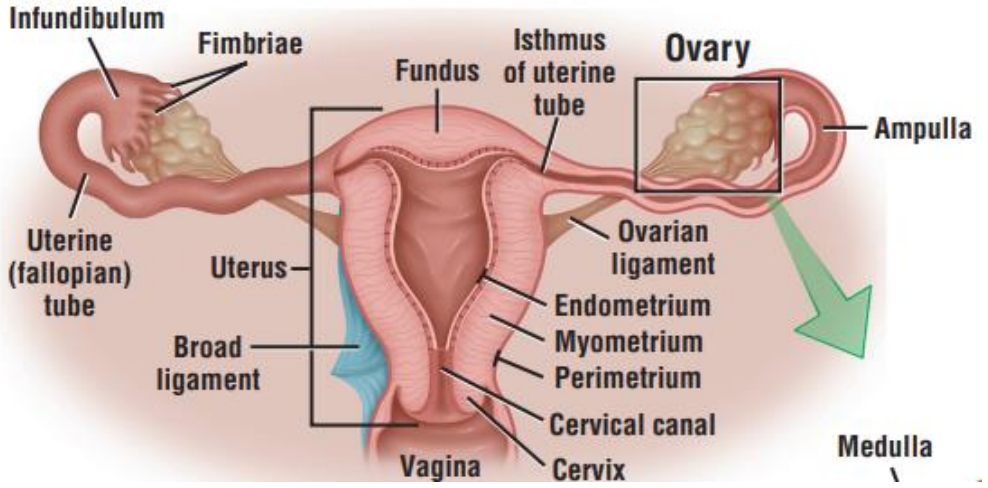
1. Karın boşluğundaki kısım
2. Mezonefrik duktusları çaprazlayan horizontal kısım
3. Karşı taraftan gelen eşiyle birleşen vertikal kısım

Overlerin aşağıya inişiyle birlikte ilk iki kısımdan uterus tüpleri gelişir. Kaudal parçalarda uterus kanalını oluşturur. Paramezonefrik duktusların ikinci kısımları mediokaudale doğru yer değiştirir ve böylece daha trans düzleme otururlar. Duktusların orta hatta birleşmesiyle, pelviste transvers katlantı oluşur. Birbiriyle kaynaşan paramezonefrik duktusların lateralinden, pelvis duvarına doğru uzanan bu katlantı uterusun broad ligamenti olarak adlandırılır. Bu yapının üst sınırında uterus tüpleri, arka sınırında ise overler bulunur. Uterusla birlikte broad ligamentler pelvisi ikiye böler ve bu bölmelere uterorektal poş ve uterovezikal poş denir. Paramezonefrik duktusların birleşmesiyle uterusun korpus, serviks ve vajinanın üst kısmı gelişir (Sadler, 2018; Carlson, 2019).

1.1.2. Uterus Anotomisi

Mentrual siklusun ve implantasyonun meydana geldiği uterus; pelviste mesane ile rektum arasında bulunan, içi boş, armut şeklinde, 7,5 cm uzunluğunda, 30-40 gram ağırlığında bir organdır (Şekil 1.2). Uterus anatomik olarak ikiye ayrılır: korpus uteri ve serviks uteri (Ross ve ark., 2016; Yalçın, 2015). Korpus uteri, uterusun büyük üst kısmıdır. Anterior yüzeyi neredeyse düzken, posterior yüzeyi konvekstir. Gövdenin tuba uterina bağlantısının üstünde genişleyen yuvarlak parçasına korpus fundus adı verilir (Ross ve ark., 2016).

Korpus uteri ile fundus uteri arasında üç adet oluşum bulunur: tuba uterina, ligamentum teres uteri ve ligamentum ovari proprium (Yalçın, 2015). Serviks, uterusun alttaki silindir biçimli kısmıdır ve istmus tarafından uterus gövdesinden ayrılmaktadır (Ross ve ark., 2016). Uterusun 1/3' ünü oluşturur ve 2 cm'dir. Servikal kanal denilen lümeni her iki ucunda dar açıklıklara sahiptir. İnternal os uterin kaviteye açılır iken eksternal os vajinaya açılır. Vajinanın üstünde kalan bölümüne portio supervaginalis, vajinanın içerisinde kalan kısmına portio vaginalis denmektedir. Vajinanın üst kısmı, portio vaginalisi kuşatır. Böylece uterus ile vajina arasında fornix vajina yapısı oluşur, burası spermiumların atıldığı yerdir. Corpus uterinin iç boşluğuna cavitas uteri denir ve ortalama 6,5 cm'dir. (Ross ve ark., 2016; Yalçın, 2015).

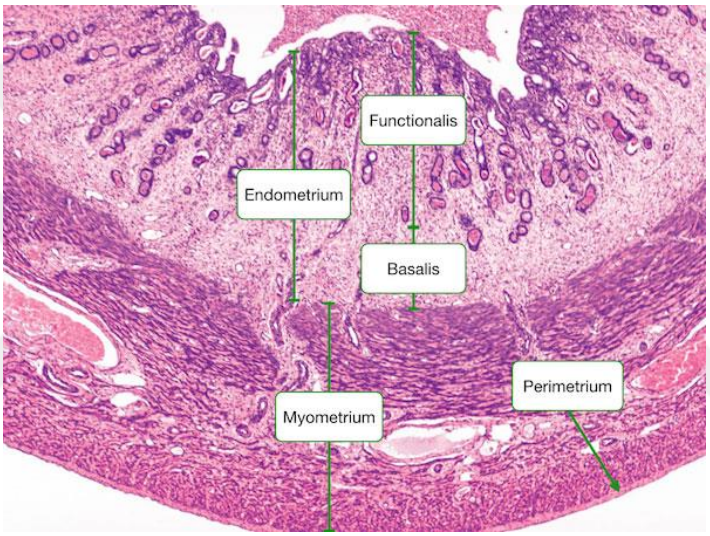


Şekil 1. 2 Uterus Anatomisi (Eroschenko, 2013).

1.1.3. Uterus Histolojisi

Uterusun duvarı histolojik olarak üç tabakadan oluşmaktadır (Şekil 1.3). Ayrıca uterusu örten peritondan meydana gelen tunika seroza yapısı vardır. Bu tabakalar dıştan lümene doğru (Ross ve ark., 2016; Yalçın, 2015):

1. Perimetriyum (tunika seroza)
2. Miyometrium (tunika muskularis)
3. Endometrium (tunika mukoza)



Şekil 1.3 Uterusun histolojik tabakaları.
(https://medcell.org/histology/female_genital_tract_uterine_cycle.php. Erişim tarihi 03.12.24).

1.1.3.1. Perimetriyum

Perimetriyum uterusu kaplayan visseral periton ve dış seröz tabaka olarak adlandırılır. İnce gevşek bir bağ dokudan ve mezotelyumdan meydana gelir. (Ross ve ark., 2016; Junqueira, 2006). Pelvik ve abdominal periton ile devam eder. Elastik doku tabakası mezotelyumun altında belirgindir. Perimetriyum anterior yüzün bir kısmını kaplarken posterior yüzeyin tamamını kaplar. Anterior bölgenin geri kalan kısmı ise adventisya ya da bağ dokusu ile kaplıdır (Ross ve ark., 2016).

1.1.3.2. Miyometrium

Uterus duvarının en kalın kas tabakası olan miyometrium düz kas liflerinden oluşur, vajinanın ve tuba uterinanın kas tabakası ile devamlılık gösterir. Miyometrium üç düz kas tabakasından oluşur: Stratum vaskulare adını alan orta kas tabakası en kalın tabakadır ve çok sayıda kan damarları ve lenfatikler içerir. İç ve dış tabakalar da ise düz kas demetleri uterusa paralel şekilde yapılanır. Rutin histolojik kesitlerde görülen kas demetleri rastgele dizilmiş gibi görünürler (Ross ve ark., 2016). Uterusun kontraksiyonu sırasında miyometriumun bütün tabakaları birlikte çalışır (Ross ve ark., 2016; Junqueira, 2006). Gebe olmayan uterus düz kas hücreleri ortalama 50 nm uzunluğundadır, ama gebelik sırasında uterusta genişleme olur. Bu büyüme birincil olarak düz kas hücrelerinin hipertrofisi ile sağlanır. Ayrıca mezenkimal hücrelerin farklılaşması ve var olan hücrelerin çoğalmasıyla da kas lifi oluşur, böylece bağ doku miktarı da artar ve uterusta genişleme meydana gelir (Ross ve ark., 2016).

Uterusu implantasyona hazır hale getirmek için hem miyometrium hem de endometirum her ay mentrual siklus değişikliklerine uğrar ve bu değişiklikler sırasında kas tabakasının kalınlığı da değişir. Eğer embriyo implante olursa siklus durur. Her iki tabaka da gebelik sırasında gelişime ve büyümeye uğrar (Ross ve ark., 2016; Junqueira, 2006).

Serviks uterusun gövdesine göre daha az düz kas daha çok bağ dokusu içerir. Elastik lifler uterus gövdesinde sadece miyometriumda bulunurken servikste bol miktarda elastik lif bulunur (Ross ve ark., 2016; Junqueira, 2006).

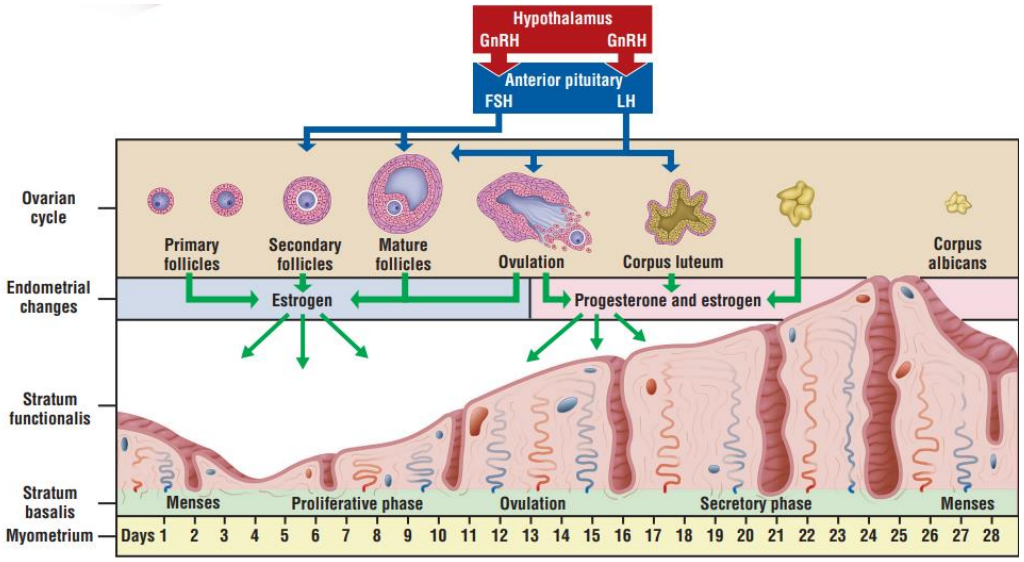
1.1.3.3. Endometrium

Endometrium, soluk kırmızı, ortalama 5 mm kalınlığında ve mukoza yapısındadır. Fötusun yerleştiği uterusun en iç tabakasıdır (Ross ve ark., 2016; Yalçın, 2015). Endometrium, çok sayıda kan damarı içeren ince interstisyel bağ dokusu şeritleriyle ayrılmış kompakt düz kas demetlerinden oluşan miyometriumun üzerinde yer alır. Kas demetleri çapraz, oblik ve uzunlamasına kesitlerde görülür (Ross ve ark., 2016; Junqueira, 2006).

Endometrium fonksiyonel olarak iki tabakadan oluşur:

1. Stratum fonksiyonale; mentruasyon sırasında dökülen endometriumun en kalın parçasıdır.

2. Stratum bazale; stratum fonksiyonale ya da fonksiyonel tabakanın rejenerasyonu için kaynak görevi görür. Menstrual kanama sırasında korunur. Bazalis tabakasının altında, hem longitudinal hem de transvers düzlemlerde kesilmiş düz kas demetleri ve kan damarları içeren miyometrium bulunur (Ross ve ark., 2016; Junqueira, 2006) (Şekil 1.4).



Şekil 1.4 Endometrium tabakaları (Junqueira, 2017).

Endometrium, tek katlı silyumlu prizmatik epitel hücreleri ve salgı hücrelerini içerir (Ross ve ark., 2016; Yalçın, 2015). Yüzey epiteli uterus bezlerini oluşturmak için lamina propria tabakasının içine doğru invajine olur ve oluşan silyumlu hücreler endometriumun derin kısımlarına doğru dallanır (Ross ve ark., 2016; Yalçın, 2015). Lamina propria kalın bir bağ doku tabakasıdır ve kollajen tip III' ten oluşan bağ doku liflerini içerir (Ross ve ark., 2016).

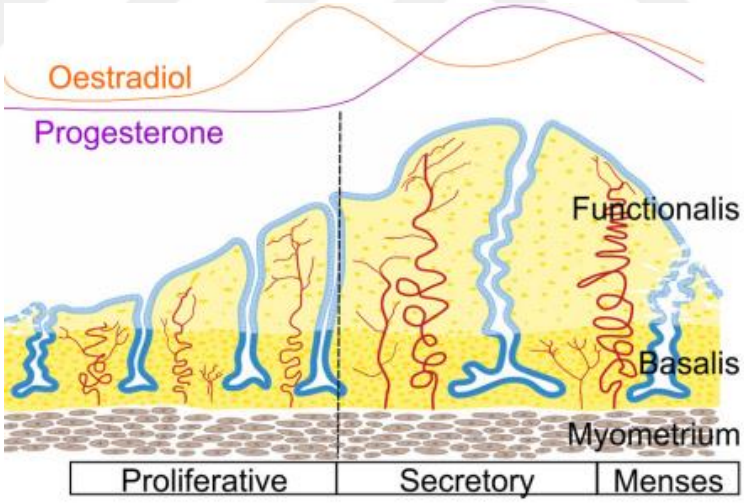
1.2. Menstrual Siklus

Endometrium, gelişen over folikülleri tarafından salgılanan östrojen seviyelerinin artması sonucunda proliferatif faz sırasında gelişmeye devam eder (Ross ve ark., 2016; Yalçın, 2015). Endometriumun kalınlığı artıkça kıvrımlı segmentte gerilir. Menstruasyondan önce düz ve kıvrımlı segmentin ayrıldığı noktadan başlayan kontraksiyonlar kan akımını azaltır ve böylece fonksiyonel tabaka dökülür (Ross ve ark., 2016; Junqueira, 2006). Endometriumun damar ağı her menstrual siklusta

prolifere ve dejenere olmaktadır. Uterin arterden miyometriyumda anastomoz yapan 6-10 arkuat arter çıkar. Radial arterler endometriumun bazal tabakasına girerler. Böylece endometriumu besleyen küçük düz arterleri oluştururlar. Radial arterin ana kolu yukarı doğru devam ederek sarmal hale gelir. Bu nedenle bu artere spiral arter denmektedir. Kapiller yatak, ince duvarlı lakünalar içermektedir. Menstrual siklus sırasında düz arterler ve spiral arterlerin proksimal parçalarında dönüşme olmaz. Östrojenin ve progesteronun etkisi altında spiral arterlerin distal parçaları ise menstrual siklusta dejenerasyona ve rejenerasyona uğrar (Ross ve ark., 2016).

Her siklisun sonunda endometriumda bölgesel dökülmeyle birlikte 3-5 gün süren menstruasyon ya da menstrual kanama olarak adlandırılan vajinadan boşaltılan kanama olur (Ross ve ark., 2016). Menstruasyon gerçekleşirken endometrium kalınlığı değişir (1-6 mm) (Yalçın, 2015) (Şekil 1.5).

Ovulasyon olmadığında korpus luteum oluşmaz ve progesteron üretilmez. Progesteron yokluğunda, endometrium sektretuar faza geçmez ve menstruasyona kadar proliferasyon fazında kalır (Ross ve ark., 2016).

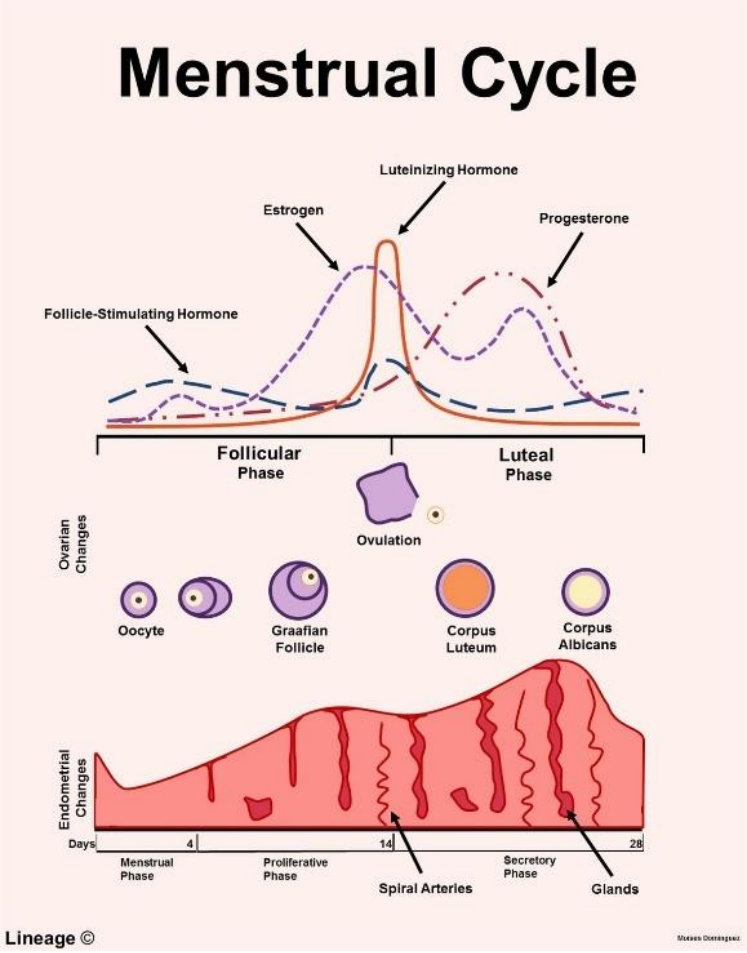


Şekil 1.5 Mentruasyon gerçekleşirken endometrium kalınlığı (Bozorgmehr ve ark., 2020).

1.2.1. Menstrual Siklus Sırasında Uterus

Menstrual siklus, endometriumun stratum fonksiyonalis tabakasındaki gelişimsel evrelerin puberteden menopoza kadar arka arkaya devam etmesiyle

meydana gelen süreçtir (Ross ve ark., 2016; Yalçın, 2015). Ovaryumun steroid salgılarını düzenleyen gonadotropinler tarafından kontrol edilmektedir (Ross ve ark., 2016). Siklus 28 günde bir tekrar eder ve bu sırada endometrium ardışık morfolojik ve fonksiyonel değişikliklerden geçer (Ross ve ark., 2016; Yalçın, 2015). Siklus üç ardışık fazdan oluşmaktadır (Şekil 1.6).



Şekil 1.6 Menstrual döngü sırasında hormonal, ovaryum ve endometriumda meydana gelen değişiklikler (https://jethrojeff.com/ 02.12.2024), Erişim Tarihi 03.12.24).

1.2.1.1.Proliferasyon Fazı

Foliküler maturasyon ile aynı anda, 5-14 günler arasında gerçekleşir (Ross ve ark., 2016). Menstrual siklusun proliferasyon fazında meydana gelen değişiklikler östrojenler tarafından düzenlenmektedir (Ross ve ark., 2016; Yalçın, 2015). Bezlerin bazal bölgelerindeki epitelyal hücreler bezleri yeniden yapılandırır. Stromal hücreler

prolifere olurlar ve kollajen ile ara madde salgılarlar. Proliferatif fazda, uterus bezleri endometriumun süperfisiyal kısmında genellikle düzdür ancak miyometriyuma yakın daha derin bölgelerde dallanma gösterebilir (Gürel, 2007). Endometrium yeniden oluşurken spiral arterler uzar. Sonuç olarak endometrium çok sayıda kan damarı içeren interstisyel bağ doku iplikleriyle miyometriumun üzerinde bulunmuş olur. Bu arterler hafifçe sarmallaşır ve endometriumun üst üçte birlik kısmına uzanırlar. Proliferasyon fazı ovulasyondan 1 gün sonrasına kadar devam eder. Süreç sonunda endometrium kalınlığı yaklaşık 3 mm ulaşmış olur. Bezler neredeyse düz olsalarda hafif dalgalı görünüme sahiptirler. Epitelyal hücrelerin bazal kısımlarında glikojen birikimleri olur (Yalçın, 2015).

1.2.1.2.Sekretuar Fazı

Menstrual siklusun sekretuar fazı ovulasyonda 1-2 gün sonra stratum fonksiyonaliste progesteron tarafından düzenlenmektedir (Ross ve ark., 2016; Yalçın, 2015). Endometrium ödemli hale gelir ve sonunda yaklaşık 5 mm kalınlığına ulaşır (Ross ve ark., 2016). Bezler büyür ve lümenleri salgı ürünleri ile dolduğu için kesecikli hale gelir. Bez epiteli tarafından üretilen mukoid sıvı implantasyonu destekler (Ross ve ark., 2016; Yalçın, 2015). Endometrium bu aşamada en kalın durumdadır (Eşrefoğlu, 2009). Spiral arterler uzarlar ve daha fazla sarmal hale gelirler. Hemen hemen endometriumun yüzeyine kadar uzanırlar (Ross ve ark., 2016).

Sekretuar dönemde endometirumda üç farklı gölge görülür:

- Kompakt tabaka: Yüzeye yakın ince bölüm.
- Spongiyoz tabaka: Lamina propriya ile sarılı, ödemli bölgedir.
- Bazal tabaka: Siklik değişime en az uğrayan bölümdür ve menstruasyon sırasında atılmaz.

1.2.1.3. Mentrual Faz

Menstrual faz, ovaryumdan progesteron ve östrojen salgılanmasının azalmasının sonucudur. Fertilizasyon gerçekleşmezse korpus luteum aktif olarak hormon üretir. Bezlerin salgılanması sona erer, stromadaki ödemin azalması ile birlikte endometrium büzüşür ve 2 gün sonra, uzun süreli arteriyal kontraksiyon ve kısa süreli kan akımı nedeniyle yüzey epitelinde bozulma meydana gelir (Ross ve ark., 2016;

Yalçın, 2015). Endometriumdan doku yamalar halinde ayrıldıkça venlerin, arterlerin ve bezlerin kopmuş uçları ortaya çıkar. Bu durum sadece stratum bazale kalana kadar devam eder. Menstrual kanama periyodunda kanın pıhtılaşması inhibe edilir. Menstrual kanama periyodu normalde yaklaşık 5 gün sürer ve bu süreçte ortalama 35-50 ml kan kaybedilir. Fertilizasyon gerçekleşmemiş ise, kanamanın durması, yeni ovaryum foliküllerinin büyümesine ve olgunlaşmasına eşlik eder (Ross ve ark., 2016).

1.2.2. Menstrual Siklus Sırasında Ovaryum

Ovaryum döngüsü; puberte ile başlar, hipotalamus tarafından kontrol edilerek düzenlenir. Hipotalamus tarafından salınan GnRH hipofiz ön lobuna etki ederek gonadotropin salgılanmasını uyarır. LH ve FSH salınımını düzenler (Gürel, 2007) (Şekil 1.6). Döngü 3 fazda incelenir:

1.2.2.1. Foliküler Faz:

Döngünün ilk yarısını oluşturur. FSH ve LH etkisi altında gelişir. Her siklusun ilk 13. Gününde 20-50 arasında primordial folikül gelişip büyür. Bu gelişimi FSH düzenler. Böylece primer folikül oluşur. Daha sonra primer folikül sekonder foliküle, o da tersiyer/graaf folikülüne dönüşür. Bu sırada, primer oosit, birinci mayoz bölünmeyi tamamlar ve sekonder oosit haline gelir (Ross ve ark., 2016; Yalçın, 2015; Gürel, 2007). Gelişen folikülden, östrojen hormonu üreten teka hücreleri meydana gelir. Östrojen hormonu, endometriumun kalınlaşmasına neden olarak proliferatif faz adı verilen hazırlık evresini başlatır. Aynı zamanda östrojen, hipofiz bezini LH salgılaması için uyarır. Östrojenin büyük kısmı teka interna hücreleri ve granüloza hücrelerinden salgılanır (Ross ve ark., 2016).

1.2.2.2. Ovulasyon

Ovulasyonun tetiklenebilmesi için östrojen artışını FSH inhibe eder ve ani LH yükselişi olur ve bu 14. günde gerçekleşir. Graaf folikülün çatlaması ile sekonder oosit granüloza hücreleriyle birlikte serbest kalır (Gürel, 2007). Bu olaya ovulasyon denir. Serbest kalan ovum, tuba uterinanın fimbriaları vasıtasıyla yakalanır (Ross ve ark., 2016). Graaf folikülü yerini korpus luteuma bırakır (Gürel, 2007; Hayes ve ark., 2006).

1.2.2.3. Luteal Faz

Döngünün 15-28. günleri arasında gerçekleşir. LH, teka lutein hücrelerinde östrojen ve granuloza lutein hücrelerinden de progesteron salgılanmasını düzenler. Ovulasyon sonrasında, çatlamış follikülden geriye kalan teka interna ve granüloza hücreleri büyür ve lipit açısından zenginleşir. Bu yapıya korpus luteum denir. Korpus luteum, başlıca progesteron, östrojen ve inhibin hormonlarını salgılar. Bu hormonlar, uterusun döllenmiş bir yumurtayı tutmaya hazır hale gelmesini sağlar. Korpus luteum, yumurtlamadan yaklaşık 10 gün sonra tam gelişir. Eğer döllenme sağlanırsa, korpus luteum gebelik korpus luteumu olarak işlevini görür ve plasenta oluşana kadar hormon salgılar. Döllenme gerçekleşmezse, korpus luteum zamanla işlevsiz hale gelir. Ovulasyondan sonra sekonder oosit, ikinci mayoz bölünmenin metafaz evresinde durur. İkinci mayoz bölünme sadece bir sperm tarafından döllenirse tamamlanır (Ross ve ark., 2016; Gürel, 2007). Fertilizasyon gerçekleşmez ise korpus luteum denejenere olur ve korpus albikans' a dönüşür (Gürel, 2007; Hayes ve ark., 2006).

1.3.Kök Hücre

Kök hücreler özelleşmiş hücrelere dönüşebilme yeteneği olan, sınırsız çoğalma kapasitesine sahip öncü hücrelerdir. (Hayes ve ark., 2006; Ono ve ark., 2008; Ay, 2012). Hücreler, hücre bölünmesi sonucunda meydana gelen telomer kısalması nedeniyle Hayflick sınırı olarak adlandırılan yaşlanmadan önce 50-60 kez çoğalabilir; buna karşılık kök hücreler, yaşlanmaya girmeden kendilerini daha birçok kez yenileyebilmelerini sağlayan yüksek telomeraz seviyelerine sahiptir (Roobrouck ve ark., 2008; Karadaş, 2011).

Kök hücrelerin gelişim potansiyeline göre totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent olarak tanımlanır. Kök hücreler kökenlerine göre ise iki ana gruba ayrılırlar: embriyonik/fetal kök hücreler ve yetişkin kök hücreler (Ay, 2012; Can, 2014).

Embriyonik kök hücreler (EKH'ler), blastosistin iç hücre kütlesinden türetilen pluripotent kök hücrelerdir. EKH'lerin uzun vadeli çoğalma potansiyeli, kendini yenileme kapasitesi vardır ve birden çok hücre tipine farklılaşma yetenekleriyle ayırt edilirler. Ancak etik tartışmalar, EKH'lerin izolasyonu ve klinik kullanımı konusunda

engel çıkarmaktadır (Chen ve ark., 2019a; Chen ve ark., 2019b). EKH'ler, *Oct3/4* ve *Sox2* gibi pluripotensi genlerini ifade ederler (Ludwig ve ark., 2006).

Yetişkin kök hücreler (stromal kök hücreler) erken embriyo gelişimini tamamlamış organizmalarda bulunan kök hücreleridir. Yetişkin kök hücreler, differansiye olmuş dokuda ayrışmamış halde bulunurlar ve kendini yenileyip köken aldığı organın spesifik hücresine dönüşebilirler. Bu şekilde kök hücre havuzunun yenilenmesini ve sürdürülebilmesini garanti altına alırlar. En çok çalışılan yetişkin kök hücreler hematopoetik kök hücreler ve mezenkimal kök hücrelerdir (Can, 2014; Ay, 2012).

Diğer yetişkin kök hücre türleri mezenkimal, nöral, epidermal, korneal, endotelyal, bağırsak, karaciğer, uterus ve pankreatik kök hücrelerdir. Embriyonik kök hücrelere göre daha az tümörojenik olmaları ve farklı dokulardan elde edilmelerinin mümkün olması nedeniyle yetişkin kök hücreleri rejeneratif tıpta önem kazanmaktadır (Karadaş, 2011).

1.3.1. Mezenkimal Kök Hücre

Mezenkimal kök hücre (MKH)'ler kemik iliği, yağ dokusu, dental pulpa, adet kanı, sinovial sıvı vb. gibi farklı dokulardan elde edilebilen, kendini yenileme yeteneğine ve farklılaşma potansiyeline sahip multipotent özellikteki kök hücre tipidir (Karadaş, 2011; Can, 2014; Chen ve ark., 2019a; Khanmohammad ve ark., 2012; Uzieliene, ve ark., 2018).

MKH'nin elde edilmesi ve tanımlanması, bazı yüzey belirteçlerinin varlığı veya yokluğu, plastik kültür yüzeylerine yapışarak büyümesi/çoğalması ve in vitro ortamda en az üç soya (osteojenik, kondrojenik, adipojenik) farklılaşması altın standart olarak kabul edilmektedir (Can, 2014).

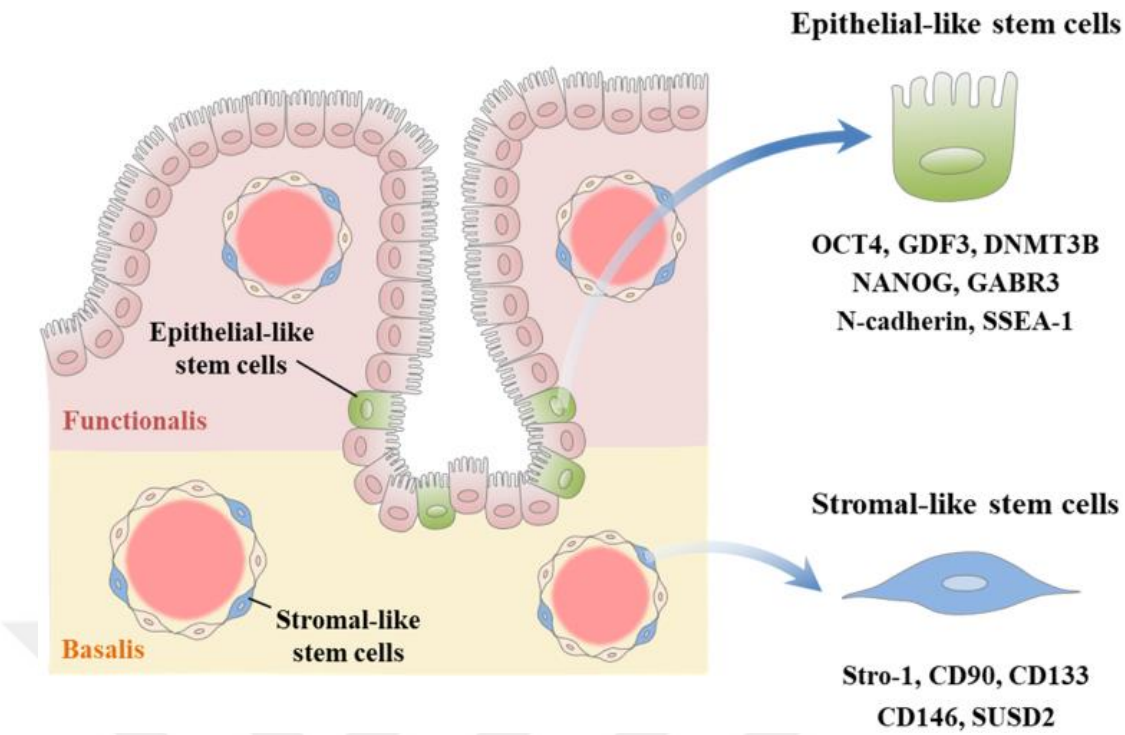
MKH'ler yaklaşık 30-70 kez bölünme geçirebilirler. Heterojen görünümün ilk bulgusu kültür ortamındaki hücre kolonilerinin fenotipinde, çoğalma hızında, in vitro farklılaşma yetilerinde ve in vitro olarak ektopik nakillerde ortaya çıkar (Can, 2014). Tek bir hücreden elde edilen klonlar arasında farklı derecelerde multipotensi ve in vitro çoğalma derecesi saptanırken kısa zaman içerisinde bu özelliklerini yitirirler. Bu bulgular vücut dışına alınıp çoğaltılan hücrelerin öncü ve kök hücrenin bir karışımı olduğunu göstermektedir. Öte yandan fötal dönemde gelişip postnatal dönemde elde edilen dokulardan türetilen MKH'nin koloni morfolojisi, farklılaşma potansiyeli ve

gen ifadesi oldukça farklıdır. MKH'ler hasarlı dokuları onarma ve yenileme potansiyellerinin yanı sıra, embriyonik kök hücrelerin aksine terotom riski oluşturmaması ve etik sorunlar taşımaması rejeneratif tıpta ve araştırmalarda onu daha cazip kılmaktadır (Can, 2014; Ay, 2012).

1.3.2. Endometiral Kök Hücre

İnsan endometriumu uterusun mukoza tabakasına karşılık gelmekle birlikte farklı yapılara ve işlevlere sahip fonksiyonalis ve bazalis tabakalarından oluşmaktadır. Fonksiyonalis tabakası endometriumun üst üçte ikilik bölümünü oluştururken bazalis tabakası üçte birlik bölümden meydana gelir. Her menstrual döngü sırasında fonksiyonalis tabakası dökülür ve hemen ardından yeniden oluşturulur. Bazalis tabakası ise bir değişikliğe uğramaz. Menstrual döngü sırasındaki bu döngüsel çoğalma ve yenilenme endometriumda bulunan yerleşik yetişkin kök hücre popülasyonu tarafından gerçekleştiği Prianishnikov tarafından 1978 yılında öne sürülmüştür (Prianishnikov, 1978; Hong, 2023). Son yıllarda endometriuma ait klonojenik epitelyal ve stromal kök hücreler tanımlanmıştır. Başlangıçta endometriyal kök hücrelerin sadece bazalis bölgesinde var olduğu düşünülürken son yapılan çalışmalar kök hücrelerin hem fonksiyonalis hem de bazalis bölgesinde olduğunu ortaya koymuştur (Leyendecker ve ark., 2002). Endometriyal kök hücrelerin kökeni hakkında bir diğer görüş ise dolaşımdaki kemik iliği kaynaklı kök hücrelerinde burada kaynak olabileceğine yöneliktir (Hong, 2023).

İnsan endometriumunda üç farklı kök hücre bulunmaktadır: epitelial kök hücreler, mezenkimal kök hücreler ve endotelial kök hücreler. Bu kök hücreler, spesifik yüzey belirteçlerinin varlığına ve farklılaşma potansiyellerine göre tanımlanmaktadır (Cordeiro ve ark., 2022). Bu belirteçler epitelial kök hücreler için OCT4, GDF3, DNMT3B, NANOG, GABR3 mezenkimal kök hücreler için CD44, CD90, CD133, CD146, Stro-1, SUSD2 ve endotelial kök hücreler için CD146 ‘dır. Stro-1, CD90, CD133, CD 146 ce SUSD2 stromada, OCT4, GDF3, DNMT3B, NANOG, GABR3 ise epiteldedir (Hong, 2023) (Şekil 1.7).



Şekil 1.7 Endometrium kaynaklı kök hücre belirteçleri (Hong, 2023).

Bazalis tabakasının endometriumda rejenerasyonundan sorumlu olduğu bilinmektedir (Yalçın, 2015; He, 2007). Endometrium kök hücrelerin tanımlanmasında sergilemesi gereken özellikler; proliferatif potansiyeli, koloni oluşturma ve bir ya da daha fazla soy hattına farklılaşma kapasitesidir. Kadın üreme sistemindeki rejenerasyon ve yeniden şekillenme, artan deneysel kanıtlarla desteklenen endometriyal ve miyometriyal kök hücre sistemlerinin varlığına işaret etmektedir. Endometriyal kök hücreler mezenkimal kaynaklı kök hücrelerden, adipositlere, düz kas hücrelerine, kondrositlere ve osteoblastlara farklılaşır (He, 2007). Bu kök hücrelerin karakterizasyonu ve rejenerasyonlarını kontrol eden mekanizmaların incelenmesi, kadın üreme sisteminin fizyolojisi ve patofizyolojisinin anlaşılması için veri sağlayabilir. (Hayes ve ark., 2006).

1.3.3. Menstrual Kan Kök Hücre (MenKH)

Menstrual kan kök hücre (MenKH)'ler ilk olarak endometrial rejeneratif hücreler olarak tanımlanmışlardır. MenKH ilk kez 2007 yılında endometriumun fonksiyonalis tabakasının menstruasyon sırasında dökülen parçalarınında bulunduğu menstrual kandan elde edilen yetişkin kök hücrelerdir (Meng ve ark., 2007; Chen, ve

ark., 2019). MenKH'ler CD44, CD73, CD90, SSEA-4, OCT-4 vb. belirteçler için pozitif, CD34, STRO-1, SSEA-4 ve NANOG için negatiftir (Karadaş, 2011; Chen ve ark., 2019). MenKH hücrelerinin, invaziv olmayan ve kolay elde yöntemi, yüksek çoğalma potansiyelleri, pluripotensi ve düşük immunojenite özellikleri ile etik sorunların olmaması nedeniyle rejeneratif tıpta kullanım potansiyelini arttırmaktadır (Can, 2014; Uzieiene ve ark., 2018; Chen ve ark., 2019). Menstrual kandan elde edilen MKH'ler kök hücre temelli tedavi için yeni ve kolay erişilebilir bir kaynak olma potansiyeline sahip olabilir (Chen ve ark., 2019). MenKH'ler ayrıca hem bağışıklık hem de stromal hücrelerden sitokin üretimini düzenler. MenKH, birçok bağışıklık sistemi hücresiyle etkileşime girer, hücresel ve humoral bağışıklıkların düzenlenmesine katılır. MenKH tarafından MHC-I'in ifade edilmesi, MenKH'nin immünomodülasyon yeteneğini ortaya koymaktadır. MenKH'ler proinflamatuar sitokinlerin (örn. TNF-α ve IFN-γ) salgılanmasını azaltırken, antiinflamatuar sitokinlerin (örn. IL-10 ve TGF-β) salınımını teşvik ederler. Bu özellikleri sayesinde doku onarımı için daha uygun bir ortam yaratır (Chen ve ark., 2019). Bağışıklık sistemi tarafından reddedilmediği için de allojenik hücre kaynağı olarak kullanılması kadınların ileri hastalık tedavileri için umut vericidir (Karadaş, 2011).

Bu tür kök hücreler uzun süreli kendi kendini çoğaltabilir; ektodermal ve endodermal kökenli hücrelere farklılaşabilir. MenKH'ler kemik iliği kaynaklı mezenkimal stromal kök hücrelerine (BM-MKH) kıyasla daha fazla farklılaşma potansiyeline sahiptir (Uzieiene ve ark., 2018). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, uygun kültür koşulları sağlandığında MenKH'lerin her 20 saatte iki katına çıkabildiği, bunun da kemik iliği MKH'lerinin iki katına çıkma süresinin yaklaşık iki katı kadar hızlı olduğu bildirilmiştir (Cordeiro ve ark., 2022). MenKH'ler 25-40 pasaja kadar çoğalma kapasitesine sahiptir. MenKH'lerin telomeraz aktivitesindeki farklılıklar bu yüksek oranda çoğalma özelliğini kısmen açıklayabilir. MenKH'ler, iğ benzeri morfolojiye sahip olmaları, klasik üç soylu farklılaşma ve yüzey belirteçleri ile BM-MKH'lere benzerlik göstermektedir (Cordeiro ve ark., 2022; Men ve ark., 2007; Chen ve ark., 2019b; Cui ve ark., 2007; Hida ve ark., 2008). Bunun yanında MenKH'ler in vitro olarak incelendiklerinde birçok çalışma tarafından neredeyse hiçbir belirgin kromozomal anormalliğin olmadığı gösterilmiştir. Böylesine yüksek oranda çoğalma oranı ve stabil genetik özelliği ve belirgin pluripotensi özelliği, bu hücrelerin yeni kök hücre kaynağı olarak kullanılmasını desteklemektedir (Cordeiro ve ark., 2022).

Yapılan çalışmalar ile MenKH'lerin uygun farklılaşma teknikleri kullanılarak adipojenik, osteojenik, kardiyomiyositik nöronal soyların yanı sıra solunum epitelyal, endotelyal, hepatik, germ benzeri ve pankreas hücrelerine farklılaşabildiği gösterilmiştir. Ek olarak MenKH'lerin ovaryum dokusu benzeri hücrelere farklılaşabileceği de ortaya konulmuştur (Meng ve ark., 2007; Khoury ve ark., 2014).

MenKH'lerin terapötik potansiyeli, immünomodülasyon özellikleri, endojen hücresel onarım veya rejenerasyonu teşvik eden parakrin etkilerine dayanarak incelenmiştir. MenKH'ler MKH'lere benzer şekilde hücre-doku entegrasyonu gerçekleştirir ve bu süreçte bir hücre farklılaşması geçirmezler. Ayrıca, yapılan in vivo çalışmalar ile MenKH'nin farelerde anti-inflamatuar ve immünomodülatör etkileriyle karaciğeri akut hasardan koruyabileceğini göstermiştir (Chen ve ark., 2019; Sanchez-Mata ve ark., 2021; Nikoo ve ark., 2014).

1.3.4. MenKH'lerin Karakterizasyonu

MKH'nin multipotent tanımına sahip olabilmesi için hücrelerin *in vitro* ortamda en az üç farklı hücre serisine farklılaşması gereklidir. Bu durum hücrelerin pluripotensi yetkinliğini ortaya koyar. Bu sebeple MKH'yi tanımlarken yüzey belirteçlerinin yanı sıra farklılaşma yetenekleri de kriter olmalıdır (Can, 2014).

1.3.4.1.Osteojenik Farklılaşma

Osteojenik farklılaşmada MKH'lerin fibroblast benzeri morfolojilerini dönüşüme uğrayarak kübik şekil alırlar. Hücreler arası matriks elemanlarından özellikle tip 1 kollajeni sentezlerler. Matriksin oluşum kriteri olan yer yer yoğun ve nodüler görünümlü Alizarin red ve Von Kossa ile boyanan özellikleri ile kemikleşme analiz edilir. Osteojenik farklılaşma moleküler düzeyde birtakım faktörlerin birbiri arasındaki etkileşimi ile gerçekleşir. Runt ile ilişkili TF-2 (Runx2) promotör bölgelerine bağlanarak kemiğe ilişkin genlerin ifadesini artırır. Bunlar osterix (OKH), kollajen tip a-1 (Coll1a1), osteokalsin ve kemik sialoprotein (BSP)'dir. Genellikle Runx-2, AF, kollajen1a1, dönüştürücü büyüme faktörü (TGF)ß1, osteonektin ve kemik morfojenik protein (BMP)-2 osteoblastik farklılaşmanın erken belirteçleri olarak kabul edilirken, osteonektin ve osteopontin daha ileri süreçlerde de ifade edilir (Can, 2014).

1.3.4.2.Kondrojenik Farklılaşma

In vitro kondrojenik farklılaşmada iki prensip vardır; i) sıkı bir hücre-hücre ilişkisinin sağlanması, ii) kültür ortamına deksametazon, askorbik asit, TGFβ, BMP, fibroblastik büyüme faktörü (FGF) ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) gibi biyolojik etkinliği olan kondrojenik maddeler eklemektir. MKH kondrojenik farklılaşma sırasında fibroblast benzeri görünümlerinden küresel biçime dönüşürler. Hücreler kollajen tip II'nin oluşturduğu matriks ile çevrelenir. Bunların arasında proteoglikan ve yüksek molekül ağırlıklı glikozaminoglikan makro molekülleri yer alır. Bu oluşumlar Alcian blue, toluidin blue ve safranin O ile gösterilir. *In vivo* kondrojenez, TGF-βs, Aktivin A, BMP-2, BMP-4, BMP-7 ve FGFs gibi çeşitli büyüme faktörleri tarafından başlatılır. TGF-β, hem in vitro hem de in vivo kondrojenik farklılaşma için önemli bir uyarıcı olarak kabul. TGF-β'lar (esas olarak TGF-β1 ve TGF-β3) SMAD3 proteini aracılığıyla kondrojenezi uyarır, bu da Sox9'un transkripsiyonel aktivitesini uyararak tip II ve tip IX kollajen, aggrekan, CD-RAP ve kıkırdak oligomerik protein (COMP) gibi kıkırdağa özgü protein genlerinin aktivasyonunu başlatır. Ayrıca, FGF'ler genellikle IGF'ler gibi uygun bir kondrogenez oluşumunun yanı sıra hücre proliferasyonu ve diğer büyüme faktörleriyle birlikte hareket eder. Sonik hedgehog (SHH), MKH'leri; BMP'leri sentezlemeye teşvik ederek MKH farklılaşmasını kondrojenik soylara yönlendirir, yani Sox9, MKH'lerde ifade anahtar transkripsiyon faktörüdür (Uzieliene ve ark., 2018).

Yapılan bir çalışmada farklılaşmış (Khanmohammadi, 2012) MenKH'ler, BMKH'lere benzer bir şekilde, Kolajen tip 2'ye karşı bir monoklonal antikora karşı güçlü bir immünoreaktivite göstermiştir. Ancak, MenKH'lerde Collagen 2A1, Collagen 9A1 ve SOX9 gibi kondrojenik belirteçlerin RT-PCR ile değerlendirilen mRNA ekspresyon düzeyleri BMKH'lerdekilerden farklı çıkmıştır. Bu sonuçlara bakıldığında, MenKH'ler iki boyutlu kültürde BMKH'lerden daha yüksek proliferasyona ve karşılaştırılabilir kondrojenik farklılaşma yeteneğine sahip benzersiz bir kök hücre popülasyonu gibi görünmektedir (Khanmohammadi, 2012).

1.3.4.3. Adipojenik Farklılaşma

Erişkinlerde yağ dokusu, özellikle plastik ve rekonstrüktif cerrahide sıklıkla kullanılır. Bu bağlamda MKH'den elde edilen doku mühendisliği yaklaşımıyla hasarlı bölgede kullanılması oldukça yaygındır (Chen ve ark., 2019b).

In vitro adiposit farklılaşması çok basamaklı olup genellikle preadipositlerin gelişmesiyle son bulur. Bir MKH' nin yağ hücresine dönüşümünde; yuvarlaklaşma, sitoplazmada yağ damlacıklarının ortaya çıkması ve giderek büyümesi, laminin, fibronektin ve kollajen tip 1, 3, 4, 5 ve 6 gibi hücre dışı matriks proteinlerinin sentezi gerçekleşir. Işık mikroskobik olarak görüntülenmesinde Oil Red O boyası kullanılır. Oil Red O boyasının niceliksel ölçümü için isopropanol ile hücre içindeki boya eritilip spektrofotometirk ölçüm yapılır (Chen ve ark., 2019a).

1.4. Metformin Etki Mekanizması

Metformin, Orta Çağ Avrupası'nda bitkisel ilaç olarak kullanılan *Galega officinalis* bitkisinden elde edilen doğal bir ürün olan galeginden türetilmiştir. Kimyasal olarak, galegin guanidinin izoprenil türevidir, iki eşlenmiş guanidin molekülü içeren biguanidlerdir. (Rena ve ark., 2017) (Şekil 1.8). Metformin (dimetilbiguanid), insüline bağımlı olmayan diabetes mellitus (NIDDM) hastalarında kan glikoz konsantrasyonlarını düşürmek için kullanılan oral yoldan uygulanan bir ilaçtır (Bailey & Turner, 1996). İnsülin duyarlılığını iyileştirir ve böylece NIDDM'de yaygın olan insülin direncini azaltır (Bailey & Turner, 1996; Bridgeman ve ark., 2018). NIDDM hastalığında ana etki mekanizması hepatik glukoneogenezin inhibisyonudur. Metformin, mitokondriyal elektron taşıma zincirinin kompleksiyle etkileşime girerek hücresel ATP seviyelerini düşürür ve AMP birikimine neden olur. AMP'nin adenilat siklaz bölgesine bağlanması, glukagona yanıt olarak etkisini inhibe eder ve böylece AMPc-PKA sinyallemesini bozar. Sonuç olarak, glukoneojenik yol enzimlerinin aktivitesi glikoliz lehine inhibe edilir (da Trindade ve ark., 2018).

Glikoz düşürücü etkisine ek olarak, metforminin polikistik over sendromu (PKOS), gebelik diyabeti ve endometriyal kanser tedavilerinde ve kardiyovasküler riskle bağlantılı dolaşımdaki lipitler üzerinde yararlı olduğu bulunmuştur (Shao ve ark., 2014). PKOS'lu hastalarda metforminin ovulasyonu, adet döngüsünü ve klinik

gebelik oranını iyileştirdiği ve ovulasyonu indüklemede diğer ilaçların etkinliğini optimize ettiği bildirilmiştir.

Metformin ayrıca, insan da dahil olmak üzere çeşitli türlerde granulosa hücreleri tarafından in vitro steroid üretimini inhibe ederek ovaryum üzerinde doğrudan etkiler gösterebilmektedir (Costello ve ark., 2006). Gonadotropinlerin uygulanması, *in vitro* fertilizasyon (IVF) programları sırasında kontrollü over hiperstimülasyonunun başlatılması için PKOS'lu kadınlarda kısırlık tedavisinin son terapötik adımını temsil eder. Bunun gibi gelişmeler üzerine son zamanlarda PKOS'lu kadınlar giderek daha fazla metformin tedavisi altında gonadotropin almaktadırlar (Palomba ve ark., 2013).

Metformin hidrofilik bir yapıya sahip olduğu için plazma membranını kolaylıkla geçebilir. Fakat metforminin hücre içine alımında organik katyonik taşıyıcılar (Organic Cation Transporters-OCT) ailesi üyeleri rol oynarken, salınımda çoklu ilaç ve toksin taşıyıcısı (Multidrug and Toxin Extrusion -MATE) ailesi proteinleri rol oynar. İnsan endometrial epitelial ve stromal hücrelerde OCT2, OCT3, MATE1 ve MATE2 ekspresyonu varken, OCT1'in sadece stromal hücrelerde eksprese edildiği gösterilmiştir. Bu veriler ile metforminin endometrial epitel ve stromada alım ve salınımlarını gerçekleştirebilecek moleküller yer almaktadır (Shao ve ark., 2014). Metformin inflamasyon ile ilişkili sitokinleri, lokal östrojen sentezini ve ötopik stromal hücre proliferasyonu azalttığı için endometriotik lezyonların kontrolünde kullanılmaktadır (Mashayekhi ve ark, 2022). Ancak metforminin endometrial kök hücreler ve menstrual kök hücreler üzerine etkisi net değildir (Zhou ve ark., 2001).

AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK), metforminin faydalı metabolik etkilerine aracılık edebilecek bir potansiyel hedef sunmaktadır. Metforminin mezenkimal kök hücre farklılaşmasını AMPK yolağı ile sağladığı hipotezi birçok kanser türünde ortaya konmuştur (Mashayekhi ve ark., 2022). Metforminin endometriozisteki etkisinin, endometrial MKH'lerden dolayı olabileceği de düşünülmektedir (Saini & Yang , 2018; Kimber-Trojnar ve ark., 2022).

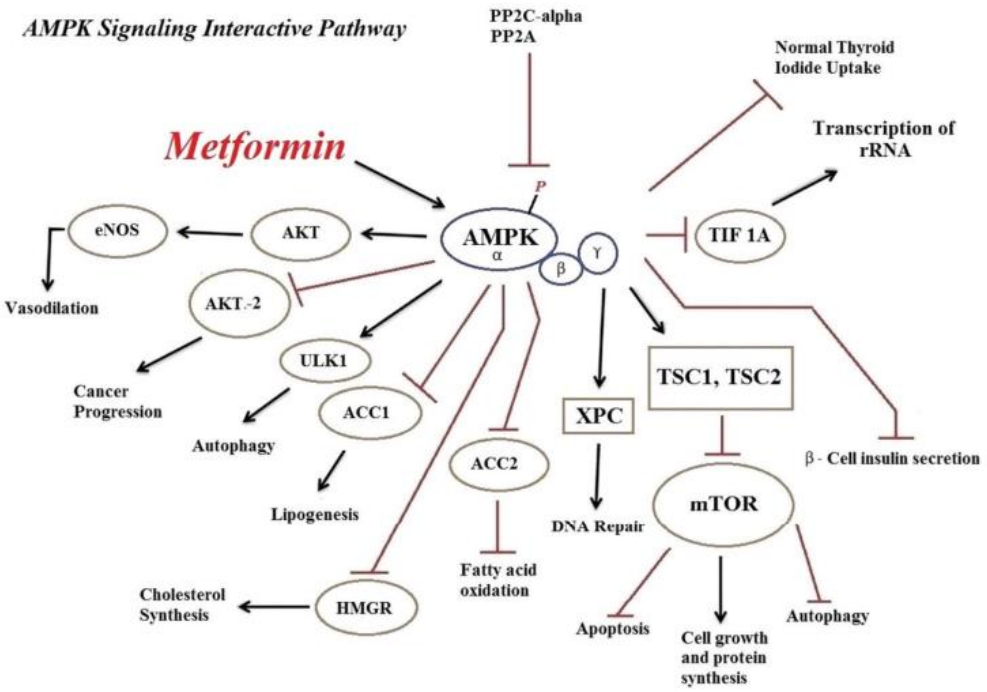
AMPK, bir katalitik alt birim (AMPKα) ve iki düzenleyici alt birimden (AMPKβ ve AMPKɣ) oluşan heterotrimerik bir komplekstir. AMP'nin kinaza bağlanmasının, konformasyonunu değiştirerek α-alt biriminin up stream protein kinazları tarafından fosforilasyonuna izin verdiği düşünülmektedir. AMP'nin ɣ-alt birimine bağlanması ve α-alt biriminin fosforilasyonu kombinasyonu kinazın aktivasyonuyla sonuçlanır. Buna karşılık, ATP'nin bağlanması α-alt biriminin

fosforilasyonunu önler ve dolayısıyla aktivasyonunu zayıflatır. Böylece AMPK sadece AMP konsantrasyonundaki değişikliklere değil aynı zamanda AMP'nin ATP'ye oranındaki değişikliklere de yanıt verir (Kimball, 2006; Hardie, 2013).

Metformin, AMPK üzerinden etkisi yanısıra insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ve reseptörü üzerinde de etki edebilmektedir. IGF hücre proliferasyonu, obezite, diyabet ve hiperinsülinemi ile ilişkili olup IGF-1, IGF- 2 ve IGF-1 reseptörünün (IGF-1R) ekspresyon seviyelerinin endometrail kanser hücrelerinde ve normal endometriumdan önemli ölçüde daha yüksek olduğu gösterilmiştir. IGF proteinlerinin biyolojik etkilerine, yapısal olarak insülin reseptörü ile ilişkili bir transmembran tirozin kinaz olan IGF-1R aracılık eder. IGF-1R, karşılık gelen ligandlar olan IGF-1, IGF-2 ve insüline bağlanarak otofosforilasyonu indükler. Bu da fosfatidilinositol 3-kinaz-AKT/mammalian target of rapamycin (mTOR) sinyal yolu da dahil olmak üzere farklı sinyal yollarının aktivasyonuyla sonuçlanır ve nihayetinde hücre proliferasyonunu teşvik eder ve apoptozu baskılar.

Birçok çalışma, AMPK'nin metforminin farmakolojik etkilerde rol oynayan anahtar molekül olduğunu göstermiştir. Metformin, mitokondriyal solunum zincirinin kompleks I'ini veya AMP-deaminazı inhibe edebilir, bu da ATP üretimini azaltır ve ADP ve AMP seviyelerini artırır (Owen ve ark., 2000). Metformin ayrıca, up stream molekülleri tarafından AMPK aktivasyonunu teşvik etmek için doğrudan AMPK alt birimlerine bağlanır (Viollet ve ark., 2012).

Etki mekanizmaları tam olarak anlaşılmamış olsada, metforminin fosforilasyonu ve dolayısıyla AMP ile aktive olan proteinkinazın (AMPK) aktivasyonunu teşvik etme kabiliyetinin, etki tarzının merkezinde olduğu ve glukoneojenik genlerin inhibisyonuyla sonuçlandığı düşünülmektedir. Hücresel metabolizmanın önemli bir düzenleyicisi olarak kabul edilen AMPK'nın aktivasyonu, yalnızca glukoz metabolizmasına dahil olanları değil, aynı zamanda lipid metabolizması, mitokondriyal biyogenez, otofaji, hücre büyümesi ve sirkadiyen ritmi de içeren çok sayıda yolu etkilemektedir (Şekil 1.8). AMPK aktivitesinin metformin kaynaklı modülasyonunun epigenetik süreçleri etkilediğine dair yeni kanıtlar ortaya çıkmaktadır (Saxton & Sabatini, 2017).



Şekil 1.8 Metformin ile AMPK pathway arasındaki ilişki (Hasanvand, A. 2022).

Hayvanlarda protein sentezi, kısmen rapamisinin memeli hedefi (mammalian target of rapamycin-mTOR) olarak adlandırılan protein kinaz içeren bir sinyal yolu aracılığıyla düzenlenir (Junqueira, 2006; Kimball, 2006). mTOR sinyallemesi, embriyonik kök hücrelerin ve pluripotent kök hücrelerin endoderm, ektoderm ve mezoderme dönüştüğü memeli embriyonik farklılaşmasında da yer alır (Kojima ve ark., 2014).

mTOR inhibisyonu insan pluripotent kök hücre farklılaşmasını destekler. İnsan pluripotent kök hücrelerinde Raptor'un devre dışı bırakılması mezendoderm farklılaşmasını başlatır (Nazareth ve ark., 2016) ve aynı etki insan pluripotent kök hücrelerinin rapamisin ile tedavi edilmesiyle de meydana gelir (Inoki ve ark., 2003).

Estradiol-17β (E2) ve Progesteron (P4), endometriumun hücre bölünmesini ve farklılaşmasını düzenleyen en önemli faktörlerdir. E2, PKC (fosfo-kinaz C)/ERK/mTOR yoluyla uterus epitel hücrelerinde protein sentezini ve DNA sentezini düzenler ve bu da nihayetinde hücre çoğalmasını yönlendirir. Bununla birlikte, P4, mTOR sinyallemesini etkilemeden yalnızca E2 kaynaklı DNA sentetik yanıtını inhibe eder (Chen ve ark., 2018; Stuttfeld ve ark., 2018). mTOR sinyallemesinin baskılanması ayrıca S6K1 aracılığıyla gerçekleşen ve LC3-II ekspresyonuna dayanarak

belirlenebilen otofaji indüksiyonu yoluyla insan endometrial stromal hücre apoptozunu da destekler (Guo & Yu, 2019; Choi ve ark., 2014).

Endometrial stromal hücrelerin salgılayıcı desidual hücrelere dönüşümü olan desidualizasyon, insan endometrial stromal hücrelerinde PI3K-Akt-mTOR sinyal yolları aracılığıyla gerçekleşir. mTOR bu yolak aracılığı ile endometriumun embriyo gelişimi için uygun hale getilmesini sağlar.

mTOR sinyal yolu, ovaryum rezervi, folikül gelişimi, oosit mayotik olgunlaşması, ovaryum yaşlanması ve ovaryum somatik hücrelerinin proliferasyonu ve steroidogenezi dahil olmak üzere ovaryumda meydana gelen çeşitli süreçlere katılır. Ovaryumda mTOR sinyallemesinin iki etkileyici işlevi vardır. Birincisi, hem oositlerde hem de primer folikül gronüloza hücrelerinde artan mTOR ekspresyonu, ovaryum rezervi koruması için büyük potansiyele sahip olan primer folikülü aktive eder. İkincisi, mTOR'u baskılamak, oosit mayotik olgunlaşmasını engeller ve bu da mTOR baskılayan ilaçların doğurganlıkla ilgili hastalıklarda kullanımını sınırlayabilir. Ovaryumdakine ek olarak, mTOR hipotalamus fonksiyonları, endometrium değişiklikleri ve embriyo gelişimi için de önemli görünmektedir (Guo & Yu, 2019).

1.5. Çalışmada Bakılması Hedeflenen Proteinler

1.5.1. OCT2 ve *Slc47a-1*

Metforminin hücre membranından pasif difüzyonu düşüktür ve metobolize olmaz (Tkáč ve ark., 2013; Saiz-Rodríguez ve ark., 2023). Ancak OCT metforminin farklı organlara taşınmasını ve kandan idrara atılmasında görev alır (Tkáč ve ark., 2013). OCT, toksik maddeler, endojen bileşikler (örn. dopamin ve serotonin) ve klinik olarak kullanılan ilaçlar (örn. prokainamid ve amantadin) dahil olmak üzere küçük ve hidrofilik organik katyonların poli-spesifik taşıyıcılarıdır (Jonker & Shikata, ve ark., 2007).

OCT1 metforminin emiliminden sorumlu ana taşıyıcıdır, hepatositlerin bazolateral membranında bulunur. OCT2 ise, böbrek proksimal tübül epitelinin bazolateral membranında ifade edilir ve kan dolaşımından böbrek epitel hücrelerine birçok ksenobiyotiğin alınmasında rol oynar. Kimura ve arkadaşları (2005), OCT2 ifade eden HEK293 hücrelerini kullanarak metforminin OCT2 için iyi bir substrat olduğunu göstermiştir (Kimura ve ark., 2005).

Oct1 genindekilere benzer şekilde, *Oct2* geninde işlevsel olarak farklı varyantlar tanımlanmıştır (Shikata ve ark., 2007).

Oositlerde hOCT2'nin ekspresyonundan sonra, rOCT1 ve rOCT2'ye benzer şekilde oldukça aktif, sodyumdan bağımsız ve elektrojenik katyon taşınımı gözlenmiştir.

Oct1, Oct2, Oct3 ve *Octn1; Slc22a1, Slc22a2, Slc22a3* ve *Slc22a4* genleri tarafından kodlanır (Koepsell, 2020).

1.5.2. Çoklu İlaç ve Toksin Çıkaran Proteinler 1 (Multidrug and Toxin Extrusion Protein 1) (MATE1)

Slc47a1 tarafından kodlanan MATE1 renal tübüler hücrelerin membranında lokalizedir ve OCT2 ile birlikte metforminin kandan idrara atılmasına aracılık eder. *Slc22a1*'deki bazı polimorfizmler metformin alımının azalması, renal tübüler reabsorpsiyonun azalması sonucu eliminasyonun artması ve metforminin karaciğerdeki etkisinin azalması nedeniyle terapötik yanıtın azalması ile ilişkilendirilmiştir (Tkáč ve ark., 2013; Saiz-Rodríguez ve ark., 2023). Ayrıca, *Slc22a1* ve S*lc22a2*'deki çeşitli polimorfizmler farmakokinetik ve metformine yanıttaki değişikliklerle ilişkilendirilmiştir (Saiz-Rodríguez ve ark., 2023).

1.5.3. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1 (IGF1)

İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF1), hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptozunun düzenlenmesinde önemli rol oynayan bir mitogendir (Majchrzak-Baczmańska, & Malinowski, (2016).

Daha önceki çalışmalar, insülin benzeri büyüme faktörlerinden moleküllerin normal endometriyal hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşmasının yanı sıra embriyo implantasyonuna katıldığına dair önemli miktarda kanıt sunmaktadır. Çeşitli çalışmalar normal bir adet döngüsü sırasında endometriumda IGF1 ve IGFBP proteininin varlığını göstermiştir (Wang & Chard, 1999). Endometriyal stromal hücreler IGF11 ve IGF2'nin yanı sıra yüksek afiniteli IGF bağlayıcı proteinleri (IGFBP'ler) üretirler. Epitel hücreleri ve daha az miktardaki stromal hücreler de IGF'ler için hücre zarı reseptörleri içerir. (Rutanen, 1998).

1.5.4. İntegrin αVβ3

İntegrinler, üreme döngüsü ve erken gebelik boyunca uterus içinde mekansal ve zamansal olarak düzenlenir (Lessey, 1996; Klentzeris, 1993; Reddy & Meherji, 1999; Bowen ve ark., 1996; Fazleabas ve ark., 1997). İnsanlarda integrin alt birimi αv, uterusun luminal epitelinde tanımlanmıştır (Reddy & Mangale, 2003).

1.5.5. Mucin 1 (MUC1)

Mucin1 (MUC1, EMA, MCD, PEM, PUM, KL-6 ve MAM6 olarak da bilinir) bir makromoleküler proteindir. Mucin ailesinin en kolay tanınan transmembran proteinidir ve yüksek oranda glikozlanmış bir ekstraselüler alana sahiptir (Chen ve ark., 2021). Mucin'ler, epitelyal yüzeylerde koruyucu mukoza bariyerleri oluşturmada önemli bir rol oynayan O-glikozillenmiş proteinlerdir. Bu proteinler aynı zamanda hücre içi sinyalizasyonda da rol oynar. Endometrial epitelde MUC1 ekspresyonunun, implantasyon sırasında kaldırılması gereken embriyo tutunmasına karşı bir bariyer oluşturduğu düşünülmektedir (Meseguer ve ark., 2001).

1.5.6. Lösemi İnhibitör Faktör (LIF)

Lösemi inhibitör faktör (LIF), sitokinlerin interlökin-6 ailesinin en pleyotropik üyesidir (Taga & Kishimoto, 1997). LIF, bir sitokin olup, inflamatuar yanıtı, nöronal gelişimi, kök hücre kendini yenilemesini ve kanser ilerlemesini içeren çok çeşitli biyolojik süreçlerde önemli bir rol oynar (Nicola & Babon, 2015). LIF, endometriumda adet döngüsüne bağlı bir şekilde ifade edilir ve en yüksek seviyesi implantasyon sırasında ortaya çıkar. LIF, muhtemelen adet döngüsü sırasında östrojen seviyelerinin yükselmesinin bir sonucu olarak, hem farelerde hem de insanlarda blastosist oluşumu sırasında ve blastosist implantasyonundan önce uterus endometrial bezlerinde yüksek oranda ifade edilir. Uterus yıkamalarında ve ex-vivo eksplantlarda LIF salgı seviyelerinin kanıtlanmış kısırlığı olan kadınlarda geç proliferatif ve erken sekresyon fazlarında önemli ölçüde daha düşük olduğu bildirilmiştir. Giess ve ark.'nın yaptığı çalışmada infertil kadınlarda LIF geninde mutasyon olduğu gösterilmiştir (Giess, 1999). Benzer şekilde, açıklanamayan infertilitesi olan kadınlardan elde edilen endometriyal eksplantlarda LIF salgılanma seviyeleri azalmıştır. LIF'in LIF

reseptörüne ve gp130'a bağlanması sinyal iletim yollarını aktive eder. LIF reseptörü endometrium, oositler ve blastokistlerde eksprese edilir (Lass ve ark., 2001).

Çalışmada menstrual kandan izole edilen kök hücrelerin, sebebi açıklanamayan hastalar da olduğu gibi infertilite sebebini oluşturabilecek mekanizmaların çalışılabileceği bir kaynak olarak seçildi. Bu doğrultuda infertil ve fertil hastalardan alınan menstrual kan örneklerinden kök hücre elde edilmesi, kültürü ve metformin uygulaması sonrasında seçilen moleküller üzerindeki değişikliklerin incelenmesi amaçlandı.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Proje, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Etik Kurulu'nun 12/11/2014 tarih ve 10.07.2024/20.478.486/2512 sayılı onayı ve Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından (proje no:2024-068) destek ile gerçekleştirilmiştir.

2.1. Çalışmaya Ait Grupların Oluşturulması

Menstrual kan örnekleri Manisa Celal Bayar Üniversitesi Hafsa Sultan Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniğine başvuran fertil ve sebebi açıklanamayan infertil vakalardan alındı. Tüm katılımcılara çalışma hakkında detaylı bilgi verildi ve çalışma başlamadan önce hastalardan gönüllü onamları alındı.

Fertil hastalar (n=5) en az bir doğum yapmış, 18-40 yaş arası endometrial herhangi bir rahatsızlığı olmayan hastalardan oluşurken, sebebi açıklanamayan infertil hasta grubu ise (n=5) 18-40 yaş arası, normal ve yardımcı üreme teknikleri ile tedavi sonrasında hiç implantasyon saptanmamış ve doğum yapmamış, polikistik over sendromu, endometriozis vb. infertiliteye sebep olan diğer hastalığı olmayan hastalardan oluşturuldu. Her bir grup hastadan menstrual kan örnekleri adet gününün 2. gününde pipel yardımı ile toplandıktan sonra Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji AD, Hücre Kültürü laboratuvarına en az 10 ml olacak şekilde ulaştırıldı.

Fertil ve infertil hasta verileri tablo 2.1. ve 2.2 de verilmiştir.

Tablo 2.1. Fertil hastaların klinik verileri

FERTİL HASTA					
Hasta No	**F1**	**F2**	**F3**	**F4**	**F5**
Yaş	24	28	31	25	22
Boy	153	155	155	160	160
Kilo	63	53	70	72	90
Ovaryum	Her iki overde pkos	Sağ over normal, sol pkos	Her iki overde kist	normal	normal
Uterus	İnce	İnce	ince	İnce	ince
Evlilik Süresi	??	1 yıl	1 yıl	??	1 yıl
AMH	1.99 ng/mL	11.78 ng/mL	3.19 ng/mL	4.77 ng/mL	7.64 ng/mL
Progesteron	14.9 ng/mL	14.9 ng/mL	0.39 ng/mL	0.50 ng/mL	0.54 ng/mL
FSH	4.89 mlU/mL	4.89 mlU/mL	5.13 mlU/mL	6.65 mlU/mL	6.11 mlU/mL
LH	13.66 ml/U	13.66 ml/U	11.86 ml/U	18.24 ml/U	4.89 ml/U
Prolaktin	12.8 ng/mL	14.9ng/mL	3.3 ng/mL	5.4 ng/mL	20.3 ng/mL
E2		24 pg/mL	47 pg/mL	35 pg/mL	36 pg/mL
TSH	0.39 uU/mL	1.40 uU/mL	1.19 uU/mL	1.05 uU/mL	2.83 uU/mL

Tablo 2.2. Infertil hastaların klinik verileri

İNFERTİL HASTA					
Hasta No	**F1**	**F2**	**F3**	**F4**	**F5**
Yaş	34	33	27	23	27
Boy	165	160	160	150	160
Kilo	65	53	100	50	65
Ovaryum	Sağ over 2 cm kist	normal	Her iki overde kist	normal	normal
Uterus	İnce	ince	ince	İnce	İnce
Evlilik Süresi	4 yıl	10 yıl	4 yıl	1.5 yıl	2 yıl
AMH	7.64 ng/mL	4.23 ng/mL	3.32 ng/mL	0.96 ng/mL	3.87ng/mL
Progesteron	20.3 ng/mL	0.60 ng/mL	0.62 ng/mL	0.33 ng/mL	0.49 ng/mL
FSH	6.11 mlU/mL	7.46 mlU/mL	5.71 mlU/mL	12.96 mlU/mL	11.37 mlU/mL
LH	4.89 ml/U	7.10 ml/U	5.45 ml/U	4.37 ml/U	11.87 mlU/mL
Prolaktin	12.1 ng/mL	6.6 ng/mL	19.3 ng/mL	8.6 ng/mL	14.2 ng/mL
E2	71 pg/mL	45 pg/mL	37 pg/mL	61 pg/mL	26 pg/mL
TSH	2.83uU/mL	1.40 uU/mL	3.86 uU/mL	1.60 uU/mL	3.3uU/mL

2.2. MenKH Eldesi ve Kültürü

Kan örnekleri Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji AD, Hücre Kültürü laboratuvarına ulaştıktan sonra iki farklı protokol için iki tüpe bölündü ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.

İlk protokol olan Ficoll protokolünde; kan örnekleri ficoll (Biochrom, L 6115) ile 1:1 oranda seyreltildi ve 2000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Buffy coat tabakasındaki hücreler toplandı ve %5 fetal sığır serumu (FBS, Gibco, 2440087) ve %1 penisilin-streptomisin (Capricorn synthesis, PS-B) içeren DMEM F12 (Sigma Life Science, RNBG7035) ile yıkanarak ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Daha sonra süpernatant uzaklaştırıldı, pellet kültür ortamı ile homojenize edildi ve hücreler 37°C, %5 CO_2'de inkübe edildi.

İkinci protokol olan Kollajenaz protokolüde; kollajenaz I (0.005 U/mL, Sigma Aldrich, 9001-12-1) DMEM F12 kültür vasatı ile 0.005 U/mL oranında hazırlandı. Ardından menstrual kana eklendi ve 37°C, %5 CO_2'de 60 dakika inkübe edildi. Örnekler daha sonra 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra toplandı ve ficoll protokolü ile benzer şekilde kültür ortamı ile kültüre edildi. Kültür ortamı her 2 günde bir değiştirildi ve hücreler Tripsin-EDTA (Capricorn Scientific, TRY-4265) solüsyonu ile pasajlandı.

2.3. MenKH'lerin Karakterizasyonu

İki protokolden de elde edilen MenKH'lerin karakterizasyonu için hücreler indirekt immunoperoksidaz yöntemi ile analiz edildi. Bunun için her iki yöntemle elde edilen hücreler %4 paraformaldehit (Merck, TP70404 415) ile tespit edildi ve 2x15 dk fosfat tampon solüsyonu (PBS, Bioshop PBS404.100) ile yıkandı. Ardından %3'lük H_2O_2 (Merck, 1.08597.2500) ile 10 dk inkübe edildi. Tekrar 3x5 dk PBS ile yıkanan hücrelerin permeabilizasyonu % 0.1 Triton-X100 (Applichem, A4975,0100) ile buz üstünde 15 dk bekletilerek sağlandı ve takiben 3x5 dk PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Hücrelere bloklama solüsyonu (Thermo Scientific, TP-125-HL) ilave edilerek 1 saat oda sıcaklığında inkübasyonun ardından, 1/50 oranında PBS ile hazırlanan, primer antikorlar (CD34 (Santa Cruz, sc-74499) ve CD44 (Proteintech, 15675-1-AP) ile hücreler 1 gece $+4^0$C de inkübe edildi. Hücreler PBS ile 3x5 dk

yıkandıktan sonra biotin-streptavidin peroksidaz sekonder antikorları (Thermo Scientific, TP-125-HL) ile her bir basamak 30 dk olacak şekilde boyandı ve PBS ile yıkamanın ardından diaminobenzidine kromojeni (DAB, Thermo Scientific, TA-125-HD) ile 3 dk boyama gerçekleştirildi. Önce PBS ardından distile su ile yıkama işleminden sonra örnekler 3 dk Mayer's hematoksilen (Atom Scientific Ltd, Kat. No: TTSP60) ile boyama yapıldıktan sonra immunositokimya kapatma medium (Spring Bioscience, DMM- 125) ile kapatılarak ışık mikroskobu altında incelendi.

2.4. MenKH Farklılaşması

MenKH'lerin osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşma potansiyelleri analiz edildi. Bu amaçla osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşma indüksiyonu için, chamber slideların her bir gözde 1×10^4 hücre olacak şekilde ekildi. Osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşma için kitler kullanıldı (bakınız 2.4.1, 2.4.2, 2.4.3). Farklılaştırma mediumu 2 günde bir değiştirilerek tazelendi ve bu işleme 21 gün devam edildi.

Hücrelerin farklılaşma durumlarının kontrol edilmesi amacıyla kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde boyamaları gerçekleştirildi. Osteojenik farklılaşma için Alizarin Red S (Bio BASIC, C14H07SNa) boyaması, kondrojenik farklılaşma için Alcian Blue (Chem Cruz, KH-203749A) boyaması ve adipojenik farklılaşma için Oil Red (Carlo Erba 428561) boyaması yapıldı. Hücreler 1. hafta, 2. hafta ve 3. haftanın sonunda %4 PFA ile tespit edildi. Ardından boyamaları gerçekleştirildi.

2.4.1. Osteojenik Farklılaşma Protokolü

Osteojenik farklılaşma için %10 StemPro® Osteogenesis Supplement (Gibco in life Technologies, A10066-01) ve %1 Penicillin Streptomycin (Capricorn synthesis, PS-B) içeren StemPro® Osteogenesis bazal mediumu (Gibco in life Technologies, A10069-01) içeren kültür vasatı kullanıldı.

MenKH'ler fiksasyondan sonra PBS ile 3x5 dk boyunca yıkandı. Ardından %2'lik Alizarin Red S boyası dH_2O ile hazırlandı ve pH'si 4.3 olacak şekilde ayarlandı. Alizarin Red S boyasının hücrelere 2-3 dk uygulanmasının ardından distile su ile 3x5 dk yıkama işlemi gerçekleştirildi ve ardından ışık mikrosbu (Işık Mikroskobu BX40,

Olympos) ile görüntüleme yapıldı. Bu işlemler ikinci ve üçüncü hafta farklılaştırma yapılan hücreler için de tekrarlandı.

2.4.2. Kondrojenik Farklılaşma Protokolü

Kondrojenik Farklılaşma vasatı; %10 StemPro® Chondrogenesis Supplement (Gibco in life Technologies, A10069-01) ve %1 Penicillin Streptomycin (Capricorn synthesis, PS-B) içeren StemPro® Chondrocyte Differentiation Basal Medium (Gibco in life Technologies, A10064-01) ile hazırlandı.

MenKH'ler fiksasyondan sonra PBS ile 3x5 dk yıkandı. Ardından 1N HCl, %37'lik HCl ve serum fizyolojik ile hazırlanarak %1 Alcian Blue hazırlamak için kullanıldı. Hazırlanan %1 Alcian Blue MenKH'lerle muamele edilerek 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon bittikten sonra hücreler 1N HCl ile 3 defa yıkandı ve (Işık Mikroskobu BX40, Olympos) görüntülendi. Bu işlemler ikinci ve üçüncü hafta farklılaştırma yapılan hücreler için de tekrarlandı.

2.4.3. Adipojenik Farklılaşma Protokolü

Adipojenik Farklılaşma Vasatı; %10 StemPro® Adipogenesis Supplement (Gibco in life Technologies, A10065-01) ve %1 Penicillin Streptomycin %1 (Capricorn synthesis, PS-B) içeren StemPro® Adipogenesis Differentiation Basal Medium (Gibco in life gibco life technologies, A10410-01) ile hazırlandı.

MenKH'ler fiksasyondan sonra PBS ile 3x5 dk yıkandı. Ardından ilk olarak Oil Red stok solüsyonu hazırlandı. Bunun için 100 ml izopropil alkolde 300 mg oil red çözdürüldü ve filtreden geçirildi. Çalışma solüsyonu için bu hazırlanan stok solüsyonundan 3 ml alınarak 2 ml dH_2O içerisine konuldu ve tekrardan filtreden geçirildi. Boyama sırasında ilk olarak MenKH'ler %60 isopropilde 2-3 dk bekletildi. Süre bitiminden sonra isopropil alkol ile hazırlanan Oil Red solüsyonu hücrelerin üzerine konuldu ve 5-15 dk bekletildi. Ardından dH_2O ile 3x5 dk yıkama yapılarak görüntüleme işlemi gerçekleştirildi. Bu işlemler ikinci ve üçüncü hafta farklılaştırma yapılan hücreler için de tekrarlandı.

2.5. Çalışma Grupları ve Uygulamalar

Çalışmada fertil ve infertil hastalardan elde edilen MenKH 4 grup olarak değerlendirildi. Fertil (Grup 1) ve infertil (Grup 2) hastalardan elde edilen MenKH

hücreleri yukarıda belirtilen kültür vasatı içerisinde kültüre edilir iken Grup 3 örneklerde fertil hastalardan elde edilen MenKH'lerine metformin uygulaması, Grup 4 örneklerde ise infertil hastalardan elde edilen MenKH'lerine metformin uygulaması gerçekleştirildi. Metforminin insanda kullanılan tedavi dozu dikkate alınarak (800 mg/gün) *in vitro* uygulama dozu hücre kültürü sırasında ekilen kültür kabının yüzey alanı ölçülerine göre yapıldı (9 x 10^{-7}gr/ml). Uygulama süresi yine insan da kullanılan süre olan 1 (bir) ay olarak gerçekleştirildi.

Tüm gruplar için 24 gözlü kültür kabına her bir gözde 3x 10^{3} hücre olacak şekilde ekim gerçekleştirildi. Grup 3 ve grup 4 örnekler için belirlenen metformin dozu uygulanması gerçekleştirdi. Metformin uygulaması günlük olarak gerçekleştirildiği için her gün vasat değişimi yapıldı. Eş zamanlı olarak grup 1 ve grup 2 de bulunan hücrelerde de her gün vasat değişimi gerçekleştirildi. Süre sonunda tüm grup örnekleri %4 paraformaldehit (Merck, TP70404 415) ile rutin fiksasyon işleminden sonra OCT2 (Affinity Biosciences, AF0225) OCT3/4 (Santa Cruz, sc-5279), MATE1(Bissus, BS-928412O), integrin αVβ3 (Santa Cruz, sc-7312), MUC-1 (Santa Cruz, sc-6827), LIF (Santa Cruz, sc-1336) ve IGF1(Santa Cruz, sc-9013) dağılımları indirekt immunositokimyasal analiz ile değerlendirildi (Tablo 2.3).

Tablo 2.3. MenKH'lerin 24 gözlü kültür kabında uygulama sonrası immunusitokimyasal analiz için antikor dağılımları

MATE1 OCT2	MATE1 OCT2	MATE1 OCT2
OCT3/4 IGF1	OCT3/4 IGF1	OCT3/4 IGF1
LIF MUC1	LIF MUC1	LIF MUC1
αVβ3 Kontrol	αVβ3 Kontrol	αVβ3 Kontrol

2.6. İstatistiksek Analiz

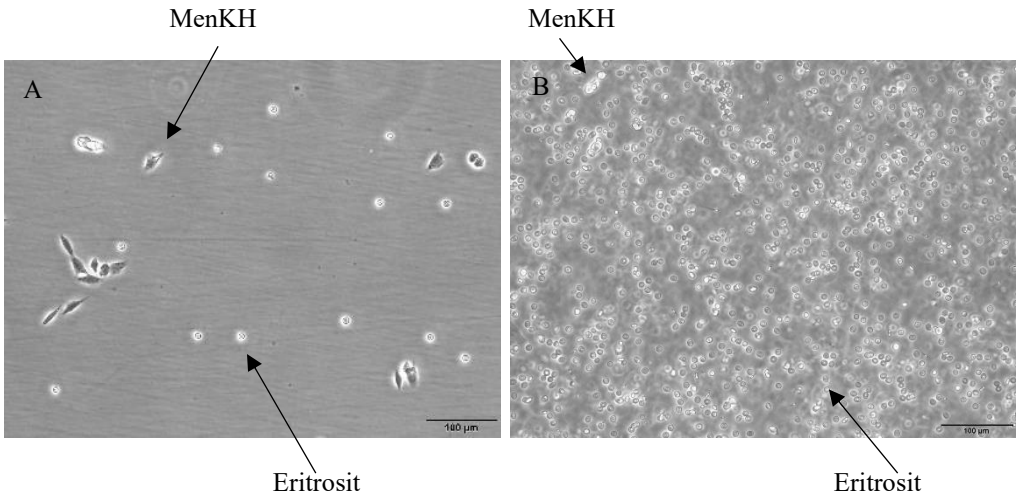
Gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırmalar Kruskal Wallis testi kullanılarak yapıldı. p değeri 0.05'ten küçük olarak saptandığında istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. SONUÇLAR

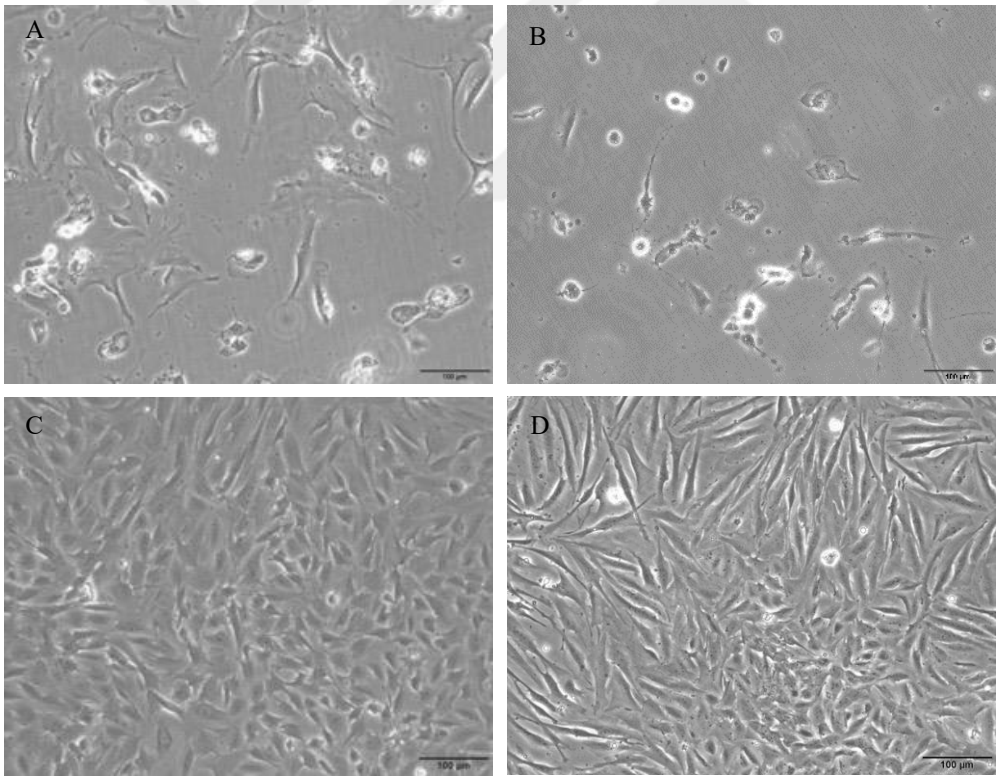
3.1.MenKH Eldesi ve Kültürü

Menstrual kandan elde edilen MenKH'ler ficoll ve kollajenaz I protokolleri sonrasında kültüre edilip 1. Gününde incelendiğinde, ficoll sonrası hücrelerin sayıca az, yer yer kültür kabına yapışan fibroblast benzeri yapıda hücreler olduğu gözlendi (Şekil 3.1A). Kollajenaz I sonrası elde edilen hücrelerde ise kültürün 1. gününde parlak, çoğunlukla yüzen yuvarlak hücrelerin eritrositler arasında olduğu izlendi (Şekil 3.1B). Kültürün 3. gününde ise ficoll protokolü ile elde edilen hücrelerin kültür kabına yapıştığı ve sayıca çoğaldığı, fibroblast benzeri yapılarını koruduğu saptandı (Şekil 3. 2A). Kollajenaz I ile elde edilen hücrelerin ise vasat değişimi sonrası eritrositlerin uzaklaştırılması ile kültür kabına yapışmış, fibroblast benzeri karakterde oldukça fazla sayıda hücre olduğu gözlendi (Şekil 3.2C). Hücrelerin 1 haftalık kültüründen sonra ise ficoll protokolü ile elde edilen hücrelerin sayıca bir önceki kültür ile benzer olduğu, yer yer kalkan hücrelerin olduğu saptandı (Şekil 3.2B). Kollejenaz I ile elde edilen hücrelerin ise kültürün 1. Haftasında %85-90 konfluent oldukları ve fibroblast benzeri özelliklerini korudukları izlendi (Şekil 3.2D) ve bu hücrelerin 4. pasaja kadar hücre proliferasyonu gösterdikleri ve morfolojilerinde değişiklik gözlenmediği belirlendi.

Ficoll ile elde edilen MenKH'lerde artan pasaj sayısı ile birlikte hücre proliferasyonunda azalma ve morfolojilerinde değişiklik olmasından dolayı projede kollajenaz I protokolünün kullanılmasına karar verildi ve sonraki çalışmalar sadece kollajenaz I ile elde edilmiş hücreler ile gerçekleştirildi.



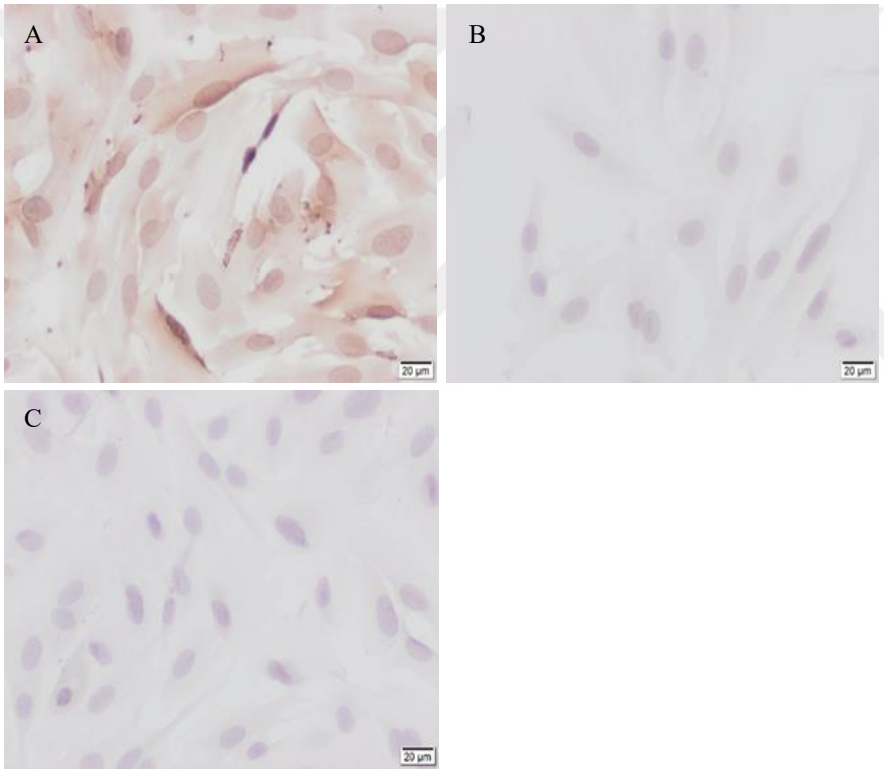
Şekil 3.2 Menstrual kandan ficoll (A) ve kollajenaz I (B) yöntemi ile elde edilen Menstrual kan kök hücrelerinin kültürün 1. günü. Ölçek: 100 µm.



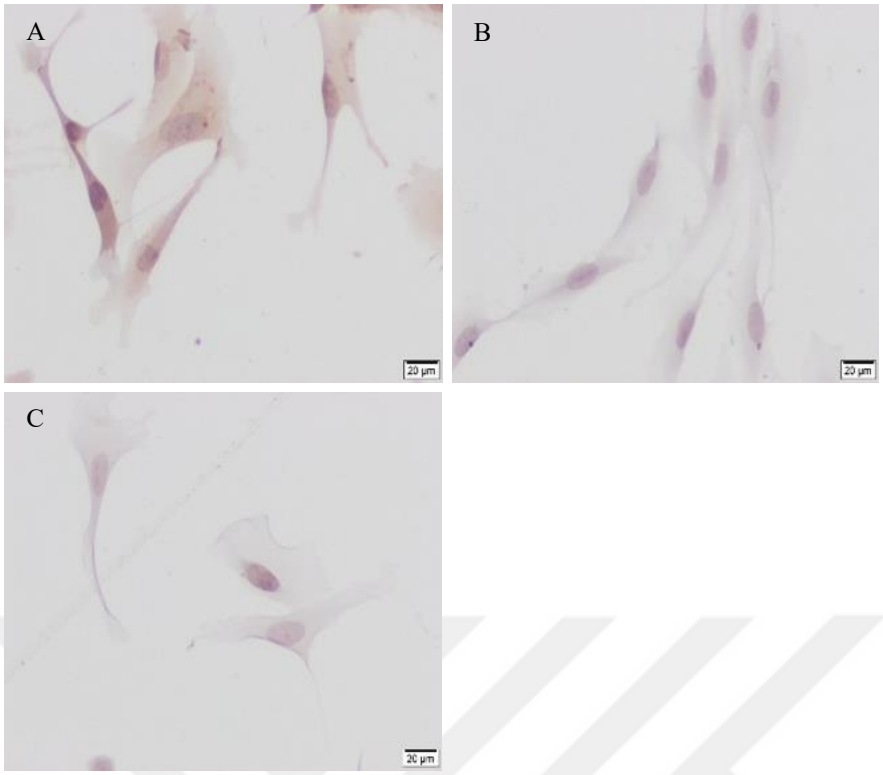
Şekil 3.2 Menstrual kandan ficoll (A, B) ve kollajenaz I (C,D) ile elde edilen menstrual kan kök hücrelerinin kültürün 3. günü (A, C) ve 1. haftadaki (B, D) görüntüleri. Ölçek: 100 µm.

3.2.MenKH Karakterizasyonu

Menstrual kandan izole edilen MenKH'lerin karakterizasyonu için kök hücre pozitif belirteci CD44, negatif belirteci CD34 indirekt immunoperoksidaz tekniği kullanılarak değerlendirildi. Hem kollajenaz I (Şekil 3.3) hem de ficoll (Şekil 3.4) protokolleri sonrası elde edilen MenKH'lerde CD44 immunoreaktivitesinin orta, yer yer şiddetli pozitif olduğu gözlenir iken, (Şekil 3.3A, Şekil 3.4A, sırasıyla) CD34 immunoreaktivitesi her iki protokol ile elde edilen hücrelerde negatif idi (Şekil 3.3B, Şekil 3.4B). Kontrol immunositokimya boyamalarında da boyanmanın olmadığı izlendi (Şekil 3.3C, Şekil 3.4C).



Şekil 3.3 Menstrual kandan kollajenaz I protokolü ile elde edilen MenKH'lerde CD44 (A), CD34 (B) ve kontrol (C) immünositokimyasal boyama görüntüleri. Ölçek: 20 µm.

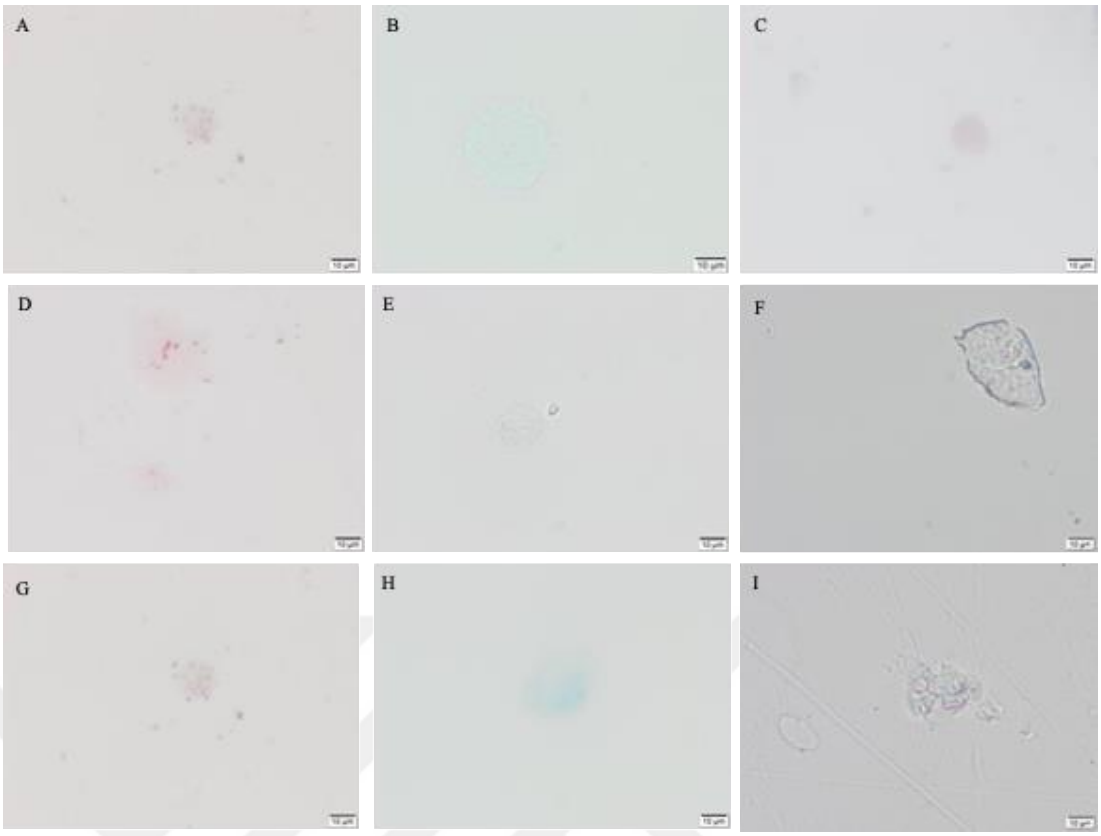


Şekil 3.4 Menstrual kandan Ficoll protokolü ile elde edilen MenKH'lerde CD44 (A), CD34 (B) ve kontrol (C) immünositokimyasal boyama görüntüleri. Ölçek: 20 µm.

3.3.MenKH Farklılaşması

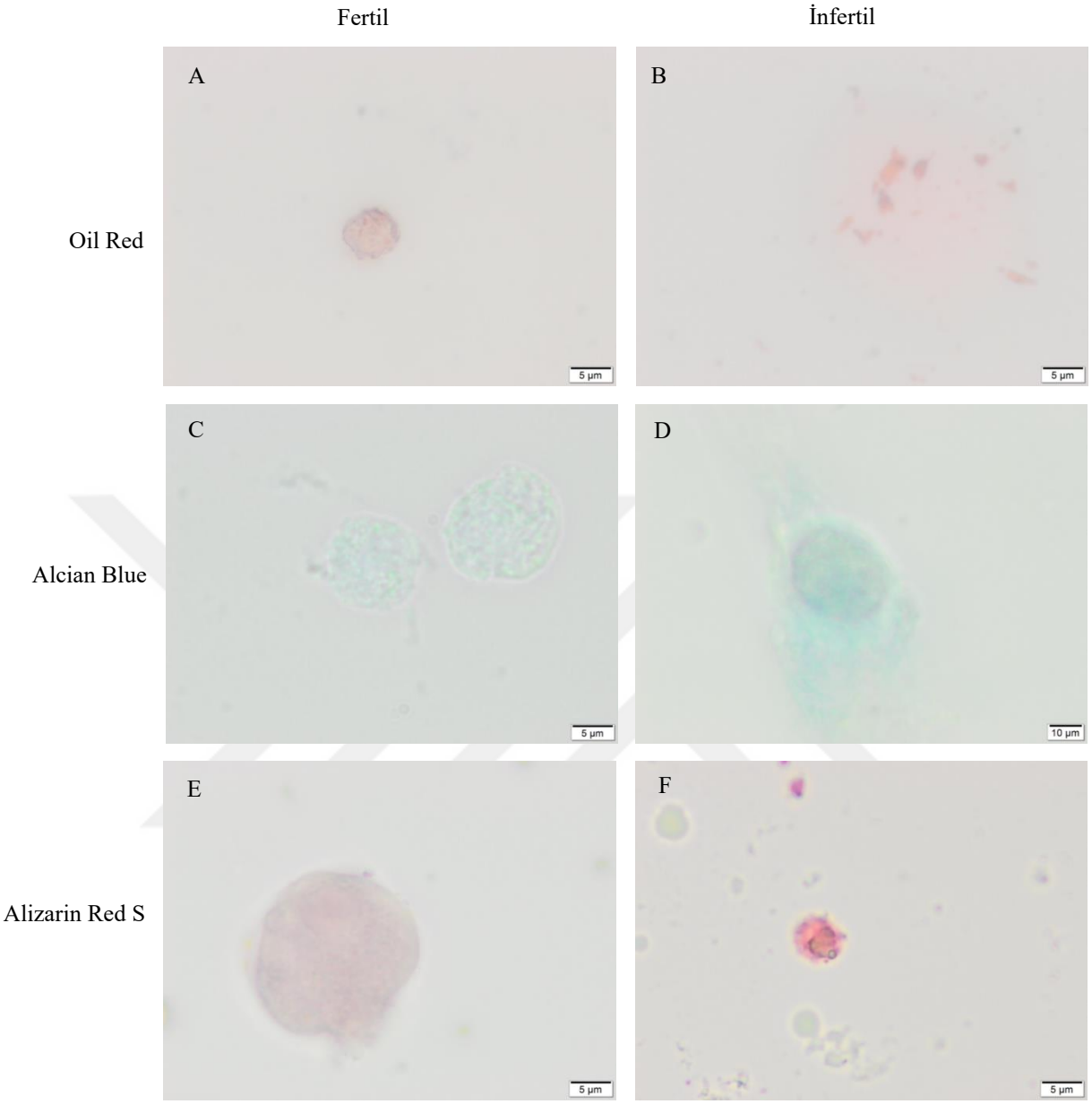
Hem kollajenaz I hem de ficoll ile elde edilen MenKH'lerin kök hücre olarak değerlendirilebilmeleri için üç farklı (adipojenik, kondrojenik ve osteojenik) seri hücreye farklılaşma protokolleri kapsamında 21 gün süre ile kültüre devam edildi ve farklılaşmanın 7., 14. ve 21. günlerinde Oil Red, Alizarin Red S ve Alcian Blue boyamaları yapıldı.

Farklılaşmanın 7. (Şekil 3.5A, B, C),14. (Şekil 3.5D, E, F) ve 21. (Şekil 3.5G, H, I) günlerinde ficoll protokolü ile elde edilen fertil hasta kaynaklı MenKH'lerde oil red (Şekil 3.5A, D, G), alcian blue (Şekil 3.5B, E, H) ve alizarin red S (Şekil 3.5C, F, I) boyamalarında boyanma gözlenmedi.



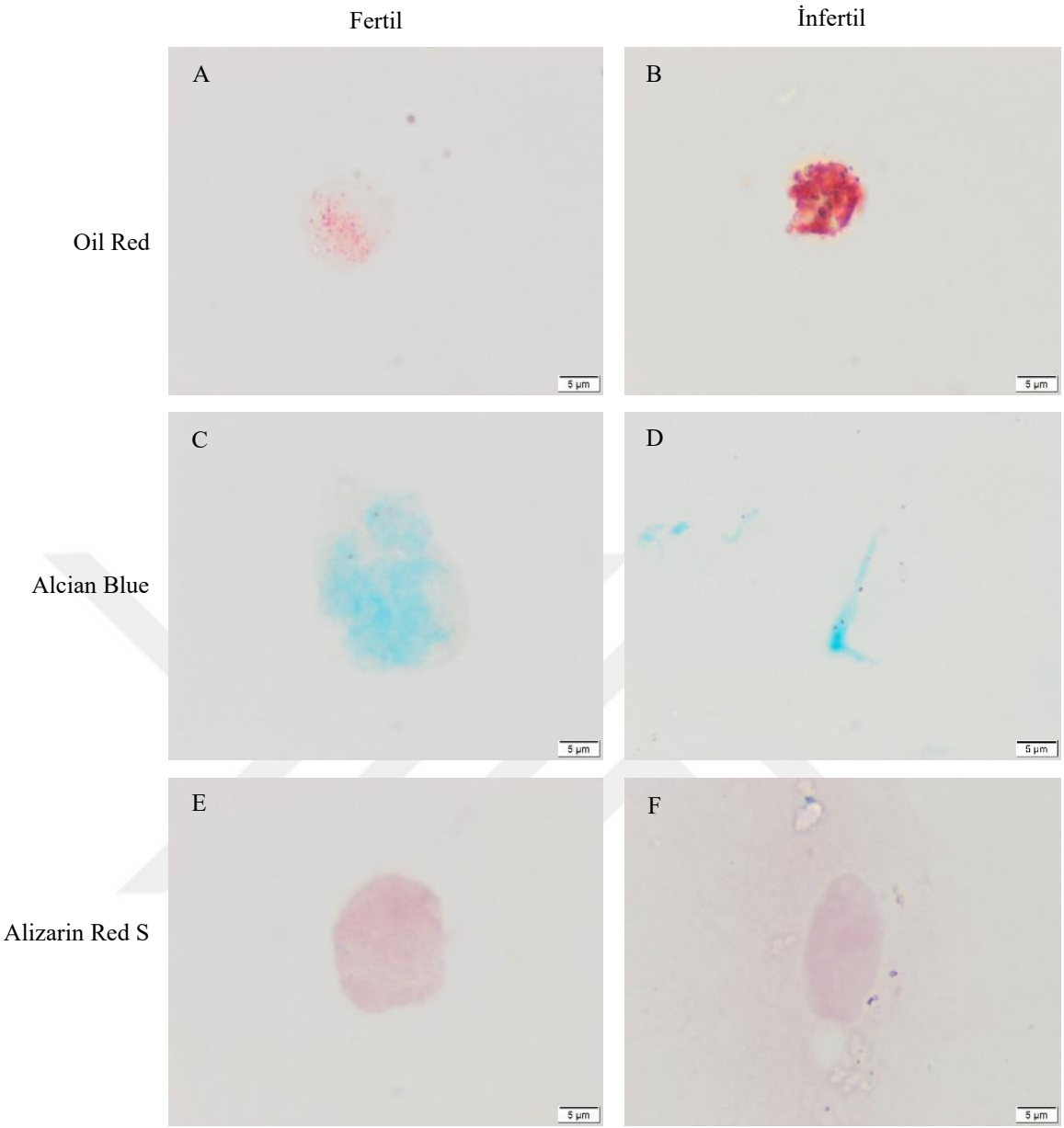
Şekil 3.5 Fertil hasta örneğinden ficoll ile elde edilen MenKH'lerin farklılaşma protokolünün 7. Gün (A, B, C), 14. gün (D, E, F) ve 21. Gün (G, H, I) kültürü sonrası Oil Red (A, D, G), alcian blue (B, E, H) ve alizarin red S (C, F, I) boyama görüntüleri. Ölçek: 10 µm.

Hem fertil (Şekil 3.6A, C, E) hem de infertil (Şekil 3.6B, D, F) hasta örneklerinden kollajenaz I protokolü sonrasında elde edilen MenKH'lerin farklılaşmanın 7. gününde sitoplazmalarının Oil Red ile turuncu-kırmızı olarak boyandığı (Şekil 3.6A, B) saptandı. Ayrıca hem kondrojenik (Şekil 3.6C, D) hem de osteojenik (Şekil 3.6E, F) farklılaşma için yapılan boyamalar sonucunda hem fertil hem de infertil hastadan elde edilen MenKH'lerde boyanma saptandı.



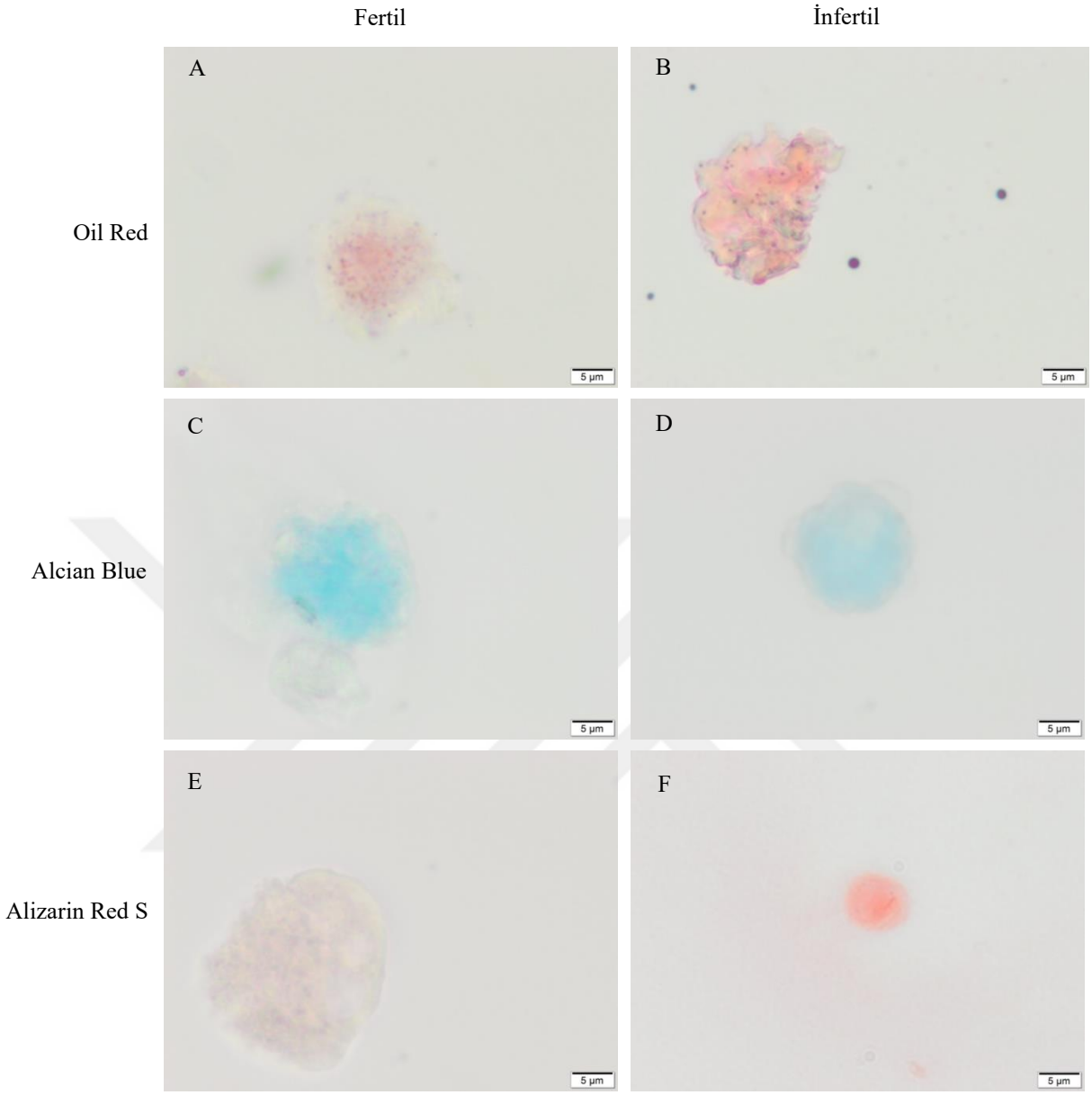
Şekil 3.6 Fertil (A, C ve E) ve infertil (B, D ve F) hasta örneklerinden kollajenaz I ile elde edilen MenKH'lerin farklılaşma protokolünün 7. gün kültürü sonrası Oil Red (A, B), alcian blue (C, D) ve alizarin red S (E, F) boyama görüntüleri. Ölçek: 5 µm.

Farklılaşmanın 14. gününde Oil Red boyamasının kollajenaz I ile elde edilen hem fertil (Şekil 3.7A) hem de infertil hasta (Şekil 3.7B) MenKH'lerinde artış gösterdiği bulundu. Bunun yanında kondrojenik ve osteojenik farklılaşma için yapılan sırasıyla Alcian Blue (Şekil 3.7C, D) ve Alizarin Red S (Şekil 3.7E, F) boyamaları sonrasında hem fertil hem de infertil hasta hücrelerinde boyanma saptandı.



Şekil 3.7 Fertil (A, C ve E) ve infertil (B, D ve F) hasta örneklerinden kollajenaz I ile elde edilen MenKH'lerin farklılaşma protokolünün 14. gün kültürü sonrası Oil Red (A, B), alcian blue (C, D) ve alizarin red S (E, F) boyama görüntüleri. Ölçek: 5 µm.

Farklılaşmanın son günü olan 21. günde yapılan tüm boyamalarda boyanma saptandı ve özellikle Oil red (Şekil 3.8A, B) ve Alcian blue (Şekil 3.8C, D) boyamalarında boyanma şiddetinin arttığı görüldü.



Şekil 3.8 Fertil (A, C ve E) ve infertil (B, D ve F) hasta örneklerinden kollajenaz I ile elde edilen MenKH'lerin farklılaşma protokolünün 21. Gün kültürü sonrası Oil Red (A, B), Alcian Blue (C, D) ve Alizarin Red S (E, F) boyama görüntüleri. Ölçek: 5 µm.

3.2. Çalışma Grupları ve Uygulamalar

Fertil (Grup 1 ve Grup 3) ve infertil (Grup 2 ve Grup 4) hastalardan elde edilen MenKH'ler 30 gün metformin uygulanan (Grup 3 ve Grup 4) ve metformin uygulanmayan kontrol hücreleri (Grup 1 ve Grup 2) olarak dört grup halinde kültüre edildi. Hücrelerin kültürü esnasında her gün hücre kültür vasatları değiştirildi.

Ardından hücreler %4 paraformaldehit ile fikse edildi ve indirekt immunoperoksidaz tekniği kullanılarak MATE1, OCT2, OCT3/4, IGF1, LIF, MUC1 ve Integrin αVβ3 immunoreaktiviteleri değerlendirildi. Antikorların dağılımları gruplar arasında istatistiksel olarak değerlendirildi.

MATE1 immunoreaktivitesi grup 1 (Şekil 3.9A) ve grup 4'de (Şekil 3.10B) kuvvetli (+++) şiddette pozitif iken, grup 2 (Şekil 3.10A) ve grup 3'te (Şekil 3.9B) orta (++) şiddette idi. İstatistiksel analiz sonucunda gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 3.11A).

OCT-2 immunoreaktivitesi grup 1 (Şekil 3.9C) ve grup 3'te (Şekil 3.9D) orta (++) şiddette idi (Tablo 3.1). Grup 2 (Şekil 3.10C) ve grup 4'te (Şekil 3.10D) ise kuvvetli (+++) şiddette Oct-2 immunoreaktivitesi izlendi. Ancak gruplar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 3.11B).

OCT3/4 immunoreaktivitesi grup 1 (Şekil 3.9E), grup 2 (Şekil 3.10E) ve grup 4'te (Şekil 3.10F) negatif (-) iken grup 3'te (Şekil 3.9F) zayıf (+) şiddette idi. OCT3/4 'ün grup 3 deki yoğunluğu hem grup 1 hem de grup 4 den daha fazla olduğu ve istatistiksel olaraktan anlamlı olduğu saptandı ($p= 0.007$, Şekil 3.11C).

IGF1 immunoreaktivitesinin grup 1 (Şekil 3.9G) ve grup 3'te (Şekil 3.9H) negatif (-) iken grup 2'de (Şekil 3.10G) orta (++) şiddette, grup 4'te (Şekil 3.10H) ise zayıf (+) şiddette olduğu değerlendirildi. IGF1 yoğunluğu grup 1 ve grup 2 karşılaştırması sonrasında istatistiksel olarak anlamlı idi ($p= 0.002$, Şekil 3.11D).

LIF immunoreaktivitesi grup 1 (Şekil 3.9I) ve grup 2'de (Şekil 3.10I) negatif (-) iken, grup 3 (Şekil 3.9J) ve grup 4'te (Şekil 3.10J) zayıf (+) şiddete idi. LIF yoğunluğu grup 1 ve grup 3 karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ve p değeri 0.015 olarak saptandı (Şekil 3.11E). Grup 2 ve grup 4 karşılaştırıldığında ise LIF immunoreaktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p= 0.05$, Şekil 3.11E).

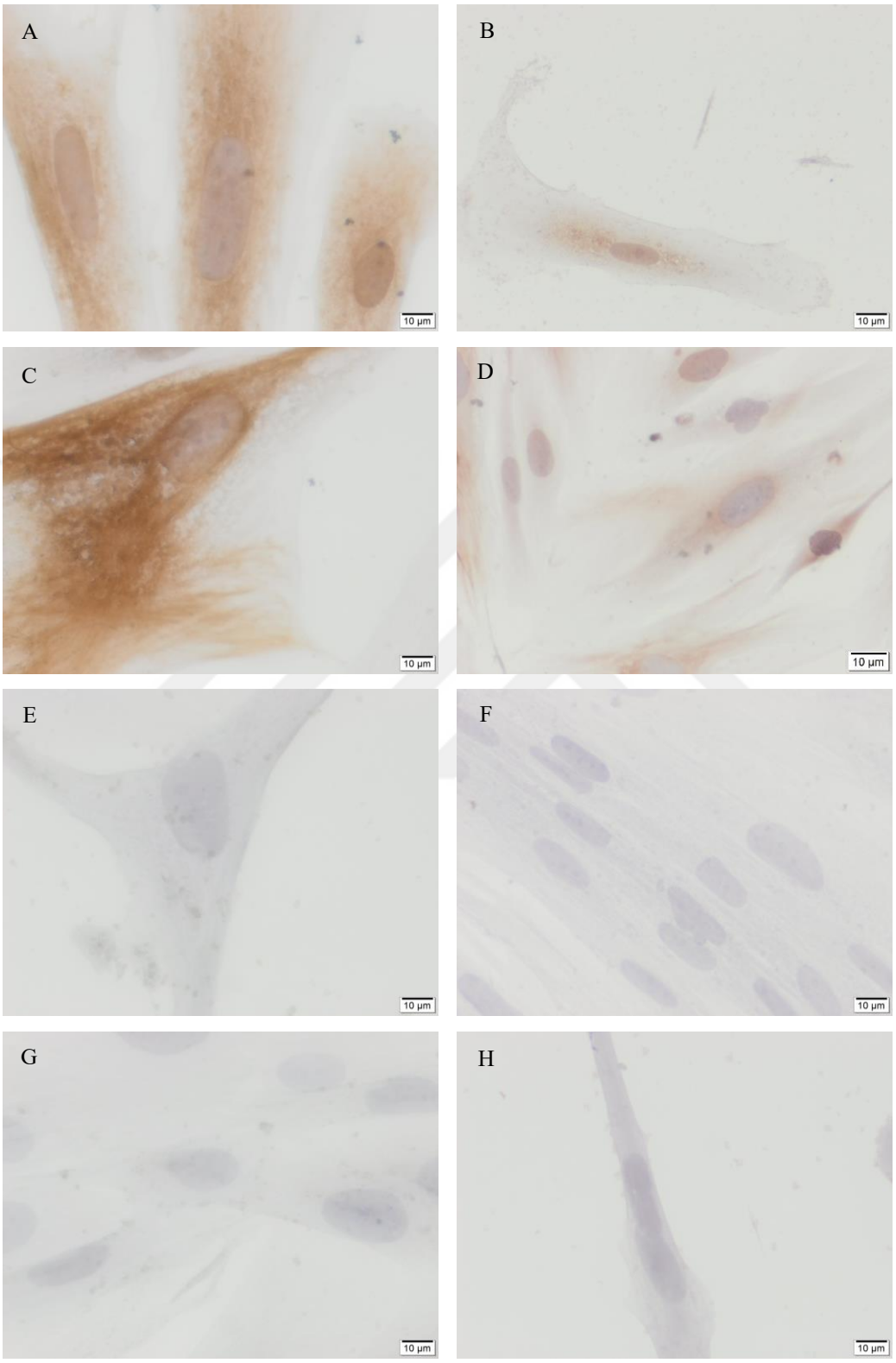
MUC1 immunoreaktivitesi grup 1 (Şekil 3.9K) ve grup 3'te (Şekil 3.9L) negatif (-) iken, grup 2 (Şekil 3.10K) ve grup 4'te (Şekil 3.10L) zayıf (+) şiddette idi. Grup 1 ve grup 2 istatistiksel olarak karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı iken ($p= 0.005$), diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (Şekil 3.11F).

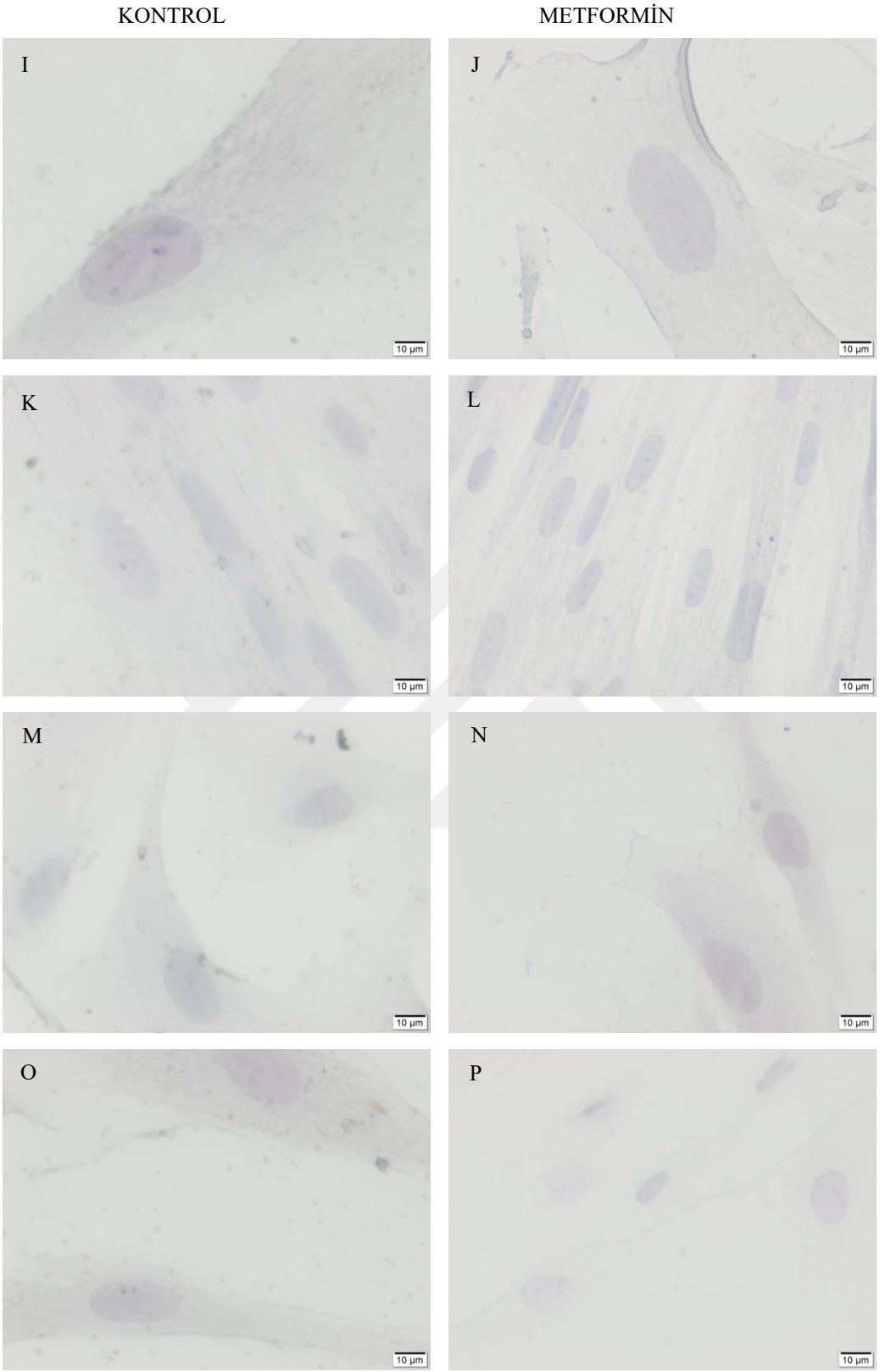
İntegrin αVβ3 immunoreaktivitesi metformin uygulaması yapılan grup 3 (Şekil 3.9N) ve grup 4'te (Şekil 3.10N) zayıf (+) immunoreaktivite gösterirken, grup 1 (Şekil 3.9M) ve grup2'de (Şekil 3.10M) negatif (-) idi. İstatistiksel olarak anlamlılık grup 1 ve grup 3 karşılaştırıldığında saptandı (p= 0.011, Şekil 3.11).

Tablo 3.1 Fertil (Grup 1 ve Grup 3) ve infertil (Grup 2 ve Grup 4) hastalardan elde edilen MenKH'lerde immunohistokimya analizi sonrası antikor yoğunlukları

Grup/Antikor	MATE1	OCT2	OCT3/4	IGF1	LIF	MUC1	αVβ3
Grup 1	+++	++/+++	-	-	-	-	-
Grup 2	++/+++	+++	-	++	-	+	-
Grup 3	++/+++	++/+++	+/-	+/-	+/-	-	+
Grup 4	+++	+++	-	++/+	+/-	+	+

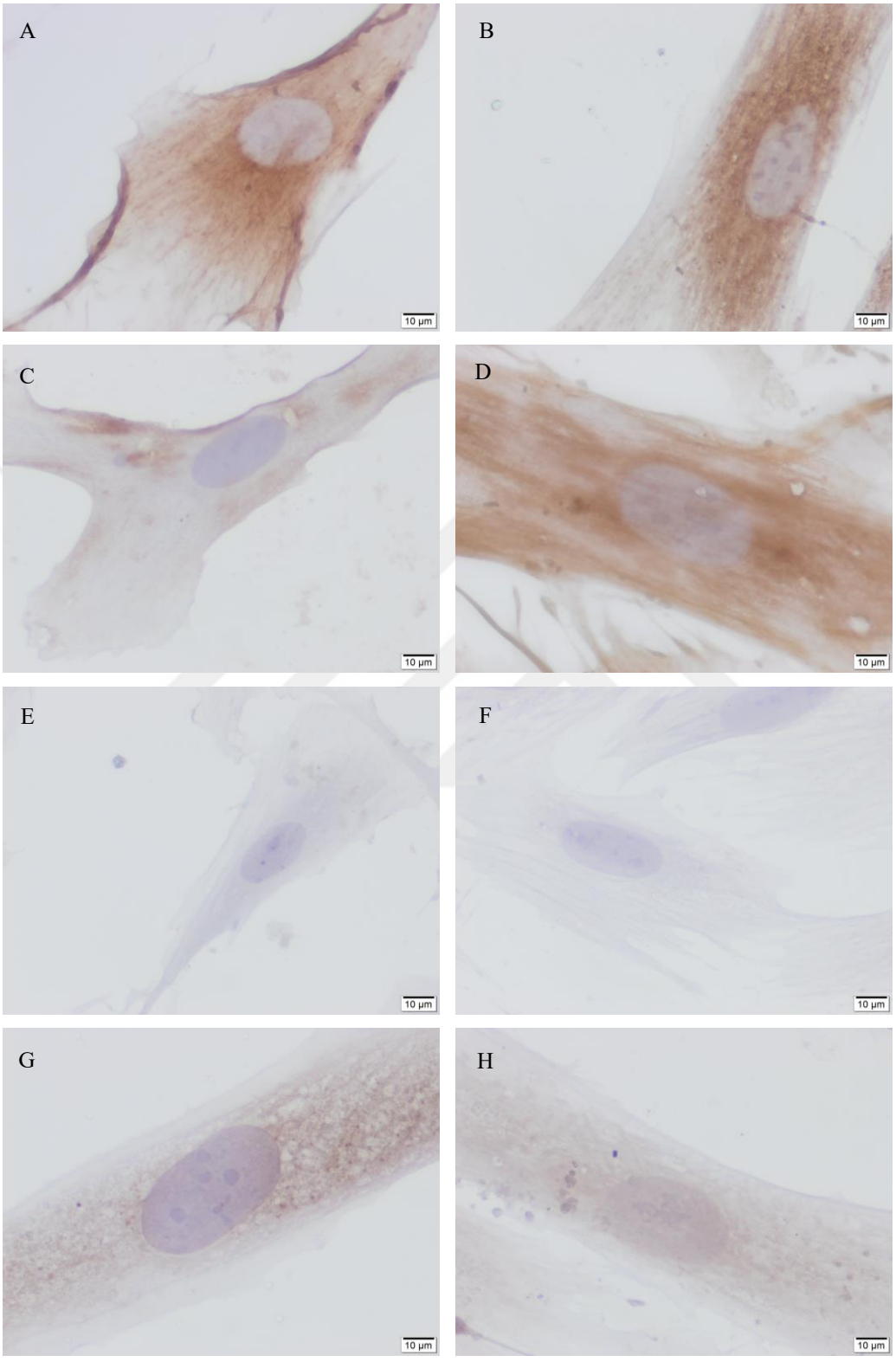
KONTROL METFORMİN

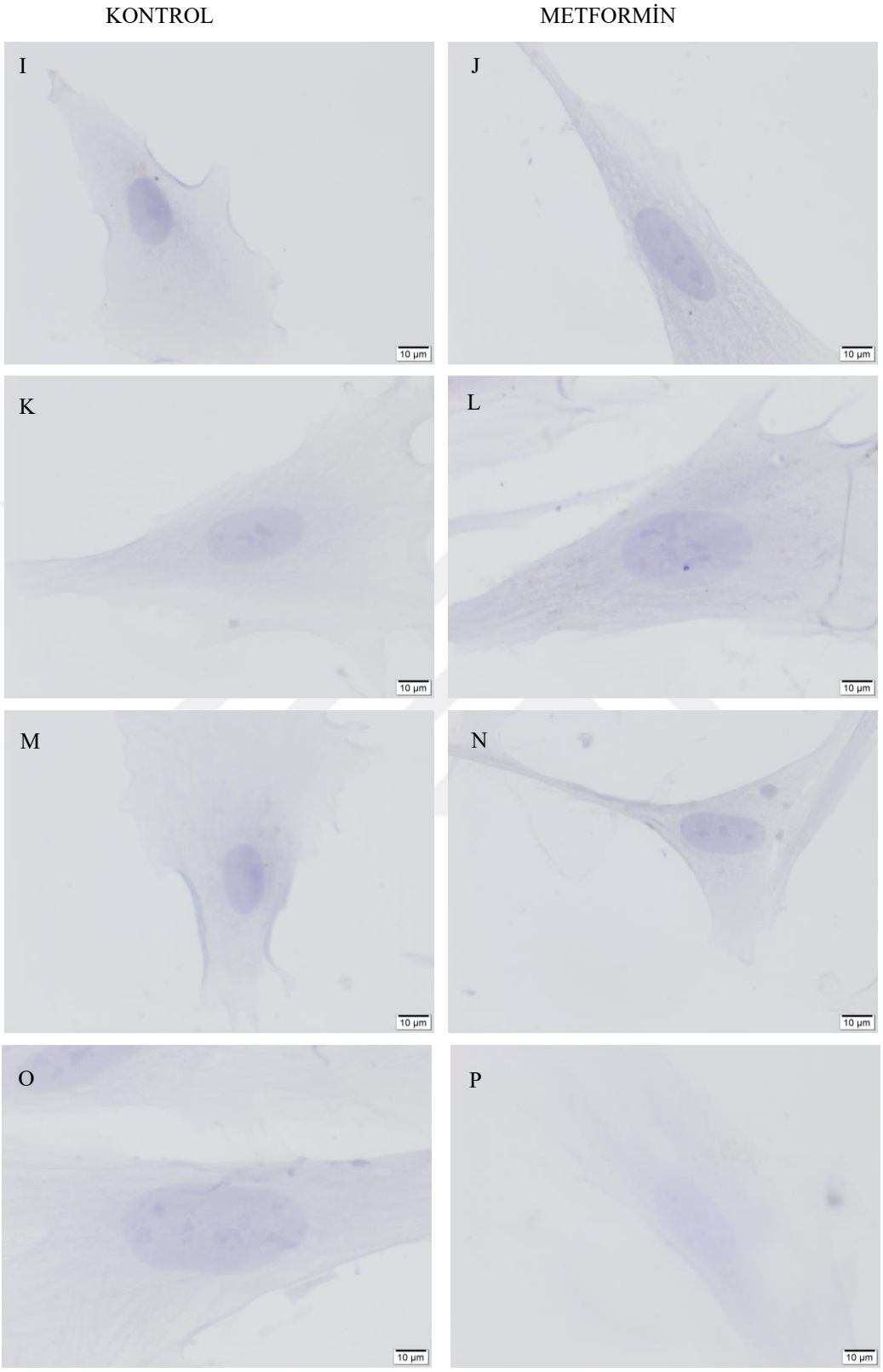




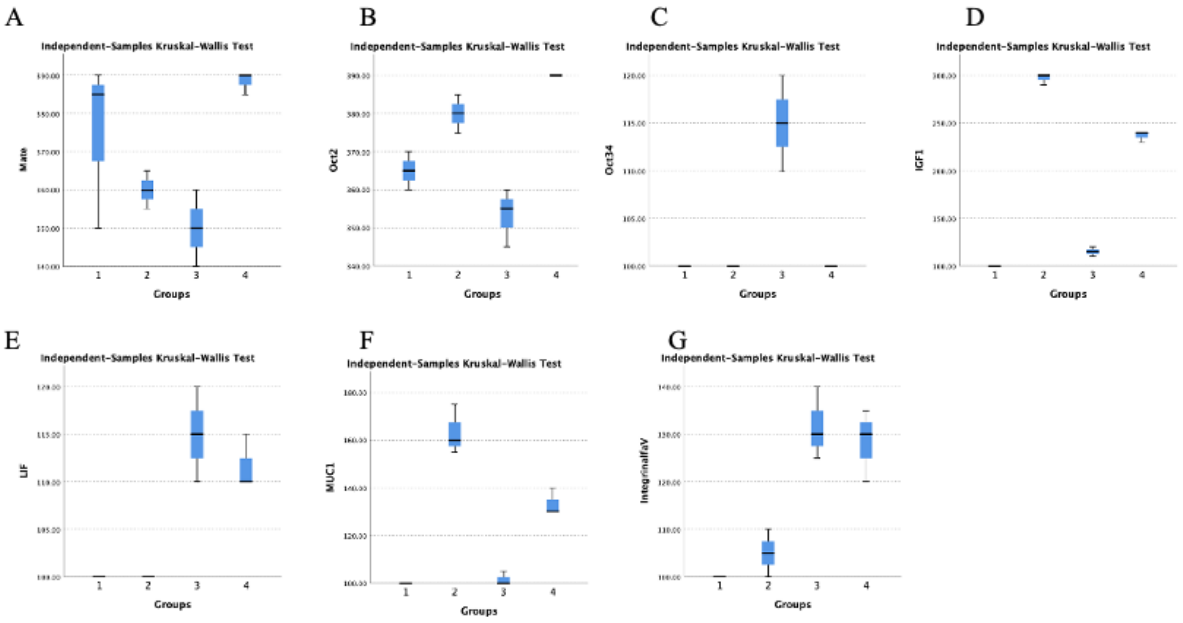
Şekil 3.9 Fertil hastalardan elde edilen MenKH'lerde kontrol (grup 1) ve metformin (grup 3) uygulaması sonrasında MATE1(A, B), OCT2 (C, D), OCT3/4 (E, F), IGF1 (G, H), LIF (I, J), MUC1 (K, L) ve integrin αVβ3 (M, N) ve kontrol immunohistokimya (O, P) görüntüleri. Ölçek:10 µm.

KONTROL METFORMİN





Şekil 3.10 Infertil hastalardan elde edilen MenKH'lerde kontrol (grup 2) ve metformin (grup 4) uygulaması sonrasında MATE1(A, B), OCT2 (C, D), OCT3/4 (E, F), IGF1 (G, H), LIF (I, J), MUC1 (K, L) ve integrin αVβ3 (M, N) ve kontrol immunohistokimya (O, P) görüntüleri. Ölçek: 10 µM.



Şekil 3.11 Çalışma gruplarında Kruskal Wallis testi kullanılarak antikorlara ait yoğunlukların istatistiksel karşılaştırma sonuçları.

4. TARTIŞMA

Menstrual kök hücreler, invaziv olmayan ve kolay erişilebilir bir yöntemle elde edilebilmeleri, farklı hücre popülasyonlarına çoğalma potansiyeline sahip olmaları, pluripotent özellikler göstermeleri, düşük immünojenitede olmaları ve etik sorunlara yol açmamaları gibi avantajları ile dikkat çekmektedir. Bu özellikler sayesinde MenKH'ler rejeneratif tıp alanında kullanılabilecek umut verici mezenkimal kök hücreler olarak değerlendirilmektedir (Uzieliene ve ark., 2018; Chen ve ark., 2019).

MenKH'ler pluripotent ve embriyonik kök hücre yüzey belirteçlerinden OCT-4, SSEA-4 ve c-kit'i, mezenkimal kök hücre belirteçlerinden CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146 güçlü bir şekilde ifade ederler (Sanchez-Mata ve ark., 2021; Uzieliene ve ark., 2018; Chen ve ark., 2019).

MenKH'ler ilk defa Meng ve arkadaşları tarafından elde edildikten sonra morfolojileri belirlenmiş ve karakterizasyonları yüzey belirteçlerinin (CD9, CD29, CD41a, CD44, CD59, CD73, CD90 ve CD105) ekspresyonları ile tanımlandı (Meng ve ark., 2007). Bunun yanında bu hücrelerin, kardiyomiyosit, solunum epitel hücresi, nöron, kas hücresi, endotel, pankreas hücresi, hepatosit, adiposit ve osteoosit olmak üzere 9 farklı hücre tipine farklılaşabildikleri gösterildi (Meng ve ark., 2007).

MenKH'lerin yaralanma bölgelerine göç etme, çözünür faktörlerin salgılanması ve bağışıklık tepkilerinin düzenlenmesi gibi farklı biyolojik süreçlerde rol oynadığı da gösterilmiştir (Chen ve ark., 2019). Yapılan çeşitli çalışmalar ile MenKH'lerin vasküler yeniden şekillendirme ve doku onarımında aktif rolünün olduğu ortaya konulmuştur (Chen ve ark., 2017; Lv ve ark., 2018; Lu ve ark., 2016). Lu ve arkadaşlarının farelerde yaptıkları bir çalışmada MenKH hücrelerinin akut karaciğer hasarının tedavisinde etkili olabileceği ve genel olarak doku rejenerasyonunu desteklediği gösterilmiştir (Lu ve ark., 2016). Ayrıca lentivirüsler ile MenKH'lerin uygulamaları sonrasında gen iletimi içinde bu hücrelerin kullanılabileceğinin gösterilmiş olması (Lv ve ark., 2018) MenKH'lerin sadece rejeneratif tıpta değil, diğer araştırma alanlarında da kullanılabilecek kök hücre kaynağı olduğunu desteklemektedir.

MenKH hücreleri farklı yöntemler kullanılarak elde edilmiştir (Meng ve ark., 2007; Zhau ve ark., 2018; Tavakol ve ark., 2018; Skliut'e ve ark., 2018). Meng ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, menstrual siklus sırasında toplanan

menstrual kan örneklerinden Ficoll yöntemiyle MenKH'ler elde edilmiştir. Benzer şekilde, Zhau ve arkadaşları, Ficoll kullanarak MenKH elde etmeyi başarmışlardır (Zhau ve ark., 2018). Kültür sonrasında, Meng ve arkadaşları, MenKH hücrelerinin fibroblast benzeri morfolojiye sahip, adeziv hücreler olduğunu bildirmişlerdir. Aynı morfolojik özellikler, başka araştırmacılar tarafından da gözlemlenmiştir (Cui vd., 2007; Meng vd., 2007; Toyoda vd., 2007; Allickson ve Xiang, 2012). Kültüre edilen MenKH'lerin, 24 saat içinde sayılarının iki katına çıktığı da Zhau ve arkadaşları tarafından ortaya konulmuştur (Zhau ve ark., 2018).

Diğer bir MenKH elde etme yöntemi ise kollajenaz kullanımına dayanmaktadır. Kollajenaz I, matriks metalloproteinazlar ailesinin bir üyesidir ve doğal kollajen fibrillerini parçalayan başlıca insan enzimidir. Bu enzim, özellikle bağ dokularında, cilt, tendon, kan damarları ve kemik gibi dokularda bulunan üçlü sarmallı kollajeni parçalayan benzersiz özelliklere sahiptir. Kollajenaz, bu dokuların kültürlenmesinde yaygın olarak kullanılır ve ayrıca insan tümörleri, fare böbreği ve beyin dokusu gibi çeşitli doku türlerinin kültürlerinde de primer hücre elde edilmesi için uygun olduğu da gösterilmiştir. Tavakol ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, hastalardan alınan menstrual kan örneklerini kollajenaz I (1 mg/ml) ile 37°C'de 30-45 dakika inkübe etmişlerdir ve ardından hücrelerin eldesini sağlamışlardır (Tavakol ve ark., 2018). Skliut'e ve arkadaşları ise benzer bir şekilde kollajenaz II kullanarak MenKH elde etmişlerdir (Skliut'e ve ark., 2018). Her iki çalışmada da, kollajenaz I ve kollajenaz II kullanılarak elde edilen hücrelerin fibroblast benzeri, adeziv özellikler taşıyan ve kümeler halinde büyüyen yapıda olduğu gözlemlenmiştir.

Çalışmamızda menstrual kandan kök hücre eldesi için en yaygın kullanılan kollajenaz I ve ficoll olmak üzere iki farklı protokol denendi. Elde edilen hücrelerin mezenkimal kök hücre benzeri hücreler olduğunun belirlenmesi için avrupa kök hücre derneğinin belirlemiş olduğu kriterlerden kültür kabına yapışma özelliği, üç farklı hücre serisine farklılaşma potansiyelleri ve yüzey belirteçlerinin tanımlanması kullanıldı (https://www.hoganlovells.com/en/publications/regulation-of-stem-cell-use-in-the-eu). Çalışma amacımıza uygun olarak fertil ve infertil hastalardan ficoll ve kollajenaz I ile ayrı ayrı elde edilen MenKH'lerin kültür kabına yapışmış, fibroblastik karakterde hücreler olduğu saptandı. Ancak ficoll protokolü ile elde edilen hücrelerin hem çoğalma potansiyellerinin azalması hem de fibroblast benzeri morfolojik özelliklerini kültüre devam edildiğinde kaybettiklerinin gözlenmesi nedeni ile ficoll protokolünün çalışmamızda MenKH eldesi için uygun olmadığına karar verildi.

Kollajenaz I ile elde edilen MenKH hücrelerinin morfolojilerini koruyup kümeler halinde çoğalmalarını sürdürdükleri izlendi. Ayrıca kollajenaz I ile elde edilen MenKH'lerin hem fibroblast benzeri karakterini koruması hem de pasajlanma protokolleri sonrasında canlılık ve çoğalma kapasitelerinde azalma olmaması nedeni ile kollajenaz I ile çalışmaya devam edilmesine karar verildi.

MenKH hücrelerinin farklılaşma potansiyellerinin analiz edildiği adipojenik, kondrojenik ve osteojenik seri hücrelerine farklılaşma protokollerinde standart ticari kit kullanıldı. Farklılaşma analizleri protokollerin 7., 14. Ve 21. Gününde değerlendirildi. Farklılaşma protokolünün ilk analiz gününden itibaren ficoll protokolü ile elde edilen hücrelerde her üç seriye ait boyamalarda boyanmanın gözlenmemesi üzerine ficoll protokolünün MenKH eldesinde çalışmamızda uygun olmadığına karar verildi.

Kollajenaz I protokolü ile elde edilen MenKH'lerin farklılaşma analizlerinde ise adipojenik seriye ait farklılaşmanın kültürün 1. haftasından itibaren gözlendiği ve kültürün 3. haftasında da devam etmiş olması elde edilen hücrelerin kök hücre benzeri hücreler olma özelliğini desteklemektedir. Kondrojenik ve osteojenik farklılaşmada ise kültürün 1. Haftasında hücre sitoplazmasında zayıf bir boyanma görülürken, 2. ve 3. haftalarında ise boyanmaların daha fazla olduğu görülmesi üzerine bu protokol ile elde edilen MenKH'lerin mezenkimal kök hücre benzeri olma kriterlerini göstermektedir. Kondrojenik ve osteojenik farklılanmada kullanılan standart kit protokolüne sırası ile 14. ve 21. günlerde boyanmanın olması gerekliliği belirtildiğinden ilk analiz günü olan 7. Günde boyanmaların olmaması beklenen sonuç idi. Kültürün 14. ve 21. günlerinde ise hücre sayısının az olmasından dolayı matriks oluşumu gözlenmese de boyanmaların olduğu gözlendi.

Mezenkimal kök hücre benzeri kriteri kapsamında son değerlendirme olan mezenkimal kök hücre pozitif ve negatif belirteçleri immunositokimya ile değerlendirildi. Menstrual kandan elde edilen MenKH'ler CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146 vb yüzey belirteçlerinin pozitif, CD31, CD34 ve CD45 gibi kök hücre belirteçlerinin ise negatif olduğu bilinmektedir (Skliut'e ve ark., 2018; Sanchez-Mata ve ark., 2021). Kollajenaz I protokolü sonrasında hem fertil hem de infertil hasta örneklerinden elde edilen MenKH'lerin CD44 immunoreaktivitesinin pozitif ve CD34 immunoreaktivitesinin negatif olması çalışma kapsamında elde edilen hücrelerin mezenkimal kök hücre benzeri hücreler olduğunu desteklemektedir.

Metformin tip 2 diyabet tedavisinde sıklıkla kullanılan bir ilaç olmakla birlikte MATE1 ve OCT2 gibi taşıyıcıların aktivitesinde rol oynar. Bu taşıyıcılar mertforminin alım ve eliminasyonunda görevlidir. MATE1'in, metformin hücresel alımını aracılık ettiği Verma ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (Verma ve ark., 2019). Böbrek ve karaciğerde MATE'ler, organik katyon taşıyıcıları (OCT'ler) ile birlikte çalışarak, organik katyonlar için bir eliminasyon yolu oluştururlar (Staud ve ark., 2013). Çalışmamızda infertil hasta menstrual kanından elde edilen MenKH'lerde metformin uygulanmasının ardından MATE1 ve OCT2 immunoreaktivitelerinde artış olduğu görüldü. Bu bulgu, böbreklerde metforminin işlenmesinde MATE1 ve OCT2'nin bilinen rolüyle tutarlıdır (Toyama ve ark., 2012) ve metforminin bu hücrelerdeki hücresel alımı ve dışarı atımını etkileyebileceğini düşündürmektedir. Ek olarak, infertil hastadan elde edilen kök hücrelerde metformin tedavisinin ardından MATE1 ve OCT2 için artmış immünoreaktivite saptanması, ilaca yanıt olarak bu taşıyıcıların telafi edici bir şekilde upregülasyonuna işaret ediyor olabilir. Bu, özellikle infertilite ile ilişkili olduğu düşünülen insülin direnci, obezite ve polikistik over sendromu gibi metabolik bozukluklarda sıklıkla görülen, metabolizması veya atılım yolları değişmiş olabilecek kişilerde metformin klirensini artırmak için bir tedavi mekanizması olabilir (He ve ark., 2019). Bunun yanında fertil hasta menstrual kanından elde edilen kök hücrelere metformin uygulanmasının (grup 3) ardından hem MATE1 hem de OCT2 immunoreaktivitesinin azaldığı görüldü. Bu bulgu, grup 2 ve grup 4 MenKH'lerinin verdiği cevapla zıtlık oluşturmaktadır. Elde edilen bu veriler MATE1 ve OCT2 taşıyıcılarının bazal aktivitesinin, fertil kadınlarda organik katyon taşımacılığını dengelemek için yeterli olabileceğini düşündürdü. Fertil hasta örneklerine metformin uygulanmasının ardından, hücresel sistem, hücresel homeostazın bozulmasını önlemek için MATE1 ve OCT2'nin ifadesini downregüle eden bir mekanizmayı tetiklemiş olabilir. Bu şekilde hücre içi metformin birikimine karşı koruyucu bir mekanizma ortaya çıkabilir ve fertil hücrelerde, metforminin aşırı hücre içi tutulmasını sınırlanabilir. Böylece olası toksisiteden kaçınılabilir. Fertil ve infertil hasta MenKH'lerinde MATE1 ve OCT2'deki bu farklılıklar, metforminin farmakodinamiği için önemli sonuçlardır ve özellikle farklı metabolik profillere sahip bireylerde metformin tedavisinde kişiselleştirilmiş yaklaşımlara olan ihtiyaç olabileceğini düşündürdü.

MenKH'lerin mezenkimal kök hücre belirteçlerinin yanında bazı pluripotensi belirteçlerini ifade ettiği de gösterildi (Chen ve ark., 2019). Shariati ve arkadaşları

tarafından OCT4 ekspresyonunun endometriumda menstruasyon sırasında düşük olduğu gösterildi. Bizim çalışmamızda ise grup 1, grup 2 ve grup 4'te OCT3/4 immunoreaktivitesinin negatif ve grup 3'te ise zayıf olarak saptanmış ve istatistiksel olarak anlamlı olan sonuç ile infertil grup MenKH'lerinde OCT3/4 fertil gruptan farklı olduğunu ve metformin uygulaması ile fertil gruba benzerlik göstererek azalmış olası önemlidir.

İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1), karaciğerde üretilen anabolik bir hormondur (Yang, 2020). IGF-1, insülin metabolizması ve hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptoz gibi büyüme hormonu ile ilgili biyolojik aktiviteleri düzenlemede önemli bir rol oynar. İnsanlarda metformin alımının IGF-1 seviyesi üzerindeki etkisini incelemek için çeşitli çalışmalar yürütülmüştür (Cai ve ark., 2016; Irani ve ark., 2018). Bununla birlikte, metformin ve IGF-1 düzeyleri arasındaki ilişkiye ilişkin yapılan farklı çalışmaların tutarsız ve bazen çelişkili bulgularında ortaya konulduğu görülmektedir. Örneğin, Cai ve ark. ile Hamed ve ark. metformin alımının IGF-1 düzeyinde önemli bir azalmaya yol açabileceğini ortaya koyarken, Díaz ve ark. ile Yates ve ark. metformin müdahalesinin ardından IGF-1 düzeyinde herhangi bir önemli değişiklik olmadığını göstermiştir (Cai ve ark., 2016; Hamed ve ark. 2010; Díaz ve ark., 2015; Yates ve ark.,2018). İrani ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise sıçan uterin sıvısında yüksek IGF-1 düzeyinin embriyo gelişimi üzerinde zararlı etkilere sahip olduğu ve muhtemelen gebelik kaybında artışa yol açtığı gösterilmiştir (İrani ve ark., 2018). Yapmış olduğumuz çalışmamızda fertil hastalarda metformin uygulaması sonrasında IGF-1 immunoreaktivitesinde belirgin bir değişiklik olmadığı ve negatif immunoreaktivitede olduğu görülürken infertil hastalarda mertformin uygulaması sonrasında IGF-1 seviyesinde bir miktar azalma olduğu belirlendi. Ayrıca infertil MenKH'lerinde IGF-1 yoğunluğunun istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı olması, infertil hastalarda görülen yüksek IGF-1 immunoreaktivitesinin metformin ile düzenlenebileceğini ve bu uygulama ile infertiliteye olumlu yönde katkıda bulunulabileceğini düşündürdü.

Lösemi inhibitör faktörü (LIF), üreme sürecinde rolü olan önemli bir glikoproteindir ve özellikle implantasyonun düzenlenmesinde kritik rol oynamaktadır (Steck ve ark., 2004). LIF'in endometriumda en yüksek seviyesi implantasyon sırasında görülmektedir (Lass ve ark., 2001). LIF ayrıca uterin yıkama sonrasında da tespit edilmiştir ve sebebi açıklanamayan infertilitesi olan kadınlarda önemli ölçüde daha düşüktür (Lass ve ark., 2001). Tsai ve ark. ise fertil kadınların endometriumunda,

infertil kadınlarınkinden daha belirgin LIF ekspresyonu varlığını vurgulamak ile birlikte LIF ekspresyonunun lüminal epitelde en yüksek, glandüler epitelde orta ve stromada en düşük olduğunu gösterdi (Tsai ve ark., 2000). Çalışmamızda grup 1 ve grup 2'de MenKH hücrelerinde LIF immunoreaktivitesinin negatif olması ve metformin uygulanması sonucunda LIF immunoreaktivitesindeki zayıf artış saptanması metforminin LIF düzenlenmesinde katkı sağlayabileceğini düşündürdü. Bunun yanında grup 1 ve grup 2'de görülen negatif immunoreaktivite bu hücrelerin stroma kaynaklı olmasından dolayı olduğuda söylenebilir.

Transmembran musin glikoproteini (MUC1), adezyon önleyici bir role sahiptir ve uterusun non-reseptivite durumunun sürdürülmesi için işlev görür. Zarei ve arkadaşları MUC1 seviyesinin diyabetik sıçan endometriumunda yüksek olduğunu metformin uygulamasının ardından ise MUC1 seviyesinin düştüğünü göstermiştir (Zarei ve ark.,2020). Benzer şekilde çalışmamızda fertil hasta gruplarında MUC1 immunoreaktivitesi negatif iken, infertil hasta grubu olan Grup 2'de zayıf immunoreaktivite görüldü ve metformin uygulamasının ardından Grup 4'te immunoreaktivitenin azaldığı izlendi. Bu bulgular, metforminin MUC1 ekspresyonunu düzenleyerek endometrial reseptivitesini etkileyebileceğini ve implantasyon potansiyelini artırabileceğini desteklemektedir.

İntegrinler, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimini düzenleyen bir transmembran glikoprotein ailesidir (Wu ve ark., 2018). Orta luteal fazda, implantasyonun gerçekleşmesinin beklendiği süreçte, integrin ekspresyonu belirgin şekilde artar. Bu nedenle, integrinler potansiyel olarak implantasyon penceresinin çerçevesi için belirteç görevi görebilir (Elnaggar ve ark., 2017). Çalışmamızda integrin αVβ3 immunoreaktivitesi grup 1 ve grup 2 de negatif iken metformin uygulamasının ardından Grup 3 ve Grup 4 hücrelerinde zayıf immunoreaktivite gösterdi. İstatistiksel olarak infertil hasta örneklerinde daha fazla olduğu değerlendirilen αVβ3 'ün MenKH hücrelerinin menstruasyon sırasında elde edilmesinden kaynaklanabileceğini düşündürdü.

Sonuç olarak çalışmada kollajenaz I protokolü ile fertil ve infertil hasta örenklerinden elde edilen hücrelerin daha stabil ve morfolojik olarak daha tutarlı olması, MenKH elde edilmesinde uygun olan protokol olduğunu göstermektedir. Ayrıca fertil ve infertil hasta örneklerinden aynı protokol ile aynı özellikte hücrelerin elde edilmiş olması da diğer bir olumlu sonuçtur. MenKH'lerin mezenkimal kök hücre kaynağı olarak kullanılması yanısıra araştırma amaçlı kullanım potansiyeli ile

endometriumdan bilgi sağlayabilecek bir hücre olabileceği de çalışmada metformin uygulaması yapılarak gösterilmiştir. Özellikle metformin uygulaması sonrasında infertil hasta örnekleri üzerinde belirli taşıyıcı (MATE1, OCT1 ve OCT2) ve biyobelirteçlerin (LIF, αVβ3) düzenlenmesinde etkili olabileceği sonucuna varıldı. Çalışmada metformin uygulamasının, infertilite ile ilişkilendirilen metobolik bozuklukları olan bireylerde kök hücrelerin biyolojik aktivitelerini düzenleyerek olumlu etkiler yaratabileceğine dair veriler de elde edilmiştir. Ayrıca metformin MUC1 immunoreaktivitesini azaltarak endometriyal reseptiviteyi arttırabileceği ve implantasyon potansiyelini iyileştirebileceğini düşündürdü. İnfertilite ile ilişkili durumlarda, metforminin MUC1 düzenlenmesi yoluyla sağladığı bu olumlu etkilerin mekanizmalarının daha ayrıntılı bir şekilde araştırılması gerekmektedir.

Özetle elde edilen MenKH'lerin mezenkimal benzeri kök hücre kaynağı olarak elde edilmesi protokolü çalışılmış ve infertil hastalarda kullanılan ilaç ile deneme yapılarak bu hücrelerin ilaca karşı olan moleküler yolaklardaki bazı proteinlerin varlığı incelenerek analiz edilmiş, diğer çalışmalar için ön veri elde edilmesi sağlanmıştır.

5. KAYNAKLAR

1. Alcayaga-Miranda F, Cuenca J, Luz-Crawford P, et al. Characterization of menstrual stem cells: angiogenic effect, migration and hematopoietic stem cell support in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. Stem Cell Res Ther. 2015; 6:32.
2. Ay. B. (2012) İnsan miyoblast ve mezankimal kök hücre yüklenmiş aselüler çizgili kas kaynaklı doğal ve yarı-yapay iskelelerin çizgili kas dokusu oluşturma potansiyelleri [Yüksek lisans tez, Kocaeli Üniversitesi].
3. Bailey, C. J., & Turner, R. C. (1996). Metformin. New England Journal of Medicine, 334(9), 574-579.
4. Bowen, J. A., Bazer, F. W., & Burghardt, R. C. (1996). Spatial and temporal analyses of integrin and Muc-1 expression in porcine uterine epithelium and trophectoderm in vivo. Biology of reproduction, 55(5), 1098-1106.
5. Bridgeman, S. C., Ellison, G. C., Melton, P. E., Newsholme, P., & Mamotte, C. D. S. (2018). Epigenetic effects of metformin: from molecular mechanisms to clinical implications. Diabetes, Obesity and Metabolism, 20(7), 1553-1562.
6. Bruce M. Carlson, (2022) Carlson: İnsan Embriyolojisi ve Gelişim Biyolojisi. Güneş Tıp Kitapevleri.
7. Cai D, Sun H, Qi Y, Zhao X, Feng M, Wu X. Insulin-Like Growth Factor 1/Mammalian Target of Rapamycin and AMP-Activated Protein Kinase Signaling Involved in the Effects of Metformin in the Human Endometrial Cancer. Int J Gynecol Cancer. 2016 Nov;26(9):1667-1672.
8. Can A. (2014) Kök hücre biyolojisi, türleri ve tedavide kullanımları. *Akademisyen Tıp Kitapevi.*
9. Chen L, Qu J, Cheng T, Chen X, Xiang C. Menstrual blood-derived stem cells: toward therapeutic mechanisms, novel strategies, and future perspectives in the treatment of diseases. Stem Cell Res & Ther 2019; 10(1) : 406
10. Chen L, Qu J, Xiang C. The multi-functional roles of menstrual blood-derived stem cells in regenerative medicine. Stem Cell Res Ther. 2019; 10(1): 1.
11. Chen, L., Qu, J., & Xiang, C. (2019). The multi-functional roles of menstrual blood-derived stem cells in regenerative medicine. Stem cell research & therapy, 10, 1-10.
12. Chen, L., Zhang, C., Chen, L., Wang, X., Xiang, B., Wu, X., ... & Xiang, C. (2017). Human menstrual blood-derived stem cells ameliorate liver fibrosis in mice by targeting hepatic stellate cells via paracrine mediators. Stem cells translational medicine, 6(1), 272-284.
13. Chen, W., Zhang, Z., Zhang, S., Zhu, P., Ko, J. K. S., & Yung, K. K. L. (2021). MUC1: structure, function, and clinic application in epithelial cancers. International journal of molecular sciences, 22(12), 6567.
14. Cordeiro, M. R., Carvalhos, C. A., & Figueiredo-Dias, M. (2022). The emerging role of menstrual-blood-derived stem cells in endometriosis. Biomedicines, 11(1), 39.
15. Costello, M. F., Chapman, M., & Conway, U. (2006). A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials on metformin co-administration during gonadotrophin ovulation induction or IVF in women with polycystic ovary syndrome. Human Reproduction, 21(6), 1387-1399.,
16. Cui, C. H., Uyama, T., Miyado, K., Terai, M., Kyo, S., Kiyono, T., & Umezawa, A. (2007). Menstrual blood-derived cells confer human dystrophin expression in the

murine model of Duchenne muscular dystrophy via cell fusion and myogenic transdifferentiation. Molecular biology of the cell, 18(5), 1586-1594.
17. da Trindade, M. T., Kogawa, A. C., & Salgado, H. R. N. (2018). Metformin: a review of characteristics, properties, analytical methods and impact in the green chemistry. Critical reviews in analytical chemistry, 48(1), 66-72.
18. Elnaggar A, Farag AH, Gaber ME, Hafeez MA, Ali MS, Atef AM. AlphaVBeta3 Integrin expression within uterine endometrium in unexplained infertility: a prospective cohort study. BMC Womens Health. 2017 Sep 26;17(1):90.
19. Eşrefoğlu M. (2009) Özel Histoloji, *Medipres Matbaacılık*, Malatya 2009; 978-975-6676-43-
20. Fazleabas, A. T., Bell, S. C., Fleming, S., Sun, J., & Lessey, B. A. (1997). Distribution of integrins and the extracellular matrix proteins in the baboon endometrium during the menstrual cycle and early pregnancy. Biology of Reproduction, 56(2), 348-356.
21. Giess, R., Tanasescu, I., Steck, T., & Sendtner, M. (1999). Leukaemia inhibitory factor gene mutations in infertile women. Molecular human reproduction, 5(6), 581-586.
22. Guo, Z., & Yu, Q. (2019). Role of mTOR signaling in female reproduction. Frontiers in endocrinology, 10, 692.
23. Gürel A. (2007) Menstrual siklusta tuba uterinada epidermal büyüme faktör reseptörlerinin dağılımlarının immünohistokimyasal olarak gösterilmesi [Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi]
24. H.O. Hamed, A.F. Hasan, O.G. Ahmed, M.A. Ahmed, Metformin versuslaparoscopic ovarian drilling in clomiphene- and insulin-resistant women with polycystic ovary syndrome, Int.J. Gynecol. Obstet. 108 (2) (2010) 143–147.
25. Hardie, D. G. (2013). AMPK: a target for drugs and natural products with effects on both diabetes and cancer. Diabetes, 62(7), 2164-2172.
26. Hasanvand, A. (2022). The role of AMPK-dependent pathways in cellular and molecular mechanisms of metformin: a new perspective for treatment and prevention of diseases. Inflammopharmacology, 30(3), 775-788.
27. Hayes, J. D., & McMahon, M. (2006). The double-edged sword of Nrf2: subversion of redox homeostasis during the evolution of cancer. Molecular cell, 21(6), 732-734.
28. He, Q., Wan, C., & Li, G. (2007). Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. Stem cells, 25(1), 69-77.
29. He, Y., Lu, Y., Zhu, Q., Wang, Y., Lindheim, S. R., Qi, J., ... & Sun, Y. (2019). Influence of metabolic syndrome on female fertility and in vitro fertilization outcomes in PCOS women. American journal of obstetrics and gynecology, 221(2), 138-e1.
30. Hida, N., Nishiyama, N., Miyoshi, S., Kira, S., Segawa, K., Uyama, T., ... & Umezawa, A. (2008). Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesenchymal cells. Stem cells, 26(7), 1695-1704.
31. Hong, I. S. (2023). Endometrial stem/progenitor cells: Properties, origins, and functions. Genes & Diseases, 10(3), 931-947.
32. https://jethrojeff.com/ 02.12.2024), Erişim Tarihi 03.12.24
33.https://medcell.org/histology/female_genital_tract_uterine_cycle.php. Erişim tarihi 03.12.24
34. https://www.hoganlovells.com/en/publications/regulation-of-stem-cell-use-in-the-eu. Erişim Tarihi 10.12.24
35. Inoki, K., Zhu, T., & Guan, K. L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. Cell, 115(5), 577-590.

36. Irani, M., Nasioudis, D., Witkin, S. S., Gunnala, V., & Spandorfer, S. D. (2018). High serum IGF-1 levels are associated with pregnancy loss following frozen-thawed euploid embryo transfer cycles. Journal of reproductive immunology, 127, 7-10.
37. Jacobs, S. A., Roobrouck, V. D., Verfaillie, C. M., & Van Gool, S. W. (2013). Immunological characteristics of human mesenchymal stem cells and multipotent adult progenitor cells. Immunology and cell biology, 91(1), 32-39.
38. Jonker, J. W., & Schinkel, A. H. (2004). Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3). Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 308(1), 2-9.
39. Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji. Aytekin Y, Solakoğlu S, *Nobel Tıp Kitapevleri*, İstanbul, 2006: 449-467.
40. Karadaş Ö. (2011) Collagen Scaffolds with in situ grown calcium phosphta for osteogenic differentiation if Wharton's jelly and menstrual blood stem cells. [Deggre of master, Middle East Technical University]
41. Khanmohammadi, M., Khanjani, S., Bakhtyari, M. S., Zarnani, A. H., Edalatkhah, H., Akhondi, M. M., ... & Kazemnejad, S. (2012). Proliferation and chondrogenic differentiation potential of menstrual blood-and bone marrow-derived stem cells in two-dimensional culture. International journal of hematology, 95, 484-493.
42. Khoury M, Alcayaga-Miranda F, Illanes SE, et al. The promising potential of menstrual stem cells for antenatal diagnosis and cell therapy. Front Immunol. 2014; 5:205.
43. Kimball, S. R. (2006). Interaction between the AMP-activated protein kinase and mTOR signaling pathways. Medicine and Science in sports and exercise, 38(11), 1958.
44. Kimber-Trojnar, Ż., Dłuski, D. F., Wierzchowska-Opoka, M., Ruszała, M., & Leszczyńska-Gorzelak, B. (2022). Metformin as a potential treatment option for endometriosis. Cancers, 14(3), 577.
45. Kimura N, Okuda M, Inui K (2005) Metformin transport by renal basolateral organic cation transporter hOCT2. Pharm Res 22:255–259
46. Klentzeris, L. D. (1997). The role of endometrium in implantation. Human reproduction (Oxford, England), 12(11 Suppl), 170-175.
47. Koepsell, H., & Daws, L. C. (2020). Organic cation transporters in health and disease. Pharmacological reviews, 72(1), 253-319.
48. Kojima, Y., Kaufman-Francis, K., Studdert, J. B., Steiner, K. A., Power, M. D., Loebel, D. A., ... & Tam, P. P. (2014). The transcriptional and functional properties of mouse epiblast stem cells resemble the anterior primitive streak. Cell stem cell, 14(1), 107-120.
49. Lass, A., Weiser, W., Munafo, A., & Loumaye, E. (2001). Leukemia inhibitory factor in human reproduction. Fertility and sterility, 76(6), 1091-1096.
50. Lass, A., Weiser, W., Munafo, A., & Loumaye, E. (2001). Leukemia inhibitory factor in human reproduction. Fertility and sterility, 76(6), 1091-1096.
51. Lessey, B. A. (1998). Endometrial integrins and the establishment of uterine receptivity. Human Reproduction, 13(suppl_3), 247-258.
52. Leyendecker, G., Herbertz, M., Kunz, G., & Mall, G. (2002). Endometriosis results from the dislocation of basal endometrium. Human Reproduction, 17(10), 2725-2736.
53. Lu, S., Shi, G., Xu, X., Wang, G., Lan, X., Sun, P., ... & Wang, H. (2016). Human endometrial regenerative cells alleviate carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. Journal of translational medicine, 14, 1-15.
54. Ludwig, T. E., Bergendahl, V., Levenstein, M. E., Yu, J., ProbaKHo, M. D., & Thomson, J. A. (2006). Feeder-independent culture of human embryonic stem cells. Nature methods, 3(8), 637-646.

55. Lv, H., Hu, Y., Cui, Z., & Jia, H. (2018). Human menstrual blood: a renewable and sustainable source of stem cells for regenerative medicine. Stem cell research & therapy, 9, 1-11.
56. M. Díaz, J. Bassols, A. López Bermejo, F. deZegher, L. Ibáñez, Metformintreatment to reduce central adiposity after prenatal growth restraint: a placebo-controlled pilot study in prepubertal children, Pediatr. Diabetes 16 (7) (2015) 538–545.
57. M.S. Yates, A.M. Coletta, Q. Zhang, R.E. Schmandt, M. Medepalli, D. Nebgen, B. Soletsky, A. Milbourne, E. Levy, B. Fellman, D. Urbauer, Y. Yuan, R.R. Broaddus, K. Basen-Engquist, K. Lu, Prospective randomized biomarker study of metformin and lifestyle intervention for prevention in obese women at increased risk for en- dometrial cancer, Cancer Prev. Res. 11 (8) (2018) 477–490.
58. Majchrzak-Baczmańska, D., & Malinowski, A. (2016). Does IGF-1 play a role in the biology of endometrial cancer?. Ginekologia polska, 87(8), 598-604.
59. Mashayekhi, P., Noruzinia, M., & Khodaverdi, S. (2022). Metformin as a potential agent for modulating the faulty endometriotic mesenchymal stem cells: A case-control study. International Journal of Reproductive BioMedicine, 20(10), 861
60. Meng X, Ichim TE, Zhong J, Rogers A, Yin Z, Jackson J, et.al. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. J Transl Med. 2007; 5: 57.
61. Meseguer, M., Pellicer, A., & Simon, C. (1998). MUC1 and endometrial receptivity. Molecular human reproduction, 4(12), 1089-1098.
62. Michael H, Ross. & Wojciech Pawlina (2019). Histology: A Text and Atlas 6/E, Lippincott Williams& Wilkins/ Wolters Kluwer Hearth, Inc, Two Commerce Square.
63. Nazareth, E. J. P., Rahman, N., Yin, T., & Zandstra, P. W. (2016). A multi-lineage screen reveals mTORC1 inhibition enhances human pluripotent stem cell mesendoderm and blood progenitor production. Stem Cell Reports, 6(5), 679-691.
64. Nicola, N. A., & Babon, J. J. (2015). Leukemia inhibitory factor (LIF). Cytokine & growth factor reviews, 26(5), 533-544.
65. Nikoo, S.; Ebtekar, M.; Jeddi-Tehrani, M.; Shervin, A.; Bozorgmehr, M.; Vafaei, S.; Kazemnejad, S.; Zarnani, A.H. Menstrual blood-derived stromal stem cells from women with and without endometriosis reveal different phenotypic and functional characteristics. Mol. Hum. Reprod. 2014, 20, 905–918.
66. Ono, M., Maruyama, T., & Yoshimura, Y. (2008). Regeneration and adult stem cells in the human female reproductive tract. Stem Cells and Cloning: Advances and Applications, 23-29.
67. Owen, M. R., Doran, E., & Halestrap, A. P. (2000). Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. Biochemical journal, 348(3), 607-614.
68. Palomba, S., Falbo, A., & La Sala, G. B. (2013). Effects of metformin in women with polycystic ovary syndrome treated with gonadotrophins for in vitro fertilisation and intracytoplasmic sperm injection cycles: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology, 120(3), 267-276.
69. Prianishnikov VA. On the concept of stem cell and a model of functional-morphological structure of the endometrium. Contraception. 1978;18(3):213e223.
70. Reddy, K. V. R., & Mangale, S. S. (2003). Integrin receptors: the dynamic modulators of endometrial function. Tissue and Cell, 35(4), 260-273.
71. Reddy, K., & Meherji, P. K. (1999). Integrin cell adhesion molecules in endometrium of fertile and infertile women throughout menstrual cycle.

72. Rena, G., Hardie, D. G., & Pearson, E. R. (2017). The mechanisms of action of metformin. Diabetologia, 60(9), 1577-1585.
73. Rutanen, E. M. (1998). Insulin-like growth factors in endometrial function. Gynecological Endocrinology, 12(6), 399-406.
74. Saini, N., & Yang, X. (2018). Metformin as an anti-cancer agent: actions and mechanisms targeting cancer stem cells. Acta biochimica et biophysica Sinica, 50(2), 133-143.
75. Saiz-Rodríguez, M., Ochoa, D., Zubiaur, P., Navares-Gómez, M., Román, M., Camargo-Mamani, P., ... & Abad-Santos, F. (2023). Identification of transporter polymorphisms influencing metformin pharmacokinetics in healthy volunteers. Journal of Personalized Medicine
76. Sanchez-Mata, A., & Gonzalez-Muñoz, E. (2021). Understanding menstrual blood-derived stromal/stem cells: Definition and properties. Are we rushing into their therapeutic applications. Iscience, 24(12).
77. Saxton, R. A., & Sabatini, D. M. (2017). mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. Cell, 168(6), 960-976. Junqueira LC
78. Shao, R., Li, X., Feng, Y., Lin, J. F., & Billig, H. (2014). Direct effects of metformin in the endometrium: a hypothetical mechanism for the treatment of women with PCOS and endometrial carcinoma. Journal of experimental & clinical cancer research, 33, 1-11.
79. Staud, F., Cerveny, L., Ahmadimoghaddam, D., & Ceckova, M. (2013). Multidrug and toxin extrusion proteins (MATE/SLC47); role in pharmacokinetics. The international journal of biochemistry & cell biology, 45(9), 2007-2011.
80. Steck, T., Giess, R., Suetterlin, M. W., Bolland, M., Wiest, S., Poehls, U. G., & Dietl, J. (2004). Leukaemia inhibitory factor (LIF) gene mutations in women with unexplained infertility and recurrent failure of implantation after IVF and embryo transfer. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 112(1), 69-73.
81. T.W Sadler, (2018). Langman's Medical Embryology. *Wolters Kluwer*.
82. Taga, T., & Kishimoto, T. (1997). Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. Annual review of immunology, 15(1), 797-819.
83. Tavakol, S., Azedi, F., Hoveizi, E., Ai, J., & Joghataei, M. T. (2018). Human endometrial stem cell isolation from endometrium and menstrual blood. Bio-protocol, 8(2), e2693-e2693.
84. Tkáč, I., Klimčáková, L., Javorský, M., Fabianová, M., schroner, Z., Hermanová, H., ... & Tkáčová, R. (2013). Pharmacogenomic association between a variant in SLC47A1 gene and therapeutic response to metformin in type 2 diabetes. Diabetes, obesity and metabolism, 15(2), 189-191.
85. Toyama, K., Yonezawa, A., Masuda, S., Osawa, R., Hosokawa, M., Fujimoto, S., ... & Katsura, T. (2012). Loss of multidrug and toxin extrusion 1 (MATE1) is associated with metformin-induced lactic acidosis. British journal of pharmacology, 166(3), 1183-1191.
86. Tsai HD, Chang CC, Hsieh YY, Lo HY. Leukemia inhibitory factor expression in different endometrial locations between fertile and infertile women throughout different menstrual phases. J Assist Reprod Genet. 2000 Sep;17(8):415-8. doi: 10.1023/a:1009457016871. PMID: 11062850; PMCID: PMC3455564.
87. Uzieliene, I., Urbonaite, G., Tachtamisevaite, Z., Mobasheri, A., & Bernotiene, E. (2018). The Potential of Menstrual Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Repair and Regeneration: Novel Aspects. Stem cells international, 2018(1), 5748126.

88. Verma, S., Rizvi, S., Abbas, M., Raza, T., & Mahdi, F. (2019). Personalized medicine-future of diagnosis and management of T2DM. Diabetes & metabolic syndrome, 13(4), 2425-2430.
89. Viollet, B., Guigas, B., Garcia, N. S., Leclerc, J., Foretz, M., & Andreelli, F. (2012). Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. Clinical Science, 122(6), 253-270.
90. Wang HS, Chard T. IGFs and IGF-binding proteins in the regulation of human ovarian and endometrial function. J Endocrinol. 1999, 161, 1–13
91. Wu, F., Chen, X., Liu, Y., Liang, B., Xu, H., Li, T. C., & Wang, C. C. (2018). Decreased MUC1 in endometrium is an independent receptivity marker in recurrent implantation failure during implantation window. Reproductive Biology and Endocrinology, 16, 1-7.
92. Yalçın B. (2015). Doğum Sonrası Gelişim Dönemlerindeki Sıçan Uterus Dokusunda Kök Hücre Varlığının Araştırılması [Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi]
93. Yang, X., Kord-Varkaneh, H., Talaei, S., Clark, C. C., Zanghelini, F., Tan, S. C., ... & Zhang, Y. (2020). The influence of metformin on IGF-1 levels in humans: A systematic review and meta-analysis. Pharmacological Research, 151, 104588
94. Zarei, R., Nikpour, P., Rashidi, B., Eskandari, N., & Aboutorabi, R. (2020). Evaluation of Muc1 gene expression at the time of implantation in diabetic rat models treated with insulin, metformin and pioglitazone in the normal cycle and ovulation induction cycle. International Journal of Fertility & Sterility, 14(3), 218.
95. Zhao Y, Chen X, Wu Y, et al. Transplantation of human menstrual blood-derived mesenchymal stem cells alleviates Alzheimer's disease-like pathology in APP/PS1 transgenic mice. Front Mol Neurosci. 2018; 11:140.
96. Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., ... & Moller, D. E. (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. The Journal of clinical investigation, 108(8), 1167-1174.