

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ  
ENSTİTÜSÜ

**ASETİL-11-KETO-BETA-BOSVELİK  
ASİTİN (AKBA) İN VİTRO KOŞULLARDA  
KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI MEZENKİMAL  
KÖK HÜCRE İLE ORTAK KÜLTÜRE  
EDİLEN ANAPLASTİK TİROİD KANSER  
HÜCRELERİ ÜZERİNE KANSER KARŞITI  
VE SİTOPROTEKTİF ETKİLERİNİN  
İNCELENMESİ**

Hazırlayan Ayşenur KAYA

Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Yönetmeliğinin Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi  
Programı için Öngördüğü BİLİM UZMANLIĞI /  
YÜKSEKLİSANS TEZİ Olarak Hazırlanmıştır.

**KOCAELİ  
2018**



T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ  
ENSTİTÜSÜ

**ASETİL-11-KETO-BETA-BOSVELİK  
ASİTİN (AKBA) İN VİTRO KOŞULLARDA  
KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI MEZENKİMAL  
KÖK HÜCRE İLE ORTAK KÜLTÜRE  
EDİLEN ANAPLASTİK TİROİD KANSER  
HÜCRELERİ ÜZERİNE KANSER KARŞITI  
VE SİTOPROTEKTİF ETKİLERİNİN  
İNCELENMESİ**

Hazırlayan Ayşenur KAYA

Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Yönetmeliğinin Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi  
Programı için Öngördüğü BİLİM UZMANLIĞI /  
YÜKSEKLİSANS TEZİ Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman  
Dr. Öğr. Üyesi Gülçin GACAR

Destekleyen Kurum  
Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Koordinasyon Birimi

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
(Tez Onay Sayfası)

Tez adı: *Abatıl-11-Kate-Bata* Bazelik Asidin invitro Kaulatı Komit İlişi  
Kognitif morfolojik Kık hücre de ortak Kulture edilen anoplastik tirat  
Konseri hücreleri üzerine konza koru ve sitoprotektif etkilerinin inceleme

Tez yazarı: *Ayşenur KAYA*

Tez savunma tarihi: *03/06/2018*

Tez Danışmanı: *Dr. Öğr. Üyesi Gülen GACAR*

*İş bu çalışma Jürimiz tarafından Kık Hücre Anabilim*  
Dali...*tezi olarak kabul edilmiştir.*

Tez Savunma Sınavı jüri üyeleri		İmzası
Ünvanı Adı Soyadı		
Üye Doç. Dr.	<i>Yusuf YATIR</i>	<i>[Signature]</i>
Üye Doç. Dr.	<i>Ayten TÜRKAN</i>	<i>[Signature]</i>
Üye Dr. Öğr. Üyesi	<i>Gülen GACAR</i>	<i>[Signature]</i>

ONAY

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

...../...../20

Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ

Enstitü Müdürü

## ÖZET

### **Asetil-11-Keto-Beta-Bosvelik Asitin (AKBA) İn Vitro Koşullarda Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre İle Ortak Kültüre Edilen Anaplastik Tiroid Kanser Hücreleri Üzerine Kanser Karşıtı Ve Sitoprotektif Etkilerinin İncelenmesi**

**AMAÇ:** Sunulan tez çalışmasında anaplastik tiroid kanser hücreleri (iATKH) ve insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler (iKİ-MKH) ile birlikte Asetil-11-Keto-Beta-Bosvelik Asitin (AKBA) kanser karşıtı etkilerinin incelenmesi amaçlanmaktadır.

**YÖNTEM:** Anaplastik tiroid kanser hücreleri ve Mezenkimal kök hücreler steril koşullarda kültür kaplarında uygun besiyerlerinde çoğaltılmıştır. Çoğaltılan hücrelerin analizi için pasaj 3'e gelindiğinde hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırılıp akım sitometrik analizleri gerçekleştirilmiştir. Karakterizasyon çalışmalarının son aşamasında elde edilen Mezenkimal kök hücreler *in vitro* koşullarda farklılaştırma kültür ortamına alınarak adipojenik ve osteojenik yönde farklılaştırmak üzere 4 hafta kültür edilmiştir. Hücrelerin ortak kültürü ve etkileşimlerinin incelenmesi için toplam 2 kontrol grubu (CAL62, İKİ-MKH) ve 6 deney grubu (iKİ-MKH+AKBA, İKİ-MKH+CAL62, İKİ-MKH+CAL62+AKBA; CAL62+AKBA CAL62+iKİ-MKH, CAL62+iKİ-MKH+AKBA) olmak üzere hücreler 7 gün boyunca ortak kültüre alınmıştır. Hücreler arasında doğrudan olmayan (indirekt) ortak kültür gerçekleştirilmiştir. Ortak kültüre alındıktan sonra hücre canlılığı, apoptoz, proliferasyon ve gen ekspresyonlarındaki değişimleri karşılaştırılmıştır. Ortak kültür sonrası 0,1,4 ve 7. günün sonunda CAL62 hücrelerinin apoptoz düzeyleri, hücre canlılığı, gen ekspresyonlarındaki değişimleri ve karakterizasyonu belirlenmiştir.

**BULGULAR:** Elde edilen sonuçlar Asetil-11-Keto-Beta-Bosvelik Asitin (AKBA) kanser karşıtı etkilerini göstermektedir. Yapılan deneylerde AKBA 'nın kemik iliği kökenli Mezenkimal kök hücre ile birlikte anaplastik tiroid kanser hücrelerinin çoğalmasını engellediğini, canlı hücre sayısında azalmaya, apoptatik hücre sayısında ise artışa neden olduğunu göstermiştir. AKBA' nın insan kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerinin üzerinde apoptotik etkisi saptanmamıştır.

**SONUÇ:** AKBA' nın insan anaplastik tiroid kanseri hücreleri üzerinde apoptotik etkisi olduğu gösterilmiştir. İnsan kemik iliği kökenli Mezenkimal kök hücrelerin apoptozunu arttırmadığı gözlemlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Mezenkimal kök hücre, Anaplastik tiroid kanseri, Asetil-11-Keto-Beta-Bosvelik Asit (AKBA)



## ABSTRACT

### **The Investigation Into The Anticancer and Cytoprotective Effects of Acetyl-11-Keto-Beta-Boswellic Acid (AKBA) on Anaplastic Thyroid Cancer Cells Co-Cultured with Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Vitro Conditions**

**Objective:** In the proposed thesis study, it is aimed to investigate into the anticancer effects of Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid (AKBA) in combination with anaplastic thyroid cancer cells (hATCC) and human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hBM-MSK).

**Method:** Anaplastic thyroid cancer cells and mesenchymal stem cells were grown under sterile conditions with proper media in culture dishes. For analysis of proliferated cells within passage 3, cells were removed by trypsinization and flow cytometric analysis was performed. Mesenchymal stem cells at the final stage of characterization studies were cultured for 4 weeks in vitro conditions to adipogenic and osteogenic differentiation. Cells were incubated 7 days in co-culture with 2 control groups (CAL62, hBM-MSK) and 6 experimental groups (hBM-MSK+AKBA, hBM-MSK+CAL62, hBM-MSK+CAL62+AKBA; CAL62+AKBA CAL62+ hBM-MSK, CAL62+ hBM-MSK +AKBA) for the investigation into interactions of co-culture cells. Indirect co-culture was performed between cells. After co-culture expression for variation of cell viability, apoptosis, proliferation and gene expressions were compared.

**Results:** The results obtained show the anticancer effects of Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid (AKBA). Studies have shown that AKBA inhibits the proliferation of anaplastic thyroid cancer cells with bone marrow-derived mesenchymal stem cells, leading to a decrease in the number of viable cells and an increase in the number of apoptotic cells. Apoptotic effects of AKBA on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells were not detected.

**Conclusions:** It was demonstrated that AKBA has been shown to be an apoptotic effect on human anaplastic thyroid cancer cells. AKBA also has not been shown to increase apoptosis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells.

**Keywords:** Mesenchymal stem cell, Anaplastic thyroid cancer, Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid (AKBA)

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca öneri ve desteklerini esirgemeyerek bizlerin gelişimine sağladığı katkılardan dolayı bölüm başkanım, hocam Sayın Doç. Dr. Yusufhan YAZIR'a, her zaman güler yüzlü sevecen tavırları ile bilgi ve tecrübelerini paylaşan tez hocam Sayın Yrd.Doc.Dr Gülçin GACAR'a, Sayın Yrd.Doc.Dr Gökhan DURUKSU hocama ve bize her zaman bir abla gibi davranan, yardımseverliğiyle tezime katkıda bulunan Sayın Yrd. Doç. Dr. Zehra Seda ÜNAL HALBUTOĞULLAR'ı hocama sonsuz teşekkür ederim.

Laboratuvarda sürekli birlikte olduğumuz değerli arkadaşlarım, Sema YUSUFUĞLU, Büşra ÖNCEL DUMAN ve Ayşegül BAĞLAR katkılarından dolayı teşekkür ederim. KÖGEM biriminde eğitimim boyunca kazandığım çok değerli bilgiler haricinde; güzel dostluklarda edindim. Bunun için ayrıca Kamil Can KILIÇ ve Ahmet ÖZTÜRK arkadaşşıma teşekkür ederim.

Bana yeri geldiğinde hocam yeri geldiğinde bir anne gibi davranan danışmanım, hocam Sayın Gülçin GACAR'a bu güne kadar vermiş olduğu emeklerinden dolayı sonsuz teşekkür ederim.

Laboratuvardaki tüm hocalarımı ve arkadaşlarımı ailem gibi seviyorum. Hepinize tek tek sonsuz teşekkür ederim. Fakat öncelikle bu günlere gelebilmemde üzerimde asla ödeyemeceğim emeği olan tek dostum melek anneme, eğitimim için tüm zorluklara göğüs geren canımdan çok sevdiğim bana hayatımda aldığım nefes olan babama ve baba yarım olan abime, kız kardeşim gibi sevdiğim Cansum'a bana gösterdikleri emeklerinden dolayı sonsuz teşekkür ederim.



## İTHAF

Kanser üzerine olan uzmanlık tezimi kanser hastalığına yakalanmış ve tedavi bekleyen hastalara bir umut olmak adına ve kanser hastalığından sevdiklerini kaybetmiş tüm hasta yakınlarına saygıyla ithaf ediyorum.



## TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİŐİ

Tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, çizim, çizelge ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiŐtir. Tezimin herhangi bir yayından kısmen ya da tamamen aşırma olmadığını ve bir intihal programı kullanılarak test edildiğini beyan ederim.

Ayşenur KAYA



## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	v
ABSTRACT .....	vii
TEŞEKKÜR .....	viii
İTHAF .....	ix
TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ .....	x
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	xiii
ÇİZİMLER DİZİNİ .....	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xxi
1. GİRİŞ .....	1
1.1 Genel bilgiler .....	1
1.2 Kök Hücreler .....	2
1.2.1 Kök Hücre Tarihiçesi .....	5
1.2.2 Kök Hücrelerin Farklılaşma Kapasitesine Göre Sınıflandırılması .....	6
1.2.3 Kök Hücrelerin Çeşitleri .....	7
1.3 Tiroid Histolojisi .....	15
1.3.1 Tiroid Kanseri Oluşumu Ve Gelişimi .....	18
1.4 Tedavilerde Mezenkimal Kök Hücrenin Rolü .....	24
1.5 Kanser Kök Hücreleri .....	25
1.6 Boswellia Serrata .....	29
2. AMAÇ .....	34
3. Yöntem .....	35
3.1 Hücreler Ve Kültür Koşulları .....	35
3.1.1 İnsan Anaplastik Tiroid Kanseri Hücre Dizisinin Çoğaltımı .....	35
3.1.2 İnsan Kemik İliği Kaynaklı MKH (İki-MKH) Hücre Dizisi Çoğaltımı .....	35
3.2 Deney Gruplarının Oluşturulması .....	35
3.3 Asetil-11-Keto-Beta-Bosvelik Asitin (AKBA) Konsantrasyonunun Belirlenmesi .....	37
3.3.1 WST Testi .....	37
3.3.2 Annexin PI Testi .....	37
3.4 Akım Sitometrik Analiz .....	38
3.5 İnsan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaştırma Analizi .....	40
3.5.1 Adipojenik Farklılaştırma .....	40
3.5.2 Osteojenik Farklılaştırma .....	41
3.6 Hücrelerin Ortak Kültürü ve Etkileşimlerinin İncelenmesi .....	41
3.6.1 Annexin V-PI kapasite tayini .....	42
3.6.2 Hücre Canlılığı .....	43

3.6.3	Gen Ekspresyonlarındaki Değişimlerin Belirlenmesi – Real Time PCR .....	43
3.6.4	Real Time PCR.....	46
3.6.5	Akım Sitometrik Analiz .....	47
3.7	İstatiksel Analiz.....	48
4	BULGULAR .....	49
4.1	İnsan Anaplastik Tiroid Kanseri Hücre Dizisinin Çoğaltımı .....	49
4.2	İnsan Anaplastik Tiroid Kanseri Hücre Dizisinin Karakterizasyonu.....	50
4.3	İnsan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Çoğaltımı .....	50
4.4	İnsan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu .....	51
4.5	Farklılaştırma Analizi .....	52
4.5.1	Adipojenik Farklılaştırma.....	52
4.5.2	Osteojenik Farklılaştırma.....	53
4.6	Asetil-11-Keto-Beta-Bosvelik Asitin (AKBA) Konsantrasyonunun Belirlenmesi .....	54
4.6.1	WST testi .....	54
4.6.2	Annexin PI Testi .....	57
4.7	Hücrelerin Ortak Kültürü ve Etkileşimlerinin İncelenmesi .....	59
4.7.1	Ortak Kültür Sonrası Annexin V-PI Kapasite Tayini .....	59
4.7.2	Ortak Kültür Sonrası Hücre Canlılığı Tayini.....	73
4.7.3	Ortak Kültür Sonrası Gen Ekspresyonlarındaki Değişimlerin Belirlenmesi – Real Time PCR .....	81
4.7.4	Real Time PCR.....	91
4.7.5	Ortak Kültür Sonrası Akım Sitometrik Analizi.....	92
5	TARTIŞMA.....	93
5.4	Sınırlılıklar.....	99
6	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	100
	KAYNAKLAR .....	101
	ÖZGEÇMİŞ .....	112
	EKLER.....	115

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

µm: mikrometre

AHB: Kök hücreler asimetrik bölünme

AKBA: Acetyl-11-keto-β-bosvelik asit

ALS: Amiyotrofik lateral skleroz

AML: akut myeloid lösemi

AR: androjen reseptörü

ATCC: Biyolojik Materyal Kaynak Merkezi

*B.Serrata*: *Boswellia serrata*

BMP: Kemik morfogenetik protein

BMP4: Kemik morfogenetik protein 4

BT: Bilgisayarlı Tomografi

CAL62: insan anaplastik tiroid kanseri hücreleri

CRC: Kolorektal kanser

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium

DMSO: Dimetil sülfoksit

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

EGF: Epidermis büyüme faktörü

EKH: embriyonik kök hücreleri

EMT: Epitelial Mezenkimal geçiş

ESM: Ektstraselüler matriks molekülleri

FBS: Fetal bovine serum

FGF2: fibroblast büyüme faktörü 2

FGF4: fibroblast büyüme faktörü 4

FITC: fluoresan izotiyosiyonat

HE: Hematoksilen ve Eozin

HGF: hepatosit büyüme faktörü

HKH: Hematopetik kök hücreler

İKİ-MKH: İnsan kemik iliği kaynaklı Mezenkimal kök hücre

İKİ-MKH: insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre

LIF: Lösemi inhibitör faktörü

LPS: lipopolisakkarit

MKH: Mezenkimal kök hücreler

mL: Mililitre

MM: multiple myeloma

MR: manyetik rezonans

NGF: sinir büyüme faktörü

PBS: Fosfat Salin Tamponu

PE: fikoeritrin

PMNL: insan polimorfonükleer lökositler

RPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute medium

SHH: sonic hedgehog

T3: Triiodotironin

T4: Tiroksin

TG : Tiroglobulin

TGF $\beta$ : Transforming growth factor beta

TRH: Tirotropin salgılayıcı hormon

TSH: Tiroid bezini uyarıcı hormon

TTF1: tiroid transkripsiyon faktörü 1

TTF2: tiroid transkripsiyon faktörü 2

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü



## ÇİZİMLER DİZİNİ

**Çizim 1.1** Kromozom üzerinde telomer yapısının gösterimi

**Çizim 1.2** Kök hücrelerin asimetrik bölünme ile farklılaşmış hücre oluşması

**Çizim 1.3** Embriyonik kök hücrelerin eldesi ve farklılaşma kapasitesi

**Çizim 1.4** Multipotent kök hücrelerin kaynakları ve farklılaşma kapasitesi

**Çizim 1.5** Tiroid bezinin anatomik görüntüsü

**Çizim 1.6** Tiroid bezinden salgılanan hormonlar

**Çizim 1.7** Tiroidin temel yapısı

**Çizim 1.8** T4 ve T3 moleküler yapısı

**Çizim 1.9** Tümör hücrelerinin kemoterapi ve radyoterapi sonunda nüks etmesi

**Çizim 1.10** Boswellia serrata çeşitli kimyasal formları

**Çizim 1.11** Boswellia serrata (AKBA)'nın moleküler hedefleri

**Çizim 4.1** İnsan anaplastik tiroid kanseri hücre kültürü

**Çizim 4.2** İnsan anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin akım sitometrisi (hücre sayar) ile yüzey belirteçlerinin belirlenmesi

**Çizim 4.3** İnsan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre kültürü

**Çizim 4.4** İnsan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin akım sitometrisi (hücre sayar) ile yüzey belirteçlerinin belirlenmesi

**Çizim 4.5** İnsan kemik iliği kökenli Mezenkimal kök hücrelerin adipojenik farklılaştırma in vitro görüntüleri

**Çizim 4.6** İnsan kemik iliği kökenli Mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaştırma in vitro görüntüleri

**Çizim 4.7** İnsan anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin 1.25µM, 2,5µM, 5µM, 10µM, 20µM, 40µM, 60µM, 80µM, 100µM AKBA konsantrasyonlarında WST testi grafik analizleri

**Çizim 4.8** İnsan anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin 1.25µM, 2,5µM, 5µM, 10µM, 20µM, 40µM, 60µM, 80µM, 100µM AKBA konsantrasyonlarında WST testi değerleri



**Çizim 4.19** İnsan kemik iliği kökenli Mezenkimal kök hücrelerinin 1.25µM, 2,5µM, 5µM, 10µM, 20µM, 40µM, 60µM, 80µM, 100µM AKBA konsantrasyonların da WST testi grafik analizleri

**Çizim 4.10** İnsan kemik iliği kökenli Mezenkimal kök hücrelerinin 1.25µM, 2,5µM, 5µM, 10µM, 20µM, 40µM, 60µM, 80µM, 100µM AKBA konsantrasyonların da WST testi değerleri

**Çizim 4.11** İKİ-MKH VE CAL62 AKBA konsantrasyonunun Annexin PI Testi ile belirlenmesi

**Çizim 4.12** 1.4 ve 7. Günlerde İKİ-MKH AKBA konsantrasyonunun Annexin PI testi ile belirlenmesi

**Çizim 4.13** 1.4 ve 7. Günlerde CAL62 AKBA konsantrasyonunun Annexin PI testi ile belirlenmesi

**Çizim4.14** CAL62 1:1 oranında kontrol grubu Annexin V-PI analizi

**Çizim 4.15** CAL62 1:1 oranında 80 µl AKBA ile ortak kültür sonrası 1,4 ve 7. günlerde Annexin V-PI analizi

**Çizim 4.16** CAL62 1:1 oranında İKİ-MKH ile birlikte ortak kültür sonrası 1,4 ve 7. günlerde Annexin V-PI analizi

**Çizim 4.17** CAL62 1:1 oranında 80 µl AKBA+ İKİ-MKH ile birlikte ortak kültür sonrası 1,4 ve 7. günlerde Annexin V-PI analizi

**Çizim 4.18** Ortak kültür sonrası CAL62 hücrelerin 80µl AKBA konsantrasyonunda 1,4 ve 7. Günlerde 1:1 oranında ko kültür testinin ölüm grafiği

**Çizim 4.19** Ortak kültür sonrası CAL62 hücrelerin 80µl AKBA konsantrasyonunda 1,4 ve 7. Günlerde 1:1 oranında ko kültür testinin canlılık grafiği

**Çizim 4.20** Ortak kültür sonrası CAL62 hücrelerin 80µl AKBA konsantrasyonunda 1,4 ve 7. Günlerde 1:1 oranında ko kültür testinin apoptoz grafiği

**Çizim 4.21** İKİ-MKH 1:1 oranında kontrol grubu Annexin V-PI analizi

**Çizim 4.22** İKİ-MKH 1:1 oranında 80 µl AKBA ile ortak kültür sonrası 1,4 ve 7. günlerde Annexin V-PI analizi

**Çizim 4.23** İKİ-MKH 1:1 oranında İKİ-MKH ile birlikte ortak kültür sonrası 1,4 ve 7. günlerde Annexin V-PI analizi

**Çizim 4.24** İKİ-MKH 1:1 oranında 80 µl AKBA+ İKİ-MKH ile birlikte ortak kültür sonrası 1,4 ve 7. günlerde Annexin v-PI analizi

**Çizim 4.25** Ortak kültür sonrası İKİ-MKH hücrelerin 80µl AKBA konsantrasyonunda 1,4 ve 7. Günlerde 1:1 oranında ko kültür testinin ölüm grafiği

**Çizim 4.26** Ortak kültür sonrası İKİ-MKH hücrelerin 80µl AKBA konsantrasyonunda 1,4 ve 7. Günlerde 1:1 oranında ko kültür testinin canlılık grafiği

**Çizim 4.27** Ortak kültür sonrası İKİ-MKH hücrelerin 80µl AKBA konsantrasyonunda 1,4 ve 7. Günlerde 1:1 oranında ko kültür testinin apoptoz grafiği

**Çizim 4.28** CAL62 1:3 oranında kontrol grubu 1,4 ve 7. Gün Annexin V-PI analizi

**Çizim 4.29** CAL62 1:3 oranında 80 µl AKBA ile ortak kültür sonrası 1,4 ve 7. günlerde Annexin V-PI analizi

**Çizim4.30** CAL62 1:3 oranında İKİ-MKH ile birlikte ortak kültür sonrası 1,4 ve 7. günlerde Annexin V-PI analizi

**Çizim4.31** CAL62 1:3 oranında 80 µl AKBA+ İKİ-MKH ile birlikte ortak kültür sonrası 1,4 ve 7. günlerde Annexin V-PI analizi

**Çizim4.32** Ortak kültür sonrası CAL62 hücrelerin 80µl AKBA konsantrasyonunda 1,4 ve 7. Günlerde 1:3 oranında ko kültür testinin ölüm grafiği

**Çizim4.33** Ortak kültür sonrası CAL62 hücrelerin 80µl AKBA konsantrasyonunda 1,4 ve 7. Günlerde 1:3 oranında ko kültür testinin canlılık grafiği.

**Çizim4.34** Ortak kültür sonrası CAL62 hücrelerin 80µl AKBA konsantrasyonunda 1,4 ve 7. Günlerde 1:3 oranında ko kültür testinin apoptoz grafiği

**Çizim4.35** İKİ-MKH 1:3 oranında kontrol grubu Annexin V-PI analizi

**Çizim4.36** İKİ-MKH 1:3 oranında 80 µl AKBA ile ortak kültür sonrası 1,4 ve 7. günlerde Annexin V-PI analizi

**Çizim4.37** İKİ-MKH 1:3 oranında CAL62 ile birlikte ortak kültür sonrası 1,4 ve 7. günlerde Annexin V-PI analizi

**Çizim4.38** İKİ-MKH 1:3 oranında 80 µl AKBA+ CAL 62 ile birlikte ortak kültür sonrası 1,4 ve 7. günlerde Annexin v-PI analizi

**Çizim4.39** Ortak kültür sonrası İKİ-MKH hücrelerin 80µl AKBA konsantrasyonunda 1,4 ve 7. Günlerde 1:3 oranında ko kültür testinin ölüm grafiği.

**Çizim4.40** Ortak kültür sonrası İKİ-MKH hücrelerin 80µl AKBA konsantrasyonunda 1,4 ve 7. Günlerde 1:3 oranında ko kültür testinin canlılık grafiği.

**Çizim4.41** Ortak kültür sonrası İKİ-MKH hücrelerin 80µl AKBA konsantrasyonunda 1,4 ve 7. Günlerde 1:3 oranında ko kültür testinin apoptoz grafiği

**Çizim4.42** CAL62 hücrelerinin 1:1 ko kültür oranında 1.gün calcein ve EtBr boyaması ile floresan mikroskopta canlılıklarının tayini

**Çizim4.43** CAL62 hücrelerinin 1:1 ko kültür oranında 4.gün calcein ve EtBr boyaması ile floresan mikroskopta canlılıklarının tayini

**Çizim4.44** CAL62 hücrelerinin 1:1 ko kültür oranında 7.gün calcein ve EtBr boyaması ile floresan mikroskopta canlılıklarının tayini

**Çizim4.45** İKİ-MKH hücrelerinin 1:1 ko-kültür oranında 1.gün calcein ve EtBr boyaması ile floresan mikroskopta canlılıklarının tayini

**Çizim4.46** İKİ-MKH hücrelerinin 1:1 ko-kültür oranında 4.gün calcein ve EtBr boyaması ile floresan mikroskopta canlılıklarının tayini

**Çizim4.47** İKİ-MKH hücrelerinin 1:1 ko-kültür oranında 7.gün calcein ve EtBr boyaması ile floresan mikroskopta canlılıklarının tayini

**Çizim4.48** CAL62 hücrelerinin 1:3 ko kültür oranında 1.gün calcein ve EtBr boyaması ile floresan mikroskopta canlılıklarının tayini

**Çizim4.49** CAL62 hücrelerinin 1:3 ko kültür oranında 4.gün calcein ve EtBr boyaması ile floresan mikroskopta canlılıklarının tayini

**Çizim4.50** CAL62 hücrelerinin 1:3 ko kültür oranında 7.gün calcein ve EtBr boyaması ile floresan mikroskopta canlılıklarının tayini

**Çizim4.51** İKİ-MKH hücrelerinin 1:3 ko-kültür oranında 1.gün calcein ve EtBr boyaması ile floresan mikroskopta canlılıklarının tayini

**Çizim4.52** İKİ-MKH hücrelerinin 1:3 ko-kültür oranında 4.gün calcein ve EtBr boyaması ile floresan mikroskopta canlılıklarının tayini

**Çizim4.53** İKİ-MKH hücrelerinin 1:3 ko-kültür oranında 7.gün calcein ve EtBr boyaması ile floresan mikroskopta canlılıklarının tayini

**Çizim 4.54** CAL62 + AKBA 1.gündeki gen ekspresyonlarındaki değişimlerinin real time PCR ile belirlenmesi

**Çizim 4.55** CAL62 +AKBA 4.gündeki gen ekspresyonlarındaki değişimlerinin real time PCR ile belirlenmesi

**Çizim 4.56** CAL62 +AKBA 7.gündeki gen ekspresyonlarındaki değişimlerinin real time PCR ile belirlenmesi

**Çizim 4.57** CAL62 + İKİ-MKH 1.gündeki gen ekspresyonlarındaki değişimlerinin real time PCR ile belirlenmesi

**Çizim 4.58** CAL62 + İKİ-MKH 4.gündeki gen ekspresyonlarındaki değişimlerinin real time PCR ile belirlenmesi

**Çizim 4.59** CAL62 + İKİ-MKH 7.gündeki gen ekspresyonlarındaki değişimlerinin real time PCR ile belirlenmesi

**Çizim 4.60** CAL62 + İKİ-MKH+ AKBA 1.gündeki gen ekspresyonlarındaki değişimlerinin real time PCR ile belirlenmesi

**Çizim 4.61** CAL62 + İKİ-MKH+ AKBA 4.gündeki gen ekspresyonlarındaki değişimlerinin real time PCR ile belirlenmesi

**Çizim 4.62** CAL62 + İKİ-MKH+ AKBA 7.gündeki gen ekspresyonlarındaki değişimlerinin real time PCR ile belirlenmesi

**Çizim4.63** CAL62'nin Real Time PCR ile IL6 ve BCL2 geninin ekspresyonunun belirlenmesi

**Çizim4.64** İnsan anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin ortak kültür sonrası akım sitometrisi (hücre sayar) ile yüzey belirteçlerinin belirlenmesi

**Çizim 4.65** insan kemik iliği kaynaklı Mezenkimal kök hücrelerinin ortak kültür sonrası akım sitometrisi (hücre sayar) ile yüzey belirteçlerinin belirlenmesi

## **ÇİZELGELER DİZİNİ**

**Çizelge 3.1** Deney gruplarının belirlenmesi

**Çizelge 3.2** CAL62 hücrelerinin pozitif ve negatif belirteçleri

**Çizelge 3.3** İnsan kemik iliği kökenli Mezenkimal kök hücrelerin akım sitometride pozitif / negatif belirteçleri

**Çizelge 3.4** Hücrelerin ko-kültür sistemi planı

**Çizelge 3.5** Cancer PathwayFinder PCR Array analizinde 96well plate referans ve negatif genlerin yerleşimi

**Çizelge 3.6** Cancer PathwayFinder PCR Array analizinde bakılan genlerin listesi

**Çizelge 3.7** Cancer PathwayFinder PCR Array analizinde genlerin hedef etkileri

**Çizelge3.8** Ortak kültür sonrası CAL 62 ve iKİ-MKH pozitif ve negatif belirteçleri

# 1. GİRİŞ

## 1.1 Genel bilgiler

Kanser günümüzde en önemli sağlık sorunlarının arasında ilk sırada yer almaktadır. Çok sık görülmesi ve yüksek oranda ölümlere yol açtığından kanser bir halk sağlığı sorunu olmasıyla birlikte dünyanın en önemli sağlık sorunu haline gelmiştir. Ölüm oranlarının fazla olması konunun önemini oldukça arttırmaktadır. Kanser bir hücre hastalığıdır ve hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması olarak kısaca tanımlanabilmektedir. Hücresel temelli tedaviler kanser hastalarının tedavisinde büyük umut ışığı olmuştur. Kanser hastaların yaşam kalitesini oldukça olumsuz yönde etkileyen en ölümcül hastalıktır. Kanserinin ortaya çıkma nedenlerine baktığımız zaman ilk olarak yaşa, cinsiyete, aile öyküsüne ve yaşam şekline göre değişmektedir. En önemli nedeni genetik yatkınlıktır. Günümüzde çeşitli kanser türlerine standart tedavi yaklaşımları geliştirilmiş olsa da insanların Deoksiribo Nükleik Asit (DNA)'sı farklı olduğundan tedavilerden farklı cevaplar alınması kaçınılmazdır.

Kanser konusunda hastalara yardımcı olmak, kanser gerçeği hakkında bilgilendirmek için 18 Şubat 1947'de Ankara'da önemli bilim adamları tarafından ' Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu' adı altında bir yardım derneği kurulmuştur. Kanser araştırma ve savaş kurumunun temel amacı kanserden korunma, erken tanı ve tedavi için konferanslar düzenleyerek hastaları ve toplumu bilgilendirmektir. Kanserler köken aldıkları dokulara göre isimlendirilmektedir. Epitel dokusunan kaynaklanan kanserler karsinom adını alırken, kas ve bağ dokusundan kaynaklanan kanserler sarkom adını almaktadır. Belirti ve tedavi şekilleri de kanserin cinsine göre değişmektedir.

Baş boyun kanserleri dünyadaki en yaygın 8. Kanser tipidir ve tüm kanserlerin yaklaşık %6 'sını oluşturmaktadır. Dünyada yılda yaklaşık 650.000 yeni baş boyun kanser vakası teşhis edilmekte ve her yıl bu vakaların yaklaşık yarısı ölmektedir (Grandis ve diğ 2004, Shah ve diğ 2003).Baş boyun kanserleri geç semptom verdiğiinden büyük boyutlara kolayca ulaşabilmektedirler. Tanısı ve evresi bilgisayarlı tomografi(BT), manyetik rezonans(MR), ultrasonografi ve skopik incelemeler ile yapılmaktadır. Tiroid kanseri baş boyun kanserleri içerisinde çok belirgin farklılıklara sahip olan ve en sık görülen endokrin tümördür. Tiroid organı insanların yaşamlarını sağlıklı olarak sürdürebilmesi için hayati öneme sahip hormonlar salgılayan ve metabolizmayı düzenleyen endokrin bezlerdir.

Kanser türleri içerisinde çok sık görülmemesine ve mortalite oranının düşük olmasına rağmen tiroid kanseri bireylerin hayati fonksiyonlarının sürdürülebilmesi açısından önemli bir klinik problem olma özelliğini korumaktadır. Kanser tedavisinde gelinen diğer bir önemli aşama olan hücresel temelli tedavilerde kök hücre önemli bir yer almaktadır. Kök hücreler kendi kendini yenileme yeteneğine sahip olan, yüksek bölünme kapasiteleri olan ve farklılaşma özelliğine sahip özelleşmiş hücre grubudur.

Kök hücreler otolog (hastanın kendi vücudundan elde edilen) olarak elde edilebildiğinden hücreler immün sistem tarafından red edilmemektedir. İmmünolojik olarak red edilemeyeceği için hücresel temelli tedavilerde kök hücreler hastalara büyük umut ışığı olmaktadır. Kök hücrelerin kanser hücrelerine doğru gösterdikleri migrasyon kapasitesi, kök hücrelerin kanser tedavilerine karşı uygulamasında bilim insanlarını heyecanlandırmaktadır.

*Boswellia serrata* (B.Serrata) anti-kanser özellik sergilediği gözlemlenmiş *Burseraceae* familyasına ait olan bir bitki türüdür. B.serrata orta büyüklükte dallanma gösteren Hindistan, Kuzey Afrika ve Orta Doğu'nun kuru dağlık bölgelerinde bulunan 17 cins ve 600 türünden en önemlileri arasında yer alan bitki çeşididir. *Boswellia serrata* bağışıklık sistemini baskılayıcı etkisi, kanser hücresinin büyümesini engelleyici, sitotoksik etkileri ve kanser karşıtı etkileri insanlar üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarda doğrulanmıştır.

Önerdiğimiz çalışmamızda *B.serrata*'nın AKBA (acetyl-11-keto- $\beta$ -bosvelik asit) formunun kullanılmasının öngörülmesi arasında anti-kanserojenik, modülasyonda moleküler düzeyde kinazlar, transkripsiyon faktörleri, enzimler, reseptörler, büyüme faktörleri ve hücre proliferasyonu üzerine olan etkileri yer almaktadır.

Bu çalışmada *boswellia serrata*'dan elde edilen AKBA formu bosvelik asit ile kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin tiroid kanseri türleri içerisinde en agresif seyreden anaplastik tiroid kanser hücreleri üzerinde birlikte gösterecekleri hücresel tedavi edici etkilerini incelenmiştir.

## 1.2 Kök Hücreler

Kanser tedavisi tıbbın en yoğun tedavi uygulanması gereken alanıdır. Günümüzde teknolojinin ilerlemesi ile birlikte güncel tedavi yaklaşımları hızla ilerlemektedir. Rejeneratif tıp hasar görmüş olan dokuların ve organların eski işlevselliğini kazandırmak amacıyla kullanılan kök hücreleri ve hücresel tedaviyi kapsamaktadır.

Günümüzde kök hücre tedavileri deneysel aşamada olup ve bazı alanlarda ise klinik olarak uygulanan tedavi yöntemlerinden biridir. Kanser bir hücre hastalığı olduğundan hücresel tedaviye yönelim oldukça artmaktadır. Vücudumuz hücrelerden oluşmaktadır ve kanser hücreleri kontrolsüz bir şekilde hızla bölünerek yayılmaktadır.

Kök hücreler bölünebilme ve kendini yenileyebilme yeteneğine sahip farklılaşmamış fakat özelleşmiş hücrelere farklılaşabilme kapasitesine sahip hücrelerdir. Henüz farklılaşmamış olan kök hücreler sınırsız bölünme ve kendini yenileme özelliğinden dolayı dokulara ve organlara dönüşebilme kapasitesine sahiptir. Farklılaşma özellikleri sayesinde özelleşmiş bir hücreye kaynaklık edebilirler. Normal kök hücrelerimiz ve kanser hücrelerimiz çoğalma ve farklılaşma kapasitesine sahiptir. Normal kök hücrelerimiz kontrollü bir şekilde çoğalıp farklılaşırken kanser hücrelerinin çoğalma ve farklılaşması kontrolsüz bir şekilde olmaktadır.

Yüksek bölünebilme potansiyelleri sayesinde migrasyon özellikleriyle hasarlı bir dokuda onarım gerçekleştirebilirler. Kök hücreler sınırsız bölünebilme sonucunda özelliklerini halen daha korumaktadır. Kök hücreler, ökaryotik kromozomların uçlarında yer alan telomer olarak isimlendirilen binlerce kez tekrar edilen kısa DNA dizileri (TTAGGG) içermesinden sürekli ve sınırsız bölünebilme özelliğine sahiptir.

Telomer her bir DNA yapısının uç kısmında bulunan heterokromatin yapılarıdır ve kromozomların yapısını korur. Telomer kök hücrelerin bölünmesinde oldukça önemli bir rol oynamaktadır. Bir hücrenin telomer yapısı ne kadar uzun ise o kadar hızlı ve çok bölünebilme kapasitesine sahip olur. Hücrelerin bölünmesi sonucunda 50-150 baz çifti telomer uzunluğu azalmaktadır (Reddel 2003).

Telomeraz ribonükleoprotein yapıda özel bir DNA polimerazdır. Kök hücreler sınırsız bölünürken telomeraz enzimi sayesinde telomerlerini uzatarak gerçekleştirirler. Kök hücrelerin dışındaki hücrelerin belli bir bölünme kapasitesi vardır. Kök hücrelerde, kanser hücrelerinde ve insan germ hücrelerinde hTERT geni çok aktif olduğundan telomeraz aktivitesi oldukça yüksektir.

İnsan germ hücrelerinin telomeraz aktivitesi çok yüksek olduğundan bu hücreler asla yaşlanmazlar. Somatik hücrelerin embriyonik dönemde hTERT geninin transkripsiyonu baskılandığından telomeraz aktivitesi oldukça düşüktür ve çok fazla bölünme kapasitesine sahip değildir. Somatik hücreler bölünmeleri sonucunda yaşlanmaya giden hücrelerdir. Progeria hızlı yaşlanma hastalığıdır ve ciddi yüksek telomer kısalması olmaktadır.



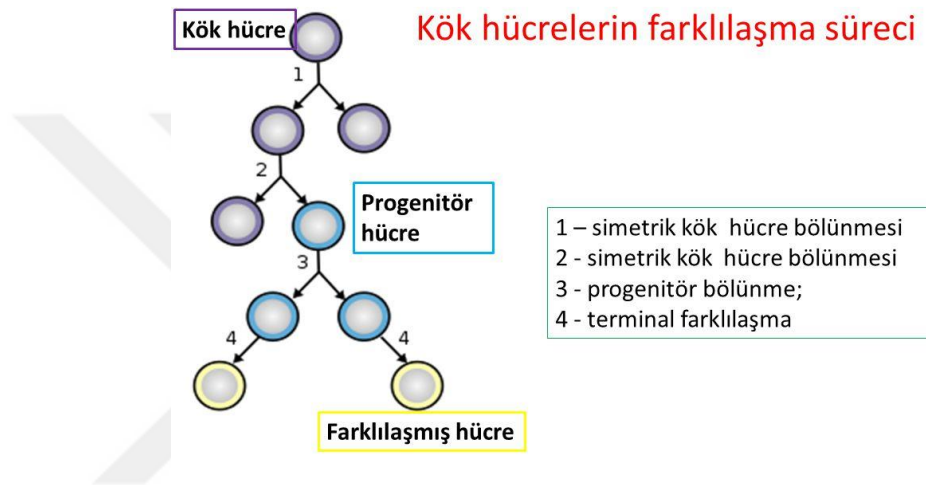


### 1.2.1 Kök Hücre Tarihi

Kök hücre çalışmaları 1960'lı yılların başlarında hemapoetik kök hücrelerin keşfi ile başlamıştır. Daha sonrasında çalışmalar çeşitli bilim adamları tarafından geliştirilerek günümüze kadar gelmiştir. Prof. Dr Süreyya Tahsin Aygün kök hücre çalışmalarına ışık tutarak öncülük etmiştir. 1950-1960'lı yıllarda hayvanlarda fetal greftler ve kordon kanı greftleriyle bazı hastalıkların tedavisinde araştırmalara öncülük etmiştir. İlk olarak 1967 yılında embriyonal karsinoma farelerdeki teratokarsinomaların embriyonik germ hücrelerinden köken aldığı ve kültür ortamında çoğaltılabilmesi kök hücre çalışmalarında önemli bir adım olmuştur. Aynı dönemde Ernest McCulloch ve James Till tarafından fare kemik iliği hücrelerinin kendi kendini yenileme özelliği nakil sonrasında keşfedilmiştir. Kemik iliği kök hücreleri o dönemde hastalıkların kök hücre ile tedavi olması açısından büyük umut olmuştur. 1968 yılında ilk insan yumurtası in vitro olarak fertilize edilmiştir. 1978 yılında ise İlk IVF bebeği (tüp bebek) olan Louise Brown, İngiltere'de doğmuştur (Evans ve ark.1981). 1981 yılında Evans, Kaufman ve Martin isimli bilim adamları blastosistlerin iç hücre kitlelerinden fare embriyonik kök hücreleri(EKH) elde etmişlerdir. İn vitro ortamda pluripotent fare EKH'lerini çoğaltmak için, gerekli kültür şartlarını oluşturmuşlardır. Rhesus isimli bilim adamının yaptığı bir çalışmada maymunlardan EKH hücreleri elde etmiştir. Rhesus'un yaptığı bu çalışma insan EKH'lerinin de elde edilip in vitro ortamda çoğaltılabileceğinin düşüncesini oluşturmuştur. Wisconsin üniversitesinde James Thomson ve ekibinin IVF laboratuvarında 36 tane embriyodan insan EKH' elde etmişlerdir(Thomson ve ark.1998).Embriyonik kök hücrelerin gelecekte hastalıkların tedavisinde kullanılabilme ihtimallerinin yüksek olması, bilim insanlarında heyecan oluştururken, henüz çözümlenememiş etik sorunlar kök hücre çalışmaları için ciddi bir problem yaratmıştır (Güneş, 2005). Etik problemler dolayısıyla kök hücre çalışmaları yerini yetişkin tip kök hücrelere bırakmıştır. Günümüzde kök hücre çalışmaları halen devam etmekte olup hastalıkların tedavisinde güncel yaklaşımlar oluşturulmasında önemli yer tutmaktadır.

## 1.2.2 Kök Hücrelerin Farklılaşma Kapasitesine Göre Sınıflandırılması

Kök hücreler asimetrik bölünme(AHB) özelliğine sahip hücre grubudur. Kendilerini yenileme ve farklılaşma özelliklerinin temelinde asimetrik hücre bölünmesi yatmaktadır. Asimetrik bölünme sonucunda kök hücreler kendilerini yenileyerek aynı zamanda da farklılaşma özelliğini yerine getirmek amaçlı yeni bir yavru hücre elde etmiş olmaktadır. AHB sonucunda kök hücre havuzundaki hücre sayısı sabit kalmaktadır. AHB sonucunda hemaostazi dengesi korunmuş olmaktadır (Lanza R ve diğ.2009).



**Çizim1.2.** Kök hücrelerin asimetrik bölünme ile farklılaşmış hücre oluşması (Prof.Dr. Gönül Kanıgür)

Kök hücrelerin diğer hücelere farklılaşabilme özelliği potensi olarak tanımlanır. Kök hücreler sahip oldukları potensisine göre totipotent, pluripotent ve multipotent yönde farklılaşma gerçekleştirirler (Slack 2018).

### 1.2.2.1 Totipotent Kök Hücreler

Tek bir hücrenin bölünmesiyle ait olduğu organizmadaki tüm hücre tiplerine farklılaşarak organı ve dokuları oluşturabilecek en yüksek farklılaşma kapasitesine sahip kök hücrelerdir. Sperm ile yumurta hücresinin bir araya gelerek gerçekleştirmiş olduğu döllenme aşaması ile ortaya çıkan zigot farklılaşma kapasitesi en yüksek olduğundan totipotent kök hücre grubu içerisinde yer almaktadır. Totipotent kök hücreler zigotun 8 aşamalı hücre grubu dahil olduğu aşamaya kadar var olan hücrelerdir. (Elçin 2009).

### **1.2.2.2 Pluripotent Kök Hücreler**

Pluripotent kök hücreler karaciğer, beyin, kan ve kalp gibi her üç germ tabakasını(ektoderm, endoderm ve mezoderm) hücrelerini oluşturabilme kapasitesine sahip hücre grubudur. Embriyonun 4-5 günlük aşamasına blastokist olarak bilinir. Blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilen hücreler pluripotent karakterdeki hücrelerdir. Blastokistin iç hücre kitlesindeki bu hücreler ektodermal, endodermal ve mezodermal yönde farklılaşabilen hücrelerdir(Elçin 2010). Tek başlarına bir organizmayı oluşturabilecek kapasitede olmayan hücre grubudur(Özcan 2010).

### **1.2.2.3 Multipotent Kök Hücreler**

Erişkinlerin vücudunda var olan birkaç farklı hücre grubuna farklılaşabilme kapasitesine sahip hücrelerdir (Gardner 2002). Multipotent karakterdeki hücreler göbek kordon kanında(Covas ve diğ,2003) ve adipoz dokusunda (Tallone ve diğ. 2011) ve daha birçok dokuda bulunabilmektedir. Multipotent karakterdeki hücreler pluripotent karakterdeki hücrelere oranla daha sınırlı sayıda farklılaşma kapasitesine sahip olmakta ve özelleşmiş hücre gruplarını oluşturabilme yeteneğine sahip hücrelerdir. Multipotent hücreler buldukları dokunun hücre tiplerini üretirler. Örneğin multipotent karakterde bir hücre olan hematopoetik kök hücreler nötrofil, monosit gibi daha özelleşmiş hücre tiplerini oluşturmaktadır(Karaöz ve diğ,2009).

### **1.2.3 Kök Hücrelerin Çeşitleri**

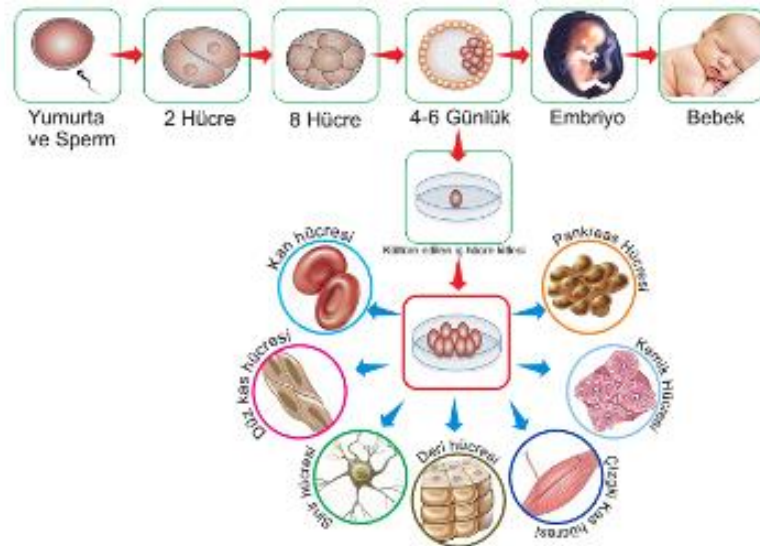
Kök hücreler embriyonik ve erişkin dönemde bulunan farklı bir hücreye farklılaşma kapasitesine sahip hücrelerdir. Embriyonik kök hücreler ve embriyonik olmayan kök hücreler olmak üzere temelde iki sınıfa ayrılırlar(Karaöz ve Ercümet 2004).Embriyonik kök hücreler üzerindeki çalışmalar 1970'li yıllarda başlamıştır. Farelerde gelişen teratokarsinomadan embriyo karsinoma hücrelerinin elde edilmesi embriyonik kök hücrelerin varlığının ortaya konmasında önemli adım olmuştur(Kahan ve ark.1970).

Embriyonik kök hücreler blastokistin 4-5 günlük iç hücre kitlesinden elde edilen kendi kendini yenileme yeteneğine sahip ve her üç germ yaprağına(endoderm, ektoderm ve

mezoderm) farklılaşabilme kapasitesine sahip pluripotent hücrelerdir. Lösemi inhibitör faktör (LIF) sayesinde fibroblast tabakaya yerleştirildiklerinde prolife olarak sonsuz pluripotent kalırlar(Evans MJ,1981). Embriyonik kök hücrelerin telomeraz aktivitesi çok yüksektir.

Embriyonik kök hücreler vücuttaki farklılaşmış herhangi bir hücreyi oluşturabilme yeteneğine sahiptir (Amabile ve ark. 2009). Ektoderm, endoderm ve mezoderm yönde farklılaşma kapasitesine sahip hücrelerdir. Bu hücreler kalp, kas, kemik, pankreas, karaciğer, akciğer, böbrek, kemik ve beyin hücrelerine dönüşebilecek kapasiteye sahip yüksek farklılaşma yeteneğine sahiptirler. Örneğin; GATA4 embriyonik kök hücrelerin endoderm farklılaşmasındaki en önemli belirteçidir. Hücre farklılaşması gerçekleştirilmeden sınırsız sayıda simetrik bölünürler. Gelişim esnasında ilgili hücrelere dönüşmesi en karakteristik özelliğidir.

Embriyonik kök hücrelerin ektoderm, endoderm ve mezoderm farklılaşmasında bazı önemli faktörler vardır. Retinoik asit, BMP4, FGF2 ve Epidermis büyüme faktörü (EGF) ektoderm ve mezoderm farklılaşmasında rol aldığı; activin A, hepatosit büyüme faktörü(HGF),sinir büyüme faktörü(NGF) ve TGF $\beta$ 'nın, mezoderm farklılaşmasını uyardığı gösterilmiştir(Wobus ve ark. 2005). İnsan embriyonik kök hücrelerinin nöroepitel hücrelerine farklılaştığı 1998 yılında yapılan çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışma sonucunda nöropaminerjik nöronların farklılaştırılması gerçekleştirebilmiştir(Thomson ve ark 1998).

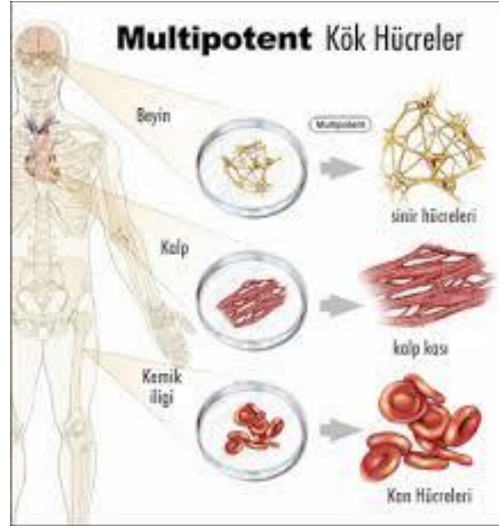


**Çizim1.3.** Embriyonik kök hücrelerin eldesi ve farklılaşma kapasitesi

İnsan embriyonik kök hücreleri kendi kendilerini yenilemesinde ve pluripotensi özelliklerinin ortaya konmasında rol alan FGF2 ve Activin A ifadelerine sahiptir. Kendilerini yenileme özelliklerinin korunmasında FGF2 önemli rol oynarken BMP'nin baskılanması da diğer önemli faktördür. Embriyonik olmayan kök hücreler kadavradan veya erişkinlerden elde edilen kök hücrelerdir.

Yetişkin tip kök hücrelerin elde edildikleri kaynaklar kemik iliği, göbek kordon kanı, plasenta ve çeşitli dokulardır. Yetişkin haldeki kök hücrelerin elde edildikleri dokular beyin, deri, kalp, göz, karaciğer, pankreas, meme, ovaryum, testis ve gastro-intestinal sistem olarak yapılan çalışmada gösterilmiştir (Blau, 2001).

Yetişkin haldeki kök hücrelerin sayıları embriyonik kök hücrelere oranla daha sınırlıdır. Yaralanma ve hasar sonucunda, hasara uğrayan hücreleri tamir etmek en önemli özelliğidir. Yetişkin kök hücreler multipotent özellikteki kök hücrelerdir. Yetişkin kök hücreler embriyonun blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilen yani pluripotent karakterdeki hücreler ile aynı benzer diferansiyasyon özelliğine sahip olduğu ve kemik iliği kökenli kök hücrelerin iskelet kası hücrelerine farklılaşması çeşitli bilim adamları tarafından örnek gösterilmiştir. Yetişkin kök hücrelerinin (multipotent) doku kaynağı olarak, tedavi amacıyla kullanılabilmesi için, bu hücrelerin plastisite ve vücut dışında proliferasyon özelliklerinin artırılması yönünde çalışmalar sürdürülmektedir (Coulombel,2003).



**Çizim 1.4.** Multipotent kök hücrelerin kaynakları ve farklılaşma kapasitesi (Multipotent stem cells was last modified: March 21st, 2017 by Regen Center)

Erişkin haldeki kök hücrelerde kendi arasında;

1. Hematopoetik kök hücreler
  - 1.1 Kemik iliği kök hücreleri
  - 1.2 Periferik kan kök hücreleri
  - 1.3 Kordon kanı kök hücreleri
2. Stromal kök hücreler
3. Organlardaki erişkin kök hücreler olarak sınıflandırılmaktadır (Karaöz ve Ovalı, 2004).

### **1.2.3.1 Hematopoetik Kök Hücreler**

1870 yılında Alman patolog Julius Cohnheim bilim adamı tarafından öncül hematopoetik kök hücreleri tanımlanmıştır. Daha sonra ilerleyen süreçte 1906 yılında Alexander Maximov bilim adamı tarafından hematopoetik kök hücrelerden progenitör hücrelerinin farklılaştığı ve geliştiğini göstermiş buna ek olarak kemik iliği stromasında bu farklılaşma ve gelişme için bazı önemli faktörler olabileceğini ileri sürmüştür. 1971 yılında Alexander Friedenstein tarafından hematopoetik kök hücre stroma ilişkisine yönelik önemli çalışmalar yapılmıştır(Friedenstein A,1989).

Hematopoetik kök hücreler kemik iliğinde ‘niş’ adı verilen mikroçevrede bulunmaktadır. Bu kök hücrelerin yaşam boyu fonksiyonlarını devam ettirebilmeleri kemik iliğindeki ‘niş’ adı verilen mikroçevreye yerleşmeleriyle olmaktadır. Hücre siklusunun G0 evresinde kök hücre havuzunda hücre sayısını sabit tutmaya çalışırlar. İhtiyaç halinde hücre siklusuna girerler. Bu hücrelerin çoğunluğu normal şartlar altında hücre siklusuna girmeyip endosteal niş bölgesinde beklemekte ve gerektiğinde hücre siklusuna girmektedir (Nilsson ve ark. 2004).

Hematopoetik kök hücreler embriyoda hemanjiyoblastlardan ve hemojenik epitel hücrelerinden kökenlenir. İlk olarak kısa sürede fetüsün karaciğerinde görülürler. Karaciğerde çoğaldıktan sonra myeloid ve lenfoid serilerine farklılaşarak karaciğerden çıkarak kemik iliğine gelirler.(Wilson ve diğ.2006). CXCL12 ve CXCL4 hematopoetik kök hücrelerin gelişimde en önemli reseptörüdür(Shiozawa ve diğ.2008). CXCL4 reseptörünün baskılanması hematapoetik kök hücrelerin kemik iliğine yerleşmesini engellemektedir.

Hematopoetik kök hücreler etkinlik kazanarak kanın ve immün sistemin myeloid ve lenfoid hücrelerini oluşturmada görevlidirler. Kan hücreleri oldukça kısa ömürlü hücrelerdir. Hematopoetik kök hücrelerin en önemli görevleri kısa ömürlü olan kan hücrelerinin yenisini oluşturmak ve yenilemektir. Hematopoetik kök hücreler yetişkin tipteki kök hücreler olmakla birlikte bütün kan hücrelerine farklılaşabilme ve kendini yenileyebilme kapasitesine sahiptirler. Hematopoez embriyonik dönemde yolk kesesinde başlamaktadır. Embriyonik dönemden sonra timüs, dalak, kemik iliği olmak üzere devam etmektedir(Durand ve ark.2005).

Hematopoez yalnızca bir kök hücreden çok sayıda farklı kan hücrelerinin oluşması ve farklılaşması sürecini içermektedir. Hematopetik kök hücreler (HKH) yaşam boyu hematopoezin devamlılığı için gerekli olan hücrelerdir. Hematopoezin devamlılığı için kemik iliğindeki mikroçevrenin önemi oldukça büyüktür. Hematopetik kök hücrelerin migrasyonu, kendini yenilemesi, farklanması ya da diğer biyolojik aktivileri kemik iliğinde ki niş tarafından belli olmaktadır. Kemik iliğinde oluşan çeşitli sinyaller doğrultusunda kendi kendini yenilemesi, sessiz kalması veya 'niş' ten çıkarak farklılaşmaya gitmesi belli olmaktadır. Hematopoetik kök hücrelerin nişe yerleşmesi ve burada sessiz fazda kalmasında adezyon önemli rol oynar. Hematopoetik kök hücrelerin kemik iliğindeki niş ortamından çıkması ve migrate olması kemik iliği stromasında bulunan ekstraselüler matriks molekülleri (ESM), reseptör-ligand etkileşimleri, kemokinler-sitokinler ve hücre-matriks ilişkisiyle olmaktadır (Heazlewood ve ark. 2014).

#### **1.2.3.1.1 Kemik İliği Kök Hücreleri**

Kemik iliği sternum ve kalça kemikleri gibi uzun ve düz olan kemiklerin içerisinde bulunan süngerimsi dokudur. Kemik iliği hücrelerinin görevi kanda dolaşan kan hücrelerini ve oluşan enfeksiyonlara karşı bağışıklık hücrelerini üretmektir. Pelvis adı verilen leğen kemiği en fazla kemik iliğini içermekte ve bu kemikte oldukça yüksek oranda kök hücre bulunmaktadır.

Vücudumuzdaki her doku kök hücre adı verilen ana hücreden üretilmektedir. Tüm kan hücrelerimizde kök hücrelerden üretilmektedir ve bu kan kök hücrelerinin de ana kaynağı kemik iliğidir. Kan hücreleri lenfosit, eritrosit, trombosit, lökosit olmak üzere birçok farklı çeşitte kan hücreleri bulunmaktadır. Kan hücrelerinin yabancı etkenlere karşı vücudun



savunma sistemini oluşturma ve dokulara oksijen taşıma gibi hayati önem taşıyan çeşitli görevleri vardır.

Kemik iliğinde hematopoetik kök hücreler ve mezenkimal kök hücreler olmak üzere iki çeşit kök hücre grubu yer almaktadır. Mezenkimal kök hücreler ve hematopoetik kök hücreler kemik iliği mikro çevresinin gelişiminde önemli rol oynar.

#### **1.2.3.1.2 Periferik Kan Kök Hücreleri**

Kan kök hücreleri yüksek oranda kemik iliğinde bulunmakla birlikte az miktarda da olsa periferik kanda bulunmaktadır. Diğer kök hücre kaynaklarına baktığımız zaman kanda bulunan kök hücrelerin sayıları çok azdır. Kemik iliği kök hücrelerine oranla sayılarının oldukça az olmasına rağmen çoğalma kapasiteleri oldukça yüksektir. Periferik kan kök hücre transplantasyonu onkolojik ve hematolojik hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır.

#### **1.2.3.1.3 Kordon Kanı Kök Hücreleri**

Göbek kordonu wharton jeli olarak olarak isimlendirilen iki arter ve bir ven içeren 3 damardan oluşan müköz bağ dokusu ile çevrilmiş yapıdır. Wharton jeli göbek kordonu jelatinöz bağ doku ve myofibroblast benzeri stromal hücrelerden, kollajen liflerden ve proteoglikanlardan meydana gelmiştir(Mitchell ve diğ.2003).

Dokuya özgü kök hücrelerinin yeni bir kaynağı olduğunu *Mitchell et al*, tarafından göbek kordonu stromasında var olduğu gösterilmiştir. Kordon kanı göbek kordonu içerisinde doğumdan sonra kalan kandır. Doğum gerçekleştikten ilk üç dakika içerisinde damardan kan akışı devam etmekte ve bu kan kök hücre açısından çok zengindir. Yapılan araştırmalar kordon kanı kök hücrelerinin hastalıklarda tedavi amaçlı kullanımında önemli bir göreve sahip olduğunu göstermiştir. 1972’de bilim adamları tarafından lenfoblastik lösemnin tedavisinde olumlu sonuçları olęu gösterilmiştir(Ende ve diğ.1972). Diğer kök hücre kaynaklarına oranla eldesinin kolay olması, saklanması sırasında daha az risk taşması ve farklılaşma özelliğinin daha yüksek olması hastalıklarda büyük umut olmaktadır.

Kordon kanında hematopoetik kök hücreler ve mezenkimal kök hücreler bulunmaktadır. Kordon kanı kök hücrelerinin kemik iliği kökenli kök hücrelere oranla üreme hızı daha

fazladır fakat daha narin hücrelerdir(Mayani,2010). Kordon kanı kök hücreleri hematopoetik kök hücreler tarafından oldukça zengindir(Kurtzberg J,1996).Göbek kordon kanı hematopoetik kök hücre tarafından oldukça zengin olmasından dolayı hematopoetik kök hücre transplantasyonu için aslında kemik iliğine ek olarak alternatif bir yöntemdir(Broxmeyer ve diğ.2011).

Kordon kanında bulunan mezenkimal kök hücreler kemik iliğinde bulunan mezenkimal kök hücrelere oranla daha fazla çoğalma kapasitesine sahiptir(Bieback ve diğ.2004). İlk olarak 1988 yılında Fanconi göbek kordon kanı naklini gerçekleştirmiştir(Gluckman ve diğ.1989). Kordon kanı kök hücre nakillerinin tedavi amaçlı hastaya verilmesinde olumlu sonuçlar alındığı yapılan çalışmalarda kanıtlanmıştır(Laughlin ve diğ.2004).

### **1.2.3.2 Stromal Kök Hücreler**

Mezenkimal kök hücreler(MKH) ilk kez Fridenstein tarafından tanımlanmış bağ dokunun ana hücresi olan erişkin haldeki kök hücrelerdir. Fridenstein yaptığı çalışmada fetal buzağı serumu kullanarak kemik iliği kültüründeki hücrelerin yağ ve kemik hücrelerine farklılaşabildiğini göstermiştir(Fridenstein ve diğ,1970). Sonraki yapılan çalışmalarda pluripotent kök hücreler olduğu tanımlanıp mezenkimal kök hücre adını almıştır(TÜBA Kök Hücre Çalışma Grubu,2009).Bu hücreler mezenkimal stromal kök hücreler olarak da isimlendirilebilmektedir. Mezenkimal kök hücrelerin en çok bulunduğu yer kemik iliği olmakla birlikte birçok dokudan elde edilebilirler. Mezenkimal kök hücreler mezodermal kökenli (Ogawa 2006) nöral kristadan köken alan özel hücrelerdir(Takashima ve diğ. 2006). Tedavilerde en çok kullanılan superior iliaktan alınan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerdir. Kemik iliği dışında; amniyon sıvısı, periferik kan, kordon kanı, diş pulpası, plasenta, karaciğer ve yağ dokusu gibi dokulardan elde edilebilir. Mezenkimal kök hücreler yağ, kas, kemik, kıkırdak, tendon ve nöron hücrelerine farklılaşabilen hücre grubudur(Andrades ve diğ. 2011).

Mezenkimal kök hücrelerin sayısı yaşla birlikte azalma göstermektedir. Ergenlik yıllarında kemik iliğinde bulunan mezenkimal kök hücre sayısı, yeni doğanda bulunan mezenkimal kök hücre sayısının 1:1000.000, 50'li yaşlarda bu sayı1:400.000 olduğu varsayılp hücre sayısının yaşla birlikte azaldığı varsayılmaktadır(Caplan 1994). Mezenkimal kök hücrelerin yapılan çalışmalarda adipojenik, osteojenik, kondrojenik

yönde mezenkimal kökenli dokulara farklılaşabildiği aynı zamanda mezenkimal kökenli olmayan kardiyomiyojenik ve nörojenik farklandığıda ortaya konmuştur.

Mezenkimal kök hücrelerin osteojenik yönde farklılaşma kapasitesi örneğin kemik onarımında hastalara büyük umut ışığı olmaktadır. Mezenkimal kök hücreler kültür ortamında plastik yüzeye yapışmaları en karakteristik özelliğidir. Uzun ince fibroblast benzeri bir morfolojiye sahiptir(Goetzke ve diğ, 2018).

Mezenkimal kök hücreler hücrel tedavilerde ve deneysel çalışmalarda en çok kullanılan kök hücre tipidir. Mezenkimal kök hücreler 1995 yılından itibaren klinik çalışmalarda oldukça yer almaktadır. Graft versus host hastalığı, kemik, kalp hastalıkları, diyabet, kanser, omurilik zedelenmeleri, kırıldak hasarları gibi birçok hastalıkta tedavi amaçlı mezenkimal kök hücre çalışmaları yer almaktadır(Wang S,2012).

Mezenkimal kök hücreler hasarlı bir dokunun onarımında önemli rol oynarlar. Bulunduğu dokudan ayrılıp hasarlı dokuya doğru migrasyon yetenekleri vardır. Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin fareler üzerinde yapılan deneylerde hasarlı fare pankreası üzerindeki etkisi araştırılmış ve pankreatik rejenerasyonu sağlayarak insülin salınımını arttırdığı gözlemlenmiştir. Mezenkimal kök hücrelerin kanser hücrelerinin üzerinde ki anti-tümörojenik etkisi yapılan birçok deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (Shah,2012). Mezenkimal kök hücreler vücuda damar yoluyla verilerek dolaşıma katıldığında tümör dokularına göç ettikleri ve dokuda bir savunma sistemi oluşturduğu, onarım sağladığı çalışmalarda gösterilmiştir(Heldring,2015). Hücrede gerçekleşen parakrin etki nedeniyle mezenkimal kök hücrelerin tümör seçici özelliği olduğu bilinmektedir. Hücreden salınan sitokinlerin salınımıyla gerçekleştirdiği yapılan çalışmalarda kanıtlanmıştır(Liu,2011).

Mezenkimal kök hücrelerin anjiyogenez olan bölgelere göç etmeleri kanser tedavisinde önemli bir hücre olmasını sağlamıştır. İmmünsüpresif/non-immünojenik özellikte olmaları ve anjiyojenik, antiapoptotik, antiinflamatuvar etki göstermeleri hücrel tedaviler içinde Mezenkimal kök hücrelerin öne çıkmasını sağlamaktadır (Utku Ateş,2016). Akut ve kronik lösemi gibi ciddi kan hastalıklarının tedavisinde kemik iliği nakillerine göre in vitro hücre kültürü ortamında elde edilen kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin tedavi amaçlı kullanılması yaygınlaşmıştır(Yokuş O,2012).

Çeşitli kanser türlerinde mezenkimal kök hücre tedavisinin klinik etkinliği araştırılmaya devam etmektedir(Jocham D,2004).Günümüzde tümörlerin tedavisinde ciddi oranda kemoteropi ve radyoterapi uygulanmaktadır. Bu tedavi sonrasında ve tedavi esnasında

hastaların yaşam kalitesi oldukça düşmektedir. Mezenkimal kök hücrelerin kanser hücresine ve dokusuna doğru göstermiş olduğu migrasyon ve onarım mekanizması hastaların yaşam kalitesi düşmeden tedavi olmalarında büyük ışığı olmaktadır.

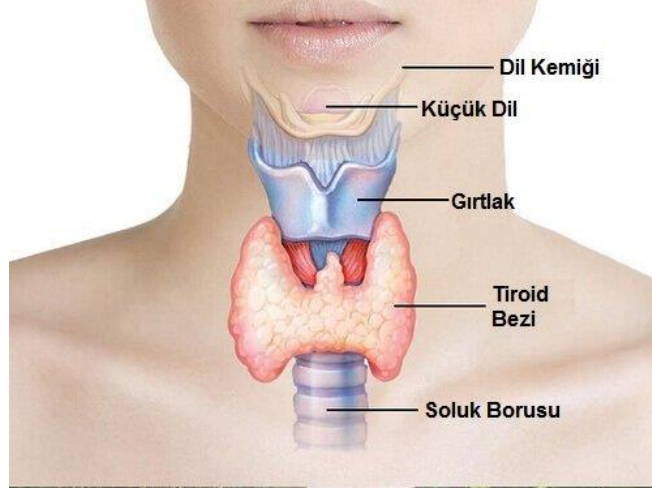
### **1.2.3.3 Organlardaki Erişkin Kök Hücreler**

Organlarda bulunan kök hücrelerin esas görevleri oluşan doku hasarını tamir etmektir. Organlarda bulunan kök hücreler organa spesifik olmaktadır. Kalpte bulunan kalp kök hücreleri, bir tümör hücresinde bulunan kanser kök hücresi, beyinde yer alan nöral kök hücreler veya gözde bulunan limbal kök hücreleri her biri bulunduğu organa ait kök hücrelerdir. Organlarda bulunan kök hücreler kalp kası, endotelyal, epidermal, adiposit, nöronal, kıl kökü, korneal ve meme bezi olarak sınıflandırılmaktadır(İnan ve diğ.2009).

### **1.3 Tiroid Histolojisi**

Tiroid boynun ön kısmında yer alan, hayati öneme sahip hormonlar salgılayan isthmus aracılığıyla birleşmiş iki lateral lobdan oluşan kelebek görünümlü organımızdır. Loblar steernotiroid ve sternohyoid adı verilen kaslarla çevrilidir.

Tiroid bezi embriyoda oluşan ilk endokrin bezdir. Foramen cecum'dan kökenlenir. Tiroid 1 ve 2. Faringeal poşlar arasındaki primitif farinksin tabanından başlar, aşağıya doğru inerek gelişimini tamamlar. Tiroid folliküler ve parafolliküler (C hücreleri) ile bağ dokudan oluşan yapıyı tamamlarlar (Shaha AR, 1998). Tiroid organı gebeliğin 9.haftasında lateral ve median tiroidin birbiri ile birleşmesiyle tam oluşur. Histolojik gelişiminin tamamlanması gebeliğin 16.haftasına kadar devam eder. Tiroid yaklaşık 5 cm boyunda ve yetişkinde 20-30 gr ağırlığında bir organdır. Tiroid tüm yaşam boyu vücudun metabolizmasını düzenlemede görevli olduğundan vücudumuzda ki tüm hücreler trioid organından etkilenmektedir.



**Çizim1.5.** Tiroid bezinin anatomik görüntüsü(<https://evdesifa.com/tiroid-bezinin-fazla-calismasinin-sebepleri>)

Tiroid organı bir iç salgı bezidir. Metabolizmayı düzenlemede görevli olmakla birlikte en önemli fonksiyonlarından biridir. Tiroid bezini uyarıcı hormon (TSH) beyindeki hipofiz bezinden salgılanan hormondur. Kalp atış hızını düzenlemek gibi birçok hayati öneme sahip görevi olan hormondur. Tiroid de bulunan; C hücreleri kalsitonin hormonunun üretiminde görev alırken, folliküler tiroid hormonlarını (T3 ve T4) üretir.

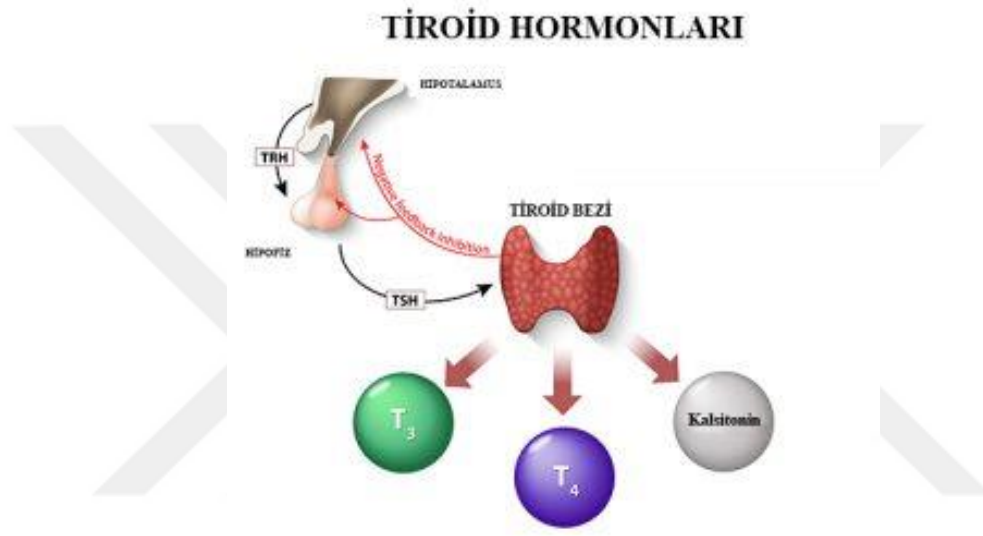
TSH hormonu beyindeki hipofizden kan yolu ile tiroid organına gelerek hayati öneme sahip hormonlar yapılır. Depolanmış olan tiroid hormonlarının kana salınmasını sağlar. En önemli işlevi T3(Triiodotironin) ve T4(tiroksin) adı verilen hormonların salgılanması ve salgılanan hormonların kana verilmesidir. Tiroid hücreleri Tiroglobulin (TG) adında bir glikoprotein sentezler. Bu sentezlenen tiroglobulin folikül içine doğru salgılanır. TG molekülü tirozin adı verilen aminoasitleri içerir.

T3 ve T4 hormonu aminoasit yapılıdır. Tirozin aminoasidi T3 ve T4 oluşumu için ana maddedir ve yapılarında tirozin adı verilen aminoasit bulunur. Tirozine üç tane iyot yapısı eklenerek T3, dört tane iyot yapısı eklenerek T4 hormonu oluşmaktadır. T4 hormonu(%80), T3 hormonuna(%20) oranla vücutta daha fazla salgılanmasına rağmen T3 hormonu, T4 hormonuna göre hücrelere girmede daha etkilidir. T4 hormonu hücrelere girememektedir.

T4 hormonu karaciğerde deiyodinaz enzimi sayesinde hedef dokularda T3 hormonuna dönüşmektedir. Bu dönüşüm sonucunda hücrelere T3 hormonu girmektedir.

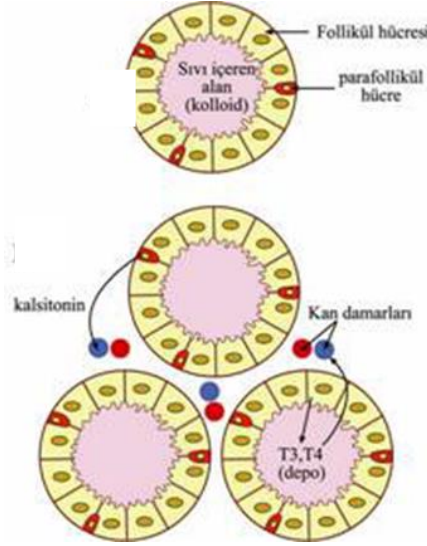
T4 hormonu kanda fazla bulunurken T3 hormonu bu dönüşüm sonucunda kanda fazla bulunmamaktadır. T4 hormonunun T3 hormonuna olan dönüşümün bozulmasıyla yeterince

T3 oluşamaz ve trioid organı görevini yeterince yerine getiremez. T3 ve T4 hormonu bütün vücut hücrelerine ulaşabildiğinden, T3 ve T4 hormonlarının normal sınırın üstünde ya da altında olması tiroid bezinin iyi çalışmadığının göstergesi olmakta ve rahatsızlıkların oluşmasında kaçınılmaz olmaktadır. Tiroid hormonlarının yüksek olması ile ortaya çıkan tiroid hormon yüksekliği tıp alanında hipertiroidi olarak isimlendirilir. Hipofizden fazla miktarda TSH salınımı ile normalden çok fazla hormon üretilmesiyle ortaya çıkmaktadır. Aynı şekilde tiroid hormonlarının az çalışması da rahatsızlıkların temelini oluşturur. Tiroid bezinin gereğinden az çalışması hipotiroidi olarak isimlendirilir.



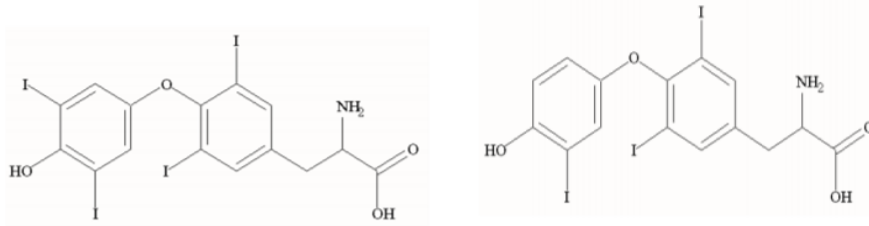
**Çizim1.6.** Tiroid bezinden salgılanan hormonlar(<https://serkanteksoz.com/tag/tiroid-bezi-nasil-calisir>)

TRH hormonu tiotropin salgılayıcı hormon olarak isimlendirilir. Beyinde hipotalamus tarafında ki median eminence adı verilen sinir uçlarından salınır ve kontrol edilir. TRH hormonu paraventricüler çekirdekte sentezlenir. İlk olarak prohormon olarak sentezlenen TRH paraventricüler çekirdekte proTRH şeklindedir. Posttranskripsiyonel işlemten sonra aktif hormon haline dönüşümü gerçekleşir. Tiotropin salgılayıcı hormon (TRH), hipofizden salgılanacak olan tiroid bezini uyarıcı hormon (TSH)'un kontrolünü sağlar. TRH hormonu hipofizin tiotrop hücrelerinde aktive olarak TSH'ın salınımını gerçekleştirir. Gestasyonel yaşın 11-12 haftalarında fetal TSH uyarısı ile tiroid hormonu sentezlenir. Kalsitonin hormonun görevi kanda kalsiyum düzeyini düşürerek kemikte kalsiyum ve fosfat düzeyini artırır. Kalsitonin bu görevi sayesinde kemik erime sürecinde oldukça büyük rol oynar.



**Çizim1.7.** Tiroidin temel yapısı(<https://www.dromerbender.com/tiroid-bezinin-yeri-yapisi-ve-islevi>)

Tiroide özgün fenotipin ortaya çıkması ve tiroidin aşağıya doğru inmesinde tiroid transkripsiyon faktörü 1 (TTF1), tiroid transkripsiyon faktörü 2 (TTF2), PAX8 ile kalp ve tiroidin gelişiminde exprese edilen NKX2.5'in rolü olduğu belirtilmektedir. Tiroidin iki lob haline gelmesinde 'sonic hedgehog(SHH)' geni önemli rol oynamaktadır. Kadherin ana kan damarları dahil yandaş dokuların gelişmesi ve tiroidin kaudale doğru yer değiştirmesinde rol oynar.



**Çizim1.8.** T4 ve T3 moleküler yapısı (Prof. Dr. Arif ALTINTAŞ Tiroid Fonksiyon Testleri ve Fیزیopatolojisi)

### 1.3.1 Tiroid Kanseri Oluşumu Ve Gelişimi

Tiroid kanseri en sık görülen endokrin tümördür. Hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasıyla oluşmaktadır. Her yıl kanser olgularının %1'inde tiroid kanseri ile karşılaşmaktadır ve kanser sebebiyle gerçekleşen ölümlerin %0.5'i bu hastalığa bağlıdır(Tyler DS,2000).

Günümüzde tiroid kanseri her iki cinsiyette görülmesiyle birlikte kadınlarda görülme oranı daha fazla olmakta 40 yaşın altındaki kadınlarda 6. Sırada yer almaktadır(Randolph ve diğ.2007). Çok sık görülmemesine ve mortalite oranının düşük olmasına rağmen tiroid kanseri bireylerin hayati fonksiyonlarının sürdürülebilmesi açısından önemli bir klinik problem olma özelliğini korumaktadır. Tirod kanser olgularında karşılaşılan en önemli sorun tiroid kanseri ile daha yaygın görülen benign tiroid nodülü veya guatrın ayırımının güç olmasıdır. Bu ayırımın kısa sürede yapılabilmesi kişinin yaşam süresi ve kalitesi ile doğru orantı sağlar. Soliter tiroid nodüllerinde bildirilen malignite insidansı %10 ile %30 arasında değişmektedir(Tyler ve diğ.2000). Malignite riskinden dolayı bu kadar sık görülen tiroid nodüllerinin tamamının dikkatli bir şekilde incelenmesi gerekir. Bu amaçla yeni ve daha basitleştirilmiş tanı ve tedavi yaklaşımlarının araştırılması zorunlu olmaktadır.

Tiroid kanseri ile ilgili diğer dikkat edilmesi gereken bir diğer nokta ise genellikle benign bir klinik seyreden tiroid kanserinin bazı durumlarda agresif olabilmesidir. Hastalarda agresif ve rekürrent hastalık gelişeceğini belirlemek her zaman mümkün değildir(Callender ve diğ.1996).

Tiroid kitlesi ile gelen hastanın klinik değerlendirmesi ayrıntılı anamnez alınması ve fizik muayene ile başlar. Bening tiroid nodülü insidansı 20-40 yaş arasındaki kadınlarda daha yüksektir ve bu gruptaki hastalarda kanser riski yaklaşık %5-10 olarak bildirilmektedir. Bununla birlikte erkek hastalarda, 20 yaş altında ve 40 yaş üstünde kanser insidansı çok daha yüksek olarak bildirilmektedir. Bu nedenle tiroid kanserinde yaş ve cinsiyet çok önemli faktörleri oluşturmaktadır(Myers EN,1997).

Tiroid kanserinin nedenleri arasında radyasyon önemli yer almaktadır. Alfa, beta, gama ve X adı verilen ışınlar tiroid kanserine neden olmaktadır. Tiroid dokusunun karşılaştığı bu ışınlar ile kanserin gelişme arasında doğrudan bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. Gıdalarla yetersiz iyot alımında T3 ve T4 hormon üretimi normal olması gereken miktardan daha az üretilir ve TSH salgısı artar. TSH salgısının artmasıyla tiroid hücreleri çoğalır ve kontrolsüz çoğalma ortaya çıkabilir. İyot eksikliği sonucunda tiroid kanserleri içerisinden folliküler tiroid kanseri ortaya çıkmaktadır. Gıdalarla fazla iyot alımı ile papiller tiroid kanseri arasında ilişki vardır.

Tiroid tümörlerinin önemli bir bölümünü primer epitelyal neoplazmlar oluşturur. Tiroid dokusunda bulunan başlıca iki tip epitelyal hücre-folikül epitel hücresi ve C hücreleri-tiroidin primer epitelyal tümörlerine kaynak teşkil ederler. Tiroid kanseri genel olarak



diferansiye(papiller ve folliküler) ve indiferansiye (medüller ve anaplastik)olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Folikül hücrelerinden köken alan tümörler öncelikle benign ve malign olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Benign tümörler genel olarak folliküler adenom adını alırlar. Malign tümörlerden iyi diferansiye olanlar yapısal özellikleri göz onunda bulundurulurak folliküler ve papiller; daha az diferansiye olanlar indiferansiye veya anaplastik karsinom olarak sınıflandırılırlar. C hücre diferansiyasyonu gösteren malign tiroid tümörü ise medüller karsinom adını alır(Kayıhan ve diğ.2003).

### **1.3.1.1 Papiller Tiroid Kanseri**

Tiroid kanser grubu içerisinde diferansiye kanserler içerisinde yer almaktadır. Tiroid kanserlerinin görülme oranının % 90'ini oluşturmaktadır(Tuttle ve diğ.2007). Tiroid kanseri çeşitleri içerisinde coğrafi bölgelere göre değişiklik göstermesiyle birlikte en sık görülen kanser türüdür. Kadınlarda görülme sıklığı erkeklerde görülme sıklığından daha yüksektir. Kadınlarda 40-60 yaş arasındaki bireylerde daha sık görülmektedir(Altekruse ve diğ. 2007).

Genellikle tiroid organının tek lobunda ortaya çıkmaktadır. Görülme yaş aralığı 40-60 olmasına rağmen baş-boyun bölgesinde radyasyona maruz kalmış her yaş grubunda görülebilmektedir(DeGroot ve diğ. 1973). Tümör baskılayıcı genlerdeki(süpresör) mutasyonlar sonucundada oluşabilmektedir. Yapılan çalışmalarda RET veya NTRK1 adı verilen Tirozin kinaz reseptörleri başta olmak üzere RAS ve BRAF yolaklarında ki mutasyon sonucu oluştuğu gösterilmiştir(Jung ve diğ.2012). Ağrısız, ve şişkinlikle belirti vermektedir. Lenf bezlerine %50 oranında metastazı görülmektedir(İto ve diğ,2006). Yetişkinlerde bu oran %36 iken, çocuklar da %80 dir(Mazzaferri ve diğ.2005). Lenf bezine metastazı kanserin tiroide ki yerleşimiyle doğru orantılıdır(Qubain ve diğ.2002). Lenf düğümü metastazı sağ kalım oranını düşürmektedir(Podnos ve diğ.2005).

Papiller tiroid kanseri hücreleri beyin, akciğer ve kemik gibi uzak dokulara da metastaz yapabilirler(İto ve diğ.2012). beyin ve kemikte gelişen uzak metastaz akciğerde gelişen metastaza göre prognozu daha kötüdür(Nixon ve diğ.2012). Yapılan çalışmalarda papiller tiroid kanseri hastalarında 5- 10 yıllık sağ kalım sonrasında akciğere olan metastaz oranı %78-49 olarak saptanırken akciğer dışı uzak metastaz oranı %60- %37 olarak saptanmış ve aralarında anlamlı fark bulunmuştur (İto ve diğ,2010). Papiller tiroid kanserinin tedavisinde cerrahi müdahale yapılmaktadır. Buna ek olarak radyoaktif iyot tedavisi uygulanmaktadır.

Genellikle cerrahi müdahale sonrasında iyot tedavisi ile desteklenmektedir. Cerrahi işlem sonrası metastazdaki kanser hücreleri ve tiroid de kalan kanser hücrelerini ortadan kaldırmak amacıyla yapılmaktadır(Mazzaferrri ve diğ.2001).

Tiroglobulin tiroid bezi hücreleri tarafından salgılanan bir proteindir. Tiroid hormonlarının sentezlenmesinde önemli rol oynar. Sağlıklı kişilerin kanında yüksek bulunmaz. Papiller tiroid kanserinde kanserin tedavi sonrasında nüks etmesi değerlendirilmesi açısından önemli bir belirteçtir.

### **1.3.1.2 Folliküler Tiroid Kanseri**

Tiroid kanser türleri içerisinde papiller tiroid kanserinden sonra ikinci en sık görülen tiroid kanser türüdür. Folliküler tiroid kanseri papiller tiroid kanseri kadar iyi seyretmemektedir. İyot eksikliği genellikle endemik bölgelerde olmaktadır ve endemik bölgelerde yaşayan insanların folliküler tiroid kanseri görülme oranı diğer bölgelere oranla daha yüksek olmaktadır(Sabino de Matos P,2008). Kadınlarda ve yapılan çalışmalarda folliküler tiroid kanserinin oluşumunda iyot eksikliğinin önemli olduğu kanıtlanmıştır(Alevizaki M,2009).

Olguların çoğunda yapılan incelemeler doğrultusunda RAS onkogen ailesi (KRAS, NRAS, HRAS)'inde ve PAX8 geninde mutasyon saptanmıştır (Caron ve diğ.2004). Genellikle ağrısız ve tek tiroidde bilateral kanserleşme görülmektedir(McHenry ve diğ.2011). Hematojen yolla yayılmaktadır. Genellikle kemik ve akciğere metastazı vardır(Niepomniszcze ve diğ. 2006).

Folliküler tiroid kanseri tedavi aşamasında cerrahi işlem gerektirmektedir. İleri yaş, tümör büyüklüğü, uzak metastaz gibi durumlarda total tiroidektomi önerilmektedir(Ban ve diğ.2012). Cerrahi işlem sonrasında radyoaktif iyot tedavisi uygulanabilmektedir. Radyoaktif iyot tedavisinin uygulanması uzak metastazları olan hastalarda yaşam beklentisini artırmaktadır(Sawka ve diğ.2004).

### **1.3.1.3 Medüller Tiroid Kanseri**

Tiroid bezinde yer alan parafolliküler C hücrelerinden kaynaklanan kanser olarak bilinmektedir(From ve diğ.2000). Tiroidin C hücreleri nöral krista kökenli nöroendokrin

hücreler olmakla birlikte C hücreleri en yoğun tiroid loblarının santral-posterolateralinde bulunurlar(İşgör A,2000). Medüller tiroid kanseri tüm tiroid kanserlerinin %7'sini oluşturmaktadır. 10 yıllık sağkalım oranı ise %75 dir(Moley 2010).

Medüller tiroid kanseri ilk defa 1959 yılında solid tiroid tümörlü bir hastada saptanmıştır(Hazard JB, 1959). Tiroid kanserlerinin %5-10 'luk kısmını oluşturmaktadır(Graze K,1978). Yirminci yüzyılda Papiller tiroid kanseri hızla artmasına rağmen medüller tiroid kanseri oranında belirgin bir değişme görülmemiştir(Davies ve diğ.2006). Coğrafi bölgelerle kıyaslandığında farklı bölgelerdeki iyot fazlalığı veya eksikliği medüller tiroid kanserini etkilememektedir(Clayman ve diğ.2003).

Lenf bezine metastazı papiller tiroid kanseri ile karşılaştırıldığında olasılığı daha yüksektir(Machens 2008). Uzak doku metastazlarında beyin, kemik, akciğer ve karaciğer organları yer almaktadır. Karaciğer medüller tiroid kanserinin uzak metastaz yaptığı en sık organdır. Oluşumunda genetik faktörler rol oynamaktadır otozomal dominant kalıtımla geçmektedir(Kloos ve diğ.2009).

RET protoonkogenine ait ilk çalışmalar 1987 yılında yapıldı. Medüller tiroid kanseri tanısı konan hastaların hepsinde RET mutasyonu saptanmıştır. RET protoonkogenin de nokta mutasyonları görülmektedir (Roman ve diğ.2009). MEN2 gen haritasının belirlenmesi ve Tirozin kinaz reseptörü olan RET protoonkogeni mutasyonunun bulunması medüller tiroid kanserinde çok önemli bir yol olmuştur (Mulligan ve diğ. 1993). RET sisteminin anlaşılması medüller tiroid kanserinde moleküler tedavi gelişiminde büyük umut olmuştur(Jimenez ve diğ.2008).

Medüller tiroid kanserinin tedavi seçeneğinde kemoterapi sınırlıdır. RET protoonkogeninin saptanması gerekmekte ve hedefe yönelik moleküler tedavi daha başarılı olacağı ortadadır. Medüller tiroid kanserine sahip olan hastaların kanlarında kalsitonin hormonu yüksektir.

Kadınlarda ve erkeklerde görülme sıklığı benzerdir. Tedavisinde cerrahi işlem gerekmekte ve cerrahi müdahale sonrasında radyoterapi uygulanmaktadır(Machens A,2010). C hücreleri radyoaktif iyodu tutmazlar ve radyoaktif iyot tedavisi medüller tiroid kanseri için bir seçenek değildir(Brauckhoff ve diğ. 2004). Günümüzde yapılan çalışmalarda radyoaktif iyot tedavisinin medüller tiroid kanserine yararlı etkileri gösterilememiştir(Moo-Young ve diğ.2009).

#### 1.3.1.4 Anaplastik Tiroid Kanseri

Anaplastik tiroid kanseri, follikül epitelyal hücrelerden kaynaklanan farklılaşmamış kanser türüdür. Tiroid kanser türleri içerisinde en agresif seyreden malignitesidir. Görülme sıklığı son derece ender olan diğer tiroid kanser türlerine oranla daha az olmakla birlikte ölüm oranı daha yüksek olmaktadır(Tan ve diğ.1995). Ulusal kanser enstitüsü'nün SEER(Surveillance, Edpidemiology, and Results) verilerine göre 1973 ve2000 yılları arasında yapılan çalışmalarda 516 anaplastik tiroid kanseri hasta sayısına ulaşılmıştır(Kebebew ve diğ.2005).

Anaplastik tiroid kanseri genellikle ileri yaşta(ortalama 65) ortaya çıkmaktadır. tiroid kanserlerinin de %5-1'ini oluşturmaktadır. Ortalama sağ kalım süresi 6 ay olmakta ve canlılık oranı %90 dır(Mclver ve diğ.2001).Kadınlarda görülme sıklığı daha yüksek olmasına rağmen her iki cinsiyette de görülmektedir. Endemik guatr bölgelerinde daha çok rastlanmaktadır. Dolayısıyla iyot eksikliği önemli bir faktördür(Williams 1980).

Anaplastik tiroid kanseri daha önce var olan özellikle folliküler tümör yada diferansiye tiroid karsinomlarından gelişmektedir. P16 gen kaybı diferansiye tiroid karsinomlarından anaplastik tiroid kanserinin oluşumundaki dönüşümü açıklamaktadır(Giuffrida ve diğ.2000). Transforme edici büyüme faktörü  $\beta$  (TGF $\beta$ ) tümörün agresifliğiyle doğrudan ilişkilidir. Transforme edici büyüme faktörü  $\beta$  (TGF $\beta$ ) ek olarak beta-katenin mutasyona uğrayarak tümörün agresif olmasına katkıda bulunur(Garcia ve diğ.1999).

Anaplastik tiroid kanseri olgularında P53 geni mutasyonu saptanmıştır(Smallridge ve diğ.2009). P53 geni hücrelerin çoğalması kontrol eden genidir. Mutasyon ile hücrede ki kontrolün bozulmasıyla diferansiye tiroid karsinomu anaplastik tiroid karsinomuna dönüşebilmektedir (Soares ve diğ.1994).Ayrıca H-ras, C-myc, Nm23, PTEN, APC, PIK3CA, TP53, BRAF ve RAS genlerindeki mutasyonla anaplastik tiroid kanseri arasında ilişki saptanmıştır. Anaplastik tiroid kanseri doğrudan çevre dokulara yayılmasına ek olarak akciğer metastazı yaygın olmakla birlikte hematojen veya lenfatik yollarla metastaz yapabilmektedir. Lenf düğümü metastazı %40 iken uzak metastaz oranı ise 15-50 olmaktadır. Akciğer metastazı ise %90 oranındadır. Adrenal bez, deri, kalp, ince bağırsak, pankreas, mide metastazlarında yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur(Chiu ve diğ.1997).

Makroskobik incelmede tümör genellikle tiroid bezinin tamamını tutmuş, kapsül dışına taşarak çevre yumuşak dokulara invaze olabildiği gözlemlenmiştir. Nekroz ve hemoraji

alanları vardır. Mikroskopik görünüm her olguda ve hatta aynı tümörün farklı alanlarında değişiklikler gösterebilmektedir. Tümör hücreleri skuamoid, iğsi veya dev hücre şeklinde olabilirler.

Tümör hücreleri iri ve ileri derecede pleomorfik nükleuslu veya multiple nükleuslu olabilirler. Bu üç tip anaplastik karsinomlarda ortak özellikler arasında sık mitoz geçirme, geniş nekroz alanları ve bez içinde veya çevresindeki dokularda oluşturduğu yaygın invazyon yer almaktadır(Wiseman ve diğ.2003). Cerrahi tedavi tek başına yeterli olmamaktadır ve sağ kalım oranını etkilememektedir(Are ve diğ.2006).

Anaplastik tiroid kanseri hücreleri kemoterapiye dirençli hücrelerdir. Tedavinin başlangıcında kemoterapiye yanıt veren kanser türü olmasına rağmen bir sonraki kemoterapi uygulanmasından önce tekrar hızla eski boyutuna dönüşebilmektedir. Çok çeşitli kemoterapik ajanlar örneğin etoposide, sisplatin, bleomisin denenmiş fakat faydalı olmamıştır(Woyach ve diğ.2009). 2012 yılında Amerikan Tiroid birliği tarafından anaplastik tiroid kanseri ile ilgili bir tedaviyi içeren klavuz yayınlanmıştır. Bu klavuzda kemoterapi uygulaması için bazı kombinasyon ilaçların (doksurobicin, paclitaxel, docetaxel vb.) metastazı olmayan hastalarda uygulanabileceği yayınlanmıştır(Smallridge ve diğ.2012).

Çalışmamızda anaplastik tiroid kanseri türünü seçmemizin en önemli nedeni tiroid kanseri türleri içerisinde en agresif seyretmesidir. Anaplastik tiroid kanseri tedavisinde kemoterapi yeterli başarıyı sağlamadığından çalışmamızda kemoterapiye ek olarak daha yeterli hücresel temelli tedavi geliştirilmesi ve kanser hücrelerinin apoptozunu indüklemek hedeflenmiştir.

#### **1.4 Tedavilerde Mezenkimal Kök Hücrenin Rolü**

Kanser tedavisinde geline en önemli aşamalardan biri hücresel temelli tedavilerde kök hücre yer almaktadır. Mezenkimal kök hücre grubu kök hücre grubu içerisinde en çok çalışılan hücre grubu olmakla birlikte salgıladıkları sitokinler sayesinde hedef bulma, bulunduğu dokuda hasar onarımı ve bağışıklık sistemi üzerine düzenleyici etkiye sahiptir. Günümüzde mezenkimal kök hücreler birçok hastalığın tedavisinde umut ışığı olmakta ve çalışmalar yapılmaktadır. Yapılan çalışmalarda mezenkimal kök hücrelerin tümörün mikro çevresinde immün reaksiyonları engelleyerek tümörün progresyonunu engellediği gösterilmiştir. Sarkoma modeli fare deneyinde mezenkimal kök hücrelerin tümör

büyümesini azaltıcı etkiye sahip olduğu gösterilmektedir(Khakoo ve diğ.,2006). Mezenkimal kök hücreler meme kanseri hücre hattı olan MCF7'nin hücre büyümesini engelleyici etkiye sahip olduğu bilim adamları tarafından yapılan çalışmada ortaya konmuştur(Ryu H,2014). Omurilik yaralanmalarında kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler yapılan bir çalışmada başarı elde edildiği bilim adamları tarafından gösterilmiştir.

Mezenkimal kök hücrelerinin göstermiş olduğu immün düzenleyici etkisi, antiinflamatuvar ve salgıladığı nörotrofin omurilik hasarlarında umut ışığı olmuştur( Park ve diğ. 2012). Serebral arter tıkanmasıyla oluşan iskemik inme geçiren farelerde yapılan çalışmada kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler intravenöz yolla verilmiş ve inme semptomlarının azaldığı görülmüştür(Onda ve diğ.2008).Amiyotrofik lateral skleroz (ALS) omurilik, beyinde ve serebral kortekste işlev kaybına neden olan ayrıca motor nöronlarda dejenerasyon oluşumu gerçekleştiren kas zayıflığına neden olan hastalıktır. 9 ALS hastasına otolog olarak kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre verilen çalışmada motor nöron kaybında azalma saptanmıştır(Vercelli ve diğ.2008).

### **1.5 Kanser Kök Hücresi**

Kanser kök hücreleri normal kök hücreler gibi kendi kendini yenileyebilen, çok yönde farklılaşabilen ve yüksek telomeraz aktivitesine sahip hücrelerdir. Kanser kök hücreleri tümörün başlangıcından sorumlu ana hücrelerdir.

Kanserin agresif olma özelliği kök hücre özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Kanser kök hücrelerini normal kök hücrelerden ayıran en önemli özelliği kanser kök hücrelerinin metastaz özelliğidir. Asimetrik hücre bölünmesi, kendini yenilemesi için kullanıldığı sinyal yolları (Wnt, Hedgehog, Shh, Notch), anjiyojenik faktörlerle anjiyogenezi uyarma, uzun telomere sahip olma gibi diğer özellikleri normal kök hücreler ile kanser kök hücrelerinin ortak özellikleridir. Kanser kök hücreleri var olan kök hücrelerin düzenleyici yollarını (Wnt, Hedgehog, Shh, Notch ) kendisini yenilemek için kullanır. Notch sinyal yolağının hem tümör oluşumunu ve hem de hücre yenilenmesini etkilediği bilinmektedir. Notch yolağının etkileşmesi gliyoma oranını artırmaktadır. (Hambardzumyan ve diğ. 2008).

Tümör hücrelerinde kanser kök hücrelerinin varlığından ilk kez 1983 yılında Mackillop tarafından ortaya atılmıştır. Tümörün doku içindeki başka diğer hücrelerden köken aldığı ileri sürmüştür(Yang ve diğ.2008). Kanser kök hücreleri onkogenlerdeki ve tamir genlerindeki

genetik değişimlerden ortaya çıkmaktadır. Genetik değişimler kadar epigenetik değişimler histon modifikasyonu, anormal metilasyonda kanser kök hücrelerinin var oluşunda etkilidir(Gil ve diğ. 2008).

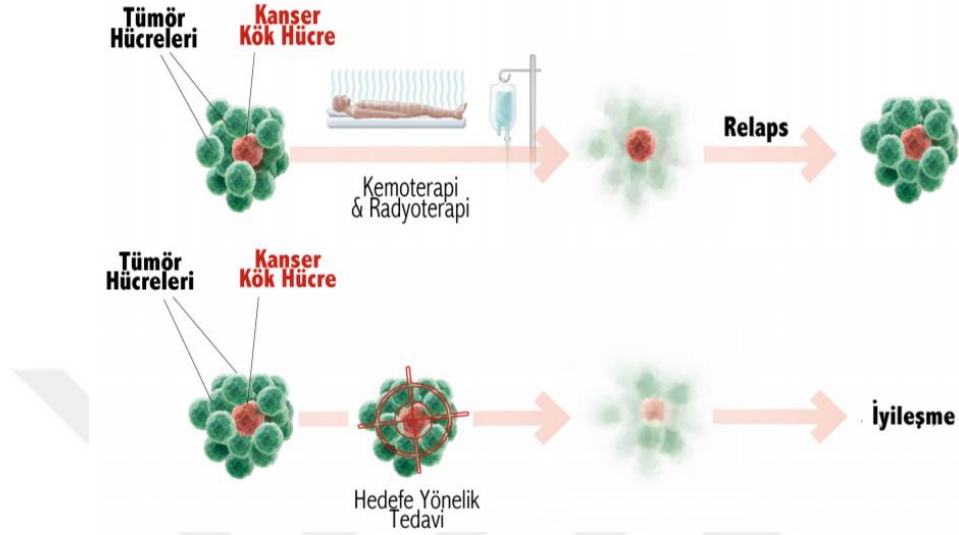
Kanser kök hücreleri bulunduğu dokuya ilaveten diğer dokularda koloni oluşturabilen hücrelerdir. Kimyasal uyarılara ve radyasyona dirençlidirler. Kemoterapi sonrasında kanserin tekrar ortaya çıkması ya da metastaz yapması bulunduğu doku dışında koloni oluşturmasına ve kimyasal uyarılara son derece dirençli olmasından kaynaklıdır. Bilim adamlarının yaptığı bir çalışmada meme kanseri olgularında tedaviden 10 yıl sonra bile metastaz ortaya çıkabileceğini kanıtlamışlardır(Aguirre ve diğ.2007).

Kanser, hücrelerin aşırı ve zamansız çoğalmalarına yol açan metabolik ve davranışsal değişiklikler geçiren süreçtir. Bu değişiklikler hücre çoğalmasını ve ömrünü, komşu hücrelerle ilişkileri ve immün sistemden kaçma kapasitesini kontrol eden modifikasyonlar sonucu ortaya çıkar. Kanserini gelişimi, kendini göstermesi ve sonuçları bir hastadan diğer bir hastaya göre çok değişiklik gösteren bir hastalıktır. Aynı heterojenlik ve çeşitlilik hücrenel ve moleküler düzeyde de kendini gösterir.

Kanser, hücrelerin aşırı ve zamansız çoğalmalarına, immün sistemin gözetiminden kaçmalarına ve nihai olarak da uzaktaki dokuları da istila ederek metastazlar oluşturmalarına yol açan metabolik ve davranışsal değişiklikler geçirdikleri, çok basamaklı bir süreçtir. Bu değişiklikler hücre çoğalmasını ve ömrünü, komşu hücrelerle ilişkileri ve immün sistemden kaçma kapasitesini kontrol eden genetik programlardaki modifikasyonların birikmesiyle ortaya çıkar. Bu süreç, regülasyonu bozulmuş, normal hücre büyümesini ve davranışını denetleyen kurallara uymadıkları için “asi” olarak nitelendirilebilecek hücrelerden oluşan bir kitlenin oluşumuna neden olur. Böylesi bir kitle uzun bir süre asemptomatik olabilir. Bununla birlikte, sonunda büyüyerek, fizyolojik işlevleri altüst edecek, kitlenin yerine ve büyüklüğüne bağlı olarak çok sayıda semptom ve kanser hücrelerinin organizma içinde yayılmasına yol açacaktır.

Tümörün barındırdığı kanser hücreleri günümüzde kullanılan kanser tedavi seçenekleriyle bozulabilir olsada tümör içerisinde bulunan ve kanserleşmiş hücreyi oluşturan, kanser kök hücrelerini tümörden arındıramadığımız sürece kanser varlığını korumaya devam edecektir. Kanser kitlesinin içinde yeni kanser hücrelerinin oluşumunu sağlayan, kendini yenileme, sürekli çoğalma ve metastazlara neden olma yeteneğine sahip tek hücre grubu kanser kök hüresidir. Kanser kök hücrelerinin yenilemeyen tümör

oluşturma yeteneği vardır. Apoptoza karşı dirençlidirler. Günümüzde kanser tedavilerinde kemoterapi ajanları tümör kitlesini hedef almaktadır. Fakat kanser kök hücresi antiapoptatik proteinleri sayesinde kimyasal uyarılara direnç göstermektedirler.



**Çizim1.9** Tümör hücrelerinin kemoterapi ve radyoterapi sonunda nüks etmesi (<http://www.erkzurum.edu.tr> /Omer Faruk KARATAS)

Tümörler morfoloji, yüzey işaretleyicileri, genetik bozukluklar ve tedaviye cevap açısından farklılıklar göstermektedir. Bir tümör kitlesindeki tüm kanser hücreleri homojen ve eşit değildir. Kendi içinde dahi çok farklı genetik ve epigenetik bozukluklar, değişik büyüme ve farklılaşma kapasitesi gösterirler.

Kanser kök hücreleri öncü hücreler, kök hücreler ve farklılaşmış hücrelerden köken aldığı düşünülen 3 varsayım yer almaktadır. Kanser kök hücreleri normal yetişkinde bulunan kök hücrelerden kaynaklanır. Lösemiye neden olan kanser hücrelerinin normal kök hücrelerden kaynaklandığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Hematopoetik kök hücrelerden kanser kök hücresinin oluştuğunu göstermek amaçlı yapılan bir çalışmada akut myeloid lösemi (AML) hastadan elde edilen kanser kök hücreleri farelere farklı dozlarda verildiğinde farelerde lösemi oluşumu gözlemlenmiştir (Hope ve diğ. 2004).

Öncü hücreler dokuların içerisinde kök hücreye oranla daha çok bulunurlar. Öncü hücreler olgun hücreleri oluşturmak üzere bölünürler. Öncü hücrelerde kök hücreler gibi kendini yenileme özelliğine sahiptir. Kök hücrelere oranla dokularda daha fazla bulunması kanser kök hücrelerinin kökeni olabileceğini düşündürmüştü ve bunun üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır(Kucia ve diğ. 2006).



Onkogenlerde oluşan mutasyonlar farklılaşmış hücrelerin yeniden düzenlenmesiyle (dedifeeransiyasyon), telomeraz aktivesi kazanarak yaşam süresi uzun hücrelere dönüşmektedir. Bu dönüşüm kanser kök hücrelerinin farklılaşmış hücrelerden köken aldığı varsayımı ortaya çıkarmaktadır(Takahashi ve diğ. 2007).

Kanser kök hücrelerinin oluşumunda ve metastazında niş önemli rol oynamaktadır. Niş kök hücrelerin çoğalmasında, kendini yenilemesinde ve kök hücre özelliklerinin devamlılığında önemlidir. Kanser kök hücrelerinin kemoterapiye olan direnç mekanizmasını kazanmasında nişten gelen sinyaller doğrultusunda gerçekleştirirler(Lane ve ark 2009). Kanser kök hücrelerinin bir dokuya yerleşmesinde nişin önemli olduğu yapılan bir diğer çalışmada gösterilmiştir(Ishikawa ve diğ.2007).

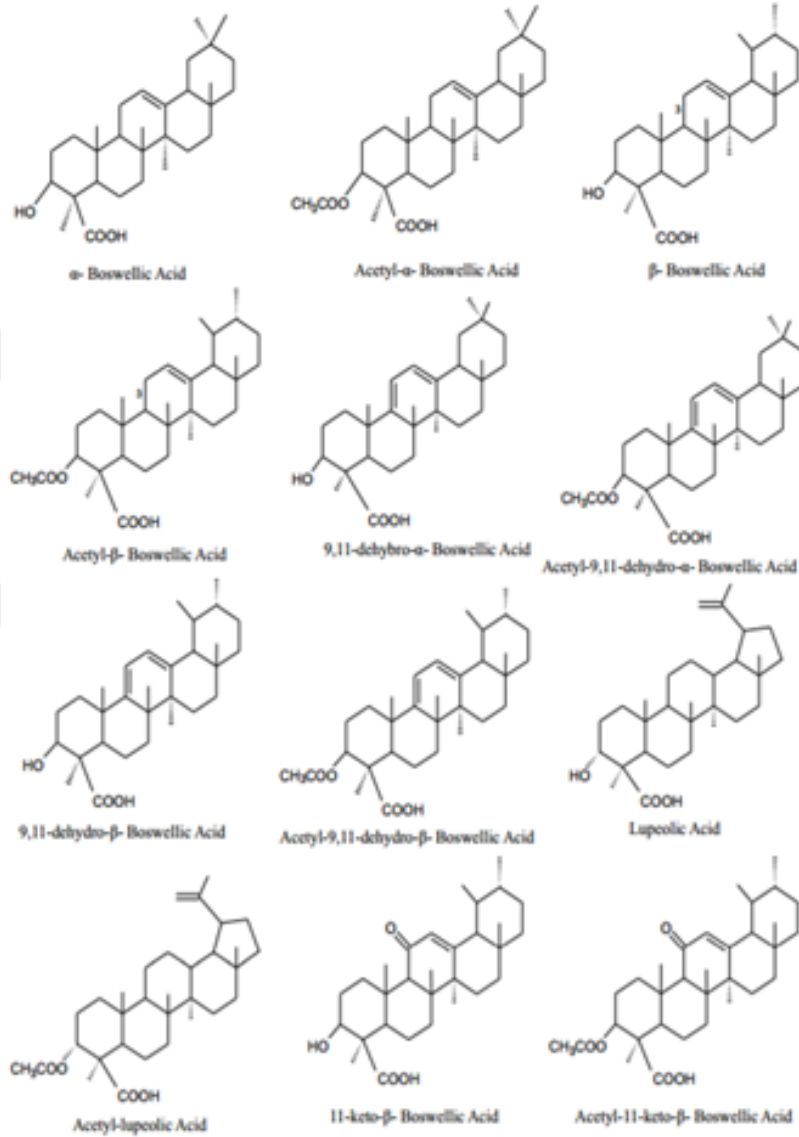
Periostin bir hücre dışı matriks proteini olmakta ve kanser kök hücrelerinin köklülüğünde rol oynar. Kanser metastaz yapmasında görev alan proteindir. Kanser kök hücreleriyle niş arasında metastaz için önemli zemin oluşturmaktadır. Kolon kanseri hücrelerinde ve karaciğer metastazında periostin seviyesinin yüksek olduğu yapılan çalışmada gösterilmiştir( Bao ve diğ. 2004).

Kemokinler hücreler ve dokular tarafından üretilen, bağışıklık sisteminde önemli görev alan en temel görevi migrasyondan sorumlu olan proteindir. CXCL12 ve CXCR4 kök hücrelerin göç etmesinde önemli görev alırlar. Hücrenin mortalitesinin artmasında ve metastazında yardımcı olan protein olarak gösterilmiştir( Ratajczak ve diğ.2006). Kanser hücreleri hipoksik ortamlarda daha agresif olmaktadır. Kanser hipoksi bölgelerinde CXCL12 ve CXCR4 ifadelerinde artış görülmektedir(Smith ve diğ.2004).

Kanser kök hücrelerinin belirlenmesinde akım sitometri, manyetik hücre ayrıştırma ve FACS gibi çeşitli tekniklerden yararlanılmaktadır. Her kanser türünü kendine özgü belirteçlere sahiptir. Baş-boyun kanserlerinde CD44 pozitif ekspresyon olurken, lösemide CD44 negatif CD34 pozitifdir.

## 1.6 Boswellia Serrata

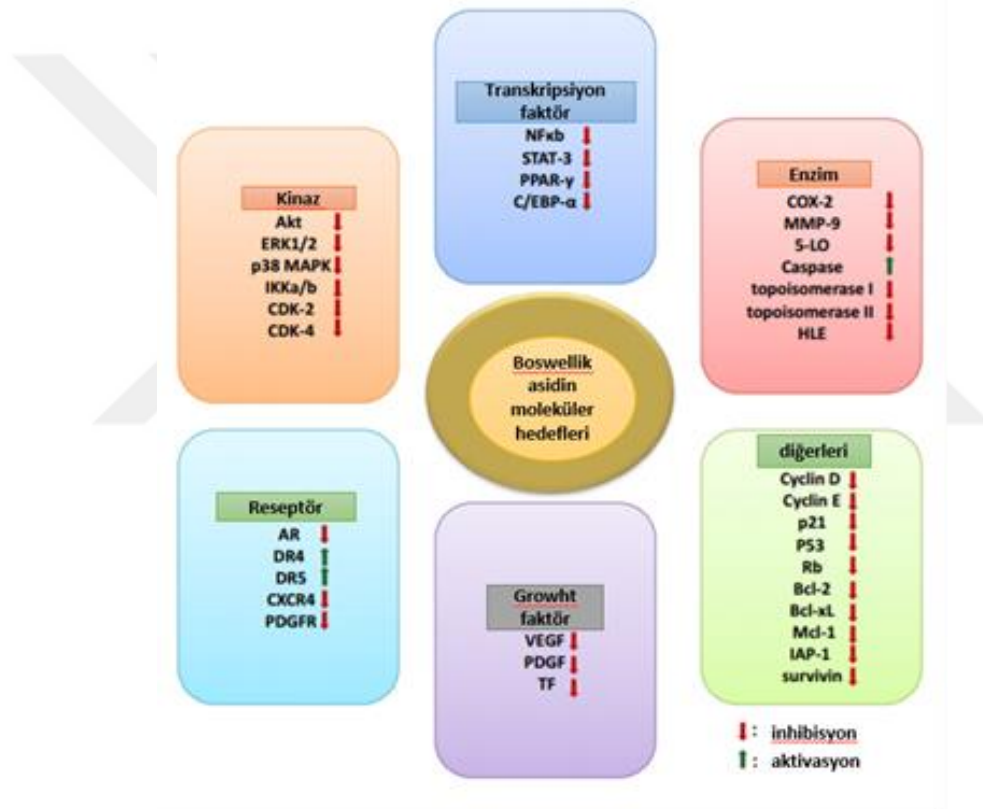
*Boswellia serrata* (*B.Serrata*) anti-kanser özellik sergilediği gözlemlenmiş Burseraceae familyasına ait olan bir bitki türüdür. *B.serrata* orta büyüklükte dallanma gösteren Hindistan, Kuzey Afrika ve Orta Doğu'nun kuru dağlık bölgelerinde bulunan 17 cins ve 600 türünden en önemlileri arasında yer alan bitki çeşididir(M.Z. Siddiqui,2011).



**Çizim1.10.** *Boswellia serrata* çeşitli kimyasal formları (N.K Roy et al./cancer Letters 377 (2016) 74-86)

B.Serrata, güncel literatür bilgilerine bakıldığında farklı kanser hücreleri ile ortak kültüründe tek tip kimyasal form yerine sakız reçinesi pentasiklik triterpenik asitleri, bosvelik asit ( $\alpha,\beta,\gamma$  BA), acetyl- $\beta$  bosvelik asit, 11-keto- $\beta$ -bosvelik asit, acetyl-11-keto- $\beta$ -bosvelik asit (AKBA) gibi çeşitli kimyasal formlarda kullanıldığı gözlemlenmiştir( Buchele ve diğ.2003).

Önerdiğimiz çalışmamızda B.serrata'nın AKBA (acetyl-11-keto- $\beta$ -bosvelik asit) formunun kullanılmasının öngörülmesi arasında anti-kanserojenik, modülasyonda moleküler düzeyde kinazlar, transkripsiyon faktörleri, enzimler, reseptörler, büyüme faktörleri ve hücre proliferasyonu üzerine etkileri nedenleri yer almaktadır.



**Çizim1.11.** *Boswellia serrata* (AKBA)'nın moleküler hedefleri (N.K Roy et al./cancer Letters 377 (2016) 74-86)

*B.Serrata* bağışıklık sistemini düzenleyici etkileri uzun yıllardan beri çalışmalarda gösterilmektedir. Bağışıklık sistemini baskılamamanın yanı sıra kanser hücre büyümesini engelleyici ve sitotoksik etkileri rapor edilmiş ve kanser karşıtı etkileri insanlar üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarda doğrulanmıştır(Hoernlein ve diğ.1999). Hücre büyümesini engelleyen etkileri kanser modellerinde gözlemlenmiş, *Boswellia Serrata* ekstralarının sıçan

gliyoma büyümesi ve fare tümör promosyonunda gösterilmiştir(Winking ve diğ. 2000).*B.Serrata* hücre büyümesini engelleyici etkisinin yanında başkalaşımı destekleyici etkisinde vardır. Hücre başkalaşımına apoptotik hücre ölümü eşlik etmiştir.

*B.Serrata* mast hücresi degranülasyonunun inhibisyonu (Pungle ve diğ.2003) ve sıçan peritoneal makrofajlarında LPS(lipopolisakkarit) ile indüklenmiş NO üretiminin baskılanması (Pandey, 2005) gibi anafilaksi riskini azaltan etkiler ile çok sayıda faydalı bağışıklık sistemini düzenleyici sonucu belgelenmiştir.

AKBA moleküller düzeyde apoptotik işlemi düzenlemektedir. Yapılan çalışmalarda; AKBA çeşitli gliyoblastom hücre dizilerinde(Glaser ve diğ.1999), HL-60 hücrelerinde (Xia ve diğ.2005) ve çeşitli diğer insan lösemi hücre dizilerinde (K562,U937,MOLT-4,THP-1,(Hostanska K,2002), CCRF-CRM, NB4,SKNO-1,ML-1 (Xia ve diğ.2005) beyin tümör hücre dizilerinde(LN-18,LN-229) (Hostanska ve diğ.2002), karaciğer kanseri HepG2 hücrelerinde(Liu ve diğ.2002),kolon kanseri HT-29 (Liu ve diğ.2006) prostat kanseri PC-3 hücrelerinde (Syrovets ve diğ.2005), insan fibrosarkoma HT-1080 ve fare melanom B1610 hücrelerinde(Zhao ve diğ.2003) apoptozu indüklemiştir.

Asetil-11-keto-beta-bosvelik asitin (AKBA), insan polimorfonükleer lökositler (PMNL) için hücre içi mobilizasyonda önemli olan  $Ca^{+2}$  aktive ederek MAPK sitimüle ettiğini göstermişlerdir(Altmann ve diğ. 2002,2004). Asetil-11-keto-beta-bosvelik asitin (AKBA) meningioma hücrelerinde sitotoksik etkisi üzerine yapılan bir başka çalışmada, AKBA'nın hücre dışı sinyalle düzenlenmiş kinaz-1 ve -2'nin (Erk-1/2) fosforilasyonunu baskıladığı bulunmuştur(Buchele ve diğ.2003).

Kolon kanserinde HCT-116 hücrelerinde AKBA tedavisi, siklin D, siklin E, CDK2 ve CDK4 gibi Siklin bağımlı kinazlarda bir azalmaya neden olmuştur (Liu ve diğ.2006). AKBA'nın malign fenotip ile ilişkili bir transkripsiyon faktörü olan NF- $\kappa$ B'ye olan etkisini çeşitli kanser türleri üzerinde göstermiş ve monositlerde TNF- $\alpha$ 'ın LPS ile başlatılan IKK aktivitesine ve IkappaB kinaz (IKK) üzerindeki doğrudan inhibe edici etkilerine bağlı olduğunu göstermiştir. alfaBA ve AKbetaBA 'nın NF-kappaB'nin inhibisyonunu sağladığını ve aktive edilmiş insan monositlerinde TNFalfa ekspresyonunu indirgediğini göstermişlerdir(T. Syrovets ve diğ. 2005) .

Asetil-beta bosvelik asit ve AKBA'nın, kemoterapötik androjenden bağımsız PC-3 prostat kanseri hücrelerinde in vitro ve in vivo'da IkappaB kinaz (IKK) aktivitesini durdurarak, aktifleştirilmiş NF-kappaB sinyalini inhibe ederek proliferasyonu azaltmakta ve

hücreyi ölüme götürmektedir(Syrovets ve diğ.2005). AKBA; TNF ve kemoterapötik ajanların indüklediği apoptozu daha etkin hale getirmekte ve TNF ye bağlı invazyonu bastırmaktadır.

AKBA'nın doğrudan NF-kappaB'nin DNA'ya bağlanmasını etkilemediği, ancak TNF'nin indüklediği IKK, İkappaBalpa fosforilasyonu, IkappaBalpa ubikitinasyon, IkappaBalpa degradasyonu, p65 fosforilasyonu ve p65 nükleer translokasyonunun sıralı olarak inhibe ettiği de bilinmektedir(Takada ve diğ.2006).

AKBA; NF-κB'nin inhibisyonu ve MCP-1, MCP-3, IL-1alpha, MIP-2,TF VEGF'nin inhibisyonuyla LPS'ye maruz kalan ApoE - / - farelerinde antiinflamatuvar ve anti-aterojenik etkiler sergilemektedir(Cuaz ve diğ.2008).

Pankreas kanseri hücre dizilerinde, AKBA, NF-κB'nin ekspresyonunu İnhibe ederek COX-2, MMP-9, CXCR4, genlerinin baskılanmasına neden olmuştur. AKBA ve aspirin arasındaki APCMin / + farelerde bağırsak adenomatöz polipozisin önlenmesini kontrol eden karşılaştırmalı bir çalışma, AKBA'nın adenomatöz poliplerde Wnt / β-katenin yolağının ve NF-κB / COX-2 yolağının modülasyonu yoluyla daha yüksek bir potansiyele sahip olduğunu ortaya koymuştur(Wang ve diğ.2014).

Son zamanlarda, boswellia içeren bir ekstre, NF-κB İnhibe ederek ve ardından VEGF, TNF-α ve MCP-1 ekspresyonunda azalma göstererek fare karaciğer granülomasını ve fibrozisini iyileştirdiği bulunmuştur(Liu ve diğ.2014). AKBA aynı zamanda olgun adipositlerdeki doz ve zamana bağlı olarak PPAR-γ ve C / EBP-α'nın inhibisyonundan sorumludur ve sonuçta lipoliz oluşturur(Liu ve diğ.2013). BA'nın yarı sentetik bir analogu olan 3-α-Butyryloxy-β-bosvelik asit (BOBA) ile tedavi, kanser hücresi apoptozunu indüklediği ve NF-κB'nin indirgenmesi ve PARP bölünme indüksiyonu ile tümör regresyonuna neden olduğu gösterildi(Qurishi ve diğ.2013).

STAT-3 transkripsiyon faktörünün sinyal transdüserleri ve aktivatörlerinin aktivasyonu, insan multiple myeloma (MM) dahil olmak üzere tümör hücrelerinin hayatta kalması, proliferasyonu, kemore direnci ve anjiyogeneziyle ilişkilidir. Kunnumakkara ve arkadaşları tarafından kapsamlı bir çalışma yapılmıştır. İnsan MM hücrelerinde STAT-3'ün temel olarak aktivasyonunun STAT-3'ün defosforilasyonundan sorumlu olan Src homoloji bölgesi alanını içeren fosfataz 1'in (SHP-1) indüksiyonu ile AKBA tarafından inhibe edilebileceğini ortaya koymuştur. Ek olarak, AKBA tarafından STAT3 aktivasyonunun inhibisyonu, hücre

çoğalmas, hayatta kalma ve anjiyogenezde rol oynayan genlerin bastırılmasına neden olmuştur(Kunnumakkara ve diğ.2009).

AKBA'nın NF-κB ve STAT'lerin güçlü inhibitörleri olarak işlev görür ve HT-29 kolonu, SW-620, Colo-205 Hep-2 larenks, DU-145 ve prostat PC-3 de dahil olmak üzere çeşitli insan kanser hücre dizilerine karşı geniş sitotoksiste etkisi görülmektedir( Kumar ve diğ.2012).

AKBA 'nın türevleri; AKBA, bosvelik asit asetat ve bir propiyoniloksi türevi olan 11-keto-β-boswellik asit (PKBA, 11-keto-β-bosvellik asitin yarı sentetik bir analogu) Topoizomeraz I ve II'nin aktivitesini etkilemekte ve böylece farklı kanser hücre dizilerinde apoptozun indüklenmesine yol açar(Chashoo ve diğ.2011). Lipooksijenazlar (5-LO) Araşidonik asit ve insan lökosit elastazı (HLE) 'dan lökotrien sentezinin katalizörlüğünden sorumludur(H.Safayhi ve diğ. 1997).

Karaciğer hasarına bağlı hepatik stellat hücrelerin (HSC) mitojenik tepkisini teşvik eden sinyaller, plateletderif büyüme faktörü (PDGF) ile bağlandığında trombositik büyüme faktörü reseptörünün (PDGFR) dimerizasyonu ve oto-transfosforilasyonu ile aktive edildiği iyi bilinmektedir ve Böylece hepatik fibroz gelişimine katkıda bulunur. BA, daha sonra PDGFR-β'nin defosforilasyonu ve PDGF uyarımından sonra PDGFb bağımlı sinyalizasyonun inhibe ederek böylece HSC'ler üzerinde bir antiproliferatif etki meydana getirmektedir( Tibaldi ve diğ.2014).

Prostat kanserinde, AKBA, androjen reseptörü (AR), ölüm reseptör 5 (DR5) ve vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptör 2 (VEGFR2) içeren farklı reseptörleri hedef alır ve prostat kanseri hücrelerinin apoptoz yoluyla çoğalmasını inhibe eder.VEGFR2 baskılayarak anjiyogenezin indüksiyonu ve bastırılması sağlar (Pang ve diğ.2009).

Kolorektal kanser (CRC) en sık görülen kanserlerden biridir. HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde, Boswellia serrata'nın (B. serrata) kanser karşıtı aktivitesi vardır. B. serrata ile tedavi edilen HT-29'da anlamlı kontrol grubuna oranla anlamlı fark görülmüştür(Ranjbarnejad ve diğ.2017).

## 2. AMAÇ

Bu çalışmada, *boswellia serrata*'dan elde edilen asetil-11-keto-beta-bosvelik asitin (AKBA) formu ile in vitro koşullarda kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler ile ortak kültüre edilen anaplastik tiroid kanser hücreleri üzerinde birlikte gösterecekleri tedavi edici etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir. İndirekt kurulan ko kültür sistemi ve sonrasında yapılan testler sayesinde bu tez çalışmasında mezenkimal kök hücrelerin *boswellia serrata* ile birlikte anaplastik tiroid kanserine karşı gösterecekleri kanser karşıtı ve sitoprotektif etkilerinin incelenmesi amaçlanmaktadır. AKBA'nın kanser hücrelerinin apoptozunu sağlarken Mezenkimal kök hücrelerinde destekleyicisi olması beklenmektedir.

Günümüzde kanser tedavilerinde kullanılan yöntem kemoterapi ve radyoterapidir. Kemoterapi ve radyoterapiden başarılı sonuçlar elde edilse de hastanın tedavi sırasında yaşam kalitesi düşmektedir. Kanser hücrelerini ölüme götürürken kanserle savaşmaya hazır olan sağlıklı hücrelerinde ölümüne sebep olmaktadır. Öte yandan kanser bir hücre hastalığı olduğundan hücresel temelli tedaviler umut verici olmaktadır. Mezenkimal kök hücrelerin hedef bulma özelliği ve hasarlı dokuya olan migrasyonu kanser hastalığında hücresel temelli tedavilerde heyecan yaratmaktadır. Mezenkimal kök hücrelerin tek başına kanser hücrelerine karşı olan kanser karşıtı etkisinin ve immün sistem düzenleyicisi etkisi olan, aynı zamanda moleküler düzeyde apoptatik etkisi kanıtlanmış olan *boswellia serrata* ile birlikte gösterecekleri etki yeni fikirlerin oluşumuna yol açması çalışmanın en önemli hedefidir.

### **3. Yöntem**

#### **3.1 Hücreler Ve Kültür Koşulları**

Bu çalışmada kullanılan sağlıklı insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre (iKİ-MKH) ve insan anaplastik tiroid kanser hücre dizileri( CAL62), ATCC (Biological Resource Center / Biyolojik Materyal Kaynak Merkezi) hücre koleksiyonundan elde edilmiştir.

##### **3.1.1 İnsan Anaplastik Tiroid Kanseri Hücre Dizisinin Çoğaltımı**

Bu hücreler; FBS %10(Fetal bovine serum), Penisilin-streptomisin %1 içeren RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) besi ortamında kültüre edildi. Hücreler %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C'lik ortamda inkübe edilerek 3 günde bir besi ortamı değiştirildi. Hücreler literatür doğrultusunda %70-80 konfluent olunca pasaj işlemi gerçekleştirilmek üzere tripsin-EDTA (%0,25) ile kültür kabından kaldırılıp yeni kültür kaplarına uygun yoğunlukta ekildi.

##### **3.1.2 İnsan Kemik İliği Kaynaklı MKH (İki-MKH) Hücre Dizisi Çoğaltımı**

İnsan kemik iliği kaynaklı MKH (iKİ-MKH) hücre dizisinin kültürü için FBS%10(Fetal bovine serum), Penisilin-streptomisin %1, 10 mM FGF-b, 200 mM L-glutamin içeren L-DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) besi ortamında kültüre edildi. Günlük mikroskop incelemeleri ile 3 günde bir besiyeri değiştirildi. Hücreler %70-80 konfluent olunca pasaj işlemi gerçekleştirmek üzere tripsin-EDTA (%0,25) ile kültür kabından kaldırılıp yeni kültür kaplarına uygun yoğunlukta ekildi.

#### **3.2 Deney Gruplarının Oluşturulması**

Çalışmada esas olarak insan anaplastik tiroid kanser hücreleri(CAL62) üzerinde insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin(iKİ-MKH) etkisinin incelenmesi (çizelge3.1, grup3),insan anaplastik tiroid kanseri hücreleri üzerinde mezenkimal kök hücrelerin AKBA (Çizelge3.1 grup 7) ile birlikte etkilerinin incelenmesi ve insan anaplastik tiroid kanseri hücrelerin sadece AKBA (çizelge3.1 grup 5) ile olan etkileşimlerinin incelenmesi hedeflenmiştir. Aynı zamanda insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök



hücrelerin AKBA (Çizelge3.1, grup 6) ile etkileşime bakılmıştır. ko kültür kurularak insan kemik iliği kaynaklı Mezenkimal kök hücrelerin üzerinde insan anaplastik tiroid kanser hücrelerinin etkisin bakılmıştır(Çizelge3.1, grup 4). İnsan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerinin üzerinde İnsan Anaplastik Tiroid Kanser Hücrelerinin AKBA ile birlikte etkisine bakılmıştır (Çizelge3.1, grup 8). Deney gruplarına ek olarak insan anaplastik tiroid kanseri hücreleri (Çizelge3.1, grup 1) ve insan kemik iliği kökenli Mezenkimal kök hücre (Çizelge3.1, grup 2) kontrol grupları kurulmuştur. Hücreler arası oran insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler ile insan anaplastik tiroid kanseri hücreleri arası oran iKİ-MKH / CAL62 1:1 ve iKİ-MKH / CAL62 1:3 olarak yapılmıştır.

**Çizelge 3.1** Deney gruplarının belirlenmesi

<u>DENEY</u> <u>GRUPLARI</u>	<u>EKİM YAPILAN HÜCRELER</u>	<u>BESİ ORTAMI</u>
GRUP 1	İnsan Anaplastik Tiroid Kanser Hücreleri (CAL62)	RPMI 1640
GRUP 2	İnsan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreleri	
GRUP 3	İnsan Anaplastik Tiroid Kanser Hücreleri İle İnsan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreleri	RPMI 1640
GRUP 4	İnsan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreleri ile İnsan Anaplastik Tiroid Kanser Hücreleri	
GRUP 5	İnsan Anaplastik Tiroid Kanser Hücreleri (CAL62) ile AKBA	RPMI 1640
GRUP6	İnsan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreleri ile AKBA	
GRUP7	İnsan Anaplastik Tiroid Kanser Hücreleri İle İnsan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreleri +AKBA	RPMI 1640
GRUP8	İnsan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreleri ile İnsan Anaplastik Tiroid Kanser Hücreleri + AKBA	RPMI 1640

### **3.3 Asetil-11-Keto-Beta-Bosvelik Asitin (AKBA) Konsantrasyonunun Belirlenmesi**

Asetil-11-Keto-Beta-Bosvelik Asit (AKBA) maddesi Santa Cruz'dan (SC-221208) temin edilmiştir. Literatürler doğrultusunda AKBA'nın insan anaplastik kanser hücreleri üzerinde letal dozunun belirlenmesi amacıyla 1.25µM, 2.5µM, 5µM, 10µM, 20µM, 40µM, 60µM, 80µM, 100µM AKBA konsantrasyonları için optimizasyon deneyleri gerçekleştirildi. C32H48O5 moleküler formüle sahip olan AKBA 512,7205 gr/molariteye sahiptir. Stok halinde gelen 5mg AKBA DMSO içerisinde çözülerek üzerine distile su eklenerek alikotlara bölünmüştür. Konsantrasyonu belirlemek amacıyla AKBA'nın insan kemik iliği kaynaklı Mezenkimal kök hücreler için toksik olmayan, insan anaplastik tiroid kanseri hücreleri içinde letal dozunun belirlenmesi amacıyla WST ve Annexin PI testleri gerçekleştirildi.

#### **3.3.1 WST Testi**

Hücre proliferasyonunu saptamak amacıyla 1.25µM, 2.5µM, 5µM, 10µM, 20µM, 40µM, 60µM, 80µM, 100µM AKBA konsantrasyonları için insan anaplastik tiroid kanseri hücreleri ve insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler her bir oran 3 tekrar olacak şekilde kültür kaplarına ekilerek 1,4 ve 7 gün sonunda WST(Water soluble tetrazolium-1) testi gerçekleştirildi. 96 kuyucuklu kültür kaplarında büyütülen hücreler, WST-1 deneyi gerçekleştirmek için kültür ortamından tamamen uzaklaştırılıp %10 WST-1 reaktifi ile 4 saat karanlıkta inkübe edildi. Bu inkübasyon süresinden sonra, 96 kuyucuklu kültür kabı spektrofotometre (ELISA okuyucu)de 460nm ölçümü gerçekleştirildi.

#### **3.3.2 Annexin PI Testi**

Hücrede apoptozu saptamak amacıyla 1.25µM, 2.5µM, 5µM, 10µM, 20µM, 40µM, 60µM, 80µM, 100µM AKBA konsantrasyonları için insan anaplastik tiroid kanseri hücreleri ve insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler her bir oran 3 tekrar olacak şekilde kültür kaplarına ekilerek 1,4 ve 7 gün sonunda AnnexinV-PI kiti (BD Biosciences) testi gerçekleştirildi. Hücreler enzimatik olarak kaldırılıp; 15 ml'lik steril falkon tüpte toplanıp, 2 kez soğuk PBS ile yıkandıktan sonra 1X binding buffer ile sayısı  $1 \times 10^6$  ml olacak şekilde süspanse edildi. Akabinde 5 µl Annexin V, 5 µl PI eklenerek ve oda ısısında karanlıkta 15 dakika inkübe edildi. Hazırlanan hücre süspansiyonu FACS Calibur akım sitometri

cihazında okutularak BD Cell Quest™ programı kullanılarak apoptotik hücre analizi gerçekleştirilmiştir.

Bu şekilde deney sonrası canlı, erken-geç apoptotik ve ölü hücre oranları sayısal olarak belirlenip uygun doz belirlenmiştir.

### **3.4 Akım Sitometrik Analiz**

İnsan kemik iliği kaynaklı Mezenkimal kök hücrelerin ve insan anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin morfolojilerini incelemek amacıyla hücre kültürü esnasında Olympus IX71 mikroskobunda gözlemlenmiştir. iKİ-MKH kök hücre özelliğini taşıdığını ve CAL62 hücrelerinin karakterterizasyonlarının gösterilmesi amacıyla çeşitli testler yapılmıştır.

#### **3.4.1 İnsan Anaplastik Tiroid Kanseri Hücrelerinin Akım Sitometrik Analizi**

İnsan anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin karakterizasyon analizi için pasaj 3'e geldiğinde hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırdı.  $4 \times 10^6$  CAL62 PBS içinde homojenize edildi. Belirlenen hücre yüzey işaretleyicilerine özel, fluoresan izotiyosiyonat (FITC)- ve fikoeritrin (PE) konjuge monoklonal antikolar (CD18, CD24, CD31, CD34, CD38, CD44, CD133, CD166, CD309, CD324, CD325, CD338, Ki-67, PCNA) ve uygun izotip kontrollerinden 10µl eklenerek oda ısısında ,karanlıkta 45 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası yıkama solüsyonu eklenip santrifüj edilerek (5dk. 1800 rpm) 400µl hücre yıkama solüsyonu ile resüspanse edildi. Hazırlanan hücre süspansiyonu BD FACS Calibur cihazında okutularak ve analizi BD Cell Quest™ software programı ile gerçekleştirildi.

**Çizelge3.2.** CAL62 hücrelerinin pozitif ve negatif belirteçleri

<u>BELİRTEÇ</u>	<u>POZİTİF/NEGATİF</u>
CD18	+
CD24	-
CD31	-
CD38	-
CD44	+
CD133	-
CD166	+
CD309	-
CD324	+
CD325	-
CD338	-
Ki-67	+
PCNA	+

### 3.4.2 Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök hücrelerin Akım Sitometrik Analizi

İnsan kemik iliği kaynaklı Mezenkimal kök hücreler karakterizasyon analizi için Pasaj 3'e gelindiğinde hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırıldı.  $4 \times 10^6$  iKİ-MKH PBS içinde homojenize edildi. Belirlenen hücre yüzey işaretleyicilerine özel, fluoresan izotiyosiyonat (FITC)- ve fikoeritrin (PE) konjuge monoklonal antikorlar CD13,CD15, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 ve HLA A,B,C CD14, CD34, CD45, CD117 ve HLA-DR için uygun izotip kontrollerinden  $10 \mu\text{l}$  eklenerek oda ısısında, karanlıkta 45 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası yıkama solüsyonu eklenip santrifüj edilerek (5dk. 1800 rpm)  $400 \mu\text{l}$  hücre yıkama solüsyonu ile resüspanse edildi. Hazırlanan hücre süspansiyonu BD FACS Calibur cihazında okutularak ve analizi BD Cell Quest TM software programı ile gerçekleştirildi.

**Çizelge3.3.** İnsan kemik iliği kökenli Mezenkimal kök hücrelerin akım sitometride pozitif / negatif belirteçleri

<u>BELİRTEÇ</u>	<u>POZİTİF/NEGATİF</u>
CD13	+
CD14	-
CD15	-
CD29	+
CD34	-
CD44	+
CD45	-
HLABC	+
CD73	+
CD90	+
CD105	+
CD117	-
HLA-DR	-

### **3.5 İnsan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaştırma Analizi**

İnsan kemik iliği kaynaklı Mezenkimal kök hücrelerin kök hücre karakterinde olduğunu göstermek için in-vitro ortamda adipojenik, osteojenik ve kondrojenik yönde farklılaştırma analizleri gerçekleştirilmiştir.

#### **3.5.1 Adipojenik Farklılaştırma**

Kültür kabına 3000 adet/cm<sup>2</sup> hücre olacak şekilde ekilen iKİ-MKH'leri içinde %10 FBS, 0,5 mM isobutyl-methylxanthine, 10<sup>-6</sup> M dexamethasone, 10 µg/ml insulin, 200 µM indomethacin ve 1% penisilin-streptomisin bulunan MEM kültür medyumunda dört hafta süreyle kültüre edilmiştir. Kültür sonrası hücre içi biriken yağ oluşumları, Oil Red O histolojik boyaması yapılarak pozitifliği mikroskopik incelemelerle gösterilmiştir. Hücreler %4 paraformaldehit (PFA) (Merck) ile 15 dk oda ısısında inkübe edilmiştir. Öncelikle PBS sonrasında distile su ile yıkaması gerçekleştirilen hücreler %60 2-propanol (Sigma-Aldrich)

ile 5 dk oda ısısında bekletilerek fiksasyon işlemi tamamlanmıştır. Oil Red O (Sigma-Aldrich) isopropanol ile 0,3gr/100 ml olacak şekilde solüsyon hazırlanmıştır. Solüsyon 1 saat 37 C° inkübe edilmiştir. Boyaması gerçekleştirilen iKİ-MKH'lerinin hücre içi lipidler Olympus IX71 mikroskobunda gösterilmiştir.

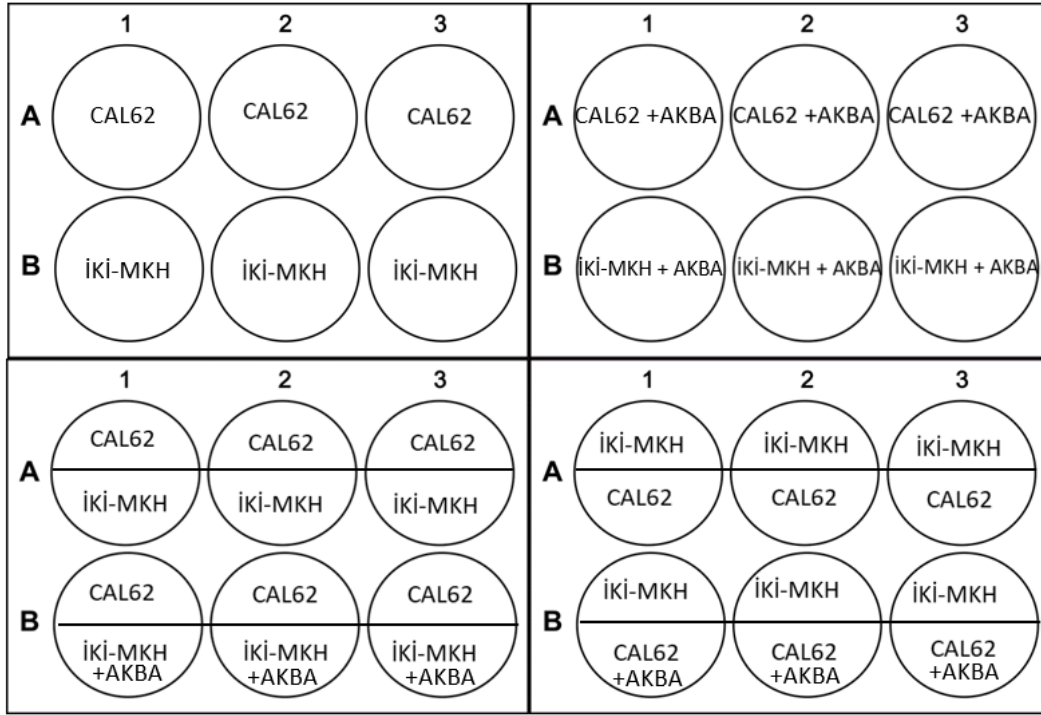
### **3.5.2 Osteojenik Farklılaştırma**

Kültür kabının 3000 adet/cm<sup>2</sup> hücre olacak şekilde ekilen iKİ- MKH'leri; 100 nM dexamethasone, 0.05 µM ascorbate-2phosphate, 10 mM β-glycerophosphate, %1 penisilin-streptomisin ve %10 FBS içeren MEM kültür medyumunda 4 hafta boyunca kültüre edildi. 4 hafta sonunda Alizarin Red-S (Fluka) ile histolojik boyaması yapılmıştır. Hücreler %70'lik alkol ile 5 dk oda ısısında fikse edilmiştir. %2'lik 4,0-4,3 pH değeri aralığında hazırlanan Alizarin Red-S (Fluka) ile boyandı. Histolojik boyamanın pozitifliği mikroskobik incelemelerle hücre içi kalsiyum nodülleri Olympus IX71 mikroskobunda gösterildi.

### **3.6 Hücrelerin Ortak Kültürü ve Etkileşimlerinin İncelenmesi**

Hücrelerin birbirleriyle olan etkileşimlerinin incelenmesi amacıyla indirekt ko kültür sistemi kullanılmıştır. Hücreler deney gruplarına bağlı kalınarak her grup üç tekrar olacak şekilde 1:1 ve 1:3 oranında 7 gün boyunca %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C'lik ortamda birbirleriyle direk temas etmeden aynı besiyeri ortamında 6 well kültür kaplarında insertler aracılığıyla ortak kültüre alındılar. 7 gün boyunca hücreler Olympus IX71 mikroskobunda gözlemlendi. 1,4 ve 7. gün sonunda hücrelerin canlılığı, çoğalımı, apoptozu ve gen ekspresyonlarındaki değişimleri karşılaştırılmıştır.

**Çizelge3.4.** Hücrelerin ko-kültür sistemi planı



Yukarıdaki çizelgede yer alan plan 1,4 ve 7.gün olmak üzere , Annexin V-PI kapasite tayini, Hücre Canlılığı ve Gen Ekspresyonlarındaki Değişimlerin Belirlenmesi – Real Time PCR deneylerinin her biri için ayrıca kurulmuştur. Ko kültür sistemi sonucunda hücrelerin birbirleriyle olan etkileşimleri ve AKBA ile olan etkileşimleri incelenmiştir.

### 3.6.1 Annexin V-PI kapasite tayini

Ortak kültür sonrası 0, 1, 4 ve 7.günün sonunda insan anaplastik tiroid kanseri (CAL62) hücrelerinde apoptoz düzeylerini saptamak amacıyla AnnexinV-PI kiti (BD Biosciences) kullanıldı. 7 gün boyunca %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C'lik inkübatörde muhafaza edilen hücreler enzimatik olarak tripsinle kaldırılıp; 15 ml'lik steril falkon tüpte toplanarak, 2 kez soğuk PBS ile yıkandıktan sonra 1X binding buffer ile sayısı  $1 \times 10^6$  ml olacak şekilde süspanse edilmiştir. Akabinde 5 µl Annexin V, 5 µl PI eklenerek ve oda ısısında karanlıkta 15 dakika inkübe edildi. Hazırlanan hücre süspansiyonu FACS Calibur akım sitometri cihazında okutularak BD Cell Quest™ programı kullanılarak apoptotik hücre analizi gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde deney sonrası canlı, erken-geç apoptotik ve ölü hücre oranları sayısal olarak belirlenmiştir.

### 3.6.2 Hücre Canlılığı

Ortak kültüre alınan hücreler 6 kuyucuklu hücre kaplarına yerleştirilmeden önce hücre kaplarının tabakasına hücre kültürü lamları yerleştirilmiştir. Bu lamların üzerine ortak kültüre alınan hücreler ve uygun besi ortamları konularak 7 gün boyunca %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C'lik inkübatörde muhafaza edilmiştir. 1, 4 ve 7. günün sonunda LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kiti (ThermoFisher Scientific) kullanılarak kit prosedürüne göre hücreler calcein ve etidyum bromür (EtBr) ile boyanarak oda ısısında karanlıkta 40 dk inkübe edildi. Boyaması gerçekleşen hücrelerin floresan mikroskopta hücre canlılık oranlarını saptanmıştır.

### 3.6.3 Gen Ekspresyonlarındaki Değişimlerin Belirlenmesi – Real Time PCR

Ortak kültürler sonrası hücrelerin gen ekspresyonlarındaki değişimlerinin saptanabilmesi için kanser hücrelerine yönelik “Cancer PathwayFinder PCR Array (SABioscience)” paneli kullanılmıştır. Öncelikle hücrelerin RNA'ları, RNA izolasyon kiti (High Pure RNA Isolation Kit; Roche, Mannheim, Germany) ile saflaştırıldı. İzolasyondan sonra RNA konsantrasyonu spektrofotometre ile ölçülerek ve 1µg total RNA olacak şekilde cDNA sentez kiti (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit; Roche, Mannheim, Germany) ile cDNA'ya çevrilmiştir. Hedef genlerin amplifikasyonu SYBR green boyası ile LightCycler 480-II (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland) gerçek-zamanlı kantitatif PCR) cihazında gerçekleştirilmiştir. Hedef gen ve ona uygun seçilmiş olan referans genler aynı panelde çoğaltıldı. PCR koşulları; 95°C'de 10 dakika inkübasyon, takibinde 45 döngü 95°C'de 15 s denatürasyon, 60°C'de 1 dak bağlanma ve uzama şeklinde uygulandı. Sonuçlar Light Cycler yazılımıyla (version 4) Cp değerlerinin hesaplanmasıyla analiz gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge3.5.** Cancer PathwayFinder PCR Array analizinde 96well plate referans ve negatif genlerin yerleşimi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ACLY	ACSL4	ADM	ANGPT1	ANGPT2	APAF1	ARNT	ATPSA1	AURKA	BCL2L11	BIRC3	BMI1
B	CA9	CASP2	CASP7	CASP9	CCL2	CCND2	CCND3	CDC20	CDH2	CFLAR	COX5A	CPT2
C	DOB2	DDIT3	DKC1	DSP	E2F4	EPO	ERCC3	ERCC5	ETS2	FASLG	FGF2	FLT1
D	FOXC2	G6PD	GADD45G	GPD2	GSC	HMOX1	IGFBP3	IGFBP5	IGFBP7	KDR	KRT14	LDHA
E	LIG4	LPL	MAP2K1	MAP2K3	MAPK14	MCM2	MKI67	NOL3	OCLN	PFKL	PGF	PINX1
F	POLB	PPP1R15A	SERPINB2	SERPINF1	SKP2	SLC2A1	SNAI1	SNAI2	SNAI3	SOD1	SOX10	STMN1
G	TBX2	TEK	TEP1	TERF1	TERF2IP	TINF2	TNKS	TNKS2	UQCRF51	VEGFC	WEE1	XIAP
H	ACTB	B2M	GAPDH	HPRT1	RPLP0	HGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC



**Çizelge3.6.** Cancer PathwayFinder PCR Array analizinde bakılan genlerin listesi (<https://www.qiagen.com>)

Position	UniGene	GenBank	Symbol	Description
A01	Hs.387567	NM_001096	ACLY	ATP citrate lyase
A02	Hs.268785	NM_004458	ACSL4	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4
A03	Hs.441047	NM_001124	ADM	Adrenomedullin
A04	Hs.369675	NM_001146	ANGPT1	Angiopoietin 1
A05	Hs.583870	NM_001147	ANGPT2	Angiopoietin 2
A06	Hs.728891	NM_001160	APAF1	Apoptotic peptidase activating factor 1
A07	Hs.632446	NM_001668	ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
A08	Hs.298280	NM_004046	ATP5A1	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1, cardiac muscle
A09	Hs.250822	NM_003600	AURKA	Aurora kinase A
A10	Hs.469658	NM_006538	BCL2L11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
A11	Hs.127799	NM_001165	BIRC3	Baculoviral IAP repeat containing 3
A12	Hs.380403	NM_005180	BMI1	BMI1 polycomb ring finger oncogene
B01	Hs.63287	NM_001216	CA9	Carbonic anhydrase IX
B02	Hs.368982	NM_032982	CASP2	Caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase
B03	Hs.9216	NM_001227	CASP7	Caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase
B04	Hs.329502	NM_001229	CASP9	Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase
B05	Hs.303649	NM_002982	CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
B06	Hs.376071	NM_001759	CCND2	Cyclin D2
B07	Hs.534307	NM_001760	CCND3	Cyclin D3
B08	Hs.524947	NM_001255	CDC20	Cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)
B09	Hs.464829	NM_001792	CDH2	Cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)
B10	Hs.390736	NM_003879	CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator
B11	Hs.401903	NM_004255	COX5A	Cytochrome c oxidase subunit Va
B12	Hs.705379	NM_000098	CPT2	Carnitine palmitoyltransferase 2
C01	Hs.700338	NM_000107	DDB2	Damage-specific DNA binding protein 2, 48kDa
C02	Hs.728989	NM_004083	DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3
C03	Hs.4747	NM_001363	DKC1	Dyskeratosis congenita 1, dyskerin
C04	Hs.519873	NM_004415	DSP	Desmoplakin
C05	Hs.108371	NM_001950	E2F4	E2F transcription factor 4, p107/p130-binding
C06	Hs.2303	NM_000799	EPO	Erythropoietin
C07	Hs.469872	NM_000122	ERCC3	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 3 (xeroderma pigmentosum group B complementing)
C08	Hs.258429	NM_000123	ERCC5	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5
C09	Hs.644231	NM_005239	ETS2	V-Ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 (avian)
C10	Hs.2007	NM_000639	FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
C11	Hs.284244	NM_002006	FGF2	Fibroblast growth factor 2 (basic)
C12	Hs.654360	NM_002019	FLT1	Fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor)
D01	Hs.436448	NM_005251	FOXC2	Forkhead box C2 (MFH-1, mesenchyme forkhead 1)
D02	Hs.461047	NM_000402	G6PD	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
D03	Hs.9701	NM_006705	GADD45G	Growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma
D04	Hs.512382	NM_000408	GPD2	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 (mitochondrial)
D05	Hs.440438	NM_173849	GSC	Goosecoid homeobox

Position	UniGene	GenBank	Symbol	Description
D06	Hs.517581	NM_002133	HMOX1	Heme oxygenase (decycling) 1
D07	Hs.450230	NM_000598	IGFBP3	Insulin-like growth factor binding protein 3
D08	Hs.607212	NM_000599	IGFBP5	Insulin-like growth factor binding protein 5
D09	Hs.479808	NM_001553	IGFBP7	Insulin-like growth factor binding protein 7
D10	Hs.479756	NM_002253	KDR	Kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)
D11	Hs.654380	NM_000526	KRT14	Keratin 14
D12	Hs.2795	NM_005566	LDHA	Lactate dehydrogenase A
E01	Hs.166091	NM_002312	LIG4	Ligase IV, DNA, ATP-dependent
E02	Hs.180878	NM_000237	LPL	Lipoprotein lipase
E03	Hs.145442	NM_002755	MAP2K1	Mitogen-activated protein kinase kinase 1
E04	Hs.514012	NM_002756	MAP2K3	Mitogen-activated protein kinase kinase 3
E05	Hs.485233	NM_001315	MAPK14	Mitogen-activated protein kinase 14
E06	Hs.477481	NM_004526	MCM2	Minichromosome maintenance complex component 2
E07	Hs.689823	NM_002417	MKI67	Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67
E08	Hs.513667	NM_003946	NOL3	Nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain)
E09	Hs.592605	NM_002538	OCLN	Occludin
E10	Hs.255093	NM_002626	PFKL	Phosphofructokinase, liver
E11	Hs.252820	NM_002632	PGF	Placental growth factor
E12	Hs.490991	NM_017884	PINX1	PIN2/TERF1 interacting, telomerase inhibitor 1
F01	Hs.654484	NM_002690	POLB	Polymerase (DNA directed), beta
F02	Hs.631593	NM_014330	PPP1R15A	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A
F03	Hs.594481	NM_002575	SERPINF2	Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2
F04	Hs.532768	NM_002615	SERPINF1	Serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1
F05	Hs.23348	NM_005983	SKP2	S-phase kinase-associated protein 2 (p45)
F06	Hs.473721	NM_006516	SLC2A1	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1
F07	Hs.48029	NM_005985	SNAI1	Snail homolog 1 (Drosophila)
F08	Hs.360174	NM_003068	SNAI2	Snail homolog 2 (Drosophila)
F09	Hs.253790	NM_178310	SNAI3	Snail homolog 3 (Drosophila)
F10	Hs.443914	NM_000454	SOD1	Superoxide dismutase 1, soluble
F11	Hs.376984	NM_006941	SOX10	SRY (sex determining region Y)-box 10
F12	Hs.209983	NM_005563	STMN1	Stathmin 1
G01	Hs.531085	NM_005994	TBX2	T-box 2
G02	Hs.89640	NM_000459	TEK	TEK tyrosine kinase, endothelial
G03	Hs.508835	NM_007110	TEP1	Telomerase-associated protein 1
G04	Hs.442707	NM_017489	TERF1	Telomeric repeat binding factor (NIMA-interacting) 1
G05	Hs.301419	NM_018975	TERF2IP	Telomeric repeat binding factor 2, interacting protein
G06	Hs.496191	NM_012461	TINF2	TERF1 (TRF1)-interacting nuclear factor 2
G07	Hs.370267	NM_003747	TNKS	Tankyrase, TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase
G08	Hs.329327	NM_025235	TNKS2	Tankyrase, TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase 2
G09	Hs.170107	NM_006003	UQCRCF1	Ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1
G10	Hs.435215	NM_005429	VEGFC	Vascular endothelial growth factor C
G11	Hs.249441	NM_003390	WEE1	WEE1 homolog (S. pombe)
G12	Hs.356076	NM_001167	XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis
H01	Hs.520640	NM_001101	ACTB	Actin, beta
H02	Hs.534255	NM_004048	B2M	Beta-2-microglobulin
H03	Hs.592355	NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H04	Hs.412707	NM_000194	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
H05	Hs.546285	NM_001002	RPLP0	Ribosomal protein, large, P0
H06	N/A	SA_00105	HGDC	Human Genomic DNA Contamination
H07	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H08	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H09	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H10	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H11	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H12	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control

**Çizelge3.7.** Cancer PathwayFinder PCR Array analizinde genlerin hedef etkileri(<https://www.qiagen.com>)

**Angiogenesis**

ANGPT1, ANGPT2, CCL2 (MCP-1), FGF2 (BFGF), FLT1 (VEGFR1), KDR (VEGFR3), PGF, SERPINF1, TEK (TIE-2, TIE2), VEGFC.

---

**Apoptosis**

APAF1, BCL2L11, BIRC3 (c-IAP2), CASP2, CASP7, CASP9, CFLAR (Casper), FASLG (TNFSF6), NOL3, XIAP (BIRC4).

---

**Cell Cycle**

AURKA, CCND2, CCND3, CDC20, E2F4, MCM2, MKI67, SKP2, STMN1, WEE1.

---

**Cellular Senescence**

BMI1 (PCGF4), ETS2, IGFBP3, IGFBP5, IGFBP7, MAP2K1 (MEK1), MAP2K3 (MEK3), MAPK14 (p38ALPHA), SERPINB2 (PAI-2), SOD1, TBX2.

---

**DNA Damage & Repair**

DDB2, DDIT3 (GADD153, CHOP), ERCC3 (XPB), ERCC5, GADD45G, LIG4, POLB, PPP1R15A (GADD34).

---

**Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT)**

CDH2 (N-Cadherin), DSP, FOXC2, GSC, KRT14, OCLN, SNAI1 (SNAIL), SNAI2, SNAI3, SOX10.

---

**Hypoxia Signaling**

ADM, ARNT, CA9, EPO, HMOX1, LDHA, SLC2A1.

---

**Metabolism**

ACLY, ACSL4, ATP5A1, COX5A, CPT2, G6PD, GPD2, LPL, PFKL, UQCERS1.

---

**Telomeres & Telomerase**

DKC1, PINX1, TEP1, TERF1, TERF2IP, TINF2, TNKS (TIN1), TNKS2.

### 3.6.4 Real Time PCR

RNA izolasyon kiti (ROCHE) kullanılarak CAL62 hücrelerinden total RNA izole edildi. RNA konsantrasyonu spektrofotometre ile ölçülerek ve 1 µg total RNA olacak şekilde cDNA sentez kiti ile komplementer DNA ya çevrildi. IL6 ve BCL2 Genlerine uygun şekilde tasarlanan primerlerle PCR reaksiyonu kuruldu. PCR master çözeltisi (ROCHE) içerisindeki SYBR green ile çoğalan genlerin miktarı Real- Time PCR ölçümleri ile belirlendi.

### 3.6.5 Akım Sitometrik Analiz

Ortak hücre kültürünün 0, 1, 4 ve 7.gün sonunda insan anaplastik tiroid kanseri (CAL62) hücreleri için; CD18 , CD24, CD31, CD34, CD38, CD44, CD133, CD166, CD309, CD324, CD325, CD338, Ki-67, PCNA ve insan kemik iliği kaynaklı Mezenkimal kök hücreleri (iKİ-MKH) için CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 ve HLA-ABC CD14, CD34, CD45, CD117 ve HLA-DR olası değişikliklerin tayini için uygun izotip kontrollerinden 10µl eklenerek oda ısısında, karanlıkta 45 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası yıkama solüsyonu eklenip santrifüj edilerek (5dk. 1800 rpm) 400µl hücre yıkama solüsyonu ile resüspanse edildi. Hazırlanan hücre süspansiyonu BD FACS Calibur cihazında okutularak ve analizi BD Cell Quest TM software programı ile gerçekleştirildi.

**Çizelge3.8.** Ortak kültür sonrası CAL 62 ve iKİ-MKH pozitif ve negatif belirteçleri

<u>BELİRTEÇ</u>	<u>İKİ-MKH</u>	<u>CAL62</u>
CD13	+	
CD14	-	
CD15	-	
CD18		+
CD24		-
CD29	+	
CD31		+
CD34	-	-
CD38		-
CD44	+	+
CD45	-	
CD73	+	
CD90	+	
CD105	+	
CD117	-	
CD133		-
CD166		+
CD309		-
CD324		+
CD325		-
CD338		-
Kİ-67		+
HLA-ABC	+	
HLA-DR	-	
PCNA		+

### 3.7 İstatiksel Analiz

Sonuçların istatistiksel analizleri SPSS 10.0 (SPSS, Chicago, ABD) programı ile yapıldı. Veriler eğli t-testi ve çoklu analizler için Newman–Keuls metodu ile test edildiler. Her deneyen az üç kez tekrar edildi. Deney ve kontrol grupları arasındaki fark  $p<0,05$  olduğunda anlamlı ve  $p<0,01$  olduğunda ileri derece anlamlı olarak ifade edildi.

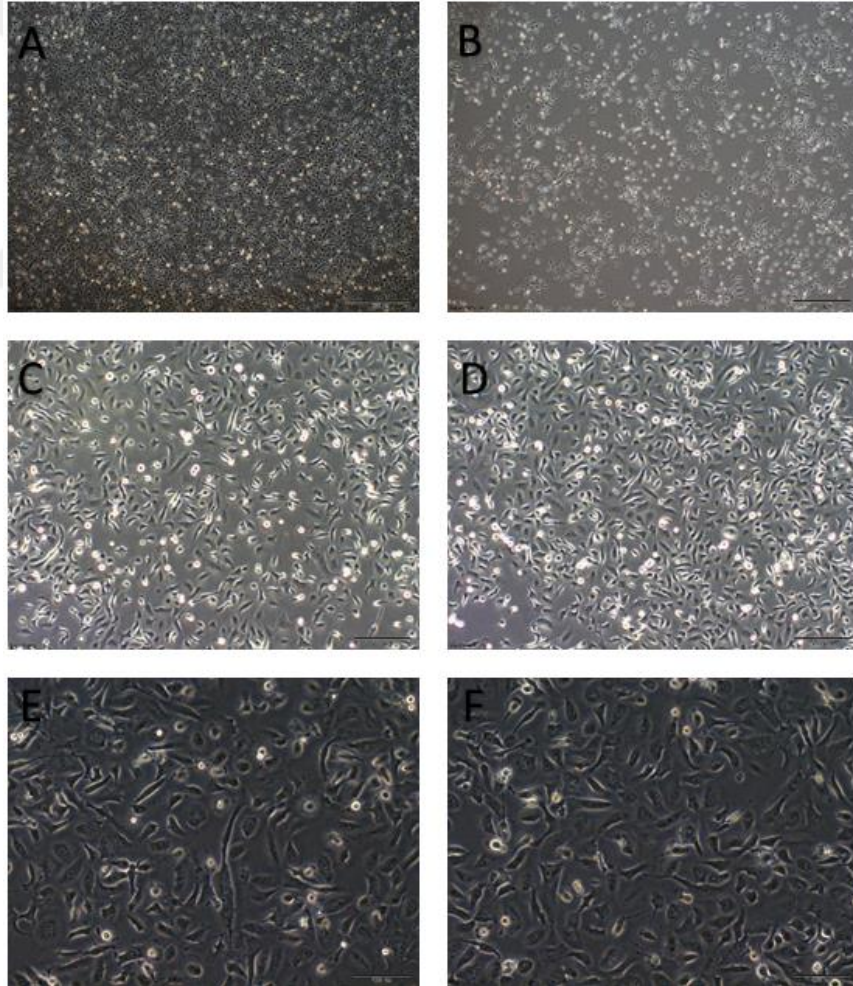




## 4 BULGULAR

### 4.1 İnsan Anaplastik Tiroid Kanseri Hücre Dizisinin Çoğaltımı

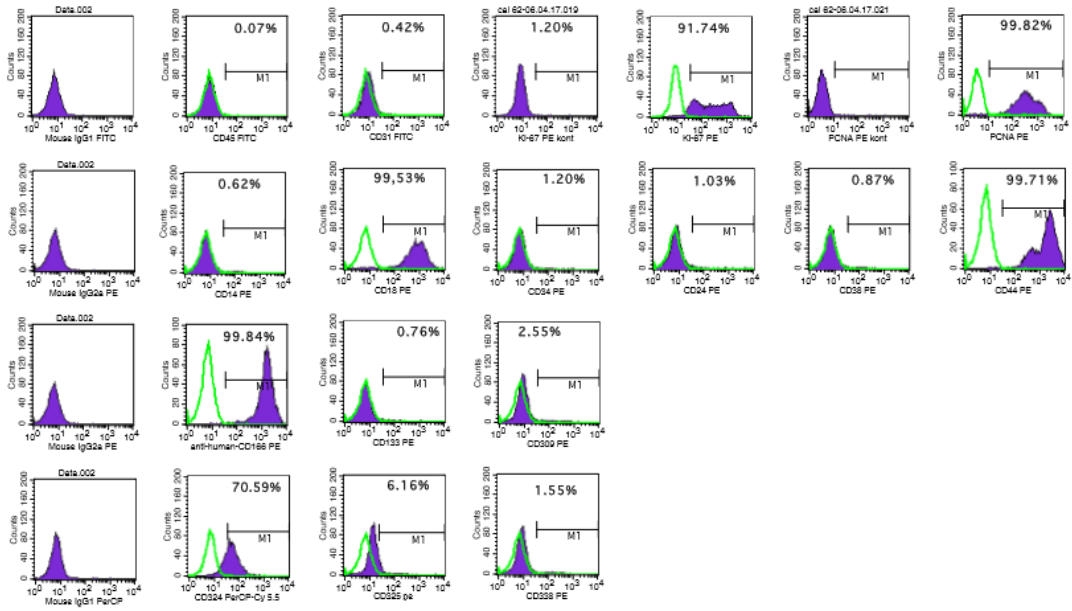
-150 C'de dondurularak saklanan ATCC (Biological Resource Center / Biyolojik Materyal Kaynak Merkezi) hücre koleksiyonundan elde edilen insan anaplastik tiroid kanseri hücreleri 37 C° su banyosunda çözüldükten sonra FBS %10(Fetal bovine serum), Penisilin-streptomisin %1 içeren RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) besi ortamında çoğaltıldı. Hücreler %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C'lik ortamda inkübe edilerek 3 günde bir besi ortamı değiştirildi. Kültür kabında % 70-80 yoğunluğa ulaştıklarında pasajlama işlemi tripsin kullanılarak yapıldı. Hücrelerin morfolojileri Olympus IX71 mikroskopunda gözlemlendi (Çizim4.1).



**Çizim4.1.** insan anaplastik tiroid kanseri hücre kültürü. (a-f) ölçek çubuğu: 500µm (a-b), 200µm (c-d) ve 100 µm (e-f)

## 4.2 İnsan Anaplastik Tiroid Kanseri Hücre Dizisinin Karakterizasyonu

Hücrelerinin karakterizasyon analizi için pasaj 3'e gelindiğinde tripsinizasyon işlemi ile kaldırdı. Hücreler taşıdıkları yüzey belirteçlerine göre karakterize edildi. CD18 , CD24, CD31, CD34, CD38, CD44, CD133, CD166, CD309, CD324, CD325, CD338, Ki-67, PCNA hücre yüzey belirteçleri sırasıyla %99,53, %1,03, %0,42, %1,20, %0,87, %99,71, %0,76, %99,84, %2,55, %70,59, %6,16, %1,55, %91,74, %99,82 olarak bulunmuştur(Çizim4.2).



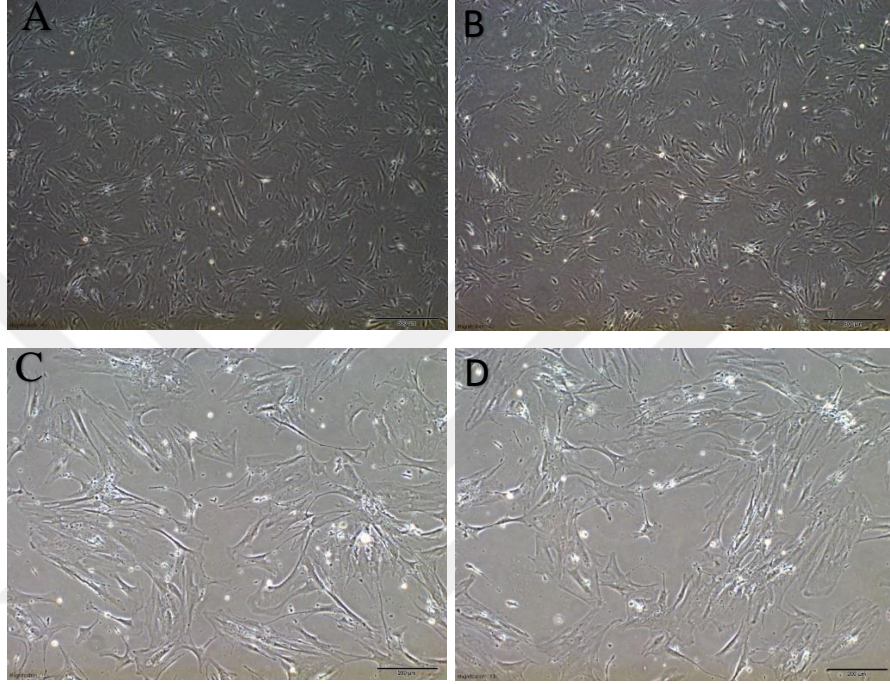
**Çizim4.2.** İnsan anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin akım sitometrisi (hücre sayar) ile yüzey belirteçlerinin belirlenmesi.

Flow sitometrik analiz sonrasında CD18, CD44, CD166, CD324, Ki67 ve PCNA için pozitif CD24, CD31, CD34, CD38, CD133, CD309, CD325 ve CD338 için negatifliği akım sitometri cihazında saptanarak insan anaplastik tiroid kanseri hücre yüzey belirteçleri gösterildi.

## 4.3 İnsan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Çoğaltımı

-150 C' de dondurularak saklanan ATCC (Biological Resource Center / Biyolojik Materyal Kaynak Merkezi) hücre koleksiyonundan elde edilen insan kemik iliği kaynaklı Mezenkimal

kök hücreleri 37 C° su banyosunda çözüldükten sonra FBS %10(Fetal bovine serum), Penisilin-streptomisin %1 içeren L- DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) besi ortamında çoğaltıldı. Hücreler %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C'lik ortamda inkübe edilerek 3 günde bir besi ortamı değiştirildi. Kültür kabında % 70-80 yoğunluğa ulaştıklarında pasajlama işlemi tripsin kullanılarak yapıldı. Hücrelerin morfolojileri Olympus IX71 mikroskopunda gözlemlendi (Çizim4.3).

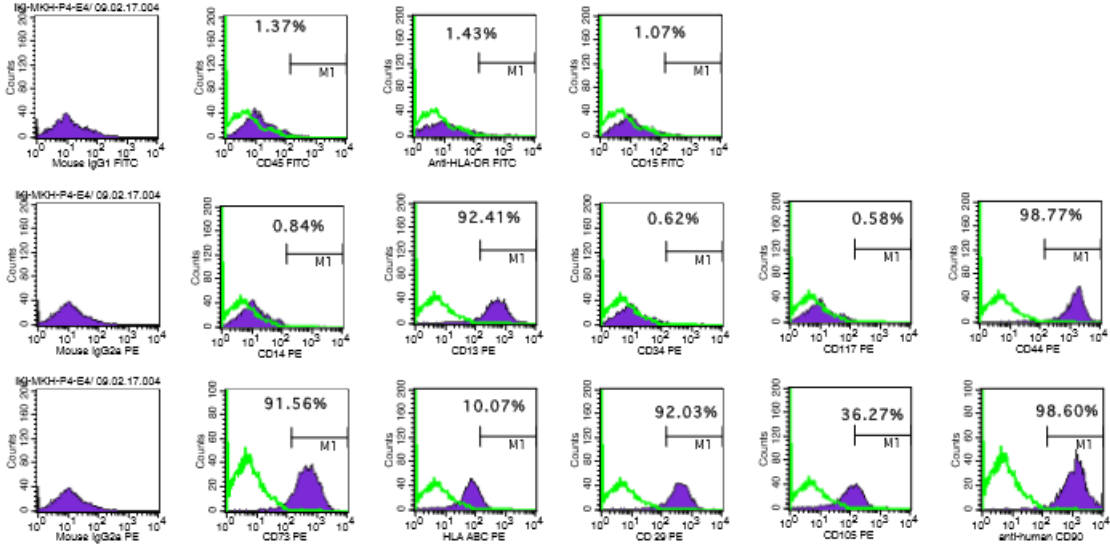


**Çizim4.3.** İnsan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre kültürü. (a-d) ölçek çubuğu: 500µm (a-b), 200µm (c-d)

#### 4.4 İnsan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

Hücrelerinin karakterizasyon analizi için pasaj 3'e gelindiğinde tripsinizasyon işlemi ile kaldırdı. Taşıdıkları yüzen belirteçlerine, kök hücre belirteçlerine ve farklılaşma yeteneğine göre karakterize edildi. Taşıdıkları yüzey belirteçleri CD13, CD15, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 ve HLA A,B,C, CD14, CD34, CD45, CD117 ve HLA-DR ekspresyonlarına bakılarak sırasıyla %92,41, %1,07, %92,03, %98,77, %91,56 %98,60 %36,27 %10,07 %0,84 ,%0,62, %1,37 %0,58, %1,43 olarak bulunmuştur(Çizim4.4).





**Çizim4.4.** İnsan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin akım sitometrisi (hücre sayar) ile yüzey belirteçlerinin belirlenmesi.

Flow sitometrik analiz sonrasında CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 ve HLA A,B,C için pozitif ve CD14, CD15, CD34, CD45, CD117 ve HLA-DR için negatifliği akım sitometri cihazında saptanarak insan kemik iliği kaynaklı Mezenkimal kök hücrelerin kök hücre karakterine sahip olduğu gösterildi.

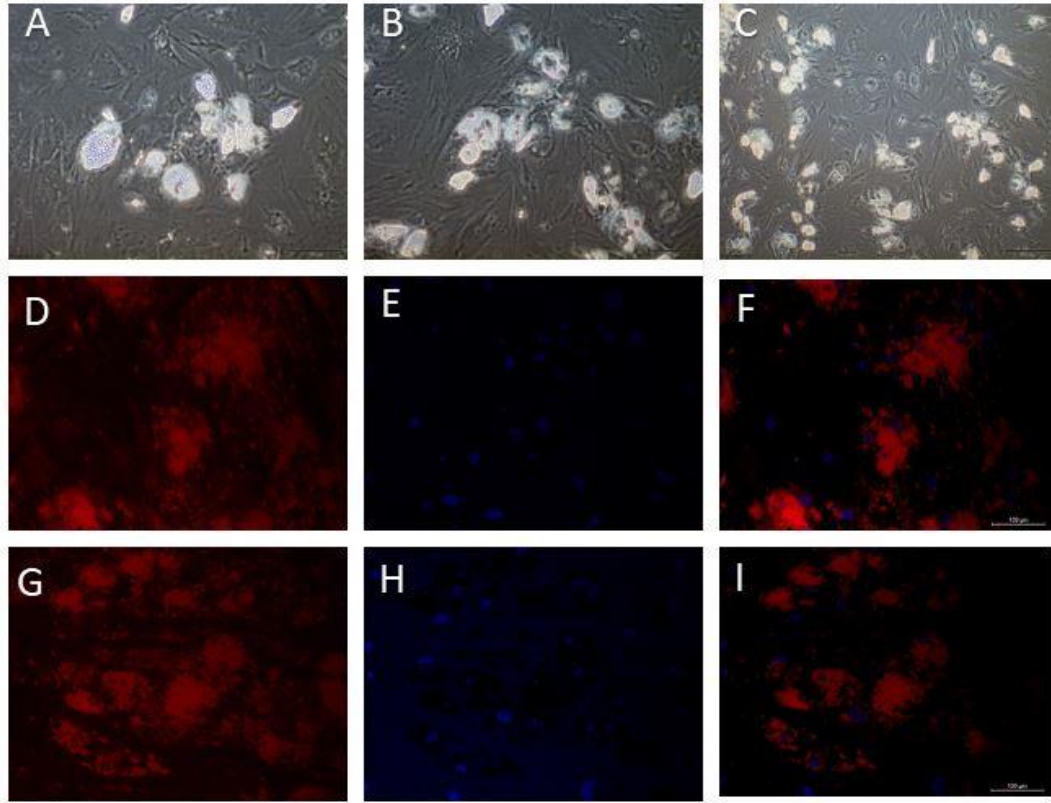
## 4.5 Farklılaştırma Analizi

İnsan kemik iliği kökenli Mezenkimal kök hücrelerin kök hücre özelliklerinin ortaya konmasında adipojenik, osteojenik ve kondrojenik hücre hatlarına farklılaşabilme kapasiteleri incelendi.

### 4.5.1 Adipojenik Farklılaştırma

İnsan kemik iliği kökenli Mezenkimal kök hücreler adipojenik farklılaştırma besi ortamına alınarak kök hücre karakterini taşıdığı göstermek amacıyla hücrelerin morfolojileri Olympus IX71 mikroskopunda incelendi. Dört hafta süren farklılaştırma sonrasında hücrelerin sitoplazmasında gözlemlenen yağ tanecikleri Oil-Red-O ile boyandı.

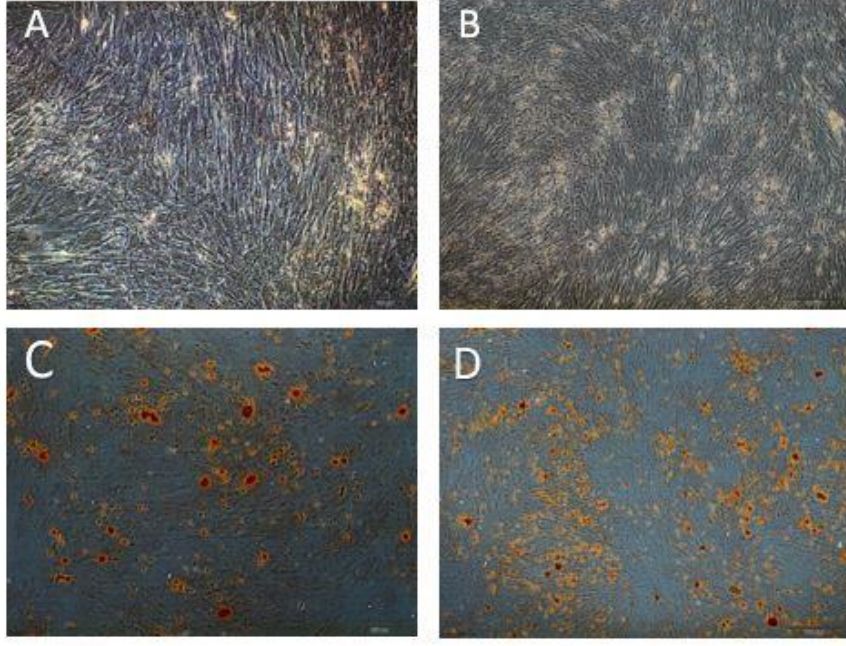
Hücrelerin başarılı bir şekilde adipojenik farklılaştırması gerçekleştirilmiş ve karakterizasyonu tamamlanmıştır (Çizim4.5).



**Çizim4.5.** İnsan kemik iliği kökenli Mezenkimal kök hücrelerin adipojenik farklılaştırma in vitro görüntüleri (**a-f**) Adipojenik farklılaştırma hücrelerin sitoplazmasında oluşan yağ taneciklerinin in vitro görüntüsü (**a-c**) Hücrelerin Oil-Red-O boyaması ile yağ taneciklerinin boyanması (**d-I**) ölçüm çubuğu; 100 $\mu$ m (**a-b**), 200  $\mu$ m (**c**) 100 $\mu$ m (**d-I**)

#### 4.5.2 Osteojenik Farklılaştırma

Osteojenik farklılaştırma ile hücrelerin Mezenkimal kök hücre karakteri taşıdığı gösterildi. Hücrelerin morfolojileri Olympus IX71 mikroskopunda 4 hafta boyunca incelendi. Oluşan kalsiyum nodülleri Alizerin Red-S ile boyandı. Pozitif boyama ile insan kemik iliği kaynaklı Mezenkimal kök hücrelerin osteojenik hücre hatlarına farklılaşabilme kapasitesine sahip olduğu gösterildi(Çizim4.6).



**Çizim4.6.** İnsan kemik iliği kökenli Mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaştırma in vitro görüntüleri (a-d ) Osteojenik farklılaştırma sonrasında oluşan kalsiyum nodüllerinin in vitro görüntüsü (a-b) Hücrelerin Alizerin Red-S boyaması ile kalsiyum nodüllerinin boyanması (c-d ) ölçüm çubuğu; 100µm (a-b), 200µm (c-d)

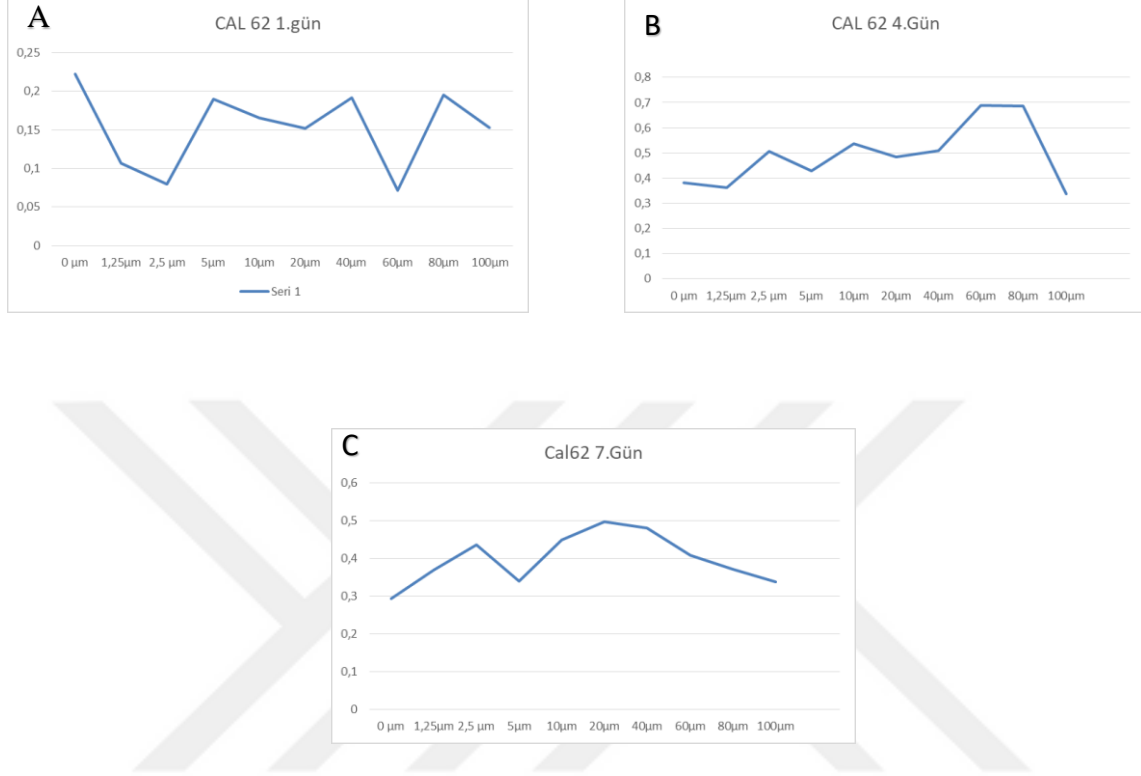
#### 4.6 Asetil-11-Keto-Beta-Bosvelik Asitin (AKBA) Konsantrasyonunun Belirlenmesi

AKBA'nın insan anaplastik kanser hücreleri üzerinde letal dozunun belirlenmesi ve insan kemik iliği kökenli Mezenkimal kök hücreler için toksik olmayan dozu belirlemek amacıyla 1.25µM, 2.5µM, 5µM, 10µM, 20µM, 40µM, 60µM, 80µM, 100µM AKBA konsantrasyonları denenerek WST ve annexin PI testleri gerçekleştirildi. Yapılan testler sonucunda literatür doğrultusunda konsantrasyon 80µM olarak belirlendi. Tez çalışması boyunca tüm deneylerde AKBA konsantrasyonu 80µM olacak şekilde kullanıldı.

##### 4.6.1 WST testi

İnsan anaplastik tiroid kanseri(CAL62) ve insan kemik iliği kökenli Mezenkimal kök hücrelerde(İKİ-MKH) AKBA konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla WST testi gerçekleştirildi. WST testi sonrasında 1.25µM, 2,5µM, 5µM, 10µM, 20µM, 40µM, 60µM, 80µM, 100µM AKBA konsantrasyonlarında hücrelerin canlılık oranları saptandı. CAL62 ve

İKİ-MKH'leri için 1,4 ve 7.günlere bakılarak WST testi analiz sonuçlarına göre 80 µM AKBA konsantrasyonu belirlendi.



**Çizim4.7** İnsan anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin 1.25µM, 2,5µM, 5µM, 10µM, 20µM, 40µM, 60µM, 80µM, 100µM AKBA konsantrasyonlarında WST testi grafik analizi (a-c) CAL62 1.gün WST değerlerinin grafik görüntüsü (a) CAL62 4.gün WST değerlerinin grafik görüntüsü (b) CAL62 7.gün WST değerlerinin grafik görüntüsü (c)

**A**

0 µm	1,25µm	2,5 µm	5µm	10µm	20µm	40µm	60µm	80µm	100µm	BLANK
0,2	0,09	0,119	0,214	0,126	0,104	0,388	0,119	0,381	0,208	0,012
0,255	0,143	0,097	0,087	0,298	0,187	0,383	0,022	0,222	0,17	-0,004
0,213	0,134	0,07	0,345	0,181	0,341	0,216	0,073	0,096	0,076	-0,001
0,084	0,062	0,034	0,113	0,189	0,165	0,167	0,33	0,083	0,156	0,007

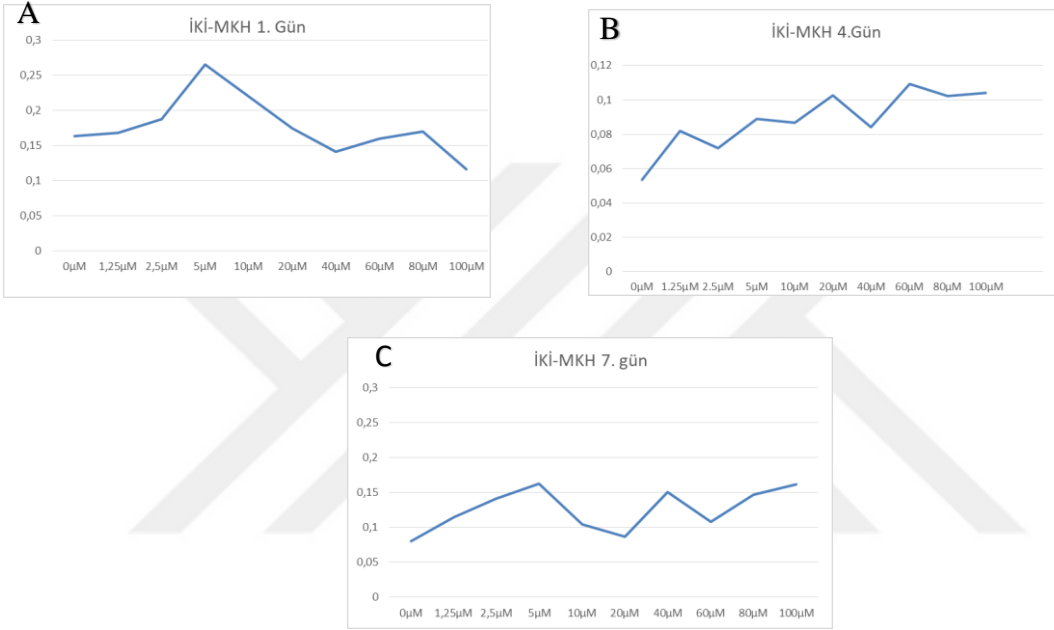
**B**

0 µm	1.25µm	2.5 µm	5µm	10µm	20µm	40µm	60µm	80µm	100µm	BLANK
0.272	0.385	0.573	0.453	0.609	0.480	0.535	0.634	2.122	0.342	-0.003
0.409	0.383	0.451	0.372	0.568	0.535	1.057	0.741	1.482	1.377	0.012
0.464	0.431	0.450	0.414	0.629	0.736	0.408	3.303	0.561	0.386	-0.008
0.385	0.251	0.554	0.479	0.339	0.435	0.583	2.223	0.809	0.285	-0.001

C

0 µm	1.25µm	2.5 µm	5µm	10µm	20µm	40µm	60µm	80µm	100µm	BLANK
0.165	0.285	0.396	0.202	0.353	0.453	0.008	0.366	0.422	0.375	-0.004
0.221	0.403	0.464	0.456	0.254	0.504	0.005	0.421	0.350	0.459	0.003
0.380	0.302	0.532	0.275	0.579	0.531	0.028	0.389	0.321	0.279	-0.000
0.409	0.485	0.348	0.424	0.610	0.022	0.480	0.452	0.388	0.238	0.001

**Çizim4.8** İnsan anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin 1.25µM, 2,5µM, 5µM, 10µM, 20µM, 40µM, 60µM, 80µM, 100µM AKBA konsantrasyonlarında WST testi değerleri (a-c) CAL62 1.gün WST değerlerinin sonuçları (a) CAL62 4.gün WST değerlerinin sonuçları (b) CAL62 7.gün WST değerlerinin sonuçları (c)



**Çizim4.19** İnsan kemik iliği kökenli Mezenkimal kök hücrelerinin 1.25µM, 2,5µM, 5µM, 10µM, 20µM, 40µM, 60µM, 80µM, 100µM AKBA konsantrasyonlarında WST testi grafik analizleri (a-c) İKİ-MKH 1.gün WST değerlerinin grafik görüntüsü (a) İKİ-MKH 4.gün WST değerlerinin grafik görüntüsü (b) İKİ-MKH 7.gün WST değerlerinin grafik görüntüsü (c)

A

0µM	1.25µM	2.5µM	5µM	10µM	20µM	40µM	60µM	80µM	100µM	BLANK
0.161	0.131	0.133	0.120	0.202	0.151	0.095	0.076	0.133	0.106	-0.001
0.188	0.233	0.383	0.234	0.248	2.170	0.157	0.259	0.122	0.220	0.001
0.142	0.216	0.170	0.283	0.214	0.214	0.207	0.090	0.411	0.055	-0.002
0.087	0.091	0.260	0.278	0.215	0.157	0.105	0.214	0.254	0.084	0.003

B

0µM	1.25µM	2.5µM	5µM	10µM	20µM	40µM	60µM	80µM	100µM	BLANK
0,075	0,072	0,074	0,068	0,068	0,094	0,088	0,09	0,074	0,102	-0,008
0,021	0,08	0,065	0,089	0,095	0,115	0,07	0,12	0,099	0,08	0,004
0,056	0,075	0,079	0,085	0,09	0,099	0,077	0,099	0,121	0,092	-0,001
0,061	0,101	0,069	0,114	0,094	0,103	0,101	0,128	0,115	0,142	0,005



C

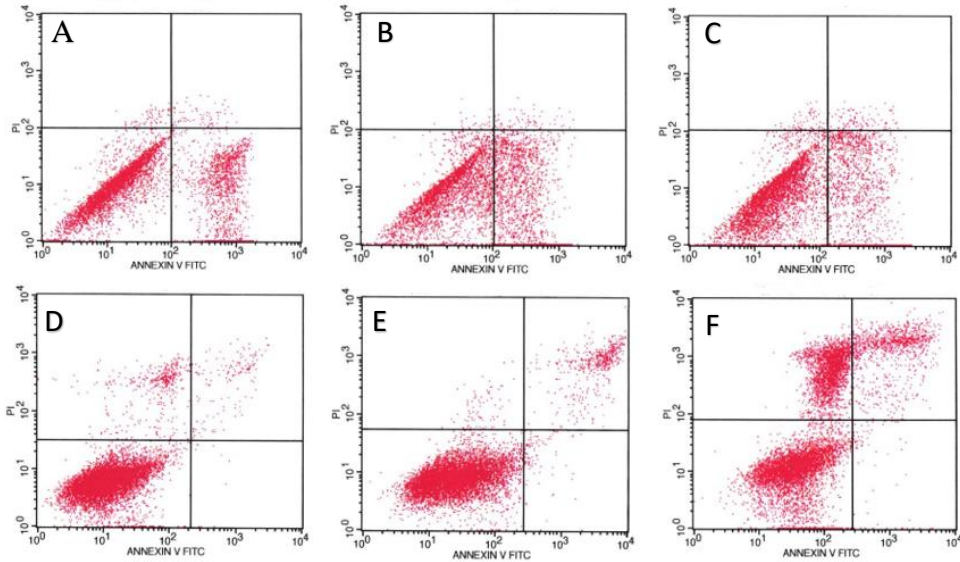
0 $\mu$ M	1.25 $\mu$ M	2.5 $\mu$ M	5 $\mu$ M	10 $\mu$ M	20 $\mu$ M	40 $\mu$ M	60 $\mu$ M	80 $\mu$ M	100 $\mu$ M	BLANK
0.056	0.088	0.114	0.161	0.114	0.086	0.117	0.110	0.143	0.140	0.002
0.084	0.140	0.139	0.150	0.065	0.120	0.163	0.119	0.169	0.145	0.006
0.123	0.082	0.174	0.210	0.074	0.054	0.146	0.083	0.150	0.159	-0.006
0.060	0.147	0.137	0.130	0.165	0.087	0.177	0.122	0.127	0.204	-0.003

**Çizim4.10** İnsan kemik iliği kökenli Mezenkimal kök hücrelerinin 1.25 $\mu$ M, 2,5 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M, 40 $\mu$ M, 60 $\mu$ M, 80 $\mu$ M, 100 $\mu$ M AKBA konsantrasyonlarında WST testi değerleri (a-c) İKİ-MKH 1.gün WST değerlerinin sonuçları (a) İKİ-MKH 4.gün WST değerlerinin sonuçları (b) İKİ-MKH 7.gün WST değerlerinin sonuçları (c)

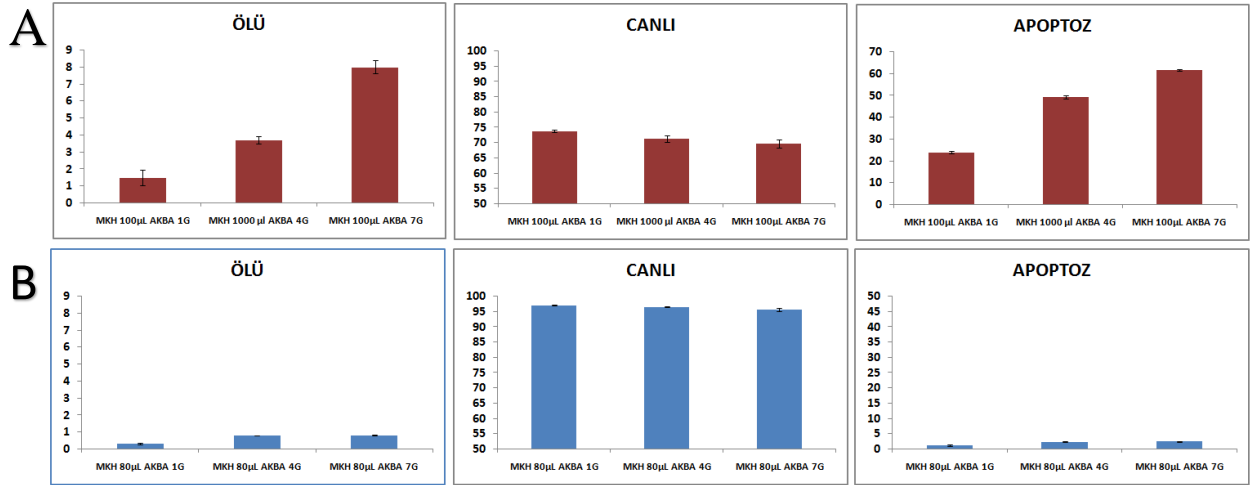
WST testi sonucunda CAL62 hücrelerinde 4 ve 7. Günlerde 80  $\mu$ M konsantrasyon oranında canlılıkta azalma tespit edildi. İKİ-MKH hücrelerinde ise 4 ve 7. Günlerde 80  $\mu$ M konsantrasyon oranında canlılıkta artış tespit edildi.

#### 4.6.2 Annexin PI Testi

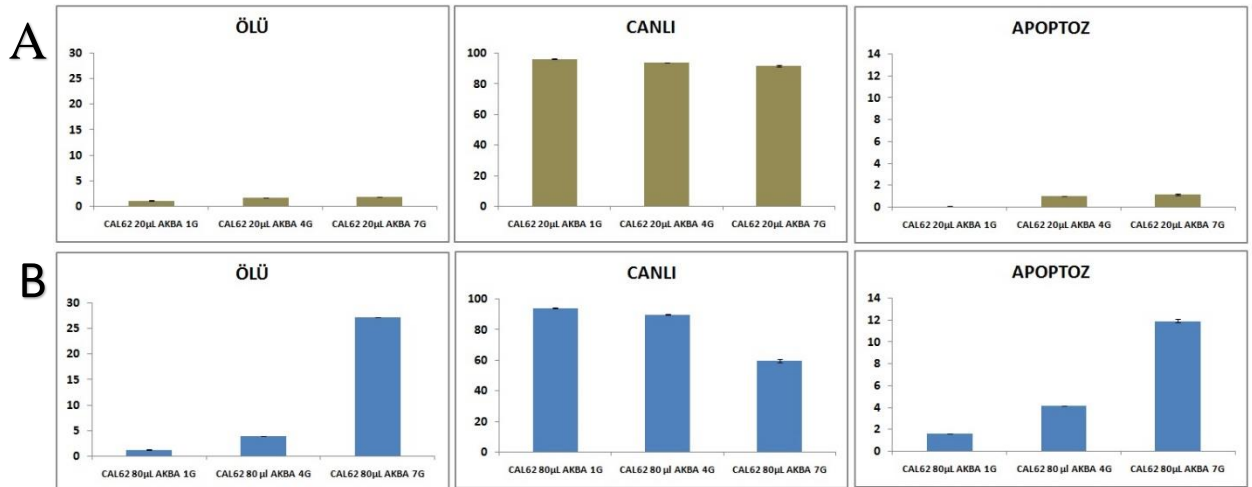
İnsan anaplastik tiroid kanseri(CAL62) ve insan kemik iliği kökenli Mezenkimal kök hücrelerde(İKİ-MKH) AKBA konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla Annexin PI testi gerçekleştirildi. Annexin PI testi sonucunda 1.25 $\mu$ M, 2,5 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M, 40 $\mu$ M, 60 $\mu$ M, 80 $\mu$ M, 100 $\mu$ M AKBA konsantrasyonlarında canlı, ölü, erken apoptotik ve geç apoptotik sonuçlarına bakılarak yapılan analizlerde her iki hücre grubu için uygun doz 80 $\mu$ l olarak belirlendi



**Çizim 4.11** İKİ-MKH VE CAL62 AKBA konsantrasyonunun Annexin PI Testi ile belirlenmesi (a-f) İKİ-MKH 80 $\mu$ l AKBA 1.gün (a) İKİ-MKH 80 $\mu$ l AKBA 4.gün (b) İKİ-MKH 80 $\mu$ l AKBA 7.gün (c) CAL62 80 $\mu$ l AKBA 1.gün (d) CAL62 80 $\mu$ l AKBA 4.gün (e) CAL62 80 $\mu$ l AKBA 7.gün (f)



**Çizim 4.12** 1.4 ve 7. Günlerde İKİ-MKH AKBA konsantrasyonunun Annexin PI testi ile belirlenmesi(a-b) İKİ-MKH hücrelerinin 100µl AKBA konsantrasyonunda ölü, canlı ve apoptoz Annexin PI grafikleri (a) İKİ-MKH hücrelerinin 80µl AKBA konsantrasyonunda ölü, canlı ve apoptoz Annexin PI grafikleri (b)



**Çizim 4.13** 1.4 ve 7. Günlerde CAL62 AKBA konsantrasyonunun Annexin PI testi ile belirlenmesi(a-b) CAL62 hücrelerinin 20µl AKBA konsantrasyonunda ölü, canlı ve apoptoz Annexin PI grafikleri (a) CAL62 hücrelerinin 80µl AKBA konsantrasyonunda ölü, canlı ve apoptoz Annexin PI grafikleri (b)

Yapılan Annexin PI testi sonucunda İKİ-MKH hücreleri için 100µl AKBA konsantrasyonunun, 80µl AKBA konsantrasyonuna oranla ölüm oranının ve apoptoz oranının fazla olduğu canlılık oranının ise düşük olduğu saptandı. 80µl AKBA konsantrasyonunda İKİ-MKH hücrelerinin canlılık oranının yüksek olduğu apoptoz ve ölüm

oranlarının çok düşük olması hücrenin proliferasyonunda olumlu etkisi olduğunu göstermektedir. CAL 62 hücrelerinde ise 80 µl oranında apoptoz oranının fazla olduğu görüldü. 20 µl AKBA konsantrasyonunda hücrelerin 80µl kadar apoptoz oranını etkilemediği saptandı.

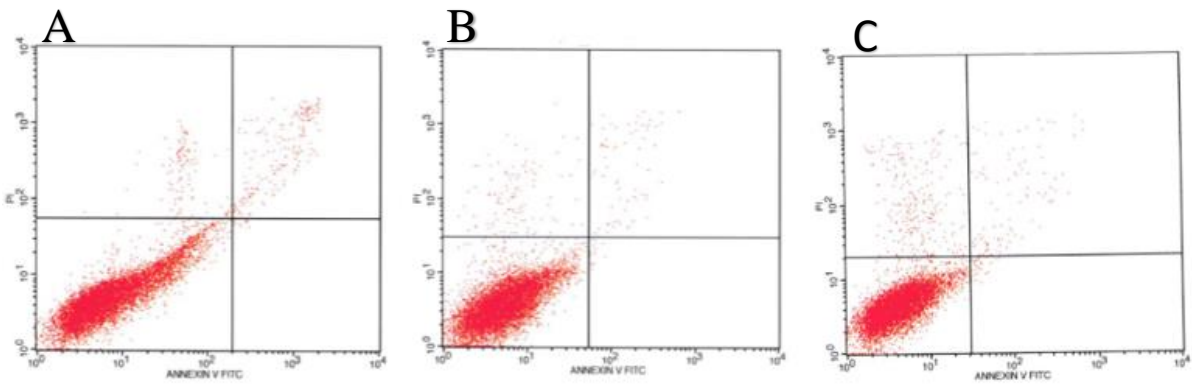
#### 4.7 Hücrelerin Ortak Kültürü ve Etkileşimlerinin İncelenmesi

Çoğaltılan ve karakterizasyon işlemleri tamamlanan İKİ-MKH ve CAL62 hücrelerinin birbirleriyle ve aynı zamanda AKBA ile etkileşimlerine bakmak üzere insertler aracılığıyla ortak kültüre alındılar. 7 gün süren ortak kültür sonrasında analizler gerçekleştirildi. Hücrelerin birbiriyle olan etkisi ortaya kondu.

##### 4.7.1 Ortak Kültür Sonrası Annexin V-PI Kapasite Tayini

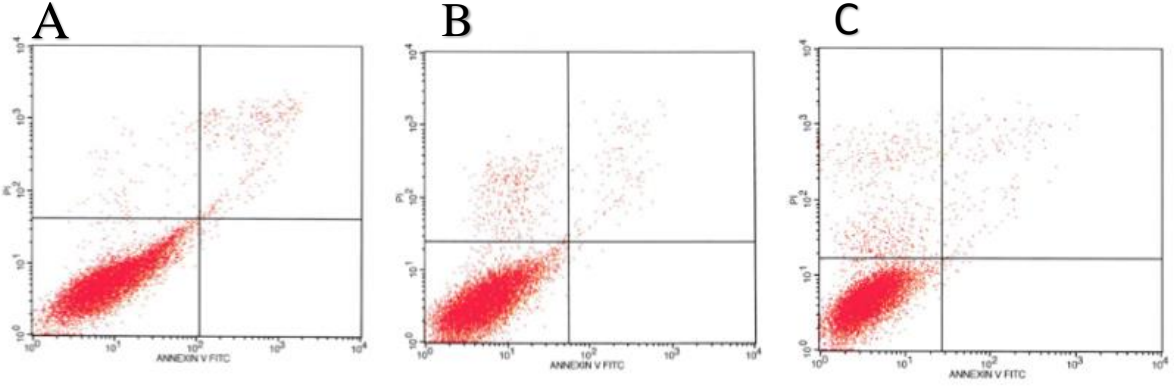
Ortak kültür sonrasında 1, 4 ve 7.günlerde 1:1 ve 1:3 oranlarında hücrelerin birbirleriyle etkisine bakılarak ve AKBA'nın hücrelerin üzerindeki etkisi incelenerek canlı, erken-geç apoptotik ve ölü hücre oranları saptandı.

##### 4.7.1.1 Ortak Kültür Sonrası 1:1 Oranında CAL62 Hücrelerinin Annexin V-PI Kapasite Tayini

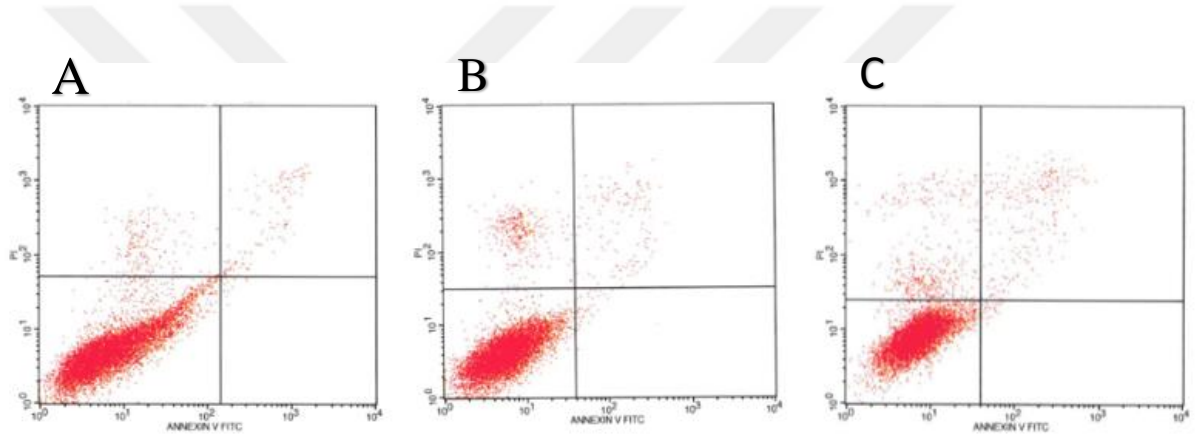


**Çizim4.14.** CAL62 1:1 oranında kontrol grubu 1,4 ve 7. günlerde Annexin V-PI analizi(a-c) 1.gün (a) 4.gün (b) 7.gün (c)

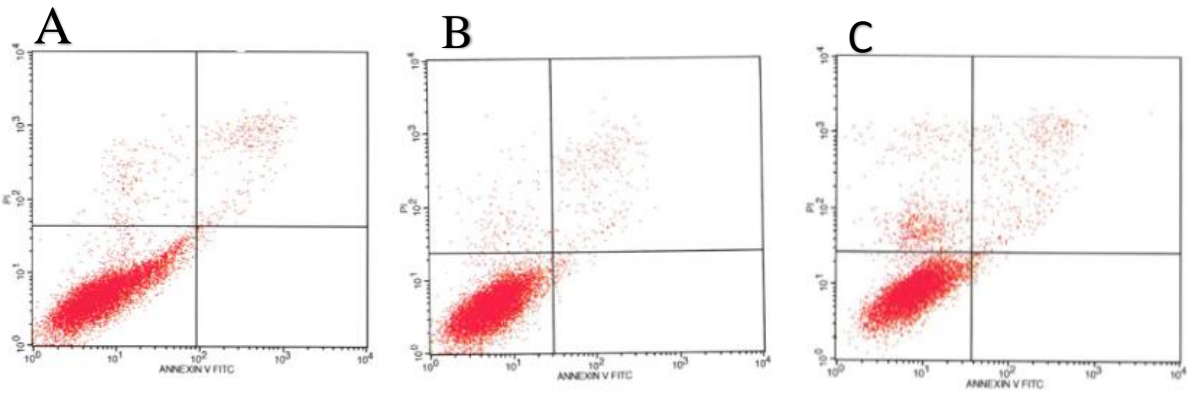




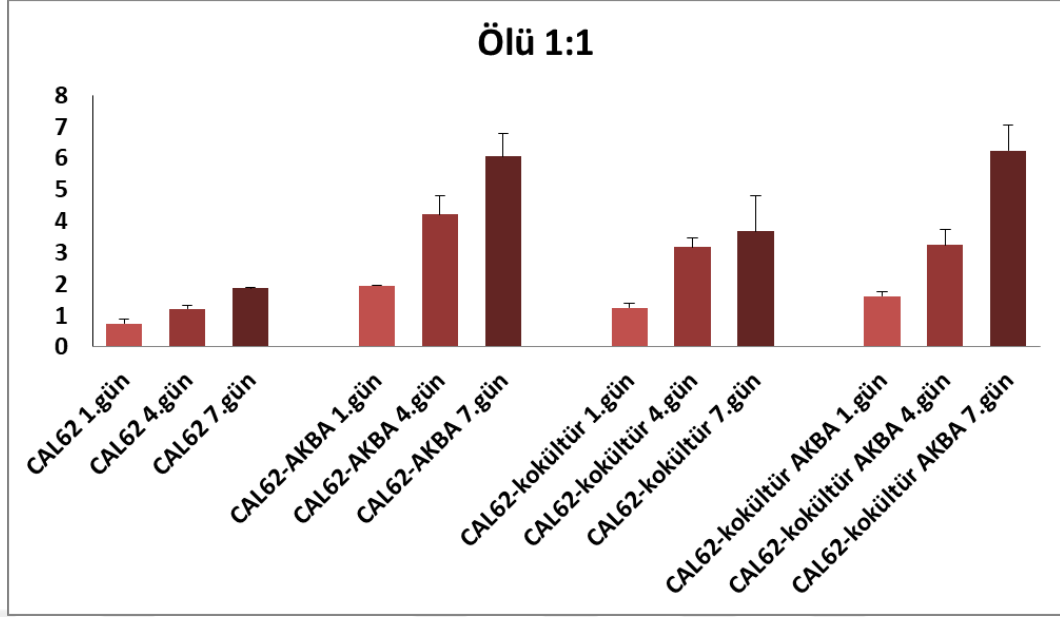
**Çizim4.15** CAL62 1:1 oranında 80 µl AKBA ile ortak kültür sonrası 1,4 ve 7. günlerde Annexin V-PI analizi (a-c) 1.gün (a) 4.gün (b) 7.gün (c)



**Çizim4.16** CAL62 1:1 oranında İKİ-MKH ile birlikte ortak kültür sonrası 1,4 ve 7. günlerde Annexin V-PI analizi (a-c) 1.gün (a) 4.gün (b) 7.gün (c)

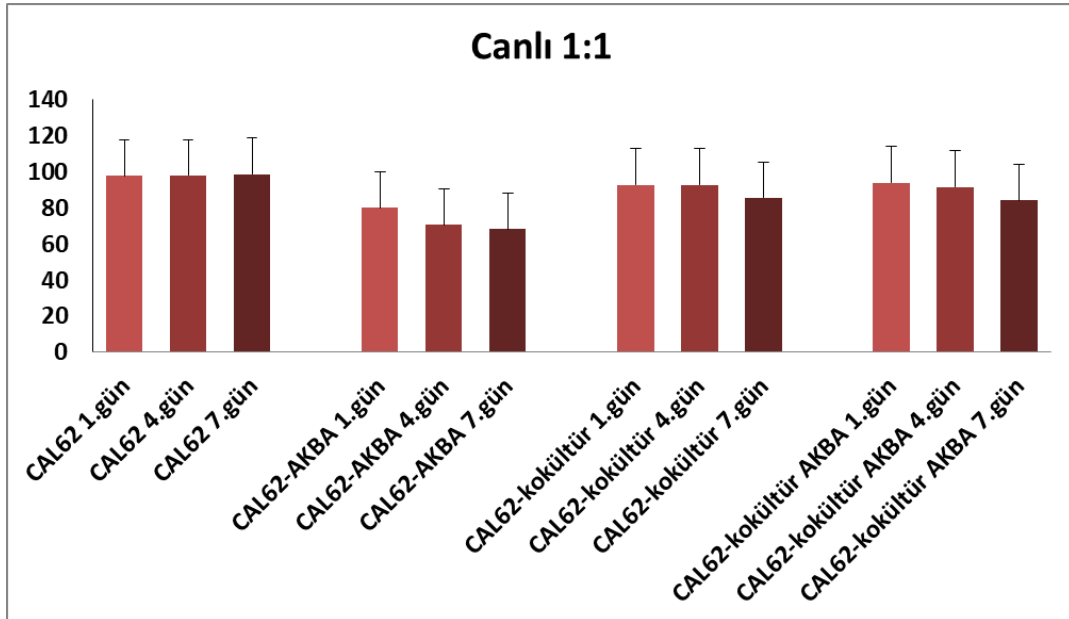


**Çizim4.17** CAL62 1:1 oranında 80 µl AKBA+ İKİ-MKH ile birlikte ortak kültür sonrası 1,4 ve 7. günlerde Annexin V-PI analizi (a-c) 1.gün (a) 4.gün (b) 7.gün (c)



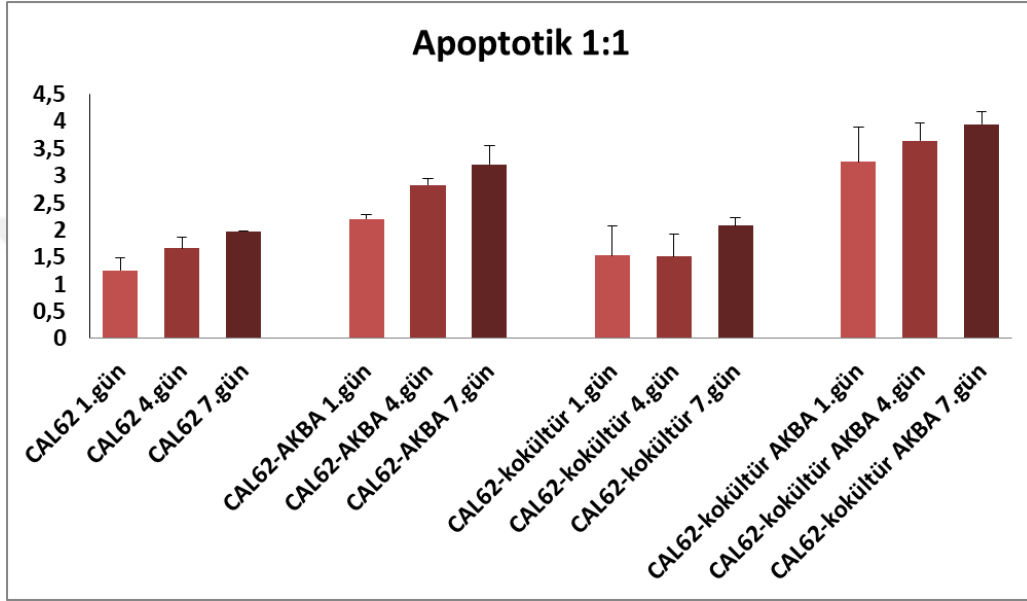
**Çizim4.18** Ortak kültür sonrası CAL62 hücrelerin 80µl AKBA konsantrasyonunda 1,4 ve 7. Günlerde 1:1 oranında ko kültür testinin ölüm grafiği.

Ortak kültür sonrasında yapılan Annexin PI testi sonucunda CAL62 hücrelerinin 80µl AKBA'lı olan kültürde ölüm oranının diğer gruplara oranla daha fazla olduğu saptandı. CAL62+AKBA grubunda 7 gündeki ölüm oranının 1 ve 4 güne oranla arttığı gözlemlendi. Cal62 ko kültür +AKBA grubunda ki ölüm oranında cal62 ve cal 62 kokültür grubuna oranla daha yüksek olduğu bulgularda görülmektedir.



**Çizim4.19** Ortak kültür sonrası CAL62 hücrelerin 80µl AKBA konsantrasyonunda 1,4 ve 7. Günlerde 1:1 oranında ko kültür testinin canlılık grafiği.

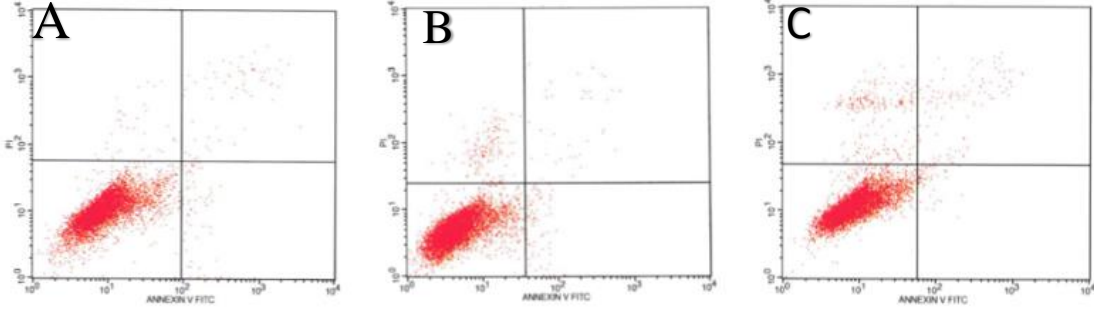
Ortak kültür sonrasında yapılan Annexin PI testi sonucunda CAL62 hücrelerinin 80µl AKBA'lı olan kültürde canlılık oranının diğer gruplara oranla daha az olduğu saptandı. CAL62+AKBA grubundaki canlılık oranının 1 güne oranla 4 ve 7. Günlerde azaldığı gözlemlendi.



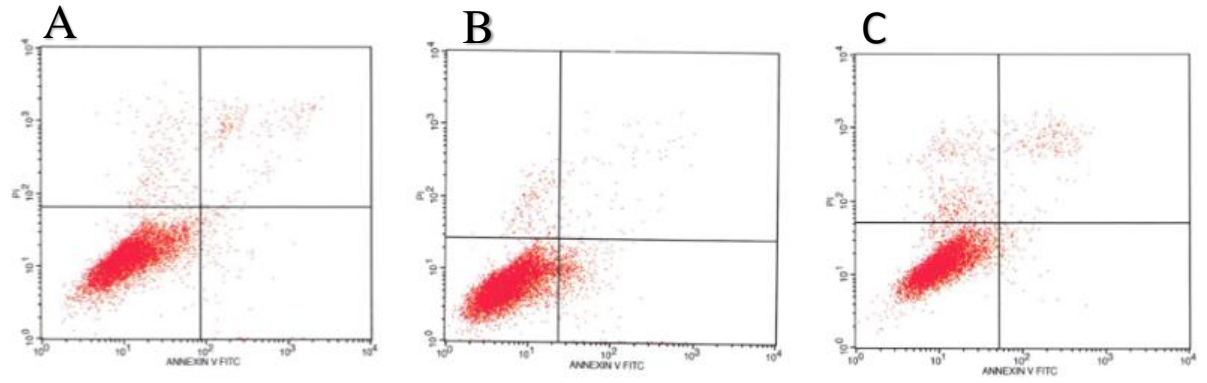
**Çizim4.20** Ortak kültür sonrası CAL62 hücrelerin 80µl AKBA konsantrasyonunda 1,4 ve 7. Günlerde 1:1 oranında ko kültür testinin apoptoz grafiği.

Ortak kültür sonrasında yapılan Annexin PI testi sonucunda CAL62 hücrelerinin 80µl AKBA'lı olan kültürde apoptoz oranının cal62 ve cal62 ko kültür gruplarına oranla daha fazla olduğu görüldü. CAL62 + AKBA lı grupta 1,4 ve 7 günlerde apoptoz oranında artış izlendi. Cal 62 ko kültür AKBA grubunda CAL62 +AKBA grubuna benzer apoptotik oranında artış izlendi.

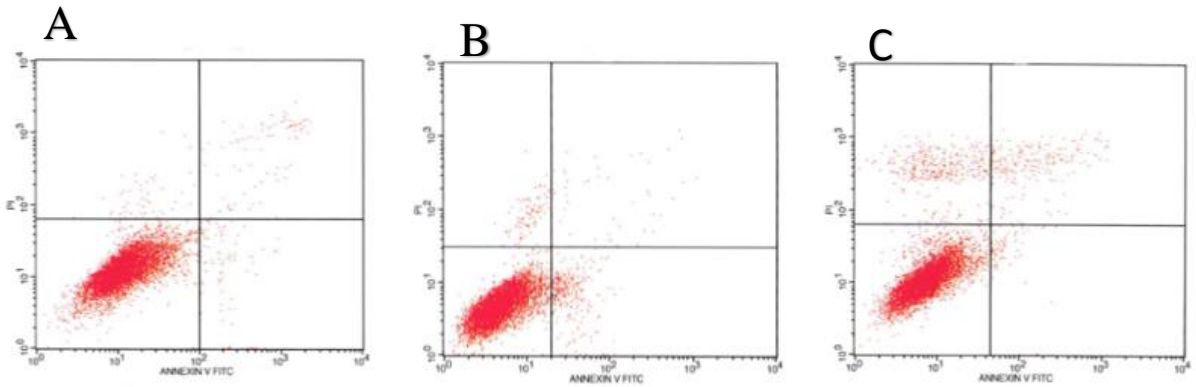
#### 4.7.1.2 Ortak Kültür Sonrası İKİ-MKH 1:1 Oranında Annexin V-PI Kapasite Tayini



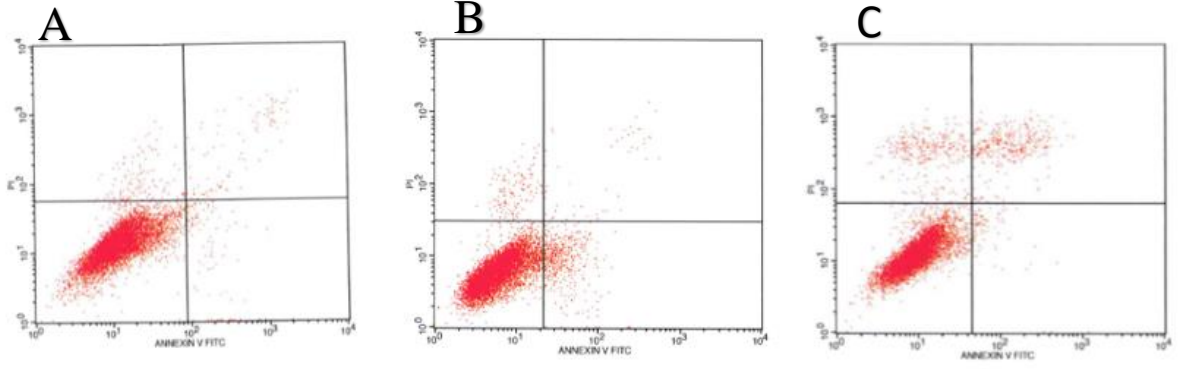
**Çizim4.21** İKİ-MKH 1:1 oranında kontrol grubu Annexin V-PI analizi (a-c) 1.gün (a) 4.gün (b) 7.gün (c)



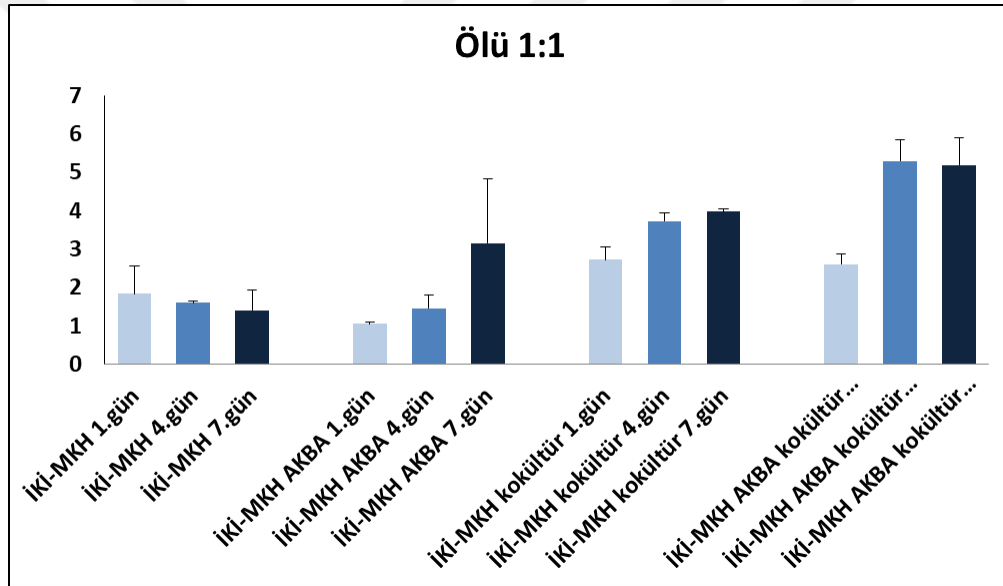
**Çizim4.22** İKİ-MKH 1:1 oranında 80 µl AKBA ile ortak kültür sonrası 1,4 ve 7. günlerde Annexin V-PI analizi(a-c) 1.gün (a) 4.gün (b) 7.gün (c)



**Çizim4.23** İKİ-MKH 1:1 oranında İKİ-MKH ile birlikte ortak kültür sonrası 1,4 ve 7. günlerde Annexin V-PI analizi (a-c) 1.gün (a) 4.gün (b) 7.gün (c)

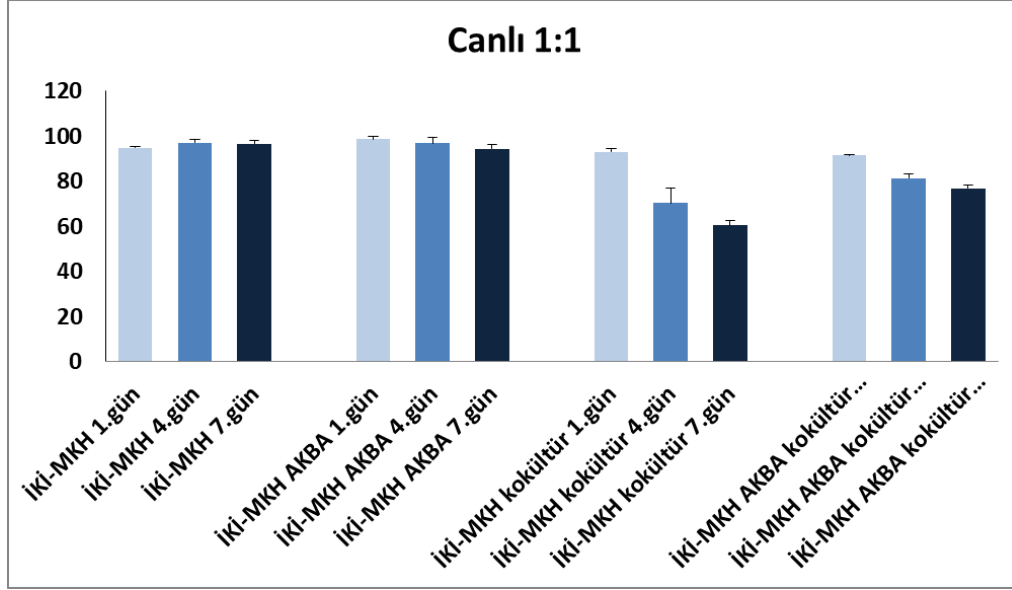


**Çizim4.24** İKİ-MKH 1:1 oranında 80 µl AKBA+ İKİ-MKH ile birlikte ortak kültür sonrası 1,4 ve 7. günlerde Annexin v-PI analizi (a-c) 1.gün (a) 4.gün (b) 7.gün (c)



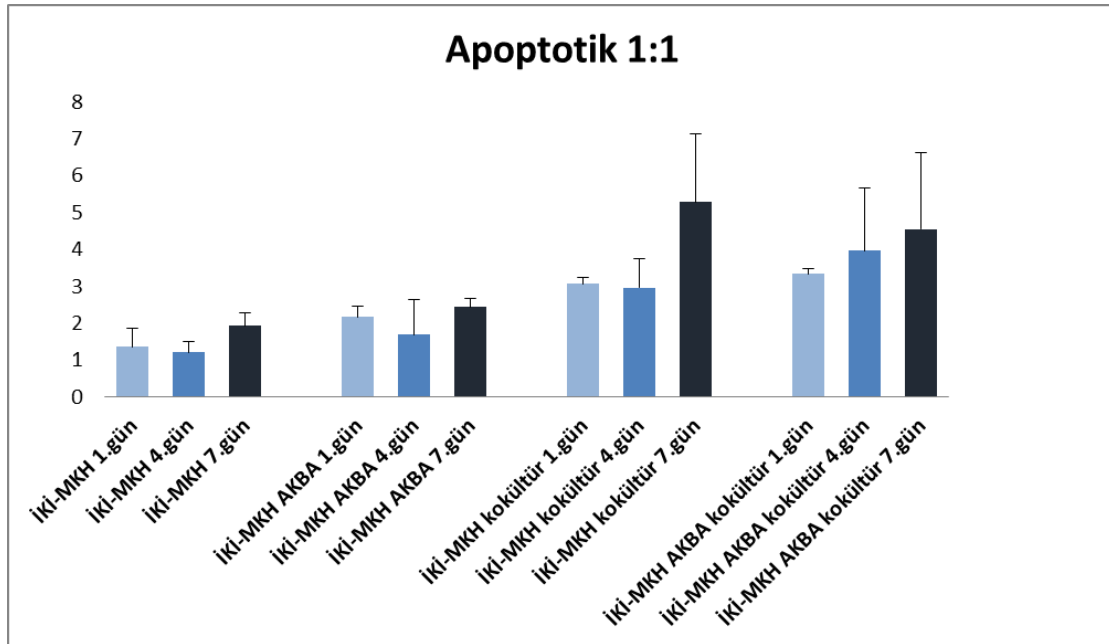
**Çizim4.25** Ortak kültür sonrası İKİ-MKH hücrelerin 80µl AKBA konsantrasyonunda 1,4 ve 7. Günlerde 1:1 oranında ko kültür testinin ölüm grafiği.

Ortak kültür sonrasında yapılan Annexin PI testi sonucunda İKİ-MKH hücrelerinin 80µl AKBA konsantrasyonundaki ölüm oranının İKİ-MKH ko kültür ve İKİ-MKH + AKBA kokültür gruplarında oranla daha az olduğu gözlemlendi.



**Çizim4.26** Ortak kültür sonrası İKİ-MKH hücrelerin 80 $\mu$ l AKBA konsantrasyonunda 1,4 ve 7. Günlerde 1:1 oranında ko kültür testinin canlılık grafiği.

Ortak kültür sonrasında yapılan Annexin PI testi sonucunda İKİ-MKH hücrelerinin 80 $\mu$ l AKBA konsantrasyonundaki canlılık oranının İKİ-MKH ko kültür ve İKİ-MKH + AKBA kokültür gruplarında oranla daha fazla olduğu gözlemlendi.

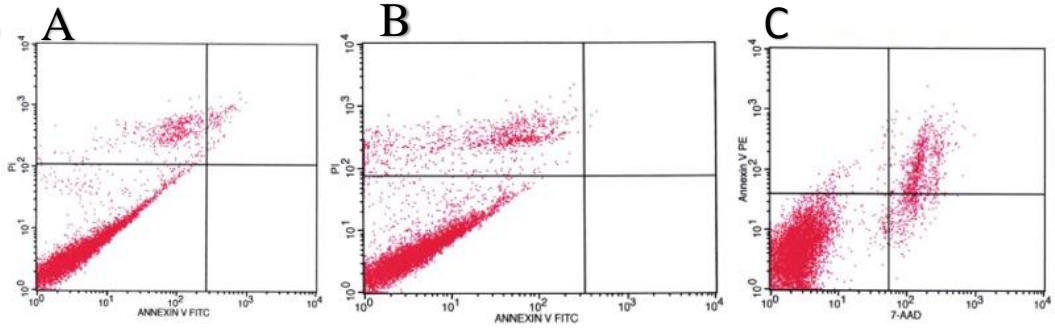


**Çizim4.27** Ortak kültür sonrası İKİ-MKH hücrelerin 80 $\mu$ l AKBA konsantrasyonunda 1,4 ve 7. Günlerde 1:1 oranında ko kültür testinin apoptoz grafiği.

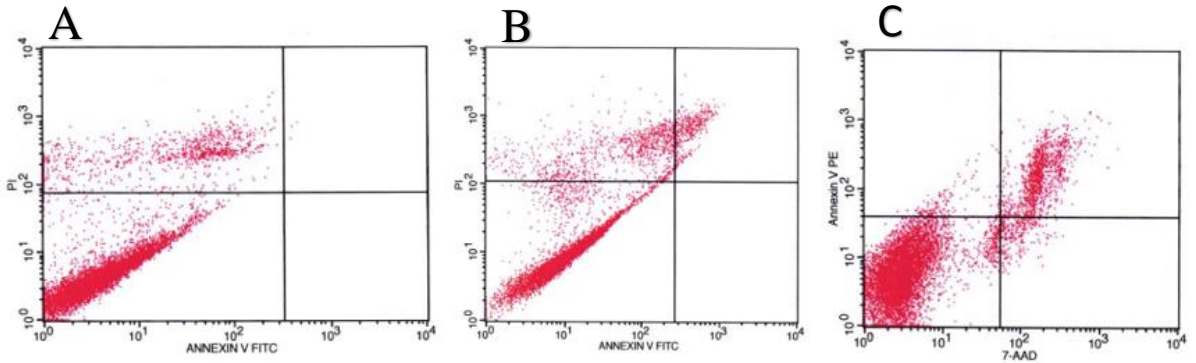
Ortak kültür sonrasında yapılan Annexin PI testi sonucunda İKİ-MKH hücrelerinin 80µl AKBA konsantrasyonundaki apoptoz oranının İKİ-MKH ko kültür ve İKİ-MKH + AKBA kokültür gruplarında oranla daha az olduğu gözlemlendi.

Yapılan Annexin PI testi sonucunda 80 µl AKBA konsantrasyonunun İKİ-MKH hücreleri için İKİ-MKH ko kültür grubu ve İKİ-MKH ko kültür AKBA grubuna göre apoptozunu azalttığı, canlılık oranının ise arttırdığı gözlemlendi.

#### 4.7.1.3 Ortak Kültür Sonrası 1:3 Oranında CAL62 Hücrelerinin Annexin V-PI Kapasite Tayini

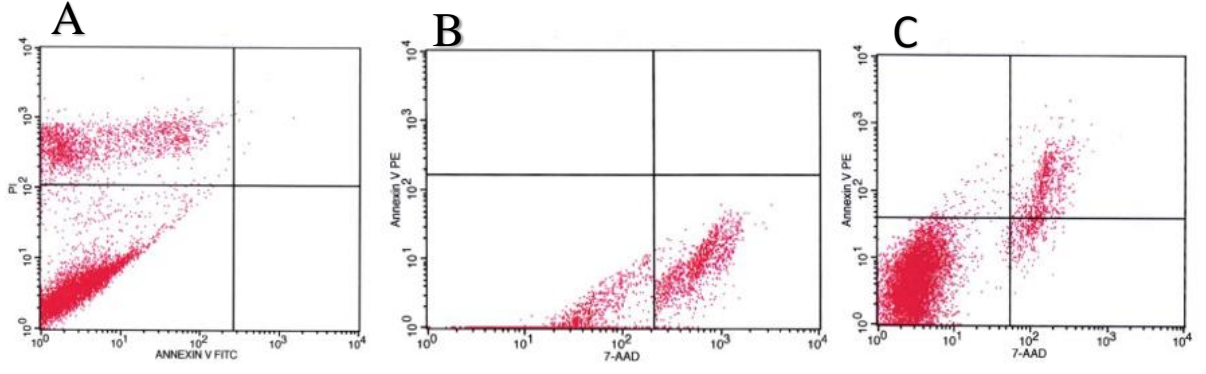


**Çizim4.28.** CAL62 1:3 oranında kontrol grubu 1,4 ve 7. Gün Annexin V-PI analizi (a-c) 1.gün (a) 4.gün (b) 7.gün (c)

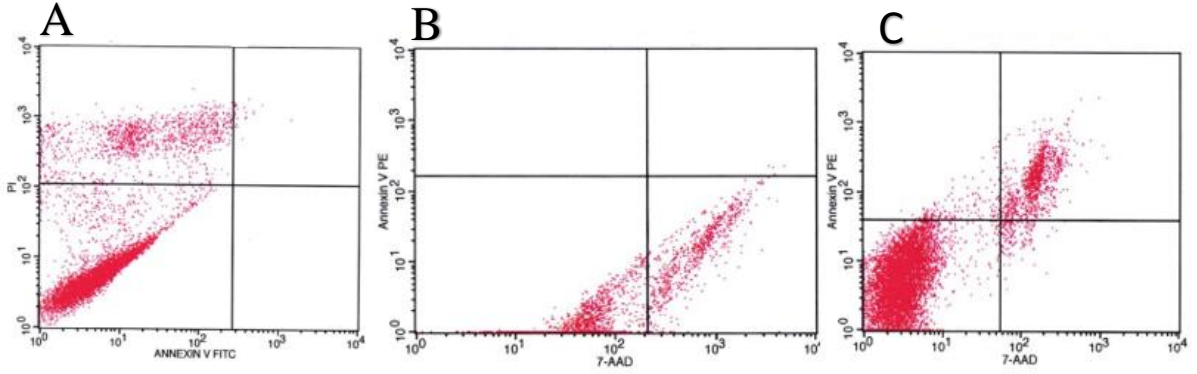


**Çizim4.29** CAL62 1:3 oranında 80 µl AKBA ile ortak kültür sonrası 1,4 ve 7. günlerde Annexin V-PI analizi (a-c) 1.gün (a) 4.gün (b) 7.gün (c)

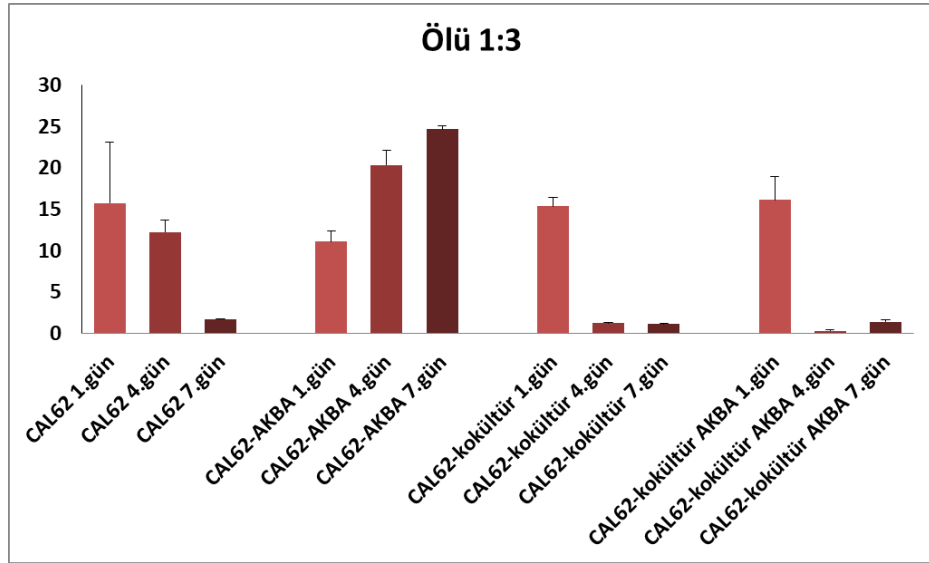




**Çizim4.30** CAL62 1:3 oranında İKİ-MKH ile birlikte ortak kültür sonrası 1,4 ve 7. günlerde Annexin V-PI analizi (a-c) 1.gün (a) 4.gün (b) 7.gün (c)



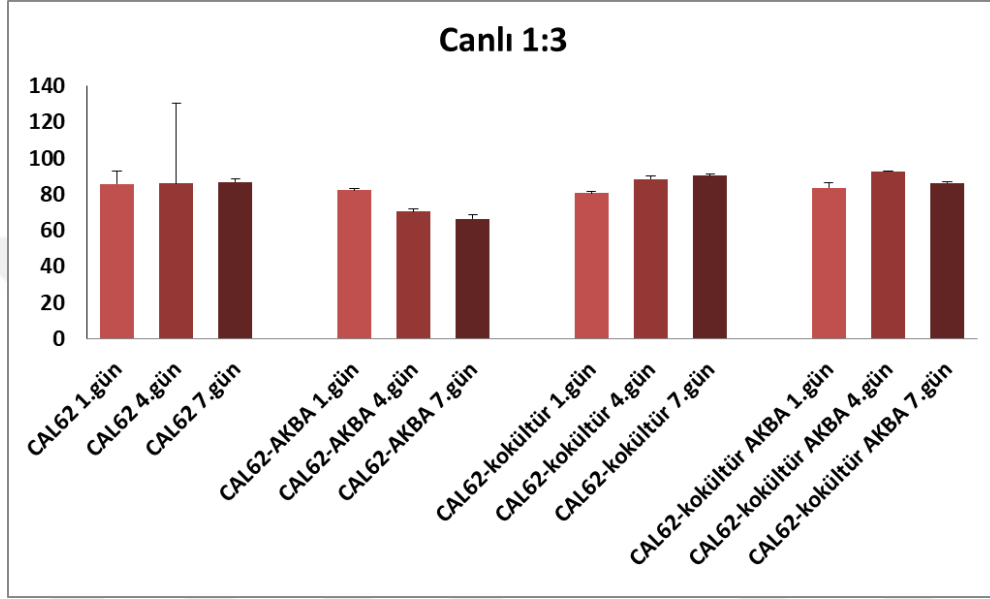
**Çizim4.31** CAL62 1:3 oranında 80 µl AKBA+ İKİ-MKH ile birlikte ortak kültür sonrası 1,4 ve 7. günlerde Annexin V-PI analizi (a-c) 1.gün (a) 4.gün (b) 7.gün (c)



**Çizim4.32** Ortak kültür sonrası CAL62 hücrelerin 80µl AKBA konsantrasyonunda 1,4 ve 7. Günlerde 1:3 oranında ko kültür testinin ölüm grafiği.

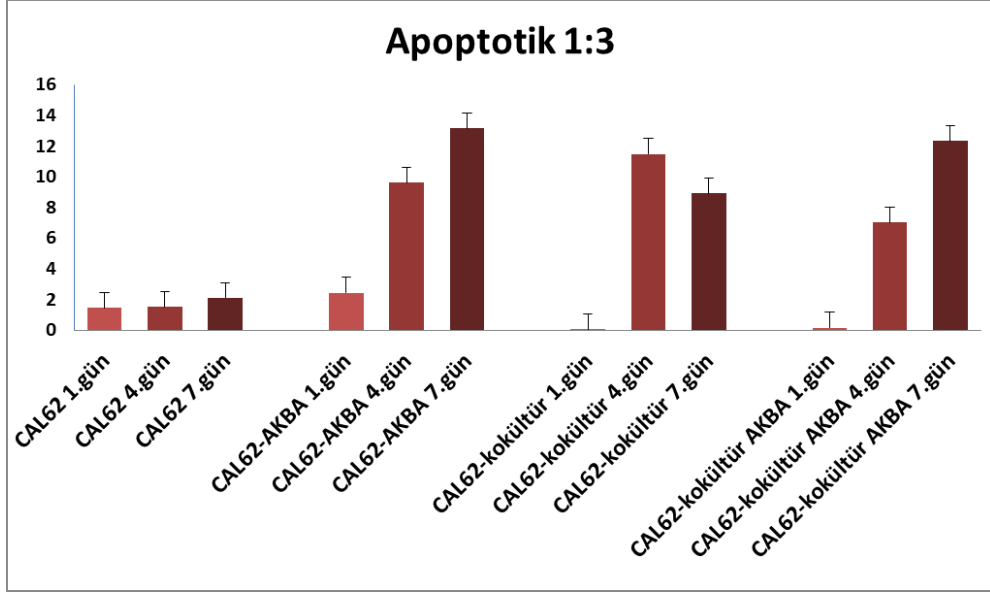


1:3 oranında ortak kültür sonrasında yapılan Annexin PI testi sonucunda CAL62 hücrelerinin 80µl AKBA'lı olan kültürde ölüm oranının diğer gruplara oranla daha fazla olduğu saptandı. CAL62+AKBA grubunda 7 gündeki ölüm oranının 1 ve 4 güne oranla arttığı gözlemlendi. Cal62 ko kültürün ve CAL62 kokültür +AKBA grubunda ki 4ve 7. gündeki ölüm oranınında CAL62 +AKBA gurubuna oranla anlamlı fark görüldü.



**Çizim4.33** Ortak kültür sonrası CAL62 hücrelerin 80µl AKBA konsantrasyonunda 1,4 ve 7. Günlerde 1:3 oranında ko kültür testitinin canlılık grafiği.

1:3 oranında ortak kültür sonrasında yapılan Annexin PI testi sonucunda CAL62 hücrelerinin 80µl AKBA'lı olan kültürde canlılık oranının diğer gruplara oranla daha az olduğu saptandı. CAL62+AKBA grubundaki canlılık oranının 1 güne oranla 4 ve 7. Günlerde azaldığı gözlemlendi.

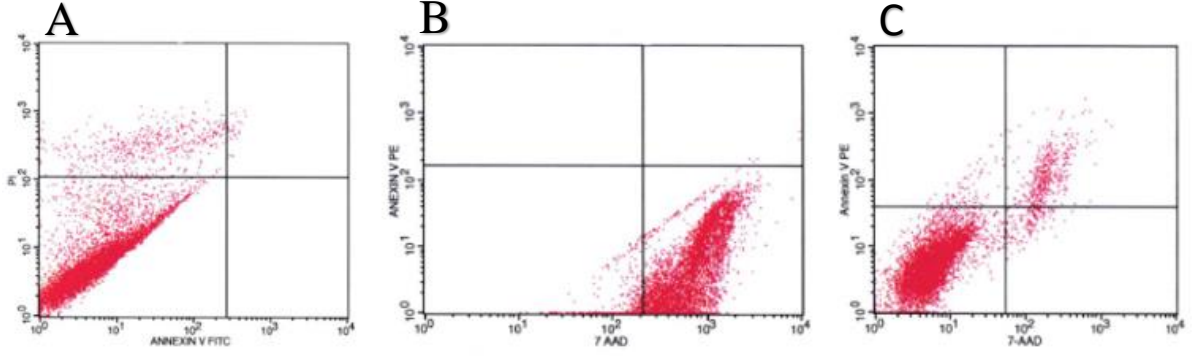


**Çizim4.34** Ortak kültür sonrası CAL62 hücrelerin 80µl AKBA konsantrasyonunda 1,4 ve 7. Günlerde 1:3 oranında ko kültür testinin apoptoz grafiği.

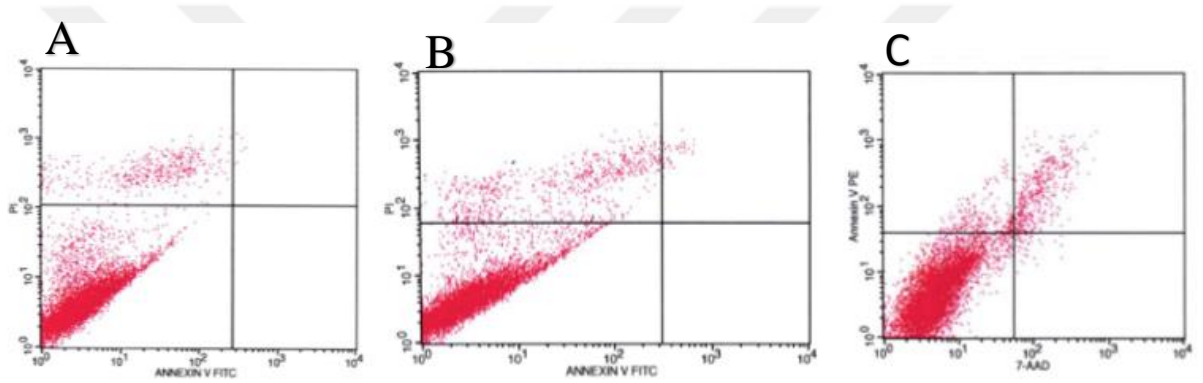
1:3 oranında ortak kültür sonrasında yapılan Annexin PI testi sonucunda CAL62 hücrelerinin 80µl AKBA'lı olan kültürde apoptoz oranının cal62 ve cal62 ko kültür gruplarına oranla daha fazla olduğu görüldü. CAL62 + AKBA lı grupta 1,4 ve 7 günlerde apoptoz oranında artış izlendi. Cal 62 ko kültür AKBA grubunda CAL62 +AKBA grubuna benzer apoptotik oranında artış izlendi.

1:3 oranında ko kültür sonrasındaki yapılan Annexin PI testi sonucunda CAL62 hücrelerinde AKBA'lı grubta diğer gruplara oranla hücrelerin apoptozunu arttırdığı saptanmış canlılık oranında düşüş gözlemlenmiştir.

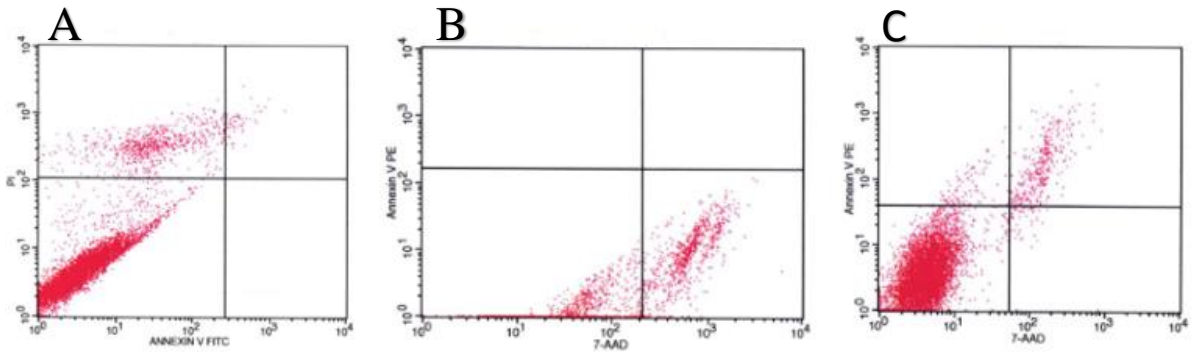
#### 4.7.1.4 Ortak Kültür Sonrası 1:3 Oranında İKİ-MKH Hücrelerinin Annexin V-PI Kapasite Tayini



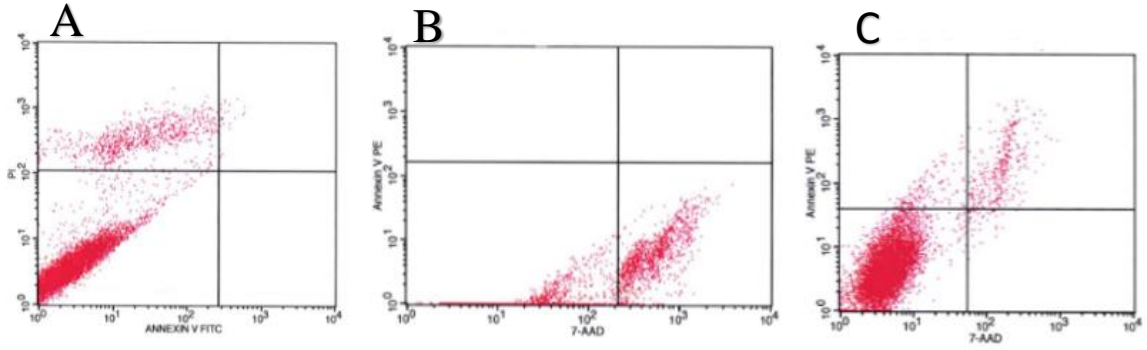
**Çizim4.35** İKİ-MKH 1:3 oranında kontrol grubu Annexin V-PI analizi (a-c) 1.gün (a) 4.gün (b) 7.gün (c)



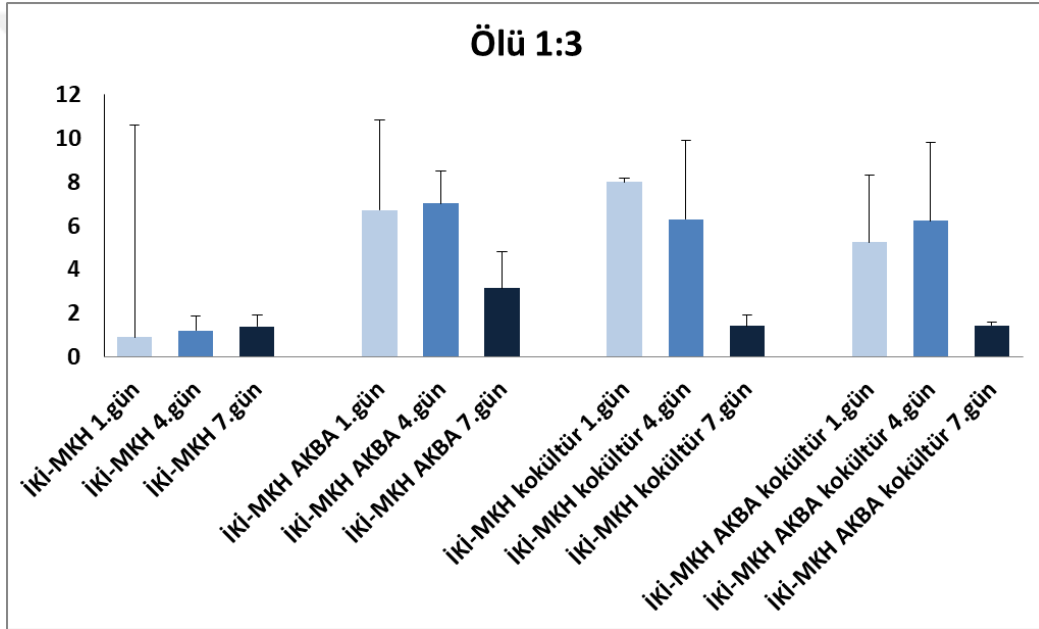
**Çizim4.36** İKİ-MKH 1:3 oranında 80 µl AKBA ile ortak kültür sonrası 1,4 ve 7. günlerde Annexin V-PI analizi (a-c) 1.gün (a) 4.gün (b) 7.gün (c)



**Çizim4.37** İKİ-MKH 1:3 oranında CAL62 ile birlikte ortak kültür sonrası 1,4 ve 7. günlerde Annexin V-PI analizi (a-c) 1.gün (a) 4.gün (b) 7.gün (c)

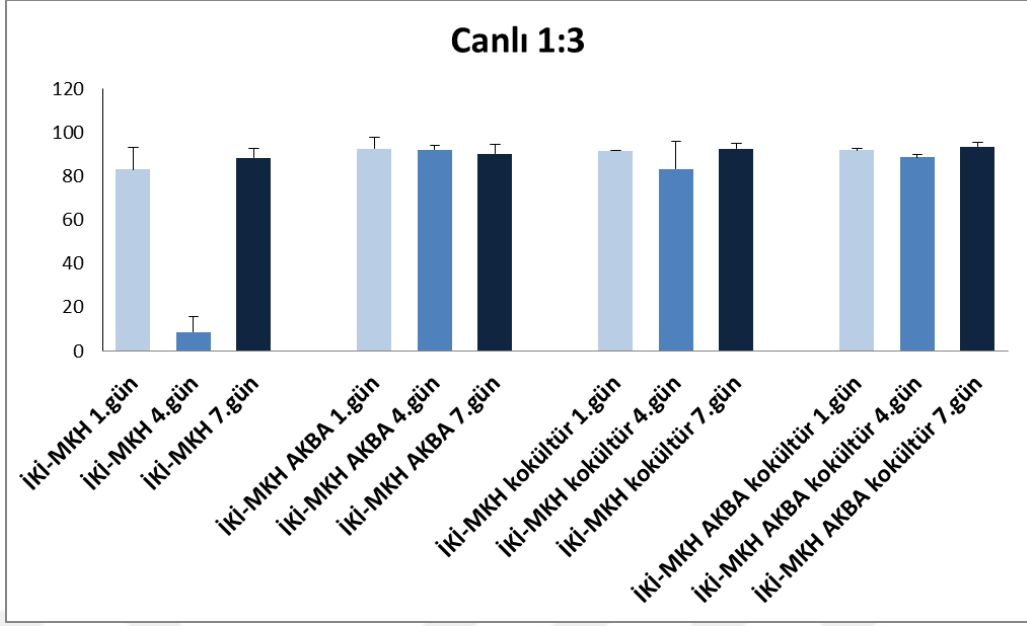


**Çizim4.38** İKİ-MKH 1:3 oranında 80 µl AKBA+ CAL 62 ile birlikte ortak kültür sonrası 1,4 ve 7. günlerde Annexin v-PI analizi (a-c) 1.gün (a) 4.gün (b) 7.gün (c)



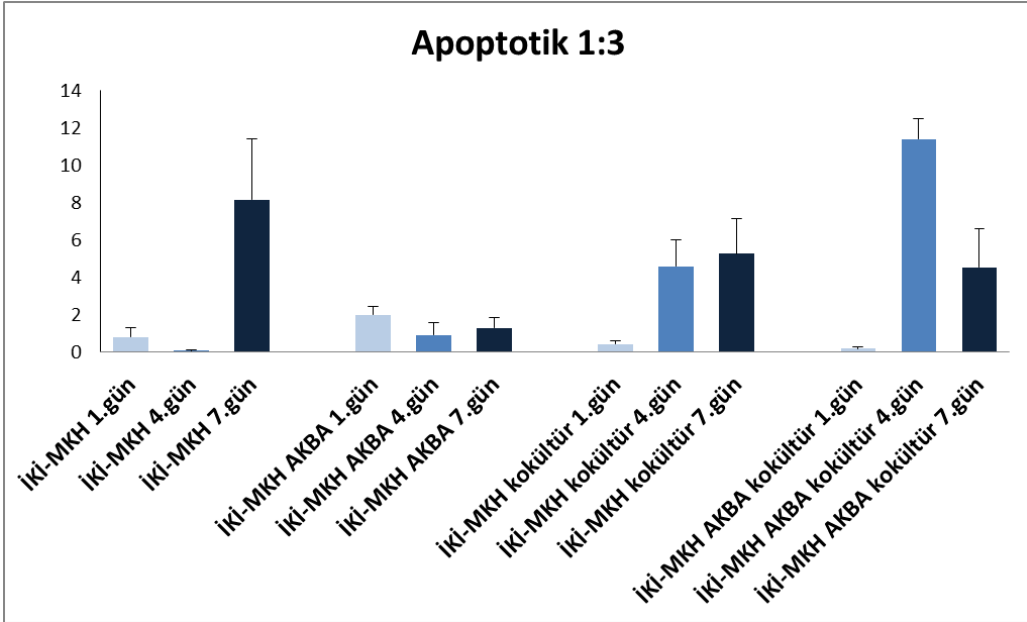
**Çizim4.39** Ortak kültür sonrası İKİ-MKH hücrelerin 80µl AKBA konsantrasyonunda 1,4 ve 7. Günlerde 1:3 oranında ko kültür testinin ölüm grafiği.

1:3 oranında ortak kültür sonrasında yapılan Annexin PI testi sonucunda İKİ-MKH hücrelerinin 80µl AKBA konsantrasyonundaki 1. Gündeki ölüm oranının İKİ-MKH ko kültür grubuna oranla daha düşük olduğu izlenmiş, İKİ-MKH AKBA grubuna oranlarda daha yüksek olduğu görülmüştür.



**Çizim4.40** Ortak kültür sonrası İKİ-MKH hücrelerin 80µl AKBA konsantrasyonunda 1,4 ve 7. Günlerde 1:3 oranında ko kültür testinin canlılık grafiği.

1:3 oranında ortak kültür sonrasında yapılan Annexin PI testi sonucunda İKİ-MKH hücrelerinin 80µl AKBA konsantrasyonundaki canlılık oranı diğer gruplara yakın olduğu gözlemlendi.



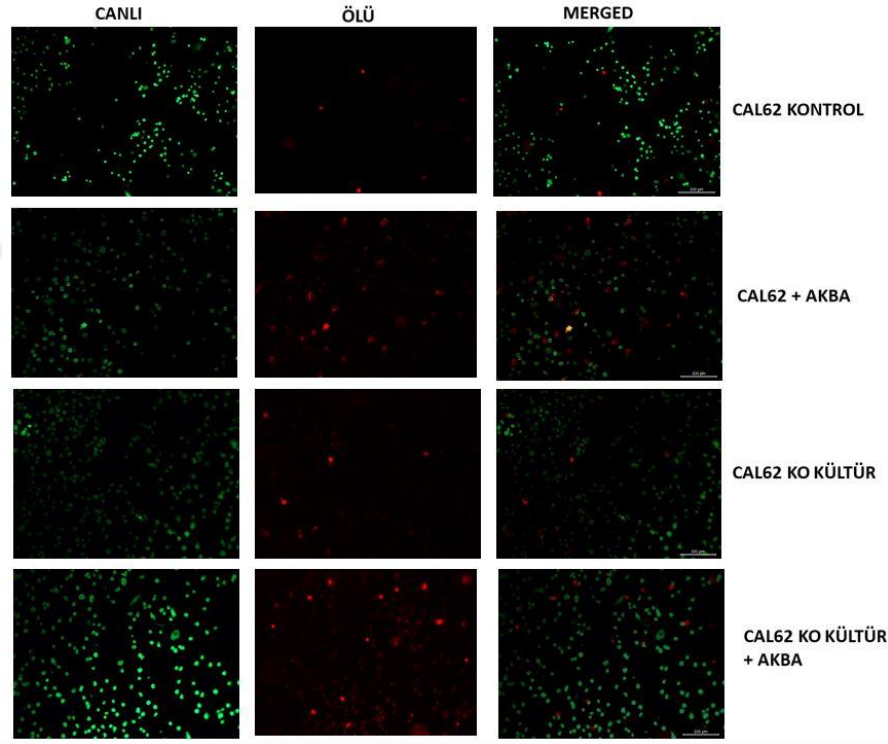
**Çizim4.41** Ortak kültür sonrası İKİ-MKH hücrelerin 80µl AKBA konsantrasyonunda 1,4 ve 7. Günlerde 1:3 oranında ko kültür testinin apoptoz grafiği.

1:3 oranında ortak kültür sonrasında yapılan Annexin PI testi sonucunda İKİ-MKH hücrelerinin 80µl AKBA konsantrasyonundaki apoptoz oranının İKİ-MKH ko kültür ve İKİ-MKH + AKBA kokültür gruplarında oranla daha az olduğu gözlemlendi.

#### 4.7.2 Ortak Kültür Sonrası Hücre Canlılığı Tayini

Ortak kültüre alınan İKİ-MKH VE CAL62 hücrelerinin 1, 4 ve 7. günün sonunda 1:1 ve 1:3 oranında LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kiti (ThermoFisher Scientific) kullanılarak boyaması yapıldı. Hücrelerin floresan mikroskopta canlılık ve ölüm oranlarını saptandı.

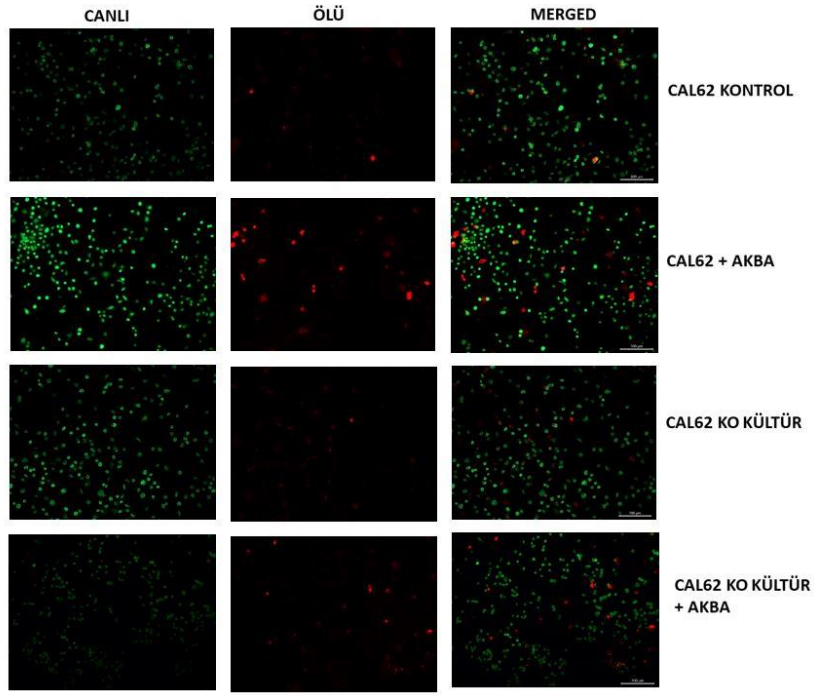
##### 4.7.2.1 Ortak Kültür Sonrası 1:1 Oranında CAL62 Hücrelerinin Canlılığının Tayini



**Çizim4.42** CAL62 hücrelerinin 1:1 ko kültür oranında 1.gün calcein ve EtBr boyaması ile floresan mikroskopta canlılıklarının tayini

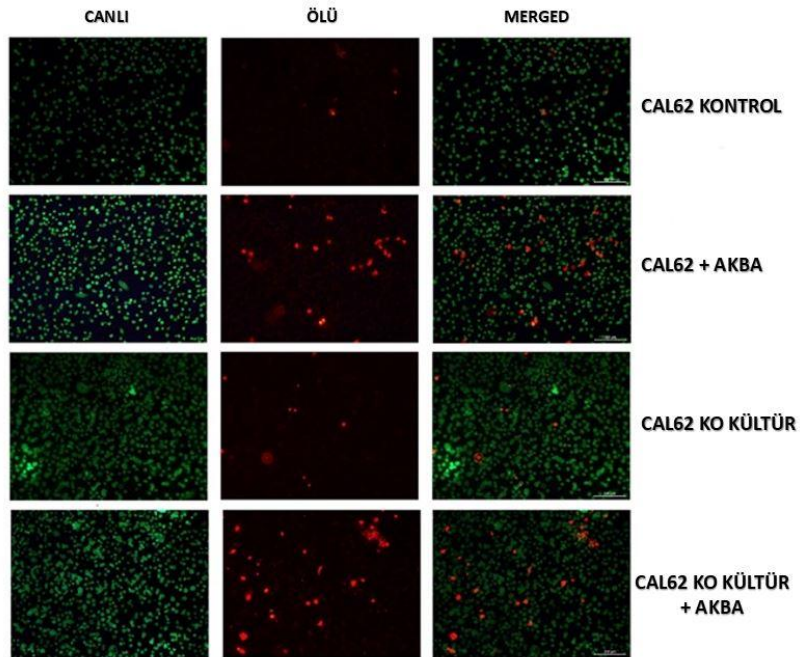
1:1 ortak kültür sonrasında 1. Günde CAL62 + AKBA lı kültürlerde CAL62 ve CAL62 ko kültür grubuna göre ölü hücre sayısı arttığı calcein ve EtBr boyasıyla izlenmiştir. CAL62 ko kültür +AKBA grubundada CAL62 + AKBA grubuna benzer bir şekilde ölü hücre sayısında artış olmuştur.





**Çizim4.43** CAL62 hücrelerinin 1:1 ko kültür oranında 4.gün calcein ve EtBr boyaması ile floresan mikroskopta canlılıklarının tayini

1:1 ortak kültür sonrasında 4. günde 1. Güne oranla CAL62 + AKBA lı kültürlerde CAL62 ve CAL62 ko kültür grubuna göre ölü hücre sayısı arttığı calcein ve EtBr boyasıyla izlenmiştir. CAL62 ko kültür +AKBA grubundada CAL62 + AKBA grubuna benzer bir şekilde ölü hücre sayısında artış olmuştur.

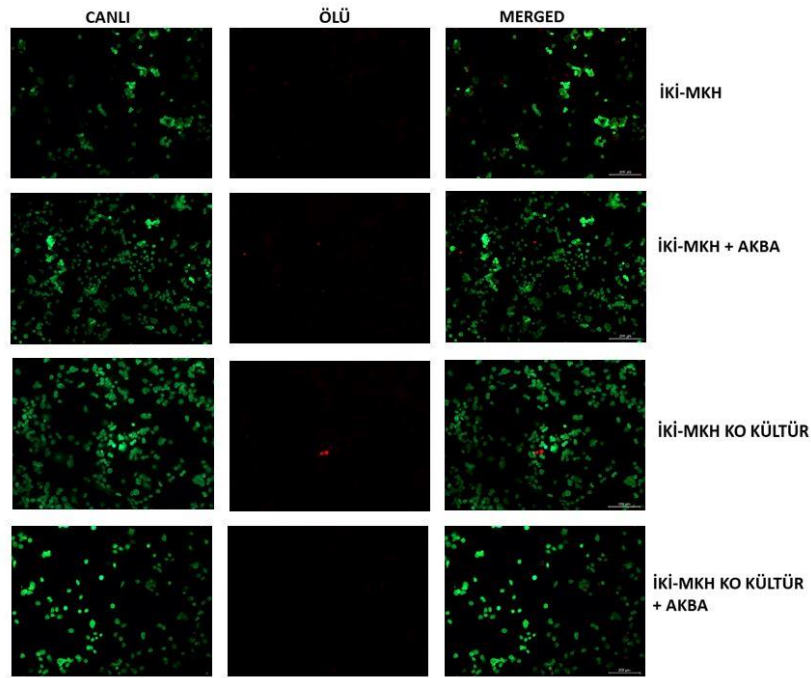


**Çizim4.44** CAL62 hücrelerinin 1:1 ko kültür oranında 7.gün calcein ve EtBr boyaması ile floresan mikroskopta canlılıklarının tayini

1:1 ortak kültür sonrasında 7. günde 4. Güne oranla CAL62 + AKBA lı kültürlerde CAL62 ve CAL62 ko kültür grubuna göre ölü hücre sayısı arttığı calcein ve EtBr boyasıyla izlenmiştir. CAL62 ko kültür +AKBA grubundada CAL62 + AKBA grubuna benzer bir şekilde ölü hücre sayısında artış olmuştur.

1:1 oranında kurulan ko kültür sonrasında yapılan hücre canlılık testinde 1,4 ve 7 günlerde CAL62 +AKBA 'lı hücre gruplarında ölü hücre sayısı diğer gruplara oranla daha fazla olduğu floresan mikroskobunda izlenmiştir.

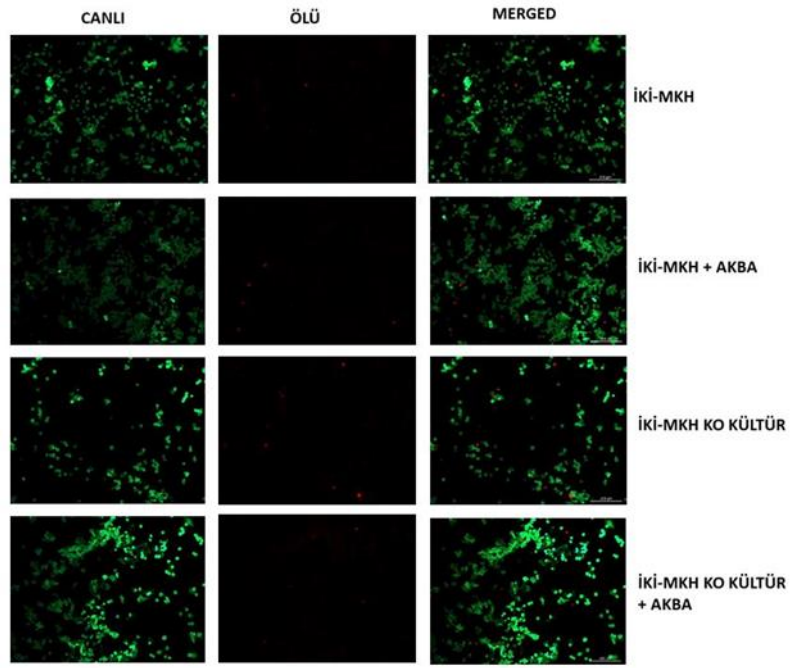
#### 4.7.2.2 Ortak Kültür Sonrası 1:1 Oranında İKİ-MKH Hücrelerinin Canlılığının Tayini



**Çizim4.45** İKİ-MKH hücrelerinin 1:1 ko-kültür oranında 1.gün calcein ve EtBr boyaması ile floresan mikroskopta canlılıklarının tayini

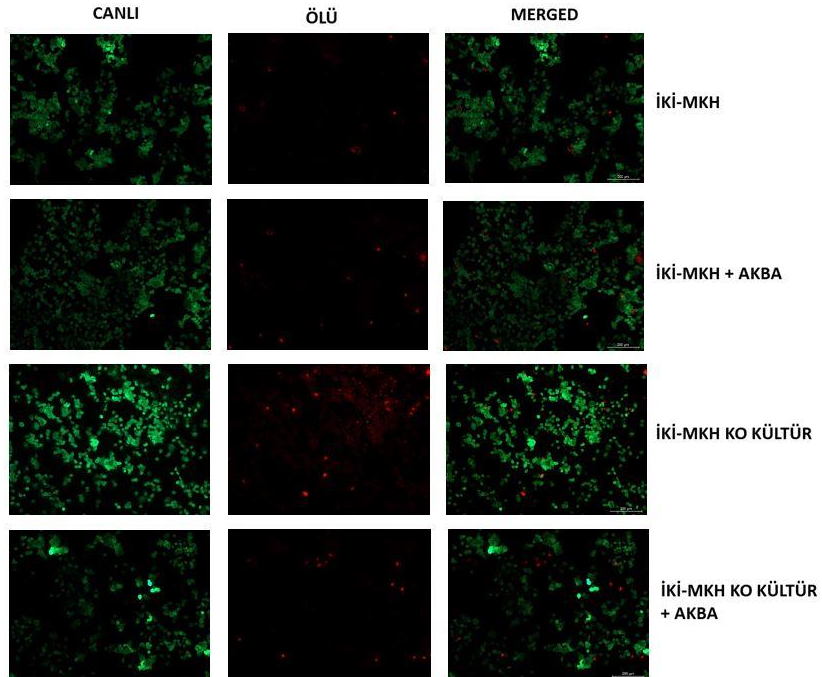
1:1 ortak kültür sonrasında İKİ-MKH hücrelerinin 1.günde canlılık oranlarının her grupta benzer olduğu izlendi.





**Çizim4.46** İKİ-MKH hücrelerinin 1:1 ko-kültür oranında 4.gün calcein ve EtBr boyaması ile floresan mikroskopta canlılıklarının tayini

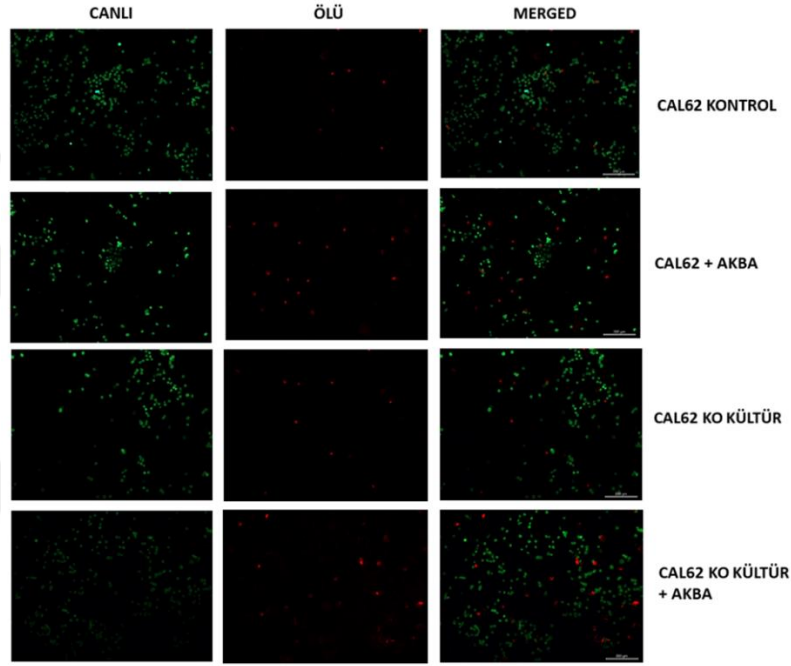
1:1 ortak kültür sonrasında İKİ-MKH hücrelerinin 1. Güne oranla 4.günde ölü hücre sayısı İKİ-MKH ko kültür ve İKİ-MKH +AKBA ko kültür gruplarında daha fazla olduğu izlenmiştir.



**Çizim4.47** İKİ-MKH hücrelerinin 1:1 ko-kültür oranında 7.gün calcein ve EtBr boyaması ile floresan mikroskopta canlılıklarının tayini

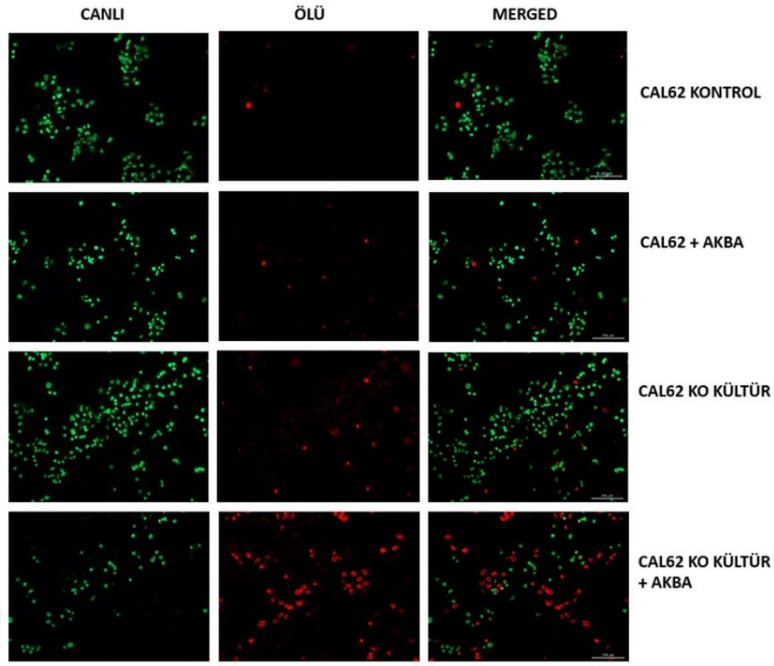
1:1 ortak kültür sonrasında İKİ-MKH hücrelerinin 4. Güne oranla 7.günde ölü hücre sayısı İKİ-MKH ko kültür ve İKİ-MKH +AKBA ko kültür gruplarında daha fazla olduğu izlenmiştir.

#### 4.7.2.3 Ortak Kültür Sonrası 1:3 Oranında CAL62 Hücrelerinin Canlılığının Tayini



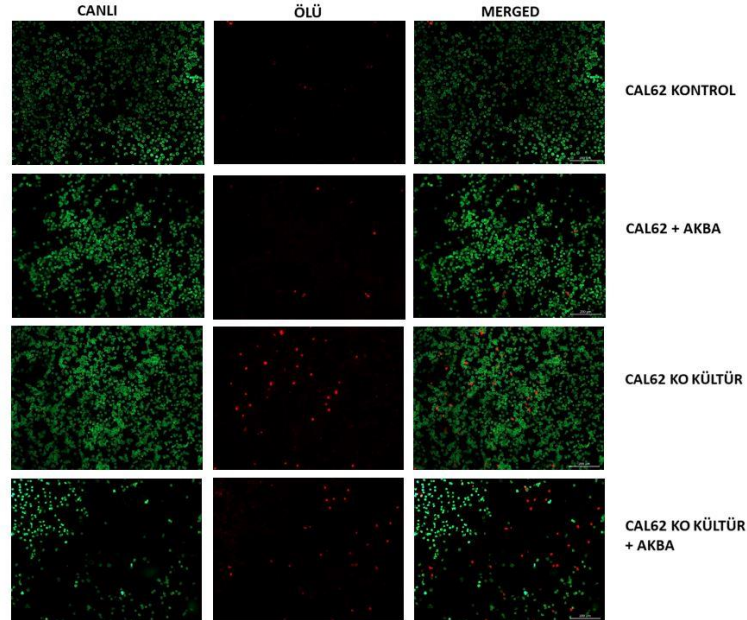
**Çizim4.48** CAL62 hücrelerinin 1:3 ko kültür oranında 1.gün calcein ve EtBr boyaması ile floresan mikroskopta canlılıklarının tayini

1:3 ortak kültür sonrasında 1. Günde CAL62 + AKBA lı kültürlerde CAL62 ve CAL62 ko kültür grubuna göre ölü hücre sayısı arttığı calcein ve EtBr boyasıyla izlenmiştir. CAL62 ko kültür +AKBA grubundada CAL62 + AKBA grubuna benzer bir şekilde ölü hücre sayısında artış olmuştur.



**Çizim4.49** CAL62 hücrelerinin 1:3 ko kültür oranında 4.gün calcein ve EtBr boyaması ile floresan mikroskofta canlılıklarının tayini

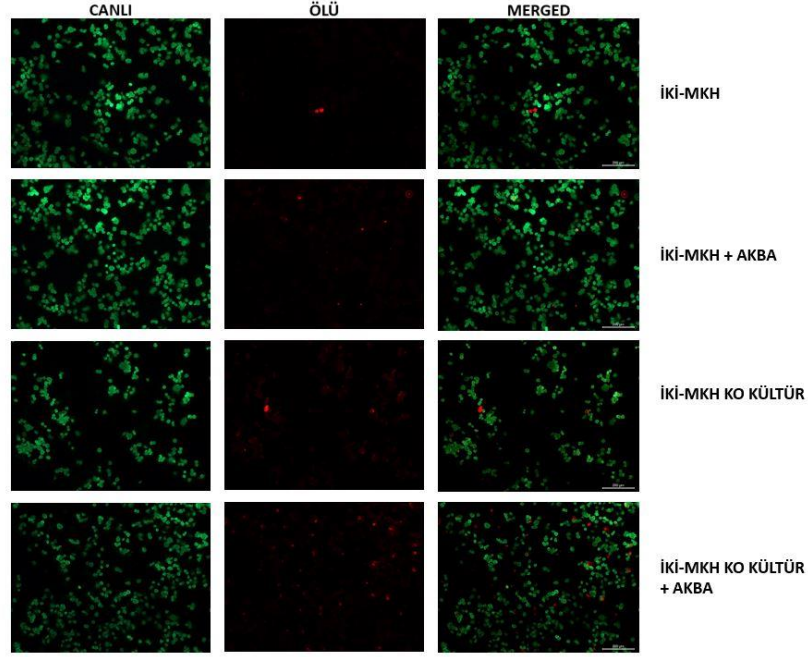
1:3 ortak kültür sonrasında 4. günde CAL62 + AKBA ko kültür grubunda ölü hücre sayısında diğer gruplara oranda daha fazla artış görülmüştür.



**Çizim4.50** CAL62 hücrelerinin 1:3 ko kültür oranında 7.gün calcein ve EtBr boyaması ile floresan mikroskofta canlılıklarının tayini

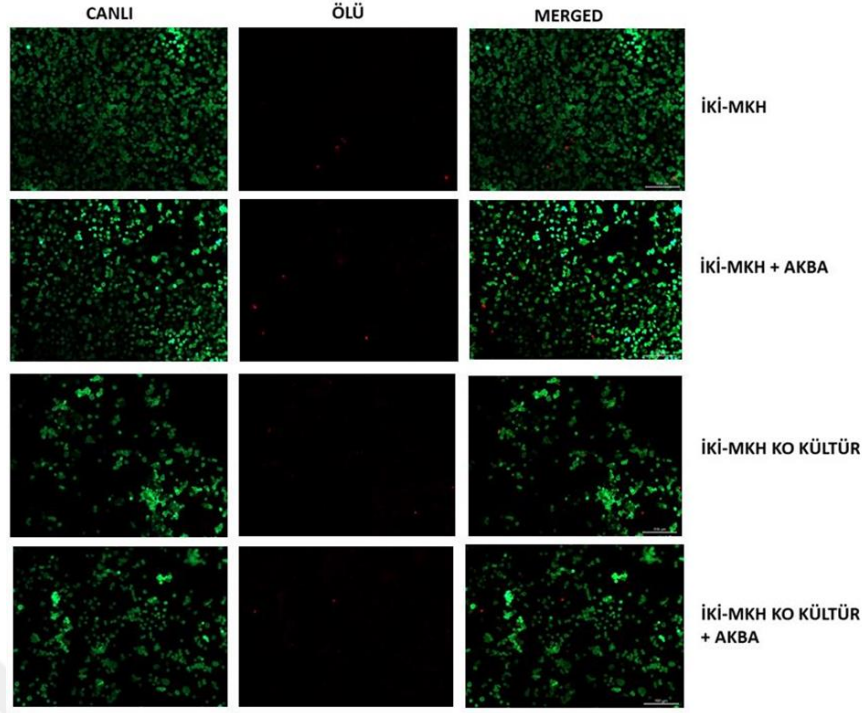
1:3 ortak kültür sonrasında 7. günde CAL62 + AKBA ko kültür grubunda ölü hücre sayısında diğer gruplara oranda daha fazla artış görülmüştür.

#### 4.7.2.2 Ortak Kültür Sonrası 1:3 Oranında İKİ-MKH Hücrelerinin Canlılığının Tayini



**Çizim4.51** İKİ-MKH hücrelerinin 1:3 ko-kültür oranında 1.gün calcein ve EtBr boyaması ile floresan mikroskopta canlılıklarının tayini

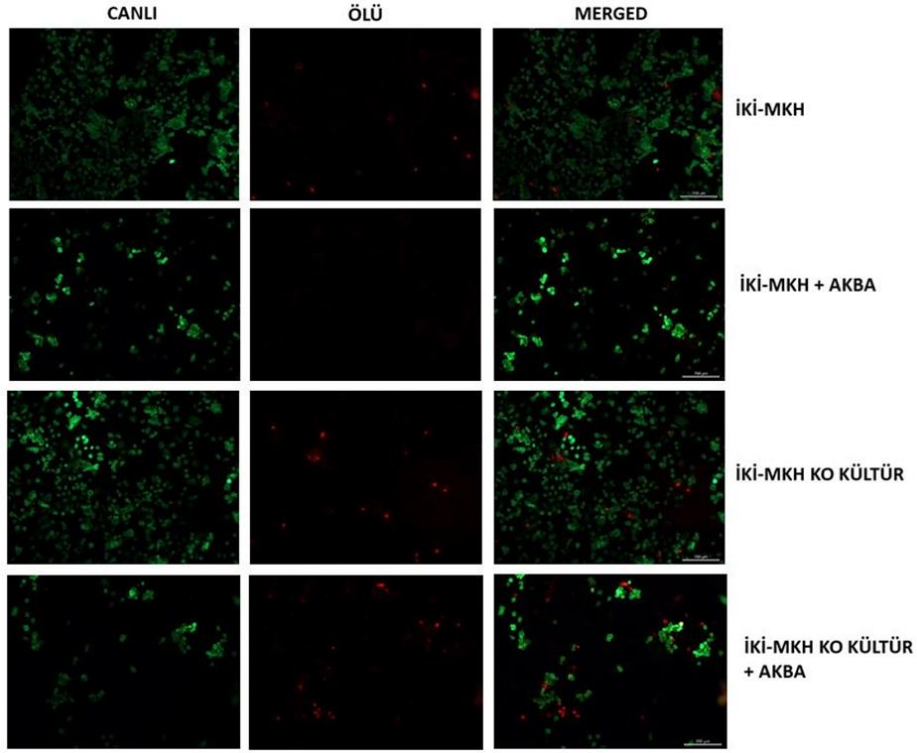
1:3 ortak kültür sonrasında İKİ-MKH hücrelerinin 1.günde canlılık oranları İKİ-MKH , İKİ-MKH+AKBA ve İKİ-MKH ko kültür grubunda benzer olduğu İKİ-MKH ko kültür AKBA grubunda ise ölü hücre sayısının diğer gruplara oranla daha fazla olduğu izlenmiştir.



**Çizim4.52** İKİ-MKH hücrelerinin 1:3 ko-kültür oranında 4.gün calcein ve EtBr boyaması ile floresan mikroskopta canlılıklarının tayini

1:3 ortak kültür sonrasında İKİ-MKH hücrelerinin 1. Güne oranla 4.günde ölü hücre sayısı İKİ-MKH ko kültür ve İKİ-MKH +AKBA ko kültür gruplarında benzer sonuçlar izlenmiştir.





**Çizim4.53** İKİ-MKH hücrelerinin 1:3 ko-kültür oranında 7.gün calcein ve EtBr boyaması ile floresan mikroskopta canlılıklarının tayini

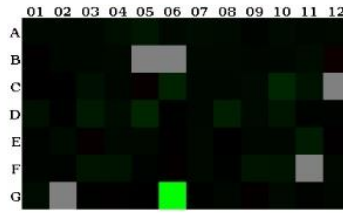
1:3 ortak kültür sonrasında İKİ-MKH hücrelerinin 4. Güne oranla 7.günde ölü hücre sayısı İKİ-MKH ko kültür ve İKİ-MKH +AKBA ko kültür gruplarında daha fazla olduğu izlenmiştir.

1:1 ve 1:3 ko kültür sonrasında yapılan hücre canlılık testinde AKBA'nın İKİ-MKH'lerinin canlılığını etkilemediği gözlemlenerek İKİ-MKH ko kültür ve İKİ-MKH +AKBA gruplarında ölü hücre sayısının daha fazla olduğu izlenmiştir.

#### 4.7.3 Ortak Kültür Sonrası Gen Ekspresyonlarındaki Değişimlerin Belirlenmesi – Real Time PCR

Ortak kültürler sonrası “Cancer PathwayFinder PCR Array (SABioscience)” paneli kullanılarak kanser hücrelerine yönelik (CAL62) 1,4 ve 7.gündeki gen ekspresyonlarındaki değişimler saptandı. Kırmızı renk yoğunluğu ilgili genin ifadesinin arttığı anlamına gelirken yeşil rengin yoğunluğu ise gen ifadesinin azaldığını işaret etmektedir. Gen ekspresyonu analizi sonucunda C yazanların ekspresyonları 35 üstü olmakta ve analize katılmayacaktır.

Treated Group	Control Group
Group I	Control Group

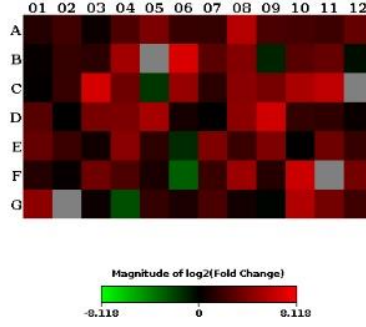


Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ACLY -1.59	ACSL4 -1.65	ADM -1.73	ANGPT1 -2.95	ANGPT2 -6.03	APAF1 -1.99	ARNT -2.59	ATP5A1 -2.47	AURKA -1.42	BCL2L11 -2.19	BIRC3 -1.55	BMI1 -1.88
B	CA9 1.26	CASP2 -1.56	CASP7 -1.63	CASP9 -2.09	CCL2 -23.46	CCND2 -23.46	CCND3 -2.03	CDC20 -1.78	CDH2 -1.52	CFLAR -1.64	COX5A -2.85	CPT2 2.69
C	DDB2 -1.04	DDIT3 1.05	DKC1 -3.71	DSP -1.60	E2F4 1.80	EPO -17.65	ERCC3 -1.71	ERCC5 -1.71	ETS2 -2.24	FASLG -21.29	FGF2 -4.41	FLT1 -23.46
D	FOXC2 -4.01	G6PD -1.14	GADD45 -9.01	GPD2 -2.87	GSC -22.50	HMOX1 -1.16	IGFBP3 -1.60	IGFBP5 -11.98	IGFBP7 -2.19	KDR -4.93	KRT14 -1.36	LDHA -1.35
E	LIG4 -1.40	LPL -2.43	MAP2K1 1.60	MAP2K3 -1.92	MAPK14 -1.81	MCM2 1.13	MKI67 -2.07	NOL3 -1.02	OCLN -1.98	PFKL -1.62	PGF -10.72	PINK1 1.20
F	POLB -1.31	PPP1R15A -1.46	SERPINB2 -5.21	SERPINF1 -4.09	SKP2 -1.43	SLC2A1 1.32	SNAI1 -2.06	SNAI2 -1.25	SNAI3 -5.00	SOD1 -4.12	SOX10 -23.46	STMN1 -1.81
G	TBX2 -2.57	TEK -23.46	TEP1 -1.20	TERF1 1.12	TERF2IP -1.02	TINF2 -1243707	TNKS -1.10	TNKS2 -1.72	UQCRRF51 1.31	VEGFC -2.47	VEE1 -1.46	XIAP -1.55

**Çizim 4.54** CAL62 + AKBA 1.gündeki gen ekspresyonlarındaki değişimlerinin real time PCR ile belirlenmesi

ACLY, ACSL, ADM, ANGPT1, ANGPT2, APAF1, ARNT, ATP5A1, AURKA, BCL2L11, BIRC3, BMI1, CASP2, CASP7, CASP9, CCL2, CCND2, CCND3, CDC20, CDH2, CFLAR, COX5A, DDB2, DKC1, DSP, EPO, ERCC3, ERCC5, ETS2, FASLG, FGF2, FLT1, FOXC2, G6PD, GADD45G, GPD2, GSC, HMOX1, IGFBP3, IGFBP5, IGFBP7, KDR, KRT14, LDHA, LIG4, LPL, MAP2K3, MAPK14, MKI67, NOL3, OCLN, PFKL, PGF, POLB, PPP1R15A, SERPINB2, SERPINF1, SKP2, SNAI1, SNAI2, SNAI3, SOD1, SOX10, STMN1, TBX2, TEK, TEP1, TERF2IP, TINF2, TNKS, TNKS2, VEGFC, VEE1, XIAP, genlerinin ekspresyonu azalırken;CA9, CPT2, DDIT3, E2F4, MAP2K1, MCM2, PINK1, SLC2A1, TERF1, UQCRRF51 genlerinde ekspresyonu artmıştır.

Treated Group	Control Group
Group 1	Control Group



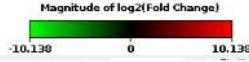
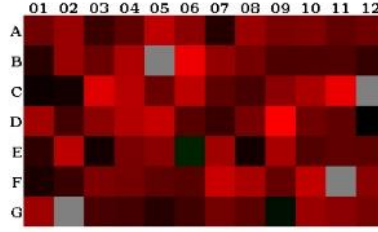
Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ACLY 2.17 A	ACSL4 4.08 A	ADM 1.33 A	ANGPT1 5.27 A	ANGPT2 15.22 A	APAF1 3.27 A	ARNT 3.18 A	ATP5A1 55.25 A	AURKA 5.02 A	BCL2L11 4.53 A	BIRC3 3.70 A	BMI1 8.93 A
B	CA9 1.19 A	CASP2 3.11 A	CASP7 2.60 A	CASP9 35.95 A	CCL2 277.82 C	CCND2 124.33 C	CCND3 7.30 C	CDC20 18.74 A	CDH2 -2.22 A	CFLAR 7.10 A	COX5A 9.30 A	CPT2 -1.36 A
C	DDB2 1.11 A	DDIT3 3.34 A	DKC1 112.05 A	DSP 11.14 A	E2F4 -3.34 A	EPO 27.63 A	ERCC3 2.53 A	ERCC5 21.08 A	ETS2 13.81 A	FASLG 42.46 A	FGF2 69.45 A	FLT1 277.82 C
D	FOXC2 6.53 A	G6PD 1.06 A	GADD45 14.80 G	GPD2 15.12 A	GSC 40.45 A	HMOX1 1.64 A	IGFBP3 1.06 A	IGFBP5 23.23 A	IGFBP7 102.39 A	KDR 3.13 A	KRT14 2.71 A	LDHA 1.24 A
E	LIG4 9.37 A	LPL 3.53 A	MAP2K1 1.47 A	MAP2K3 20.94 A	MAPK14 2.75 A	MCM2 -2.55 A	MKI67 17.12 A	NOL3 3.65 A	OCLN 16.09 A	PFKL 1.06 A	PGF 11.46 A	PINX1 3.22 A
F	POLB 2.17 A	PPP1R15A 1.18 A	SERPINB2 11.94 A	SERPINF1 5.46 A	SKP2 1.78 A	SLC2A1 -8.41 A	SNAI1 3.63 A	SNAI2 32.40 A	SNAI3 2.26 A	SOD1 88.52 A	SOX10 277.82 C	STMN1 13.25 C
G	TBX2 22.60 A	TEK 277.82 C	TEP1 1.28 A	TERF1 -5.47 A	TERF2IP 3.16 A	TINF2 1.74 A	TNKS 5.13 A	TNKS2 1.58 A	UQCRRF51 -1.09 A	VEGFC 50.49 A	VEE1 12.80 A	XIAP 3.86 A

**Çizim 4.55** CAL62 +AKBA 4.gündeki gen ekspresyonlarındaki değişimlerinin real time PCR ile belirlenmesi

CDH2, CPT2, E2F4, MCM2, SLC2A1, TERF1, UQCRRF51 genlerinin 4. Günde ekspresyonu azalırken ; ACLY, ACSL, ADM, ANGPT1, ANGPT2, APAF1, ARNT, ATP5A1, AURKA, BCL2L11, BIRC3, BMI1, CA9, CASP2, CASP7, CASP9, CCL2, CCND2, CCND3, CDC20, CFLAR, COX5A, DDB2, DDIT3, DKC1, DSP, EPO, ERCC3, ERCC5, ETS2, FASLG, FGF2, FLT1, FOXC2, G6PD, GADD45G, GPD2, GSC, HMOX1, IGFBP3, IGFBP5, IGFBP7, KDR, KRT14, LDHA, LIG4, LPL, MAP2K1, MAP2K3, MAPK14, MKI67, NOL3, OCLN, PFKL, PGF, PINX1, POLB, PPP1R15A, SERPINB2, SERPINF1, SKP2, SNAI1, SNAI2, SNAI3, SOD1, SOX10, STMN1, TBX2, TEK, TP1, TERF2IP, TINF2, TNKS, TNKS2, VEGFC, VEE1, XIAP genlerinde ekspresyonu artmıştır.



Treated Group	Control Group
Group 1	Control Group

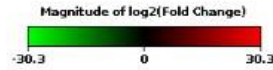
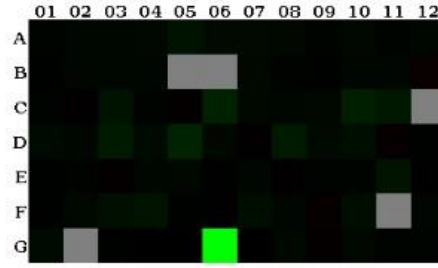


Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ACLY 21.68 A	ACSL4 66.63 A	ADM 5.20 A	ANGPT1 13.72 A	ANGPT2 196.45 A	APAF1 47.11 A	ARNT 2.67 A	ATP5A1 74.96 A	AURKA 28.80 A	BCL2L11 33.54 A	BIRC3 14.50 A	BMI1 21.98 A
B	CA9 3.01 A	CASP2 68.97 A	CASP7 19.40 A	CASP9 126.94 A	CCL2 902.64 C	CCND2 728.10 A	CCND3 57.60 A	CDC20 25.60 A	CDH2 8.44 A	CFLAR 8.62 A	COX5A 8.99 A	CPT2 4.43 A
C	DDB2 1.40 A	DDIT3 1.69 A	DKC1 487.07 A	DSP 162.92 A	E2F4 19.40 A	EPO 184.57 A	ERCC3 13.25 A	ERCC5 7.35 A	ETS2 48.10 A	FASLG 113.61 A	FGF2 708.19 C	FLT1 902.64 C
D	FOXC2 92.93 A	G6PD 6.36 A	GADD45 50.84 A	GPD2 145.82 A	GSC 245.23 A	HMOX1 11.30 A	IGFBP3 4.82 A	IGFBP5 28.01 A	IGFBP7 1126.79 A	KDR 23.56 A	KRT14 14.20 A	LDHA -1.04 A
E	LIG4 3.63 A	LPL 175.83 A	MAP2K1 1.75 A	MAP2K3 26.69 A	MAPK14 45.19 A	MCM2 -2.52 A	MKI67 86.10 A	NOL3 1.69 A	OCLN 105.27 A	PFKL A A	PGF 14.40 A	PINX1 13.44 A
F	POLB 2.13 A	PPP1R15A 5.06 A	SERPINB2 31.96 A	SERPINF1 25.78 A	SKP2 14.30 A	SLC2A1 10.54 A	SNAI1 261.02 A	SNAI2 112.05 A	SNAI3 15.43 A	SOD1 224.10 C	SOX10 902.64 C	STMN1 48.44 A
G	TBX2 78.68 A	TEK 902.64 C	TEP1 7.10 A	TERF1 6.63 A	TERF2IP 2.92 A	TINF2 5.89 A	TNKS 23.88 A	TNKS2 12.71 A	UQCRRFS1 -1.57 A	VEGFC 72.91 A	VEE1 47.11 A	XIAP 26.69 A

**Çizim 4.56** CAL62 +AKBA 7.gündeki gen ekspresyonlarındaki değişimlerinin real time PCR ile belirlenmesi

LDHA, MCM2, UQCRRFS1 genlerinin 7. Günde ekspresyon azalırken; ACLY, ACSL, ADM, ANGPT1, ANGPT2, APAF1, ARNT, ATP5A1, AURKA, BCL2L11 BIRC3, BMI1, CA9, CASP2, CASP7, CASP9, CCL2, CCND2, CCND3, CDC20, CDH2, CFLAR, COX5A, CPT2, DDB2, DDIT3, DKC1, DSP, E2F4, EPO, ERCC3, ERCC5, ETS2, FASLG, FGF2, FLT1, FOXC2, G6PD, GADD45G, GPD2, GSC, HMOX1, IGFBP3, IGFBP5, IGFBP7, KDR, KRT14, LIG4, LPL, MAP2K1, MAP2K3, MAPK14, MKI67, NOL3, OCLN, PFKL, PGF, PINX1, POLB, PPP1R15A, SERPINB2, SERPINF1, SKP2, SLC2A1, SNAI1, SNAI2, SNAI3, SOD1, SOX10, STMN1, TBX2, TEK, TP1, TERF1, TERF2IP, TINF2, TNKS, TNKS2, VEGFC, VEE1, XIAP genlerinde ekspresyonu artmıştır.

Treated Group	Control Group
Group 2	Control Group

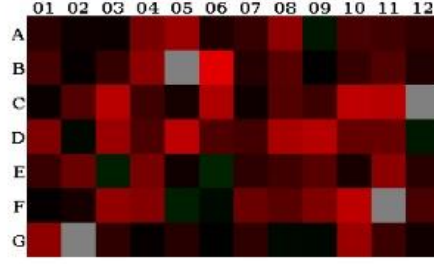


Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ACLY -1.47	ACSL4 -1.56	ADM -1.64 A	ANGPT1 -1.83	ANGPT2 -4.72	APAF1 -2.23 A	ARNT -2.33 A	ATP5A1 -2.01	AURKA -1.39	BCL2L11 -2.04 A	BIRC3 -1.39	BMI1 -1.59
B	CA9 -1.10	CASP2 -1.69 A	CASP7 -1.59	CASP9 -1.66 A	CCL2 -20.68 C	CCND2 -20.68 C	CCND3 -2.07	CDC20 -1.39	CDH2 -1.27 A	CFLAR -1.65 A	COX5A -1.53	CPT2 2.14 A
C	DDB2 -1.32 A	DDIT3 1.10	DKC1 -4.17	DSP -1.40	E2F4 1.28 A	EPO -16.11	ERCC3 -1.83 A	ERCC5 -1.53	ETS2 -2.00 A	FASLG -11.88	FGF2 -7.21	FLT1 -20.68 C
D	FOXC2 -2.36	G6PD -1.72 A	GADD45 G -8.94	GPD2 -2.43 A	GSC -19.84	HMOX1 -2.01	IGFBP3 1.18 A	IGFBP5 -8.00	IGFBP7 -2.11	KDR -3.29	KRT14 1.54	LDHA -1.16
E	LIG4 -1.11 A	LPL -1.42	MAP2K1 1.30 A	MAP2K3 -1.52	MAPK14 -1.88	MCM2 -1.13	MKI67 -1.67	NOL3 1.16 A	OCLN -1.35	PFKL -1.46 A	PGF -4.92	PINX1 1.21 A
F	POLB -1.16 A	PPP1R15A -1.80 A	SERPINB2 -3.97	SERPINF1 -5.06	SKP2 -1.26	SLC2A1 1.22 A	SNAI1 -3.27	SNAI2 -1.73 A	SNAI3 1.59 A	SOD1 -3.34	SOX10 -20.68 C	STMN1 -1.73
G	TBX2 -2.23	TEK -20.68 C	TEP1 -1.13	TERF1 1.06 A	TERF2IP -1.00	TINF2 -1321931 247.99	TNKS -1.00 A	TNKS2 -1.89 A	UQCRRFS1 1.35	VEGFC -1.80 A	VEE1 -1.43	XIAP -1.40 A

**Çizim 4.57** CAL62 + İKİ-MKH 1.gündeki gen ekspresyonlarındaki değişimlerinin real time PCR ile belirlenmesi

ACLY, ACSL, ADM, ANGPT1, ANGPT2, APAF1, ARNT, ATP5A1, AURKA, BCL2L11, BIRC3, BMI1, CA9, CASP2, CASP7, CASP9, CCL2, CCND2, CCND3, CDC20, CDH2, CFLAR, COX5A, CPT2, DDB2, DDIT3, DKC1, DSP, E2F4, EPO, ERCC3, ERCC5, ETS2, FASLG, FGF2, FLT1, FOXC2, G6PD, GADD45G, GPD2, GSC, HMOX1, IGFBP5, IGFBP7, KDR, LDHA, LIG4, LPL, MAP2K3, MAPK14, MCM2, MKI67, OCLN, PFKL, PGF, POLB, PPP1R15A, SERPINB2, SERPINF1, SKP2, SNAI1, SNAI2, SNAI3, SOD1, SOX10, STMN1, TBX2, TEK, TP1, TERF2IP, TINF2, TNKS, TNKS2, VEGFC, VEE1, XIAP genlerinin 1.günde ekspresyonu azalırken IGFBP3, KRT14, MAP2K1, NOL3, PINX1, SLC2A1, TERF1, UQCRRFS1 genlerinin ekspresyonu artmıştır.

Treated Group	Control Group
Group 2	Control Group

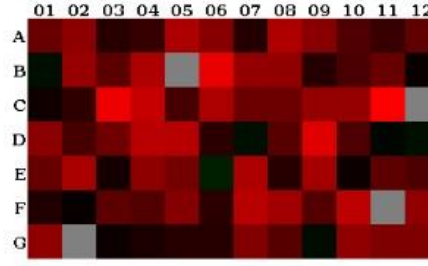


Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ACLY 3.37 A	ACSL4 1.49 A	ADM 1.45 A	ANGPT1 33.64 A	ANGPT2 2.62 97.14	APAF1 5.00 A	ARNT 5.00 A	ATP5A1 63.21 A	AURKA -1.89 A	BCL2L11 8.18 A	BIRC3 6.37 A	BMI1 3.82 A
B	CA9 7.58 A	CASP2 1.28 A	CASP7 4.70 A	CASP9 68.21 A	CCL2 1773.03 C	CCND2 793.45 A	CCND3 3.01 A	CDC20 13.57 A	CDH2 1.04 A	CFLAR 4.80 A	COX5A 10.79 A	CPT2 2.50 A
C	DDB2 1.31 A	DDIT3 11.98 A	DKC1 232.65 A	DSP 6.29 A	E2F4 1.91 A	EPO 176.31 A	ERCC3 1.50 A	ERCC5 11.25 A	ETS2 5.91 A	FASLG 270.97 A	FGF2 224.72 C	FLT1 1773.03 C
D	FOXC2 41.70 A	G6PD -1.26 A	GADD45 94.48 A	GPD2 9.40 A	GSC 258.14 A	HMOX1 10.50 A	IGFBP3 6.74 A	IGFBP5 148.26 A	IGFBP7 221.63 A	KDR 20.00 A	KRT14 20.71 A	LDHA -2.03 A
E	LIG4 5.11 A	LPL 22.50 A	MAP2K1 -2.38 A	MAP2K3 32.95 A	MAPK14 1.56 A	MCM2 -2.88 A	MKI67 3.61 A	NOL3 6.37 A	OCLN 12.92 A	PFKL 2.03 A	PGF 64.98 A	PINX1 3.19 A
F	POLB 1.22 A	PPP1R15A 1.91 A	SERPINB2 76.21 A	SERPINF1 51.34 A	SKP2 -2.41 A	SLC2A1 -1.32 A	SNAI1 23.13 A	SNAI2 14.05 A	SNAI3 42.58 A	SOD1 259.93 C	SOX10 1773.03 C	STMN1 8.18 C
G	TBX2 70.13 A	TEK 1773.03 C	TEF1 3.84 A	TERF1 1.17 A	TERF2IP 2.99 A	TINF2 -1.05 A	TNKS 3.92 A	TNKS2 -1.30 A	UQCRRF51 -1.17 A	VEGFC 95.14 A	VEE1 5.78 A	XIAP 1.60 A

**Çizim 4.58** CAL62 + İKİ-MKH 4.gündeki gen ekspresyonlarındaki değişimlerinin real time PCR ile belirlenmesi

AURKA, G6PD, MAP2K1, MCM2, SKP2, SLC2A1, TINF2, TNKS2, UQCRRF51 genlerinin 4. Günde ekspresyon azalırken; ACLY, ACSL, ADM, ANGPT1, ANGPT2, APAF1, ARNT, ATP5A1, BCL2L11, BIRC3, BMI1, CA9, CASP2, CASP7, CASP9, CCL2, CCND2, CCND3, CDC20, CDH2, CFLAR, COX5A, CPT2, DDB2, DDIT3, DKC1, DSP, E2F4, EPO, ERCC3, ERCC5, ETS2, FASLG, FGF2, FLT1, FOXC2, GADD45G, GPD2, GSC, HMOX1, IGFBP3, IGFBP5, IGFBP7, KDR, KRT14, LDHA, LIG4, LPL, MAP2K3, MAPK14, MKI67, NOL3, OCLN, PFKL, PGF, PINX1, POLB, PPP1R15A, SERPINB2, SERPINF1, SNAI1, SNAI2, SNAI3, SOD1, SOX10, STMN1, TBX2, TEK, TP1, TERF1, TERF2IP, TNKS, VEGFC, VEE1, XIAP genlerinde ekspresyonu artmıştır.

Treated Group	Control Group
Group 2	Control Group

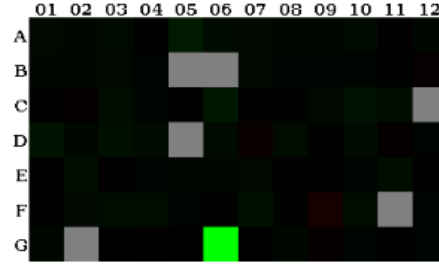


Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ACLY 9.85 A	ACSL4 23.10 A	ADM 2.41 A	ANGPT1 3.27 A	ANGPT2 46.85 A	APAF1 20.39 A	ARNT 2.23 A	ATP5A1 49.18 A	AURKA 21.11 A	BCL2L11 5.98 A	BIRC3 3.46 A	BMI1 8.28 A
B	CA9 -1.39 A	CASP2 29.24 A	CASP7 7.67 A	CASP9 47.18 A	CCL2 215.27 C	CCND2 173.65 A	CCND3 25.99 A	CDC20 25.63 A	CDH2 2.35 A	CFLAR 5.21 A	COX5A 10.13 A	CPT2 1.23 A
C	DDB2 1.44 A	DDIT3 2.75 A	DKC1 196.72 A	DSP 79.89 A	E2F4 4.63 A	EPO 44.02 A	ERCC3 11.08 A	ERCC5 11.08 A	ETS2 27.47 A	FASLG 27.10 A	FGF2 280.14 C	FLT1 215.27 C
D	FOXC2 22.16 A	G6PD 4.66 A	GADD45 12.13 G	GPD2 61.82 A	G5C 58.49 A	HMOX1 2.69 A	IGFBP3 -1.39 A	IGFBP5 6.68 A	IGFBP7 149.09 A	KDR 5.62 A	KRT14 -1.15 A	LDHA -1.40 A
E	LIG4 9.51 A	LPL 41.93 A	MAP2K1 1.56 A	MAP2K3 22.94 A	MAPK14 12.82 A	MCM2 -1.97 A	MKI67 47.50 A	NOL3 2.27 A	OCLN 38.85 A	PFKL 1.29 A	PGF 7.84 A	PINX1 5.28 A
F	POLB 2.01 A	PPP1R15A 1.21 A	SERPINB2 7.62 A	SERPINF1 6.15 A	SKP2 19.70 A	SLC2A1 2.51 A	SNAI1 62.25 A	SNAI2 35.26 A	SNAI3 6.54 A	SOD1 65.34 C	SOX10 215.27 C	STMN1 25.11 C
G	TBX2 23.92 A	TEK 215.27 C	TEP1 1.32 A	TERF1 1.83 A	TERF2IP 2.31 A	TINF2 2.35 A	TNKS 17.63 A	TNKS2 6.63 A	UQCRCF51 -1.28 A	VEGFC 23.75 A	VEE1 16.22 A	XIAP 16.22 A

**Çizim 4.59** CAL62 + İKİ-MKH 7.gündeki gen ekspresyonlarındaki değişimlerinin real time PCR ile belirlenmesi

CA9, IGFBP3, KRT14, LDHA, MCM2, UQCRCFS1 genlerinin 7. Günde ekspresyonu azalırken; ACLY, ACSL, ADM, ANGPT1, ANGPT2, APAF1, ARNT, ATP5A1, AURKA, BCL2L11, BIRC3, BMI1, CASP2, CASP7, CASP9, CCL2, CCND2, CCND3, CDC20, CDH2, CFLAR, COX5A, CPT2, DDB2, DDIT3, DKC1, DSP, E2F4, EPO, ERCC3, ERCC5, ETS2, FASLG, FGF2, FLT1, FOXC2, G6PD, GADD45G, GPD2, G5C, HMOX1, IGFBP5, IGFBP7, KDR, LIG4, LPL, MAP2K1, MAP2K3, MAPK14, MKI67, NOL3, OCLN, PFKL, PGF, PINX1, POLB, PPP1R15A, SERPINB2, SERPINF1, SKP2, SLC2A1, SNAI1, SNAI2, SNAI3, SOD1, SOX10, STMN1, TBX2, TEK, TP1, TERF1, TERF2IP, TINF2, TNKS, TNKS2, VEGFC, VEE1, XIAP genlerinin ekspresyonu artmıştır.

Treated Group	Control Group
Group 3	Control Group

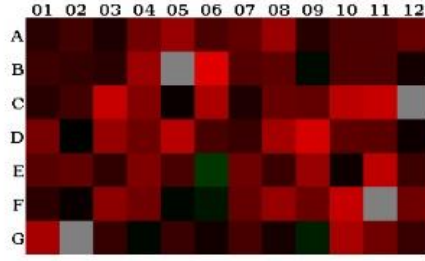


Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ACLY -1.80	ACSL4 -1.71	ADM -2.11 A	ANGPT1 -1.08	ANGPT2 -9.37	APAF1 -2.46 A	ARNT -2.10	ATP5A1 -1.67	AURKA -1.63	BCL2L11 -2.43	BIRC3 1.27	BMI1 -1.52
B	CA9 -1.58	CASP2 -1.74 A	CASP7 -1.93	CASP9 -1.47 A	CCL2 -13.34 C	CCND2 -13.34 C	CCND3 -2.04	CDC20 -1.35	CDH2 -1.49 A	CFLAR -1.35 A	COX5A -1.16	CPT2 1.71
C	DDB2 -1.16 A	DDIT3 1.32	DKC1 -2.69	DSP -1.47	E2F4 -1.24 A	EPO -7.05	ERCC3 1.26 A	ERCC5 -1.17	ETS2 -1.96 A	FASLG -4.59	FGF2 -3.38	FLT1 -13.34 C
D	FOXC2 -4.78	G6PD -1.60 A	GADD45 G -3.50	GPD2 -2.26 A	GSC -13.34 C	HMOX1 -2.34	IGFBP3 2.27 A	IGFBP5 -2.80	IGFBP7 -1.12	KDR -2.17	KRT14 1.36	LDHA -1.39
E	LIG4 -1.12 A	LPL -3.18	MAP2K1 1.21 A	MAP2K3 -1.41	MAPK14 -1.70	MCM2 -1.69	MKI67 -1.97	NOL3 1.16 A	OCLN -1.17	PFKL -1.30 A	PGF -3.20	PINX1 -1.05 A
F	POLB -1.16 A	PPP1R15A -1.93	SERPINB2 -2.55	SERPINF1 -2.80	SKP2 -1.36	SLC2A1 -1.12 A	SNAI1 -3.94	SNAI2 -1.21 A	SNAI3 6.07 A	SOD1 -2.56	SOX10 -13.34 C	STMN1 -1.31
G	TBX2 -1.71	TEK -13.34 C	TEP1 -1.02	TERF1 1.10 A	TERF2IP 1.07	TINF2 -1537564 728.09	TNKS 1.02 A	TNKS2 -1.76 A	UQCRFS1 1.34	VEGFC -1.35 A	WEE1 -1.19	XIAP -1.50 A

**Çizim 4.60** CAL62 + İKİ-MKH+ AKBA 1.gündeki gen ekspresyonlarındaki değişimlerinin real time PCR ile belirlenmesi

ACLY, ACSL, ADM, ANGPT1, ANGPT2, APAF1, ARNT, ATP5A1, AURKA, BCL2L11, BIRC3, BMI1, CA9, CASP2, CASP7, CASP9, CCL2, CCND2, CCND3, CDC20, CDH2, CFLAR, COX5A, DDB2, DKC1, DSP, E2F4, EPO, ERCC5, ETS2, FASLG, FGF2, FLT1, FOXC2, G6PD, GADD45G, GPD2, GSC, HMOX1, IGFBP5, IGFBP7, KDR, LDHA, LIG4, LPL, MAP2K3, MAPK14, MCM2, MKI67, OCLN, PFKL, PGF, PINX1, POLB, PPP1R15A, SERPINB2, SERPINF1, SKP2, SLC2A1, SNAI1, SNAI2, SOD1, SOX10, STMN1, TBX2, TEK, TP1, TINF2, TNKS2, VEGFC, VEE1, XIAP genlerinin 1. Günde ekspresyonu azalırken CPT2, DDIT3, ERCC3, IGFBP3, KRT14, MAP2K1, NOL3, SNAI3, TERF1, TERF2IP, TNKS, UQCRFS1 genlerinin ekspresyonu artmıştır.

Treated Group	Control Group
Group 3	Control Group



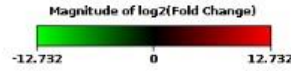
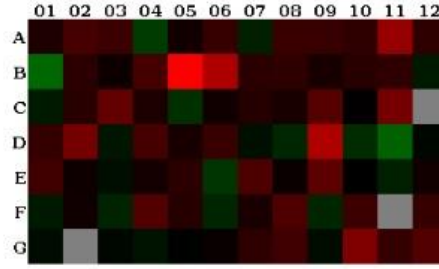
Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ACLY 3.21 A	ACSL4 6.47 A	ADM 2.30 A	ANGPT1 23.82 A	ANGPT2 68.78 A	APAF1 8.31 A	ARNT 15.61 A	ATP5A1 76.32 A	AURKA 2.96 A	BCL2L11 8.48 A	BIRC3 8.42 A	BMI1 17.56 A
B	CA9 5.37 A	CASP2 4.33 A	CASP7 3.33 A	CASP9 81.23 A	CCL2 1255.46 C	CCND2 561.83 A	CCND3 10.44 A	CDC20 13.49 A	CDH2 -1.33 A	CFLAR 8.31 A	COX5A 8.36 A	CPT2 1.77 A
C	DDB2 3.15 A	DDIT3 6.38 A	DKC1 267.61 A	DSP 39.78 A	E2F4 1.35 A	EPO 124.85 A	ERCC3 2.27 A	ERCC5 18.82 A	ETS2 15.93 A	FASLG 191.87 A	FGF2 265.76 C	FLT1 1255.46 C
D	FOXC2 29.53 A	G6PD -1.07 A	GADD45 66.90 A	GPD2 21.62 A	GSC 182.78 A	HMOX1 7.43 A	IGFBP3 4.77 A	IGFBP5 104.98 A	IGFBP7 425.79 A	KDR 14.16 A	KRT14 12.24 A	LDHA 1.51 A
E	LIG4 11.19 A	LPL 15.93 A	MAP2K1 3.77 A	MAP2K3 35.36 A	MAPK14 7.38 A	MCM2 -4.52 A	MKI67 22.22 A	NOL3 5.18 A	OCLN 69.26 A	PFKL 1.51 A	PGF 200.02 A	PINX1 5.48 A
F	POLB 3.42 A	PPP1R15A 1.35 A	SERPINB2 53.97 A	SERPINF1 24.66 A	SKP2 -1.20 A	SLC2A1 -1.86 A	SNAI1 16.38 A	SNAI2 70.72 A	SNAI3 20.17 A	SOD1 258.50 A	SOX10 1255.46 C	STMN1 22.38 C
G	TBX2 111.74 A	TEK 1255.46 C	TEP1 4.58 A	TERF1 -1.21 A	TERF2IP 4.70 A	TINF2 1.62 A	TNKS 7.23 A	TNKS2 1.87 A	UQCRRS1 -2.26 A	VEGFC 115.68 A	VEE1 23.49 A	XIAP 4.70 A

**Çizim 4.61** CAL62 + İKİ-MKH+ AKBA 4.gündeki gen ekspresyonlarındaki değişimlerinin real time PCR ile belirlenmesi

CDH2, G6PD, MCM2, SKP2, SLC2A1, TERF1, UQCRRS1 genlerinin 4.günde ekspresyonu azalırken; ACLY, ACSL, ADM, ANGPT1, ANGPT2, APAF1, ARNT, ATP5A1, AURKA, BCL2L11 BIRC3, BMI1, CA9, CASP2, CASP7, CASP9, CCL2, CCND2, CCND3, CDC20, CFLAR, COX5A, CPT2, DDB2, DDIT3, DKC1, DSP, E2F4, EPO, ERCC3, ERCC5, ETS2, FASLG, FGF2, FLT1, FOXC2, GADD45G, GPD2, GSC, HMOX1, IGFBP3, IGFBP5, IGFBP7, KDR, KRT14, LDHA, LIG4, LPL, MAP2K1, MAP2K3, MAPK14, MKI67, NOL3, OCLN, PFKL, PGF, PINX1, POLB, PPP1R15A, SERPINB2, SERPINF1, SNAI1, SNAI2, SNAI3, SOD1, SOX10, STMN1, TBX2, TEK, TEP1, TERF2IP, TINF2, TNKS, TNKS2, EGFC, VEE1, XIAP genlerinin ekspresyonu artmıştır.



Treated Group	Control Group
Group 3	Control Group

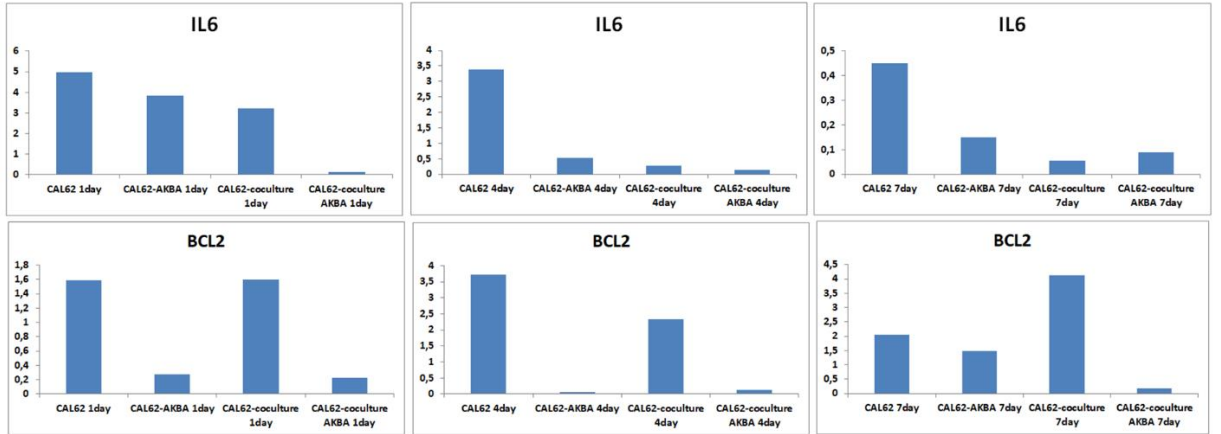


Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ACLY	ACSL4	ADM	ANGPT1	ANGPT2	APAF1	ARNT	ATP5A1	AURKA	BCL2L11	BIRC3	BMI1
	2.87	11.25	8.18	-7.93	1.81	6.46	-3.11	7.53	7.17	5.07	195.63	4.97
B	CA9	CASP2	CASP7	CASP9	CCL2	CCND2	CCND3	CDC20	CDH2	CFLAR	COX5A	CPT2
	-36.20	4.73	1.62	10.94	6803.21	452.57	4.51	4.90	2.30	3.98	5.18	-2.46
C	DDB2	DDIT3	DKC1	DSP	E2F4	EPO	ERCC3	ERCC5	ETS2	FASLG	FGF2	FLT1
	-2.39	3.90	32.49	2.57	-5.16	1.70	3.59	2.22	19.32	1.04	58.16	8.29
D	FOXC2	G6PD	GADD45	GPD2	G5C	HMOX1	IGFBP3	IGFBP5	IGFBP7	KDR	KRT14	LDHA
	6.07	58.57	G	11.25	2.25	7.37	-1.71	-3.89	428.16	-4.62	-30.65	-1.23
E	LIG4	LPL	MAP2K1	MAP2K3	MAPK14	MCM2	MKI67	NOL3	OCLN	PFKL	PGF	PINX1
	9.40	1.62	-1.61	1.95	4.44	-5.89	15.37	1.42	23.62	-1.03	-3.09	1.89
F	POLB	PPP1R15A	SERPINB2	SERPINF1	SKP2	SLC2A1	SNAI1	SNAI2	SNAI3	SOD1	SOX10	STMN1
	-2.48	1.79	-3.41	16.94	3.69	-3.60	2.40	15.05	-3.73	8.07	8.29	6.37
G	TBX2	TEK	TEP1	TERF1	TERF2IP	TINF2	TNKS	TNKS2	UQCRRF51	VEGFC	VEE1	XIAP
	-1.53	8.29	-1.26	-1.85	-1.06	1.30	4.76	8.77	-1.51	85.75	6.24	17.65

**Çizim 4.62** CAL62 + İKİ-MKH+ AKBA 7.gündeki gen ekspresyonlarındaki değişimlerinin real time PCR ile belirlenmesi

ANGPT1, ARNT, CA9, CPT2, DDB2, E2F4, GADD45G, IGFBP3, IGFBP5, KDR, KRT14, LDHA, MAP2K1, MCM2, PFKL, PGF, POLB, SERPINB2, SLC2A1, SNAI3, TBX2, TEP1, UQCRRF51, TERF2IP, TERF1;genlerinin 7.Günde ekspresyonu azalırken; ACLY, ACSL, ADM, ANGPT2, APAF1, ATP5A1, AURKA, BCL2L11, BIRC3, BMI1, CASP2, CASP7, CASP9, CCL2, CCND2, CCND3, CDC20, CDH2, CFLAR, COX5A, DDIT3, DKC1, DSP, EPO, ERCC3, ERCC5, ETS2, FASLG, FGF2, FLT1, FOXC2, G6PD, GPD2, G5C, HMOX1, IGFBP7, LIG4, LPL, MAP2K3, MAPK14, MKI67, NOL3, OCLN, PINX1, PPP1R15A, SERPINF1, SKP2, SNAI1, SNAI2, SOD1, SOX10, STMN1, TEK, TINF2, TNKS, TNKS2, VEGFC, VEE1, XIAP genlerinin ekspresyonu artmıştır.

#### 4.7.4 Real Time PCR



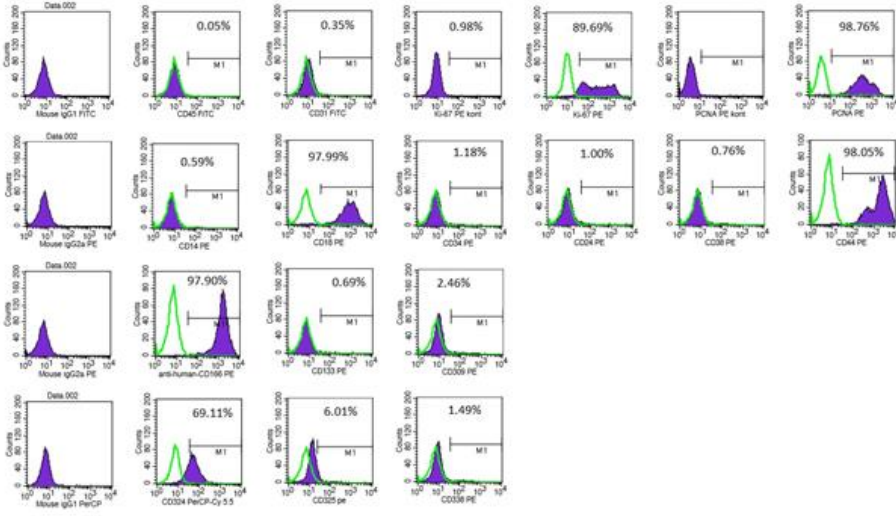
**Çizim4.63** CAL62'nin Real Time PCR ile IL6 ve BCL2 geninin ekspresyon grafiği

CAL62+AKBA'lı gruplarda CAL62 grubuna kıyasla 1,4 ve 7. günlerde sırasıyla IL6 geninin ekspresyonunda azalma görülmüştür. IL6 geninin ekspresyonunun azalması hücre proliferasyonunun azaldığını göstermektedir. CAL62 grubuna kıyasla diğer gruplarda hücre proliferasyonunda azalma görülmüştür.

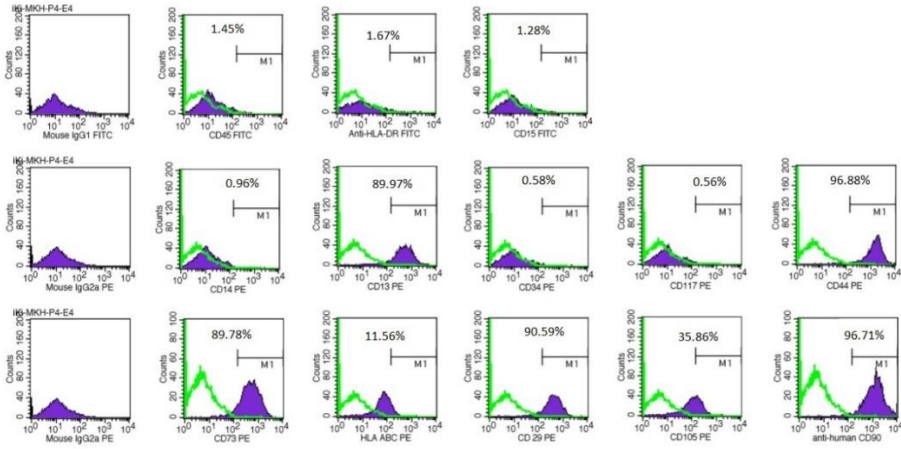
CAL62 grubuna kıyasla 1,4 ve 7. Günlerde CAL62+AKBA grubunda BCL2 geninin ekspresyonunda azalma görülmüştür. BCL2 antiapoptatik bir gen olduğundan ekspresyonunun azalması CAL62 hücrelerinin apoptoza gittiğini ifade etmektedir.



#### 4.7.5 Ortak Kültür Sonrası Akım Sitometrik Analizi



**Çizim 4.64** İnsan anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin ortak kültür sonrası akım sitometrisi (hücre sayar) ile yüzey belirteçlerinin belirlenmesi



**Çizim 4.65** insan kemik iliği kaynaklı Mezenkimal kök hücrelerinin ortak kültür sonrası akım sitometrisi (hücre sayar) ile yüzey belirteçlerinin belirlenmesi

Ortak kültür sonrasında CAL62 ve İKİ-MKH'lerinin belirteçleri incelendi. Yapılan inceleme sonrasında ortak kültür öncesine göre hücrelerin belirteçlerinin ekspresyonlarında azalma gözlemlendi. Dolayısıyla sadece kanser hücre hattı değil kök hücrelerinde ortak kültür sonrasında etkilendiğini görmekteyiz.

## 5 TARTIŞMA

Günümüzde kanser hastalığının tedavisinin yetersiz olması ve ölüm oranının yüksek olması bilim insanlarının bu konuya önem vermesine ve üzerinde çalışmaların yoğunlaşmasına yol açmıştır. Günümüzdeki çalışmalar kanseri tedavi etmeye yönelik çalışmalar haricinde kanserden korunma ve erken tanıyı da kapsamaktadır. Cerrahi tedaviler radyoterapi, kemoterapi haricinde hedefe yönelik tedavi ve gen tedavileri çalışmaları hız kazanmıştır. Son zamanlarda kök hücrenin keşfi ile kanser çalışmaları hız kazanmış hücresel temelli tedaviler geliştirilmeye ve önem kazanmaya başlamıştır.

Kök hücreler hasarlı dokuya migrasyon yetenekleri olan ve bulunduğu dokunun yenilenmesinde görevli olan çok özel hücrelerdir. Öte yandan kanser hastalarının kemoterapi ve radyoterapi sonrasında yaşam kalitesi oldukça düşmektedir. Hastanın yaşam kalitesini arttırmak amacıyla da kök hücreler büyük önem sağlamaktadır. Allojenik kemik iliği nakli ile hastanın yaşam kalitesinin arttığı yapılan çalışmalarda görülmüştür.(Berk Ö, 1986).

Kök hücrenin klinikte uygulama alanının genişlemesi için moleküler mekanizmasının tam olarak çözülmesi gerekmektedir. Günümüzde yapılan çalışmalar moleküler düzeyde hızla artmaktadır. Yolakların tam olarak tanımlanabilmesi büyük önem taşımaktadır. Kanserli oluşturan kanser kök hücrelerinin normal kök hücreler ile olan benzerlikleri kendilerini yenilemesi için kullandığı sinyal yolakları( Notch, SHH,WNT) , asimetrik hücre bölünmesi ve taşıdıkları benzer transkripsiyon faktörleri ( SOX2, Nanog, Klf4 ,OCT 4 ) kanseri oluşturan hücrelerin normal kök hücrelerden kaynaklandığını düşündürmektedir (Wend P,2010).

Mezenkimal kök hücreler çalışmalarda en çok kullanılan hücre grubudur. Hasarlı dokuya olan migrasyon yeteneği ve orada dokunun onarımını sağlaması, kanser hücrelerinin üzerinde anti tümörojenik etkisi çalışmamızda Mezenkimal kök hücre grubunu seçmemize neden olmuştur. Antiinflamatuvar özelliğe sahip olması diğer kök hücreler arasında hücresel temelli tedavilerde Mezenkimal kök hücrelerin daha çok çalışılan hücre grubu olmasını sağlamaktadır.

Çalışmamızda mezenkimal kök hücrelerin tiroidin en agresif seyreden kanser tipi olan anaplastik tiroid kanseri hücreleri üzerinde etkisinin izlenmesi haricinde, moleküler düzeyde etkisi tanımlanmış olan antitümörojenik ve antikanserojenik olan kanser

hücresinin büyümesini engelleyici etkiye sahip olan AKBA (acetyl-11-keto- $\beta$ -bosvelik asit)'nin anaplastik tiroid kanseri üzerinde hem tek başına hem de Mezenkimal kök hücre ile birlikte gösterecekleri etkisi incelenmiştir.

Çalışmanın amacı dikkate alındığında AKBA'nın kanser hücreleri haricinde mezenkimal kök hücrelerinin üzerinde gösterecek olduğu etki büyük önem içermektedir. AKBA'nın Mezenkimal kök hücrelerinin canlılığına ve proliferasyonuna olan etkisinin incelenmesi günümüzde yapılan çalışmalardan ayrıcalık kazanmasına neden olmuştur. Bu çalışmada AKBA'nın anaplastik tiroid kanseri hücreleri üzerinde apoptozu arttırması yönünde yoğunlaşmıştır. Apoptozu arttırıcı etkiye sahip olan AKBA'nın Mezenkimal kök hücre ile olan birlikte etkisinde en önemli hedefdir.

Yapılan kanser çalışmalarında Mezenkimal kök hücreler önemli yer tutmaktadır. Ancak tek başına kanseri eradike edebilecek bir tedavi oluşturulamamıştır. Mezenkimal kök hücrelerin kanserli bir dokuya verildiğinde kanser dokusunun olduğu yere yerleşip savunma sistemi oluşturduğu yapılan çalışmalarda izlenmiştir(Heldring 2015). AKBA'nın kanser hücrelerinin apoptozunu arttırıcı etkiye sahip olması mezenkimal kök hücrelerinde kanser hücreleri üzerinde gösterdiği etkiler birlikte incelenerek hücresel temelli tedavilerde yeni fikirlerin oluşumun yol açmak en büyük hedef olmuştur. Dolayısıyla bu çalışma sadece Mezenkimal kök hücrelerin kanser hücreleri üzerinde etkisinin incelenmesinin yanı sıra Mezenkimal kök hücreleri destekleyici etkilere sahip olan eklentiler ile çalışmalara devam edilebileceğini göstermektedir.

AKBA'nın CAL62 ve İKİ-MKH hücreleri üzerinde uygun dozu bulmak amaçlı konsantrasyon deney yapılmıştır. Kanser hücreleri üzerinde uygun AKBA konsantrasyonu 80  $\mu$ l olarak belirtilmiştir(Xia ve ark. 2016)). Yapılan konsantrasyon deneyi sonucunda CAL62 ve İKİ-MKH hücreleri için kurulacak olan ortak kültür için İKİ-MKH için sitotoksik olmayan hücrenin proliferasyonunu azaltıcı olmayan ve en önemlisi kanser hücreleri üzerinde gösterecek olduğu gibi apoptatik etkiye sahip olmayan doz WST ve Annexin PI testi ile belirlendi. Wst testi sonucuna göre CAL62 hücrelerinde 80  $\mu$ l doz AKBA konsantrasyonunda canlılığında düşme olduğunu gördük. İKİ-MKH hücrelerinde 4 ve 7. Günde hücre canlılığında artma olduğunu izledik. Bu verilerin üzerine canlı, ölü, erken ve geç apoptatik seviyelerini görmek üzere Annexin PI analizi gerçekleştirildi. 100  $\mu$ l AKBA'nın İKİ-MKH'ların apoptozunu arttırdığını 80 $\mu$ l AKBA konsantrasyonunda İKİ-MKH hücrelerinin canlılık oranının yüksek olduğu apoptoz ve ölüm oranlarının çok

düşük olması hücrenin proliferasyonunda olumlu etkisi olduğunu gösterdiğinden uygun konsantrasyon veriler sonucunda 80 µl olarak belirlendikten sonra hücreler ortak kültüre alındılar(Çizim4.12).

Yapılan çalışmalarda Annexin PI analizi ile hücrelerin canlı, ölü, erken ve geç apoptotik seviyeleri belirlenmektedir(Zhang ve ark.2014). Ortak kültür sonrasında AKBA'nın CAL62 ve İKİ-MKH hücreleri üzerinde canlılık, ölüm ve apoptoz seviyelerini analiz etmek amacıyla Annexin PI analizi gerçekleştirilmiştir. CAL62 kontrol grubuna oranla CAL62+AKBA grubunda apoptoz seviyesinin anlamlı bir şekilde yükseldiğini gördük.

Hücrede apoptozun düzenlenmesinde BCL2 geni oldukça büyük rol oynamaktadır. Hücrenin apoptoza eğiliminin olup olmadığını BCL2 geninin homodimer ve heterodimer formuna bağlıdır(Adams ve ark. 2001). BCL2 geninin hücreleri apoptozdan koruduğu bilinmektedir(Garcia ve ark. 1992). BCL2 geninin ifadesindeki artış çeşitli kanserlerde yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur(Gobé ve ark. 2002).

Yapılan ko kültür sonrasındaki Real time analizinde BCL2 geninin AKBA olan kültür gruplarında kontrol grubu CAL62 oranınla azalması AKBA'nın insan anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin apoptozunu düzlediğini göstermektedir. CAL62+İKİ-MKH ko kültür grubunda BCL2 gen ekspresyonu CAL62 kontrol grubuna yakın çıkması AKBA'nın tek başına kanser hücrelerinin apoptozunda rol oynadığını göstermektedir.

Kanser hücreleri oldukça aktif olan ve sürekli kontrolsüz çoğalan hücrelere olduğundan kanser hücrelerinin çoğalmasını engelleyici ya da azaltıcı etkiler kanserin tedavisinde büyük umut olacaktır. IL6 hücre çoğalmasını düzenleyen çok önemli bir sitokindir. T hücreleri, makrofajlar tarafından salınan kanserin progresyonuyla doğrudan ilişkilidir. Yapılan çalışmalarda kanser hastalarında IL6 seviyesinin yüksek olduğu belirlenmiştir(Oka ve ark.1996). Ortak kültür sonrasında yapılan Real time PCR analizinde IL6 gen ekspresyon seviyesi CAL62+ AKBA grubunda kontrol grubu CAL62'ye göre 4 ve 7 günde belirgin bir şekilde düşüş göstermiştir. Bu veride bize AKBA'nın insan anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin proliferasyonunu azaltıcı etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Yapılan bir çalışmada karaciğer metastazlı kolon kanseri hastalarda serum IL6 seviyesinin, metastazı olmayan hastalara oranla çok yüksek bulunmuştur(Özgür ve ark,2010). AKBA'nın IL6 seviyesi düşürmesi bize metastazının düzenlenmesinde rol olabileceği hipotezini düşündürmüştür.

Kanser hücreleri sürekli ve kontrolsüz bölündüğünden canlılıkları çok yüksek hücrelerdir. Hücre canlılığını belirlemek amacıyla LIVE/DEAD analizi gerçekleştirdik. AKBA'nın CAL62 ve İKİ-MKH üzerinde olan hücre canlılığı tespit edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda AKBA'nın CAL62 olan hücre grubunda ölü hücre sayısında artış gözlemlenirken İKİ-MKH+AKBA grubunda belirgin bir ölü hücre görüntüsü elde edilememiştir. CAL62 kontrol grubuna oranla CAL62+AKBA hücre grubunda 1,4 ve 7 günlerde 1:1 ve 1:3 oranında ölü hücreler gözlemlenmiştir. Aynı benzer durum CAL62+İKİ-MKH+AKBA grubunda da izlenmiştir.

Vücutta mevcut olan damarlardan yeni kan damarlarının oluşması anjiyogenez olarak tanımlanmaktadır. Tümör gelişimlerinde anjiyogenez oldukça büyük önem taşımaktadır(Fotsis ve ark.1994). Hipoksik ortam ve henüz tam olarak ortaya konmamaş bazı uyaranlar anjiyogenez özelliği taşıyan bazı VEGF gibi faktörleri ortaya çıkarırlar. Tümör hücresi büyüdükçe vaskülarizasyon artmaktadır. Kanser hastalığının tedavisinin güç olmasının en önemli nedenleri arasında metastaz yatmaktadır. Kanser metastaz yapmasında anjiyogenez büyük role sahiptir(Folkman ve ark.2002). Anjiyogenez inhibitörlerinin nasıl etki ettiği mekanizması henüz tam olarak açığa kavuşmamıştır. Kanser hücrelerinin metastazının engellenmesinde ve yeni tedavi stratejilerinin oluşumunda tümör damarlarının hedeflenmesi oldukça önemlidir.

Çalışmamızda CAL62 hücrelerinin anjiyogenez özelliğini tanımlamak amaçlı ANGPT2, VEGF2 ve KDR genlerinin ekspresyonları incelenmiştir. AKB tek başına kullanıldığında 7 gün boyunca anjiyogenezi arttırmaktadır. CAL62-İKİ-MKH grubunda ilk 4 gün boyunca artış gözlemledik. 7.gün olan kültürde ise düşüş görülmektedir.CAL62-İKİ-MKH + AKBA grubunda 4.günde ciddi bir etki gözlemlerken 7.günde çok ciddi düşüş gözükmektedir. Bu ekspresyon düşmesini AKBA'dan kaynaklanan ve anjiyogenezi destekleyen etkisizleştirmeyle açıklanabilir. Özellikle CAL62-İKİ-MKH+AKBA beraber olduğu gruplarda ANGTP2 ve KDR geninin ekspresyonu üzerinde sinerjik etki yaratarak ekspresyonu düşürmüştür. Yapılan bir çalışmada Asetil-11-keto-beta-boswellik asit, VEGF2 anjiogenezi baskılayarak prostat büyümesini inhibe ettiğini göstermiştir(Pang ve ark,2009).

Oksidatif stres başta kanser olmak üzere birçok hastalığın patogenezinde rol oynamaktadır(Berlett ve ark. 1997). Oksidatif stresin CAL62 hücreleri üzerinde AKBA'nın yaptığı etkiyi saptamak amacıyla HMOX1 geninin ekspresyonu incelenmiştir. Yapılan

inceleme sonrasında AKBA eklenen gruplarda HMOX1 geninin ekspresyonunda artış gözlemlenmiştir. 4. Günde CAL62 + AKBA olan gruplarda yaklaşık 2.5 kat artış gözlemlenirken bu artış 7.günde ise yaklaşık 11 kat artmaktadır. AKBA CAL62 hücrelerinin üzerinde oksidatif stres yarattığını gözlemlemekteyiz. CAL62 + İKİ-MKH olan grupta ise benzer durum söz konusudur. 4.güne kadar oksidatif stresin arttığını görmekteyiz fakat 7.günde bu stresin azaldığı gözlemlenmektedir. CAL62+ AKBA grubunda ve CAL62+MKH hücre grubunda oksidatif strese sebep olduğunu gözlemlemekteyiz ancak CAL62 + İKİ-MKH hücre grubunda ölüme sebep olacak bir oksidatif stres görülmezken CAL62 +AKBA grubunda oksidatif stres 1,4 ve 7 günde devamlı artış görüldüğünden oksidatif stres açısından daha iyi olduğunu gözlemlemekteyiz.

AKBA'nın CAL62 hücreleri üzerinde apoptotik etkisini saptamak amacıyla CASP2, CASP7, CASP9, CFLAR(CAS8), MAP2K1, MAP2K3, MAP2K14 genlerinin ekspresyonlarına bakılmıştır. CASP genlerinin artması hücrede apoptoza neden olduğunu ifade etmektedir. CAL62 +AKBA olan gruplarda CASP2,7,9 gen ekspresyonlarındaki artış AKBA'nın CAL62 hücrelerinin apoptoza neden olduğunu göstermektedir. CASP kendi içerisinde kıyasladığımız zaman CAL62 +AKBA da CAS7 geninin ekspresyonu daha yüksek olduğundan hücrelerin apoptoza gittiğini söyleyebiliriz. CAL62 +İKİ-MKH olan gruba baktığımız zaman 4. Günde CAS7 geninin ekspresyonu artmakta ancak CAS2 ve CAS7 7.günde dahada artmışken CAS9 da gen ifadesi düşmüştür. CAL62+İK-MKH+AKBA olan grupta CASP grupları 4. Günde artarken CAS7 ve CAS9 gen ifadesi 7.günde düştüğü görülmektedir. CFLAR(CAS8) geninin ifadesi CAL62+ AKBA olan grupta artış gözlemlenirken, CAL62+İKİ-MKH +AKBA olan grupta 7.günde apoptoz ifadesinde düşme saptanmıştır. CAL62 +AKBA olan grupta CFLAR geninin ekspresyonu bize AKBA'nın CAL62 hücreler üzerinde apoptotik etkiye neden olduğunu göstermektedir. Genel olarak MAP2K genlerinin ekspresyonunu incelediğimizde 4 ve 7. Günlerde ekspresyonunun arttığı görülmüştür. Bu bulgu hücrelerin stres altına girdiğini göstermektedir. Bu stres kaynağı HMOX1 geninin ekspresyonu artışında gösterdiği gibi oksidatif stresten kaynaklandığını düşündürmektedir.

AKBA'nın hücre çoğalması ve proliferasyonu üzerine olan etkisini anlamak amacıyla MKI67(Ki67),E2F4,G6PD,GPD2 ve LDHA genlerinin ekspresyonları incelenmiştir. MKI67 ve E2F4 geninin ekspresyonu doğrudan hücre proliferasyonunu ifade eden başlıca proteinlerdir. MKI67 hücrenin S1 fazınının dışındaki bütün hücre siklusu aşamalarında ifade edilmektedir. Çalışmamızın CAL62+AKBA olan gruplarında MKI67 geninin

ekspresyonu 4 ve 7. Günde 17 ve 86 kat artmıştır. CAL62 +İKİ-MKH 4 ve 7.günde CAL62 +AKBA grubu kadar olmasada MKI67 geninin ekspresyonunda artış gözlemlenmiştir. Bu bulgu CAL62+AKBA olan grupta hücre siklusunu arttırıcı bir etki olduğunu ancak CAL62+İKİ-MKH olan grupta artışın daha az olduğunu göstermektedir. İlginç olarak CAL62+ İKİ-MKH+AKBA grubunda 4. Günde 3.6 kat, 7.günde ise 15.3 kat artış görülmektedir. Bu artış AKBA'nın ve İKİ-MKH CAL62'ye karşı tek başlarına kullanıldığında belirgin bir düşüş olduğunu göstermektedir. Bu durumu AKBA ve İKİ-MKH birlikte kullanımının sinerjik etki yarattığını ve hücre çoğalmasını yavaşlattığını göstermektedir.

E2F4 geninin ekspresyonuna baktığımız zaman CAL62+AKBA olan gruptaki gen ifadesi 4.gün düşme görülsede 7.günde yaklaşık 2 kat artma görülmektedir. CAL62 +İKİ-MKH grubunda 7.günde gen ekspresyonu 4.6 kat artmış ancak CAL62+İKİ-MKH+AKBA olan grupta gen ekspresyonu 5 kat düşmüştür. Bu bulgu hücrenin G1 fazında S fazına geçişte ihtiyaç duyduğu E2F4 geninin ekspresyonunu sağlayamadığını ve bunun düşük çıkan hücre proliferasyonunun sebebi olabileceğini düşündürmektedir. MKI67 geninin ifadesi G1 fazından geçen hücrelerde görüldüğünden doğrudan hücre çoğalma hızıyla ilişkilendirilir. Ancak S1 fazına geçmiş hücrelerin hücre döngüsü hızını CAL62+İKİ-MKH+AKBA grubunda çok yavaş gerçekleştiği hesaplandı.

G6PD geninin ekspresyonu glikoliz aşamasıyla ilişkilendirilir. Elde ettiğimiz bulgular incelendiğinde 1 ve 4. Günlerde belirgin değişim olmaz iken CAL62+AKBA olan grupta 7. Günde 6.3 kat CAL62+İKİ-MKH olan grupta 4.7 kat ve CAL62+İKİ-MKH +AKBA olan grupta yaklaşık 58.6 kat artış olduğu gözlemlendi.

Laktik asit üretiminden sorumlu olan LDHA geni ifadesinde belirgin değişim olmamıştır. Bu durum CAL62+İKİ-MKH+AKBA grubunun glikolizi desteklediği yönünde düşündürmektedir.

Öte yandan GPD2 geni oksidatif fosforilasyon belirteç proteindir. CAL62+AKBA grubunda 4.günde 15 kat 7.günde 146 kat artış olduğu hesaplanmıştır. Bu durum AKBA kullanımının CAL62 hücreleri üzerinde glikolizden oksidatif fosforilasyon sürecine doğru sürüklediği şeklinde yorumlanmaktadır. Benzer durum CAL62+İKİ-MKH grubunda gözlemlenmemiştir. CAL62+İKİ-MKH+AKBA grubunda 4.günde GPD2 geninin ekspresyonu yaklaşık 21.6 kat artmışken 7.günde artış 11.3 olarak düşüş göstermiştir. Bu

verilerden hücre pluripotensi özelliklerini kaybettiğini kanser kök hücresi popülasyonun da azalma olduğuna işaret etmektedir.

CAL62+İKİ-MKH+AKBA grubunda GPD2 geninin ekspresyonu 11.25 kat G6PD geninin ekspresyonu 58.6 kat artmış olması hücrelerin ATP üretiminin kaynağının glikolizmi yoksa oksidatif fosforilasyondan mı kaynaklanıyor konusunda yorumları güçleştirmektedir.

Epitelial Mezenkimal geçiş(EMT) hücrede uyarılar sonucunda epitelial özelliklerini kaybederek mezenkimal özellik kazanmasıdır. EMT metastatik hücrenin en karakteristik özelliklerinden biridir. Yapılan çalışmada kanserin ilerlemesinde EMT temel rol oynadığı gösterilmiştir(Font-Clos ve ark. 2018).

KRT14 epitelial markerı olarak tanımlanmıştır. KRT14 geninin ekspresyonunun azalması EMT geçişini ifade eder. CAL62+AKBA olan grupta KRT14 geninin ifadesinde artma görülmektedir. CAL62+İKİ-MKH grubunda 4. Günde KRT14 geninin ekspresyonu artarken 7. Günde azalma görülmektedir. Benzer durum CAL62 +İKİ-MKH+AKBA grubundada gözlemlenmektedir. KRT14 geninin ekspresyonu CAL62+İKİ-MKH+AKBA grubunda 7. Günde 30 kat düşmüştür. Bu durum EMT göstergesi olabileceğini düşündürmektedir. Ancak İKİ-MKH'de bir Mezenkimal kök hücre olduğu için yapmış olduğu salgılarda CAL62'yi EMT sürecine sokmuş mezenkim karakteri kazandırmış olabilmektedir

SNAI1,SNAI2,SNA3 genlerinin ekspresyonlarına bakıldığında CAL62+AKBA 7 gün boyunca gen ekspresyonu düşmeyerek devamlı artış göstererek EMT sürecini desteklediğini göstermiştir. CAL62+İKİ-MKH+AKBA grubun da bu süreç 4.günde artış gösterirken 7.günde çok ciddi gen ifadesinde düşme görülmüştür.

#### **5.4 Sınırlılıklar**

Ko kültürün yer aldığı bu çalışmada 7 günden daha fazla süreçte AKBA'nın etkisine bakılarak apoptoz hakkında daha derin bilgilere ulaşılabilir. Çalışmanın İn-vivo kısmı yapılarak hayvanlar üzerindeki etkisine bakılarak daha etkili sonuçlar gözlemlenebilir.



## 6 SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan tez çalışmasında AKBA ile insan anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin apoptozunu engellemesi amaçlanmıştır. Bu sayede dünyada bir ilk niteliği sağlayan söz konusu çalışmada AKBA'nın insan anaplastik tiroid kanseri hücreleri üzerindeki apoptatik etkiye sahip olacağı düşünülmektedir. Elde edilen bulgular AKBA'nın insan anaplastik tiroid kanseri hücreleri üzerinde etkili apoptatik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bunun yanında AKBA'nın insan kemik iliği kaynaklı Mezenkimal kök hücrelerin proliferasyonunu arttırıcı apoptozunu azaltıcı etkisi olduğuda görülmektedir.

AKBA'nın insan anaplastik tiroid kanseri hücreleri üzerindeki apoptatik etkisi hücre canlılık testleriyle floresan teknikle ve FACS Calibur akım sitometri cihazında gösterilerek; gen düzeyindeki ekspresyon değişimleriyle desteklenmiştir.

AKBA'nın gen ifadesindeki değişimlerle insan anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin proliferasyonunu azalttığı, apoptozunu desteklediği, EMT sürecindeki ve kanserin metastaz yapmasında çok önemli faktör olan damarlaşmada rol oynayan genlerde meydana gelen ekspresyonlarla ortaya konmuştur.

Yine bu çalışma ile AKBA'nın, daha önce tümör hücrelerinin büyümeyi engelleyici etkisi bilinen ve bağışıklık sistemi üzerine düzenleyici etkisi ile birlikte Mezenkimal kök hücrelere tedavilere destek sağlayabileceğine yeni bir yaklaşım sunmuştur.

Çalışmada gözlemlenen AKBA'nın İnsan anaplastik kanseri hücreleri üzerine gözlemlenen apoptatik etkilerini daha kapsamlı incelemek için yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. AKBA'nın apoptozunun tayini için TUNEL yöntemi, Kaspaz-3 yöntemi, Western blotting yöntemleri kullanılmalı ayrıca in vivo yöntemle hayvanlarda apoptozu engellediği gösterilmelidir. Bu sayede sonuçlar daha AKBA'nın insan anaplastik tiroid kanserini apoptoza götürdüğünü daha gözlemsel olarak belirlenmiş olacaktır.

## KAYNAKLAR

- A. Kumar, B.A. Shah, S. Singh ve diğ. Acyl derivatives of boswellic acids as inhibitors of NF-kappaB and STATs, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22 (2012) 431–435.
- A.Altmann, D.Poeckel, L Fischer ve diğ. Coupling of boswellic acid – induced Ca<sup>2+</sup> mobilisation and MAPK activation to lipid metabolism and peroxide formation in human leucocytes , *Br. J. Pharmacol* 141 (2004) 223-232
- A.Altmann,D. Poeckel, L. Fischer ve diğ. Boswellic acids activate p42 (MAPK)and stimulate Ca(2+) mobilization, *Biochem. Biophys.Res. Commun.* 290(2002) 185-190
- A.B. Kunnumakkara, A.S. Nair, B. Sung ve diğ. Boswellic acid blocks signal transducers and activators of transcription 3 signaling, proliferation, and survival of multiple myeloma via the protein tyrosine phosphatase SHP-1, *Mol. Cancer Res.* 7 (2009) 118–128.
- Adams JM, Huang DC, Strasser A ve diğ. Subversion of the Bcl-2 life/death switch in cancer development and therapy. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2005;70:469-77.
- Aguirre-Ghiso JA Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy.*Nat Rev Cancer.* 2007 Nov;7(11):834-46.
- Alevizaki M, Papageorgiou G, Rentziou G ve diğ. Increasing prevalence of papillary thyroid carcinoma in recent years in Greece: the majority are incidental. *Thyroid.* 2009 Jul;19(7):749-54. doi: 10.1089/thy.2008.0421. Well differentiated thyroid cancer.
- Altekruse SF, Kosary CL, Krapcho M ve diğ. (eds). SEER Cancer Statistics Review , 1975-2007 National Cancer Institute. Bethesda MD, 2007
- Amabile G, Meissner A. Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine *Trends Mol Med.* 2009 Feb;15(2):59-68. doi: 10.1016/j.molmed.2008.12.003. Epub 2009 Jan 21
- American Thyroid Association Guidelines Task Force1, Kloos RT, Eng C, Evans DB, Francis GL, Gagel RF, Gharib H, Moley JF, Pacini F, Ringel MD, Schlumberger M, Wells SA Jr. Medullary thyroid cancer: management guidelines of the American Thyroid Association. *Thyroid.* 2009 Jun;19(6):565-612. doi: 10.1089/thy.2008.0403.
- Andrades JA, Claros S, Palomo PJ, Lopez-Puerta JM, Zamora-Navas P, Guerado E, Monleon M,Araque MC, Becerra J (2011): Skeletal Regeneration by Mesenchymal Stem Cells: What Else? *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials.*5:107-144. DOI: 10.5772/20889.
- Are C, Shaha AR. Anaplastic thyroid carcinoma: biology, pathogenesis, prognostic factors, and treatment approaches. *Ann Surg Oncol.* 2006 Apr;13(4):453-64. Epub 2006 Feb 15.
- B. Buchele, W. Zugmaier, T. Simmet, Analysis of pentacyclic triterpenic acids from frankincense gum resins and related phytopharmaceuticals by highperformance liquid chromatography. Identification of lupeolic acid, a novel pentacyclic triterpene, *J. Chromatogr. B Analyt Technol Biomed Life Sci,* 791 (2003) 21-30
- B. Park, S. Prasad, V. Yadav ve diğ. B.B. Aggarwal, Boswellic acid suppresses growth and metastasis of human pancreatic tumors in an orthotopic nude mouse model through modulation of multiple targets, *PLoS ONE* 6 (2011) e26943.

- Ban EJ, Andrabi A, Grodski S ve diğ. Follicular thyroid cancer: minimally invasive tumours can give rise to metastases. *ANZ J Surg.* 2012 Mar;82(3):136-9. doi: 10.1111/j.1445-2197.2011.05979.x. Epub 2012 Feb 1.
- Bao S, Ouyang G, Bai X Periostin potently promotes metastatic growth of colon cancer by augmenting cell survival via the Akt/PKB pathway. *Cancer Cell.* 2004 Apr;5(4):329-39.
- Berk Ö. High dose chemotherapy in solid tumours and otolog bone marrow transplantation treatment. *Doğa Tr Tıp ve Ecz DC* 1986;10:104-109.
- Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem.* 1997;272:20313-20316
- Bieback K, Kern S, Klüter H ve diğ. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells.* 2004;22(4):625-34.
- Blau HM., Brazelton TR., Weimann JM., 2001. The evolving concept of a stem cell: Entity or function. *Cell*, 105, 829-841.
- Brauckhoff M, Lorenz K, Ukkat J ve diğ. Medullary thyroid carcinoma. *Scand J Surg.* 2004;93(4):249-60.
- Broxmeyer HE, Lee MR, Hangoc G, Hematopoietic stem/progenitor cells, generation of induced pluripotent stem cells, and isolation of endothelial progenitors from 21- to 23.5-year cryopreserved cord blood. *Blood.* 2011 May 5;117(18):4773-7. doi: 10.1182/blood-2011-01-330514. Epub 2011 Mar 10.
- C. Cuaz-Perolin, L. Billiet, E. Bauge ve diğ. Antiinflammatory and antiatherogenic effects of the NF-kappaB inhibitor acetyl-11-keto-beta-boswellic acid in LPS-challenged ApoE-/- mice, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28 (2008) 272–277.
- Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast Surg.* 1994 Jul;21(3):429-35.
- Caron NR, Clark OH. *Scand J Surg.* 2004;93(4):261-71.
- Cavaleri F, Schöler H. Molecular Basis of Pluripotency. In: Lanza R, editor. *Essential of Stem Cell Biology.* San Diego: Academic Press; 2009. p. 39-60.
- Chiu AC, Delpassand ES, Sherman SI. Prognosis and treatment of brain metastases in thyroid carcinoma *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Nov;82(11):3637-42.
- Clayman GL, el-Baradie TS. Medullary thyroid cancer. *Otolaryngol Clin North Am.* 2003 Feb;36(1):91-105.
- Coulombel L Adult stem cells: seing is not being *Med Sci (Paris).* 2003 Jun-Jul;19(6-7):683-94.
- Covas DT, Siufi JL, Silva AR, Orellana MD. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Braz J Med Biol Res.* 2003 Sep;36(9):1179-83. Epub 2003 Aug 19.
- Çelebi B, Elçin AE, Elçin YM. Proteome analysis of rat bone marrow mesenchymal stem cell differentiation. *J Proteome Res.* 2010 Oct 1;9(10):5217-27. doi: 10.1021/pr100506u.
- Çelebi, B, Elçin, Y.M. 2009. “Proteome analysis of rat bone marrow mesenchymal stem cell subcultures”, *J Proteome Res*, 8, 2164-2172.

- Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *JAMA*. 2006 May 10;295(18):2164-7.
- DeGroot L, Paloyan E. Thyroid carcinoma and radiation. A Chicago endemic. *JAMA*. 1973 Jul 30;225(5):487-91.
- Dralle H, Machens A. Surgical approaches in thyroid cancer and lymph-node metastases. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2008 Dec;22(6):971-87. doi: 10.1016/j.beem.2008.09.018.
- Durand C1, Dzierzak E Embryonic beginnings of adult hematopoietic stem cells. *Haematologica*. 2005 Jan;90(1):100-8.
- E. Tibaldi, F. Zonta, L. Bordin ve diğ. The tyrosine phosphatase SHP-1 inhibits proliferation of activated hepatic stellate cells by impairing PDGF receptor signaling, *Biochim. Biophys. Acta* 2014 (1843) 288– 298.
- E.R. Sailer, L.R. Subramanian, B. Rall, R.F. ve diğ. Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid (AKBA): structure requirements for binding and 5-lipoxygenase inhibitory activity, *Br. J. Pharmacol*. 117 (1996) 615–618
- Elçin YM (2010) “Kök hücre kaynakları: Embriyonik kök hücreler” TÜBİTAK Bilim ve Teknik- Haziran 2010, 511: 40-41.
- Elçin, Y.M. (2009) “Embriyonik kök hücreler” Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar, TÜBA Raporları 20: 23-28, ISBN: 978-9944-252-29-4.
- Ende M, Ende N. Hematopoietic transplantation by means of fetal (cord) blood. A new method. *Va Med Mon (1918)*. 1972 Mar;99(3):276-80.
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotent tail cells from mouse embryos. *Nature*, 1981; 292:154-6
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981;292:154-6
- Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 2002;29:15-8.
- Font-Clos F1, Zapperi S1,2, La Porta CAM3. Topography of epithelial-mesenchymal plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 May 21. pii: 201722609. doi: 10.1073/pnas.1722609115
- Friedenstein A Stromal-hematopoietic interrelationships: Maximov's ideas and modern models. *Haematol Blood Transfus*. 1989;32:159-67.
- Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970 Oct;3(4):393-403.
- From G, Mellemegaard A, Knudsen N ve diğ. Review of thyroid cancer cases among patients with previous benign thyroid disorders. *Thyroid*. 2000 Aug;10(8):697-700.
- G. Chashoo, S.K. Singh, P.R. Sharma ve diğ. A propionylxy derivative of 11-keto-beta-boswellic acid induces apoptosis in HL-60 cells mediated through topoisomerase I & II inhibition, *Chem. Biol. Interact*. 189 (2011) 60–71.

- Garcia I, Martinou I, Tsujimoto Y, Martinou JC. Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by the bcl-2 proto-oncogene. *Science* 1992; 258: 302-304.
- Garcia-Rostan G, Tallini G, Herrero A ve diğ. Frequent mutation and nuclear localization of beta-catenin in anaplastic thyroid carcinoma. *Cancer Res.* 1999 Apr 15;59(8):1811-5.
- Gardner RL. Stem Cells: potency, plasticity and public perception. *J Anat* 2002;200:277-282.
- Gil J, Stembalska A, Pesz KA ve diğ. Cancer stem cells: the theory and perspectives in cancer therapy. *J Appl Genet.* 2008;49(2):193-9. doi: 10.1007/BF03195612.
- Giuffrida D, Gharib H. Anaplastic thyroid carcinoma: current diagnosis and treatment. *Ann Oncol.* 2000 Sep;11(9):1083-9.
- Glaser, T, Winter, S, Groscurth, P ve diğ. *Br. J. Cancer*, 1999, 80, 756
- Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med.* 1989 Oct 26;321(17):1174-8.
- Gobé G, Rubin M, Williams G ve diğ. Apoptosis and expression of Bcl-2, Bcl-XL, and Bax in renal cell carcinomas. *Cancer Invest* 2002; 20: 324-332.
- Goetzke R, Sechi A, De Laporte L ve diğ. Why the impact of mechanical stimuli on stem cells remains a challenge. *Cell Mol Life Sci.* 2018 May 4. doi: 10.1007/s00018-018-2830-z.
- Graze K, Spiler IJ, Tashjian AH Jr ve diğ. Natural history of familial medullary thyroid carcinoma: effect of a program for early diagnosis. *N Engl J Med.* 1978 Nov 2;299(18):980-5.
- Güneş AM. Kök hücre plastisitesi ve tıptaki kullanım alanları. *Güncel Pediatri*, 2005; 3642
- H. Safayhi, B. Rall, E.R. Sailer, H.P. Ammon, Inhibition by boswellic acids of human leukocyte elastase, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 281 (1997) 460–463.
- H. Safayhi, E.R. Sailer, H.P. Ammon, Mechanism of 5-lipoxygenase inhibition by acetyl-11-keto-beta-boswellic acid, *Mol. Pharmacol.* 47 (1995) 1212–1216.
- H.Q. Yuan, F. Kong, X.L. Wang ve diğ. Inhibitory effect of acetyl-11-keto-beta-boswellic acid on androgen receptor by interference of Sp1 binding activity in prostate cancer cells, *Biochem. Pharmacol.* 75 (2008) 2112–2121
- Hambardzumyan D, Becher OJ, Holland EC. Cancer stem cells and survival pathways. *Cell Cycle.* 2008 May 15;7(10):1371-8. Epub 2008 Mar 19.
- HAZARD JB, HAWK WA, CRILE G Jr. Medullary (solid) carcinoma of the thyroid; a clinicopathologic entity *J Clin Endocrinol Metab.* 1959 Jan;19(1):152-61.
- Heazlewood SY, Oteiza A, Cao H ve diğ. Analyzing hematopoietic stem cell homing, lodgment, and engraftment to better understand the bone marrow niche. *Ann N Y Acad Sci.* 2014 Mar;1310:119-28. doi: 10.1111/nyas.12329. Epub 2014 Jan 15.
- Heldring N, Mäger I, Wood M, ve diğ. (2015). Therapeutic Potential of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells and Their Extracellular Vesicles. *Human gene therapy*, 26(8), 506-517.

Heldring, N., Mäger, I., Wood, M. J., Le Blanc, K., and Andaloussi, S. E. (2015). Therapeutic Potential of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells and Their Extracellular Vesicles. *Human gene therapy*, 26(8), 506-517.

Hoernlein, R.F, Orlikowsky T, Zehrer C ve diğ. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1999, 288, 613

Hope KJ, Jin L, Dick JE. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat Immunol.* 2004 Jul;5(7):738-43. Epub 2004 May 30.

Hostanska K, Daum G, Saller R. *Anticancer Res.*, 2002, 22, 2853

Ishikawa F, Yoshida S, Saito Y Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nat Biotechnol.* 2007 Nov;25(11):1315-21. Epub 2007 Oct 21.

Ito Y, Higashiyama T, Takamura Y ve diğ. Clinical outcomes of patients with papillary thyroid carcinoma after the detection of distant recurrence. *World J Surg.* 2010 Oct;34(10):2333-7. doi: 10.1007/s00268-010-0712-0.

Ito Y1, Kudo T, Kobayashi K, ve diğ. Prognostic factors for recurrence of papillary thyroid carcinoma in the lymph nodes, lung, and bone: analysis of 5,768 patients with average 10-year follow-up. *World J Surg.* 2012 Jun;36(6):1274-8. doi: 10.1007/s00268-012-1423-5.

İnan S, Özbilgin K. Kök hücre: Biyolojik ve klinik yaklaşım. *Sağlıkta Birikim Dergisi* 2009;1:57-65.

J.J. Liu, B. Huang, S.C. Hooi, Acetyl-keto-beta-boswellic acid inhibits cellular proliferation through a p21-dependent pathway in colon cancer cells, *Br. J. Pharmacol.* 148 (2006) 1099–1107.

J.J. Liu, W.C. Toy, S. Liu ve diğ. Acetyl-ketobeta-boswellic acid induces lipolysis in mature adipocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 431 (2013) 192–196.

Jiménez C, Hu MI, Gagel RF. Management of medullary thyroid carcinoma. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2008 Jun;37(2):481-96, x-xi. doi: 10.1016/j.ecl.2008.03.001.

Jocham D, Richter A, Hoffman L, et al. Adjuvant autologous renal tumour cell vaccine and risk of tumour progression in patients with renal-cell carcinoma after radical nephrectomy: phase III, randomised controlled trial. *Lancet* 2004;363:594-599.

Jung CK, Im SY, Kang YJ ve diğ. Mutational patterns and novel mutations of the BRAF gene in a large cohort of Korean patients with papillary thyroid carcinoma. *Thyroid.* 2012 Aug;22(8):791-7. doi: 10.1089/thy.2011.0123. Epub 2012 Apr 3.

Kahan BW, Ephrussi B. Developmental potentialities of clonal in vitro cultures of mouse testicular teratoma. *J Natl Cancer Inst.* 1970 May;44(5):1015-36.

Karaöz E, Aksoy A, Ayhan S ve diğ. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochem Cell Biol*, 2009 132:533-46

Karaöz E, Ovalı E. Kök Hücreler. *Atı Teknoloji yayın no:1. Trabzon.* 2004.

Kayıhan ENGİN, Levent ERİŞEN. Baş –Boyun Kanserleri. *Nobel Tıp Kitabevleri*, 2003

Kebebew E, Greenspan FS, Clark OH ve diğ. Anaplastic thyroid carcinoma. Treatment outcome and prognostic factors. *Cancer.* 2005 Apr 1;103(7):1330-5.

Kebudi A, Calişkan C, Yetkin G ve diğ. The role of pre-operative B mode ultrasound in the evaluation of the axillary lymph node metastases in the initial staging of breast carcinoma. *Acta Chir Belg.* 2005 Sep-Oct;105(5):511-4.

Khakoo AY, Pati S, Anderson SA, Reid W, Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *J Exp Med.* 2006 May 15;203(5):1235-47. Epub 2006 Apr 24.

Kloos RT, Ringel MD, Knopp MV Phase II trial of sorafenib in metastatic thyroid cancer. *J Clin Oncol.* 2009 Apr 1;27(10):1675-84. doi: 10.1200/JCO.2008.18.2717. Epub 2009 Mar 2.

Kucia M, Ratajczak MZ. Stem cells as a two edged sword--from regeneration to tumor formation. *J Physiol Pharmacol.* 2006 Nov;57 Suppl 7:5-16.

Kurtzberg J. Umbilical cord blood: a novel alternative source of hematopoietic stem cells for bone marrow transplantation. *J Hematother.* 1996 Apr;5(2):95-6.

Lane SW, Scadden DT, Gilliland DG. The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities. *Blood.* 2009 Aug 6;114(6):1150-7. doi: 10.1182/blood-2009-01-202606. Epub 2009 Apr 28.

Lanza R, Gearhart J, Hogan B ve diğ. Editors (2009) "Essentials of Stem Cell Biology II ndEd." Academic Press, ISBN 978-0-12-374729-7.

Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P, Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med.* 2004 Nov 25;351(22):2265-75.

Liu J.J, Huan B, Hooi S.C. *Br. J. Pharmacol.*, 2006, 148, 1099

Liu J.J, Nilsson A, Oredsson S ve diğ. *Int. J. Mol. Med.*, 2002, 10, 501

Liu, S., Ginestier, C., Ou, S. J., Clouthier, S. G., Patel, S. H., Monville, F., Kleer, C. G. (2011). Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks. *Cancer research*, 71(2), 614-624.

M. Liu, Q. Wu, P. Chen ve diğ. A boswellic acidcontaining extract ameliorates schistosomiasis liver granuloma and fibrosis through regulating NF-kappaB signaling in mice, *PLoS ONE* 9 (2014) e100129

M. Lu, L. Xia, H. Hua ve diğ. Acetyl-keto-beta-boswellic acid induces apoptosis through a death receptor 5-mediated pathway in prostate cancer cells, *Cancer Res.* 68 (2008) 1180–1186.

Machens A, Hauptmann S, Dralle H. Prediction of lateral lymph node metastases in medullary thyroid cancer. *Br J Surg.* 2008 May;95(5):586-91. doi: 10.1002/bjs.6075.

Mayani H. Biological differences between neonatal and adult human hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells Dev.* 2010 Mar;19(3):285-98. doi: 10.1089/scd.2009.0327.

Mazzaferri EL, Kloos RT. Clinical review 128: Current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Apr;86(4):1447-63.

Mazzaferri EL *Thyroid carcinoma: Papillary and follicular* In: Mazzaferri EL, Saman N (eds). *Endocrine tumors*, Cambridge ,MA : BlackwellScientific , 1993:278-333

- McHenry CR, Phitayakorn R. Follicular adenoma and carcinoma of the thyroid gland. *Oncologist*. 2011;16(5):585-93. doi: 10.1634/theoncologist.2010-0405. Epub 2011 Apr 11.
- McIver B, Hay ID, Giuffrida DF ve diğ. Anaplastic thyroid carcinoma: a 50-year experience at a single institution Surgery. 2001 Dec;130(6):1028-34.
- Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells*. 2003;21(1):50-60.
- Moley JF. Medullary thyroid carcinoma: management of lymph node metastases. *J Natl Compr Canc Netw*. 2010 May;8(5):549-56.
- Moo-Young TA, Traugott AL, Moley JF. Sporadic and familial medullary thyroid carcinoma: state of the art. *Surg Clin North Am*. 2009 Oct;89(5):1193-204. doi: 10.1016/j.suc.2009.06.021.
- Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS ve diğ. Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature*. 1993 Jun 3;363(6428):458-60.
- Niepomnische H, Suárez H, Pitoia F ve diğ. Follicular carcinoma presenting as autonomous functioning thyroid nodule and containing an activating mutation of the TSH receptor (T620I) and a mutation of the Ki-RAS (G12C) genes. *Thyroid*. 2006 May;16(5):497-503.
- Nilsson SK, Simmons PJ. Transplantable stem cells: home to specific niches *Curr Opin Hematol*. 2004 Mar;11(2):102-6.
- Nixon IJ, Witcher MM, Palmer FL ve diğ. The impact of distant metastases at presentation on prognosis in patients with differentiated carcinoma of the thyroid gland. *Thyroid*. 2012 Sep;22(9):884-9. doi: 10.1089/thy.2011.0535. Epub 2012 Jul 24.
- Ogawa K1, Saito A, Matsui H ve diğ. Activin-Nodal signaling is involved in propagation of mouse embryonic stem cells. *J Cell Sci*. 2007 Jan 1;120(Pt 1):55-65.
- Ogawa R. The importance of adipose-derived stem cells and vascularized tissue regeneration in the field of tissue transplantation. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2006 Jan;1(1):13-20.
- Oka M, Yamamoto K, Takahashi M, Hakozi M, Abe T, et al. Relationship between serum levels of IL-6, various disease parameters and malnutrition in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1996; 56:2776-2780.
- Onda T, Honmou O, Harada K Therapeutic benefits by human mesenchymal stem cells (hMSCs) and Ang-1 gene-modified hMSCs after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008 Feb;28(2):329-40. Epub 2007 Jul 18.
- Özcan E, Özcan SSA. Periodontal Rejenerasyonda Kök Hücrenin Yeri Importance Of Stem Cell In Periodontal Regeneration. *Atatürk Üniv. Dis Hek. Fak. Derg*. 2010;20:123-30.
- Özgür Kemik, Ahu Sarbay Kemik , A.Cumhur Dülger Karaciğer Metastazlı Kolon Kanserli Hastalarda İnterlökin-6 Düzeyleri *Van Tıp Dergisi*: 17 (2): 42-45, 2010
- Pandey, R.S, Singh, B.K, Tripathi, Y.B. *Ind. J. Exp. Biol.*, 2005, 43, 509
- Pang X1, Yi Z, Zhang X ve diğ. Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid inhibits prostate tumor growth by suppressing vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis. *Cancer Res*. 2009 Jul 15;69(14):5893-900. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0755. Epub 2009 Jun 30.



- Park JH, Kim DY, Sung IY, Long-term results of spinal cord injury therapy using mesenchymal stem cells derived from bone marrow in humans. *Neurosurgery*. 2012 May;70(5):1238-47; discussion 1247. doi: 10.1227/NEU.0b013e31824387f9
- Pitt SC, Moley JF, Medullary, anaplastic, and metastatic cancers of the thyroid. *Semin Oncol*. 2010 Dec;37(6):567-79. doi: 10.1053/j.seminoncol.2010.10.010.
- Podnos YD, Smith D, Wagman LD ve diğ. The implication of lymph node metastasis on survival in patients with well-differentiated thyroid cancer. *Am Surg*. 2005 Sep;71(9):731-4
- Pungle, P, Banavalikar, M, Suthar A ve diğ. *Exp. Biol.*, 2003, 41, 1460
- Qubain SW1, Nakano S, Baba M, Takao S, Aikou T. Distribution of lymph node micrometastasis in pN0 well-differentiated thyroid carcinoma. *Surgery*. 2002 Mar;131(3):249-56.
- R. Wang, Y. Wang, Z. Gao ve diğ. The comparative study of acetyl-11-keto-beta-boswellic acid (AKBA) and aspirin in the prevention of intestinal adenomatous polyposis in APC(Min/+) mice, *Drug Discov. Ther.* 8 (2014) 25–32.
- R.F. Hoernlein, T. Orlikowsky, C. Zehrer ve diğ. Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid induces apoptosis in HL-60 and CCRF-CEM cells and inhibits topoisomerase I, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288 (1999) 613–619.
- Randolph GW, Thompson GB, Branovan DI ve diğ. Treatment of thyroid cancer: 2007--a basic review. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007;69(2 Suppl):S92-7.
- Ratajczak MZ, Zuba-Surma E, Kucia M, The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. *Leukemia*. 2006 Nov;20(11):1915-24. Epub 2006 Aug 10.
- Reddel RR. Alternative Lengthening Of Telomeres, Telomerase, And Cancer. *Cancer Lett*. 2003 May 15;194(2):155-62.
- Roman S, Mehta P, Sosa JA. Medullary thyroid cancer: early detection and novel treatments. *Curr Opin Oncol*. 2009 Jan;21(1):5-10. doi: 10.1097/CCO.0b013e32831ba0b3.
- Ryu H, Oh JE, Rhee KJ ve diğ. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells cultured at high density express IFN- $\beta$  and suppress the growth of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Lett*. 2014 Oct 1;352(2):220-7. doi: 10.1016/j.canlet.2014.06.018. Epub 2014 Jul 10.
- Sabino de Matos P. Throid epithelial tumors. *Diagnostic Histopathology*, 2008 ;14:236-46
- Sawka AM, Thephamongkhol K, Brouwers M, Thabane L, Browman G, Gerstein HC. Clinical review 170: A systematic review and metaanalysis of the effectiveness of radioactive iodine remnant ablation for well-differentiated thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Aug;89(8):3668-76.
- Shah, K. (2012). Mesenchymal stem cells engineered for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 64(8), 739-748.
- Shaha AR. Management of the neck in thyroid cancer. *Otolaryngol Clin North Am*. 1998 Oct;31(5):823-31.
- Shiozawa Y, Havens AM, Pienta KJ ve diğ. The bone marrow niche: habitat to hematopoietic and mesenchymal stem cells, and unwitting host to molecular parasites. *Leukemia*. 2008 May;22(5):941-50. doi: 10.1038/leu.2008.48. Epub 2008 Feb 28.

Slack JMW What is a stem cell? Wiley Interdiscip Rev Dev Biol. 2018 May 15:e323. doi: 10.1002/wdev.323

Smallridge RC, Ain KB, Asa SL ve diğ. American Thyroid Association guidelines for management of patients with anaplastic thyroid cancer. *Thyroid*. 2012 Nov;22(11):1104-39. doi: 10.1089/thy.2012.0302.

Smallridge RC, Marlow LA, Copland JA. Anaplastic thyroid cancer: molecular pathogenesis and emerging therapies. *Endocr Relat Cancer*. 2009 Mar;16(1):17-44. doi: 10.1677/ERC-08-0154. Epub 2008 Nov 5.

Smith MC, Luker KE, Garbow JR, CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res*. 2004 Dec 1;64(23):8604-12.

Soares P, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simões M. Immunohistochemical detection of p53 in differentiated, poorly differentiated and undifferentiated carcinomas of the thyroid. *Histopathology*. 1994 Mar;24(3):205-10.

Syrovets T, Gschwend J.E , Buchele B ve diğ. *Biol. Chem.*, 2005, 280, 6170

T. Syrovets, B. Buchele, C. Krauss ve diğ. Acetyl-boswellic acids inhibit lipopolysaccharide-mediated TNF-alpha induction in monocytes by direct interaction with IkappaB kinases, *J. Immunol*. 174 (2005) 498–506.

T. Syrovets, J.E. Gschwend, B. Buchele ve diğ. Inhibition of IkappaB kinase activity by acetyl-boswellic acids promotes 84 N.K. Roy et al. / *Cancer Letters* 377 (2016) 74–86 apoptosis in androgen-independent PC-3 prostate cancer cells in vitro and in vivo, *J. Biol. Chem*. 280 (2005) 6170–6180.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M ve diğ. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007 Nov 30;131(5):861-72.

Takahashi K, Yamanaka S (2006): Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult fibroblast Cultures by Defined Factors. *J Cell*, 126: 663- 676.

Tallone T, Realini C, Böhmler A ve diğ. Adult human adipose tissue contains several types of multipotent cells. *J Cardiovasc Transl Res*. 2011 Apr;4(2):200-10. doi: 10.1007/s12265-011-9257-3. Epub 2011 Feb 15.

Tan RK, Finley RK , Driscoll D ve diğ. Anaplastic carcinoma of the thyroid: a 24-year experience. *Head Neck*. 1995 Jan-Feb;17(1):41-7; discussion 47-8.

Tatiana Syrovets, Jurgen E. Gschwend, Berthold Buchele ve diğ. Inhibition of I kB Kinase Activity by Acetyl-boswellic Acids Promotes Apoptosis in Androgen-independent PC-3 Prostate Cancer Cells in Vitro and in Vivo *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Vol. 280, No. 7, Issue of February 18, pp. 6170–6180, 2005 © 2005 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Printed in U.S.A.

Ten Berge D, Kurek D, Blauwkamp T ve diğ. Embryonic stem cells require Wnt proteins to prevent differentiation to epiblast stem cells. *Nat Cell Biol*. 2011 Aug 14;13(9):1070-5. doi: 10.1038/ncb2314.

Thomson JA, Itskovitz EJ, Sharipo SS ve diğ. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998; 282 (5391):1145-7

Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, et al. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7844-8

Tuttle RM, Leboeuf R, Martorella AJ Papillary thyroid cancer: monitoring and therapy. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2007 Sep;36(3):753-78,

Tyler DS, Shaha AR, Udelsman RA ve diğ. Thyroid cancer: 1999 update. *Ann Surg Oncol.* 2000 Jun;7(5):376-98.

Tyler DS. Thyroid cancer: 1999 update. *Ann Surg Oncol* 2000; 7(5): 376-98

Utku Ateş Kök hücreyi tanıyalım FNG & Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi 2016;1(1):19-28 doi: 10.5606/fng.transplantasyon.2016.004

Vercelli A, Mereuta OM, Garbossa D Human mesenchymal stem cell transplantation extends survival, improves motor performance and decreases neuroinflammation in mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis.* 2008 Sep;31(3):395-405. doi: 10.1016/j.nbd.2008.05.016. Epub 2008 Jun 4.

W. Zhao, F. Entschladen, H. Liu ve diğ. Boswellic acid acetate induces differentiation and apoptosis in highly metastatic melanoma and fibrosarcoma cells, *Cancer Detect. Prev.* 27 (2003) 67–75.

Wang, S., Qu, X., and Zhao, R. C. (2012). Clinical applications of mesenchymal stem cells. *J Hematol Oncol*, 5(1), 19

Wend P, Holland JD, Zeibold ve diğ. Wnt signaling in stem and cancer stem cells. *Semin Cell Dev Biol*, 2010; 21(8): 855-863

Williams ED. Thyroid cancer: pathologic and natural history. *Recent Results Cancer Res.* 1980;73:47-55.

Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol.* 2006 Feb;6(2):93-106.

Winking, M Sarikaya S Rahmanian ve diğ. *Neurooncol.*, 2000, 46, 97

Wiseman SM, Loree TR, Rigual NR ve diğ. Anaplastic transformation of thyroid cancer: review of clinical, pathologic, and molecular evidence provides new insights into disease biology and future therapy. *Head Neck.* 2003 Aug;25(8):662-70.

Wobus AM, Boheler KR. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev.* 2005 Apr;85(2):635-78.

Woyach JA, Shah MH. New therapeutic advances in the management of progressive thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2009 Sep;16(3):715-31. doi: 10.1677/ERC-08-0335. Epub 2009 Feb 13.

X. Pang, Z. Yi, X. Zhang ve diğ. Acetyl-11-keto-boswellic acid inhibits prostate tumor growth by suppressing vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis, *Cancer Res.* 69 (2009) 5893–5900

Xia Xue, Fang Chen, Anxin Liu ve diğ. Reversal of the multidrug resistance of human ileocecal adenocarcinoma cells by acetyl-11-keto- $\beta$ -boswellic acid via downregulation of P-glycoprotein signals. *Biosci Trends.* 2016 Nov 15;10(5):392-399. Epub 2016 Aug 19.

Xia, L, Chen D, Han ve diğ. *Mol. Cancer Ther.*, 2005, 4, 381

Y. Qurishi, A. Hamid, P.R. Sharma ve diğ. NF-kappaB down-regulation and PARP cleavage by novel 3-alpha-butyryloxy-beta-boswellic acid results in cancer cell specific apoptosis and in vivo tumor regression, *Anticancer Agents Med. Chem.* 13 (2013) 777–790.

Y. Takada, H. Ichikawa, V. Badmaev ve diğ. Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid potentiates apoptosis, inhibits invasion, and abolishes osteoclastogenesis by suppressing NF-kappa B and NF-kappa B-regulated gene expression, *J. Immunol.* 176 (2006) 3127–3140.

Yang YM, Chang JW. Current status and issues in cancer stem cell study. *Cancer Invest.* 2008 Aug;26(7):741-55. doi: 10.1080/07357900801901856.

Ying QL, Nichols J, Chambers I, ve diğ. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell.* 2003 Oct 31;115(3):281-92.

Yokuş O, Albayrak M. Early and late endocrinologic complications of the hematopoietic stem cell transplantation performed for hematologic malignancies. *J Clin Exp Invest* 2012;3:149-150

Zhang W, Liang Z Comparison between annexin V-FITC/PI and Hoechst33342/PI double stainings in the detection of apoptosis by flow cytometry *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 2014 Nov;30(11):1209-12.

Zhao W, Entschladen, F, Liu, H, ve diğ. *Cancer Detect. Prev.*, 2003, 27, 67.

## ÖZGEÇMİŞ

### Bireysel Bilgiler

**Adı Soyadı:** Ayşenur KAYA

**Doğum yeri ve tarihi:** Sakarya- 04.07.1992

**UYRUĞU:** T.C

**Medeni Durumu:** Bekar

**Çalıştığı kurum:** Kocaeli Üniversitesi

**İletişim Adresi:** Semerciler Mah. Şen Sok. Taşkent Sit. C blok kat: 4 daire 15  
SAKARYA

**Telefon:** 0531 471 89 03

**E-posta adresi:** [kayaysenur92@gmail.com](mailto:kayaysenur92@gmail.com)

### Eğitimi (tarih sırasına göre):

01/2018- Devam ediyor

Anabilim

09/2010-06/2014

Fakültesi

### Yüksek lisans

Kocaeli Üniversitesi, Kök Hücre

Dalı, Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi

Programı -Kocaeli / TÜRKİYE

### Lisans

Sakarya Üniversitesi Fen-Edebiyat

Biyoloji Bölümü-Sakarya /TÜRKİYE

09/2006-06/2010

**Lise**

Sakarya Lisesi- Sakarya /TÜRKİYE

**Yabancı Dili:** İngilizce

**Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar:** Kök Hücre ve Hücresel Tedaviler Derneği

### **Bilimsel Etkinlikler**

XIX. Kök Hücre Ve Doku Mühendisliği Kursu: Temel Kök Hücre Teknikleri Ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları (16-20 Kasım 2015, Kurs Düzenleme Kurulu Üyesi)

XX. Kök Hücre Ve Doku Mühendisliği Kursu: Temel Kök Hücre Teknikleri Ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları (7-11 Aralık 2015, Kurs Düzenleme Kurulu Üyesi)

XXI. Kök Hücre Ve Doku Mühendisliği Kursu: Temel Kök Hücre Teknikleri Ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları (17-21 Ekim 2016, Kurs Düzenleme Kurulu Üyesi)

XXII. Kök Hücre Ve Doku Mühendisliği Kursu: Temel Kök Hücre Teknikleri Ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları (3-7 Temmuz 2017, Kurs Düzenleme Kurulu Üyesi)

XXIII. Kök Hücre Ve Doku Mühendisliği Kursu: Temel Kök Hücre Teknikleri Ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları (2-6 Ekim 2017, Kurs Düzenleme Kurulu Üyesi)

XXIV. Kök Hücre Ve Doku Mühendisliği Kursu: Temel Kök Hücre Teknikleri Ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları (19-23 Şubat 2017, Kurs Düzenleme Kurulu Üyesi)

XXV. Kök Hücre Ve Doku Mühendisliği Kursu: Temel Kök Hücre Teknikleri Ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları (2-6 Nisan 2018, Kurs Düzenleme Kurulu Üyesi)

### **Aldığı Burslar**

Kondrosarkom hayvan modelinde CD8+ T hücre destekli, Mezenkimal kök hücre temelli tedavilerde resveratrolün iyileştirici ve kanser karşıtı etkilerinin karşılaştırılması olarak incelenmesi (TÜBİTAK, Proje No: 215S611)

### **Uluslararası Bilimsel Etkinliklerde Poster Bildirileri**

**Kaya A**, Gacar G, Halbutogullari ZS, Duruk G. Yazir Y 18-21 Mayıs 2017 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry ICHC 2017 Kervansaray Lara Hotel The Apoptotic Effect of the Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid (AKBA) To Anaplastic Thyroid Cancer

Gacar G, Halbutogullari ZS, Kilic KC, **Kaya A**, Utkan T, Yazir Y Investigation of resveratrol's protective and anti-inflammatory effects on thoracic aorta and blood plasma of rats under unpredictable chronic mild stress (UCMS) model (Sözlü Bildiri, 22-25 Aralık 2017, Afyon, Türkiye, International Congress on Molecular Biology and Biotechnology)

Gacar G, Halbutogullari ZS, Kilic KC, **Kaya A**, Utkan T, Yazir Y. Examination of resveratrol's neuroprotective effects on brain cortex and hippocampal tissue of rats exposed unpredictable chronic mild stress (UCMS) model (Poster Bildiri, 3-5 Mayıs 2018, Eskişehir, Türkiye, International Congress for Applied Biological Sciences)

### **Uluslararası Bilimsel Etkinliklerde Sözlü Sunum Bildirileri**

**Kaya A**, Gacar G, Halbutogullari ZS, Duruk G. Yazir Y 21 - 23 Eylül 2017 1. Uluslararası Kanser Ve İyon Kanalları Kongresi, Şanlıurfa Therapeutic Effect Of Acetyl-11-Keto-Beta-Boswellic Acid (AKBA) With Mesenchymal Stem Cells In Anaplastic Thyroid Cancer

## EKLER

### EK 1. Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Onay Formu



T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR  
ETİK KURULU



Etik Kurul Bilgileri	Adı	Kocaeli Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	Adres	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Ara Kat 41380 Umuttepe Yerleşkesi /KOCAELİ
	Telefon	0262 303 74 50
	Faks	0262 303 74 63
	E-Posta	gokaetikkurul@kocaeli.edu.tr

Başvuru Bilgileri	Araştırmanın Adı	Asetil-11-Keto-Beta-Bosvelik Asitin (AKBA) İn Vitro Koşullarda Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre ile Ortak Kültüre Edilen Anaplastik Tiroid Kanser Hücreleri Üzerine Kanser Karşıtı Ve Sitoprotektif Etkilerinin İncelenmesi			
	Araştırma Proje Numarası	KÜ GOKAEK 2016/313			
	Sorumlu Araştırmacı Unvanı/Adı/Soyadı	Yrd. Doç. Dr. Gülçin GACAR			
	Sorumlu Araştırmacının Uzmanlık Alanı	Kök Hücre			
	Araştırma Merkezi	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi KÖGEM			
	Destekleyici				
	Araştırmanın Türü	Yüksek Lisans Tezi			
	Araştırmaya Katılan Merkezler	Tek Merkezli <input checked="" type="checkbox"/>	Çok Merkezli <input type="checkbox"/>	Ulusal <input checked="" type="checkbox"/>	Uluslararası <input type="checkbox"/>

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Var	Yok	Açıklama
	Başvuru Dilekçesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Başvuru Formu	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Araştırmanın Türü	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Koleksiyon Materyalleri ile Yapılacak Olan Çalışma
	Araştırma Protokolü	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Kullanılacak Form Örnekleri	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Aydınlatılmış Onam Formu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Araştırma Bütçesi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Literatür Örneği	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Taahhütname	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Biyolojik Materyal Transfer Anlaşması	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	İzin Belgeleri	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Başhekimlik Onayı	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Özgeçmişler	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Değişiklik Bilgi Formu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Proje Sonuç Formu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Diğer	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		

KÜ Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Onay Formu	Belge Kodu	Rev. Tarihi / No.su:	Sayfa
	Onay formu	21.09.2016/KOGÖEK01.1	1/2



Karar Bilgileri	Karar No: KÜ GOKAEK 2016/20.7	Proje No: 2016/313	Tarih: 30/11/2016
	Yrd. Doç. Dr. Gülçin GACAR sorumluluğunda yapılan ve yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler, araştırmanın gerekçesi, amacı, yaklaşım ve yöntemleri, gönüllüler için beklenen yarar ve riskler dikkate alınarak değerlendirilmiş ve araştırmanın ilgili protokol doğrultusunda belirtilen merkezlerde yürütülmesi etik açıdan, <input checked="" type="checkbox"/> Uygun bulunmuştur. <input type="checkbox"/> Eksikliklerin tamamlanması koşulu ile uygun bulunmuştur.* <input type="checkbox"/> Uygun bulunmamıştır.*		

Dayanakları	Hasta Hakları Yönetmeliği (01.08.1998/23420); Biyoloji ve Tıbbın Uygulanması Bakımından İnsan Hakları ve İnsan Haysiyetinin Korunması Sözleşmesi; İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesinin Uygun Bulunduğuna Dair Kanun (09.12.2003/25311); Biyotıp Araştırmalarına İlişkin İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesine Ek Protokolün Onaylanmasının Uygun Bulunduğuna Dair Kanun (29.03.2011/27899); İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik (13.04.2013/28617); Tıbbi Cihaz Klinik Araştırmaları Yönetmeliği (06.09.2014/29111); Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi; İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu; Türk Tabipleri Birliği Hekimlik Meslek Etiği Kuralları; Türk Tabipleri Birliği Araştırma Etiği Bildirgesi
-------------	--

**Etik Kurul Üyeleri**

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile İlişki		Toplantıda Bulunma		İmza
			E	K	E	H	E	H	
Prof. Dr. Kadir Babaoğlu Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. İ. Erdem Okay Üye	Genel Cerrahi	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Canan Baydemir Üye	Biyostatistik	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Selcen Göçmez Üye	Farmakoloji	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Özlem Yıldız Gündoğdu Üye	Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Haluk Emre Özel Üye	Restoratif Diş Tedavisi	Kocaeli Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Yusufhan Yazır Üye	Histoloji ve Embriyoloji	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	İlişkili
Yrd. Doç. Dr. Aslıhan Akpınar Raportör	Tıp Tarihi ve Etik	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Ceyla Eraldemir Üye	Biyokimya	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

\* Gerekçe ve öneriler:

KÜ Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Onay Formu	Belge Kodu	Rev. Tarihi / No.su:	Sayfa
	Onay formu	21.09.2016/KOGOEK01.1	2/2

### Ek 3. Tez Denetleme Listesi

Tez, aşağıdaki denetimler yapılarak tamamlanmıştır.

- Kapak ve iç kapak sayfalarında BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA şeklinde elde edilen unvanlar yazıldı (Kapak sayfasına danışman adı yazılmamalıdır).
- Kapak sayfasına mezun olunan PROGRAMIN (Anabilim dalının değil) adı yazıldı.
- Tez kapağı sırt kısmına kılavuzda belirtilen çizimde (yazının yönüne dikkat!) ad, program, yıl yazıldı.
- Onay sayfası uygun çizimde hazırlandı (kazanılan unvanlar BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA olmalıdır) imzalatıldı (Enstitü Müdürü'nün imzası da gereklidir, imzaların aynı renk kalemle atılmasına dikkat edilmelidir).
- Dizinler kılavuzda belirtildiği gibi sıralandı.
- Ön sayfalara i, ii, iii şeklinde Roma rakamları konuldu.
- Sayfa numaraları kılavuzda belirtildiği şekilde konuldu.
- Sayfa düzeni kılavuzda belirtildiği şekilde yapıldı.
- Ana metin yazı boyutu 12 olacak biçimde basıldı.
- Dipnot yazı boyutu 10 olacak şekilde basıldı.
- Ana metin satır aralığı 1.5 olacak şekilde yazıldı.
- Kaynaklar abecesel sıralamaya göre yazıldı.
- Kaynak gösterme ilkelerine ve yazım kurallarına uyuldu.
- Ekler kılavuzda belirtildiği gibi verildi.

Tarih 22.06.2018

Danışman Dr.Öğr.Üyesi Gülçin GACAR

