



T.C.  
EGE UNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**URSODEOKSİKOLİK ASİDİN SİROLİMUSA MARUZ  
KALMIŞ YAĞ DOKU KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK  
HÜCRE HATTI ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Yüksek Lisans Tezi**

Esra ARISU NAGHAVİ

Kök Hücre Anabilim Dalı

**İzmir  
2019**

T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**URSODEOKSİKOLİK ASİDİN SİROLİMUSA MARUZ  
KALMIŞ YAĞ DOKU KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK  
HÜCRE HATTI ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Esra ARISU NAGHAVİ

Danışman

Prof. Dr. Yiğit UYANIKGİL

Kök Hücre Anabilim Dalı

İzmir

2019

## TEZ ONAY SAYFASI

**Kurum Adı** : EGE ÜNİVERSİTESİ

**Anabilim Dalı** : KÖK HÜCRE

**Program** : KÖK HÜCRE

**Tez Konusu** : URSODEOKSİKOLİK ASİDİN SİROLİMUSA MARUZ KALMIŞ YAĞ DOKU KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRE HATTI ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

**Danışman** : Prof. Dr. YİĞİT UYANIKGİL

**Tezi Hazırlayan** : ESRA ARISU NAGHAVİ

**Değerlendirme Kurulu Üyeleri** :

**Adı Soyadı**

**Başkan(Danışman)**

**Üye / İmza**

**Üye / İmza**

: Prof. Dr. YİĞİT UYANIKGİL

: Prof. Dr. DİLEK TAŞKIRAN

: Prof. Dr. MELTEM KURUŞ

**Tezin Kabul Edildiği Tarih** : 27.05.2019

## ÖZET

### URSODEOKSİKOLİK ASİDİN SİROLİMUSA MARUZ KALMIŞ YAĞ DOKU KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRE HATTI ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Mezenkimal kök hücre (MKH) tedavileri günümüzde tıbbın birçok alanında deneysel ve klinik olarak uygulamaya girmiş önemli tedavi yöntemleridir. Klinik vakalarda organ nakli sonrasında immunsupresif ilaçların yanında destek amaçlı olarak hastalara MKH nakledilmesi gittikçe yaygınlaşmaktadır. Yapılan bu çalışmadaki amaç organ nakillerinde immunsupresif amaçla kullanılan Sirolimus'un, insan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerinin araştırılması ve antioksidan özelliği bilinen Ursodeoksikolik asitin (UDKA), bu toksisite üzerine etkilerinin araştırılmasıdır.

İnsan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücre hattı ticari olarak temin edilmiştir. Özel besiyerleri içinde üretilen insan mezenkimal kök hücreleri yeterli sayıya ulaşana kadar 37 ° C'de inkübe edilmiştir. Etkin maddelerin sitotoksik etkileri WST-1 testi ile zaman ve doz bağımlı olarak değerlendirilmiştir. Canlılık ve proliferasyon analizleri için ışık mikroskobu ve hücre sayım cihazı, apoptoz ve hücre siklusu değerlendirmeleri için ise Muse® hücre analiz cihazı kullanılmıştır. Biyokimyasal yöntemlerle lipit peroksidasyonu, süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi, katalaz (CAT) aktivitesi, glutatyon peroksidaz (GPX) aktivitesi ölçülmüştür.

Gruplara uygulanan ajanların sitotoksik dozları WST-1 testi ile bulunmuştur. Anneksin V ile apoptotik olmayan, erken apoptotik, geç apoptotik, toplam apoptotik ve ölü hücreler hem yüzde olarak hem de hücre/ml olarak hesaplanmıştır. Oksidatif stresle oluşan ve reaktif oksijen metabolitlerinin verdiği zararı belirlemek amacıyla lipit peroksidasyonu, SOD aktivitesi, CAT aktivitesi, GPX aktivitesi ölçülmüştür.

İnsan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerde Sirolimus IC<sub>50</sub> dozu (48. saat) için 15,85 µM olarak belirlenmiştir. UDKA için ise çalışılan dozlarda sitotoksik etki gözlemlenmemiştir. Bu yüzden en yüksek sabit doz olan 100 µM ile çalışmaya devam edilmiştir. Muse® hücre cihazı ile yapılan ölçümler ve yapılan hesaplamalar

doğrultusunda kontrol grubunda ölü hücre %1.03, canlı hücre %98.97 olarak hesaplanmıştır. UDKA grubunda ölü hücreler %2.59, canlı hücreler %97.41 olarak hesaplanmıştır. Sirolimus grubunda erken apoptoz %7.69, geç apoptoz %4.31, ölü hücre %8.10, canlı hücre %79.90 olarak hesaplanmıştır. Sirolimus + UDKA kombine grupta erken apoptoz oranı %3.90, geç apoptoz oranı %1.34, ölü hücre %7.81, canlı hücre %86.95 olarak ölçülmüştür. Hücre siklusu analizinde kontrol ve UDKA grubunda G2/ M fazlarının yüzdeleri sırasıyla % 19.3 ve 18.9' dur. Sirolimus uygulama grubunda G2/ M fazı yüzdesi 15.9 'a düşmüştür. Biyokimyasal bulgular ise MDA düzeylerinde UDKA-kombine grubu; GSH-Px düzeyleri açısından Kontrol-UDKA dışındaki tüm ikili gruplar; CAT düzeyleri açısından kontrol-UDKA; kontrol-kombine; UDKA- Sirolimus ve UDKA- kombine grupları; SOD düzeyleri açısından tüm gruplar arası ikili farkların tümü istatistiksel olarak anlamlı olarak saptanmıştır (p<0.001).

Çalışmada, Sirolimusun mezenkimal kök hücrelerdeki apoptozu arttırması literatürle uyumlu bir sonuçtur. UDKA'nın hücre proliferasyonu düzenlediğini gösteren bulguların varlığı ve UDKA'nın antiapoptotik etkileri bu çalışmanın kombine grupta UDKA'nın sirolimus etkisini baskılamasıyla uyumlu olduğu görülmüştür. Organ ve doku nakilleri sonrası immunsupresif tedavi ve yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücre uygulamasında, UDKA kullanımı, mezenkimal kök hücrelerin üzerinde pozitif etkiler göstermiştir.

**Anahtar kelimeler:** Sirolimus; Ursodeoksikolik asit; yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücre; Oksidatif stres

## **ABSTRACT**

### **INVESTIGATION OF URSODEOXYCHOLIC ACID EFFECTS ON SIROLIMUS TREATED AND ADIPOSE DERIVED MESENCYHMAL STEM CELL LINE**

Mesenchymal stem cell therapies are important therapeutic modalities that have been applied experimentally and clinically in many fields of medicine today. Transplantation of mesenchymal stem cells into patients for supportive purposes besides immunosuppressive drugs is becoming common after organ transplantation in clinical cases. The aim of this study is to investigate the cytotoxic effects of Sirolimus, which is used for immunosuppressive purposes in organ transplants, on mesenchymal stem cells derivating from human adipose tissue and to investigate the effects of ursedeoxycholic acid (UDCA), which is known to have antioxidant properties, on this cytotoxicity.

The human adipose tissue-derived mesenchymal stem cell line is commercially available. Human mesenchymal stem cells produced in special media which were incubated at 37 ° C until sufficient numbers were reached. The cytotoxic effects of the active substances were assessed by time and dose-dependent WST-1 test. Light microscopy and cell counting device were used for vitality and proliferation analyzes. Muse was used for evaluation of apoptosis and cell cycle in cell analyzer. Lipid peroxidation, superoxide dismutase (SOD) activity, catalase (CAT) activity, glutathione peroxidase (GPX) activity were measured by biochemical methods.

Cytotoxic doses of the agents administered to the groups were found by the WST test. Non-apoptotic, early apoptotic, late apoptotic, total apoptotic and dead cells were calculated as both percent and cell/ml by Annexin V. Lipid peroxidation, SOD activity, CAT activity, GPX activity were measured to determine the damage caused by oxidative stress and reactive oxygen metabolites.

In human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, Sirolimus IC<sub>50</sub> was determined as 15.85 µM for dozen (48th hour). For UDCA, no cytotoxic effect was observed at the doses studied. Therefore, the study continued with the highest fixed dose of 100 µM. In the control group, according to the measurements made with

Muse® cell analyzer the calculations made, the dead cell was calculated as 1.03% and the living cell as 98.97%. In the UDCA group, dead cells were calculated as 2.59% and living cells as 97.41%. In the Sirolimus group, early apoptosis was calculated as 7.69%, late apoptosis as 4.31%, dead cell as 8.10% and live cell as 79.90%. In the combined group of Sirolimus+ UDCA early apoptosis rate was 3.90%, late apoptosis rate was 1.34%, dead cell was 7.81% and viable cell was 86.95%. In the cell cycle analysis, the percentages of the G2/ M phases in the control and UDCA groups were 19.3% and 18.9%, respectively. The percentage of G2/ M phase in the Sirolimus treatment group was reduced to 15.9. Biochemical findings were; MDA- combined group; All binary groups except for Control- UDCA in terms of GSH-Px levels; Control in terms of CAT levels- UDCA; control-combined; UDCA- Sirolimus and UDCA- combined groups; SOD levels were statistically significant ( $p < 0.001$ ).

In the study, Sirolimus was found to be compatible with the literature in promoting apoptosis in mesenchymal stem cells. The presence of evidence that UDCA regulates cell proliferation and the antiapoptotic effects of UDCA have been shown to be consistent with suppressing the Sirolimus effect in the combined group. In immunosuppressive treatment after organ and tissue transplantation and in adipose tissue-derived mesenchymal stem cell application, the use of UDCA showed positive effects on mesenchymal stem cells.

**Key Words:** Sirolimus; Ursodeoxycholic acid; oxidative stress; human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	v
TABLolar DİZİNİ .....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	ix
GRAFIKLER DİZİNİ .....	x
KISALTMALAR DİZİNİ .....	xi
GİRİŞ .....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
1.1 Kök Hücre Nedir? .....	3
1.2 Kök Hücrelerin Sınıflandırılması .....	4
1.2.1 Mezenkimal Kök Hücreler.....	5
1.2.1.1 Mezenkimal Kök Hücrelerin Tarihçesi.....	5
1.2.1.2 Mezenkimal Kök Hücre Tanımı ve Kaynakları.....	6
1.2.1.3 Mezenkimal Kök Hücreler Tarafından Salgılanan Faktörler .....	7
1.2.1.4 Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmunmodülatör Etkileri.....	7
1.2.1.5 Mezenkimal Kök Hücrelerin Terapötik Potansiyeli.....	8
1.3 İmmünyüpresyon .....	10
1.3.1 İmmünyüpresif Ajanlar .....	11
1.3.1.1. Sirolimus Ve Etki Mekanizması .....	12
1.4 Ursodeoksikolik asit (UDKA) ve Hücreyel Tedavideki Yeri .....	13
GEREÇ VE YÖNTEM.....	15
2.1 Hücre Kültürü Çalışmaları .....	15
2.1.1. Hücrelerin Kültür Ortamında Çoğaltılması .....	15
2.1.2. Hücrelerin Çözülmesi.....	17



2.1.3. Hücre Canlılığının Hesaplanması .....	18
2.1.4. Hücrelerin Pasajlanması .....	19
2.1.5. Hücrelerin Dondurulması .....	20
2.2. Etken Maddenin Kullanıma Hazırlanması .....	20
2.3. Sitotoksikite Testleri .....	20
2.4. Kombinasyon Gruplarının Oluşturulması.....	22
2.5. Annexin V Yöntemi ile Apoptotik Hücre Analizi.....	24
2.6. Hücre Döngüsünün Belirlenmesi .....	25
2.7 Oksidatif Stres Analiz Parametreleri .....	27
2.7.1. Lipit Peroksidasyonu (MDA) Ölçümü .....	27
2.7.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Ölçümü .....	29
2.7.3. Katalaz (CAT) Aktivitesi Ölçümü.....	31
2.7.4. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Ölçümü.....	33
2.8. İstatistiksel Değerlendirme Yöntemi .....	35
<b>BULGULAR .....</b>	<b>36</b>
3.1. Sirolimus ve UDKA'nın İnsan ADKH Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi .....	36
3.2 Annexin V Yöntemi ile Yapılan Apoptoz Analizi Bulguları.....	40
3.3 Muse® Cell Cycle Kiti İle Yapılan Hücre Siklusu Analizi Bulguları.....	41
3.4 Hücre Canlılık Analizlerinin İstatistiksel Değerlendirilmesi .....	43
3.4.1. Ölü Hücre Yüzdesi.....	43
3.4.2. Geç Apoptoz/Ölü Yüzdesi .....	44
3.4.3. Erken Apoptoz Yüzdesi.....	45
3.4.4. Canlı Hücre Yüzdesi.....	46
3.5 Oksidatif Stres Analiz Parametreleri Bulguları .....	47
3.5.1 Lipit Peroksidasyonu (MDA) Ölçümü Bulgusu .....	47
3.5.2 Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Ölçümü Bulgusu .....	48

3.5.3 Katalaz (CAT) Aktivitesi Ölçümü Bulgusu.....	49
3.5.4 Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Ölçümü Bulgusu.....	50
3.6 Oksidatif Stres Parametrelerinin İstatiksel Değerlendirilmesi.....	51
3.6.1. Lipit Peroksidasyon (MDA) Düzeyi .....	51
3.6.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) düzeyi .....	52
3.6.3. Katalaz (CAT) düzeyi.....	53
3.6.4. Süperoksit Dismutaz (SOD) düzeyi.....	54
TARTIŞMA .....	57
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	66
KAYNAKLAR .....	67
ÖZGEÇMİŞ.....	77

## TABLÖLAR DİZİNİ

**Tablo 1.** Hücre Canlılığı analizlerinin istatistiksel değerlendirme tablosu. .... 55

**Tablo 2.** Biyokimyasal parametrelerin istatistiksel değerlendirme tablosu..... 56



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. MKH hücrelerinin kültüre edilmesinde kullanılan kimyasallar .....	16
Şekil 2. 75 cm <sup>2</sup> lik flaslara ekilen insan yağ doku kaynaklı MKH .....	17
Şekil 3. ArthurTM Cihazının dış görünümü .....	18
Şekil 4. İnsan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin üçüncü pasajdaki mikroskopik görünümü .....	19
Şekil 5. Wst-1 testi plak planı .....	21
Şekil 6. Kombinasyon grubunun oluşturulma planı .....	23
Şekil 7. Apoptoz analizi için deney gruplarının plaktaki yerleşimi .....	24
Şekil 8. Hücre döngüsünün tayini için oluşturulan flask .....	25
Şekil 9. Muse® Cell Analyzer Cihazının görünümü .....	26
Şekil 10. Lipit Peroksidasyonu ölçümü için hazırlanan plak yerleşim planı .....	28
Şekil 11. Peroksidaz ölçümü için hazırlanan plak yerleşim planı .....	30
Şekil 12. Katalaz aktivitesi ölçümü için hazırlanan plak yerleşim planı .....	31
Şekil 13. Süperoksit dismutaz aktivitesi ölçümü için hazırlanan plak yerleşim planı.	33
Şekil 14. Sirolimus açık formülü (Taylor et al., 2005). Sirolimusun Etki Mekanizması (Cutler & Antin, 2004) .....	57
Şekil 15. Mezenkimal kök hücrelerin immunmodülatör etkileri (Frenette et al., 2013). T hücre aktivasyonu için gereken 3 sinyal (Halloran, 2004) .....	58

## GRAFİKLER DIZINI

<b>Grafik 1.</b> ADKH' lerinde sirolumusun IC <sub>50</sub> dozu. ....	37
<b>Grafik 2.</b> ADKH' lerinde UDKA'nın sitotoksik etkinliği. ....	38
<b>Grafik 3.</b> ADKH' lerinde Sirolumus ve UDKA kombinasyon dozları. ....	39
<b>Grafik 4.</b> Muse® Cell Analyzer ile yapılan ölçümlerin gruplara göre dağılımı ..... 40	40
<b>Grafik 5.</b> Muse Cell Cycle Kiti ile Yapılan Hücre Siklusu Analizi Bulguları..... 41	41
<b>Grafik 6.</b> Ölü hücre yüzdesi istatistiksel grafiği. ....	43
<b>Grafik 7.</b> Geç apoptoz/öly yüzdesi istatistiksel grafiği. ....	44
<b>Grafik 8.</b> Erken apoptoz yüzdesi istatistiksel grafiği. ....	45
<b>Grafik 9.</b> Canlı hücre yüzdesi istatistiksel grafiği. ....	46
<b>Grafik 10.</b> MDA standart eğrisi ..... 47	47
<b>Grafik 11.</b> NADPH standart eğrisi. .... 48	48
<b>Grafik 12.</b> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> standart eğrisi ..... 49	49
<b>Grafik 13.</b> SOD Aktivitesi. .... 50	50
<b>Grafik 14.</b> MDA düzeyi istatistiksel grafiği (p=0.001). .... 51	51
<b>Grafik 15.</b> GSH-Px düzeyi istatistiksel grafiği. .... 52	52
<b>Grafik 16.</b> CAT düzeyi istatistiksel grafiği. .... 53	53
<b>Grafik 17.</b> SOD düzeyi istatistiksel grafiği. .... 54	54

## KISALTMALAR DİZİNİ

CD	Clusters of Differentiation
mTOR	Sirolimusun Memelideki Hedef Proteini
UDKA	Ursodeoksikolik asit
Oct-4	Octamer-binding Transcription Factor
Sox	Sry-box Containing Gene
HLA	İnsan Lökosit Antijeni
SVF	Stromal Vascular Fraction
CFU-F	Fibroblast kolonisi oluşturan birim
FKBP12	Takrolimusn bağlayıcı protein
EKH	Embriyonik kök hücre
MKH	Mezenkimal kök hücre
YKH	Yetişkin kök hücre
TSC	Tüberoz skleroz
EGF	Epidermal Growth Factor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
KGF	Keratinocyte Growth Factor
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
HGF	Hepatocyte Growth Factor
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor Beta
IGF	İnsulin-like Growth Factor
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
Flt3	Fms-like Tyrosine Kinase-3

G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor
IL	İnterlökin
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor Alfa
NK	Naturel Killer
SDF-1	Stroma kökenli faktör
MHC	Major Histocompatibility Complex
IGN- $\gamma$	Interferon Gama
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
PGE2	Prostoglandin E2
NO	Nitric Oxide
STAT5	Signal transducer and activator of transcription 5
Th2	Type 2 T helper cells Treg: Regulatory T Cells
Ig	İmmunoglobulin
RTK	Reseptör tirozin kinaz
ASH	Antijen sunucu hücreler
THR	T hücre reseptörü
PI3K	Fosfatidilinositol-3 kinaz
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-fosfat
MAP	Mitojenle active protein
DC	Dendritic cell
$\Gamma\delta$ T	Gama Delta T cells
iDC	Immature dendritic cells

mDC	Mature dendritic cells
GVHH	Graft Versus Host Hastalığı
NF-AT	Aktive Olmuş T Hücresi Nükleer Faktörü
AP-1	Aktifleştirici protein 1
KDKA	Kenodeoksikolik asit
F	Fosfat
LH	Luteinleştirici Hormon
AKH	Adipoz Kökenli Kök Hücre
DMSO	Dimetilsülfoksit
FBS	Fetal Bovine Serum
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
PS	Phosphatidylserine
PBS	Phosphate buffered saline
T-AOK	Total antioksidatif kapasite
MDA	Malondialdehit
D	Dilüsyon Faktörü
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
CAT	Katalaz
SOD	Süperoksit Dismutaz



## GİRİŞ

Dünyada her yıl çok sayıda insan organ yetmezliği problemiyle karşı karşıya kalmakta ve organ nakline ihtiyaç duymaktadır. Büyük umutlarla beklenen organ nakilleri sonrasında her bireyin kendisine özgü bağışıklık sistemi ise aşılması gereken en büyük sorundur (Wong & Pagalilauan, 2015). Bağışıklık sistemi kendine ait olan ile olmayanı birbirinden ayırt etme, gerekli durumlarda ise savunma mekanizmasını harekete geçirme üzerine kurulu eşsiz bir sistemdir. Kişinin kendi dokusu tekrar kendisine nakledilirse (otolog) bağışıklık sistemi kendi doku ve hücrelerini tanımakta ve bu durum bağışıklık sistemi tarafından bir sorun oluşturmamaktadır. Fakat farklı vericiden yapılan nakil işlemlerinde (allojenik) alıcının bağışıklık sistemi yabancı organlara karşı vücudu korumaya çalışarak onu reddetmektedir (Watson & Dark, 2012).

Nakil işleminde alıcının kendine nakledilen organı yabancı saymasını önlemek ve alıcıda grefte karşı tolerans oluşturmak amacıyla immunsupresif tedavi uygulanmaktadır. Bu amaçla immunsupresif ajanlar kullanılmaktadır. Bu ajanların sayısı da gün geçtikçe artmakta ve gelişmelerle daha etkili, daha güvenli ve daha hedefe yönelik bir tedavi nakillerdeki başarıların artışına katkıda bulunmaktadır (Halloran, 2004).

İmmunsupresif ajanlardan bir tanesi de bu çalışmada kullanılan Sirolimus adlı etken maddedir. İlk kez 1975 yılında Paskalya Adası- Rapa Nui olarak bilinen Güney Pasifik'teki küçük bir adadan alınan toprak örneğinden izole edilmiştir. Sirolimus *Streptomyces hygroscopicus* tarafından üretilen makrolid bir laktondur. İmmunsupresif etkisini immun yanıt oluşturmada kilit rol oynayan T hücrelerinden sentezlenen IL-2 (interlökin-2)'nin kendisini çoğalmak üzere ko-stimule etmesini bloke ederek göstermektedir. Bunu spesifik hücre içi reseptörü olan FKBP12 ve mTOR (Sirolimusun memelideki hedef proteini) proteinine bağlanması sonucu oluşturduğu kompleks yapıyla, mTOR yolağının düzenleyicisi olan raptor proteinin mTOR'a bağlanmasını önleyerek, yani bu yolağının işleyişine engel olarak gerçekleştirmektedir (Halloran, 2004, Tsang et al., 2007).

İmmunsupresif ilaçların yan etki profili araştırmacıların yeni arayışlara girmesine sebep olmuştur. Bu araştırmaların odak noktalarından biriside vücudumuzda bulunan

tüm hücre, doku ve organların temelini oluşturan, özelleşmemiş, ancak farklı hücre tiplerine dönüşebilme yeteneğinde olan, kendini yenileyebilen, rejeneratif tıp ve doku tamiri alanında da sıkça kullanılan kök hücreler olmuştur. Bu noktada MKH'lerin diğer kök hücrelerden farklı olarak çok sayıda sitokin, kemokin, enzim ve ekstraselüler matriks proteini sentezleyerek bağışıklık sistemini düzenleyici etkiler göstermesi dikkatleri çekmiştir (Murphy et al., 2013, Frenette et al., 2013, Ma et al., 2014). Klinikte organ nakilleri sonrasında immunsupresyon amaçla MKH kullanımı gündeme gelmiştir. Böylece immunsupresif olarak MKH'lerin ve immunsupresif ilaçların birlikte kullanıldığı yeni bir döneme girilmiştir. Bu noktada netleştirilmesi gereken en önemli unsur immunsupresif ajanlarla MKH'lerin birlikte kullanımlarının kök hücre biyolojisi ve sitotoksik açıdan etkilerinin ortaya konmasıdır.

Ursodeoksikolik asit (UDKA) ilk kez Siyah Çin Ayısı'nın safra asitinin kurutulmasıyla elde edilmiş makrosiklik bir laktondur (Roma et al., 2011). Klinikte karaciğer, böbrek, safra taşı eritilmesi gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmakta olan bir ajandır. Bunun yanı sıra allojenik kök hücre nakillerinde hepatik komplikasyonları önlemek amacıyla da kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar ise UDKA'nın anti-inflamatuar, immunmodülatör özellikte olduğunu ve in vitro ve in vivo ortamda oksidatif strese karşı direnç kazandırdığını göstermiştir (Lapenna et al., 2002). Yapılan literatür taramasında mezenkimal kök hücreler üzerindeki etkisine yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmanın amacı; organ nakillerinde immunsupresif ajan olarak kullanılan Sirolimusun insan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücre hattı üzerindeki etkilerini ve antioksidan bir ajan olan UDKA'nın Sirolimus nedenli toksisite üzerine kullanılma potansiyelinin araştırılmasıdır.

## GENEL BİLGİLER

### 1.1 Kök Hücre Nedir?

Kök hücreler genel olarak vücudumuzdaki tüm organ, doku ve hücrelere kaynaklık eden, henüz farklılaşmamış ancak farklı hücre tiplerine dönüşebilme yetkinliğine sahip (potensi), kendini yenileyebilen (mevcut kök hücre havuzu yenilenmesi) ve klon oluşturma yetisinde (tek bir kök hücreden fazla sayıda yeni kök hücrenin oluşması) olan hücreler olarak tanımlanmaktadır (Can, 2013, Weissman et al., 2001). Kök hücrelerin tanımında yola çıkarak baktığımızda fonksiyonel olarak farklılaşmamış, potansiyel olarak heterojen olan kök hücreler temelde 3 özellik ile tanımlanabilir.

**Kendini yenileyebilme (Self-renewal):** Kök hücreler, özelleşmeden çoğalarak kendini yenileyebilme, gerektiğinde ise organ ve dokulara özel öncü hücrelere dönüşebilme yeteneğine sahiptirler. Bölünme sırasında bir yandan öncü hücreye farklılaşacak hücreleri üretirken diğer yandan da kendi yedeğini oluşturmaktadırlar, bu durum ‘asimetrik hücre bölünmesi’ olarak tanımlanmaktadır. Bu özellik gelişim sürecinde hücrelerin yayılması, yetişkin dokuların korunması ve yaralanma sonrası iyileşme için kök hücrelerin sahip olduğu önemli bir özelliktir (He et al., 2009). Bazen de bölünen hücreler iki adet farklılaşacak hücreyi oluşturabileceği gibi iki adet kök hücreyi de meydana getirebilir ki buna ‘simetrik hücre bölünmesi’ denir. Böylelikle özellikle doku işlevinin harabiyeti gibi durumlarda kısa zamanda onarımı garanti altına alınmış olur. Doku onarımı, doku hacminin genişlemesi ve embriyonun gelişim süreci gibi durumlarda yeni hücre ihtiyacını karşılayabilmek için simetrik bölünmede gereklidir (Can, 2008).

**Pluripotensi (Köklülük):** Kök hücrelerin diğer hücrelerden ayırt edilmesini sağlayan hücresel ve moleküler özelliklerini tanımlamak için pluripotensi kavramı kullanılmaktadır. Hücrelerin yüzeyinde yer alan belirteçler veya hücre- hücre adezyon molekülleri kullanılarak kök hücre tipi belirlenebilmektedir. Bu belirteçlerden birçoğu farklılaşma kümeleri (Clusters of differentiation, CD) olarak bir başlık altında toplanmıştır. Ektoderm, endoderm ve mezoderm tabakalarına ve bu üç germ yaprağının türevlerine farklılaşabilme kabiliyetine köklülük denir (Cavaleri & Schöler, 2009, Weissman, 2000).

**Farklılaşma (Plastisite);** Farklılaşma işlevsel olarak olgun bir hücre olma yolunda geçirilen biyokimyasal ve fenotipik olaylar bütünü olarak tanımlanabilir. Bu süreç hücredeki sitoplazmik farklılıklar, asimetrik hücre bölünmesi, hücre dışı matriks proteinleri, kararlanma aşamaları, histon ve gen metilasyonları, epigenetik kontrol, sinyal yollarının karmaşık iletişimleriyle gerçekleşmektedir (Tekeli, 2016).

Kök hücreler farklılaşma kapasitelerine göre totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent olarak adlandırılır. Totipotent kök hücreler teorik olarak bir organizmayı oluşturma kapasitesine sahip hücrelerdir. Zigot ilk totipotent hücredir. Bu hücreler; ekstraembriyonik yapı olan göbek kordonu, amniyon kesesi, Wharton Jeli ve plasentayı oluşturarak pluripotent, multipotent, unipotent özellik gösterebilirler. Pluripotent hücreler ise tüm germ yapraklarına (endoderm, ektoderm, mezoderm) ait dokuları oluşturabilme kapasitesine sahiptir (Eckfeldt et al., 2005). Pluripotent hücreler fetal veya yetişkin hücre tiplerini oluşturabilir fakat bir organizmayı oluşturabilme yeteneğine sahip değildirler. Multipotent kök hücrelerin farklılaşması ise daha sınırlı sayıda olup insan vücudunda sadece birkaç hücre türüne dönüşebilen hücrelerdir. Laboratuvar ortamında gerekli koşullar ve sinyaller sağlandığında daha fazla hücre türüne dönüşebilmeleri mümkündür. Unipotent hücreler ise gelişmiş bir organizmada tek bir hücre grubuna farklılaşma yeteneği olan hücrelerdir (Can, 2013).

## **1.2 Kök Hücrelerin Sınıflandırılması**

Literatürde kök hücrelerin çok çeşitli sınıflandırmaları mevcuttur. Kök hücreleri organizmanın yaşam sürecinde bulunduğu döneme göre (embriyo, fetüs, yetişkin olarak) sınıflandırma daha genel bir sınıflandırmadır. Buna göre; embriyonik kök hücreler (EKH); Blastokist aşamasındaki embriyonun (4-5 günlük) iç hücre kitlesinde yer alan, pluripotent karakterde yani gelişim sırasında embriyoya ait 3 germ tabakasına (endoderm, mezoderm, ektoderm) ve bu tabakalardan köken alan farklı hücre tiplerine dönüşebilme yetkinliğinde olan hücrelerdir. EKH'ler uygun besi ortamı ve kültür şartları sağlandığında indüklenecek farklı hücre tiplerine dönüşebilirler. Embriyonik kök hücrelerin tedavide kullanımında en cezbedici nokta farklılaşmasının istenilen yönde kontrol edilebilir olmasıdır (Can, 2013). Ancak ülkemizde birçok ülkede etik, dinsel ve politik sorunlar nedeniyle EKH kullanımı sınırlandırılmıştır (Ara, 2005).

Fetal kök hücreler; Embriyo dışı dokular olan plasenta, kordon kanı, göbek kordon stroması, amniyon sıvısı ve amniyon zarından elde edilen hücrelerdir. Fetal kök hücreleri, embriyo kök hücreleri ve yetişkin kaynaklı kök hücreler arasında çoğalma ve farklılaşma özelliği göstermektedir (Can, 2013). Yüzey belirteçleri açısından bakıldığında ise bu hücrelerin hem embriyo kök hücreleri hem de yetişkin kök hücreleri ile benzer markırlara sahip olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (Barcena et al., 2011). Bu hücrelerin gebelik sırasında veya doğumu takiben birkaç dakika içinde kolaylıkla ve etik problemlere yol açmadan elde edilebilir olması, araştırma ve hücrenel tedavide uygulanabilme açısından avantaj sağlamıştır (Karahuseyinoglu et al., 2007).

Yetişkin kök hücreleri (YKH); Uzun süre kendisini yenileyebilme ve organizmanın yaşam sürecinde onarım kapasitesine sahip, erişkinde başta kemik iliği olmak üzere çeşitli organlarda ve dokularda bulunan multipotent karakterdeki hücrelerdir (Can, 2008). Hematopoietik dokulardan elde edilen YKH'ler hematopoietik kök hücreler (HKH) olarak adlandırılmakta iken, mezenkimal dokularda bulunan kök hücreler ise mezenkimal kök hücreler (MKH) olarak adlandırılmaktadır. HKH'ler hematopoez sürecinde rol alan, kemik iliği, periferik kan, kordon kanı ve fetusun karaciğerinde ve dalağında bulunan hücrelerdir. Mezenkimal kök hücreler ise çeşitli dokulardan izole edilen kemik, kıkırdak, yağ, kas, astrosit ve nöron hücreleri gibi mezenşim kökenli hücrelere farklılaşabilen hücrelerdir (Murphy, 2013).

## **1.2.1 Mezenkimal Kök Hücreler**

### **1.2.1.1 Mezenkimal Kök Hücrelerin Tarihiçesi**

Alman patolog *Cohnheim* tarafından 130 yıl önce ilk kez kemik iliğinde hematopoietik olmayan kök hücrelerin varlığı ileri sürülmüştür. *Cohnheim*'in gözlemleri, bu hücrelerin fibroblast-benzeri morfolojiye sahip olduğunu göstermiş ve kemik iliğinin yara iyileşmesi sürecinde rol alan fibroblastların kaynağı olabileceğini gündeme getirmiştir (Chamberlain et al., 2007). 60'lı yılların sonunda *Friedenstein ve arkadaşları* tarafından kemik iliğinden elde edilen fibroblast-benzeri hücreler, kültür ortamında iç-şekli ve kolonijenik olması nedeniyle fibroblast kolonisi oluşturan birim (CFU-F) olarak tanımlanmıştır. Bu hücrelerin *in vivo* ve *in vitro* da diğer mezenkimal hücrelere farklılaşabildiği, plastik kültür kabına yapıştıkları

(Salem & Thiemermann, 2010) ve kültür ortamına alınan bu hücrelerin 2- 3 gün aktif olmayıp daha sonra hızla çoğalmaya başladığı rapor edilmiştir (Chamberlain et al., 2007). 90'lı yılların başında Arnold Caplan, bu hücrelerin mezenşim kökenli hücre tiplerine (adiposit, kondrosit, osteosit) dönüşebilmesi sebebiyle, bu hücreleri tanımlamak için ilk kez 'Mezenkimal Kök Hücre' terimini kullanmıştır (Caplan, 1991).

### 1.2.1.2 Mezenkimal Kök Hücre Tanımı ve Kaynakları

Mezenkimal kök hücreler (MKH), mezenşim kaynaklı dokularda bulunan, geniş bir çoğalma potansiyeline ve farklı hücre tiplerine dönüşebilme yetkinliğine sahip multipotent progenitör hücrelerdir (Bobis et al., 2006). MKH'ler, terapötik potansiyellerinden dolayı biyolojik ve klinik açıdan araştırmacıların ilgisini çekmiştir. 2006 yılında Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği MKH tanımlanmasında standardizasyon sağlamak amacıyla minimal kriterler belirlemiştir.

Buna göre MKH'ler;

1. Standart kültür koşullarında plastik kültür yüzeyine yapışmalıdırlar (adherasyon).
2. CD73, CD90 ve CD105 yüzey belirteçlerini yüksek düzeyde (>%95) ifade ederken, CD45, CD34, CD14/CD11b, CD79a/CD19 ve HLA-DR gibi diğer hücrelere ait olabilecek yüzey belirteçlerini (<%2) ifade etmemelidir.
3. *In vitro* ve *in vivo* koşullarda kemik, yağ ve kıkırdak hücrelerine dönüşebilmelidir (Dominici et al., 2006).

En çok araştırılan ve klinik olarak kullanılan mezenkimal kök hücre kaynağı kemik iliği, yağ doku ve kordon kanıdır (Kim et al., 2013). Bu çalışmada kullanılan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler ise yağ depolama yoluyla enerji metabolizmasının sürdürülebilirliğini sağlayan adipoz doku tüm memeli türlerinde embriyonik gelişim evresinde mezoderm tabakasından kökenlenmektedir (Can, 2013). Yağ dokusunun damarlı bölgesinin stromasından (stromal vascular fraction, SVF) yağ hücrelerinin uzaklaştırılmasıyla elde edilmektedirler. Yağ dokusu kaynaklı MKH'ler fibroblast benzeri morfoloji gösterirler. *In vitro* ortamda sayılarını iki katına çıkarma süreleri kültür ortamına ve pasaj sayılarına bağlı olarak 2- 4 gün arasında değişmektedir. İzole edilen yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin çoğalabilme kapasiteleri vericinin yaşına, cinsiyetine, yağ dokusunun alındığı bölgeye, alınma şekline göre bile

farklılıklar gösterebilmektedir (Akgün, 2016). Bol bulunmaları, izolasyonlarının ve kültüre edilmesinin yani çoğaltılmasının kolay oluşu ve mezodermden köken alan diğer doku tiplerine farklılaşabilmeleri nedeniyle çeşitli klinik uygulamalarda kullanılabilirler (Banas et al., 2007).

### **1.2.1.3 Mezenkimal Kök Hücreler Tarafından Salgılanan Faktörler**

Kendini yenileyen, çoğalan ve farklı hücre tiplerine dönüşebilme potansiyeline sahip olan MKH'ler çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler, kemokinler ve hücre dışı matriks proteinlerini salgılamaktadır. İşlevlerini yerine getirebilmek için bu faktörlerin sentezlenmesine ve regüle edilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Yağ doku kaynaklı kök hücreler yüksek oranda epidermal büyüme faktörü (EGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), keratinosit büyüme faktörü (KGF), platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF), dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- $\beta$ ), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ve beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) salgılamaktadırlar. Aynı zamanda Flt-3 (Fms benzeri tirozin kinaz 3) ligand, granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF), granülosit/makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF), interlökin-6 (IL-6), interlökin-7 (IL-7), interlökin-8 (IL-8), interlökin-11 (IL-11), interlökin-12 (IL-12), lökemia inhibitör faktörü (LIF) ve tümör nekrozis faktörü alfa (TNF- $\alpha$ ) gibi sitokinleri salgırlar.

### **1.2.1.4 Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmunmodulatör Etkileri**

MKH'ler rejeneratif tıp alanında kullanılmasının dışında immün sistem yanıtını düzenlemesiyle ve bağışıklık sistemi tarafından tanınmamasıyla transplantasyon tıbbında da araştırmacıların ilgi odağı olmuştur. MKH aracılı immunsupresyon, mezenkimal kök hücrelerin immün hücreler (T lenfositler, doğal öldürücü hücreler-NK, monosit, makrofajlar) tarafından salgılanan proinflamatuvar sitokin IFN $\gamma$ 'nın yalnız veya TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  veya IL-1 $\beta$  ile birlikte ön aktivasyonunu gerektirir (Ren et al., 2008). Bunun sonucunda MKH'ler immünmodulatör özelliklerini salgıladıkları çözünür faktörler ile hedef hücreleri indükleyerek ya da inhibe ederek gösterirler.

Çözünür faktörlerden biri indolamin 2,3-dioksijenaz (IDO)dır. Bu enzim triptofanın kynurenine dönüşümünü katalizler. Kynurenin lokal triptofanın tükenmesine bu da toksik yıkım ürünlerinin birikmesine neden olur. Bunun sonucunda da T ve B hücrelerinin çoğalması engellenir (Frenette et al., 2013).

Bu süreçte rol alan çözünür faktörlerden bazıları; uyarılan siklooksijenaz-2 (COX-2) enzimi tarafından sentezlenen prostoglandin E2 (PGE2), hepatosit büyüme faktörü (HGF), insan lökosit antijeni-G (HLA-G), transforme edici büyüme faktörü beta (TGF-  $\beta$ ) ve interlökin reseptör 10 (IL-10) dur (Wang et al., 2012).

MKH'ler indirekt olarak düzenleyici T hücrelerinin (Treg) *in vivo* çoğalmasını indükler. Bunu Fas-ligand/Fas aracılı T hücre apoptozu indükleyerek makrofajlardan sentezlenen TGF  $\beta$  ile yapar (Frenette et al.,2013). Uyarılan COX-2 enzimi tarafından sentezlenen PGE<sub>2</sub> ise makrofaj ve dendritik hücelere EP4R ve EP2R reseptörlerine bağlanarak etki eder. Böylece makrofajlar tarafından IL-10 salınımı indüklenir bu da nötrofillerin dokuya infiltrasyonunu inhibe eder. Ayrıca PGE2, NK hücrelerinde fonksiyonlarını inhibe eder (Frenette et al., 2013).

MKH'ler sentezledikleri bu çözünür faktörler üzerinden doğal ve adaptif immunojenitede rol alan makrofaj, nötrofiller, efektör T hücreleri, regülatör T hücreleri, B hücreleri, doğal öldürücü hücreler ve dendritik hücrelerin proliferasyon ve tolerans mekanizmasına etki ederek immunsupresif ve anti-inflamatuvar özelliklerini gösterirler (Salem & Thiernemann, 2010, Ghannam et al., 2010).

MKH'ler non-immunojeniktir yani; bu hücrelerde CD40, CD80 ve CD86 gibi ko-stimülatör moleküller yoktur. Bu moleküllerin yokluğu T hücrelerinin ikincil sinyallere karşı duyarsız olmasını sağlar. MKH'lerin ayrıca MHC sınıf II antijeni taşımadığı (temel doku uyumluluğu kompleksi), MHC sınıf I antijenini de zayıf düzeyde eksprese ettiği bilinmektedir (Chamberlain et al., 2007). MKH'ler bu özellikleriyle immun rejeksiyondan kaçabilirler ve *in vivo* kullanımlarında doku uyumu şartı aranmaz.

### **1.2.1.5 Mezenkimal Kök Hücrelerin Terapotik Potansiyeli**

Günümüzde kök hücreler deneysel ve klinik bilimlerde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. MKH'lerin farklılaşma potansiyellerinin fazla olması, kararlı genetik yapıları, salgıladıkları çözünür faktörlerle ilgili dokulardaki hücrelerin



gelişimine ve fonksiyonuna stromal destek sağlaması, özellikle iskemik bölgelerde apoptozu engeleyen faktörler salgılaması, hasarlı hücre ile füzyon yeteneğinin olması (böylece hücre yeniden fonksiyon kazanır), malign transformasyona dönüşme olasılığının az olması, immunojenitesinin düşük olması (HLA doku uyumu şart değil), immunmodulator özelliği, elde edilmesinin ve çoğaltılmasının kısmen kolay oluşu, kemokinler sayesinde enflamasyon bölgelerine migrasyon yetenekleriyle ulaşabilmeleri hücre tedaviler içinde MKH'lerin diğer kök hücrelere göre ön plana çıkmasını sağlamış ve birçok hastalıkta klinik uygulama alanı oluşturmuştur (Lee, 2008).

MKH'ler hem otolog hem de allojeneik olarak çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Lokal hasarların onarımı amacıyla bu hücreler laboratuvar ortamında çoğaltılarak yeterli hücre sayısına ulaştırılmakta ( $1-2 \times 10^6$  /kg) ve eğer gerekliyse istenilen hücre tipine farklılaştırılarak hastalara verilmektedir. Klinik uygulamalarda kullanım kolaylığı ve daha etkili olması amacıyla MKH'ler ven yoluyla (intravenöz infüzyonla) hastalara verilmiş, ancak sadece düşük bir oranının hasarlı bölgeye ulaştığı, geri kalan kısmının ise hasarlı bölgeye ulaşmadan apoptoza uğradığı gözlemlenmiştir. Dezavantajlarından dolayı MKH'lerin yerel olarak hastalara uygulanması da söz konusu olmuştur. Günümüzde her iki yöntemle de hastalara uygulanmaktadır (Kavanagh & Kalia, 2011).

MKH'ler kullanılarak yapılan ilk klinik denemeler hematoloji-onkoloji alanında gerçekleştirilmiştir. MKH'lerin kemik iliğinden izole edilebilmesi ve hematopoez sürecini desteklemesi bu hücrelerin kemik iliği yapılanmasında da etkili olabileceğini düşündürmüştür. *In vitro*'da çoğaltılan kemik iliği kaynaklı MKH'ler ve hematopoetik kök hücreleri otolog olarak göğüs kanseri hastalarına kemik iliğini desteklemesi amacıyla verilmiştir (Koç et al., 2000). Bu hücrelerin kemik iliğinin yeniden şekillenmesinde etkili olması ve hematopoez sürecini hızlandırması araştırmacıların ilgisini çekmiştir.

Günümüzde MKH'ler immunsupresif olarak en çok GVHH tedavisinde kullanılmaktadır. Bu hastalık kök hücre veya kemik iliği naklinden sonra meydana gelen, donör T hücrelerinin organ alıcısının hasta dokularına karşı immun aracılı hasar vermesi ve ağır inflamatuvar olaylar serisine neden olmasıyla bilinen zor ve ölümcül bir komplikasyondur. Görülme oranı tedavi dozuna, HLA uyumuna, alıcının

yaşına ve hastalığın evresine göre %20-70 arasında değişmektedir. MKH'lerin immunsupresif, anti-inflamatuar etkileri ve doku uyumu (MHC) gözetmeksizin T hücre proliferasyonunu baskılıyor olmasından dolayı GVHH tedavisinde alternatif bir yaklaşım olarak kullanılmıştır (Kim et al., 2013, McGuirk & Weiss, 2011). İlk başarılı tedavi *Le Blanc ve ark.* tarafından yapılan haploidentik (kısmi uyumlu) nakil sonrası steroide karşı dirençli akut GVHH (Gastrointestinal sistem tutulumu) gelişen ALL tanılı, 9 yaş erkek olguda *ex vivo* olarak çoğaltılan MKH'lerin uygulanmasıyla gerçekleştirilmiştir. Hastanın annesinin kemik iliğinden alınan MKH'ler naklin 73. günü hastaya verilmiş, semptomlarda hızlı bir iyileşme gözlemlenmiştir. Bir süre sonra semptomların nüks etmesi üzerine hastaya tekrar MKH verilmiş, bu sefer kalıcı bir cevap elde etmişlerdir. Bu klinik deneme MKH'lerin GVHH tedavisinde kullanımını açısından yapılan çalışmalar için dönüm noktası olmuştur (Ograczyk et al., 2015).

Günümüz itibarıyla klinik olarak denenen 7163 kök hücre çalışması vardır. Bu çalışmalardan 944 tanesi mezenkimal kök hücrelerle ilgilidir. MKH'ler kliniklerde en çok nakillerde kullanılmasının yanında miyokard enfarktüsü, osteogenez, beyin yaralanması, osteoartrit, diyabet, Crohn hastalığı, GVHH, karaciğer sirozu, multiple skleroz, parkinson, kalıtsal hastalıklar başta olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Tekeli & Arısu et al., 2016).

### 1.3 İmmunsupresyon

Organ ve doku nakli, başka bir tıbbi çözüm olmadığı durumlarda sağlıklı durumuna getiremeyecek biçimde hastalanmış bir organın, canlı bir vericiden ya da kadavradan alınan sağlam bir doku veya organ ile değiştirilmesi işlemidir. İmmun sistem kendine ait olanla olmayana birbirinden ayırt etme ve yabancı-zararlı olan her türlü maddeye karşı gerekli mekanizmayı geliştirerek tepki verme üzerine kurulu bir sistemdir (Halloran, 2004). Kişinin kendi dokusu tekrar kendisine nakledilirse bağışıklık sistemi kendi doku ve hücrelerini tanımakta ve bu durum bağışıklık sistemi tarafından bir sorun oluşturmamaktadır. Fakat farklı vericiden yapılan nakil işlemlerinde alıcının bağışıklık sistemi yabancı hücre, doku ve organlara karşı vücudu korumaya çalışarak onları reddetmektedir. Nakledilen hücre/doku/organın zarar görmesine neden olan bir dizi olaya sebebiyet veren bu duruma hücre/doku/organ reddi denilmektedir (Watson & Dark, 2012). Organ nakillerinde karşılaşılan en büyük

engel doku reddidir ve bu engelin aşılması organ nakillerindeki başarı oranının artmasında önemli bir unsurdur. Normalde antijen sunucu hücreler (ASH) organizmanın yapısına yabancı olan bir maddeyle (antijenle) karşılaştığında onu T hücrelerine sunar. Antijen sunucu hücrenin MHC reseptörü ile T hücrelerinin T-hücre reseptörü (THR) etkileşime girerek sinyal 1'i oluşturur. Daha sonra ASH'lerin yüzeyinde bulunan CD80 ve CD86 reseptörleri, T hücreleri üzerindeki CD28 reseptörü ile etkileşime girerek sinyal 2'yi oluşturur. Bu 2 sinyalle birlikte aktive olan T hücresinde üç sinyal-iletim yolunu aktive olur; kalsiyum-kalsineurin yolağı, mitojenle aktive protein (MAP) kinaz yolağı ve protein kinaz C-nükleer faktör kB (NK-kB) yolağını aktive eder. Buna bağlı olarak CD 154 reseptörünün, interlökin 2 reseptörünün bir zincirinin (CD 25) ve interlökin-2 ifadesi gerçekleşir. Sinyal 3'te salınan IL-2 ve IL-15 hücre döngüsünü başlatıcı sinyal 3'ü fosfoinositid-3-kinaz (PI-3K) yolağını ve mTOR (moleküler hedefi rapamisin olan yolak) yolağını harekete geçirir. Bununla birlikte T hücresi ihtiyaca göre çoğalma, farklılaşma ve antikor üretme aşamaları sürecine girer (Halloran, 2004).

Transplantasyon işleminde ise alıcının kendine nakledilen dokuların reddini önlemek ve alıcıda grefte karşı tolerans oluşturmak amacıyla immunsupresif tedavi uygulanmaktadır. İmmunsupresyon ile antijen tanınarak, red olayının oluşmasında kilit pozisyonda bulunan T hücrelerinin antijeni tanınması, çoğalması, farklılaşması ve antikor yapımı işlevi baskılanmaktadır (Taylor et al., 2005). Etkili bir immunsupresyon başarılı bir organ nakli için son derece önemlidir.

### **1.3.1 İmmunsupresif Ajanlar**

Grefte karşı tolerans oluşturan, red olayının gerçekleşmesini önleyen her tür madde immunsupresif olarak adlandırılmaktadır. İmmunsupresif kullanımına bağlı olarak nakil sonrası gerçekleşen morbitide ve mortalite, infeksiyon ve rejeksiyonlara bağlı olarak gerçekleşen ölümlerin sayısında önemli bir azalma olmuştur (Kansu, 2002). İmmunsupresif ajanlardaki gelişmelerle birlikte daha çok hedefe yönelik bir tedaviye olanak sağlanmıştır (Rathee et al., 2013). İmmunsupresif ilaçlar allogrefte karşı oluşan immunregülatör sistemin değişik basamaklarını hedef almaktadırlar. Etkilerini antijen sunucu hücrelerin T hücrelerine antijen sunumunu yaptığı basamağı, T hücre

aktivasyonu üzerinden inhibe ederek, sitokin sentezini inhibe ederek veya hücre çoğalmasını inhibe ederek gösterirler (Taylor et al., 2005).

### 1.3.1.1. Sirolimus Ve Etki Mekanizması

Sirolimus (Rapamisin) 1970'li yıllarda pasifikte bir ada olan Paskalya adası yada diğer ismi ile Rapa Nui'ye ait toprak örneğinden izole edilmiş, *Streptomyces hygroscopicus* tarafından üretilen makrolid bir laktondur (Taylor et al., 2005).

Sirolimus bir antifungal madde olarak geliştirilmiş, keşfinden sonraki 20 yıl boyunca yalnızca bir düzine kadar yayın çıkmıştır. 1990'lı yılların başlarında Sirolimusun etki mekanizmasının ve ilaç hedefinin tespiti ile ilgili olarak çalışmalar gündeme tekrar gelmiştir. 1997 yılında böbrek transplantasyonunda organ reddini önleyen bir ilaç olarak kullanılmak üzere FDA tarafından onaylanmıştır (Tsang et al., 2007). 21. yüzyılın başlarında tekrar sirolimusa olan ilgi artmış ve yapılan son çalışmalar sirolimusun memelilerdeki hedefi olan yolağın (mTOR yolağı) moleküler yapısı hakkında önemli bilgiler sağlamıştır. Daha da önemlisi, birçok hastalığın altında yatan temel süreçte mTOR yolağının rolü olduğu keşfedilmiş ve teyit edilmiştir. Sirolimusun memelilerdeki hedef proteini 'mTOR' hücrel ve organizma büyümesinde merkezi denetleyicidir; besin ve hormonal sinyalleri bütünleştirmekte ve çeşitli hücrel işlemleri düzenlemektedir (Tsang et al, 2007). mTOR, 289 kDa ağırlığında ökaryotik organizmalarda iyi korunmuş, fosfatidilinositol 3-kinaz- ilişkili bir kinazdır. Kabaca raptor ve gbl proteinleriyle birlikte iş görmektedir. Yapılan çalışmalar raptor proteinin yokluğunda T hücresinin kıtlığa girdiğini düşünerek bölünme ve büyümeyi durdurduğunu, gbl proteinin yokluğunda ise nutrient miktarına duyarsızlaşarak anormal tipte hücre oluşumuna sebep olduğunu göstermiştir.

Organ nakillerinden sonra immunsupresif etki nedeniyle kullanılan sirolimus öncelikle spesifik olarak 12 kDa ağırlığındaki FKBP proteinine (FKBP12) bağlanarak bir kompleks yapı oluşturur. Bu kompleks mTOR'da bulunan TOR proteinin FRB bölgesine bağlanarak, raptorun mTOR'a bağlanmasını engeller, böylece mTOR'un fonksiyonlarını ve mTOR'a bağlı diğer yolakları inhibe eder (raptor; mTOR yolağının işleyişindeki düzenleyici bir proteindir). En net etkisi hücre döngüsünün ilerlemesi için gerekli olan siklin-cdk kompleksinin oluşmasını engelleyerek T hücre

aktivasyonundan sonra efektör hücre olarak fonksiyon görmelerini inhibe etmesidir. Böylece red olayının gerçekleşmesini engellenir (Tsang et al., 2007).

Sirolimusun immünsüpresif özelliği dışında antifungal, antitümör, antineoplastik ve antiproliferatif özellikleri bilinmektedir (Sehgal, 2003). Organ nakilleri sırasında immun sistemin baskılanıyor oluşu kişiyi kansere açık hale getirdiği için antitümör özelliği bilinen Sirolimusun immunsüpresif amaçlı kullanımı avantaj oluşturmaktadır. Uzun yarı ömre sahip olan Sirolimus, gastrointestinal sistem tarafından emilmekte ve 1, 2 saat içerisinde tepe yoğunluğuna ulaşmaktadır. Takrolimus ile kombinasyonu organ nakillerinden sonra sıkça kullanılmaktadır (Cutler & Antin, 2004). Son organ toksisitesi yapmayan bir ilaç olmasına rağmen, hücre bazda toksik etkisinde olduğunu gösteren bazı çalışmalar mevcuttur (Hoogduijn et al., 2008, Buron et al., 2009). Ancak, bu verilerin yetersiz sayısına oluşu nedeniyle, kesin bir kaniye varmak zor olmaktadır.

#### **1.4 Ursodeoksikolik asit (UDKA) ve Hücre Tedavideki Yeri**

UDKA; ilk kez siyah Çin Ayısı'nın safra asidinin kurutulmasıyla elde edilmiş hidrofilik bir safra asitidir. İnsanda primer safra asitlerinden biri olan kenodeoksikolik asitin (KDKA) bakteriyel oksidasyonu sonucu oluşan 7-ketolitik asitten karaciğerde sentezlenmektedir. UDKA'nın kimyasal formülü  $3\alpha, 7\beta$ -dihidroksi-5 $\beta$ -cholan-kolanoik asittir (Lazaridis et al., 2001). Vücuttaki tüm safra asitlerinin yalnızca %3-5'lik kısmını oluşturmaktadırlar. Kendisinden daha hidrofobik olan KDKA'dan yalnızca bir hidroksil grubunun farklı düzlemde yerleşimiyle farklılık gösterir. KDKA'te  $7\alpha$  hidroksilasyon varken, UDKA'da  $7\beta$  hidroksilasyon vardır. Vücutta, glisin ve taurin ile konjuge halde bulunmaktadır (Lazaridis et al., 2001, Ikegami & Matsuzaki, 2008). Yapılan hücre çalışmaları UDKA'nın lipit bileşimini değiştirerek hepatosit hücre membranını stabilize ettiği, karaciğerden safra üretimini ve atılımını hızlandırarak hidrofobik safra asitlerini dengeleyip koleratik etki sağladığı, mitokondriyal depolarizasyonu önleyerek ve reaktif  $O_2$  üretimini azaltarak hücreleri koruduğu, sitokrom c salınımını modüle edip apoptozu azaltarak anti-apoptotik etkiye sahip olduğu, hücre sinyalizasyonunda, anti-inflamatuar ve detoksifiye edici etkilere sahip olduğunu göstermiş (Ikegami & Matsuzaki, 2008). Tüm bunların yanında yapılan bazı çalışmalar UDKA kullanımının ödem ve malondialdehit (MDA) seviyesini azaltırken, total antioksidatif kapasiteyi (T-AOK),

süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon peroksidaz (Gpx), glutatyon-s-transferaz (GST), indirgenmiş glutatyon (GSH) ve total sülfirite seviyelerinde artışa sebep olduğu gözlemlenmiştir. Bu belirteçler UDKA'nın direkt ve indirekt olarak antioksidan özellik taşıdığını göstermektedir (Lapenna et al., 2002, Akdemir et al., 2015, Qi et al., 2012). UDKA'nın daha hidrofilik ve yüksek polariteye sahip olmasından dolayı miçel oluşturma potansiyelinin düşük oluşu toksisitesinin diğerlerine göre az olmasına neden olmakta, bu durumda UDKA'nın tedavide kullanımının ön plana çıkmasına neden olmaktadır (Roma et al., 2011). Günümüzde UDKA kolestatik karaciğer hastalıklarında, kistik fibroziste, sirozda, kolon kanseri ve diğer kanser çalışmalarında, akut viral hepatitlerde, kronik hepatitlerde, alkolik karaciğer hastalığında, safra taşı eritilmesinde, gebeliğin intrahepatik kolestazında ve hepatit c'li hastalarda yükselmiş alanin-amino-transferaz (ALT) seviyesini düşürülmesinde kullanılmaktadır (Ikegami & Matsuzaki, 2008). Ayrıca allojenik olarak gerçekleştirilen kök hücre nakillerinde sıklıkla gelişen karaciğer komplikasyonlarını önlemek amacıyla da UDKA kullanımı söz konusudur. Yapılan çalışmaların uzun dönem sonuçları UDKA kullanılan grupların sağkalım oranlarının yüksek, akut/kronik/karaciğer/bağırsak GVHH gelişme oranının azaldığı rapor edilmiştir (Ruutu et al., 2002, Ruutu et al., 2014, Wang et al., 2014). Literatürde yapılan kapsamlı bir tarama sonucunda MKH'ler üzerindeki etkisine yönelik bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

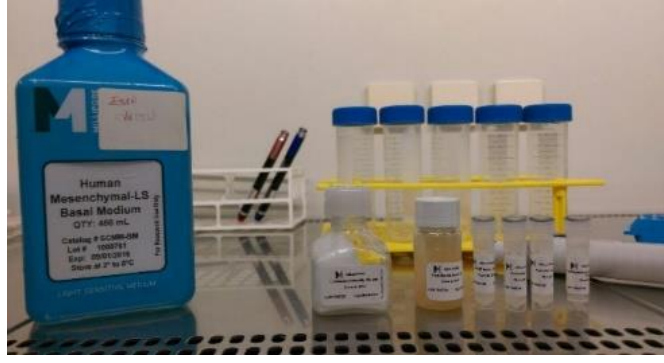
## GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1 Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü; ticari olarak elde edilebilir oluşu, etik sorun oluşturmaması, *in vitro* da gerekli koşullar sağlandığında çoğalabilmesi, donmuş stoklar halinde bir süre depolanabilir olması, çözme işlemiyle tekrar kullanılabilir olması, ortamın kontrol altında tutulabiliyor oluşu, hücreler üzerindeki etkilerin doğrudan gözlemlenebilmesi gibi avantajlara sahiptir. Bunun yanında devam eden bir hücre kültüründe pasaj ilerledikçe hücre tipi değişmeyeceğinden homojenlik sağlanmış olur yani *in vitro* da *in vivo* ya en yakın ortam sağlanır. Bu gibi avantajları nedeniyle çalışma kapsamında test edilecek maddelerin *in vitro* ortamda çalışılmasına karar verilmiştir. Bu amaçla insan adipoz doku kaynaklı MKH hattı (Millipore Cat.No: SCR038) ticari olarak temin edilmiştir.

#### 2.1.1. Hücrelerin Kültür Ortamında Çoğaltılması

Hücrelerin kültür ortamında yaşatılması için gereken maddeleri içeren besiyeri Human Mesenchymal-LS Expansion Medium Kit (Millipore Cat.No: SCM023) ticari olarak temin edilmiştir. Antibiyotik (%1 penisilin/streptomisin Gibco Cat.No 15140-122) ile desteklenen ortam bazal besiyeri (480 mL) ve rhFGF-b (0,5 mL, 5ng/mL), Askorbic Acid (0,5 mL, 50 µg/mL), L-Glutamin (18,75mL, 7,5mM), Hidrokortizon Hemisukkinat (0,5 mL, 1,0 µg/mL), İnsülin (0,5 mL, 5 µg/mL) ve FBS (10 mL, %2) supplementlerini içermektedir. Hücrelerin çözdürülmesinden sonraki uyum sağlama sürecinde bu besiyeri kullanılmış olup, diğer aşamalarda ise %1 penisilin/streptomisin, %1 L-glutamin, %3 FBS (Cat.No 10270-106) içeren RPMI 1640 medyumu (Cat.No: 21875-091) kullanılmıştır.



**Şekil 1.** MKH hücrelerinin kültüre edilmesinde kullanılan kimyasallar.

Hücreler yatay konumdaki 75 cm<sup>2</sup>'lik filtreli kapaklı flasklar (Corning Cat.No: 430639) içerisinde kültür edilmiştir. Yapılacak çalışmaların gerektirdiği doğrultuda, hücreler yeterli sayıya ulaşana kadar geçen süreçte %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde (Thermo Electron Corporation's Class 100) 37°C'de inkübe edilmiştir. İhtiyaç fazlası hücreler daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere dondurulup, -86°C'de saklanmışlardır. Hücrelerin canlılık ve proliferasyonlarını gözlemek amacıyla ışık mikroskobu (Olympus-CH30) ve Arthur<sup>TM</sup> (Nanotek) kullanılmıştır. Hücrelerin ortam değişimi, pasajlama, dondurma ve çözme ve yapılacak analizler için sürdürülmesi işlemleri 30 dk. ultraviyole ile sterilize edilen laminar hava akımlı kabinde (ESCO Class II, Biological Safety Cabinets) gerçekleştirilmiştir.



### 2.1.2. Hücrelerin Çözülmesi

Ticari olarak temin edilen ve sıvı azot içersinde elimize ulaştırılan hücrelerin deneyde kullanılabilir hale gelmesi için hücrelere çözme işlemi uygulanmıştır. Çözme işlemi hazırlık aşamasında hücrelerin bulunduğu kriyotüp daha önce 37°C dereceye ısıtılmış sıcak su banyosunda hafiffçe çözdürülmüş ve kullanılacak olan taze besiyeri de 37°C dereceye ısıtılmıştır. Isıtılan besiyerinden 15 ml'lik santrifüj tüpüne taze besiyeri eklenmiştir. Otomatik pipet aracılığıyla taze besiyerinin 1 ml'si alınıp, yavaş bir şekilde damla damla kriyotüpe eklenerek hücrelerin yavaş bir şekilde çözülmesi sağlanmıştır. Daha sonra hücrelerin tamamı içinde 14 ml taze besiyeri kalan santrifüj tüpüne alınarak 1200 rpm'de 5 dk. santrifüj cihazında (Thermo Scientific Heraeus Labofuge 400) santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi sonrası süpernatant uzaklaştırılarak, pellet üzerine taze besiyeri damla damla bırakılmıştır. Bunu takiben pipetaj işlemiyle pellet süspanse edilmiştir. Aynı şartlarda bir santifrüj işlemi daha gerçekleştirildikten sonra supernatant uzaklaştırılıp pellet süspanse edilmiş ve üzerine taze besiyeri eklenen hücreler flasklara ekilmiştir.



**Şekil 2.** 75 cm<sup>2</sup> lik flasklara ekilen insan yağ doku kaynaklı MKH

### 2.1.3. Hücre Canlılığının Hesaplanması

Çalışmada hücreler çözüldükten sonra ya da hücrelerin pasajlanması sırasında total hücre, canlı ve ölü hücre sayısına/yüzdesine ulaşmak için Arthur™ (Nanotek) cihazı kullanılmıştır. Bu amaçla hücre süspansiyonundan 100 µl alınarak ve içerisine 1 µl Propidyum iyodür (PI) boyası konulmuş ve pipetajı yapılmıştır. 15 dk karanlıkta inkübe edildikten sonra içerisinden 25 µl alınarak cihazın özel lamına pipetlenmiş ve cihaza okutturulmuştur. Arthur™ cihazı 3 ayrı kanala (parlak zemin, kırmızı ve yeşil floresan) sahip olup, bu cihaz sayesinde kısa bir sürede hücre sayımı, canlılığı, Annexin V apoptoz ve hücre döngüsü analizleri yapılabilmekte ve sonuç grafiği elde edilebilmektedir. Çalışma sırasında yine aynı amaçla Tripan mavisi (Biological industries Cat.No:03-102-1B) ile boyanarak hücrelerin canlılık yüzdesi kontrol edilmiştir. Tripan mavisi adı verilen boya negatif yüklü bir boyadır. Eğer hücre canlı ise, boyanın hücre içine girmesine izin vermeyeceğinden hücreler şeffaf renkte görünürken canlı olmayan hücreler boyayı absorbe ederek mikroskop altında mavi renkte görülürler. Canlılık testi için 50 µl hücre ve 50 µl tripan mavisi boyası karıştırılarak Neubauer lamına aktarılmıştır. Neubauer lamına ışık mikroskobu altında bakılarak 4x4'lük karelerden oluşan 4 adet alanda bulunan hücreler sayılmış ve ortalamaları hesaplanmıştır. Hücrelerin canlılık yüzdelerini bulmak için canlı hücre sayısı toplam hücre sayısına oranlanmıştır. Canlı hücre sayısını dilüsyon faktörü ve  $2 \times 10^4$  ile çarparak milimetredeki canlı hücre sayısı hesaplanmıştır.



**Şekil 3.** Arthur™ Cihazının dış görünümü.

#### 2.1.4. Hücrelerin Pasajlanması

Pasajlanma işlemine geçilmeden önce hücreler 1x PBS eklenerek yıkanmış ve daha sonra PBS uzaklaştırılmıştır. Hücreleri yüzeyden kaldırmak amacıyla % 0.25'lik tripsin-EDTA (Sigma, Trypsin EDTA Solution, Cat. No: T4049) hücre yüzeyini kaplayacak şekilde flaska eklenmiş (3- 4 ml) ve 4 dakika inkübatörde bekletilmiştir. Hücreler yüzeyden ayrıldıktan sonra tripsini nötrleştirmek amacıyla hızlı bir şekilde üzerine serumlu besiyeri eklenmiş ve santrifüj tüplerine alınarak 1200 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi sonunda süpernatant uzaklaştırılmış, hücre pelleti taze besiyeri ile süspanse edilmiştir. Daha sonra hücre sayımı gerçekleştirilmiş, hücreler sayılarına bağlı olarak uygun sayıdaki flasklara ekilmişlerdir. Hücreler çoğalma hızlarına bağlı olarak milimetredeki sayıları  $10^5$ -  $10^6$  aralığında kalacak şekilde pasajlanmış ayrıca 2 günde bir düzenli olarak ortam değişimleri yapılmıştır.



**Şekil 4.** İnsan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin üçüncü pasajdaki mikroskopik görünümü.

### 2.1.5. Hücrelerin Dondurulması

Deneyleerde kullanılmayacak olan fazla hücreler, daha sonraki dönemlerde yaşlanma etkisinden korunması için dondurularak muhafaza edilmişlerdir. Bu amaçla dondurulacak hücreler 15 ml'lik santrifüj tüplerinde 1200 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmişlerdir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre pelleti tekrar süspanse edilmiştir. Hücreler buz üzerinde hazırlanan 1:9 oranında (%10) DMSO (Dimetil sülfoksit) (Amresco Cat.No: N182), (%90) FBS (Fetal Bovine Serum) (Gibco Cat.No: 10270-106) içeren karışım ile birlikte kriyotüplere aktarılarak -86°C'ye kaldırılmışlardır.

### 2.2. Etken Maddenin Kullanıma Hazırlanması

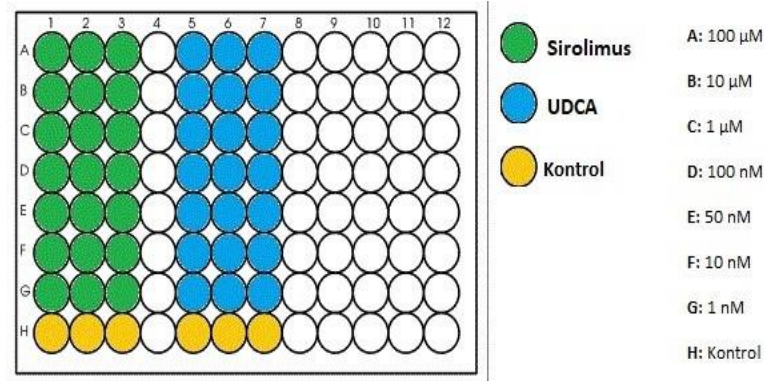
Bu çalışma kapsamında kullanılacak olan Sirolimus (Rapamycin from *Streptomyces hygroscopicus*  $\geq 95\%$  (HPLC)), Sigma (Cat No: R0395-1MG)'dan temin edilmiştir. Moleküler ağırlığı 914.17g/mol olan Sirolimus son konsantrasyonu 25 mM olacak şekilde 43.7  $\mu$ l DMSO içinde çözülmüştür. Deneyleerde kullanılacak diğere bir etken madde olan UDKA (Ursodeoxycholic acid  $\geq 99\%$ ), Sigma (Cat No: U5127- 1G)'dan temin edilmiştir. UDKA'nın moleküler ağırlığı 392.57 g/mol'dür ve 1 mg'ı kullanılarak son konsantrasyonu 25 mM olacak şekilde 102  $\mu$ l etanol (EtOH) içersinde çözülmüştür. Kullanıma hazır hale gelen etken maddelerin çözeltisi insan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelere 1 nM ile 100  $\mu$ M aralığında uygulanmıştır.

### 2.3. Sitotoksisite Testleri

Hücre proliferasyonu, canlılığı ve sitotoksisitesini ölçmek amacıyla yapılan WST-1 (suda çözünebilir tetrazolium tuzu) testinin çalışma prensibi temel olarak; proliferasyona uğrayan hücrelerin mitokondrilerinde bulunan dehidrojenaz enzim aktivitesinin artması ile tetrazolyumu kullanarak formazan boya üretmesi sonucu görülen renk değışiminin absorbans olarak ELISA okuyucu ya da spektrofotometre

(4250 ve 620 nm) ile ölçülmesine dayalıdır. Ölçülen absorbans değeri ne kadar yüksek ise canlı hücre sayısı da o kadar yüksek olur. Hücresel enzimler tetrazolium tuzlarını parçalar, bunun sonucunda soluk sarı renkli WST-1 boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır.

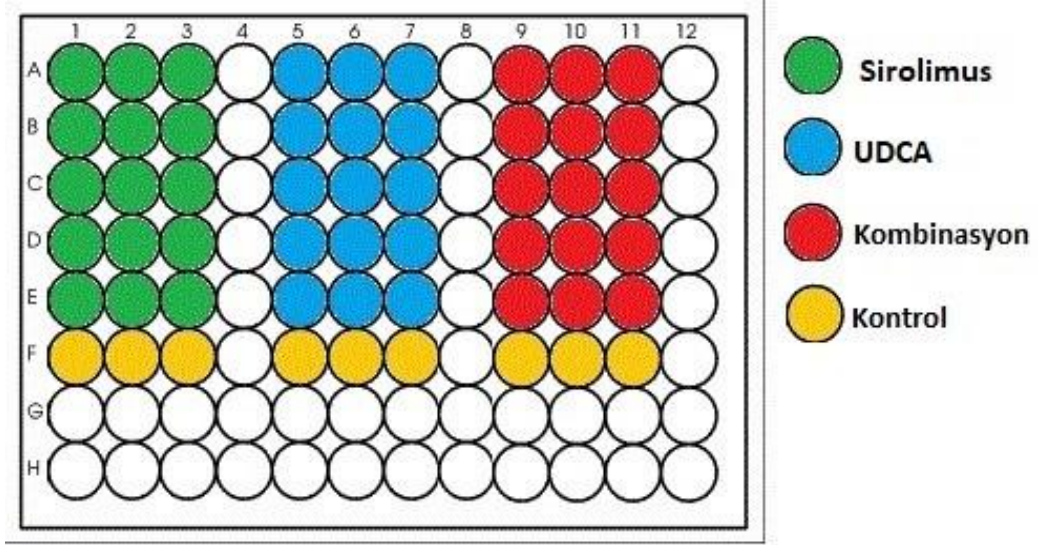
Çalışma kapsamında ilk olarak doksanaltı kuyucuklu plaklara 1 ml'de  $5 \times 10^4$  hücre olacak şekilde 60 kuyucuğa 100  $\mu$ l hücre ekilip, üzerine 100  $\mu$ l besiyeri ilave edilmiştir. Ekilen hücreler 37°C, % 5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 1 gün inkübe edildikten sonra besi yerleri çekilmiştir. Daha sonra sirolimus ve UDKA etken maddeleri 1 nM ile 100  $\mu$ M doz aralığında her kuyucukta son hacim 100  $\mu$ l olacak şekilde besiyeriyle birlikte hücreler üzerine eklenmiştir. Etken maddelerin uygulanmadığı son yatay sıradaki hücre grubu kontrol grubu olarak alınmıştır. Etken maddelerin hücrelere eklendikten sonraki 24., 48. ve 72. saatlerinde her bir kuyucuğa 10  $\mu$ l WST-1 solüsyonu (Roche Cat.No: 11644807001) eklenerek 15 dakikada bir Multiskan FC (Thermo) mikropalak okuyucusu kullanılarak formazan boya oluşumu fotometrik olarak ölçülmüştür. Sirolimus ve UDKA etken maddelerinin insan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler üzerindeki IC<sub>50</sub> değeri CalcuSyn 2.0 (Biosoft) yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 5. Wst-1 testi plak planı

#### 2.4. Kombinasyon Gruplarının Oluşturulması

Sirolimus ve UDKA etken maddelerinin kombinasyonlarının olası sinerjistik, additif, nötral veya antagonistik etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla doksanaltı kuyucuklu plaklara 1 ml'de  $5 \times 10^4$  hücre olacak şekilde her kuyucuğa 100  $\mu$ l hücre 100  $\mu$ l besiyeri hacminde ekim yapılmıştır. Ekilen hücreler 37°C, % 5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 1 gün inkübe edildikten sonra besiyerleri çekilmiş, yerine taze besiyeri içeren Sirolimus ve UDKA etken maddeleri IC<sub>50</sub> dozları dikkate alınarak farklı dozlarda her kuyucukta son hacim 100  $\mu$ l olacak şekilde hücreler üzerine eklenmiştir. Etken maddelerin uygulanmadığı son yatay sıradaki hücre grubu kontrol grubu olarak alınmıştır. Etken maddelerin hücelere eklendikten sonraki 24., 48. ve 72. saatlerinde her bir kuyucuğa 10  $\mu$ l WST-1 solüsyonu eklenerek 15 dakikada bir Multiskan FC (Thermo) mikroplak okuyucusu kullanılarak formazan boya oluşumu fotometrik olarak ölçülmüştür.



Şekil 6. Kombinasyon grubunun oluşturulma planı.

**Sirolimus için;**

- A: 100  $\mu$ M
- B: 75  $\mu$ M
- C: 50  $\mu$ M
- D: 25  $\mu$ M
- E: 10  $\mu$ M
- F: DMSO

**UDKA için;**

- A: 100  $\mu$ M
- F: Ortam

**Kombinasyon için;**

- A: R100  $\mu$ M + U100  $\mu$ M
- B: R 75  $\mu$ M + U 100  $\mu$ M
- C: R 50  $\mu$ M + U 100  $\mu$ M
- D: R 25  $\mu$ M + U 100  $\mu$ M
- E: R 10  $\mu$ M + U 100  $\mu$ M
- F: EtOH



## 2.5. Annexin V Yöntemi ile Apoptotik Hücre Analizi

Apoptoz analizi, ticari firmadan temin edilen Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit (Millipore, Cat. No: MCH100105) kullanılarak Muse® Cell Analyzer ile yapılmıştır. Annexin V hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanabilen bir proteindir ve floresan bir madde ile işaretlenerek apoptotik hücreyi görünebilir hale getirmektedir. Normalde canlı hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzeyinde fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Apoptotik hücrelerde bu moleküller hücre zarının dış yüzeyine transloke olmaktadır. Bu translokasyon hücre ölümünün erken evrelerinde gerçekleşmektedir.

Yapılan çalışmada apoptoz analizi için 6'lı plağa ve 1 tane 25'lik flaska 1 ml'de  $1 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. 24 saat sonra ekim yapılan hücrelere WST-1 tesinde bulunan  $IC_{50}$  dozunda Sirolimus ve en yüksek doz olan 100  $\mu$ M UDKA etken maddeleri ve bunların kombinasyonları uygulanmıştır. 25'lik flaskın sadece besiyeri değiştirilmiştir. Madde uygulanması işleminden sonra hücreler 37°C, %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 96 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 7. Apoptoz analizi için deney gruplarının plaktaki yerleşimi.



## 2.6. Hücre Döngüsünün Belirlenmesi

Hücre döngüsü analizleri, ticari firmadan temin edilen Muse™ Cell Cycle kit (Millipore, Cat. No: MCH100106) kullanılarak Muse® Cell Analyzer ile yapılmıştır. Hücre döngüsü kiti propidium (PI) ve RNase A içeren bir solüsyon içermektedir. Her bir hücre döngüsü fazındaki hücrelerin ölçülmesi için PI bağlanması dikkate alınır. Normalde dinlenme halindeki hücreler (G0/G1) her bir kromozomunun iki kopyasını içermektedir. Hücreler bölünmeye başladığında, hücreler kromozomal DNA sentezlerler (S fazı). Kit içeriğinde bulunan PI floresans yoğunluğu tüm kromozomal DNA ikiye katlandığında artar (G2/M). Bu aşamada G2/M hücreler ikiye bölünür, PI floresans yoğunluğu ise G0/G1'in yaklaşık iki katına çıkar.

Hücre döngüsünü belirlemek amacıyla tıpkı apoptoz analizinde olduğu gibi 6'lı plağa ve 1 tane 25'lik flaska 1 ml'de  $1 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. 24 saat sonra ekim yapılan hücrelere WST-1 tesinde bulunan IC<sub>50</sub> dozunda sirolimus ve en yüksek doz olan 100 µM UDKA etken maddeleri ve bunların kombinasyonları uygulanmıştır. 25'lik flaskın sadece besiyeri değiştirilmiştir. Madde uygulanması işleminden sonra hücreler 37°C, %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 96 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 8. Hücre döngüsünün tayini için oluşturulan flask.

96 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre döngüsü analizinde kullanılmak üzere her bir kuyucuktaki supernatant pipet yardımıyla ayrı ayrı 15'lik falkon tüplerine aktarılmıştır. Önce her kuyucuğa 1'er ml 1x PBS eklenerek yıkama yapılmış ve bu PBS uzaklaştırılmıştır. Daha sonra plakta yapışık halde bulunan hücrelerin % 0.25'lik tripsin ile 4 dk. inkübasyonu sonucu kalkmaları sağlanmıştır. Aynı işlem kontrol için kullanılacak olan 25'lik flasttaki hücreler içinde yapılmıştır. Hücrelerin kalkıp kalkmadıkları mikroskopla kontrol edilmiş ve kalkan hücreler daha önceden süpernatantların alındığı 15'lik falkon tüplerine eklenmiştir. Tripsin inaktivasyonu için falkon tüplerine FBS içeren besiyeri eklenmiştir. 15'lik falkon tüplerinde bulunan dört grup hücre 300g'de 5 dk santrifüjlendikten sonra üzerlerine besiyeri eklenerek süspansiyon edilmişlerdir. Daha sonra bu hücre süspansiyonlarından 200'er µl alınarak ayrı ayrı Sirolimus, UDKA, kombinasyon ve kontrol olarak etiketlenmiş 4 ependorflara alınmıştır. Üzerine 1ml 1x PBS eklenerek vortekslenen hücreler 300g'de 5 dk santrifüj edilmişlerdir.



**Şekil 9.** Muse® Cell Analyzer Cihazının görünümü.

Karanlık ortamda dört deney grubu için kullanılacak bu ependorflara 200 µl soğuk %70'lik etanol eklenerek -20°C'de 3 saat beklemeleri sağlanmıştır. Bekleme süresi sonunda hücreler PBS'le tekrar yıkanarak 300g'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında PBS uzaklaştırılmış ve her bir ependorfa 200 µl Muse® Cell Cycle solüsyonundan eklenilerek oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda ependorfların kapakları kesilerek Muse® Cell Analyzer cihazında ölçümleri yapılmıştır.

## 2.7 Oksidatif Stres Analiz Parametreleri

Sağlıklı bir yaşam sürdürebilmenin temelinde hem hücrenin hem de organizmanın oksidan-antioksidan dengesi son derece önemlidir. Oksidatif stres organizmada serbest radikal oluşumundaki artışa veya antioksidan sistemdeki yetersizliğe bağlı olarak gelişebilmektedir. Oksidatif stres sebebiyle oluşan reaktif oksijen metabolitleri lipit, protein ve DNA gibi hücre bileşenlerini etkileyebilmekte ve onlara zarar verebilmektedirler. Bu nedenle, serbest radikal üreten reaksiyonlar ve antioksidan savunma biyolojik sistemlerde önemli bir yer tutmaktadır. Lipit, protein ve DNA moleküllerinde oluşan hasarın onarılması; oluşan serbest radikallerin etki alanlarından toplanarak temizlenmesi; hücresel kinaz kayıplarının önlenmesi; serbest radikal üreten kimyasal reaksiyonların durdurulması ya da reaksiyon hızının baskılanması organizmadaki antioksidan mekanizmalarından bazılarıdır.

Bu çalışmada ise antioksidan özelliği görebilmek amacıyla lipit peroksidasyonu (MDA), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz aktivitesi (CAT) ve superoksit dismutaz (SOD) aktivitesi parametreleri kullanılmıştır.

### 2.7.1. Lipit Peroksidasyonu (MDA) Ölçümü

Oksijenli ortamda bazen metabolizma reaksiyonu sırasında, bazen de dış etkilere bağlı olarak ortaya çıkan oksijen kaynaklı radikaller, lipoproteinlerde ve hücre zarında yer alan lipitlerde oksidasyona neden olmaktadır. Reaktif bir radikalin, yağ asitlerinin metilen grubundan bir hidrojen atomunu koparması ile yağ asitlerinin oksidasyonu başlamakta ve bunun sonucunda da karbon merkezli radikaller oluşmaktadır. Sonrasında moleküler oksijenin bağlanması ile lipit hidroperoksitleri ortaya çıkmaktadır. Lipit hidroperoksitlerinin yıkımıyla da biyoaktif aldehytler oluşmaktadır. Bunlardan başlıcası malondialdehit (MDA)'tir. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize olur, ya da difüze olarak diğer hücrelerde hasara sebebiyet verirler. Lipit peroksidasyonunun göstergesi olarak lipit hidroperoksitleri ve yıkım ürünü olan düşük molekül ağırlıklı MDA kullanılmaktadır.

Bu çalışmada lipit peroksidasyonunun ölçümü için temin edilen Lipit Peroxidation (MDA) Colorimetric/Fluorometric Assay Kit (BioVision, Cat. No: K739-100)

kullanılmıştır ve firmanın önerdiği prosedüre bağlı kalınmıştır. Örnek hazırlamak için buz üzerindeki  $1 \times 10^6$  sayıdaki hücre 300  $\mu$ l MDA Lysis Buffer ve 3  $\mu$ l BHT (X100) ile homojenize edildikten sonra 13000 g' de 10 dk santrifüjlenmiştir.

MDA standart eğrisi elde etmek amacıyla sırasıyla; 0.1 M MDA solüsyonu hazırlamak için 10  $\mu$ l MDA standart 407  $\mu$ l distile su ile seyreltilmiştir. Sonrasında 0.1 M MDA solüsyonunun 20  $\mu$ l'si alınarak 980  $\mu$ l distile su ile seyreltilerek 2 mM MDA standart solüsyonu hazırlanmıştır. Kolorimetrik analizler için ependorflara 2 mM'lık MDA standart'tan 0,2,4,6,8,10  $\mu$ l konularak son volüm 200  $\mu$ l olacak şekilde distile su eklenmiş ve 0, 4, 8, 12, 16 ve 20 nmol standart elde edilmiştir. Florometrik analizler için ise 2 mM MDA standart 10 kez dilue edilmiştir. Daha sonra ependorflara 0, 2, 4, 6, 8, 10  $\mu$ l'lar 0.2 mM MDA standart ve son hacim 200  $\mu$ l olacak şekilde distile su eklenerek 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 ve 2.0 nmol standart oluşturulmuştur.

Daha sonra standart ve örneklerin bulunduğu her vial'e 600  $\mu$ l TBA eklenerek 95°C'de 60 dk inkübasyonu sağlanmıştır. Örnekler oda sıcaklığına getirilmek için 10 dk buz üzerinde soğutulduktan sonra 200  $\mu$ l'si pipetlenerek 96 kuyucuklu plağa eklenmiştir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0 $\mu$ l MDA	2 $\mu$ l MDA	4 $\mu$ l MDA	6 $\mu$ l MDA	8 $\mu$ l MDA	10 $\mu$ l MDA						
B	0 $\mu$ l MDA	2 $\mu$ l MDA	4 $\mu$ l MDA	6 $\mu$ l MDA	8 $\mu$ l MDA	10 $\mu$ l MDA						
C	Siro	UDKA	Komb	Knt								
D	Siro	UDKA	Komb	Knt								
E												
F												
G												
H												

**Şekil 10.** Lipit Peroksidasyonu ölçümü için hazırlanan plak yerleşim planı.

Kolorimetrik analizler için 532 nm'de, florometrik analizler için Ex/Em = 532/553 nm'de okutulmuşlardır. (Ex: nanometredeki eksitasyon dalga boyu, Em: nanometredeki emisyon dalga boyu).

Hesaplama ise  $C = [(A / (mg \text{ veya } ml))] \times 4 \times D = nmol/ml \text{ veya } nmol/mg$  formülü ile yapılmıştır. (**A**: Standart eğrideki örnek MDA miktarı, **mg**: Kullanılan orijinal doku miktarı, **ml**: Kullanılan plazma volümü, **D**: Dilüsyon faktörü).

### 2.7.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Ölçümü

Yapısında dört selenyum (Se) atomu bulundurarak tetramerik bir enzim olan glutasyon peroksidaz hücrelerde sitozolde yer almaktadır. Hücre içindeki görevi hidrojen peroksit ile hidroperoksitlerin indirgenmesini sağlamaktır. Bunu zar fosfolipitlerinden, lipit hidroperoksitlere etki ederek yapmaktadır. Diğer bir önemli fonksiyonu ise solunum patlaması sırasında serbest radikal hasarı sonucu fagositik hücrelerin hasar görmesini engellemektir. GSH- Px aktivitesindeki azalma hidrojen peroksitin birikerek, hücre hasarına yol açmasına sebep olmaktadır. GSH-Px, hem lipit peroksidasyonunun başlamasını önlemekte, hem de lipit peroksidasyonu sonucu oluşan lipit hidroperoksitlerin metabolizmasını sağlamaktadır.

Yapılan bu çalışmada glutasyon peroksidaz ölçümü için Glutathione Peroxidase Activity Colorimetric Assay Kit (BioVision, Cat. No: K762-100) kullanılmıştır ve firmanın önerdiği prosedüre bağlı kalınmıştır. Sırasıyla;

1. Örnek hazırlamak için buz üzerindeki  $1 \times 10^6$  sayıdaki hücre 0.2 ml soğuk Assay Buffer ile homojenize edildikten sonra  $4^\circ\text{C}$ 'de 15 dk 10.000 g'de santrifüjlenmiştir. Daha sonra çalışma için süpernatant kısmı toplanmış ve buz üzerinde bekletilmiştir. Örneklerin 2- 50  $\mu\text{l}$ 'si 96 kuyucuklu plağa ekildikten sonra son volüm 50  $\mu\text{l}$  olacak şekilde Assay Buffer eklenmiştir.
2. NADPH standart eğrisi için 1 mM NADPH standart oluşturmak amacıyla 40 mM NADPH solüsyonun 25  $\mu\text{l}$ 'si 975  $\mu\text{l}$  distile su ile seyreltilmiştir. 1 mM NADPH'nin de 0, 20, 40, 60, 80, 100  $\mu\text{l}$ 'si kuyucukta 0, 20, 40, 60, 80, 100 nmol standart oluşturmak üzere 96 kuyucuklu plağa eklenmiştir. Daha sonra son volüm 100  $\mu\text{l}$  olacak şekilde Assay Buffer eklenmiştir. Pozitif kontrol için 5- 10  $\mu\text{l}$  GPx pozitif kontrol istenen kuyucuklara eklendikten sonra Assay Buffer ile son volüm 50  $\mu\text{l}$ 'ye tamamlanmıştır. Reaktif kontrolü için ise 50  $\mu\text{l}$

Assay Buffer eklenmiştir.

3. Her kuyucuk için 33 µl Assay Buffer, 3 µl 40 mM NADPH solüsyon, 2 µl GR solüsyon, 2 µl GSH solüsyon'dan oluşan 40 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Her bir örneğe 40 µl reaksiyon karışımı eklendikten sonra örnekler 15 dk inkübe edilmişlerdir. GPx reaksiyonunu başlatmak için her kuyucuğa 10 µl Cumene Hydroperoxide Solution eklenmiştir. Her bir örnek 25°C'de 5 dk inkübe edildikten sonra 340 nm'de okutulmuştur.

4. Hesaplama için **GPx aktivitesi = B/ (T2-T1) x Vx Örnek Dilüsyonu = nmol/dk/ml=mU/mL**

formülü kullanılmıştır. (**B**: T1 ve T2 arasında nmol'deki azalan NADPH miktarı, **T1**: İlk örneğin dk'daki ilk okunma anı, **T2**: İkinci örneğin dk'daki ikinci okunması, **V**: Reaksiyon kuyucuğunda ml'deki işlenmiş örnek volümü)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0 µM NADPH	20 µM NADPH	40 µM NADPH	60 µM NADPH	80 µM NADPH	100 µM NADPH						
B	0 µM NADPH	20 µM NADPH	40 µM NADPH	60 µM NADPH	80 µM NADPH	100 µM NADPH						
C	Siro	UDKA	Komb	Knt	PK	RK						
D	Siro	UDKA	Komb	Knt	PK	RK						
E												
F												
G												
H												

**Şekil 11.** Peroksidaz ölçümü için hazırlanan plak yerleşim planı

### 2.7.3. Katalaz (CAT) Aktivitesi Ölçümü

Yapısında hem bulunduran bir protein olan katalaz,  $H_2O_2$ 'in ve hidroksil radikallerinin (OH) oluşumunu önlemek için bunların moleküler oksijen ve suya çevrilmesini katalizlemektedir. Hücrede peroksizomlarda ve sitozolde bulunmaktadır. Katalaz metil hidroperoksit ve etil hidroperoksit gibi küçük moleküllerin indirgenmesine yol açarken, büyük molekül ağırlıklı lipid hidroperoksitleri etkilemez.

Katalaz aktivitesini ölçmek için Catalase Activity Colorimetric/ Fluorometric Assay Kit (BioVision, Cat. No: K773-100) kullanılmıştır ve firmanın önerdiği prosedüre bağlı kalınmıştır. İlk olarak buz üzerindeki  $1 \times 10^6$  sayıdaki hücre 0.2 ml soğuk Assay Buffer ile süspansiyon edildikten sonra  $4^\circ C$ 'de 15 dk 10.000 g'de santrifüjlenmiştir. Test için toplanan süpernatant buz üzerinde bekletilmiştir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0 $\mu$ l ( $H_2O_2$ )	2 $\mu$ l ( $H_2O_2$ )	4 $\mu$ l ( $H_2O_2$ )	6 $\mu$ l ( $H_2O_2$ )	8 $\mu$ l ( $H_2O_2$ )	10 $\mu$ l ( $H_2O_2$ )						
B	Siro	UDKA	Komb	Knt								
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Şekil 12. Katalaz aktivitesi ölçümü için hazırlanan plak yerleşim planı

Daha sonra 2- 78  $\mu$ l örnek veya 1- 5  $\mu$ l Pozitif Control Solution her bir kuyucuğa eklenerek son volüm 78  $\mu$ l olacak şekilde Assay Buffer ile tamamlanmıştır.

$H_2O_2$  Standart Eğrisi oluşturmak amacıyla da 20 mM  $H_2O_2$  için 0.88 M  $H_2O_2$ 'nin 5  $\mu$ l'si 215  $\mu$ l su ile dilüe edilmiştir. Daha sonra 1 mM  $H_2O_2$  için 20 mM  $H_2O_2$ 'nin 50  $\mu$ l'si 0.95 ml distile su ile dilüe edilmiştir. 1 mM  $H_2O_2$  solüsyonun 0, 2, 4, 6, 8, 10  $\mu$ l'si 0, 2, 4, 6, 8, 10 nmol/kuyucuk olmak üzere 96 kuyucuklu plağa ekilmiştir. Son

volüm Assay Buffer ile birlikte 90 µl'ye getirildikten sonra her kuyucuğa 10 µl stop solüsyonu eklenmiştir. Katalaz reaksiyonunu başlatmak için Sirolimus, UDKA, kombinasyon ve kontrol grubu örneklerinin bulunduğu kuyucuklara 12 µl taze 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenmiştir. Örnekler 25°C'de 30 dk inkübe edildikten sonra reaksiyonu durdurmak için tüm kuyucuklara 10 µl Stop Solüsyonu eklenmiştir. Her kuyucuk için 46 µl Assay Buffer, 2 µl OxiRed™ Probe, 2 µl HRP solüsyon'dan oluşan 50 µl'lik büyüme karışımı hazırlanmıştır. Her bir örneğe 50 µl büyüme karışımı eklendikten sonra 25°C'de 10 dk inkübe edilmişlerdir. Plak okuyucuda 570 nm'de okutulmuşlardır.

Hesaplama Katalaz Aktivitesi =  $B/30xVx$  *Örnek Dilüsyon Faktörü* = *nmol/dk/ml* = *mU/mL* formülü ile yapılmıştır. (**B**: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Standart Eğri'sinden çözünmüş H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı,

**V**: Reaksiyon kuyucuklarına eklenen ml'deki işlem görmüş örnek volümü 30: Reaksiyonun 30. dk'sı)



#### 2.7.4. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Ölçümü

SOD, peroksit serbest radikalının ( $O_2^-$ ) ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) radikallerinin moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen antioksidan bir enzimdir. Oksijenli solunum yapan tüm hücrelerde bulunmaktadır. Sitozol ve mitokondrilerde bulunan bu enzim süperoksit radikallerini etkisizleştirirken, hücreleri süperoksit radikalının zararlarından korur. Dokularda oksijen basıncının ( $pO_2$ ) yükselmesi ile SOD aktivitesi artmaktadır. Fagosit edilmiş bakterilerin intraselüler olarak öldürülmesinde rol oynayan bu enzim aynı zamanda granülosit fonksiyonu için önemlidir.

Süperoksit dismutaz aktivitesini ölçmek için Superoxide Dismutase (SOD) Activity Assay Kit (BioVision, Cat. No: K335-100) kullanılmıştır ve bu analiz yapılırken firmanın önerdiği prosedüre bağlı kalınmıştır. Bu amaçla önce homojenize hale getirilmiş hücreler  $4^{\circ}C$ 'de 5 dk 14000 g'de santrifüjlendikten sonra hücre debris atılmıştır.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Boşluk1	S	U	Komb	Knt	S2	U2	Komb2	Knt2	Boşluk3		
B						Boşluk2	Boşluk2	Boşluk2	Boşluk2			
C												
D												
E												
F												
G												
H												

**Şekil 13.** Süperoksit dismutaz aktivitesi ölçümü için hazırlanan plak yerleşim planı.

(Örnek= Sirolimus: S, UDKA: U, Kombinasyon: Komb, Kontrol: Knt, Boşluk2= S2, U2, Komb2, Knt2)

1. Örneklerin bulunduğu kuyucuklara ve boşluk 2'lere 20 µl Sample Solution, boşluk 1 ve boşluk 3'e 20 µl ddH<sub>2</sub>O eklenmiştir.

2. Her kuyucuğa 200 µl WST Working Solution eklenmiştir.

3. Boşluk 2'lere ve boşluk 3'e 20 µl Dilution Buffer eklenmiştir.

4. Örneklerin bulunduğu kuyucuğa ve boşluk 1'e 20 µl Enzyme Working Solution eş zamanlı olarak eklenmiştir.

5. Plak 37°C'de 20 dk inkübe edilmiştir.

6. Örnekler mikropalak okuyucuda 450 nm'de okutulmuştur.

$$\text{Hesaplama } \mathbf{SOD \text{ Aktivitesi}} = \frac{(A_{\text{boşluk1}} - A_{\text{boşluk3}}) - (A_{\text{örnek}} - A_{\text{boşluk2}})}{(A_{\text{boşluk1}} - A_{\text{boşluk3}})} \times 100$$

formülü ile yapılmıştır.

## 2.8. İstatistiksel Değerlendirme Yöntemi

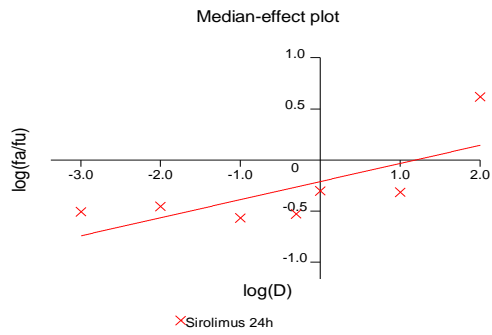
Muse cell® analyzer ile elde edilen ölü hücre yüzdesi, apoptoz/ölü hücre yüzdesi, erken apoptoz yüzdesi, canlı yüzde hücresi, elisa plate ile okutması yapılan Katalaz aktivitesi, SOD (% inhibisyon), MDA, GPx için her gruba ait veriler Microsoft Office Excel 2010 versiyonu üzerine yazılarak, IBM SPSS Statistics 23.00 (Statistical Package for Social Sciences) programında oluşturulan veri tabanına aktarıldı ve istatistiksel analizler aynı program ile yapılmıştır. Sürekli değişkenlere ait; ortalama, standart sapma ve hata, minimum ve maksimum değerleri ve ortalamalar için %95 güven aralıkları sunulmuştur. Öncelikle 2x2 faktöriyel ANOVA uygulandı. Ancak iki faktör arasında etkileşim (interaction) anlamlı bulunduğu için 4 grup oluşturulup tek yönlü varyans analizi uygulandı. Çoklu karşılaştırmalar sonrası grupların ikili analizi için Dunnett T3 yöntemi kullanılmıştır. Tüm hipotez kontrolleri 0.05 önem seviyesinde gerçekleştirilmiş, yani  $p < 0.05$  anlamlı kabul edilmiştir.

## BULGULAR

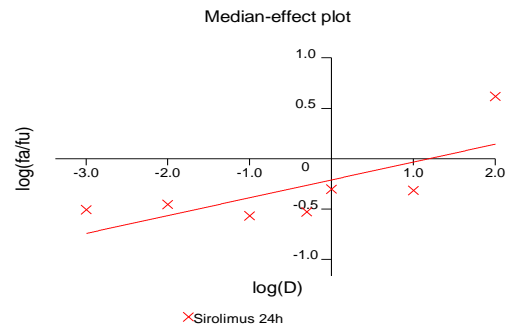
### 3.1. Sirolimus ve UDKA'nın İnsan ADKH Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi

Sirolimus ve UDKA etken maddelerinin insan ADKH hattı üzerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla üç gün ve üç tekrarlı olacak şekilde kurulan WST-1 testi kullanılmıştır. Sirolimusun insan ADKH'lerinin proliferasyonunu yüzde elli oranında inhibe eden dozu yani IC<sub>50</sub> değeri CalcuSyn 2.0 (Biosoft) yazılımı kullanılarak 48. saatte 15.85 µM olarak hesaplanmıştır. UDKA'nın insan ADKH'leri üzerindeki sitotoksik etkisi belirlenememiştir. 100 µM'lık doza kadar hücreler üzerinde sitotoksik etkisi bulunmamaktadır.

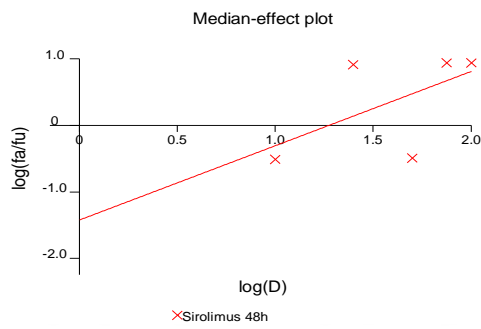
### Sirolimus24h



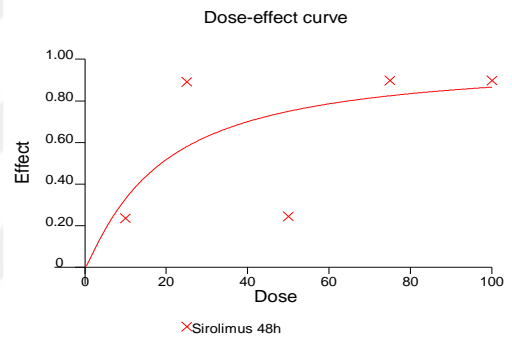
### Sirolimus24h



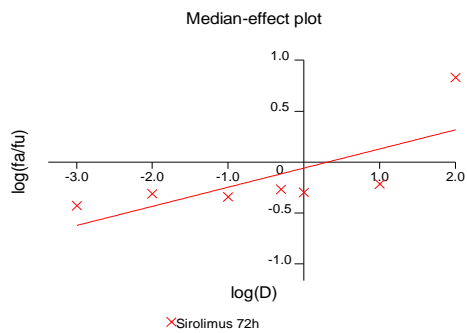
### Sirolimus48h



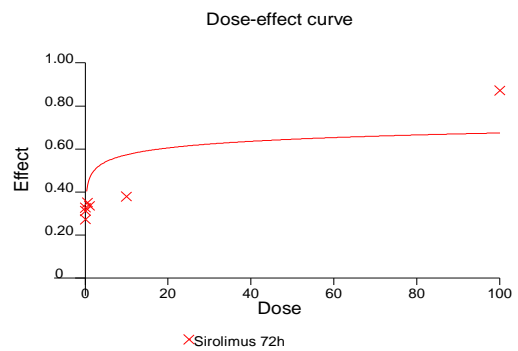
### Sirolimus48h



### Sirolimus72h

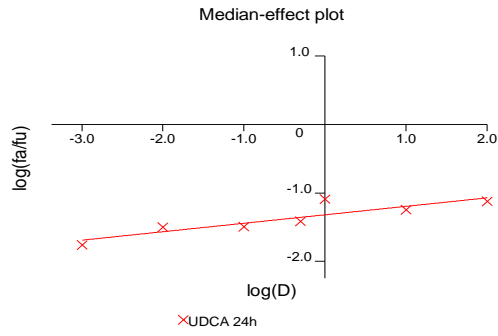


### Sirolimus72h

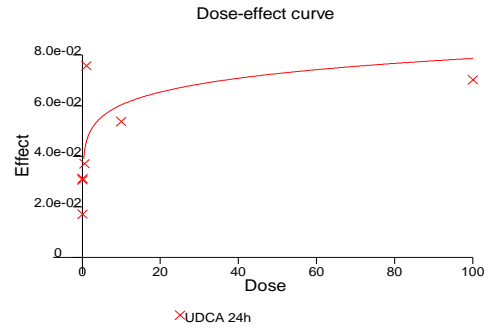


Grafik 1. ADKH' lerinde sirolumusun IC<sub>50</sub> dozu.

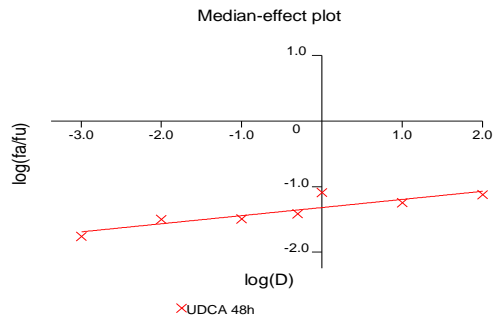
### UDCA24h



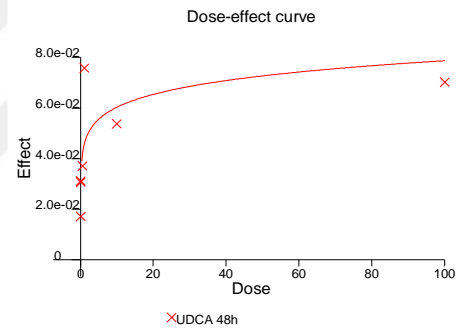
### UDKA24h



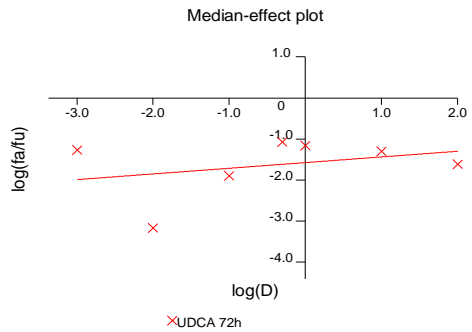
### UDCA48h



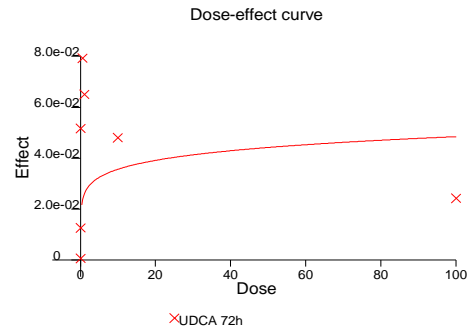
### UDCA48h



### UDCA72h

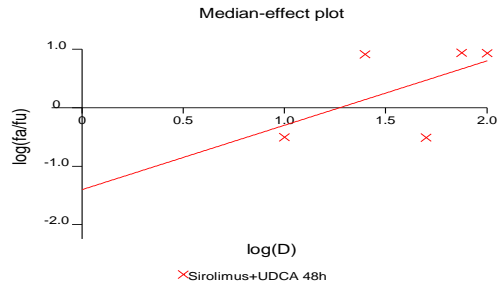


### UDCA72h

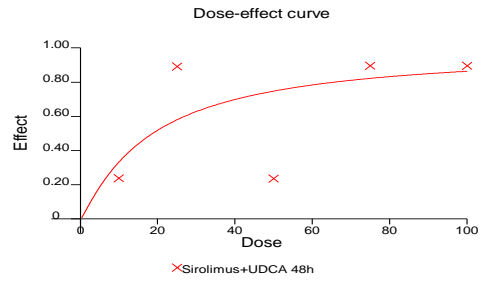


**Grafik 2.** ADKH' lerinde UDKA'nın sitotoksik etkinliği.

### Kombinasyon 48h



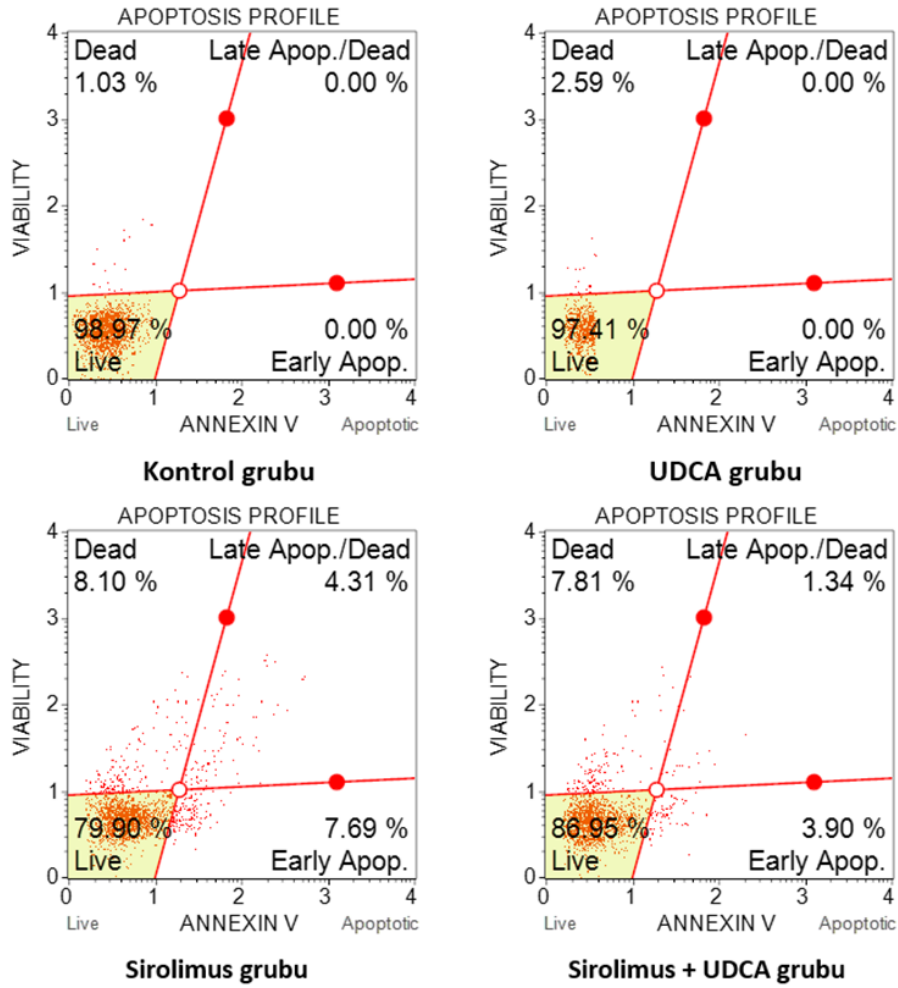
### Kombinasyon 48h



**Grafik 3.** ADKH' lerinde Sirolimus ve UDCA kombinasyon dozları.



### 3.2 Annexin V Yöntemi ile Yapılan Apoptoz Analizi Bulguları

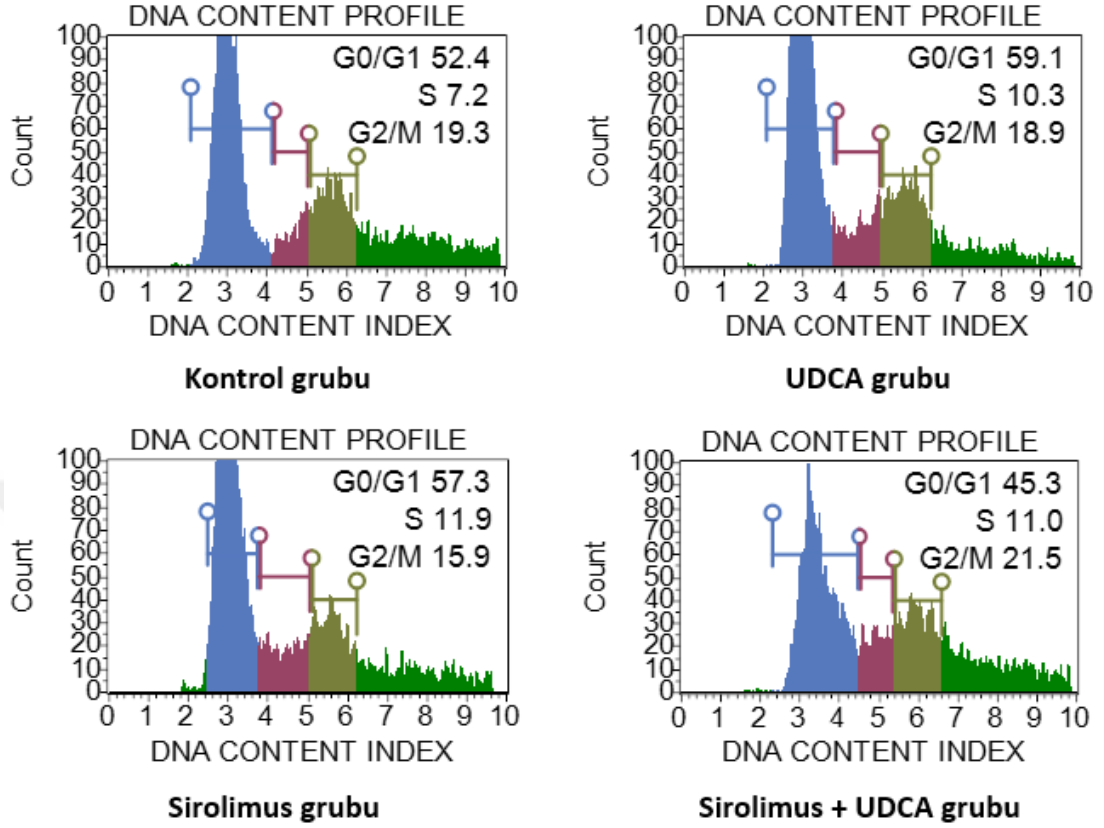


**Grafik 4.** Muse® Cell Analyzer ile yapılan ölçümlerin gruplara göre dağılımı

Muse® Cell Analyzer ile yapılan ölçümler ve yapılan hesaplamalar doğrultusunda etken maddeye maruz kalmayan kontrol grubundaki hücrelerde ölü hücre yüzdesi 1.03, canlı hücre yüzdesi 98.97 olarak hesaplanmıştır. UDKA grubundaki hücrelerde ölü hücre yüzdesi 2.59, canlı hücre yüzdesi 97.41 olarak hesaplanmıştır. Sirolimus grubunda erken apoptoz oranı %7.69, geç apoptoz oranı %4.31, ölü hücre % 8.10, canlı hücre %79.90 olarak hesaplanmıştır. Sirolimus+ UDKA kombine grup sonuçlarında ise erken apoptoz oranı %3.90, geç apoptoz oranı %1.34, ölü hücre yüzdesi 7.81, canlı hücre yüzdesi 86.95 olarak ölçülmüştür.

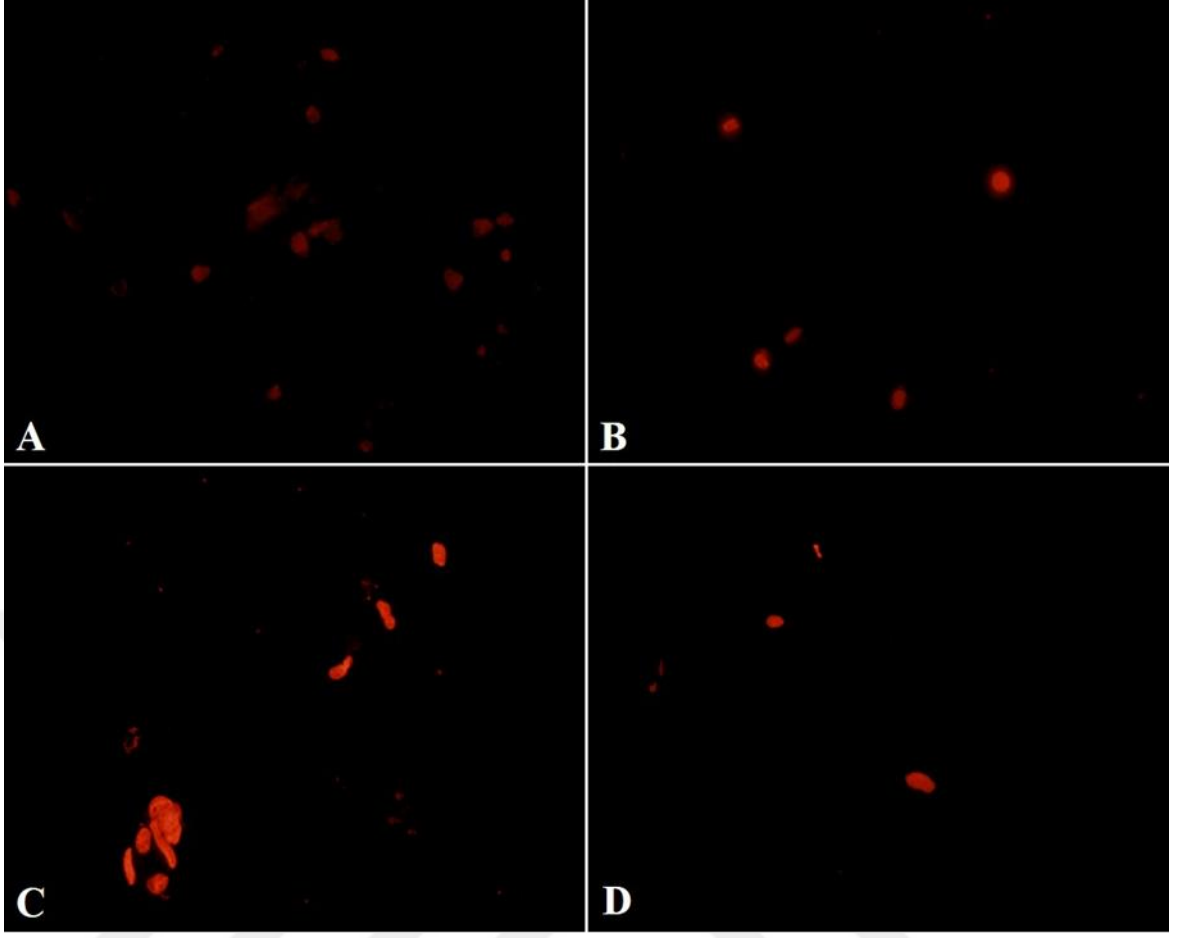


### 3.3 Muse® Cell Cycle Kiti İle Yapılan Hücre Siklusu Analizi Bulguları



**Grafik 5.** Muse Cell Cycle Kiti ile Yapılan Hücre Siklusu Analizi Bulguları

Kontrol ve UDKA uygulanmış grupta G2/M fazlarının yüzdeleri sırasıyla % 19.3 ve %18.9' dur. Sirolimus uygulama grubunda G2/M fazı %15.9 'a düşmüştür. Veriler Sirolimus grubunda mitotik aktivitenin azaldığını göstermektedir. Sirolimus+ UDKA grubunda ise azalan mitotik aktivitenin kontrol ve UDKA grubuna benzer şekilde yüksek olduğu saptanmıştır.

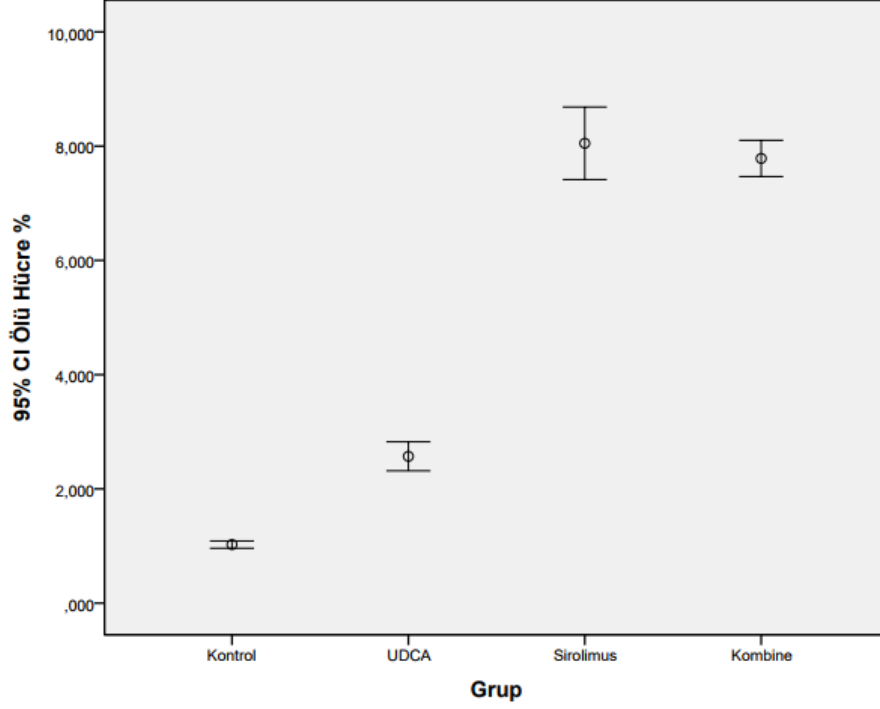


**Şekil 14.** Annexin V ile yapılan immunfloresans görüntüleme.

A. Kontrol grubu B. UDKA grubu C. Sirolimus grubu D. Sirolimus + UDKA grubu. Annexin V ile yapılan immunofloresans incelemede Sirolimus grubunda Muse® analizi ile benzer şekilde boyanan hücre sayısı yüksek olarak saptanmıştır. UDKA ve Sirolimus+ UDKA grubunda ise benzer görünümde ve yakın sayılarda Annexin V pozitif hücre sayısı elde edilmiştir.

### 3.4 Hücree Canlılık Analizlerinin İstatiksel Değerlendirilmesi

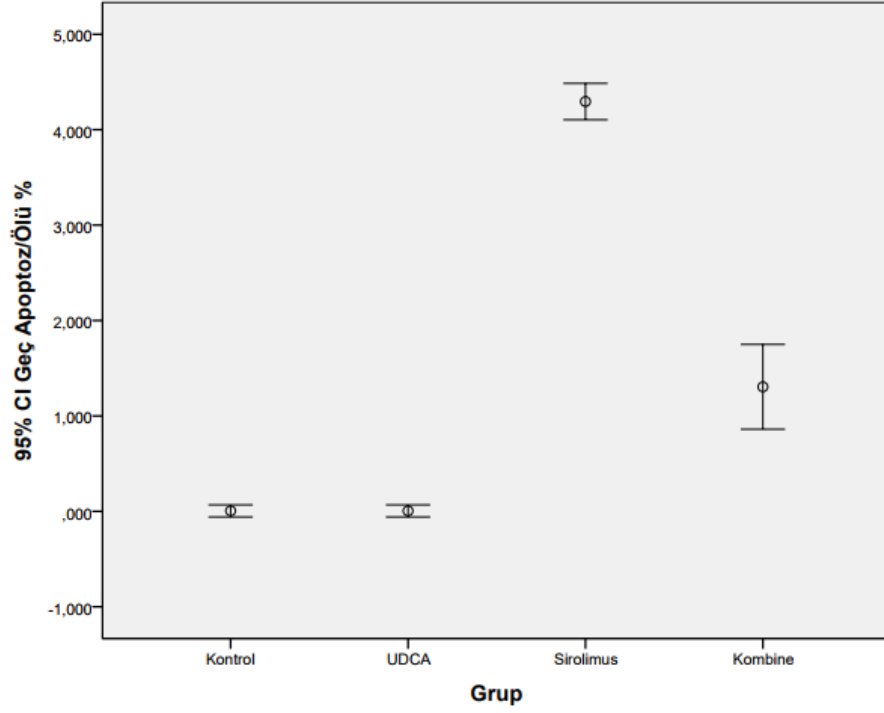
#### 3.4.1. Ölü Hücree Yüzdesi



**Grafik 6.** Ölü hücre yüzdesi istatistiksel grafiği.

Sirolimus ve kombine grup arası hariç diğer gruplar arası istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,0001$ ). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında UDKA etkisi de anlamlıdır.

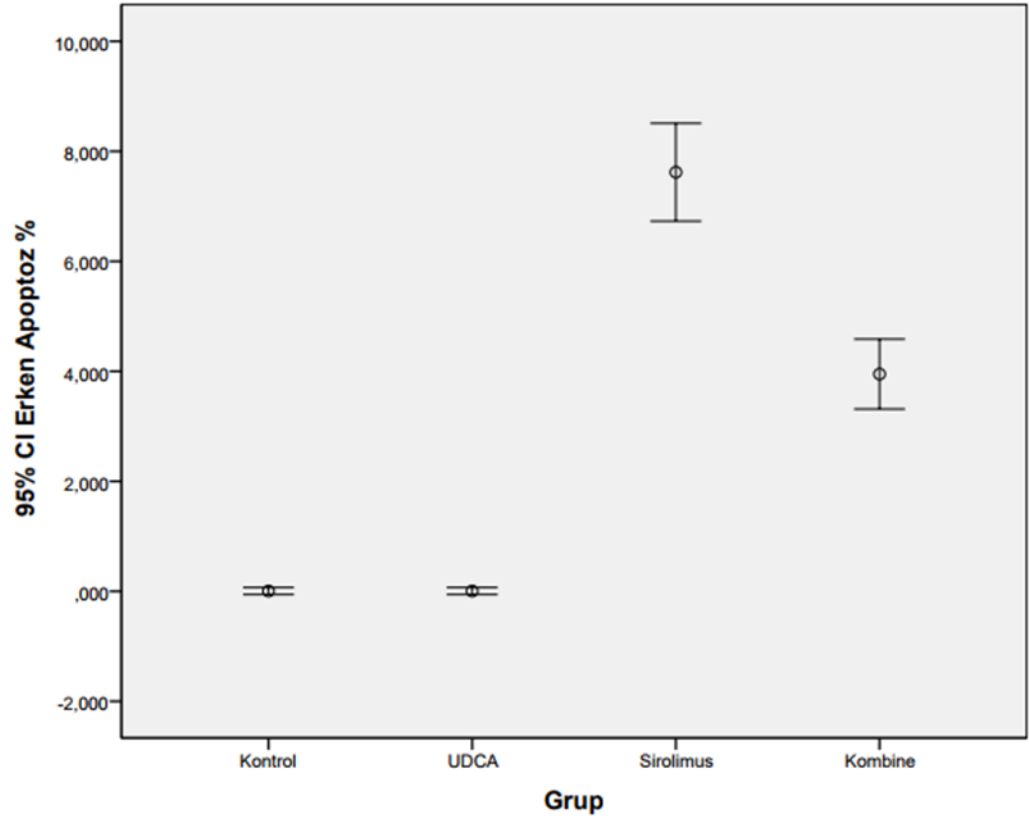
### 3.4.2. Geç Apoptoz/Ölü Yüzdesi



**Grafik 7.** Geç apoptoz/ölü yüzdesi istatistiksel grafiği.

Kontrol ve UDKA grupları istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p=1.000$ ). Geç apoptoz/ölü hücre yüzdesi oranı Kontrol- Sirolimus; Kontrol-Kombine, UDKA-Sirolimus; UDKA-Kombine; Sirolimus- Kombine grupları arası anlamlıdır. ( $p < 0.0001$ ).

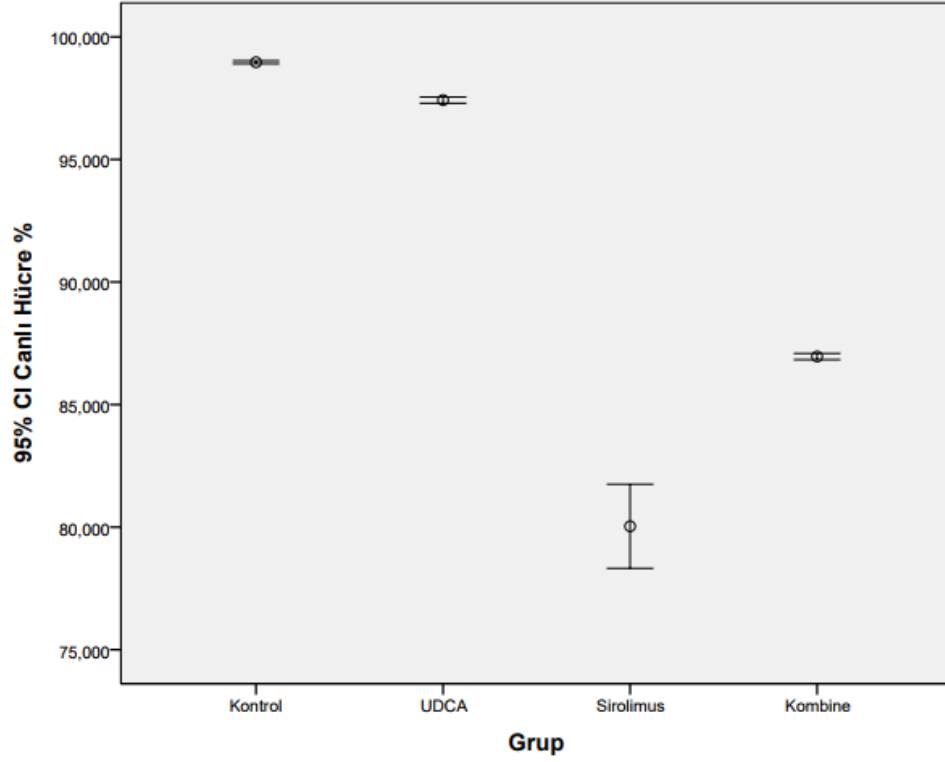
### 3.4.3. Erken Apoptoz Yüzdesi



**Grafik 8.** Erken apoptoz yüzdesi istatistiksel grafiği.

Kontrol - UDKA arası anlamlı değildir ( $p=1.000$ ). gruplar arasında ikili farkların tümü istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0,05$ ). Kontrol- Sirolimus; Kontrol- Kombine, UDKA-Sirolimus; UDKA-Kombine; Sirolimus- Kombine grupları arası anlamlıdır ( $p < 0.0001$ ).

### 3.4.4. Canlı Hücre Yüzdesi

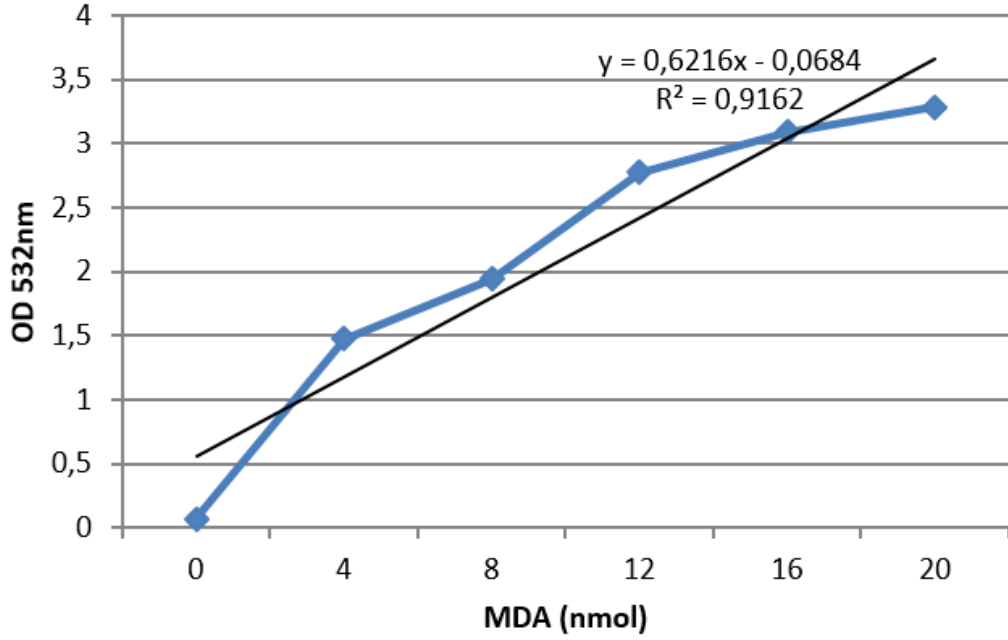


**Grafik 9.** Canlı hücre yüzdesi istatistiksel grafiği.

Gruplar arasında ikili farkların tümü istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0.001$ ). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında UDKA etkisi de anlamlıdır. Kombine grupta UDKA'nın etkisi sirolimusu etkisini baskılamıştır. En az canlı hücre sirolimus grubunda gözlemlenmiştir.

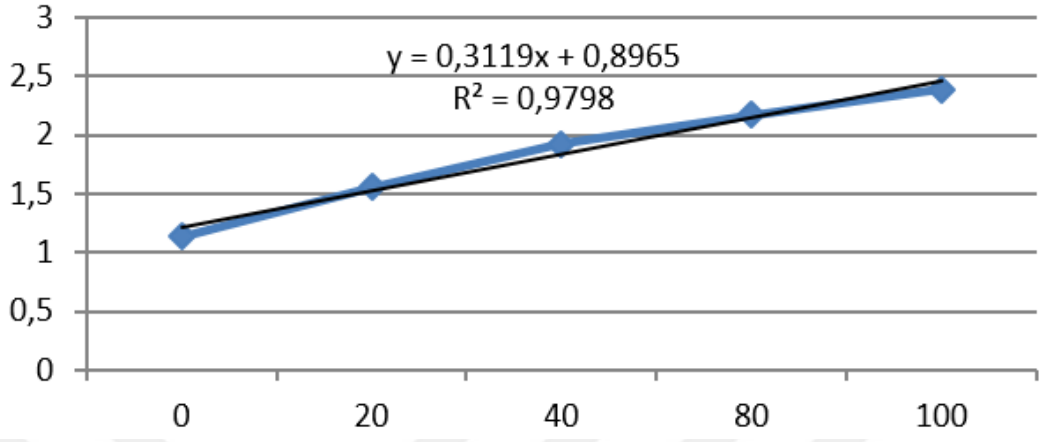
### 3.5 Oksidatif Stres Analiz Parametreleri Bulguları

#### 3.5.1 Lipit Peroksidasyonu (MDA) Ölçümü Bulgusu



**Grafik 10.** MDA standart eğrisi

### 3.5.2 Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Ölçümü Bulgusu

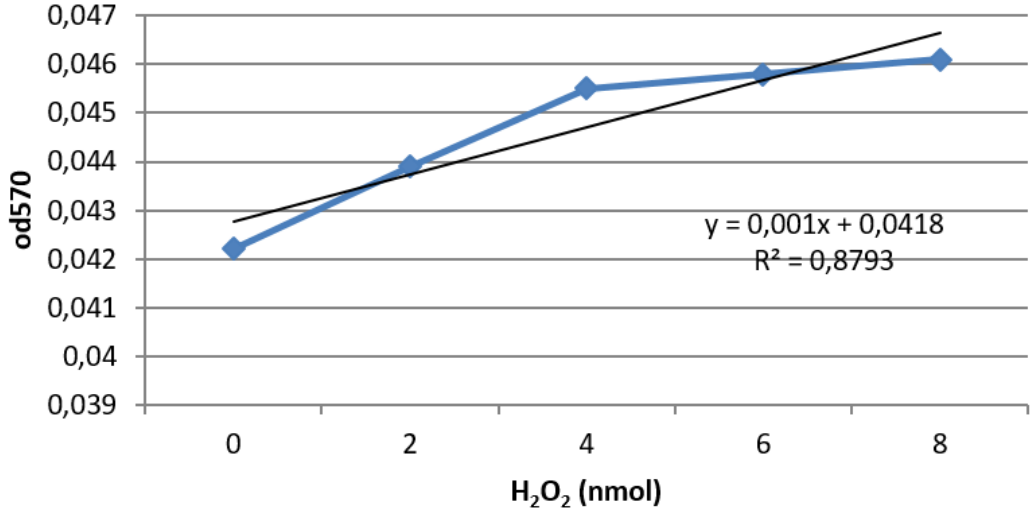


**Grafik 11.** NADPH standart eğrisi.



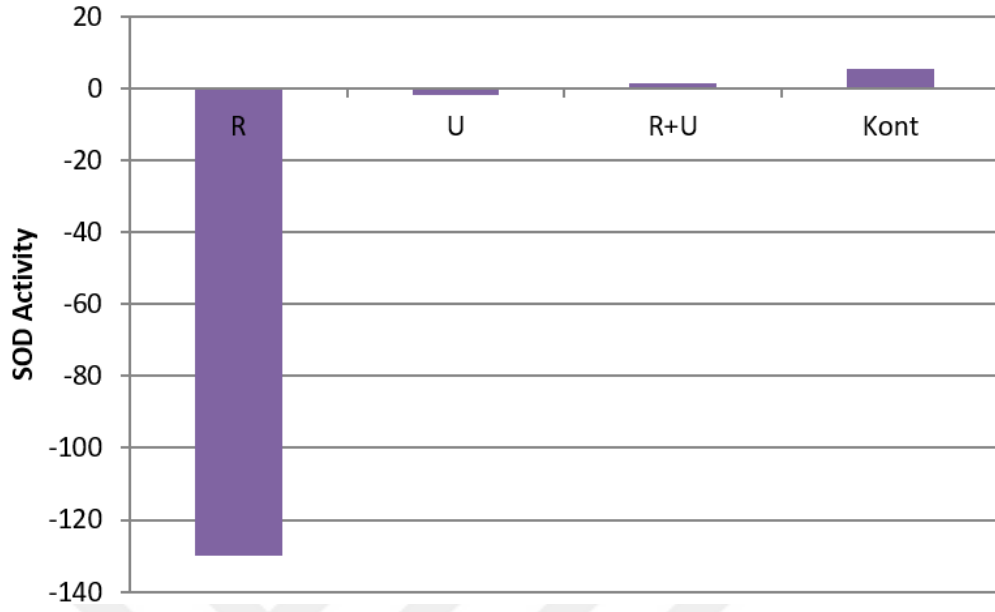
### 3.5.3 Katalaz (CAT) Aktivitesi Ölçümü Bulgusu

#### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Standart Eğri



Grafik 12. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> standart eğrisi

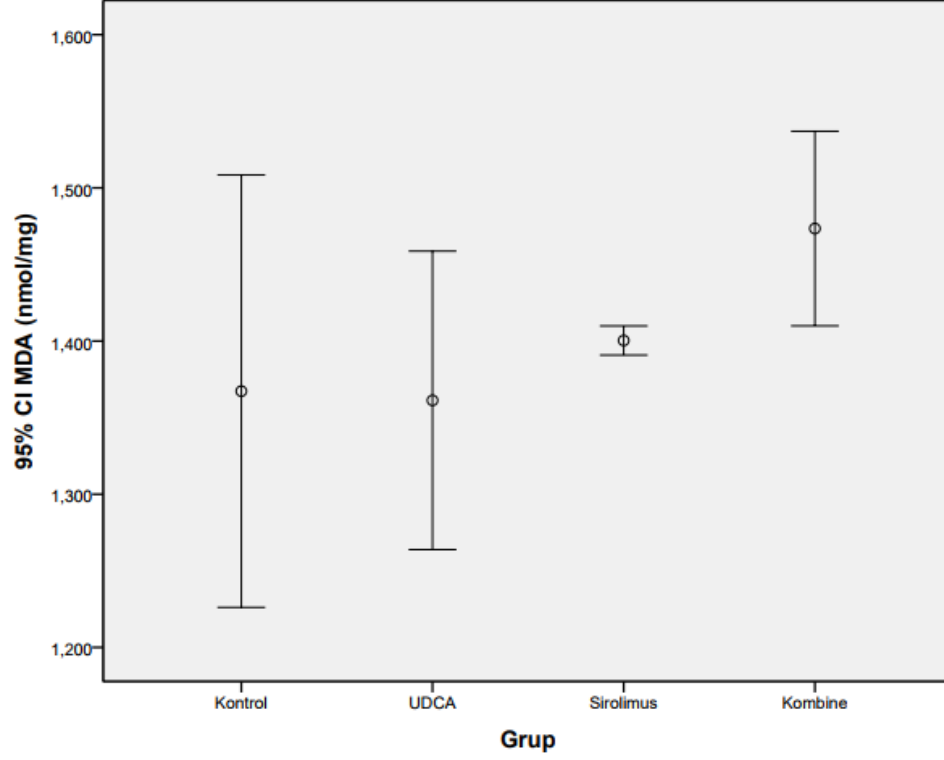
### 3.5.4 Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Ölçümü Bulgusu



**Grafik 13.** SOD Aktivitesi.

### 3.6 Oksidatif Stres Parametrelerinin İstatiksel Değerlendirilmesi

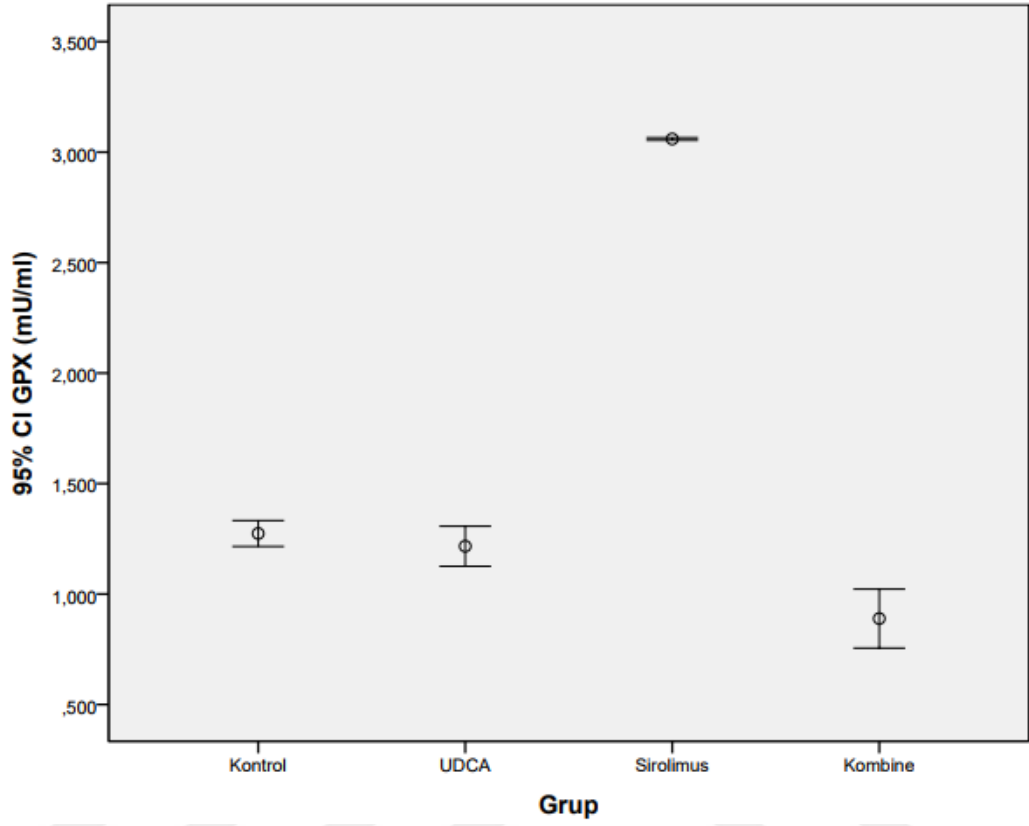
#### 3.6.1. Lipit Peroksidasyon (MDA) Düzeyi



**Grafik 14.** MDA düzeyi istatistiksel grafiği (p=0.001).

UDKA-kombine grubu arası anlamlıdır (p=0.031). Diğer ikili gruplar arasında farkların tümü istatistiksel olarak anlamlı değildir (Kontrol- UDKA p=0.993; Kontrol-Sirolimus p=0.414; Kontrol- Kombine p=0.086; UDKA-Sirolimus p=0.240; Sirolimus-kombine p=0.083).

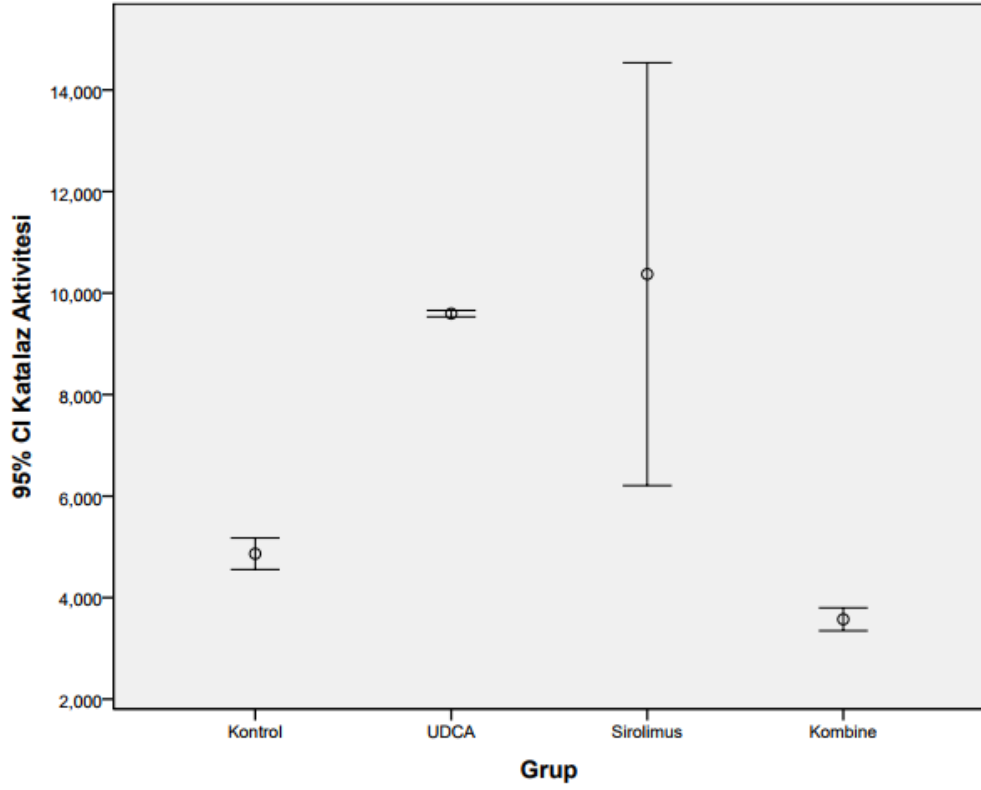
### 3.6.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) düzeyi



**Grafik 15.** GSH-Px düzeyi istatistiksel grafiği.

Kontrol- UDKA arası istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p=0,085$ ). Diğer tüm ikili gruplar anlamlıdır ( $p<0.001$ ).

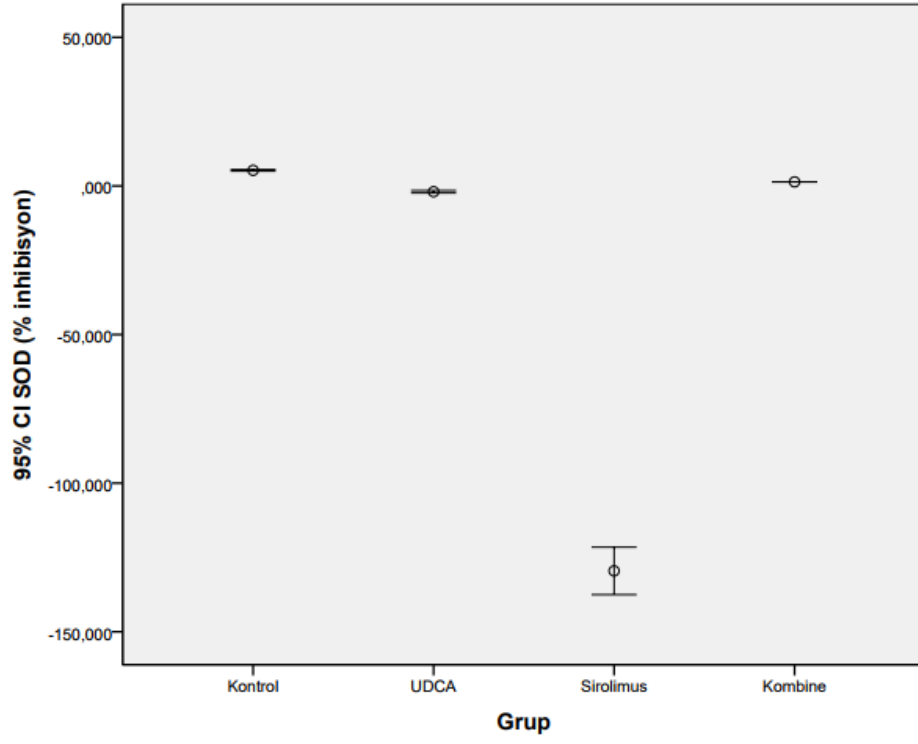
### 3.6.3. Katalaz (CAT) düzeyi



**Grafik 16.** CAT düzeyi istatistiksel grafiği.

Kontrol- UDKA; kontrol- kombine; UDKA- kombine grupları arası anlamlıdır ( $p < 0.001$ ). Kontrol- Sirolimus ( $p = 0.077$ ); UDKA-Sirolimus ( $p = 0.503$ ); Sirolimus-Kombine ( $p = 0.063$ ) grupları arasında fark anlamsızdır.

### 3.6.4. Süperoksit Dismutaz (SOD) düzeyi



**Grafik 17.** SOD düzeyi istatistiksel grafiği.

Tüm gruplar arasında ikili farkların tümü istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0.001$ ).

**Tablo 1.** Hücre Canlılığı analizlerinin istatistiksel değerlendirme tablosu.

Multiple Comparisons							
Dunnett T3							
Dependent Variable	(I) Grup	(J) Grup	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Ölü Hücre %	Kombine	Kontrol	-.385016*	.011469	.014	-.53724	-.23279
		UDCA	-.327509*	.012696	.008	-.44142	-.21360
		Sirolimus	-2.170489*	.010512	.007	-2.44477	-1.89620
	UDCA	Kontrol	-1.545000*	.020616	.011	-1.95416	-1.13584
		Sirolimus	-7.025000*	.050249	.009	-8.28468	-5.76532
		Kombine	-6.760000*	.025495	.003	-7.31580	-6.20420
	Sirolimus	Kontrol	1.545000*	.020616	.011	1.13584	1.95416
		UDCA	-5.480000*	.053852	.004	-6.25605	-4.70395
		Kombine	-5.215000*	.032016	.000	-5.47400	-4.95600
Kombine	Kontrol	7.025000*	.050249	.009	5.76532	8.28468	
	UDCA	5.480000*	.053852	.004	4.70395	6.25605	
	Kombine	.265000	.055902	.182	-.39263	.92263	
Geç Apoptoz/Ölü %	Kontrol	UDCA	.000000	.007071	1.000	-.05406	.05406
		Sirolimus	-4.290000*	.015811	.002	-4.55334	-4.02666
		Kombine	-1.300000*	.035355	.032	-2.14268	-.45732
	UDCA	Kontrol	.000000	.007071	1.000	-.05406	.05406
		Sirolimus	-4.290000*	.015811	.002	-4.55334	-4.02666
		Kombine	-1.300000*	.035355	.032	-2.14268	-.45732
	Sirolimus	Kontrol	4.290000*	.015811	.002	4.02666	4.55334
		UDCA	4.290000*	.015811	.002	4.02666	4.55334
		Kombine	2.990000*	.038079	.005	2.47349	3.50651
Kombine	Kontrol	1.300000*	.035355	.032	.45732	2.14268	
	UDCA	1.300000*	.035355	.032	.45732	2.14268	
	Sirolimus	-2.990000*	.038079	.005	-3.50651	-2.47349	
Erken Apoptoz %	Kontrol	UDCA	.000000	.007071	1.000	-.05406	.05406
		Sirolimus	-7.615000*	.070178	.012	-9.41796	-5.81204
		Kombine	-3.945000*	.050249	.016	-5.20468	-2.68532
	UDCA	Kontrol	.000000	.007071	1.000	-.05406	.05406
		Sirolimus	-7.615000*	.070178	.012	-9.41796	-5.81204
		Kombine	-3.945000*	.050249	.016	-5.20468	-2.68532
	Sirolimus	Kontrol	7.615000*	.070178	.012	5.81204	9.41796
		UDCA	7.615000*	.070178	.012	5.81204	9.41796
		Kombine	3.670000*	.086023	.003	2.92564	4.41436
Kombine	Kontrol	3.945000*	.050249	.016	2.68532	5.20468	
	UDCA	3.945000*	.050249	.016	2.68532	5.20468	
	Sirolimus	-3.670000*	.086023	.003	-4.41436	-2.92564	
Canlı Hücre %	Kontrol	UDCA	1.545000*	.011180	.001	1.41347	1.67653
		Sirolimus	18.930000*	.135093	.009	15.39263	22.46737
		Kombine	12.005000*	.011180	.000	11.87347	12.13653
	UDCA	Kontrol	-1.545000*	.011180	.001	-1.67653	-1.41347
		Sirolimus	17.385000*	.135370	.010	13.91395	20.85605
		Kombine	10.460000*	.014142	.000	10.35188	10.56812
Dependent Variable	(I) Grup	(J) Grup	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	Sirolimus	Kontrol	-18.930000*	.135093	.009	-22.46737	-15.39263
		UDCA	-17.385000*	.135370	.010	-20.85605	-13.91395
	Kombine	Kontrol	-6.925000*	.135370	.025	-10.39605	-3.45395
		UDCA	-12.005000*	.011180	.000	-12.13653	-11.87347
UDCA	Kontrol	-10.460000*	.014142	.000	-10.56812	-10.35188	
	Sirolimus	6.925000*	.135370	.025	3.45395	10.39605	

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

**Tablo 2.** Biyokimyasal parametrelerin istatistiksel değerlendirme tablosu.

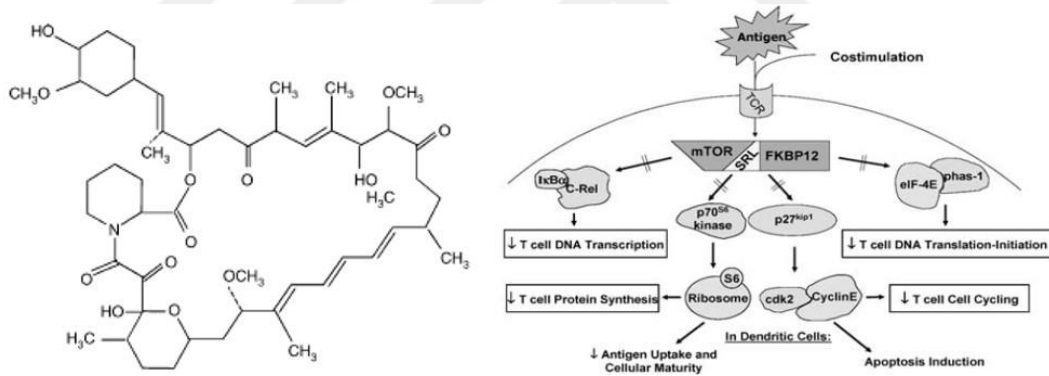
Dunnett T3

Dependent Variable	(I) Grup	(J) Grup	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Katalaz Aktivitesi	Kontrol	UDCA	-4,730556*	,024951	,005	-5,27015	-4,19097
		Sirolimus	-5,507778	,328688	,077	-13,93256	2,91700
		Kombine	1,291112*	,030225	,003	1,03273	1,54950
	UDCA	Kontrol	4,730556*	,024951	,005	4,19097	5,27015
		Sirolimus	-,777222	,327816	,503	-9,41157	7,85712
		Kombine	6,021667*	,018467	,002	5,67783	6,36551
	Sirolimus	Kontrol	5,507778	,328688	,077	-2,91700	13,93256
		UDCA	,777222	,327816	,503	-7,85712	9,41157
		Kombine	6,798889	,328260	,063	-1,72764	15,32542
	Kombine	Kontrol	-1,291112*	,030225	,003	-1,54950	-1,03273
		UDCA	-6,021667*	,018467	,002	-6,36551	-5,67783
		Sirolimus	-6,798889	,328260	,063	-15,32542	1,72764
SOD (% inhibisyon)	Kontrol	UDCA	7,212500*	,038849	,000	6,83772	7,58728
		Sirolimus	134,767500*	,628335	,006	118,28875	151,24625
		Kombine	3,895500*	,020500	,007	3,35490	4,43610
	UDCA	Kontrol	-7,212500*	,038849	,000	-7,58728	-6,83772
		Sirolimus	127,555000*	,628866	,007	111,20516	143,90484
		Kombine	-3,317000*	,033000	,013	-4,18723	-2,44677
	Sirolimus	Kontrol	-134,767500*	,628335	,006	-151,24625	-118,28875
		UDCA	-127,555000*	,628866	,007	-143,90484	-111,20516
		Kombine	-130,872000*	,628000	,007	-147,43280	-114,31120
	Kombine	Kontrol	-3,895500*	,020500	,007	-4,43610	-3,35490
		UDCA	3,317000*	,033000	,013	2,44677	4,18723
		Sirolimus	130,872000*	,628000	,007	114,31120	147,43280
MDA (nmol/mg)	Kontrol	UDCA	,006014	,013498	,993	-,11366	,12569
		Sirolimus	-,033077	,011133	,414	-,31991	,25376
		Kombine	-,106183	,012182	,086	-,26422	,05186
	UDCA	Kontrol	-,006014	,013498	,993	-,12569	,11366
		Sirolimus	-,039092	,007704	,249	-,23267	,15448
		Kombine	-,112197*	,009154	,031	-,19702	-,02738
	Sirolimus	Kontrol	,033077	,011133	,414	-,25376	,31991
		UDCA	,039092	,007704	,249	-,15448	,23267
		Kombine	-,073105	,005056	,083	-,19245	,04624
	Kombine	Kontrol	,106183	,012182	,086	-,05186	,26422
		UDCA	,112197*	,009154	,031	,02738	,19702
		Sirolimus	,073105	,005056	,083	-,04624	,19245
GPX (mU/ml)	Kontrol	UDCA	,057507	,008495	,085	-,02180	,13681
		Sirolimus	-1,785473*	,004635	,003	-1,90125	-1,66969
		Kombine	,385016*	,011469	,014	,23279	,53724
	UDCA	Kontrol	-,057507	,008495	,085	-,13681	,02180
		Sirolimus	-1,842980*	,007151	,005	-2,02729	-1,65867
		Kombine	,327509*	,012696	,008	,21360	,44142
	Sirolimus	Kontrol	1,785473*	,004635	,003	1,66969	1,90125
		UDCA	1,842980*	,007151	,005	1,65867	2,02729
		Kombine	2,170489*	,010512	,007	1,89620	2,44477



## TARTIŞMA

Organ nakli özellikle 20. yüzyılın ikinci yarısından günümüze kadar geçen süreçte hızlı bir şekilde artış göstermiştir. Bu süreçteki en büyük engel alıcının bağışıklık sistemi olmuştur. Alıcı ve greft ölümlerine bağlı olgular da araştırmacıları özelleşmiş immunsupresif arayışına itmiştir (Taylor et al., 2005). İmmunsüpresif ajanlardan birisi de bu çalışmada kullanılan Sirolimus'tur. Bu ajan, *Streptomyces hygroscopicus* bakterisinden izole edilen, böbrek ve karaciğer nakli başta olmak üzere organ nakillerinde bağışıklık sistemini baskılayan makrolid bir laktondur. İmmunsupresif etkisini; immun yanıt oluşturmada kilit rol oynayan T hücrelerinden sentezlenen IL-2'nin kendisini çoğalmak üzere ko-stimule etmesini bloke ederek göstermektedir. Bunu spesifik hücre içi reseptörü olan FKBP12'ye bağlanıp mTOR üzerindeki FKBP12- Sirolimus bağlayıcı domaine bağlanarak, mTOR yolağının işlevine engel olarak gerçekleştirmektedir (Hung et al., 2012, Hay & Sonenberg, 2004).

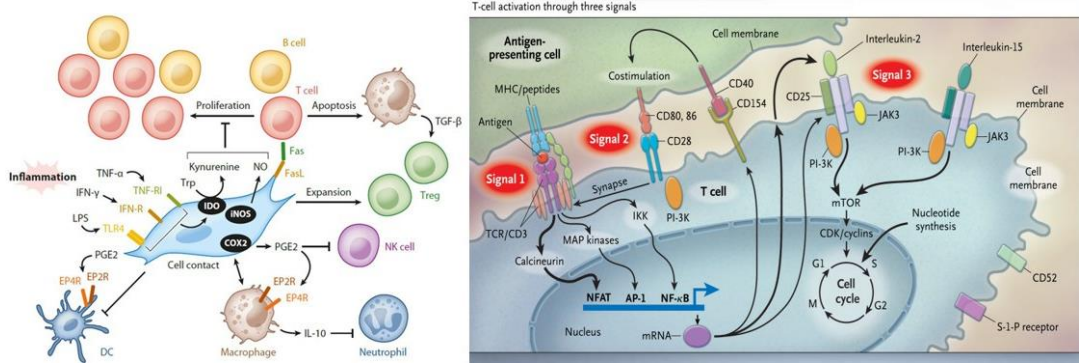


**Şekil 14.** Sirolimus açık formülü (Taylor et al., 2005). Sirolimusun Etki Mekanizması (Cutler & Antin, 2004).

İmmunsupresif ilaçların hepsi toksisite ile ilişkilendirilmektedir. Bu nedenle tedavi süreçlerinde sık sık farklı dozlar ve kombinasyonlar uygulanmaktadır (Taylor et al., 2005). Sirolimus analogu olan takrolimustan farklı olarak kalsinörünü inhibe etmez, bu nedenle kalsinörün inhibitörlerinin akut nefrotoksik profiline sahip değildir (Taylor et al., 2005). *Gonwa ve ark. 2002* yılında yaptıkları çalışmada diğer bir immunsupresif ajan olan Siklosporin A' nın sonlandırılıp yerine sirolimusun uygulandığı hastalarda

bu olumlu etki gözlemlenmiştir (Aleksic et al., 2002). Ancak daha sonraları sirolimusun gecikmiş greft fonksiyonu, kalsinörün inhibitörlerinin nefrotoksik etkilerini potansiyelize etme, proteinüri ve glomerülopati ile ilişkili olabileceği ortaya konulmuştur (Horoz, 2016). Hücre kültürü çalışmaları bazında bakıldığında Sirolimusun sitotoksik etkilerinin olduğunu gösteren az sayıda çalışma mevcuttur (Hoogduijn et al., 2008, Buron et al., 2009).

İmmünesupresif ilaçların yan etki profilinden dolayı yeni arayışlara girmişlerdir. Bu noktada MKH'lerin immünesupresif, immunmodülatör özellikleri, migrasyon yetenekleri araştırmacıların ilgisini çekmiştir (Barry & Murphy, 2004). Daha sonra yeni bir dönem başlamış ve organ nakillerinde MKH'lerin klinik kullanımı gündeme gelmiştir. GVHH tedavisi başta olmak üzere, organ nakillerinde bağışıklık sistemini baskılaması amacıyla immünesupresif ajanlarla birlikte kullanılmıştır. İmmünesupresif ajan ve MKH'ler arasındaki etkileşim ise aydınlatılması gereken en büyük sorun haline gelmiştir.



**Şekil 15.** Mezenkimal kök hücrelerin immunmodülatör etkileri (Frenette et al., 2013). T hücre aktivasyonu için gereken 3 sinyal (Halloran, 2004).

Bu deneysel çalışmada; organ nakillerinde immünesupresif özellikteki Sirolimus'un yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler üzerindeki etkileri ve antioksidatif özelliği bilinen UDKA'nın Sirolimusa bağlı toksisite üzerine etkilerini gözlemlenmiş ve yeni bir ajan olarak kullanılma potansiyeli araştırılmıştır.

Buron ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler (Kİ-MKH) ile beş immunsupresif ilacın (Siklosporin, Takrolimus, Sirolimus, Mikofenolat asit, Deksametazon) birbirlerine olan etkileşimleri değerlendirmişlerdir (Buron et al., 2009). T lenfosit hücrelerine önce Kİ-MKH verilmiş, daha sonra Kİ-MKH ile birlikte ilaç uygulaması yapılmıştır. Sirolimus ve Kİ-MKH'lerin birlikte verildiği deney grubunda, T hücrelerinin proliferasyonundaki artış sirolimusun kök hücreyi olumsuz etkilediği şeklinde değerlendirilmiştir (Buron et al., 2009). Bir başka çalışmada Sirolimusun adipojenik farklılaşmayı indüklediği tespit edilmiş ve bu durum Sirolimusun yan etkisi olan hiperlipidemi ile ilişkilendirilmiştir (Hoogduijn et al., 2008). Sirolimusun allojeneik kök hücre nakilleri sonrasında GVHH'yi önlemek amacıyla kullanımını gösteren çalışmalarda mevcuttur (Cutler & Antin, 2004, Perruccio et al., 2015). Böbrek nakliyle yapılan birkaç randomize çalışma, Sirolimus eklenmesi ile kurulan immunsupresif rejimin allogreft sağkalımı ve nakil sonrası uzun süreli böbrek fonksiyonunun sağlanması ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Perruccio et al., 2015). İncelenen bu çalışmalarda kemik iliği MKH'leri ile Sirolimusun birbirlerine doğrudan olan ilişkilerinin araştırılmamış oluşu literatürde bir boşluk oluşturmaktadır.

Ursodeoksikolik asit (UDKA) ilk kez Çin Siyah Ayısı'nın safra asitinden elde edilmiş makrosiklik bir laktondur (Roma et al., 2011, Ikegami & Matsuzaki, 2008). Klinikte karaciğer, böbrek, safra taşı eritilmesi gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmasının dışında allojeneik kök hücre nakillerinde hepatik komplikasyonları önlemek amacı ile de kullanılmaktadır (Ruutu et al., 2002, Ruutu et al., 2014, Wang et al., 2014). Son yıllarda yapılan çalışmalar ise UDKA'nın anti-inflamatuar, immunmodülatör özellikte olduğunu, in vitro ve in vivo ortamda oksidatif strese karşı direnç kazandırdığını göstermiştir (Roma et al., 2011, Lazaridis et al., 2001).

*Poupon ve ark.* yaptığı çalışmada UDKA'nın 500 µmol/l'ye kadar hepatik hücrelerde hücre membranında hasara yol açmadığı gözlemlenmiştir (Poupon, 1995). Kök hücreler ile ilişkili olarak literatüre bakıldığında allojenik hematopoietik kök hücre nakli sonrası sıklıkla gelişen karaciğer GVHH'yi önlemek amacıyla UDKA'nın klinikte kullanıldığı bir çalışma mevcuttur (Ruutu et al., 2002, Ruutu et al., 2014). Randomize yapılan, uzun süre takip edilen bu çalışmada UDKA kullanımı ile karaciğer GVHH, bağırsak GVHH, akut ve kronik GVHH ve hastalık nüks oranının azaldığı, sağkalım oranının yüksek olduğu bildirilmiştir (Ruutu et al., 2014). Ancak

literatür verileri incelendiğinde UDKA'nın kök hücreler üzerine etkilerinin değerlendirilmesine yönelik bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Hücre kültürü çalışmalarına bakılacak olursa *Avcı ve ark.* yapmış olduğu çalışmada Sirolimusun prostat kanseri hücre hatlarındaki hücre canlılığı üzerindeki etkilerine bakılmıştır. DU145, PC3 ve LNCaP hücre hatlarında Sirolimus'un 72. saatteki IC<sub>50</sub> dozları sırasıyla 11.08, 50.80 ve 1.25 nM olarak XTT yöntemi ile tespit edilmiştir (*Avcı et al., 2013*).

*Hoogduijn ve ark.* Sirolimus'un kalp dokusundan izole edilen MKH'ler üzerindeki etkilerine bakmak için hücrelere 0, 1, 1, 10 ve 50 ng/ml konsantrasyonlarında Sirolimus uygulamışlardır ve 7 gün boyunca MTT testi ile değerlendirilmiştir. 1. gün anlamlı bir değişiklik gözlemlenmezken, 7. gün hücre canlılığında doza bağımlı olarak 0,1 ve 1 ng/ml konsantrasyonlarında artış gözlemlenirken, 10ng/ml Sirolimus konsantrasyonunda anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. 50 ng/ml konsantrasyon uygulanan MKH canlılığında ise anlamlı derecede düşüş olduğu raporlanmıştır. Yine aynı çalışmada 10ng/ml konsantrasyonundaki Sirolimusun apoptozi indüklediğini, 0.1 ve 1ng/ml konsantrasyonlarında MHK proliferasyonu üzerine herhangi bir etki göstermediğini ancak 10 ng/ml konsantrasyonundan itibaren proliferasyonu önemli ölçüde azalttığını belirtmişlerdir (*Hoogduijn et al., 2008*).

Sirolimus'un yağ doku kaynaklı MKH'lerin canlılıkları üzerindeki etkileri ile ilgili çalışmalar bulunmakla birlikte literatürde tespit edilmiş bir IC<sub>50</sub> değeri bulunmamaktadır. Bu çalışmada Sirolimusun insan yağ doku kaynaklı MKH hattı üzerindeki sitotoksik etkisine WST-1 testi ile bakılmış, Hücreler üzerindeki IC<sub>50</sub> dozu yani proliferasyonunu yüzde elli oranında inhibe eden doz 48. saatte 15.85 µM olarak tespit edilmiştir.

UDKA uygulanan *in vivo* çalışmalara bakılacak olursa *Poupon ve ark.* yaptığı çalışmayla UDKA'nın 500 µmol/l'ye kadar hepatik hücre membranında hasara yol açmadığı, bir sitotoksik etkisininin olmadığını raporlamışlardır (*Poupon et al., 1995*).

*Qi ve ark.* yaptığı bir çalışmada ise sitotoksik etkisi gözlemlenmeyen UDKA'nın 500 µmol/l dozu ile çalışma deneyleri kurulmuştur (*Qi et al., 2012*).

Literatür verileri incelendiğinde UDKA'nın yağ doku kaynaklı MKH'lerin canlılıkları üzerindeki etkileri ile ilgili tespit edilmiş herhangi bir veri bulunmamaktadır.

Literatürde UDKA'nın MKH üzerindeki IC<sub>50</sub> değeri ile ilgili hiçbir veri bulunmaması, terapötik dozlarda sitotoksik etkisinin olmadığını gösteren çalışmalar olması ve yaptığımız WST-1 testinde de 100 µM'lık doza kadar bir sitotoksik etkinin bulunmaması sebebiyle çalışmanın diğer kısmında UDKA'nın 100 µM'lık dozu üzerinden deneyler kurulmuştur.

Bu çalışmada UDKA'nın insan yağ doku kaynaklı MKH hattı üzerindeki IC<sub>50</sub> değerini belirlemek amacıyla WST-1 testi yapılmış ve 100 µM'lık doza kadar hücreler üzerinde sitotoksik etkisinin bulunmadığı gözlemlenmiştir. Sirolimusun kısa süreli maruziyeti ile yapılan hücre çalışmaları Sirolimus'un apoptozu indüklediğini göstermiştir.

*Avcı ve ark.* prostat kanser hatlarıyla (PC-3, LNCaP ve DU 145) yaptıkları çalışmada Sirolimusun 72. saatte doza (1nM, 10nM, 25nM, 50nM ve 100nM) ve zamana bağımlı olarak apoptozu arttırdığını gözlemlemişlerdir (Avcı et al., 2013).

Literatür verilerine bakıldığında hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde kritik rol oynayan, Sirolimusun memelideki hedef proteini olan mTOR'un, PI3K/ AKT/ mTOR yolağı üzerinden p53, Bcl-2, BAD, p21, p27 ve c-myc moleküllerini inhibe ederek hücre ölümünü düzenlediği, Sirolimus varlığında ise bu kontrolü sağlayamayarak hücreyi apoptozla götürdüğü bilinmektedir (Küçüköner, 2013, Cutler & Antin, 2004, Avcı et al., 2013).

Toksik safra asitleri, hepatosit hücrelerde hücre yüzeyinde bulunan Fas ölüm reseptörü üzerinden apoptozu indüklemektedir. Fas ölüm reseptörünün aktive olmasıyla kaspaz-8 de aktive olur. Bunu takiben Bax proteinini mitokondriyal membrana yönlendirerek mitokondrinin fonksiyonel hale geçmemesine neden olan Bid 'i aktiveleştirir (Bid/Bax Bcl-2 ailesinden olan proapoptotik moleküller). Daha sonra mitokondrilerden sitozole sitokrom C salınımı gerçekleşir bu da apoptozla neden olur. UDKA hepatositlerde mitokondriyel işlev bozukluğunu ve sitokrom c salınımını önleyerek apoptozu engellemektedir (Lazaridis et al., 2001, Ikegami & Matsuzaki, 2008).

*Rodrigues ve ark.* sıçanlarla yaptıkları çalışmayla deoksikolik asitlerin apoptozu indüklediğini ancak UDKA'nın ise in vitro ve in vivo da hepatosit ve diğer hücrelerde proapoptotik uyarıcılar olan Fas ligand, TGF-β veya etanolden kaynaklanan apoptozu % 50-100 oranında inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir (Rodrigues et al., 1998). Apoptoz ile ilişkilendirilen p53 genine bakıldığında UDKA'nın hepatosit hücrelerde p53 ve

Bax sinyal moleküllerini regüle ederek deoksikolik asitlerden kaynaklanan apoptozu inhibe ettiğini gözlemlenmiştir (Ji et al., 2009, Amaral et al., 2007).

*Koga ve ark.* yaptıklarıyla çalışmayla UDKA kullanımıyla apoptoz artışında marker olarak kullanılan apoptozu inhibe edici bir protein olan Bcl-2 ekspresyonunda artış gözlemlenmiştir (Koga et al., 1997).

Bu çalışmada Sirolimus, UDKA, Sirolimus+ UDKA ve kontrolden oluşan dört deney grubuna Annexin V yöntemi uygulanarak canlı- ölü hücre yüzdesi ve erken-geç apoptoz oranları Muse® Cell Analyzer ile hesaplanmıştır. Yapılan ölçümler ve yapılan hesaplamalar doğrultusunda etken maddeye maruz kalmayan kontrol grubundaki hücrelerde ölü hücre %1.03, canlı hücre %98.97 olarak hesaplanmıştır. UDKA grubunda ölü hücreler %2.59, canlı hücreler %97.41 olarak hesaplanmıştır. Sirolimus grubunda erken apoptoz oranı %7.69, geç apoptoz oranı %4.31, ölü hücreler %8.10, canlı hücreler %79.90 olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubuna kıyasla canlı hücre yüzdesindeki bu azalma Sirolimusun hücreler üzerindeki negatif etkisini göstermektedir. Bu analiz literatürde yer alan ve bu çalışmada WST-1 testi ile gözlemlenen Sirolimus'un toksik etkisi nedeniyle hücreleri öldürdüğü yönündeki bulguyu destekler niteliktedir.

Sirolimus+ UDKA kombine grup sonuçlarında ise erken apoptoz oranı %3.90, geç apoptoz oranı %1.34, ölü hücreler %7.81, canlı hücreler % 86.95 olarak ölçülmüştür. Kombine grupta UDKA'nın etkisi Sirolimus etkisini baskılamış ve en az canlı hücre sirolimus grubunda gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar Sirolimus grubundaki sonuçlarla kıyaslandığında ölü hücre yüzdesindeki azalma ve canlı hücre yüzdesindeki artış, UDKA grubunun kontrol grubuna kısmi benzerliği göz önünde bulundurularak UDKA'dan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Hücre canlılık analizlerinin istatistiksel değerlendirilmesinde, ölü hücre yüzdesi Sirolimus ve kombine grup arası hariç diğer gruplar arası istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0,0001$ ). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında UDKA etkisi de anlamlıdır. Geç apoptoz/ölü yüzdesi istatistiksel değerlendirilmesinde kontrol ve UDKA grupları istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p=1.000$ ). Geç apoptoz/ölü hücre yüzdesi oranı Kontrol-Sirolimus; kontrol-kombine, UDKA- Sirolimus; UDKA- Kombine; Sirolimus-kombine grupları arası anlamlıdır ( $p<0.0001$ ). Erken apoptoz yüzdesi istatistiksel değerlendirilmesinde Kontrol - UDKA arası anlamlı değilken ( $p=1.000$ ),

gruplar arasında ikili farkların tümü istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,05$ ). Kontrol-Sirolimus; kontrol- Kombine, UDKA-Sirolimus; UDKA- Kombine; Sirolimus-Kombine grupları arası anlamlıdır ( $p < 0,0001$ ). Canlı hücre yüzdesi istatistiksel değerlendirilmesinde gruplar arasında ikili farkların tümü istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,001$ ). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında UDKA etkisi de anlamlıdır. Kombine grupta UDKA'nın etkisi sirolimusu etkisini baskılamıştır. En az canlı hücre sirolimus grubunda gözlemlenmiştir.

Çalışma sonunda elde edilen, Sirolimusun MHK'lerdeki apoptozu artırması literatürle uyumlu olarak beklenen bir sonuçtur. UDKA'nın hücre proliferasyonu düzenlediğini gösteren bulguların varlığı ve UDKA'nın antiapoptotik etkileri çalışmamızda elde ettiğimiz kombine grupta UDKA'nın Sirolimus etkisini baskılamasıyla uyumludur (Hempfling et al, 2003, Kowdley, 2000).

Sirolimusun memelideki hedef proteini olan mTOR'un önemli fonksiyonlarından bir tanesi 4EBP-1/ eIF4E üzerinden hücre döngüsünün ilerlemesinde yer alan proteinlerin (siklin D1, c-myc, ortinin dekarboksilaz) mRNA translasyonlarını düzenlemesidir (Kotb, 2012). Sirolimusun varlığıyla mTOR bu işlevini gerçekleştiremez. Sirolimus-FKBP ile bir kompleks oluşturarak T hücre döngüsünde G1/S fazı geçişi için gerekli olan siklin/cdk kompleksinin aktivasyonunu engelleyip, T hücre aktivasyonunu önlemektedir. Böylece hücrelerde mitotik aktivite azalır (Lazaridis et al., 2001, Ikegami & Matsuzaki, 2008, Serviddio et al., 2004).

UDKA'nın hücre döngüsü üzerindeki etkileriyle ilgili çalışma literatürde az sayıda bulunmaktadır. *Tsagarakis ve ark.* HepG2 hepatosellüler karsinoma hücreleriyle yaptıkları çalışma yüksek konsantrasyondaki UDKA'nın hücre döngüsünün ilerlemesini geciktirdiği yönündedir (Tsagarakis et al., 2010).

Bu çalışmada Sirolimus, UDKA, Sirolimus+ UDKA ve kontrolden oluşan dört deney grubuna Muse cell cycle kit kullanılarak hücre döngüleri Muse® Cell Analyzer ile hesaplanmıştır. Kontrol ve UDKA uygulanmış grupta G2/M fazlarının yüzdeleri sırasıyla %19.3 ve %18.9' dur. Sirolimus uygulanan grupta G2/M fazı %15.9 'a düşmüştür. Veriler Sirolimus grubunda mitotik aktivitenin azaldığını göstermektedir. Sirolimus+ UDKA grubunda ise azalan mitotik aktivitenin Kontrol ve UDKA grubuna benzer şekilde yüksek olduğu saptanmıştır.

Hücrelerde kararsız yapıda olarak bulunan serbest radikaller organizmada bulunan kararlı moleküllerin yapılarını bozarak oksidatif reaksiyonların oluşumuna neden olmaktadır. Bu durumdan yağ, protein, DNA, RNA gibi önemli bileşikler zarar görmekte bu da hücre ve dokularda hasarlara neden olmaktadır. Antioksidatif özelliğe sahip moleküller ise serbest radikallere kolayca yakalayabilecekleri bir hedef elektron oluşturarak sabit bir yapı oluşmasını sağlar (Cheeseman & Slater, 1993, Aydemir & Sarı, 2009, Karafakıoğlu, 2010).

Bu araştırma projesinde; antioksidatif etkinliğe bakmak amacıyla deney grupları lipit peroksidasyonu, glutatyon peroksidaz, katalaz ve süperoksit dismutaz olmak üzere dört ayrı oksidatif stres parametresi ile enzimatik olarak değerlendirilmiştir.

Literatüre bakıldığında UDKA'nın MKH'lerde antioksidatif etkinliğiyle ilgili herhangi bir çalışma mevcut değildir. Ancak hücre temelli çalışmalara bakıldığında ise *Akdemir ve ark.* 2015 yılında sıçan ovaryumlarında iskemik/ reperfüzyon ile oluşturulan bir yara modeli ile yaptıkları çalışmada UDKA kullanılan grupta ödem ve malondialdehit seviyelerinde (MDA-oksidatif stres parametresi) azalma, diğer oksidatif stres parametreleri olan  $\gamma$ -glutaminsistein sentetaz ( $\gamma$ -Gcs) mRNA ve glutatyon (GSH) seviyelerinde ise artış olduğunu gözlemlemişlerdir (Akdemir et al., 2015).

*Lapenna ve ark.* ise yaptıkları bir çalışmayla UDKA'nın Fe<sup>+3</sup> ve OH<sup>-</sup> moleküllerini bağlayarak antioksidan etki gösterdiğini belirtmişlerdir. En iyi yakalamayı 29 mM konsantrasyonunda göstermiştir (Lapenna et al., 2002).

*Perez ve Briz* çalışmalarında UDKA'nın Fe<sup>+3</sup> ve OH<sup>-</sup> moleküllerini bağlayarak ve katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon S-transferaz seviyelerine etki ederek doğrudan ve dolaylı olarak antioksidatif özellik gösterdiğini gözlemlemişlerdir (Perez & Britz, 2009).

*Qi ve arkadaşları* tarafından yapılan bir çalışmada in vitro ve in vivo selenyum kullanılarak oluşturulan oksidatif stresin UDKA tarafından engellendiğini gözlemlemişlerdir. Antioksidatif kapasiteyi değerlendirmek için total antioksidatif kapasite (T-AOC), Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutatyon redüktaz (GR), Glutatyon peroksidaz (Gpx), Glutatyon s-transferaz (GST), indirgenmiş glutatyon (GSH) ve Malondialdehit (MDA) parametrelerine bakmışlardır. UDKA ile



T-AOC ve diğer antioksidan enzim değerleri yükselmiş, MDA seviyesinin ise azaldığı gözlemlenmiştir (Qi et al., 2012).

Bu araştırmada; lipid peroksidasyon düzeyi istatistiksel açıdan  $p=0,001$  önem seviyesinde UDKA– kombinasyon grubu için anlamlı bulunurken ( $p=0.031$ ), diğer ikili gruplar arasındaki farkların tümü anlamsız olarak bulunmuştur. Glutasyon peroksidaz düzeyi ise istatistiksel açıdan  $p<0.001$  önem seviyesinde Kontrol–UDKA arası hariç ( $p=0,085$ ) diğer tüm ikili gruplar için anlamlıdır. Katalaz düzeyi  $p<0.001$  önem seviyesinde Kontrol- UDKA, Kontrol- Kombine, UDKA- Kombine grupları için anlamlı bulunurken, Kontrol- Sirolimus, UDKA- Sirolimus ve Sirolimus- Kombine grupları arasında anlamsız olarak saptanmıştır. Süperoksit dismutaz düzeyine bakıldığında tüm gruplar arasındaki ikili farkların tümü istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0.001$ ).

Elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda; Lipid peroksidasyon parametresi açısından bakıldığında yalnız sirolimus kullanımının oksidatif stres yarattığı, yalnız UDKA kullanımının oksidatif stresi azalttığı, ancak birlikte kullanımlarında anlamlı bir etkinin olmadığını gözlemledik. Bunun yanında Glutasyon peroksidaz ve katalaz parametreleri açısından bakıldığında ise beklenen etkiyi gözlemleyemedik. Bu durum sirolimusun yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler üzerinde bir oksidatif stres yaratmasını beklememize karşın, *Kofman ve ark.* yaptıkları çalışmadaki sirolimusun yetişkin kök hücrelerde antioksidatif gen ekspresyon düzeyini arttırarak, oksidatif stresi azaltmasını gözlemlenmeleriyle açıklanabilecek bir sonuçtur (Kofman, 2012).

SOD parametresi açısından bakıldığında ise, sirolimus kullanımı ile azalan süperoksit dismutaz enzim düzeyinin, kombinasyon grubunda UDKA'nın etkisiyle arttığı gözlemlenmektedir.

## SONUÇ VE ÖNERİLER

- 1- Sirolimus yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermektedir.
- 2- Sirolimus- UDKA kombinasyon grubunda canlı hücre, ölü hücre, erken ve geç apoptoz yüzdeleri açısından kontrol grubuna daha yakın değerlerde saptanmıştır. Bu bulguların UDKA etkisiyle olduğu düşünülmüştür.
- 3- Sirolimus ve UDKA etken maddelerinin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla, bu etken maddeler hücreler üzerine 1 nM-100 µM doz aralığında 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon periyodları süresince uygulanmıştır. WST-1 testi ile gerçekleştirilen analiz sonucunda Sirolimus'un yağ doku kaynaklı MKH'ler üzerindeki IC<sub>50</sub> dozu 48. saatte 15.85 µM olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte, güncel literatür verileriyle de uyumlu olarak UDKA'nın hücreler üzerinde herhangi bir sitotoksik etkisinin bulunmadığı belirlenmiştir.
- 4- Organ ve doku nakilleri sonrası immünsüpresif tedavi ve yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücre uygulaması birlikte yapılan hastalarda UDKA kullanımının, mezenkimal kök hücre popülasyonu üzerinde pozitif etkiler oluşturabileceği düşünülmektedir. Bu anlamda UDKA'nın klinik uygulamalar için yeni bir ajan olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir.
- 5- Konu ile ilgili *in vitro* çalışmalar ve başarılı sonuçlar alınırsa insan çalışmaları hücresel tedavilerde UDKA'nın rutin kullanıma sunulması açısından büyük önem taşımaktadır.

## KAYNAKLAR

- Akdemir, A., Sahin, C., Erbas, O., Yeniel, A. O., & Sendag, F. (2015). Is ursodeoxycholic acid crucial for ischemia/reperfusion-induced ovarian injury in rat ovary? *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 292(2), 445–450.
- Akgün, I. (2016). Mezenkimal kök hücre Mesenchymal stem cell, *I*(1), 29–32.
- Aleksic, I., Baryalei, M., Busch, T., Pieske, B., Schorn, B., Strauch, J., ... Dalichau, H. (2002). Improved renal function in sirolimus-treated renal transplant patients after early cyclosporine elimination. *Transplantation*, 69(8), 1560–1567.
- Amaral, J. D., Castro, R. E., Solá, S., Steer, C. J., & Rodrigues, C. M. (2007). p53 is a key molecular target of ursodeoxycholic acid in regulating apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 282(47), 34250-34259.
- Ara, CRE, Sa, TH., & Bakanli, LIK. (2005). Embriyonik kök hücre araştirmalari hakkında sağlık bakanliği genelgesi, 1–4.
- Avcı,Ç.B., Yılmaz, S. S., Doğan Ö, Ş., Üniversitesi Tıp Fakültesi, E., Biyoloji Anabilim Dalı, T., Üniversitesi Fen Fakültesi, E., & Bölümü, B. (2013). Rapamisinin prostat kanseri hücre hatlarındaki etkisi The effect of rapamycin in prostate cancer cell lines. *Araştırma Makalesi / Research Paper Ege Tıp Dergisi / Ege Journal of Medicine*, 52(1), 7–14
- Aydemir, B., Sarı E.K.,(2009) *Kocatepe Veteriner Dergisi*, Antioksidanlar ve Büyüme Faktörleri ile İlişkisi Erişim Adresi: <http://dergipark.gov.tr/kvj>
- Baksh, D., Song, L., & Tuan, R. S. (2004). Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 8(3), 301–316.
- Banas, A., Teratani, T., Yamamoto, Y., Tokuhara, M., Takeshita, F., Quinn, G., ... Ochiya, T. (2007). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology*, 46(1), 219–228.
- Bárcena A Kapidzica M, Gormleya M, M. M. O., & Goldfiena GA, and F. S. J. (2011). Human placenta and chorion: potential additional sources

- of hematopoietic stem cells for transplantation. *Transfusion*, 51(Suppl 4), 94S–105S.
- Barry, F. P., & Murphy, J. M. (2004). Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(4), 568–584.
- Bianco, P. (2014). “Mesenchymal” Stem Cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30(1), 677–704.
- Blum, B., & Benvenisty, N. (2008). The Tumorigenicity of Human Embryonic Stem Cells. *Advances in Cancer Research*, 100(8), 133–158.
- Bobis, S., Jaroča, D., & Majka, M. (2006). Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochemica et Cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*. Bobis, S., Jaroča, D. & Majka, M. *Mesenchymal Stem Cells: Characteristics and Clinical Applications. Folia Histochem. Cytobiol.* 44, 215–230 , 44(4), 215–230.
- Bogdanova, A., Bērziņš, U., Brūvere, R., Eivazova, G., & Kozlovskā, T. (2010). Adipose-derived stem cells cultured in autologous serum maintain the characteristics of mesenchymal stem cells. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences.*, 64(3–4), 106–113.
- Buron, F., Perrin, H., Malcus, C., Héquet, O., Thaunat, O., Kholopp-Sarda, M. N., ... Morelon, E. (2009). Human Mesenchymal Stem Cells and Immunosuppressive Drug Interactions in Allogeneic Responses: An In Vitro Study Using Human Cells. *Transplantation Proceedings*, 41(8), 3347–3352.
- Can, A. (2008). A concise review on the classification and nomenclature of stem cells. *Turkish Journal of Hematology*, 25(2), 57–59.
- Can, A. (2013) Kök Hücre Biyolojisi, Türleri ve Klinik Kullanımları. *Akademisyen Kitapevi*
- Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research : Official Publication of the Orthopaedic Research Society*. 641-650
- Cavaleri, F., & Schöler, H. (2009). Molecular bases of pluripotency. In *Essentials of Stem Cell Biology* (pp. 37-60). Academic Press.

- Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., & Middleton, J. (2007). Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *Stem Cells*, 25(11), 2739–2749.
- Cheeseman, K. H., & Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British medical bulletin*, 49(3), 481-493.
- Ching, C. B., & Hansel, D. E. (2010). Expanding therapeutic targets in bladder cancer: the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Laboratory investigation*, 90(10), 1406.
- Cutler, C., & Antin, J. H. (2004). Sirolimus for GVHD prophylaxis in allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 34(6), 471–476.
- Dazzi, F., Ramasamy, R., Glennie, S., Jones, S. P., & Roberts, I. (2006). The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Reviews*, 20(3), 161–171.
- Denton, M. D., Magee, C. C., & Sayegh, M. H. (1999). Immunosuppressive strategies in transplantation. *The Lancet*, 353(9158), 1083-1091.
- DiMarino, A. M., Caplan, A. I., & Bonfield, T. L. (2013). Mesenchymal stem cells in tissue repair. *Frontiers in Immunology*, 4(JUL), 1–9.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., ... Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317.
- Eckfeldt, C. E., Mendenhall, E. M., & Verfaillie, C. M. (2005). The molecular repertoire of the “almighty” stem cell. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 6(9), 726–737.
- Frenette, P. S., Pinho, S., Lucas, D., & Scheiermann, C. (2013). *Mesenchymal Stem Cell: Keystone of the Hematopoietic Stem Cell Niche and a Stepping-Stone for Regenerative Medicine. Annual Review of Immunology* (Vol. 31). 285-316
- Ghannam, S., Bouffi, C., Djouad, F., Jorgensen, C., & Noël, D. (2010). Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem cell research & therapy*, 1(1), 2.

- González, M. A., Gonzalez–Rey, E., Rico, L., Büscher, D., & Delgado, M. (2009). Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. *Gastroenterology*, *136*(3), 978-989.
- Halloran, P. F. (2004). Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med*, *351*(26), 2715–2729.
- Harel, A. (2013). Cryopreservation and cell banking for autologous mesenchymal stem cell-based therapies. *Cell & Tissue Transplantation & Therapy*, *2013*(5), 1-7.
- Harris, D. (2014). Stem cell banking for regenerative and personalized medicine. *Biomedicines*, *2*(1), 50-79.
- Hay, N., & Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes & development*, *18*(16), 1926-1945.
- He, S., Nakada, D., & Morrison, S. J. (2009). Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *25*, 377–406.
- Hempfling, W., Dilger, K., & Beuers, U. (2003). Ursodeoxycholic acid—adverse effects and drug interactions. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, *18*(10), 963-972.
- Hoogduijn, M. J., Crop, M. J., Korevaar, S. S., Peeters, A. M. A., Eijken, M., Maat, L. P. W. M., ... Baan, C. C. (2008). Susceptibility of Human Mesenchymal Stem Cells to Tacrolimus, Mycophenolic Acid, and Rapamycin. *Transplantation*, *86*(9), 1283–1291.
- Horoz, M. (2016). Kalsinörin ve mTOR İnhibitörü Nefrotoksitesisi. *Turkiye Klinikleri Nephrology-Special Topics*, *9*(2), 44-52.
- Horwitz, E. M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., ... Keating, A. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, *7*(5), 393–395.
- Hung, C. M., Garcia-Haro, L., Sparks, C. A., & Guertin, D. A. (2012). mTOR-dependent cell survival mechanisms. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *4*(12), a008771.

- Ikegami, T., & Matsuzaki, Y. (2008). Ursodeoxycholic acid: Mechanism of action and novel clinical applications. *Hepatology Research*, 38(2), 123–131.
- Ji, W. J., Qu, Q., Jin, Y., Zhao, L., & He, X. D. (2009). Ursodeoxycholic acid inhibits hepatocyte-like cell apoptosis by down-regulating the expressions of Bax and Caspase-3. *Zhonghua yi xue za zhi*, 89(42), 2997-3001.
- Kalervo Väänänen, H. (2005). Mesenchymal stem cells. *Annals of medicine*, 37(7), 469-479.
- Kansu, E. (2002) İmmünsüpresif Ajanların Genel Özellikleri ve Etki Mekanizmaları ANKEM derg 16 (No3)
- Karahuseyinoglu, S., Cinar, O., Kilic, E., Kara, F., Akay, G. G., Demiralp, D. Ö., ... Can, A. (2007). Biology of Stem Cells in Human Umbilical Cord Stroma: In Situ and In Vitro Surveys. *Stem Cells*, 25(2), 319–331.
- Kavanagh, D. P. J., & Kalia, N. (2011). Hematopoietic stem cell homing to injured tissues. *Stem Cell Reviews*, 7(3), 672–682.
- Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H., & Bieback, K. (2006). Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells*, 24(5), 1294–1301.
- Kim, E.-J., Kim, N., & Cho, S.-G. (2013). The potential use of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Experimental & Molecular Medicine*, 45(1), e2.
- Karafakioğlu, Y.S. (2010) *Kocatepe Veteriner Dergisi*, Antioksidanlar ve Bir Antioksidan Olarak Taurin Erişim Adresi: <http://dergipark.gov.tr/kvj>
- Koç, O. N., Gerson, S. L., Cooper, B. W., Dyhouse, S. M., Haynesworth, S. E., Caplan, A. I., & Lazarus, H. M. (2000). Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, 18(2), 307–316.
- Kofman, A. E., McGraw, M. R., & Payne, C. J. (2012). Rapamycin increases oxidative stress response gene expression in adult stem cells. *Aging (Albany NY)*, 4(4), 279.

- Koga, H., Sakisaka, S., Ohishi, M., Sata, M., & Tanikawa, K. (1997). Nuclear DNA fragmentation and expression of Bcl-2 in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*, 25(5), 1077–1084.
- Kotb, M. A. (2012). Molecular mechanisms of ursodeoxycholic acid toxicity & side effects: Ursodeoxycholic acid freezes regeneration & induces hibernation mode. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8882–8914.
- Kowdley, K. V. (2000). Ursodeoxycholic acid therapy in hepatobiliary disease. *The American journal of medicine*, 108(6), 481–486.
- Küçüköner, M. (2013). mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in the treatment of cancer. *Dicle Medical Journal / Dicle Tıp Dergisi*, 40(1), 156–160.
- Lapenna, D., Ciofani, G., Festi, D., Neri, M., Pierdomenico, S. D., Giamberardino, M. A., & Cuccurullo, F. (2002). Antioxidant properties of ursodeoxycholic acid. *Biochemical Pharmacology*, 64(11), 1661–1667.
- Lazaridis, K. N., Gores, G. J., & Lindor, K. D. (2001). Ursodeoxycholic acid mechanisms of action and clinical use in hepatobiliary disorders. *Journal of Hepatology*, 35, 134–146.
- Lee, K.-D. D. (2008). Applications of mesenchymal stem cells: an updated review. *Chang Gung Medical Journal*, 31(6), 228.
- Lindner, U., Kramer, J., Rohwedel, J., & Schlenke, P. (2010). Mesenchymal stem or stromal cells: Toward a better understanding of their biology? *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 37(2), 75–83.
- Ling, W., Zhang, J., Yuan, Z., Ren, G., Zhang, L., Chen, X., ... Shi, Y. (2014). Mesenchymal stem cells use IDO to regulate immunity in tumor microenvironment. *Cancer Research*, 74(5), 1576–1587.
- Liu, Z. J., Zhuge, Y., & Velazquez, O. C. (2009). Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of cellular biochemistry*, 106(6), 984–991.
- Ma, S., Xie, N., Li, W., Yuan, B., Shi, Y., & Wang, Y. (2014). Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell death and differentiation*, 21(2), 216.
- McGuirk, J. P., & Weiss, M. L. (2011). Promising cellular therapeutics for prevention



- or management of graft-versus-host disease (a review). *Placenta*, 32, S304-S310.
- Murphy, M. B., Moncivais, K., & Caplan, A. I. (2013). Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Experimental & Molecular Medicine*, 45(11), e54.
- Ograczyk, E., Kowalewicz-Kulbat, M., Wawrocki, S., & Fol, M. (2015). Immunosuppression - Tough ally in torrid time. *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej*, 69.
- Perez, M. J., & Britz, O. (2009). Bile-acid-induced cell injury and protection. *World Journal of Gastroenterology*, 15(14), 1677–1689.
- Perruccio, K., Mastrodicasa, E., Arcioni, F., Capolsini, I., Cerri, C., Gurdo, G., & Caniglia, M. (2015). Sirolimus-based immunosuppression as GVHD prophylaxis after bone marrow transplantation for severe aplastic anaemia: a case report and review of the literature. *Case Reports in Hematology*, 2015, 321602.
- Poupon, R., & Poupon, R. E. (1995). Ursodeoxycholic acid therapy of chronic cholestatic conditions in adults and children. *Pharmacol Ther*, 66(1), 1–15.
- Qi, H.-P., Wei, S.-Q., Gao, X.-C., Yu, N.-N., Hu, W.-Z., Bi, S., & Cui, H. (2012). Ursodeoxycholic acid prevents selenite-induced oxidative stress and alleviates cataract formation: In vitro and in vivo studies. *Molecular Vision*, 18(January), 151–160.
- Qiao, L., Yacoub, A., Studer, E., Gupta, S., Pei, X. Y., Grant, S., ... Dent, P. (2002). Inhibition of the MAPK and PI3K pathways enhances UDCA-induced apoptosis in primary rodent hepatocytes. *Hepatology*, 35(4), 779–789.
- Rathee, P., Chaudhary, H., Rathee, S., Rathee, D., & Kumar, V. (2013). Immunosuppressants : A Review, *I*(12), 90–101.
- Rebelatto, C. K., Aguiar, A. M., Moretao, M. P., Senegaglia, A. C., Hansen, P., Barchiki, F., ... Correa, A. (2008). Dissimilar Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, and Adipose Tissue. *Experimental Biology and Medicine*, 233(7), 901–913.
- Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A. I., ... Shi, Y. (2008). Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted

- Action of Chemokines and Nitric Oxide. *Cell Stem Cell*, 2(2), 141–150.
- Rodrigues, C. M., Fan, G., Wong, P. Y., Kren, B. T., & Steer, C. J. (1998). Ursodeoxycholic acid may inhibit deoxycholic acid-induced apoptosis by modulating mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen species production. *Molecular medicine*, 4(3), 165-178.
- Rodrigues, C. M. P., Fan, G., Ma, X., Kren, B. T., & Steer, C. J. (1998). A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. *Journal of Clinical Investigation*, 101(12), 2790–2799.
- Roma, M. G., Toledo, F. D., Boaglio, A. C., Basiglio, C. L., Crocenzi, F. A., & Sánchez Pozzi, E. J. (2011). Ursodeoxycholic acid in cholestasis: linking action mechanisms to therapeutic applications. *Clinical Science*, 121(12), 523–544.
- Rossant, J. (2008). Stem Cells and Early Lineage Development. *Cell*.527-531
- Ruutu, T., Eriksson, B., Remes, K., Juvonen, E., Volin, L., Remberger, M., ... & Ringdén, O. (2002). Ursodeoxycholic acid for the prevention of hepatic complications in allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, 100(6), 1977-1983.
- Ruutu, T., Juvonen, E., Remberger, M., Remes, K., Volin, L., Mattsson, J., ... Ringdén, O. (2014). Improved Survival with Ursodeoxycholic Acid Prophylaxis in Allogeneic Stem Cell Transplantation: Long-Term Follow-Up of a Randomized Study. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 20(1), 135–138.
- Salem, H. K., & Thiemermann, C. (2010). Mesenchymal stromal cells: Current understanding and clinical status. *Stem Cells*, 28(3), 585–596.
- Santos, F., Hendrich, B., Reik, W., & Dean, W. (2002). Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Developmental biology*, 241(1), 172-182.
- Sehgal, S. N. (2003). Sirolimus: Its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplantation Proceedings*, 35(3 SUPPL.).
- Serviddio, G., Pereda, J., Pallardó, F. V., Carretero, J., Borrás, C., Cutrin, J., ... & Sastre, J. (2004). Ursodeoxycholic acid protects against secondary biliary cirrhosis in rats by preventing mitochondrial oxidative stress. *Hepatology*, 39(3).

- Taylor, A. L., Watson, C. J. E., & Bradley, J. A. (2005). Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 56(1 SPEC. ISS.), 23–46.
- Tekeli, S. (2016). Stem cells; mesenchymal stem cells and current clinical applications, 1(2), 72–83.
- Tsagarakis, N. J., Drygiannakis, I., Batistakis, A. G., Kolios, G., & Kouroumalis, E. A. (2010). A concentration-dependent effect of ursodeoxycholate on apoptosis and caspases activities of HepG2 hepatocellular carcinoma cells. *European Journal of Pharmacology*, 640(1–3), 1–7.
- Tsang, C. K., Qi, H., Liu, L. F., & Zheng, X. F. S. (2007). Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases. *Drug Discovery Today*, 12(3–4), 112–124.
- Wang, L., Han, Q., Chen, H., Wang, K., Shan, G. L., Kong, F., ... & Wang, Q. (2014). Allogeneic bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with UDCA-resistant primary biliary cirrhosis. *Stem cells and development*, 23(20), 2482-2489.
- Wang, S., Qu, X., & Zhao, R. (2012). Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Journal of Hematology & Oncology*, 5(1), 19.
- Watson, C. J. E., & Dark, J. H. (2012). Organ transplantation: historical perspective and current practice. *British Journal of Anaesthesia*, 108(suppl 1), i29–i42.
- Weissman, I. L., Anderson, D. J., & Gage, F. (2001). Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annual review of cell and developmental biology*, 17(1), 387-403.
- Weissman, I. L. (2000). Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science*, 287(5457), 1442-1446.
- Wong, C. J., & Pagalilauan, G. (2015). Primary Care of the Solid Organ Transplant Recipient. *Medical Clinics of North America*, 99(5), 1075–1103.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilimsel anlamda her konuda bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, her türlü yardımı ve desteğiyle arkamda olduğunu bildiğim, ayrıca tez çalışma konumun belirlenmesinden, araştırmanın sonuçlanmasına kadar olan süreçte bana yol gösteren değerli danışman hocam **Prof. Dr. Yiğit UYANIKGİL**'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince bilgisi, tecrübesi, tavsiyeleri ve yarattığı imkânlarla yardımlarını esirgemeyen değerli hocam **Sn. Doç. Dr. Çığır BİRAY AVCI**'ya, sitotoksisite testleri aşamasında vaktini ayırarak yardımcı olan değerli hocam, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı **Sn. Prof. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ**'e, deneylerim süresince benimle bilgisini, tecrübelerini, vaktini ve emeğini paylaşan, her zaman desteklerini yanımda hissettiğim değerli arkadaşlarım **Sn. Arş. Gör. Bakiye GÖKER BAĞCA** ve **Sn. Burak GÖKÇE**'ye çok teşekkür ederim.

Çalışmamın apoptozis testleri ve hücre döngüsünün belirlenmesi aşamalarında bilgi ve tecrübeleriyle bana yardımcı olan değerli arkadaşım **Sn. Arş. Gör. Gürkan YİĞİTTÜRK**'e, istatistiksel analizlerinin yapılmasında yardımcı olan **Sn. Doç. Dr. Timur KÖSE**'ye, her zaman her koşulda değerli arkadaşlığı ve dostluğuyla yanımda olan, yüksek lisans eğitimim boyunca, sevinçleri ve üzüntüleri birlikte paylaştığımız, yardımı ve motivasyonu ile her an bana destek olan, ne mutlu ki aynı zamanda iş arkadaşım **Sn. Dr. Senem TEKELİ**'ye çok teşekkür ederim.

Hayatıma girdiği ilk günden beri her an yanımda olan, bana özel olduğumu hissettiren, varlığıyla yaşamıma anlam katan, dostum, arkadaşım, sevgilim, biricik eşim **Sn. Dr. Atabak NAGHAVİ**'ye koşulsuz sevgisi ve desteği için teşekkür ederim.

Gözlerini bu dünyaya açtığı ilk andan beri her şeyi paylaştığımız, birbirimize destek olduğumuz, canımdan çok sevdiğim, kardeşim olduğu için çok şanslı hissettiğim canım kardeşim kimyager **Sn. Aslı ARISU**'ya, hayattaki en büyük şansım, attığım her adımda sonsuz güvenlerini, desteklerini ve sevgilerini hissettiğim, çocukları olduğum için gurur ve mutluluk duyduğum canım annem **Sn. Emsal ARISU** ve canım babam **Sn. İsmail ARISU**'ya ayrıca teşekkür ederim.

Hayatımın en güzel, en saf, en özel yanı kızım **Larisa'ma** teşekkürlerimle...

Bu tez çalışmasının gerçekleşmesine Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu 2015-TIP-010 nolu BAP projesi aracılığıyla destek sağlayan Ege Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

İzmir, 05.04.2019

**Esra ARISU NAGHAVİ**

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı** : Esra ARISU NAGHAVİ  
**e-posta** : [esra\\_arisu@hotmail.com](mailto:esra_arisu@hotmail.com)



### Eğitim Durumu

- 2013-Halen Ege üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü/ Kök Hücre Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans
- 2008-2013 Ege Üniversitesi/Fen Fakültesi/Biyoloji Bölümü/Moleküler Biyoloji ve  
Genetik Opsiyonu
- 2004-2007 Özel Amid Lisesi
- 2003-2004 Şehit Namık Tümer İlköğretim Okulu

### Yabancı Dil

**İngilizce** Ege University School of Foreign Languages, English Language  
Department Preparatory Unit, Proficiency Exam Certificate Exam  
Result: 73%

### Eğitim Sertifikaları

Ege Üniversitesi Eğitim Fakültesi Formasyon Sertifikası

New Brunswick Marka 170S Model CO<sub>2</sub> İnkübatör Cihazına İlişkin Kullanıcı Eğitim  
Programı 14.11.2014

Olympus Marka S761 Model Stereo Mikroskop Cihazına İlişkin Kullanıcı Eğitim  
Programı 14.11.2014

ISO / IEC 17025:2005 Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Yeterliliği  
12.03.2013

OHSAS 18001:2007 İş Sağlığı ve Güvenliği Yönetim Sistemi 11.03.2013

ISO 14001:2004 Çevre Yönetim Sistemi 10.03.2013

### **Staj**

E.Ü Tüp Bebek Merkezi 01.02.2013-28.02.2013

E.Ü. Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Moleküler Tıp  
Laboratuvarı ( Zorunlu Staj) 17.07.2012-23.08.2012

E.Ü. Nükleer Tıp Anabilim Dalı 02.01.2012-09.03.2012

E.Ü. Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı 12.10.2010-24.12.2010

### **Katılım Sertifikaları**

2nd İnternational Congress On Stem Cell And Celluler Therapies/ANTALYA 15-18  
Ekim 2015

Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yaşam, Bilim ve Etik Semineri/İZMİR 20  
Mart 2014

Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Uyum Eğitimi/İZMİR 7 Mart 2014

Ege Üniversitesi Temel Kök Hücre Eğitim Semineri Egekök/İZMİR 25 Ocak 2014

Uluslararası Katılımlı 9.İÜGEN Moleküler Biyoloji ve Genetik Kış Okulu/  
İSTANBUL 24-26 Şubat 2012

18. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi/İSTANBUL 4-9 Temmuz 2011

Geleneksel 3. Kök Hücre Sempozyumu/İZMİR 30 Nisan 2011

Ege Üniversitesi 8. Kariyer Günleri/İZMİR 4-5-6 Mayıs 2010

## **Bilgisayar Bilgisi**

Microsoft Office Word – Excel – Powerpoint, Internet

## **Projelerde Aldığı Görevler**

Ursodeoksikolik Asidin Sirolimusa Maruz Kalmış İnsan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Hattı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Ege Üniversitesi, 15-TIP-010, ARAŞTIRMACI, 2015-Halen

Hipoksik Ortamda Otolog Serumla Elde Edilen İnsan Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerde Kriyoprezervasyon Etkisi, Proliferatif Ve Kondrojenik Farklanma Kapasitesinin İncelenmesi. Ege Üniversitesi, 15-TIP-011, ARAŞTIRMACI, 2015-Halen

Hipoksik Ortamda Otolog Serumla Elde Edilen İnsan Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerde Kriyoprezervasyon Etkisi, Proliferatif Ve Kondrojenik Farklanma Kapasitesinin İncelenmesi. Ege Üniversitesi İnsan Etik Kurulu, 2015

## **Dergilerde Yayınlanan Makaleler**

Sır Gözde, **Arısu Esra**, Yiğittürk Gürkan, Çavuşoğlu Türker, Avcı Çığır Biray, Çelik Servet, Erbaş Oytun, Uyanıkgil Yiğit, Oksitosinin Hücresel Tedavide Kullanılma Potansiyeli Review, 2015, *FNG Bilim Tıp Dergisi* 2015;1(3):163-169

Sır Gözde, Tekeli Senem, Kürekçi Şebnem Yıldırım, **Naghavi Esra Arısu**, Çavuşoğlu Türker, Uyanıkgil Yiğit, Kordon kanı kök hücreleri ve klinik kullanımı Review, 2016, *FNG Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi* 2016;1(2):53-58

Tekeli Senem, **Naghavi Esra Arısu**, Gökçe Burak, Sır Gözde, Yiğittürk Gürkan, Çavuşoğlu Türker, Uyanıkgil Yiğit, Kök hücreler; mezenkimal kök hücreler ve güncel klinik uygulamaları Review, 2016, *FNG Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi* 2016;1(2):72-83

## **Poster ve Bildiriler**

2.Uluslararası Kök Hücre Ve Hücresel Tedavi Kongresinde ‘Investigation Of The Effect Of Oxytocin On AT-MSc Exposure With Tacrolimus’ konulu poster, 15-18 Ekim/ANTALYA

