



**T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**RESVERATROL İLE MUAMELE EDİLMİŞ YAĞ DOKUSU  
KAYNAKLI MEZENŞİMAL KÖK HÜCRE  
SİTOKİNLERİNİN A549 KANSER HÜCRESİNE  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**

**ERHAN ŞAHİN**

**DANIŞMAN**

**PROF.DR. CENGİZ BAYÇU  
PROF.DR. AYŞE TANSU KOPARAL**

**2015**





**T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**RESVERATROL İLE MUAMELE EDİLMİŞ YAĞ DOKUSU  
KAYNAKLI MEZENŞİMAL KÖK HÜCRE SİTOKİNLERİNİN  
A549 KANSER HÜCRESİNE ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**

**ERHAN ŞAHİN**

**DANIŞMAN**

**PROF.DR. CENGİZ BAYÇU**

**PROF.DR. AYŞE TANSU KOPARAL**


**Bu Çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma  
Projeleri Komisyonunca desteklenmiştir.  
Proje No: 201411038**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Erhan Şahin'in Doktora Tezi olarak hazırladığı "Resveratrol İle Muamele Edilmiş Yağ Dokusu Kaynaklı Mezenşimal Kök Hücre Sitokinlerinin A549 Kansere Hücrelerine Etkilerinin Araştırılması" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "**KABUL**" edilmiştir.

Tarih: 12.11.2015

Üye: Prof.Dr. Cengiz Bayçu



Üye: Prof.Dr. Varol Şahintürk



Üye: Prof.Dr. Fatma Sultan Kılıç



Üye: Prof.Dr. Ayşe Tansu Koparal



Üye: Yrd. Doç.Dr. Dilek Burukoğlu Dönmez



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 13 / 11 / 2015 tarih ve 1067/4999 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hasan Meysi GÜNEŞ  
Enstitü Müdürü



## ÖZET

Günümüzde kök hücre tedavileri, tıbbın birçok alanında deneysel veya bazı alanlarında da klinik olarak kullanılan önemli tedavi yöntemlerindedir. Farklı tedavi yöntemleri kullanılmasına rağmen henüz kanseri eradike edebilecek bir tedavi mevcut değildir. Akciğer kanseri en sık görülen kanser türleri arasındadır. Birçok deneysel çalışmada tedavi edici ve koruyucu özelliği gösterilen MKH'nin kanser modellerinde kanserli hücreleri baskıladığı ve çoğalmalarını durdurduğu bildirilmiştir. Ancak son yıllarda kanser tedavisi için kök hücrelerin kullanıldığı çalışmalarda; kök hücrelerin kanser oluşumunu tetiklediği, kitleyi büyüttüğü, yeni damarların oluşumuna ve kanserin invazyonuna yardımcı olduğu gösterilmiştir. MKH'ler ile kanser hücreleri arasındaki iletişimin MKH'lerden salınan sitokinler yardımıyla sağlandığı bilinmektedir. MKH'nin salgıladığı bu sitokinlerin varlığı ve kanserli hücreler üzerindeki etkisi MKH'lerin tedavi güvenilirliğini azaltmaktadır. Resveratrolün inflamasyon, oksidatif stres, kanser oluşması ve ilerlemesi, platelet agregasyonu, aterosklerozis ve yaşlanma gibi birçok biyolojik aktivitede olumlu görev aldığı gösterilmiştir. Bu çalışmanın amacı, MKH'ler ile A549 akciğer kanser hücrelerini *in-vitro* olarak aynı ortamda tutarak, MKH'lerin kanserli hücreleri desteklerken kullandığı sitokinleri, faydalı ve anti kanserojenik özelliğiyle bilinen resveratrol ile baskılayarak, kanserin tedavisinde çok önemli yeri olan MKH'lerin kullanımını ve tedavinin güvenilirliğini araştırmaktır.

Bu çalışmada hücre kültürü seviyesinde 6 ayrı grup oluşturularak çalışılmıştır. MKH'lerden salınan sitokinler (IL 6, CCL5, VEGF, SDF-1) ve resveratrolün bu sitokinler üzerindeki etkileri toplanan medyumlarda ELISA, western blot ve gerçek zamanlı PCR (rt-PCR) yöntemleriyle araştırılmıştır. Deneyimizde *in-vitro* sitotoksitesite testleri yapılmıştır. Floresan boyama ile morfolojik inceleme (DAPI boyama) yapılmıştır.

Yaptığımız sitotoksitesite deneyleri sonucunda A549 kanser hücrelerinde ve MKH'de güvenli doz 1µM olarak bulunmuştur. DAPI floresan boyaması sonucunda resveratrolün ve MKH'nin A549 kanser hücresi üzerinde apoptotik etkisi görülmemiştir. ELISA ve western blot deneyi ile gruplar arası sitokin miktar değişimine baktığımızda IL-6 ve VEGF sitokinlerinin ifade olduğu, SDF-1 ve CCL-5 salınımının olmadığı tespit edilmiştir. Rt-PCR deneyleri ile VEGF mRNA ekspresyonuna bakılmış, ELISA ve western blot deneyleri ile paralellik gösterdiği bulunmuştur. Gruplar arası sitokin salınımına baktığımızda en yüksek IL-6 ve VEGF salınımının A549+MKH grubunda olduğu resveratrolün anlamlı bir şekilde bu salınımı azalttığı bulundu.

Sonuç olarak IL-6 ve VEGF salınımı A549 kanser hücreleri ve MKH'leri bir arada bulunduğu artmaktadır. Resveratrol bu artışı anlamlı bir şekilde düşürmektedir. Tüm gruplarda SDF-1 ve CCL-5 salınımı gözlenmedi.

**Anahtar kelimeler:** Mezenşimal kök hücre, A549 kanser hücresi, IL-6, VEGF, SDF-1, CCL-5, Resveratrol.

## SUMMARY

Stem cell therapies are very important treatment methods that are used in many areas of experimental medicine or clinical part. Despite the use of different treatment methods, there has been no definitive treatment for cancer treatment yet. Of all cancer types, lung cancer is the most common one. MSCs therapeutic and protective features have been demonstrated in various experimental studies. In cancer models, MSCs suppressed and stopped the growth of cancer cells in recent studies. However, recently the stem cells used in cancer treatment studies trigger the formation of cancer, make larger its mass, help the formation of new vessels and lead to cancer invasion. The communication between cancer cells and MSCs are known to be done with MSC's released cytokines. The presence of these cytokines that secreted by MSC's and effects on cancer cells reduces the reliability of MSC treatment. Resveratrol has been shown to have positive role in many biological activities such as atherosclerosis, aging, inflammation, oxidative stress, cancer development and progression, platelet aggregation. Within this scope the aim of this study is to co-cultured the MSCs with the A549 cancer cells, to suppress the releasing of cytokines that released from MSCs for supporting the cancer cells and increased the usage of stem cell therapies and therapy reliability with resveratrol known for its beneficial and anti-carcinogenic properties. Experimental studies in the thesis investigated at the cell culture level. Six separate groups were formed. MSCs secreted cytokines (IL-6, CCL5, VEGF, SDF-1) and effect of resveratrol on these cytokines analyzed by ELISA, western blot and rt-PCR at conditioned medium. The *in-vitro* cytotoxicity assays were performed. Morphological investigation was performed with DAPI staining. 1  $\mu$ M resveratrol was found safety dose for A549 cancer cells and MSCs with *in-vitro* cytotoxicity assays. As a result of DAPI fluorescence staining apoptotic effects of resveratrol and MSCs not observed on A549 cancer cells. If we look cytokine levels among groups with ELISA and western blot methods; IL-6 and VEGF cytokines has been detected but SDF-1 and CCL-5 releasing has not been detected. VEGF mRNA levels were analyzed by rt-PCR and found paralleled results with ELISA and western blot assays. We observed the highest release of IL-6 and VEGF from the co-cultured A549 cells and MSCs, and resveratrol was found to significantly decrease the release of these cytokines.

Consequently, IL-6 and VEGF secretion was increased in co-culture of A549 cancer cells and MSCs. Resveratrol reduces this increase significantly. SDF-1 and CCL-5 secretion was not observed among groups.

**Key words:** Mesenchymal stem cells, cancer cells, A549, IL-6, VEGF and Resveratrol.

# İÇİNDEKİLER

<b>KABUL VE ONAY SAYFASI .....</b>	<b>iv</b>
<b>ÖZET .....</b>	<b>iv</b>
<b>TABLO DİZİNİ.....</b>	<b>ix</b>
<b>ŞEKİL DİZİNİ.....</b>	<b>x</b>
<b>SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....</b>	<b>xi</b>
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER .....</b>	<b>4</b>
2.1. Kök Hücre ve Temel Özellikleri.....	4
2.2. Kök Hücre Türleri .....	5
2.3. Yağ Doku Kaynaklı Mezenşimal Kök Hücreler .....	8
2.4. Mezenşimal Kök Hücrelerin Klinik Kullanımı .....	9
2.5. Mezenşimal Kök Hücrelerin Kanser Tedavisinde Kullanımı .....	10
2.6. Akciğer Kanser.....	12
2.7. A549 Akciğer Kanser Hücreleri .....	15
2.8. Sitokin Kavramı .....	15
2.9. Mezenşimal Kök Hücrelerden Salınan, Kanserli Dokunun Büyümesini ve Metastazını Sağlayan Sitokinler.....	19
2.10. Resveratrol'ün Tanım Ve Tarihi.....	21
2.11. Resveratrol ve Kanser.....	21
2.12. Resveratrol'ün Sitokin Salınımı Üzerine Etkileri.....	22
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER .....</b>	<b>24</b>
3.1. Gereçler.....	24
3.1.1. Cihazlar .....	24
3.1.2. Kimyasal Maddeler .....	24
3.1.3. Hücreler .....	25
3.2. Yöntem .....	25
3.2.1. Gruplar.....	26
3.2.2. Hücrelerin Kültür Ortamında Büyütülmesi.....	28
3.2.3. Resveratrol Dozlarının Hesaplanması .....	30
3.2.4. İn-Vitro Sitotoksite Testleri .....	30
3.2.4.1. MTT Testi .....	30
3.2.4.2. Lizozomal Aktiviteye Dayanan Neutral Red Up-Take Ölçümü .....	31

3.2.5. Fluoresan Boyama ile Morfolojik İnceleme (DAPI boyama) .....	32
3.2.6. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) Yöntemi ile Sitokin Ölçümü.....	32
3.2.7. Western Blot Yöntemi ile Sitokin Ölçümü.....	33
3.2.8. Gerçek Zamanlı PCR Uygulaması ile VEGF (Vascular endothelial growth factor) mRNA Seviyesindeki Değişimin Saptanması.....	34
3.2.9. İstatistiksel Analiz.....	37
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>38</b>
4.1. Resveratrolün A549 Akciğer Kanseri Hücreleri ve MKH'lerdeki Güvenli Dozunun MTT Testiyle Değerlendirilmesi.....	38
4.2. Resveratrolün A549 Kanseri Hücreleri ve MKH'lerdeki Güvenli Dozunun Lizozomal Aktiviteye Dayanan Neutral Red Up-Take Ölçüm Testiyle Değerlendirilmesi .....	40
4.3. Resveratrolün ve MKH'lerin A549 Kanseri Hücreleri Üzerine Apoptotik Etkilerinin DAPI Boyasıyla Belirlenmesi.....	42
4.4. IL-6, VEGF, CCL5 ve SDF-1 Sitokinlerinin ELISA Yöntemiyle Değerlendirilmesi ....	44
4.4.1. ELISA Yönteminden Elde Edilen IL-6 Sonuçları .....	44
4.4.2. ELISA Yönteminden Elde Edilen VEGF Sonuçları.....	46
4.4.3. ELISA Yönteminden Elde Edilen SDF-1 ve CCL5 Sonuçları .....	48
4.5. IL-6, VEGF, CCL5 ve SDF-1 Sitokinlerinin Western Blot Yöntemiyle Değerlendirilmesi .....	50
4.5.1. Western Blot Yönteminden Elde Edilen IL-6 Sonuçları.....	50
4.5.2. Western Blot Yönteminden Elde Edilen VEGF Sonuçları .....	52
4.5.3. Western Blot Yönteminden Elde Edilen SDF-1 ve CCL5 Sonuçları .....	54
4.6. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Uygulaması ile VEGF (Vascular endothelial growth factor) mRNA Seviyesindeki Değişimin Değerlendirilmesi.....	54
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>56</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>64</b>
<b>7. KAYNAKLAR DİZİNİ .....</b>	<b>66</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>78</b>



## **TABLO DİZİNİ**

Tablo 2.1: Akciğer kanserinin histolojik yapısına göre sınıflandırılması.....	14
Tablo 4.1: Gruplardan elde edilen medyumlardaki IL-6 miktarları.....	45
Tablo 4.2: Gruplardan elde edilen medyumlardaki VEGF miktarları.....	47

## ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 3.1: Çalışmamızda kullanılan hücre dizileri.....	29
Şekil 4.1: Resveratrolün A549 kanser hücresi canlılığı üzerine etkisinin mitokondrial aktiviteye göre değerlendirilmesi.....	38
Şekil 4.2: Resveratrolün MKH canlılığı üzerine etkisinin mitokondrial aktiviteye göre değerlendirilmesi.....	39
Şekil 4.3: Resveratrolün A549 kanser hücresi canlılığı üzerine etkisinin lizozomal aktiviteye dayanan neutral red up take ölçüm testine göre değerlendirilmesi.....	40
Şekil 4.4: Resveratrolün MKH canlılığı üzerine etkisinin lizozomal aktiviteye dayanan neutral red up take ölçüm testine göre değerlendirilmesi.....	41
Şekil 4.5: Resveratrolün ve MKH'lerin A549 kanser hücreleri üzerine apoptotik etkilerinin DAPI boyasıyla belirlenmesi.....	43
Şekil 4.6: Gruplar arası IL-6 miktarı.....	45
Şekil 4.7: IL-6 standart grafiği.....	45
Şekil 4.8: Gruplar arası VEGF miktarı.....	47
Şekil 4.9: VEGF standart grafiği.....	48
Şekil 4.10: SDF-1 standart grafiği.....	49
Şekil 4.11: SDF-1 ELISA plakası.....	49
Şekil 4.12: CCL-5 standart grafiği.....	49
Şekil 4.13: CCL-5 ELISA plakası.....	49
Şekil 4.14: Gruplar arası IL-6 miktar değişimi.....	51
Şekil 4.15: Gruplar arası VEGF miktar değişimi.....	53
Şekil 4.16: VEGF mRNA seviyesindeki değişim.....	55

## **SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ**

- MKH: Mezenşimal Kök Hücre  
DKK-1: Dickkopf ilişkili protein 1  
IL: İnterlökin  
CXCL: CX kemokin ligant  
JAK: Janus Kinaz  
STAT: Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon aktivatörü  
TGF-beta: Dönüştürücü büyüme faktörü beta  
Alfa-SMA: Alfa-düz kas aktini  
FSP: Fibroblast salgısal proteini  
SDF-1: Stromal hücre faktörü-1  
CCL-5: Kemokin ligant-5  
VEGF: Vasküler Endotelial büyüme faktörü  
FGF: Fibroblast büyüme faktörü  
IFN: İnterferon  
TNF: Tümör nekroz faktörü  
NF-kB: Nükleer faktör kappa b  
UPKH: Uyarılmış pluripotent kök hücre  
KLF-4: Kruppel benzeri faktör 4  
CD: Farklılaşma faktörü  
SLE Hastalığı: Sistemik Lupus Eritematoz  
FBS: Föetal bovin serum  
EDTA: Etilendiamintetraasetik asit  
kDa: Kilo Dalton  
PI3K/AKT: Fosfoinositid 3-kinaz/AKT sinyal yolağı  
MCF-7: İnsan meme adenokarsinomu  
CDK-4: Siklin bağımlı kinaz  
GM-CSF: Granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör  
RPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute 1640

$\alpha$ -MEM: Minimum Essential Medium

b-FGF: Basic fibroblast growth factor

TBS-T: Tris-Buffered Saline and Tween 20

PCR: Polimeraz zincir tepkimesi

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

PBS: Phosphate-buffered saline

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

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

ATCC: American Type Culture Collection

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kök hücreler farklı bir hücreye farklılaşma kapasitesi yüksek olan hem embriyonik hem de erişkin dönemde bulunan hücre türüdür. Erişkin dönemde yıllarca suskun kalabilen ama yaralanma veya onarım durumlarında aktif hale gelebilen hücrelerdir. Kök hücreler başlıca embriyonik kök hücreler ve yetişkin tip kök hücreler olmak üzere iki ana grupta incelenebilirler. Mezenşimal kök hücreler (Razmkhah et al.) yetişkin kök hücre tipidir. MKH'ler farklılaşmamış ve genel olarak her dokuda bulunabilen stromal hücrelerdir. Başta kemik iliği olmak üzere birçok dokudan izole edilebilir. Kök hücre izolasyon kaynaklarına baktığımızda yağ doku kolay ve fazla hücrenin izole edilebildiği kaynaklar arasındadır (Yao et al., 2015).

Kanser, görülme sıklığı son yıllarda artan bir hastalıktır. Farklı tedavi yöntemleri kullanılmasına rağmen henüz kanseri tamamen ortadan kaldıracak bir tedavi mevcut değildir. Kanser, bu yüzyılın başlarında ölüme neden olan hastalıklar arasında 7.-8. sıralarda yer alırken bugün birçok ülkede kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sıraya yerleşmiştir. Erkeklerde en sık görülen kanser türleri akciğer, prostat ve kolorektal iken kadınlarda meme, kolorektal ve akciğerdir. Kanser tedavisinde ölümleri azaltmak ve sağ kalımı arttırmak için farklı tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Cerrahi yöntemler, radyoterapi, kemoterapi, hormon tedavisi, immunoterapi, sinyal ileti sistemi inhibitörleri, gen tedavisi ve anjiyogenez inhibitörleri kanser tedavisinde kullanılan tedavi yöntemleridir. Kanser tedavisi için son yıllarda birçok ilaç ve yeni tedavi yöntemleri geliştirilmiş olsa da günümüzde ilerlemiş kanser hastalarında tam olarak tedavi seçenekleri yok gibidir. Bu durum, kanser gelişim sürecinin karmaşıklığı ve aydınlatılması gereken çok sayıda noktanın olması ile kısmen açıklanabilir (Aktaş, 2010; Houghton, Morozov, Smirnova, & Wang, 2007).

Akciğer kanserinin oranı gelişen ülkelerde çevre faktörlerinin insan hayatını daha fazla etkilemesinden dolayı gün geçtikçe oranı artmaktadır. Günümüzde tüm dünyada gözlenen kanserler arasında erkeklerde en sık görülen kanser türüdür. Kadınlarda ise en sık görülen 3. kanserdir. Dünyada kansere bağlı ölümler arasında akciğer kanseri birinci sıradadır. Tüm akciğer kanserli hastaların sadece %15,9'u tanıdan sonra 5 yıl veya daha fazla yaşamaktadır. Akciğer kanserinde en önemli etiyolojik faktör sigaradır ve sigara içenlerde akciğer kanseri riski içmeyenlerden 30 kat daha fazladır. Pasif

sigara içiminde de akciğer kanseri riski 3,5 kat artmaktadır. Çünkü etrafa yayılan sigara dumanında da tüm zararlı bileşenler aynen bulunur ve sigara filtresinden de geçmediğinden çok daha tehlikelidir. Yaş, cinsiyet, ırk, mesleki ve çevresel karsinojenler, diyet, sosyoekonomik durum, geçirilmiş akciğer hastalıkları ve genetik faktörler diğer önemli etiyolojik faktörlerdir (Dey et al., 2015; Nguyen et al., 2004).

MKH'ler hücrel tedavilerde gerek klinik çalışmalarda gerekse de deneysel çalışmalarda en çok kullanılan hücre türüdür. Klinik denemelerden hayvan modeli çalışmalarına MKH'ler birçok hastalığın tedavisinde umut verici olmuştur. MKH'ler ile ilgili yapılan klinik çalışmalar her geçen gün artmaktadır. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'nin önerileri doğrultusunda hücrel tedavilerde kullanılacak bir hücrenin; kolay elde edilebilir, immün yanıt oluşturmayan, karsinojenik olmayan, hızlı bölünen, gittiği dokuda hücrelere farklanabilen ve kan yoluyla verildiğinde yaralı alana göç edebilen bir hücre olması gerekmektedir. MKH'ler tüm bu özellikleri taşımaktadır (Bang, 2015; Wei et al., 2013). 1995 yılından beri MKH'ler birçok klinik çalışmada kullanılmıştır. MKH'nin kullanıldığı klinik çalışmalara baktığımızda kanser, diyabet, Chron hastalığı, kalp hastalıkları, karaciğer hastalıkları, multiple skleroz, graft versus host hastalığı, kemik ve kırıldak hasarları, omurilik zedelenmeleri ve beyin hasarlanmaları yer almaktadır (S. Wang, Qu, & Zhao, 2012).

İlk yapılan MKH-Kanser hücresi çalışmalarında; MKH'lerin anti-kanserojenik, proliferasyonu durdurucu ve apoptotik etkisi gösterilmiştir, daha sonra yapılan çalışmalarda MKH'lerin kanser oluşumunu tetiklediği, kitleyi büyüttüğü, yeni damarların oluşumuna ve kanserin invazyonuna yardımcı olduğu gösterilmiştir. MKH'lerin kanserli hücreler üzerindeki bu etkileri MKH'nin tedavi yöntemi olarak kullanımını sınırlamıştır (Torsvik & Bjerkvig, 2013).

Hastalıkların tedavisinde ve kanser tedavilerinde MKH'ler damar yoluyla verilmektedir. Damar yoluyla verilen kök hücrelerin damarlarda dolaştıktan sonra yangılı bölgeye veya kanser bölgesine geçtikleri bilinmektedir. Kök hücrelerle kanser hücreleri arasındaki iletişimin parakrin olarak etki gösteren sitokinlerin salınımıyla gerçekleştiği kanıtlanmıştır (S. Liu et al., 2011).

MKH'den salınan ve kanser hücrelerini olumsuz yönde etkileyen birçok sitokin tespit edilmiştir. Bu sitokinlerden bazıları IL-6, SDF-1, CCL-5, TGFβ1, EGF, FGF, VEGF ve CXCL7'dir (Torsvik & Bjerkvig, 2013).

Resveratrol siyah üzüm kabuğu, yerfıstığı ve dut gibi birçok bitkide bulunan polifenol grubu bir bileşiktir. Resveratrolün inflamasyon, oksidatif stres, kanser oluşması ve ilerlemesi, platelet agregasyonu, aterosklerozis ve yaşlanma gibi birçok biyolojik aktivitede olumlu görev aldığı gösterilmiştir. Resveratrol hücre içinde birçok genin ifadesini ve gen ürününün etkinliğini değiştirebilmektedir. Yapılan çalışmalar resveratrolün bu faydalı etkilerini genelde sitokinlerin salınımı üzerinden gerçekleştirdiğini göstermişlerdir. Biyolojik etkiye göre resveratrol bazı sitokinlerin salınımını durdururken bazılarının salınımını arttırmaktadır. Salınımını baskıladığı sitokinlerden bazıları IL-6, IL-12, IL-2, IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$ 'dır (Tao et al., 2015; Tung et al., 2015).

Kanser, dünya çapında yaygın ve tedavisi hasta açısından oldukça ağır, ağrılı ve ülke ekonomisi açısından da oldukça masraflı bir hastalıktır. Bu yüzden dünya genelinde alternatif tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır (Ferlay et al., 2015). MKH'lerin kanserli organizmaya sistemik olarak verildiğinde dolaşımdan kanserli dokunun bulunduğu alana geçtiği ve bu dokuya karşı çeşitli savunma yöntemleri geliştirdiği deneysel olarak gösterilmiştir (Heldring, Mäger, Wood, Le Blanc, & Andaloussi, 2015). MKH'lerin bu kanserli dokuya göç etme hareketi hücreye dayalı kanser tedavisinin geleceğini oluşturmaktadır. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar MKH'lerin kanserli hücrelerin büyümesini, bölünmesini ve metastazını arttırabileceğini göstermektedir (Torsvik & Bjerkvig, 2013).

Bu kapsamda çalışmanın amacı, MKH'ler ile A549 akciğer kanser hücrelerini *in-vitro* olarak aynı ortamda tutarak, MKH'lerin kanserli hücreleri uyarırken kullandığı sitokinleri, faydalı ve anti kanserojenik özelliğiyle bilinen resveratrol ile baskılayarak, kanserin tedavisinde çok önemli yeri olan MKH'lerin kullanımını ve tedavinin güvenilirliğini araştırmaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kök Hücre ve Temel Özellikleri

İnsan dokusu içindeki hücreler sürekli bir değişim ve yenilenme durumundadırlar. Olgun farklılaşmış hücreler ölür ve yerine yenileri gelir. Dokulardaki bu yenilenme o dokuda bulunan bazı hücrelerin bölünmesine ve farklılaşmasına bağlıdır. Dokularda söz edilen bu yenilenme daha uzun ömürlü ve farklılaşabilen kök hücre adı verilen hücrelere bağlıdır. Tarihsel olarak kök hücre bir ata/progenitör hücreyi tanımlamada kullanılmıştır. Kök hücre kelimesi günümüze kadar anlamını korumuştur. Günümüzde, gelişimsel biyolojide canlı bir organizmayı veya olgunlaşmış bir organizmada doku ve organları oluşturan, tamir eden ve devamlılığını sağlayan hücreyi tanımlamada kullanılmaktadır (Rajasekhar, 2014).

Her yeni bilgi kök hücre tanımında ve özelliklerinde farklılıklar oluşturmaya başlasa da bugün kabul edilen bir kaç temel ölçüt kök hücreleri tanımlamamızda bizlere yardımcı olmaktadır. Kök hücre özellikleri şu şekilde sıralanabilir:

- Kendini yenileme,
- Farklı hücrelere farklılaşma yetkinliği (potensi),
- Klon oluşturma yeteneği (klonalite).

*Kendini yenileme:* Kök hücreler dokularda devamlılığını sağlamak adına bölünürler ve bölünmeleri yeni kök hücrelerin oluşmasıyla sonuçlanır. Bu olaya kök hücrenin kendini yenilemesi denir. Bu bölünmelerde kök hücre asimetric ve simetric bölünmeler geçirir. Sonuçta oluşan iki hücreden biri anne kök hücreyle aynı özellikteyken diğeri bölünmelerine devam ederek farklılaşır. Farklılaşmadan kalan kök hücre dokudaki kök hücrelerin devamlılığını sağlar. Kendini yenileme mekanizmasındaki bir bozukluk organizmada gelişimsel geriliğe ve kansere neden olabilir. Kök hücrelerdeki kendini yenileme mekanizmasının çözülmesi gelişim, kanser ve yaşlanma olaylarının nedenlerini açıklayabilir (Alp, 2013; F. Ren et al., 2015; Shenghui, Nakada, & Morrison, 2009).



*Pluripotensi* (çoklu yetkin olma) veya farklılaşma zenginliği kök hücrenin özelleşmiş bir hücreye farklılaşabilme kapasitesini tanımlamada kullanılmaktadır. Kök hücre denecek hücre diğer iki özellik gibi bu özelliği de gösterebilmelidir. Bu özellik kök hücreleri diğer hücrelerden ayıran en önemli özelliktir. Kök hücreler potensi özelliklerine göre bir hiyerarşi oluştururlar. Kök hücrelerden bir kısmı sadece bir hücreye farklılaşabilirken, bazıları tüm organizmayı oluşturabilir (Bianco, Robey, & Simmons, 2008).

*Klon oluşturma* özelliği kök hücrelerin diğer bir özelliğidir. Klon kelime olarak birbirine benzer hücrelerin oluşturduğu birliktelik olarak düşünülebilir. Bir kök hücre bölünerek kendi klonunu oluşturur. Hücreler oluşturdukları klonlarla birbirinden şekilsel ve fizyolojik farklılık gösterir (Glauche, Bystrykh, Eaves, & Roeder, 2013).

## **2.2. Kök Hücre Türleri**

Kök hücreleri elde edildikleri kaynaklara göre veya farklılaşabilme yetkinliğine göre sınıflandırabiliriz.

Farklılaşabilme yetkinliğine göre,

- Totipotent
- Pluripotent
- Multipotent

Elde edilebildikleri kaynaklara göre,

- Embriyonik kök hücreler
- Yetişkin kök hücreleri
- Kanser kök hücreleri
- Uyarılmış pluripotent kök hücreler olarak sınıflandırabiliriz (Fortier, 2005) .

Totipotent, hücre fizyolojisinde tüm organizmayı oluşturabilecek hücreleri tanımlamada kullanılır. Totipotent kök hücre tüm organizmayı meydana getirebilecek DNA miktarına ve özelliğine sahiptir. Totipotent hücre insandaki tüm hücreleri, ekstra embriyonik membranları ve plasentayı oluşturabilecek kapasiteye sahiptir. İnsan gelişimine baktığımızda totipotent hücre zigot ve bundan sonraki 4-5 bölünme sonucunda oluşan blastomerleri kapsar. Bölünmeler sonucunda oluşan her bir blastomer uygun şartlarda kültüre edilirse her birinden yeni bir organizma gelişebilir (Ma, 2012).

Pluripotent kök hücre insanda bulunan 200 farklı hücreye farklanabilir. Ancak insan gelişiminde embriyo dışında kalan yapıları ve dokuları oluşturamamaktadır. Morula aşamasındaki embriyoda uterus salgılarının morulanın iç taraflarına sızmasıyla gerekse de iç tarafta bulunan hücrelerin hücreler arası alana salgılarıyla embriyonun iç kısmında blastosöl denilen bir boşluk oluşur. Bu dönemde embriyoya blastosist adı verilir. Bu aşamada blastosistin bir kutbunda yerleşmiş olan iç hücre kütlesi embriyoblast, dış tarafta kalan hücreler de trofoblast olarak adlandırılır. Blastosistin iç hücre kitlesini oluşturan hücreler pluripotent özellikte olan kök hücrelerdir. Bu hücreler organizmada bulunan tüm hücrelere farklılaşabilirler. Embriyonun iç hücre kitlesinden elde edilen pluripotent kök hücrelere embriyonik kaynaklı kök hücreler de denir (Hui, Hu, Zhao, & Tang, 2011).

Multipotent kök hücreler pluripotent hücrelere göre daha sınırlı bir farklılaşma kapasitesine sahip hücrelerdir. Bu hücreler özelleşmiş hücrelere farklanabilirler. Buldukları dokunun hücrelerine farklanmayla birlikte *in-vitro* olarak uygun uyaranlar sağlandığında farklı tipte hücrelere de farklılaşabilirler. Örneğin beyinde bulunan multipotent bir kök hücre nöronları ve nöroglia hücrelerini oluşturabilir. MKH'ler multipotent kök hücrelerdir (A. I. Li, Hokugo, Jarrahy, & Zuk, 2014)

Fertilizasyondan 5-6 gün sonra insan embriyosu 50-150 hücreye erişir bu aşamadaki embriyoya blastosist aşamasındaki embriyo denir. Embriyonik kök hücreler iç hücre kitlesinden elde edilirler. Bu hücreler üç germ yaprağını ve bu tabakalardan meydana gelen doku ve organları oluşturabilirler. Embriyonik kök hücreler ilk olarak fare embriyolarından izole edilmiştir. Bu izolasyonu takiben insan embriyonik kök hücreleri de izole edilebilmiştir. İzolasyon basamaklarını özetleyecek olursak; ilk olarak blastosist aşamasındaki embriyonun trofoblastları uzaklaştırılır. İç hücre kütlesi birkaç yıkama

işleminde sonra daha önceden bölünmeleri durdurulmuş fibroblastlar üzerine ekilir. 10-15 gün sonra ilk pasajlama yapılır (Karaşahin, 2012). Embriyonik kök hücrelerin kültüre edilmesinde fibroblastların kullanım amacı kök hücrelerin farklılaşmadan bölünmelerini sağlamaktır (Özel, Ozan, & Dabak, 2008).

Yetişkin kök hücreler daha sınırlı bir farklılaşma kapasitesine sahiptirler. Yetişkin kök hücreler ihtiyaç doğrultusunda kendini yenileyebilirler. Erişkin dokularda bulunan öncül ve özelleşmiş hücrelere farklılaşabilirler. Yetişkin kök hücreleri potansi özellikleri açısından multipotent kök hücrelerdir. Bu hücrelerin embriyonik kök hücreler gibi *in-vitro* ortamlarda uzun süre özelliklerini koruyarak çoğalma yetenekleri yoktur. Teratom oluşturmazlar. Üzerinde en çok çalışılan yetişkin kök hücreleri hematopoetik kök hücreler ve mezenşimal kök hücrelerdir (Ural, 2006).

Kanser kök hücreleri bazı araştırmacılara göre kanser öncülü hücrelerdir. Kanser kök hücreleri kanserin başlangıcından büyümesine ve çevre dokulara yayılmasına kadar kanser sürecinin her aşamasında görülebilmektedir. Yapılan çalışmalar kanser kök hücrelerinin hem kanser tedavisinde hedef olabileceğini, hem de kanser kök hücrelerinin kanserli hücrelerin kanser tedavisine karşı direnç kazanmalarını sağladığını göstermiştir (Z. Yu, Pestell, Lisanti, & Pestell, 2012).

Kanser kök hücrelerinin kaynağına bakıldığında bazı çalışmalarda bu hücrelerin aslında doku kaynaklı multipotent kök hücreler olduğu, kanserli dokuya göç ettikten sonra o çevreye uyum sağladıkları gösterilmişken, bazı çalışmalarda da bunların dış ve iç uyaranlar sonucunda genetik farklılaşma göstermiş, ama kök hücre özelliğini koruyan kök hücreler olduğu gösterilmiştir. Kanser kök hücreleri genel olarak normal kök hücrelerle aynı özellikleri gösterirler. Kanser kök hücrelerinin kanserli bir dokunun içinde yaklaşık %0,3-2 oranında bulunduğu gösterilmiştir. Kanser kök hücreleri de uygun çevre koşulları sağlandığında farklı hücrelere farklılaşabilir, kendini yenileyebilir ve kanser dokusu oluşturabilir (Jordan, Guzman, & Noble, 2006).

Uyarılmış pluripotent kök hücreler (UPKH) normalde pluripotent olmayan bir hücrenin dışardan verilen uyaranlar ile DNA'sında bazı genlerin aktive edilmesiyle hücrenin geriye farklılaştırılması sonucu oluşan hücrelerdir. UPKH'ler birçok yönüyle normal bir pluripotent kök hücreye benzer. UPKH'leri yetişkin bir organizmada bulunan somatik hücreye retroviral transfeksiyon ile

Oct 3/4, SOX-2, c-MYC ve KLF-4 genlerinin aktarılması sonucu oluşturulmaktadır (Takahashi & Yamanaka, 2006).

### **2.3. Yağ Doku Kaynaklı Mezenşimal Kök Hücreler**

Kök hücreler kendini yenileyebilen, uzun ömürlü ve çoklu farklanma gösterebilen hücrelerdir. Çoklu farklanma özelliği kök hücrenin bulunduğu farklanma seviyesine bağlıdır. En yüksek farklanma kapasitesine embriyonik kök hücreler sahiptir, ancak embriyonik kök hücrelerin deneysel ve klinik açıdan kullanımı etik nedenlerden dolayı sınırlıdır. Dolayısıyla kemik iliğinden ilk defa elde edilmiş olan multipotent özellikte olan kemik iliği kaynaklı mezenşimal kök hücre, bilimsel çalışmalara alternatif bir kök hücre ve kaynak kazandırmıştır (Zuk et al., 2002).

Kemik iliğinden MKH izolasyonunun hasta açısından oldukça ağırlı ve masraflı olması araştırmacıları farklı kaynaklara yöneltmiştir. Ayrıca kemik iliği aspiratından çok fazla MKH çıkmamaktadır. Yağ dokusu da kemik iliği gibi mezenşimal kaynaklıdır. Ortak kaynaktan köken almaları yağ dokuda MKH araştırmalarını hızlandırmıştır. Yağ doku kaynağı olarak genelde lipoaspirat kullanılmaktadır. Lipoaspirat elde edilmesi açısından kemik iliği aspiratına göre daha ağırsız ve masrafsızdır. Yapılan primer hücre kültürasyonu sonucunda lipoaspiratlardan yağ, kemik ve kıkırdak dokuya farklanabilen bir mezenşimal kök hücre izole edilebilmiştir. Yağ dokunun kemik iliğine kıyasla daha fazla kök hücre içerdiği gösterilmiştir (A. I. Li et al., 2014).

Kendini yenileme, potensi ve klonalite gibi kök hücre özelliklerini gösteren birçok kök hücre yetişkin dokulardan (kemik iliği, kan, sinovyal sıvı, göbek kordonu, diş, iskelet kası, kordon kanı ve deri gibi) izole edilebilmiştir. Bu kök hücrelerin hepsi multipotent kök hücrelerdir. Genel olarak da bu multipotent kök hücreler damar çevresine yerleşmektedirler. Tüm MKH kaynakları karşılaştırıldığında en fazla kök hücrenin yağ dokudan izole edilebildiği gösterilmiştir (Hass, Kasper, Bohm, & Jacobs, 2011). İlk defa 2001 yılında Zuk ve arkadaşları yağ dokudan kök hücre izolasyonunu yapmıştır. İzolasyon basamaklarına baktığımızda ilk etapta cerrah tarafından steril koşullarda yağ doku aspirat halinde bir tüpte toplanır. İzolasyonda yıkama, kimyasal parçalama, santrifügasyon, yıkama ve kan hücrelerinden arındırma basamakları takip edilir. Tüpe toplanan yağ doku aspiratı 1 saat süresince kollejenaz enzimi ile inkübe edilir. Kimyasal parçalanma sonucunda tüpte yağ

tabakası ve stromal hücrelerin oluşturduğu tabakalar santrifügasyon işlemiyle birbirinden ayrılır. Altta toplanan stromal hücreler yıkandıktan sonra kan hücresi liziz tamponuyla muamele edilir ve stroma hücrelerinden kan hücrelerinin ayrılması sağlanır. Hücreler flasklara ekilmeden önce 100-150 µm'lik filtrelerden geçirilir. İzole edilen kök hücreler belli bir yoğunluğa ulaştığında kemik, kıkırdak ve yağ dokuya farklıdırılır (Baptista, Pedrosa, Silva, & Borojevic, 2011).

## 2.4. Mezenşimal Kök Hücrelerin Klinik Kullanımı

Son on yılda *in-vitro* ve *in-vivo* prelinik çalışmalarda hücresel tedavi yöntemlerini konu alan çalışmaların sayısı oldukça artmıştır. Birçok hastalık modelinde hem embriyonik kök hücreler hem de yetişkin kök hücreler hücresel tedavi aracı olarak kullanılmıştır. Mezenşimal kök hücrelerin embriyonik kök hücrelere göre daha kararlı ve sınırlı bir farklılaşma özelliğinin olması bu hücrenin kullanımını arttırmıştır (Bobis, Jarocha, & Majka, 2007; Giordano, Galderisi, & Marino, 2007).

MKH ilk defa 1968 yılında Friedenstein tarafından kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerin plastiğe yapışmasından dolayı bulunmuştur. Artan çalışmalar sonucunda MKH'lerin izolasyonu ve fenotiplendirilmesi daha kolay hale gelmiştir. İlk klinik çalışma 1995 yılında yapılmış ve bundan sonra giderek artmıştır. 2015 Nisan ayı itibarıyla <http://clinicaltrials.gov> adresine girilmiş çeşitli faz basamaklarında (Faz I, Faz II ve Faz III) MKH'lerle ilgili 490 çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar gönüllü insanlar üzerinde yapılmaktadır (Bobis et al., 2007).

MKH ile ilgili klinik deneyim literatürde en fazla ve belki de en başarılı sonuçlar graft versus host hastalığının tedavisinde olmuştur. Bu hastalık kemik iliği transplantasyonu sonucu gelişen bir yan etkidir. MKH'nin diğer yaygın olarak kullanıldığı alanlar; menisküs hasarı, kıkırdak ve kemik defektleri, osteoporoz, omurilik yaralanmaları, motor nöron hastalığı, Hurler sendromu, metakromatik lökodistrofi, siroz, multipl skleroz, SLE hastalığı, Chron hastalığıdır. MKH'lerin immün baskılayıcı özelliğinden dolayı doku transplantasyonlarında kullanılmaktadır. MKH birçok hastalığın tedavisinde insanlar üzerinde denenmiş ve olumlu sonuçlar alınmıştır (García-Olmo et al., 2005; Kassem, Kristiansen, & Abdallah, 2004; Parekkadan & Milwid, 2010).

Mezenşimal kök hücrelerin yangılı veya hasarlı alana göç etmesi onun gen terapilerinde vektör olarak kullanımını başlatmıştır. Gen terapisi çalışmalarında kullanılacak gen, taşıyıcı hücrenin kromozomlarına aktarılır, modifiye hücreler kan yoluyla verilir ve onların hedef dokudaki etkinliği incelenir. Yeni bir konu olmasına karşın modifiye kök hücrelerin klinik kullanım denemeleri her geçen gün artmaktadır (Gokce et al., 2015).

## **2.5. Mezenşimal Kök Hücrelerin Kanser Tedavisinde Kullanımı**

Mezenşimal kök hücrelerin deney hayvanı çalışmalarında ve *in-vitro* deneylerde anti-tümörojenik etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Bu anti kanserojenik etkinliğini kanser hücrelerine (gliyom, melanom, akciğer kanseri, hepatoma, meme kanseri) karşı salgıladığı sitokinler vasıtasıyla yaptığı görülmüştür. MKH'ler aynı zamanda genetik olarak modifiye edilerek vektör olarak da kanser hücrelerine karşı kullanılmıştır (Shah, 2012). *In-vitro* ve hayvan çalışmalarında MKH'lerin salgıladığı bazı sitokinlerle kanser hücrelerini uyarması, kanser hücrelerinin büyümesini ve metastatik özelliğini arttırması onun tedavi aracı olarak kullanımını sınırlamıştır (Torsvik & Bjerkvig, 2013).

Asparajinaz, akut lenfoblastik lösemi tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. MKH'nin salgıladığı asparajinaz sentetaz enzimi ile bu ilacın bloke edildiği gösterilmiştir. MKH'nin, salgıladığı enzimler vasıtasıyla kanser tedavisini etkisizleştirdiği araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Iwamoto, Mihara, Downing, Pui, & Campana, 2007).

MKH'lerin hedgehog sinyali ile plazma hücresi ve B lenfosit kanserlerini desteklediği ve yaşam sürelerini arttırdığı gösterilmiştir. Deney hayvanı kanser modellerinde ve *in-vitro* çalışmalarda MKH'lerin kanserli dokuyu büyüttüğü ve kanser hücrelerine metastatik özellik kazandırdığı bildirilmiştir (Djouad et al., 2003).

Djouad ve arkadaşları *in-vitro* olarak ürettikleri kanser hücrelerini bağışıklık sistemi baskılanmış farelere vererek lokal bir tümör dokusu oluşturmuşlardır. Bu hayvanlara intravenöz olarak kök hücreler verildiğinde MKH'lerin kanserli bölgeye göç ettikleri ve farelerde belli bir süre sonra işaretlenmiş kanser kitlesi içerisinde bulunan kanser hücrelerinin akciğer dokusuna metastaz yaptıkları gösterilmiştir. Bu çalışmada araştırmacılar

gruplar arasında kanserli dokuları karşılaştırdıklarında MKH verilen gruptaki kanser hücrelerinin metastatik özelliklerinin arttığı gösterilmiştir. MKH'nin kanserli dokuyu büyüttüğü vücudun immün sistemine karşı koruduğu metastatik özellik kazandırdığını gösteren birçok hayvan ve *in-vitro* çalışma bulunmaktadır (Djouad et al., 2006).

Birçok araştırmacı damar yoluyla verildiğinde kök hücrenin kanserli veya hastalıklı bölgeye hareket ettiğini, bölgenin çevresinde yer alarak salgıladığı sitokinler vasıtasıyla bölgede tedavi ve hemostazı sağladığını göstermiştir. MKH'nin kanserli bölgeye göçü araştırmacılar MKH'yi vektör olarak kullanma fikrini doğurmuştur. Antikanserojenik özelliği bilinen genler MKH'lere aktarılmış ve damar yoluyla verildiğinde deney hayvanlarında MKH'nin kanserli dokunun çevresine yerleştiği ve apoptozu başlattığı, kitleyi küçülttüğü gösterilmiştir. MKH'nin bu göç hareketi onun ilaç ve gen taşıyıcısı olarak kullanımını sağlamaktadır (Galderisi, Giordano, & Paggi, 2010).

Beyin tümörlerinin tedavisi kan beyin bariyerinin bulunmasından dolayı oldukça zordur. Çünkü kan yoluyla verilen kemoterapötik ajanlar kan beyin bariyerini geçemez ve tedavi sağlanamaz. Studeny ve arkadaşları MKH'yi floresan olarak işaretlemiş ve IFN-beta genini de bu hücrelere transfer ederek farelere damar yoluyla vermiştir. İşaretli ve IFN-beta genini taşıyan hücrelerin kan beyin bariyerini geçerek kitle etrafında toplandığı ve IFN-beta sitokin salgılarıyla tümör kitlesini küçülttüğü gösterilmiştir (Studeny et al., 2002).

Son yıllarda araştırmacılar kanserli dokudan da kök hücre izolasyonu yapabilmişlerdir. Yapılan bir çalışmada mide kanseri bulunan dokudan ve normal mide dokusunda MKH izolasyonu yapılmış ve bu iki hücrenin gastrik kanser hücreleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Sonuç olarak, kanserli dokudan izole edilen kök hücrenin gastrik kanser hücreleri üzerinde büyütücü ve kanserli hücreleri metastatik yönde uyarıcı etkide bulunduğu gösterilmiştir. Normal dokudan izole edilen kök hücrenin de aynı yönde uyardığı ancak etkinliğinin kanserli dokudan izole edilen kök hücreye oranla daha az olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada kök hücreler ile kanser hücreleri arasındaki iletişimin sitokinlerle sağlandığı ve IL-8 sitokininin ön plana çıktığı bulunmuştur (W. Li et al., 2015).

miRNA'lar kısa kodlanmamış RNA'lardır. Bu RNA'lar mRNA'ların komplementer sekanslarına hibride olarak gen ifadesinin düzenlenmesinde

görev alırlar. miRNA'ların mRNA'lara bağlanması bazen protein oluşumunu engeller ve bazen de mRNA'nın kesilmesini (RNA interferansa benzer bir süreçle) kolaylaştırır. MKH'lerin meme kanseri hücrelerini etkilediği bilinmektedir. Yapılan çalışmaların çoğu MKH-Kanser hücresi arasında görev alan sitokinler üzerinedir. Ancak Cuiffo ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada MKH'lerin kanser hücreleri ile temas kurduğu bu temasın kanser hücreleri içerisinde bazı yolakları aktif hale getirdiği gösterilmiştir. MKH'nin meme kanseri hücrelerine temas etmesinin kanser hücrelerinde miRNA'ları aktif hale getirdiği, miRNA'larında FOXP2 genini susturduğu ve durağan haldeki kanser hücrelerinin kök hücre temasıyla büyüyüp metastatik özellik kazandığı bulunmuştur (Cuiffo et al., 2014).

## **2.6. Akciğer Kanseri**

Dünyada her yıl 14 milyon kişiye kanser tanısı konulmakta ve bu hastalardan her yıl yaklaşık 8,2 milyonu kanser nedeniyle ölmektedir. Önümüzdeki 20 yıl boyunca bu oranın %70 oranında artacağı düşünülmektedir. 2012 yılından 2015 yılına kadar dünyada erkeklerde en çok görülen kanser türleri akciğer, prostat, kolorektum, mide ve karaciğer kanserleridir. Kadınlarda ise sıralama meme, kolorektum, akciğer, serviks ve mide şeklindedir. Akciğer kanseri erkeklerde birinci, kadınlarda da 3. sırada yer almaktadır. Tüm dünyada kanserden ölüm oranlarına baktığımızda akciğer kanseri her yıl 1.59 milyon kişi ile birinci, 745 bin kişi ile karaciğer ikinci, 723 bin kişi ile mide kanseri üçüncü sırada yer almaktadır (Wild, 2015).

Ülkemize baktığımızda ise akciğer kanseri erkeklerde en sık, kadınlarda da 6. sırada olan bir kanser türüdür. Akciğer kanserinde en önemli tanı yöntemi görüntüleme ve biyopsi yöntemidir. Görüntüleme ve biyopsi ile kanserin tanısı, evresi ve tedavi yolu seçilir (Halk Sağlığı Kurumu, 2015).

Akciğer kanseri nedenlerine bakıldığında çok sayıda faktörün rol oynadığı görülmektedir. Sigara kullanımı akciğer kanseri nedenleri arasında birinci sıradadır. Sigara içenlerde içmeyenlere göre akciğer kanseri gelişme riski 30-40 kat daha fazladır. Hava kirliliği, mesleki karsinojenler, beslenme alışkanlığı, enfeksiyonlar, geçirilmiş akciğer hastalıkları, genetik ve immünolojik faktörler akciğer kanserinde yer alan diğer etiyolojik faktörlerdir. Akciğer kanseri hastaları genelde doktora yakınmaları sonucunda başvururlar. Bu yakınma belirtileri; öksürük, nefes darlığı, göğüs ağrısı, kilo kaybı, kemik ağrısı, çomak



parmak, ateş ve kas güçsüzlüğüdür. Bu belirtilerin yanında akciğer kanseri farklı belirtiler de verebilir (Köktürk, 2004)

Akciğer kanserlerine bakıldığında en çok karsinomların görüldüğü saptanmıştır. Karsinomlar %90-95 oranındadır. Akciğer kanserleri 2004 yılında Dünya Sağlık Örgütü tarafından histolojik yapılarına göre Tablo 2.1'de gösterildiği şekilde sınıflandırılmıştır (Burç, 2010):

**Tablo 2.1:** Akciğer kanserinin histolojik yapısına göre sınıflandırılması (Burç, 2010).

<b>Skvamöz hücreli karsinom</b>	<b>Küçük hücreli karsinom</b>	<b>Adenokarsinom</b>
Papiller Berrak hücreli Küçük hücreli Bazaloid	Kombine küçük hücreli karsinom	Adenokarsinom, mikst subtip Asiner adenokarsinom Papiller adenokarsinom Bronkoalveoler karsinom Müsinöz Nonmüsinöz Mikst Müsin salgılayan solid adenokarsinom Fetal Kolloid Müsinöz kist adenokarsinom Taşlı yüzük adenokarsinom Berrak hücreli adenokarsinom
<b>Büyük hücreli (BH) karsinom</b>	<b>Adenoskvamöz karsinom</b>	<b>Adenoskvamöz karsinom</b>
BH Nöroendokrin karsinom BH Kombine nöroendokrin karsinom Bazaloid karsinom Lenfoepitelyoma benzeri karsinom Berrak hücreli karsinom Rabdoid fenotipinde BH karsinom		Pleomorfik karsinom İğ hücreli karsinom Dev hücreli karsinom Karsinosarkom Pulmoner blastom
<b>Karsinoid tümör</b>	<b>Tükürük bezi tipindeki karsinomlar</b>	<b>Preinvaziv lezyonlar</b>
Tipik karsinoid Atipik karsinoid	Mukoepidermoid karsinom Adenoidkistik karsinom Epitelyal-miyoepitelyal karsinom	Skvamöz hücreli insitu karsinom Atipik adenomatöz hiperplazi Diffüz idiyopatik pulmoner Nöroendokrin hücre hiperplazisi

## 2.7. A549 Akciğer Kanseri Hücreleri

A549 akciğer kanser hücreleri 1972 yılında D.J Giard tarafından 58 yaşında erkek bir hastadan izole edilmiştir. A549 kanser hücreleri akciğer kanser türleri arasında adenokarsinomlar içerisinde değerlendirilmektedir. Alveol epiteli karsinomudur. Normal dokularda bu hücreler alveol içerisini saran, yassı şekilli, gazların ve elektrolitlerin geçişini sağlayan hücrelerdir (Foster, Oster, Mayer, Avery, & Audus, 1998).

A549 kanser hücreleri %10 FBS + RPMI 1640 medyum + %1 Penisilin/Streptomisin besin ortamında %5 karbondioksit, 37°C ve %95 nem ortamında yetiştirilebilmektedir. 3-4 günde bir medyumunu değiştirilir. %70-80 yoğunluğa ulaştığında pasajlama işlemi yapılır. Pasajlama işleminde önce flaskta veya petride ekili bulunan hücrelerin eski medyumunu çekilir, PBS ve PBS/EDTA solüsyonu ile yıkanır, hücrelerin üzerine tripsin/EDTA enzimi verilir ve hücreler kaldırılır. Kaldırılan hücreler sayılarak yeni flasklara ekimi yapılır (Y.-L. Hsu, Kuo, & Lin, 2004).

## 2.8. Sitokin Kavramı

Hücre sinyalizasyonunda görev alan 5-20 kDa ağırlığında olan salgısal proteinler ve polipeptitlerdir. Yunanca 'cyto (hücre)' ve 'kine (hareket)' kelimelerinin birleşmesinden oluşur. Bu salgısal proteinler salındığı hücreyi, hücrenin hemen etrafındaki hücreleri veya daha uzak hücreleri etkileyebilir. Hücreden salındıktan sonra karşı hücrede kendine özel bulunan reseptörüne bağlanırlar. Sürekli salınmazlar, ihtiyaç duyulduğunda üretilir ve salınırlar (Barnes, Drazen, Rennard, & Thomson, 2009).

Sitokinler genelde üretildiği hücrenin başka bir sitokin vasıtasıyla uyarılması sonucu üretilir ve salınırlar. İnterferonlar, interlökinler, lenfokinler ve tümör nekrozis faktörü gibi alt grupları bulunmaktadır. İlk tanımlanan sitokinler bağışıklıkta görev alan lenfokinlerdir. Sitokinler neredeyse tüm hücrelerden salınır, aynı sitokin birbirinden farklı hücrelerden bile salınabilir (Dimitrov, 2012).

Bir hormon sadece özelleşmiş bir hücreden salınırken, aynı sitokin birbirinden çok farklı hücrelerden salınabilir. Bu yanı sıra hormonlarla karıştırılmamalıdır. Hormonlar sisteme verildikten sonra endokrin olarak etki

gösterirler ve kanda daha az oranlarda bulunurlar. Sitokinler otokrin, parakrin ve endokrin etki gösterebilirler. Normal şartlarda kanda hormonlara göre daha az oranda bulunurlar ama travma gibi bir durumda miktarları bin kat artabilir. Çeşitli durumlarda hücrenin bu duruma vereceği yanıtı belirlerler. Hücre bölünme döngüsü, büyüme, farklılaşma, kendini yenileme, nekroz, iyileşme ve apoptozis gibi birçok yaşamsal olaylarda büyük etkinlikleri vardır. Daha çok immün sistem hastalıklarında aldıkları görevler nedeniyle tanınmaktadırlar. Vücut savunmasında lenfosit, granülosit, monosit ve makrofajlardan yoğun olarak salınmaktadırlar. Sitokinler salındıktan sonra hedef hücre üzerinde reseptörüne bağlanır ve hücre içi bir sinyalizasyon hareketi başlatırlar. Bu hareket sonucunda DNA'da bulunan bazı genler aktif veya inaktif olurlar. Özelleşmiş bir sitokinin sadece bir görevi yoktur. Bulunduğu dokuda ve salınma nedenine göre karşı hücrede çok farklı hücre içi sinyalizasyonları başlatabilir. Örneğin IL-6 kanserli dokuda apoptozisi başlatırken immün sistemde hücrelerin aktivasyonunu ve çoğalmasını başlatır (Woodman, Erickson, Rae, Jaffe, & Curnutte, 1992).

Bazı sitokinler hastalıklardaki etkinliğinden dolayı rekombinant DNA teknolojisi sayesinde ilaç haline getirilmiştir. Bu sitokinler aşağıdaki gibidir.

- Kemik morfogenetik protein kemik hastalıklarında
- Eritropoetin anemide
- Granülosit koloni uyarıcı faktör kanser hastalarındaki nötropenide
- Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör kanserli hastaların fungal enfeksiyonlarında ve nötropenilerinde
- İnterferon alfa multiple sklerozda ve hepatit c hastalığında
- İnterferon beta multiple sklerozda
- İnterferon gama kronik granülomatöz hastalıklarda ve osteopetroziste
- İnterlökin 2 (IL-2) kanser tedavisinde

- İnterlökin 11 (IL-11) kanser hastalarının trombositopenilerinde kullanılır (Dimitrov, 2012).

İnterlökin 6, birçok biyolojik olayda görev alan pleiotropik bir sitokindir. Başta immün yanıtta sorumlu hücreler olmak üzere birçok hücreden (lenfosit, monosit, makrofaj, fibroblast, endotel hücreleri, keratinosit, bazı tümör hücreleri, kök hücreler gibis) salgılabılır. IL-6 salındıktan sonra hedef hücrede ya hücre membranında bulunan ya da sitoplazmada bulunan reseptörüne bağlanır. Hücre membranındaki reseptörüne bağlanması genel olarak anti-inflamatuar etki yaratır. Sitoplama içerisindeki reseptörüne bağlanması ise membrandaki reseptörleri inhibe ederek pro-inflamatuar etki yaratır. Hücre içerisinde IL-6 sinyalizasyonu JAK/STAT yolağı üzerinden aktivite gösterir. STAT3 yolağının uyarılması hücrede tümör büyümesi, anjiyogenez, metastaz ve hücrenin yaşam süresinin uzamasını sağlar. IL-6/STAT3 yolağı bu sitokinin kanserojenik etkinliğini göstermektedir. IL-6/Ras-MAPK ve IL-6/PI3K-Akt yolaklarıyla da anti-apoptotik ve tümörojenik etki göstermektedir (Holmer, Goumas, Waetzig, Rose-John, & Kalthoff, 2014).

IL-6 kanserli dokuda uyarıcı etki oluşturmaktadır. Genellikle otokrin ve parakrin etki göstermektedir. Birçok kanser olgusunda (örneğin prostat, meme ve kolon kanserleri) hastaların kan IL-6 miktarlarının çok yüksek olduğu bulunmuştur. Bu kanser hücreleri IL-6 salınımını takiben IL-6 reseptörünü oluşturmaktadırlar. Dolayısıyla hücreler kendi salgıladıkları sitokinle otokrin olarak uyarılmaktadırlar. Bazı kanser türleri (myeloma, nöroblastoma gibi) ise IL-6 salgılamadıkları halde reseptörünü oluşturarak parakrin etkiden yararlanmakta ve devamlılıklarını sağlamaktadırlar (Andreasen et al., 2015; Ara & DeClerck, 2010).

Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), vaskülogenezi ve anjiyogenezi uyaran hücreler tarafından üretilen bir sinyal proteindir. VEGF bir tür vasküler büyüme faktörüdür. VEGF damar oluşumu yanında kemik oluşumu, hematopoez, yara iyileşmesi ve embriyonal gelişim gibi birçok fizyolojik olayda da görev almaktadır. Birçok hücre tarafından salgılanmaktadır (kanser hücreleri, makrofajlar, plateletler, keratinositler ve renal mezengial hücreler gibi). Memelilerde 5 tür VEGF bulunmaktadır (VEGFA, Plasental büyüme faktörü, VEGF-B, VEGF-C ve VEGF-D). VEGF sitokini hücre membranında bulunan tirozin kinaz reseptörüne bağlanır. VEGF yoğun olarak lösemi ve lenfoma hastalarında salgılanmaktadır. Bunun dışında solit

tümörlerde de görev almaktadır. Solit tümörlerde anjiyogenez, proliferasyon ve metastazı uyarmaktadır (Duffy, Bouchier-Hayes, & Harmey, 2004; Zhao et al., 2015).

Rantes veya CCL-5 kemokin ligant 5 olarak da bilinmektedir. 8 kDa büyüklüğünde kemotaktik bir sitokindir. T lenfositler, eosinofiller, bazofiller ve lökositler için kemotaksi yaratır. Rantes hücrede CCR3, CCR1, CCR5 ve GPR75 gibi reseptörlere bağlanır. Rantes AIDS, kanser, ateroskleroz, astım, transplantasyon, artrit, diyabet ve glomerulonefrit gibi birçok hastalıkta klinik önem taşımaktadır. Yaralanma veya inflamasyon durumunda bu sitokin T lenfositlerin aktivasyonundan 3-5 gün sonra salgılanmaktadır (Krensky & Ahn, 2007). CCL-5'in kanserde görev aldığı özellikle *in-vitro* çalışmalarda meme kanseri hücrelerinin ilerlemesini arttırdığı gösterilmiştir. Kök hücre ve kanser çalışmalarında, kanser hücrelerinin kök hücreleri uyardığı kök hücrelerinde buna yanıt olarak CCL-5 sitokini salgıladığı bu sitokin de kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve büyümesini arttırdığı gösterilmiştir (Karnoub et al., 2007). Mezenşimal kök hücrelerin Alzheimer hastalığında etkinliği incelenmiş ve bu hastalıkta MKH'lerin beyinde CCL-5 salgılayarak kemik iliğinden daha fazla mikroglia hücrelerinin beyine gelmesini sağladığı, dolayısıyla plak oluşumunun azaldığı gösterilmiştir (Turgeman, 2015).

SDF-1 (stromal derived factor-1) C-X-C motif kemokin 12 (CXCL12) olarak da bilinmektedir. Alfa ve beta gibi iki adet gen ürünü olarak üretilmektedir. Kemokin ailesine ait lökositleri aktif hale getiren, proinflamatuvar sitokinler (Lipopolisakkarit, TNF, IL-1) tarafından salınımı sağlanan küçük yapıli sitokinlerdir. SDF-1 ekspresyonu gelişimsel olarak oldukça önemlidir. Olgun organizmada lenfositler için kemotaksi yaratır. Embriyonal dönemde ise kan hücrelerinin karaciğerdan kemik iliğine geçişini sağlar. SDF-1 gen ekspresyonu susturmalarında ölü doğumlar gerçekleşir. SDF-1 sitokininin reseptörü CXCR4'tür. Kanser hücrelerinin CXCR4 reseptörlerini hücre membranında oluşturduğu gözlenmiştir. Bu reseptörün uyarılmasının kanser hücrelerinde proliferasyonu, büyümeyi ve metastazı uyardığı bulunmuştur. Bu yüzden SDF-1 kanser patogenezinde de görev almaktadır (D'Apuzzo et al., 1997; H. Liu, Li, Du, Yang, & Ge, 2015).

## 2.9. Mezenşimal Kök Hücrelerden Salınan, Kanseri Dokunun Büyümesini ve Metastazını Sağlayan Sitokinler

Son yıllarda MKH'nin hastalıklar üzerine etkilerini konu alan çalışmaların sayısı artmıştır. Birçok hastalıkta MKH'lerin tedavi amacıyla kullanıldığı klinik uygulamalar başlamıştır. Kemik iliği transplantasyonu sonucu oluşan komplikasyonları önlemek adına rutin bir tedavi olarak periferik MKH uygulamaları rutin tedaviler arasındadır (Torsvik & Bjerkvig, 2013).

Tedavi özelliğinin yanında, kök hücrelerin damar yoluyla verildiğinde hastalıklı veya kanser bölgesine yerleşmesi kök hücrelerin madde taşınımında kullanılabilme yolunu açmıştır. Deneysel birçok çalışmada kök hücreler gerek hastalıkların tedavisinde gerekse kanserin önlenmesinde ilaç veya gen ürünü moleküllerin taşınımında kullanılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Klinik açıdan kök hücreler bazı hastalıkların tedavisinde yer almaya başlasa da kanser tedavisinde cevabı alınmamış birçok soru bulunmaktadır. Kanser tedavisinde kök hücrelerin biyo-güvenliği tartışmalı konular arasındadır. Deney hayvanı çalışmalarında ve *in-vitro* çalışmalarda kök hücrenin kanserli dokuya dönüşmesi, kanserli kitlenin hacmini veya kanserli hücrelerin metastatik özelliklerini arttırması MKH'nin klinik faz çalışmalarına geçmesi yönünde en büyük engeldir. MKH'ler kanserli dokuyu salgıladığı parakrin etkili sitokinlerle etkilemektedir. Kanser uyarıcı sitokinlerin MKH'lerden neden salgılandığı hangi uyarıların bu salgılamada görev aldığı güncel çalışma konularındandır (Z. Ren et al., 2011; Z. Ren, Zhang, & Chen, 2012).

Bir doku, stroma ve parankim hücrelerinden oluşur. Dokuyu oluşturan ana hücrelerin yanında lenfositler, makrofajlar, fibroblastlar, fibrositler, yağ hücreleri ve diğer immün yanıtta görev alan hücreler bulunmaktadır. Kanseri dokuda stroma kanserin büyümesinde, anjiyogenez ve metastazında en etkili bileşenlerdir. Tümör stromasında bulunan aktif fibroblastlara, tümör ilişkili fibroblastlar denmektedir. MKH'lerin TGF-beta uyarısı altında tümör ilişkili fibroblastlara farkedildiği myofibroblast özelliğinde proteinler ve yüzey belirteçleri ifade etmeye başladığı gösterilmiştir. Bu MKH den fibroblastlara farkedilmiş hücrelerin CCL-5 ve SDF-1 gibi tümör hücrelerini uyarıcı etkinliği bulunan sitokin salınımını başlattığı gösterilmiştir. Kanser stromasıyla ilgili yapılan *in-vitro* çalışmalarda kanser ilişkili fibroblastların %20'sinin MKH'lerden farkedildiği gösterilmiştir (Jotzu et al., 2010; Mishra et al., 2008; Mueller & Fusenig, 2004; Quante et al., 2011).

MKH'ler ile kanser hücreleri arasındaki iletişimi salgılanan sitokinler sağlamaktadır. MKH'lerden salgılanan sitokinlerin kanserli hücreler üzerindeki etkisinin olumlu veya olumsuz olduğu hakkında net bir karar verilememektedir. Bazı çalışmalarda MKH'lerden salınan sitokinlerin apoptozisle hücre ölümünü başlattığı ve tümör kitlesini azalttığı gösterilirken, bazı çalışmalarda ise MKH'ların kanserli hücreleri uyardığı ve tümör kitlesini büyütürken metastaza neden olduğu gösterilmiştir. Farelerle yapılan bir çalışmada MKH'lerin salgıladığı TREG sitokiniyle CD8 T lenfosit ve doğal öldürücü hücreleri baskıladığı ve kanser hücrelerin hücrel immün yanıtı kurtulduğu ve kanserin yaygınlaştığı gösterilmiştir (Djouad et al., 2003).

Kanser dokusunda, artık varlığı bilinen MKH ve kanser kök hücreleri kanser tedavisinde kilit noktadılar. Yapılan bir çalışmada glioma (bir tür beyin kanseri) dokusundan hem MKH'ler hem de glioma kanser kök hücreleri izole edilmiş, bunların genetik ve fenotipik farklılığı gösterildikten sonra deneye alınmıştır. MKH'lerin salgıladıkları IL-6 sitokini ile gp130/STAT3 yolağı üzerinden kanser kök hücrelerinin proliferasyonunu ve kanser hücresi özelliklerini arttırdığı gösterilmiştir (Hossain et al., 2015). Başka bir çalışmada akciğer kanser hücrelerinde yine MKH'lerin IL-6 sitokiniyle A549 akciğer kanser hücrelerinde metastazı arttırdığı gösterilmiştir (H.-S. Hsu et al., 2012; Tsai et al., 2011).

Birçok deneysel çalışma MKH'nin tümör uyarıcı etkisinin olduğunu göstermektedir. Bu tümör uyarıcı etkilerini CCL-5 ve SDF-1 gibi salgıladıkları proteinlerle sağlamaktadırlar. Tümör ortamına MKH'lerin bu sitokinleri salması ve tümör hücrelerinin bu sitokinlere metastatik özellikteki cevabı MKH'nin klinik bir tedavi olarak kullanılmasındaki en büyük engeldir. Bu iki sitokinin kanser hücrelerinde PI3K/Akt yolağını uyardığı gösterilmiştir (Barbero et al., 2003; Ignatov, Robert, Gregory-Evans, & Schaller, 2006).

Kanserin büyüüp yaygınlaşmasını sağlayan diğer önemli sitokin grubu da pro-anjiyojenik sitokinlerdir. MKH'lerin kanserli stromada bu sitokinleri salgıladığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu sitokinler arasında fibroblast büyüme faktörü-2, VEGF, anjiyojenin, TGF beta ve platelet kaynaklı büyüme faktörü-BB'dür (Dufourcq et al., 2008; Hung, Pochampally, Chen, Hsu, & Prockop, 2007; Lin et al., 2010; Razmkhah et al., 2011).



## 2.10. Resveratrol'ün Tanım ve Tarihçesi

Tükettiğimiz birçok bitkisel kökenli yiyecek ve içecek, bitkilerin kendilerini yaralanma ve mantar enfeksiyonlarına karşı korumaya yönelik sentezledikleri fenolik bileşikler içermektedir. Bir stilben fitoaleksinin olan resveratrol bu tür bileşikler arasında insan sağlığına yararlı olduğu düşünülen esas aktif bileşiktir. Resveratrol (3,4',5-trihidroksistilben,  $C_{14}H_{12}O_3$ , M.A: 228,25 g) yüksek miktarda siyah üzüm kabuğu ve çekirdeği, yerfıstığı ve ananas gibi yaklaşık 70 bitkide bulunmaktadır. Kimyasal olarak flavonoid yapıda, nonsteroid ve polifenolik bir bileşiktir. Uzun yıllar geleneksel Çin ve Japon tıbbında birçok bakteriyel ve mantar enfeksiyonlarına karşı *Polygonum cuspidatum* (Itadori çayı) köklerinden elde edilen ve kojokan adı verilen bir ilaç kullanılmıştır. 1963 yılında *Polygonum cuspidatum* köklerinden elde edilen bu ilahtaki birincil aktif tedavi edici bileşiğin resveratrol olduğu gösterilmiştir (Fremont, 2000). 1976 yılında Langcake ve Pryce asma (*Vitis vinifera*) yaprakları üzerine yaptığı çalışma sonucunda bu bitkinin fungal (*Botrytis cinerea* türü) enfeksiyonlara, soğuk hava koşullarına, patojen mikroorganizmalar ya da ultraviyole ışığına maruz kaldığında bu etmenlere karşı korunma amaçlı olarak resveratrolü sentezlediğini göstermiştir (Langcake & Pryce, 1976; Soleas, Diamandis, & Goldberg, 1997). Resveratrolün cis- ve trans- izomerik formu bulunmasına karşın biyolojik olarak aktif şekli trans resveratroldür (Stojanović, Sprinz, & Brede, 2001). Yüksek pH, ultraviyole ve ışık, trans formdan cis'e dönüşüme neden olurken; düşük pH, yüksek ısı ve gün ışığı aksi yönde dönüşüme neden olmaktadır. Trans izomer daha sabit olan şekildir (Fremont, 2000).

## 2.11. Resveratrol ve Kanser

Kanser ve benzeri hastalıklara karşı doğal ürünlerin tedavi amacıyla kullanılması her geçen gün artmaktadır. Kanser genelde durdurulamayan hücre büyümesi ve çoğalmasına ek olarak apoptotik yolların başlamasına direnç gösterme olarak tanımlanabilir. 1997 yılında polinükleer aromatik hidrokarbon dimetilbenzantrasen (DMBA) ile oluşturulan tümörün başlama, yükselme ve ilerlemesinin resveratrol ile durdurulması resveratrol'ün anti-karsinogenik etkisini ilk olarak ortaya koymuştur (Jang et al., 1997). Daha sonra bu konuda yapılan çalışmalarla resveratrol'ün deri, mide, kalınbağırsak, akciğer, meme, prostat, karaciğer, pankreas kanserleri, nöroblastoma, fibrosarkoma, ve lösemi kanserlerinde engelleyici ve kanserli hücrelerin ortadan kaldırılmasında etkin rol aldığı gösterilmiştir (Athar et al., 2007).

Resveratrolün hücre çoğalmasını G1/S evresinde durdurduğu gösterilmiştir. CEM-C7H2 akut lösemi hücreleri ve MCF-7 meme kanseri hücreleri ile yapılan bir çalışmada resveratrol'ün bu hücrelerin çoğalmasını S evresinde durduğu göstermiştir. Resveratrolün G1/S evresi düzenleyicileri olan siklin D1, cdk4 ve siklin E gibi düzenleyicilerin miktarını artırdığı belirlenmiştir (Joe et al., 2002).

Resveratrol hücre çoğalmasını önlemesinin yanında programlı hücre ölümünü de uyarmaktadır. Apoptozisi reseptör bağımlı kaspaz-8 ya da mitokondrial kaspaz-9 yollarıyla gerçekleştirdiği, bu yollardan birini kullanabileceği gibi her ikisini de kullanabileceği saptanmıştır. Resveratrol survivin gibi anti-apoptotik ve siklooksijenaz-2, ornitin dekarboksilaz gibi tümör büyüme göstergesi olan proteinlerin ifadesini de baskılar (Pervaiz, 2004).

Meme kanseri üzerine yapılan bir çalışmada resveratrol'ün T47D meme kanseri hücrelerinde hücre çoğalmasını fas/fas ligant üzerinden engellediği belirlenmiştir. Resveratrol östrojen reseptör negatif MDA-MB-468 insan meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını baskılar. Bunu otkrin büyüme faktörleri, TGF-a ve insülin benzeri büyüme faktörü-1 reseptörünü engelleyerek ve büyüme baskılayıcısı olan TGF- b2 miktarını arttırarak gerçekleştirir (Magee & Rowland, 2004; Serrero & Lu, 2001).

## **2.12. Resveratrol'ün Sitokin Salınımı Üzerine Etkileri**

Resveratrol inflamasyon, oksidatif stres, tümör başlaması ve ilerlemesi, platelet agregasyonu aterosklerozis gibi birçok hastalıkta biyolojik aktiviteye sahiptir. Birçok genin susturulmasında veya ifade edilmesinde görev almaktadır. Resveratrol'ün bu yararlı etkilerini IL-6, IL-12, IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  ve NF- $\kappa$ B gibi birçok sitokinin salınımı baskılayarak yaptığı düşünülmektedir (Tung et al., 2015). Resveratrolün A549 akciğer kanser hücreleri üzerine antiinflamatuvar etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu etkinliğini granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör, IL-8 ve siklooksijenaz-2 sitokinlerini baskılayarak yaptığı gösterilmiştir (Donnelly et al., 2004).

Kronik obsrükatif akciğer hastalığı (KOAH) makrofajlardan salınan sitokinlerin neden olduğu kronik bir akciğer enflamasyonudur. KOAH'lı hastalardan izole edilen makrofajlar *in-vitro* olarak kültüre edilmiştir.

Resveratrol kültürdeki makrofajlara verildiğinde GM-CSF ve IL-8 salınımını %61 ve %51 oranında azalttığı gösterilmiştir (Culpitt et al., 2003).

Resveratrolün obesiteye karşı da sitokinlerin baskınlanması yoluyla etkili olduğu gösterilmiştir. Obez hayvanlarla yapılan çalışmada; resveratrol verilen obez hayvanların diğer gruplara göre %58 oranında kilo kaybettiği gösterilmiştir. Moleküler çalışmalarla bakıldığında resveratrolün TNF alfa, IFN alfa, IFN beta ve IL-6 gibi sitokinleri gen seviyesinde baskıladığı hem yağ oluşumunu hem de enflamasyon oluşumunu baskıladığı gösterilmiştir (S. Kim, Jin, Choi, & Park, 2011).

Resveratrolün ARPE-19 serisi insan retinal pigment epitel hücrelerinde inflamasyonu durdurduğu bunu başta CCL-5, CXCL9, CSF2 ve NOS2A gibi sitokinlerin salınımını durdurarak yaptığı gösterilmiştir (Kutty et al., 2013).

TNF-alfa birçok inflamasyonda görev alan yolak başlatıcı sitokindir. Miyotüp hücreleri ile yapılan bir *in-vitro* çalışmada 1 µM resveratrolün TNF-alfa üzerinden IL-6, MCP-1/CCL2 ve RANTES/CCL5 salınımını düşürdüğü gösterilmiştir (Earl, Lightfoot, & McArdle, 2015).

Resveratrol çok güçlü bir antioksidan ve anti inflmatuar ajandır. Kanser çalışmalarında, resveratrolün kanser büyümesi ve metastazını azalttığı bunlarla ilişkili genleri baskıladığı gösterilmiştir. Bu etkilerinin yanında resveratrol çok etkili bir anti anjiyojenik moleküldür. Resveratrolün östrojen reseptör alfa negatif beta pozitif insan meme kanseri hücrelerinde tümörü baskıladığı kitleyi küçülttüğü ve tümör bölgesinde VEGF salınımı baskılayarak yeni damar oluşumunu durdurduğu gösterilmiştir (Garvin, Öllinger, & Dabrosin, 2006).

İmmün sistemi baskılanmış fareler kanser model çalışmalarında oldukça faydalıdır. Karaciğer kanseri üzerine resveratrolün etkileri konulu bir çalışmada resveratrolün *in-vitro* ortamda VEGF salımını NF-Kappa B yolağı üzerinden baskıladığı hayvan modeli çalışmalarında da resveratrolün tümör kitlesini küçülttüğü ve içerisinde mikro damar oluşumunu durdurduğu gösterilmiştir (H.-B. Yu et al., 2009).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEMLER**

#### **3.1. Gereçler**

##### **3.1.1. Cihazlar**

Soğutmalı ve yüksek devirli santrifüj (Heraus), soğutuculu masa üstü santrifüj (ependorf tüpler için, Ependorf), kuru hava sterilizatörü (Nüve), otoklav (Sanyo), derin dondurucu (-20, -86) (Liebherr, Thermo), buzdolabı (Ariston, Sanyo, Liebherr), CO<sub>2</sub> inkübatörü (Heraus), steril kabin (Heraus), sıvı azot kapları (Thermo Scientific), otomatik pipetler (Ependorf), kar-buz makinesi (Scotsman), su banyosu (Clifton), eliza cihazı (ELx808-IU/Bio-Tek, SpectraMax M2/Molecular Devices)tt, fluoresan mikroskop (Olympus BX50), Inverted Mikroskop (IX71 Olympus), 12 Kanallı mikropipet (ependorf), dağıtıcı pipet (Eppendorf), kaba terazi (Velp Scientific), hassas terazi (Ohaus), damla spektrofotometre cihazı (GE Healthcare, Nanovue), plaka çalkalayıcı (GFL), sonikatör (Sonorex Digital 10P), vortex, manyetik karıştırıcı (Ikamag), pipet tabancası (Ependorf Easypet), ph metre (Thermo Scientific Orion Star A211), elektroforez tankı (Bio-Rad), güç kaynağı (Bio-Rad), transfer cihazı (Bio-Rad), zrt-PCR cihazı (Corbett/Qiagen), thermal cyler cihazı (Palm Cycler), plaka çalkalayıcı (GFL), Transwell Insert Sistemi (BD Falcon, 3450), Cedex hücre sayıcı.

##### **3.1.2. Kimyasal Maddeler**

Resveratrol (Sigma, R5010-100 mg) Penisilin/Streptomisin (Gibco, 15140-122), Fungizone (Gibco, 15290-026), Growth Kit-Low Serum (ATCC, PCS-500-040), MSC Basal Medium (ATCC, PCS-500-030), FBS (HyClone, for hMSC-SH30070.03), bFGF (Sigma, F0291),  $\alpha$ -MEM Modification (HyClone, SH30568.01), MTT (Sigma, M5655), DMSO DNase-RNase free (Sigma, D8418), DMSO (Sigma, 41640), tripsin (Sigma, T4174), PBS tablet (Sigma, D5652), Triton-X-100 (Sigma, T8787), Trizma hidroklorid (Sigma, T3253), BSA (Sigma, A9418), Formaldehit (Sigma, F8775), SDS (Sigma, L4390), Nonidet P-40 (Sigma, 74385), DAPI (4'-diamidino-2 fenilindol) (Sigma, D9542), Preparat kapama solüsyonu (Invitrogen, 8110 ClearMount™ Mounting Solution), Su banyosu antibakteriyel solüsyonu (Aquaresist vwr Prolabo, 462-700), RNA izolasyon kiti (Qiagen RNeasy Plus RNA isolation kit, 74134),

Reverse transkriptaz (rt) enzimi (Qiagen,205313), Gene özgü primerler (GAPDH, VEGF), IL-6 primer antikoru (Santa cruz, sc-28343), VEGF primer antikoru (Santa cruz, sc-7269), CCL-5 primer antikoru (Santa Cruz, sc-514019), SDF-1 primer antikoru (Santa Cruz, sc-74271), Qubit® Protein Assay Kit (Life Science, Q33211), Clarit Western ECL Substrate (Bio-Rad, 1705060), goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz, Sc-2031), Hazır gradient jeller (Bio-rad, Mini-PROTEAN® TGX, 4569033), yürütme tamponu (Bio-Rad, 1610732), Western Blot Transfer seti (Bio-Rad, 1704156), santrüfügal konsentratörler (Amicon, UFC900324), Örnek yükleme tamponu (NuPAGE LDS Sample Buffer (4X) - Life Technologies), Protein merdiveni (Bio-Rad, Precision Plus Protein™ Dual Xtra Prestained Protein Standards, 1610397), TBST tamponu (Pierce 20X TBS Tween 20 Buffer - Life Technologies), IL-6 ELISA kiti (Elapscience, E-EL-H0102), VEGF ELISA Kiti (Elapscience, E-EL-H0111), SDF-1 ELISA Kiti (Elapscience, E-EL-H0052), CCL5 ELISA Kiti (Elapscience, E-EL-H0023).

### **3.1.3. Hücreler**

İnsan yağ dokusu kökenli mezenkimal kök hücre (American Type Culture Collection, PCS-500-011) ve A549 akciğer kanser hücreleri (Osaka Fermentasyon Enstitüsü (IFO), Japonya)

## **3.2. Yöntem**

Tezdeki deneysel çalışmalar hücre kültürü seviyesinde moleküler temeller üzerinde araştırıldı. Altı ayrı grup oluşturuldu. MKH'lerden salınan sitokinler (IL 6, CCL-5, VEGF, SDF-1) ve resveratrolün bu sitokinler üzerindeki etkileri toplanan medyumlarda ELISA, western blot ve rt-PCR yöntemleriyle araştırıldı. Deneyimizde *in-vitro* sitotoksosite testi olarak MTT Testi ve Lizozomal aktiviteye dayanan neutral red up-take ölçümü ve fluoresan boyama ile morfolojik inceleme (DAPI boyama) yapıldı.

### **3.2.1. Gruplar**

1. MKH
2. A549 hücreleri
3. MKH+A549 hücreleri (Transwell İnsert Sistemi kullanılarak araştırılmıştır)
4. MKH+A549 hücreleri+Resveratrol(1 $\mu$ M) (Transwell İnsert Sistemi kullanılarak araştırılmıştır)
5. MKH + Resveratrol (1 $\mu$ M)
6. A549 hücreleri + Resveratrol (1 $\mu$ M)

#### 1.Grup MKH

2x10<sup>5</sup> hücre 75 cm<sup>2</sup>'lik flaslara ekilerek, konfluent olması beklendi (medyum olarak standart medyum ve FBS kullanıldı). Konfluent olunca eski medyum dökülerek hücreler PBS ile yıkanmış ve flaska yeni FBS içermeyen medyum eklenerek ve 3 gün süreyle kültüre edildi. Üç gün sonra medyum alınarak 1000 g x 10 dak. santrüfjü edildi ve süpernatant 0,2  $\mu$ m lik filtreden geçirilerek sitokinlerin ölçümü için stoklandı (-80 °C).

#### 2.Grup Kanser (A549 Akciğer Kanseri Hücreleri)

Hücreleri 75 cm<sup>2</sup>'lik flaslara ekilerek konfluent olması beklendi (medyum olarak standart medyum ve FBS kullanılmıştır). Konfluent olunca eski medyum dökülerek hücreler PBS ile yıkandı ve flaska yeni FBS içermeyen medyum eklendi ve 3 gün süreyle kültüre edildi. Üç gün sonra medyum alındı. 1000 g x 10 dak. santrüfjü edildi. Süpernatant 0,2  $\mu$ m lik filtreden geçirilip sitokinlerin ölçümü için stoklanmıştır (-80 °C).

#### 3.MKH + A549 Kanseri Hücreleri

Kök hücreler ve A549 kanser hücreleri transwell ko-kültür sistemiyle aynı ortamda inkübe edildi. MKH'ler ve A549 kanser hücreleri iç içe geçen kuyucuklar sayesinde salgıladıkları sitokinler ile birbirini etkileyebilmektedir. Deneyimizde A549 hücreleri alt kata, MKH ise üst kata ekildi. Üst kattaki kuyucuğun zemininde 0,4  $\mu$ m'lik porlar bulunmaktadır. Bu porlar iki hücre kültürü ortamı arasındaki iletişimi sağlamaktadır. Deneyimizde transwell sistemin alt ve üst katına aynı miktarda MKH ve A549 hücreleri ekildi (200 bin

hücre\kuyu). MKH'ler ile A549 kanser hücreleri 3 gün süreyle aynı ortamda inkübe edildi. Daha sonra toplanan süpernatant 0,2 µm lik filtreden geçirilip sitokinlerin ölçümü için stoklandı (-80 °C).

#### 4.MKH + A549 Kanser Hücresi + Resveratrol

Transwell sistemin alt ve üst katına aynı miktarda MKH ve A549 hücreleri ekildi. Ekim ortamına 1 µM resveratrol (güvenli doz) karıştırılarak MKH'ler ve A549 kanser hücreleri 3 gün süreyle inkübe edildi. Daha sonra toplanan süpernatant 0,2 µm'lik filtreden geçirilerek sitokinlerin ölçümü için stoklandı (-80 °C).

#### 5.MKH + Resveratrol

Konfluent haldeki MKH'lerin medyumunu dökülerek FBS içermeyen yeni medyum ve 1 µM resveratrol eklenip 3 gün süreyle inkübe edildi. Daha sonra toplanan süpernatant 0,2 µm lik filtreden geçirilip sitokinlerin ölçümü için stoklandı (-80 °C).

#### 6.A549 Hücreleri + Resveratrol

Konfluent haldeki A549'lerin medyumunu dökülerek FBS içermeyen yeni medyum ve 1 µM resveratrol eklenip 3 gün süreyle inkübe edildi. Daha sonra toplanan süpernatant 0,2 µm lik filtreden geçirilip sitokinlerin ölçümü için stoklandı (-80 °C).

#### *Transwell Insert Sistemi*

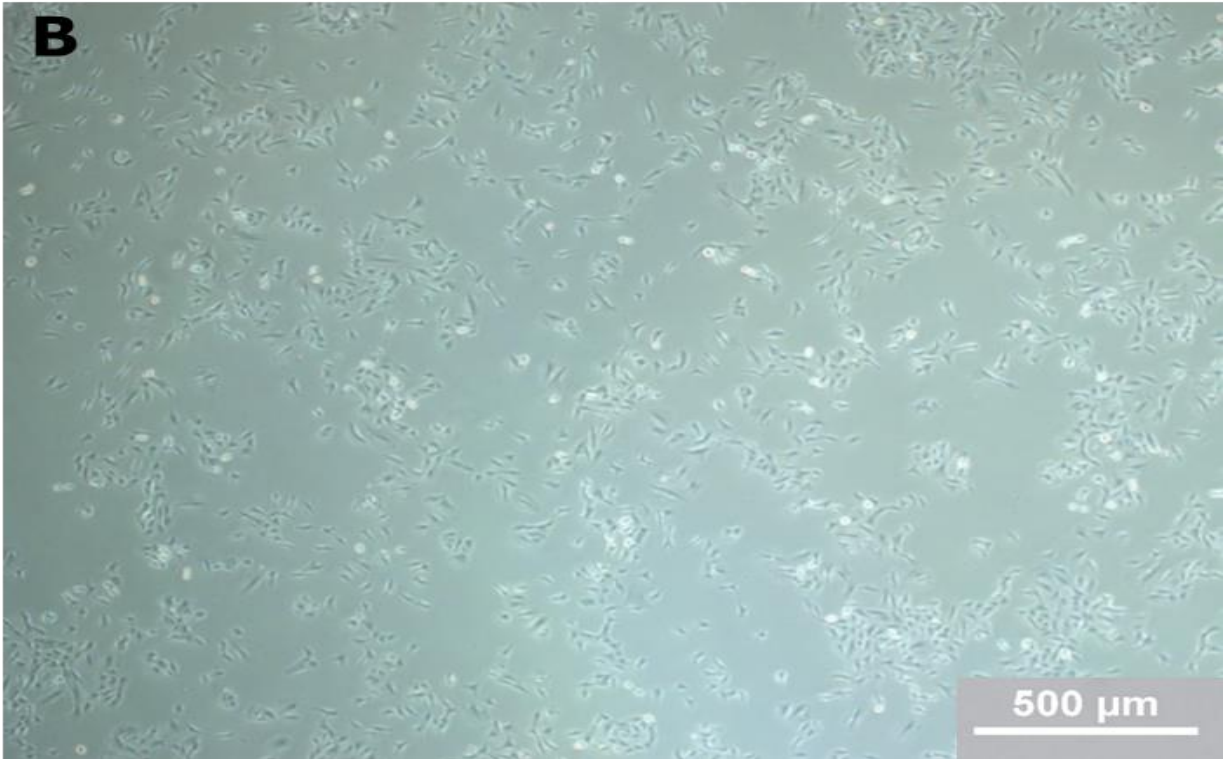
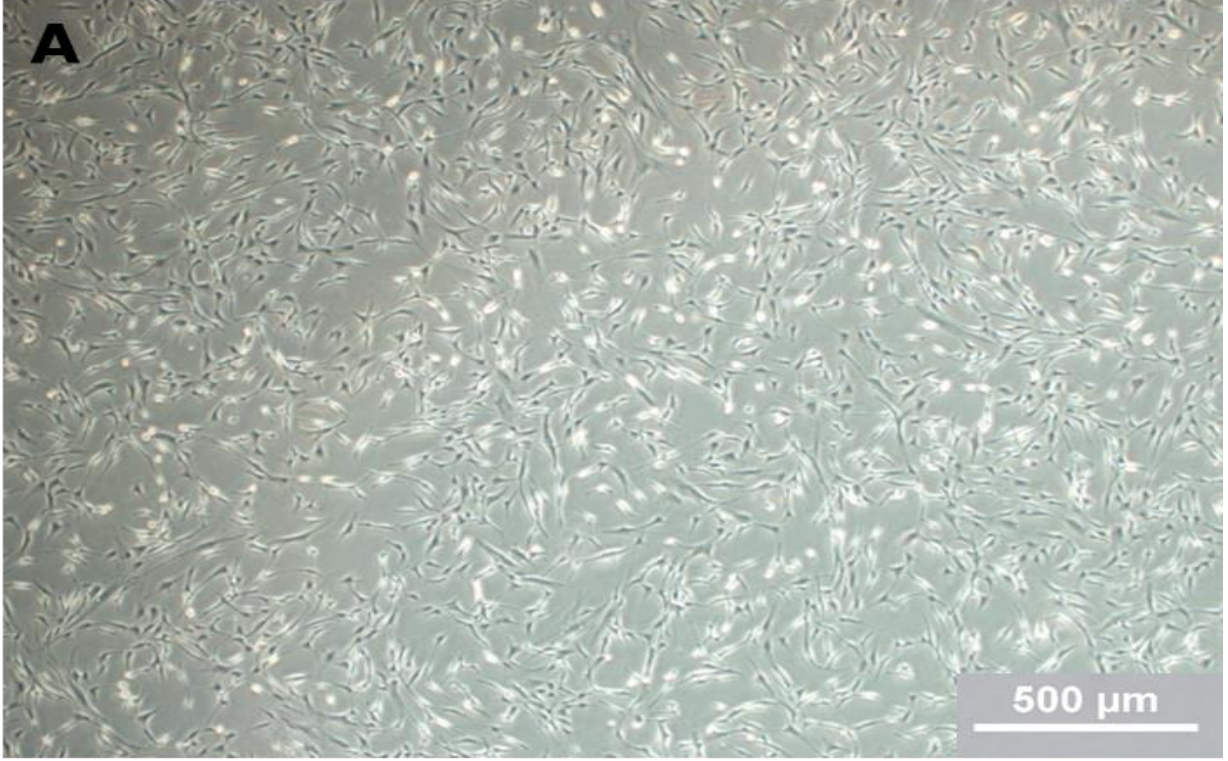
Transwell insert sistemi *in-vitro* deneylerin yapılmasını sağlayan bir yöntemdir. Bu yöntemde 6 kuyucuklu kapların içerisine yerleştirilebilen insertler bulunur. Bu insertler içine hücre ekilebilen zemininde iki ortamdaki çözünebilir bileşiklerin karşılıklı geçmesini sağlayan porlar (0,45 µm genişliğinde) bulundurulur. İki katlı birbirine porlarla bağlı petri sistemidir.

### **3.2.2. Hücrelerin Kültür Ortamında Büyütülmesi**

Çalışmada kullanılan MKH'ler American Type Culture Collection (ATCC-USA) hücre bankasından satın alındı. Hücreler, bankanın önerisi doğrultusunda ikinci kez pasajlanma zamanına kadar %1 penisilin/streptomisin, % 0,5 fungizone, ATCC Growth Kit- Low Serum (%2) içeren ATCC MSC Basal Medium içerisinde %95'lik hava ve %5 CO<sub>2</sub>'li gaz ortamında, 37°C'deki CO<sub>2</sub> inkübatöründe kültüre edildi. Daha sonra, inaktive edilmemiş %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin, %0,5 fungizone ve 5 ng/ml bFGF içeren  $\alpha$ -MEM medyum içerisinde pasaj 4'e kadar büyütüldü ve yeterli sayıya erişen hücreler deneye alındı.

Çalışmamızda kullanılan A549 kanser hücreleri Institute of Fermentation Osaka (IFO), Japonya'dan satın alınıp stoklanmış hücrelerdir. A549 hücreleri inaktif hale getirilmiş %10'luk Fetal Bovine Serum/Fetal Calf Serum, RPMI 1640, penisilin-streptomisin ve %7,5 NaHCO<sub>3</sub> içeren besiyerinin bulunduğu 25 cm<sup>2</sup>'lik flaslarda %95'lik hava ve %5 CO<sub>2</sub>'li gaz ortamında, 37°C'deki CO<sub>2</sub> inkübatöründe kültüre edildi (Şekil 3.1).





**Şekil 3.1:** Çalışmamızda kullanılan hücre dizileri. A ; Mezenşimal kök hücreler, B; A549 Akciğer kanser hücreleri.

### **3.2.3. Resveratrol Dozlarının Hesaplanması**

Resveratrol, dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülerek stok solüsyon hazırlandı. 1-1,25-2-2,5-5-10-15-20-25 ve 30 µM'lık konsantrasyonlar ana stoktan DMSO ile dilüsyon yapılarak hazırlandı. Resveratrol, DMSO içinde çözüldüğü için; negatif kontrol olarak çözücü madde olan DMSO kullanıldı. DMSO'in final konsantrasyonu % 0,3 den küçük olacak şekilde ayarlandı. Resveratrol stoğu her çalışma için taze hazırlanarak kullanıldı.

### **3.2.4. İn-Vitro Sitotoksisite Testleri**

Resveratrol'ün MKH ve A549 kanser hücreleri üzerindeki güvenli dozunu saptamak amacıyla sitotoksisite testleri (MTT ve Neutral red) gerçekleştirildi.

#### *3.2.4.1. MTT (Metiltiazol difenil tetrazolyum) Testi*

Resveratrolün A549 kanser hücresi ve MKH üzerindeki sitotoksisitesinin belirlenmesinde MTT testi uygulanmıştır. MTT genellikle hücre canlılığını ölçmek için kullanılan bir yöntemdir. Hızlı bir şekilde başlıca mitokondrilerde bulunan dehidrogenazların aktivitesini ölçer. Sarı renkli suda çözünebilen tetrazolium tuzunun mor renkli çözünmeyen formazon tuzuna dönüşümüne dayalı kolorimetrik bir testtir. Hücrenin canlılığı kaybolduğu zaman mitokondrial fonksiyon azalır ve sonuç olarak tetrazolium tuzunu formazona çevirebilme yeteneği azalır. Formazon miktarı birçok hücrede hücre sayısı ile orantılı olarak değişir. Formazon miktar değişimiyle hücre canlılığı tespit edilir (Angius & Floris, 2015; Bostancioğlu, 2015).

Uygun koşullarda çoğalmaya bırakılan hücreler flask yüzeyini %70 oranında kapladıkları zaman Tripsin-EDTA ile muamele edilerek flask tabanından kaldırıldı. Trypan mavisi boyası ile boyanan hücreler, Cedex hücre sayıcı ile sayılarak 96 kuyucuklu hücre kültürü tabakalarının her kuyucuğunda 5 bin A549 ve 2 bin MKH hücre olacak şekilde % 2 FBS içeren besiyerinde süspansiyon haline getirildikten sonra hücre kültürü plakalarına 0,2 ml hücre süspansiyonu aktarıldı. Hücrelerin yapışması ve yeni ortama alışması için 37°C'de 24 saat inkübe edildi. 24 saat inkübasyon süresi sonunda hücrelerin üzerindeki besiyerleri plakaların ters çevrilmesi suretiyle uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine resveratrolün farklı konsantrasyonları taze besiyerleri ile ilave edilerek, 37°C'de CO<sub>2</sub> inkübatöründe inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda besiyerleri uzaklaştırıldı. Hücreler 5 mg/ml MTT solüsyonu ile canlı

hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri sonucu MTT boyasının suda çözünmeyen formazon tuzuna dönüşebilmesi için 2 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda hücrelerden MTT boyası uzaklaştırıldı. Canlı hücreler tarafından oluşturulan formazon tuzlarının çözünmesi için her bir kuyucuğa 0,1 ml DMSO ilave edildi. Plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri ELISA cihazında 570 nm dalga boyunda okutuldu. Test maddesi ile muamele edilmeyen hücre canlılık oranı % 100 olarak kabul edilerek deney hücrelerinin canlılık oranları yüzde olarak ifade edildi. Hücrelerin, deney setlerinde test maddesi dozu için 8 paralel halinde ekildiği deneyler, birbirinden bağımsız olarak 3 kez tekrarlandı.

#### 3.2.4.2. *Lizozomal Aktiviteye Dayanan Nötral Kırmızı Up-Take Ölçümü*

Resveratrolün A549 kanser hücresi ve MKH üzerindeki sitotoksitesini belirlemede ikinci bir sitotoksite testi olarak nötral kırmızısı testi uygulanmıştır. Bu test nötral kırmızısı boyasının canlı ve sağlıklı hücrelerin lizozomlarında birikmesi prensibine dayanan hızlı ve kolorimetrik bir yöntemdir. Hücre zarı veya daha hassas olan lizozom zarının hasar görmesi durumunda, yani hücrenin bütünlüğünün bozulduğu durumlarda, nötral kırmızı boyası hücreye girip bağlanamaz ve sonuçta kolorimetrik bir azalma yaşanır. Dolayısıyla canlı sağlam hücrelerle hasarlı/ölü hücreleri ayırt edebilmek mümkün olmaktadır (Repetto, del Peso, & Zurita, 2008).

Uygun koşullarda çoğalmaya bırakılan hücreler flask yüzeyini %70 oranında kapladıkları zaman tripsin-EDTA ile muamele edilerek flask tabanından kaldırılmıştır. Trypan mavisi boyası ile boyanan hücreler, Cedex hücre sayıcı ile sayılarak nötral kırmızı-up take testi için 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarının her kuyucuğunda belirlenen sayıda hücre olacak şekilde % 2 FBS içeren besiyerinde süspansiyon haline getirildikten sonra 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına 0,1 ml hücre süspansiyonu olacak şekilde aktarıldı. Hücrelerin yapışması ve yeni ortama alışması için 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Yermi dört saat inkübasyon süresi sonunda hücrelerin üzerindeki besiyerleri plakaların ters çevrilmesi suretiyle uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine resveratrolün farklı konsantrasyonları taze besiyerleri ile ilave edilerek 37°C'de CO<sub>2</sub> inkübatöründe inkübe edildi. Hücrelerden besiyerleri uzaklaştırılarak hücreler 37°C'ye getirilmiş steril fosfat tampon tuz çözeltisi ile 3 kez yıkandı. Hücreler 50 µg/ml nötral kırmızı up-take solüsyonu ile 37°C'de 2-3 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda hücrelerden boya solüsyonu uzaklaştırılarak taze hazırlanmış formaldehit-kalsiyum klorür fiksatif/yıkama solüsyonundan 0,1 ml

ilave edilerek oda sıcaklığında 1-2 dakika muamele edildi. Daha sonra fiksatif/yıkama solüsyonu dökülüp plakalar ters çevrilerek kurutma kâğıdı üzerinde bekletilerek kurutuldu. Bu süre sonunda asetik asit-etanol solüsyonu 0,1 ml ilave edilerek 15 dakika oda ısısında bekletildi ve 30 dakika çalkalayıcıda çalkalanarak boya homojen hale getirildi. Plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri ELISA cihazında 540 nm dalga boyunda okutuldu. Bu test 3 kez tekrar edilmiştir.

### **3.2.5. Floresan Boyama ile Morfolojik İnceleme (DAPI boyama)**

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) adenin timin nükleotidlerinden zengin çift zincirli DNA'ya bağlanan floresan bir boyadır. DAPI boyama A549, A549+MKH, A549+MKH+resveratrol ve A549+resveratrol gruplarında yapıldı. Bu dört grupta A549 kanser hücreleri boyandı. Altılı plakalara yerleştirilen steril lameller üzerine ekilen kanser hücreleri 24 saat lamellerin üzerine yapışmaları için 37°C'de % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde kültüre edildi. Daha sonra A549+MKH ve A549+MKH+resveratrol gruplarında altta ekili bulunan kanser hücreleri üzerine insertlerde ekili bulunan MKH'ler yerleştirildi. Deney sonunda lamellere yapışmış hücreler PBS'de çözülmüş olan %3,7'lik paraformaldehit çözeltisi ile 37°C'de 15 dakika tespit edildi. Tespit işleminin ardından lameller 3 kez PBS ile yıkanarak, 30 dakika 37°C'de 1mg/ml DAPI (4',6-diamidino-2 fenilindol) ile karanlık ortamda inkübe edildi. Lameller daha sonra PBS ile yıkanarak kapatıldı ve floresan mikroskopunda incelenerek fotoğrafları çekildi.

### **3.2.6. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) Yöntemi ile Sitokin Ölçümü**

96 kuyucuklu plakaların 1. sütununa standartlar artan dilüsyon oranlarında yüklendi. Diğer sütunlara ise (2.-12.) oda ısısına getirdiğimiz hücre kültürü medyumlarından her gruba ait örnekler 100'er µl yüklendi. Plakalar 90 dakika 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda kuyulardaki sıvılar plakanın ters çevrilmesi suretiyle boşaltıldı. Kuyuların tamamen boşaltılması amacıyla plakalar hafifçe kurutma kâğıdı üzerine vurularak örnekler uzaklaştırıldı. Yıkama yapılmadan kuyulara kitin içerisinden çıkan 1/100 oranında sulandırılmış biyotinlenmiş antikor 100 µl yüklenmiş ve 60 dakika 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Sonrasında 350 µl yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı. Yıkamalar sonunda kuyuların tamamen boşaltılması amacıyla hafifçe

kurutma kâğıdı üzerine vurularak kurulandı. Yıkama işleminden sonra kuyulara 1/100 oranında sulandırılmış HRP conjugate uygulandı (30 dakika, 37°C). Sonrasında 350 µl yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı. Her kuyuya 90 µl substrate solüsyonu uygulandı (15 dakika 37°C). Kuyulara 50 µl durdurma solüsyonu eklenerek spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda okutuldu. Tüm işlemler her kuyuya eşit solüsyon veren mikropipetör kullanılarak yapıldı.

### **3.2.7. Western Blot Yöntemi ile Sitokin Ölçümü**

Deney sonunda toplanan ve filtre edilen medyumlar western blot çalışmasına kadar -80°C'de saklandı. -80°C' de saklanan Ependorf tüpler içerisindeki hücre kültürü medyumları buz üzerine alınarak erimeleri beklendi. Medyum içerisindeki proteinler santrifügal konsentratörler yardımıyla konsantre hale getirildi (40 dakika, oda sıcaklığında, 5 bin g'de). Floresan ölçüm yapabilen Qubit 2.0 fluorometre cihazı ile medyumların ml'deki protein miktarı bulundu. Her grupta eşit miktarda total protein olacak şekilde proteinler 4:1 oranında örnek tamponuyla eşitlenerek vortekslenip, santrifüj edilerek tekrar buz üzerine konuldu. Daha sonra 5 dakika 95°C'de kaynatılarak tekrar vortekslenip, santrifüj edilerek buz üzerine yerleştirildi. Çalışılacak olan proteinin kilo dalton ağırlığı dikkate alınarak uygun yüzdelerde jeller hazır olarak alındı. Jel, elektroforez tankına yerleştirildi. Jelin her kuyucuğuna, başta 5 µl moleküler ağırlık işaretleyicisi olmak üzere, 20 µl protein içeren örnekler yüklendi. Örnekler kuyucuklardan inene kadar, ilk önce 100 V' da, sonra 80 V' da 1,5 saat, oda sıcaklığında jelin sonuna kadar yürütme tamponu içerisinde yürütüldü. Elektroforez işleminden sonra jeldeki proteinler membrana aktarıldı. Nitroselüloz membran TBS-T çözeltisiyle dolu küçük bir kapta, 10 dakika yatay karıştırıcı üzerinde yıkandı. Ardından membran 1 saat süre ile oda ısısında, yatay karıştırıcı üzerinde, TBS-T ile hazırlanan % 5' lik BSA ile bloklandı. Bloklama işleminden sonra, membran bloklama tamponu ile sulandırılmış birincil antikorla bir gece soğuk ortamda (+4 °C), yatay karıştırıcı üzerinde, muamele edildi. Ertesi sabah membran birincil antikordan alınarak, TBS-T çözeltisiyle dolu kaba aktarılarak 4 kez 5' er dakika yıkandı. Yıkama işleminden sonra membran bloklama tamponu ile sulandırılmış ikincil antikorla bir saat oda sıcaklığında, yatay çalkalayıcı üzerinde inkübasyonu yapıldı. İnkübasyon sonrasında tekrar TBS-T ile 4 kez 5' er dakika yıkandı. Ardından kemuluminisans madde ile 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edilip kemuluminisans görüntüleme yapan cihazla membrandaki protein bantlarının

resimleri çekildi. Western blot deneyi sonucunda elde edilen bantlar image studio Lite ver 5.2 programı kullanılarak ölçüldü.

### **3.2.8. Gerçek Zamanlı PCR Uygulaması ile VEGF mRNA Seviyesindeki Değişimin Saptanması**

Gerçek zamanlı PCR çift iplik haline getirilmiş mRNA'ların floresan boyalar veya floresan işaretli problarla miktarını belirlememizi sağlayan bir yöntemdir. Floresan ışımaya gerçek zamanlı olarak oluşan DNA miktarına bağlı olarak artmaktadır. Bu yöntemde özgül olmayan tüm çift iplikli DNA'ya bağlanan SYBR Green I gibi floresan boyalar ya da özgül olarak DNA'da belirli bölgelere bağlanabilen hibridizasyon problemleri kullanılır (Dorak, 2007). Bu çalışmada VEGF mRNA seviyesinin ölçülmesi sırasında her bir hücre grubundan standart yöntemle total RNA izolasyonu yapıldı. Çalışmada, her hücrede sabit miktarda ekspresye olduğu bilinen GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) gen ekspresyonu temel alınarak VEGF geninin kantitatif (niceliksel) ekspresyon düzeyleri belirlendi. mRNAların elde edilmesinde Qiagen RNeasy Plus RNA izolasyon kiti kullanılmış ve kit protokolü takip edildi. Elde edilen RNA'dan reverse transkriptaz enzimi kullanılarak cDNA sentezlendi. Her örnekten 1 µg RNA kullanılarak cDNA (complementer DNA, Tamamlayıcı DNA) sentezi gerçekleştirildi. Gene özgül olarak seçilen primerlerle, hücre örneklerinden elde edilen cDNA'lar amplifiye edilmiş ve referans gene (GAPDH) oranlanarak göreceli (relatif) olarak hedef genin (VEGF) miktarı saptandı. Gerçek zamanlı PCR deneyleri planlanırken, DNA'ya özgül bağlanan primer problemlerin kullanılmasına karar verildi ve primerler "non-specific" bağlanmayı engelleyecek şekilde dizayn edildi. Deneylerde kullanılan primer dizisi şu şekildedir;

VEGF	Reverse	5'-CCAGGAAAGACTGATACAGAACG-3'
	Forward	5'-GGTTTCTGGATTAAGGACTGTTC-3'

Deney sonuçlarının analizi sırasında göreceli miktar tayini yapılmıştır. Göreceli miktar tayini hedefin (VEGF mRNA) konsantrasyonunun belli bir referansın (GAPDH mRNA) konsantrasyonuna oranı olarak ifade edilir. Bu yöntem ile hedef ve referans genin konsantrasyonlarını belirleyebilmek için her ikisine ait standart eğrilerin kullanımına ihtiyaç duyulur. Çalışmamızda gerçek zamanlı PCR sonuçlarımızı yorumlarken, hedef genlerimizin konsantrasyon

değerini referans genin konsantrasyon değerine oranlayarak elde ettiğimiz sonuçların diğer gruplara göre ne kadar değiştiği incelendi.

## **RNA izolasyonu**

- RNA izolasyonunda Qiagen RNeasy Plus RNA izolasyon kiti kullanıldı ve kit protokolü takip edildi.
- Altı ayrı grup oluşturuldu ve deney süresince hücreler transwell sistemde tutuldu.
- Deney bitiminde hücrelerin üzerindeki medyumlar sitokin tayini için toplandı.
- Hücreler, PBS solüsyonu ve PBS-EDTA solüsyonu ile yıkanarak tripsin yardımı ile zeminden kaldırılmış ve santrifüj tüpüne toplanarak, 1250 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- Hücrelerin üzerine Buffer RTL plus + Beta merkaptoetanol karışımı konularak yavaş yavaş pipetlenmiş ve genomik DNA'yı tutan kolonlara konularak 10000 rpm'de 1,5 dakika santrifüj edildi. Böylece genomik DNA'nın kolonda kalması sağlandı.
- Alttaki genomik DNA'nın bulunmadığı lizatın üzerine 350 µl %70'lik etanol eklenerek pipetlenmiş ve pembe renkli kolonlara konularak 10 bin rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Altta kalan sıvı atılarak kolona 700 µl RW1 eklenmiş, 15 saniye 10 bin rpm de santrifüj edildi ve sıvı yine döküldü.
- Pembe kolonların üzerine 500 µl Buffer RPE konuldu, 14 bin rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Daha sonra pembe kolonlar yeni bir toplama tüpünün üzerine konuldu aynı işlem tekrarlanarak 14 bin rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.

- Kolon yeni bir toplama tüpüne konularak, hiçbir şey eklemeyen kurumasi için 14 bin rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Kolon yeni temiz Ependorf tüpü içerisine yerleŐtirildikten sonra üzerine 40 l RNAz bulunmayan su tam orta kismaya gelecek Şekilde dikkatlice eklendi ve 10 bin rpm'de 1,5 dakika santrifüj edildi.
- Üstteki kolon atılarak, altta kalan RNA'lar nano dropta ölçüldü ve gerçek zamanlı PCR için işlem yapilana kadar -80 C'de saklandı.

### **RNA konsantrasyonunun hesaplanması**

RNA'nın miktarı ve saflığını belirlemek amacıyla izole edilen RNA nanodrop cihazında ölçülerek 1 ngr DNA'ya ulaŐacak Şekilde DNAz ve RNAz bulunmayan su ile seyreltildi.

### **cDNA sentezi**

cDNA sentezi için, toplam hacim 20  l olacak Şekilde reaksiyon hazırlandı ve cDNA sentez işlemi palm cyclor cihazında yapıldı. cDNA sentezi için kullanılan karışım içeriği aşağıdaki Şekildedir;

<b>Karışım</b>	<b>Miktar( �l )</b>
Quantiscript reverse transcriptase	1
Quantiscript reverse transcriptase Buffer	4
Reverse transcriptase primer mix	1
RNA	14
<b>Toplam</b>	<b>20</b>

Elde edilen cDNA'lar rt-PCR'da kullanılıncaya kadar -20  C'de saklandır.



## Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR

Yukarıda anlatıldığı şekilde elde edilen cDNA'lar, PCR reaksiyonunun kurulmasında kullanıldı. VEGF ve GAPDH genleri için aşağıda belirtilen miktarları içeren temel karışım hazırlandı.

<b>Karışım</b>	<b>Miktar( µl )</b>
Primer prob	10
Master Mix	1
RNase Free Water	4
cDNA	5
<b>Toplam</b>	<b>20</b>

Elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirmelerinde SPSS statistics 21 programı kullanıldı. Verilerin analizinde elde edilen tüm sonuçların ortalamaları karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir.

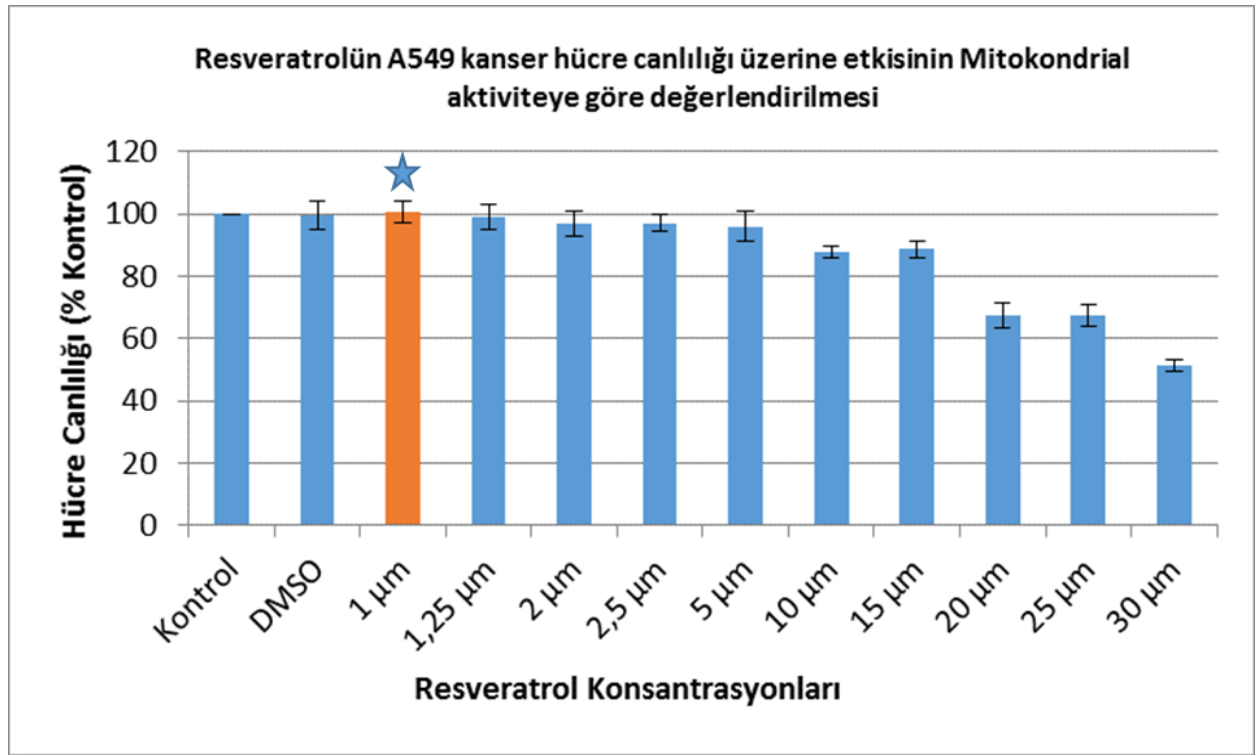
### **3.2.9. İstatistiksel Analiz**

İstatistiksel değerlendirmeler IBM SPSS Statistics 21 paket programı ile yapıldı.  $P < 0,05$  değeri anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile araştırıldı. Tüm deney verilerinin normal dağılım gösterdiği belirlendi ve parametrik testler uygulandı. İki grup ortalamasının karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi, bağımsız iki grubun karşılaştırılmasında ise bağımsız gruplar t-testi kullanıldı. Varyansların homojenliği Levene testi ile ölçüldü. Varyansların homojen olduğu durumlarda da Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi yapıldı.

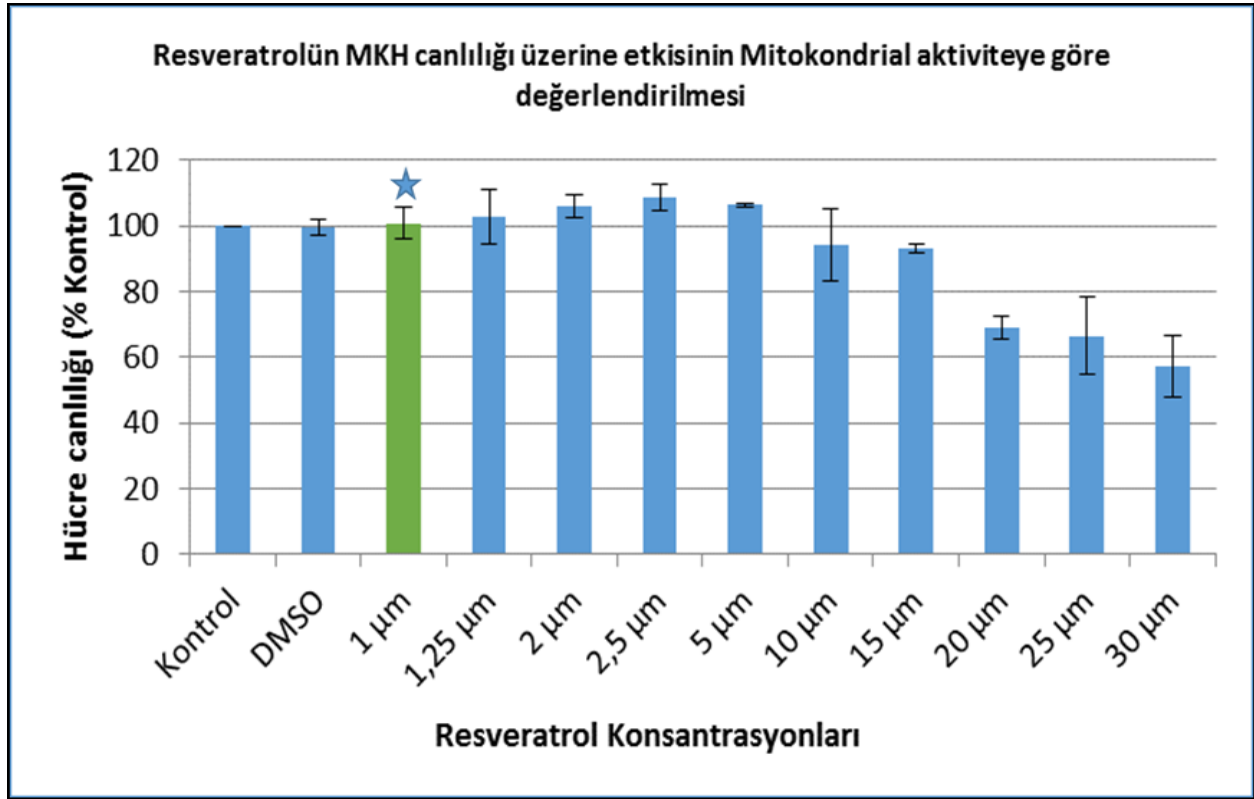
## 4. BULGULAR

### 4.1. Resveratrolün A549 Akciğer Kanseri Hücreleri ve MKH'lerdeki Güvenli Dozunun MTT Testiyle Değerlendirilmesi

A549 hücreleri ve MKH'lerin canlılığı 72. saatte mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesine dayalı MTT deneyi ile belirlendi. Sonuçlar Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de gösterilmektedir.



**Şekil 4.1:** Resveratrolün A549 kanser hücresi canlılığı üzerine etkisinin mitokondriyal aktiviteye göre değerlendirilmesi. Ölçümler 72 saatlik deney süresince artan resveratrol konsantrasyonlarında büyütülen A549 kanser hücrelerinde yapılmıştır. Kontrol grubu 100 olarak kabul edilmiştir. 1 µm resveratrol 72 saatlik deney süresince A549 kanser hücrelerinde güvenli doz olarak bulunmuştur. ★ = Güvenli doz. Güvenli doz canlılık oranının kontrol grubuna benzer olduğu gruptur.



**Şekil 4.2:** Resveratrolün MKH canlılığı üzerine etkisinin mitokondrial aktiviteye göre değerlendirilmesi. Ölçümler 72 saatlik deney süresince artan resveratrol konsantrasyonlarında büyütülen MKH'lerde yapılmıştır. Kontrol grubu 100 olarak kabul edilmiştir. 1 µM resveratrol 72 saatlik deney süresince MKH'de güvenli doz olarak bulunmuştur. ★ = Güvenli doz. Güvenli doz canlılık oranının kontrol grubuna benzer olduğu gruptur.

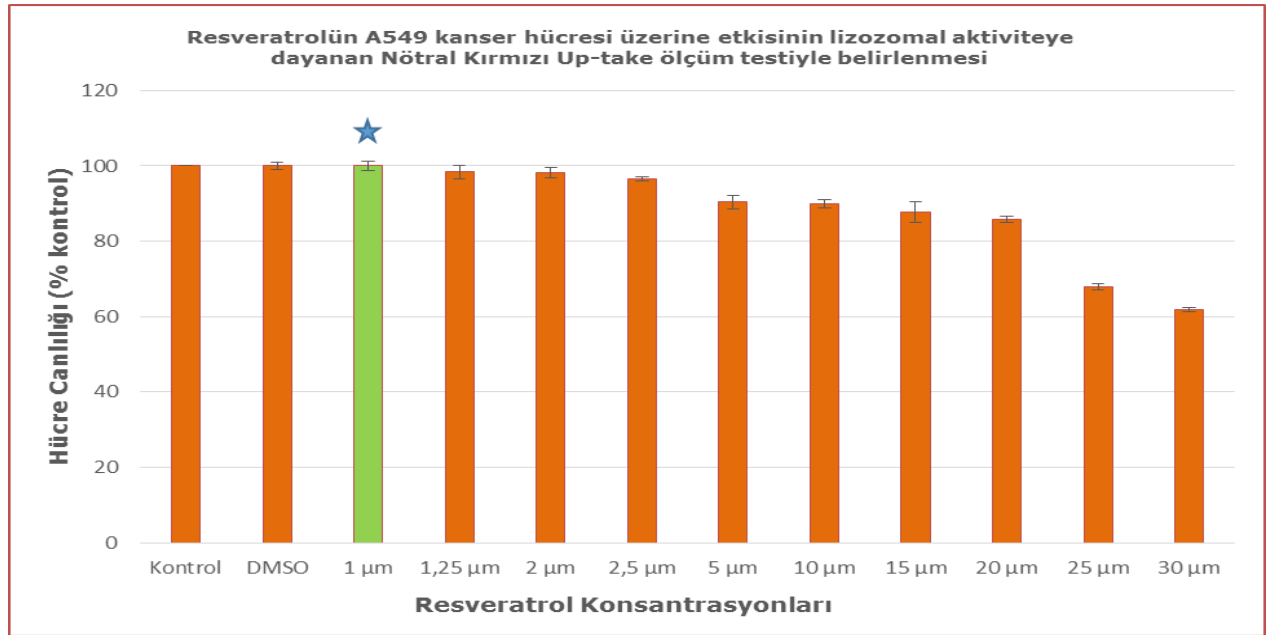
Resveratrolün MKH ve A549 kanser hücresi üzerine sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla yapılan MTT testine göre; 72 saatlik deney süresi sonunda artan dozla beraber resveratrolün A549 kanser hücrelerinde yüksek toksik etkilere sahip olduğu bulundu. Resveratrolün A549 kanser hücrelerinde 1,25 µM'dan itibaren toksisite gösterdiği, yüksek doz olarak belirlenen 30 µM'da canlılığın yaklaşık olarak % 49 oranında azaldığı gözlemlendi. 1 µM resveratrol uygulanan A549 kanser hücrelerinde canlılığın kontrol grubuna benzer olduğu, 1 µM resveratrolün 72 saatlik deney süresince A549 kanser hücreleri için güvenli doz olduğu bulundu (Şekil 4.1).

MKH ile yapılan MTT deneylerinde artan dozla beraber resveratrolün MKH'lerin proliferasyonunu 5 µM dozuna kadar arttırdığı, 5µM'dan sonra ise

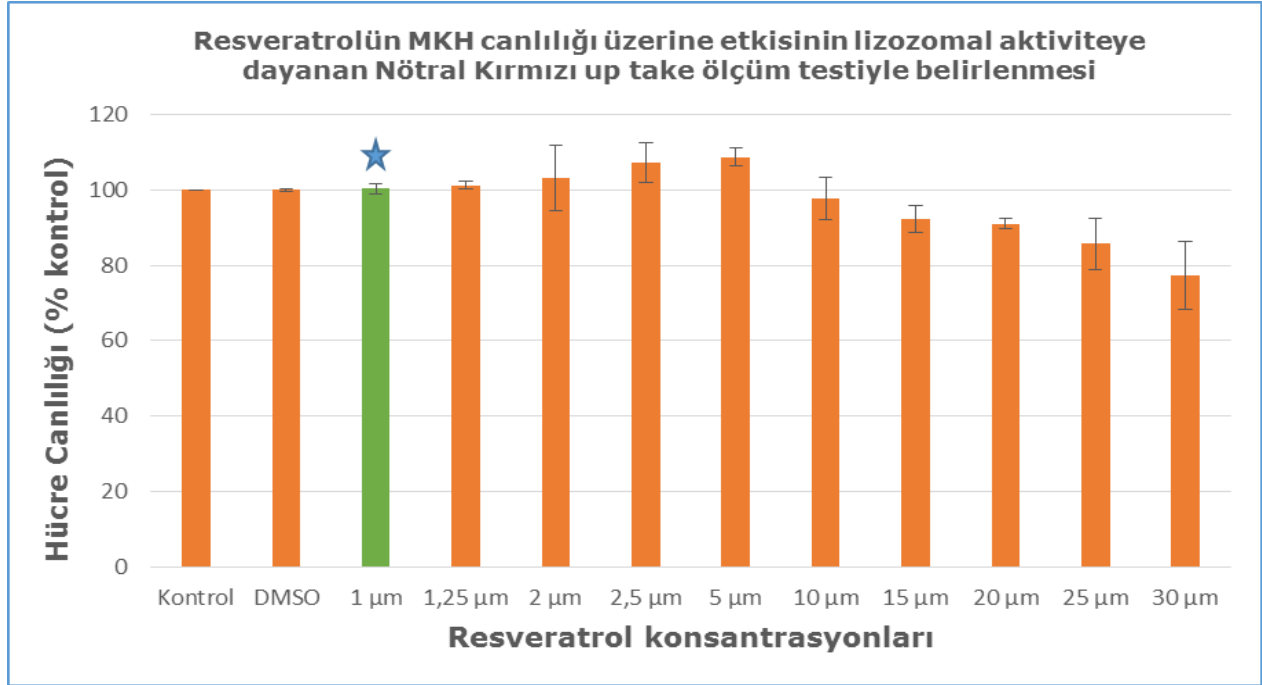
resveratrolün 10,15,20,25,30  $\mu\text{M}$  uygulanan hücrelerde doz artışıyla beraber sitotoksisite gösterdiği bulundu. Yüksek doz olarak belirlenen 30  $\mu\text{M}$ 'da canlılığın yaklaşık olarak % 42 oranında azaldığı gözlemlendi. Deneyimizde A549 kanser hücreleri ve MKH'ler transwell insert sistemiyle aynı ortamda ekileceğinden ikisi içinde ortak güvenli doz 1  $\mu\text{M}$  resveratrol olarak belirlendi (Şekil 4.2).

## 4.2. Resveratrolün A549 Kanser Hücreleri ve MKH'lerdeki Güvenli Dozunun Lizozomal Aktiviteye Dayanan Nötral Kırmızı Up-Take Ölçüm Testiyle Değerlendirilmesi

A549 hücreleri ve MKH'lerin canlılığı 72. Saatte lizozomal aktiviteye dayanan Neutral Red Up-Take ölçüm testiyle belirlendi. Sonuçlar Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'de gösterilmektedir.



**Şekil 4.3:** Resveratrolün A549 kanser hücresi canlılığı üzerine etkisinin lizozomal aktiviteye dayanan nötral kırmızı up take ölçüm testine göre değerlendirilmesi. Ölçümler 72 saatlik deney süresince artan resveratrol konsantrasyonlarında büyütülen A549 kanser hücrelerinde yapılmıştır. Kontrol grubu 100 olarak kabul edilmiştir. 1  $\mu\text{M}$  resveratrol 72 saatlik deney süresince A549 kanser hücrelerinde güvenli doz olarak bulunmuştur. ★ = Güvenli doz. Güvenli doz canlılık oranının kontrol grubuna benzer olduğu gruptur.



**Şekil 4.4:** Resveratrolün MKH canlılığı üzerine etkisinin lizozomal aktiviteye dayanan nötral kırmızı up take ölçüm testine göre değerlendirilmesi. Ölçümler 72 saatlik deney süresince artan resveratrol konsantrasyonlarında büyütülen MKH’de yapılmıştır. Kontrol grubu 100 olarak kabul edilmiştir. 1 µM resveratrol 72 saatlik deney süresince MKH’de güvenli doz olarak bulunmuştur. ★ = Güvenli doz. Güvenli doz canlılık oranının kontrol grubuna benzer olduğu gruptur.

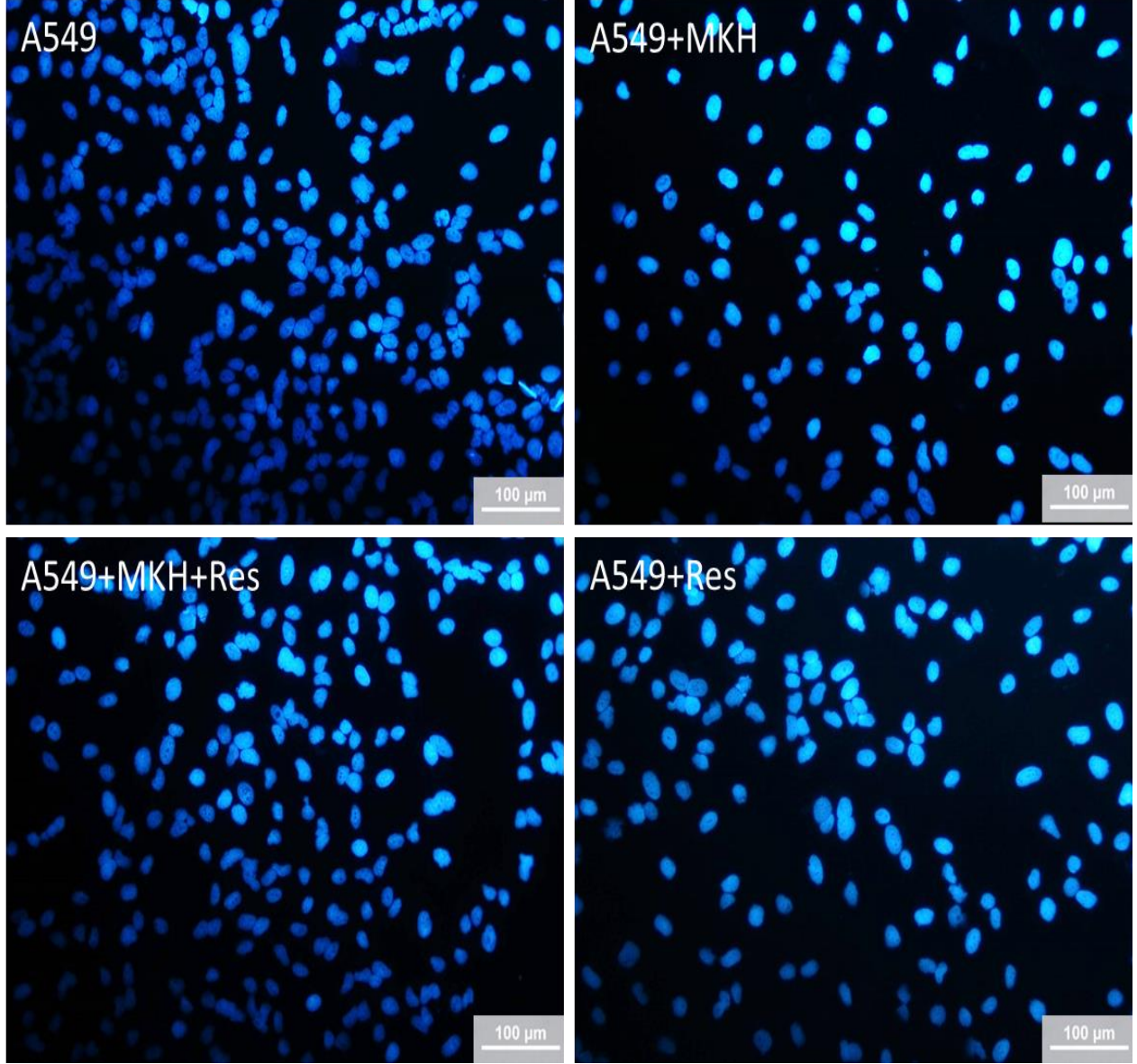
Nötral kırmızı Up-take ölçüm testi lizozomal aktiviteye dayanan hücre canlılığını belirlemede kullanılan bir sitotoksosite testidir. Nötral red testine göre 72 saatlik deney süresi sonunda artan dozla beraber resveratrolün A549 kanser hücrelerinde yüksek toksik etkilere sahip olduğu bulundu. Neutral red sonuçları MTT deneyi ile paralellik gösterdi. Resveratrolün A549 kanser hücrelerinde 1,25 µM’den itibaren toksisite gösterdiği yüksek doz olarak belirlenen 30 µM’da canlılığın yaklaşık olarak %38 oranında azaldığı gözlemlendi. 1 µM resveratrol uygulanan A549 kanser hücrelerinde canlılığın kontrol grubuna benzer olduğu, 1 µM resveratrolün 72 saatlik deney süresince A549 kanser hücreleri için güvenli doz olduğu bulundu (Şekil 4.3).

MKH ile yapılan nötral kırmızı deneylerinde artan dozla beraber resveratrolün MKH’lerin proliferasyonunu 5 µM dozuna kadar arttırdığı, 5µM dan sonra ise resveratrolün 10,15,20,25,30 µM uygulanan hücrelerde doz

artışıyla beraber sitotoksisite gösterdiği bulundu. Yüksek doz olarak belirlenen 30  $\mu\text{M}$ 'da canlılığın yaklaşık olarak %23 oranında azaldığı gözlemlendi. Deneyimizde A549 hücreleri ve MKH'ler transwell insert sistemiyle aynı ortamda ekileceğinden ikisi içinde ortak güvenli doz 1  $\mu\text{M}$  resveratrol olarak belirlendi (Şekil 4.4).

### **4.3. Resveratrolün ve MKH'lerin A549 Kanseri Hücreleri Üzerine Apoptotik Etkilerinin DAPI Boyasıyla Belirlenmesi**

Apoptotik etkinin belirlenmesi için DAPI floresan boyama yapıldı. DAPI adenin timin nükleotidlerinden zengin çift zincirli DNA'ya bağlanan floresan bir boyadır. DAPI boyama A549, A549+MKH, A549+MKH+resveratrol ve A549+resveratrol gruplarında yapıldı. Bu dört grupta A549 kanser hücreleri boyandı. Grupları temsil eden floresan mikroskop görüntüleri şekil 4.5'de gösterildi.



**Şekil 4.5:** Resveratrolün ve MKH'lerin A549 kanser hücreleri üzerine apoptotik etkilerinin DAPI boyasıyla belirlenmesi. Normal yapıda hücre çekirdekleri görülmektedir, apoptotik cisim oluşumu görülmemektedir (Bar= 100 µm, DAPI boyaması).

DAPI boyaması sonucu elde edilen verilere göre; A549, A549+MKH, A549+MKH+resveratrol ve A549+resveratrol gruplarında hücre çekirdek morfolojilerinin benzer olduğu, apoptotik cisim oluşumlarının gözlenmediği tespit edildi.

#### **4.4. IL-6, VEGF, CCL5 ve SDF-1 Sitokinlerinin ELISA Yöntemiyle Değerlendirilmesi**

Deney sonunda hücre kültüründen elde edilen medyumlar sitokin ölçümünde kullanıldı. Altı ayrı gruptan alınan medyumlarda IL-6, VEGF, CCL5 ve SDF-1 sitokinlerinin varlığı ve miktarı araştırıldı.

##### **4.4.1. ELISA Yönteminden Elde Edilen IL-6 Sonuçları**

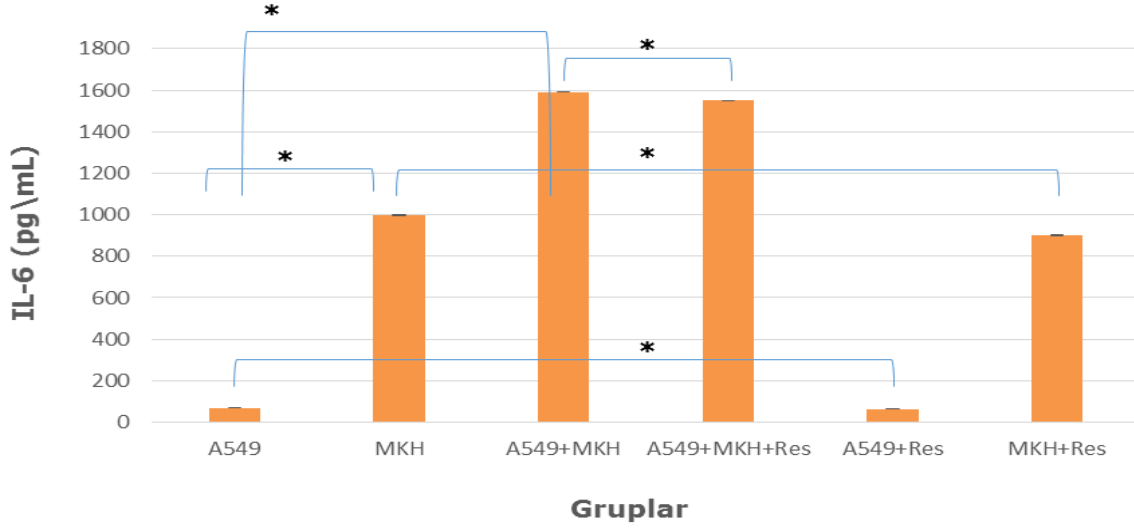
Hücrelerin 3 gün sonunda kültür ortamına salgıladıkları sitokinler içerisinde IL-6 miktarına baktığımızda; istatistiksel olarak her grubun birbirinden farklı olduğu bulundur. Bu gruplar içerisinde;

- MKH grubunun, A549 grubuna göre daha fazla IL-6 sitokini salgıladığı, bunun da istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ( $p < 0,05$ ).
- MKH ve A549'un aynı ortama ekildiği grupta IL-6 miktarının, iki grubun ayrı ayrı salgıladıklarından daha fazla miktarda salgılandığı bulundu. Bu artış istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p < 0,05$ ). Bu sonuç MKH ve A549 kanser hücrelerinin aynı ortamda bulunmasının, IL-6 salınımını ikisinin toplamından daha fazla oranda arttırdığını göstermektedir.
- Sitotoksosite testleri sonucunda 1  $\mu$ M resveratrol iki hücre hattı için de güvenli doz olarak bulundu. 1 $\mu$ M resveratrolün A549+MKH grubunun IL-6 salınımını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşürdüğü gözlemlendi ( $p < 0,05$ ).
- Yalnız MKH grubuna 1 $\mu$ M resveratrol verildiğinde bunun IL-6 miktarını anlamlı bir şekilde düşürdüğü saptandı ( $p < 0,05$ ).
- Yalnız A549 grubuna 1 $\mu$ M resveratrol verildiğinde bunun da IL-6 miktarını anlamlı bir şekilde düşürdüğü bulundu ( $p < 0,05$ ).
- Gruplar arası IL-6 miktar değişimleri Tablo 4.1 ve Şekil 4.6' da verilmiştir.
- IL-6 ELISA deneyinin standart grafiği Şekil 4.7'de verilmiştir.

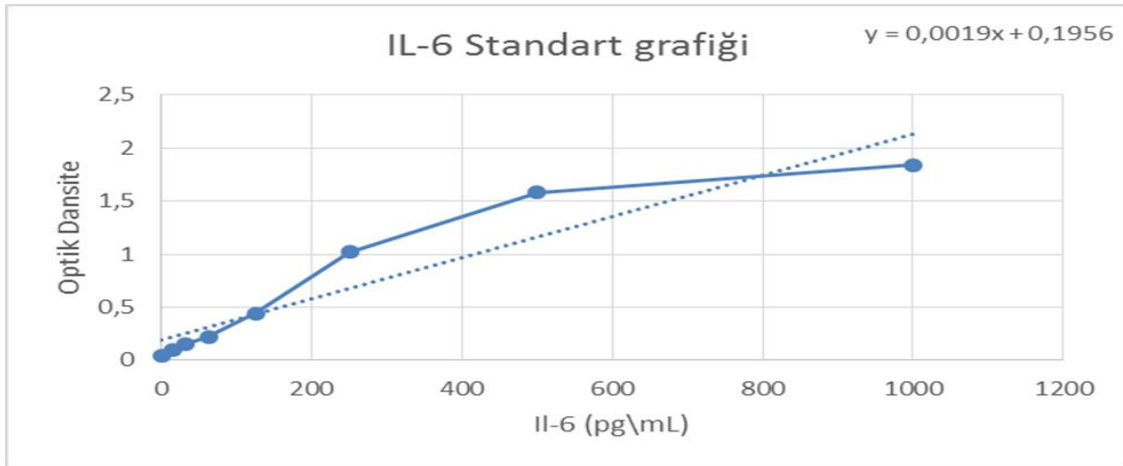


**Tablo 4.1:** Gruplardan elde edilen medyumlardaki IL-6 miktarları (pg/mL).

Grup	Ortalama $\pm$ Standart Sapma
A549	69 $\pm$ 0,75
MKH	998 $\pm$ 0,78
A549+MKH	1591 $\pm$ 0,75
A549+MKH+Resveratrol	1550 $\pm$ 0,81
A546+Resveratrol	63 $\pm$ 0,56
MKH+Resveratrol	901 $\pm$ 0,21



**Şekil 4.6:** Gruplara göre IL-6 miktarları (pg/mL).



**Şekil 4.7:** IL-6 standart grafiği.

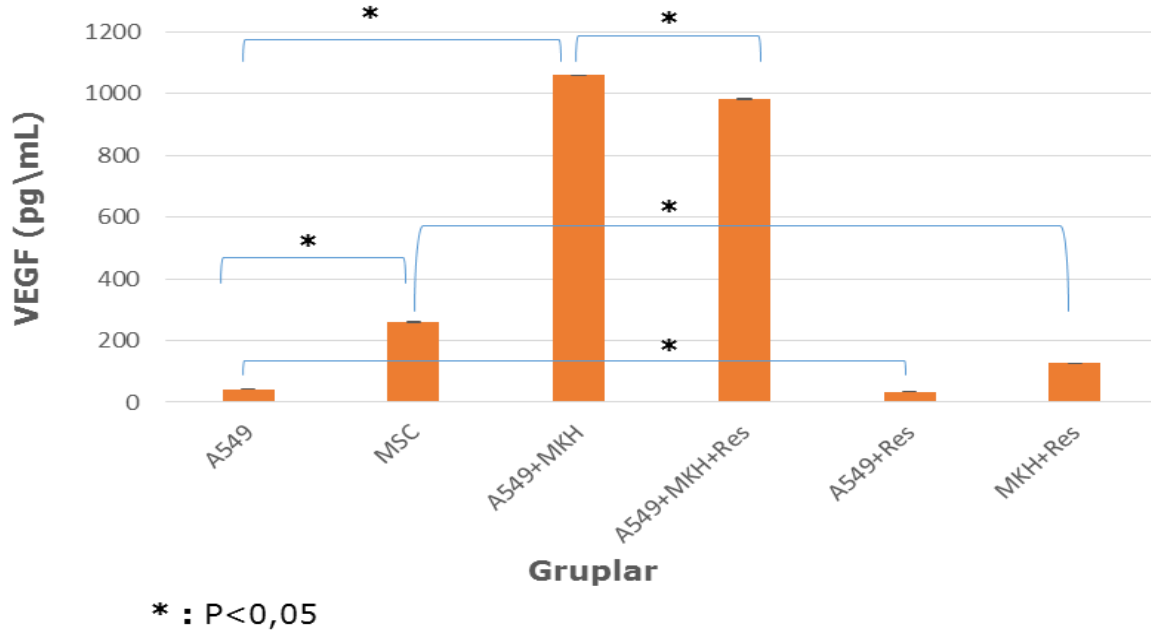
#### **4.4.2. ELISA Yönteminden Elde Edilen VEGF Sonuçları**

Hücrelerin 3 gün sonunda kültür ortamına salgıladıkları sitokinler içerisinde VEGF miktarına baktığımızda, VEGF miktar değişiminin IL-6 sitokinine benzer olduğu bulundu. İstatiksel olarak her grubun birbirinden farklı olduğu bulundu. Bu gruplar içerisinde;

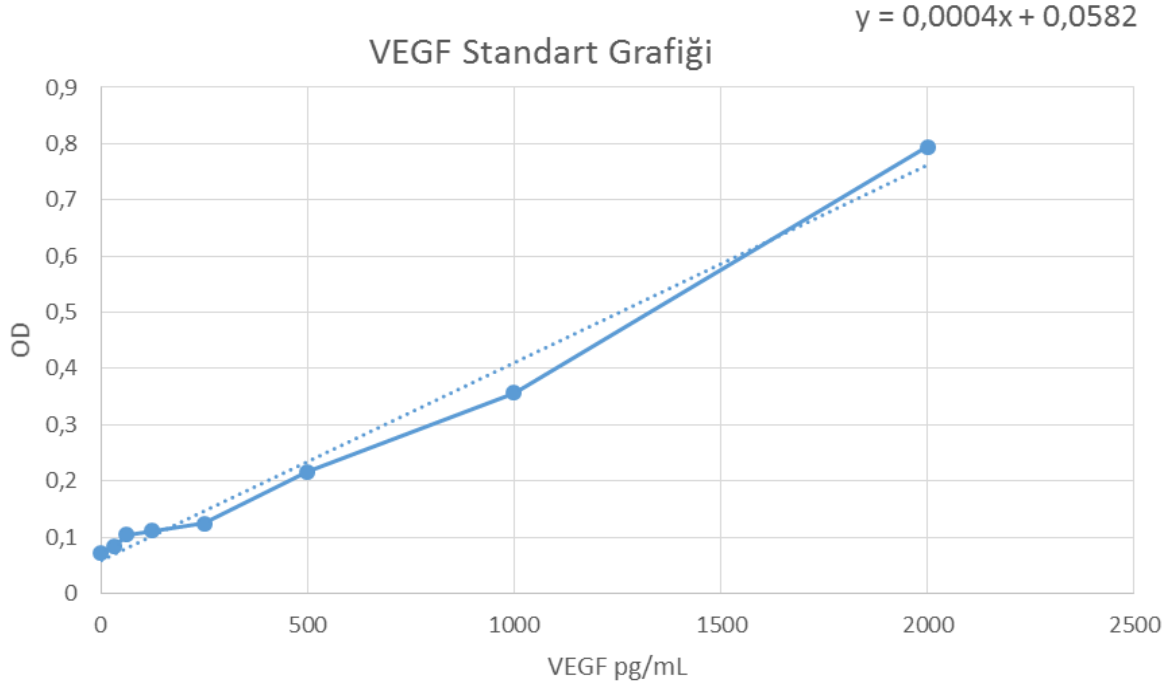
- MKH grubunun, A549 grubuna göre daha fazla VEGF sitokini salgıladığı, bunun da istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ( $p < 0,05$ ).
- MKH ve A549'un aynı ortama ekildiği grupta VEGF miktarının, iki grubun ayrı ayrı salgıladıklarından daha fazla miktarda salgılandığı bulundu. Bu artış istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p < 0,05$ ). Bu sonuç MKH ve A549 kanser hücrelerinin aynı ortamda bulunmasının, VEGF salınımını ikisinin toplamından da fazla miktarda arttırdığını göstermektedir.
- Sitotoksosite testleri sonucunda 1  $\mu$ M resveratrol iki hücre hattı için de güvenli doz olarak bulunmuştur. 1 $\mu$ M resveratrolün A549+MKH grubunun VEGF salınımını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşürdüğü saptandı ( $p < 0,05$ ).
- Yalnız MKH grubuna 1 $\mu$ M resveratrol verildiğinde bunun VEGF miktarını anlamlı bir şekilde düşürdüğü gözlemlendi ( $p < 0,05$ ).
- Yalnız A549 grubuna 1 $\mu$ M resveratrol verildiğinde bunun da VEGF miktarını anlamlı bir şekilde düşürdüğü bulundu ( $p < 0,05$ ).
- Gruplara göre VEGF miktar değişimleri Tablo 4.2 ve Şekil 4.8' de verilmiştir.
- VEGF ELISA deneyinin standart grafiği Şekil 4.9'da verilmiştir.

**Tablo 4.2:** Graplardan elde edilen medyumlardaki VEGF miktarları (pg/mL).

Grup	Ortalama $\pm$ Standart Sapma
A549	42,27 $\pm$ 0,25
MKH	259,27 $\pm$ 0,49
A549+MKH	1059,40 $\pm$ 0,46
A549+MKH+Resveratrol	982,17 $\pm$ 0,47
A546+Resveratrol	35,27 $\pm$ 0,38
MKH+Resveratrol	127,23 $\pm$ 0,32



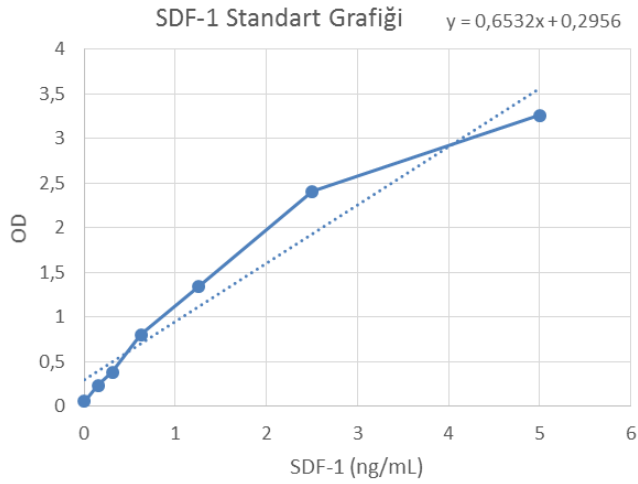
**Şekil 4.8:** Graplara göre VEGF miktarları (pg/mL).



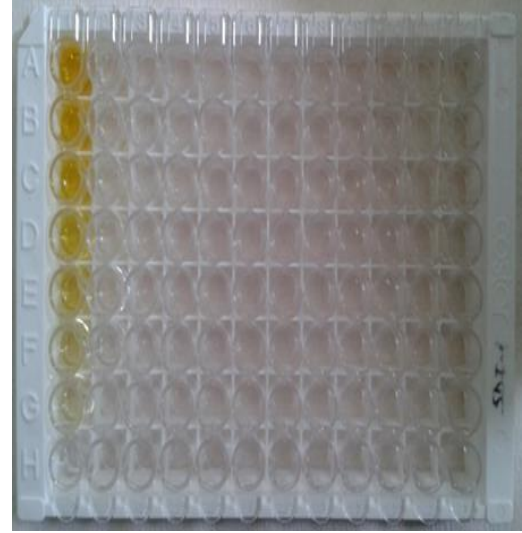
**Şekil 4.9:** VEGF standart grafiği.

#### **4.4.3. ELISA Yönteminden Elde Edilen SDF-1 ve CCL5 Sonuçları**

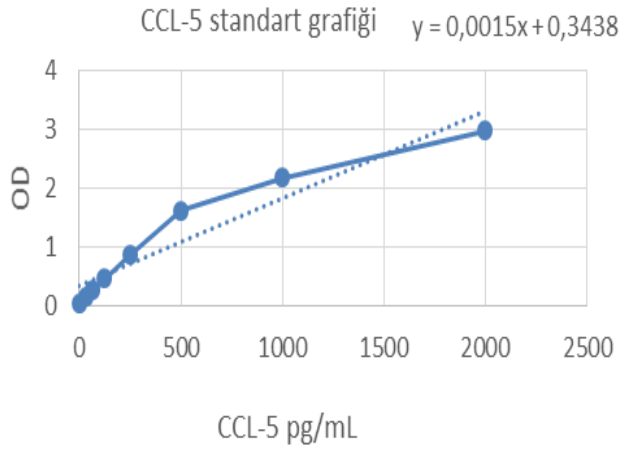
Yapılan ELISA deneyleri sonucunda CCL-5 ve SDF-1 sitokinleri tespit edilemedi. ELISA deneyleri sonucunda sitokinlere ait kitten çıkan sitokin standartları pozitif reaksiyon verirken gruplarda reaksiyon görülmedi. Veriler Şekil 4.10- 4.13'de gösterilmiştir.



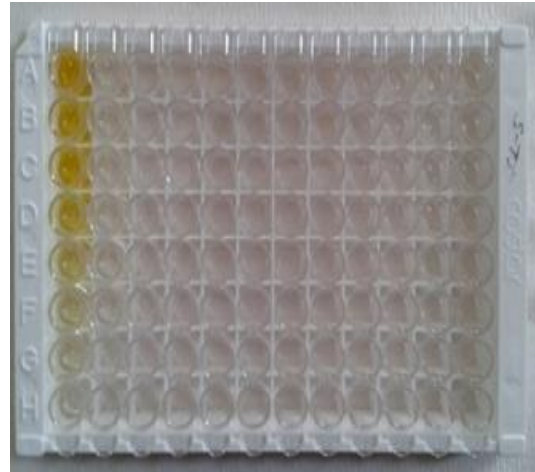
**Şekil 4.10:** SDF-1 standart grafiği.



**Şekil 4.11:** SDF-1 ELISA plakası. 1. kolonda görünen azalan konsantrasyondaki SDF-1 standartıdır. Deney örneği yüklenen diğer kuyucuklarda reaksiyon gerçekleşmemiştir.



**Şekil 4.12:** CCL-5 standart grafiği.



**Şekil 4.13:** CCL-5 ELISA plakası. 1. kolonda görünen azalan konsantrasyondaki CCL-5 standartıdır. Deney örneği yüklenen diğer kuyucuklarda reaksiyon gerçekleşmemiştir.

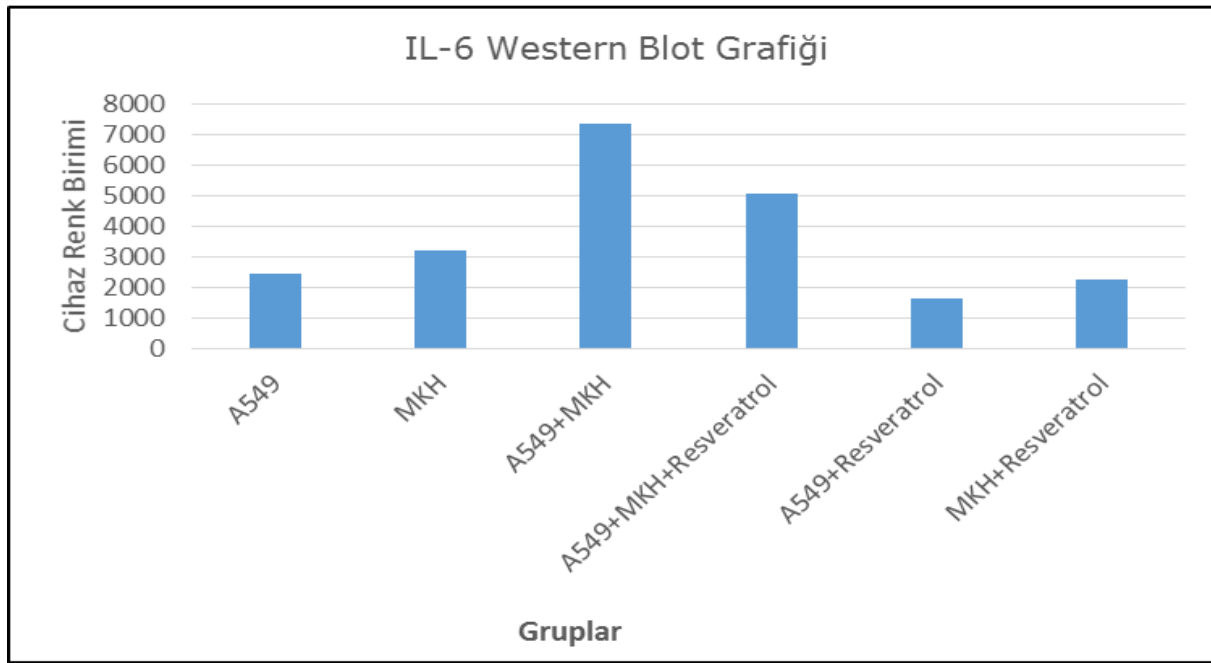
## **4.5. IL-6, VEGF, CCL5 ve SDF-1 Sitokinlerinin Western Blot Yöntemiyle Değerlendirilmesi**

Deney sonunda kültür kaplarının alt yüzeyine yapışmış hücrelerin üzerinde bulunan medyumlar toplanmış, filtre edilmiş ve western blot çalışmaları için stoklanmıştı. Bu medyumlar kültürü yapılan hücrelerin çevrelerine salgıladıkları sitokinleri içermektedir. Bu medyumlar hem ELISA hem de western blot deneylerinde kullanıldı. Altı ayrı gruptan alınan medyumlarda IL-6, VEGF, CCL5 ve SDF-1 sitokinlerinin varlığı ve miktarı western blot yöntemiyle araştırıldı.

### **4.5.1. Western Blot Yönteminden Elde Edilen IL-6 Sonuçları**

IL-6 sitokininin gruplara göre western blot sonuçlarına bakıldığında;

- IL-6'nın MKH grubunda A549 grubuna göre 1,66 kat daha fazla salgılandığı saptandı.
- A549 ve A549+MKH grupları karşılaştırıldığında ise IL-6'nın A549+MKH grubunda 2,69 kat daha fazla salgılandığı gözlemlendi.
- MKH ve A549+MKH grupları karşılaştırıldığında ise IL-6'nın A549+MKH grubunda 1,62 kat daha fazla salgılandığı bulundu.
- A549+MKH ve A549+MKH+resveratrol grupları karşılaştırıldığında resveratrolün IL-6 salınımını 1,33 kat azalttığı saptandı.
- A549 ve A549+resveratrol gruplarında ise resveratrolün IL-6 salınımını 1,41 kat azalttığı gözlemlendi.
- MKH ve MKH+resveratrol grupları karşılaştırıldığında resveratrolün IL-6 ifadesini 1,72 kat azalttığı bulundu.
- Gruplar arası IL-6 miktar değişimleri Şekil 4.14' de verilmiştir.



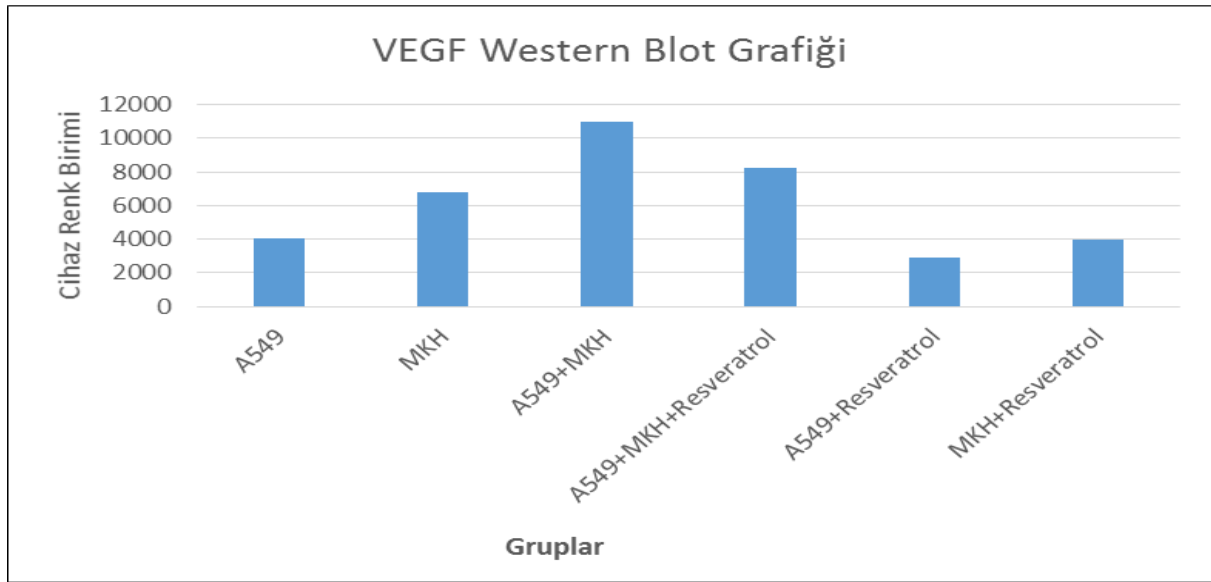
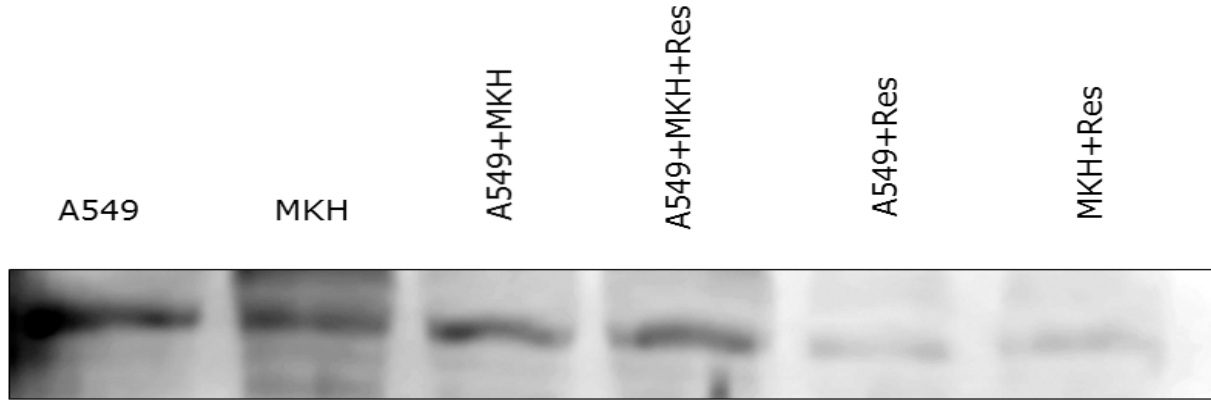
**Şekil 4.14:** Gruplara göre IL-6 miktarının cihaz renk birimine göre değişimi.

#### **4.5.2. Western Blot Yönteminden Elde Edilen VEGF Sonuçları**

VEGF sitokininin gruplar arası western blot sonuçlarına bakıldığında;

- VEGF'nin MKH grubunda A549 grubuna göre 1,32 kat daha fazla salgılandığı bulundu.
- A549 ve A549+MKH grupları karşılaştırıldığında ise VEGF'nin A549+MKH grubunda 3,02 kat daha fazla salgılandığı saptandı.
- MKH ve A549+MKH grupları karşılaştırıldığında ise VEGF'nin A549+MKH grubunda 2,28 kat daha fazla salgılandığı gözlemlendi.
- A549+MKH ve A549+MKH+resveratrol grupları karşılaştırıldığında resveratrolün VEGF'nin salınımını 1,44 kat azalttığı bulundu.
- A549 ve A549+resveratrol gruplarında ise resveratrolün VEGF'nin salınımını 1,48 kat azalttığı saptandı.
- MKH ve MKH+resveratrol grupları karşılaştırıldığında resveratrolün VEGF ifadesini 1,41 kat azalttığı gözlemlendi.
- Gruplar arası VEGF miktar değişimleri Şekil 4.15' de verilmiştir.





**Şekil 4.15:** Gruplara göre VEGF miktarının cihaz renk birimine göre değişimi.

### **4.5.3. Western Blot Yönteminden Elde Edilen SDF-1 ve CCL5 Sonuçları**

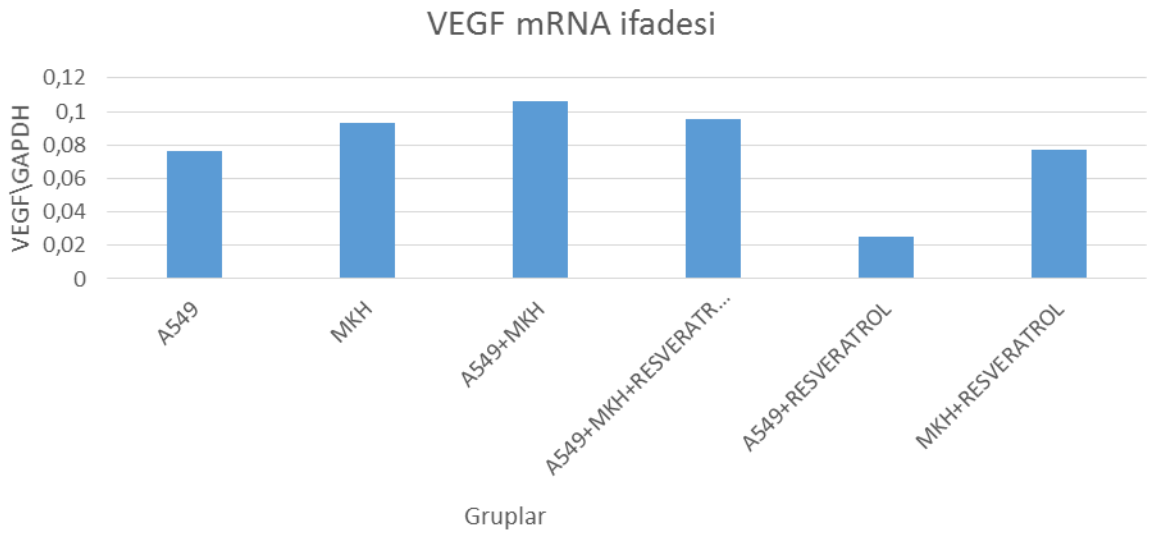
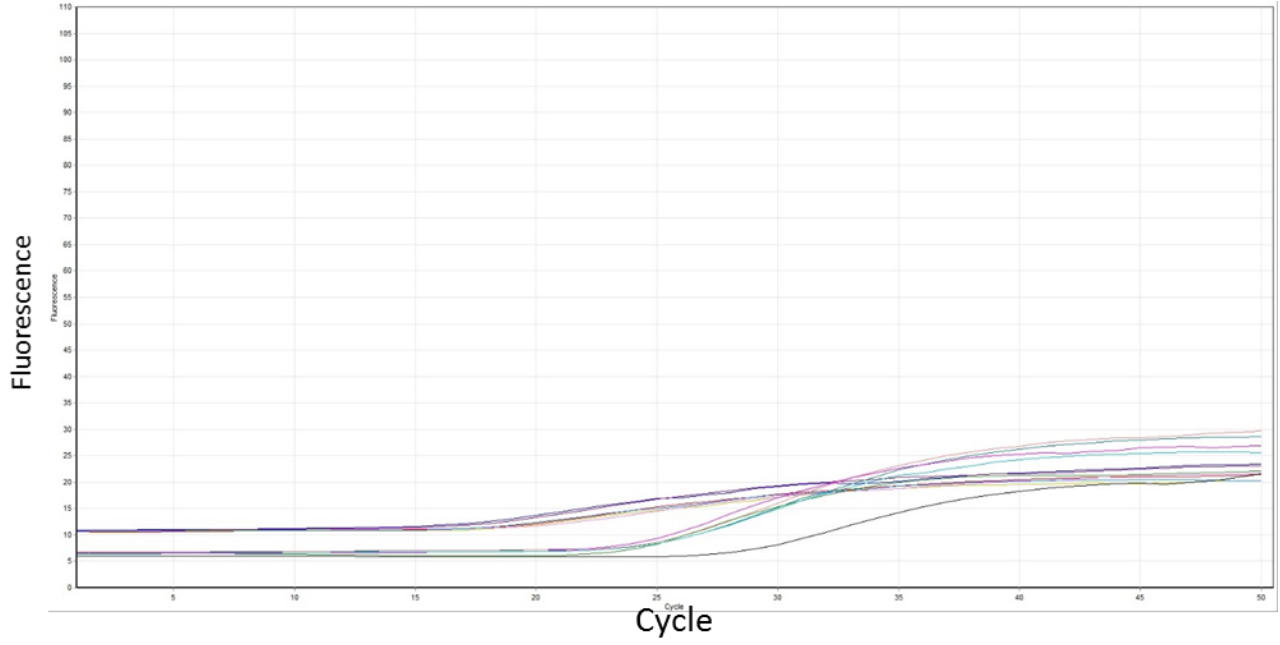
ELISA yönteminden elde edilen verilere paralel bir şekilde western blot deneyinde de SDF-1 ve CCL-5 sitokinleri tespit edilememiştir.

### **4.6. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Uygulaması ile VEGF mRNA Seviyesindeki Değişimin Değerlendirilmesi**

Üç gün süreyle 6'lı plakalarda büyütülen hücreler deney sonunda kaldırılarak ticari kitle total RNA izolasyonu ve ardından rt-PCR deneyi yapıldı. Gruplar arası VEGF gen ekspresyon seviyesi ölçüldü. VEGF mRNA seviyesinin ELISA ve western blot deney sonuçlarıyla paralellik gösterdiği bulundu.

- A549+MKH grubuna 3 gün süreyle 1µM resveratrol uygulandığında VEGF mRNA ifade miktarının azaldığı gözlemlendi.
- Resveratrolün ayrı ayrı hem A549 hem de MKH gruplarında anlamlı bir şekilde VEGF mRNA ifade miktarını azalttığı saptandı.
- MKH grubunun kanser grubuna kıyasla daha fazla VEGF mRNA ifade ettiği bulundu.

Gruplara göre VEGF mRNA miktar değişimleri Şekil 4.16' da verilmiştir.



**Grafik 4.16:** VEGF mRNA seviyesindeki miktar değişimi.

## 5. TARTIŞMA

Kök hücreleri diğer hücrelerden ayıran en önemli özelliği farklılaşmadan kendilerini uzun yıllar yenilemeleri ve fizyolojik veya doğal koşullarda istenilen hücreye doğru farklanmalarının uyarılabilesidir. Kök hücre çalışmalarında genelde iki tip kök hücre kullanılır bunlardan birincisi *in vitro* fertilizasyon çalışmalarında ihtiyaç duyulmayan ve sahipleri tarafından bilimsel çalışmalarda kullanılmak üzere bağışlanan embriyolardan izole edilenlerdir, ikincisi ise hem fetal hem de yetişkin dokudan izole edilebilen Mezenşimal kök hücrelerdir. Bu iki kök hücreye ilaveten son dönemlerde somatik hücreden oluşturulan uyarılmış pluripotent kök hücre de kök hücre çalışmalarında yerini almaktadır (Al-Daccak & Charron, 2015).

Mezenşimal kök hücreler mezodermden köken alan multipotent kök hücrelerdir. Deneysel ve fizyolojik koşullarda birçok hücreye dönüştürülebilirler. MKH'ler yetişkin ve fetal kaynakların birçoğundan izole edilebilir. MKH'ler fibroblast benzeri hücre gövdesinden ince uzantılar çıkan ökromatik ve merkezde büyük bir çekirdeğe sahip hücrelerdir. İlk olarak kemik iliğinde bulunmuş ve 3 mezodermal kökenli dokuya (yağ, kıkırdak ve kemik) farklılaştığı gösterilmiştir. Daha sonraki çalışmalar bu multipotent hücrenin her dokuda (yağ, kordon kanı, plasenta, plasenta villusları, amniyon sıvısı, periferik kan ve karaciğer gibi) bulunabileceğini doku hasarı oluştuğunda doku yenilenmesinde görev aldığı ve kan dokuyla ihtiyaç duyulan alana göç ettiği gösterilmiştir (Bobis et al., 2007; Nicolay, Lopez Perez, Debus, & Huber, 2015).

Hücresele tedaviler rejeneratif tıbbın bir türüdür. Günümüzde hücresele tedavilerde en çok kullanılan kök hücre türü hematopoietik kök hücredir. Hücresele tedavilerde en etkili tedavi gösteren kök hücre ise embriyonik kök hücredir. Embriyodan izolasyonu etik nedenlerle sorunlu olan bu hücrenin kullanımı sınırlıdır. Embriyonik kök hücrelerin teratoma oluşturma riski de oldukça fazladır. Embriyonik kök hücrelerin hücresele tedavilerdeki bu limitli kullanımı, etik ve teratomlar açısından herhangi bir riski bulunmaması mezenşimal kök hücreleri hücresele tedavilerde ilgi odağı haline getirmektedir (Trounson & McDonald, 2015; Wei et al., 2013).

MKH'lerle ilgili ilk klinik çalışma 1995 yılında yapılmış ve bundan sonra giderek artmıştır. 2015 Nisan ayı itibarıyla <http://clinicaltrials.gov> adresine

girilmiş çeşitli faz basamaklarında (Faz I, Faz II ve Faz III) MKH'lerle ilgili 490 çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar gönüllü insanlar üzerinde yapılmaktadır (Bobis et al., 2007).

Kök hücreler klinikte en çok garft versus host hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır. Bu hastalık kemik iliği transplantasyonu sonucu gelişen bir yan etkidir. MKH'lerin immün baskılayıcı özelliğinden dolayı doku transplantasyonları sonucu kullanılmaktadır. MKH'nin diğer yaygın olarak kullanıldığı alan kalp damar hastalıklarıdır. Miyokart infarktüsü sonucu oluşmuş hasarlı bölgeye MKH'ler verildiğinde bölgede iyileşme ve yenilenme olduğu görülmüştür. Genetik olarak bozuk kollajen tip I'in üretimi sonucu meydana gelen osteogenezis imperfekta hastalığının tedavisinde de MKH tedavisi olumlu sonuçlar vermiştir. Motor nöron hastalığı, hürler sendromu, metakromatik lökodistrofi, eklem kıkırdak hasarları, siroz, multipl skleroz, SLE hastalığı, krohn hastalığı gibi daha birçok hastalığın tedavisinde MKH insanlar üzerinde denenmiş ve olumlu sonuçlar alınmıştır (García-Olmo et al., 2005; Kassem et al., 2004; Parekkadan & Milwid, 2010). Kanser tedavilerinde kök hücrenin yerine bakıldığında, kemoterapi sonrasında verilen MKH'nin kemoterapi yan etkilerini azalttığı gösterilmiştir. MKH'lerin direk solit kanserlerin tedavisinde kullanımı tartışmalıdır. MKH'nin kanser tedavisinde kullanılması yönünde engelleyici ve kafa karıştırıcı olan birçok deneysel çalışma bulunmaktadır. Örneğin MKH'nin WNT sinyal yolağı baskılandığında *in-vitro* ortamda sarkoma hücrelerine farklılaştığı gösterilmiştir (Galderisi et al., 2010; Giordano et al., 2007).

MKH'nin birçok deneysel çalışmada tedavi edici ve koruyucu özelliği gösterilmiştir. Kanser modellerinde kanserli hücreleri baskılamış ve çoğalmalarını durdurmuştur. Ancak son yıllarda kanser tedavisi için kök hücrelerin kullanıldığı çalışmalarda; kök hücrelerin kanser oluşumunu tetiklediği, kitleyi büyüttüğü, yeni damarların oluşumuna ve kanserin invazyonuna yardımcı olduğu gösterilmiştir. MKH'ler ile kanser hücreleri arasındaki iletişimin MKH'lerden salınan sitokinler yardımıyla sağlandığı bilinmektedir. Bu sitokinlerin varlığı ve kanserli hücreler üzerindeki etkisi MKH'lerin tedavi güvenilirliğini azaltmaktadır (Torsvik & Bjerkvig, 2013; Trounson & McDonald, 2015).

Çalışmamızda kullandığımız resveratrol bitkilerden izole edilebilen kimyasal olarak fitoaleksinin grubunda bulunan bitkisel kaynaklı bir bileşiktir.

Son yıllarda faydalarının çok yüksek olmasından dolayı kimyasal olarak da üretilmektedir. Resveratrol yüksek miktarda siyah üzüm kabuğunda, yerkıstığı, ananas ve bunun gibi yaklaşık 70 tür bitkide bulunmaktadır. Resveratrol inflamasyon, oksidatif stres, tümör başlaması ve ilerlemesi, platelet agregasyonu atherosklerozis gibi birçok hastalıkta biyolojik aktiviteye sahiptir. Birçok genin susturulmasında veya ifade edilmesinde görev almaktadır. Resveratrol'un bu yararlı etkilerini IL-6, IL-12, IL-2, IFN-γ, TNF-α ve NF-κB gibi birçok sitokinin salınımı baskılayarak yaptığı gösterilmiştir (Tung et al., 2015). Bizde çalışmamızda resveratrolün IL-6, CCL-5, SDF-1 ve VEGF sitokinlerini baskılaması amacıyla kullandık.

Çalışmamızda ilk olarak sitotoksisite deneyleri yapıldı. Resveratrol yardımıyla MKH'lerden salınan 4 sitokin salınımını durdurmayı veya azaltmayı amaçladığımız için resveratrolün A549 ve MKH'lerde toksik dozunu değil güvenli dozunu kullanmayı amaçladık.

Güvenli doz gruplar arası hücre canlılığının kontrol grubuna benzer olduğu, hücre ölümünün olmadığı dozdur.

Güvenli doz kullanmamızdaki amacımız MKH ve kanser hücrelerinde hücre ölümü gerçekleştirmeden sitokin salınımını durdurmaktır. Yüksek konsantrasyonlarda resveratrolün aşırı sitotoksik olması, sitokin salınımı yapan hücrelerde ölüme neden olabilir ve bu hücre sayısındaki azalmada sitokin miktarındaki azalmayı doğuracağından, sitokin miktarındaki değişimleri yorumlamamızda hatalara neden olabilirdi bu yüzden çalışmamızda hücre ölümü olmadan sitokin üretimini azaltacak olan doz kullanıldı.

Literatürdeki A549-Resveratrol doz çalışmalarına baktığımızda; Kim ve arkadaşları A549, EBC-1 ve Lu65 gibi akciğer kanser hücre hatları üzerine resveratrolün apoptotik ve anti kanserojenik özelliğini incelediklerinde, resveratrolün 5-10 µM aralığında A549 kanser hücrelerinde apoptotik ve anti kanserojenik özellik gösterdiğini bulmuşlardır (Y. Kim et al., 2003).

Donnelly ve arkadaşları resveratrolün A549 kanser hücrelerindeki anti-inflamatuar etkisini incelemişlerdir. Çalışmalarında 60 ve 120 µM resveratrol kullanmışlardır. 60 µM resveratrolün A549 kanser hücrelerinde anti-inflamatuar etki yarattığı, IL-8 ve granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör salınımını durdurduğunu rapor etmişlerdir (Donnelly et al., 2004).

Literatürde daha çok Resveratrolün A549 kanser hücresi üzerine olan apoptotik etkisi incelenmiştir (Gu, Chen, Jiang, & Zhang, 2015). Güvenli doz bulma çalışmaları sınırlılığını korumaktadır.

Kumar ve arkadaşları PC12 Feokromositoma kanser hücrelerinde yaptıkları 24 saatlik deneyde 10 µM resveratrolü güvenli doz olarak bulmuşlardır. A549 hücreleri ve Resveratrol ile yaptığımız sitotoksisite deneyleri (MTT ve Nötral kırmızı) ile, 72 saat sonunda, 1 µM resveratrolün A549 kanser hücreleri üzerinde güvenli doz olduğu saptandı (Kumar, Tripathi, Singh, Lohani, & Kuddus, 2013).

MTT ve nötral kırmızı sitotoksisite deneyleri ile beraber güvenli dozu tespit etmek adına floresan boyamada yapılmıştır. DAPI adenin timin nükleotidlerinden zengin çift zincirli DNA ya bağlanan floresan bir boyadır. Bu boyamayla çekirdekdeki apoptotik değişimler incelenebilir. Yaptığımız DAPI floresan boyamasıyla 1 µM Resveratrolün A549 kanser hücresinde apoptozis oluşturmadığı görüldü.

Çalışmamızda MKH'ler ve A549 kanser hücreleri aynı ortamda kültüre edildiğinden ortama verilen resveratrol iki hücreyi de etkilemiş dolayısıyla resveratrolün MKH'ler üzerine olan sitotoksik etkilerine de bakıldı.

Literatürdeki *MKH-Resveratrol* doz çalışmalarına baktığımızda; Peltz ve arkadaşları resveratrolün MKH üzerine olan kendini yenileme ve yaşlanma (senesens) etkilerini incelemişlerdir. 0.1, 1, 5 ve 10 µM resveratrol dozlarının MKH'ler üzerindeki kısa (6 gün) ve uzun (30 gün) vadedeki etkilerini incelemişlerdir. 0.1, 1 ve 5 µM resveratrol uygulanan hücrelerin kısa vadede hücrenin kendini yenileme yani bölünme kat sayısının doz bağımlı arttığını göstermişlerdir. Bizim yaptığımız *MKH-Resveratrol* doz belirleme çalışmaları Peltz ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalara benzerlik göstermektedir. 3 gün sonunda çalışmamızda 5 µM resveratrol uygulanan grubun canlılığının kontrole göre % 15 arttığı, 5 µM'dan sonra doz bağımlı olarak canlılığın kontrol seviyesinin altına indiği bulundu (Peltz et al., 2012).

Sitotoksisite deneyleri sonucunda resveratrolün güvenli dozunun A549 için 1 µM, kök hücre için ise güvenli dozun 5 µM olduğunu gösterildi. Transwell sistemde iki hücre aynı ortamı kullandığından ve resveratrol A549 için 1 µM'dan sonra toksisite gösterdiğinden iki hücre içinde ortak olan 1 µM güvenli

doz olarak belirlendi. Sitotoksosite deneylerinden sonra ko-kültür deneylerine geçildi.

Çalışmamızda ko-kültür deneyleri kullanıldı. Ko-kültür deneylerinde *in-vitro* ortamda farklı iki hücrenin birbirine olan etkileri incelenebilir. Ko-kültür deneylerinin bazılarında hücreler birbirleriyle direk temas halindeyken bazı deney modellerinde ise hücreler birbirlerinden üzerinde hücrelerin geçemeyeceği ancak salgılarının geçebileceği porlar bulunan membranlarla ayrılmışlardır. Bu tür hücrelerin birbirinden ayrı olduğu ko-kültür deneyleri transwell insert sistemiyle sağlanır. Transwell insert sistem de 6 kuyucuklu plakaların içerisine yerleştirilebilen insertler bulunur. İntertler içine hücre ekilebilen zemininde iki ortamdaki çözünebilir bileşiklerin karşılıklı geçmesini sağlayan porlar (0,45 µm genişliğinde) bulundurur. İki katlı birbirine porlarla bağlı petri sistemidir.

Transwell insert sistemin üst katına kök hücreler alt katına da A549 hücreleri ekilerek medyumlarına resveratrol ileve edilmiş ve 3 gün süreyle inkübe edildi. 3 gün sonunda resveratrolün sitokinlerin salınımı üzerine olan etkileri moleküler yöntemlerle araştırıldı.

Bugüne kadar kanser hücreleri ile MKH'ler arasında görev yapan kanserli hücrenin büyümesini, çoğalmasını, hayatta kalımını, kanserli bölgede damar oluşumunu ve kanserli hücrenin başka dokulara metastazını arttıran birçok sitokin bulunmuştur (Jotzu et al., 2010).

Örneğin kanserli hücre ile MKH aynı ortamda kültüre edildiğinde kanser hücrelerinden TGF-beta salınımının arttığı gözlenmiştir. MKH'lerin ise buna cevap olarak miyofibroblast benzeri hücrelere dönüştüğü ve moleküler anlamda alfa-SMA, Tenaskin-c ve FSP genlerinin ifadesini arttırdığı gösterilmiştir. Bu kök hücreden farklılaşan miyofibroblast benzeri hücrenin SDF-1 ve CCL-5 sitokinleri yardımıyla kanser hücrelerinin hayatta kalımını ve kanser kitlesinin büyümesine neden olduğu gösterilmiştir (Mishra et al., 2008; Quante et al., 2011; Torsvik & Bjerkgvig, 2013).

Mezenşimal kök hücreler ve kanser hücreleriyle yapılan çalışmalarda; MKH'lerin hem kendilerinin kanserli hücrelere farkedildiği hem de var olan kanserli hücreleri daha saldırgan hale getirdiği gösterilmiştir. Sarkomaların kökeni ile ilgili yapılan bir çalışmada, yaygın olarak görülen tümörlerden olan



Malignant fibröz histiyostomaların (MFH), MKH'lerden köken alabileceğini gösteren sonuçlara ulaşılmıştır. Çalışmada, DKK-1 sitokinin MKH'lerde WNT sinyal yolağını bloke ettiği ve MKH'lerin malign sarkomalara dönüştüğü saptanmıştır. DKK-1 MFH'da yoğun olarak sentezlenen bir sitokindir ve bu sitokinin MKH'ler üzerine olan dönüştürücü etkisi MKH'lerin tedavi amaçlı kullanımlarının uygunluğunu düşündürmektedir (Matushansky et al., 2007; Tolar et al., 2007)

Yaptığımız terminolojik araştırmalar sonucunda, MKH'lerin kanserli hücrelere karşı kullandığı sitokinlere baktığımızda, karşımıza en çok 4 sitokin çıkmaktadır; CCL-5, SDF-1, IL-6 ve VEGF. Bizde çalışmamızda bu dört sitokini inceledik.

Hastalıkların tedavisinde ve kanser tedavilerinde MKH'ler damar yoluyla verilmektedir. Damar yoluyla verilen kök hücrelerin damarlarda dolaştıktan sonra yangılı bölgeye veya kanser bölgesine geçtikleri bilinmektedir. Kök hücrelerle kanser hücreleri arasındaki iletişimin parakrin olarak etki gösteren sitokinlerin salınımıyla gerçekleştiği kanıtlanmıştır. Kök hücrelerin IL-6 ve CXCL-7 sitokinleriyle meme kanseri hücrelerini uyardığı ve genetiği değiştirilmiş farelere meme kanseri hücreleri ve kök hücreler beraber verildiğinde meme kanseri kitlesini büyüttüğü gösterilmiştir (S. Liu et al., 2011). Bizim çalışmamızda da MKH'ler ve akciğer kanseri hücreleri birlikte kültüre edildi. Medyuma salınan sitokinler arasında IL-6 miktarının MKH'lerin kanserli hücrelerle birlikte kültüre edildiği grupta arttığı görüldü bu bulgu Liu ve arkadaşlarının (2011) bulgularıyla paralellik göstermektedir.

Hsu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada; MKH'lerin, A549 ve CL1-5 akciğer kanseri hücreleri ile kültüre edildiğinde IL-6 sitokini salgıladığını, bu sitokininin kanserli hücrelerde ilaç direncini ve siferik hücre formasyonunu IL-6/JAK2/STAT3 yolağı ile arttırdığını belirlemişlerdir. Aynı zamanda genetik olarak immün yetmezliği olan farelere bu kök hücreler ve kanser hücreleri nakil edildiğinde tümör oluşturduğunu saptamışlardır (H.-S. Hsu et al., 2012).

Scherzad ve arkadaşları insan kaynaklı MKH'leri baş ve boyun skuamöz kanser hücreleriyle kültüre etmiş, MKH sitokinlerinin kanser hücrelerini proliferasyonunu arttırdığını göstermişlerdir. Bu proliferasyonun anti-IL-6 antikoruyla durduğu gösterilmiştir. Kanser hücrelerinde de en çok ERK1/2 yolağının aktif olduğu bulunmuştur (Scherzad et al., 2015).

Kök hücrelerden salınan IL-6 sitokininin çeşitli kanser hücreleri üzerine olan negatif etkileri bilinmektedir. Hsu ve Liu yaptıkları *MKH-Kanser* çalışmalarında MKH'lerin en çok IL-6 salgıladığını bu sitokinin de kanser hücrelerinin metastazik özelliğini arttırdığını bulmuşlardır (H.-S. Hsu et al., 2012; S. Liu et al., 2011).

Bizim çalışmamızda da IL-6 sitokini ön plana çıkmaktadır. IL-6 miktarı kök hücrelerin kanserli hücrelerle kültüre edildiği grupta artmış bu bulgu Hsu ve Liu'nun bulgularıyla paralellik göstermektedir. Bizim çalışmamızda Hsu ve Liu'nun çalışmasından farklı olarak kanserli hücreler üzerinde negatif etkinliği olduğu bilinen IL-6 salınımının güvenli doz resveratrol verilerek durdurulması veya salınımının azaltılması amaçlanmıştı. Elde ettiğimiz bulgular vermiş olduğumuz resveratrolün IL-6 salınımını anlamlı bir şekilde düşürdüğünü ancak kontrol grupları seviyesine indiremediğini göstermiştir.

Cho ve arkadaşları meme kanseri hücrelerinden elde edilen ekzozomları MKH'lere uygulamış ve deney sonucunda MKH'lerin sitokinleri arasında anlamlı olarak en çok SDF-1, VEGF, CCL5 ve TGF $\beta$  miktarının arttığı gösterilmiştir (Cho, Park, Lim, & Lee, 2012). Bizim çalışmamızda da VEGF miktar artışı tespit edilmiştir, bu bulgu Cho ve arkadaşlarının bulgularıyla paralelken, SDF-1 ve CCL-5 salınımı bizim çalışmamızda gerek ELISA gerek western blot çalışmaları sonucunda tespit edilemedi. Çalışmamızdaki bu farklılığın nedeninin iki çalışma arasında kullanılan kanser hücrelerinin farklılığına dayandığı düşünülmektedir

SDF-1 ve CCL-5 üzerine yapılan başka bir çalışmada Xu ve arkadaşları bu iki sitokinin MKH'lerden salgılandığı ve Saos-2 hücrelerinin migrasyonunu arttırdığı ve bu iki sitokinin kanserli hücrelerin metastazını arttırabileceğini düşündürmüştür (Xu, Bian, Fan, Li, & Tang, 2009). Biz Xu ve arkadaşlarından farklı olarak SDF-1 ve CCL-5 salınımını deneylerimiz sonucunda tespit edemedik.

Nakanishi ve arkadaşları fareden izole ettikleri yağ doku kaynaklı Mezenşimal kök hücrelerin gen ve protein ekspresyonuna bakmışlar. 1 gün süreyle kültüre edilmiş hücrelerim medyumları toplanmış ve daha sonra bunlarda sitokin taraması yapılmıştır. Sonuç olarak MKH'lerin birçok sitokin salgıladığı ama Hepatocyte growth factor (HGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), adrenomedullin (AM), stem cell-derived factor-1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ ),

interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) ve leptin sitokinlerinin ön plana çıktığını ve 1 günlük kültürasyon da bu sitokinleri salgıladığını bulmuşlardır (Nakanishi et al., 2011). Bizim çalışmamızda da insan kaynaklı, yağ dokudan izole edilmiş MKH'ler kullanıldı. 3 günlük kültürasyon sonucunda CCL-5 ve SDF-1 ekspresyonunun olmadığı görüldü bu farklılık kültürasyon süresinin farklılığına ve kullanılan kök hücrenin farklı kaynaklardan izole edilmesine bağlanmaktadır.

Yeni damar oluşumu kanserli dokuyu destekleyen en büyük fizyolojik olaydır (Z. Wang et al., 2015). MKH'lerin kanserli hücrelerle kültüre edildiğinde damar oluşumunu sağlayan sitokin olan VEGF salınımını arttırdığı birçok çalışma tarafından tespit edilmiştir. Örneğin yağ doku kaynaklı MKH'nin kolon kanseri hücrelerine karşı VEGF salınımını arttırdığı gösterilmiştir (Chen et al., 2015). Chen ve arkadaşlarının (2015) çalışmalarında olduğu gibi bizim çalışmamızda da MKH'nin akciğer kanseri hücresine karşı VEGF salınımını arttırdığı gösterildi. Chen ve arkadaşlarından farklı olarak MKH-A549 kanser hücresinin beraber bulunduğu ortama 1  $\mu$ M resveratrol verildiğinde ise VEGF salınımının anlamlı bir şekilde düştüğü bulundu.

Resveratrolün güvenli dozunun MKH'lerin salgıladığı IL-6 ve VEGF sitokinleri üzerinde etkili olduğu salınımını anlamlı bir şekilde düşürdüğü ancak IL-6 ve VEGF miktarının resveratrolde sonra hala kontrol seviyesinden yüksek olduğu bulunmuştur.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda yağ doku kaynaklı Mezenşimal kök hücreler ile A549 akciğer kanser hücreleri transwell insert sistemle 3 gün süreyle beraber ko-kültüre edilmiştir. Resveratrolün bu iki hücre üzerindeki güvenli dozu IL-6, CCL-5, SDF-1 ve VEGF sitokinlerinin salınımını durdurmak için kullanılmıştır.

Sonuçlar;

- Resveratrolün A549 için 3 günlük güvenli dozu 1 $\mu$ M olarak bulunmuştur.
- Resveratrolün 1 $\mu$ M'dan 5 $\mu$ M kadar kök hücrelerde proliferasyonu arttırdığı 5  $\mu$ M'dan sonra doz bağımlı olarak hücre proliferasyonunun azaldığı gözlenmiştir.
- İki hücre içinde deneyimizde ortak güvenli doz 1 $\mu$ M olarak saptanmıştır.
- ELISA ve Western blot deneylerinde IL-6 ve VEGF salınımı tespit edilirken, SDF-1 ve CCL-5 salınımı tespit edilememiştir.
- A549-MKH grubunda IL-6 ve VEGF salınımının en yüksek olduğu 1 $\mu$ M resveratrolün bu iki sitokininin salınımını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşürdüğü ancak hala kontrol seviyesinden yüksek olduğu bulunmuştur.

Öneriler;

- Kök hücrelerin kanser tedavisindeki kullanımı tartışılmalı ve tam olarak netlik kazanmadan klinik uygulamalara geçilmemelidir.
- Daha önce bilimsel olarak çalışılmış faydalı olduğu kanıtlanmış resveratrol gibi bitkisel kaynaklı bileşiklerle kök hücreler muamele edilip o şekilde tedaviye alınabilir. Bizim çalışmamızda resveratrolün sitokin salınımı üzerine olumlu etkileri bulunmuştur. Resveratrolün güvenli dozu kök hücre tedavilerinde kök hücreyle beraber verilebilir.

- Diğer bir önerimiz gelecek çalışmalarda MKH'lerin tedavi edici özelliğinden yararlanmak adına, genetiği değiştirilmiş kök hücreler kullanılabilir. Örneğin genetik olarak IL-6 ve VEGF gibi sitokinleri salgılayamayan kök hücreler üretilebilir.

## 7. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aktaş, S. H. (2010). *Kemoterapinin Kolon Kanseri, Meme Kanseri Ve Mide Kanserinde Vegf Düzeylerine Etkisinin İn Vivo Ve İn Vitro İncelemesi*. (Yüksek Lisans Tezi), Ankara Üniversitesi Ankara.
- Alp, C. (2013). KÖK HÜCRE. *Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları: AKADEMİSYEN KİTABEVİ*.
- Al-Daccak, R., & Charron, D. (2015). Allogenic benefit in stem cell therapy: cardiac repair and regeneration. *Tissue antigens*, 86(3), 155-162.
- Andreasen, S., Therkildsen, M. H., Grauslund, M., Friis-Hansen, L., Wessel, I., & Homøe, P. (2015). Activation of the interleukin-6/Janus kinase/STAT3 pathway in pleomorphic adenoma of the parotid gland. *APMIS*, 123(8), 706-715.
- Angius, F., & Floris, A. (2015). Liposomes and MTT cell viability assay: An incompatible affair. *Toxicology in Vitro*, 29(2), 314-319.
- Ara, T., & DeClerck, Y. A. (2010). Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression. *European Journal of Cancer*, 46(7), 1223-1231.
- Athar, M., Back, J. H., Tang, X., Kim, K. H., Kopelovich, L., Bickers, D. R., & Kim, A. L. (2007). Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicology and applied pharmacology*, 224(3), 274-283.
- Bang, O. Y. (2015). Autologous Mesenchymal Stem Cell Therapy in Patients with Stroke *Cell Therapy for Brain Injury* (pp. 21-35): Springer.
- Baptista, L., Pedrosa, C., Silva, K., & Borojevic, R. (2011). *Processing of lipoaspirate samples for optimal mesenchymal stem cells isolation*: INTECH Open Access Publisher.
- Barbero, S., Bonavia, R., Bajetto, A., Porcile, C., Pirani, P., Ravetti, J. L., Schettini, G. (2003). Stromal cell-derived factor 1 $\alpha$  stimulates human glioblastoma cell growth through the activation of both extracellular signal-regulated kinases 1/2 and Akt. *Cancer research*, 63(8), 1969-1974.
- Barnes, P. J., Drazen, J. M., Rennard, S. I., & Thomson, N. C. (2009). *Asthma and COPD*: Academic Press.

- Bianco, P., Robey, P. G., & Simmons, P. J. (2008). Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. *Cell Stem Cell*, 2(4), 313-319.
- Bobis, S., Jarocha, D., & Majka, M. (2007). Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 44(4), 215-214.
- Bostancıoğlu, R. B. (2015). *Metal Katkılı Hidroksiapatit Nanokaplama Malzemeleri Üzerinde Büyütölen Yağ Dokusu Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Adezyon, Canlılık Ve Osteojenik Farklılaşma Kapasitelerinin İn Vitro Yöntemlerle Değerlendirilmesi*. (Doktora tezi), Anadolu Üniversitesi, Eskişehir.
- Burç, K. (2010). *Küçük hücreli dışı akciğer kanseri mediastinal evrelemesinde PET-BT'nin yeri ve önemi*. (uzmanlık tezi), Kocaeli Üniversitesi, Kocaeli
- Chen, D., Liu, S., Ma, H., Liang, X., Ma, H., Yan, X., Liu, X. (2015). Paracrine factors from adipose-mesenchymal stem cells enhance metastatic capacity through Wnt signaling pathway in a colon cancer cell co-culture model. *Cancer Cell International*, 15(1), 42.
- Cho, J. A., Park, H., Lim, E. H., & Lee, K. W. (2012). Exosomes from breast cancer cells can convert adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into myofibroblast-like cells. *International journal of oncology*, 40(1), 130-138.
- Cuiffo, Benjamin G., Campagne, A., Bell, George W., Lembo, A., Orso, F., Lien, Evan C., Karnoub, Antoine E. (2014). MSC-Regulated MicroRNAs Converge on the Transcription Factor FOXP2 and Promote Breast Cancer Metastasis. *Cell Stem Cell*, 15(6), 762-774.
- Culpitt, S., Rogers, D., Fenwick, P., Shah, P., De Matos, C., Russell, R., Donnelly, L. (2003). Inhibition by red wine extract, resveratrol, of cytokine release by alveolar macrophages in COPD. *Thorax*, 58(11), 942-946.
- D'Apuzzo, M., Rolink, A., Loetscher, M., Hoxie, J. A., Clark-Lewis, I., Melchers, F., Moser, B. (1997). The chemokine SDF-1, stromal cell-derived factor 1, attracts early stage B cell precursors via the chemokine receptor CXCR4. *European journal of immunology*, 27(7), 1788-1793.

- Dey, T., Dutta, P., Kalita, J., Boruah, H. P. D., Kalita, M., & Unni, B. (2015). Glutathione S-transferase gene polymorphism and lung cancer in Indian population: a meta-analysis of case-control studies. *Current Science*, *109*(3), 536-540.
- Dimitrov, D. S. (2012). Therapeutic proteins *Therapeutic Proteins* (pp. 1-26): Springer.
- Djouad, F., Bony, C., Apparailly, F., Louis-Pence, P., Jorgensen, C., & Noël, D. (2006). Earlier onset of syngeneic tumors in the presence of mesenchymal stem cells. *Transplantation*, *82*(8), 1060-1066.
- Djouad, F., Pence, P., Bony, C., Tropel, P., Apparailly, F., Sany, J., Jorgensen, C. (2003). Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood*, *102*(10), 3837-3844.
- Donnelly, L. E., Newton, R., Kennedy, G. E., Fenwick, P. S., Leung, R. H., Ito, K., Barnes, P. J. (2004). Anti-inflammatory effects of resveratrol in lung epithelial cells: molecular mechanisms. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, *287*(4), L774-L783.
- Dorak, M. T. (2007). *Real-time PCR*: Taylor & Francis.
- Duffy, A. M., Bouchier-Hayes, D. J., & Harmey, J. H. (2004). Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Role in Non-Endothelial Cells: Autocrine Signalling by VEGF. *VEGF and Cancer*, 133-144.
- Dufourcq, P., Descamps, B., Tojais, N. F., Leroux, L., Oses, P., Daret, D., Duplaa, C. (2008). Secreted Frizzled-Related Protein-1 Enhances Mesenchymal Stem Cell Function in Angiogenesis and Contributes to Neovessel Maturation. *Stem Cells*, *26*(11), 2991-3001.
- Earl, K., Lightfoot, A., & McArdle, A. (2015). The Impact of a Polyphenol Treatment on TNF- $\alpha$ -Induced Cytokine Release from C2C12 Myotubes. *The FASEB Journal*, *29*(1 Supplement), 913.912.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, *136*(5), E359-E386.



- Fortier, L. A. (2005). Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Vet Surg*, 34(5), 415-423.
- Foster, K. A., Oster, C. G., Mayer, M. M., Avery, M. L., & Audus, K. L. (1998). Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Experimental cell research*, 243(2), 359-366.
- Fremont, L. (2000). Biological effects of resveratrol. *Life sciences*, 66(8), 663-673.
- Galderisi, U., Giordano, A., & Paggi, M. G. (2010). The bad and the good of mesenchymal stem cells in cancer: Boosters of tumor growth and vehicles for targeted delivery of anticancer agents. *World journal of stem cells*, 2(1), 5.
- García-Olmo, D., García-Arranz, M., Herreros, D., Pascual, I., Peiro, C., & Rodríguez-Montes, J. A. (2005). A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Diseases of the colon & rectum*, 48(7), 1416-1423.
- Garvin, S., Öllinger, K., & Dabrosin, C. (2006). Resveratrol induces apoptosis and inhibits angiogenesis in human breast cancer xenografts in vivo. *Cancer letters*, 231(1), 113-122.
- Giordano, A., Galderisi, U., & Marino, I. R. (2007). From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *Journal of cellular physiology*, 211(1), 27-35.
- Glauche, I., Bystrykh, L., Eaves, C., & Roeder, I. (2013). Stem cell clonality — Theoretical concepts, experimental techniques, and clinical challenges. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 50(4), 232-240.
- Gokce, A., Abd Elmageed, Z. Y., Lasker, G. F., Bouljihad, M., Braun, S. E., Kim, H., Hellstrom, W. J. (2015). Intratunical Injection of Genetically Modified Adipose Tissue-Derived Stem Cells with Human Interferon  $\alpha$ -2b for Treatment of Erectile Dysfunction in a Rat Model of Tunica Albuginea Fibrosis. *The journal of sexual medicine*, 12(7), 1533-1544.

- Gu, S., Chen, C., Jiang, X., & Zhang, Z. (2015). Resveratrol synergistically triggers apoptotic cell death with arsenic trioxide via oxidative stress in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Biological trace element research*, 163(1-2), 112-123.
- Hass, R., Kasper, C., Bohm, S., & Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): a comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal*, 9(1), 12.
- Heldring, N., Mäger, I., Wood, M. J., Le Blanc, K., & Andaloussi, S. E. (2015). Therapeutic Potential of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells and Their Extracellular Vesicles. *Human gene therapy*, 26(8), 506-517.
- Holmer, R., Goumas, F. A., Waetzig, G. H., Rose-John, S., & Kalthoff, H. (2014). Interleukin-6: a villain in the drama of pancreatic cancer development and progression. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 13(4), 371-380.
- Hossain, A., Gumin, J., Gao, F., Figueroa, J., Shinojima, N., Takezaki, T., Joyce, C. (2015). Mesenchymal Stem Cells Isolated from Human Gliomas Increase Proliferation and Maintain Stemness of Glioma Stem Cells Through the IL-6/gp130/STAT3 Pathway. *Stem Cells*.
- Houghton, J., Morozov, A., Smirnova, I., & Wang, T. C. (2007). *Stem cells and cancer*. Paper presented at the Seminars in cancer biology.
- Hsu, H.-S., Lin, J.-H., Hsu, T.-W., Su, K., Wang, C.-W., Yang, K.-Y., Hung, S.-C. (2012). Mesenchymal stem cells enhance lung cancer initiation through activation of IL-6/JAK2/STAT3 pathway. *Lung Cancer*, 75(2), 167-177.
- Hsu, Y.-L., Kuo, P.-L., & Lin, C.-C. (2004). Proliferative inhibition, cell-cycle dysregulation, and induction of apoptosis by ursolic acid in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Life sciences*, 75(19), 2303-2316.
- Hui, H., Hu, M., Zhao, X., & Tang, Y. (2011). *Stem Cells: General Features and Characteristics*: INTECH Open Access Publisher.
- Hung, S. C., Pochampally, R. R., Chen, S. C., Hsu, S. C., & Prockop, D. J. (2007). Angiogenic Effects of Human Multipotent Stromal Cell Conditioned Medium Activate the PI3K-Akt Pathway in Hypoxic Endothelial Cells to Inhibit Apoptosis, Increase Survival, and Stimulate Angiogenesis. *Stem Cells*, 25(9), 2363-2370.

- Ignatov, A., Robert, J., Gregory-Evans, C., & Schaller, H. (2006). RANTES stimulates Ca<sup>2+</sup> mobilization and inositol trisphosphate (IP<sub>3</sub>) formation in cells transfected with G protein-coupled receptor 75. *British journal of pharmacology*, 149(5), 490-497.
- Iwamoto, S., Mihara, K., Downing, J. R., Pui, C.-H., & Campana, D. (2007). Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase. *Journal of Clinical Investigation*, 117(4), 1049.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W., Mehta, R. G. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275(5297), 218-220.
- Joe, A. K., Liu, H., Suzui, M., Vural, M. E., Xiao, D., & Weinstein, I. B. (2002). Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. *Clinical Cancer Research*, 8(3), 893-903.
- Jordan, C. T., Guzman, M. L., & Noble, M. (2006). Cancer stem cells. *New England Journal of Medicine*, 355(12), 1253-1261.
- Jotzu, C., Alt, E., Welte, G., Li, J., Hennessy, B. T., Devarajan, E., Song, Y.-H. (2010). Adipose tissue-derived stem cells differentiate into carcinoma-associated fibroblast-like cells under the influence of tumor-derived factors. *Analytical cellular pathology*, 33(2), 61-79.
- Karaşahin, T. (2012). Embriyonik kök hücreler. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 9(1).
- Karnoub, A. E., Dash, A. B., Vo, A. P., Sullivan, A., Brooks, M. W., Bell, G. W., Weinberg, R. A. (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*, 449(7162), 557-563.
- Kassem, M., Kristiansen, M., & Abdallah, B. M. (2004). Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 95(5), 209-214.
- Kim, S., Jin, Y., Choi, Y., & Park, T. (2011). Resveratrol exerts anti-obesity effects via mechanisms involving down-regulation of adipogenic and inflammatory processes in mice. *Biochemical pharmacology*, 81(11), 1343-1351.

- Kim, Y., Lee, W. H., Choi, T. H., Rhee, S.-H., Park, K.-Y., & Choi, Y. H. (2003). Involvement of p21WAF1/CIP1, pRB, Bax and NF- $\kappa$ B in induction of growth arrest and apoptosis by resveratrol in human lung carcinoma A549 cells. *International journal of oncology*, 23(4), 1143-1149.
- Köktürk, N. (2004). Akciğer kanseri moleküler biyolojisi. *Türkiye Klinikleri Journal of Pulmonary Medicine*, 2(3), 177-182.
- Krensky, A. M., & Ahn, Y.-T. (2007). Mechanisms of Disease: regulation of RANTES (CCL5) in renal disease. *Nature clinical practice. Nephrology*, 3(3), 164-170.
- Kumar, V., Tripathi, V. K., Singh, A. K., Lohani, M., & Kuddus, M. (2013). Trans-resveratrol restores the damages induced by organophosphate pesticide-monocrotophos in neuronal cells. *Toxicology international*, 20(1), 48.
- Kurumu, T. C. S. B. T. H. S. (2015) Türkiye kanser istatistikleri. Ankara.
- Kutty, R., Nagineni, C., Samuel, W., Duncan, T., Vijayasarathy, C., Jaworski, C., & Redmond, T. M. (2013). Resveratrol Protects Human Retinal Pigment Epithelial Cells from Inflammatory Insults. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 54(6), 4989.
- Langcake, P., & Pryce, R. (1976). The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiological Plant Pathology*, 9(1), 77-86.
- Li, A. I., Hokugo, A., Jarrahy, R., & Zuk, P. A. (2014). Human Adipose Tissue as a Source of Multipotent Stem Cells *Stem Cells in Aesthetic Procedures* (pp. 67-83): Springer.
- Li, W., Zhou, Y., Yang, J., Zhang, X., Zhang, H., Zhang, T., Wu, H. (2015). Gastric cancer-derived mesenchymal stem cells prompt gastric cancer progression through secretion of interleukin-8. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 34(1), 1-15.
- Lin, G., Yang, R., Banie, L., Wang, G., Ning, H., Li, L. C., Lin, C. S. (2010). Effects of transplantation of adipose tissue-derived stem cells on prostate tumor. *The Prostate*, 70(10), 1066-1073.

- Liu, H., Li, M., Du, L., Yang, P., & Ge, S. (2015). Local administration of stromal cell-derived factor-1 promotes stem cell recruitment and bone regeneration in a rat periodontal bone defect model. *Materials Science and Engineering: C*, 53, 83-94.
- Liu, S., Ginestier, C., Ou, S. J., Clouthier, S. G., Patel, S. H., Monville, F., Kleer, C. G. (2011). Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks. *Cancer research*, 71(2), 614-624.
- Ma, M. H. Y. Y. M. (2012). Totipotent of Stem Cell. *Stem Cell*, 3(4), 1-5.
- Magee, P. J., & Rowland, I. R. (2004). Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. *British Journal of Nutrition*, 91(04), 513-531.
- Matushansky, I., Hernando, E., Socci, N. D., Mills, J. E., Matos, T. A., Edgar, M. A., Cordon-Cardo, C. (2007). Derivation of sarcomas from mesenchymal stem cells via inactivation of the Wnt pathway. *The Journal of clinical investigation*, 117(117 (11)), 3248-3257.
- Mishra, P. J., Mishra, P. J., Humeniuk, R., Medina, D. J., Alexe, G., Mesirov, J. P., Banerjee, D. (2008). Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cancer research*, 68(11), 4331-4339.
- Mueller, M. M., & Fusenig, N. E. (2004). Friends or foes—bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 4(11), 839-849.
- Nakanishi, C., Nagaya, N., Ohnishi, S., Yamahara, K., Takabatake, S., Konno, T., Yamagishi, M. (2011). Gene and protein expression analysis of mesenchymal stem cells derived from rat adipose tissue and bone marrow. *Circulation Journal*, 75(9), 2260-2268.
- Nguyen, T., Tran, E., Nguyen, T. H., Do, P., Huynh, T., & Huynh, H. (2004). The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells. *Carcinogenesis*, 25(5), 647-659.
- Nicolay, N. H., Lopez Perez, R., Debus, J., & Huber, P. E. (2015). Mesenchymal stem cells – A new hope for radiotherapy-induced tissue damage? *Cancer letters*, 366(2), 133-140.

- Özel, H. B., Ozan, E., & Dabak, D. (2008). Embriyonik kök hücreler. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 28(3), 333.
- Parekkadan, B., & Milwid, J. M. (2010). Mesenchymal stem cells as therapeutics. *Annual review of biomedical engineering*, 12, 87.
- Peltz, L., Gomez, J., Marquez, M., Alencastro, F., Atashpanjeh, N., Quang, T., Zhao, Y. (2012). Resveratrol exerts dosage and duration dependent effect on human mesenchymal stem cell development. *PLoS One*, 7(5), e37162.
- Pervaiz, S. (2004). Chemotherapeutic potential of the chemopreventive phytoalexin resveratrol. *Drug resistance updates*, 7(6), 333-344.
- Quante, M., Tu, S. P., Tomita, H., Gonda, T., Wang, S. S., Takashi, S., Betz, K. S. (2011). Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer cell*, 19(2), 257-272.
- Rajasekhar, V. (2014). *Cancer Stem Cells*. Somerset, NJ, USA: John Wiley & Sons, Incorporated.
- Razmkhah, M., Jaberipour, M., Erfani, N., Habibagahi, M., Talei, A.-r., & Ghaderi, A. (2011). Adipose derived stem cells (ASCs) isolated from breast cancer tissue express IL-4, IL-10 and TGF- $\beta$ 1 and upregulate expression of regulatory molecules on T cells: do they protect breast cancer cells from the immune response? *Cellular immunology*, 266(2), 116-122.
- Ren, F., Wang, K., Zhang, T., Jiang, J., Nice, E. C., & Huang, C. (2015). New insights into redox regulation of stem cell self-renewal and differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta (Razmkhah et al.) - General Subjects*, 1850(8), 1518-1526.
- Ren, Z., Wang, J., Zhu, W., Guan, Y., Zou, C., Chen, Z., & Zhang, Y. A. (2011). Spontaneous transformation of adult mesenchymal stem cells from cynomolgus macaques in vitro. *Experimental cell research*, 317(20), 2950-2957.

- Ren, Z., Zhang, Y. A., & Chen, Z. (2012). Spontaneous transformation of cynomolgus mesenchymal stem cells in vitro: further confirmation by short tandem repeat analysis. *Experimental cell research, 318*(5), 435-440.
- Repetto, G., del Peso, A., & Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature protocols, 3*(7), 1125-1131.
- Scherzad, A., Steber, M., Gehrke, T., Rak, K., Froelich, K., Schendzielorz, P., Hackenberg, S. (2015). Human mesenchymal stem cells enhance cancer cell proliferation via IL-6 secretion and activation of ERK1/2. *International journal of oncology, 47*(1), 391-397.
- Serrero, G., & Lu, R. (2001). Effect of resveratrol on the expression of autocrine growth modulators in human breast cancer cells. *Antioxidants and Redox Signaling, 3*(6), 969-979.
- Shah, K. (2012). Mesenchymal stem cells engineered for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev, 64*(8), 739-748.
- Shenghui, H., Nakada, D., & Morrison, S. J. (2009). Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annual Review of Cell and Developmental, 25*, 377-406.
- Soleas, G. J., Diamandis, E. P., & Goldberg, D. M. (1997). Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clinical biochemistry, 30*(2), 91-113.
- Stojanović, S., Sprinz, H., & Brede, O. (2001). Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics, 391*(1), 79-89.
- Studený, M., Marini, F. C., Champlin, R. E., Zompetta, C., Fidler, I. J., & Andreeff, M. (2002). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon- $\beta$  delivery into tumors. *Cancer research, 62*(13), 3603-3608.
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *cell, 126*(4), 663-676.

- Tao, K., Bai, X., Jia, W., Liu, Y., Zhu, X., Han, J., Hu, D. (2015). Effects of Resveratrol on the Treatment of Inflammatory Response Induced by Severe Burn. *Inflammation*, 38(3), 1273-1280.
- Tolar, J., Nauta, A. J., Osborn, M. J., Panoskaltsis Mortari, A., McElmurry, R. T., Bell, S., Schroeder, T. M. (2007). Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 25(2), 371-379.
- Torsvik, A., & Bjerkvig, R. (2013). Mesenchymal stem cell signaling in cancer progression. *Cancer treatment reviews*, 39(2), 180-188.
- Trounson, A., & McDonald, C. (2015). Stem cell therapies in clinical trials: progress and challenges. *Cell Stem Cell*, 17(1), 11-22.
- Tsai, K. S., Yang, S. H., Lei, Y. P., Tsai, C. C., Chen, H. W., Hsu, C. Y., Chiou, S. H. (2011). Mesenchymal stem cells promote formation of colorectal tumors in mice. *Gastroenterology*, 141(3), 1046-1056.
- Tung, B. T., Rodríguez-Bies, E., Talero, E., Gamero-Estévez, E., Motilva, V., Navas, P., & López-Lluch, G. (2015). Anti-inflammatory effect of resveratrol in old mice liver. *Experimental gerontology*, 64, 1-7.
- Turgeman, G. (2015). The therapeutic potential of mesenchymal stem cell in Alzheimer's disease: converging mechanisms. *Neural Regeneration Research*, 10(5), 698.
- Ural, A. U. (2006). Hematopoetik Kök Hücre. *Turkiye Klinikleri Journal of Surgical Medical Sciences*, 2(43), 5.
- Wang, S., Qu, X., & Zhao, R. C. (2012). Clinical applications of mesenchymal stem cells. *J Hematol Oncol*, 5(1), 19.
- Wang, Z., Dabrosin, C., Yin, X., Fuster, M. M., Arreola, A., Rathmell, W. K., Ribatti, D. (2015). *Broad targeting of angiogenesis for cancer prevention and therapy*. Paper presented at the Seminars in Cancer Biology.
- Wei, X., Yang, X., Han, Z.-p., Qu, F.-f., Shao, L., & Shi, Y.-f. (2013). Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34(6), 747-754.
- Wild, B. S. a. C. P. (2015). *World cancer report* (Vol. 57): IARC press Lyon.



- Woodman, R., Erickson, R., Rae, J., Jaffe, H., & Curnutte, J. (1992). Prolonged recombinant interferon-gamma therapy in chronic granulomatous disease: evidence against enhanced neutrophil oxidase activity. *Blood*, 79(6), 1558-1562.
- Xu, W.-t., Bian, Z.-y., Fan, Q.-m., Li, G., & Tang, T.-t. (2009). Human mesenchymal stem cells (hMSCs) target osteosarcoma and promote its growth and pulmonary metastasis. *Cancer letters*, 281(1), 32-41.
- Yao, W., Hu, Q., Ma, Y., Xiong, W., Wu, T., Cao, J., & Wu, D. (2015). Human adipose-derived mesenchymal stem cells repair cisplatin-induced acute kidney injury through antiapoptotic pathways. *Experimental and Therapeutic Medicine*.
- Yu, H.-B., Zhang, H.-F., Zhang, X., Li, D.-Y., Xue, H.-Z., Pan, C.-E., & Zhao, S.-H. (2009). Resveratrol inhibits VEGF expression of human hepatocellular carcinoma cells through a NF-kappa B-mediated mechanism. *Hepato-gastroenterology*, 57(102-103), 1241-1246.
- Yu, Z., Pestell, T. G., Lisanti, M. P., & Pestell, R. G. (2012). Cancer stem cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44(12), 2144-2151.
- Zhao, D., Pan, C., Sun, J., Gilbert, C., Drews-Elger, K., Azzam, D. J., Slingerland, J. M. (2015). VEGF drives cancer-initiating stem cells through VEGFR-2/Stat3 signaling to upregulate Myc and Sox2. *Oncogene*, 34(24), 3107-3119.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Hedrick, M. H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell*, 13(12), 4279-4295.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

### Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Erhan Şahin  
Doğum tarihi ve yeri : 23.04.1985 Kırşehir  
Uyruğu : T.C.  
Medeni durumu : Evli  
İletişim adresleri : Büyükdere Mah. Ermutlu Sok. 8/13  
Odunpazarı Eskişehir

### Eğitim Durumu:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji Bölümü	Hacettepe Üniversitesi	2007
Y. Lisans	Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Gazi Üniversitesi	2011
Doktora/S.Yeterlik/ Tıpta Uzmanlık	Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi	-

### Mesleki Deneyim:

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Araş.Gör.	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	2011-

### Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar:

Türk Histoloji Embriyoloji Derneği, 2011-

## **Yayınlar**

- 1.Erhan Sahin, Celal Ilgaz, Deniz Erdoğan, Gülnur Take, Güleser Göktas (2014). Protective effects of Resveratrol against Di-n Buthyl Phthalate (DBP) induced toxicity in Ductus Epididymis and Ductus Deferens in rats. Indian Journal of Pharmacology. Year : 2014 | Volume : 46 | Issue : 1 | Page : 51-56
- 2.Bektur, N. E., Sahin, E., Baycu, C., & Unver, G. (2013). Protective effects of silymarin against acetaminophen-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in mice. Toxicology and industrial health, 0748233713502841.
- 3.Ünal, S. G., Take, G., Erdoğan, D., Göktas, G., & Sahin, E. (2013). The effect of di-n-butyl phthalate on testis and the potential protective effects of resveratrol. Toxicology and industrial health, 0748233713512364.
- 4.Burukoglu, D., Baycu, C., Taplamacioglu, F., Sahin, E., & Bektur, E. (2014). Effects of nonsteroidal anti-inflammatory meloxicam on stomach, kidney, and liver of rats. Toxicology and industrial health, 0748233714538484.

## **Bilimsel Etkinlikler**

Burslar:

- 1.TÜBA-1. Kök Hücre Üretiminde Yeni Teknikler Kursu, 2014

Ödüller:

Projeler:

1. Deneysel Olarak Oluşturulmuş Hipotiroid, Hipertiroid ve ötroid Modellerinde Miyokardiyal Yağ Asidi Metabolizması ile İnflamasyon, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri, Proje No: 201411026, Yardımcı Araştırmacı (Devam Ediyor).

2. Sıçanlarda Vazospazm Çözücü İlaçların Etkilerinin Deneysel Nöroendovasküler Yöntemler Kullanılarak Karotid Arter üzerinde Gösterilmesi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri, Proje No: 201411035, Yardımcı Araştırmacı (Devam Ediyor).
3. Sıçanlarda Siyatik Sinir Yaralanması Sonrası, Gabapentin ve Genisteinin Nöroprotektif Etkilerinin Araştırılması, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri, Proje No: 201411031, Yardımcı Araştırmacı (Devam Ediyor).
4. A549 Kanser Hücreleri (İnsan Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanser Hücresi) Üzerinde Resveratrol İle Muamele Edilmiş Yağ Doku Kaynaklı Mezenşimal Kök Hücre Sitokinlerinin Etkileri, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri, Proje No: 201411038, Yardımcı Araştırmacı (Devam Ediyor).
5. Diyabetik Nöropatide Mirtazapin'in Omurilik ve Arka Kök Gangliyonlarında Bulunan İyon Kanalları ve Nöropeptidler Üzerine Etkisi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri, Proje No: 201411D18, Yardımcı Araştırmacı (Devam Ediyor).
6. Karadutun (Morus Nigra) Sıçanlarda 5-Fluorouracil ile Oluşturulan Oral Mukozit Üzerine Etkisi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri, Proje No: 201442044, Yardımcı Araştırmacı (Devam Ediyor).

Sözlü Konferans veya Seminerler:

Kurslar ve Eğitim Programları:

1. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Moleküler Biyoloji üzerine 15 günlük Kurs ve Staj. 2013
2. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası.
3. Embriyoloji Laboratuvar Sorumlusu sertifikası.