

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNERLÖKİN-2 İLE UYARILMIŞ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN
ANAPLASTİK TİROİD KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNE SİTOTOKSİK
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Bulut YURTSEVER

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı için Öngördüğü

BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

KOCAELİ

2018



T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNERLÖKİN-2 İLE UYARILMIŞ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN
ANAPLASTİK TİROİD KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNE SİTOTOKSİK
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Bulut YURTSEVER

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı için Öngördüğü

BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Gülçin GACAR

T.C.
Kocaeli Üniversitesi

Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Onay Belge No: KÜ GOKAEK
2016/21.1

KOCAELİ

2018

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

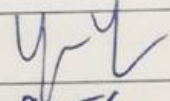
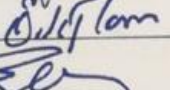
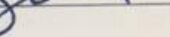
Tez adı: İnterlökin-2 ile Uyarılmış Mezenkimal Kök Hücrelerin
Anaplastik Tiroid Kanseri Hücreleri Üzerine Sitotoksik
Etkilerinin İncelenmesi

Tez yazarı: Bulut Yurtsever

Tez savunma tarihi: 06/06/2018

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi

İş bu çalışma Jürimiz tarafındanAnabilim
Dalı.....tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı jüri üyeleri		İmzası
Ünvanı	Adı Soyadı	
Üye	Doc. Dr. Yusufhan Yazar	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Özlem Sevilcan Ucar	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Gülcan Çacır	

ONAY

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

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

Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ

Enstitü Müdürü

ÖZET

Amaç: Hücrelerin bölünme faaliyetleri sırasında meydana gelen hataların ve mutasyonların etkileri sonucu, kontrolsüz hücre bölünmesi olarak adlandırılan, hücrelerin kanserleşme süreçlerine karşı onlarca yıldır yapılan çalışmalarda geliştirilen stratejiler genel olarak cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, hedeflenmiş tedaviler olarak gösterilebilir. Bu stratejilere ek olarak hücresel temelli immünoterapi stratejisi son yıllarda öne çıkmayı başarmıştır. İmmün sistemi düzenleme ve modüle etme özellikleri, mezenkimal kök hücrelerin kansere karşı kullanımını olanaklı hale getirmiştir. İmmün sistemi düzenleyen bir başka mekanizma da sitokinlerin etkileridir. İnterlökin ailesinin immün sistem hücreleri üzerine olan etkilerinden biri hücrelerin çoğalmasını ve uyarılmasını sağlamaktır. Bu bağlamda İnterlökin-2 sitokini mezenkimal kök hücreleri uyarmak ve kanser hücrelerini öldürmek amacıyla kullanılmıştır. Bu çalışmada, mezenkimal kök hücrelerin tek başlarına ve sitokin ile birlikte kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin incelenmesi amaçlanmaktadır.

Yöntem: Bu çalışmada, insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler kültüre alınıp çoğaltılmıştır. Hücreler 3.pasaja kadar çoğaltıldıktan sonra karakterizasyonları yapılmıştır. Anaplastik tiroid kanseri hücreleri olan CAL62 tümör hücre hattı ile ko-kültüre edilmiştir. Mezenkimal kök hücrelerin tümör hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin anlaşılabilmesi için sitokinli ve sitokinsiz olarak ayrı ayrı gruplar oluşturularak ko-kültür düzenekleri kurulmuştur. Sitokinin etkilerinin zamana bağlı olarak nasıl bir etki gösterdiğinin anlaşılabilmesi için ölçümler 24., 48. ve 72. saatler baz alınarak yapılmıştır. Mezenkimal kök hücrelerin CAL62 anaplastik tiroid kanseri hücreleri üzerine sitotoksik ve antiproliferatif etkilerinin incelenebilmesi için WST-I ve ELIZA (ELİSA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) analizleri yapılmıştır. Kanser hücrelerinin ko-kültür sonrası hücre siklusundaki değişimler akım sitometrik analizler ile incelenmiştir. MKH'lerin ve CAL62 anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin yüzey belirteçleri akım sitometrik analizler ile incelenmiştir. CAL62 hücrelerinin ko-kültür öncesi ve sonrası telomeraz enzim aktivitesindeki değişimler TRAP (Telomerase Repeated Amplification Protocol) yöntemi ile incelenmiştir. Ayrıca MKH'lerin ve CAL62 hücrelerinin gen ekspresyon seviyeleri Gerçek zamanlı polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile incelenmiştir.

Bulgular: Analizler sonucunda, mezenkimal kök hücrelerin tek başlarına ve sitokin ile birlikte kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin olduğu gözlemlenmiştir. Gruplar arasındaki farklar incelendiğinde, mezenkimal kök hücrelerin sitokin ile birlikte ve direkt ko-kültür olarak kullanıldığında en etkili sonuçların elde edildiği gözlemlenmiştir.

Sonuç: Analizlerin sonuçlarına göre, İnterlökin-2 sitokininin mezenkimal kök hücrelerin uyarılmasını sağladığı ve CAL62 anaplastik tiroid kanseri hücreleri üzerine sitotoksik etki oluşturduğu görülmüştür. Ayrıca direkt ko-kültürün, indirekt ko-kültüre göre antiproliferatif etkilerin gözlemlenmesi bakımından daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Mezenkimal Kök Hücre, İnterlökin-2, Direkt ve İndirekt Ko-kültür, Sitotoksik etki, CAL62 anaplastik tiroid kanseri hücresi

ABSTRACT

Objective: Strategies developed during decades of studies on cancer cell proliferation, which are termed as uncontrolled cell division, are generally referred to as surgery, radiotherapy, chemotherapy, targeted therapies. In addition to these strategies, the strategy of cell-based immunotherapy has come to the forefront in recent years. Modulation and modulating properties of the immune system have made possible the use of mesenchymal stem cells against cancer. Another mechanism that regulates the immune system is the effects of cytokines. One of the effects of the interleukin family on the immune system cells is to proliferate and stimulate the cells. In this context, Interleukin-2 cytokines have been used to stimulate mesenchymal stem cells and kill cancer cells. In this study, the cytotoxic effects of mesenchymal stem cells alone and on cytokines and cancer cells are investigated.

Method: In this study, human bone marrow derived mesenchymal stem cells were cultured and multiplied. After the cells were amplified to the 3rd passage, characterization was made. The CAL62, anaplastic thyroid cancer cells, was co-cultured with the tumor cell line. In order to understand the cytotoxic effects of mesenchymal stem cells on tumor cells, co-culture systems have been established by creating separate groups with cytokines and without cytokines. The measurements were based on 24, 48 and 72 hours so that the effects of cytokine were affected by time. WST-I and ELISA analyzes were performed to examine the cytotoxic and antiproliferative effects of mesenchymal stem cells on CAL62 anaplastic thyroid cancer cells. Changes in cell cycle of cancer cells after co-culture were examined by flow cytometric analysis. Surface markers of MSCs and CAL62 anaplastic thyroid cancer cells were examined by flow cytometric analysis. Changes in telomerase enzyme activity of CAL62 cells before and after co-culture were examined by TRAP (Telomerase Repeated Amplification Protocol) method. In addition, gene expression levels of MSCs and CAL62 cells were examined by RT-PCR (Gerçek zamanlı PCR).

Results: As a result of the analyzes, it has been observed that cytotoxic induction of mesenchymal stem cells alone and in combination with cytokines on cancer cells has been observed. When the differences between the groups were examined, it was observed that mesenchymal stem cells had the most effective results with cytokine and direct co-culture.

Conclusion: According to the results of the analyzes, Interleukin-2 cytokine induces mesenchymal stem cells and CAL62 cytotoxic effect on the cells of anaplastic thyroid cancer. It has also been concluded that direct co-cultures are more effective in observing cytotoxic effects than indirect co-cultures.

Key words: Mesenchymal Stem Cell, Interleukin-2, Direct and Indirect Co-cultures, Cytotoxic effect, CAL62 anaplastic thyroid cancer cell



TEŞEKKÜR

Birçok insanın yardımı ve desteğiyle yüksek lisans tezimi tamamlamış bulunmaktayım. Bu süreçte öncelikle öğrencisi olmaktan mutluluk ve onur duyduğum, bilgi birikimi ve sabrıyla her zaman yanımda olan ve KÖGEM ailesine katılma ayrıcalığını tanıdığı için her zaman müteşekkir kalacağım çok değerli bilim insanı hocam sayın Doç. Dr. Yusufhan YAZIR'a, tezimin en başından en sonuna her aşamasında bilgisini ve ilgisini esirgemeyen, verdiği güven duygusuyla ve sevgi dolu kalbiyle en zor anlarımda dahi çalışma azmimi arttıran ve tezimin gerçekleşmesini sağlayan çok değerli hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Gülçin GACAR'a sonsuz saygı ve sevgilerimi sunarım.

Olağanüstü pozitifliliği, güler yüzlülüğü ve karşılığını asla ödeyemeyeceğim özverisiyle sadece bir bilim insanı olarak değil, insan olarak da örnek alınası çok değerli hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Zehra Seda HALBUTOĞULLARI'na ve bitmez tükenmez öğrenme ve öğretme enerjisi, özdisiplini ve cömertliliğiyle tanımaktan mutluluk duyduğum hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Gökhan DURUKSU'ya teşekkürlerimi sunarım.

İnce düşünceliliği ve bilimsel birikimiyle tüm yoğunluğu içerisinde deneylerimi gerçekleştirmemde olağanüstü emeği geçen değerli arkadaşım Sema YUSUFOĞLU'na, hayatıma girdikleri için her daim müteşekkir olacağım, varlıklarıyla dostluğun ne demek olduğunu hissettiren, sevgi dolu arkadaşlarım Leyla KAYIŞ'e, Selen POLAT'a, Ayşenur KAYA'ya, Nur Ekimci GÜRCAN'a ve Kamil Can KILIÇ'a şükranlarımı sunarım.

Herhangi bir probleme karşı onlarca farklı çözüm yolu bulabilen yaratıcı zekası ve samimiyetiyle tüm desteğini arkamda hissettiren ve ufkumu açan çok değerli hocam sayın Prof. Dr. Ercüment OVALI'ya, her türlü zorluğu kolaylaştıran, yaşamıma girdikleri için şanslı hissettiğim Fatma EYÜBOĞLU ÜNÜVAR'a, Muhammet YILANCI'ya ve Derya DİLEK KANCAĞI'ya ne kadar teşekkür etsem azdır.

Eğitim hayatımın her aşamasında dokunuşlarıyla iz bırakan ve ilkleri yaşatan, özgeci ruhuyla tanıdığım sevgili halam Veda YURTSEVER'e, yaşadığı tüm zorluklara rağmen en zor anlarımda yanımda olan, yol gösteren, azmini örnek aldığım şefkat dolu sevgili dayım Ahmet YURTSEVER'e, varlıklarıyla düşünsel hayatıma zenginlik katan Halil Han AKTAŞ'a, Bengi Artuk'a, Ozan Utku ARTUK'a, Umut Alagül'e ve Gökmen TÜRKSÖY'a sonsuz teşekkürler.

Son olarak, şartsız koşulsuz ve sonsuz bir sevgi sunan, ailevi tüm dayatmalardan kaçınan, bir insan ömrü kadar az bir vakit aralığında onlarla yaşayabileceğim gerçeğinin bilincinde olarak her zaman kıymetlerini bilmeye çalıştığım canım babam Mehmet Metin YURTSEVER'e, canım annem Songül YURTSEVER'e ve biricik kardeşim Hazal ALAGÜL'e sonsuz sevgiyle teşekkür ederim.

Tez çalışmamı her zaman tebessümle hatırlayacağım babaannem Lütfiye YURTSEVER'e adıyorum.



TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ

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

..... / / 2018

Bulut YURTSEVER

İmza

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
ÇİZİMLER DİZİNİ.....	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Kök Hücreler	3
1.1.1. Kök Hücrelerin Sınıflandırılması	4
<i>b)Pluripotent Kök Hücreler:</i>	4
<i>c)Multipotent kök hücreler</i>	5
<i>d)Oligopotent kök hücreler:</i>	5
<i>e)Unipotent kök hücreler:</i>	5
1.1.2. Mezenkimal Kök Hücreler	7
1.2.Tiroid Dokusu	8
1.2.1. Tiroid Kanseri ve Tipleri.....	9
1.2.1.1. <i>Farklılaşmış tiroid kanserleri:</i>	10
1.2.1.1.1. <i>Papiller kanser:</i>	10
1.2.1.1.2. <i>Medüller tiroid kanseri (MTK):</i>	10
1.2.1.1.2.1. <i>Sporadik (MTK):</i>	10
1.2.1.2. <i>Anaplastik (farklılaşmamış) tiroid kanseri</i>	11
1.3. İnterlökin-2.....	11
2. AMAÇ.....	12
3. YÖNTEM.....	13
3.1. İnsan Kemik İliği Materyalinden MKH Kültürü ve Karakterizasyonu	13
3.1.1. MKH'lerin Kültürü ve Pasajı	13
3.1.2. İKİ-MKH Karakterizasyon Çalışması	13
3.1.2.1. Akım sitometri cihazı ile İKİ-MKH karakterizasyonu	13
3.1.2.2. Farklılaştırma analizleri.....	13
3.1.2.2.1. <i>Adipojenik farklılaştırma</i>	14
3.1.2.2.2. <i>Osteojenik farklılaştırma</i>	14
3.2. CAL62 (Anaplastik Tiroid Kanseri Hücre Hattı) Kültürü ve Karakterizasyonu.....	14
3.2.1. CAL62 kültürü	14

3.2.2. Akım sitometri cihazı ile CAL62 hücre hattının karakterizasyonu.....	15
3.3.Hücrelerin Ortak Kültürü ve Etkileşimlerinin İncelenmesi	15
3.3.1. Deney gruplarının oluşturulması	15
3.3.2. IL-2 ile uyarılmış MKH'lerin CAL62 hücreleri ile direkt ve indirekt ko-kültürü	16
3.3.3. Uyarılmamış MKH'lerin CAL62 hücreleri ile direkt ve indirekt ko-kültürü.....	16
3.4. CAL62 Hücrelerinin Canlılık ve Çoğalım Testleri	17
3.4.1. Hücre Döngüsü Analizi.....	17
3.4.2. Canlılık testi (WST-1).....	17
3.4.3. IL-2 eklentili ve eklentisiz grupların kültür besiyerine salgılanan sitokinlerin ELISA testi ile analizi	17
3.5. Gerçek zamanlı PZR gen ekspresyon analizi	18
3.6. CAL62 hücrelerinde telomeraz aktivitesinde meydana gelen değişimin ölçülmesi	18
3.7. İstatiksel analiz.....	18
4. BULGULAR.....	20
4.1. MKH ve CAL62 kültürü	20
4.2. MKH'lerin Akım Sitometri Cihazı ile Karakterizasyonu.....	21
4.2.1. MKH'lerin ko-kültür Öncesi Akım Sitometri Cihazı ile Karakterizasyonu	22
4.3. MKH'lerin Farklılaştırılması.....	22
4.3.1. Adipojenik Farklılaşma	22
4.3.2. Osteojenik Farklılaşma.....	23
4.4. CAL62 Hücre Hattının Akım Sitometri Cihazı ile Karakterizasyonu.....	24
4.5. Hücre Döngüsü Analizi	25
4.6. Canlılık Testi (WST-1).....	25
4.7. ELISA Analizi	27
4.8. Telomeraz aktivite tayini.....	29
4.9. Ko-kültür Öncesi ve Sonrası CAL62 Hücrelerinin Akım Sitometrik Analizi.....	30
4.10. Gerçek zamanlı PZR ile Gen Ekspresyon Analizi.....	31
4.10.1. CAL62 ve MKH Kontrol Gruplarına Göre Gerçek zamanlı PZR Analizi	31
5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	45
KAYNAKÇALAR DİZİNİ.....	46
EKLER.....	50

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

iKİ-MKH: İnsan Kemik İliği Kaynaklı-Mezenkimal Kök Hücre

IL: İnterlökin

iPKH: İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

IFN γ : İnterferon gama

TNF α : Tümör öldürücü faktör alfa

ÇİZİMLER DİZİNİ

Çizim 1.1 Tiroid bezi	9
Çizim 4.1 iKİ-MKH'lerin ışık mikroskop görüntüleri. Ölçüm çubuğu: 500 µm.....	21
Çizim 4.2 CAL62 hücrelerinin ışık mikroskop görüntüleri. Ölçüm çubuğu: 500 µm	21
Çizim 4.3 MKH'lerin akım sitometri ile karakterizasyonu	22
4.4 Adipojenik farklılaşmaya yönlendirilen MKH'lerin Oil Red O boyanması. Ölçüm çubuğu: 100 µm	23
Çizim 4.5 Osteojenik farklılaşmaya yönlendirilen MKH'lerin Alizarin Red S boyanması. Ölçüm çubuğu: 100 µm	24
Çizim 4.6 CAL62 hücre hattının akım sitometri ile karakterizasyonu	25
Çizim 4.7 CAL62 hücrelerinin MKH'ler ile 24 saatlik ko-kültürü sonucunda yapılan WST-1 testi ile proliferasyon durumlarının belirlenmesi.	26
Çizim 4.8 CAL62 hücrelerinin MKH'ler ile 48 saatlik ko-kültürü sonucunda yapılan WST-1 testi ile proliferasyon durumlarının belirlenmesi	26
Çizim 4.9 CAL62 hücrelerinin MKH'ler ile 72 saatlik ko-kültürü sonucunda yapılan WST-1 testi ile proliferasyon durumlarının belirlenmesi	27
Çizim 4.10: Kültür ortamına salınan IFN γ 'nın Eliza yöntemi ile miktar tayini (pg/ml)	27
Çizim 4.11: Kültür ortamına salınan IL-4 'ün Eliza yöntemi ile miktar tayini (pg/ml).....	28
Çizim 4.12: Kültür ortamına salınan TNF 'in Eliza yöntemi ile miktar tayini (pg/ml)	29
Çizim 4.13 Ko-kültür öncesi CAL62 hücrelerinin karakterizasyonu	30
Çizim 4.14: TGF β gen ifadesinin gerçek zamanlı PZR ile analizi	31
Çizim 4.15: IFN γ gen ifadesinin gerçek zamanlı PZR ile analizi.	31
Çizim 4.16: CASP3 gen ifadesinin gerçek zamanlı PZR ile analizi.	32
Çizim 4.17: CASP7 gen ifadesinin gerçek zamanlı PZR ile analizi.....	32
Çizim 4.18 CASP8 gen ifadesinin gerçek zamanlı PZR ile analizi.	33
Çizim 4.19 IL10 gen ifadesinin gerçek zamanlı PZR ile analizi.....	33
Çizim 4.20 IL1 β gen ifadesinin gerçek zamanlı PZR ile analizi.....	34
Çizim 4.21 IL6 gen ifadesinin gerçek zamanlı PZR ile analizi.....	34
Çizim 4.22 CAL62 kontrol gruplarına göre TGF β gen ifadesinin gerçek zamanlı PZR ile analizi. 35	
Çizim 4.23 CAL62 kontrol gruplarına göre IFN γ gen ifadesinin gerçek zamanlı PZR ile analizi. . 36	
Çizim 4.24 CAL62 kontrol gruplarına göre CASP3 gen ifadesinin gerçek zamanlı PZR ile analizi. 36	
Çizim 4.25 CAL62 kontrol gruplarına göre CASP7 gen ifadesinin gerçek zamanlı PZR ile analizi. 37	
Çizim 4.26 CAL62 kontrol gruplarına göre CASP8 gen ifadesinin gerçek zamanlı PZR ile analizi. 37	
Çizim 4.27 CAL62 kontrol gruplarına göre IL10 gen ifadesinin gerçek zamanlı PZR ile analizi. ... 38	
Çizim 4.28 CAL62 kontrol gruplarına göre IL1 β gen ifadesinin gerçek zamanlı PZR ile analizi... 38	
Çizim 4.29 CAL62 kontrol gruplarına göre IL6 gen ifadesinin gerçek zamanlı PZR ile analizi. 39	

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Hücre bölünme çeşitleri	4
Çizelge 3.1 Deney ve kontrol grupları	15
Çizelge 4.1 Ko-kültür öncesi ve sonrası CAL62 hücrelerinin hücre döngüsü	25
Çizelge 4.2 Telomeraz aktivitesi ölçüm sonucu.	30



1. GİRİŞ

Kanser her yıl dünya çapında milyonlarca insanın hayatını kaybetmesine neden olmaktadır. Yüksek ölüm oranları nedeniyle bilim dünyasında üzerine en çok araştırma yapılan hastalıkların içerisinde yer almaktadır. Birçok tipinin olması ve kişiden kişiye oluşan farklılıklardan dolayı kapsayıcı bir tedavinin geliştirilmesi güçleşmektedir.

Hücrelerin doğal bir davranışı olan hücre bölünmesi, hücrelerin çoğalması, yenilenmesi ve dokuların onarımı; canlılığın sürdürülmesi için gereklidir. Hücrelerin bölünme süreci, moleküler ve hücresele düzeyde sıkı bir denetimden geçilerek yapılmaktadır. Ancak nadir de olsa bazen bu denetim mekanizmalarında meydana gelen aksaklıklardan dolayı tümör hücreleri oluşabilmektedir. Oluşan bu tümörler yayılmadan tek bir kitle içinde durdukları zaman iyi huylu tümör (benign) olarak adlandırılırlar ve cerrahi müdahale ile alınarak çoğu zaman kesin tedavisi gerçekleştirilebilmektedir. Ancak bu tümör hücreleri çevre dokulara yayılabilme yeteneğini kazanmışsa o zaman kötü huylu (malign) olarak adlandırılırlar ki buna kanser denilmektedir.

Kanser hücrelerinin davranışlarının karmaşıklığına ve çeşitliliğine rağmen oluşum mekanizmaları temelde 2 ana mekanizmayla açıklanabilmektedir. Her iki mekanizma da DNA (Deoksiribo Nükleik Asit) ile ilişkilidir. (1) Pro-onkogen olarak adlandırılan gen grubunda meydana gelen mutasyonlar tümör hücrelerinin çoğalma gücünde ve hızında artışa neden olabilir. Bu durumda hücreler normalden daha hızlı bir şekilde çoğalabilmektedir. (2) Hücreleri bölünmeleri sırasında kontrol eden ve gardiyan genler olarak da bilinen tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar, hücrelerin kontrol edilemeden çoğalmasına ve hataların yeni oluşan hücelere düzeltilemeden geçmesine neden olmaktadır. Bu iki mekanizma sonucu tümör hücreleri kanserleşmektedir. DNA'da Hücrelerin kanserleşme sürecinin önündeki ilk engel hasar gören ve mutasyona uğrayan DNA dizisinin tamir edilmesidir. DNA tamir mekanizmaları, DNA'da meydana gelen hasarın onarılabilmesi için G1-S kontrol noktası devreye girer ve hücreyi G1 fazında durdurarak hasar tamiri için hücreye zaman kazandırır. Hasar onarılabilecek durumda değilse, tümör baskılayıcı p53 proteini hücreyi programlı hücre ölümü olarak adlandırılan apoptozis sürecine götürür. Ancak p53 geni allellerinde mutasyon varsa hasar onarılamaz ve DNA hatalı olarak replikasyon geçirir. G1-S kontrolünde herhangi bir sorun olmadan

DNA doğru replike olsa bile S fazında replikasyon sırasında DNA'da mutasyon meydana gelebilir. Bu durumda S-G2 kontrol noktası devreye girerek hücrenin G2 fazını tamamlayıp mitoz fazında geçmesini engeller. Yani hücre hem replikasyon öncesi hem de replikasyon sonrası DNA'da meydana gelen hasarları, kontrol noktaları aracılığıyla durdurur ve hücrenin genetik kararlılığını korur. Tümör baskılayıcı genler mutasyonla çalışamaz hale geldiğinde, genetik olarak hatalı hücre soyları meydana gelir. Bu durumda tümör hücrelerinin yok edilmesi için immün sistem devreye girer ve tümör hücresi öldürülür. Çoğu zaman bu engelleme mekanizmaları başarılı olmaktadır ancak nadir de olsa kanserleşme süreci organizma tarafından durdurulamamaktadır.

Kanser hücreleri köken aldıkları hücre ve doku tipine göre 3 temel sınıfa ayrılırlar. (1) Epitel hücrelerden köken alarak oluşan "karsinomlar" (2) bağ dokusu ya da kas hücrelerinden köken alan "sarkomlar" olarak adlandırılırlar. (3) Kan ve immün sisteme ait hücrelerin malignan türü olan kan kanseri "lenfoma" olarak adlandırılır.

Tiroid bezi, boynun alt kısmında bulunan kelebek şeklinde bir endokrin bezdir. Tiroid bezinden salgılanan hormonlar önce kana salgılanır, ardından tüm dokulara ulaşır. Tiroid bezinden salgılanan hormonlar, vücudun enerjisiyi kullanabilmesine, ısı dengesinin oluşturabilmesine ve diğer organların doğru çalışmasına yardımcı olur.

Vücut için hayati öneme sahip hormonların salgılandığı tiroid bezinin kanserleşmesi hastaların hayatlarını sürdürebilme olanaklarını kısıtlamaktadır. Tiroid kanserinin oluşmasına neden olan faktörler arasında en çok radyasyona maruz kalma ön plana çıkmaktadır.

Kanser tedavisinde hücresel tedavi temelli yaklaşımlar günden güne artmaktadır. Kanser hücresel tedavisinde kök hücrelerin kullanıldığı ve başarının sağlandığı birçok çalışma yapılmıştır. Kök hücrelerin immün sistem hücrelerini düzenleyebilme ve immün sistem hücreleri gibi davranabilme yetenekleri kanser tedavisinde kök hücreleri avantajlı bir konuma taşımıştır.

Multipotent stromal kök hücreler olan mezenkimal kök hücreler, adiposit, kondrosit, osteoblast ve miyosit gibi birçok hücre tipine farklılaşabilme potansiyeline sahiptir. Mezenkimal kök hücreler, farklılaşabilme kapasitelerinin yanında immünmodülatör etkilere de sahiptir. Mezenkimal kök hücrelerle yapılan çalışmalarda

interlökin sitokinleri ile uyarıldıklarında kanser hücreleri üzerine sitotoksik etki gösterdikleri gözlemlenmiştir.(Kang 2005) ,(Kang 2007).

İnterlökin-2 proteini, bir çeşit sitokin olan interlökin ailesinin bir üyesidir. Aktif T lenfositler tarafından salgılanır. İmmün sistem hücrelerini aktif hale getirebilir. 1990'lı yıllarda FDA'dan onay olarak böbrek ve deri kanserlerinde ilaç olarak kullanılmaya başlanmıştır. Hücrelerin İnterlökin-2 reseptörüne bağlanarak aktif hale getirir.

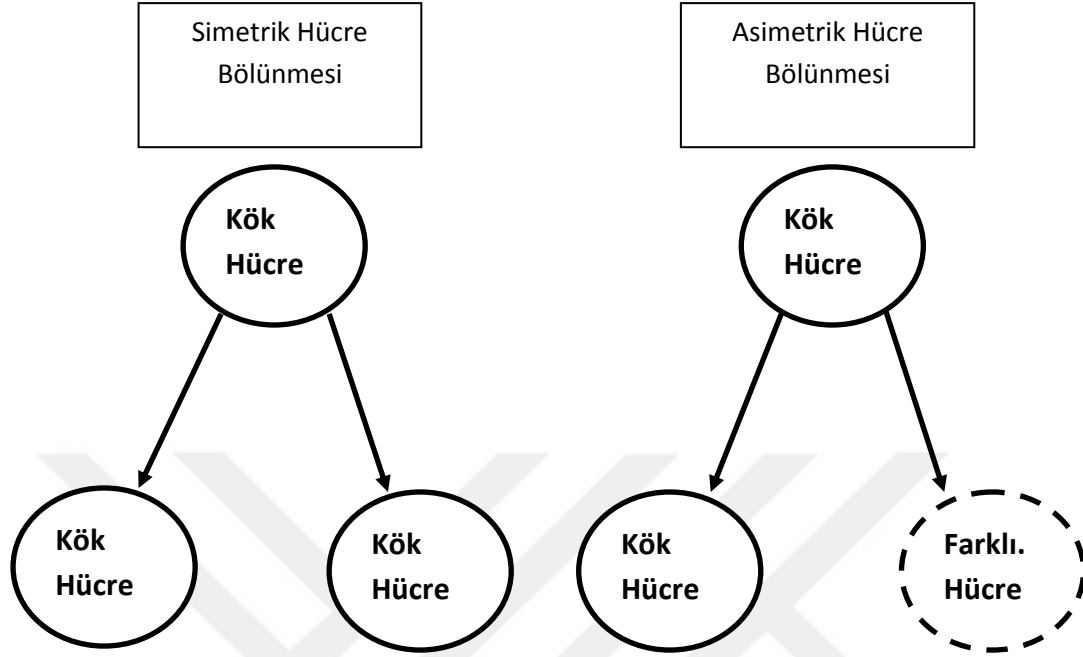
Bu çalışmada tiroid kanseri türlerinin en agresif tipi olan anaplastik tiroid kanseri hücreleri hedef alınmıştır. Mezenkimal kök hücre kaynağı olarak da kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler uygun görülmüştür. Bu bağlamda interlökin-2 ile uyarılmış mezenkimal kök hücrelerin, kanserin hücrel tedavisinde etkileri incelenmiştir. MKH ve kanser hücrelerinin kültür ortamında birbirileri ile olan etkileşimlerinin hücre hücre temasıyla mı yoksa parakrin etkiyle mi olduğunu anlayabilmek için direkt ve indirekt ko-kültür sistemleri kurulmuştur.

1.1. Kök Hücreler

Kök hücreler, kendi kendini yenileyebilen ve farklı hücre tiplerine farklılaşabilen ve bu sayede doku ve organları inşa edebilen özel hücre gruplarıdır. Döllenmiş bir yumurtadan doku ve organların nasıl gelişebildiğinin anlaşılabilmesinde, kök hücrelerin yeri oldukça önemlidir. Ayrıca birçok hastalığın tedavisinde kök hücreler, hücre trapisi ve doku jenerasyonu alanlarında önemli potansiyellere sahiptir. (Hui ve diğ. 2011)

Kök hücreler somatik hücrelere benzer olarak eş hücrelerin oluştuğu simetrik bölünme yeteneğine sahip olmanın yanında, kök hücre havuzunu korumayı sağlayan ve aynı zamanda somatik hücreleri de oluşturabildiği asimetric bölünme yeteneğine de sahiptir.

Çizelge 1.1 Hücre bölünme çeşitleri



Yapılan araştırmalar sonucunda kök hücrelerin farklı özelliklere sahip oldukları ve farklı kaynaklardan elde edilebildikleri gözlemlenmiştir. Bu nedenle kök hücreler temel olarak, farklılaşabilme potansiyellerine göre ve elde edildikleri kaynağa göre sınıflandırılırlar.

1.1.1. Kök Hücrelerin Sınıflandırılması

Farklılaşabilme kapasiteleri göz önünde bulundurulduğunda 5 ana grupta toplanırlar;

a)Totipotent Kök Hücreler: Yumurta hücresinin sperm ile dölleniyle oluşan zigot, bir vücudu inşa eden tüm hücrelere dönüşebilecek kapasiteye sahiptir. Döllenen sonraki 3. günün sonuna kadar bu özelliklerini muhafaza ederler.

b)Pluripotent Kök Hücreler: Pluripotent kök hücreler, bölünerek kendi kendine yenileme kapasitesine ve erken embriyonun üç primer germ hücre tabakası olan endoderm, mezoderm ve ektodermden köken alan tüm hücre tiplerine farklılaşabilme potansiyeline sahip hücrelerdir. Bu nedenle yetişkin vücudunun tüm hücrelerini oluşturabilir ancak

plasenta gibi ekstra embriyonik dokulara dönüşme kapasitesine sahip değildir. Embriyonik kök hücreler ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPKH) pluripotent kök hücrelerdir (Takahashi 2006).

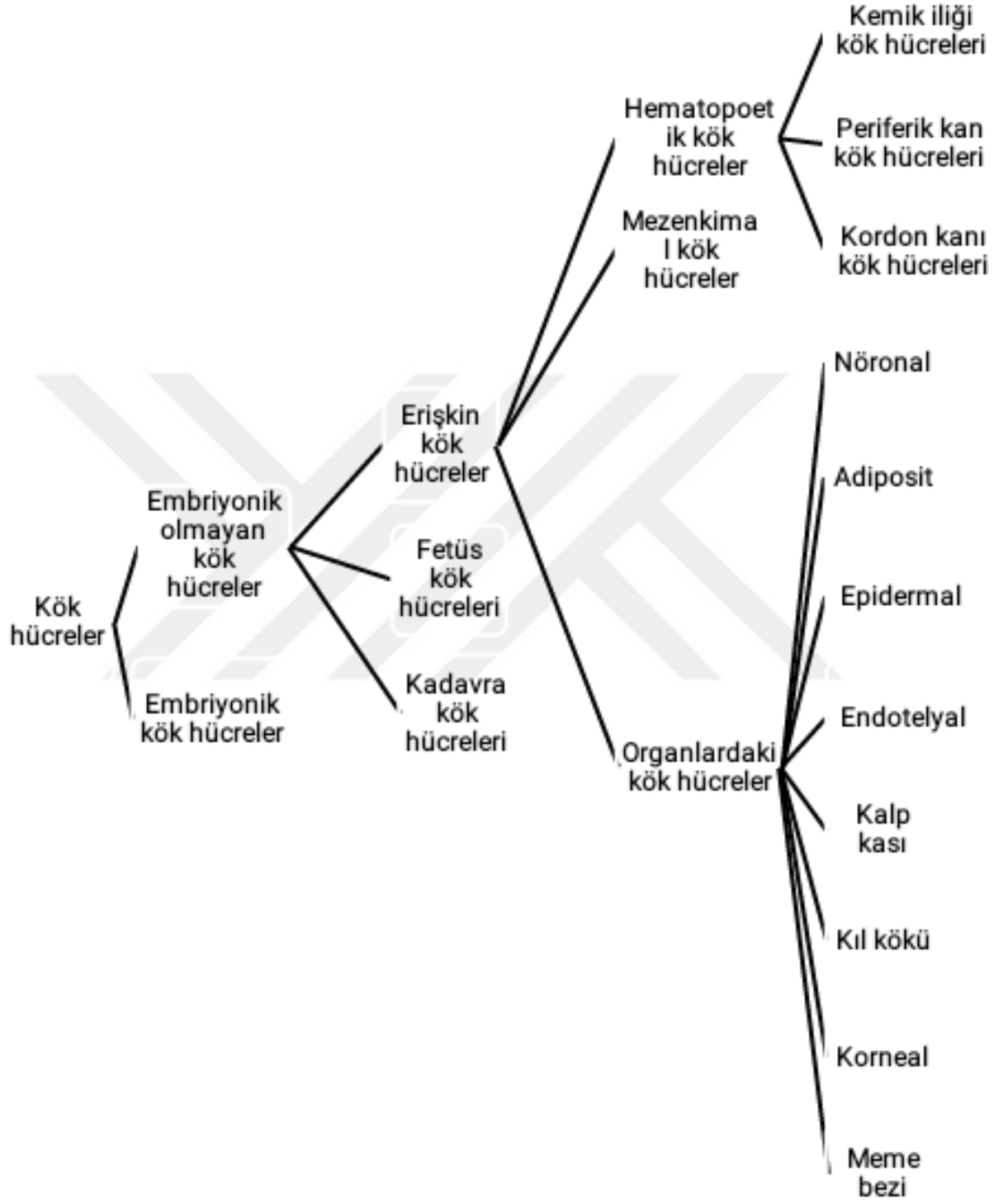
c)Multipotent kök hücreler: Multipotent kök hücreler, bölünerek kendi kendini yenileme kapasitesine sahip hücrelerdir. Belirli bir doku veya organda bulunan birçok farklı özel hücre tiplerine dönüşebilen hücrelerdir. Erişkin kök hücrelerin çoğu, multipotent kök hücrelerdir.

d)Oligopotent kök hücreler: Bu kök hücreler sınırlı bir hücre soyuna veya dokusuna farklılaşabilmektedir. Lenfoid kök hücreler ve gözdeki korneal kök hücreler oligopotent kök hücrelere örnek olarak verilebilir.

e)Unipotent kök hücreler: Bu hücreler tek bir tip hücreye dönüşebilme kapasitesine sahip olan hücrelerdir. Deri hücreleri örnek olarak verilebilir.

Kök hücreler farklılaşabilme kapasitelerinin yanında, elde edildikleri kaynaklara göre de sınıflandırılabilirler.

Çizelge 1.2. İnsan kök hücrelerinin sınıflandırılması



1.1.2. Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücreler isimlerini gevşek bağ dokusu yapısındaki mezenkimden almaktadır. Mezenkimal kök hücreleri keşfi, Friedenstein ve arkadaşlarının fareler üzerinde yaptıkları çalışmalar sırasında keşfedilmiştir. Farelerin kemik iliği stromasını başka dokuya transfer ettiklerinde kemik, kıkırdak ve retikulum hücrelerine farklılaşabildiklerini göstermişlerdir (*Friedenstein ve diğ.* 1966). Bu çalışma neticesinde, kemik iliğinde, hematopoetik kök hücrelerden farklı hücrelerin mevcut olduğu anlaşılmıştır. Sonrasında yapılan çalışmada bu hücreler üzerinde yapılan ölçümler sonucu bu hücrelerin fibroblastların öncü hücreleri olduğu iddia edilmiştir (*Friedenstein ve diğ.* 1970). Bir hücre tipinden farklı hücre tiplerine farklılaşabildiklerinden multipotent kök hücreler olarak adlandırılmışlardır (*Caplan ve diğ.* 1991)

Mezenkimal kök hücreler vücutta bulunan birçok dokudan elde edilebilmektedir. Örneğin; kemik iliği, adipoz doku, kordon kanı, diş pulpası MKH kaynaklarıdır. Ancak MKH'lerin kaynaklarının farklı olması MKH'ler içinde de farklılıklara neden olmaktadır. Buna neden olarak da kök hücrelerin mikro-çevrelerinden etkilendiği öne sürülmektedir. Mikro-çevre farklılıkları mezenkimal kök hücrelerin fenotiplerinde, farklılaşma kapasitelerinde, kemokin ve sitokin salgılama özelliklerinde farklılıklar doğmasına neden olmaktadır. Örneğin farklılaşma özellikleri ele alındığında, kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşma yetenekleri adipoz dokudan elde edilen MKH'lere göre daha fazladır (*Huang ve diğ.* 2005)

Uluslararası Hücresel Terapi Derneği'ne (International Society for Cellular Therapy) göre, dokulardan elde edilen hücrelerin MKH olduğundan emin olmak için 3 ana özelliği taşımaları beklenir

1. Adherent hücreler olmaları. MKH'ler kültüre alındıkları kültür kaplarının yüzeyine yapışabilen ve çoğalabilen hücrelerdir.
2. Farklılaşabilme kapasiteleri. MKH'ler özellikle kondrojenik, adipojenik ve osteojenik olarak farklılaşabilen hücrelerdir.
3. Pozitif ve negatif belirteçler. Yapılan birçok çalışmaya göre MKH'ler CD70, CD90, CD105 olarak pozitif iken, CD34, CD45 ve HLA-DR olarak negatif olduğu ortaya konulmuştur (*Schaffler ve diğ.* 2007)

Mezenkimal kök hücreler sahip oldukları birçok özellik nedeniyle, temel bilimsel araştırmalarda ve klinikte yaygın olarak kullanılmaktadırlar. MKH'ler vücutta hasarlı dokuya göç edebilmekte ve hasarın onarılmasında rol almaktadır. Bu yeteneğe "homing" denilmektedir. Bu özellikleri nedeniyle rejeneratif tıpta tercih edilmektedir. Farklı kaynaklardan elde edilebiliyor olmaları ve kültürde kolaylıkla çoğalmaları MKH'lerin tercih edilmesinde bir başka neden olarak gösterilebilir. Bu özelliklerinin yanı sıra, birçok hücre tipine farklılaşabilmeleri kullanım nedenlerinden biridir. Farklılaşabilme yeteneklerinden dolayı, doku mühendisliğinde ve rejeneratif tıpta kullanılmaktadır. En önemli özelliklerinden biri allojenik nakil sırasında ortaya çıkan komplikasyonlara karşı bir koruyucu olarak kullanımlarıdır. GVHD (Graft Versus Host Disease) olarak adlandırılan hastalığa karşı oldukça etkili sonuçlar alınmıştır ve bu nedenle MKH'ler klinikte nakil durumlarında kullanılmaktadır. MKH'ler ayrıca immünmodülatör özellikleri aracılığıyla immün sistem hücrelerini kontrol etmekte ve hücrelerin sayılarını düzenlemektedir. Böylece hücrelerin olması gereken nicelik ve nitelikte kalmalarını sağlayarak oto-immün reaksiyonların oluşmasının önüne geçmektedir. MKH'nin lenfositleri baskıladığını gösteren direkt ve indirekt çalışmalar mevcuttur (*Di Nicolo 2002, Krampera 2003, Klyushnenkova 2005, Tse 2003, Rasmusson 2003*).

1.2.Tiroid Dokusu

Tiroid bezi, boynun arteriyor bölgesinde konumlanmış, larinks ve trake ile komşu çift loblu bir organdır. İstmus olarak adlandırılan ince bir tiroid dokusu ile birbirine bağlı iki büyük lateral lobdan meydana gelirler. Normal bir tiroid bezi yaklaşık olarak 20 gram ağırlığındadır (*Bliss ve diğ. 2000*). Tiroid bezi gebeliğin 4.haftasında farinksin tabanında meydana gelen endodermal kalınlaşmadan köken alan primordiyumdan orijinlenerek gelişimine başlar.



Çizim 1.1 Tiroid bezi

Tiroid bezi vücut için çok önemli işlevlere sahip hormonların salgılandığı bir iç salgı bezidir. Tiroid bezinin bir fonksiyonu iyodun yoğunluğunu arttırmak ve tiroid hormonlarını salgılamaktır. Tiroid bezinden salgılanan hormonlar iki ana hücre grubundan salgılanır. Bunlardan biri **foliküller hücreler** diğeri ise **parafoliküller hücreler (C hücreleri)**'dir.

Hipotalamustan salgılanan TRH (Tiropin Salgılatıcı Hormon) hipofiz bezinden TSH (Tiroid Stimulan Hormon) salımını uyarır. TSH tiroid bezini uyararak foliküller hücrelerden aminoasit yapılı T3 (Triiyodotironin) ve T4 (Tetraiyodotironin) hormonları salgılanmasını sağlar. Kandaki kalsiyum miktarının artması tiroid bezinin parafoliküller hücrelerinin kalsitonin hormonunu salgılamasını sağlar. Kalsitonin kandaki kalsiyumun kemik dokuya geçmesini sağlayarak kandaki kalsiyum miktarını dengede tutar. Hipofiz bezinin fazla çalışması sonucu yüksek miktarda TSH ile uyarılan tiroid bezinden salgılanan hormon miktarı da yüksek seviyelere ulaşır. Bu durumda hipertiroidi oluşur. Tiroid bezinin az çalıştığı durumlarda ise hipotiroidi ortaya çıkar.

1.2.1. Tiroid Kanseri ve Tipleri

Tiroid kanseri en sık görülen malign endokrin tümördür ancak tüm maligniteler içerisindeki oranı % 1'dir. Tiroid kanserinin görülme sıklığı diagnostik görüntüleme kullanımının artmasıyla dünya çapında artmaya devam etmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde kadınlarda en sık görülen kanser türü tiroid kanseridir ve 2005 yılında kadınlarda ve erkeklerde 62,000'den fazla vaka ortaya çıkmıştır. Tiroid kanserlerinin %

90'nından fazlası farklılaşmış tiroid kanseri olarak isimlendirilen foliküler ve papiller varyantlarıdır (*Nix. ve diğ.* 2005)

Malignant tiroid tümörleri 3 ana grupta toplanır: (American Cancer Society-2016)

1.2.1.1. Farklılaşmış tiroid kanserleri:

Tiroid kanserlerinin büyük bir çoğunluğu farklılaşmış kanserlerdir. Mikroskop altında normal tiroid dokusuna benzemektedir. Bu tümör hücreleri tiroid bezinin foliküler hücrelerinden oluşur. 3 alt grupta toplanırlar:

1.2.1.1.1. Papiller kanser: Tiroid kanserlerinin % 80'ini oluştururlar. Büyüme hızları düşüktür ve tiroid bezinin sadece bir lobunda gelişirler. Yavaş büyümelerine rağmen lenf düğümlerine yayılabilirler. Ancak kolay tedavi edilebildiklerinden çoğunlukla ölümcül değildir.

1.2.1.1.2. Foliküler kanser: Tiroid kanserlerinin % 10'nunu oluştururlar. Diyetlerinde yeterince iyot tüketilmeyen toplumlarda daha yaygın olarak görülür. Genellikle lenf düğümlerine yayılmazlar ancak akciğer ve kemik gibi vücudun farklı bölgelerine yayılabilirler. Hastalığın seyri çoğu zaman iyi olmakla birlikte papiller kanserle kıyaslandığında daha kötüdür.

1.2.1.1.3. Hurtle kanser: Tiroid kanserlerinin % 3'ünü oluştururlar. Oksipil hücre karsinomu olarak da adlandırılırlar. Tespit edilmeleri ve tedavi edilmeleri zordur.

1.2.1.2. Medüller tiroid kanseri (MTK): Tiroid kanserlerinin yaklaşık olarak % 4'ünü oluştururlar. Tiroid bezinin parafoliküller hücrelerinden gelişirler. Lenf nodüllerine, akciğere ve karaciğere yayılabilirler. Tespit edilmeleri ve tedavi edilmeleri çok zordur. 2 alt grupta toplanırlar.

1.2.1.2.1. Sporadik (MTK): Medüller tiroid kanserlerinin % 80'nini bu grup hücreler oluşturur. Kalıtsal değildir ve genellikle yaşlı bireylerde görülürler. Sadece bir tiroid lobunu etkiler.

1.2.1.2.2. Ailevi (MTK): Kalıtsaldır ve bir ailedeki her jenerasyonda görülme oranları % 20 - % 25 civarındadır. Genellikle çocukluk ve erken erişkinlik döneminde gelişip, hızlıca yayılabilirler. Tiroid bezinin her iki lobunda da gelişebilirler.

1.2.1.3. Anaplastik (farklılaşmamış) tiroid kanseri: Tiroid kanserlerinin nadir olarak görülen bir tipidir ve tiroid kanserlerinin yaklaşık % 2'sini oluştururlar. Bazen var olan bir papiller ya da foliküller kanserden köken aldıkları iddia edilmektedir. Bu kanser hücreleri farklılaştıkları için mikroskop altında normal tiroid dokusu hücrelerinden farklı görünürler ve bu sayede ayırtedilebilirler. Boyun bölgesine ve vücuda çok hızlı yayıldıklarından en agresif tür olarak gösterilmektedirler. Tedavileri çok zor yapılmaktadır.

1.3. İnterlökin-2

İnterlökinler beyaz kan hücreleri tarafından ifade edilen monomerik glikoprotein yapılı bir grup sitokindir. Bağışıklık sistemi hücrelerinin çalışmasında anahtar bir role sahiptirler. Eksikliklerinde otoimmün rahatsızlıklar ve immün yetmezlik görülmektedir. İnterlökinlerin çoğu yardımcı CD4⁺ T lenfositler, monositler, makrofajlar ve endotelial hücreler aracılığıyla sentezlenirler. T ve B lenfositlerin ve hematopoetik hücrelerin gelişimini ve farklılaşmasını sağlarlar.

İnterlökin-2 sitokini ilk defa 1976 yılında keşfedilmiştir (*Morgan ve diğ. 1976*). İnterlökin-2'ye atfedilen ilk işlev T lenfositlerin in vitro olarak proliferasyonunu sağlaması ve farklılaşmasını teşvik etmesidir (*Gillis ve diğ. 1978, Morgan ve diğ. 1976*). İnterlökin-2 ile yapılan *in vivo* çalışmalarda, *in vitro* çalışmalarla uyumlu olarak T lenfositlerin klonal olarak çoğalmasını sağladıkları gözlemlenmiştir. IL-2 sitokini, T lenfositlerin olgunlaştığı timusta olgunlaşmamış T hücrelerinin farklılaşmasını sağlayıp normal hücreleri otoimmün hastalıklara karşı korur. T lenfositler antijen ile uyarıldıklarında IL-2 T lenfositlerin efektör T lenfositlere ve hafıza T lenfositlere farklılaşmasını sağlar (*Liao ve diğ. 2011*)

2. AMAÇ

Hastalıkların varlığı ile canlılığın varlığı arasında hep bir bağlantı olagelmıştır. Hücrelerden meydana gelen canlıların iç ve dış kaynaklı etkenlerden hücrelerin çalışmasında ve devamlılığında aksaklık meydana gelmektedir. Bunun sonucunda hastalıklar oluşmaktadır. Hücrelerin temel amaçlarından biri olan genetik materyallerini kopyalama isteği kimi zaman hatalarla kontrolden çıkmakta ve kontrolsüz hücre çoğalması olarak adlandırılan ve hücrel organizmanın canlılığını tehdit eden kanserin oluşmasına neden olmaktadır.

Kanserin tedavisinde hücrelerin kullanılması fikri 19. yüzyılın sonlarına kadar uzanmaktadır (Coley toksinleri). Tümör hücrelerinin çoğalmasının durdurulması ve öldürülmesi amacıyla immünmodülatör özelliğe sahip olan mezenkimal kök hücrelerin kullanıldığı ve başarılı olduğu çalışmalar mevcuttur. Mezenkimal kök hücrelerin bu özellikleri yine vücudun bağışıklık sisteminin çalışmasını düzenleyen sitokinler ile desteklendiğinde MKH'lerin kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin arttığı gözlemlenmiştir. Yapılan literatür taramasında, tiroid kanserinin agresif bir tipi olan anaplastik tiroid kanserine yönelik IL-2 ile uyarılmış mezenkimal kök hücrelerin kullanılmadığı görülmüştür. Bu çalışmada, kanser hastalarına yan etkileri daha az olan ancak diğer tedavi stratejilerinden daha etkin bir seçenek sunmak ve hücrel tedavilere katkıda bulunmak amaçlanmaktadır.

3. YÖNTEM

3.1. İnsan Kemik İliği Materyalinden MKH Kültürü ve Karakterizasyonu

3.1.1. MKH'lerin Kültürü ve Pasajı

İnsan kemik iliği kaynaklı MKH (İKİ-MKH) hücre dizisinin kültürü için RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium)(Capricorn Scientific, Almanya) besiyer karışımı (RPMI 1640, %10 serum, %1 antibiyotik, 200 mM L-glutamin) kullanıldı. Günlük mikroskop incelemeleri ile 3 günde bir kez besiyeri değiştirildi ve hücreler %70-80 yoğunluğa ulaştığında alt kültürleme (pasaj) yapmak üzere tripsin-EDTA (%0,25) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, İngiltere) ile kültür kabından kaldırılıp yeni kültür kaplarına uygun yoğunluklarda ekildi. Pasaj 3 (P3) 'e geldiğinde karakterizasyon analizleri gerçekleştirildi.

3.1.2. İKİ-MKH Karakterizasyon Çalışması

3.1.2.1. Akım sitometri cihazı ile İKİ-MKH karakterizasyonu

Kültür ortamında P3'e kadar çoğaltılan MKH'ler tripsin-EDTA (%0,25) ile kaldırıldıktan sonra kök hücre karakterizasyonunun ilk aşaması olan yüzey belirteçlerinin oranın belirlenmesi akış sitometri ile gerçekleştirildi. Uluslararası Hücre Terapileri Derneği (ISCT) tarafından belirlenen kriterlere göre elde edilen MKH'lerin analiz sonucunda CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 ve HLA A,B,C için pozitifliği ve CD14, CD34, CD45, CD117 ve HLA-DR için negatifliği belirlendi.

3.1.2.2. Farklılaştırma analizleri

MKH'lerin karakterizasyonu için farklılaştırma süreçleri tamamlandı. MKH'ler farklılaştırma besiyerleri içerisinde in vitro olarak kültüre edildi. Osteojenik ve adipojenik farklılaştırılmaları gerçekleştirildi.

3.1.2.2.1. Adipojenik farklılaştırma

iKİ-MKH'ler 6 kuyucuklu kültür kabına 3000 adet/cm² hücre olacak şekilde ekildikten sonra adipojenik farklılaştırma besiyerinde (StemPro™ Adipogenesis Differentiation Kit, Gibco, Thermo Fisher Scientific, İngiltere) 4 hafta süreyle kültüre edildi. Kuyucuk başına 2 mL adipojenik farklılaştırma besiyeri konuldu. Besiyeri değişimi 3 günde bir yapıldı. Kültür sonrası Oil Red O (Sigma-Aldrich, Almanya) histolojik boyama yapılarak hücre içinde biriken yağ yapıları mikroskopik olarak incelendi ve adipojenik farklılaşmanın pozitifliği gösterildi.

3.1.2.2.2. Osteojenik farklılaştırma

iKİ-MKH'ler 6 kuyucuklu kültür kabına 3000 adet/cm² hücre olacak şekilde ekildikten sonra osteojenik farklılaştırma besiyerinde (StemPro™ Osteogenesis Differentiation Kit, Gibco, Thermo Fisher Scientific, İngiltere) 4 hafta süreyle kültüre edildi. Kuyucuk başına 2 mL osteojenik farklılaştırma besiyeri konuldu. Besiyeri değişimi 3 günde bir yapıldı. Kültür sonrası Alizarin Red O (Sigma-Aldrich, Almanya) histolojik boyama yapılarak osteojenik farklılaşmanın pozitifliği mikroskopik incelemelerle gösterildi.

3.2.CAL62 (Anaplastik Tiroid Kanseri Hücre Hattı) Kültürü ve Karakterizasyonu

3.2.1. CAL62 kültürü

İnsan anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin çoğaltılmasında % 10 FBS, % 1 penisilin/streptomisin içeren RPMI 1640 besiyeri kullanıldı. Günlük olarak mikroskop altında takip edilen hücrelerin besiyerleri 3 günde bir değiştirildi. Hücreler kültür kabının tabanının % 70-80'nini doldurduğunda tripsin/EDTA kullanılarak kültür kabının zemininden kaldırıldı ve yeni kültür kabına ekildi.

3.2.2. Akım sitometri cihazı ile CAL62 hücre hattının karakterizasyonu

CAL-62 kanser hücre hattının CD44, CD166, CD117, CD34, CD38, CD19, CD133, CD123 düzeyleri, yaklaşık 10.000 hücre okutulmuş CellQuest software (Becton Dickinson) ile akım sitometrik analizi yapılarak değerlendirildi.

3.3.Hücrelerin Ortak Kültürü ve Etkileşimlerinin İncelenmesi

3.3.1. Deney gruplarının oluşturulması

Toplam 2 kontrol grubu, 6 deney grubu olmak üzere hücreler 3 gün boyunca ortak kültüre alındı (Tablo 1). Kültür sırasında hücreler ile kullanılacak eklentiler aynı kuyucukta yer alacak şekilde planlandı. Tez çalışmasında hem ayırıcı (insert) kullanılması hem de ayırıcı kısım kullanılmadan olacak şekilde yapılması planlandı. Hücreler arası doğrudan (direkt) ve doğrudan olmayan (indirekt) ortak kültürler gerçekleştirildi. Ortak kültüre alındıktan sonra hücre canlılığı, çoğalımı, apoptozu ve gen ekspresyonlarındaki değişimleri karşılaştırıldı. Hücreler arası oranlar CAL62: İKİ-MKH 1:1, hücre kültür besiyerine verilecek IL-2 oranı ise 50 ng/ml olarak şekilde ayarlandı.

Çizelge 3.1 Deney ve kontrol grupları

Kontrol Grupları	Deney Grupları
CAL62	CAL62 + İKİ-MKH (indirekt)
MKH	CAL62 + İKİ-MKH + IL-2 (indirekt)
	CAL62 + İKİ-MKH (direkt)
	CAL62 + İKİ- MKH + IL-2 (direkt)
	CAL62 + IL-2
	İKİ-MKH + IL-2
CAL62: İnsan anaplastik tiroid kanser hücresi İKİ-MKH: İnsan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre IL-2: İnterlökin-2 (Biovision)	

3.3.2. IL-2 ile uyarılmış MKH'lerin CAL62 hücreleri ile direkt ve indirekt ko-kültürü

Mezenkimal kök hücreler ve CAL62 hücreleri 6 kuyulu plakalara ekildi. Hücrelerin oranları 1:1 oranında olacak şekilde ayarlandı. Hücreler ekildikten sonra ortama IL-2 verildi ve etkileşime geçilmesi için 24 saat beklenildi. Kuyu başına 6 ml hazır besiyeri eklendi.

MKH'lerin CAL62 hücreleri ile indirekt ko-kültürü için 6 kuyucuklu transwell plakalar kullanıldı. Kuyunun tabanına MKH'ler ekilirken, 0,4 µm'lik por aparatına CAL62 hücreleri ekildi. Hücreler 1:1 (30×10^4 : 30×10^4) oranında ekildi. Aynı besiyeri ortamını paylaşan MKH'ler ve CAL62 hücreleri hücre-hücre teması olmaksızın indirekt olarak ko-kültüre edildi. Ortama IL-2 ilavesi yapıldı. Ko-kültür düzeneği kurulduktan ve IL-2 ile uyarılma yapıldıktan sonra 24., 48., ve 72. saatlerde 1 mL'lik örnekler alınarak testler için saklandı.

MKH'lerin CAL62 hücreleri ile direkt ko-kültürü için 6 kuyulu plakalar kullanıldı. Hücreler 1:1 oranında (15×10^4 : 15×10^4) ekildi. Ortama IL-2 ilavesi yapıldı. Hücrelerin doğrudan hücre-hücre teması sağlandı.

3.3.3. Uyarılmamış MKH'lerin CAL62 hücreleri ile direkt ve indirekt ko-kültürü

Mezenkimal kök hücreler ve CAL62 hücreleri 6 kuyulu plakalara ekildi. Hücrelerin oranları 1:1 oranında olacak şekilde ayarlandı. Hücreler ekildikten sonra ortama IL-2 verildi. Kuyu başına 6 mL hazır besiyeri eklendi.

MKH'lerin CAL62 hücreleri ile direkt ko-kültürü için 6 kuyulu transwell plakalar kullanıldı. Kuyunun tabanına MKH'ler ekilirken, 0,4 µm'lik por aparatına CAL62 hücreleri ekildi. Hücreler 1:1 (30×10^4 : 30×10^4) oranında ekildi. Aynı besiyeri ortamını paylaşan MKH'ler ve CAL62 hücreleri hücre-hücre teması olmaksızın indirekt olarak ko-kültüre edildi. Ko-kültür düzeneği kurulduktan sonra 24., 48., ve 72. saatlerde 1 mL'lik örnekler alınarak testler için saklandı.

MKH'lerin CAL62 hücreleri ile direkt ko-kültürü için 6 kuyulu plakalar kullanıldı. Hücreler 1:1 oranında (15×10^4 : 15×10^4) ekildi. Hücrelerin doğrudan hücre-hücre teması sağlandı.

3.4.CAL62 Hücrelerinin Canlılık ve Çoğalm Testleri

3.4.1. Hücre Döngüsü Analizi

Ko-kültüre edilen hücrelerin hücre siklusu analizi için BD cell cycle/DNA kiti ve protoklü kullanılarak akım sitometrik analizi yapıldı.

3.4.2. Canlılık testi (WST-1)

WST-1 testinde, WST-1 yapısındaki tetrazolyum tuzları canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenaz enzimi tarafından formazon kristallerine dönüştürülür. Canlı hücre artışına paralel olarak hücrelerde bulunan mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesinde de artış olur. Bu durum formazon kristallerinin artmasına ve daha koyu bir renkte ayraç oluşturmasına neden olur. Oluşan formazon kristallerinin miktarındaki artış, metabolik olarak aktif hücre sayısı ile doğru orantılıdır.

WST-1 testi için, 6-kuyulu plakalardan kaldırılan CAL62 hücreleri 15 mL'lik falkon tüplere toplanarak 1800 rpm'de 5 dk santrifij edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre pelleti 100 µL hazır besiyeri ile 96-kuyulu plakalara ekildi. Kuyucuk başına 10 µL WST-1 kimyasalı eklendi. Işıktan etkilenmesini önlemek için folyo ile sarıldı. 37 °C'de % 5 CO₂'li inkübatörde 3-4 saat bekletildi. Sonrasında mikropate kullanılarak 480 nm dalga boyunda absorbans değeri okundu.

3.4.3. IL-2 eklentili ve eklentisiz grupların kültür besiyerine salgılanan sitokinlerin ELIZA testi ile analizi

IL-2 eklenmiş ve eklenmemiş kültürlerde ortama salınan sitokinlerin profillerinin ve protein miktarlarının belirlenmesi için IFN γ , TNF, IL4 ELIZA (Arigo,Taiwan) testi yapıldı.

3.5. Gerçek Zamanlı PZR gen ekspresyon analizi

Hücrelerin RNA'ları, RNA izolasyon kiti (High Pure RNA Isolation Kit; Roche, Mannheim, Germany) ile saflaştırıldı. cDNA sentez kiti (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit; Roche, Mannheim, Germany) ile cDNA 'ya çevrilmiştir. Hedef genlerin amplifikasyonu SYBR green boyası ile LightCycler 480-II (Roche) gerçek-zamanlı kantitatif PZR cihazında gerçekleştirilmiştir. Hedef gen ve ona uygun seçilmiş olan referans genler aynı panelde çoğaltıldı. PZR koşulları; başlangıçta 95°C'de 10 dakika inkübasyon, 45 döngü boyunca 95°C 'de 15 s denatürasyon, 60°C'de 30 sn bağlanma, 72 °C'de 30sn şeklinde uygulandı. Sonuçlar Light Cycler yazılımıyla (version 4) Cp değerlerinin hesaplanmasıyla analiz gerçekleştirilmiştir. Kontrol grupları baz alınarak hücrelerin TGFb, IFNg, CASP3, CASP7, CASP8, IL-10, IL-1b ve IL-6 gen ekspresyon analizleri yapıldı.

3.6.CAL62 hücrelerinde telomeraz aktivitesinde meydana gelen değişimin ölçülmesi

CAL62 hücrelerinin ko-kültürden önce ve sonra telomeraz aktivitelerindeki değişimi ölçmek için Telomeraz Aktivitesi Tayini testi yapıldı. Telomeraz aktivitesi TRAP (Telomer Tekrarı Çoğalma Protokolü) yöntemi ile kantitatif olarak saptandı. Telo TAGGG Telomerase PZR ELISAPLUS, ROCHE kiti (Cat NO: 12013789001) kiti kullanıldı.

3.7.İstatistiksel analiz

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



4. BULGULAR

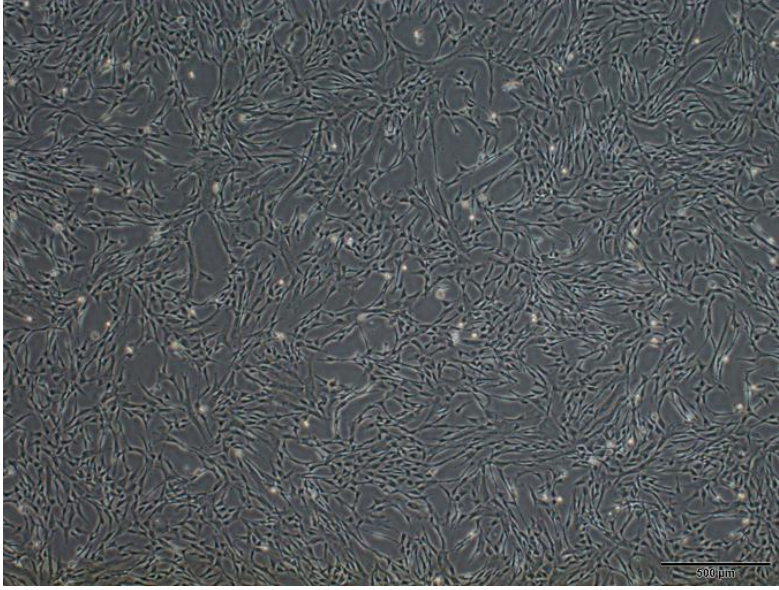
Hücresel tedavilerde amaç dokularda ve organlarda meydana gelen hasarların, bozuklukların ve hastalıkların vücuda yabancı olmayan materyallerle tedavi edilmesidir. Bu sayede ilaçların ve diğer tedavi yöntemlerinin olası yan etkilerinin ve başarısızlığının önüne geçilmesi hedeflenmiştir.

Bu çalışmada immün sistem hücrelerinin çalışmasını düzenleyen MKH ve IL-2 kullanarak kanser hücrelerinin çoğalmasının azaltılıp durdurulacağı ve hatta öldürüleceği varsayılmıştır. Deneyler sonucunda yapılan testlerden çıkan verilere göre IL-2 ile uyarılmış mezenkimal kök hücrelerin CAL62 anaplastik tiroid kanseri hücreleri üzerine antiproliferatif ve apoptotik etkiler gösterdiği gözlemlenmiştir. Buna ek olarak, MKH'lerin CAL62 hücreleri ile direkt ve indirekt ko-kültürü yapılarak hücre-hücre temasının önemli olup olmadığı da araştırılmıştır. Yapılan testler sonucunda indirekt ko-kültürün daha etkili olduğu gözlemlenmiştir.

Proje boyunca kullanmış olduğumuz hücreler, KÖGEM hücre arşivinde mevcut olan ve daha önceden etik kurul onayı alınmış, insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerdir. Bu çalışmada kullanılmak üzere alınmış olan etik kurul onayına dair karar numarası: KÜ GOKAEK 2016/21.1'dir.

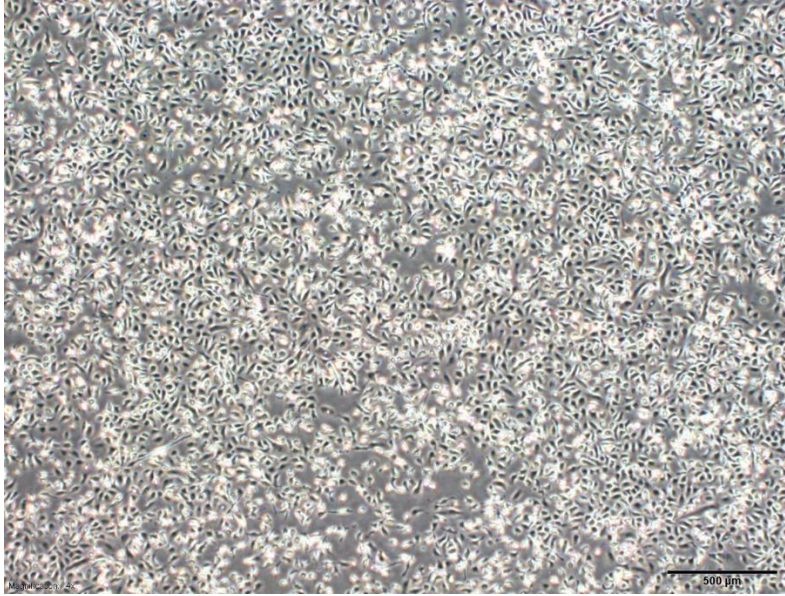
4.1. MKH ve CAL62 kültürü

İnsan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kültüre alındıklarında, mikroskop altında yapılan incelemelerinde fibroblast hücrelerine benzeyen iğsi fenotipte oldukları gözlemlendi.



Çizim 4.1 iKI-MKH'lerin ışık mikroskop görüntüleri. Ölçüm çubuğu: 500 μm

CAL62 hücrelerinin mikroskop altında görüntüleri incelendiğinde kültür kabının yüzeyine yapıştığı gözlemlendi. CAL62 hücrelerinin iğsi yapılar oluşturmadığı ve MKH'lere göre daha oval bir yapıda olduğu görüldü.

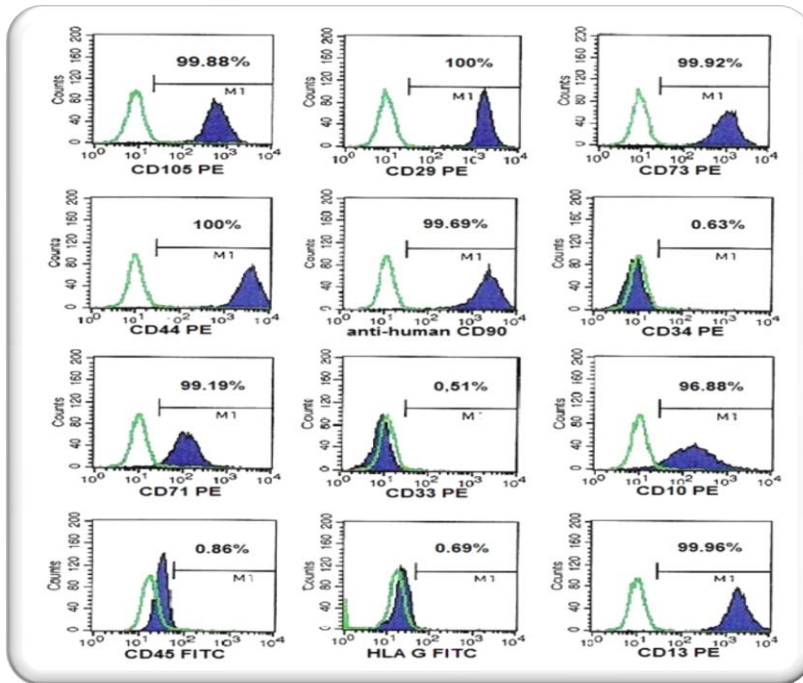


Çizim 4.2 CAL62 hücrelerinin ışık mikroskop görüntüleri. Ölçüm çubuğu: 500 μm

MKH'lerin Akım Sitometri Cihazı ile Karakterizasyonu

4.1.1. MKH'lerin ko-kültür Öncesi Akım Sitometri Cihazı ile Karakterizasyonu

Yapılan çalışmada kullanılan MKH'lerin deneye alınmadan önce akım sitometri cihazı ile karakterizasyonu gerçekleştirildi. Yapılan analiz sonucunda kullanılan hücrelerin MKH belirteçlerine sahip olduğu Çizim 4.3'de gösterilmiştir.

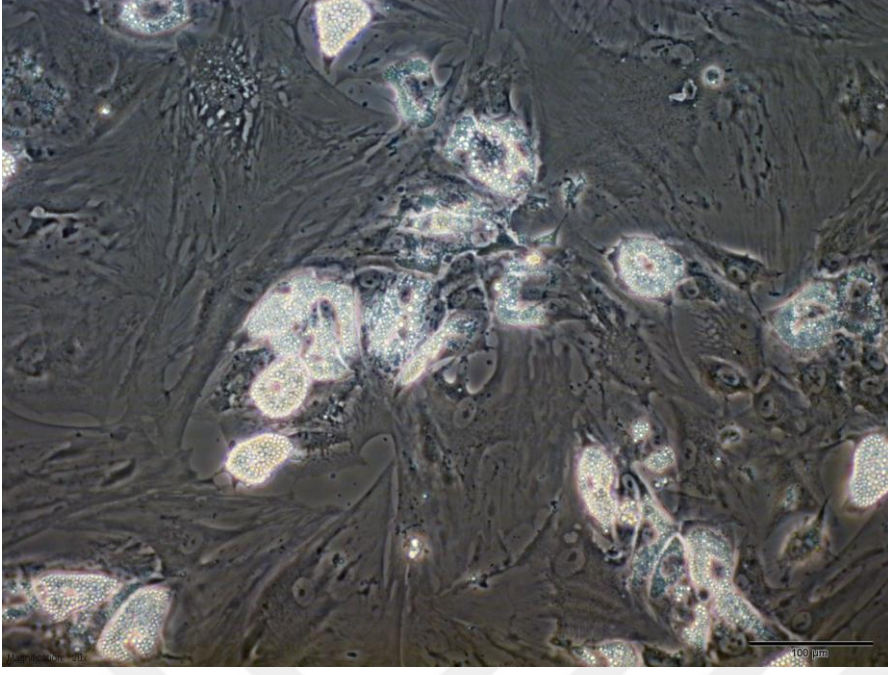


Çizim 4.3 MKH'lerin akım sitometri ile karakterizasyonu.

4.2. MKH'lerin Farklılaştırılması

4.2.1. Adipojenik Farklılaşma

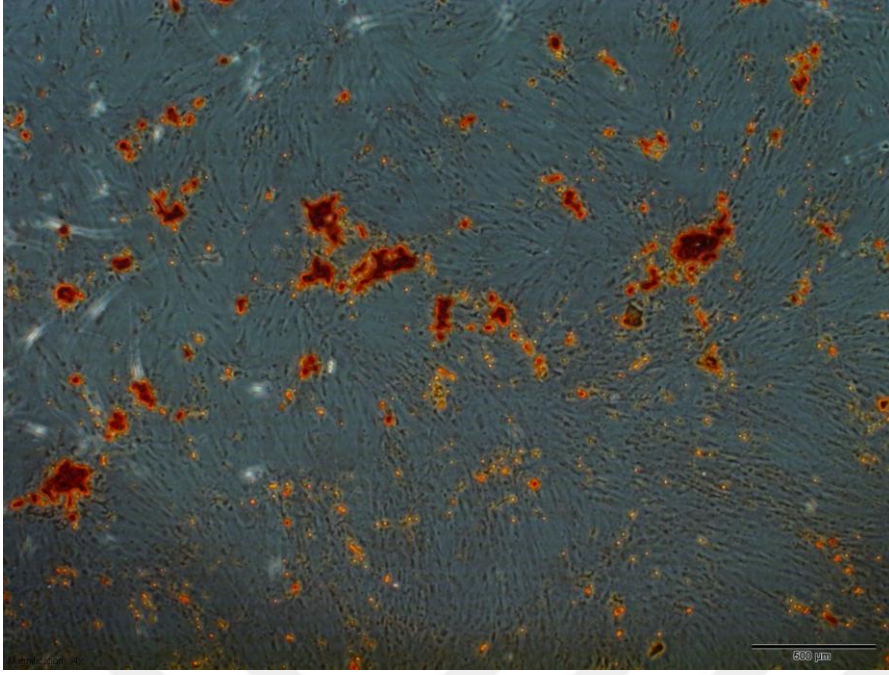
Yapılan çalışmada kullanılan MKH'lerin, multipotent özelliklerini tespit edebilmek için üç germ tabakasından mezenkim dokusuna ait adipojenik hatta farklılaştırılması yapılması. Üç hafta süren farklılaştırma işlemi sonrası hücreler fiske edilmiştir. Hücre içindeki yağ damlacıklarının görüntülenebilmesi için Oil Red O boyası ile boyanarak ışık mikroskopunda görüntülenmiştir (Çizim 4.4).



4.4 Adipojenik farklılaşmaya yönlendirilen MKH'lerin Oil Red O boyanması. Ölçüm çubuğu: 100 µm

4.2.2. Osteojenik Farklılaşma

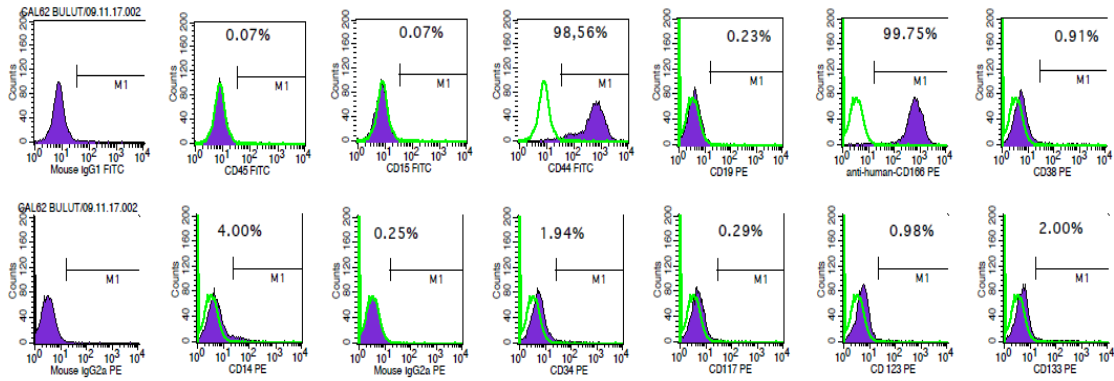
Yapılan çalışmada kullanılan MKH'lerin, multipotent özelliklerini tespit edebilmek için üç germ tabakasından mezenkim dokusuna ait osteojenik hatta farklılaştırılması yapılmıştır. bu işlem sonunda hüceler fiske edilerek, matriksteki kalsifikasyonun görüntülenmesinde kullanılan Alizarin Red S boyaması ile görünür hale getirilmiştir.



Çizim 4.5 Osteojenik farklılaşmaya yönlendirilen MKH'lerin Alizarin Red S boyanması. Ölçüm çubuğu: 100 µm

4.3. CAL62 Hücre Hattının Akım Sitometri Cihazı ile Karakterizasyonu

Yapılan çalışmada kullanılan CAL62 hücreleri deneylerde kullanılmadan önce akım sitometri cihazı ile karakterizasyonu gerçekleştirildi. Yapılan analiz sonucunda kullanılan hücrelerin CAL62 belirteçlerine sahip olduğu Çizim 4.6'da gösterilmiştir.



Çizim 4.6 CAL62 hücre hattının akım sitometri ile karakterisasyonu

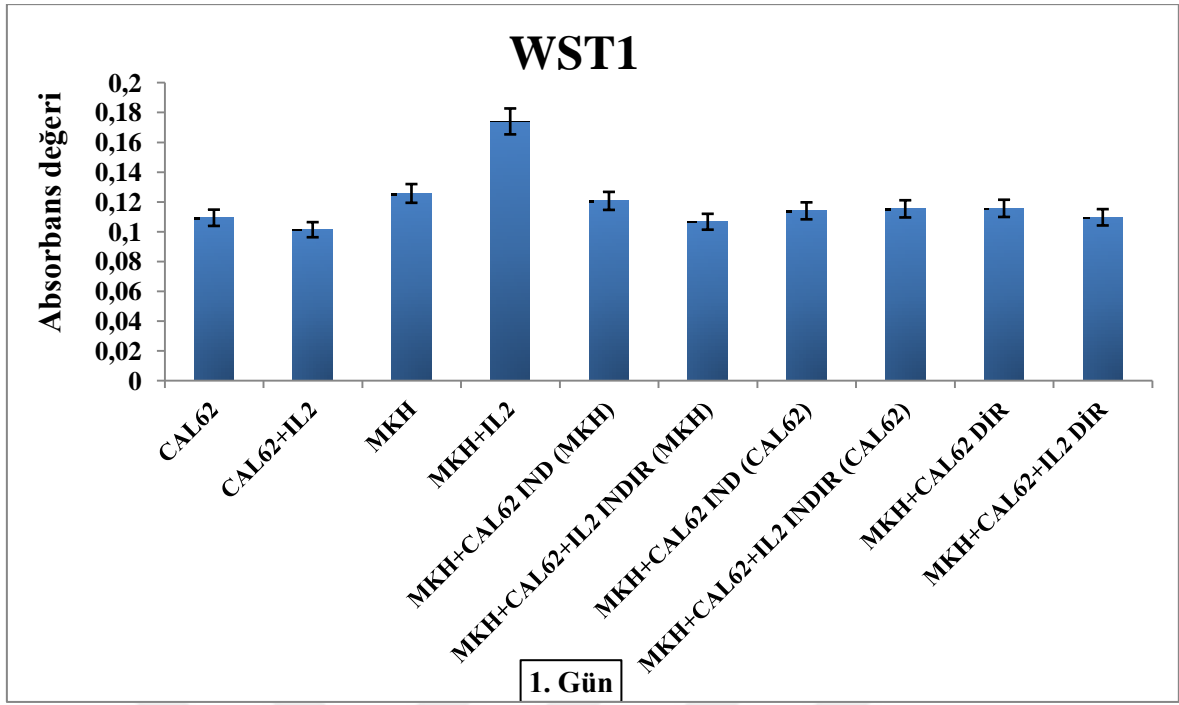
4.4. Hücre Döngüsü Analizi

Çizelge 4.1 Ko-kültür öncesi ve sonrası CAL62 hücrelerinin hücre döngüsü

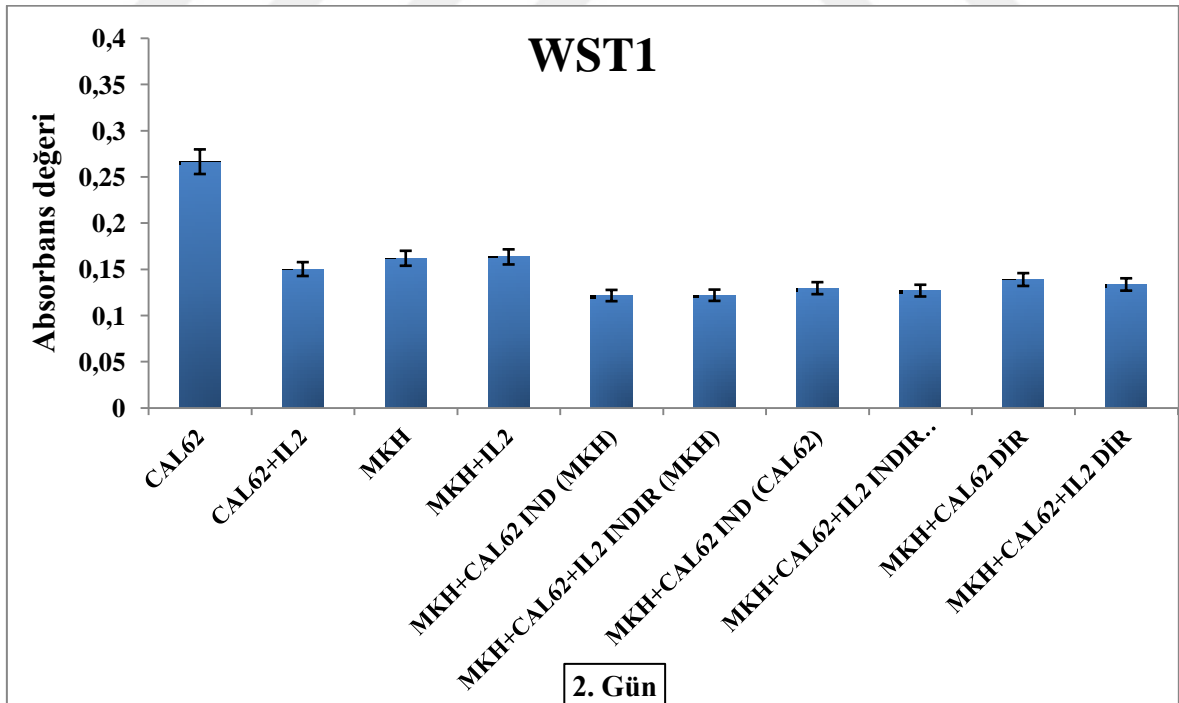
KO-KÜLTÜR ÖNCESİ (CAL62)	KO-KÜLTÜR SONRASI (CAL62)			
	Gruplar	24.saat	48.saat	72.saat
G1: % 56,25 G2: % 43,75 S: % 4	CAL62+MKH (indirekt)	G1: % 100 G2: % 0 S: % 0	G1: % 71,64 G2: % 0 S: % 28,36	G1: % 83,39 G2: % 0 S: % 16,61
	CAL62+MKH+IL-2 (indirekt)	G1: % 100 G2: % 0 S: % 0	G1: % 79,33 G2: % 6,23 S: % 14,44	G1: % 64,64 G2: % 0 S: % 35,36
	CAL62+IL-2	G1: % 63,07 G2: % 37,18 S: % 3,22	G1: % 81,17 G2: % 18,83 S: % 0	G1: % 85,85 G2: % 1,98 S: % 12,18

4.5. Canlılık Testi (WST-1)

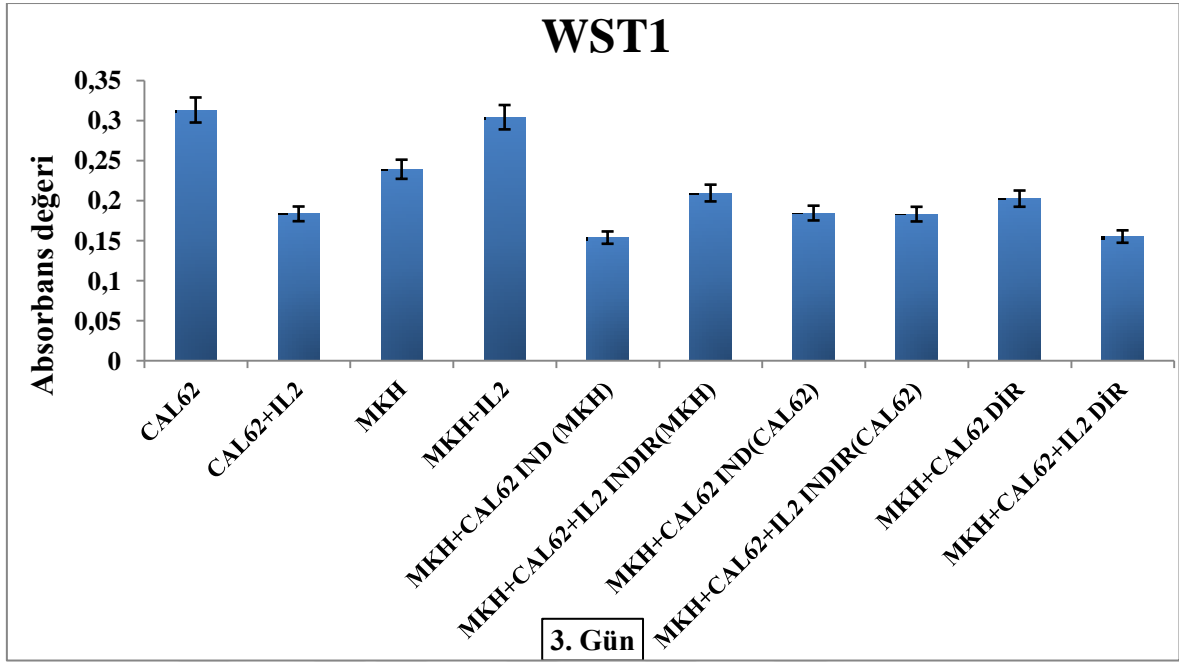
Ko-kültür deneyleri sırasında 24., 48., ve 72. saatlerde alınan örneklerle WST-1 testi yapılarak hücrelerin proliferasyonları incelendi. Yapılan incelemeler sonucunda, IL-2 ile kültüre edilen CAL62 hücrelerinin proliferasyonlarında azalma olduğu gözlemlenmiştir. İnterlökin-2 ile kültüre edilen MKH'lerin proliferasyonlarında artış olduğu tespit edilmiştir ancak MKH ve CAL62 hücrelerinin ko-kültüründe IL-2'nin antiproliferasyonu desteklediği gözlemlenmiştir.



Çizim 4.7 CAL62 hücrelerinin MKH'ler ile 24 saatlik ko-kültürü sonucunda yapılan WST-1 testi ile proliferasyon durumlarının belirlenmesi.

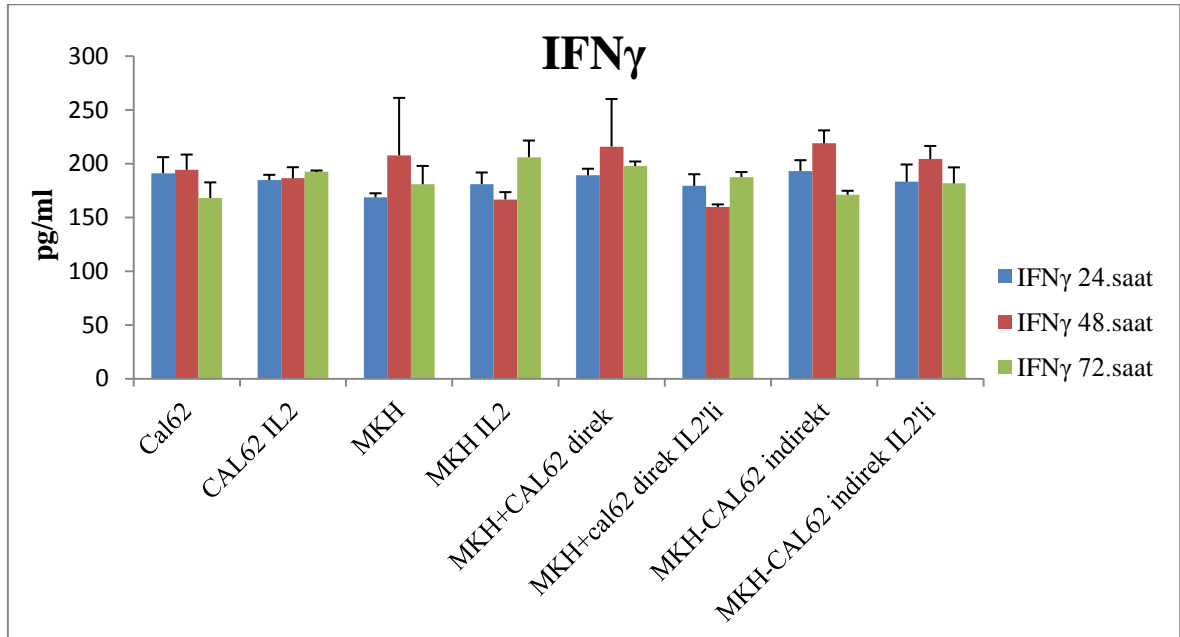


Çizim 4.8 CAL62 hücrelerinin MKH'ler ile 48 saatlik ko-kültürü sonucunda yapılan WST-1 testi ile proliferasyon durumlarının belirlenmesi



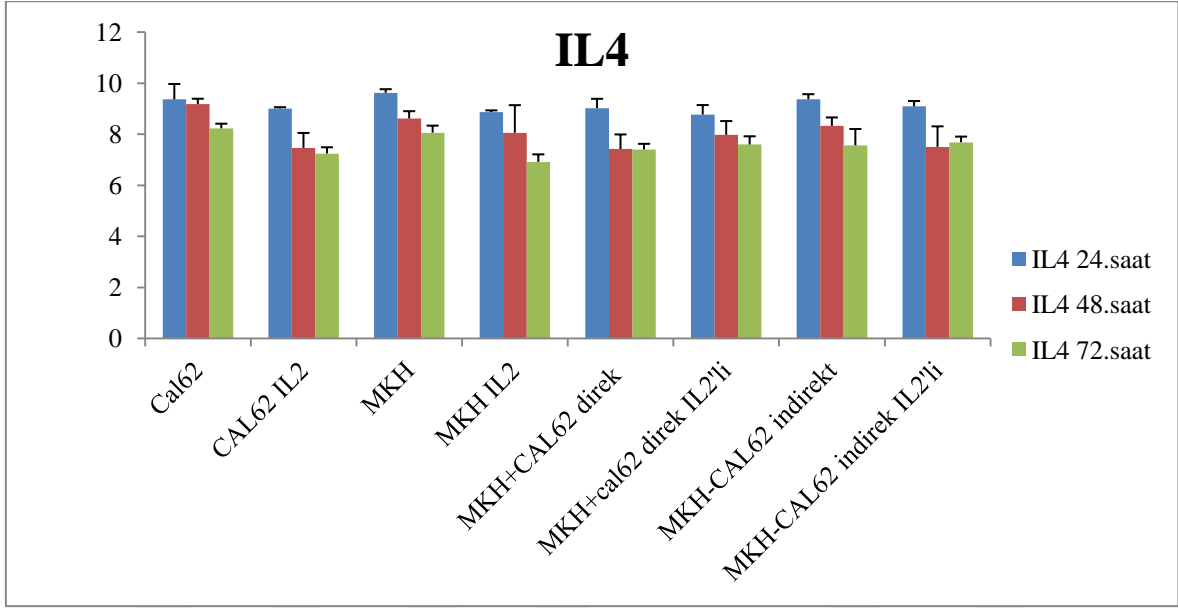
Çizim 4.9 CAL62 hücrelerinin MKH'ler ile 72 saatlik ko-kültürü sonucunda yapılan WST-1 testi ile proliferasyon durumlarının belirlenmesi

4.6. ELIZA Analizi



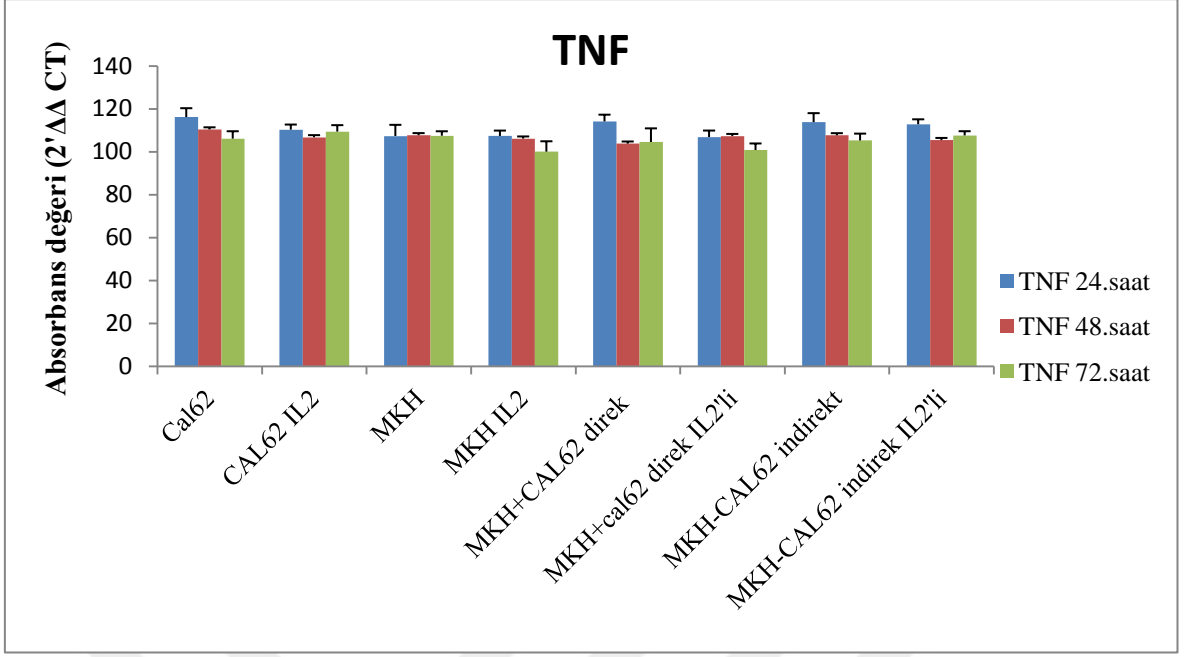
Çizim 4.10: Kültür ortamına salınan IFN γ 'nın Eliza yöntemi ile miktar tayini (pg/ml)

IL-2 eklenmiş ve eklenmemiş grupların interferon gama (IFN γ) ölçümleri ELISA testi ile yapıldı. 48. saatte kültür süpernatantlarından elde edilen ELISA sonuçlarına göre proinflamatuvar sitokinlerden IFN γ miktarında, IL2 ile uyarılmış MKH'lerle direk ko-kültüre edilen CAL62'li grupta daha anlamlı azalma göstermiştir. (T-TEST)



Çizim 4.11: Kültür ortamına salınan IL-4 'ün Eliza yöntemi ile miktar tayini (pg/ml)

IL4 için 48. saatte CAL62 IL-2 içeren besiyeri ile kültüre edildiğinde hem direkt hem de indirekt kültürde anlamlı azalmalar gösterdi. 72. saatte benzer sonuçlar görüldü.



Çizim 4.12: Kültür ortamına salınan TNF 'in Eliza yöntemi ile miktar tayini (pg/ml)

TNF için 24. saattede anlamlı düşüşler tespit edildi. 24. saat ve 48. saat için sadece IL-2 ile uyarılmış CAL62'lerde anlamlı düşüş varken 72. saatte sadece uyarılmış CAL62 ve MKH'nin IL-2 ile kültüründe anlamlı düşüş saptandı.

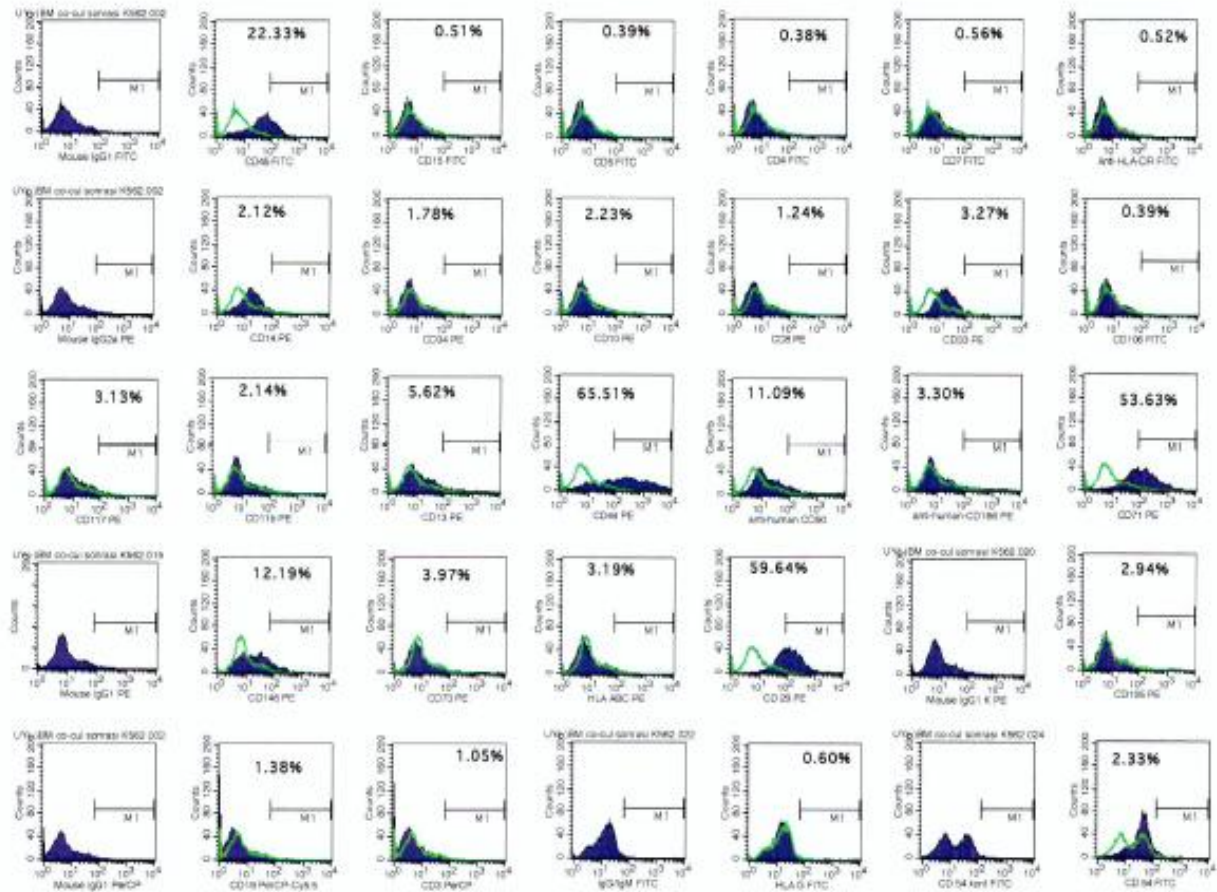
4.7. Telomeraz aktivite tayini

Çizelge 4.2'de görüldüğü gibi, IL-2'li ve IL-2'siz ortamlarda ko-kültür öncesi ve sonrasında CAL62 hücrelerinin telomeraz enzim aktivitelerindeki değişim anlamlı değildir. (RTA > 50 pozitif TRAP)

Çizelge 4.2 Telomeraz aktivitesi ölçüm sonucu.

CAL62	Rölatif Telomeraz Aktivite
Kültür Öncesi	300 RTA (Pozitif)
IL-2'siz indirekt	268 RTA (Pozitif)
IL-2'li indirekt	267 RTA (Pozitif)

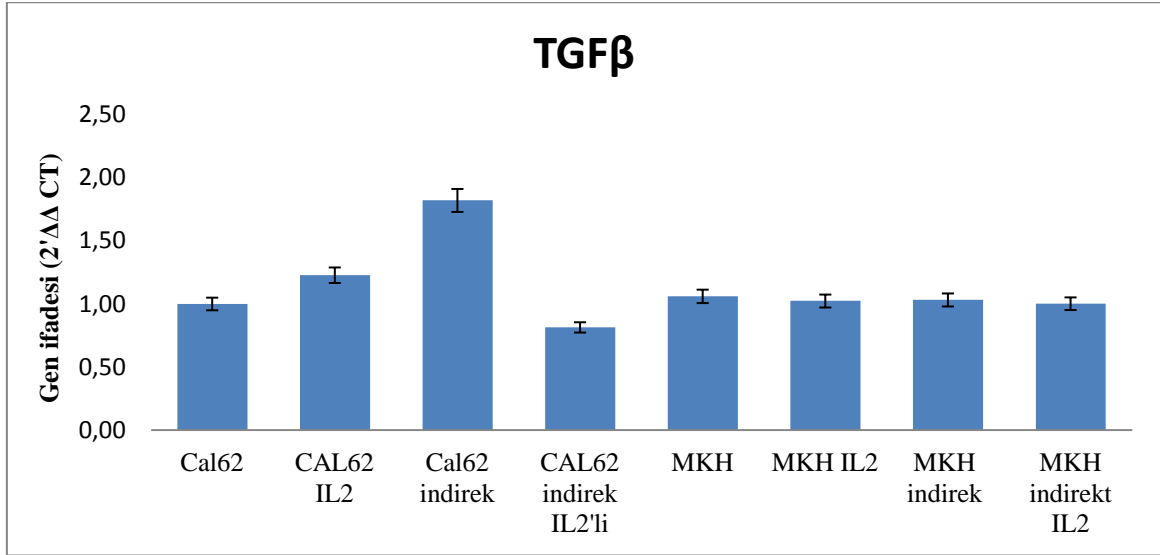
4.8. Ko-kültür Öncesi ve Sonrası CAL62 Hücrelerinin Akım Sitometrik Analizi



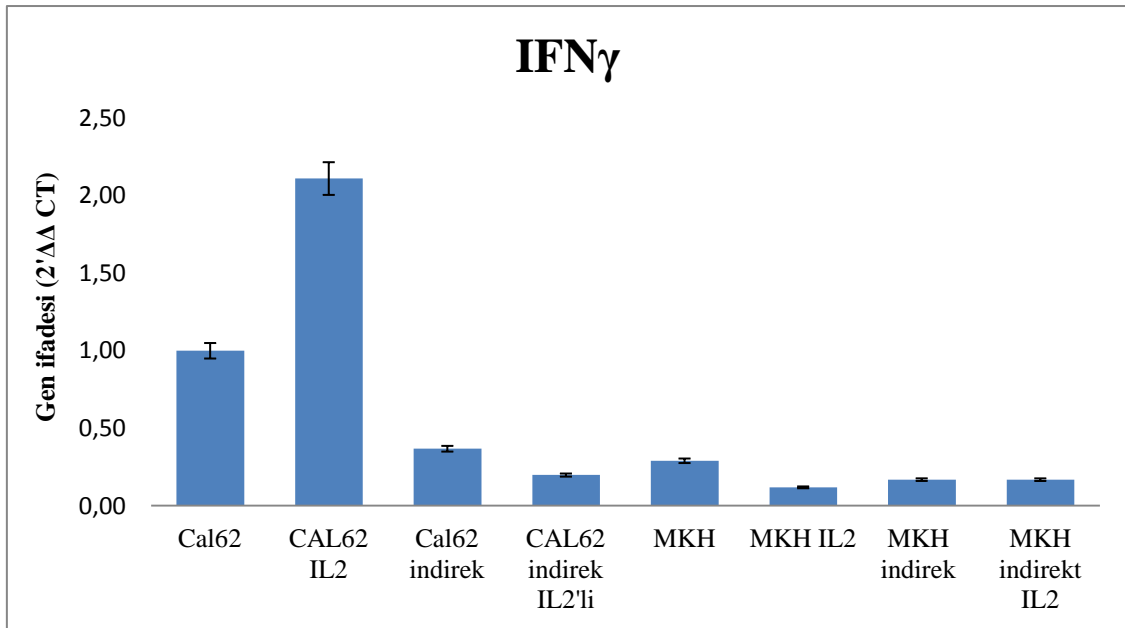
Çizim 4.13 Ko-kültür öncesi CAL62 hücrelerinin karakterizasyonu

4.9. Gerçek zamanlı PZR ile Gen Ekspresyon Analizi

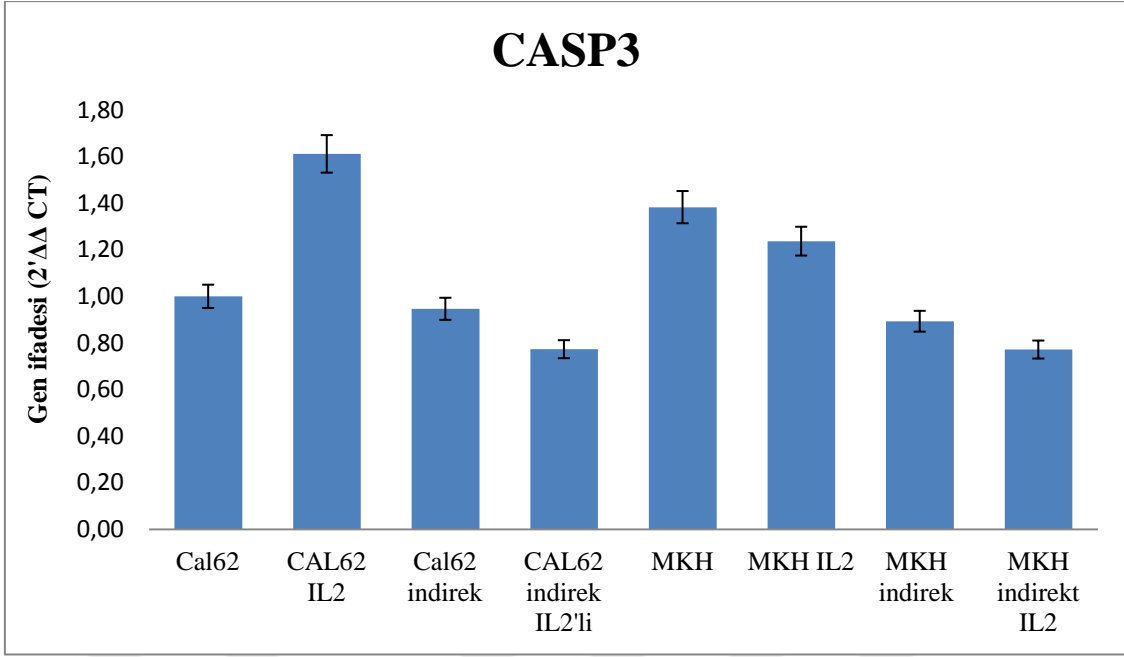
4.9.1. CAL62 Kontrol Gruplarına Göre tüm kültür gruplarının Gerçek Zamanlı PZR Analizi



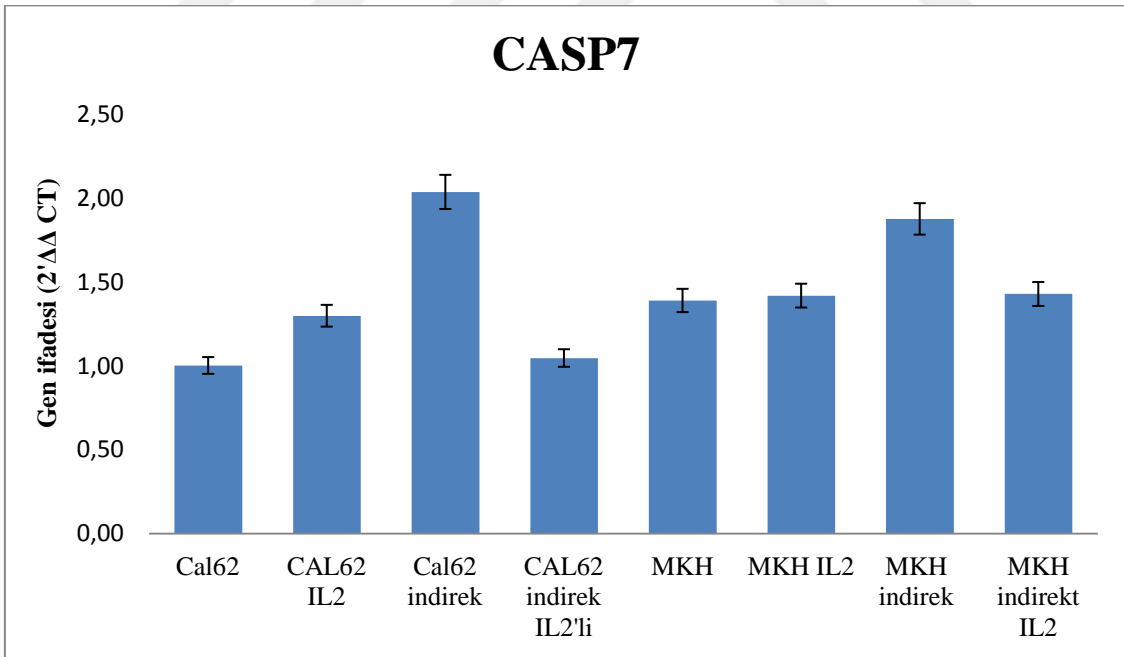
Çizim 4.14: TGFb gen ifadesinin gerçek zamanlı PZR ile analizi.



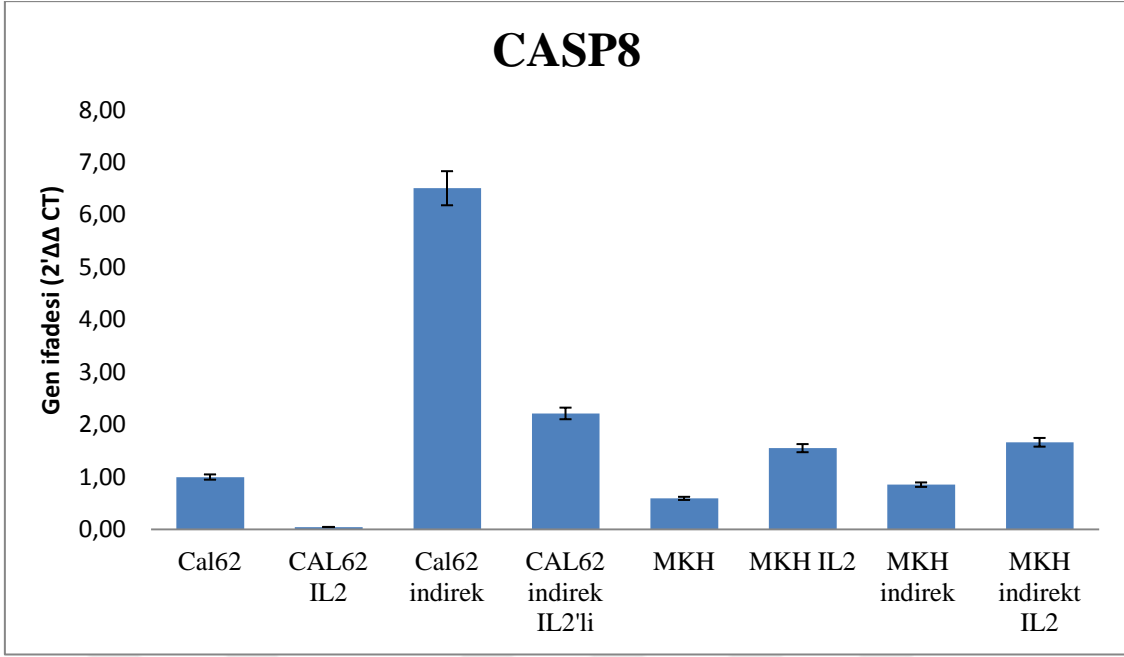
Çizim 4.15: IFNγ gen ifadesinin gerçek zamanlı PZR ile analizi.



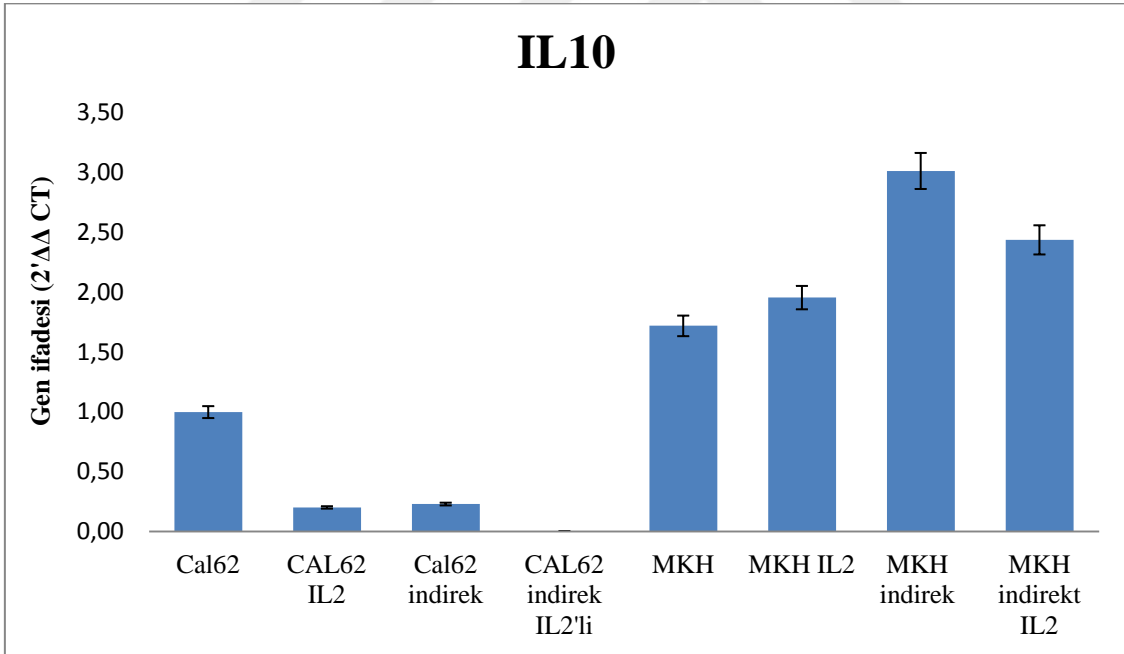
Çizim 4.16: CASP3 gen ifadesinin gerçek zamanlı PZR ile analizi.



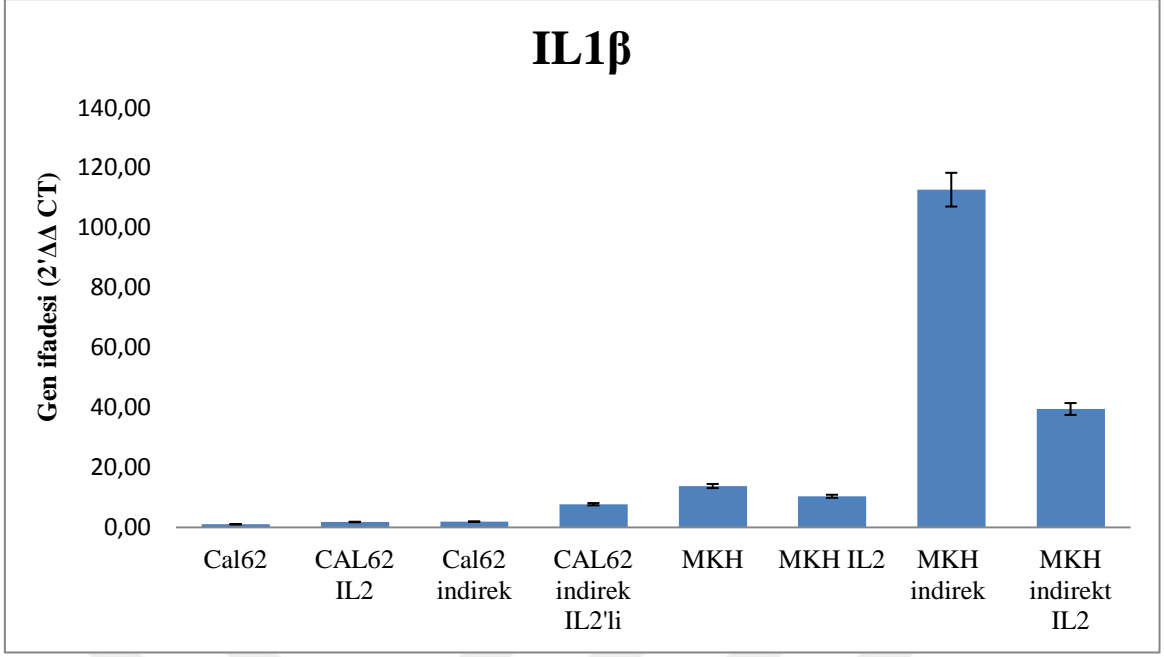
Çizim 4.17: CASP7 gen ifadesinin gerçek zamanlı PZR ile analizi.



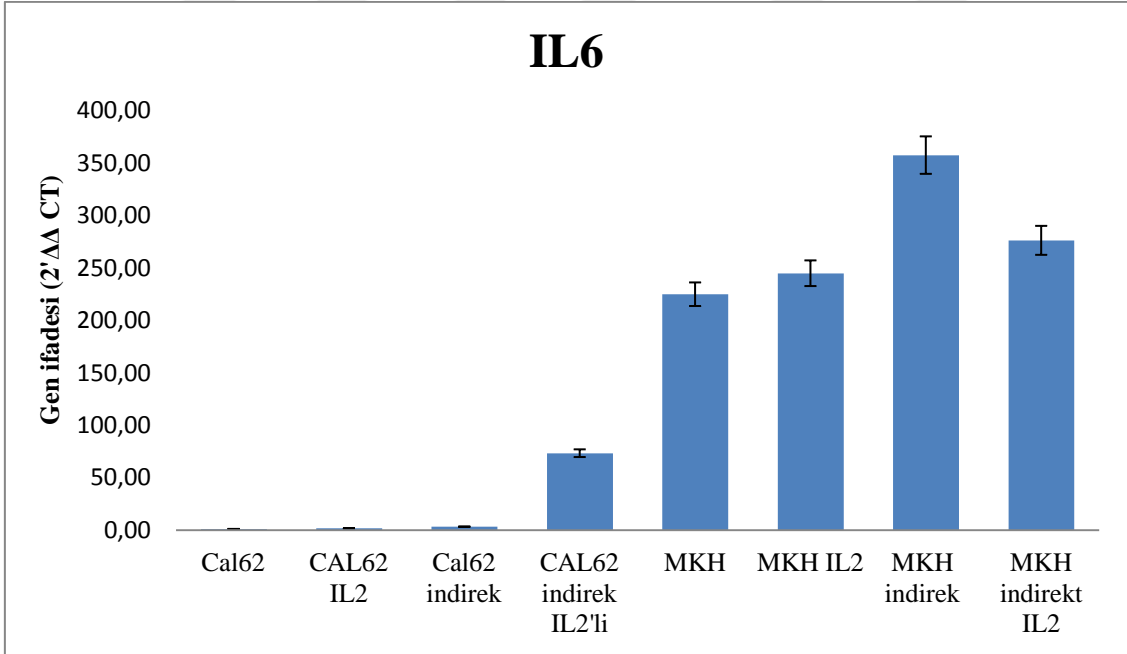
Çizim 4.18 CASP8 gen ifadesinin gerçek zamanlı PZR ile analizi.



Çizim 4.19 IL10 gen ifadesinin gerçek zamanlı PZR ile analizi.



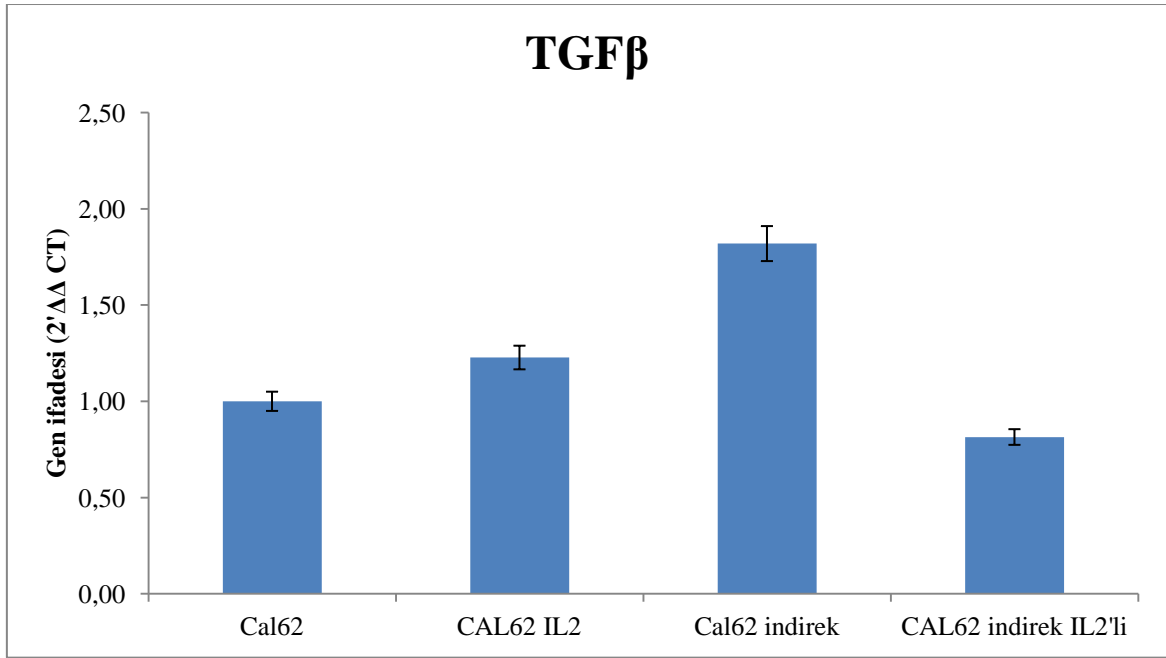
Çizim 4.20 IL1 β gen ifadesinin gerçek zamanlı PZR ile analizi.



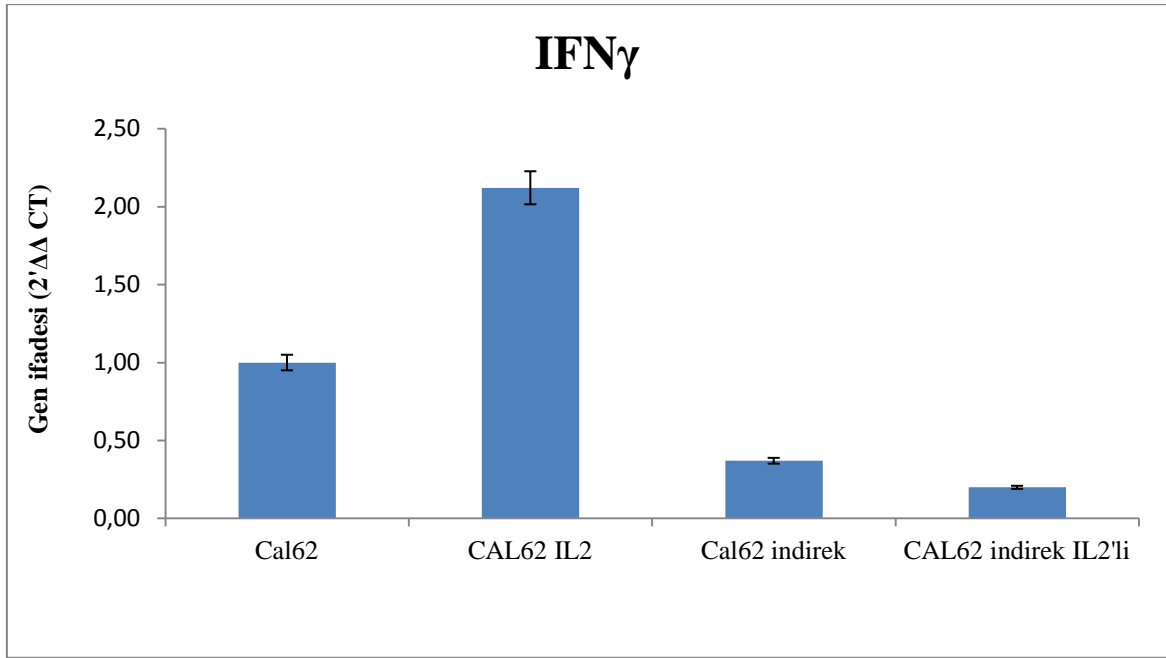
Çizim 4.21 IL6 gen ifadesinin gerçek zamanlı PZR ile analizi.

4.9.2. CAL62 kontrol gruplarına göre Gerçek Zamanlı PZR analizi

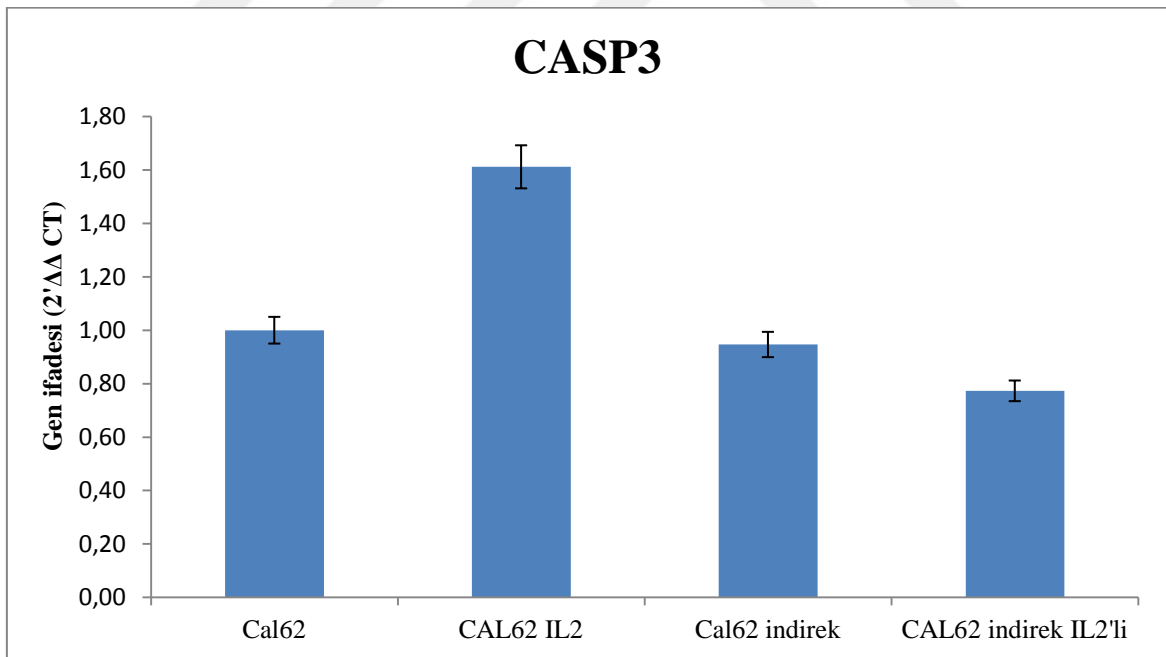
CAL62 kanser hücre hattı üzerinde IL-2 ve MKH etkilerini göstermek için; tek başına CAL62 kültürü kontrol alınarak, CAL62 IL2, CAL62 indirek (MKH ile ayırıcı bölmelerle kültüre edilen grup) ve CAL62 indirek IL2 (IL2 ile uyarılmış MKH ile ayırıcı bölmelerle kültüre edilen grup) gruplarında TGF β , IFN γ , CASP3, CASP7, CASP8, IL1 β , 10 ve IL-6 gen ifadelerinde meydana gelen değişimler değerlendirildi.



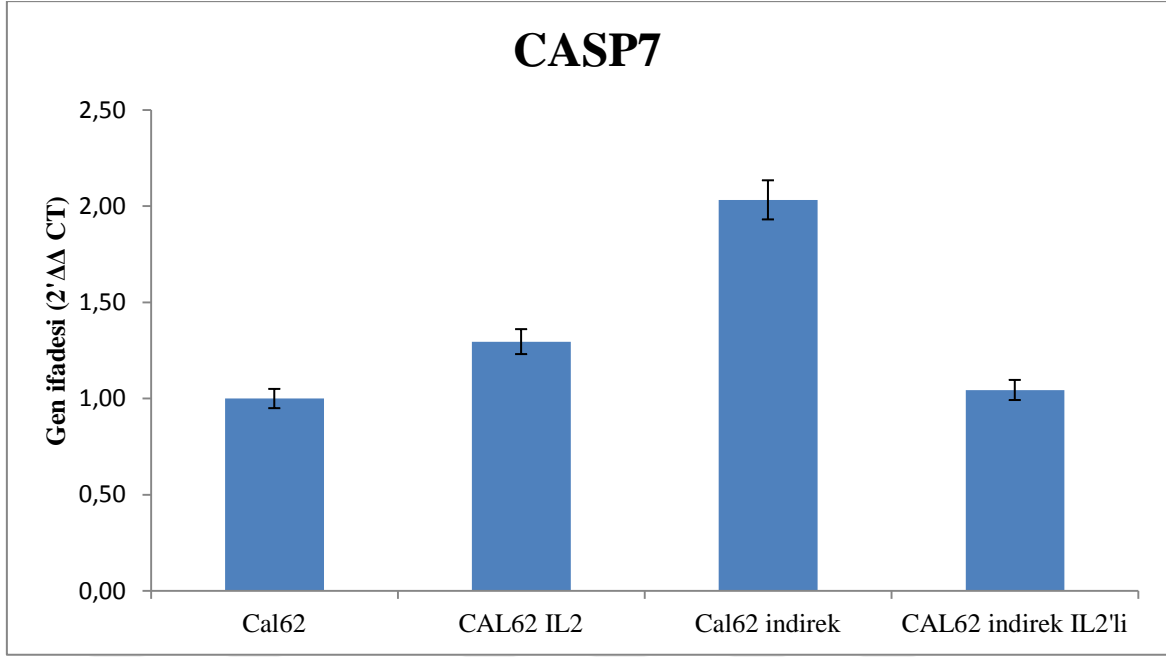
Çizim 4.22 CAL62 kontrol gruplarına göre TGF β gen ifadesinin gerçek zamanlı PZR ile analizi.



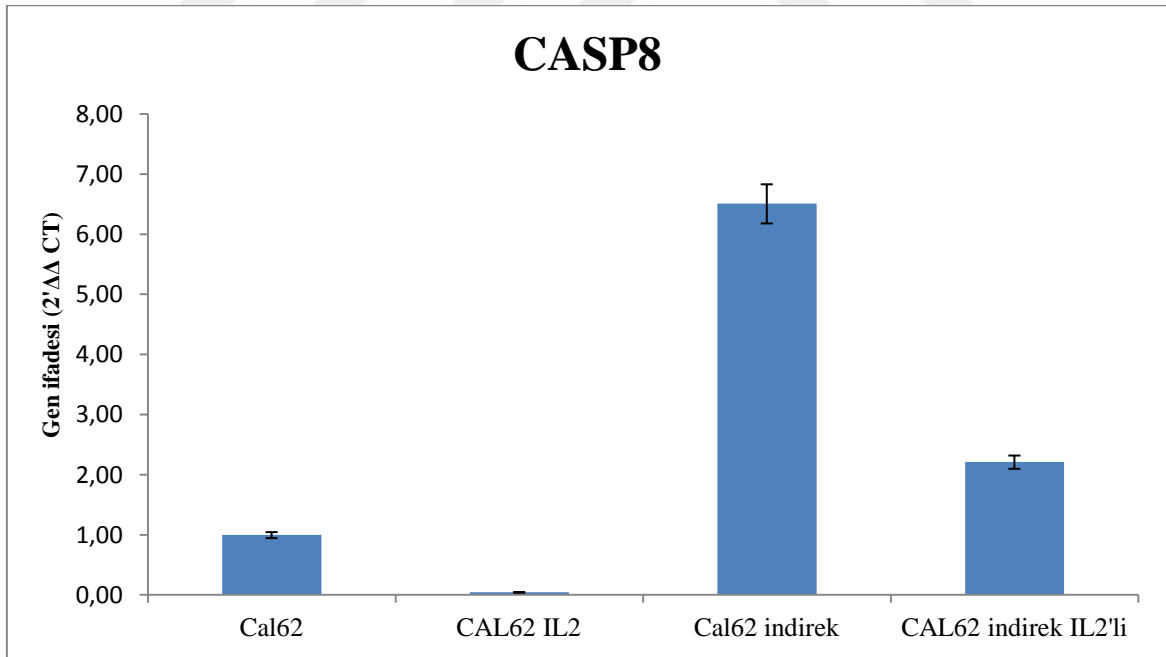
Çizim 4.23 CAL62 kontrol gruplarına göre IFN γ gen ifadesinin gerçek zamanlı PZR ile analizi.



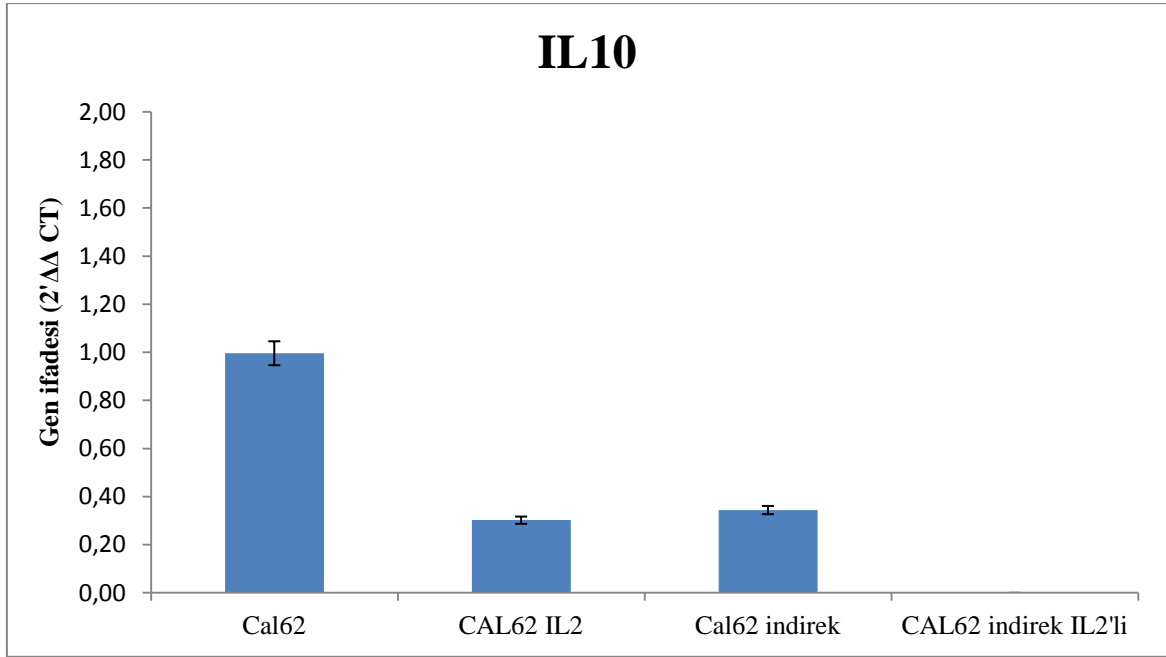
Çizim 4.24 CAL62 kontrol gruplarına göre CASP3 gen ifadesinin gerçek zamanlı PZR ile analizi.



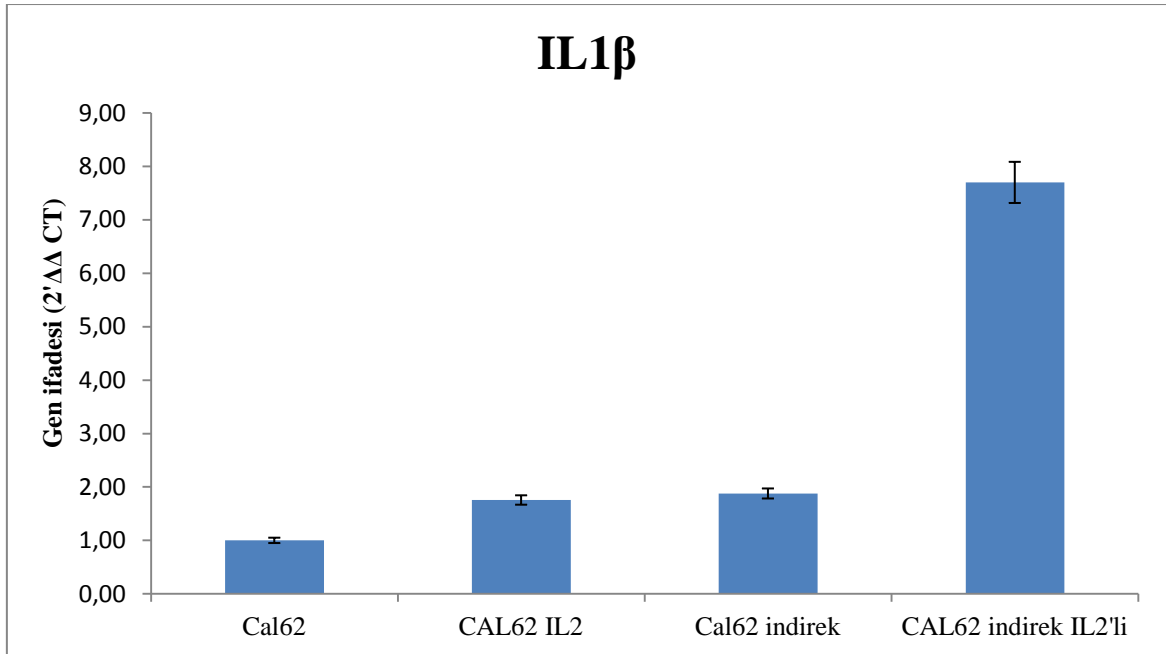
Çizim 4.25 CAL62 kontrol gruplarına göre CASP7 gen ifadesinin gerçek zamanlı PZR ile analizi.



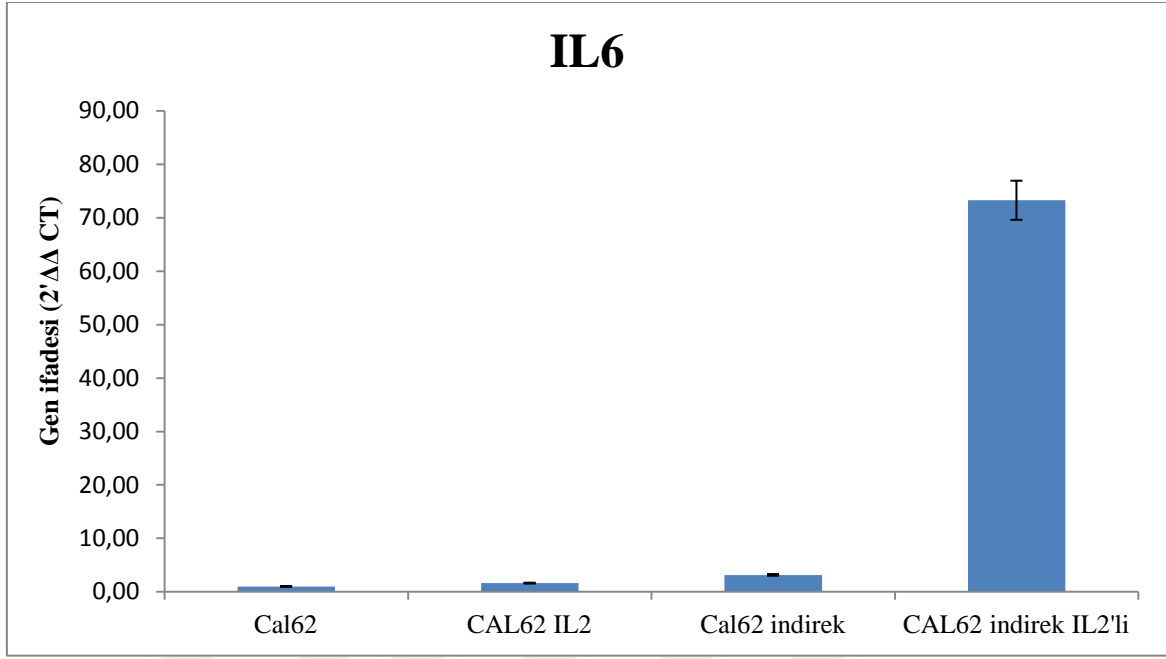
Çizim 4.26 CAL62 kontrol gruplarına göre CASP8 gen ifadesinin gerçek zamanlı PZR ile analizi.



Çizim 4.27 CAL62 kontrol gruplarına göre IL10 gen ifadesinin gerçek zamanlı PZR ile analizi.



Çizim 4.28 CAL62 kontrol gruplarına göre IL1β gen ifadesinin gerçek zamanlı PZR ile analizi.



Çizim 4.29 CAL62 kontrol gruplarına göre IL6 gen ifadesinin gerçek zamanlı PZR ile analizi.

5. TARTIŞMA

Ortak kültür sistemleri, hücreler arasındaki etkileşimleri incelemek için uzun yıllardır kullanılmaktadır. Ortak kültür sistemleri iki ya da daha fazla hücre popülasyonunun belirli derecelerde temas etmelerine izin veren, *in-vivo* çalışmaların taklit edildiği bir hücre yerleştirme tekniğidir. Ortak kültür sistemleri; popülasyonlar arasındaki doğal etkileşimlerin incelenmesi (*Cottet ve diğ. 2002*), belirli hücre popülasyonları için kültür başarısının geliştirilmesi (*Jessup ve diğ. 2004-Tanouchi ve diğ. 2012*) ve hücre popülasyonları arasında sentetik etkileşimlerin kurulması amacıyla kullanılır (*Moraes ve diğ. 2011-Kim 2005*).

Hücrelerin birbirleri ile ortak kültür deneylerinin yapılabilmesi için deneylerin amaçlarına göre çeşitli ko-kültür sistemleri tasarlanmıştır. (1) Hücre popülasyonlarının bulunduğu bölümleri ayıran sıvı kanal bağlantısının ya da membranların bulunduğu ve damlalar aracılığıyla hücrelerin ayrı ayrı tutulabildiği sistemler olan mikrofluodik sistemler, (2) kolonilerin ayrı ayrı konumlandığı petri kabı sistemleri, (3) damlacıklar içinde gaz madde değişiminin mümkün olduğu katı destek sistemleri, (4) hücrelerin bulunduğu bölmeler arasında opsiyonel ayırmayı sağlayan biyoreaktör sistemleri ve (5) hücrelerin geçemeyeceği büyüklükte porlara sahip aparatlara sahip transwell sistemler ortak kültür sistemleridir (*Goers ve diğ. 2014*).

Yaptığımız çalışmada, mezenkimal kök hücrelerin ve CAL62 anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin bir kısmı hücre-hücre temasının sağlanması için direkt olarak ko-kültüre edilirken bir kısmı da sadece hücrelerin temas etmesini engelleyen ancak madde alış-verişini engellemeyen transwell sistemi kullanılarak indirekt ortak kültüre alınmıştır. Deney gruplarından bazılarında interlökin-2 eklenirken bazı gruplara eklenmemiştir. Buradaki amaç mezenkimal kök hücrelerin CAL62 hücreleri üzerine olası sitotoksik etkilerinin mezenkimal kök hücrenin kendisinden mi kaynaklandığını yoksa interlökin-2 sitokininin mi kaynaklandığı sorusuna cevap bulmaktır. Ayrıca ko-kültür sistemlerinin direkt ve indirekt olarak kurulması ile mezenkimal kök hücrelerin CAL62 hücreleri üzerine olası sitotoksik etkilerinin hücre-hücre temasında mı yoksa temas etmeksizin mi daha etkili olduğunun anlaşılabilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda kemik iliği materyalinden izole edilmiş olan MKH'ler karakterizasyon için flow sitometrik analizden geçirildi. Analiz sonuçlarına göre CD10, CD13, CD29, CD44, CD71, CD73, CD90 ve CD105 gibi MKH belirteçleri pozitif

çıkarken CD33, CD34, CD45 ve HLA-G negatif çıkmıştır. Bu sonuçlar kullandığımız hücrelerin mezenkimal kök hücre karakterine sahip olduğunu göstermektedir. Osteojenik ve adipojenik farklılaşmalarını, mikroskop altındaki morfolojileri ve kültür kabının yüzeyine yapışmaları da kullandığımız hücrelerin mezenkimal kök hücreler olduğunu ispatlamaktadır.

Kullandığımız CAL62 anaplastik tiroid kanseri hücre hattının karakterizasyonu için de belirli yüzey belirteçleri flow sitometri cihazıyla saptanmıştır. Bu analiz sonucunda, CAL62 hücrelerinin CD18, CD44, CD166, CD324, KI67 ve PCNA belirteçleri bakımından pozitif olduğu, CD24, CD31, CD34, CD38, CD133, CD309, CD325 ve CD338 belirteçleri bakımından negatif olduğu gösterilmiştir.

Bu çalışmada mezenkimal kök hücrelerin tek başlarına ve sitokin ile birlikte anaplastik tiroid kanseri hücreleri üzerine etkileri incelenmiştir.

Mezenkimal kök hücreler, adiposit, osteoblast, kondrosit, miyosit gibi birçok hücre tipine farklılaşma potansiyeline sahip multipotent hücreler olmalarının yanı sıra immün yanıtı düzenleme özelliğine de sahiptir. İmmün sistem hücrelerinin çoğalmasını baskılayarak immün sistem hücrelerinin gerektiğinden fazla reaksiyon göstermesini engeller. Bu sayede otoimmün reaksiyonların önüne geçer.

Mezenkimal kök hücreler ile kanser hücreleri arasındaki ilişkiyi açıklayabilmek için birçok çalışma yapılmıştır. Bazı çalışmalarda MKH'lerin kanser hücrelerini desteklediği bazı çalışmalarda ise baskıladığı gözlemlenmiştir. MKH'lerin kanser hücrelerini destekledikleri çeşitli mekanizmalar vardır. Bu mekanizmalar; tümörle ilişkili fibroblastlara geçiş, immün yanıtın baskılanması, anjiyogenezin teşvik edilmesi, epitelyal-mezenkimal geçişin (EMT) uyarılması, tümör mikroçevresine destek ve kanser hücrelerinin metastaz yapmalarına destek olarak sıralanabilir. MKH'lerin tümör gelişimini baskılama mekanizmaları ise inflamatuvar infiltrasyonun arttırılması, anjiyogenezin inhibe edilmesi ve Wnt yolağının baskılanması aracılığıyla tümör gelişiminin inhibe edilmesi olarak gösterilebilir (*Rhee ve diğ. 2015*)

Kanser hücreleri kontrolsüz ve hızlı çoğalan hücrelerdir. (*Hanahan ve Weinberg 2011*) Bu nedenle, hücrelerin DNA'sını replike ettiği S fazındaki ve çoğalmaya geçtiği G2 fazındaki hücre sayısı fazladır (*Giuffrida ve diğ. 2010*). Bu verilerle uyumlu olarak, kültür öncesi CAL62 hücrelerinin akım sitometri cihazı ile yapılan hücre döngüsü analizine göre S evresinde ve G2 evresinde bulunan hücre yüzdesi yüksektir. Deney grupları ve analiz saatlerinin karşılaştırıldığı analiz sonuçlarına göre, CAL62 hücreleri ile MKH'nin indirekt

ko-kültüründe 24.saatin sonunda S ve G2 fazında azalma olduğu görülmektedir. 48.saate sonunda G1 fazının arttığı gözlemlenmiştir. Bu da CAL62 hücrelerinin G1 fazında bekletildiğini göstermektedir.. Ayrıca, G2 fazında hücre olmaması hücrelerin proliferasyon hızının düştüğünü göstermektedir.CAL62 hücrelerinin MKH ile indirekt ko-kültüre edildiği ve IL-2 bulunan grupta ise yine G2 fazında bulunan CAL62 hücre yüzdesinin düştüğü ve G1 fazında bulunan hücre yüzdesinin arttığı gözlemlenmiştir. Bu veriye göre, CAL62 hücrelerinin proliferasyon hızının IL-2 ile uyarılmış MKH tarafından baskılandığı belirlenmiştir. CAL62 hücrelerinin IL-2'li ortamda 24.saatin sonunda çok az da olsa G1 fazında artış görülmektedir. Ayrıca G2 fazının ve S fazının yüzdelere düştüğü tespit edilmiştir. IL-2'nin CAL62 hücrelerinin proliferasyon hızını düşürdüğü gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, CAL62 hücrelerinin MKH ve IL-2 bulunan ortamlarda, proliferasyon hızlarının düştüğü söylenebilir.

Çalışmamızda yaptığımız canlılık testine (WST-1) göre 24. saatte MKH, CAL62 ve IL-2'nin bulunduğu indirekt grup ile MKH ve CAL62'nin bulunduğu indirekt gruplar karşılaştırıldığında CAL62 hücrelerinin proliferasyonlarında anlamlı bir azalma gözlenmemektedir. Ancak IL-2, MKH'nin proliferasyonunu arttırmıştır. 24. saat için CAL62'nin en çok antiproliferatif etkiyle karşılaştığı grubun MKH, CAL62 ve IL-2'nin bir arada olduğu direkt ko-kültür olduğu düşünülmektedir.

48.saate incelendiğinde IL-2'nin CAL62 hücrelerine karşı antiproliferatif etki gösterdiği gözlemlenmiştir. MKH proliferasyonunun yine arttığı görülmektedir. Ancak MKH, CAL62 ve IL-2'nin bulunduğu indirekt grupta MKH proliferasyonunun azaldığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda CAL62 proliferasyonunda da azalma meydana gelmiştir. Bu durumda MKH'nin CAL62 ile IL-2 bulunmayan direkt ve indirekt ortamlarda karşılıklı olarak proliferasyonlarının azaldığı ancak CAL62'nin MKH'ye göre daha az çoğaldığı görülmüştür. Aynı grupların indirekt gruplarla karşılaştırılması durumunda CAL62 hücrelerinin proliferasyonlarının, direkt ko-kültürde indirekt ko-kültüre göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. MKH'lerin hücre hücre teması olduğunda CAL62 hücreleri üzerine antiproliferatif etkilerinin daha fazla olduğu söylenebilir. 48. saat için CAL62'nin en çok antiproliferatif etkiyle karşılaştığı grubun MKH, CAL62 ve IL-2'nin bir arada olduğu direkt ko-kültür olduğu düşünülmektedir.

72. saat incelendiğinde IL-2'nin CAL62 hücrelerinin çoğalmasını baskıladığı gözlemlenmiştir. IL-2, MKH proliferasyonunu arttırmıştır. CAL62 hücreleri ile MKH'lerin indirekt ko-kültüründe hem CAL62 hücrelerinin hem de MKH'nin proliferasyonunda azalma görülmektedir. Ancak kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında CAL62 hücrelerinin

MKH'ye göre daha az çoğaldığı görülmektedir. Bu veriye göre MKH'nin indirekt ko-kültürde IL-2 ile uyarılmaksızın CAL62 hücrelerinin çoğalmasını baskıladığı söylenebilir. MKH'nin IL-2 ile uyarıldığı indirekt ortamda bir miktar çoğaldığı, CAL62'nin ise azaldığı gözlemlenmiştir. 72. saat için CAL62'nin en çok antiproliferatif etkiyle karşılaştığı grubun MKH, CAL62 ve IL-2'nin bir arada olduğu direkt ko-kültür olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak, IL-2 varlığında CAL62 hücrelerinin proliferasyonunun düştüğü, MKH'nin proliferasyonunun ise arttığı söylenebilir. MKH'nin IL-2 ile uyarılmaksızın CAL62 hücrelerinin çoğalmasını baskılayabildiği ancak IL-2 varlığında MKH'nin, CAL62 hücrelerinin çoğalmasını daha çok baskıladığı tespit edilmiştir. Ayrıca, indirekt ve direkt ko-kültürlerin CAL62 proliferasyonundaki rolleri karşılaştırıldığında direkt ko-kültürde CAL62 hücrelerinin daha az çoğaldığı gözlemlenmiştir.

ELISA testleri analiz edildiğinde, proinflamatuvar bir sitokin olan IFN γ 'nin miktarlarının en düşük olduğu grubun 48. saatte, IL-2, MKH ve CAL62'nin direkt ko-kültüre edildiği grup olduğu tespit edilmiştir. Sitokinlerle uyarılan MKH'nin IFN γ ve IL-4 sitokini salgılayarak apoptoziste rol oynadığını ileri süren çalışmalar mevcuttur (*Kang ve diğ. 2005*). IL4 için 48. saatte CAL62 IL-2 içeren besiyeri ile kültüre edildiğinde hem direkt hem de indirekt kültürde anlamlı azalmalar olduğu saptandı. 72. saatte de benzer sonuçlar görüldü. Ancak IL-4 için sadece IL-2 ile kültüre edilen CAL62'lerde azalma görülmesi inflamatuvar sitokinindeki azalmanın sadece MKH'lerden kaynaklı olabileceğini kanıtlamamaktadır. TNF için 24. saatte anlamlı düşüşler olduğu gözlemlendi. 24. saat ve 48. saat için sadece IL-2 ile uyarılmış CAL62'lerde anlamlı düşüş varken 72. saatte sadece uyarılmış CAL62 ve MKH'nin IL-2 ile kültüründe anlamlı düşüş saptandı.

Gerçek zamanlı PZR sonuçları analiz edildiğinde, TGF β miktarında indirekt ko-kültürde MKH'nin etkisiyle anlamlı bir artış olduğu görülmektedir. Proinflamatuvar sitokin IFN γ miktarında ise genel olarak MKH ile ilişkili olan tüm gruplarda düşüş gözlemlenmiştir. CASP7, sistein-aspartik asit proteazı (kaspaz) ailesinin bir üyesini kodlar. Kaspazların ardışık aktivasyonu, hücre apoptozunun yürütme evresinde merkezi bir rol oynar. Kaspazlar, aktif enzimi oluşturmak üzere dimerize olan büyük ve küçük iki alt-birim üretmek için korunmuş aspartik artıklarda proteolitik işleminden geçirilen aktif olmayan proenzimler olarak bulunurlar. Kodlanan proteinin prekürsörü kaspaz 3 ve 10 tarafından yarılr, hücre ölüm uyarıcıları üzerinde aktive edilir ve apoptozu uyarır. Bu gen için çoklu izoformları kodlayan, alternatif olarak eklenmiş transkript varyantları gözlemlenmiştir. CASP7 miktarında, CAL62 ve MKH'nin hem direkt hem de indirekt ko-

kültürlerinde yüksek düzeyde ekspresyon tespit edilmiştir. Bu da kanser hücrelerinin apoptozise yönlendirildiğini göstermektedir.

CASP8 ekspresyon düzeyinin, CAL62 hücrelerinin MKH'lerle indirekt ko-kültüründe anlamlı olarak yükselmesi, apoptozisin MKH tarafından tetiklendiğini düşündürmektedir. IL-1b sitokini, interlökin 1 sitokin ailesinin bir üyesidir. Bu sitokin, aktive makrofajlar tarafından, propaner olarak üretilir ve kaspaz 1 (CASP1 / ICE) ile aktif formuna proteolitik olarak işlenir. Bu sitokin, enflamatuvar tepkinin önemli bir aracıdır ve hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptoz dahil çeşitli hücrel aktivitelere yer alır. Merkezi sinir sisteminde bu sitokinle siklooksijenaz-2 (PTGS2 / COX2) indüksiyonunun, inflamatuvar ağrı aşırı duyarlılığına katkıda bulunduğu bulunmuştur. IL-6 sitokini hücre içi sinyalleri uyararak inflamatuvar sitokinler üretimini sağlayan kaskadları tetikler. Böylece apoptozisi destekler. IL-10, metastaz oluşumunu inhibe edebilen bir sitokindir. (Zheng 1996) İndirekt ko-kültüre edilen MKH'de IL-1b, IL-6 ve IL-10 ekspresyonlarının yüksek çıkması MKH'lerin kanser hücreleri üzerine sitotoksik etki gösterdiğini ortaya koymuştur.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yaptığımız çalışmada, insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler karakterize edilip CAL62 hücreleriyle birlikte IL-2'li ve IL-2'siz ortamlarda ko-kültüre edildi. MKH'lerin CAL62 hücreleri üzerine antiproliferatif ve sitotoksik etkileri incelendi. Yapılan analizler neticesinde mezenkimal kök hücrelerin CAL62 hücreleri üzerine antiproliferatif etkileri ve sitotoksik etkileri olduğu gözlemlenmiştir.

Bu çalışma ile MKH'lerin tiroid kanserinin tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilebileceği gösterilmiştir. Ancak daha etkili ve verimli sonuçlar alınması için hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmaların artırılması gerekmektedir. Ayrıca MKH'lerin kanser hücrelerini öldürme mekanizmalarının aydınlatılması için moleküler yollar çalışılmalıdır.

Çalışmamızın bir sonraki hedefi farklı sitokinlerin farklı kombinasyonlarla kullanılması ve *in-vitro* deneylerin *in-vivo* olarak da incelenmesidir. Aradaki farklılıkların incelenmesi ile sitokinlerin etkinlikleri arasındaki farklar incelenebilecektir.

Bulgularımıza göre direkt kültürde MKH'lerin CAL62 hücreleri üzerine indirekt ko-kültür ile karşılaştırıldığında antiproliferatif etkilerinin daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle hücre-hücre temasının olmasının MKH'lerin antiproliferatif etkilerini arttırdığı düşünülmektedir.

Ayrıca gruplar incelendiğinde IL-2 ile uyarılmış MKH'lerin, IL-2 ile uyarılmamış MKH'lere göre CAL62 hücreleri üzerine daha fazla antiproliferatif etki gösterdiği gözlemlenmiştir.

KAYNAKÇALAR DİZİNİ

A Patient-Matched Comparison, *Journal of Orthopaedic Research* 23 (2005) 1383-1389

Bliss RD, Gauger PG, Delbridge LW, Surgeon's Approach to the Thyroid Gland: Surgical Anatomy and the Importance of Technique. *World J. Surg.* 2000, 24, 891-897

Caplan AI, Mesenchymal Stem Cell, *Journal of Orthopedic Research* 1991; 9:641-650

Cottet S, Corthésy-Theulaz I, Spertini F ve diğ. Microaerophilic conditions permit to mimic in vitro events occurring during in vivo *Helicobacter pylori* infection and to identify Rho/Ras-associated proteins in cellular signaling. *J Biol Chem.* 2002 Sep 13;277(37):33978-86.

Friedenstein AJ, Piatetzky I, Petrakova KV, Osteogenesis İn Transplants Of Bone Marrow Cells. *Embryol. exp. Morph.*, Vol. 16, 3, pp. 581-390, 1966

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, and Lalykin KS, The Development Of Fibroblast Colonies In Marrow And Spleen Cells Monolayer Cultures Of Guinea-Pig. *Cell Tissue Kinet.* 1970; 3, 393-403.

Gillis S, Baker PE, Ruscetti FW ve diğ. Long-term culture of human antigen-specific cytotoxic T-cell lines. *J Exp Med. J Exp Med.* 1978 Oct 1;148(4):1093-8.

Giuffrida D, Rogers I.M, Nagy A ve diğ. Human embryonic stem cells secrete soluble factors that inhibit cancer cell growth. *Cell Proliferation.* 2009; 42:788-798.

Goers L, Freemont P ve Polizzi KM, Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. *J R Soc Interface.* 2014 6;11(96). pii: 20140065

Hanahan D ve Weinberg RA, Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-74

Huang JI, Kazmi N, Durbhakula MM ve diğ. Chondrogenic potential of progenitor cells derived from human bone marrow and adipose tissue: a patient-matched comparison. *J Orthop Res.* 2005 Nov;23(6):1383-9.

Jessup CM, Kassen R, Forde SE ve diğ. Big questions, small worlds: microbial model systems in ecology. *Trends Ecol Evol.* 2004 Apr;19(4):189-97.

Hua J, Qiu P, Zhu H ve diğ. Multipotent mesenchymal stem cells (MSCs) from human umbilical cord: Potential differentiation of germ cells. *African Journal of Biochemistry Research* Vol. 2011; 5(4), pp. 113-123

Kang SG, Jeun SS, Lim JY ve diğ. Cytotoxicity of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells against human malignant glioma cells. *Child's Nerv Syst* 2008;24(3):293-302

Kang SG, Jeun SS, Lim JY, ve diğ. Cytotoxicity of rat marrow stromal cells against malignant glioma cells. *Child's Nerv Syst* 2005;21(7):528-38.

Kim JB, Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. *Semin Cancer Biol.* 2005; 15(5):365-77

Liao W, Lin JX ve Leonard WJ, IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Curr Opin Immunol.* 2011 Oct;23(5):598-604.

Moraes C, Mehta G, Leshner-Perez SC ve diğ. Organs-on-a-chip: a focus on compartmentalized microdevices. *Ann Biomed Eng.* 2012;40(6):1211-27

Morgan DA, Ruscetti FW ve Gallo RC. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrow. *Science.* 1976 Sep 10;193(4257):1007-8

Nix P, Nicolaides A ve Coatesworth AP, Thyroid Cancer Review 1: Presentation And Investigation Of Thyroid Cancer. *Blackwell Publishing Ltd Int J Clin Pract*, November 2005, 59, 11, 1340-1344

Rhee KJ, Lee JI ve Eom YW, Mesenchymal Stem Cell-Mediated Effects of Tumor Support or Suppression. *Int J Mol Sci.* 2015; 16(12): 30015–30033

Schäffler A, Buchler C. Concise Review: Adipose Tissue-Derived Stromal Cells Basic and Clinical Implications for Novel Cell-Based Therapies. *AlphaMed Press* 2007; 1066-5099

Takahashi K ve Yamanaka S, Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell.* 2006; 25;126(4):663-76. Epub

Tanouchi Y, Smith RP ve You L, Engineering microbial systems to explore ecological and evolutionary Dynamics. *Curr Opin Biotechnol.* 2012;23(5):791-7.

Zheng LM, Ojcius DM, Garaud F ve diğ. Interleukin-10 inhibits tumor metastasis through an NK cell-dependent mechanism. *The Journal of Experimental Medicine.* 1996; 184 (2): 579–84.



ÖZGEÇMİŞ

1. Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı: Bulut YURTSEVER
Doğum yeri ve tarihi: Bingöl 20.02.1990
Uyruğu: T.C.
Medeni durumu: Bekar
İletişim adresi: Ahmediye Mah. Namık Paşa Sok. 12/13
Telefon: +(90) 507 212 17 76

2. Eğitimi (tarih sırasına göre)

09.2015-Devam ediyor **Yüksek Lisans**

Kocaeli Üniversitesi, Kök Hücre AD.

Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı

Kocaeli – TÜRKİYE

09.2009-09.2014 **Lisans**

Atatürk Üniversitesi

Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Erzurum – TÜRKİYE

09.2004-06-2008 **Lise**

Bingöl Anadolu Lisesi

Fen Bilimleri

Bingöl– TÜRKİYE

Yabancı Dili: İngilizce

3. Bilimsel Etkinlikler

a) Uluslararası bilimsel etkinliklere poster bildirileri

- CD19 Spesifik Transgenik Car-T Hücre Üretimi Labcell/Türkiye Verileri, Sunum, P6, III. Ulusal Kan Ve Kemik İliği Nakli Kongresi, 29-31 Mart 2018
- İnterlökin-2 ile Uyarılmış Mezenkimal Kök Hücrelerin Tiroid Kanseri Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkilerinin İncelenmesi, Sözlü Sunum, P7, III. Ulusal Kan ve Kemik İliği Nakli Kongresi, 29-31 Mart 2018
- Kanser Tedavisinde Sitotoksik Hücrelerin Rolü ve (CIK/NK/TIL) Üretim Modelleri, Sözlü Sunum, Hücrel İmmünoterapi Sempozyumu, 20-22 Ekim 2017

EKLER

Ek 1. İnsan kemik iliği kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerinin kullanımı için etik kurul onay belgesi

Karar Bilgileri	Karar No: KÜ GOKAEK 2016/21.1	Proje No: 2016/314	Tarih :21/12/ 2016			
	Yrd. Doç. Dr. Gülçin GACAR sorumluluğunda yapılan ve yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler, araştırmanın gerekçesi, amacı, yaklaşım ve yöntemleri, gönüllüler için beklenen yarar ve riskler dikkate alınarak değerlendirilmiş ve araştırmanın ilgili protokol doğrultusunda belirtilen merkezlerde yürütülmesi etik açıdan, <input checked="" type="checkbox"/> Uygun bulunmuştur. <input type="checkbox"/> Eksikliklerin tamamlanması koşulu ile uygun bulunmuştur.* <input type="checkbox"/> Uygun bulunmamıştır.*					
Dayanakları	Hasta Hakları Yönetmeliği (01.08.1998/23420); Biyoloji ve Tıbbın Uygulanması Bakımından İnsan Hakları ve İnsan Haysiyetinin Korunması Sözleşmesi; İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesinin Uygun Bulunduğuna Dair Kanun (09.12.2003/25311); Biyotıp Araştırmalarına İlişkin İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesine Ek Protokolün Onaylanmasının Uygun Bulunduğuna Dair Kanun (29.03.2011/27899); İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik (13.04.2013/28617); Tıbbi Cihaz Klinik Araştırmaları Yönetmeliği (06.09.2014/29111); Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi; İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu; Türk Tabipleri Birliği Hekimlik Meslek Etiği Kuralları; Türk Tabipleri Birliği Araştırma Etiği Bildirgesi					
Etik Kurul Üyeleri						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlişki	Toplantıda Bulunma	İmza
Prof. Dr. Kadir Babaoğlu Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	KATILMADI
Prof. Dr. I. Erdem Okay Üye	Genel Cerrahi	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Canan Baydemir Üye	Biyostatistik	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Selcen Göçmez Üye	Farmakoloji	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Özlem Yıldız Gündoğdu Üye	Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Haluk Emre Özel Üye	Restoratif Diş Tedavisi	Kocaeli Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Yusufhan Yazır Üye	Histoloji ve Embriyoloji	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	İLİŞKİLİ
Yrd. Doç. Dr. Aslıhan Akpınar Raportör	Tıp Tarihi ve Etik	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	Aslıhan Akpınar
Yrd. Doç. Dr. Ceyla Eraldemir Üye	Biyokimya	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	KATILMADI
* Gerekeç ve öneriler:						
KÜ Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Onay Formu				Belge Kodu	Rev. Tarihi / No.su:	Sayfa
				Onay formu	21.09.2016/KOGOEK01.1	2/2

Tez Denetleme Listesi

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

... / ... / 2018

Danışman

İmza