



**T.C.  
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**İNTERLÖKİN 12'NİN AKCİĞER KANSERİ  
HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Hazırlayan  
Seval TURNA**

**Danışman  
Prof. Dr. M. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU**

**İstanbul 2019**

**T.C.  
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**İNTERLÖKİN 12'NİN AKCİĞER KANSERİ  
HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Hazırlayan  
Seval TURNA**

**Danışman  
Prof. Dr. M. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU**

**İstanbul 2019**

## LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

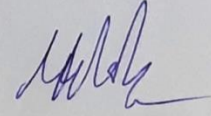
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Öğrencisi Seval TURNA tarafından hazırlanan "*İnterlökin 12'nin Akciğer Kanseri Hücreleri Üzerine Etkisi*" konulu çalışması jürimizce Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 25.06.2019

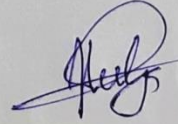
(Jüri Üyesinin Ünvanı, Adı, Soyadı ve Kurumu):

İmzası

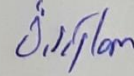
Jüri Üyesi : Prof.Dr.Burcu IRMAK YAZICIOĞLU  
: Haliç Üniversitesi (Danışman)



Jüri Üyesi : Prof.Dr.Hülya YILMAZ AYDOĞAN  
: İstanbul Üniversitesi

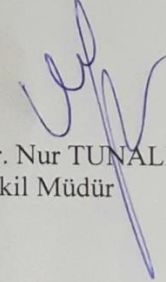


Jüri Üyesi : Dr.Öğr.Üyesi Özlem SAĞLAM UÇAR  
: Haliç Üniversitesi



Bu tez Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunun kararıyla kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Nur TUNALI  
Vekil Müdür



## İnterlökin 12'nin Akciğer Kanseri Hücreleri Üzerine Etkisi

### ORIJINALLIK RAPORU

%**9**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**5**

İNTERNET  
KAYNAKLARI

%**3**

YAYINLAR

%**7**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

### BİRİNCİL KAYNAKLAR

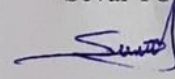
- 1** [dergipark.ulakbim.gov.tr](http://dergipark.ulakbim.gov.tr) %**1**  
İnternet Kaynağı
- 2** Submitted to Konya Necmettin Erbakan University %**1**  
Öğrenci Ödevi
- 3** Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) %**1**  
Öğrenci Ödevi
- 4** [www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080](http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080) <%**1**  
İnternet Kaynağı
- 5** Submitted to Istanbul University <%**1**  
Öğrenci Ödevi
- 6** López-Bravo, María, María Minguito de la Escalera, Pilar M. Domínguez, Leticia González-Cintado, Carlos del Fresno, Pilar Martín, Gloria Martínez del Hoyo, and Carlos Ardavín. "IL-4 blocks TH1-polarizing/inflammatory cytokine gene expression during monocyte-derived dendritic

Moleküler Biyoloji ve Genetik  
Anabilim Dalı Başkanı  
Prof. Dr. M. Burcu IRMAK YAZICIOĞU !!

**TEZ ETİK BEYANI**

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum "**İnterlökin 12'nin Akciğer Kanseri Hücreleri Üzerine Etkisi**" başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. M. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU'nun sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, deneyleri ve analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Seval TURNA



## ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimime başladığım ilk günden itibaren bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, gerek duyduğum her an bana zaman ayıran, desteğini hep yanımda hissettiğim tez danışmanım Sayın Prof. Dr. M. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU'na,

Akademik bilgisi ile her sıkıştığımızda yardımımıza koşan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ayyub EBRAHİMİ ve Dr. Öğr. Üyesi Özlem Sağlam UÇAR'a,

Yüksek lisans eğitimine başlamama vesile olan, beni hep destekleyen, başta Bezmialem Vakıf Üniversitesi Patoloji Bölüm Başkanı Prof. Dr. Sema ARICI olmak üzere Doç. Dr. Zühal GÜCİN, Doç. Dr. Nur BÜYÜKPINARBAŞILI ve adını saymadığım tüm patoloji ailesi doktorlarına,

Eğitim sürem boyunca hep yanımda olan, sabırla beni dinleyen, yardımlarını esirgemeyen, en büyük destekçilerim çok sevgili ekip arkadaşlarım Byg. Çağla MUTLU ve Uzm. Mol. Byg. Güzin GÖKAY'a,

Deney sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesinde yardımlarından dolayı, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Sezen ATASOY'a,

Haliç Üniversitesi Araştırma Görevlisi Anıl CEBECİ, Hatice KURNAZ ve Şafak ŞENER'e,

Yüksek lisans eğitimi boyunca beraberliğimizi hiç bozmadığımız, hep desteklediğimiz, beraber gülüp beraber ağladığımız sevgili Havva KAŞIKÇI ve Betül CEYLANER'e,

Hayatımın her anında koşulsuz beni destekleyen, sabrına hayran kaldığım, beni bugünlere getiren sevgili anneme sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Haziran, 2019

Seval TURNA

## İÇİNDEKİLER

Sayfa No.

ÖNSÖZ.....	vi
İÇİNDEKİLER .....	I
ŞEKİLLER .....	V
ÖZET .....	VIII
DESTEK .....	IX
ABSTRACT .....	X
ACKNOWLEDGEMENTS .....	X
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>4</b>
2.1. Kök Hücre ve Temel Özellikleri .....	4
2.1.1. Kök Hücre Türleri.....	5
2.2. Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler .....	8
2.2.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinik Kullanımı .....	8
2.2.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Kanser Tedavisinde Kullanımı .....	9
2.3. Akciğer Kanseri.....	10
2.3.1. A549 Akciğer Kanseri Hücreleri .....	13
2.4. Sitokin Kavramı .....	13
2.5. Apoptoz (Programlı Hücre Ölümü).....	16
2.5.1. Apoptoz Mekanizmaları .....	17
2.5.2. Apoptoz ve Kanser .....	18
2.6. Otofaji.....	19
2.6.1. Otofaji Mekanizmaları.....	19
2.6.2. Otofaji ve Kanser .....	21
2.7. Hücre Döngüsü.....	21
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>25</b>
3.1. Gereçler .....	25
3.1.1. Kimyasal Maddeler.....	25
3.1.2. Cihazlar.....	26
3.1.3. Hücreler .....	27
3.1.4. Hücrelerin Kültür Ortamında Büyütülmesi .....	27

3.2. Yöntem .....	28
3.2.1. Gruplar .....	28
3.2.2. Transwell İnsert Sistemi .....	29
3.3. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) Yöntemi ile Sitokin Ölçümü .....	29
3.4. Gerçek Zamanlı PZR Uygulaması ile Gen Ekspresyon Seviyelerindeki Değişimin Saptanması .....	30
3.4.1. RNA İzolasyonu .....	32
3.4.2. cDNA Sentezi .....	33
3.4.3. Gerçek Zamanlı PZR .....	33
3.4.4. İstatiksel Analiz .....	34
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>35</b>
4.1. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR ile Genlerin mRNA Seviyelerinin Belirlenmesi .....	35
4.1.1. 2. Saat Deney Sonuçları .....	35
4.1.2. 5. Saat Deney Sonuçları .....	39
4.1.3. 12. Saat Deney Sonuçları .....	43
4.1.4. 24. Saat Deney Sonuçları .....	47
4.1.5. 48. Saat Deney Sonuçları .....	51
4.1.6. 72. Saat Deney Sonuçları .....	55
4.2. IL-12p70 ve IL-12p40 Sitokinlerinin ELİSA Yöntemiyle Değerlendirilmesi .....	58
4.2.1. ELİSA Yönteminden Elde Edilen IL-12p70 Sonuçları .....	59
4.2.2. ELİSA Yönteminden Elde Edilen IL-12p40 Sonuçları .....	61
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>63</b>
<b>6. SONUÇLAR .....</b>	<b>70</b>
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>71</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>83</b>



## KISALTMALAR

<b>A549</b>	: Akciğer adenokarsinomu
<b>Apaf 1</b>	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1
<b>AT</b>	: Alveolar tip hücreleri
<b>ATG</b>	: Otofajiye bağlı genler
<b>CD</b>	: Cluster of Differentiation Antigen (Farklılaşma faktörü)
<b>CDK</b>	: Siklin bağımlı kinaz
<b>cDNA</b>	: Komplementer DNA
<b>COX</b>	: Siklooksijenaz
<b>CXCL</b>	: Kemokin ligandı
<b>DMEM F12</b>	: Dulbecco'nun modifiye Eagle ortamı
<b>ECM</b>	: Ekstrasellüler matriks (hücreler arası sıvı)
<b>EDTA</b>	: Etilendiamintetraasetik asit
<b>EKH</b>	: Embriyonik kök hücre
<b>FADD</b>	: Fas ile ilişkili ölüm alanı proteini
<b>FBS</b>	: Fetal bovin serum
<b>FOXP3</b>	: Forkhead kutusu P3
<b>GAPDH</b>	: Gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz
<b>HIF</b>	: Hipoksi indüklenebilir faktör
<b>IFN</b>	: İnterferon
<b>IL</b>	: İnterlökin
<b>IL12R</b>	: İnterlökin 12 reseptörü
<b>IRF</b>	: İnterferon düzenleyici faktör
<b>İPKH</b>	: Uyarılmış pluripotent kök hücre
<b>JAK-STAT4</b>	: Janus Kinaz ve Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 4
<b>KHAK</b>	: Küçük hücreli akciğer karsinomu
<b>KHDAK</b>	: Küçük hücreli dışı akciğer karsinomu
<b>LAMP2A</b>	: Lizozomla ilişkili membran proteini tip 2A
<b>LIF</b>	: Lenfosit baskılayıcı faktör
<b>LnRNA</b>	: Uzun kodlanmayan RNA
<b>M-CSF</b>	: Makrofaj koloni uyarıcı faktör
<b>MHC</b>	: Majör histo-uyumluluk kompleksi
<b>miRNA</b>	: MikroRNA

<b>MKH</b>	: Mezenkimal kök hücre
<b>MMP</b>	: Matris metaloproteinaz
<b>mRNA</b>	: Mesajcı RNA
<b>NK</b>	: Doğal öldürücü hücreler
<b>NP</b>	: Nöropilin
<b>PAS</b>	: Otofaji oluşum merkezi
<b>PCNA</b>	: Proliferatif hücre nükleer antijeni
<b>PE</b>	: Fosfotidiletanolamin
<b>PI3K</b>	: Fosfoinositid 3-kinaz
<b>PZR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>RB</b>	: Retinoblastoma proteini
<b>SLE Hastalığı:</b>	Sistemik Lupus Eritematoz Hastalığı
<b>SVF</b>	: Stromal vasküler fraksiyon
<b>Th</b>	: T yardımcı hücreleri
<b>TNF</b>	: Tümör nekroz faktörü
<b>TNF-R1</b>	: Tümör nekroz faktörü reseptörü 1
<b>TRADD</b>	: Tümör nekroz faktör reseptörü 1 ile ilişkili ölüm domeni proteini
<b>TRAIL</b>	: Tümör nekroz faktör ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand
<b>TRAILR</b>	: Tümör nekroz faktör ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand reseptörü
<b>VEGF</b>	: Vasküler endotelial büyüme faktörü
<b>VEGFR</b>	: Vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü
<b>Vps34</b>	: Vakuolar proteini sınıflandırma ile ilişkili proteini 34

## ŞEKİLLER

Sayfa No.

Şekil 2.1. Antikanser yanıtında IL 12'nin sinyal yolları.....	15
Şekil 2.2. Apoptotik olayların şematize gösterimi.....	17
Şekil 2.3. Otofaji mekanizması.....	20
Şekil 2.4. Siklinler ve hücre döngüsü düzenlenmesi .....	22
Şekil 3.1. Deneyde kullanılan hücreler .....	27
Şekil 3.2. Transwell kültür sistemi şematize hali .....	29
Şekil 4.1. 2. saat IL-12p40 ve p35 göre apoptoz ve otofaji değişimi .....	36
Şekil 4.2. 2. saat IL-12p40 ve p35 göre sitokin değişimi .....	37
Şekil 4.3. 2. saat IL-12p40 ve p35 göre hücre döngüsü değişimi.....	38
Şekil 4.4. 2. saat IL-12p40 ve p35 göre proliferasyon değişimi.....	39
Şekil 4.5. 5. saat IL-12p40 ve p35 göre apoptoz ve otofaji değişimi .....	40
Şekil 4.6. 5. saat IL-12p40 ve p35 göre sitokin değişimi .....	41
Şekil 4.7. 5. saat IL-12p40 ve p35 göre hücre döngüsü değişimi.....	42
Şekil 4.8. 5. saat IL-12p40 ve p35 göre proliferasyon değişimi.....	43
Şekil 4.9. 12. saat IL-12p40 ve p35 göre apoptoz ve otofaji değişimi .....	44
Şekil 4.10. 12 saat IL-12p40 ve p35 göre sitokin değişimi .....	45
Şekil 4.11. 12. saat IL-12p40 ve p35 göre hücre döngüsü değişimi.....	46
Şekil 4.12. 12. saat IL-12p40 ve p35 göre proliferasyon değişimi.....	47
Şekil 4.13. 24. Saat IL-12p40 ve p35 göre apoptoz ve otofaji değişimi.....	48
Şekil 4.14. 24. saat IL-12p40 ve p35 göre sitokin değişimi .....	49
Şekil 4.15. 24. saat IL-12p40 ve p35 göre hücre döngüsü değişimi.....	50
Şekil 4.16. 24. saat IL-12p40 ve p35 göre proliferasyon değişimi.....	51
Şekil 4.17. 48. saat IL-12p40 ve p35 göre apoptoz ve otofaji değişimi .....	52
Şekil 4.18. 48. saat IL-12p40 ve p35 göre sitokin değişimi .....	53
Şekil 4.19. 48. saat IL-12p40 ve p35 göre hücre döngüsü değişimi.....	54
Şekil 4.20. 48. saat IL-12p40 ve p35 göre proliferasyon değişimi.....	55
Şekil 4.21. 72. saat IL-12p40 ve p35 göre apoptoz ve otofaji değişimi .....	56
Şekil 4.22. 72. saat IL-12p40 ve p35 göre sitokin değişimi.....	57
Şekil 4.23. 72. saat IL-12p40 ve p35 göre hücre döngüsü değişimi.....	57
Şekil 4.24. 72. saat IL-12p40 ve p35 göre proliferasyon değişimi.....	58

<b>Şekil 4.25.</b> Saaatlere göre IL-12p70 sitokin miktarı değişimleri.....	60
<b>Şekil 4.26.</b> Anlamalı bulunan saat aralıklarına göre IL-12p70 miktarları.....	60
<b>Şekil 4.27.</b> IL-12p70 standart grafiği.....	61
<b>Şekil 4.28.</b> IL-12p40 standart grafiği.....	61
<b>Şekil 4.29.</b> IL-12p40 ELISA plakası .....	62



## ÇİZELGELER

Sayfa No.

<b>Çizelge 2.1.</b> Akciğer kanserinin histolojik yapısına göre sınıflandırılması.....	12
<b>Çizelge 3.1.</b> Yapılan araştırmada kullanılan kimyasal maddeler ve markaları .....	25
<b>Çizelge 3.2.</b> Yapılan araştırmada kullanılan cihazlar ve markaları .....	26
<b>Çizelge 3.3.</b> Deneyde kullanılan primerler .....	31
<b>Çizelge 3.4.</b> cDNA sentezi reaktif miktarları .....	33
<b>Çizelge 3.5.</b> cDNA sentezi reaksiyon koşulları .....	33
<b>Çizelge 3.6.</b> Gerçek zamanlı PZR işleminde kullanılan reaktif miktarları .....	34
<b>Çizelge 3.7.</b> Gerçek Zamanlı PZR işleminde kullanılan reaksiyon koşulları .....	34
<b>Çizelge 4.1.</b> Gruplardan elde edilen besiyerlerindeki IL-12p70 miktarları.....	59

## ÖZET

### İTERLÖKİN 12'NİN AKCİĞER KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Günümüzde kök hücre tedavileri, tıbbın birçok alanında deneysel veya klinik olarak kullanılan tedavi yöntemlerindedir. Farklı tedavi yöntemleri geliştirilmiş olmasına rağmen henüz kanseri yok edebilecek bir tedavi bulunmamaktadır. Akciğer kanseri en sık görülen kanser türleri arasındadır. Birçok deneysel çalışmada mezenkimal kök hücrelerin (MKH) tedavi edici ve koruyucu özelliği bildirilirken kanser modellerinde ise, kanserli hücrelerin çoğalmalarını baskıladığı ve durdurduğu gösterilmektedir. Ancak yapılan bazı çalışmalarda da kök hücrelerin kanser oluşumunu tetikleyerek kitleyi büyüüttüğü, yeni damar oluşumuna ve kanserin invazyonuna neden olduğu gösterilmiştir. MKH'ler ile kanser hücreleri arasındaki iletişim hücrelerden salgılanan sitokinler yardımıyla sağlanmaktadır. MKH'lerin tedavi edici özelliği bu sitokinler ile gerçekleşmektedir.

Bu çalışmanın amacı, MKH'ler ile A549 akciğer kanser hücrelerini *in-vitro* olarak aynı ortamda tutarak, MKH'lerin kanserli hücrelerin büyümesini baskılamak için kullandığı sitokinlerden interlökin (IL)-12 salgılamasını sağlayarak, IL-12'nin A549 kanser hücrelerinde apoptotik ve otofajik yollardaki genlere olan etkileri ile birlikte hücre döngüsü ve proliferasyon genleri üzerindeki etkilerini araştırarak MKH'lerin kanser hücreleri üzerindeki etkisini görebilmektir.

Bu çalışma hücre kültürü seviyesinde 3 ayrı grup oluşturularak ve 6 farklı saat diliminde yapılmıştır. Hücrelerden salınan sitokinlerden IL-12p70 ve IL-12p40 seviyeleri toplanan besiyerlerinden ELİSA çalışılarak tespit edilmiştir. Ayrıca IL-12 alt birimleri ve reseptörleri, apoptoz ve otofaji , hücre döngüsü belirteçleri ile birlikte proliferasyon belirteçleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile araştırılmıştır.

Yaptığımız ELİSA testi ve gz-PZR sonucunda, IL-12'nin salgılanmaya başladığı ilk saatlerde apoptoza direnç gelişmeye başlamış olabileceği gibi ilerleyen zaman diliminde bu apoptotik direncin IL-12 etkisi ile gerilemiş olabileceği ve hücre döngüsü süresinin ise IL-12 salınımından sonra G1/S fazında uzadığı düşünülmektedir. Proliferasyon belirteçlerinin gz-PZR ile mRNA ekspresyon düzeylerine baktığımızda ise IL-12 salgılandıktan sonra azalırken daha sonra yavaşta olsa tekrar eksprese olmaya başladığı gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak, MKH'lerin, IL-12 salınımı ile A549 kanser hücrelerini baskılamak için tek başına kullanıldığında yetersiz kaldığı, ancak IL-12 salınımı ile kanser hücrelerinin çoğalmasının baskılanmasına rağmen durdurulamadığı düşünülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** Mezenkimal kök hücre, A549, İnterlökin-12

## **DESTEK**

Bu çalışma 2018-2019 yılları arasında T.C. Haliç Üniversitesi'nin bilimsel araştırma ve uygulama çalışmalarına verdiği destekle hazırlanmıştır.



## **ABSTRACT**

### **THE EFFECT OF INTERLEUKIN 12 ON LUNG CANCER CELLS**

Nowadays, stem cell therapies are one of the therapeutic methods used in many areas of medicine. Although different treatment methods have been developed, there is no cure for cancer. Lung cancer is the most common type of cancer. Many experimental studies have reported the therapeutic and protective properties of mesenchymal stem cells (MSCs), while in cancer models it has been shown to suppress and stop the proliferation of cancer cells. However, in some studies, it has been shown that stem cells stimulate the formation of cancer, increase the mass, cause new vessel formation and invasion of cancer. Communication between MSCs and cancer cells is provided by the help of cytokines secreted from the cells. The therapeutic properties of MSCs are mediated by these cytokines.

The aim of this study was to keep MSCs and A549 lung cancer cells in vitro in the same medium, to ensure that MSCs secrete interleukin (IL)-12 from cytokines that suppress the growth of cancer cells. To investigate the effects of IL-12 on genes in apoptotic and autophagic pathways in A549 cancer cells, as well as their effects on cell cycle and proliferation genes, to see the effect of MSCs on cancer cells.

This study was carried out by forming 3 different groups at cell culture level and in 6 different time zones. IL-12p70 and IL-12p40 levels from cytokines released from cells were determined by ELISA from the collected media. In addition, IL-12 subunits and receptors, apoptosis and autophagy, cell cycle markers and proliferation markers were investigated by real time polymerase chain reaction (rt-PCR).

As a result of our ELISA test and q-PCR, resistance to apoptosis may have started to develop in the first hours when IL-12 is secreted, and this apoptotic resistance may be regressed with IL-12 effect in the later hours and the cell cycle time may be decreased after IL-12 release. phase is thought to extend. When the proliferation markers of mRNA expression with real time PCR were examined, it was observed that IL-12 decreased after secretion and then started to be expressed again slowly.

In conclusion, MSCs were found to be insufficient when used alone to suppress A549 cancer cells by IL-12 release, but could not be stopped despite the suppression of proliferation of cancer cells by IL-12 release.

**Key words:** Mesenchymal stem cell, A549, Interleukin-12

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This study was conducted between 2018-2019 in T.C. It is prepared with the support of Haliç University for scientific research and application studies.



## 1. GİRİŞ

Kök hücreler henüz farklılaşmamış, aldıkları sinyallere göre farklılaşabilen, kendilerini yenileyebilen, sınırsız bölünebilme kapasitesi olan, hasarlı dokuya verildiğinde onarabilme özelliğine sahip hücrelerdir (Weissman et al., 2001; Koshizuka et al., 2004; Çetin ve Ural, 2010). Kök hücreler elde edilme kaynaklarına göre, embriyonik kök hücreler ve yetişkin kök hücreler olmak üzere iki ana grupta incelenebilmektedir (Fuchs and Segre, 2000). Mezenkimal kök hücreler (MKH) yetişkin tip kök hücreler olup stromal kökenlidir ve organizmadaki birçok dokudan izole edilebilirler (Chagastelles and Nardi, 2011). Kök hücre izolasyon kaynakları karşılaştırıldığında yağ dokudan elde edilen kök hücreler kemik iliği kaynaklı kök hücrelere oranla daha fazla izolasyon verimine ve çoğalma kapasitesine sahiptir (Raposio et al., 2017).

Kanser son yıllarda dünya çapında görülme oranı ile ölüm oranı hızla artan bir hastalıktır (Ferlay et al., 2013; Pan et al., 2017). Farklı tedavi yöntemleri kullanılmasına rağmen henüz kanseri tamamen ortadan kaldıracak bir tedavi bulunamamıştır. Dünya çapında akciğer ve meme kanseri hem kadınlarda hem de erkeklerde en sık tanı alan kanser olup kanser ölümlerinin önde gelen nedenleridir. Bunlar dışında sık rastlanan diğer kanserler arasında, erkeklerde karaciğer, mide ve kolorektum ve kadınlar arasında mide, serviks uteri ve kolorektum bulunmaktadır (Torre et al., 2015). Kanser tedavisinde ölümü azaltmak ve sağ kalımı arttırmak için cerrahi yöntemler, radyoterapi, kemoterapi, hormon tedavisi, immünoterapi, sinyal ileti sistemi inhibitörleri, gen tedavisi, hedefe yönelik tedaviler ve anjiyogenez inhibitörleri gibi çeşitli tedavi yöntemleri kullanılmaktadır (Toledo-Guzman et al., 2018). Kanser tedavisi için son yıllarda birçok ilaç ve yeni tedavi yöntemleri geliştirilmiş olsa da günümüzde halen ileri evre kanser hastalarının tam olarak tedavi seçenekleri yok gibidir.

Akciğer kanseri vakalarının büyük çoğunluğu az gelişmiş ülkelerde görülmektedir. Akciğer kanserinin en önemli nedeni tütün ve tütün ürünleri kullanımıyken bunun dışında asbest maruziyeti, krom, kadmiyum ve arsenik gibi bazı metaller, radyasyon ve kömür dumanı gibi çevresel faktörlerde akciğer kanserine neden

olmaktadır (Wong et al., 2017). Son yıllarda akciğer kanseri hem erkeklerde hem de kadınlar arasında en sık tanı alan kanser türü olmakla beraber aynı zamanda tüm kanserler arasında en çok ölüm oranına sahiptir (Bray et al., 2018). Akciğer kanserinden sonra en sık tanı alan kanserler kadın meme kanseri, kolorektal kanser, mide kanseri, karaciğer kanseri ve prostat kanseri (Ferlay et al., 2015) iken, ölüm nedeni olarak erkekler de mide ve prostat, kadınlar da ise meme kanseri ve kolorektal kanser izlemektedir (Siegel et al., 2018).

MKH'lerin klinik hücresel tedavi uygulamalarında, doku mühendisliğinde kullanımı her geçen gün artmaktadır. MKH'ler enflamatuvar hastalıklarda ve immün bozukluklarla ilgili hastalıklarda ve hayvan çalışmalarında kullanılmaktadır. Kanser, diyabet, Chron hastalığı, kalp hastalıkları, karaciğer hastalıkları, multiple skleroz, graft versus host hastalığı, kemik ve kıkırdak hasarları, omurilik zedelenmeleri ve beyin hasarlanmaları MKH tedavisinin kullanıldığı hastalıklardır (Gaojing et al., 2018). MKH'lerin farklılaşma kapasiteleri, parakrin etkileri, immün cevabı düzenleyebilmeleri ve yaralanma bölgelerine göç etme yetenekleri klinik tedavi amaçlı kullanılmalarını sağlayan biyolojik özellikleridir (Wang et al., 2012; Farini et al., 2014; Squillaro et al., 2016).

MKH ile yapılan kanser tedavilerinde bazı çalışmalar, hücre döngüsünü G0-G1 fazında durdurduğu veya apoptozu uyararak tümör büyümesini baskıladığını gösterirken tam aksine bazı çalışmalar da epiteliyal mezenkimal geçişi artırdığını, apoptozu baskıladığını ve yeni damarlanmaların oluşmasıyla kanser ilerlemesini artırdığını göstermektedir. Bu nedenle MKH tedavilerinin kanser hücreleri üzerindeki rolü tartışılmaktadır (Rhee et al. , 2015; Lee and Hong, 2017; Zhang et al. , 2017).

Hastalıkların tedavisinde ve kanser tedavisinde MKH'ler hastaya verildikten sonra hasarlı doku, travma veya iltihaplı bölgelere ve kanserli bölgeye göç etme kabiliyetindedirler. Bu göç kanser hücreleri tarafından salgılanan sitokinlere cevap olarak parakrin etkileri ile meydana gelmektedir (Spaeth et al., 2008; Lee and Hong, 2017; Chulpanova et al., 2018).

MKH'lerden salınan ve kanser hücrelerinin daha hızlı çoğalmasını sağlayan veya kanser hücrelerinin çoğalmasını baskılayan birçok sitokin mevcuttur. Bu sitokinlerden bazıları interlökin 6 (IL-6), IL-7, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, lenfosit baskılayıcı faktör (LIF) ve makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF) sitokinleridir (Malik et al., 2015).

Kanser, dünya çapında yaygın ve hasta açısından tedavisi oldukça zor, ağrılı ve ülke ekonomisi açısından da masraflı bir hastalık olduğundan yeni alternatif tedavi yöntemlerine olan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır (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 et al., 2015). Ancak son yıllarda yapılan bazı çalışmalar MKH'lerin kanserli hücrelerin büyümesini, bölünmesini ve metastazını arttırabileceğini gösterirken (Nguyen et al., 2014), bazı çalışmalar da tam aksine kanserli hücrelerin büyümesinin baskılanmasını sağladıklarını göstermektedir (Li et al., 2015).

Ancak A549 (akciğer adenokarsinom hücre hattı) akciğer kanseri için literatürde IL-12 indüklü apoptoz ve otofajik yollarla ilgili yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır. Bu kapsamda çalışmanın amacı, MKH'ler ile A549 akciğer kanser hücrelerini *in-vitro* olarak aynı ortamda tutarak, MKH'lerin kanserli hücrelerin büyümesini baskılamak için kullandığı sitokinlerden IL-12 salgılamasını sağlayarak, ilk defa IL-12'nin A549 kanser hücreleri üzerindeki apoptotik ve otofajik etkileri ile birlikte hücre döngüsü ve proliferasyon genleri üzerindeki etkilerini araştırarak MKH'lerin kanser hücreleri üzerindeki etkisini görebilmektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kök Hücre ve Temel Özellikleri

Organizmalardaki hücreler sürekli bir değişim göstererek yenilenirler. Olgun farklılaşmış hücreler ölürken yerlerine yeni hücreler olgunlaşırlar. Dokulardaki bu yenilenme o dokuda bulunan kök hücre denilen hücrelerin bölünmesine ve farklılaşmasına bağlıdır. Kök hücre veya bir başka deyişle projenitör hücre hem sınırsız bir şekilde kendini yenileme yeteneğine sahip hem de farklılaşma kapasiteleri ile dokuların yenilenmelerini ve devamlılığını sağlayan farklılaşmamış hücrelere denmektedir (Weissman, 2000).

Kök hücreleri tanımlamada kullanılan ve onların benzersiz hücre popülasyonu olarak kabul edilmesini sağlayan özellikleri şu şekilde sıralanabilmektedir:

- Kendi kendini yenileme yetenekleri
- Farklı hücre tipine farklılaşma yetenekleri (potensi)
- Tek bir hücreden türetilen klon oluşturma yetenekleri (klonalite) (Tran and Damaser, 2015; Zhang et al., 2017)

Kendini yenileme, dokuların devamlılığını sağlamak için kök hücreler bölünerek yeni kök hücreleri meydana getirmektedir. Bu olaya kök hücrenin kendini yenilemesi denmektedir. Ancak, kök hücreler bu bölünmelerde simetrik ve asimetric bölünmeler geçirirler. Simetrik bölünme ile özelliklerinde hiçbir değişim olmadan iki yavru hücre meydana gelerek kök hücrelerin devamlılığını sağlamaktadır. Asimetric bölünmede ise, oluşan yavru hücrelerden bir tanesi ana hücrenin tüm özelliklerini taşıırken diğer yavru hücre öncül hücreyi oluşturmaktadır. Oluşan öncül hücreler de daha sonraki bölünmeler sırasında farklılaşarak, farklılaşmış olgun hücreleri meydana getirmektedirler. Kendini yenileme mekanizmalarında oluşabilecek bozukluklar organizmada gelişimsel geriliğe ve kansere neden olabilmektedir (He et al., 2009; Ateş, 2016; Ökçesiz ve Bucurgat, 2017).

Farklılaşma, en genel tanımı ile kök hücre farklılaşması belirli bir doku veya organdaki bir kök hücrenin farklı bir doku veya organdaki hücre fenotipine dönüşmesi iken bazı durumlarda da farklı soylardaki hücreler arasında geçiş yapma yeteneğidir.

Kök hücreler farklılaşmış hücreleri oluşturmak için farklı yollar kullanırlar. Kök hücrelerin bu özelliği, onu diğer hücrelerden ayıran en önemli özelliklerinden biridir. Kök hücreler farklılaşma özelliklerine göre de farklılık göstermektedirler. Kök hücrelerden bir kısmı sadece bir hücreye farklılaşabilirken, bir kısmı tüm organizmayı oluşturabilmektedir (Martin-Rendon and Watt, 2003; Bianco et al., 2008).

Klon oluşturma yeteneği, kök hücreler tek bir hücreden hücre kolonileri üretebilme özelliğindedirler. Tek bir kök hücreden kaynaklanan hücre kolonileri ile ya farklılaşan hücreler üretmeden kök hücre sayısını artırır ya da kök hücre sayısını arttırmadan farklılaşan hücreler üretirler (Bianco et al., 2008; Bianco and Robey, 2015).

### **2.1.1. Kök Hücre Türleri**

Kök hücreler elde edildikleri kaynaklara ve farklılaşma kapasitelerine göre sınıflandırılabilirler.

Farklılaşma kapasitelerine göre,

- Totipotent
- Pluripotent
- Multipotent
- Unipotent kök hücreler olarak sınıflandırılmaktadır (Sobhani et al., 2017).

Elde edildikleri kaynaklara göre ise,

- Embriyonik kök hücreler
- Embriyonik olmayan kök hücreler
  - Kemik iliği
  - Yağ dokusu
  - Diş pulpası
  - Göbek kordonu
  - Amniyon sıvısı ve plasenta
  - Periferik kan
  - Sinoviyum ve sinovyal sıvı
  - Endometrium
  - Cilt

➤ Kas kaynaklı kök hücreler (Berebichez-Fridman and Montero-Olvera, 2018).

- Kanser kök hücreleri
- Uyarılmış pluripotent hücreler olarak sınıflandırılabilir (Zhang et al., 2017).

Totipotent hücre, tüm organizmayı, ekstraembriyonik membranları ve plasentayı oluşturma kapasitesindeki hücredir. Döllenen yumurtanın totipotent duruma gelmesinin nedeni epigenetik yeniden programlamalardır. Totipotent hücre, insanda zigot ve bundan sonraki 1-3 günde meydana gelen bölünmeler sonucu oluşan blastomerleri kapsar. Bölünmeler sonucunda oluşan her bir blastomer uygun şartlarda kültüre edildiğinde her birinden yeni bir organizma gelişebilir (Sobhani et al., 2017; Baker and Pera, 2018).

Pluripotent kök hücre bir hücrenin *in vitro* ve *in vivo* üç germ tabakasından hücrelere dönüşme kapasitesini belirten hücredir (De Paepe et al., 2014). Blastosit aşamasındaki embriyoda, blastositin periferik hücreleri (trofoblast) embriyonik zarları ve plasentayı oluştururken, blastositin iç hücre kitlesi embriyoyu oluşturmaktadır. Bu hücreler, başka bir embriyoyu oluşturmazlar ancak yetişkin bir organizmanın tüm hücre tiplerini oluşturmaktadırlar. Bunlar aynı zamanda kök hücre kültürlerini oluşturmak için kullanılan hücrelerdir (Chagastelles and Nardi, 2011).

Multipotent kök hücreler diğer kök hücrelerin benzer ana karakterlerine sahip olmalarına rağmen daha özelleşmiş hücrelere yol açan hücrelerdir. Örneğin kemik iliğinde bulunan kök hücreler tüm kan hücresi formlarına farklılaşabilmektedir. Multipotent kök hücreler doku iyileşmesi, savunma ve gelişimde önemli işlevleri olan hücrelerdir. Multipotent hücreler bu farklılaşma özelliklerinden dolayı yetişkin kök hücrelerdir. MKH'ler multipotent hücrelerdir (Sobhani et al., 2017).

Unipotent hücrelerin farklılaşma kapasiteleri çok daha sınırlıdır ve sadece tek bir hücre tipine yol açabilmektedirler (Singh et al., 2016).

Embriyonik kök hücreler (EKH) blastosistin iç hücre tabakasından elde edilen ve embriyonun tüm hücre tiplerini geliştirme ve farklılaştırma kapasitelerinden dolayı pluripotent hücrelerdir (Gonzalez et al., 2016). İlk primat EKH 1995 yılında Rhesus makak blastosistlerinden elde edilirken, ilk insan embriyonik kök hücreler 1998 yılında *in vitro* fertilizasyon tedavisi için dondurulmuş embriyolardan izole edilmiştir (Nichols and Smith, 2012).

Embriyonik olmayan yani yetişkin kök hücreleri ise daha sınırlı bir kendini yenileme kapasitesine sahip, her dokuda bulunan sakin hücrelerdir. Fizyolojik veya patolojik süreçlerden dolayı bir doku içinde hasar gören hücrelerin yenilenmesinden, hücrenin hayatta kalması ve çoğalabilmesi için gerekli olan çözünebilir faktörlerin üretilmesinden, bağışıklık tepkisinin düzenlenmesinden sorumludurlar (Gonzalez and Bernad, 2012; Squillaro et al., 2016). Yetişkin kök hücreleri arasında en çok araştırılmış, en iyi anlaşılmiş ve kök hücre tedavilerinde en sık kullanılan hücre tipleri mezenkimal kök hücreler ve hematopoietik kök hücreleridir (Tran and Damaser, 2015).

Kanser kök hücreleri hücre yüzey belirteçleri incelendiğinde kök benzeri bir kanser hücresi alt popülasyonunu oluşturmaktadır. Yapılan araştırmalarda, tümör başlatma kapasitesine sahip olan kanser kök hücreleri birçok kanser türünde % 0,1 oranında bulunduğu gösterilmektedir. Normal kök hücreler gibi kanser kök hücreleri de kendini yenileme, kök dışı kanser hücrelerine farklılaşma ve ortak sinyalizasyon yollarını kullanırlar. Kanser kök hücreleri normal kök hücrelerden farklı olarak kitledeki tüm kanser hücrelerinin kaynağı olabileceği gibi, kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ilaçlara direnç göstererek tekrarlamalarının ve uzak metastazlara yol açan hücrelerin kaynağı olabilirler (Dawood et al., 2014; Nassar and Blanpain, 2016; Zhang et al., 2017).

Uyarılmış pluripotent kök hücreler (İPKH) yetişkin hücrelerin yeniden programlanarak pluripotent özellik kazandırılması ile oluşan hücrelerdir. İPKH'lerin, spesifik genlerin ve proteinlerin ekspresyonu, kromatin metilasyonu, farklılaşma kapasiteleri, teratom oluşumu ve in vitro kültür kinetiği dahil olmak üzere birçok açıdan doğal pluripotent embriyonik kök hücrelerle aynı olduğu düşünülmektedir (Chagastelles and Nardi, 2011). Başlangıç hücrelerini yeniden programlamak için farklı teknikler kullanılsa da asıl protokol OCT4, Sox2, C-Myc ve Klf4 transkripsiyon faktörlerinin viral vektörler yoluyla aktarılması temeline dayanmaktadır. Viral vektörlerle yeniden programlama tekniklerinde çoğunlukla Adenovirüs ve Sendai virüsü kullanılırken, viral olmayan teknikler de mRNA, protein, plazmid ve transpozon bazlı yöntemler kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemlerin çoğunluğu lenti-veya gamma retroviral yöntemlerle karşılaştırıldığında düşük verimlilik ve yüksek güvenlik sağlamaktadır (Haake et al., 2019).

## 2.2. Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler

Multipotent mezenkimal kök hücreler, çeşitli organ ve dokularda bulunan hematopoietik olmayan mezodermal türevli yetişkin kök hücreleridir. MKH'ler ilk önce kemik iliğinde tanımlanmış ve izole edilmiştir. Bunun dışında iskelet kası, süt dişi, amniyon sıvısı, göbek kordonu gibi çeşitli dokulardan izole edilebilmektedir. Bu kaynaklardan izole edilen hücre miktarları sınırlı olduğundan sorun teşkil etmektedir. Ayrıca kemik iliğinden MKH izolasyonu hasta açısından oldukça invaziv ve ağrılı bir işlemdir. Buna karşılık yağ dokudan kök hücrelerin alınması daha verimli ve daha az ağrılı bir işlemdir. Yağ dokusu yetişkin kök hücre kaynakları arasında en zengin olanıdır (Mizuno et al., 2012; Wei et al., 2015; Ma et al., 2017).

Yağ dokusu kaynaklı MKH'ler ilk defa Zuk et al. (2001) tarafından lipoaspirat materyalinden izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Ayrıca embriyonik kök hücrelere göre daha hızlı farklılaşma, kemik iliği MKH'lere göre daha güçlü bir proliferasyon yeteneğine sahiptirler (Ma et al., 2017). Yağ dokusu kaynaklı kök hücreler genellikle insan deri altı yağ dokusundan lokal anestezi ile elde edilir. Yağ dokusu, stromal vasküler fraksiyon (SVF) olarak adlandırılan heterojen hücre popülasyonuna sahiptir (De Francesco et al., 2015). Bu SVF'lerden birincil yağ hücrelerini yıkama, mekanik parçalama, görünür kan damarları ve fibrotik tabakalardan temizlendikten sonra kimyasal olarak parçalandıktan sonra santrifüj edilerek ayrılır (Wystrychowski et al., 2016). Fibroblast benzeri bir morfolojiye sahip olan bu hücrelerin sitoplazmalarında lipid damlacıkları yokken (Mizuno et al., 2012) yüzey belirteçleri olarak Cluster of Differentiation Antigen 13 (CD13, Farklılaşma faktörü), CD29, CD49d, CD73, CD90, CD133, Majör histo-uyumluluk kompleksi I (MHC I) ve MHC II'yi kuvvetli bir şekilde eksprese edip CD106'yı eksprese etmeyerek ayırt edilirler (Dai et al., 2016).

### 2.2.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinik Kullanımı

Kendi kendini yenileme, genişleme ve farklı hücre soylarına farklılaşma yeteneğine sahip olan hücreler olarak tanımlanan kök hücrelerin rejeneratif tıpta kullanımları umut vericidir. Bir kök hücrenin rejeneratif tıpta kullanılabilmesi için bol miktarda bulunabilir, minimal invaziv bir prosedürle toplanabilir, çoklu hücre soylarına farklılaşabilen ve otolog veya allogenic bir konakçıya güvenli ve etkili bir şekilde nakledilebilir olmalıdır. Ancak embriyonik kök hücrelerin ve uyarılmış pluripotent kök



hücrelerin kullanımlarında etik düşünceler, teratom oluşumunun hücrenel düzenlenmesi gibi bazı sınırlamalar bulunmaktadır (Bunnell et al., 2008; Mizuno et al., 2012).

Yağ doku kaynaklı MKH'lerin proliferatif kapasiteleri kemik iliği kaynaklı MKH'lere oranla daha fazladır. Ayrıca diğer kök hücre kaynaklarına göre daha fazla kaynaktan ve daha verimli olarak izole edilebilmeleri onları çekici hale getirmektedir. Bu kök hücreler, normal doku bütünlüğünün korunmasında ve hasarlı durumda hasarın giderilmesi için sitokinleri ve büyüme faktörlerini salgılayabilirler. Bunun dışında kalp, merkezi sinir sistemi, kaslar bağışıklık sistemi ve hücre canlılığı üzerinde olumlu etkilere sahip olmaları tedavi amaçlı kullanımlarında artan ilgiye neden olmaktadır. Ulusal Sağlık Enstitüleri (ABD) tarafından sağlanan klinik araştırma veri tabanına göre Faz I, Faz II, Faz III basamaklarında yağ doku kaynaklı MKH'ler ile ilgili toplam 296 çalışma, tüm MKH grupları ile toplam 920 çalışma bulunmaktadır (<http://clinicaltrials.gov>, Erişim tarihi: 10.02.2019). MKH'lerin kullanıldığı çalışmalardan bazıları diyabet, karaciğer hastalıkları, kardiyovasküler hastalıklar, akciğer hastalıkları, sistemik lupus eritematoz (SLE) hastalığı, omurilik yaralanmaları, graft versus konak hastalığı, Crohn hastalığı, yumuşak doku büyütme ve kemik defektlerinin tedavisidir. Bunlar dışında rejeneratif tıpta doku mühendisliğinde ve gen terapi yöntemlerinde kullanılmaktadırlar (Bajek et al., 2016; Dai et al., 2016; Kim and Park, 2017).

### **2.2.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Kanser Tedavisinde Kullanımı**

MKH'ler iskemik alanlara, primer veya metastatik tümör alanlarına göç etme kabiliyetindedirler. Tümör mikro çevresi tümör büyümesinde ve büyümenin korunmasında çok önemli bir yere sahiptir. Tümör mikro çevresindeki değişiklikler kronik enflamasyon oluşturmaktadır. Sonuç olarak gelişen tümör ve tümör mikro çevresi sürekli olarak sitokinler, kemokinler ve enflamatuar mediatörleri üreterek hücre çoğalması ve farklılaşması, matris tadilatı, kan damarlarının oluşumu, hücre göçü ve hücre alımını tümörün yararına yeniden programlayabilirler. MKH'ler de reseptörleri için ligand görevi gören tümör mikro çevresi tarafından salgılanan bu maddelere cevap olarak kanserli bölgelere göç ederler. Ancak yapılan bazı çalışmalarda immünsupresif özellikleri ile kanserin büyümesini ve metastaz yapmasını engellerken bazı kanserlerde tam tersi etki yaparak sağ kalım süresini azaltmaktadır (Liu et al., 2011; Monir et al., 2014; Mohammadi et al., 2016).

MKH'lerin kanserli bölgeye göçü onları hedefli tedaviler için bir araç yapmaktadır. Hedefli tedavilerde genetiği değiştirilmiş MKH'ler kullanılarak anti-kanser ajanlarının sürekli olarak dağıtılması sağlanmaktadır. MKH'lerin genetiği viral veya viral olmayan yollarla değiştirilebilmektedir. Viral olmayan vektörlerle tedavi, viral yöntemlere göre daha büyük transgenler taşıyabilmesi, daha düşük maliyetli olması ve bağışıklık tepkisini daha az uyarması gibi avantajları olmasına rağmen düşük transfeksiyon verimleri ve geçici gen ekspresyonu gibi dezavantajlara sahiptir. Viral yöntemlerle tedavi ise vektör olarak retro, lenti, herpes simpleks, adeno veya adeno ilişkili virüsler kullanılarak kök hücre özellikleri değiştirilmeden viral genomun konakçı hücre çekirdeğine girerek sürekli ekspresyon yapması ile sağlanır. Ancak kullanılan her viral vektör tipinin de avantajları ve dezavantajları olmakla birlikte vektör seçimi gereken tedaviye ve tedavi edilecek olan hastalığa göre belirlenir. Viral vektörler yüksek transdüksiyon verimi sağlarken, kullanılan virüs tipine bağlı olarak uzun süre stabil transgen ekspresyonu sağlamaktadır (Sage et al., 2016).

Eksozomlar canlı hücreler tarafından salgılanan nano boyutta (40-200 nm) veziküller olup kan, amniyotik sıvı, beyin omurilik sıvısı, idrar, safra, lenf gibi vücut sıvılarında bulunurlar. Eksozomlar mRNA'lar, mikroRNA'lar (miRNA), uzun kodlanmayan RNA'lar (lncRNA), genomik DNA, mitokondriyal DNA, proteinler, lipitler içermektedirler. Eksozomlar etkilerini parakrin mekanizmaları ile gösterirler. Eksozom aracılı genetik bilgi alış verişi ile alıcı hücrelerde fenotipik değişiklikler meydana getirirler. Yapılan araştırmalar MKH eksozomlarının birçok kanser türünde kanser hücrelerinin büyümesini, metastazını ve ilaç direncini, angiogenezi ve hücre çoğalmasını artırarak kanserin ilerlemesini sağladığını göstermektedir. Buna karşı yapılan başka bir çalışma miR-146b'yi -anti-kanser miRNA'sı- taşıyan MKH eksozomlarının, glioma hücrelerine verildiğinde kanseri küçülttüğü gösterilmiştir. Sonuç olarak MKH eksozomları, MKH'lerin parakrin fonksiyonlarına bağlı olarak kanser büyümesini sağlayabilir veya baskılayabilirler (Fatima and Nawaz, 2015; Zhou et al., 2018).

### **2.3. Akciğer Kanseri**

Akciğer kanseri dünya genelinde kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedeni olmakla birlikte Amerika Birleşik Devletlerinde, kadınlarda kanserle ilişkili ölümlerin % 26'sını oluştururken erkeklerde bu oran % 28'dir. ABD'de kadınlarda ve erkeklerde

en sık yeni tanı alan ikinci kanser olan akciğer kanseri tüm kanserlerin % 13' ünü oluşturmaktadır ( Siegel et al., 2017; Nanavati and Reed, 2018).

Akciğer kanseri, 50'den fazla histomorfolojik alt tipten oluşan heterojen bir kanser grubu olmasına karşın, çok fazla morfolojik alt sınıflandırma gerektirmeyen sınırlı tedavi seçeneklerinden dolayı genel olarak küçük hücreli dışı akciğer karsinomu (KHDAK) ve küçük hücreli akciğer karsinomu (KHAK) olarak kullanılmaktadır. KHDAK'leri tüm akciğer kanserlerinin % 80-85'ini oluştururken adenokarsinomlar yaklaşık % 40'luk oranla en sık rastlanan histolojik alt tipidir. Sigara içmeyenlerde en sık görülen akciğer kanseri türü adenokarsinomdur. Erken evrede teşhis edilen KHDAK hastalarında 5 yıllık sağ kalım oranı ileri evrede teşhis edilene göre oldukça fazladır (Cancer Genome Atlas Research, 2014; Rezaee et al., 2018; Osmani et al., 2018; Weinberger et al., 2019).

Akciğer kanseri nedenlerine bakıldığında çok sayıda faktör rol almaktadır. Sigara kullanımı bu faktörler arasında birinci sıradadır ve sigara içenlerde içmeyenlere göre akciğer kanseri gelişme riski 25 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 belirtileri öksürük, hemoptizi, nefes darlığı, göğüs ağrısı, kilo kaybı, ses kısıklığı, tekrarlayan zatürre ve bronşitlerdir (Nanavati Reed, 2018; Rezaee et al., 2018).

Akciğer kanserleri 2014 yılında Dünya Sağlık Örgütü tarafından histolojik yapılarına göre Çizelge 2.1'de gösterildiği şekilde sınıflandırılmıştır (Travis et al., 2015).

**Çizelge 2.1.** Akciğer kanserinin histolojik yapısına göre sınıflandırılması (Travis et al., 2015)

<b>Adenokarsinom</b>	<b>Skvamöz hücreli karsinom</b>	<b>Nöroendokrin tümörler</b>
Lepidik adenokarsinom Asiner adenokarsinom Papiller adenokarsinom Mikropapiller adenokarsinom Solid adenokarsinom İnvaziv müsinöz adenokarsinom Kolloid adenokarsinom Fetal adenokarsinom Enterik adenokarsinom Minimal invaziv adenokarsinom	Keratinize skuamöz hücreli karsinom Keratinize olmayan skuamöz hücreli karsinom Bazaloid skuamöz hücreli karsinom	Küçük hücreli karsinom Kombine küçük hücreli karsinom Büyük hücreli nöroendokrin karsinomu Kombine büyük hücreli nöroendokrin karsinomu Karsinoid tümörler Büyük hücreli karsinom Adenoskuamöz karsinom Sarkoidoz karsinomları
<b>Preinvaziv lezyonlar</b>	<b>Tükürük bezi tipi tümörler</b>	<b>Diğer ve sınıflandırılmamış karsinomlar</b>
Atipik adenomatöz hiperplazi İn situ adenokarsinom İn situ skuamöz hücreli karsinom Diffüz idiyopatik pulmoner nöroendokrin hücre hiperplazisi	Mukopidermoid karsinom Adenoid kistik karsinom Epitelyal miyoepitelyal karsinom Pleomorfik adenom	Lenfoepitelyoma benzeri karsinom NUT karsinomu
<b>Papillomlar</b>	<b>Mezenkimal tümörler</b>	<b>Lenfohistiyositik tümörler</b>
Skvamöz hücreli papilloma Glandüler papilloma Karışık skuamöz ve glandüler papilloma	Akciğer hamartomu Kondroma PEComatous tümör Konjenital peribronşiyal miyofibroblastik tümör Diffüz pulmoner lenfanjiomatosis İnflamatuvar myofibroblastik tümör Epitelioid hemanjiyotelyoma Plevropulmoner blastom Sinovyal sarkom Pulmoner arter intimal sarkomu EWSR1 – CREB1 translokasyonlu miksoid sarkom Miyoeptelyal tümör	Mukozaya bağlı ekstranodal marjinal zon lenfomaları Lenfoid doku (MALT lenfoma) Diffüz büyük hücreli lenfoma Lenfomatoid granülomatosis İntravasküler büyük B hücreli lenfoma Pulmoner Langerhans hücreli histiyositoz Erdheim – Chester hastalığı
<b>Ektopik kökenli tümörler</b>	<b>Adenomları</b>	<b>Metastatik tümörler</b>
Germ hücre tümörleri İntrapulmoner timoma Melanom Meningioma	Sklerozan pnömositoma Alveoler adenomu Papiller adenom Müsinli kistadenom Mukoza bezi adenomu	

### **2.3.1. A549 Akciğer Kanseri Hücreleri**

A549 akciğer kanseri hücreleri 1972 yılında pulmoner adenokarsinomdan izole edilmiştir. A549 kanser hücreleri, alveollerin yüzeyini döşeyen Alveolar Tip I (AT I) ve Alveolar Tip II (AT II) hücrelerinden AT II'nin karakteristik özelliklerine sahiptir. AT II hücreleri, AT I hücrelerinin öncül hücreleri olarak görev yapmaktadır. Bunun dışında akciğer içindeki doğal bağışıklıkta ve aktif sodyum taşınması yoluyla alveolar sıvının temizlenmesinde rol alırlar (Foster et al., 1998; Cooper et al., 2016).

### **2.4. Sitokin Kavramı**

Sitokinler, hücreler arası reseptörlü iletişim sağlayan, adaptif enflamatuar konak savunmalarında, hücre büyümesi, farklılaşması ve ölümünde, anjiyogenezde, homeostazın sağlanmasında ve immun yanıtların düzenlenmesinde anahtar düzenleyiciler olarak işlev gören çözünebilir hücre dışı proteinler veya glikoproteinlerdir. Sürekli salınmazlar, genellikle uyarıcılara tepki olarak üretilir ve salınırlar ve birçok hücre tipi tarafından üretilmektedir (Oppenheim, 2001; Lipiainen et al., 2015).

Sitokinler görevlerine bakılarak altı sınıfa ayrılmışlardır. Bunlar interlökinler, kemokinler, interferonlar, koloni uyarıcı faktörler, tümör nekroz faktörleri ve büyüme faktörleridir. Sitokinlerin çoğunluğunun parakrin ve otokrin etki göstermesi vücut planı organizasyonunda, embriyonik gelişim sırasında hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasında, bağışıklık tepkisinde önem arz etmektedir (Duitman et al., 2011).

Hücreler arası iletişimde hücre sinyal proteinleri olarak görev yapan sitokinler salındıktan sonra hedef hücre üzerindeki reseptörüne bağlanır ve bu bağlanma sonucu oluşan aktivasyon hücre fonksiyonlarını değiştiren hücre içi sinyalizasyon başlamasına neden olmaktadır. Bu sinyalizasyon sonucu DNA'da bulunan bazı genler ve bunların transkripsiyon faktörleri aktif veya inaktif olmaktadır. Salınma nedenine göre, hedef hücrede diğer sitokinlerin üretilmesine, diğer moleküller için hücre yüzey reseptörlerinin sayısında artışa veya geri bildirim inhibisyonu yoluyla kendi etkisinin bastırılmasına neden olurlar (Hegazi and Abdel-Rahman, 2015). Örneğin IL-12 kanserli dokuda antianjiyogenetik faktörler üretebilmek için immün sistem hücrelerini uyararak kanserin büyümesini baskılamaktadır (Del Vecchio et al., 2007).

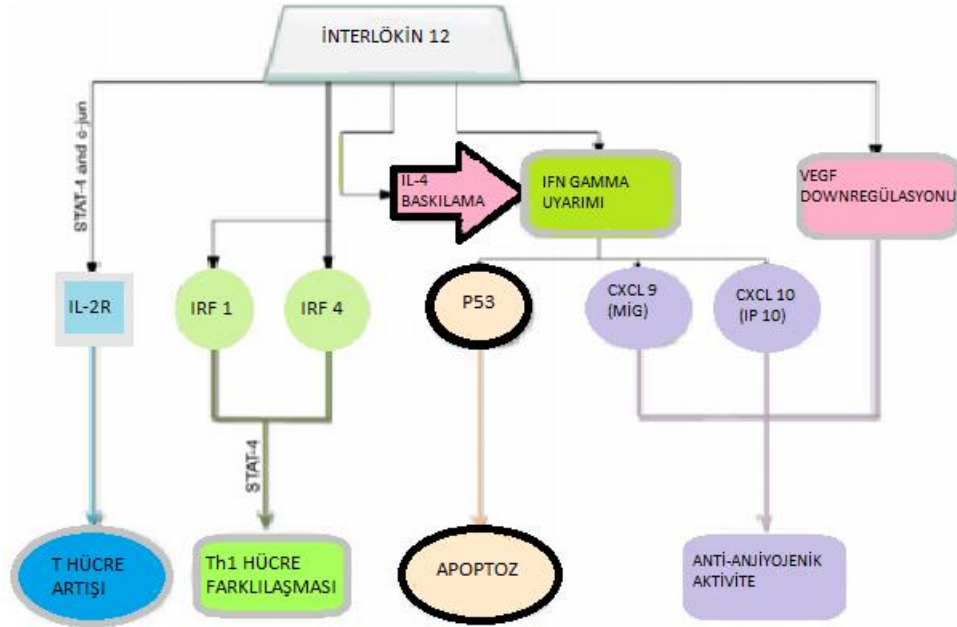
Bazı sitokinler hastalıklara verdikleri yanıtlardan dolayı rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak ilaç haline getirilmiştir. Bu sitokinler aşağıdaki gibidir.

- 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 granüloamatöz hastalıklarda ve osteopetroziste
- IL-2 kanser tedavisinde
- IL-11 kanser hastalarının trombositopenilerinde
- İnterferon gama kronik granülamatöz hastalıklarda ve osteopetrozis tedavisinde kullanılır (Hegazi and Abdel-Rahman, 2015)

IL-12 birbirine disülfid kovalent bağlar ile bağlı p35 ve p40 alt birimlerinden oluşan 70 kDa heterodimerik bir salgı proteinidir. Biyolojik olarak aktif IL-12p70 heterodimerinin oluşabilmesi için her iki alt biriminde aynı hücrede birlikte eksprese olması gerekmektedir. Birlikte, birbirlerinden bağımsız olarak üretilirlebilmektedirler. p35 geni çeşitli hücre ve dokularda eksprese olurken, p40 geninin ekspresyonu sadece IL-12 üreten hücrelerde gerçekleştirilmektedir (Jalah et al., 2013). IL-12 immün hücrelerinin yüzeylerinde bulunan IL-12 reseptörlerine (IL-12R) bağlanarak etkilerini gösterirler. IL-12R, IL-12R  $\beta$ 1 ve IL-12R  $\beta$ 2 olmak üzere iki aminoasit zincirinden meydana gelir. IL-12'nin IL-12R  $\beta$ 2 reseptörü ile bağlandıktan sonra tirozinler fosforile edilir ve IL-12 aktivitesi için kritik olan Janus kinaz- sinyal transdüseri ve transkripsiyon aktivatörü 4 (JAK-STAT4) sinyal yolunu aktive eder. IL-12, interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) üretiminde, yardımcı T hücrelerinin farklılaşmasında, aktive edilmiş T ve doğal öldürücü hücrelerin (NK hücreleri) çoğalmasında ve antikanser tepkilerin uyarılmasında önemli rol oynamaktadır (Jayanthi et al., 2014; Hernandez-Alcoceba et al., 2016).

IL-12 proinflamatuvar bir sitokin olup, IL-12 ile uyarılan IFN  $\gamma$ , MHC'lerinin ve adezyon moleküllerinin upregüle olmasına neden olmaktadır. MHC moleküllerinin yeniden düzenlenmesi ve tip 1 yardımcı T hücrelerinin (Th1) immün yanıtlarının oluşturulması kanser hücrelerinin antijenlerini sitotoksik T lenfositlerine sunmaktadır. Bu da kanser hücrelerini öldürmeye olan duyarlılığı arttırmaktadır. IL-12, ayrıca, Th1 hücrelerinin farklılaşmasında önemli olan interferon düzenleyici faktör 1 ve 4'ün (IRF1

ve IRF4) ekspresyonu olmasını sağlamaktadır. IL-12, IFN  $\gamma$  aracılığıyla anjiyogenezi baskılamaktadır. IFN  $\gamma$  ile uyarılabilir kemokin ligandı (CXCL) 9 ve CXCL10 üretiminin artması, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ve metaloproteinaz-9'un (MMP-9) azalmış üretimi dolaylı da olsa anjiyogenezin baskılanmasına ve kanser büyümesinin kontrol altına alınmasına yardım etmektedir. IFN  $\gamma$  üretimi IL-4 tarafından baskılanabilmektedir. IL-12, IL-4'ün etkilerini baskılayarak IFN  $\gamma$ 'nın aktive olmasını sağlamaktadır. Ek olarak, IL-12, özellikle IL-2 immunoterapisinde IL-2R'nin ekspresyonunu arttırarak antikanser yanıtının başlatılabilmesinde önemli rol oynamaktadır. Bunların dışında IFN  $\gamma$  üretilmesi, p53 aktivitesinde artışa neden olarak apoptozun uyarılmasını sağlamaktadır. Bu farklı etkileri nedeniyle IL-12 anti-kanser bağışıklığının ana düzenleyicisi olarak kabul edilmektedir (Weiss et al., 2007; Seo et al., 2011; Yuzhalin and Kutikhin, 2012; Tugues et al., 2015) (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Antikanser yanıtında IL 12'nin sinyal yolları (Yuzhalin and Kutikhin, 2012)

VEGF, VEGF reseptör tirozin kinazlarına (VEGFR'lerine) bağlanarak aktive olan, vasküler geçirgenliği ve anjiyogenezi arttıran bir sitokindir. Anjiyogenez yani yeni damar ağlarının oluşumu embriyonik gelişimde, doku ve organ homeostazında, hastalık ilerlemesinde, kemik oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Ayrıca VEGF birçok tümörde sadece anjiyogenezi değil tümör büyümesini, metastazı ve sağkalımı uyarmaktadır. İnsanlarda, VEGF ailesi 8 üyeden oluşmaktadır. Bunlar VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F, plasental büyüme faktörü ve endokrin bezinden türetilmiş vasküler endotel büyüme faktörüdür. VEGF'in biyolojik

fonksiyonlarına bağlı olarak VEGFR-1 / Flt-1, VEGFR-2 / Flk-1, VEGFR-3 / Flt-4 reseptörlerine bağlanırlar. VEGFR-1 ve VEGFR-2, daha çok vasküler endotel hücrelerde eksprese edilirken, VEGFR-3, özellikle lenfatik endotel hücrelerde eksprese edilir. Endotel hücreleri ayrıca, reseptör tirozin kinazların aktivitesini düzenleyen nöropilin 1 ve 2 (NP-1 ve NP-2) ortak reseptörlerini eksprese ederler. NP-1 VEGFR-2'nin aktivitesini altı katına kadar arttırdığından en güçlü pro-anjiyojenik aktiviteye ve VEGFR-1'den daha yüksek bir tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. Hem VEGF ve VEGFR'ler sadece endotel hücrelerinde değil, aynı zamanda endotel dışı hücrelerde de eksprese edilir (Dai and Rabie, 2007; Jang et al., 2017; Itatani et al., 2018; Melincovici et al., 2018).

Tümör nekroz faktör alfa (TNF  $\alpha$ ), doku hasarı veya fiziksel stres sonrası fibroblastlar, endotel hücreleri, makrofajlar, tümör hücreleri gibi birçok hücre tarafından üretilen proinflamatuvar pleiotropik sitokindir. TNF  $\alpha$ , hücre yüzeyinde bulunan tümör nekroz faktörü reseptörü 1 ve 2 (TNF-R1 ve TNF-R2)'ye bağlanarak aktive olur. TNF-R1 birçok hücre tipinde yapısal olarak bulunmakla birlikte farklı sinyal yollarını aktive ederek proliferasyona ve hayatta kalmaya veya kaspazların aktivasyonuna bağlı olarak apoptoza yol açabilmektedir. TNF-R2 ise daha çok endotel ve lenfoid hücrelerde eksprese olurken TNF-R1'in uyardığı hücre ölümünü arttırabilir veya hücre aktivasyonunu, göçünü ve proliferasyonunu arttırarak etki göstermektedir. Sonuç olarak TNF  $\alpha$  üretimi, enflamasyon bölgesinde apoptozu uyararak antikanser aktivitesine neden olurken, aynı zamanda; diğer sitokinlerin, anjiyogenik faktörlerin ve kemokinlerin uyarılarak enflamasyon bölgesine çekilmesini sağlayarak kanserogenezi desteklemektedir (Montesano et al., 2005; Babbar and Casero, 2006; Piura et al., 2014).

## **2.5. Apoptoz (Programlı Hücre Ölümü)**

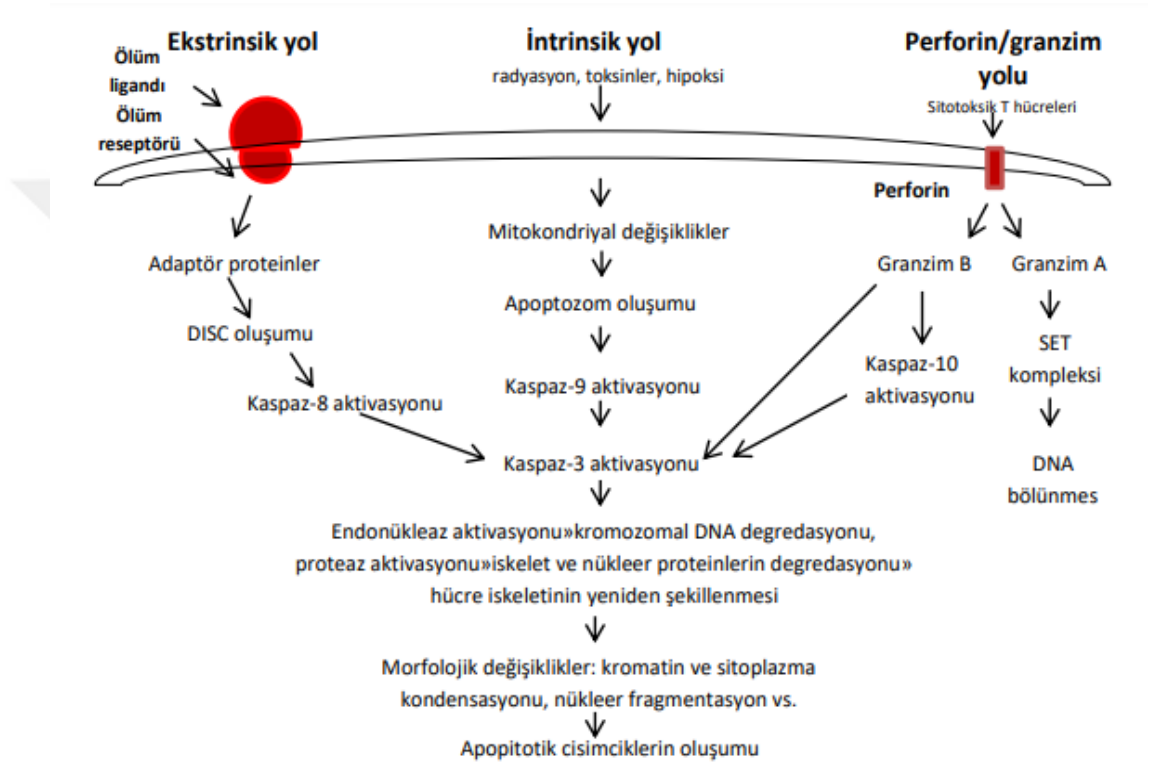
Organizmada görevini tamamlamış ya da DNA hasarı sonrasında veya gelişim sırasında meydana gelen hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılması ile tanımlanan programlı hücre ölümü veya apoptoz; genlerle kontrol edilen, enerjiye gereksinim duyan, organizmadaki homeostazi sağlayan bir olaydır. Apoptoz dışsal uyarılara ve içsel uyarılara karşı cevap olarak gelişebilir. Apoptoz mekanizmalarında meydana gelen bozukluklar sonucunda kanser, otoimmün hastalıklar, Parkinson hastalığı,



Alzheimer hastalığı, AIDS, viral hastalıklar ve nörojeneratif hastalıklar gibi hastalıklar meydana gelebilmektedir (Renehan et al., 2001; Elmore, 2007).

### 2.5.1. Apoptoz Mekanizmaları

Apoptoz mekanizmalarındaki dışsal veya ölüm reseptörü yolu ile içsel veya mitokondriyal yol olan iki ana apoptotik yola ilave T hücre aracılı sitotoksinite veya hücrenin perforin-granzime bağlı öldürülmesini içeren bir yolu daha vardır (Elmore, 2007) (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Apoptotik olayların şematize gösterimi (Elmore, 2007)

Ölüm reseptörlerine bağlı dışsal apoptotik yolda uyarı, TNF reseptör süper ailesinin bir alt kümesi olan hücre yüzeyi ölüm reseptörlerinin, TNF'nin üyeleri olan ilgili aktive edici ölüm ligandları ile birleştirilmesi ile başlatılır. Ölüm reseptörleri yapısal olarak apoptozun uyarılmasında görevli hücre içi protein-protein etkileşim alanı olan ölüm bölgesi olarak tanımlanmaktadır. Ölüm reseptörü-ligand sinyal sistemleri arasında en iyi karakterize edilenleri TNFR1-TNF $\alpha$ , FAS (CD95, APO-1) –FasL (Fas ligand), TRAILR1 (tümör nekroz faktör ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand reseptörü) TRAIL (Tümör nekroz faktör ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand), TRAILR2–TRAIL içerir. Ölüm reseptörlerinin karşılık gelen ligand ile bağlanması sonucu oluşan aktivasyon hücre içinde bulunan Fas/TNFR ile ilişkili adaptör proteini (FADD,

TRADD) aktive eder. Bu aktivasyon apoptatik sinyal akışını başlatan kaspaz-8 uyarır. Aktifleşen kaspazlar DNaz ile birlikte DNA yıkımına ve hücrenin yok olmasına neden olurlar (Elmore, 2007; Plati et al., 2011; Pistritto et al., 2016).

İçsel yolak ise, büyüme faktörleri, oksijen yetersizliği, çeşitli sitotoksik ajanlar, serbest radikaller, viral-bakteriyel enfeksiyonlar ve hücre içi kalsiyum artışı gibi hücre içi stres ile tetiklenen mitokondri iç zarındaki sitokrom c'nin mitokondriyal dış membran geçirgenliğinin bozulması sonucu sitoplazmaya salınması ile başlar. Sitoplazmaya geçen sitokrom c apoptozu oluşturmak için apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (Apaf 1)'i bağlar. Apoptozom kaspaz 9'u aktifleştirir. Kaspaz 9 da efektör kaspazlardan prokaspaz-3'ü aktive eder ve hücre apoptoza gider (Elmore, 2007; Plati et al., 2011; Ooi and Ma, 2013; Pistritto et al., 2016).

BCL2 ailesi proteinleri içsel yolaktaki mitokondri dış zarının geçirgenliğini kontrol eden hem pro- hem de antiapoptotik düzenleyicileri ile apoptozu uyarabilir veya baskılayabilir. BCL2 proteini antiapoptotik iken BAX proapoptotik proteindir. BCL2/BAX hücrenin apoptoza gidip gitmeyeceğine karar verme sürecinde önem taşımaktadır. Eğer hücrede BCL2 fazla ise apoptoz baskılanırken, BAX fazla ise apoptoz başlatılır. Hücre içinden gelen sinyallere göre mitokondri dış zarında bulunan BCL2 proteini, mitokondri dış zarının geçirgenliğini engelleyerek sitokrom c ve diğer apoptotik moleküllerin sitoplazmaya geçmesini durdurarak göstermektedir (Elmore, 2007; Plati et al., 2011; Pistritto et al., 2016).

### **2.5.2. Apoptoz ve Kanser**

Kanser hücre düzenlenmesinin normal mekanizmalarının bozulması, aşırı hücre çoğalması veya hücre ölümünün baskılanarak azalması olarak tanımlanırsa apoptozun baskılanması kanser gelişiminde önemli bir etkidir. Kanser hücreleri, BCL2 gibi antiapoptotik proteinlerin aşırı ekspresyonu, BAX gibi proapoptotiklerin ekspresyonlarının baskılanması veya mutasyonları ile apoptoza direnç kazanabilmektedirler. Ayrıca kanser hücreleri, apoptozun baskılanmasını immün sistemden kaçarak sağlayabilmektedirler (Elmore, 2007).

Kanser metastazı, kanser hücresinin uzak bir organa hareket etmesi ve o bölgede kanser gelişimi olarak bilinmektedir. Apoptoz bu metastatik hücrelerin öldürülmesini sağlayarak metastazın baskılanmasında oldukça önemli bir role sahiptir. Ancak metastatik hücrelerdeki apoptotik direnç onların gittikleri bölgede yerleşerek

koloni oluşturmalarına imkan sağlamaktadır. Apoptotik dirençte birçok farklı etken bulunmakla birlikte ilk adım, hücre-hücre ve hücre-hücreler arası sıvı (ekstracellüler matriks, ECM) temaslarının kaybolması ile oluşan hücre ölümüne dirençtir. Örneğin ECM'de bulunan MMP'lar kanser hücrelerindeki apoptozun dışsal apoptotik yollarındaki ligandlarının veya reseptörlerinin bölünmesi yoluyla uyarılmasını engelleyerek apoptozu baskılamaktadır (Su et al., 2015).

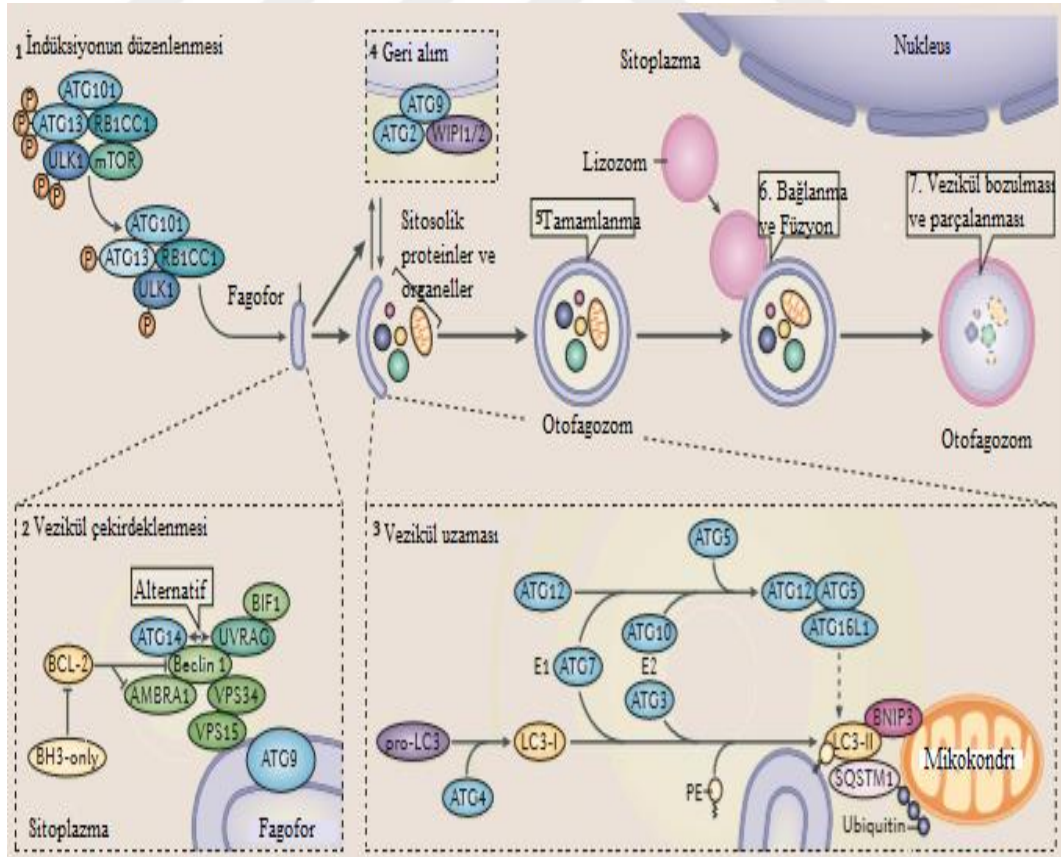
## **2.6. Otofaji**

Otofaji, hücre içi makro moleküllerin, hasar görmüş organellerin bir otofagozom içine alınarak lizozomlara yönlendirilmesi ve lizozomla birleşerek parçalanması işlemine denilmektedir. Elde edilen bozunma ürünleri daha sonra yeniden kullanım için membran geçirgenliğini sağlayan permeazların aktivitesi vasıtasıyla sitoplazmaya geri taşınır. Otofaji hücre içi homeostazın sağlanmasında oldukça önemlidir (Zaffagnini and Martens, 2016). Otofajinin düzenlenmesinde en önemli uyarılar açlık, stres ve hipoksi durumlarıdır. Otofajinin işlevsel bozuklukları kanser, enflamatuar hastalıklar ve nörodejeneratif hastalıklara neden olmaktadır (Guan et al., 2013). Makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı otofaji olmak üzere 3 farklı otofaji mekanizması tanımlanmıştır. Makrotofaji, mitokondri ve peroksizomlar gibi proteinleri ve organelleri içine alan otofagosomların lizozomlarla kaynaşarak yıkılması işlemidir. Yıkılan materyal aminoasitler gibi makromoleküllerin öncüllerini oluşturarak yeniden döngüye girmeleri sağlamaktadır. Mikrotofaji, lizozom membranının içe çökmesi ve sitoplazma içeriğinin doğrudan yıkılması ile gerçekleşmektedir. Son olarak şaperon aracılı otofajide ise, KFERQ benzeri aminoasit motifleri içeren proteinlerin ısı şoku proteini hsc70 tarafından lizozoma yönlendirilir. Burada LAMP2A (lizozomla ilişkili membran proteini tip 2A) ile bağlanarak lizozomal enzimler tarafından yıkımının gerçekleştirilmesidir (Thorburn, et al., 2014).

### **2.6.1.Otofaji Mekanizmaları**

Otofaji mekanizmaları, 30'dan fazla otofajiye bağlı genler (ATG) ile düzenlenir. ATG gen ürünleri, otofagosom olarak adlandırılan çift membranlı vezikül oluşumunu kontrol eder. Hücrede otofagozom oluşumu 'otofaji oluşum merkezi' (Preautophagosomal structure, PAS) adı verilen endoplazmik retikulum ile golgi cisimciğinin arasında olduğu düşünülen bölgede başlamaktadır. Otofagozom oluşumu fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) ve vakuolar proteini sınıflandırma ile ilişkili proteini 34

(Vps34)'ün Atg6 (Beclin-1) ile etkilişimi sonucu başlatılır. PI3K kesecik oluşumunda rol oynayan proteinleri kendisine bağlayarak PAS'a yönlendirir ve otofagozom membranının çekirdeği oluşturulur. Fagoforların oluşumu ile otofajiye başlanmasının ardından ATG12-ATG5 kompleksinin oluşumu kataliz edilerek Atg12 – Atg5 – Atg16 kompleksi oluşur. Bu kompleks ile membranlar birbirine bağlanır ve otofagozomlar meydana gelir. Kompleks ATG8 (LC3) proteininin fosfotidiletanolamin (PE) yağ molekülüne bağlanması için gereklidir. LC3, proteaz Atg4 ile ayrılır. PE, Atg7 ve ikinci bir E2 benzeri enzim olan Atg3 ile bölünmüş LC3'e bağlanır ve bu lipitlenmiş LC3-II, yeni oluşan otofagosom membranları ile birleşir. LC3-II, lizozomlarla kaynaşma sonrasına kadar olgun otofagosomlarda kalır ve genellikle otofajiyi izlemek için kullanılır. Oluşan otofagozom membranları kargonun etrafında toplanır ve kargonun daha sonra bir lizozomla birleşip oto-lizozom oluşturan bir kese içinde sarılmasını sağlar. İçerik daha sonra proteazlar, lipazlar, nükleazlar ve glikozidazlar tarafından indirgenir ve oluşan parçalanma ürünleri sitoplazmaya salınırlar (Rabinowitz and White, 2010; Amaravadi et al., 2016; Zaffagnini and Martens, 2016; Li et al., 2017) (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Otofaji mekanizması (Fullgrabe et al., 2014)

### 2.6.2. Otofaji ve Kanser

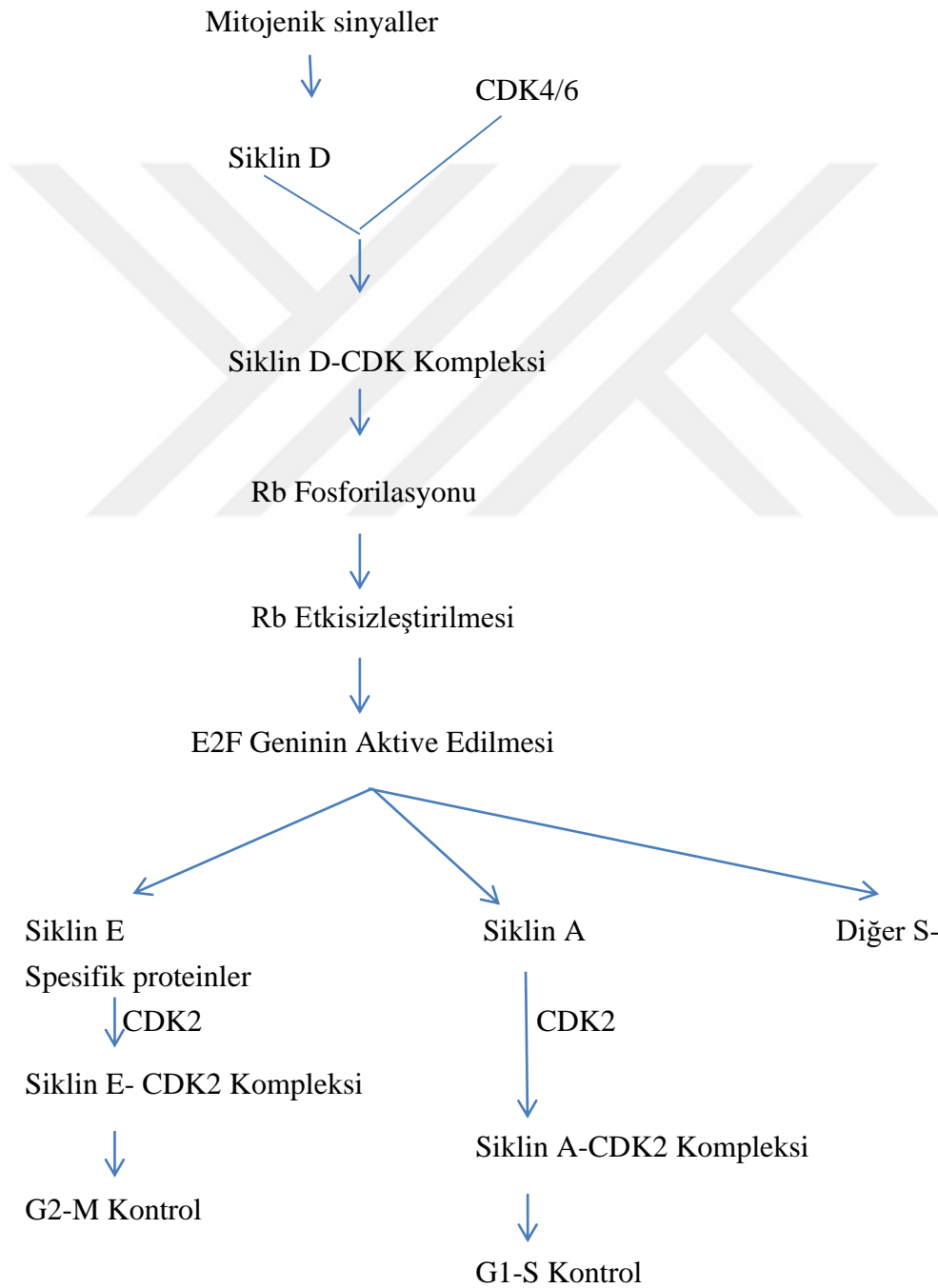
Kanserde otofaji karmaşık bir role sahiptir. Normal hücrelerde bazal otofaji seviyeleri oldukça düşükken, yetersiz beslenme, hipoksi, büyüme faktörleri azlığında hızla artmaktadır. Otofaji besin yetersizliği durumunda, hücre içindeki makromolekülleri, hasarlı organelleri parçalayarak metabolizmayı desteklemek için substratlar sağlamaktadır. Otofaji, kanser mikroçevresindeki hipoksi, asitlik, artan metabolik ürünler, yüksek mitotik aktivite ve sınırlı anjiyogenez gibi stresler sonucu kanser hücresinin metabolik sağkalımını desteklemektedir. Bu nedenle otofaji tümör büyümesini ve hayatta kalmayı desteklemektedir. Ancak otofajinin baskılanması, otofaji genlerinin ekspresyonunun azaltılması sağkalımı ve kanserogenezi azaltmaktadır (White and DiPaola, 2009; Rabinowitz and White, 2010; White et al., 2015; Kimmelman and White, 2017).

### 2.7. Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü, bir hücrenin bölünmeye başlamasından itibaren takip eden ikinci hücre bölünmesine kadar geçen zamanda, hücrede gerçekleşen biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerin izlendiği sürece denir. Hücre döngüsü, interfaz ve mitoz (M) fazı olmak üzere iki aşamada gerçekleşir. Hücre bölünmesine hazırlık dönemi olarak bilinen interfaz, Gap1 (G1), Sentez (S), Gap2 (G2) olmak üzere üç evreden oluşur. G1 evresinde, hücrede organel sayıları iki katına çıkar. S evresi, DNA sentezinin gerçekleştiği evredir. G2 evresinde ise, DNA sentezi durur ancak hücre içeriği artmaya devam ederek mitoz hazırlanır. M evresi, mitoz bölünmenin gerçekleştiği evredir (Aktuğ, 2014; Canpolat, 2016).

Hücre döngüsünü düzenleyen moleküller siklinler, siklin bağımlı kinazlar (Cyclin- Dependent Kinase, CDK), ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleridir (CDKI). Siklinler hücre döngüsünün belirli evrelerinde sentez edilirken, CDK'lar inaktif formda sürekli ifade edilirler ve siklinlere bağlanıp fosforile edilerek aktif hale geçerler. Hücre döngüsünde ilk sentezlenen siklin D'dir. G1'in ortasında ortaya çıkar ve S evresinde yok olur. Siklin D, CDK4'e bağlanıp Siklin D-CDK4 kompleksini oluşturarak retinoblastoma proteinini (RB) fosforiller. RB'nin fosforilasyonu, transkripsiyon faktörü E2F ile olan kompleksin ayrılmasına ve aktive olmasına neden olmaktadır. Bu aktivite Siklin E, Siklin A ve DNA polimerazın transkripsiyonunu artırır. Siklin E-CDK2 ile kompleks oluşturur ve bu kompleks, hücre döngüsünün S evresinde

ilerleyebilmesi ve DNA replikasyonunun başlayabilmesi için gereklidir. Siklin E-CDK2 ayrıca RB'yi defosforile ederek etkisiz hale getirir. Siklin A-CDK2 kompleksi mitotik profazdaki olayları düzenler. Siklin B-CDK1 kompleksi çekirdek zarının çözülmesine neden olup ve mitozu başlatır. Mitozdan çıkış siklin B-CDK1 kompleksinin inaktive edilmesi ile gerçekleşir. Bölünme tamamlandığında, yeni bölünmüş olan hücreler G1 evresinde yeni bir replikatif döngüyü girebilirler ya da G0 evresinde kalıp dinlenmeye çekilebilirler (Stamatakos et al., 2010; Aktuğ, 2014; Rath and Senapati, 2016) (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. Siklinler ve hücre döngüsü düzenlenmesi (Stamatakos et al., 2010)

Hücre döngüsünün ilerlemesinde çok önemli role sahip olan CDK2'nin anormal aktivitesinin kanserlerle ve hücre bozukluğu ile ilgili başka hastalıklarla yakın ilişkisi olduğu bildirilmiştir. Anormal CDK2 aktivitesi prostat kanseri ve KHDAK'da proliferasyona, ayrıca meme epitel hücrelerinin kanser hücresine dönüşmesine neden olmaktadır. Bunların dışında S evresindeki aşırı CDK2 aktivitesi apoptotik sinyal oluşturarak hücrenin ölümüne neden olabilmektedir (Li et al., 2015). Siklin A2 ise, hücresel proliferasyonla ilişkili olup ekspresyonu çeşitli kanserlerde kötü prognoz göstergesidir (Yasmeen et al., 2003). Siklin A2'nin eksikliği olan hücrelerde ise kanser kök hücresi benzeri özellikler göstererek metastazın yeni bir düzenleyicisi olduğu varsayılmaktadır (Bendris et al., 2015). Ayrıca yapılan çalışmalarda Siklin A'nın pozitif olduğu KHDAK'larında hastaların sağkalım sürelerinin kısaldığı gösterilmektedir (Volm, et al., 1997).

Proliferatif hücre nükleer antijeni (PCNA), DNA replikasyonu, onarımı, kromatin tamirati, hücre döngüsünün düzenlenmesi ve apoptozda görev alan çok önemli bir proteindir (Witko-Sarsat et al., 2010; Wang et al., 2017). PCNA, hücre döngüsünde siklin A-CDK2 kompleksi ile bağlanarak CDK2 ve substratları arasında köprü görevi görmektedir. Normal şartlar altında hücre döngüsünün ilerlemesi bozulmazken DNA hasarı, hücre yaşlanması, hücrelerin p53'e bağlı veya bağımsız yollardan farklılaşması gibi durumlarda G1 fazından S fazına geçişi engelleyen p21 proteininin üretimi uyarılır. p21, sikline bağımlı kinazların aktivitesini baskılayarak G1– S fazları arasında hücre döngüsünün durmasını sağlamaktadır. Terminal olarak farklılaşmış kardiyomiyositlerle yapılan çalışmaları, hücre döngüsünün durmasının, PCNA seviyesini düşüren yüksek konsantrasyondaki p21'den kaynaklandığını göstermektedir (Maga and Hubscher, 2003; Strzalka and Ziemienowicz, 2011).

PCNA'nın ifadesi bazı tümörlerde düzensizdir ve onkogeneze rol oynamaktadır. KHDAK'larında PCNA'nın yüksek ekspresyonu kötü prognozla ilişkilidir. Ayrıca PCNA pozitif karsinomlu hastaların, PCNA negatif karsinomlu hastalara göre sağkalım sürelerinin kısaldığı bildirilmektedir (Volm and Koomagi, 2000; Wang et al., 2018).

Siklooksijenaz (COX), araşidonik asidin prostoglandinlere dönüştürülmesinde rol oynayan anahtar enzimdir. Birçok dokuda yapısal olarak ifade edilen COX1 ve ekspresyonu ancak büyüme faktörleri, sitokinler ve onkojenler gibi birçok faktör tarafından uyarıldıktan sonra başlayan COX2 olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır

(Wang et al., 2015; Yukawa et al., 2015). COX2 akciğer, prostat, meme, kolon, mesane, pankreas, baş ve boyun kanserlerinde aşırı eksprese olmakta ve buda tümör hücresinde apoptoz direncine, artan anjiyogeneze, azalan konak bağışıklığına, invazyon ve metastaza neden olmaktadır (Brown and DuBois, 2004; Sharma et al., 2005; Cao et al., 2013).

Forkhead kutusu P3 (FOXP3), düzenleyici T hücrelerinin bir transkripsiyon faktörüdür ve düzenleyici T hücrelerinin farklılaşmasında ve fonksiyonlarının düzenlenmesinde işlev görmektedir. FOXP3 ayrıca, meme, akciğer epiteli ve prostat hücrelerinde de eksprese edilmektedir. FOXP3'ün karsinogenez ve kanser ilerlemesindeki rolü, hem kanseri destekleyen hem de baskılayan özellikler gösterdiğinden henüz belirsizdir (Wang et al., 2010; Peng et al., 2018). Ancak yapılan birçok çalışma FOXP3'ün akciğer adenokarsinom dokularında ve akciğer adenokarsinomu hücre hattı olan A549'da eksprese olduğunu göstermiştir. Bu çalışmaların sonucunda FOXP3'ün proliferasyonu arttırdığı, invazyon ve metastazı desteklediği görülmektedir (O'Callaghan et al., 2015; Li et al., 2016; Yang et al., 2017).

Hipoksi indüklenebilir faktör 1 (HIF1) ortamda oksijen miktarının az olduğu durumlarda O<sub>2</sub> homeostazını sağlayarak hayatta kalmayı sağlayan transkripsiyon faktörüdür. Hipoksi, kanserde anormal damarlanma ve hızla artan hücre proliferasyonu ile ortaya çıkmaktadır. HIF1  $\alpha$  normoksik koşullar altında 5 dak'lık yarılanma süresine sahipken, hipoksik koşullar altında stabil kalarak hücre içinde birikmeye başlar. HIF1  $\alpha$ 'nın aktivasyonu tümörlerde anjiyogeneze, hücre çoğalmasına, invazyon ve metastaza, glikoz metabolizmasının aktivasyonuna ve tedaviye dirence neden olmaktadır. Akciğer, meme, pankreas, karaciğer kanseri gibi birçok kanser tipinde aşırı eksprese olmaktadır (Acosta-Iborra et al., 2009; Yu., 2017).



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Gereçler

##### 3.1.1. Kimyasal Maddeler

Çizelge 3.1. Yapılan araştırmada kullanılan kimyasal maddeler ve markaları

Kimyasal Maddeler	Markaları
Penisilin/Streptomisin	Thermo Fisher Scientific
FBS	Gibco, Life Technologies
DMSO	Sigma, Life Science
DMEM F12	Gibco, Life Technologies
RNA İzolasyon Kiti	NucleoSpin, Macherey Nagel
Syber Green	Bioline, SensiFast Sybr
cDNA Kiti	ProtoScript
Gene özgü primerler	Sentromer
IL 12 p70 ELISA kiti	Picokine, Elisa Kit
IL 12 p40 ELISA kiti	Picokine, Elisa Kit
dPBS	Gibco, Life Technologies
L- Glutamin	Gibco, Life Technologies
Tripsin-EDTA (%0,25, %0,05)	Gibco, Life Technologies
EGF	Thermo Fisher Scientific
Tripan Blue Solusyonu	Sigma, Life Science

### 3.1.2. Cihazlar

Çizelge 3.2. Yapılan araştırmada kullanılan cihazlar ve markaları

Cihazlar	Markaları
Laminar Flow Kabin	FASTER, SafeFAST Classic
Pipetler (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Corning, Axygen
Elektronik Pipet	Thermo Scientific, S1 Pipet Filter
Mikropipet Seti (0,2-2 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Thermo Scientific, Finnipipette
Santrifüjler	Hettich, Universal 320R
CO <sub>2</sub> İnkübatörü	Memmert
Multiskan Go Mikroplate Spektrofotometre	Thermo Fisher Scientific
BioRad Real Time Sistem	Bio-Rad, CFX Connect Realtime System
96-kuyulu Real-Time PCR Plakası	Corning, Axygen
Seals	Corning, Axygen
Vorteks	Stuart
Işık Mikroskobu	Zeiss, Axio Vert. A1
Su Banyosu	Memmert
Minispin	Four E's Scientific
Otoklav	BES Dik Tip Otoklav
Su Arıtma Sistemi	Thermo Scientific SMART2PURE
Buzdolapları	Arçelik, BEKO, Haier Biomedical
Buz Makinesi	Scotsman AF80
Sıvı Nitrojen Tankı	Thermo Scientific
Hücre Kültür Flaskları ve Petrileri (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> , 100x25 mm)	Corning, Axygen
BioRad T100 Thermal Cyclers	Bio-Rad
Falkonlar (15 ml, 50 ml)	Corning
Thoma Lamı ve Lameli	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG
6 kuyulu ve 96 kuyulu Plaka	Corning, Axygen
Serolojik Pipetler (5 ml, 10ml, 25 ml, 50 ml)	Corning, Axygen
Eppendorf Tüpleri (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	ISOLAB
Karyotüp (2 ml)	ISOLAB
Filtreler (0,22 mm)	Millipore Corporation SCIOLOGEX
Aspirasyon	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG
Cam Pastör Pipeti	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG
Transwell Inset Sistemi	FALCON, Corning

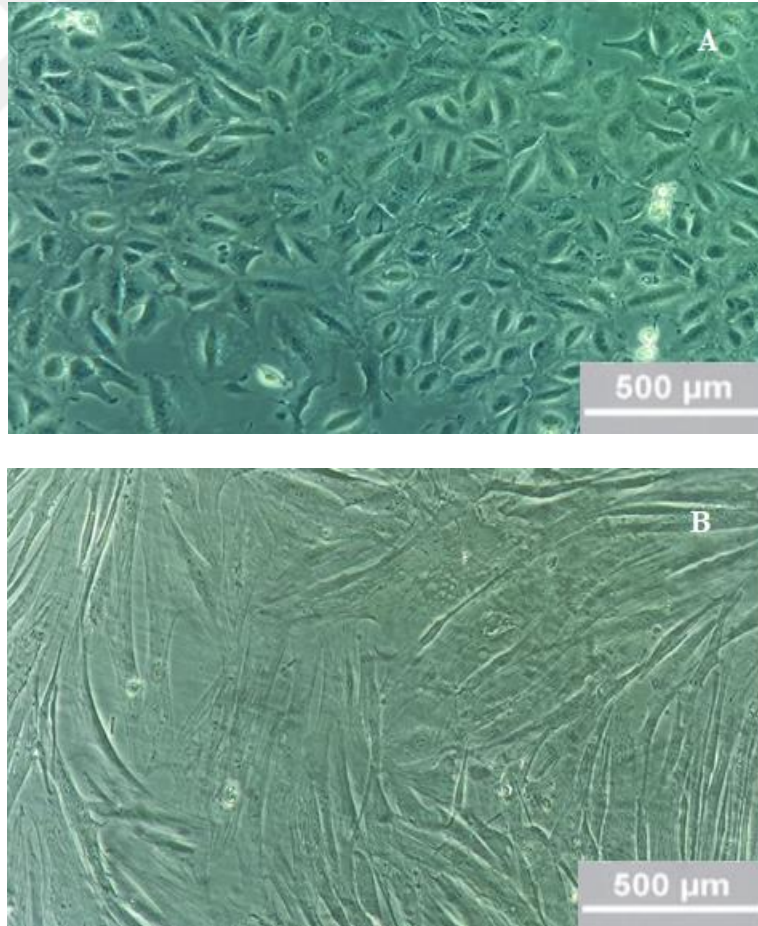
### 3.1.3. Hücreler

İnsan yağ dokusu kökenli mezenkimal kök hücreler (Acıbadem Üniversitesi) ve A549 akciğer kanser hücreleri (Yeditepe Üniversitesi)

### 3.1.4. Hücrelerin Kültür Ortamında Büyütülmesi

Araştırmada kullanılan MKH'ler Acıbadem Üniversitesi'nden 3. pasaj sonu olarak temin edilmiştir. Hücreler DMEM F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12)'nin içinde %1 penisilin/streptomisin, %25 FBS eklenerek %95'lik hava ve %5 CO<sub>2</sub>'li gaz ortamında, 37 °C'deki CO<sub>2</sub> inkübatöründe kültüre edildi ve yeterli sayıya ulaştığında deneye alındı.

Araştırmada kullanılan A549 kanser hücreleri Yeditepe Üniversitesinden temin edilmiştir. Hücreler DMEM F12'nin içinde %1 penisilin/streptomisin, %10 FBS eklenerek %95'lik O<sub>2</sub> ve %5 CO<sub>2</sub>'li, gaz ortamında, 37 °C'deki CO<sub>2</sub> inkübatöründe kültüre edildi ve yeterli sayıya ulaştığında deneye alındı (Lee et al., 2014)



**Şekil 3.1.** Deneyde kullanılan hücreler **A)** A549 Akciğer Kanseri Hücreleri ve **B)** Mezenkimal Kök Hücreler

## **3.2. Yöntem**

Yapılan deneysel çalışmalar hücre kültürü seviyesinde moleküler temeller üzerine gerçekleştirildi. Üç ayrı grup oluşturuldu. MKH'lerden salınan sitokinlerin (IL-12p70 ve IL-12p40) A549 kanser hücreleri üzerindeki etkileri toplanan besiyerlerinde ELİSA, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (gz-PZR) yöntemleriyle araştırıldı.

### **3.2.1. Gruplar**

1. MKH

2. A549 hücreleri

3. MKH+A549 hücreleri (Transwell İnsert Sistemi kullanılarak araştırılmıştır)

#### ***1. Grup MKH***

$3 \times 10^5$  hücre 6 kuyucuklu plakalara ekilerek, konfluent olması beklendi. Konfluent olunca eski besiyeri aspire edilerek hücreler PBS ile yıkandı ve kuyucuklara yeni FBS içermeyen besiyeri eklenerek kültüre edildi. IL-12 nin yarılanma ömrü kısa olduğu için deneyin 2., 5., 12., 24., 48. ve 72. saatlerinde besiyerlerinden örnek alınarak 1000 g x 10 dak. santrüfuj edildi ve süpernatant 0,2 µm lik filtreden geçirilerek sitokinlerin ölçümü için stoklandı (-80 °C). Aynı saatlerde hücreler % 0,25'lik tripsin-EDTA kullanılarak kaldırıldı. Kaldırılan hücrelerden gz-PZR analizi için RNA izolasyonu yapıldı ve cDNA'ya çevrildi.

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

$3 \times 10^5$  hücre 6 kuyucuklu plakalara ekilerek, konfluent olması beklendi (besiyeri olarak standart besiyeri ve FBS kullanılmıştır). Konfluent olunca eski besiyeri aspire edilerek hücreler PBS ile yıkandı ve kuyucuklara yeni FBS içermeyen besiyeri eklendi. IL-12 nin yarılanma ömrü kısa olduğu için deneyin 2., 5., 12., 24., 48. ve 72. saatlerinde besiyerlerinden örnek alınarak 1000 g x 10 dak. santrüfuj edildi ve süpernatant 0,2 µm lik filtreden geçirilerek sitokinlerin ölçümü için stoklandı (-80 °C). Aynı saatlerde hücreler % 0,05'lik tripsin-EDTA kullanılarak kaldırıldı. Kaldırılan hücrelerden gz-PZR analizi için RNA izolasyonu yapıldı ve cDNA'ya çevrildi.

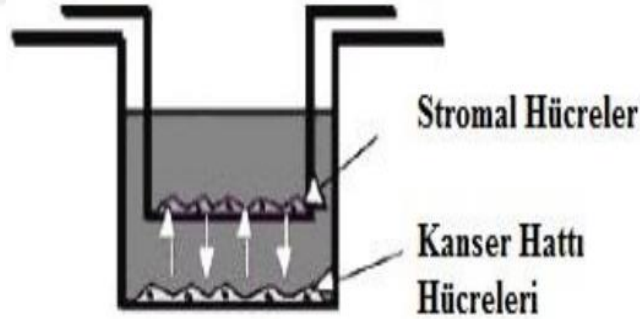
#### ***3. MKH + A549 Kanser Hücresi***

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 µm'lik porlar bulunmaktadır. Bu porlar iki hücre kültürü ortamı arasındaki iletişimi sağlamaktadır. Deneyimizde transwell sistemin alt ve üst katına aynı miktarda MKH ve A549 hücresi ekildi (300 bin hücre\kuyu). Transwell sistemi ile hücreler birleştirildiğinde eski besiyeri aspire edilerek PBS ile yıkandı ve FBS içermeyen besiyeri eklendi. IL-12 nin yarılanma ömrü kısa olduğu için deneyin 2., 5., 12., 24., 48. ve 72. saatlerinde besiyerlerinden örnek alınarak 1000 g x 10 dak. santrüfuj edildi ve süpernatant 0,2 µm lik filtreden geçirilerek sitokinlerin ölçümü için stoklandı (-80 °C). Aynı saatlerde hücreler % 0,25'lik tripsin-EDTA kullanılarak kaldırıldı. Kaldırılan hücrelerden gz-PZR analizi için RNA izolasyonu yapıldı ve cDNA'ya çevrildi.

### 3.2.2. Transwell İnsert Sistemi

Transwell insert sistemi in-vitro deneylerin yapılmasını sağlayan iki katlı birbirine porlarla bağlı petri sistemidir. Bu yöntemde 6 kuyucuklu kapların içerisine yerleştirilebilen insertler bulunur. Bu insertler içine hücre ekilebilen zemininde iki ortamdaki çözünür bileşiklerin karşılıklı geçmesini sağlayan porlar (0,45 µm genişliğinde) bulundurulur. Transwell kültür sistemi Şekil 3.2. gösterildiği gibidir.



Şekil 3.2. Transwell kültür sistemi şematize hali (Sağlam, 2014)

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

- 96 kuyucuklu plakaların 1. sütununa standartlar azalan dilüsyon oranlarında yüklendi.
- Diğer sütunlara ise (2-6) oda ısısına getirilen hücre kültürü besiyerlerinden alınan her gruba ait örnekten 100 µl yüklendi. Plakalar 90 dakika 37 °C'de inkübasyona bırakıldı.

- Süre sonunda kuyulardaki sıvılar plakanın ters çevrilmesi ile 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 yüklendi ve 60 dakika 37 °C'de inkübasyona bırakıldı.
- Sonrasında 300 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 Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleks 30 dakika, 37 °C'de inkübasyona bırakıldı.
- Süre sonunda 300 µl yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı.
- Her kuyuya 90 µl substrate solüsyonu eklendi 30 dakika, 37 °C'de inkübe edildi.
- Kuyulara 100 µl durdurma solüsyonu eklenerek spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucu ile okutuldu. Tüm işlemler her kuyuya eşit solüsyon veren mikropipetör kullanılarak yapıldı.

### **3.4. Gerçek Zamanlı PZR Uygulaması ile Gen Ekspresyon Seviyelerindeki Değişimin Saptanması**

Gerçek zamanlı PZR, çift iplik haline getirilmiş mRNA'ların floresan problemleri veya Syber Green I gibi DNA bağlayıcı floresan boyalar kullanılarak ekspresyon miktarının belirlenmesini sağlayan bir yöntemdir (Pfaffl, 2001; Navarro et al., 2015). Araştırmamızda hedef genlerin mRNA seviyelerinin ölçülmesi için her hücre grubundan total RNA izolasyonu yapıldı. Çalışmada referans gen olarak tüm çekirdekli hücre tiplerinde sabit miktarda eksprese olduğu bilinen gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) kullanıldı. Hedef genlerin ekspresyon düzeyleri GAPDH ekspresyon seviyesi temel alınarak delta delta Ct ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) metodu ile kantitatif olarak belirlendi. Deneyde kullanılan primerler aşağıdaki Çizelge 3.3. gösterilmiştir. Deneyde kullanılan primerler NCBI, primer blast ve primer 3 programları kullanılarak tasarlanmıştır.

**Çizelge 3.3.** Deneide kullanılan primerler

Primerler	Dizileri
VEGF	Forward- 5'- CCCATCGAGGAGTCCAACAT-3' Reverse- 5'-CAAATGCTTTCTCTGCTCTG-3'
LC3 II	Forward- 5'-AGAAGGCGCTTACAGCTCAA-3' Reverse- 5'-CCAATTCATTCCGAACGTCT-3'
HIF-1 $\alpha$	Forward- 5'-TGCATCTCCATCTCCTACCC-3' Reverse- 5'-CGTTAGGGCTTCTTGGATGAC-3'
BAX	Forward- 5'-CCCTTTTGCTCAGGGTTTCA-3' Reverse- 5'-ATCCTCTGCCAGCTCCATGTT-3'
BECLİN1	Forward- 5'-GGTTGAGAAAGGCGAGACA-3' Reverse- 5'-AATTGTGAGGACACCCAAGC-3'
BCL2	Forward- 5'-GCATTCTCCCGCGCTAC-3' Reverse- 5'-CCGAACTCAAAGAAGGCCA-3'
IL-12p40	Forward- 5'-CCTTGGACCAGAGCAGTGAG-3' Reverse- 5'-GCAGGAGCGAATGGCTTAGA-3'
IL-12p35	Forward- 5'-CTCCAGAAGGCCAGACAAACTC-3' Reverse- 5'-CTCTGGAATTTAGGCAACTCTCAT-3'
IL-12R $\beta$ 1	Forward- 5'-CCCCCTGGAGATGAATGTGG-3' Reverse- 5'-GTTTTTCAGGGGGAACGCACA-3'
IL-12R $\beta$ 2	Forward- 5'-GACCTCTGAAGTGTTGTCTGT-3' Reverse- 5'-AATCAACTCTGGTATAGAACTCCG-3'
Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF $\alpha$ )	Forward- 5'-GAAAACAACCCTCAGACGCC-3' Reverse- 5'-GAGCCGTGGGTCAGTATGTG-3'
Siklooksijenaz 2 (COX2)	Forward- 5'-AGGGTTGCTGGTGGTAGGAA-3' Reverse- 5'-TCATCTGCCTGCTCTGGTCAA-3'
Proliferatif Hücre Nükleer Antijeni (PCNA)	Forward- 5'-CCAGAGCTCTTCCCTTACGC-3' Reverse- 5'-TCTAGCTGGTTTCGGCTTCA-3'
Cyclin A2	Forward- 5'-AAGACTGGCATCCAAGAAGTTT-3' Reverse- 5'-TGGTTTTACTCTCATCTTGCCAC-3'
Sikline Bağımlı Kinaz 2 (CDK2)	Forward- 5'-GGATGCCTCTGCTCTCACTG-3' Reverse- 5'-GAGGACCCGATGAGAATGGC-3'
Forkhead Box P3 (FOXP3)	Forward- 5'- AGAAGCAGCGGACACTCAAT-3' Reverse- 5'- AGGTGGCAGGATGGTTTCTG-3'

### 3.4.1. RNA İzolasyonu

- mRNA'ların ekspresyon seviyelerinin ölçülmesi için RNA izolasyonu gerçekleştirildi, izolasyon NucleoSpin, Macharey Nagel RNA izolasyon kiti kullanılarak ve kit protokolü takip edilerek yapıldı.
- Deneysel süresi sonunda hücreler dPBS solüsyonu ile yıkanarak 5 dakika tripsin-ETDA'da bekletildi. Zeminden kaldırılan hücreler, santrifüj tüpüne toplanarak 5 dakika 1500 rpm'da santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- Hücrelerin üzerine 350 µl RA1 ve 3,5 µl β-mercaptoetanol ilave edilerek çözelti vortekslenildi. Elde edilen lizat NucleoSpin Filtre (mor renkli) içerisine konuldu ve 11000 x g'de 1 dak santrifüj edildi.
- Koleksiyon tüpünde toplanan lizat üzerine 350 µl %70'lik etanol eklendi ve homojen hale gelene kadar karıştırıldı.
- Homojen hale gelen lizat NucleoSpin RNA Kolon (mavi renkli) içerisine konuldu ve 11000 x g'de santrifüj edildi ve filtre yeni bir koleksiyon tüpüne yerleştirildi.
- Filtre üzerine 350 µl MDB (membran desaltin buffer, membran tuz uzaklaştırma tamponu) eklenerek 11000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Temiz bir eppendorf tüpün içinde 10 µl rDNaz ile 90 µl rDNaz reaksiyon tamponu karıştırılarak mix hazırlandı. Hazırlanan bu mix'ten 95 µl alınarak kolono eklendi ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
- Süre sonunda filtre üzerine rDNaz inaktive edilmesi için 200 µl RAW2 tamponu eklendi ve 11000 x g'de 30 saniye santrifüj edildi.
- Filtre üzerindeki filtre membranının yıkanması için 600 µl RA3 tamponu eklendi ve 11000 x g'de 30 saniye santrifüj edildi.
- Filtre yeni bir koleksiyon tüpüne alınarak üzerine 250 µl RA3 tamponu eklenerek 11000 x g'de 2 dakika santrifüj edildi.
- Filtre kit içerisindeki 1,5 ml nükleaz içermeyen eppendorf tüpüne yerleştirildi ve üzerine RNA'nın filtreden uzaklaştırılması için 30 µl Rnaz içermeyen H<sub>2</sub>O eklendi. 2 dakika santrifüj edildi.
- Toplanan RNA'nın konsantrasyonu nanodrop ile ölçüldü. İzole edilen RNA'lar cDNA sentezinde kullanılmak üzere -80 °C'de saklandı.



### 3.4.2. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için, son hacim 20 µl olacak şekilde reaksiyon hazırlandı ve sentez işlemi BİORAD T100 Thermal Cycler cihazında yapıldı. cDNA sentezinde kullanılan RNA miktarı 1 µg DNA'ya sabitlenerek hesaplandı. cDNA için kullanılan reaksiyon koşulları ve reaktifleri aşağıdaki Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5. belirtildiği gibidir.

Çizelge 3.4. cDNA sentezi reaktif miktarları

Kullanılan Reaktifler	Miktar	Reaksiyon Koşulları
Total RNA	2 µl	70 °C'de 5 dakika
d(T) <sub>2</sub> VN (50 µM)	2 µl	
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	4 µl	
<b>Total hacim</b>	<b>8 µl</b>	

Çizelge 3.5. cDNA sentezi reaksiyon koşulları

Kullanılan Reaktifler	Miktar	Reaksiyon Koşulları
M-MuLV Reaction Mix	10 µl	<b>Sentez;</b> 42 °C'de 1 saat
M-MuLV Enzyme Mix	2 µl	<b>Enzim inaktivasyonu;</b>
<b>Toplam Hacim</b>	<b>20 µl</b>	80 °C'de 5 dakika

### 3.4.3. Gerçek Zamanlı PZR

cDNA sentezi gerçekleştirildikten sonra kantitatif gen ekspresyonları gz-PZR işlemi ile gerçekleştirildi. Gz-PZR işleminde kullanılan reaktif miktarları ve reaksiyon koşulları Çizelge 3.6 ve Çizelge 3.7. gösterildiği gibidir.

**Çizelge 3.6.** Gerçek zamanlı PZR işleminde kullanılan reaktif miktarları

<b>Reaktifler</b>	<b>Stok Konsantrasyon</b>	<b>Kullanılan Miktar</b>	<b>Son Konsantrasyon</b>
SensFAST SYBR No-ROX karışımı	2X	5 µl	1X
İleri primer	10 µM	0,5 µl	2,5 µM
Geri primer	10 µM	0,5 µl	2,5 µM
Nükleaz içermeyen su	-	3 µl	-
cDNA	-	1 µl	-
<b>Toplam hacim</b>		<b>10 µl</b>	

**Çizelge 3.7.** Gerçek Zamanlı PZR işleminde kullanılan reaksiyon koşulları

Polimeraz enzim aktivasyonu	95 °C, 5 dk	
Denatürasyon	95 °C, 10 sn	Döngü Sayısı: 45
Bağlanma	60 °C, 10 sn	
Uzama	72 °C, 30 sn	
Erime Eğrisi Analizi	65 °C -95 °C, 5 sn	

Tüm deneyler iki kez biyolojik, iki kez teknik olarak tekrar edilmiştir.

#### **3.4.4. İstatiksel Analiz**

İstatistik değerlendirmeler GraphPad Prism 5.00 paket programı kullanılarak yapıldı. P<0,05 değeri anlamlılık değeri olarak kabul edildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile araştırıldı. İki'den fazla grup ortalamasının karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi, bağımsız iki grubun karşılaştırılmasında ise iki yönlü ANOVA testi ile kullanıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1.Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR ile Genlerin mRNA Seviyelerinin Belirlenmesi

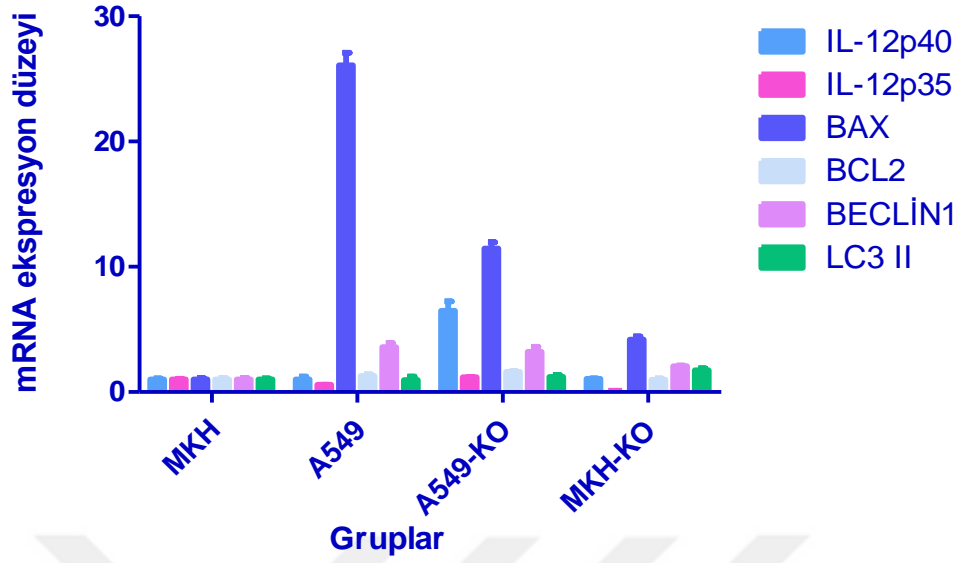
Deneyde belirlenen sürelerde bir arada tutulan hücreler, süreler sonunda kaldırılarak total RNA izolasyonu ve ardından cDNA sentezi yapıldı. Daha sonra belirlenen genlerin ekspresyon seviyelerinin ölçülebilmesi için qz-PZR deneyi yapıldı.

#### 4.1.1. 2. Saat Deney Sonuçları

Tek başına MKH grubu kontrol grubu kabul edilerek, A549+MKH grubu ve tek başına A549 kanser hücrelerinde 2 saat sonunda IL-12p40 alt birimi ve IL-12p35 alt birimine göre karşılaştırıldığında;

- Bax mRNA ifade miktarının IL-12p40 ve IL-12p35 alt birimlerine göre, tüm hücre gruplarında anlamlı olarak arttığı gözlemlendi ( $p<0,0001$ ).
- BCL2 mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p 1,0000$ ). IL-12p35 alt birimine göre ise, tüm hücre gruplarında anlamlı artış gözlemlendi ( $p<0,0001$ ).
- Beclin-1 mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, A549 ve ortak kültür MKH'de anlamlı artış gösterirken ortak kültür A549'da anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ( $p<0,0001$ ). IL-12p35 alt birimine göre ise, tüm hücre gruplarında anlamlı artış gözlemlendi ( $p<0,0001$ ).
- LC3 II mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p 1,0000$ ). IL-12p35 alt birimine göre ise, tüm hücre gruplarında istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi ( $p<0,0001$ ) (Şekil 4.1.).

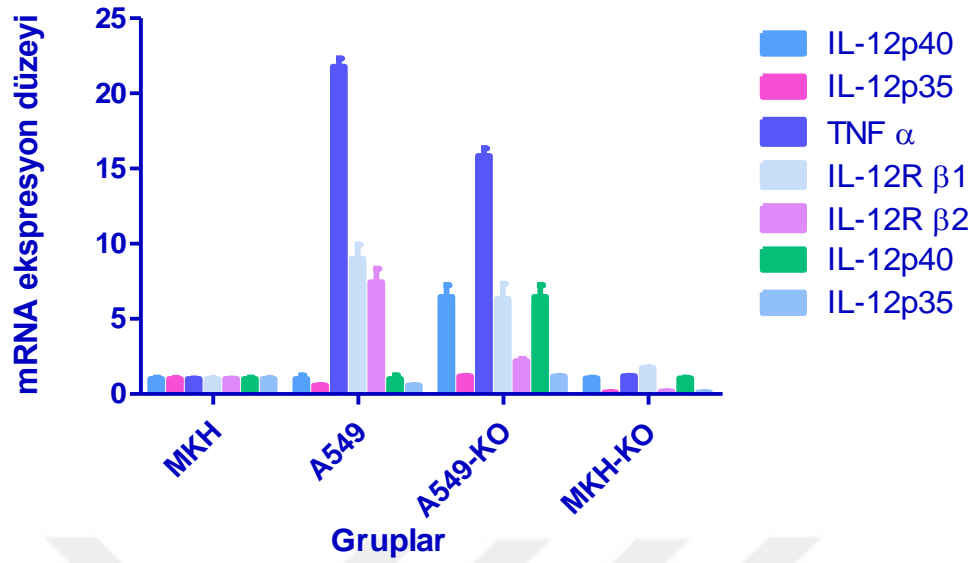
## IL-12p40-p35 APOPTOZ, OTOFAJİ DEĞİŞİMİ



Şekil 4.1. 2. saat IL-12p40 ve p35 göre apoptoz ve otofaji değişimi

- TNF $\alpha$  mRNA ifade miktarının IL-12p40 ve IL-12p35 alt birimlerine göre, tüm hücre gruplarında anlamlı artış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- IL-12R  $\beta 1$  mRNA ifade miktarının IL-12p40 ve IL-12p35 alt birimine göre, tüm hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 1,0000$ ).
- IL-12R  $\beta 2$  mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, A549 ve ortak kültür MKH'lerde anlamlı artış gösterirken ortak kültür A549'da anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimine göre ise, tüm hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 1,0000$ ).
- IL-12p35 alt birimi mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, tüm hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 1,0000$ ).
- IL-12p40 alt birimi mRNA ifade miktarının IL-12p35 alt birimine göre ise, tüm hücre gruplarında anlamlı artış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ) (Şekil 4.2.).

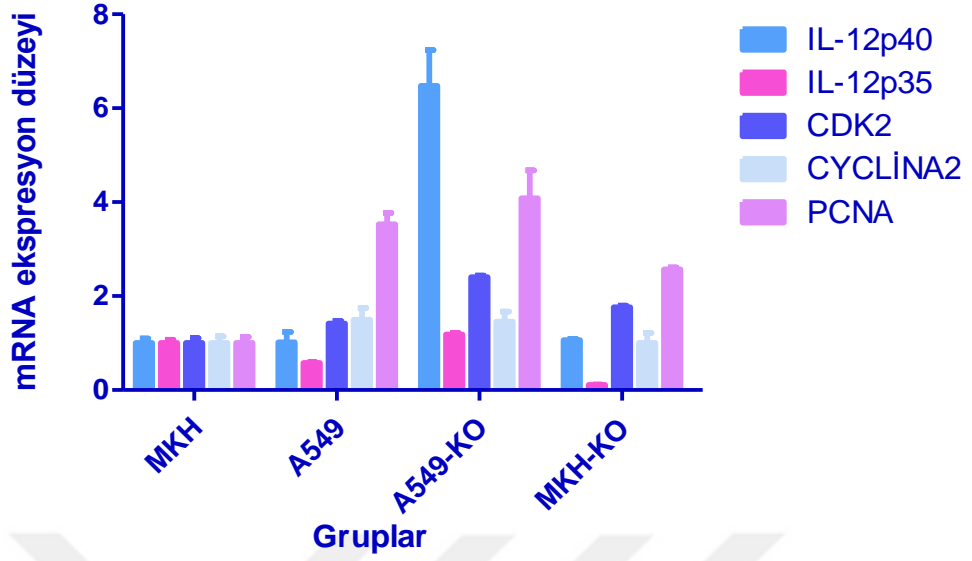
## IL-12p40-p35 SİTOKİN DEĞİŞİMİ



Şekil 4.2. 2. saat IL-12p40 ve p35 göre sitokin değişimi

- CDK2 mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre A549 ve ortak kültür MKH'lerde anlamlı artış gösterirken ortak kültür A549'da anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimine göre ise, tüm hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 1,0000$ ).
- Cyclin A2 mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, A549 ve ortak kültür MKH'lerde anlamlı artış gösterirken ortak kültür A549'da anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimine göre ise, tüm hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 1,0000$ ).
- PCNA mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, A549 ve ortak kültür MKH'lerde anlamlı artış gösterirken ortak kültür A549'da anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimine göre ise, tüm hücre gruplarında anlamlı artış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ) (Şekil 4.3.).

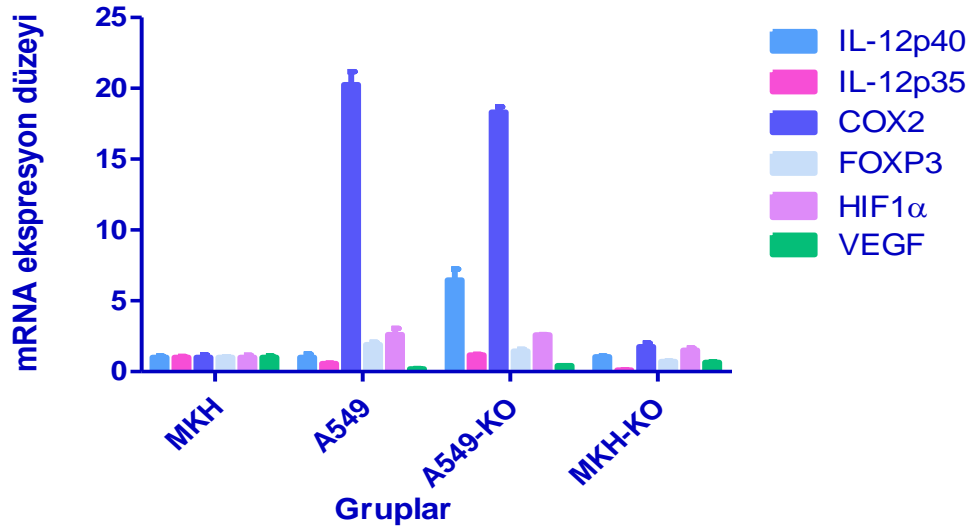
## IL-12p40-p35 HÜCRE DÖNGÜSÜ DEĞİŞİMİ



Şekil 4.3. 2. saat IL-12p40 ve p35 göre hücre döngüsü değişimi

- COX2 mRNA ifade miktarının IL-12p40 ve IL-12p35 alt birimlerine göre, tüm hücre gruplarında anlamlı artış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- FOXP3 mRNA ifade miktarının IL-12p40 ve IL-12p35 alt birimlerine göre, tüm hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 1,0000$ ).
- HIF1  $\alpha$  mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, A549 ve ortak kültür MKH'lerde anlamlı artış gösterirken ortak kültür A549'da anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimlerine göre, tüm hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 1,0000$ ).
- VEGF mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, A549 ve ortak kültür MKH'lerde anlamlı artış gösterirken ortak kültür A549'da anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimlerine göre, tüm hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 1,0000$ ) (Şekil 4.4.)

## IL-12p40-p35 PROLİFERASYON DEĞİŞİMİ



Şekil 4.4. 2. saat IL-12p40 ve p35 göre proliferasyon değişimi

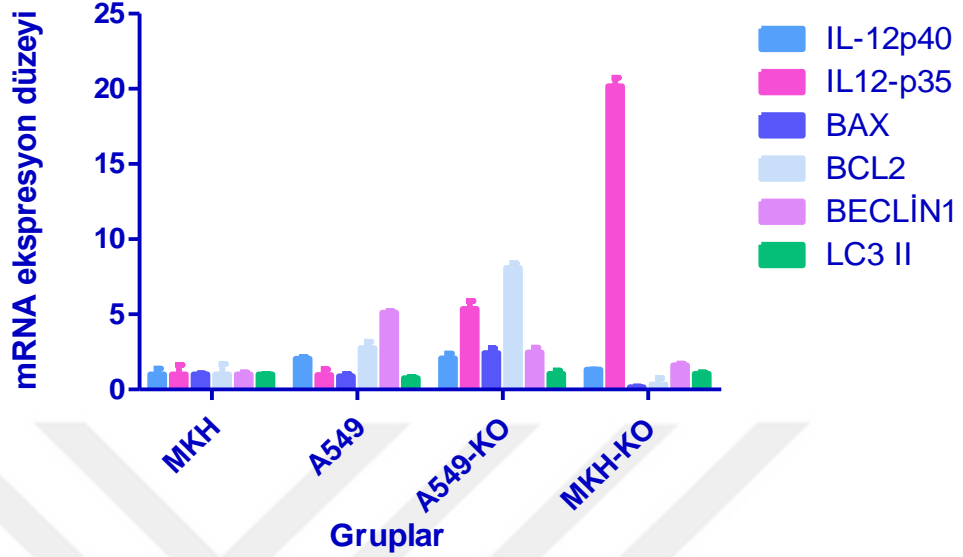
### 4.1.2. 5. Saat Deney Sonuçları

Tek başına MKH grubu kontrol grubu kabul edilerek, A5495+MKH grubu ve tek başına A549 kanser hücrelerinde 5 saat sonunda IL-12p40 alt birimi ve IL-12p35 alt birimine göre karşılaştırıldığında;

- Bax mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, A549 ve ortak kültür MKH'de anlamlı azalış gösterirken ortak kültür A549'da anlamlı olarak artış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimlerine göre, tüm hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 1,0000$ ).
- BCL2 mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, tüm hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 1,0000$ ). IL-12p35 alt birimine göre ise, A549 ve ortak kültür A549'da anlamlı artış gösterirken ortak kültür MKH'lerde anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- Beclin-1 mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, tüm hücre gruplarında anlamlı artış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimine göre ise, A549'da anlamlı artış gösterirken ortak kültür A549 ve ortak kültür MKH'lerde anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- LC3 II mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, tüm hücre gruplarında anlamlı azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimine göre ise,

tüm hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi (p 1,0000) (Şekil 4.5.).

### IL-12p40-p35 APOPTOZ, OTOFAJİ DEĞİŞİMİ

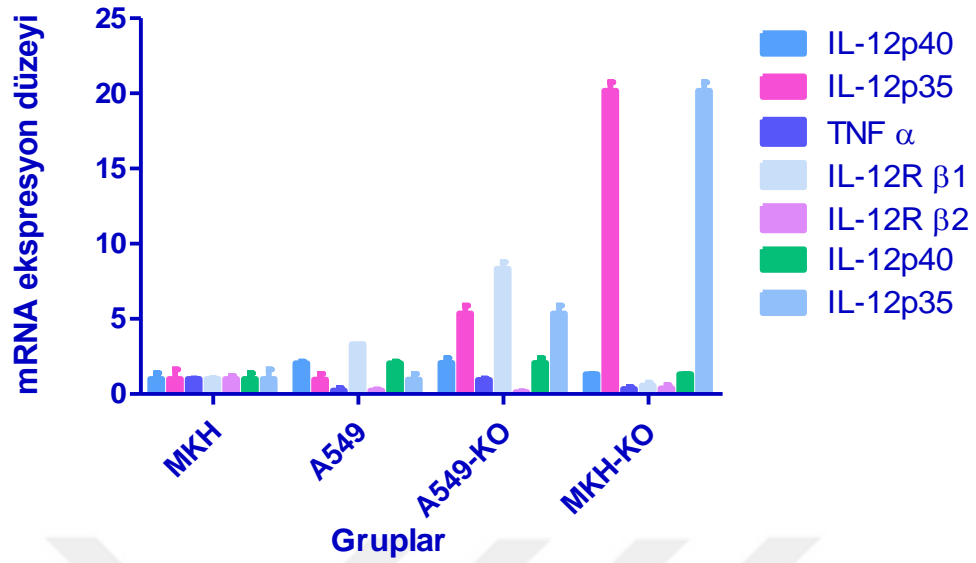


Şekil 4.5. 5. saat IL-12p40 ve p35 göre apoptoz ve otofaji değişimi

- TNF $\alpha$  mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, tüm hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi (p 1,0000). IL12-p35 alt birimine göre ise, tüm hücre gruplarında anlamlı azalış gözlemlendi (p<0,0001).
- IL-12R  $\beta$ 1 mRNA ifade miktarının IL-12p40 ve IL-12p35 alt birimlerine göre, tüm hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi (p 1,0000).
- IL-12R  $\beta$ 2 mRNA ifade miktarının IL-12p40 ve IL-12p35 alt birimlerine göre, tüm hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi (p 1,0000).
- IL-12p35 alt birimi mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, tüm hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi (p 1,0000).
- IL-12p40 alt birimi mRNA ifade miktarının IL-12p35 alt birimine göre, tüm hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi (p 1,0000) (Şekil 4.6.).



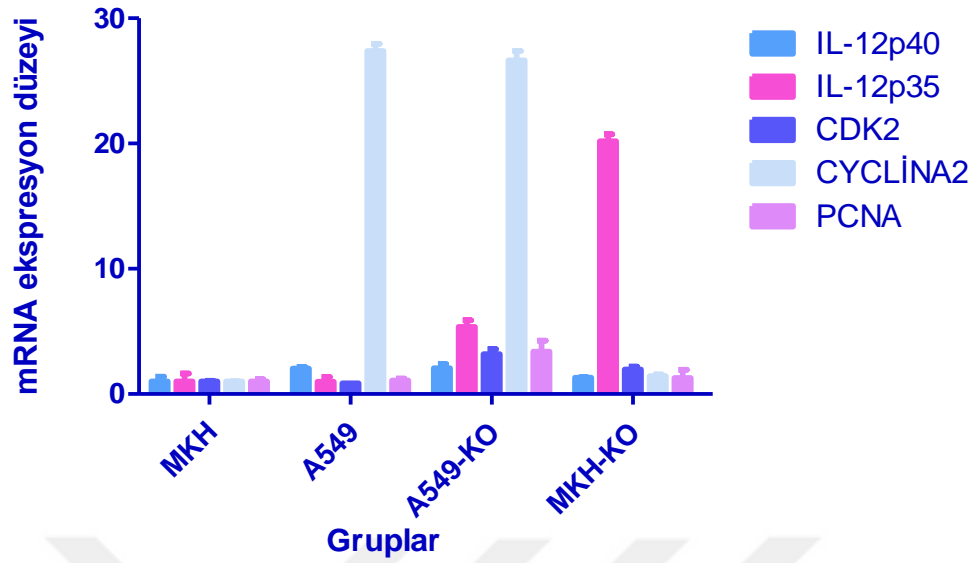
## IL-12p40-p35 SİTOKİN DEĞİŞİMİ



Şekil 4.6. 5. saat IL-12p40 ve p35 göre sitokin değişimi

- CDK2 mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, A549’da anlamlı azalış gösterirken ortak kültür A549 ve ortak kültür MKH’lerde anlamlı olarak artış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimine göre ise, A549’da anlamlı artış gösterirken ortak kültür A549 ve ortak kültür MKH’lerde anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- Cyclin A2 mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, tüm hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 1,0000$ ). IL-12p35 alt birimine göre ise, A549 ve ortak kültür A549’da anlamlı artış gösterirken ortak kültür MKH’lerde anlamlı azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- PCNA mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, A549 ve ortak kültür MKH’lerde anlamlı azalış gösterirken ortak kültür A549’da anlamlı olarak arttığı gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimine göre ise, tüm hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 1,0000$ ) (Şekil 4.7.).

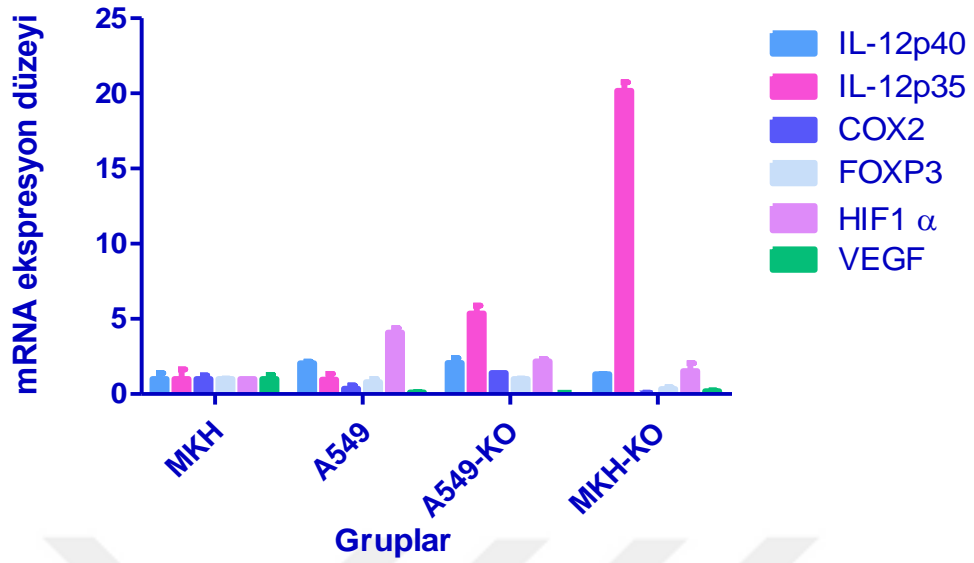
## IL-12p40-p35 HÜCRE DÖNGÜSÜ DEĞİŞİMİ



Şekil 4.7. 5. saat IL-12p40 ve p35 göre hücre döngüsü değişimi

- COX2 mRNA ifade miktarının IL-12p40 ve IL-12p35 alt birimlerine göre, tüm hücre gruplarında anlamlı azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- FOXP3 mRNA ifade miktarının IL-12p40 ve IL-12p35 alt birimlerine göre, tüm hücre gruplarında anlamlı azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- HIF1  $\alpha$  mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, tüm hücre gruplarında anlamlı azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimine göre, A549’da anlamlı artış gözlenirken ortak kültür A549 ve ortak kültür MKH’lerde anlamlı azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- VEGF mRNA ifade miktarının IL-12p40 ve IL-12p35 alt birimlerine göre, tüm hücre gruplarında anlamlı azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ) (Şekil 4.8.).

## IL-12p40-p35 PROLİFERASYON DEĞİŞİMİ



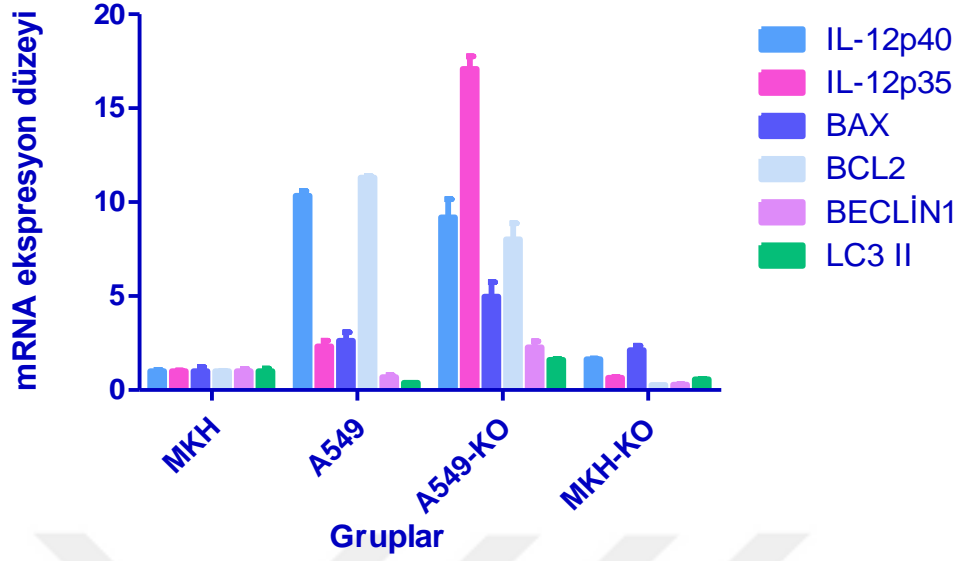
Şekil 4.8. 5. saat IL-12p40 ve p35 göre proliferasyon değişimi

### 4.1.3. 12. Saat Deney Sonuçları

Tek başına MKH grubu kontrol grubu kabul edilerek, A549+MKH grubu ve tek başına A549 kanser hücrelerinde 12 saat sonunda IL-12p40 alt birimi ve IL-12p35 alt birimine göre karşılaştırıldığında;

- Bax mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, ortak kültür MKH'lerde anlamlı artış gösterirken ortak kültür A549 ve A549'da anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimine göre ise, A549 ve ortak kültür MKH'lerde anlamlı artış gösterirken ortak kültür A549'da anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- BCL2 mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, tüm hücre gruplarında anlamlı azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimine göre ise, A549'da anlamlı artış gösterirken ortak kültür A549 ve ortak kültür MKH'lerde anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- Beclin-1 mRNA ifade miktarının IL-12p40 ve IL-12p35 alt birimlerine göre, tüm hücre gruplarında anlamlı azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- LC3 II mRNA ifade miktarının IL-12p40 ve IL-12p35 alt birimlerine göre, tüm hücre gruplarında anlamlı azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ) (Şekil 4.9.).

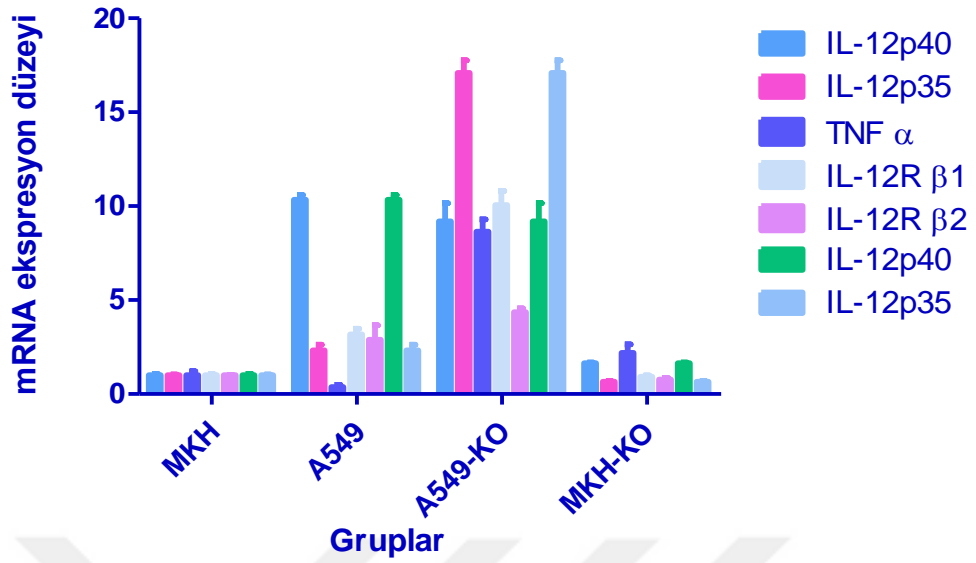
## IL-12p40-p35 APOPTOZ, OTOFAJİ DEĞİŞİMİ



Şekil 4.9. 12. saat IL-12p40 ve p35 göre apoptoz ve otofaji değişimi

- TNF $\alpha$  mRNA ifade miktarının IL-12p40 ve IL-12p35 alt birimlerine göre, A549 ve ortak kültür A549’da anlamlı azalış gösterirken ortak kültür MKH’lerde anlamlı artış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- IL-12R  $\beta 1$  mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, A549 ve ortak kültür MKH’lerde anlamlı azalış gösterirken ortak kültür A549’da anlamlı olarak artış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimlerine göre, A549 ve ortak kültür MKH’lerde anlamlı artış gösterirken ortak kültür A549’da anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- IL-12R  $\beta 2$  mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, tüm hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 1,0000$ ). IL-12p35 alt birimine göre ise, A549 ve ortak kültür MKH’lerde anlamlı artış gösterirken ortak kültür A549’da anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- IL-12p35 alt birimi mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, A549 ve ortak kültür MKH’lerde anlamlı azalış gösterirken ortak kültür A549’da anlamlı olarak artış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- IL-12p40 alt birimi mRNA ifade miktarının IL-12p35 alt birimine göre, A549 ve ortak kültür MKH’lerde anlamlı artış gösterirken ortak kültür A549’da anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ) (Şekil 4.10.).

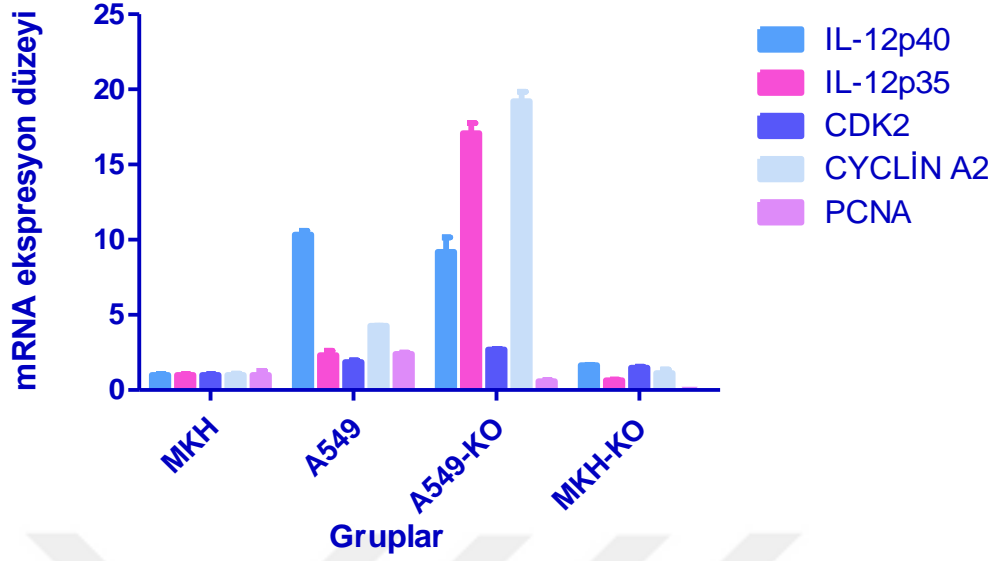
## IL-12p40-p35 SİTOKİN DEĞİŞİMİ



Şekil 4.10. 12 saat IL-12p40 ve p35 göre sitokin değişimi

- CDK2 mRNA ifade miktarının IL-12p40 ve IL-12p35 alt birimlerine göre, tüm hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 1,0000$ ).
- Cyclin A2 mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre A549 ve ortak kültür MKH'lerde anlamlı azalış gösterirken ortak kültür A549'da anlamlı olarak artış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimine göre ise, tüm hücre gruplarındaki artış istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p < 0,0001$ ).
- PCNA mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, tüm hücre gruplarında anlamlı azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimine göre ise, A549'da anlamlı olarak artarken ortak kültür A549 ve ortak kültür MKH'lerde anlamlı azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ) (Şekil 4.11.).

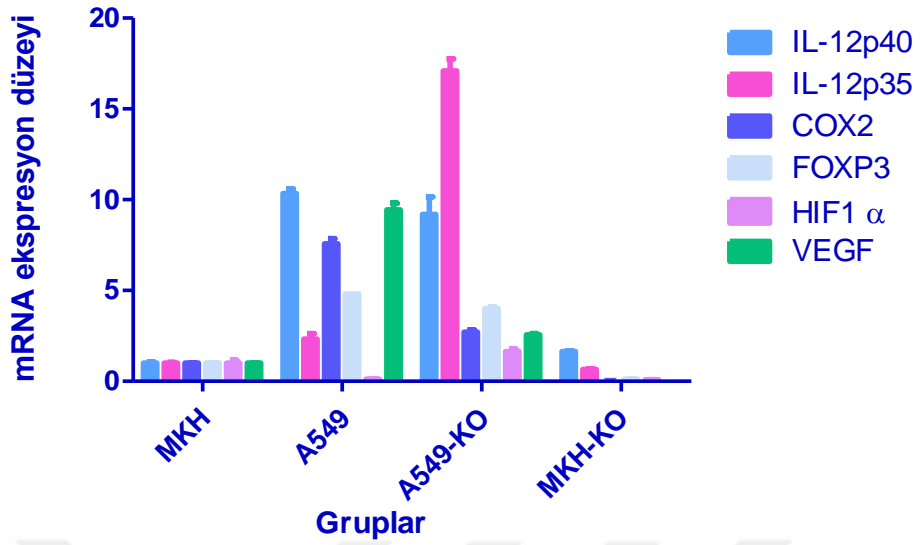
## IL-12p40-p35 HÜCRE DÖNGÜSÜ DEĞİŞİMİ



Şekil 4.11. 12. saat IL-12p40 ve p35 göre hücre döngüsü değişimi

- COX2 mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, tüm hücre gruplarında anlamlı azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimine göre ise, A549'da anlamlı olarak artarken ortak kültür A549 ve ortak kültür MKH'lerde anlamlı azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- FOXP3 mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, tüm hücre gruplarında anlamlı azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimine göre ise, A549'da anlamlı olarak artarken ortak kültür A549 ve ortak kültür MKH'lerde anlamlı azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- HIF1  $\alpha$  mRNA ifade miktarının IL-12p40 ve IL-12p35 alt birimlerine göre, tüm hücre gruplarında anlamlı azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- VEGF mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, tüm hücre gruplarında anlamlı azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimine göre ise, A549'da anlamlı olarak artarken ortak kültür A549 ve ortak kültür MKH'lerde anlamlı azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ) (Şekil 4.12.).

## IL-12p40-p35 PROLİFERASYON DEĞİŞİMİ



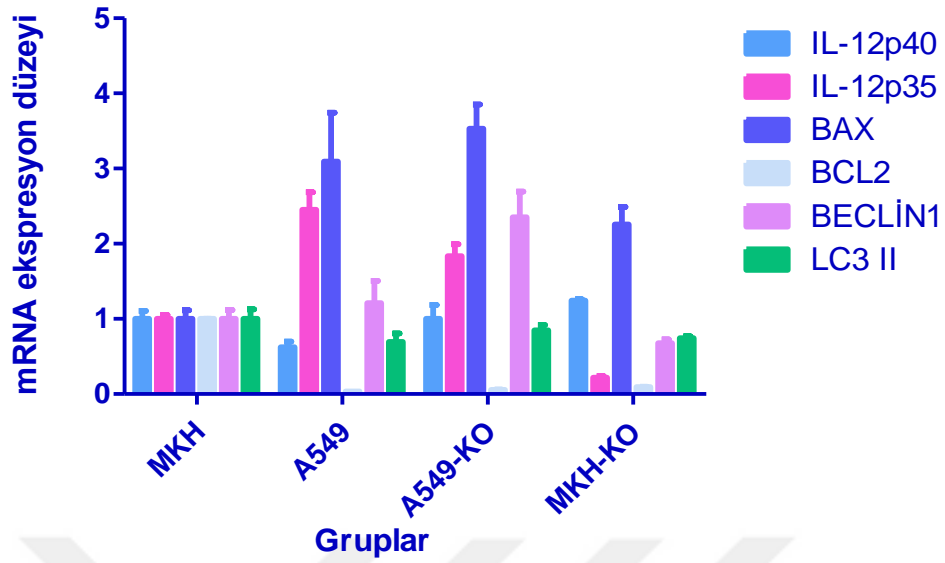
Şekil 4.12. 12. saat IL-12p40 ve p35 göre proliferasyon değişimi

### 4.1.4. 24. Saat Deney Sonuçları

Tek başına MKH grubu kontrol grubu kabul edilerek, A549+MKH grubu ve tek başına A549 kanser hücrelerinde 24 saat sonunda IL-12p40 alt birimi ve IL-12p35 alt birimine göre karşılaştırıldığında;

- Bax mRNA ifade miktarının IL-12p40 ve IL-12p35 alt birimlerine göre, tüm hücre gruplarında anlamlı artış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- BCL2 mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimlerine göre, A549'da anlamlı olarak artarken, ortak kültür A549 ve ortak kültür MKH'lerde anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimlerine göre ise, tüm hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p = 1,0000$ ).
- Beclin-1 mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimlerine göre, A549 ve ortak kültür A549'da anlamlı olarak artarken, ortak kültür MKH'lerde anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimlerine göre ise, tüm hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p = 1,0000$ ).
- LC3 II mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimlerine göre, A549'da anlamlı olarak artarken, ortak kültür A549'da ve ortak kültür MKH'lerde anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimlerine göre ise, tüm hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p = 1,0000$ ) (Şekil 4.13.).

## IL-12p40-p35 APOPTOZ, OTOFAJİ DEĞİŞİMİ

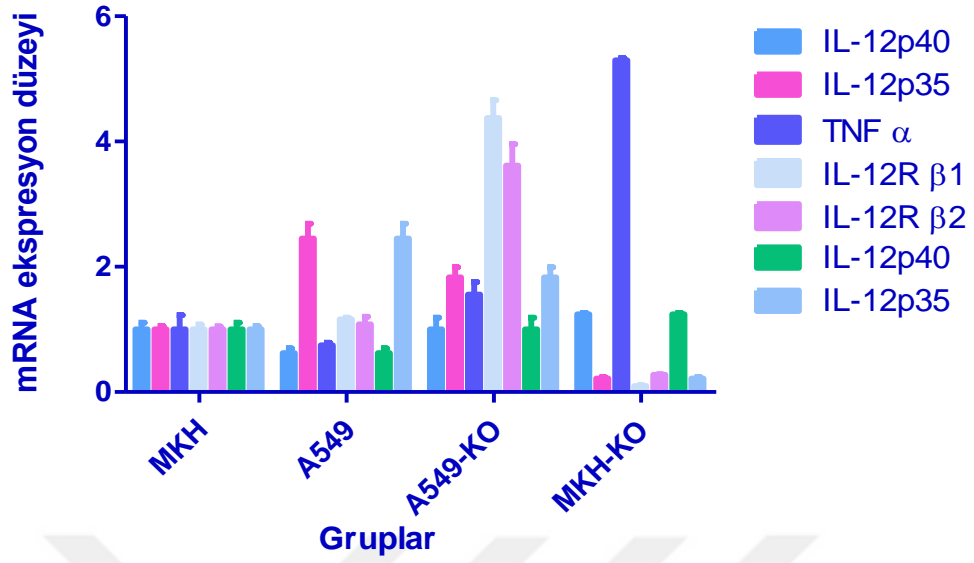


Şekil 4.13. 24. Saat IL-12p40 ve p35 göre apoptoz ve otofaji değişimi

- TNF $\alpha$  mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, tüm hücre gruplarında anlamlı artış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimlerine göre ise, A549 ve ortak kültür A549'da anlamlı azalış gösterirken ortak kültür MKH'lerde anlamlı artış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- IL-12R  $\beta$ 1 mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, A549 ve ortak kültür A549'da anlamlı artış gösterirken ortak kültür MKH'lerde anlamlı olarak azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimlerine göre ise, tüm hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 1,0000$ ).
- IL-12R  $\beta$ 2 mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, A549 ve ortak kültür A549'da anlamlı artış gösterirken ortak kültür MKH'lerde anlamlı olarak azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimlerine göre ise, tüm hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 1,0000$ ).
- IL-12p35 alt birimi mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, A549 ve ortak kültür A549'da anlamlı artış gösterirken ortak kültür MKH'lerde anlamlı olarak azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- IL-12p40 alt birimi mRNA ifade miktarının IL-12p35 alt birimine göre, A549 ve ortak kültür A549'da anlamlı azalış gösterirken ortak kültür MKH'lerde anlamlı olarak artış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ) (Şekil 4.14.).



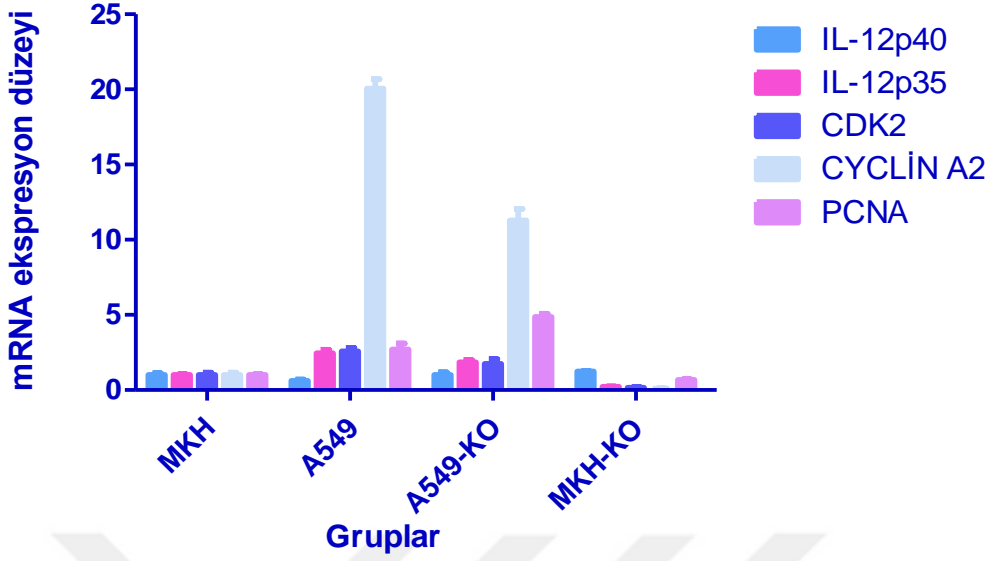
## IL-12p40-p35 SİTOKİN DEĞİŞİMİ



Şekil 4.14. 24. saat IL-12p40 ve p35 göre sitokin değişimi

- CDK2 mRNA ifade miktarının IL-12p40 ve IL-12p35 alt birimlerine göre, tüm hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 1,0000$ ).
- Cyclin A2 mRNA ifade miktarının IL-12p40 ve IL-12p35 alt birimlerine göre, A549 ve ortak kültür A549’da anlamlı artış gösterirken ortak kültür MKH’lerde anlamlı olarak azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- PCNA mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, A549 ve ortak kültür A549’da anlamlı artış gösterirken ortak kültür MKH’lerde anlamlı olarak azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimine göre ise, tüm hücre gruplarında anlamlı artış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ) (Şekil 4.15.).

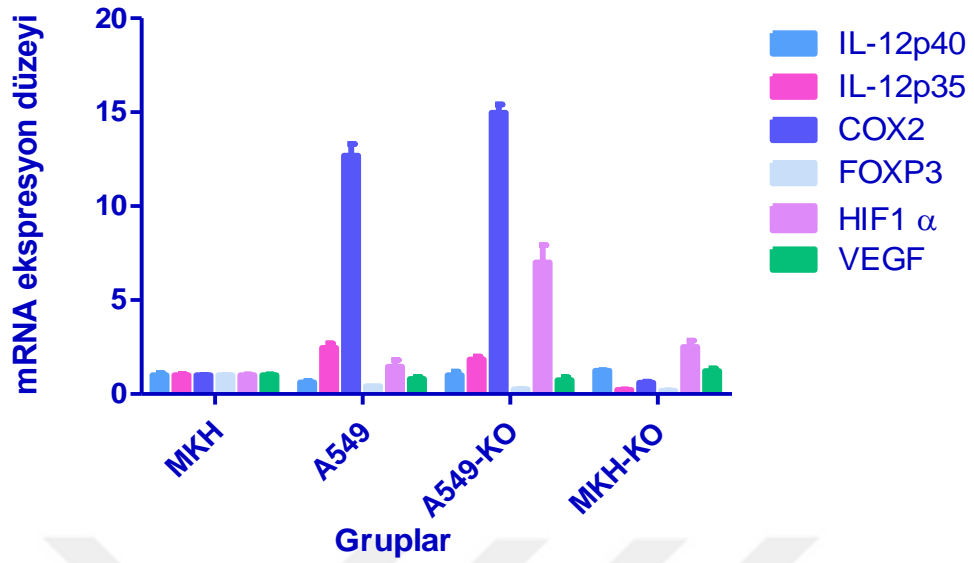
## IL-12p40-p35 HÜCRE DÖNGÜSÜ DEĞİŞİMİ



Şekil 4.15. 24. saat IL-12p40 ve p35 göre hücre döngüsü değişimi

- COX2 mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, A549 ve ortak kültür A549’da anlamlı artış gösterirken ortak kültür MKH’lerde anlamlı olarak azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimine göre ise, tüm hücre gruplarında anlamlı artış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- FOXP3 mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, tüm hücre gruplarında anlamlı azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimine göre ise, tüm hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 1,0000$ ).
- HIF1  $\alpha$  mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, tüm hücre gruplarında anlamlı artış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimine göre ise, A549’da anlamlı olarak azalırken, ortak kültür A549’da ve ortak kültür MKH’lerde anlamlı olarak arttığı gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- VEGF mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, A549’da anlamlı olarak artarken, ortak kültür A549’da ve ortak kültür MKH’lerde anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimine göre ise, tüm hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 1,0000$ ) (Şekil 4.16.).

## IL-12p40-p35 PROLİFERASYON DEĞİŞİMİ



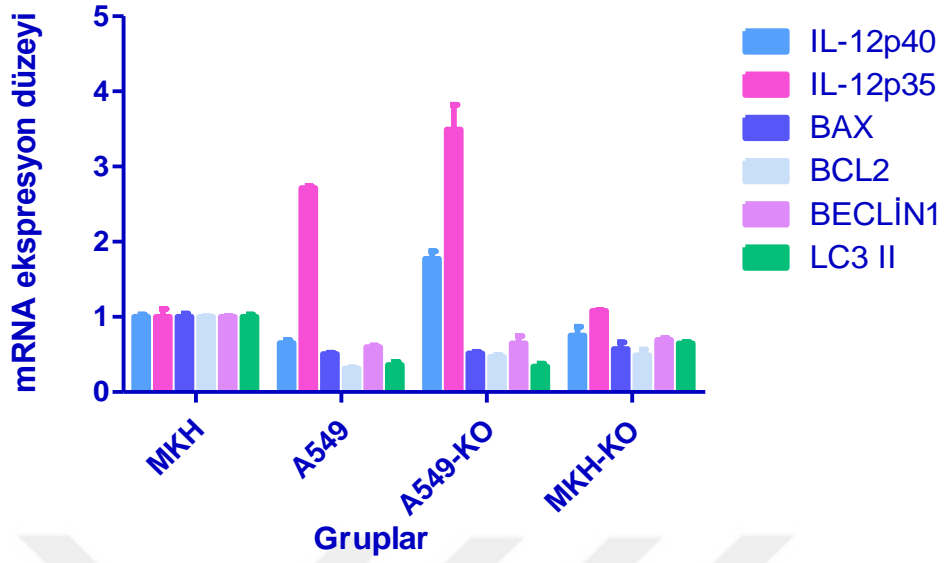
Şekil 4.16. 24. saat IL-12p40 ve p35 göre proliferasyon değişimi

### 4.1.5. 48. Saat Deney Sonuçları

Tek başına MKH grubu kontrol grubu kabul edilerek, A549+MKH grubu ve tek başına A549 kanser hücrelerinde 48 saat sonunda IL-12p40 alt birimi ve IL-12p35 alt birimine göre karşılaştırıldığında;

- Bax mRNA ifade miktarının IL-12p40 ve IL-12p35 alt birimlerine göre, tüm hücre gruplarında anlamlı azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- BCL2 mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, tüm hücre gruplarında anlamlı azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimine göre ise, tüm hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 1,0000$ ).
- Beclin-1 mRNA ifade miktarının IL-12p40 ve IL-12p35 alt birimlerine göre, tüm hücre gruplarında anlamlı azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- LC3 II mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, tüm hücre gruplarında anlamlı azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimine göre ise, tüm hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 1,0000$ ) (Şekil 4.17.).

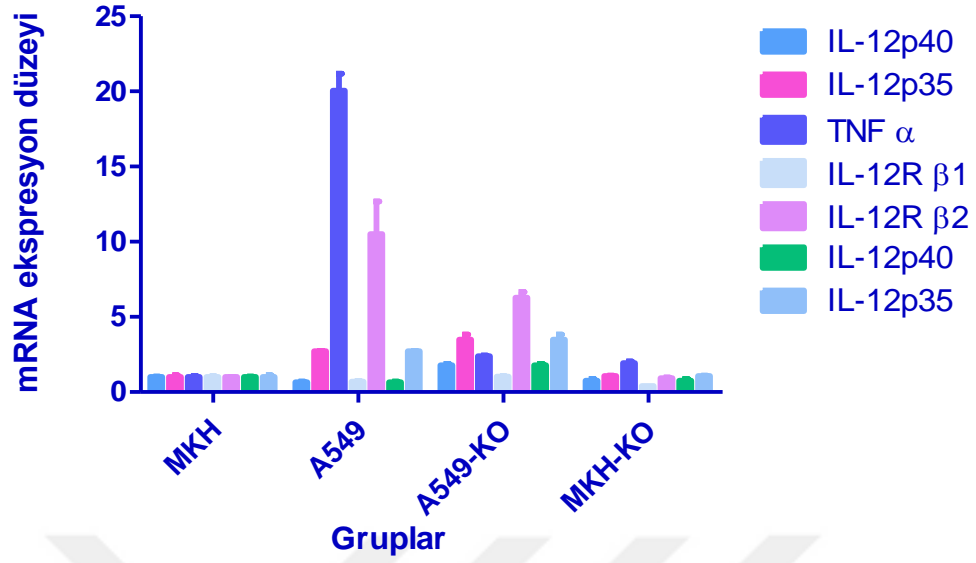
## IL-12P40-p35 APOPTOZ, OTOFAJİ DEĞİŞİMİ



Şekil 4.17. 48. saat IL-12p40 ve p35 göre apoptoz ve otofaji değişimi

- TNF $\alpha$  mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, tüm hücre gruplarında anlamlı artış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimine göre ise, A549 ve ortak kültür MKH'lerde anlamlı artış gösterirken ortak kültür A549'da anlamlı olarak azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- IL-12R  $\beta$ 1 mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, tüm hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p = 1,0000$ ). IL-12p35 alt birimine göre ise, tüm hücre gruplarında anlamlı azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- IL-12R  $\beta$ 2 mRNA ifade miktarının IL-12p40 ve IL-12p35 alt birimlerine göre, tüm hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p = 1,0000$ ).
- IL-12p35 alt birimi mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, tüm hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p = 1,0000$ ).
- IL-12p40 alt birimi mRNA ifade miktarının IL-12p35 alt birimine göre, tüm hücre gruplarında anlamlı azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ) (Şekil 4.18.).

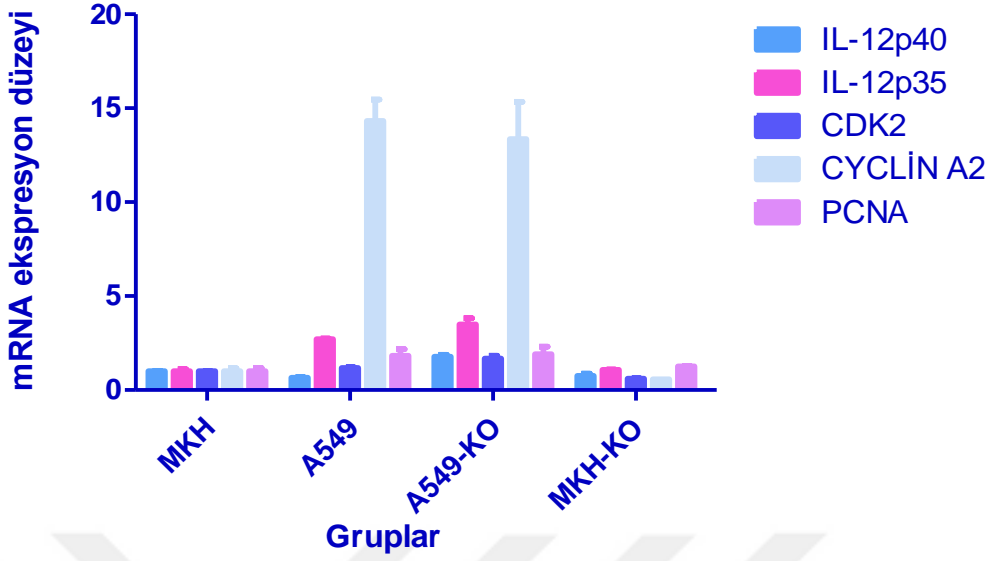
## IL-12p40-p35 SİTOKİN DEĞİŞİMİ



Şekil 4.18. 48. saat IL-12p40 ve p35 göre sitokin değişimi

- CDK2 mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, A549'da anlamlı olarak artarken, ortak kültür A549'da ve ortak kültür MKH'lerde anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimine göre ise, tüm hücre gruplarında anlamlı azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- Cyclin A2 mRNA ifade miktarının IL-12p40 ve IL-12p35 alt birimlerine göre, tüm hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 0,0001$ ).
- PCNA mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, tüm hücre gruplarında anlamlı azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimine göre ise, A549 ve ortak kültür A549'da anlamlı azalış gösterirken ortak kültür MKH'lerde anlamlı olarak artış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ) (Şekil 4.19.).

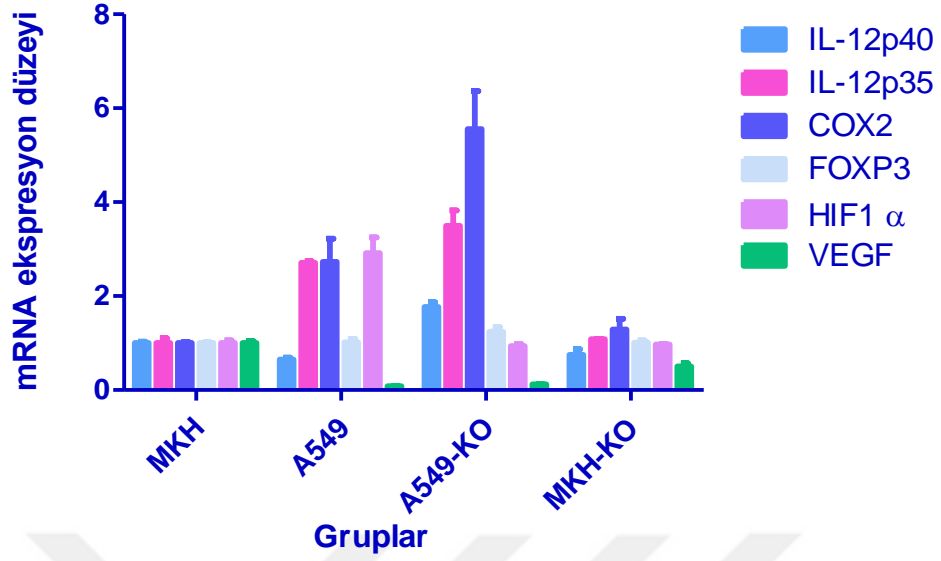
## IL-12p40-p35 HÜCRE DÖNGÜSÜ DEĞİŞİMİ



Şekil 4.19. 48. saat IL-12p40 ve p35 göre hücre döngüsü değişimi

- COX2 mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, tüm hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 1,0000$ ). IL-12p35 alt birimine göre ise, tüm hücre gruplarında anlamlı artış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- FOXP3 mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, A549 ve ortak kültür MKH'lerde anlamlı artış gösterirken ortak kültür A549'da anlamlı olarak azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimine göre ise, tüm hücre gruplarında anlamlı azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- HIF1  $\alpha$  mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, A549 ve ortak kültür MKH'lerde anlamlı artış gösterirken ortak kültür A549'da anlamlı olarak azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimine göre ise, A549'da anlamlı olarak artarken, ortak kültür A549'da ve ortak kültür MKH'lerde anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- VEGF mRNA ifade miktarının IL-12p40 ve IL-12p35 alt birimlerine göre ise, tüm hücre gruplarında anlamlı azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ) (Şekil 4.20.).

## IL-12p40-p35 PROLİFERASYON DEĞİŞİMİ



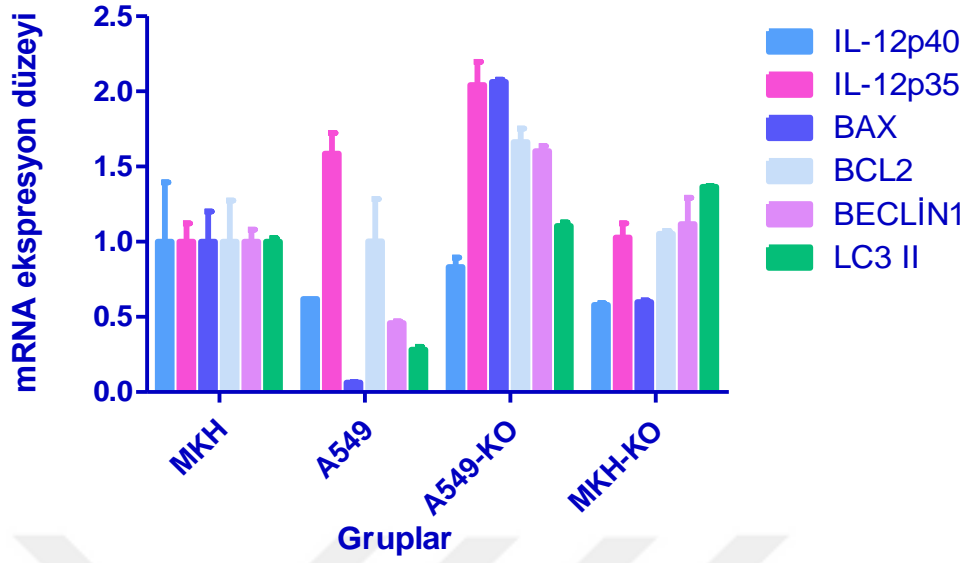
Şekil 4.20. 48. saat IL-12p40 ve p35 göre proliferasyon değişimi

### 4.1.6. 72. Saat Deney Sonuçları

Tek başına MKH grubu kontrol grubu kabul edilerek, A549+MKH grubu ve tek başına A549 kanser hücrelerinde 72 saat sonunda IL-12p40 alt birimi ve IL-12p35 alt birimine göre karşılaştırıldığında;

- Bax mRNA ifade miktarının IL-12p40 ve IL-12p35 alt birimlerine göre, tüm hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 0,0000$ ).
- BCL2 mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, tüm hücre gruplarında anlamlı artış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimine göre ise, A549 ve ortak kültür A549'da anlamlı azalış gösterirken ortak kültür MKH'lerde anlamlı olarak artış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- Beclin-1 mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, A549'da anlamlı olarak azalırken, ortak kültür A549'da ve ortak kültür MKH'lerde anlamlı olarak arttığı gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimine göre ise, tüm hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 0,0000$ ).
- LC3 II mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, A549'da anlamlı olarak azalırken, ortak kültür A549'da ve ortak kültür MKH'lerde anlamlı olarak arttığı gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimine göre ise, A549 ve ortak kültür A549'da anlamlı azalış gösterirken ortak kültür MKH'lerde anlamlı olarak artış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ) (Şekil 4.21.).

## IL-12p40-p35 APOPTOZ, OTOFAJİ DEĞİŞİMİ

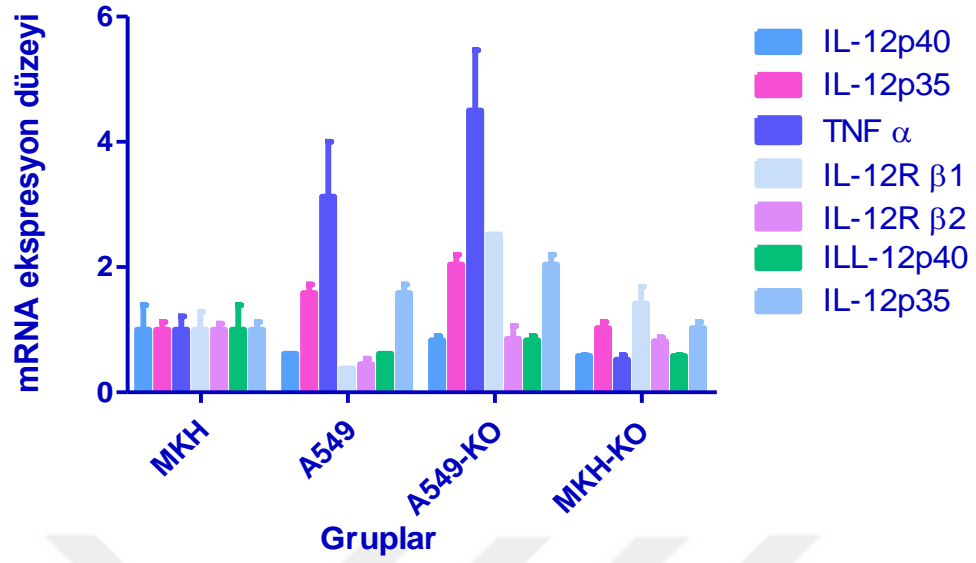


Şekil 4.21. 72. saat IL-12p40 ve p35 göre apoptoz ve otofaji değişimi

- TNF $\alpha$  mRNA ifade miktarının IL-12p40 ve IL-12p35 alt birimlerine göre, A549 ve ortak kültür A549'da anlamlı artış gösterirken ortak kültür MKH'lerde anlamlı olarak azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- IL-12R  $\beta 1$  mRNA ifade miktarının IL-12p40 ve IL-12p35 alt birimlerine göre, A549'da anlamlı olarak azalırken, ortak kültür A549'da ve ortak kültür MKH'lerde anlamlı olarak arttığı gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- IL-12R  $\beta 2$  mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, A549'da anlamlı olarak azalırken, ortak kültür A549'da ve ortak kültür MKH'lerde anlamlı olarak arttığı gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). IL-12p35 alt birimine göre ise, tüm hücre gruplarında anlamlı azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- IL-12p35 alt birimi mRNA ifade miktarının IL-12p40 alt birimine göre, tüm hücre gruplarında anlamlı artış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- IL-12p40 alt birimi mRNA ifade miktarının IL-12p35 alt birimine göre, tüm hücre gruplarında anlamlı azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ) (Şekil 4.22.).



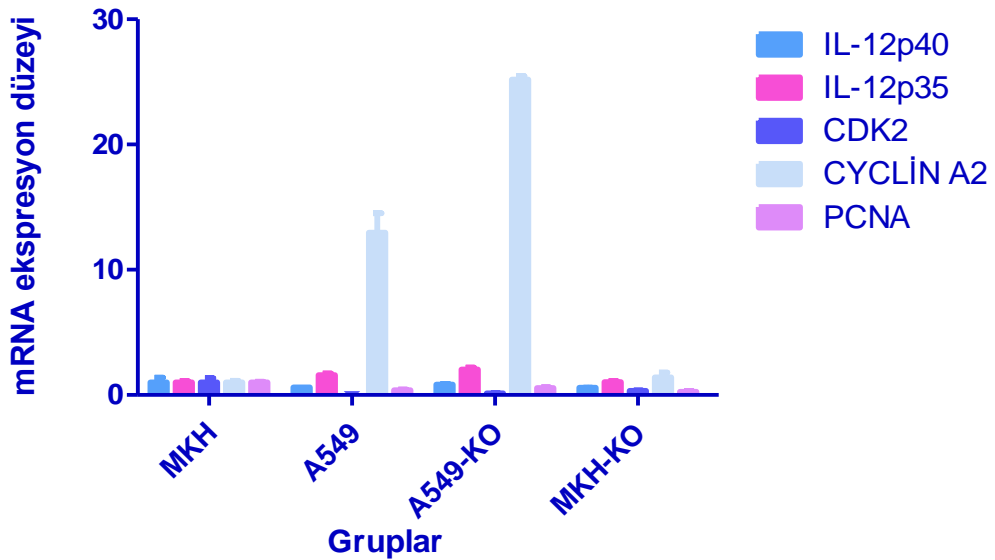
## IL-12p40-p35 SİTOKİN DEĞİŞİMİ



Şekil 4.22. 72. saat IL-12p40 ve p35 göre sitokin değişimi

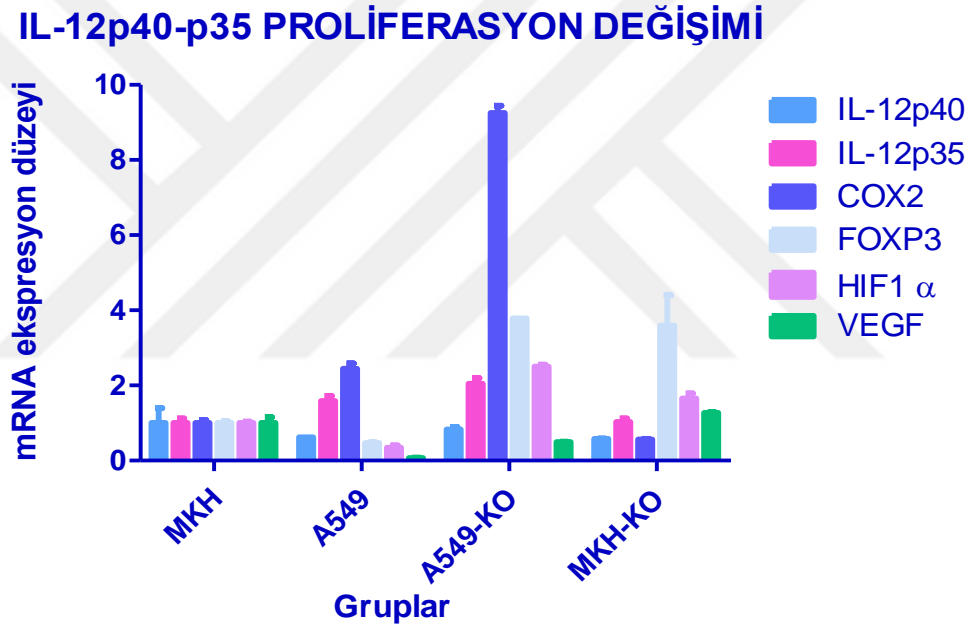
- CDK2 mRNA ifade miktarının IL-12p40 ve IL-12p35 alt birimlerine göre, tüm hücre gruplarında anlamlı azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- Cyclin A2 mRNA ifade miktarının IL-12p40 ve IL-12p35 alt birimlerine göre, tüm hücre gruplarında anlamlı artış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).
- PCNA mRNA ifade miktarının IL-12p40 ve IL-12p35 alt birimlerine göre, tüm hücre gruplarında anlamlı azalış gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ) (Şekil 4.23.).

## IL-12p40-p35 HÜCRE DÖNGÜSÜ DEĞİŞİMİ



Şekil 4.23. 72. saat IL-12p40 ve p35 göre hücre döngüsü değişimi

- COX2 mRNA ifade miktarının IL-12p40 ve IL-12p35 alt birimlerine göre, tüm hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi (p 1,0000).
- FOXP3 mRNA ifade miktarının IL-12p40 ve IL-12p35 alt birimlerine göre, tüm hücre gruplarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi (p 1,0000).
- HIF1  $\alpha$  mRNA ifade miktarının IL-12p40 ve IL-12p35 alt birimlerine göre, A549’da anlamlı olarak azalırken, ortak kültür A549’da ve ortak kültür MKH’lerde anlamlı olarak arttığı gözlemlendi (p<0,0001).
- VEGF mRNA ifade miktarının IL-12p40 ve IL-12p35 alt birimlerine göre, A549 ve ortak kültür A549’da anlamlı olarak azalırken, ortak kültür MKH’lerde anlamlı olarak arttığı gözlemlendi (p<0,0001) (Şekil 4.24.).



Şekil 4.24. 72. saat IL-12p40 ve p35 göre proliferasyon değişimi

#### 4.2. IL-12p70 ve IL-12p40 Sitokinlerinin ELİSA Yöntemiyle Değerlendirilmesi

Deney sonlarında hücre kültüründen toplanan besiyerleri sitokin ölçümünde kullanıldı. Altı farklı saatte ve üç ayrı gruptan alınan besiyerlerinde IL-12p70 ve IL-12p40 sitokinlerinin varlığı ve miktarı araştırıldı.

#### 4.2.1. ELİSA Yönteminden Elde Edilen IL-12p70 Sonuçları

Hücrelerin 2, 5, 12, 24, 48 ve 72 saat sonunda kültür ortamına salgıladıkları sitokinlerden IL-12p70'e baktığımızda; her saatin istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu bulundu.

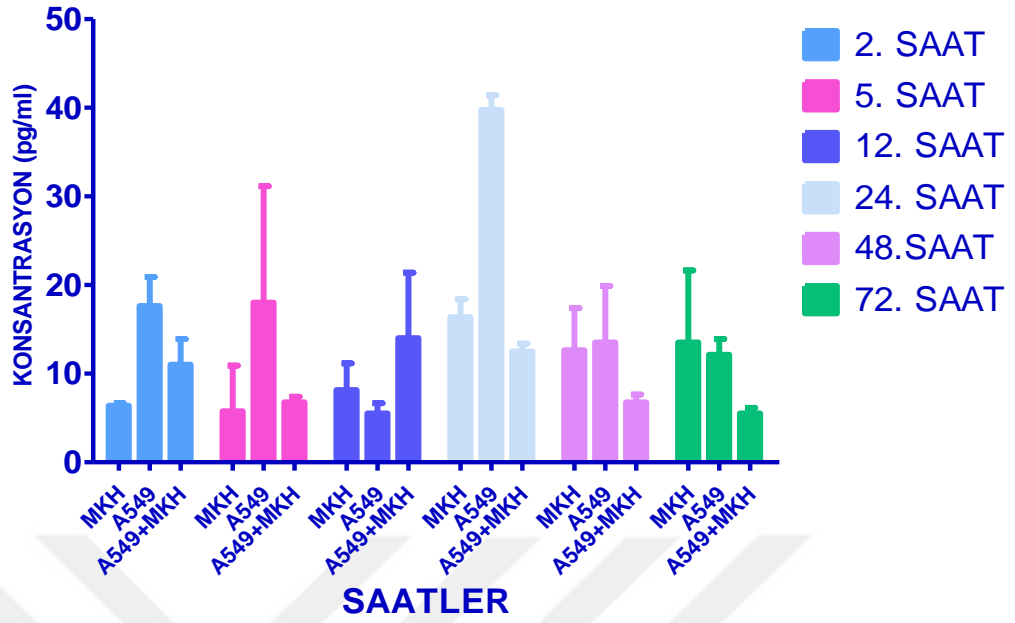
- Her saat grubu kendi içerisinde değerlendirildiğinde 24. saat hücre gruplarına göre sitokin değişimi istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p 0,0022\*\*). Tek başına A549 hücre grubunda sitokin miktarı en fazla iken, ortak kültürde en düşük seviyede olduğu bulundu.
- Her saat grubu diğer saat gruplarıyla istatistiksel olarak karşılaştırıldığında 2-24 saat, 12-24 saat ve 24-72 saatin anlamlı olduğu gözlemlendi.
- 2-24 saat sonunda sitokin düzeyinin her hücre grubunda anlamlı bir şekilde arttığı bulundu (p 0,0076 \*\*).
- 12-24 saat sonunda A549 ve MKH grubunda anlamlı artarken A549+MKH grubunda anlamlı olarak azalma tespit edildi (p 0,0053 \*\*).
- 24-72 saat sonunda ise, her hücre grubunda sitokin miktarının anlamlı olarak azaldığı bulundu (p 0,0282 \*).
- Her saatteki hücre grupları arası IL-12p70 miktar değişimleri Çizelge 4.1. ve Şekil 4. 25.'de verilmiştir.
- Anlamlı bulunan saat aralıklarına göre IL-12p70 miktarları Şekil 4.26.'da verilmiştir.
- IL-12p70 ELİSA deneyinin standart grafiği Şekil 4.27.'de verilmiştir.

**Çizelge 4.1.** Gruplardan elde edilen besiyerlerindeki IL-12p70 miktarları (pg/ml)

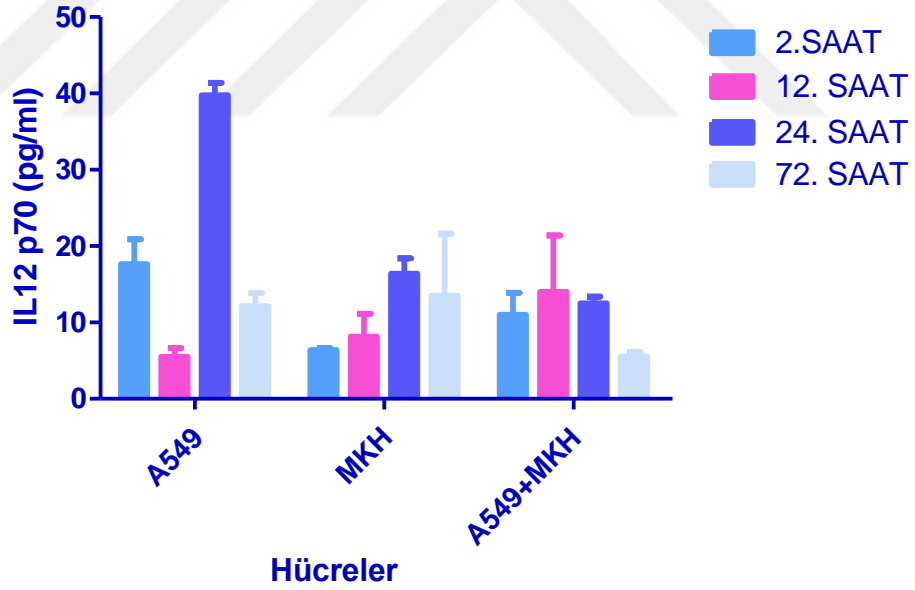
Hücre Grupları	Deney Saatlerine Göre Ortalama $\pm$ Standart Sapma					
	2 saat	5 saat	12 saat	24 saat	48 saat	72 saat
<b>A549</b>	17,65 $\pm 4,59$	18,025 $\pm 18,56$	5,525 $\pm 1,59$	39,775 $\pm 2,29$	13,525 $\pm 9,01$	12,15 $\pm 2,47$
<b>MKH</b>	6,4 $\pm 0,35$	5,775 $\pm 7,24$	8,15 $\pm 4,24$	16,4 $\pm 2,82$	12,65 $\pm 6,71$	13,525 $\pm 11,49$
<b>A549+MKH</b>	11,025 $\pm 4,06$	6,775 $\pm 0,88$	14,025 $\pm 10,42$	12,525 $\pm 1,23$	6,775 $\pm 1,23$	5,525 $\pm 0,88$

(Not: Birinci satır ortalamaları, ikinci satır ise standart sapma değerlerini vermektedir.)

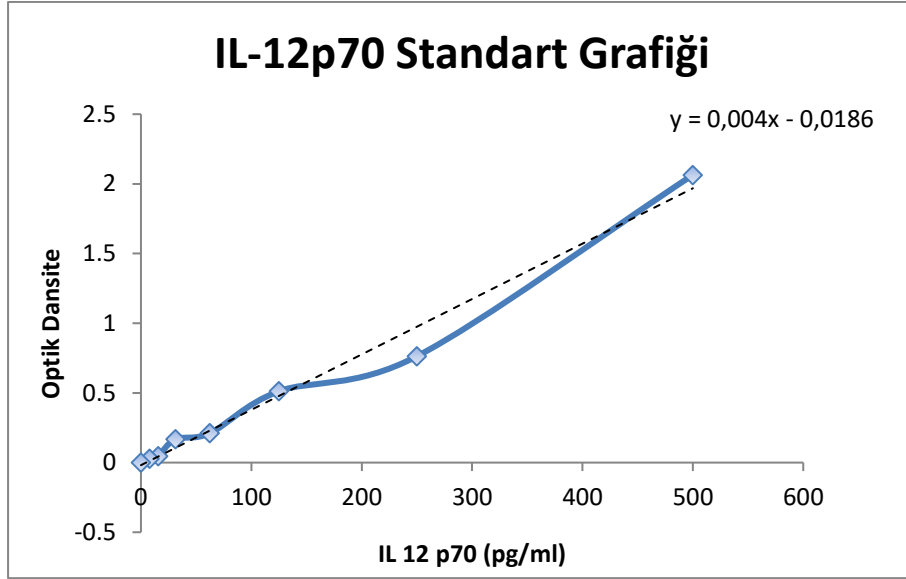
## IL-12p70



Şekil 4.25. Saatlere göre IL-12p70 sitokin miktarı değişimleri



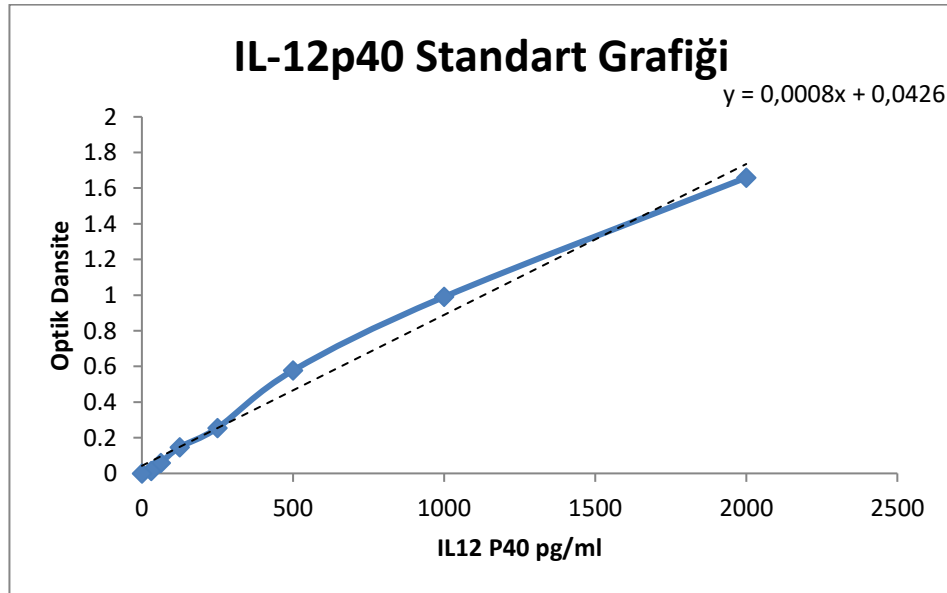
Şekil 4.26. Anlamlı bulunan saat aralıklarına göre IL-12p70 miktarları (pg/ml)



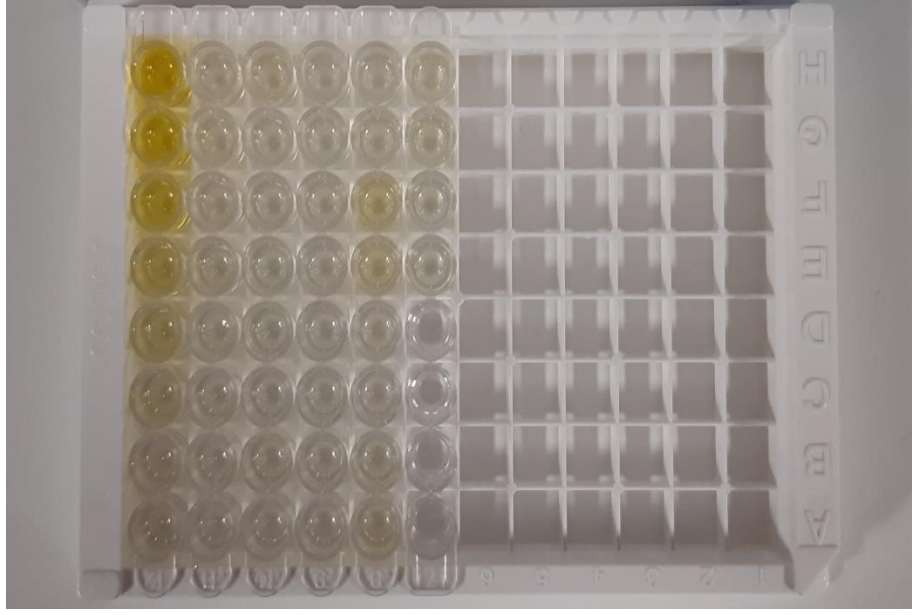
Şekil 4.27. IL-12p70 standart grafiği

#### 4.2.2. ELİSA Yöteminden Elde Edilen IL-12p40 Sonuçları

Yapılan ELİSA deneyi sonucunda IL-12p40 sitokini yalnızca 48 saat MKH grubunda düşük miktarda tespit edildi. Sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. ELİSA deneyi sonucunda sitokine ait kitten çıkan sitokin standartları pozitif reaksiyon verdi. Şekil 4.28.'de IL-12p40 standart grafiği ve Şekil 4.29.'da IL-12p40 ELİSA plakası gösterilmiştir.



Şekil 4.28. IL-12p40 standart grafiği



**Şekil 4.29.** IL-12p40 ELISA plakası

(1. kolonda görünen azalan konsantrasyondaki IL-12p40 standarttır. Deney örneği yüklenen diğer kuyucuklarda yalnızca 48. saat MKH kuyucuklarında reaksiyon gerçekleşmiştir.)

## 5. TARTIŞMA

Kök hücreler kendi kendilerini yenileyebilme yeteneklerinin yanısıra farklı hücre tiplerine farklılaşma kapasitesine sahip olan farklılaşmamış hücrelerdir (Weissman, 2000). Kök hücre çalışmaları genel olarak EKH'ler, yetişkin kök hücreler olan MKH'ler ve MKH'lerin yeniden programlanması ile oluşturulan İPKH'ler üzerinde yapılmaktadır. Ancak klinik çalışmalardaki EKH'ler ve İPKH'lerin, teratom oluşturma riski, yanısıra etik ve politik düşünceler kullanımını sınırlandırmaktadır (King and Perrin, 2014).

MKH'ler ise, daha sınırlı farklılaşma kapasitesine sahip hücreler olup mezodermden köken alırlar. MKH'ler ilk olarak kemik iliğinden izole edildikten sonra yağ dokusu, göbek kordonu kanı, sinovial sıvı, süt dişi, plesanta gibi yetişkin veya fetal dokulardan izole edilmeye başlanmıştır. Daha sonraki yapılan çalışmalarda MKH'lerin yaralanma, enfeksiyon veya hastalık durumunda doku yenilenmesi için kan yoluyla hasarlı bölgeye göç ettikleri gösterilmiştir (Murphy et al., 2013).

Hücrel tedavide rejeneratif tıpta da EKH'ler, MKH'ler ve hatta hücrelerin yeniden programlanması yolu ile oluşturulan İPKH'ler kullanılabilir. Ancak EKH'lerin ve İPKH'lerin kullanımındaki etik problemler, teratom oluşturma riski ve MKH'lere göre fazla olan farklılaşma kapasiteleri nedeniyle oluşan genomik kararsızlık sonucu tümör oluşturabilme ihtimallerinden dolayı kullanımları sınırlıdır. Buna karşın, yağ dokudan türetilmiş kök hücreler yağ dokunun bolluğu, deri altındaki konumu ve daha az invaziv işlemlerle izole edilebilir olması nedeniyle hücrel tedavilerde ilgi odağı haline gelmektedir (Kolios and Moodley, 2013; Bacakova et al., 2018).

Rejeneratif tıpta kök hücrelerin otokrin ve parakrin etkiye sahip çeşitli sitokinleri, büyüme faktörlerini salgılamalarından faydalanılmaktadır. Bu biyoaktif maddeler angiogenezi arttırarak, apoptoz ve fibrozu azaltmakta, hücre dışı sıvının yeniden biçimlendirilmesini sağlamakta, lokal iltihabı sınırlandırarak, immün yanıtları düzenlemektedir. Bu sayede hücre ve doku hasarını azaltarak onarabilmekte ve rejenerasyona neden olmaktadır. Kök hücrelerin bu özelliklerinden faydalanılarak yapılan kemik ve kıkırdak rejenerasyonu, kardiyovasküler hastalıklar, nörolojik

hastalıklar, graft versus konak hastalığı, chron hastalığı, SLE, omurilik yaralanmalarındaki tedavilerde kullanılmaktadırlar (Koshizuka et al., 2004; Kolios and Moodley, 2013; Murphy et al., 2013; Bajek et al., 2016; Keshtkar et al., 2018). Kanser tedavilerinde kök hücrelerin yerine bakıldığında ise, damarlanmayı arttırdığı, immün reaksiyonları baskıladığı ve sonuçta kitlenin büyümesine, invazyonuna yardımcı olduğu görülmektedir. Buna karşın hedefe yönelik tedavilerde vektör olarak kullanılarak anti tümör özelliklerini göstermektedir. Yapılan çalışmalarda intravenöz enjeksiyonla insan MKH'leri Kaposi's sarkoma fare modellerine verildiğinde kanserin büyümesini baskıladığı kanıtlanmıştır. MKH'ler ile kanser hücreleri arasındaki iletişimin MKH'lerden ve kanser hücrelerinden salgılanan sitokinler yardımıyla sağlandığı bilinmekte ve bu sitokinlerin varlığı kök hücre tedavilerinin güvenilirliğini azaltmaktadır (Khakoo et al., 2006; Han et al., 2012; Moniri et al., 2014; Mohammadi et al., 2016; Sage et al., 2016).

Günümüzün en büyük sağlık problemlerinden biri olan kanser ve kanser tedavisi tarih boyunca araştırma konusu olmuştur. Yıllar içinde artan teknoloji ile birlikte her yıl daha fazla kişiye kanser tanısı konmaktadır. Son yıllarda akciğer kanseri hem erkeklerde hem de kadınlar arasında en sık tanı alan kanser türü olmakla beraber aynı zamanda tüm kanserler arasında en çok ölüm oranına sahiptir (Bray et al., 2018). Bu nedenle akciğer kanserinin tanı ve tedavisinde moleküler tetkikler önem kazanmaktadır. Ancak akciğer kanserinde prognostik faktörlerin belirlenebilmesi, hedefe yönelik tedavi yaklaşımlarının geliştirilebilmesi, hücresel tedavilerin güvenilirliğinin anlaşılabilmesi için daha birçok çalışma yapılması gerekmektedir.

Sitokinler hücreler arası iletişimde görevli sinyal proteinleri olup, salındıktan sonra hedef hücre üzerindeki reseptörüne bağlanarak aktive olurlar. Bu aktivasyon hücrenin fonksiyonlarının değişmesine neden olmaktadır (Hegazi and Abdel-Rahman, 2015). Güçlü bir anti-kanser sitokini olan IL-12, kanserli dokuda antianjiyogenetik faktörler üreterek kanserli dokunun büyümesini baskılamakta ve p53 aktivasyonunda artışa neden olarak apoptozun uyarılmasını sağlamaktadır (Del Vecchio et al., 2007; Yuzhalin and Kutikhin, 2012).

Çalışmamızda altı farklı saat diliminde, MKH'ler ile A549 kanser hücrelerinin ortak kültürleri sonrası salgılanan IL-12p70 ve IL-12p40 düzeyini saptamak için ELİSA testi yaptık. Ayrıca IL-12p40, IL-12p35 alt birimleri ile bunların reseptörleri olan IL-12R  $\beta$ 1 ve IL-12R  $\beta$ 2 gen ekspresyon seviyelerini gz- PZR ile inceledik. Her



saat dilimindeki IL-12p40 ve p35 alt birimlerinin ekspresyon miktarına göre apoptoz, otofaji, hücre döngüsü ve proliferasyon değişimlerini karşılaştırdık.

IL-12 ailesi, IL-12, IL-23, IL-27 ve IL-35 heterodimerik sitokinlerini kapsamaktadırlar. IL-12 ailesi üyeleri  $\alpha$  (p19, p28 ve p35) ve  $\beta$  (p40 ve Ebi3) alt birimlerinden oluşmaktadır ve aralarında zincir paylaşımı göstermektedirler. Gösterdikleri yapısal ortak özelliklerine rağmen biyolojik aktiviteleri zıtlık göstermektedir. IL-12, p40 ve p35, IL-23, p19 ve p40 alt birimlerinden oluşurken IL-27 p28 ve Ebi3, IL-35 ise p35 ve Ebi3 alt birimlerinden meydana gelmektedir. IL-12 ve IL-23 proinflamatuvar sitokinler olmasına rağmen IL-27 immün düzenleyici sitokin ve IL-35 ise inhibitör sitokin olarak kabul edilmektedir. Ayrıca hücrel bir tepkiye neden olmak için sinyal alıcı reseptörleride birbirlerine benzerlik göstermektedir. IL-12, IL-12R  $\beta$ 1 ve IL-12R  $\beta$ 2 ile sinyal verirken, IL-23, IL-12R  $\beta$ 1 ve IL23R ile sinyal vermektedir. Buna karşılık IL-27, gp130 ve WSX-1 ile, IL-35 ise gp130 ve IL-12R  $\beta$ 2 ile sinyal verdiği gibi gp130- gp130 ve IL-12R  $\beta$ 2- IL-12R  $\beta$ 2 homodimerleri ile de sinyal verebilmektedir (Hamza et al., 2010; Jones et al., 2012; Vignali and Kuchroo, 2012).

Normal şartlar altında p40 alt biriminin hücrede monomerler ve homodimerler halinde bulunduğu ve p35 varlığında her iki formda da azalma olarak p70'i oluşturduğu gözlenmektedir. Yapılan çalışmalarda alt birimlerden p35'in yarılanma süresinin 2 saat olduğu ancak p40 varlığında bu sürenin 4 saate kadar uzayabildiği belirlenmiştir. P40 alt biriminin ise yarılanma süresinin > 4 saat olduğu ve p35 varlığından etkilenmediği görülmektedir. Ancak IL-12'nin salınabilmesi, hücre fonksiyonlarının değişimine neden olan birçok olayın uyarılabilmesi için hedef hücredeki reseptörleri ile birleşerek aktive olması gerekmektedir. Bu nedenle IL-12 proteinin iki alt biriminin ve reseptörlerinin dengeli bir şekilde birleşmesi sonucu optimal üretimi gerçekleşmektedir (Lafleur et al., 2001; Jalah et al., 2013). Rekombinant olarak üretilmiş IL-12'nin ise yarılanma ömrünün 12 saat gibi kısa bir süre olduğu ve bu nedenle bu sürenin uzatılabilmesi için hücrel tedavilerde viral vektörlerin kullanımı, eksozomların kullanımı, gen terapi gibi diğer yöntemlerin geliştirilmesini beraberinde getirmektedir (Jia et al., 2002; Hamza ve ark., 2010). Yaptığımız çalışmada IL-12 sitokininin maksimum salgılanmasının ELİSA testi sonucunda ortak kültürde 12. saatte gerçekleştiğini gözlemledik. Tek tek hücre gruplarına baktığımızda ise maksimum IL-12 salgılanmasının A549 ve MKH grubunda 24. saatte meydana geldiğini belirledik. gz-PZR testi mRNA düzeyinde ekspresyon sonuçlarına baktığımızda ise p40 ve p35 alt

birimlerinin ve reseptörlerinin de en çok 12. saatte ortak kültür A549 grubunda olduğu belirlendi. Sonuçların birbirleri ile korele olduğu görüldü. Gz-PZR gen ekspresyonu sonuçları arasındaki farklılıklar göz önüne alındığında aktif p70'i oluşturduktan sonra kalan alt birim veya reseptör mRNA ekspresyon miktarları IL-12 ailesine ait diğer sitokinlerinde zincir paylaşımı ile alt birimleri olduğundan IL-23 ve IL-35 sitokinini oluşturmuş olabilir.

IL-12 antikanser cevabının oluşturulmasında IFN  $\gamma$ 'yı kullanmaktadır. IFN  $\gamma$  doğrudan etki yoluyla BCL2'yi downregüle edip hücre apoptozunu uyarabilmektedir. Bunun dışında IFN  $\gamma$ , perforin/granzim yolundaki perforin ve granzim, dışsal yolaktaki CD95, CD95 ligand ve TRAIL mRNA ekspresyon seviyelerini arttırarak kaspaz aktivasyonu ile apoptoza neden olabilmektedir (Weiss et al., 2007; Lin et al., 2017). Biz de yaptığımız çalışmada hücre gruplarında apoptozu belirlemek için BCL2 ve BAX'ın gz-PZR ile mRNA ekspresyon miktarlarını inceledik. 2. saatin sonunda tüm hücre gruplarında azalmış BCL2 ve artmış BAX mRNA ekspresyon miktarı ile apoptozun artmış olabileceğini gözlemledik. 5. ve 24. saatlerde ise azalan BAX ve artan BCL2 ekspresyon miktarı ile apoptoza direnç gelişmeye başlamış olabileceğini tespit ettik. Apoptoza karşı oluşabilecek bu dirençte, belirlenen IL-12 seviyesinin henüz antikanser cevabı oluşturmaya yetecek miktarda IFN  $\gamma$  üretilmemiş olmasından kaynaklanıyor olabilir. IL-12'nin maksimum seviyeye ulaştığı 12. saatten sonraki 24., 48. ve 72. saatlerinde apoptoz belirteci olan BAX ekspresyonunun artması bunun kanıtı olabilir.

Hücre için açlık veya stres altında alternatif bir enerji kaynağı olarak bilinen otofajide, hücre otofagozomlar oluşturarak kendini sindirebileceği gibi hasarlı organelleri veya katlanmamış proteinleri sindirebilir. Kanserler için ise otofaji kemoterapi, radyoterapi gibi stres altında hücreyi koruyarak hayatta kalmasına neden olurken, bazı kanser tedavilerinde de hücrenin otofajiye bağlı ölümüne neden olmaktadır (Kimmelman and White, 2017). IFN  $\gamma$ , apoptozu uyararak hücre ölümüne neden olabildiği gibi, doğrudan otofajiyide uyuyarak hücre çoğalmasının baskılanmasına ve ölümüne neden olabilmektedir. Lin et al. (2016), A549 akciğer adenokarsinom hücreleri ile yaptığı çalışmada IFN  $\gamma$  kaynaklı otofaji ve otofaji aracılı mimik hücre dışı tuzak hücresi ölümüne (ETosis) neden olduğu gösterilmiştir. Biz deneyimizde otofagozomların oluşmasında rol oynayan Beclin-1 ve LC3 II genlerinin gz-PZR ile mRNA ekspresyon miktarlarını tayin ettik. 2., 5., saatlerde tüm hücre gruplarında, 12. ve 72. Saatlerde yalnızca ortak kültür A549 hücrelerinde, 24. saatte

A549 ve ortak kültür A549'da Beclin-1 mRNA ekspresyon miktarında artış gözlenirken diğer hücre gruplarında azaldığı izlendi. LC3 II geninde ise, 2., 5. ve 72. saatlerde ortak kültür A549 ve ortak kültür MKH, 12. saatte ortak kültür A549'da artış belirlenirken diğer hücre gruplarında ekspresyon düzeyinde azalma mevcuttu. IL-12 aracılı IFN  $\gamma$  salınımı belli bir miktarın üstüne çıktıktan sonra otofajiyi uyarıyor veya baskılıyor olabilir. Gelecekte bu konuyla ilgili başka çalışmalar yapılarak sonuçlar netliğe kavuşturulabilir.

PCNA ise kromatini sararak DNA sentezinde, hücre döngüsünün kontrolünde, DNA hasar tamirinde görevlidir. Bu nedenle hücre proliferasyonunun çok olduğu hastalıklarda hasta için kötü prognoz göstergesi olarak kabul edilir. Hu et al. (2017), mide kanseri ile yaptığı çalışmada PCNA ve E-cadherin ekspresyon düzeyini incelemiş ve iki belirteçinde pozitif olduğu durumlarda E-cadherinin hastaların prognozu için koruyucu olabileceğini rapor etmektedir. Ancak PCNA pozitif E-cadherin negatif olgularda tümör proliferasyonun ve metastaz aktivitesinin artacağı bildirilmektedir. Bizim deneyimizde PCNA mRNA ekspresyon düzeyinin en düşük 12. saatte olduğunu gözlemledik. Buda bize IL-12 aracılı hücre döngüsünün baskılanarak antikanser yanıt oluşturmasının bir kanıtı olabilir.

Hücre döngüsünün düzenleme sürecinde görev alan siklinlerin ve CDK'ların ekspresyon miktarları kanser gibi proliferatif hastalıklarda artmaktadır. Siklin A2, CDK2 ve CDK1 ile bağlantılı olarak hem S fazında hem de G2/M geçişinde kritik rol oynamaktadır. S fazında DNA sentezinin başlatılmasını ve ilerlemesini düzenlerken, G2/M geçişinde siklin B1/CDK1 aktivasyonunun başlatılmasına neden olur. Gopinathan et al. (2015), yaptığı CDK2, siklin A2 nakavt fareler üzerinde yaptığı çalışmalarda tümörögenезin gerilemiş olması, Yoh et al (1998), akciğer karsinomları ile yaptığı çalışmalarda CDK2/siklin A2 ekspresyonunun malign alanlarda fazla olması kötü prognozla ilişkilendirilmekteydi. Buna karşın son yıllarda McCurdy (2017) ve Li (2018), yapmış oldukları çalışmalar CDK2 eksikliğinde yerini CDK1'in doldurabileceği, siklin A2 eksikliğinde kromozom insibilitesi oluşabileceğini göstermişlerdir. Buda bazı kanser türlerinde ekspresyon düzeyleri düşük bile olsa kötü prognoza ve kısa sağkalıma neden olabilmektedir. Bizim deneyimizde ortak kültür A549 hücre grubunda 2. saatten 5. saate hızla artan siklin A2 ve CDK2 ekspresyonları hücre döngüsünün G2 fazına geçişin hızlandığını gösterirken 12. ve 24. saatlerde azalıyor olması ortamdaki yüksek IL-12 seviyesi ile alakalı olarak hücre döngüsünün yavaşladığının göstergesi olabilir. 48. saatte azalmaya başlayan IL-12 miktarı ile

birlikte siklin A2/CDK2 miktarının tekrar yükselmeye başlaması sonuçların birbiriyle korele olduğunu göstermektedir.

Düzenleyici T hücrelerinin farklılaşmasında ve fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynayan FoxP3 meme kanseri, akciğer kanserleri, mide kanserleri ve prostat ve over kanseri gibi kanser hücrelerinde eksprese edilebilmektedir. Li et al. (2016), A549 akciğer adenokarsinomu hücreleri ile yaptığı çalışmada FOXP3 inhibisyonunun, inhibe edici sitokinlerin (IL-35, transforme büyüme faktörü beta 1) salgılanmasının yanı sıra hücre çoğalmasının, metastaz ve invazyonun azaldığını bildirmişlerdir. Chu et al. (2015), yaptığı çalışmada benzer şekilde FOXP3 inhibisyonunda hücre çoğalması ve metazta azalırken apoptozun artmış olduğu bildirildi. Biz deneyimizde apoptoza oluştuğunu düşündüğümüz saatlerde FOXP3 ekspresyonunun arttığını ve apoptotik belirteçlerin ekspresyonlarının fazla olduğu saatlerde ise, FOXP3 ekspresyon düzeylerinin düşüş gösterdiğini gözlemleyerek sonuçlarımızın literatürle uyumlu olduğu belirledik.

Kanser hücrelerinde proliferasyona, apoptoza dirence ve angiogenezin artmasına, metastaza neden olan COX2'nin birçok tümörde ekspresyon miktarının arttığı gözlenmiştir. Han et al. (2017), COX2 inhibitörleri ile yaptığı çalışmada siklin A ve siklin B ile CDK1 ve CDK2 nin ekspresyon seviyelerini azaltarak hücre döngüsünün uzamasına ve sonuçta proliferasyonun yavaşlamasına neden olduğunu bulmuşlardır. Artan COX2 miktarı ortamdaki tümör teşvik edici sitokinlerin artmasına neden olurken IL-12 gibi inhibitör sitokinlerin üretimini baskılamaktadır. Bizim çalışmamızdaki sonuçlar da COX2 seviyesinin en düşük 5. saatte eksprese olduğunu gözlemledik. Saatler arasındaki farkları karşılaştırdığımızda literatür ile uyumlu olarak IL-12 miktarının azaldıkça COX2 seviyesinin attığını belirledik (Brown and DuBois, 2004).

Yeni damar ağlarının oluşumundan ve damar geçirgenliğinden sorumlu olan VEGF aynı zamanda kanser dokusunun büyümesini ve metastazıda sağlayabilmektedir. IL-12 antikanser yanıtında damarlanmayı baskılayarak tümörü küçültmektedir. Chinnasamy et al. (2012), farelerle yaptığı çalışmada IL-12'nin VEGFR-2 reseptörünü baskılayarak tümörlerde gerilemeye neden olduğunu bildirmişlerdir. Zhang et al. (2013), glioblastoma beyin kanserlerinin üzerinde yaptığı çalışmada viral vektörlerle kullandığı IL-12'nin kanserli bölgede damarlanmayı azaltarak küçülmeye neden olduğunu bildirmiştir. Bizim çalışmamızda VEGF mRNA ekspresyon seviyelerini inlediğimizde, 12. saatte ortak kültür A549'da en yüksek seviyede olduğunu gördük.

24. saatten itibaren azalan ekspresyon miktarı ortamdaki IFN  $\gamma$  ve diğer faktörlerin varlığını gösteriyor olabilir.

Yapılan çalışmaların gösterdiğine göre HIF1 normaksi koşullar altında az da olsa eksprese olmaktadır. Bizim deneyimizde de literatürle uyumlu olarak normaksi koşullarda ekspresyon gözlemlendi. Yapılan bazı çalışmalar hipoksik koşulların G1/S fazında CDK2'nin inhibe edilerek hücre döngüsünün yavaşlamasına hatta durmasına neden olduğu bildirmiştir. Ayrıca hipoksik koşullar kanser hücrelerinin yeniden programlanmasına neden olarak onlara kök hücresi benzeri özellikler katmaktadır (Hammer et al., 2007; Liang et al., 2012; Harada, 2016).

Sonuç olarak çalışmamızda MKH'lerin, kanser hücrelerinin çoğalmasını baskıladığı ancak durdurmağı düşünülebilir.

## 6. SONUÇLAR

Çalışmamızda yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler ile A549 akciğer kanser hücreleri transwell insert sistemi ile bir araya getirilerek ortak kültür ortamı oluşturuldu. Deney süreleri sonunda yapılan ELİSA testi sonucunda IL-12p70 en çok 12. saatte ifade olurken IL-12p40 da anlamlı bir salınım olmadığı tespit edilmiştir. Gz-PZR ile 5. ve 12. saatlerde apoptoza direnç gelişmeye başlamış olabileceği gibi ilerleyen zaman diliminde bu apoptotik direncin IL-12 etkisi ile gerilemiş olabileceği ve hücre döngüsü süresinin ise IL-12 salınımından sonra G1/S fazında uzadığı düşünülmektedir. Proliferasyon belirteçlerinin gz-PZR ile mRNA ekspresyon düzeylerine baktığımızda ise IL-12 salgısının anlamlı olarak artış gösterdiği saatlerde azalırken, IL-12 salgısının azaldığı daha sonraki saatelerde yavaşta olsa tekrar eksprese olmaya başladığı gözlemlenmiştir.

Elde ettiğimiz veriler doğrultusunda MKH'lerin, IL-12 salınımı ile A549 kanser hücrelerini baskılamak için tek başına kullanıldığında yetersiz kaldığını, ancak IL-12 salınımı ile kanser hücrelerinin çoğalmasının baskılanmasına rağmen durdurulamadığı düşünülmüştür.

## 7. KAYNAKLAR

Acosta-Iborra B, Elorza A, Olazabal IM, Martín-Cofreces NB, Martín-Puig S, Miró, M, Calzada MJ, Aragonés J, Sánchez-Madrid F, Landázuri MO. (2009) Macrophage oxygen sensing modulates antigen presentation and phagocytic functions involving IFN-gamma production through the HIF-1 alpha transcription factor. *J Immunol.*, 182(5): 3155-3164. doi: 10.4049/jimmunol.0801710.

Aktuğ H (2014) Apoptosis and cell cycle. *Ege Journal of Medicine*, 53(1): 60-64.

Amaravadi R, Kimmelman AC and White E. (2016) Recent insights into the function of autophagy in cancer. *Genes Dev.*, 30(17): 1913-1930. doi: 10.1101/gad.287524.116.

Ateş U. (2016) Let's familiarize ourselves with the stem cell. *FNG & Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi*, 1(1): 19-28. doi: 10.5606/fng.transplantasyon.2016.004.

Babbar N and Casero RA Jr. (2006) Tumor necrosis factor-alpha increases reactive oxygen species by inducing spermine oxidase in human lung epithelial cells: a potential mechanism for inflammation-induced carcinogenesis. *Cancer Res.*, 66(23): 11125-11130. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3174.

Bacakova L, Zarubova J, Travnickova M, Musilkova J, Pajorov J, Slepicka P, Kasalkova NS, Svorcik V, Kolska Z, Motarjemi H, Molitor M. (2018) Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells - a review. *Biotechnol Adv.*, 36(4): 1111-1126. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.03.011.

Bajek A, Gurtowska N, Olkowska J, Kazmierski L, Maj M and Drewna T. (2016) Adipose-derived stem cells as a tool in cell-based therapies. *Arch Immunol Ther Exp.*, 64(6): 443-454. doi: 10.1007/s00005-016-0394-x.

Baker CL and Pera MF. (2018) Capturing totipotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 22(1): 25-34. doi: 10.1016/j.stem.2017.12.011.

Bendris N, Lemmers B and Blanchard JM. (2015) Cell cycle, cytoskeleton dynamics and beyond: the many functions of cyclins and CDK inhibitors. *Cell Cycle*, 14(12): 1786-1798. doi: 10.1080/15384101.2014.998085.

Berebichez-Fridman R and Montero-Olvera PR. (2018) Sources and clinical applications of mesenchymal stem cells: state-of-the-art review. *Sultan Qaboos Univ Med J.*, 18(3): e264-e277. doi:10.18295/squmj.2018.18.03.002.

Bianco P and Robey PG. (2015) Skeletal stem cells. *Development*, 142(6): 1023-1027. doi: 10.1242/dev.102210.

Bianco P, Robey PG and Simmons PJ. (2008) Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*, 2(4): 313-319. doi: 10.1016/j.stem.2008.03.002.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA and Jemal A. (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide

for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.*, 68(6): 394-424. doi: 10.3322/caac.21492.

Brown JR and DuBois RN. (2004). Cyclooxygenase as a target in lung cancer. *Clin Cancer Res.*, 10(12 Pt 2): 4266s-4269s. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-040014.

Bunnell BA., Flaat M, Gagliardi C, Patel B, and Ripoll C. (2008). Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*, 45(2): 115-120. doi:10.1016/j.ymeth.2008.03.006

Cancer Genome Atlas Research, N. (2014) Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*, 511(7511): 543-550. doi: 10.1038/nature13385.

Canpolatv F. (2016) Hücre siklusu ve apoptoz. *Güncel Dermatoloji Dergisi*, 1(1): 11-17.

Cao S, Zhao G, Dong Q, Han J, Xin Y, Yan Y, Li J, Cui J. (2013) Mechanisms of EGF regulation of COX-2 through the STAT5 signaling pathway in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 16(4): 169-176. doi: 10.3779/j.issn.1009-3419.2013.04.01.

Chagastelles PC and Nardi NB. (2011) Biology of stem cells: an overview. *Kidney Int Suppl.*, 1(3): 63-67. doi: 10.1038/kisup.2011.15.

Chinnasamy D, Yu Z, Kerkar SP, Zhang L, Morgan RA, Restifo NP and Rosenberg SA. (2012). Local delivery of interleukin-12 using T cells targeting VEGF receptor-2 eradicates multiple vascularized tumors in mice. *Clin Cancer Res.*, 18(6): 1672-1683. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3050.

Chu R, Liu SY, Vlantis AC, van Hasselt CA, Ng EK, Fan MD, Ng SK, Chan AB, Du J, Wei W. (2015) Inhibition of Foxp3 in cancer cells induces apoptosis of thyroid cancer cells. *Mol Cell Endocrinol.*, 399: 228-234. doi: 10.1016/j.mce.2014.10.006.

Chulpanova DS, Kitaeva KV, Tazetdinova LG, James V, Rizvanov AA and Solovyeva VV. (2018) Application of mesenchymal stem cells for therapeutic agent delivery in anti-tumor treatment. *Front Pharmacol.*, 9: 259. doi: 10.3389/fphar.2018.00259.

Cooper JR, Abdullatif MB, Burnett EC, Kempell KE, Conforti F, Tolley H, Collins JE, Davies DE. (2016) Long term culture of the A549 cancer cell line promotes multilamellar body formation and differentiation towards an alveolar type II pneumocyte phenotype. *PLoS One*, 11(10): e0164438. doi: 10.1371/journal.pone.0164438.

Çetin A ve Ural AU. (2010) The biology and plasticity of stem cells: progress and promise. *Erciyes Medical Journal*, 32(4): 275-282.

Dai J, and Rabie AB. (2007) VEGF: an essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification. *J Dent Res.*, 86(10): 937-950. doi: 10.1177/154405910708601006.

Dai R, Wang Z, Samanipour R, Koo KI and Kim K. (2016) Adipose-derived stem cells for tissue engineering and regenerative medicine applications. *Stem Cells Int.*, 2016; 6737345. doi: 10.1155/2016/6737345.

Dawood S, Austin L and Cristofanilli M. (2014) Cancer stem cells: implications for cancer therapy. *Oncology*, 28(12): 1101-1107, 1110.



- De Francesco F, Ricci G, D'Andrea F, Nicoletti GF and Ferraro GA. (2015) Human adipose stem cells: from bench to bedside. *Tissue Eng Part B Rev.*, 21(6): 572-584. doi: 10.1089/ten.TEB.2014.0608.
- De Paepe C, Krivega M, Cauffman G, Geens M and Van de Velde H. (2014) Totipotency and lineage segregation in the human embryo. *Mol Hum Reprod.*, 20(7): 599-618. doi: 10.1093/molehr/gau027.
- Del Vecchio M, Bajetta E, Canova S, Lotze MT, Wesa A, Parmiani G and Anichini A. (2007) Interleukin-12: biological properties and clinical application. *Clin Cancer Res.*, 13(16): 4677-4685. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0776.
- Duitman EH, Orinska Z and Bulfone-Paus S. (2011) Mechanisms of cytokine secretion: a portfolio of distinct pathways allows flexibility in cytokine activity. *Eur J Cell Biol.*, 90(6-7): 476-483. doi: 10.1016/j.ejcb.2011.01.010.
- E.Weinberger S, A.Cockrill B and Jess M. (2019) Lung Cancer: Etiologic and Pathologic Aspects. In *Principles of Pulmonary Medicine*, 7 nd ed. Elsevier. Amsterdam, p: 259-269.
- Elmore S. (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.*, 35(4): 495-516. doi: 10.1080/01926230701320337.
- Farini A, Sitzia C, Erratico S, Meregalli M and Torrente Y. (2014) Clinical applications of mesenchymal stem cells in chronic diseases. *Stem Cells Int.*, 2014: 306573. doi: 10.1155/2014/306573.
- Fatima F and Nawaz M. (2015) Stem cell-derived exosomes: roles in stromal remodeling, tumor progression, and cancer immunotherapy. *Chin J Cancer*, 34(12): 541-553. doi: 10.1186/s40880-015-0051-5.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 136(5): E359-386. doi: 10.1002/ijc.29210.
- Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F. (2013) Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*, 49(6): 1374-1403. doi: 10.1016/j.ejca.2012.12.027.
- Foster KA, Oster CG, Mayer MM, Avery ML and Audus KL. (1998) Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Exp Cell Res.*, 243(2): 359-366. doi: 10.1006/excr.1998.4172.
- Fuchs E and Segre JA. (2000) Stem cells: a new lease on life. *Cell*, 100(1): 143-155.
- Fullgrabe J, Klionsky DJ and Joseph B. (2014) The return of the nucleus: transcriptional and epigenetic control of autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 15(1): 65-74. doi: 10.1038/nrm3716.
- Gaojing Q, Xiaolin X., Xianyu L, Yun C, Natalia D, Céline H, Jean-François S, Yinping L. (2018) Immunomodulatory function of mesenchymal stem cells: regulation and application. *Journal of Cellular Immunotherapy* 4(1): 1-3. doi: 10.1016/j.jocit.2018.09.001.
- Gonzalez MA and Bernad A. (2012) Characteristics of adult stem cells. *Adv Exp Med Biol.*, 741: 103-120. doi: 10.1007/978-1-4614-2098-9\_8.

- Gonzalez MJ, Morgani SM, Bone RA, Bonderup K, Abelchian S, Brakebusch C and Brickman JM. (2016) Embryonic stem cell culture conditions support distinct states associated with different developmental stages and potency. *Stem Cell Reports*, 7(2): 177-191. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.07.009.
- Gopinathan L, Tan SL, Padmakumar VC, Coppola V, Tessarollo L and Kaldis P. (2014) Loss of Cdk2 and cyclin A2 impairs cell proliferation and tumorigenesis. *Cancer Res.*, 74(14): 3870-3879. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3440.
- Guan JL, Simon AK, Prescott M, Menendez JA, Liu F, Wang F, Wang C, Wolvetang E, Vazquez-Martin A, Zhang J. (2013) Autophagy in stem cells. *Autophagy*, 9(6): 830-849. doi: 10.4161/auto.24132.
- Haake K, Ackermann M and Lachmann N. (2019) Concise review: towards the clinical translation of induced pluripotent stem cell-derived blood cells-ready for take-off. *Stem Cells Transl Med*, 8(4): 332–339. doi: 10.1002/sctm.18-0134.
- Hammer S, To KK, Yoo YG, Koshiji M and Huang LE. (2007) Hypoxic suppression of the cell cycle gene CDC25A in tumor cells. *Cell Cycle*, 6(15): 1919-1926. doi: 10.4161/cc.6.15.4515.
- Hamza T, Barnett JB and Li B. (2010) Interleukin 12 a key immunoregulatory cytokine in infection applications. *Int J Mol Sci.*, 11(3): 789-806. doi: 10.3390/ijms11030789.
- Han Z, Jing Y, Zhang S, Liu Y, Shi Y and Wei L. (2012) The role of immunosuppression of mesenchymal stem cells in tissue repair and tumor growth. *Cell Biosci.*, 2(1): 8. doi: 10.1186/2045-3701-2-8.
- Han Z, Liao H, Shi F, Chen XP, Hu HC, Tian MQ, Wang LH, Ying S. (2017) Inhibition of cyclooxygenase-2 sensitizes lung cancer cells to radiation-induced apoptosis. *Oncol Lett.*, 14(5): 5959-5965. doi: 10.3892/ol.2017.6940.
- Harada H. (2016) Hypoxia-inducible factor 1-mediated characteristic features of cancer cells for tumor radioresistance. *J Radiat Res.*, 57 (Suppl 1): i99-i105. doi: 10.1093/jrr/rrw012.
- He S, Nakada D and Morrison SJ. (2009) Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 25: 377-406. doi: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113248.
- Hegazi AG and Abdel-Rahman EH. (2015) Cytokines. Austin Publishing Group, p: 2-3.
- Heldring N, Mager I, Wood MJ, Le Blanc K and Andaloussi SE. (2015) Therapeutic potential of multipotent mesenchymal stromal cells and their extracellular vesicles. *Hum Gene Ther.*, 26(8): 506-517. doi: 10.1089/hum.2015.072.
- Hernandez-Alcoceba R, Poutou J, Ballesteros-Briones MC and Smerdou C. (2016) Gene therapy approaches against cancer using in vivo and ex vivo gene transfer of interleukin-12. *Immunotherapy*, 8(2): 179-198. doi: 10.2217/imt.15.109.
- Hu L, Li HL, Li WF, Chen JM, Yang JT, Gu JJ and Xin L. (2017) Clinical significance of expression of proliferating cell nuclear antigen and E-cadherin in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol.*, 23(20): 3721-3729. doi: 10.3748/wjg.v23.i20.3721.

- Huang B, Jiang C, Chen A, Cui Y, Xie J, Shen J, Chen J, Cai L, Liao T, Ning S. (2015) Establishment of human-embryonic-stem-cell line from mosaic trisomy 9 embryo. *Taiwan J Obstet Gynecol.*, 54(5): 505-511. doi:10.1016/j.tjog.2015.08.003.
- Itatani Y, Kawada K, Yamamoto T and Sakai Y. (2018) Resistance to anti-angiogenic therapy in cancer-alterations to anti-VEGF pathway. *Int J Mol Sci.*, 19(4). doi: 10.3390/ijms19041232.
- Jalah R, Rosati M, Ganneru B, Pilkington GR, Valentin A, Kulkarni V, Bergamaschi C, Chowdhury B, Zhang GM, Plaj RK. (2013) The p40 subunit of interleukin (IL)-12 promotes stabilization and export of the p35 subunit: implications for improved IL-12 cytokine production. *J Biol Chem.*, 288(9): 6763-6776. doi: 10.1074/jbc.M112.436675.
- Jang K, Kim M, Gilbert CA, Simpkins F, Ince TA and Slingerland JM. (2017) VEGFA activates an epigenetic pathway upregulating ovarian cancer-initiating cells. *EMBO Mol Med.*, 9(3): 304-318. doi: 10.15252/emmm.201606840.
- Jayanthi S, Koppolu Bp, Smith SG, Jalah R, Bear J, Rosati M, Pavlakis GN, Felber BK, Zaharoff DA, Kumar TK. (2014) Efficient production and purification of recombinant human interleukin-12 (IL-12) overexpressed in mammalian cells without affinity tag. *Protein Expr Purif.*, 102: 76-84. doi: 10.1016/j.pep.2014.07.002.
- Jia SF, Worth LL, Densmore CL, Xu B, Zhou Z and Kleinerman ES. (2002) Eradication of osteosarcoma lung metastases following intranasal interleukin-12 gene therapy using a nonviral polyethylenimine vector. *Cancer Gene Ther.*, 9(3): 260-266. doi: 10.1038/sj.cgt.7700432.
- Jones LL, Chaturvedi V, Uyttenhove C, Van Snick J, and Vignali DA. (2012) Distinct subunit pairing criteria within the heterodimeric IL-12 cytokine family. *Mol Immunol.*, 51(2): 234-244. doi: 10.1016/j.molimm.2012.03.025.
- Keshtkar S, Azarpira N and Ghahremani MH. (2018) Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine. *Stem Cell Res Ther.*, 9(1): 63. doi: 10.1186/s13287-018-0791-7.
- Khakoo AY, Pati S, Anderson SA, Reid W, Elshal MF, Rovira II, Nguyen AT, Malide D, Combs CA, Hall G. (2006) Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *J Exp Med.*, 203(5): 1235-1247. doi: 10.1084/jem.20051921.
- Kim HJ and Park JS. (2017) Usage of human mesenchymal stem cells in cell-based therapy: advantages and disadvantages. *Dev Reprod.*, 21(1): 1-10. doi: 10.12717/DR.2017.21.1.001.
- Kimmelman AC and White E. (2017) Autophagy and tumor metabolism. *Cell Metab.*, 25(5): 1037-1043. doi: 10.1016/j.cmet.2017.04.004.
- King NM and Perrin J. (2014) Ethical issues in stem cell research and therapy. *Stem Cell Res Ther.*, 5(4): 85. doi: 10.1186/scrt474.
- Kolios G and Moodley Y. (2013) Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*, 85(1): 3-10. doi: 10.1159/000345615.
- Koshizuka S, Okada S, Okawa A, Koda M, Murasawa M, Hashimoto M, Kamada T, Yoshinaga K, Murakami M, Moriya H. (2004) Transplanted hematopoietic stem cells from bone marrow differentiate into neural lineage cells and promote functional

recovery after spinal cord injury in mice. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 63(1): 64-72. doi: [org/10.1093/jnen/63.1.64](https://doi.org/10.1093/jnen/63.1.64).

Lafleur EA, Jia SF, Worth LL, Zhou Z, Owen-Schaub LB and Kleinerman ES. (2001) Interleukin (IL)-12 and IL-12 gene transfer up-regulate Fas expression in human osteosarcoma and breast cancer cells. *Cancer Res.*, 61(10): 4066-4071.

Lee CJ, Yue CH, Lin YJ, Lin YY, Kao SH, Liu JY and Chen YH. (2014) Antitumor activity of acriflavine in lung adenocarcinoma cell line A549. *Anticancer Res.*, 34(11): 6467-6472.

Lee HY and Hong IS. (2017) Double-edged sword of mesenchymal stem cells: Cancer-promoting versus therapeutic potential. *Cancer Sci.*, 108(10): 1939-1946. doi: [10.1111/cas.13334](https://doi.org/10.1111/cas.13334).

Li X, Zhang P, Liu X and Lv P. (2015) Expression of interleukin-12 by adipose-derived mesenchymal stem cells for treatment of lung adenocarcinoma. *Thorac Cancer*, 6(1): 80-84. doi: [10.1111/1759-7714.12151](https://doi.org/10.1111/1759-7714.12151).

Li Y, Li D, Yang W, Fu H, Liu Y and Li Y. (2016) Overexpression of the transcription factor FOXP3 in lung adenocarcinoma sustains malignant character by promoting G1/S transition gene CCND1. *Tumour Biol.*, 37(6): 7395-7404. doi: [10.1007/s13277-015-4616-3](https://doi.org/10.1007/s13277-015-4616-3).

Li Y, Zhang J, Gao W, Zhang L, Pan Y, Zhang S and Wang Y. (2015) Insights on structural characteristics and ligand binding mechanisms of CDK2. *Int J Mol Sci.*, 16(5): 9314-9340. doi: [10.3390/ijms16059314](https://doi.org/10.3390/ijms16059314).

Li YJ, Lei YH, Yao N, Wang CR, Hu N, Ye WC, Zhang DM, Chen ZS. (2017) Autophagy and multidrug resistance in cancer. *Chin J Cancer*, 36(1): 52. doi: [10.1186/s40880-017-0219-2](https://doi.org/10.1186/s40880-017-0219-2).

Liang D, Ma Y, Liu J, Trope CG, Holm R, Nesland JM and Suo Z. (2012) The hypoxic microenvironment upgrades stem-like properties of ovarian cancer cells. *BMC Cancer*, 12: 201. doi: [10.1186/1471-2407-12-201](https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-201).

Lin CF, Chen CL, Chien SY, Tseng PC, Wang YC and Tsai TT. (2016) Oxidative stress facilitates IFN-gamma-induced mimic extracellular trap cell death in A549 lung epithelial cancer cells. *PLoS One*, 11(8): e0162157. doi: [10.1371/journal.pone.0162157](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162157).

Lin CF, Lin CM, Lee KY, Wu SY, Feng PH, Chen KY, Chuang HC, Chen CL, Wang YC, Tseng PC. (2017) Escape from IFN-gamma-dependent immunosurveillance in tumorigenesis. *J Biomed Sci.*, 24(1): 10. doi: [10.1186/s12929-017-0317-0](https://doi.org/10.1186/s12929-017-0317-0).

Lipiainen T, Peltoniemi M, Sarkhel S, Yrjonen T, Vuorela H, Urtti A and Juppo A. (2015) Formulation and stability of cytokine therapeutics. *J Pharm Sci.*, 104(2): 307-326. doi: [10.1002/jps.24243](https://doi.org/10.1002/jps.24243).

Liu Y, Han ZP, Zhang SS, Jing YY, Bu XX, Wang CY, Sun K, Jiang GC, Zhao X, Li R. (2011) Effects of inflammatory factors on mesenchymal stem cells and their role in the promotion of tumor angiogenesis in colon cancer. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(28). doi: [10.1074/jbc.M110.213108](https://doi.org/10.1074/jbc.M110.213108).

Ma T, Sun J, Zhao Z, Lei W, Chen Y, Wang X, Yang J, Shen Z. (2017) A brief review: adipose-derived stem cells and their therapeutic potential in cardiovascular diseases. *Stem Cell Res Ther.*, 8(1): 124. doi: [10.1186/s13287-017-0585-3](https://doi.org/10.1186/s13287-017-0585-3).

- Maga G and Hubscher U. (2003) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci.*, 116(Pt 15): 3051-3060. doi: 10.1242/jcs.00653.
- Malik F, Korkaya H, Clouthier SG and Wicha MS. (2015) Principles of Stem Cell Biology and Cancer, 7: 125-126.
- Martin-Rendon E and Watt SM. (2003) Stem cell plasticity. *British Journal of Haematology*, 122(6): 877-891. doi: 10.1046/j.1365-2141.2003.04576.x.
- McCurdy SR, Pacal M, Ahmad M and Bremner R. (2017) A CDK2 activity signature predicts outcome in CDK2-low cancers. *Oncogene*, 36(18): 2491-2502. doi: 10.1038/onc.2016.409.
- Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, Mărginean M, Mişu C, Istrate M, Moldovan IM, Roman AL, Mişu CM (2018) Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol.*, 59(2): 455-467.
- Mizuno H, Tobita M and Uysal AC. (2012) Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells*, 30(5): 804-810. doi: 10.1002/stem.1076.
- Mohammadi M, Jaafari MR, Mirzaei HR and Mirzaei H. (2016) Mesenchymal stem cell: a new horizon in cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther.*, 23(9): 285-286. doi: 10.1038/cgt.2016.35.
- Moniri MR, Dai LJ and Warnock GL. (2014) The challenge of pancreatic cancer therapy and novel treatment strategy using engineered mesenchymal stem cells. *Cancer Gene Ther.*, 21(1): 12-23. doi: 10.1038/cgt.2013.83.
- Montesano R, Soulie P, Eble JA and Carrozzino F. (2005) Tumour necrosis factor alpha confers an invasive, transformed phenotype on mammary epithelial cells. *J Cell Sci.*, 118(Pt 15): 3487-3500. doi: 10.1242/jcs.02467.
- Murphy MB, Moncivais K and Caplan AI. (2013) Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp Mol Med.*, 45: e54. doi: 10.1038/emm.2013.94.
- Nanavati KB and Reed EB. (2018) Lung Cancer. In: *Integrative Medicine*. Eds: Rakel D., 4 nd ed., Philadelphia, p. 785-789.e782.
- Nassar D and Blanpain C. (2016) Cancer stem cells: basic concepts and therapeutic implications. *Annu Rev Pathol.*, 11: 47-76. doi: 10.1146/annurev-pathol-012615-044438.
- Navarro E, Serrano-Heras G, Castano MJ and Solera J. (2015) Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta.*, 439: 231-250. doi: 10.1016/j.cca.2014.10.017.
- Nguyen DP, Li J and Tewari AK. (2014) Inflammation and prostate cancer: the role of interleukin 6 (IL-6). *BJU Int.*, 113(6): 986-992. doi: 10.1111/bju.12452.
- Nichols J and Smith A. (2012) Pluripotency in the embryo and in culture. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 4(8): a008128. doi: 10.1101/cshperspect.a008128.
- O'Callaghan DS, Rexhepaj E, Gately K, Coate L, Delaney D, O'Donnell DM, Kay E, O'Connell F, Gallagher WM, O'Byrne KJ. (2015) Tumour islet Foxp3+ T-cell infiltration predicts poor outcome in nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir J.*, 46(6): 1762-1772. doi: 10.1183/13993003.00176-2014.

- Ooi HK and Ma L. (2013) Modeling heterogeneous responsiveness of intrinsic apoptosis pathway. *BMC Syst Biol.*, 7: 65. doi: 10.1186/1752-0509-7-65.
- Oppenheim JJ. (2001) Cytokines: past, present, and future. *Int J Hematol.*, 74(1): 3-8.
- Osmani L, Askin F, Gabrielson E and Li QK. (2018) Current WHO guidelines and the critical role of immunohistochemical markers in the subclassification of non-small cell lung carcinoma (NSCLC): Moving from targeted therapy to immunotherapy. *Semin Cancer Biol.*, 52(Pt 1): 103-109. doi: 10.1016/j.semcancer.2017.11.019.
- Ökçesiz A ve Bucurgat ÜÜ. (2017) Stem cells in cytotoxicity studies. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 41(2): 1-14. doi: 10.1501/Eczfak\_0000000595.
- Pan R, Zhu M, Yu C, Lv J, Guo Y, Bian Z, Yang L, Chen Y, Hu Z, Chen Z. (2017) Cancer incidence and mortality: A cohort study in China, 2008-2013. *Int J Cancer*, 141(7): 1315-1323. doi: 10.1002/ijc.30825.
- Peng J, Yu Z, Xue L, Wang J, Li J, Liu D, Yang Q, Lin Y. (2018) The effect of foxp3-overexpressing Treg cells on non-small cell lung cancer cells. *Mol Med Rep.*, 17(4): 5860-5868. doi: 10.3892/mmr.2018.8606.
- Pfaffl MW. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 29(9): e45.
- Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A and D'Orazi G. (2016) Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging*, 8(4): 603-619. doi: 10.18632/aging.100934.
- Piura B, Medina L, Rabinovich A, Dyomin V, Levy RS and Huleihel M. (2014). Distinct expression and localization of TNF system in ovarian carcinoma tissues: possible involvement of TNF- $\alpha$  in morphological changes of ovarian cancerous cells. *Anticancer Research*, 34(2): 745-752.
- Plati J, Bucur O and Khosravi-Far R. (2011) Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integr Biol.*, 3(4): 279-296. doi: 10.1039/c0ib00144a.
- Rabinowitz JD and White E. (2010) Autophagy and metabolism. *Science*, 330(6009): 1344-1348. doi: 10.1126/science.1193497.
- Raposio E., Simonacci F and Perrotta RE. (2017) Adipose-derived stem cells: comparison between two methods of isolation for clinical applications. *Ann Med Surg.*, 20: 87-91. doi: 10.1016/j.amsu.2017.07.018.
- Rath SL and Senapati S. (2016) Mechanism of p27 unfolding for CDK2 reactivation. *Sci Rep.*, 6: 26450. doi: 10.1038/srep26450.
- Renehan AG, Booth C and Potten CS. (2001) What is apoptosis, and why is it important?. *BMJ*, 322(7301): 1536-1538.
- Rezaee A, Herrmann K, Raderer M, Langesteger W and Beheshti M. (2018) Lung cancer. In *PET/CT in cancer: An Interdisciplinary Approach to Individualized Imaging*, 23-42.
- Rhee KJ, Lee JI and Eom YW. (2015) Mesenchymal stem cell-mediated effects of tumor Support or Suppression. *Int J Mol Sci.*, 16(12): 30015-30033. doi: 10.3390/ijms161226215.

- Sage EK, Thakrar RM and Janes SM. (2016) Genetically modified mesenchymal stromal cells in cancer therapy. *Cytherapy*, 18(11): 1435-1445. doi: 10.1016/j.jcyt.2016.09.003.
- Sağlam Ö. (2014) MDA-MB-231 kanser hücrelerinin çoğalmasında üzerine malign meme dokusu stromal hücrelerinin etkisi ve miRNA ilişkisi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Eskişehir, (Danışman: Prof. Dr. İrfan Değirmenci, Prof. Dr. Erdal Karaöz)
- Seo SH, Kim KS, Park SH, Suh YS, Kim SJ, Jeun SS and Sung YC. (2011) The effects of mesenchymal stem cells injected via different routes on modified IL-12-mediated antitumor activity. *Gene Ther.*, 18(5): 488-495. doi: 10.1038/gt.2010.170.
- Sharma S, Yang SC, Zhu L, Reckamp K, Gardner B, Baratelli F, Huang M, Batra RK, Dubinett SM. (2005) Tumor cyclooxygenase-2/prostaglandin E2-dependent promotion of FOXP3 expression and CD4+ CD25+ T regulatory cell activities in lung cancer. *Cancer Res.*, 65(12): 5211-5220. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0141.
- Siegel RL, Miller KD and Jemal A. (2017) Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin.*, 67(1): 7-30. doi: 10.3322/caac.21387.
- Siegel RL, Miller KD and Jemal A. (2018) Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.*, 68(1): 7-30. doi: 10.3322/caac.21442.
- Singh VK, Saini A, Kalsan M, Kumar N and Chandra R. (2016) Describing the stem cell potency: the various methods of functional assessment and in silico diagnostics. *Front Cell Dev Biol.*, 4: 134. doi: 10.3389/fcell.2016.00134.
- Sobhani A, Khanlarkhani N, Baazm M, Mohammadzadeh F, Najafi A, Mehdinejadi S and Sargolzaei AF. (2017) Multipotent stem cell and current application. *Acta Med Iran*, 55(1): 6-23.
- Spaeth E, Klopp A, Dembinski J, Andreeff M and Marini F. (2008) Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther.*, 15(10): 730-738. doi: 10.1038/gt.2008.39.
- Squillaro T, Peluso G and Galderisi U. (2016) Clinical trials with mesenchymal stem cells: an update. *Cell Transplant*, 25(5): 829-848. doi: 10.3727/096368915X689622.
- Stamatakis M, Palla V, Karaiskos I, Xiromeritis K, Alexiou I, Pateras I and Kontzoglou K. (2010) Cell cyclins: triggering elements of cancer or not? *World J Surg Oncol.*, 8: 111. doi: 10.1186/1477-7819-8-111.
- Strzalka W and Ziemienowicz A. (2011) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Ann Bot.*, 107(7): 1127-1140. doi: 10.1093/aob/mcq243.
- Su Z, Yang Z, Xu Y, Chen Y and Yu Q. (2015) Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Mol Cancer*, 14: 48. doi: 10.1186/s12943-015-0321-5.
- Thorburn A, Thamm DH and Gustafson DL. (2014) Autophagy and cancer therapy. *Mol Pharmacol.*, 85(6): 830-838. doi: 10.1124/mol.114.091850.
- Toledo-Guzman ME, Bigoni-Ordonez GD, Ibanez HM. and Ortiz-Sanchez E. (2018) Cancer stem cell impact on clinical oncology. *World J Stem Cells*, 10(12): 183-195. doi: 10.4252/wjsc.v10.i12.183.
- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J and Jemal A. (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.*, 65(2): 87-108. doi: 10.3322/caac.21262.

- Tran C and Damaser MS. (2015) Stem cells as drug delivery methods: application of stem cell secretome for regeneration. *Adv Drug Deliv Rev.*, 82-83: 1-11. doi: 10.1016/j.addr.2014.10.007.
- Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHL, Beasley MB, Chirieac LR, Dacic S, Duhig E, Flieder DB. (2015) The 2015 world health organization classification of lung tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification. *J Thorac Oncol.*, 10(9): 1243-1260. doi:10.1097/JTO.0000000000000630.
- Tugues S, Burkhard SH, Ohs I, Vrohings M, Nussbaum K, Vom BJ, Kulig P, Becher B. (2015) New insights into IL-12-mediated tumor suppression. *Cell Death Differ.*, 22(2): 237-246. doi: 10.1038/cdd.2014.134.
- Vignali DA and Kuchroo VK. (2012) IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat Immunol.*, 13(8): 722-728. doi: 10.1038/ni.2366.
- Volm M and Koomagi R. (2000) Relevance of proliferative and pro-apoptotic factors in non-small-cell lung cancer for patient survival. *Br J Cancer*, 82(10): 1747-1754. doi: 10.1054/bjoc.1999.1210.
- Volm M, Koomagi R, Mattern J and Stammer G. (1997) Cyclin A is associated with an unfavourable outcome in patients with non-small-cell lung carcinomas. *Br J Cancer*, 75(12): 1774-1778.
- Wang L, Kong W, Liu B and Zhang X. (2018) Proliferating cell nuclear antigen promotes cell proliferation and tumorigenesis by up-regulating STAT3 in non-small cell lung cancer. *Biomed Pharmacother*, 104: 595-602. doi: 10.1016/j.biopha.2018.05.071.
- Wang L, Liu R, Ribick M, Zheng P and Liu Y. (2010) FOXP3 as an X-linked tumor suppressor. *Discov Med.*, 10(53): 322-328.
- Wang S., Qu X. and Zhao RC. (2012) Clinical applications of mesenchymal stem cells. *J Hematol Oncol.*, 5: 19. doi: 10.1186/1756-8722-5-19.
- Wang W, Fan X, Zhang Y, Yang Y, Yang S and Li G. (2015) Association between COX-2 polymorphisms and lung cancer risk. *Med Sci Monit.*, 21: 3740-3747.
- Wang Y, Chen T, Huang H, Jiang Y, Yang L, Lin Z, He H, Liu T, Wu B, Chen J. (2017) miR-363-3p inhibits tumor growth by targeting PCNA in lung adenocarcinoma. *Oncotarget*, 8(12): 20133-20144. doi: 10.18632/oncotarget.15448.
- Wei HJ, Zeng R, Lu JH, Lai WF, Chen WH, Liu HY, Chang YT, Deng WP. (2015) Adipose-derived stem cells promote tumor initiation and accelerate tumor growth by interleukin-6 production. *Oncotarget*, 6(10): 7713-7726. doi: 10.18632/oncotarget.3481.
- Weiss JM, Subleski JJ, Wigginton JM and Wiltrout RH. (2007) Immunotherapy of cancer by IL-12-based cytokine combinations. *Expert Opin Biol Ther.*, 7(11): 1705-1721. doi: 10.1517/14712598.7.11.1705.
- Weissman IL. (2000). Units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*, 100(1); 157-168. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81692-X.
- Weissman IL, Anderson DJ and Gage F. (2001) Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 17; 387-403. doi: 10.1146/annurev.cellbio.17.1.387.



- White E and DiPaola RS. (2009) The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin Cancer Res.*, 15(17): 5308-5316. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-5023.
- White E, Mehnert JM and Chan CS. (2015) Autophagy, metabolism, and cancer. *Clin Cancer Res.*, 21(22): 5037-5046. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0490.
- Witko-Sarsat V, Mocek J, Bouayad D, Tamassia N, Ribeil JA, Candalh C, Davezac N, Reuter N, Mouthon L, Hermine O. (2010) Proliferating cell nuclear antigen acts as a cytoplasmic platform controlling human neutrophil survival. *J Exp Med.*, 207(12): 2631-2645. doi: 10.1084/jem.20092241.
- Wong MCS, Lao XQ, Ho KF, Goggins WB and Tse SLA. (2017) Incidence and mortality of lung cancer: global trends and association with socioeconomic status. *Sci Rep.*, 7(1): 14300. doi: 10.1038/s41598-017-14513-7.
- Wystrychowski W, Patlolla B, Zhuge Y, Neofytou E, Robbins RC and Beygui RE. (2016) Multipotency and cardiomyogenic potential of human adipose-derived stem cells from epicardium, pericardium, and omentum. *Stem Cell Res Ther.*, 7(1): 84. doi: 10.1186/s13287-016-0343-y.
- Yang S, Liu Y, Li MY, Ng CSH, Yang SL, Wang S, Zou C, Dong Y, Du J, Long X. (2017) FOXP3 promotes tumor growth and metastasis by activating Wnt/beta-catenin signaling pathway and EMT in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer*, 16(1): 124. doi: 10.1186/s12943-017-0700-1.
- Yasmeen A, Berdel WE, Serve H and Muller-Tidow C. (2003) E- and A-type cyclins as markers for cancer diagnosis and prognosis. *Expert Rev Mol Diagn.*, 3(5): 617-633. doi: 10.1586/14737159.3.5.617.
- Yoh D, Mitsuhiro S, Shi-Xu J, Mariko K, Yasuaki K and Toru K. (1998) Active cyclin A-CDK2 complex, a possible critical factor for cell proliferation in human primary lung carcinomas. *The American Journal of Pathology*, 153(3): 963-972. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65638-6.
- Yu T, Tang B and Sun X. (2017) Development of inhibitors targeting hypoxia-inducible factor 1 and 2 for cancer therapy. *Yonsei Med J.*, 58(3): 489-496. doi: 10.3349/ymj.2017.58.3.489.
- Yukawa T, Shimizu K, Maeda A, Yasuda K, Saisho S, Okita R and Nakata M. (2015) Cyclooxygenase-2 genetic variants influence intratumoral infiltration of Foxp3-positive regulatory T cells in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep.*, 33(1): 74-80. doi: 10.3892/or.2014.3561.
- Yuzhalin AE and Kutikhin AG. (2012) Interleukin-12: clinical usage and molecular markers of cancer susceptibility. *Growth Factors*, 30(3): 176-191. doi: 10.3109/08977194.2012.678843.
- Zaffagnini G and Martens S. (2016) Mechanisms of selective autophagy. *J Mol Biol.*, 428(9 Pt A): 1714-1724. doi: 10.1016/j.jmb.2016.02.004.
- Zhang CL, Huang T, Wu BL, He WX and Liu D. (2017) Stem cells in cancer therapy: opportunities and challenges. *Oncotarget*, 8(43): 75756-75766. doi: 10.18632/oncotarget.20798.
- Zhang W, Fulci G, Wakimoto H, Cheema TA, Buhrman JS, Jeyaretna DS, Stemmer RAO, Rabkin SD, Martuza RL. (2013) Combination of oncolytic herpes simplex

viruses armed with angiostatin and IL-12 enhances antitumor efficacy in human glioblastoma models. *Neoplasia*, 15(6): 591-599.

Zhou J, Tan X., Tan Y, Li Q, Ma J and Wang G. (2018) Mesenchymal stem cell derived exosomes in cancer progression, metastasis and drug delivery: a comprehensive review. *J Cancer*, 9(17): 3129-3137. doi: 10.7150/jca.25376.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 7(2): 211-228. doi:10.1089/107632701300062859

<http://clinicaltrials.gov/mezenkimal-kök-hücre> (10.02.2019)



## 8. ÖZGEÇMİŞ

29 Nisan 1981 tarihinde İstanbul'da dünyaya geldi. 1998 yılında Kırımlı İsmail Rüştü Olcay Lisesi'nden mezun olduktan sonra 2003 yılında İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümü'ni bitirdi. 2001-2003 yılları arasında Yedikule Göğüs Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde stajyer biyolog olarak çalışmış olup, 2003-2012 yılları arasında Özel İstanbul Göğüs Hastalıkları Merkezinde Patoloji Laboratuvarında biyolog olarak göreve başladı. 2012-2013 yılları arasında Eren Patoloji Laboratuvarında kısa bir süre çalıştıktan sonra, 2013 yılından itibaren Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hastanesi'nde görevini sürdürmektedir. Bu süre zarfında genel patoloji yanısıra immünohistokimya ve moleküler patoloji özel ilgi alanı olmaya devam etmektedir.

### YAYINLAR

- Coban G, **Turna S**, Yıldız P, Unver N, Büyükpınarbasılı N, Ersoz C, Gücin Z. (2019) The association of GLUT-1, Galectin 3 and Claudin 1 staining with the type of renal tumors. *Annals of Medical Research*, 26(5): 827-32. doi: 10.5455/annalsmedres.2019.02.095
- İrmak Yazıcıoğlu MB, Ceylaner B, **Turna S**, Kaşıkçı H. (2018) Kanserde hedefe yönelik monoklonal antikor tedavisi. *Haliç Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 1: 95-102.
- Tosuner Z, Özgün Geçer M, Hatipoğlu MA, Abdallah A and **Turna S.**, (2018) BRAF V600E mutation and BRAF VE1 immunoexpression profiles in different types of glioblastoma. *Oncology Letters*, doi: 10.3892/ol.2018.8919.
- Tosuner Z, Türkmen İ, Arıcı S, Sönmez C, **Turna S**, Onaran Ö. (2017) Immunocytoexpression profile of ProExC in smears interpreted as ASC-US, ASC-H, and cervical intraepithelial lesion. *Journal of Cytology*, 34(1). doi: 10.4103/0970-9371.197605.
- Tosuner Z, Gücin Z, Kıran T, Büyükpınarbaşılı N, **Turna S**, Taşkırıran O, Arıcı DS. (2016) A six sigma trial for reduction of error rates in pathology laboratory. *Turkish Journal of Pathology*, 32(3): 171-177. doi: 10.5146/tjpath.2015.01356.