

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OKSİTOSİNİN TAKROLİMUSA MARUZ KALMIŞ ADİPOZ DOKU
KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRE HATTI ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Kök Hücre Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Gözde SIR

DANIŞMAN

Doç. Dr. Yiğit UYANIKGİL

İZMİR

2016

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

Başkan: Doç. Dr. Yiğit Uyanıkgil

Üye: Prof. Dr. Dilek Taşkiran

Üye: Prof. Dr. Utku Ateş

Yüksek Lisans Tezinin Kabul Edildiği Tarih:

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, her türlü yardımı ve desteğiyle arkamda olduğunu bildiğim ayrıca tez konumun belirlenmesinde bana yardımcı olan danışmanım, değerli hocam **Sn. Doç. Dr. YİĞİT UYANIKGİL**’ e,

Tez çalışmam boyunca bilgisi, tecrübesi, tavsiyeleri ve yarattığı imkanlarla yardımlarını esirgemeyen değerli hocam **Sn. Doç. Dr. ÇIĞIR BİRAY AVCI**’ ya

Çalışmamın sitotoksite testleri aşamasında vaktini ayırarak yardımcı olan değerli hocam, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı **Sn. Prof. Dr. CUMHUR GÜNDÜZ**’ e

Deneyleirim süresince benimle bilgisini, tecrübelerini ve en önemlisi emeğini paylaşan değerli arkadaşım **Sn. Arş. Gör. BAKİYE GÖKER BAĞCA**’ ya

Çalışmamın apoptoz testleri aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle bana yardımcı olan değerli arkadaşım **Sn. Arş. Gör. GÜRKAN YİĞİTTÜRK**’ e

Çalışmamın istatistiksel analizlerinin yapılmasında yardımcı olan **Yrd. Doç. Dr. TİMUR KÖSE**’ye

Tüm eğitim ve öğretim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, her koşulda arkamda olduklarını bildiğim değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu ve EÜTF Bilimsel Araştırma Projeleri Altkomisyonu’na projemize verdikleri destekten dolayı teşekkür ederim.

Son olarak bu çalışmanın gerçekleşmesi için gerekli maddi desteği 2015-TIP-009 nolu BAP projesi aracılığıyla sağlayan Ege Üniversitesi Rektörlüğü’ne teşekkür ederim.

İzmir, 28.03.2016

Gözde SIR

ÖZET

OKSİTOSİNİN TAKROLİMUSA MARUZ KALMIŞ ADİPOZ DOKU KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRE HATTI ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Takrolimus (FK 506) organ nakillerinde alıcı bireyde immün cevabın oluşmasını engellemek için kullanılan ve bu etkiyi kalsinörin sinyal yolağı üzerinden T hücrelerinin uyarılmasını engelleyerek yapan kemoterapotik bir kimyasaldır. Metabolik olarak incelendiğinde vücutta temel olarak karaciğerde sitokrom P450 enzim sistemi tarafından metabolize edilen takrolimusun farklı hücreler üzerinde yüksek toksik etkilerinin olduğu bilinmektedir.

Mezenkimal kök hücreler doku yenilenmesi ve hücresel tedavide kullanılabilmesi sebebiyle son zamanlarda oldukça önem kazanmışlardır. Bazı klinik vakalarda organ nakli sonrasında hastaya destekleyici amaçla mezenkimal kök hücreler nakledilmektedir. Mezenkimal kök hücreler immünomodülatör etkileri ve rejenerasyona yardımcı olmaları sebebiyle günümüzde gittikçe yaygınlaşan bir kullanıma sahiptir.

Oksitosin, primer olarak insanda nöromodülatör olarak işlev gören ve hipofiznin nörohipofiz kısmından salgılanan peptit bir hormondur. Oksitosinin hücreler üzerinde oksidatif strese karşı direnç kazandırmak, proliferasyonu arttırmak ve rejenerasyona yardımcı olmak gibi etkileri vardır.

Yapılan çalışmada takrolimus adlı etken maddenin, insan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Bunun yanında yine aynı şekilde nöral bir peptit hormon olan oksitosinin, adipoz doku kaynaklı mezenkimal hücreler üzerinde takrolimus kaynaklı oluşan toksisiteyi inhibe edip etmediği araştırılmıştır.

İnsan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre hattı üzerinde takrolimusun sitotoksik etkisi WST-1 analizi kullanılarak zaman ve doza bağımlı olarak değerlendirilmiştir. Belirlenen zaman ve doz ile yapılan izoblogram analizleri sonucunda madde kombinasyonlarının endeks değerleri belirlenmiştir.

Takrolimus ve oksitosinin IC₅₀ dozu (72. saat) insan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler için sırasıyla 17.44 µM ve 13.43 µM olarak belirlenmiştir. İzobologram analizleri sonucu antagonistik olarak belirlenen iki etken maddenin kombinasyonlarının endeks değerleri ED50: 1.418, ED75: 1.25719, ED90: 1.23533 olarak kaydedilmiştir.

Apoptotik ve nekrotik ölüm oranlarını belirlemek amacıyla anneksin V yöntemi uygulanmıştır. Analiz sonucunda apoptotik olmayan, erken apoptotik, geç apoptotik, toplam apoptotik ve ölü hücreler hem yüzde olarak hem de hücre/ml olarak hesaplanmıştır.

Oksidatif stres ile birlikte oluşan ve reaktif oksijen metabolitlerinin verdiği zararı belirlemek amacıyla lipid peroksidasyonu, süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi, katalaz (CAT) aktivitesi, glutatyon peroksidaz (GPX) aktivitesi ölçülmüştür.

Ayrıca antijen-antikor bağlanma prensibine göre çalışan immüno Floresan boyama yöntemi ile hücrelerin içerisinde bulunan yapıtaşları ve meydana gelen kimyasal reaksiyonlar gösterilmiştir.

Yapılan çalışmada elde edilen veriler doğrultusunda takrolimusun adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler üzerinde oksidatif stres yaratarak hücrelerin erken apoptoza gitmelerine neden olduğu görülmüştür. Oksitosine maruz bırakılan hücrelerde proliferasyonun arttığı gözlemlenirken takrolimus ve oksitosin kombinasyonlarında takrolimusun hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin azaldığı belirlenmiştir. Çalışma sonunda belirlenen dozun alıcıya modifiye edilmesiyle, hem immünosupresif ilacın hem de mezenkimal kök hücrelerin birbirlerinden negatif yönde etkilenmeden immün sistem üzerinde gerekli baskıyı oluşturacakları düşünülmektedir. Bu duruma bağlı olarak organ nakilleri sonrasında uygulanan tedavi protokollerinde destekleyici olarak oksitosinin kullanımına ışık tutacağı da öngörülen sonuçlar içerisinde yer almaktadır.

Anahtar kelimeler: takrolimus; oksitosin; adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre; oksidatif stres

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF OXYTOCIN ON AT-MSC EXPOSURE WITH TACROLIMUS

Tacrolimus (FK 506) is a chemotherapeutic agent, which uses calcineurin pathway via inhibiting the stimulation of T cells to prevent the formation of immune response in the recipient individual in organ transplants. Tacrolimus is mainly metabolized in the liver by cytochrome P450 enzyme system and is known to be of high toxic effects on different cells.

Mesenchymal stem has recently gained importance because they can be used in cellular therapy and tissue regeneration. In some clinical cases mesenchymal stem cells are transferred into the patient after the organ transplantations in order to support the treatment. Because of their immunomodulatory effects and to assist the regeneration, mesenchymal stem cells has an increasingly prevalent use today.

Oxytocin is primarily acting as neuromodulators in humans and is a peptide hormone secreted by the pituitary gland of the neurohypophysis. Oxytocin has such effects on cells as to confer resistance against oxidative stress on cells and to increase the proliferation and help regeneration.

Studies on the active substance of tacrolimus were aimed to investigate the cytotoxic effects on human adipose tissue derived mesenchymal stem cells. Besides, likewise a peptide hormone oxytocin neural adipose tissue was investigated in order to reveal the inhibition of the tacrolimus-induced toxicity comprising the mesenchymal cells

Cytotoxic effects of tacrolimus on human adipose tissue derived mesenchymal stem cell line were evaluated by WST- 1 assay as time and dose dependent. Isobologram analysis was conducted using the assessed dose and time revealed the index values of substance combinations. IC₅₀ dose of tacrolimus and oxytosin (72 hours) for human adipose tissue derived mesenchymal stem cell were designated 17.44 μ M and 13.43 μ M, respectively. The results of isobologram analysis for two substance determined as antagonistic and the combination indexes were recorded as ED₅₀: 1.418, ED₇₅: 1.25719, ED₉₀: 1.23533, respectively.

In order to determine the apoptotic and necrotic death rate, annexin V method was used. By the help of the result of the analysis, non apoptotic, early apoptotic, late apoptotic, apoptotic and dead cells, both in total and percent cells / ml was calculated.

In order to determine the damage caused by the active metabolites that formed with oxidative stress, superoxide dismutase activity (SOD), catalase activity (CAT), glutathione peroxidase activity (GPX) were measured.

Also immunofluorescence staining, which works by the the antigen-antibody binding principle was conducted to the show the cell constituents and chemical reactions that take in place.

The data obtained in the present study suggest that tacrolimus has been shown to cause early apoptosis on human by creating oxidative stress. Proliferation was observed in cells that exposed to oxytocin and the combination of tacrolimus and oxytocin also decreased cytotoxic effects on cells. By the modification of the determined dose to recipient's will generate the necessary pressure on the immune system without being affected by both immunosuppressive drug and mesenchymal stem cells. Depending on this case, the results obtained in this study will enlighten the use of oxytocin in addition to treatment protocols that applied after the transplantation.

Keywords: tacrolimus, oxytocin, adipose derived mesenchymal stem cells, oxidative stress

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT	III
TABLolar DİZİNİ	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
GRAFİKLER DİZİNİ	XII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Kök Hücreler	3
2.2 Kök Hücrelerin Genel Özellikleri	4
2.2.1 Köklülük (Pluripotensi).....	5
2.2.2 Kendini Yenileme.....	5
2.2.3 Farklılaşma	5
2.3 Kök Hücre Kaynakları	6
2.3.1 Embriyonik Kök Hücreler	8
2.3.2 Erişkin Kök Hücreler	9
2.3.2.1 Mezenkimal Kök Hücreler	10
2.3.2.1.1 Adipoz Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler ...	12

2.4 Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmün Sistem Üzerindeki Etkileri	14
2.4.1 Graft Versus Host Hastalığında Mezenkimal Kök Hücre Uygulaması	17
2.5 İmmünoşüpresyon	18
2.5.1 İmmünoşüpresif Ajanlar	19
2.5.1.1 Takrolimus ve Etki Mekanizması	21
2.6 Oksitosin ve Hücreşel Tedavideki Yeri	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1 Hücre Kültürü	27
3.2 Hücrelerin Kültür Ortamında Çoğaltılması	27
3.2.1 Hücrelerin Çözülmesi	28
3.2.2 Hücre Canlılığının Hesaplanması	29
3.2.3 Hücrelerin Pasajlanması	29
3.2.4 Hücrelerin Dondurulması	30
3.2.5 Etken Maddenin Kullanıma Hazırlanması	30
3.3 WST-1 Testi	30
3.4 İzobologram Analizi	32
3.5 Annexin V Yöntemi ile Apoptoz Analizi	33
3.6 İmmünoşloresan Boyama	34
3.7 Oksidatif Stres Parametreleri	36

3.7.1 Lipid Peroksidasyonu (MDA) Ölçümü	36
3.7.2 Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Ölçümü.....	37
3.7.3 Katalaz (CAT) Aktivitesi Ölçümü	39
3.7.4 Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Ölçümü	40
3.8 İstatiksel Değerlendirme Yöntemi	42
4. BULGULAR.....	44
4.1 Takrolimus (Fk506) ve Oksitosinin İnsan ADKH Hattının Üzerinde Sitotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi.....	43
4.2 İzobologram Analizi	44
4.3 Annexin V Yöntemi ile Yapılan Apoptoz Analizi Bulguları.....	45
4.4 İmmüno Floresan Boyama Bulguları	47
4.4.1 Ki-67 Boyaması	47
4.4.2 Vimentin Boyaması.....	48
4.5 Hücre Canlılık Analizlerinin İstatiksel Değerlendirilmesi	50
4.5.1 Ölü Hücre Yüzdesi.....	50
4.5.2 Geç Apoptoz/Ölü Yüzdesi	51
4.5.3 Erken Apoptoz Yüzdesi.....	52
4.5.4 Canlı Hücre Yüzdesi.....	53
4.6 Oksidatif Stress Analiz Parametreleri Bulguları	54
4.6.1 Lipid Peroksidasyonu (MDA) Ölçümü Bulgusu	54

4.6.2 Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Ölçümü Bulgusu.....	54
4.6.3 Katalaz (CAT) Aktivitesi Ölçümü Bulgusu.....	55
4.6.4 Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Ölçümü Bulgusu.....	55
4.7 Oksidatif Stres Parametrelerinin İstatiksel Değerlendirilmesi.....	56
4.7.1 Lipid Peroksidasyon (MDA) düzeyi	56
4.7.2 Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) düzeyi	56
4.7.3 Katalaz (CAT) düzeyi.....	57
4.7.4 Süperoksit Dismutaz (SOD) düzeyi.....	57
5. TARTIŞMA	59
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	67
7. KAYNAKLAR	68
ÖZGEÇMİŞ.....	80

Tablolar Dizini

Sayfa

Tablo 1: Üç germ tabakasının meydana getirdiği oluşumlar	6
Tablo 2: Mezenkimal kök hücrelerin immünomodülatör etkilerinde rol alan mekanizmalar.	15
Tablo 3: Solid organ transplantasyonunda kullanılan immunsupresif ajanlar	20
Tablo 4: Günümüzde sık kullanılan immunsupresif ajanların T hücre aktivasyonundaki etki yerleri	20
Tablo 5: Ölü hücre yüzdesi istatistiksel tablosu	50
Tablo 6: Geç apoptoz / ölü yüzdesi istatistiksel tablosu	51
Tablo 7: Erken apoptoz yüzdesi istatistiksel tablosu	52
Tablo 8: Canlı hücre yüzdesi istatistiksel tablosu	53
Tablo 9: Biyokimyasal parametrelerin istatistiksel değerlendirme tablosu	58

Şekiller Dizini

Sayfa

Şekil 1: Farklılaşma yeteneklerine göre kök hücreler	3
Şekil 2: Kök hücre kaynakları	7
Şekil 3: Farklılaşmamış haldeki insan embriyonik kök hücre kolonisi	8
Şekil 4: Embriyonik kök hücrelerin blastosist evresindeki yeri	9
Şekil 5: Mezenkimal kök hücre kaynakları ve plastisitesi	11
Şekil 6: İnsan adipoz kaynaklı kök hücre izolasyonu, farklılaştırılması ve klinik kullanımı	13
Şekil 7: Mezenkimal kök hücrelerin immünositler üzerindeki etkileri	17
Şekil 8: Takrolimusun kimyasal yapısı	21
Şekil 9: Takrolimusun etki mekanizması	22
Şekil 10: Oksitosinin kimyasal yapısı	23
Şekil 11: Ön-arka hipofiz hormonları ve etkiledikleri yapılar	24
Şekil 12: Ön-arka hipofizin kontrolü ve damarlanması	25
Şekil 13: Hücrelerin çoğalması için kullanılan özel besiyeri	27
Şekil 14: 75 cm ² 'lik flasklara ekilen insan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler	28
Şekil 15: İnsan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin üçüncü pasajdaki mikroskop görünümü	29
Şekil 16: WST-1 testi plak planı.....	31
Şekil 17: İzobologram analizi için plak planı	32
Şekil 18: Anneksin V'in apoptotik hücelere bağlanma şekli	33
Şekil 19: Apoptoz analizi için deney gruplarının plaktaki yerleşimi	34
Şekil 20: İmmünofloresan boyama için deney gruplarının plak üzerindeki yerleşim planı	35

Şekil 21: Lipid Peroksidasyonu ölçümü için hazırlanan plak yerleşim planı	37
Şekil 22: Glutatyon Peroksidaz ölçümü için hazırlanan plak yerleşim planı	38
Şekil 23: Katalaz aktivitesi ölçümü için hazırlanan plak yerleşim planı	39
Şekil 24: Süperoksit dismutaz aktivitesi ölçümü için hazırlanan plak yerleşim planı	41
Şekil 25: Ki-67 boyaması	47
Şekil 26: Vimentin boyaması	48



Grafikler Dizini

Sayfa

Grafik 1: ADKH' lerinde takrolimusun IC ₅₀ dozu	43
Grafik 2: ADKH' lerinde oksitosinin IC ₅₀ dozu.....	43
Grafik 3: Takrolimus ve oksitosinin 72. Saatteki IC ₅₀ değeri baz alınarak kurulan izobologram analizi bulgusu	44
Grafik 4: Kontrol grubunda Muse analyzer sonuçları	45
Grafik 5: Oksitosin grubunda Muse analyzer sonuçları.	45
Grafik 6: Takrolimus grubunda Muse analyzer sonuçları	46
Grafik 7: Kombine grup (Oksitosin + Takrolimus) grupta Muse analyzer sonuçları	46
Grafik 8: Ölü hücre yüzdesi istatistiksel grafiği	50
Grafik 9: Geç apoptoz / ölü yüzdesi istatistiksel grafiği	51
Grafik 10: Erken apoptoz yüzdesi istatistiksel grafiği	52
Grafik 11: Canlı hücre yüzdesi istatistiksel grafiği	53
Grafik 12: MDA standart eğrisi	54
Grafik 13: NADPH standart eğrisi	54
Grafik 14: H ₂ O ₂ standart eğrisi.....	55
Grafik 15: SOD Aktivitesi	55
Grafik 16: MDA düzeyi istatistiksel grafiği	56
Grafik 17: GSH-Px düzeyi istatistiksel grafiği.....	56
Grafik 18: CAT düzeyi istatistiksel grafiği	57
Grafik 19: SOD düzeyi istatistiksel grafiği	57

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini

CD: Clusters of Differentiation

Oct-4: Octamer-binding Transcription Factor

HMG: High Mobility Group

Sox: Sry-box Containing Gene

HLA: Human Lymphocyte Antigen

SVF: Stromal Vascular Fraction

EGF: Epidermal Growth Factor

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

bFGF: basic Fibroblast Growth Factor

KGF: Keratinocyte Growth Factor

PDGF: Platelet Derived Growth Factor

HGF: Hepatocyte Growth Factor

TGF- β : Transforming Growth Factor Beta

IGF: Insulin-like Growth Factor

BDNF: Brain Derived Neurotrophic Factor

Flt3: Fms-like Tyrosine Kinase-3

G-CSF: Granulocyte Colony Stimulating Factor

GM-CSF: Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor

IL: İnterlökin

LIF: Leukemia Inhibitory Factor

TNF- α : Tumor Necrosis Factor Alfa

NK: National Killer

MHC: MAjor Histocompatibility Complex

IGN- γ : Interferon Gama

IDO: Indolamin-2,3-Dioxygenase

E₂(PGE₂): Prostoglandin

NO: Nitric Oxide

STAT5: Signal transducer and activator of transcription 5

Th2: Type 2 T helper cells

Treg: Regulatory T cells

Ig: İmmunoglobulin

DC: Dendritic cell

$\gamma\delta$ T: Gama Delta T cells

iDC: Immature dendritic cells

mDC: Mature dendritic cells

GVHH: Graft Versus Host Hastalığı

FK506: Takrolimus

FKBP12: Takrolimus Bağlayıcı Protein

NF-AT: Aktive Olmuş T Hücresi Nükleer Faktörü

F: Fosfat

LH: Luteinleştirici Hormon

AKH: Adipoz Kökenli Kök Hücre

DMSO: Dimetilsülfoksit

FBS: Fetal Bovine Serum

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

PS: Phosphatidylserine

PBS: Phosphate buffered saline

MDA: Malondialdehit

D: Dilüsyon Faktörü

GSH-Px: Glutasyon Peroksidaz

CAT: Katalaz

SOD: Süperoksit Dismutaz

1.GİRİŞ

Organ ve doku nakli, vücuttaki görevini yerine getiremeyecek bir organın, başka bir tıbbi çözüm olmadığı durumlarda canlı bir vericiden veya kadavradan alınan sağlam bir doku veya organ ile değiştirilmesi işlemidir. Kişinin kendi dokusunun yeniden kendisine nakledilmesi bağışıklık sistemi bakımından sorun yaratmamaktadır çünkü bu durumda bağışıklık sistemi kendi doku ve hücrelerini tanımaktadır. Fakat farklı vericiden yapılan transplantasyon işlemlerinde alıcının bağışıklık sistemi yabancı hücre, doku ve organlara karşı vücudu korumaya çalışarak onları reddetmektedir. Organ nakillerinde karşılaşılan en büyük engel doku reddidir ve bu engelin aşılması organ nakillerindeki başarı oranının artmasında önemli bir unsurdur (1-3).

Transplantasyon işleminde alıcının kendine nakledilen dokuları yabancı saymasını önlemek amacıyla immünosupresyon adı verilen yöntem uygulanmaktadır. İmmünosupresyon, bağışıklık sisteminin çeşitli yöntemlerle baskılanması işlemidir. İmmünosupresyonda antijen tanınarak T hücrelerinin antijeni tanınması, çoğalması, farklılaşması ve antikor yapımı işlevi baskılanmaktadır (4,5).

İmmünosupresif ajanlardan biri bu çalışmada da kullanılan Takrolimus adlı etken maddedir. Takrolimus ilk kez 1984 yılında *Streptomyces tsukubaensis* isimli toprak mantarından üretilmiş bir makrolid laktondur. Takrolimusun immünosupresif etkisini kalsinörin inhibisyonu yaparak, T hücre aktivasyonunu ve interlökin-2 (IL-2), IL-4, IL-5 gibi inflamatuvar sitokinlerin salınımını inhibe ederek gösterdiği düşünülmektedir. Sitokinlerin transkripsiyonel aktivasyonunda temel rol oynayan kalsinörin, hedef proteinlerden fosfat gruplarını ayırarak kalsiyum aktivasyonu yapmaktadır. Bu sebeple immünosupresyon yapmak için iyi bir hedeftir (6-9).

Mezenkimal kök hücrelerin rejeneratif tıp alanında ve doku tamirinde kullanılmalarının dışında, diğer kök hücrelerden farklı olarak, immün sistem üzerinde düzenleyici etkileri oldukları keşfedilmiştir (10-12). *In vitro* ortamda mezenkimal kök hücrelerin T ve B hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, regülatör T hücre gelişimini desteklediği, doğal öldürücü hücreler (NK) ve sitotoksik T lenfositlerin litik aktivitesini azalttığı, monositlerin dendritik hücrelere farklılaşmasını inhibe ettiği ve onların antijen sunucu fonksiyonlarına zarar verdiği gösterilmiştir. Bu nedenle artık organ nakillerinde immünosupresyon amacıyla

mezenkimal kök hücrelerin de alıcıya transplante edilmektedir (13,14). Takrolimusun tek başına kullanıldığında toksik etkisinin düşük olduğunu bildiren literatürler bulunmakla birlikte farklı immün baskılayıcı ajanlarla birlikte kullanıldığında toksik etkisinin arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur (15,16). Ayrıca daha önce yapılmış olan bazı çalışmalarda, başta lenfositler olmak üzere farklı hücreler için toksik etkiye sahip olduğu da belirtilmektedir (17,18). Fakat söz konusu kimyasalın mezenkimal kök hücreler üzerinde olası etkileri henüz tam olarak bilinmemektedir (19,20).

Oksitosin; insanlarda nörohipofiz olarak adlandırılan arka hipofizde yerleşen ve buraya hipotalamus'tan gelen supraoptik ve paraventriküler nukleuslardan salgılanan özelleşmiş hücreler tarafından sentezlenen bir memeli hormonudur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda *in vitro* yada *in vivo* ortamda oksitosinin bir çok hücrede oksidatif strese karşı direnç kazandırdığı, hücre proliferasyonunu arttırdığı ve mezenkimal hücrelerin farklılaşmasını düzenlediği bildirilmektedir (21-23).

Yapılan bu deneysel çalışmada; doku ve organ nakillerinde immünsupresif ilaç olarak kullanılan Takrolimusun adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler üzerindeki etkileri ve antioksidan bir ajan olan oksitosinin takrolimusun oluşturduğu toksik etkinin azaltılması için yeni bir ajan olarak kullanılma potansiyeli araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

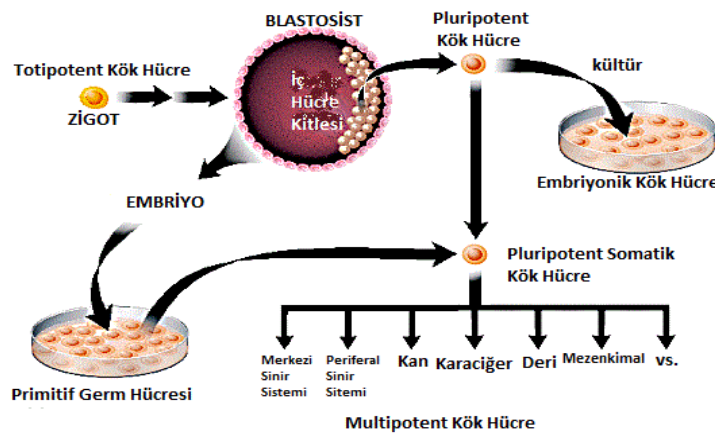
2.1. Kök Hücreler

Kök hücreler kendilerini yenileyebilme, sınırsız çoğalabilme ve kendilerinden başka hücrelere farklılaşabilme, hasarlı dokuya verildiğinde hasarlı yapıyı onarabilme özellikleri ile tanımlanan özel hücrelerdir (24). Bol miktarda bulunmaları, kolay elde edilebilmeleri, birçok hücre tipine farklılaşarak çoğalabilmeleri, otolog veya allojenik alıcılara güvenli ve etkin bir şekilde transplante edilebilmeleri sebebiyle rejeneratif tıp uygulamalarında tercih edilmektedirler (25).

Sperm ve yumurta hücresinin birleşmesi sonrası sırasıyla zigot, 4-8 hücreli blastomerler, morula ve blastosist evreleri izlenir. Embriyonik kök hücreler ve embriyonik germ hücreleri blastosist içerisindeki iç hücre kütesinde bulunurlar. Bu hücreler mezoderm, endoderm, ektoderm ve germ hücrelerini oluştururlar (26).

Gelişmekte olan organizmalarda ise embriyonik kök hücreler bulunmamaktadır. Bu organizmalarda yetişkin kök hücre adı verilen, çeşitli organlarda ve bu organların belli doku bölgelerinde çoğalabilen ve farklılaşabilen hücreler yerleşmiştir. Örneğin; derideki epidermisi veya bağırsak epitelini yenileyen kök hücreler yetişkin kök hücrelerdir (27).

Kök hücreler farklılaşma yeteneklerine göre totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent olarak 4 grupta toplanabilirler.



Şekil 1: Farklılaşma yeteneklerine göre kök hücreler (28).

Dünya sağlık örgütünün totipotent terimi için ‘organizmanın tamamını geliştirebilme kapasitesi’ ve ‘tüm hücre ve doku tiplerine farklılaşabilme’ olmak üzere iki tanımı vardır. Bu iki tanım arasındaki farklılık totipotensi teriminin tanımı açısından karışıklıklara sebep olmakla birlikte önemsizdir (29). Totipotensi bir hücrenin bir organizmayı oluşturan tüm hücre tiplerine farklılaşabilme yeteneğidir. Zigot organizmayı oluşturacak tüm hücre tiplerine farklılaşma potansiyeline sahip olan ilk totipotent hücredir (30). Totipotent hücreler, ekstraembriyonik yapı olan göbek kordonu, amniyon kesesi, Wharton Jeli ve plasentayı oluşturarak pluripotent, multipotent, unipotent özellik gösterebilirler (31).

Pluripotensi hücre biyolojisinde; bir kök hücrenin üç germ tabakası olan endoderm, mezoderm ve ektoderm tabakalarına farklılaşabilmeleri anlamında kullanılır. Pluripotent kök hücreler, fetal veya yetişkin hücre tiplerini oluşturabilir fakat bir organizmayı oluşturacak yeteneğe sahip değildirler (30). Pluripotent kök hücreler kardiyak rahatsızlıklar ve diyabet gibi birçok hastalığın tedavisi için kendini yenileyebilen, sağlıklı doku ve hücre kaynağı oluşturma imkanı sunmaktadır. Yanık hasarları ve otoimmün bir etiyolojisi olan Parkinson gibi hastalıkların tedavisinde de pluripotent kök hücrelerin iyileştirme potansiyellerinden yararlanılmaktadır. Hastalıkların tedavisinde kas, kan, kalp, sinir hücresi gibi geniş hücre potansiyeline sahip pluripotent kök hücreler aynı zamanda hücre ve doku transplantasyonlarında da kullanılmaktadırlar (28).

Multipotent hücreler insan vücudunda sadece birkaç hücre türüne dönüşebilen hücrelerdir. Laboratuvar ortamında gerekli koşullar ve sinyaller sağlandığında daha fazla hücre türüne dönüşebilmeleri mümkündür. Bu hücrelere verilebilecek en iyi örnek hematopoietik kök hücrelerdir (32).

Unipotent hücreler gelişmiş bir organizmada tek bir hücre grubuna farklılaşma yeteneği olan hücrelerdir. Doku yenilenmesinde de rol oynarlar fakat geniş doku hasarlarının tamiri için pluripotent kök hücrelere ihtiyaç vardır. Deri kök hücreleri ve kas dokusunda bulunan uydu hücreleri unipotent hücrelere örnektir (33).

2.2. Kök Hücrelerin Genel Özellikleri

Kök hücreler; pluripotensi (köklülük), kendi kendisini yenileyebilme ve farklı hücre tiplerine farklılaşabilme yeteneğine sahip hücrelerdir.

2.2.1. Köklülük (Pluripotensi)

Kök hücreleri diğer hücrelerden ayıran hücresel ve moleküller özellikleri ifade eden bir terim olan ‘köklülük’ kök hücrelerin imzası olarak kabul edilir. Bu özellikler özgün gen ifadeleri veya translasyon sonrası meydana gelen birtakım değişimleri içerir ve bunlar sayesinde kök hücreler farklılaşmadan özgün yapılarını ve işlevlerini korurlar.

Kök hücre tipleri; hücre sinyal yolları üzerinde veya hücrelerin yüzeyinde yer alan hücre-hücre yapışma molekülleri olarak rol oynayan belirteçler ile belirlenebilirler. Bu belirteçlerin çoğu Farklanma Kümeleri (Clusters of differentiation) başlığı altında toplanmışlardır. Bu başlık kısaca ‘CD’ olarak ifade edilir (34).

2.2.2. Kendini Yenileme

Kendini yenileme; kök hücrenin asimetric veya simetric olarak bölünerek, gelişme potansiyeli anne hücre ile aynı olan bir veya iki yavru hücre meydana getirme işlemidir. Kendini yenileyebilme özelliği; gelişim sürecinde hücrelerin yayılması, yetişkin dokuların korunması ve yaralanma sonrası iyileşme için kök hücrelerin sahip olduğu temel bir özelliktir. Bu özellik, hücrenin farklılaşmamış düzeydeki korunduğu süreci ifade eder (35). Kendini yenileme programı iki temel mekanizma arasındaki denge sayesinde gerçekleşir. Bu mekanizmalar; kendini yenilemeyi uyaran proto-onkogenler ve kendini yenilemeyi sınırlayan tümör baskılayıcılarıdır. Bu mekanizmalar hücre dışından özellikle de niş bölgesindeki elemanlardan aldıkları sinyallerle harekete geçerler. Dış sinyaller sayesinde hücrelerin kendini yenileme süreçlerinin kontrolü sağlanır (27).

2.2.3. Farklılaşma

Farklılaşma, hücrelerin olgunlaşma döneminde geçirdikleri bir dizi biyokimyasal olaylardan oluşan değişimi tanımlamak için kullanılır. Bu biyokimyasal olaylar sitokinlerin, büyüme ve farklılaşma faktörlerinin, hücre dışı matriks proteinlerinin ve hücrelerarası iletişimlerin kombine etkisiyle gerçekleşir. Farklılaşma aşamasındaki hücre bölünmeyi durdururken aynı zamanda hücre dışından gelen sinyallere cevap vermeye hazırlanır. Kök hücre türlerinin elde edildikleri kaynağa bağlı olarak farklılaşma potansiyelleri farklılık gösterir (36). Kök hücreler üç germ tabakası olan endoderm, mezoderm ve ektoderm

hücrelerinden meydana gelirler ve bu üç germ tabakası vücudun tüm hücrelerinin embriyonik kaynağını oluşturur (37).

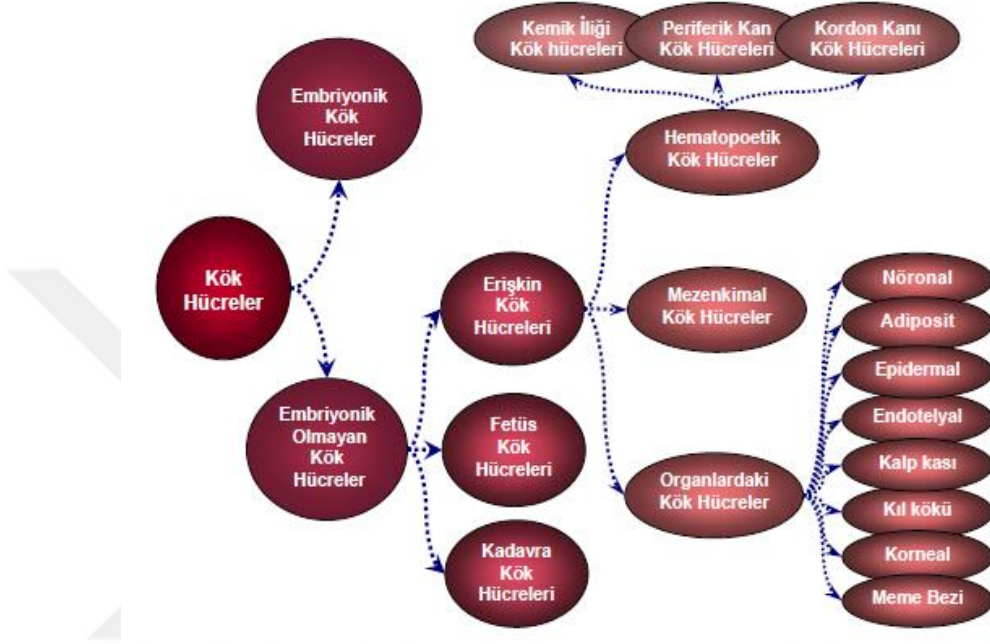
Tablo 1: Üç germ tabakasının meydana getirdiği oluşumlar (27).

Ektoderm	Mezoderm	Endoderm
Merkezi sinir sistemi	Bağ dokusu, tendonlar, meninksler ve meninkslerin kan damarları	Sindirim borusu
Periferik sinir sistemi	Kan dokusu	Karaciğer
Epidermis, melanositler	Kemik, kıkırdak, eklem ve kemik iliği	Pankreas
Dermis, deri ve ekleri (saç, kıl ve tırnak)	Kas dokuları	Solunum sistemi stroması (larinks, trakea, akciğerler)
Epitel dokusu Ağız ve ağız boşluğuna açılan salgı bezleri Nazal yollar Göz (mercek, kornea, Retina) Kulak (iç, dış)	Epitel dokusu Kalp, kan ve lenfatik dolaşım sistemi Dalak ve lenf düğümleri Ürogenital sistem Vücut boşlukları Dermis	Epitel Farinks Tiroid, paratiroid Timus, tonsilla Orta kulak
Meme bezleri, ter bezleri, yağ bezleri	Plevra, periton, perikard, mezotelyum	Mesane, üretra
Dişin mine tabakası	Böbreküstü bezinin korteksi	Vajina
Bezlerin stroması Tiroid, paratiroid Timus, tonsilla Tükürük, gözyaşı Orta kulak ve Östaki borusu		Bezlerin stroması Tiroid, paratiroid Timus, tonsilla Tükürük, gözyaşı Orta kulak ve Östaki borusu
Hipofiz, Epifiz	Bağırsak duvarı	
Böbreküstü bezinin medullası	Solunum sistemi duvarı	

2.3. Kök Hücre Kaynakları

Kök hücreler temelde elde edildikleri kaynağa göre ikiye ayrılırlar; embriyonik kök hücreler ve embriyonik olmayan kök hücreler. Embriyonik kök hücreler, embriyonun erken gelişim sürecinde blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilen hücrelerdir. Embriyonik olmayan kaynaklardan elde edilen kök hücreler ise; erişkin kök hücreler, fetüs kök hücreleri, kadavradan elde edilen kök hücreler, göbek kordonu ve plasenta kök hücreleridir.

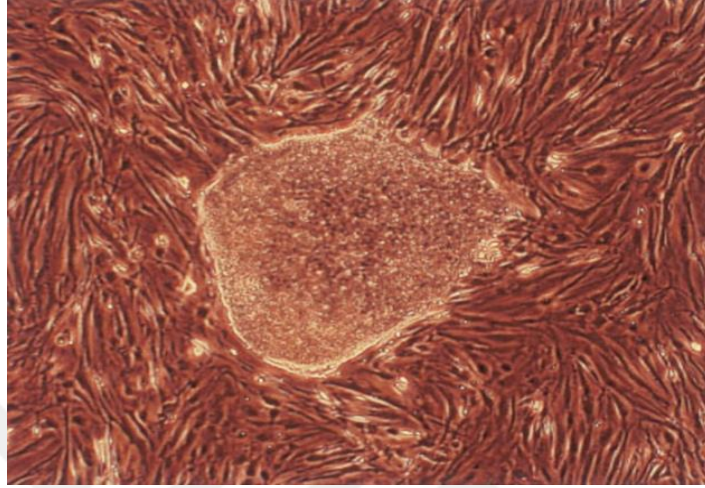
Yetişkin bir insan vücudunun neredeyse tüm doku ve organlarında kök hücrelerin varolduğu bilinmektedir. Deri, kas, kalp kemik, yağ, sinir ve kan gibi birçok doku ve organlarda yer alan kök hücreler çeşitli sebeplerle meydana gelen hasarları vücut içerisinde onarır ve iyileştirirler (38).



Şekil 2: Kök hücre kaynakları (39).

2.3.1. Embriyonik Kök Hücreler

Embriyonik kök hücreler blastosist evresinde embriyonun i  hücre kitlesinde yer alan ve pluripotent özellikteki hücrelerdir (40).

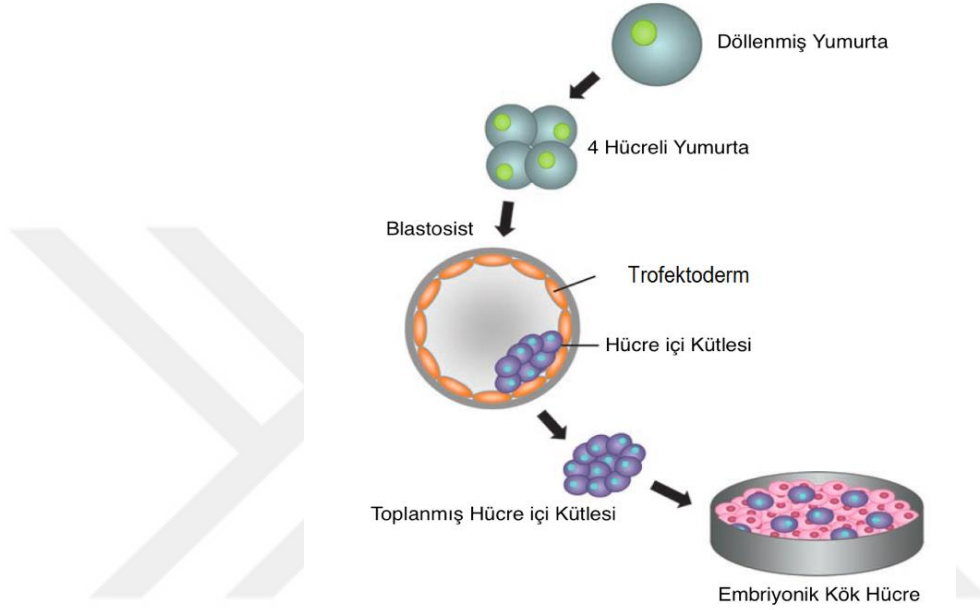


Şekil 3: Farklıla mamı  haldeki insan embriyonik kök hücre kolonisi (41)

Embriyonik kök hücreler vücuttaki tüm hücre ve dokuları oluşturabilme kapasiteleri sebebiyle doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanında oldukça büyük potansiyele sahiptirler. Fare embriyonik kök hücreleri ilk defa yaklaşık 30 yıl önce gelişmekte olan blastosistin i  hücre kitlesinden izole edilmesi ve *in vitro* ortamda çoğaltılması sonucu tanımlanmışlardır (41,42). Daha sonra yine fare embriyolarında bu hücrelerin tüm hücre hatlarına katıldığı gösterilmiştir (43). Fare embriyonik kök hücreleri *in vitro*'da farklıla mamı  halleri ile süresiz olarak  o almı lar fakat uygun sinyaller tarafından ind klendikleri zamanlarda tüm vücut fenotiplerine farklılaşma kapasitelerini sürdürmüşlerdir (44). 1998 yılında insan embriyonik kök hücreleri elde edilmi ler ve insan hastalıklarında mümkün olabilecek tedaviler için rejeneratif tıp ve doku mühendisliği alanında yapılacak çalışmalara olanak sa lamı lardır (45-47).

 nsan embriyonik kök hücre hatları ilk olarak laboratuvar ortamında d llenmi  veya ailelerin onayı alınarak ba ı lanmış embriyolardan elde edilmişlerdir. Üreme amaçlı yaratılan embriyoların yedek olanları yalnızca etik açıdan uygun bulunduğu takdirde tıbbi araştırmalarda kullanılabilmi lerdir.  nsan embriyonik kök hücre elde

edilmesiyle ilgili diğerk bir yaklaşımsomatik hücre nukleus transferi yani klonlama'dır. Bu prosedüre göre bireyin çekirdeğ i çıkarılmış yumurta hücresine somatik hücre nukleusu transfer edilir. Bu hücreler embriyonik gelişimin blastosist evresine geldikten sonra iç hücre kitlesinden izole edilen embriyonik kök hücreler donör dokuları ile genetik olarak uyumlu olurlar (48).



Şekil 4: Embriyonik kök hücrelerin blastosist evresindeki yeri (49).

Embriyonik kök hücreler kültür ortamında ya da gelişmekte olan bir embriyo içinde erişkin organizmadaki tüm hücreleri oluşturma ve sonsuza kadar yayılma yeteneğine sahiptirler. Bu yetenek embriyonik kök hücrelerin pluripotent özellikte olduklarını göstermektedir. Hücre içinde pluripotentiğ in sürdürölmesini sağlayan bazı faktörler vardır. Bu faktörler; homeodomain transkripsiyon faktörü Oct4 (Octamer-binding transcription factor), varyant homeodomain transkripsiyon faktörü Nanog ve yüksek mobilite grubu (HMG)-box transkripsiyon faktörü Sox2'dir (50).

2.3.2. Erişkin Kök Hücreler

Gelişmekte olan bir organizmada çeşitli organlarda ve bu organların belirli doku bölgelerinde kendi kendine çoğalabilen, kararlanabilen ve farklanabilen hücreler varlığını sürdürür. Bu hücrelere erişkin kök hücreler adı verilmektedir.

Erişkin kök hücreler totipotent özellikte olmadıkları için az sayıda hücre tipine farklılaşabilirler bu sebeple öncü hücre olarak da değerlendirilebilirler. Somatik kök hücreler olarak da adlandırılan bu hücreler hasarlanan dokuların yenilenmesinde de görev alırlar (36).

Son zamanlarda en çok çalışılan erişkin kök hücre tipleri hematopoetik kök hücreler, mezenkimal kök hücreler, nöral kök hücreler, bağırsak kök hücreleri ve endotel kök hücrelerdir. Bunların dışında kalp, karaciğer, akciğer, pankreas, göz, burun, kulak gibi organlarda bulunan hücrelerin köken aldığı kök hücrelerden söz edilebilir (51).

Erişkin kök hücreler arasında multipotent, oligopotent hatta unipotent hücreler görülebilir. Bu hücreleri öncü hücrelerden ayıran en büyük ölçüt, asimetric hücre bölünmesiyle birbirinden farklı iki yavru hücreye bölünmeleridir. Bu bölünme tipi kök hücre havuzunun yenilenmesini ve sayılarının azalmadan sürdürülebilmesini sağlar (52).

Erişkin kök hücrelerde görülen bir özellik de plastisitedir. Örneğin ektoderm kökenli bir kök hücrenin uygun koşullar altında endoderm ve mezoderm kökenli hücrelerin de kaynağı olabilmesi bu hücrelerin yüksek plastisitesi sonucudur (27).

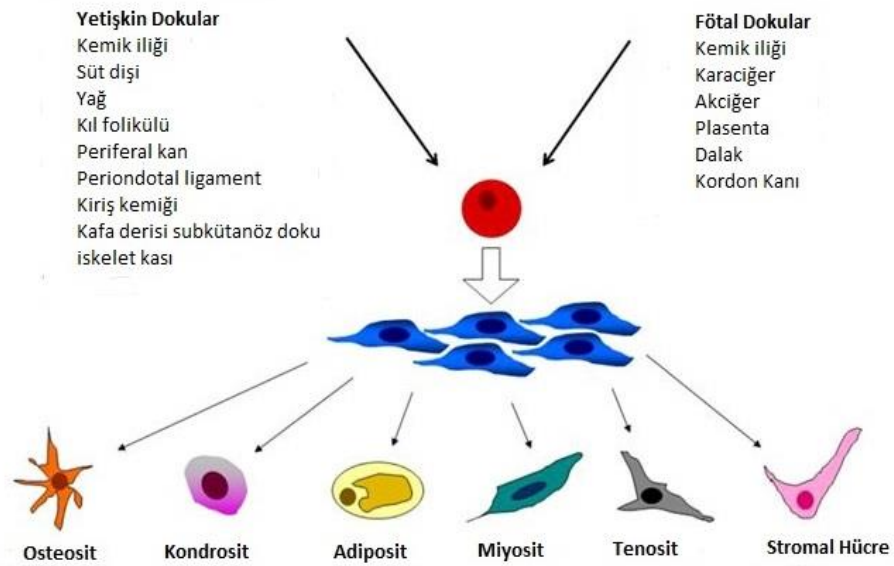
Erişkin kök hücrelerin sayıları sınırlıdır. Çeşitli sebeplerle hasara uğrayan hücrelerin yerini alacak hücrelere yön verirler ve dokudaki dengenin sağlanmasına yardımcı olurlar. Erişkin kök hücreler tüm vücuda yayılmışlardır ve bulundukları mikroçevre şartlarına göre farklılaşırlar. Fakat bu hücrelerin belirli bir yerleşimleri olmadıkları için elde edilmeleri kolay olmamaktadır (53).

2.3.2.1. Mezenkimal Kök Hücreler

1960'larda Friedenstein ve arkadaşları, fare kemik iliği stromasını başka bir dokuya nakletmişler ve burada stroma hücrelerinin yağ, kıkırdak, kemik ve retikulum hücrelerine dönüşebildiğini göstermişlerdir. Böylece kemik iliğinde hematopoetik olmayan öncü hücrelerin varolduğu anlaşılmıştır. Bu hücreler fibroblast kolonisi oluşturan birim CFU-F (colony-forming unit-fibroblast) etkinliğiyle ölçülerek fibroblastların öncüsü hücreler olarak tanımlanmışlardır. Hücrelerin genel özellikleri plastik yüzeye yapışmaları ve *in vitro* olarak çoğaltılabilmeleridir (54). Yıllar sonra bu hücreler Pittenger ve arkadaşları tarafından *in vitro* ortamda adiposit, kondrosit ve osteoblasta farklılaştırılmıştır.

Birden fazla hücre tipine farklılaşabilmeleri ve *in vitro* çoğalabilmeleri nedeniyle bu hücreler mezenkimal kök hücre olarak adlandırılmışlardır (55).

Erişkin kök hücre tipi olan mezenkimal kök hücreler kendi kendini yenileyebilen ve farklı hücre tiplerine farklılaşabilen multipotent stromal hücreler olarak ifade edilirler. Mezenkimal kök hücreler doku yenilenmesi ve hücrel tedavide kullanılabilmeleri sebebiyle son zamanlarda oldukça önem kazanmışlardır. Bu hücrelerin izolasyon ve kültürlerinin kolay olmasının yanı sıra *ex-vivo* potansiyelleri yüksektir ve *in vitro* koşullarda uzun süre kültür edilebilirler. Uygun mikro çevre koşullarında başta bağ doku olmak üzere çok çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilirler. *In-vitro* koşullarda uygun uyarılarla yağ, kemik, kıkırdak, kas, tendon, ligament gibi hücrelere farklılaştıkları gösterilmiştir (56).



Şekil 5: Mezenkimal kök hücre kaynakları ve plastisitesi (56)

Çoğu mezenkimal doku canlılıkları boyunca biçim değiştirmişlerdir. Biçim değiştirmenin en uç örneği; hasar görmüş dokunun tam bir yenilenme göstermesidir. Farklı bireylerin yanı sıra aynı bireye ait farklı dokular arasındaki yenilenme kapasitesi kayda değer farklılıklar göstermektedir (57).

Mezenkimal kök hücrelerin tipik belirteçleri henüz tam olarak bulunamamıştır. En çok kabul gören belirteçleri CD105, CD90 ve CD73 olup, hematopoetik belirteç olan CD45, CD34, CD14 ve CD11b'den yoksundurlar. Ayrıca bu belirteçlere ek olarak mezenkimal kök hücrelerin CD13, CD29, CD44, CD166 ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü taşıdıkları kabul edilmektedir.

Hücrelerin, mezenkimal kök hücre olarak tanımlanabilmesi için Uluslararası Hücresel Tedaviler Topluluğunun bildirdiği 3 özellik vardır:

1. Hücrelerin kültür ortamında plastik yüzeye tutunabilmeleri.

2. Yüzeylerinde CD105 (SH2), CD73 (SH3/4) ve CD90 gibi hematopoetik olmayan hücre yüzey belirteçlerini eksprese ederlerken, CD45, CD34, CD14 veya CD11b, CD79 veya CD19 ve HLA-DR (Human Lymphocyte Antigen-DR) gibi tipik hematopoetik belirteçleri eksprese etmemeleri.

3. *In vitro* ortamda kemik, yağ ve kıkırdak hücrelerine farklılaşabilmeleri (58).

2.3.2.1.1. Adipoz Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler

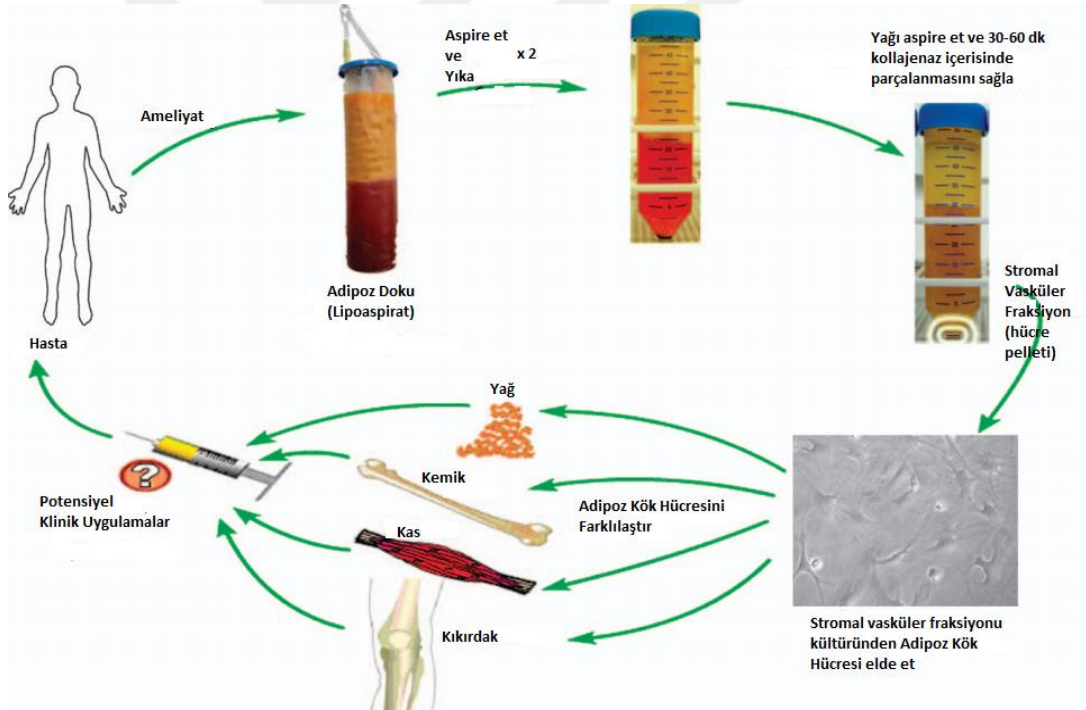
Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücreler yağ dokusunun damarlı bölgesinin stromasından (stromal vascular fraction, SVF) yağ hücrelerinin uzaklaştırılmasıyla elde edilmektedirler. Kollojenaz tip I veya tip II içersinde sindirilebilen yağ dokusundan elde edilen adipoz kökenli kök hücrelerin (AKH) kültür ortamında çoğalabilme kapasiteleri vericinin yaşı ile ters orantılıdır. Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler için;

Pozitif belirteçler; CD9, CD13, CD29, CD44, CD54, CD73, CD90, CD105, CD106, CD117, CD140b, CD146, CD166 ve HLA I.

Negatif belirteçler; CD11b, CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, CD79 α , CD133 VE CD144 olarak bilinmektedirler (27).

Adipoz doku tüm memeli türlerinde embriyonik gelişim evresinde mezodermden kökenlenmektedir. Adipoz doku tıpkı bir endokrin organ gibi çalışarak yağ depolama yoluyla enerji metabolizmasının sürdürülebilirliğini sağlamaktadır. Kahverengi ve beyaz olmak üzere iki tipi olan adipoz dokunun beyaz tipinden, adipoz kaynaklı kök hücre elde edilmektedir. Adipoz kök hücreleri ile ilgili ilk çalışmalar 1992'de araştırmacıların domuzdan alınan preperitoneal yağı kullanmasıyla başlamıştır (59). Adipoz kök hücreleri, subkütanöz ve omental yağ

içeren beyaz yağ dokusunun her türünde bulunabilmektedir. Bu hücreler doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanında gelecek vaat etmektedirler. Bol bulunmaları ve mezodermin diğer doku tiplerine farklılaşabilmeleri nedeniyle çeşitli uygulamalarda kullanılabilmektedirler (60). Osteoartrit, diyabet, kalp hastalığı, yumuşak doku yenilenmesi, mastektomi sonrası yeniden yapılanma ve deri onarımı gibi durumlarda kullanılmaktadırlar. *İn vitro* çalışmalar sayesinde donörün cinsiyetinin, vücut kütle indeksinin ve anatomik lokasyonunun adipoz kök hücrelerinin potansiyeli üzerindeki etkileri ile ilgili daha çok bilgi edinilmiştir. Son yıllarda obezitenin artmasıyla sıklaşan yağ aldırma işlemi ve bunun güvenli olması sebebiyle lipoaspirasyon yöntemi adipoz kök hücreleri için ideal kaynak olarak görülmektedir. Ayrıca klinik uygulamalarda güvenli otolog hücre kaynağı olarak gösterilmektedir (61, 62).



Şekil 6: İnsan adipoz kaynaklı kök hücre izolasyonu, farklılaştırılması ve klinik kullanımı (63).

Adipoz kök hücrelerinin *in vitro* ortamda sayılarını iki katına çıkarma süreleri kültür ortamına ve pasaj sayılarına bağlı olarak iki ile dört gün arasındadır. Araştırmacılar tarafından doku iyileşmesi ve tamirinde özel bir mekanizmaya sahip olmadıkları kabul edilmiştir. Yaralanmış veya hasta bir dokuya nakledilen adipoz

kaynaklı kök hücreler sitokinler ve büyüme faktörleri sağlayarak parakrin yollarla iyileşmeyi sağlamaktadırlar. Yüksek oranda epidermal büyüme faktörü (EGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), keratinosit büyüme faktörü (KGF), platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF), dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- β), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ve beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) salgılamaktadırlar. Aynı zamanda Flt-3 (Fms benzeri tirozin kinaz 3) ligand, granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF), granülosit/makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF), interlökin-6 (IL-6), interlökin-7 (IL-7), interlökin-8 (IL-8), interlökin-11 (IL-11), interlökin-12 (IL-12), lösemi inhibitör faktörü (LIF) ve tümör nekrozis faktörü alfa (TNF- α) gibi sitokinleri salgırlar. Otolog adipoz kök hücrelerinin düzenleyici olmaları ve doku uyumu gibi avantajları vardır (64,65).

2.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmün Sistem Üzerindeki Etkileri

Mezenkimal kök hücrelerin rejeneratif tıp alanında ve doku tamirinde kullanılmalarının dışında, diğer kök hücrelerden farklı olarak, immün sistem üzerinde düzenleyici etkileri oldukları keşfedilmiştir. Hem *in vivo* hem de *in vitro*'da gösterilen antiinflamatuvar ve immünomodülatör etkiler ağırlıklı olarak; parakrin faktörler, dönüştürücü büyüme faktörü β , prostaglandin E₂, interlökin 10, indolamin 2,3-dioksijenaz aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. *In vitro* ortamda mezenkimal kök hücrelerin T ve B hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, regülatör T hücre gelişimini desteklediği, doğal öldürücü hücreler (NK) ve sitotoksik T limfositlerin litik aktivitesini azaltarak düzenlediği, monositlerin dendritik hücrelere farklılaşmasını inhibe ettiği ve onların antijen sunucu fonksiyonlarına zarar verdiği gösterilmiştir (58).

Tablo 2: Mezenkimal kök hücrelerin immünomodülatör etkilerinde rol alan mekanizmalar (27).

<i>Etki</i>	<i>Mekanizma</i>
Lenfositlerin çoğalmasının baskılanması-engellenmesi	İndolamin dioksijenaz; nitrik oksit
T lenfositleri anarjisinin ^a uyarılması	Eriyik faktörler ve/veya hücre-hücre teması
T lenfositleri apoptozunun uyarılması	İndolamin dioksijenaz ve interferon γ ; HLA-G'ye dayalı mekanizma
Düzenleyici T hücrelerinin (Tdüz) (CD4+, CD25+) uyarılması	Eriyik faktörler ve/veya hücre-hücre teması
Antijen sunucu hücrelerin işlevlerini düzenleme	MHC sınıf II proteinlerinin ifadesini azaltmak; eş-uyarıcı moleküller olan CD80 ve CD86'nin ifadesini azaltmak; interferon γ , TNF α , IL-2 ve IL-2'nin salgısını azaltmak

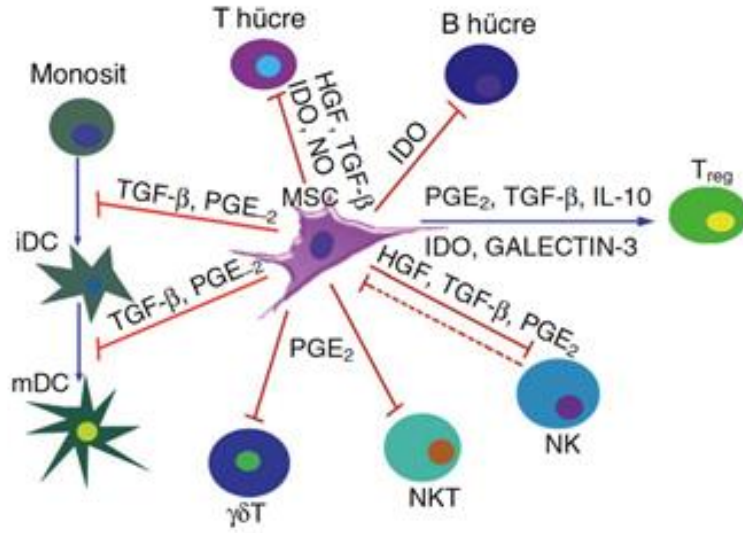
Yapılan birçok çalışmada mezenkimal kök hücrelerin alloantijenler, mitojenler, anti-CD3 ve anti-CD28 antikorları tarafından uyarılan T hücre proliferasyonunu baskıladığı kanıtlanmıştır (66). Bu baskılamanın sebebinin hücre döngüsünün G₀/G₁ fazında hücrelerin birikmesinden kaynaklı olarak hücre bölünmesi ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Moleküler seviyede; siklin D2 ekspresyonunda aşağı regülasyon olduğunda p27 ekspresyonunda yukarı regülasyon görülmesi mezenkimal kök hücrelerin T hücre proliferasyonu ve interferon gama (IFN)- γ üretimini neden etkilediğini açıklayabilmektedir. Mezenkimal kök hücreler tarafından T hücre proliferasyonu hücre-hücre etkileşimleri ve (IFN)- γ , interlökin (IL)-1 β gibi faktörlerin salınımı ile gerçekleştirilmektedir (67). Dönüştürücü büyüme faktörü (TGF)- β 1, hepatosit büyüme faktörü (HGF), indolamin 2,3-dioksijenaz (IDO) ve prostoglandin E₂(PGE₂) gibi mezenkimal kök hücre kaynaklı moleküllerin T hücre yanıtları üzerinde immünomodülatör etki yarattığı tahmin edilmektedir. Nötralizan antikorların tersine TGF- β ve HGF, mezenkimal kök hücreler tarafından indüklenen T hücre proliferasyonu baskılanmasını düzenleyebilmektedirler. T hücreler ile mezenkimal kök hücrelerin ko-kültürü yükselen PGE₂ seviyesi ile sonuçlanmaktadır. PGE₂ inhibitörleri ile tedavinin ise mezenkimal kök hücrelerle bağlantılı olan immünomodülasyonu azalttığı bilinmektedir. Mezenkimal kök hücreler tarafından nitrik oksit (NO) üretimi aynı

zamanda mezenkimal kök hücrelerin T hücre proliferasyonunu engellemektedir. NO, T hücre aktivasyonu ve proliferasyonu için gerekli bir transkripsiyon faktörü olan transkripsiyon-5'in sinyal iletimi ve aktivatörünün (STAT5) (Signal transducer and activator of transcription 5) fosforilasyonunu baskılayarak T hücre proliferasyonunu engellemektedir (68). Mezenkimal kök hücreler tarafından insan lökosit antijen-G5 (HLA-G5)'in sekresyonu sonucunda; T hücre ve NK hücre fonksiyonunun baskılanmakta ve allojenik T hücre yanıtının yardımcı T hücre 2 (Th2) (T helper 2) sitokin profiline dönüşmektedir.

Mezenkimal kök hücreler düşük seviyede HLA sınıf I molekülünü eksprese etmelerine karşın T hücresi ile ilişkili immün yanıtta önemli olan HLA sınıf II molekülünü eksprese etmezler. Son yıllarda regülatör T (Treg) hücrelerinin de Th1 ve Th2 hücrelerinin fonksiyonlarını baskılayarak immünespresif etki gösterdikleri rapor edilmiştir (69,70).

Mezenkimal kök hücreler anti-immünoglobulin (Ig) antikorlar, antiCD40L antikor ve sitokinler (IL-2 ve IL4) ile B hücre proliferasyonunu baskılamaktadırlar. Mezenkimal kök hücreler yalnız (IFN)- γ varlığında B hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmektedir. Bunun sebebinin (IFN)- γ 'nın mezenkimal kök hücrelerinIDO üretimine sebep olduğu düşünülmektedir (71). Efektör hücrelerin proliferasyonunun baskılanması triptofan yolu aracılığıyla gerçekleşmektedir.

Mezenkimal kök hücrelerin immünomodülatör etkisinin görüldüğü bir diğer hücre grubu doğal öldürücü (NK) hücrelerdir. Mezenkimal kök hücreler NK hücrelerin proliferasyonunu ve IL-2 veya IL-15 tarafından tetiklenen (IFN)- γ üretimini baskırlar (72).



Şekil 7: Mezenkimal kök hücrelerin immünositler üzerindeki etkileri. Mezenkimal kök hücreler; T hücre, B hücre, dendritik hücreler (DC), regülatör T hücreler (T_{reg}), doğal öldürücü (NK) hücreler ve gama delta T hücreleri ($\gamma\delta\text{T}$) gibi çok sayıda immün hücre ve onların etkileşimleri tarafından oluşan immün yanıtları modüle ederler. Mezenkimal kök hücrelerin inhibitör rolü salgıladıkları solübl faktörlere ve hücre-hücre etkileşimlerine bağlıdır. HGF: hepatosit büyüme faktörü, iDC: olgunlaşmamış dendritik hücre, IDO: indolamin 2,3-dioksijenaz, IL-10: interlökin-10, mDC: olgunlaşmış dendritik hücre, NO: nitrik oksit, PGE_2 : prostoglandin E_2 , $\text{TGF-}\beta$: dönüştürücü büyüme faktörü β (73).

2.4.1. Graft Versus Host Hastalığında Mezenkimal Kök Hücre Uygulaması

Graft versus host hastalığı (GVHH), donörden alınıp hastaya kök hücrelerle birlikte verilen sağlıklı T hücrelerin sebep olduğu immünolojik yanıt sonucunda görülen zor ve ölümcül bir komplikasyondur. Kök hücre nakli sonrası verici T hücreleri hastanın dokularına immün aracılı olarak hasar verirler ve ağır inflamatuvar olaylara sebep olurlar. Bu sebeple immunsupresif ilaçlar hastalar için hayati önem taşırlar. Son zamanlarda mezenkimal kök hücreler immünmodülatör etkileri ve immün cevabı düzenlemeleri nedeniyle GVHH tedavisinde alternatif bir yaklaşım olarak kullanılmaya başlamışlardır. Mezenkimal kök hücreler, T hücre proliferasyonunu temel doku uyumluluğu kompleksi (Major Histocompatibility Complex, MHC) gözetmeden baskırlarlar.

MHC sınıf I hücre yüzey molekülleri tüm çekirdekli hücrelerde bulunurlar fakat eritrosit ve kan plaketlerinde az bulunmaktadır. Hücreye özgü protein parçalarını sitotoksik T hücrelerine sunarak immün sistemin vücudun kendisine ait hücreleri yabancı hücrelerden ayırt etmesini sağlarlar. MHC sınıf I molekülü α ve β_2 -mikroglobulin olmak üzere iki polipeptid zincirden oluşur. Üç parçadan oluşan α , insan lökosit antijen (HLA) genleri tarafından kodlanır. A parçasını kodlayan genler HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G, HLA-K, HLA-L ve bu genlerin izoformlarından oluşur. Verici ile alıcı arasındaki dokunun kabulünü ve reddini özellikle HLA-A, HLA-B, HLA-C arasındaki uyum belirlemektedir. Bu moleküller mezenkimal kök hücrelerin yüzeyinde çok düşük oranda bulundukları için düşük immün yanıtı sebep olmaktadır (74).

MHC sınıf II hücre yüzey molekülleri antijen sunucu hücreler ve lenfositlerin yüzeyinde bulunmaktadır. MHC sınıf II molekülü α , β ve onlar da kendi içinde α_1 , α_2 , β_1 ve β_2 olmak üzere ikişer parçadan oluşur. HLA-DM, HLA-DO, HLA-DP, HLA-DQ ve HLA-DR olarak beş tip MHC sınıf II biçimlenmesi vardır. Mezenkimal kök hücreler genelde MHC sınıf II moleküllerini barındırmazlar bu nedenle klinik çalışmalarda üçüncü şahıslardan doku uyumu aranmadan kullanılmaktadırlar (75)

Steroide dirençli GVHH tedavisinde ilk başarılı mezenkimal kök hücre deneyimi Le Blanc ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Haploidentik nakil sonrası stereoide dirençli akut GVHH olan 9 yaşında bir erkek çocukta mezenkimal kök hücre kullanılması sonucunda hızla iyileşme görüldüğü rapor edilmiştir. Bir süre sonra semptomların tekrarlaması üzerine hastaya tekrar mezenkimal kök hücre verilmiş ve bu kez kalıcı bir cevap elde edilmiştir. 2004 yılında yapılan bu klinik deneme mezenkimal kök hücrelerin GVHH tedavisinde kullanılmaları devam eden çalışmalar için önemli bir dönüm noktasıdır (76).

2.5. İmmunosupresyon

Bağıışıklık sistemi kendinden olanı, olmayandan ayırma ve gerekli mekanizmayı geliştirerek tepki verme üzerine kuruludur. Adaptif immünite antijenle karşılaşmış olmaya bağlıdır ve esas efektörleri T ve B lenfositlerdir. B lenfositler antikor yaparken T lenfositler yardımcı ve regülatör olarak görev alırlar (82).

İmmunosupresyon zayıflatılmış veya inhibe edilmiş immün yanıt olarak tanımlanan bir durumdur. Hem humoral hem de hücrel yanıtı oluşturmaktadır. Bu

durum her bir eksilen antikor sınıfının (IgG, IgM, IgA) değışken seviyeleri, azalmış immun hücre sayısı ve fonksiyonu, sitokin üretiminin inhibisyonuna yol açan T hücreler, sinyal transdüksiyonu ve klonal genişleme ile ilişkilendirilmektedir. İmmunosupresif tedavi organ nakli, onkoloji ve otoimmun rahatsızlıklar gibi tıbbın birçok alanında kullanılmaktadır. İmmunosupresyon, immun sistem organlarının cerrahi rezeksiyonu ile, X ışını kullanılarak fiziksel yöntemlerle veya farmakolojik ajanlar kullanılarak kimyasal yöntemlerle indüklenebilir. En çok karşılaşılan yöntem ise immunsupresif ilaç uygulamalarıdır. Fakat immunosupresyondan beklenen iyileştirici etki yanında bozulmuş bağışıklıktan kaynaklı olarak bazı yan etkiler görülmektedir. Bunlar dokular üzerindeki toksik etkiler (nefrotoksisite, nörotoksisite) veya malignite süreci üzerindeki direkt etkilerdir (77).

2.5.1. İmmunosupresif Ajanlar

Son evre organ yetmezliği olan hastalar için organ nakli günümüzde uygulanan en başarılı tedavi yöntemidir. Uluslararası kayıtlara göre böbrek, karaciğer ve kalp nakillerinde hayatta kalma oranı % 85 civarındadır. Organ nakillerindeki başarının büyük bir kısmını immunsupresif tedavideki gelişmeler oluşturmaktadır. İmmunosupresif ajanlardaki gelişmeler daha hedefe yönelik bir tedaviye olanak sağlamaktadırlar (78). İmmunosupresyon ile antijen tanınır ve T hücrelerinin antijeni tanıma, çoğalma, farklılaşma ve antikor yapımı işlevi baskılanır. İmmunosupresyon yöntemi temelde nonspesifik ve spesifik olmak üzere ikiye ayrılır. Nonspesifik immunsupresyonda immun sistem antijene bağlı olmaksızın baskılanmaktadır. Bu immunsupresyon yöntemi immun sistem fonksiyonlarını her aşamada baskıladığı için alıcıyı enfeksiyonlara karşı duyarlı hale getirir. En sık kullanılan ilaçlar steroidler, azathiopirin ve anti-lenfosit globülin'lerdir. Spesifik immunsupresyon yönteminde immun sistem yanıtı, enfeksiyonlara duyarlılık artışı olmadan durdurulmaktadır (79,80).

Tablo 3: Solid organ transplantasyonunda kullanılan immunsupresif ajanlar (81).

Ajanın Sınıfı	Ajan
Kortikosteroid	Prednizolon Prednizon Metil Prednizolon
Antiproliferatif	Azatiyoprin Mikofenolat Mofetil Mikofenolat Sodyum
Kalsinörin İnhibitörü	Siklosporin Takrolimus
TOR İnhibitörü	Sirolimus Everolimus
Poliklonal Anti-Lenfosit Antikor	Anti-Lenfosit Globulin Anti-Timosit Globulin
Monoklonal Antikor	Muromonab-CD3 Basiliksimab Daklizumab

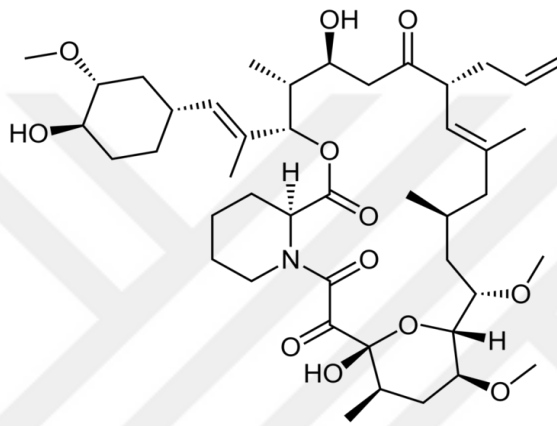
Organ transplantasyonlarında kullanılan immunsupresif ilaçların tedavi gereği yaşam boyu kullanım gerektirmesi hastaları gelişebilecek olan enfeksiyonlar ve kanser açısından riske sokmaktadır. Kalsinörin inhibitörlerinin nefrotoksik ve diabetojenik olması farklı klinik durumlardaki kullanımlarını sınırlamaktadır (82).

Tablo 4: Günümüzde sık kullanılan immunsupresif ajanların T hücre aktivasyonundaki etki yerleri (82).

İLAÇ	ETKİ YERİ
Glukokortikoidler	DNA da glukokortikoid yanıt elemanları (gen transkripsiyonunu düzenlerler)
Muromonab-CD3	T-hücre reseptör kompleksi (antijen tanınmasını bloke eder)
Siklosporin	Kalsinörin (fosfataz aktivitesini inhibe eder)
Takrolimus	Kalsinörin (fosfataz aktivitesini inhibe eder)
Azatiyopirin	Deoksiribonükleik asit (yanlış nükleotit bağlanır)
Mikofenolat motetil	İnozin monofosfat dehidrogenaz (aktivitesini inhibe eder)
Daklizumab,Basiliksimab	IL-2 reseptör (IL-2 aracılıklı T hücre aktivasyonunu bloke ederler)
Sirolimus	Hücre siklusu progesyonunda görev alan protein kinaz (mTOR) (aktivitesini inhibe eder)

2.5.1.1. Takrolimus ve Etki Mekanizması

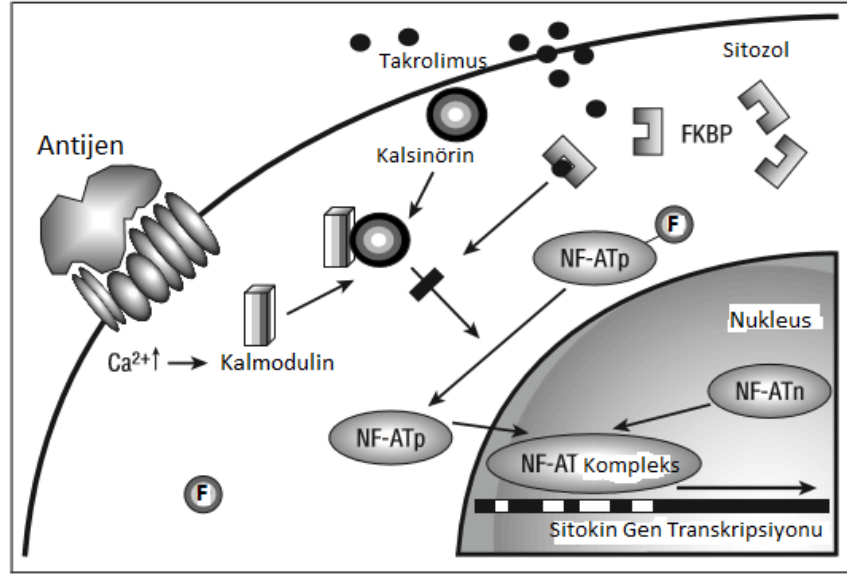
Takrolimus, ilk kez 1984 yılında *Streptomyces tsukubaensis* isimli toprak mantarından üretilmiş bir makrolid laktondur. Yapılan çalışmalarda Siklosporin-A'dan daha güçlü immunsupresif etkisi olduğu ve özellikle karaciğer ve böbrek transplantasyonunda daha iyi sonuçlar elde edildiği gösterilmektedir. Kapalı formülü $C_{44}H_{111}N_{11}O_{12}$, moleküler ağırlığı 822 dalton olan Takrolimusa 'FK506' kodu verilmiştir (80).



Şekil 8: Takrolimusun kimyasal yapısı (83)

Takrolimus immunsupresif etkisini kalsinörini inhibe ederek ve T hücre aktivasyonunu durdurarak göstermektedir. Takrolimus hücre içi bir protein olan ve yapısal olarak siklosporine benzeyen bir immünofilin olan FK-506-bağlayıcı protein-12'ye (FKBP-12) bağlanır. Bağlanma sonrasında 'Takrolimus-FKBP-12- Ca^{2+} -kalmodülin-kalsinörin' kompleksi oluşur ve kalsinörin fosfataz aktivitesi inhibe edilir. Fosfataz aktivitesinin inhibisyonu defosforilasyonu ve NFAT'ın nükleer translokasyonunu engeller bunun sonucunda da T hücre aktivasyonu inhibe edilmiş olur. Ayrıca Lan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma ile Takrolimusun NF-kappa B aracılığıyla düzenleyici etki yaparak keratinositlerden TNF- α salınımını engellediği gösterilmiştir (84).

Takrolimusun sitokin sentezini CD4 lenfosit düzeyinde inhibe ederek hücrel immünitede oynadığı rol; i) T-lenfositlerin oluşumunu inhibe etmek, ii) IL-1, IL-2 reseptörleri ve γ -interferon gibi lenfokinlerin üretimini inhibe ederek T-hücre aktivasyonunu baskılamak, iii) B hücre aktivasyonunu engellemek ve TNF- α gen transkripsiyonunu bloke etmektir (85).



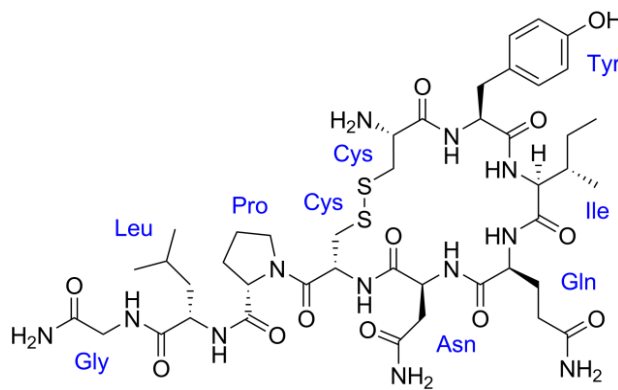
Şekil 9: Takrolimusun etki mekanizması. Takrolimusun sinyal iletim yollarını bloke etmesi aracılığıyla T hücre reseptörü – immünofilin (FK-bağlayıcı protein [FKBP]) kompleksi aktive olmuş T hücre nükleer faktörünün (NF-AT) sitoplazmik altbiriminin nükleer translokasyonunu inhibe eder. Böylece NF-AT kompleksi oluşumu engellenir ve sitokin genlerinin transkripsiyonu baskılanır. F; fosfat (85).

Takrolimus kullanımını sınırlandıran en önemli yan etkilerden biri nefrotoksisitedir. Akut reversibl renal yetmezlik, akut vaskülopati, kronik nefropati ve intertisyel fibrozis gibi klinik sendromlara sebep olabilir. Bu sebeple ilaç kullanımı süresince serum kreatinin düzeyleri yakından takip edilmelidir. Nefrotoksiste dışında hipertansiyon, uykusuzluk, böbrek fonksiyon bozukluğu, kabızlık ishal, bulantı, hiperkalemi, hiperglisemi, hipofosfotami, lökositoz ve infeksiyon gibi yan etkiler görülebilmektedir. Nörotoksik etkiler ise genellikle tremor, baş ağrısı, insomnia ve parestezi şeklinde görülmektedir (81).

Takrolimusun kandaki yarılanma ömrü yaklaşık 40 saattir. Karaciğerde sitokrom P-450 III A enzim sistemi ile metabolize olmaktadır. Ketokanozol, eritromisin, kortikosteroidler, fenitoin, fenobarbita ve benzeri ilaçlarla etkileşimi vardır. Takrolimus etkileşimi olduğu başka ilaçlarla aynı anda kullanıldığında doz ayarlaması gerekmektedir. Ayrıca kan konsantrasyonu da izlenilmelidir. Doku ve organ reddini önlemek amacıyla yetişkinlerde 0.1-0.15 mg/kg/gün dozda, ikiye bölünerek kullanılmaktadır. Çocuklarda Emilimi ve atılımı farklılık gösterdiğinden dolayı, daha yüksek doza ihtiyaç duyulur bu sebeple 0.15-0.2 mg/kg/gün kullanılması önerilmektedir (83).

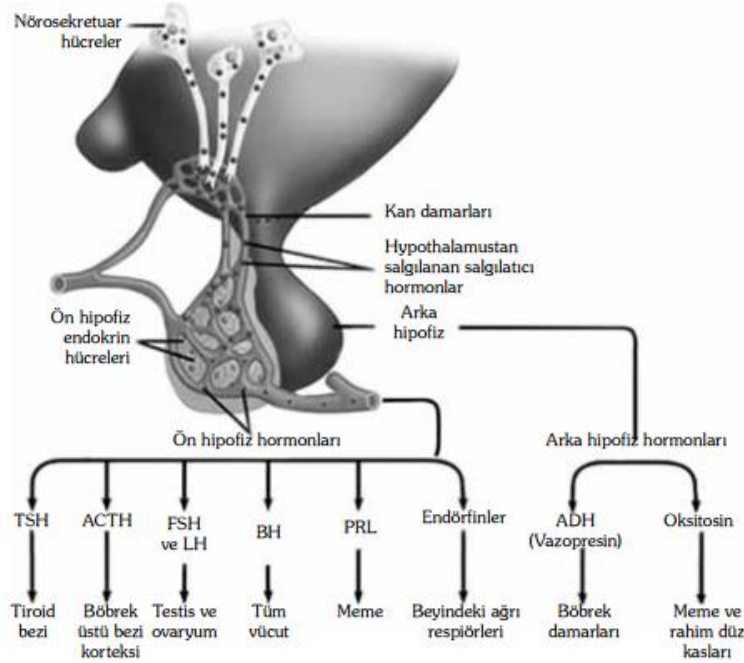
2.6. Oksitosin ve Hücresel Tedavideki Yeri

Oksitosin, insanlarda hipotalamusun supraoptik ve paraventriküler nükleuslardan nörohipofiz olarak adlandırılan arka hipofize uzanan akson benzeri yapıların presinaptik şişkinlikleri olan Herring cisimlerinde biriken ve gerektiğinde vasküler yapılara salınan bir memeli hormonudur (86). Oksitosin reseptörü beyinde (ventromedial hipotalamus, amigdala, omurilik) yaygın olarak bulunmaktadır. Beyinde nörotransmitter rolü oynayan oksitosin, İtalyan bilim insanı Nicholas Farraye tarafından 1835 yılında bulunmuştur (87). Moleküler formülü $C_{43}H_{66}N_{12}O_{12}S_2$ 'dir ve 9 amino asitten (Sistein- tirozin- isolösin- glutamin- asparagin- sistein- prolin- lösin- glisin) oluşmaktadır. Oksitosin sekansı çıkarılan ve sentezi yapılan ilk peptid hormon olma niteliğini taşımaktadır. Vincent du Vigneaud, 1953 yılında oksitosini ilk kez sentezleyerek 1955 yılında Nobel ödülü almıştır (88). Oksitosin kanda serbest bir peptit olarak dolaşır. Hormonu kan dolaşımından uzaklaştıran başlıca organlar böbrekler ve karaciğerdir (89).



Şekil 10: Oksitosinin kimyasal yapısı (87).

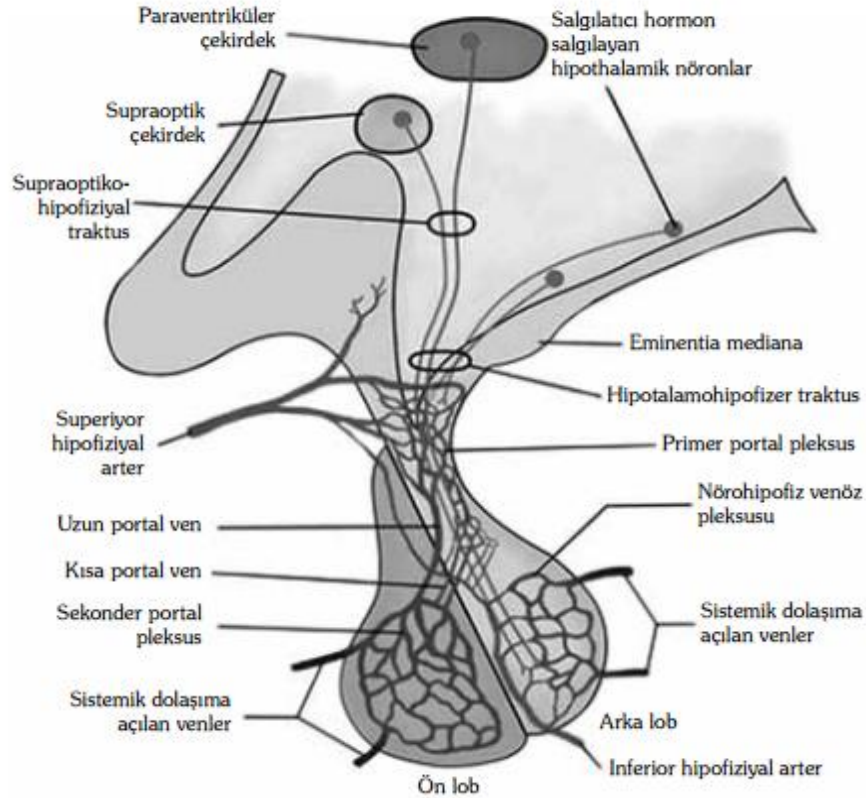
Yenidoğan döneminde, annenin bebeği emzirmesi ile oksitosin salınımı uyarılır. Oksitosin, meme süt kanalında bulunan kontraktıl miyoepitel hücreleri uyararak sütün memeden dışarı çıkmasını sağlar. Ovulasyon sonrasında ve menstrüel dönemde oksitosin reseptör yoğunluğu artar. Bu nedenle oksitosin menstrüel siklusun düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Oksitosin, gonadotropin salımını düzenler. Preovulatuvar dönemde kadınlara oksitosin uygulanması LH artışına neden olmaktadır. Erkek genital sisteminde ejakülasyonda görev yapan oksitosin, steroid sentezinde düzenleyici olarak görev yapmakta ve sperm maturasyonunu durdurmaktadır. Pankreasta insülin ve glukagon sekresyonunu artıran oksitosinin, glisemik kontrolde de fonksiyonu olduğu görülmüştür. Memelilerde üreme fizyolojisinin düzenlenmesi, doğum sırasında uterus kasılmaları ve emzirme süresince süt ejeksiyonundan sorumludur (90).



Şekil 11: Ön-arka hipofiz hormonları ve etkiledikleri yapılar (86).

Oksitosin, anatomik ve fizyolojik olarak memelilerin yaşamsal faaliyetlerinin merkezinde yer almaktadır. Memeli beyni ve pelvisi oksitosin aktivitesiyle fiziksel olarak yeniden modellenebilir bir yapıdadır. Büyük kafaya sahip yenidoğan primatlar

gibi, bazı türlere özgü durumlarda doğuma izin vermesi yönüyle büyük öneme sahiptir. Özellikle doğum sırasında beynin hipoksiden korunmasına yardımcı olmaktadır (91). Oksitosin perinatal dönemde merkezi sinir sistemini, adaptif psikoloji modellerini ve bireyin davranışlarını düzenler. Aynı zamanda otonom sinir sistemini de düzenlemektedir. Terapötik durumdaki dokuları koruma ve iyileştirmesi de şu ana kadar keşfedilen özellikleri arasındadır (92).



Şekil 12: Ön-arka hipofizin kontrolü ve damarlanması (86).

Son zamanlarda oksitosin, büyüme ve hücresel farklılaşma faktörü olarak gösterilmektedir. Ayrıca meme kanseri ve diğer tümörlerde, oksitosinin hücre büyümesini engelleyici etki gösterdiği kanıtlanmıştır (93). Aynı zamanda tümör hücreleri üzerindeki bu etkisine karşılık mitojenik aktivite gösterdiği de görülmüştür. Oksitosin, timositlerin hücre çoğalmasını ve prostat epitelyum, vasküler endotelyum ve trofoblastlardaki mitotik aktiviteyi düzenler (94). Memeli bezlerinde miyoepitelyal hücre farklılaşması ve büyümesini artırdığı da bilinen özellikleri

arasındadır. Oksitosin ve reseptörleri, kalp ve ana damarların hepsinde bulunmaktadır. Kalpte direkt veya atriyal natriüretik peptid (ANP) ile apoptoz önleyici etkiler oluşturmaktadır. Oksitosinin kardiyak farklılaşmayı artırdığını, somatik kök hücreler de dahil olmak üzere embriyonik kök hücre hatlarında kardiyomiyogenezi düzenlediğini gösteren çalışmalar mevcuttur (95). Oksitosinin mezenkimal kök hücreler ile muamelesi, kalbin korunmasında yararlı olan parakrin faktörleri uyarmaktadır.

Oksitosin nedenli kardiyovasküler olaylar; (i) kan basıncını azaltma (ii) negatif inotropik ve kronotropik etki (iii) parasempatik nöromodülasyon, (iv) vazodilatasyon (kan damarlarının genişlemesi) (v) anti-inflamatuar aktivite (vi) antioksidant aktivite ve (vii) metabolik etkilerdir. Oksitosinin anti-inflamatuar ve kardiyoprotektif roller oynadığı, vasküler ve metabolik fonksiyonları geliştirdiği bilinmektedir (96). Hücrel tedavilerdeki kısıtlamaların başlıca nedeni; iskemi, enflamasyon ve apoptoz arasındaki etkileşim nedeniyle, transplantasyon sonrasında oluşan hücre kaybıdır. Yapılan bir araştırma sonucunda oksitosinle yapılan ön koşullandırma ile mezenkimal kök hücrelerin glukoz tutulumunda belirgin artışlar olduğu görülmüştür. Saptanan sonuçlara dayanarak oksitosin muamelesinin mezenkimal kök hücrelerde, intrinsik yollar ve kardiyoprotektif faktörlerin sekresyonu vasıtasıyla koruyucu bir rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca çeşitli hücre tiplerinin oksitosin ile ön koşullandırılması onları oksidatif strese karşı dirençli hale getirmektedir (97).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, hücrelerin *in vitro* ortamda gerekli koşullar sağlanarak çoğaltılması işlemidir. Hücre kültürü çalışmalarının ortamın kontrol altında tutulabilmesi, hücrelerin üzerindeki etkilerin doğrudan doğruya gözlenilebilmesi ve organizmada karşılıklı etkileşimler nedeniyle yapılamayan araştırmaların *in vitro* ortamda yapılabilmesi gibi avantajları vardır. Ayrıca devam eden bir hücre kültüründe pasaj ilerledikçe hücre tipi değişmeyeceğinden homojenlik sağlanmış olur. Bu gibi avantajları nedeniyle çalışma kapsamında test edilecek maddelerin *in vitro* ortamda çalışılması uygun bulunmuştur.

3.2. Hücrelerin Kültür Ortamında Çoğaltılması

İnsan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre hattı (MILLIPORE Cat.No: SCC038) ticari olarak temin edilmiştir. Hücre hattı için %1 Penisilin-Streptomisin-Amfoterisin B Mixture (Lonza Cat.No: 17-745E) içeren Human Mesenchymal-LS Expansion Medium Kit (MILLIPORE Cat.No: SCM023) ile ortam hazırlanmıştır. Antibiyotik ile desteklenen ortam bazal besiyeri (480 mL), rhFGF-b (0,5 mL, 5ng/mL), Ascorbic Acid (0,5 mL, 50 ug/mL), L-Glutamin (18,75mL, 7,5mM), Hidrokortizon Hemisukkinat (0,5 mL, 1,0 µg/mL), rhİnsülin (0,5 mL, 5 µg/mL) ve FBS (10 mL, %2) içermektedir.



Şekil 13: Hücrelerin çoğaltılması için kullanılan özel besiyeri. (Human Mesenchymal-LS Expansion Medium Kit)

Hücreler yatay konumdaki 75 cm²'lik filtreli kapaklı flasklar (Nest Cat.No: 708003) içerisinde kültür edilmiştir. Hücreler yeterli sayıya ulaşana kadar geçen süreçte %95 nem ve %5 CO₂ içeren etüvde (Thermo Electron Corporation's Class 100) 37°C'de inkübe edilmiştir. İhtiyaç fazlası hücreler daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere dondurularak -86°C'de saklanmışlardır. Hücrelerin canlılık ve proliferasyonlarını gözlemlemek amacıyla ışık mikroskobu (Olympus-CH30) kullanılmıştır. Hücrelerin ortam değişimi, pasajlama, dondurma ve çözündürme işlemleri laminar akım kabini (ESCO Class II, Biological Safety Cabinets) gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Hücrelerin Çözülmesi

Ticari olarak temin edilen ve sıvı azot içerisinde muhafaza edilen hücrelerin deneyde kullanılabilmesi için hücrelere çözme işlemi uygulanmıştır. Hücrelerin bulunduğu kriyotüp buz üzerine alınmış ve 15 ml'lik santrifüj tüpüne taze besiyeri eklenmiştir. Cam pipet aracılığıyla besiyeri yavaş yavaş kriyotüpe eklenerek hücrelerin yavaş bir şekilde çözülmesi sağlanmıştır. Hücrelerin tamamı içinde taze besiyeri bulunan 15 ml'lik santrifüj tüpüne alınarak 1200 rpm'de 3 dakika santrifüj cihazında (Thermo Scientific Heraeus Labofuge 400) santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi sonrası süpernatant uzaklaştırılarak pellet süspanse edilmiş üzerine taze besiyeri damla damla bırakılmıştır. Aynı şartlarda bir santrifüj işlemi daha gerçekleştirildikten sonra süpernatant uzaklaştırılıp pellet süspanse edilmiş ve üzerine taze besiyeri eklenen hücrelerin flasklara ekim işlemi uygulanmıştır.



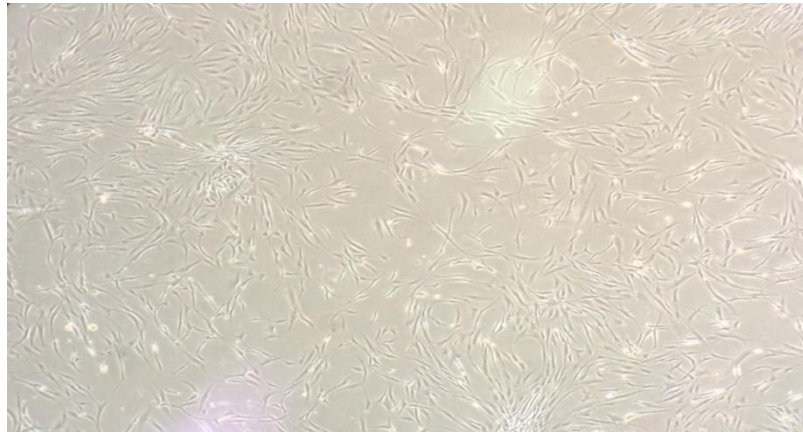
Şekil 14: 75 cm²'lik flasklara ekilen insan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler.

3.2.2. Hücre Canlılığının Hesaplanması

Hücreler çözüldükten sonra Trypan Blue boyası (Biological industries Cat.No:03-102-1B) testi kullanılarak hücrelerin canlılık yüzdesi kontrol edilmiştir. ‘Trypan Blue‘ adı verilen boya negatif yüklü bir boyadır. Eğer hücre canlı ise, boyanın hücre içine girmesine izin vermeyeceğinden hücreler şeffaf renkte görünürler. Ancak canlı olmayan hücreler boyayı absorbe ederek mikroskop altında mavi renkte görülürler. Canlılık testi için 50 µl hücre ve 50 µl tripan mavisi boyası karıştırılarak Neubauer lamına aktarılmıştır. Neubauer lamına ışık mikroskobu altında bakılarak 4X4’lük karelerden oluşan 4 adet alanda bulunan hücreler sayılmış ve ortalamaları hesaplanmıştır. Hücrelerin canlılık yüzdelerini bulmak için canlı hücre sayısı toplam hücre sayısına oranlanmıştır. Canlı hücre sayısını dilüsyon faktörü ve 2×10^4 ile çarparak milimetredeki canlı hücre sayısı hesaplanmıştır.

3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması

Pasajlanma işleminde hücreleri yüzeyden kaldırmak için % 0.25’lik tripsin (BI, Trypsin EDTA Solution B, Cat. No: 03-052-1B) hücre yüzeyini kaplayacak şekilde flaska eklenmiş ve 5 dakika inkübatörde bekletilmiştir. Hücreler yüzeyden ayrıldıktan sonra üzerine besiyeri eklenmiş ve santrifüj tüplerine alınarak 1200 rpm’de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi sonunda süpernatant uzaklaştırılmış, hücre pelleti süspanse edilmiş ve üzerine taze besiyeri eklenmiştir. Hücreler sayılarına bağlı olarak uygun sayıdaki flaslara ekilmişlerdir.



Şekil 15: İnsan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin üçüncü pasajdaki mikroskop görünümü.

Hücreler çoğalma hızlarına bağlı olarak milimetredeki sayıları 10^5 - 10^6 aralığında kalacak şekilde pasajlanmış ayrıca 2 günde bir düzenli olarak ortam değişimleri yapılmıştır.

3.2.4. Hücrelerin Dondurulması

Çalışmada kullanılmayacak fazla hücreleri ileri dönemlerde yaşlanmadan kullanabilmek için dondurularak muhafaza edilmeleri sağlanmıştır. Dondurulacak hücreler 15 ml'lik santrifüj tüplerinde 1200 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmişlerdir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre pelleti tekrar süspanse edilmiştir. Hücreler buz üzerinde hazırlanan (%10) 400 µl DMSO (Dimetil sülfoksit) (Amresco Cat.No: N182), (%40) 1600 µl Human Mesenchymal-LS Expansion Medium ve (%50) 2000 µl FBS (Fetal Bovine Serum) (Gibco Cat.No: 10270106) içeren karışım ile birlikte kriyotüplere aktararak -86°C 'ye kaldırılmışlardır.

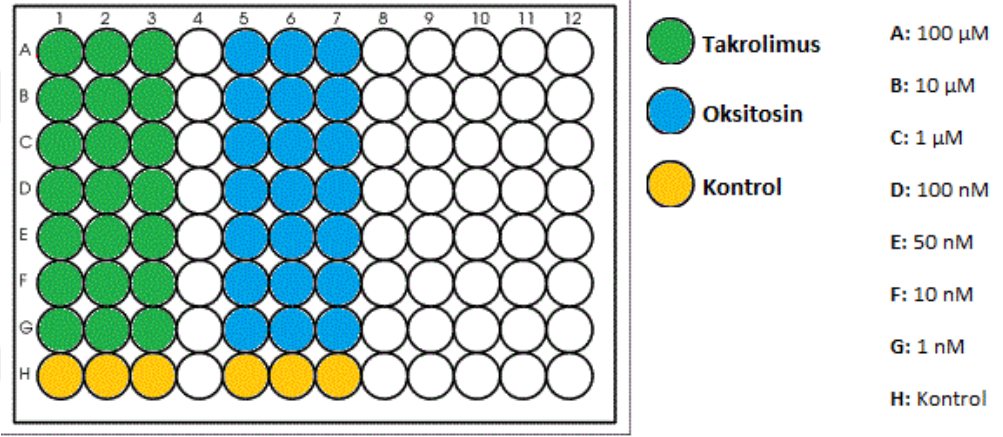
3.2.5. Etken maddenin kullanıma hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan Takrolimus (FK-506 monohydrate $\geq 98\%$ (HPLC)) Sigma (Cat.No: F4679-5MG)'dan temin edilmiştir. Moleküler ağırlığı 822,03 g/mol olan Takrolimus son konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde 1 ml DMSO içinde çözülmüştür. Deneylerde kullanılan diğer etken madde olan oksitosinin moleküler ağırlığı 1007,19 g/mol'dür ve son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde 1 ml ortam içersinde çözülmüştür. Kullanıma hazır hale gelen etken maddelerin çözeltisi insan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelere 1 nM ile 100 µM aralığında uygulanmıştır.

3.3. WST-1 Testi

Hücre proliferasyonu, canlılığı ve sitotoksitesini ölçme amacıyla yapılan WST-1 testinin çalışma prensibi temel olarak; proliferasyona uğrayan hücrelerin artan dehidrojenaz enzim aktivitesi ile tetrazolyumu kullanarak formazan boya üretmesi sonucu görülen renk değişiminin absorbans olarak ELISA okuyucu ya da spektrofotometre ile ölçülmesine dayalıdır. Hücresel enzimler tetrazolyum tuzlarını formazan tuzlarına dönüştürürler. Canlı hücre sayısı arttıkça hücrelerdeki mitokondriyal dehidrojenaz aktivitesi de artar. Enzim aktivitesinin güçlenmesiyle metabolik olarak aktif olan hücrelerin sayısı artar ve dolayısıyla formazan ile boyanan hücre miktarında artış olur. Doksanaltı kuyucuklu plaklara ekilen hücreler

30 dk– 4 saat arası WST-1 ile inkübe edildikten sonra meydana gelen formazan boya miktarı spektrofotometre ile ölçülür. Ölçülen absorbans değeri ne kadar yüksek ise canlı hücre sayısı da o kadar yüksek olur. Doksanaltı kuyucuklu plaklara 1 ml’de 5×10^4 hücre olacak şekilde her kuyucuğa 50 μ l hücre 50 μ l besiyeri hacminde ekim yapılmıştır. Ekilen hücreler 37°C, % 5 CO₂ içeren etüvde 1 gün inkübe edildikten sonra Takrolimus ve oksitosin etken maddeleri 1 nM ile 100 μ M doz aralığında her kuyucukta son hacim 100 μ l olacak şekilde hücreler üzerine eklenmiştir. Etken maddelerin uygulanmadığı son yatay sıradaki hücre grubu kontrol grubu olarak alınmıştır.

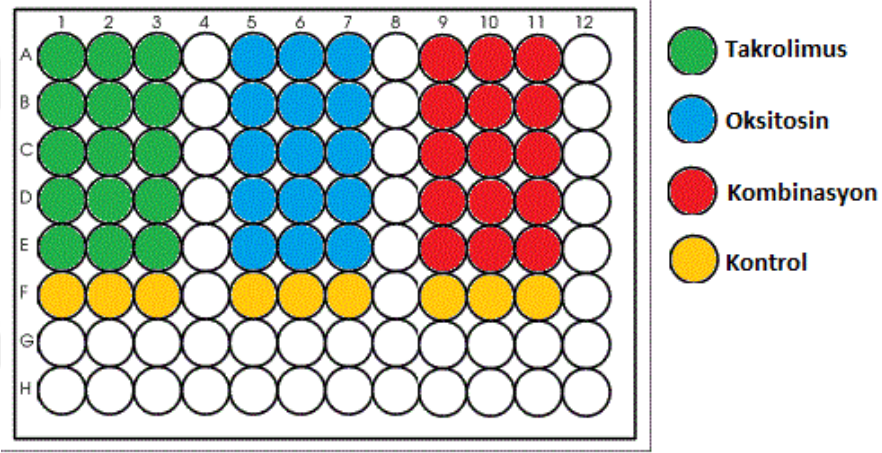


Şekil 16: Wst-1 testi plak planı

Etken maddelerin hücrelere eklendikten sonraki 24., 48. ve 72. saatlerinde her bir kuyucuğa 10 μ l WST-1 solüsyonu (Roche Cat.No: 11644807001) eklenerek 15 dakikada bir Multiskan FC (Thermo) mikropalak okuyucusu kullanılarak formazan boya oluşumu fotometrik olarak ölçülmüştür. Takrolimus ve oksitosin etken maddelerinin insan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler üzerindeki IC₅₀ değeri Graphad Prism 5.0 (Graphad Software, Inc) yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır.

3.4. İzoblogram Analizi

Takrolimus ve oksitosin etken maddelerinin kombinasyonlarının olası sinerjistik, additif, nötral veya antagonistik etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla izoblogram analizi gerçekleştirildi. Doksanaltı kuyucuklu plaklara 1 ml'de 5×10^4 hücre olacak şekilde her kuyucuğa 50 μ l hücre 50 μ l besiyeri hacminde ekim yapılmıştır. Ekilen hücreler 37°C, % 5 CO₂ içeren etüvde 1 gün inkübe edildikten sonra Takrolimus ve oksitosin etken maddelerinin IC₅₀ dozları her kuyucukta son hacim 100 μ l olacak şekilde hücreler üzerine eklenmiştir. Etken maddelerin uygulanmadığı son yatay sıradaki hücre grubu kontrol grubu olarak alınmıştır.



Şekil 17: İzoblogram analizi için plak planı

Takrolimus için;

- A: IC₅₀ x 2
- B: IC₅₀ x 2 x % 80
- C: IC₅₀ x 2 x % 60
- D: IC₅₀ x 2 x % 40
- E: IC₅₀ x 2 x % 20
- F: % 3 DMSO

Oksitosin için;

- A: IC₅₀ x 2
- B: IC₅₀ x 2 x % 80
- C: IC₅₀ x 2 x % 60
- D: IC₅₀ x 2 x % 40
- E: IC₅₀ x 2 x % 20
- F: Ortam

Kombinasyon için;

- A: T (IC₅₀ x 2) + O (IC₅₀ x 2)
- B: T (IC₅₀ x 2 x % 80) + O (IC₅₀ x 2 x % 80)
- C: T (IC₅₀ x 2 x % 60) + O (IC₅₀ x 2 x % 60)
- D: T (IC₅₀ x 2 x % 40) + O (IC₅₀ x 2 x % 40)
- E: T (IC₅₀ x 2 x % 20) + O (IC₅₀ x 2 x % 20)
- F: % 5 DMSO

Etken maddelerin hücelere eklendikten sonraki 24., 48. ve 72. saatlerinde her bir kuyucuğa 10 µl WST-1 solüsyonu eklenerek 15 dakikada bir Multiskan FC (Thermo) mikropalak okuyucusu kullanılarak formazan boya oluşumu fotometrik olarak ölçülmüştür.

3.5. Annexin V Yöntemi ile Apoptoz Analizi

Hücre zarının sitoplazmik yüzünde fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Hücre zarının iç yüzünde bulunan PS molekülleri hücrenin apoptoza gitmesiyle hücre zarının dış yüzüne transloke olmaktadır. Bu yer değıştirme hücre ölümün erken evrelerinde meydana gelmektedir. Anneksin V hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanabilen bir proteindir ve floresan bir madde ile işaretleterek apoptotik hücreyi görünebilir hale getirmektedir.



Şekil 18: Anneksin V'in apoptotik hücelere bağlanma şekli (98)

Apoptoz analizi için 6'lı plağa 1 ml'de 1×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Ertesi gün ekim yapılan hücelere WST-1 tesinde bulunan IC_{50} dozlarında Takrolimus, oksitosin etken maddeleri ve bunların kombinasyonları uygulanmıştır. Madde uygulanması işleminden sonra hüceler $37^{\circ}C$, % 5 CO_2 içeren etüvde 96 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.



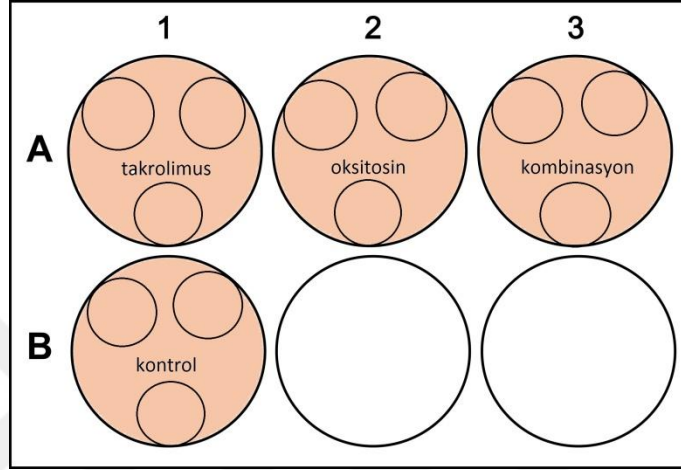
Şekil 19: Apoptoz analizi için deney gruplarının plaktaki yerleşimi

96 saatlik inkübasyon süresi sonunda apoptoz analizinde kullanılmak üzere her bir kuyucuktaki supernatant pipet yardımıyla ayrı ayrı 15'lik falkon tüplere alınmıştır. Plakta yapışık halde bulunan hücrelerin % 0.25'lik tripsin ile 5 dk inkübasyonu sonucu kalkmaları sağlanmıştır. Hücrelerin kalkıp kalkmadıkları mikroskopla kontrol edilmiş ve kalkan hücreler daha önceden supernatantların alındığı 15'lik falkon tüplerine eklenmiştir. 15'lik falkon tüplerinde bulunan dört grup hücre 1000 rpm'da 7 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında supernatantı uzaklaştırılarak PBS (Phosphate Buffered Saline, Fosfat Dengeli Tuz Solüsyonu) eklenilen hücreler 3-4 sn vortekslenmişlerdir. Dört deney grubu için kullanılacak olan mikrosantrifüj tüplerine 10 µl Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit (MILLIPORE, Cat. No: MCH100105) ve 10µl hücre eklenerek oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 20 dk beklemeleri sağlanmıştır. Bekleme süresi sonunda mikrosantrifüj tüplerinin kapakları kesilmiş ve sırasıyla Muse® Cell Analyzer kullanılarak erken-geç apoptoz, total apoptoz ve ölü hücre sayıları hesaplanmıştır.

3.6. İmmünofloresan Boyama

İmmünofloresan boyama için 6'lı plağa 1 ml'de 6×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Öncelikle kullanılacak olan her kuyucuğa 3 yuvarlak lamel koyulmuştur. Her lamele 200 µl hücre eklendikten sonra sarsmadan inkübatöre alınmıştır. İki saat sonra hücrelerin yapışma durumları kontrol edilerek her bir kuyucuk üzerine yaklaşık 1-2 ml besiyeri eklenilerek 24 saat beklemek üzere

inkübatöre kaldırılmıştır. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda besiyeri uzaklaştırılmış ve WST-1 testinde Takrolimus ve oksitosin için bulunan IC₅₀ dozları ve bunların kombinasyonları hücrelere uygulanmıştır. Kontrol grubunda bulunan hücrelere sadece taze besiyeri eklenmiştir. Daha sonraki aşamalar için hücreler 37°C, % 5 CO₂ içeren etüvde 96 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 20: İmmünofloresan boyama için deney gruplarının plak üzerindeki yerleşim planı

96 saatlik inkübasyon süresi sonunda besiyeri uzaklaştırılmış ve hücreler PBS solüsyonu ile 3 kez 2-3 defa bekletilerek yıkanmıştır. Her kuyucuğa %4 paraformaldehit eklenerek fiksasyonu sağlamak amacıyla oda sıcaklığında 20-30 dk bekletilmiştir. Paraformaldehiti çektikten sonra PBS solüsyonu ile 3 kez 2-3 dk bekleterek yıkama yapılmıştır. Hücreler 5 dk % 0.25 Triton X-100'lü PBS'te bekletildikten sonra 30 dk % 1'lik BSA [(blok solüsyon)(Super Block, Cat.No: UHP125)]'da bekletilmiştir. Blok solüsyon yıkamadan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikor olan Ki-67 (Santa Cruz Biotechnology, Cat. No: sc-15402) eklenmiştir. Daha sonra +4 °C'de nemli ortamda 1 gece inkübasyonu sağlanmıştır. Ertesi gün PBS ile 3 kez 2-3 dk bekleterek yıkandıktan sonra floresan işaretli sekonder antikor olan anti-vimentin Vim-3B4 (abcam, Cat. No: ab28028) ile 1 saat +4 °C' de nemli ortamda inkübasyonu sağlanmıştır. PBS ile 3 kez 2-3 dk bekleterek yıkandıktan sonra hazır DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) gömme ortamı damlatılmış ve lameller lam üzerine kapatılarak mikroskop görüntüleri alınmıştır.

3.7. Oksidatif Stres Analiz Parametreleri

Oksidatif stres ile birlikte oluşan ve reaktif oksijen metabolitleri lipid, protein ve DNA gibi hücre bileşenlerine zarar vermektedirler.

3.7.1. Lipid Peroksidasyonu (MDA) Ölçümü

Yağ asitlerinin oksidasyonu reaktif bir radikal tarafından yağ asitlerinin metilen gruplarından bir hidrojen atomunun koparılması ile başlar. Karbon merkezli radikal oluşması ve daha sonra moleküler oksijenin bağlanması ile lipid hidroperoksitleri meydana gelir. Lipid hidroperoksitleri, lipid peroksidasyonunun erken aşamasını oluşturur. Lipid hidroperoksitlerinin yıkımı ile de biyoaktif aldehitler oluşur. Bunlardan başlıcaları malondialdehit (MDA) ve hidroksialkenaller (örn. 4-OH-nonenal)'dir. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilir, ya da diffüze olarak diğer hücrelerde hasar yaratırlar.

Lipid peroksidasyonu ölçümü için Lipid Peroxidation (MDA) Colorimetric/Fluorometric Assay Kit (BioVision, Cat. No: K739-100) kullanılmıştır ve firmanın önerdiği prosedüre bağlı kalınmıştır.

Buz üzerindeki 1×10^6 sayıdaki hücre 300 μ l MDA Lysis Buffer ve 3 μ l BHT (X100) ile homojenize edildikten sonra 13000 g' de 10 dk santrifüjlenmiştir. 0.1 M MDA solüsyonu hazırlamak için 10 μ l MDA standard 407 μ l distile su ile dilüe edilmiştir. Sonrasında 2 mM MDA standard hazırlamak için 20 μ l 0.1 M MDA solüsyonu 980 μ l distile su ile dilüe edilmiştir. Kolorimetrik analizler için mikrosantrifüj tüplerine 2 mM'lık MDA standart'tan 0,2,4,6,8,10 μ l konularak son volüm 200 μ l olacak şekilde distile su eklenmiş ve 0,4,8,12,16 ve 20 nmol standard elde edilmiştir. Florometrik analizler için 2 mM MDA standard 10 kez dilüe edilmiştir. Daha sonra mikrosantrifüj tüplerine 0, 2, 4, 6, 8, 10 μ l 0.2 mM MDA standard ve son hacim 200 μ l olacak şekilde distile su eklenerek 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 ve 2.0 nmol Standard oluşturulmuştur. Gelişim aşamasında standart ve örneklerin bulunduğu her viyal'e 600 μ l TBA eklenerek 95°C'de 60 dk inkübasyonu sağlanmıştır. Örnekler oda sıcaklığına getirilmek için 10 dk buz üzerinde soğutulduktan sonra 200 μ l'si pipetlenerek 96 kuyucuklu plağa eklenmiştir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0 mμ MDA	2 mμ MDA	4 mμ MDA	6 mμ MDA	8 mμ MDA	10 mμ MDA						
B	0 mμ MDA	2 mμ MDA	4 mμ MDA	6 mμ MDA	8 mμ MDA	10 mμ MDA						
C	T	O	Komb	Knt								
D	T	O	Komb	Knt								
E												
F												
G												
H												

Şekil 21: Lipid Peroksidasyonu ölçümü için hazırlanan plak yerleşim planı

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

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

3.7.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Ölçümü

Tetramerik bir enzim olan glutasyon peroksidaz sitozolde bulunur ve yapısında dört selenyum (Se) atomu yer alır. Hidrojen peroksit ile hidroperoksitlerin indirgenmesini sağlayarak zar fosfolipitlerinden, fosfolipaz A2 tarafından salınan lipid hidroperoksitlere etki eder. Fagositik hücrelerde önemli bir fonksiyonu vardır. Solunum patlaması sırasında serbest radikal hasarı sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller. GSH-Px aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksit birikmesine ve hücre hasarına yol açar. GSH-Px, hem lipid peroksidasyonunun başlamasını önler, hem de lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid hidroperoksitlerin metabolizmasını sağlar. Glutasyon peroksidaz ölçümü için Glutathione Peroxidase Activity Colorimetric Assay Kit (BioVision, Cat. No: K762-100) kullanılmıştır ve firmanın önerdiği prosedüre bağlı kalınmıştır.

Buz üzerindeki 1×10^6 sayıdaki hücre 0.2 ml soğuk Assay Buffer ile homojenize edildikten sonra 4°C’de 15 dk 10.000 g’de santrifüjlenmiştir. Test için toplanan süpernatant buz üzerinde bekletilmiştir. Örnekler -80°C’de saklanmıştır.

Örneklerin 2-50 µl'si 96 kuyucuklu plağa ekildikten sonra son volüm 50 µl olacak şekilde Assay Buffer eklenmiştir.

NADPH standart eğrisi için 1 mM NADPH standart oluşturmak amacıyla 40 mM NADPH solüsyonun 25 µl'si 975 µl distile su ile dilüe edilmiştir. 1 mM NADPH'nin 0, 20, 40, 60, 80, 100 µl'si kuyucukta 0, 20, 40, 60, 80, 100 nmol standart oluşturmak üzere 96 kuyucuklu plağa eklenmiştir. Son volüm 100 µl olacak şekilde Assay Buffer eklendikten sonra 340 nm' de ölçümleri yapılmıştır.

Pozitif kontrol için 5- 10 µl GPx Positive Control istenen kuyucuklara eklendikten sonra Assay Buffer ile son volüm 50 µl'ye tamamlanmıştır. Reaktif kontrolü için ise 50 µl Assay Buffer eklenmiştir.

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

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0 mµ NADPH	20 mµ NADPH	40 mµ NADPH	60 mµ NADPH	80 mµ NADPH	100 mµ NADPH						
B	0 mµ NADPH	20 mµ NADPH	40 mµ NADPH	60 mµ NADPH	80 mµ NADPH	100 mµ NADPH						
C	T	O	Komb	Knt	PC	NC						
D	T	O	Komb	Knt	PC	NC						
E												
F												
G												
H												

Şekil 22: Glutatyon Peroksidaz ölçümü için hazırlanan plak yerleşim planı

Hesaplama $GPx \text{ Aktivitesi} = \frac{B}{(T_2 - T_1) \times V} \times \text{Örnek Dilüsyonu} = nmol/dk/ml$
 $= mU/mL$ formülü ile yapılmıştır. (B: T₁ ve T₂ arasında nmol'deki azalan NADPH

miktarı, **T₁**: İlk örneğin dk'daki ilk okunma anı, **T₂**: İkinci örneğin dk'daki ikinci okunması, **V**: Reaksiyon kuyucuğunda ml'deki işlenmiş örnek volümü)

3.7.3. Katalaz (CAT) Aktivitesi Ölçümü

Peroksizomlarda ve sitozolde bulunan ve yapısında hem içeren bir protein olan katalaz, H₂O₂'in moleküler oksijen ve suya çevrilmesini katalizlemektedir. Katalaz metil hidroperoksit ve etil hidroperoksit gibi küçük moleküllerin indirgenmesini de sağlayabilir, ancak büyük molekül ağırlıklı lipid hidroperoksitlere karşı etki göstermez.

Katalaz aktivitesini ölçmek için Catalase Activity Colorimetric/Fluorometric Assay Kit (BioVision, Cat. No: K773-100) kullanılmıştır ve firmanın önerdiği prosedüre bağlı kalınmıştır.

Buz üzerindeki 1x10⁶ sayıdaki hücre 0.2 ml soğuk Assay Buffer ile homojenize edildikten sonra 4°C'de 15 dk 10.000 g'de santrifüjlenmiştir. Test için toplanan süpernatant buz üzerinde bekletilmiştir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0µl (H ₂ O ₂)	2µl (H ₂ O ₂)	4µl (H ₂ O ₂)	6µl (H ₂ O ₂)	8µl (H ₂ O ₂)	10µl (H ₂ O ₂)						
B	T	O	Komb	Knt								
C	T (HC)	O (HC)	Komb (HC)	Knt (HC)								
D												
E												
F												
G												
H												

Şekil 23: Katalaz aktivitesi ölçümü için hazırlanan plak yerleşim planı

2 - 78 µl örnek veya 1 - 5 µl Pozitive Control Solution her bir kuyucuğa eklenerek son volüm 78 µl olacak şekilde Assay Buffer ile tamamlanmıştır. High Control için de aynı miktarda örnek farklı kuyucuklar için hazırlanarak son volüm

78 µl olacak şekilde Assay Buffer ile tamamlanmıştır. HC grubundaki örnekler 10 µl Stop Solution eklenerek karıştırılmış ve örneklerdeki katalaz aktivitesinin tamamen durması için 25°C’de 5 dk inkübe edilmiştir.

H₂O₂ Standart Eğrisi oluşturmak amacıyla 20 mM H₂O₂ için 0.88 M H₂O₂’nin 5 µl’si 215 µl su ile dilüe edilmiştir. Daha sonra 1 mM H₂O₂ için 20 mM H₂O₂’nin 50 µl’si 0.95 ml distile su ile dilüe edilmiştir. 1 mM H₂O₂ solüsyonun 0, 2, 4, 6, 8, 10 µl’si 0, 2, 4, 6, 8, 10 nmol/kuyucuk olmak üzere 96 kuyucuklu plağa ekilmiştir. Son volüm Assay Buffer ile birlikte 90 µl’ye getirildikten sonra her kuyucuğa 10 µl stop solüsyonu eklenmiştir.

Katalaz reaksiyonunu başlatmak için tüm örneklerin ve HC grubundaki örneklerin bulunduğu kuyucuklara 12 µl taze 1 mM H₂O₂ eklenmiştir. Örnekler 25°C’de 30 dk inkübe edildikten sonra reaksiyonu durdurmak için tüm kuyucuklara 10 µl Stop Solüsyonu eklenmiştir.

Her kuyucuk için 46 µl Assay Buffer, 2 µl OxiRed™ Probe, 2 µl HRP solüsyon’dan oluşan 50 µl’lik büyüme karışımı hazırlanmıştır. Her bir örneğe 50 µl büyüme karışımı eklendikten sonra 25°C’de 10 dk inkübe edilmişlerdir. Plak okuyucuda 570 nm’de okutulmuşlardır.

Hesaplama **Katalaz Aktivitesi** = $\frac{B}{30 \times V} \times \text{Örnek Dilüsyon Faktörü} = \text{nmol/dk/ml} = \text{mU/mL}$ formülü ile yapılmıştır. (B: H₂O₂ Standart Eğri’sinden çözünmüş H₂O₂ miktarı, V: Reaksiyon kuyucuklarına eklenen ml’deki işlem görmüş örnek volümü 30: Reaksiyonun 30. dk’sı)

3.7.4. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Ölçümü

Aerobik tüm hücreler SOD içermektedirler. Hem sitozol, hem de mitokondrilerde bulunan bu enzim süperoksit radikallerini etkisizleştirerek, hücreleri süperoksit radikalının zararlı etkilerinden korur. Dokularda oksijen basıncının (pO₂) yükselmesi ile SOD aktivitesi artar. Enzim fagosite edilmiş bakterilerin intraselüler olarak öldürülmesinde rol oynar ve granülosit fonksiyonu için önemlidir. İçeriğindeki metal iyonuna göre sitozolik dimerik Cu, Zn-SOD ve mitokondriyal tetramerik Mn-SOD olarak adlandırılır.

Süperoksit dismutaz aktivitesini ölçmek için Superoxide Dismutase (SOD) Activity Assay Kit (BioVision, Cat. No: K335-100) kullanılmıştır ve firmanın önerdiği prosedüre bağlı kalınmıştır.

Homojenize hale getirilmiş hücreler 4°C’de 5 dk 14000 g’de santrifüjlendikten sonra hücre debris atılmıştır.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Boşluk1	T	O	Komb	Knt	T2 Boşluk2	O2 Boşluk2	Komb2 Boşluk2	Knt2 Boşluk2	Boşluk3		
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Şekil 24: Süperoksit dismutaz aktivitesi ölçümü için hazırlanan plak yerleşim planı

(Örnek= Takrolimus: T, Oksitosin: O, Kombinasyon: Komb, Kontrol: Knt, Boşluk2= T2, O2, Komb2, Knt2)

1. Örneklerin bulunduğu kuyucuklara ve boşluk 2'lere 20 µl Sample Solution, boşluk 1 ve boşluk 3'e 20 µl ddH₂O eklenmiştir.
2. Her kuyucuğa 200 µl WST Working Solution eklenmiştir.
3. Boşluk 2'lere ve boşluk 3'e 20 µl Dilution Buffer eklenmiştir.
4. Örneklerin bulunduğu kuyucuğa ve boşluk 1'e 20 µl Enzyme Working Solution eş zamanlı olarak eklenmiştir.
5. Plak 37°C’de 20 dk inkübe edilmiştir.
6. Örnekler mikropalak okuyucuda 450 nm’de okutulmuştur.

$$\text{Hesaplama } \textbf{SOD Aktivitesi} = \frac{(\text{Aboşluk1}-\text{Aboşluk3})-(\text{Aörnek}-\text{Aboşluk2})}{(\text{Aboşluk1}-\text{Aboşluk3})} \times 100$$

formülü ile yapılmıştır.

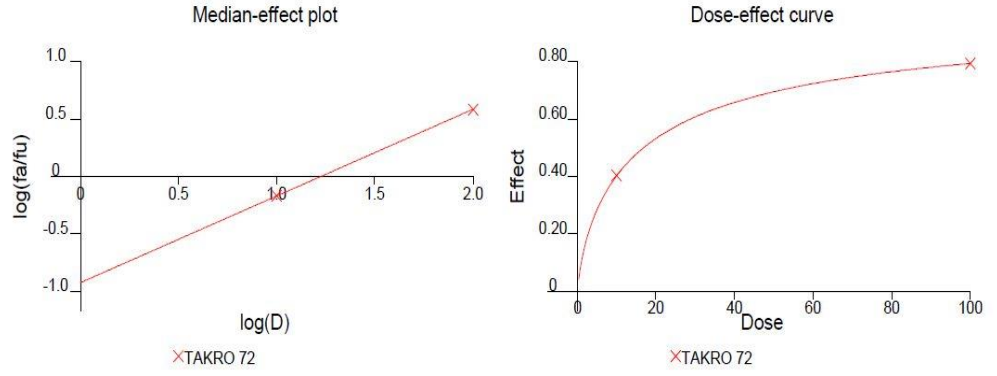
3.8. İstatistiksel Değerlendirme Yöntemi

Muse cell analyzer ile elde edilen ölü hücre yüzdesi, apoptoz/ölü hücre yüzdesi, erken apoptoz yüzdesi, canlı yüzde hücresi, elisa plate ile okutması yapılan Katalaz aktivitesi, SOD (% inhibisyon), MDA, GPx için her gruba ait veriler Microsoft Office Excel 2010 versiyonu üzerine yazılarak, IBM SPSS 20.00 Statistics (Statistical Package for Social Sciences) programında oluşturulan veri tabanına aktarıldı ve istatistiksel analizler aynı program ile yapılmıştır. Sürekli değişkenlere ait; ortalama, standart sapma ve hata, minimum ve maksimum değerleri ve ortalamalar için %95 güven aralıkları sunulmuştur. Tek yönlü varyans analizi kullanılarak deney grupları karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmalar tekrarlar arası değişkenlik olan gruplar üzerinde yapılmıştır. Çoklu karşılaştırmalar sonrası grupların ikili analizi için Bonferroni Yöntemi kullanılmıştır. Değişkenliğin olmadığı grupların diğer gruplar ile karşılaştırmaları, değişkenliğin olduğu gruplarda varyans analizinde elde edilen güven aralıkları üzerinde yapılmıştır. Tüm hipotez kontrolleri 0,05 önem seviyesinde gerçekleştirilmiş, yani $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

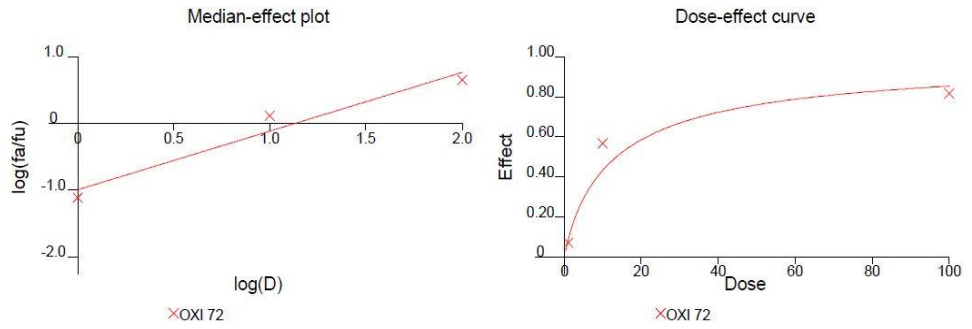
4.BULGULAR

4.1. Takrolimus (FK506) ve Oksitosinin İnsan ADKH Hattının Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi

Takrolimus ve oksitosin etken maddelerinin insan ADKH hattı üzerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla üç gün ve üç tekrarlı olacak şekilde kurulan WST-1 testi kullanılmıştır. Takrolimus ve oksitosin etken maddelerinin insan ADKH'lerinin proliferasyonunu yüzde elli oranında inhibe eden dozu yani IC_{50} değeri GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc) yazılımı kullanılarak 72. saatte sırasıyla 17.44 μM ve 13.43 μM olarak bulunmuştur.



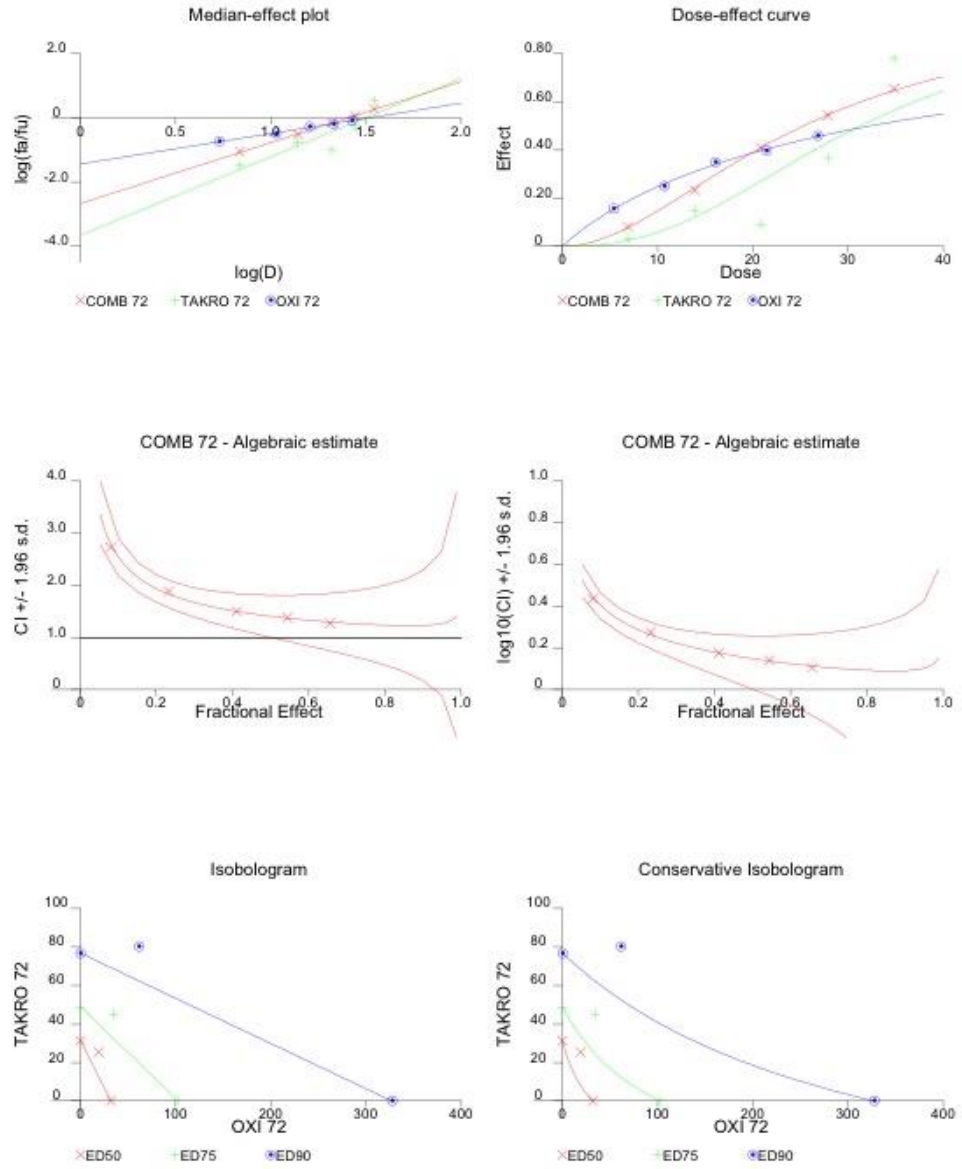
Grafik 1: ADKH' lerinde Takrolimusun IC_{50} dozu



Grafik 2: ADKH' lerinde oksitosinin IC_{50} dozu

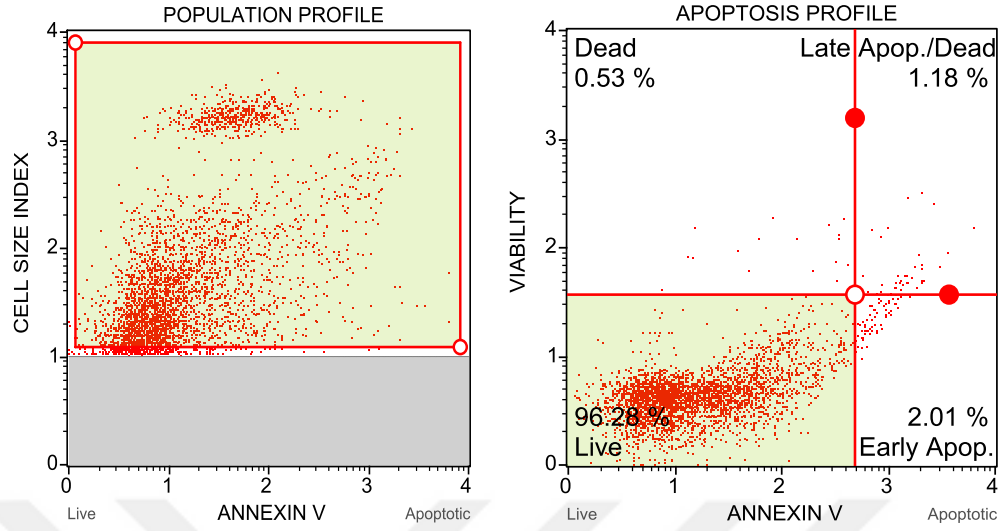
4.2. İzobologram Analizi

Takrolimus ve oksitosin etken maddelerinin IC_{50} değerleri baz alınarak yapılan izobologram analizinin kombinasyon değerleri sonucunda iki maddenin de antagonistik etki gösterdiği gözlemlenmiştir.

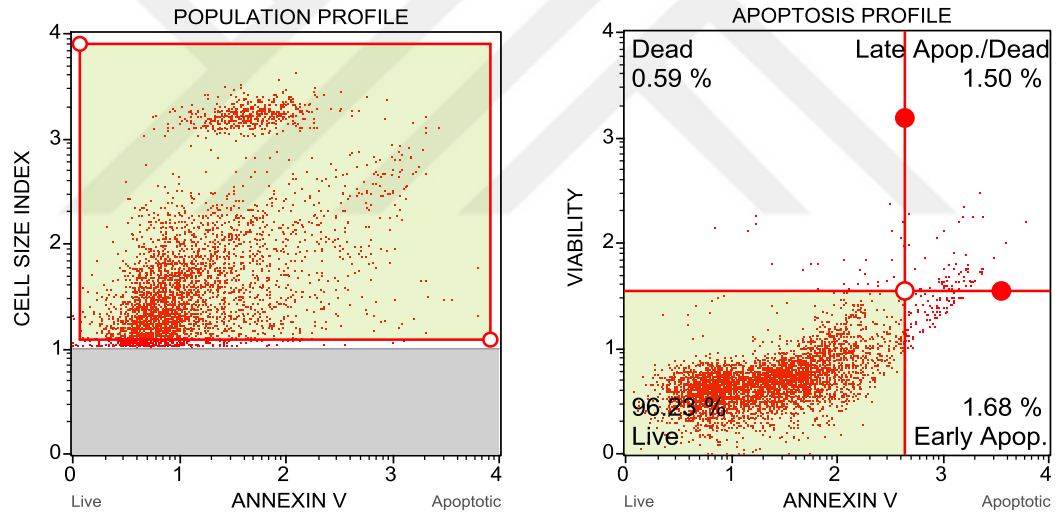


Grafik 3: Takrolimus ve oksitosinin 72. saatteki IC_{50} değeri baz alınarak kurulan izobologram analizi bulgusu

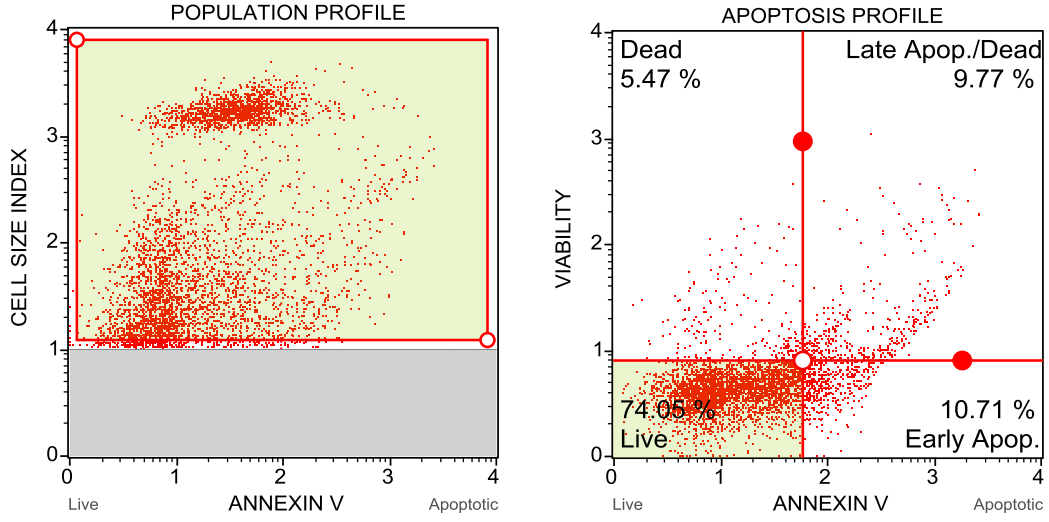
4.3. Annexin V Yöntemi ile Yapılan Apoptoz Analizi Bulguları



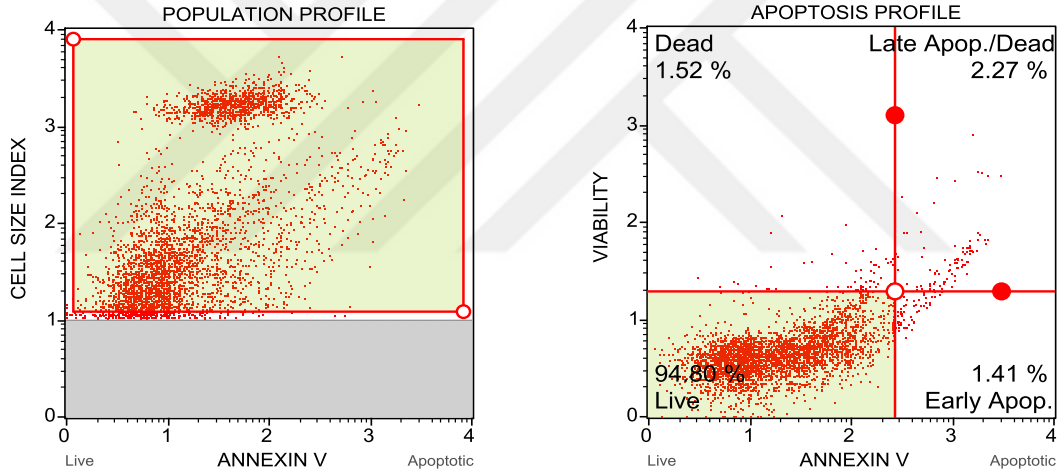
Grafik 4: Kontrol grubunda Muse analiz sonuçları.



Grafik 5: Oksitosin grubunda Muse analiz sonuçları.



Grafik 6: Takrolimus grubunda Muse analizler sonuçları.



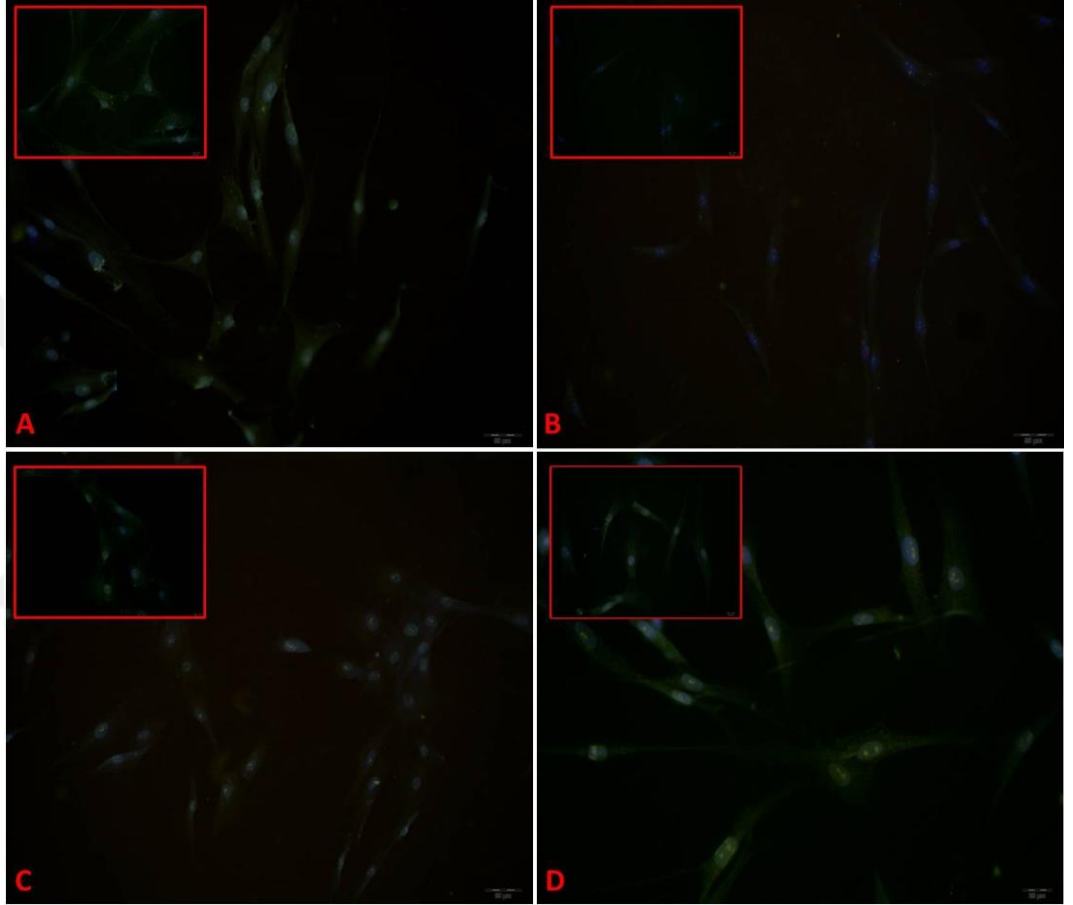
Grafik 7: Kombine grup (Oksitosin + Takrolimus) grupta Muse analizler sonuçları.

Muse® Cell Analyzer ile yapılan ölçümler ve yapılan hesaplamalar doğrultusunda etken maddeye maruz kalmayan kontrol grubundaki hücrelerde %2.01 oranında erken apoptoz, %1.18 oranında geç apoptoz görülürken ölü hücre yüzdesi 0.53, canlı hücre yüzdesi 96.28 olarak hesaplanmıştır. Oksitosin grubundaki hücrelerde %1.68 oranında erken apoptoz, %1.50 oranında geç apoptoz görülürken ölü hücre yüzdesi 0.59, canlı hücre yüzdesi 96.23 olarak hesaplanmıştır. Takrolimus grubunda erken apoptoz oranı %10.71'e, geç apoptoz oranı %9.77'ye yükselirken ölü hücre yüzdesi 5.47, canlı hücre yüzdesi 74.05 olarak hesaplanmıştır. Takrolimus

+ Oksitosin kombine grup sonuçlarında ise erken apoptoz oranı %1.41, geç apoptoz oranı %2.27, ölü hücre yüzdesi 1.52, canlı hücre yüzdesi 94.80 olarak ölçülmüştür.

4.4. İmmüno Floresan Boyama Bulguları

4.4.1. Ki-67 Boyaması

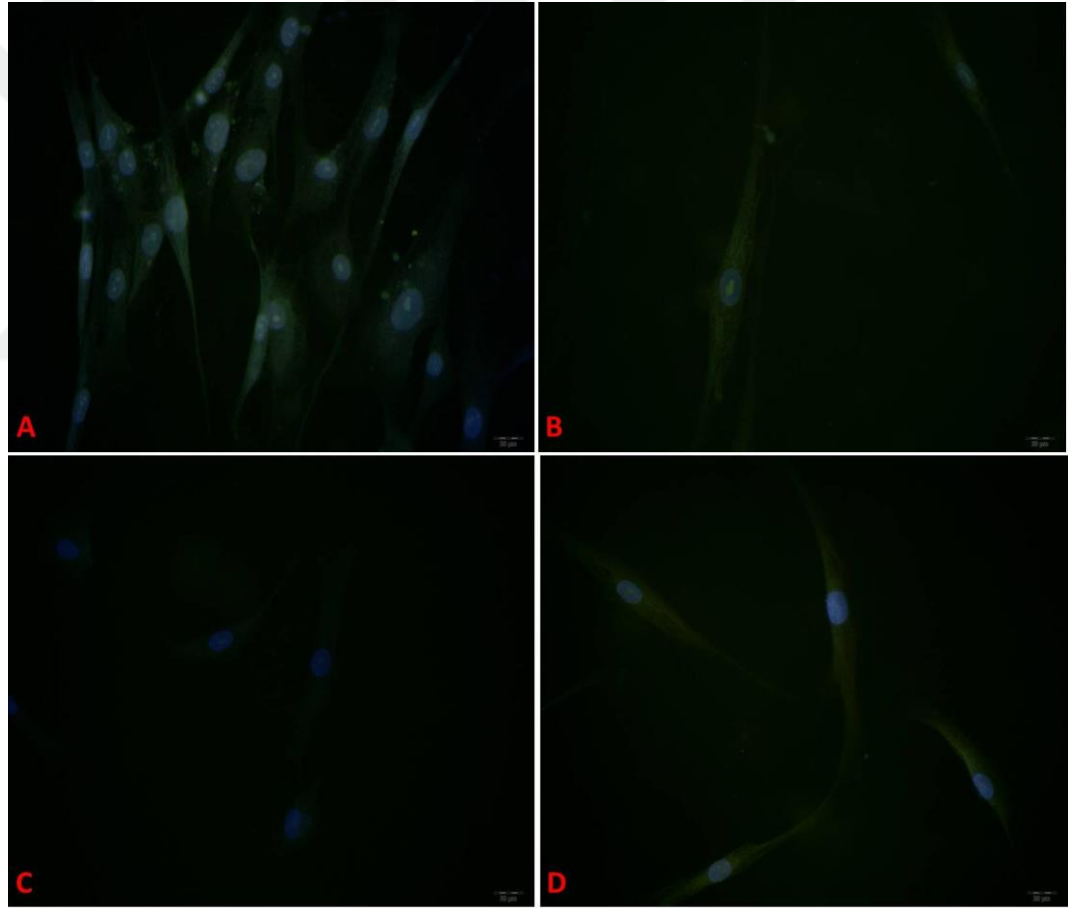


Şekil 25: Anti-Ki-67 boyaması. **A.** Kontrol grubu **B.** Takrolimus grubu **C.** Oksitosin grubu **D.** Kombine grup

Ki-67 boyamasında kontrol grubu incelendiğinde hücre hattında bölünmeye ilişkin bulguların varlığı saptanmıştır. Hücre morfolojilerinin normal yapıda olduğu görülmüştür. Ki-67 antijeni nükleusta da eksprese olduğu için nükleus boyası olan DAPI nin mavi rengi yerine beyaza yakın bir renkte bulunması Ki-67 ekspresyonu olarak kabul edilmiştir. Takrolimus grubunda hücre sayısı kontrolle karşılaştırıldığında daha az sayıdadır. Hücre morfolojilerinde incelme ve içi bir

görünüm hakimdir. Hücre nükleuslarında DAPI boyasının rengi olan mavinin bulunması Ki-67 antijeni eksprese etmediği ya da düşük seviyede ettiği olarak kabul edilmiştir. Oksitosin grubunda hücre sayısının kontrol grubuna benzerdir. Bazı hücrelerin morfolojilerinin değiştiği gözlemlenmiştir. Ki-67 antijeni açısından yüksek seviyede bir ekspresyon mevcuttur. Kombinasyon grubunda hücre morfolojilerinin kontrol grubuna benzemekle birlikte az sayıda hücrede oksitosin grubunda görülen hücresel morfolojik değişiklik gösteren hücre toplulukları gözlemlenmiştir. Hücrelerin sayı ve yapı olarak iyi durumda oldukları saptanmış ve Ki-67 ekspresyonu yüksek olarak gözlemlenmiştir.

4.4.2. Vimentin Boyaması



Şekil 26: Anti-Vimentin boyaması. **A.** Kontrol grubu **B.** Takrolimus grubu **C.** Oksitosin grubu **D.** Kombine grup

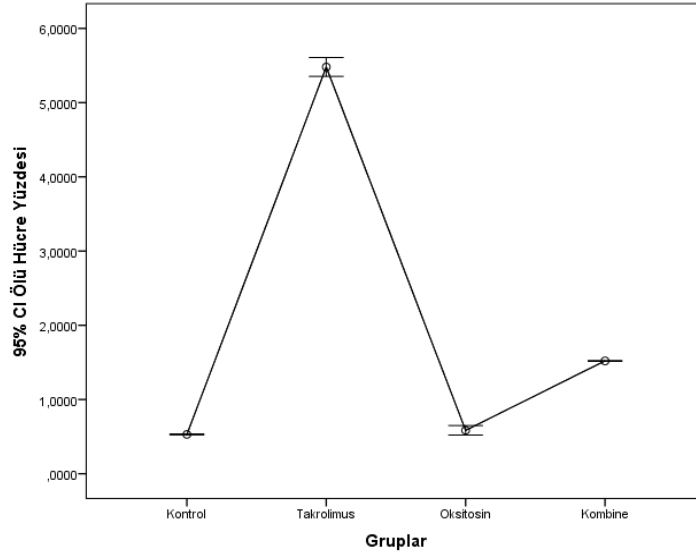
Kontrol grubunda vimentin sitoplazma içinde homojen olarak dağılım göstermektedir. Takrolimus grubunda dikkat çekici olarak kontrol grubunda görülen

ekspresyondan daha az bir ekspresyon varlığı görülmektedir. Bu gruba ait hücrelerde vimentinin homojen olarak dağılmadığı perinükleer alanda belli bölgelerde yoğunlaşma gösterdiği ve kısa küt olarak boyama göstermektedir. Oksitosin grubunda vimentin immunoekspresyonun azalma göstermesi oldukça dikkat çekici bir bulgu olarak saptanmıştır. Kombine gruptaki görünüm büyük oranda kontrol grubuna benzer olarak saptandı. Az sayıda bir hücre popülasyonunda ise Takrolimus grubuna benzer bir görünüm vermektedir. Vimentin ekspresyonu yoğun olarak gözlemlenmektedir. Hücre içi kısa küt vimentin (+) alanlar saptansa da yoğunlukla kontrol grubu benzeri bir görüntü mevcuttur.



4.5. Hücre Canlılık Analizlerinin İstatiksel Değerlendirilmesi

4.5.1. Ölü Hücre Yüzdesi

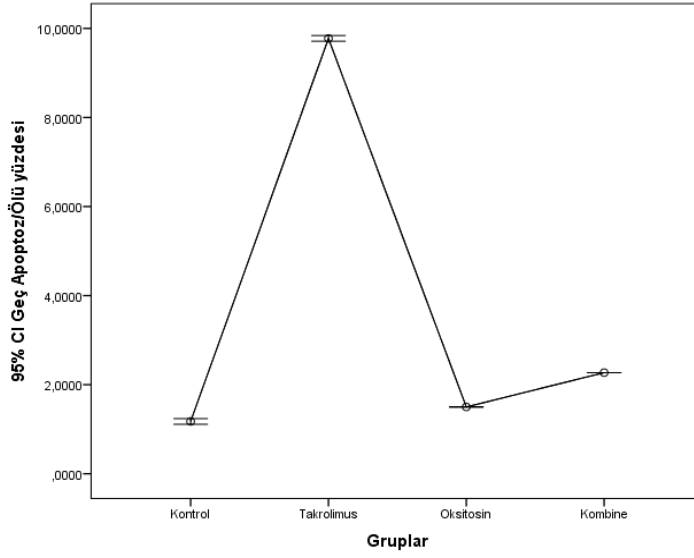


Grafik 8: Ölü hücre yüzdesi istatistiksel grafiği. 0,05 önem seviyesinde, gruplar arasında ikili farkların tümü istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında oksitosinin etkisi de anlamlıdır. Kombine gruptaki ölü hücre yüzdesi kontrol ve oksitosin grubuna göre farklı olmakla birlikte yakındır.

Tablo 5: Ölü hücre yüzdesi istatistiksel tablosu

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	2	,529500	,0007071	,0005000	,523147	,535853	,5290	,5300
Takrolimus	2	5,480000	,0141421	,0100000	5,352938	5,607062	5,4700	5,4900
Oksitosin	2	,585000	,0070711	,0050000	,521469	,648531	,5800	,5900
Total	6	2,198167	2,5422282	1,0378603	-,469738	4,866072	,5290	5,4900

4.5.2. Geç Apoptoz/Ölü yüzdesi

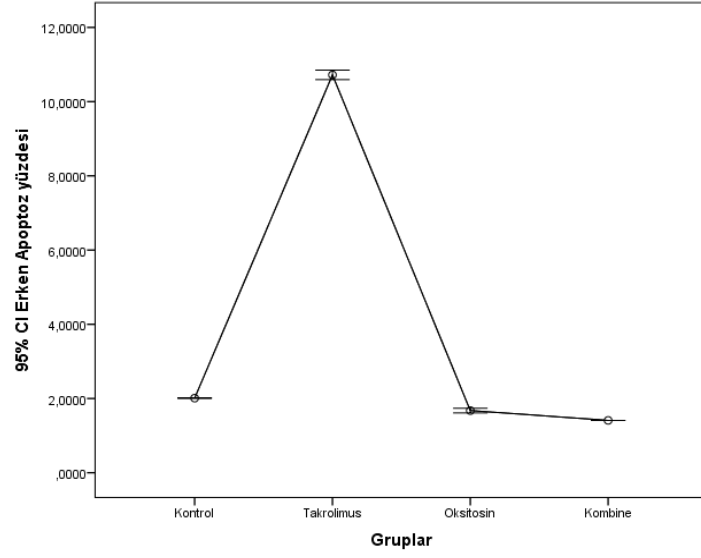


Grafik 9: Geç apoptoz/ölü yüzdesi istatistiksel grafiği. 0,05 önem seviyesinde, Kontrol ve Takrolimus grupları istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$) anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,05$). Geç apoptoz/ölü hücre yüzdesi oranı kombine grupta kontrol ve oksitosin grubuna yakındır.

Tablo 6: Geç apoptoz / ölü yüzdesi istatistiksel tablosu

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	2	1,175000	,0070711	,0050000	1,111469	1,238531	1,1700	1,1800
Takrolimus	2	9,775000	,0070711	,0050000	9,711469	9,838531	9,7700	9,7800
Total	4	5,475000	4,9652157	2,4826078	-2,425766	13,375766	1,1700	9,7800

4.5.3. Erken Apoptoz yüzdesi

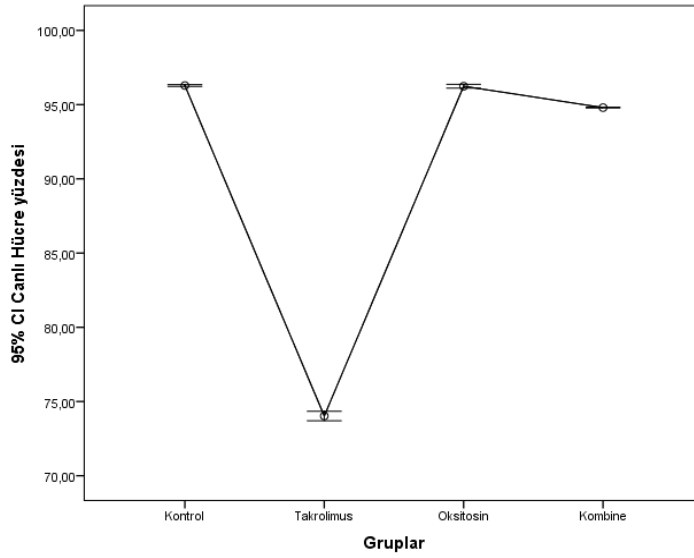


Grafik 10: Erken apoptoz yüzdesi istatistiksel grafiği 0,05 önem seviyesinde, gruplar arasında ikili farkların tümü istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında oksitosinin etkisi de anlamlıdır. Kombine grupta oksitosinin etkisi Takrolimusun etkisini minimize etmiştir.

Tablo 7: Erken apoptoz yüzdesi istatistiksel tablosu

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	2	2,010500	,0007071	,0005000	2,004147	2,016853	2,0100	2,0110
Takrolimus	2	10,720000	,0141421	,0100000	10,592938	10,847062	10,7100	10,7300
Oksitosin	2	1,675000	,0070711	,0050000	1,611469	1,738531	1,6700	1,6800
Total	6	4,801833	4,5866524	1,8724930	-,011563	9,615230	1,6700	10,7300

4.5.4. Canlı Hücre Yüzdesi



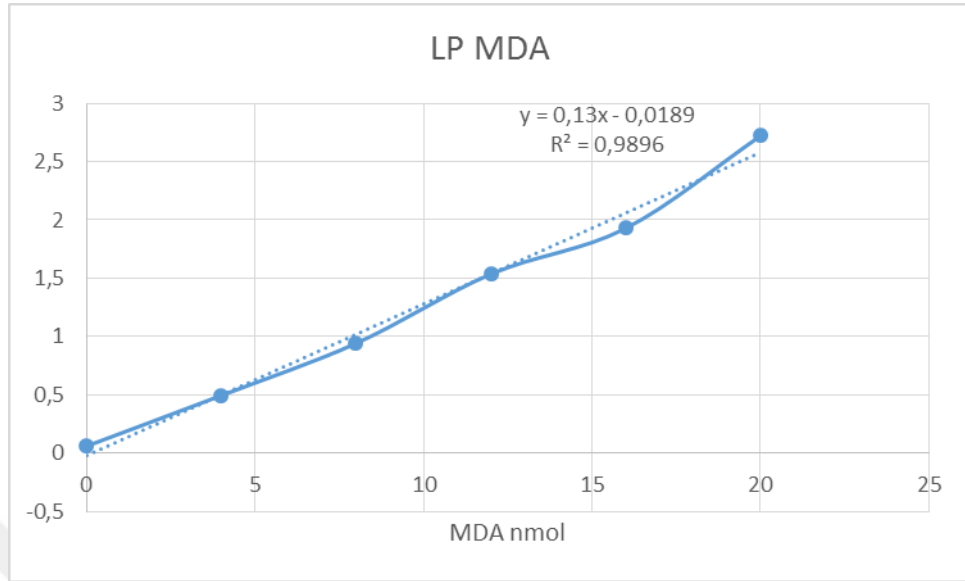
Grafik 11: Canlı hücre yüzdesi istatistiksel grafiği. Canlı hücre yüzdesi açısından 0,05 önem seviyesinde, gruplar arasında ikili farkların tümü istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında oksitosinin etkisi de anlamlıdır. Kombine grupta oksitosinin etkisi Takrolimusun etkisini minimize etmiştir. En az canlı hücre Takrolimus grubunda gözlemlenmiştir.

Tablo 8: Canlı hücre yüzdesi istatistiksel tablosu

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	2	96,2850	,00707	,00500	96,2215	96,3485	96,28	96,29
Takrolimus	2	74,0250	,03536	,02500	73,7073	74,3427	74,00	74,05
Oksitosin	2	96,2400	,01414	,01000	96,1129	96,3671	96,23	96,25
Total	6	88,8500	11,48343	4,68809	76,7989	100,9011	74,00	96,29

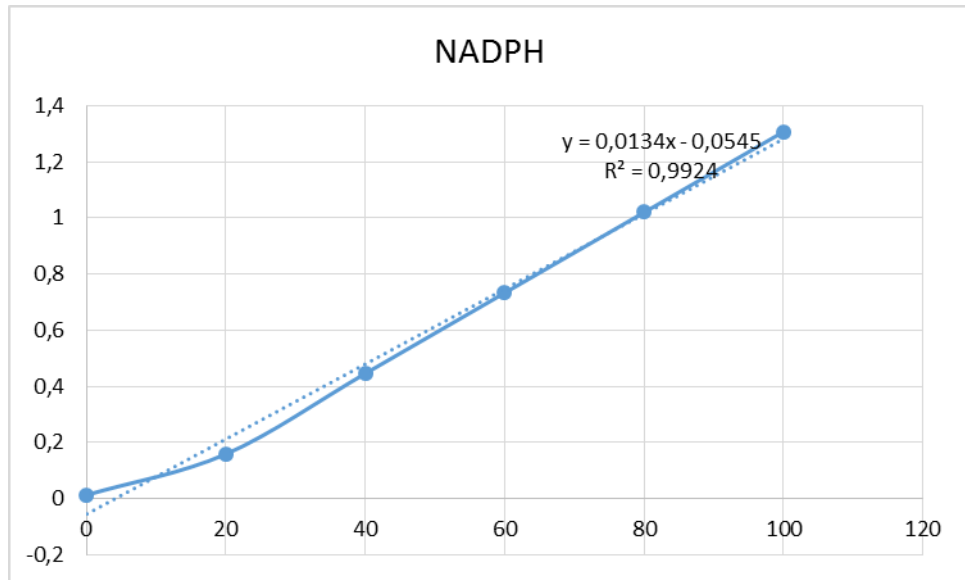
4.6. Oksidatif Stres Analiz Parametreleri Bulguları

4.6.1. Lipid Peroksidasyonu (MDA) Ölçümü Bulgusu



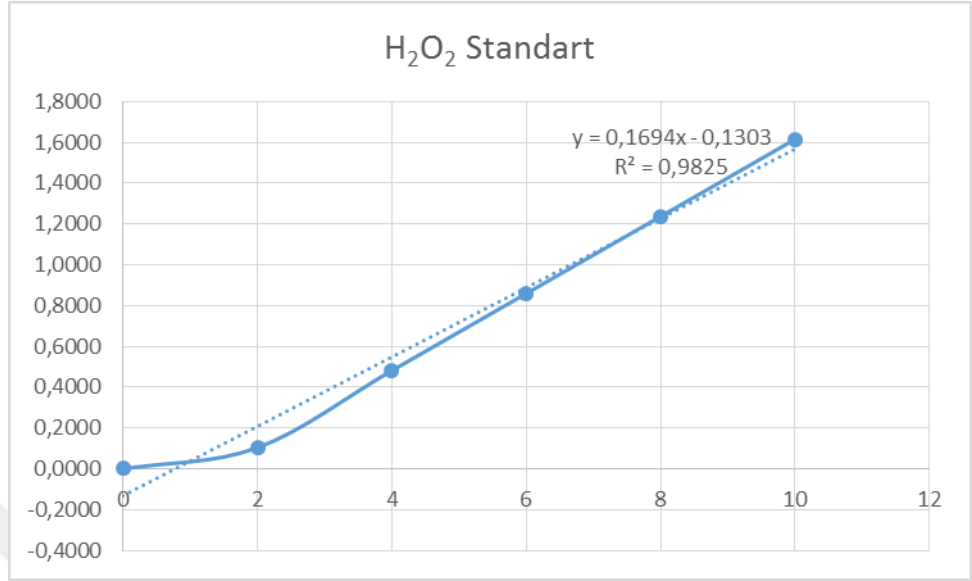
Grafik 12: MDA standart eğrisi

4.6.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Ölçümü Bulgusu



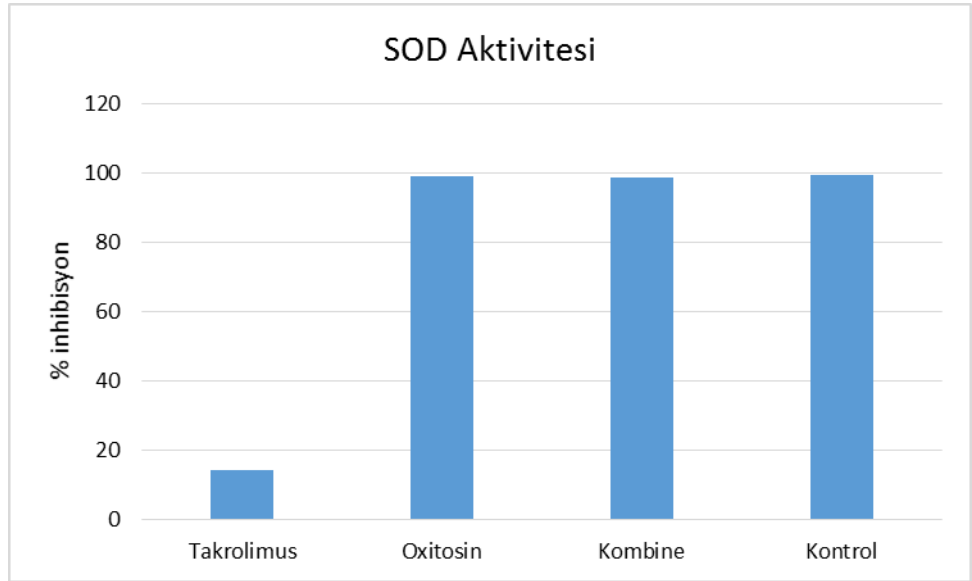
Grafik 13: NADPH standart eğrisi

4.6.3. Katalaz (CAT) Aktivitesi Ölçümü Bulgusu



Grafik 14: H₂O₂ standart eğrisi

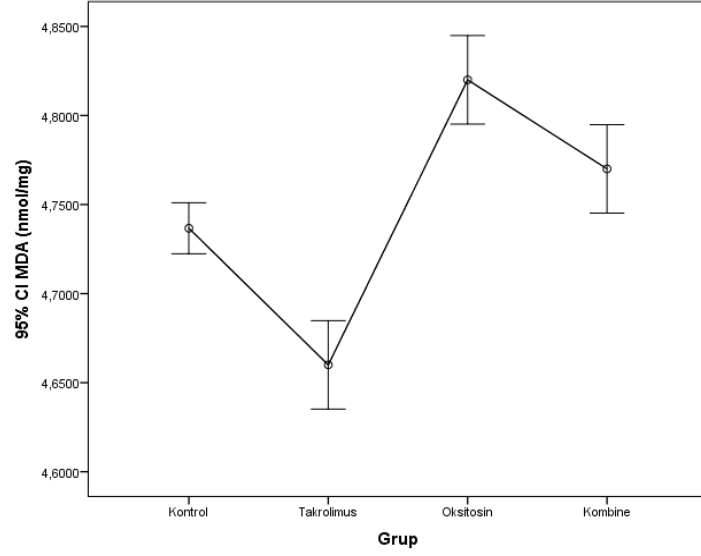
4.6.4. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Ölçümü Bulgusu



Grafik 15: SOD Aktivitesi

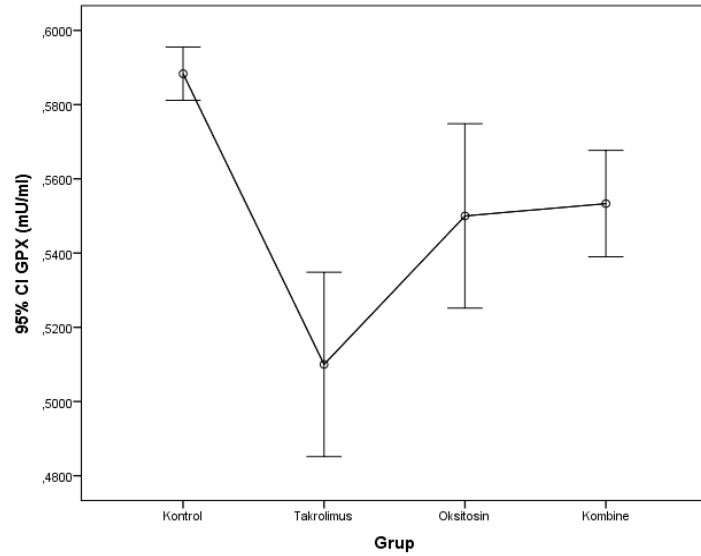
4.7. Oksidatif Stres Parametrelerinin İstatiksel Değerlendirilmesi

4.7.1. Lipid Peroksidasyon (MDA) düzeyi



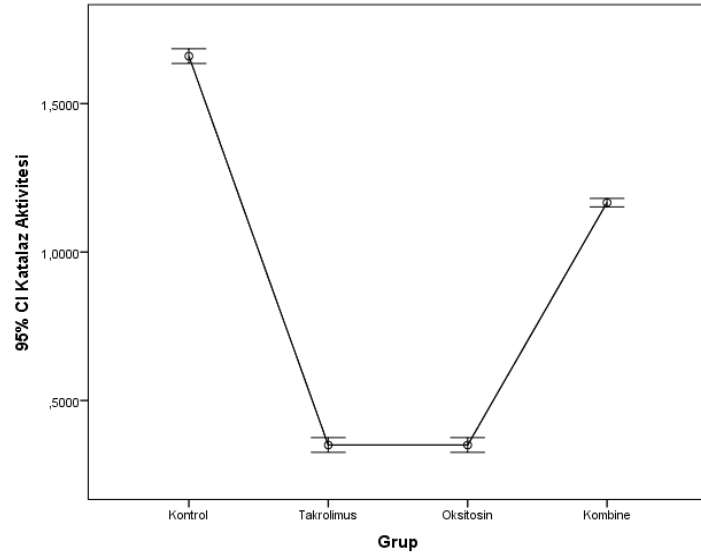
Grafik 16: MDA düzeyi istatistiksel grafiği. 0,05 önem seviyesinde, gruplar arasında ikili farkların tümü istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$).

4.7.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) düzeyi



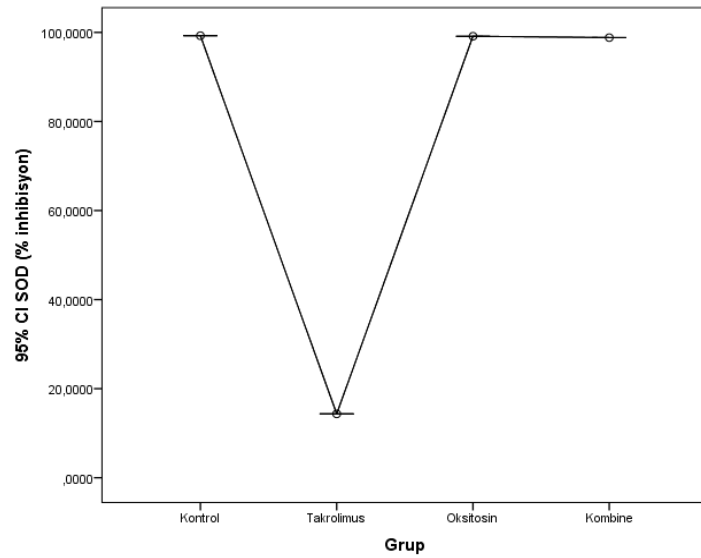
Grafik 17: GSH-Px düzeyi istatistiksel grafiği. 0,05 önem seviyesinde, Kombine-Oksitosin dışında tüm gruplar anlamlıdır ($p < 0,05$).

4.7.3. Katalaz (CAT) düzeyi



Grafik 18: CAT düzeyi istatistiksel grafiği. Takrolimus- Oksitosin grupları arasında fark anlamsızdır. Diğer gruplar arasında fark anlamlıdır ($p<0,001$).

4.7.4. Süperoksit Dismutaz (SOD) düzeyi



Grafik 19: SOD düzeyi istatistiksel grafiği. 0,05 önem seviyesinde, gruplar arasında ikili farkların tümü istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).

Tablo 9: Biyokimyasal parametrelerin istatistiksel değerlendirme tablosu

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Katalaz Aktivitesi	Kontrol	3	1,660000	,0100000	,0057735	1,635159	1,684841	1,6500	1,6700
	Takrolimus	3	,350000	,0100000	,0057735	,325159	,374841	,3400	,3600
	Oksitosin	3	,350000	,0100000	,0057735	,325159	,374841	,3400	,3600
	Kombine	3	1,166667	,0057735	,0033333	1,152324	1,181009	1,1600	1,1700
	Total	12	,881667	,5844785	,1687244	,510307	1,253027	,3400	1,6700
SOD (% inhibisyon)	Kontrol	3	99,251770	,0000100	,0000058	99,251745	99,251795	99,2518	99,2518
	Takrolimus	3	14,340950	,0000100	,0000058	14,340925	14,340975	14,3409	14,3410
	Oksitosin	3	99,139547	,0000058	,0000033	99,139532	99,139561	99,1395	99,1396
	Kombine	3	98,827780	,0000100	,0000058	98,827755	98,827805	98,8278	98,8278
	Total	12	77,890012	38,3218695	11,0625708	53,541457	102,238566	14,3409	99,2518
MDA (nmol/mg)	Kontrol	3	4,736667	,0057735	,0033333	4,722324	4,751009	4,7300	4,7400
	Takrolimus	3	4,660000	,0100000	,0057735	4,635159	4,684841	4,6500	4,6700
	Oksitosin	3	4,820000	,0100000	,0057735	4,795159	4,844841	4,8100	4,8300
	Kombine	3	4,770000	,0100000	,0057735	4,745159	4,794841	4,7600	4,7800
	Total	12	4,746667	,0612496	,0176812	4,707751	4,785583	4,6500	4,8300
GPx (mU/ml)	Kontrol	3	,588333	,0028868	,0016667	,581162	,595504	,5850	,5900
	Takrolimus	3	,510000	,0100000	,0057735	,485159	,534841	,5000	,5200
	Oksitosin	3	,550000	,0100000	,0057735	,525159	,574841	,5400	,5600
	Kombine	3	,553333	,0057735	,0033333	,538991	,567676	,5500	,5600
	Total	12	,550417	,0297305	,0085825	,531527	,569307	,5000	,5900

5. TARTIŞMA

Yapılan bu deneysel çalışmada; doku ve organ nakillerinde immünsupresif ilaç olarak kullanılan Takrolimusun adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler üzerindeki etkileri ve antioksidan bir ajan olan oksitosinin takrolimusun oluşturduğu toksik etkinin azaltılması için yeni bir ajan olarak kullanılma potansiyeli araştırılmıştır.

Takrolimus, *Streptomyces tsukubaensis* bakterisinden elde edilen ve kuvvetli bir makrolid olan kalsinörin inhibitörüdür. Kalsinörin inhibisyonu aktivitesini; iltihaba neden olan sitokinlerin azalarak düzenlenmesi, tümör nekrozis faktör- α , interlökin-1 β ve -6, interferon-c, FK bağlayıcı protein tarafından aktive edilen T hücre aktivasyonu aracılığıyla gerçekleştirmektedir (99,100). Kalsinörin inhibitörleri böbrek başta olmak üzere organ nakillerinde hastaların bağışıklık sistemini baskılayan tedavi yöntemlerinin en önemli yapıtaşlarıdır (101,102).

İmmünsupresif ilaçların hepsi toksisite ile ilişkilendirilmektedirler. Bu nedenle tedavi süresince sık sık farklı doz ve kombinasyonlar uygulanmaktadır (103). Takrolimus nefrotoksisite, nörotoksisite, diyabetojenitesi ve gastrointestinal toksisite gibi farklı toksisite profillerine sahiptir (104). Hasdemir ve ark. böbrek naklinden sonraki üçüncü haftada Takrolimusun toksisitesinden dolayı hiperozmolar hiperglisemik durumun ortaya çıktığını bildirmişlerdir (105). Hücresel seviyede bakıldığında morfolojik gözlemler tübüler endotelial hücreler, vasküler endotelial hücreler, arteriyo-miyositler ve interstisyel fibroblastların hepsinin Takrolimus nefrotoksisitesinin hedefi olduğunu göstermektedir. Klinik biyopsi materyalleri incelendiğinde Takrolimusun epitelial vakuolizasyon oluşumunda direkt olarak toksik etkisi olduğu gözlemlenmiştir (106,107).

Mezenkimal kök hücreler; doku- organ rejenerasyonuna yardımcı olmaları, immün sistemi baskılayıcı özellikte olmaları ve hasarlı dokulara migrasyon yetenekleriyle klinik kullanım potansiyeli artmakta olan hücrelerdir (108). İmmünmodülatör etkilerinden dolayı GVHH ve Crohn hastalığının tedavisinde, rejenerasyon özellikleri sebebiyle menisküs, kıkırdak ve kemik hasarlarının tamirinde, migrasyon yetenekleri nedeniyle osteoporoz ve omurilik yaralanmalarında kullanılmaktadırlar (109).

Nörohipofiziyal bir hormon olan oksitosinin antiinflamatuvar özelliği, hücre proliferasyonunu artırıcı etkisi ve oksidatif strese karşı hücreleri koruyucu görev yapması sebebiyle rejeneratif tıpta kullanımı gittikçe yaygınlaşmaktadır (110). Literatürde kök hücrelerle birlikte kullanıldıklarında büyüme ve farklılaşmayı düzenleyici etkilerinin olduğuna dair bulgular yer almaktadır (111-113).

Takrolimusun adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin canlılıkları üzerindeki etkileri ile ilgili çalışmalar bulunmakla birlikte literatürde tespit edilmiş herhangi bir IC₅₀ değeri bulunmamaktadır.

Bu çalışmada Takrolimusun insan adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisine WST-1 testi ile bakılmış, hücreler üzerindeki IC₅₀ dozu 72. Saatte 17.44 µM olarak tespit edilmiştir.

Tsuji ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada Takrolimusun ADKH'lerin hücre canlılığı üzerindeki etkilerine 7 gün boyunca MTT testi ile bakılmış, 1. gün anlamlı bir değişiklik gözlenmezken 7. gün hücre canlılığında %88.6 ± 22.91 oranında oldukça büyük bir düşüş gözlenmiştir (114). Yapılan çalışmamızda da Takrolimusun IC₅₀ dozunu 72. saatte saptanmış, maruziyet süresinin artmasının hücre canlılığını azalttığını düşündürmektedir.

Literatürde oksitosinin sıçan uterusu düz kaslarında IC₅₀ değeri bazı çalışmalarda saptanmışken (16 ± 3.14 µg/ml, 27 ± 4.0 µg/ml) insan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler üzerindeki IC₅₀ değeri ile ilgili veri bulunmamaktadır (115,116).

Çalışmamızda oksitosinin insan adipoz kökenli mezenkimal kök hücre hattı üzerindeki IC₅₀ değerini belirlemek amacıyla WST-1 testi yapılmış ve sonuç 72. saatte 13.43 µM olarak bulunmuştur.

Literatürde oksitosinin insan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler üzerindeki IC₅₀ değeri ile ilgili hiçbir veri bulunmaması sebebiyle, memeli hücreleri üzerinde oksitosinin IC₅₀ değerlerinin birbirine yakın olabileceği dışında bir tahmin yürütmek mümkün değildir.

Hem *in vitro* hem de *in vivo* yapılan çalışmalarda Takrolimusun hücreler üzerindeki toksik etkileri farklı yöntemlerle kanıtlanmıştır. Episklral ilaç implantı yapılan bir çalışmada Takrolimusun konjunktiva, iris, siliyer cisim, kornea, sklera,

koroid ve retina üzerindeki toksik etkileri yarık-lamba fotoğraflama, fundus fotoğraflama, IOP ve histolojik yöntemlerle gösterilmiştir (117).

Böbrek tübüler hücre toksisitesi ile ilgili bir çalışmada yüksek konsantrasyonlardaki Takrolimusun (10, 50 ve 100 μ M) hücrelerde vakualizasyon, şişme ve mitokondriyal büyüme gibi ultrastruktürel değişikliklere neden olduğu ifade edilmiştir (118).

Mezenkimal kök hücrelerle yapılan bir çalışmada ise Takrolimusun kısa süreli olarak hücrelerle maruziyetinde toksisite veya apoptozu indüklediğine dair bir bulguya rastlanmamıştır, fakat 7 gün sonra yüksek dozda Takrolimusun toksisiteyi indüklediği görülmüştür (119).

Son zamanlarda tedavilerde bir antioksidan olarak kullanılan oksitosinin hücreler üzerindeki toksisiteyi azalttığına dair veriler mevcuttur. Örneğin; Erbaş ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada böbrek rahatsızlıklarında kullanılan Sisplatin isimli kemoterapötik ilacın toksik etkilerinin, oksitosinin anti-inflamatuvar özelliği sayesinde azaltıldığı açıkça gösterilmiştir (120). Çalışmamızda Takrolimus ve oksitosinin 72. saatteki IC₅₀ değerleri baz alınarak yapılan izobologram analizi sonucunda oksitosinin Takrolimus üzerinde antagonistik etki yarattığı gözlemlenerek literatür verilerini destekleyici bir bulgu elde edilmiştir.

Literatüre bakıldığında Takrolimusun çeşitli hücre tiplerinde apoptozu indüklediğine dair bulgular bulunmaktadır. Choi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Takrolimusun Jurkat T hücrelerinde doza bağımlı olarak apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Takrolimusun nükleer fragmentasyon ve kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptozu arttırdığı bildirilmiştir (121).

Geçmiş yıllarda yayınlanan bir çalışmada kalp nakillerinden sonra kullanılan Takrolimusun periferik T hücreleri ve mononükleer hücrelerde apoptozu indüklediği belirtilmiştir (122, 123).

Takrolimusun apoptozu indüklemesine karşılık oksitosinin hücre proliferasyonunu arttırdığı ve bazı hücre tiplerinde koruyucu rol oynadığını gösteren bulgular vardır. Örneğin insan dermal mikrovasküler endoteliyal hücreleri ile yapılan bir çalışmada oksitosinin hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu arttırdığı ve bunu oksitosin reseptörünün hücre tipini mRNA ve protein seviyesinde eksprese ederek yaptığı tespit edilmiştir (124).

Mezenkimal kök hücreler ilgili sinyal yollarını düzenleyerek osteogeneze katkıda bulunmaları nedeniyle kemik erimesi tedavisinde kullanılmaktadırlar (125). Bu konu ile ilgili yapılan bir çalışmada oksitosinin, mezenkimal kök hücrelerin osteoblast-adiposit dengesini sağlamasında major rolü olduğunu gösteren veriler elde edilmiştir (125).

İnsan prostat modülasyonunda oksitosinin etkisine bakılmış ve oksitosin reseptörünün prostat büyümesini düzenlediği gözlemlenmiştir (126).

Çalışmamızda Takrolimus, oksitosin, Takrolimus + oksitosin ve kontrol'den oluşan dört deney grubuna Annexin V yöntemi uygulanarak canlı-ölü hücre yüzdesi ve erken geç apoptoz oranları Muse® Cell Analyzer ile hesaplanmıştır. Yapılan hesaplamalar doğrultusunda etken maddeye maruz kalmayan kontrol grubundaki hücrelerde %2.01 oranında erken apoptoz, %1.18 oranında geç apoptoz görülürken ölü hücre yüzdesi 0.53, canlı hücre yüzdesi 96.28 olarak hesaplanmıştır. Oksitosin grubundaki hücrelerde %1.68 oranında erken apoptoz, %1.50 oranında geç apoptoz görülürken ölü hücre yüzdesi 0.59, canlı hücre yüzdesi 96.23 olarak hesaplanmıştır. Oksitosin grubunun kontrol grubu ile neredeyse aynı rakamları vermesi oksitosinin hücre canlılığını negatif yönde etkilemediğini ispatlamaktadır. Takrolimus grubuna bakıldığında erken apoptoz oranı %10.71'e, geç apoptoz oranı %9.77'ye yükselirken ölü hücre yüzdesi 5.47, canlı hücre yüzdesi 74.05 olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubuna kıyasla canlı hücre yüzdesindeki bu düşüş Takrolimusun hücreler üzerindeki negatif etkisini açıkça ortaya koymaktadır. Bu analiz literatürde yer alan ve bizim WST-1 testi ile gözlemlediğimiz Takrolimusun toksik etkisi sebebiyle hücreleri öldürdüğü yönündeki bulguyu destekler niteliktedir. Oksitosin ve Takrolimustan oluşan kombine grup sonuçlarında ise erken apoptoz oranı %1.41, geç apoptoz oranı %2.27, ölü hücre yüzdesi 1.52, canlı hücre yüzdesi 94.80 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar Takrolimus grubundaki sonuçlarla kıyaslandığında ölü hücre yüzdesindeki düşüş ve canlı hücre yüzdesindeki artışın, oksitosin grubunun kontrol grubuna benzerliği göz önünde bulundurularak oksitosinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Literatürde oksitosinin hücre proliferasyonunu arttırdığı yönündeki bulguların varlığı, yaptığımız izobologram analizinde oksitosinin Takrolimus üzerinde antagonistik etki göstermesi ve apoptoz analizinde kombine grubun Takrolimus

grubuna kıyasla canlı hücre yüzdesinde artış meydana geldiği bulgusu bize birbirleri ile uyumlu sonuçlar vermektedir.

Hücre canlılık analizlerinin istatistiksel değerlendirmesinde, ölü hücre yüzdesi 0,05 önem seviyesinde, gruplar arasında ikili farkların tümü istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında oksitosinin etkisi de anlamlıdır. Kombine gruptaki ölü hücre yüzdesi kontrol ve oksitosin grubuna göre farklı olmakla birlikte yakındır.

Geç apoptoz/ölü yüzdesi istatistiksel değerlendirmesinde 0,05 önem seviyesinde, kontrol ve Takrolimus grupları istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). Geç apoptoz/ölü hücre yüzdesi oranı kombine grupta kontrol ve oksitosin grubuna yakındır.

Erken apoptoz yüzdesi istatistiksel değerlendirmesinde 0,05 önem seviyesinde, gruplar arasında ikili farkların tümü istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında oksitosinin etkisi de anlamlıdır. Kombine grupta oksitosinin etkisi Takrolimusun etkisini minimize etmiştir. Canlı hücre yüzdesi istatistiksel değerlendirmesinde canlı hücre yüzdesi açısından 0,05 önem seviyesinde, gruplar arasında ikili farkların tümü istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında oksitosinin etkisi de anlamlıdır. Kombine grupta oksitosinin etkisi Takrolimusun etkisini minimize ettiği düşünülmektedir. En az canlı hücre Takrolimus grubunda gözlemlenmiştir.

Çalışmada, immünofloresan boyama yöntemi ile Ki-67 boyaması ve Vimentin boyaması yapılmıştır.

Ki-67 gelişen ve bölünen hücrelerde bulunan, hücrenin G_0 dinlenme fazında bulunmayan bir antijendir. Hücresel bir protein olan Ki-67 antijeni hücreler proliferasyona başladığında yükselmektedir (127).

Ki-67 boyamasında kontrol grubu, hücre hattında bölünmeye ilişkin bulguların varlığı saptanmıştır. Hücre morfolojilerinin normal yapıda saptanmıştır. Ki-67 antijeni nükleusta da eksprese olduğu için nükleus boyası olan DAPI nin mavi rengi yerine beyaza yakın bir renkte bulunması Ki-67 antijeni ekspresyonuna kanıt olarak kabul edilmiştir. Takrolimus grubunda hücre sayısında kontrolle karşılaştırıldığında az sayıda olduğu görülmüştür. Hücre morfolojilerinde inceltme ve içi boş bir yapıda oldukları saptanmıştır. Hücre nükleuslarında DAPI boyasının rengi olan mavinin

bulunması Ki-67 antijeni eksprese etmediği ya da düşük seviyede ettiği olarak kabul edilmiştir. Oksitosin grubunda hücre sayısının kontrol grubuna benzer olduğu saptanmıştır. Bazı hücrelerin morfolojilerinin değiştiği gözlemlenmiştir. Bu da hücrelerin diferansiyasyon yönünde oldukları olarak yorumlanmıştır. Ki-67 antijeni açısından yüksek seviyede bir ekspresyon gösterdiği gözlemlenmiştir. Kombinasyon grubunda, hücre morfolojilerinin kontrol grubuna benzemekle birlikte az sayıda hücrede oksitosin grubunda görülen hücre morfolojide değişiklik gösteren hücre toplulukları gözlemlenmiştir. Hücrelerin sayı ve yapı olarak iyi durumda oldukları saptanmıştır. Ki-67 açısından oldukça yüksek bir ekspresyonun varlığı saptanmıştır.

Vimentin hücre iskeletinin yapısına katılan, protein yapıda bir ara filamandır. Çoğu ara filaman kararlı yapıya sahipken, vimentinin değişken bir yapısı vardır. Vimentin organellerin yerini sabitler, hücreye esneklik sağlar ve hücre içinde kolesterol taşınmasında rol oynar. Vimentin ve mikrotübüller arasında sıkı ilişkiler vardır. Genellikle mezenkimal kök hücrelerde bulunan vimentin bazı ektodermal ve endodermal kökenli hücrelerde sitokeratinlerle birlikte bulunmaktadır (128). Hücre iskeleti elemanı, ara filamanlar grubunda yer alan ve özellikle mezenkimal kökenli hücrelerde bulunan vimentin, çalışmamızdaki hücrelerin diferansiyasyonlarının takibi amacıyla boyanmıştır.

Kontrol grubunda, Vimentin sitoplazma içinde homojen olarak dağılım göstermektedir. Yüksek bir ekspresyon göstermeleri dikkat çekicidir (yeşil renk yoğun). Takrolimus grubunda dikkat çekici olarak kontrol grubunda görülen ekspresyonda daha az bir ekspresyon varlığı görülmektedir. Bu gruba ait hücrelerde vimentinin homojen olarak dağılmadığı perinükleer alanda belli bölgelerde yoğunlaşma gösterdiği ve kısa küt olarak boyama göstermesi Takrolimusun hücre iskeleti yapısı üzerinde olası negatif etkileri olarak yorumlanmıştır. Oksitosin grubunda, vimentin immunoekspresyonunun azalması oldukça dikkat çekici bir bulgu olarak saptanmıştır. Bu da hücrelerin diferansiyasyon yönünde olduklarını akla getirmektedir. Kombine grupta görünüm büyük oranda kontrol grubu ve az sayıdaki bir hücre popülasyonunda ise Takrolimus grubuna benzer bir görünüm hakimdir. Vimentin ekspresyonu yoğun olarak gözlemlenmektedir. Hücre içi kısa küt vimentin (+) alanlar saptansa da yoğunlukla kontrol grubu benzeri bir görüntü mevcuttur.

Çalışmamızda deney grupları lipid peroksidasyonu, glutatyon peroksidaz, katalaz ve süperoksit dismutaz olmak üzere dört ayrı oksidatif stres parametresi ile enzimatik olarak değerlendirilmiştir.

Oksidatif hasarlarda Takrolimus ve Siklosporinin nöroprotektif etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada söz konusu immunsupresif ajanların lipid peroksidasyonu artışına sebep olduğu gösterilmiştir (129). Böbrek nakli sonrası immunsupresif ilaç olan Takrolimus ve oksidatif stres arasındaki ilişki araştırıldığında da MDA seviyesinin artış gösterdiği görülmüştür (130). Takrolimus ve mikofenolat mofetil kombinasyon tedavisinde immunsupresif ilaçların oksidatif stres üzerinde kuvvetli etkisi olduğu ve lipid peroksidasyon seviyesinin arttığı gösterilmiştir (131).

Serbest radikaller olarak tabir edilen serbest oksijen grupları, organizmada bazı moleküllerin yapısını bozarak hücre ve dokularda hasara neden olmaktadır. Bu moleküllerden lipid peroksidasyonun en önemli ürünü malondialdehittir. Meydana gelen malondialdehit, membranda bulunan bileşiklerin çapraz bağlanmasına sebep olmaktadır. Bu sebeple iyon geçirgenliği ve enzim aktivitesinin değişmesi gibi olumsuz sonuçlar oluşmaktadır (132,134)

Bu çalışmada, malondialdehit miktarında kontrol verilerine göre uygulama gruplarında saptanan değişimlerde kontrol 4.736667 nmol/mg, Takrolimus 4.66000 nmol/mg, oksitosin 4.82000 nmol/mg, kombine grup 4.77000 nmol/mg olarak saptanırken istatistiksel açıdan 0,05 önem seviyesinde, gruplar arasında ikili farkların tümü istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$).

Glutatyon peroksidaz hücrelerde oluşan hiperoksitleri uzaklaştırma görevi olan ve hücreleri çeşitli hasarlara karşı koruyan bir enzimdir (135). Hücreleri, lipidlerin peroksidasyonundan koruyan en önemli enzim olma özelliğiyle hücrenin yapısını ve fonksiyonunu korumaktadır (136).

Yapmış olduğumuz çalışmada, GSH-Px aktivitesi kontrol grubunda 0.588333 mU/ml, tacrolimus grubunda 0.510000 mU/ml, oksitosin grubunda 0.550000 mU/ml, kombine grupta 0.553333 mU/ml olarak ölçülürken istatistiksel açıdan 0,05 önem seviyesinde, Kombine- Oksitosin dışında tüm gruplar anlamlıdır ($p < 0,05$).

Katalaz protein yapısında bol bulunan bir enzim olmakla birlikte hücreler için toksik olan hidrojen peroksidi uzaklaştırma görevini üstlenmiştir (137,138).

Antioksidan etkiye sahip olan katalaz hücreyi serbest radikal veya diğer reaktif moleküllerin oksidatif hasarından korumaktadır (139).

Çalışmamızda, katalaz aktivitesinin ölçümü sonucunda elde edilen bulgulara kontrol grubu 1.660000, Takrolimus grubu 0.350000, oksitosin grubu 0.350000, kombine grup 1.166667 olarak ölçülmüştür. İstatiksel açıdan Takrolimus-oksitosin grupları arasında fark anlamsızdır. Diğer gruplar arasında fark anlamlıdır ($p<0,001$).

Süperoksit dismutaz enzimi oksijeni metabolize eden tüm hücrelerde bulunmaktadır. Oksijen toksisitesine karşı hücreler üzerinde koruyucu rol oynamaktadır. Süperoksit dismutaz, süperoksit radikallerini, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürerek ortadan kaldırmaktadır (140).

Bu çalışmada süperoksit dismutaz enzim aktivitesi ölçümünde inhibisyon yüzdeleri kontrol grubunda 99.251770, Takrolimus grubunda 14.340950, oksitosin grubunda 99.139547, kombine grupta 98.827780 olarak tespit edilmiştir. İstatiksel açıdan 0,05 önem seviyesinde, gruplar arasında ikili farkların tümü istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0, 05$).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1-Takrolimus adipoz kaynaklı mezenşimal kök hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermektedir.

2- Oksitosin hücre kültürü çalışmalarında hücre farklanma kapasiteleri üzerinde etkiler göstermektedir.

3- Takrolimus-okситosin kombine grupta canlı hücre, ölü hücre, erken ve geç apoptoz yüzdeleri açısından kontrol grubuna yakın olarak tespit edilmiştir. Bu bulguların oksitosin etkisiyle olduğu düşünülmüştür.

4- Literatürde oksitosinin insan adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücreler üzerindeki IC_{50} değeri ile ilgili hiçbir veri bulunamamıştır. Çalışmamızda oksitosinin insan adipoz kökenli mezenkimal kök hücre hattı üzerindeki IC_{50} değerini belirlemek amacıyla WST-1 testi yapılmış ve sonuç 72. saatte 13.43 μM olarak bulunmuştur.

5- Takrolimusun adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin hücre canlılığı üzerindeki etkileri ile ilgili çalışmalar bulunmakla birlikte literatürde tespit edilmiş herhangi bir IC_{50} değeri bulunmamaktadır. Bu çalışmada Takrolimusun insan adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisine WST-1 testi ile bakılmış, hücreler üzerindeki IC_{50} dozu 72. saatte 17.44 μM olarak tespit edilmiştir.

6- Doku ve organ nakilleri sonrası immunsupresif tedavi ve adipoz kaynaklı mezenşimal kök hücre uygulaması birlikte yapılan hastalarda oksitosinin kullanımın, mezenşimal kök hücre popülasyonu üzerinde olumlu etkiler oluşturabileceği düşünülmektedir. Bu anlamda oksitosin klinik uygulamalar için potansiyel yeni bir ajan olabileceği düşünülmektedir.

7-Konu ile ilgili deney hayvanları ve başarılı sonuçlar alınırsa insan çalışmaları ile hücresel tedavilerde oksitosinin rutin kullanıma sunulması açısından önem taşımaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Fishman JA. Infection in Solid-Organ Transplant Recipients. The New England Journal of Medicine. 2007; 357: 2601-2614.
2. Watson CJE, Dark JH. Organ transplantation: historical perspective and current practice. British Journal of Anaesthesia. 2012; 108: 129-142.
3. Wong CJ, Pagalilauan G. Primary Care of the Solid Organ Transplant Recipient. Med Clin N Am. 2015; 99: 1075–1103.
4. Liapis H, Wang HL, editor. Pathology of Solid Organ Transplantation. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2011.
5. Halloran PF. Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation. The New England Journal of Medicine. 2004; 351: 2715-2729.
6. Starzl TE. FK-506: A Potential Breakthrough in Immunosuppression. Transplant Proc. 1987; 19: 101–104.
7. Macleod AM, Thomson AW. FK-506 A new immunosuppressive drug. Medicina (Firenze). 1990; 10: 329-332.
8. Fung JJ, Abu-Elmagd K, Todo S, Shapiro R, Tzakis A, Jordan M et. al. Overview of FK506 in Transplantation. Clin Transpl. 1990 ; 115–121.
9. Lim SM, White DJ. The pharmacology of immunosuppression. Ann Acad Med Singapore. 1991; 20: 144-149.
10. De Miguel MP, Fuentes-Julián S, Blázquez-Martínez A, Pascual CY, Aller MA, Arias J et. al. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. Curr Mol Med. 2012; 12: 574-591.
11. Bell E. Stem cells: Immunosuppression by mesenchymal stem cells. Nature Reviews Immunology. 2008; 8: 165.
12. Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. Cell Death and Differentiation. 2014; 21: 216–225.
13. Ghannam S, Bouffi C, Djouad F, Jorgensen C, Noel D. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. Stem Cell Research & Therapy. 2010; 1-2.
14. Shi Y, Hu G, Su J, Li W, Chen Q, Shou P et. al. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. Cell Research. 2010; 20: 510–518.

15. Kloster-Jensen K, Sahraoui A, Vethe NT, Korsgren O, Bergan S, Foss A et. al. Treatment with Tacrolimus and Sirolimus Reveals No Additional Adverse Effects on Human Islets In Vitro Compared to Each Drug Alone but They Are Reduced by Adding Glucocorticoids. *Journal of Diabetes Research*. 2016; 1-9.
16. Felix MJ, Felipe CR, Tedesco-Silva H, Osmar Medina-Pestana J. Time-Dependent and Immunosuppressive Drug-Associated Adverse Event Profiles in De Novo Kidney Transplant Recipients Converted from Tacrolimus to Sirolimus Regimens. *Pharmacotherapy*. 2016; 36: 152-165.
17. Jantz AS, Patel SJ, Suki WN, Knight RJ, Bhimaraj A, Gaber AO. Treatment of Acute Tacrolimus Toxicity with Phenytoin in Solid Organ Transplant Recipients. *Case Reports in Transplantation*. 2013; 1-6.
18. Provenzani A, Santeusano A, Mathis E, Notarbartolo M, Labbozzetta M, Poma P et. al. Pharmacogenetic considerations for optimizing tacrolimus dosing in liver and kidney transplant patients. *World J Gastroenterol*. 2013; 19: 9156–9173.
19. Ferjani H, Timoumi R, Amara I, Abid S, Achour A, Bacha H et. al. Beneficial effects of mycophenolate mofetil on cardiotoxicity induced by tacrolimus in wistar rats. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2015.
20. Taber DJ, Gebregziabher MG, Srinivas TR, Chavin KD, Baliga PK, Egede LE. African-American race modifies the influence of tacrolimus concentrations on acute rejection and toxicity in kidney transplant recipients. *Pharmacotherapy*. 2015; 35: 569-577.
21. Yi KJ, So KH, Hata Y, Suzuki Y, Kato D, Watanabe K, The regulation of oxytocin receptor gene expression during adipogenesis. *J Neuroendocrinol*. 2015; 27: 335-342.
22. Ybarra N, Vincent P, Smith LC, Troncy E. Oxytocin improves the expression of cardiac specific markers in porcine bone marrow stem cells differentiation. *Res Vet Sci*. 2015; 98: 42-50.
23. Colaianni G, Sun L, Zaidi M, Zallone A. Oxytocin and bone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2014; 307: 970–977.
24. Lajtha LG, Schofield R. Regulation of stem cell renewal and differentiation: possible significance in aging. *Adv Gerontol Res*. 1971; 3: 131-46.

25. Chen G, Shi X, Sun C, Li M, Zhou Q, Zhang C et. al. VEGF-Mediated Proliferation of Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells. PLOS ONE 2013; 8(10): e73673.
26. Lakshmipathy U, Verfaillie C. Stem cell plasticity. Elsevier. Blood Reviews 2005; 19: 29–38.
27. Can A. Kök Hücre Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları. Ankara: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi. Akademisyen A.Ş. ; 2014
28. Nishio M, Nakahara M, Yuo A, Saeki K. Human pluripotent stem cells: Towards therapeutic development for the treatment of lifestyle diseases. World J Stem Cells. 2016; 8: 56-61.
29. Condic ML. Totipotency: What It Is and What It Is Not. Stem cells and development. 2014; 23: 796-812.
30. Mitalipov S, Wolf D. Totipotency, Pluripotency and Nuclear Reprogramming. NIH-PA Author Manuscript. 2009; 114: 185–199.
31. Shanthly N, Aruva MR, Zhang K, Mathew B, Thakur ML. Stem cells: a regenerative pharmaceutical. Q J NUCL MED MOL IMAGING. 2006; 50: 205-216.
32. Şahin F, Saydam G, Omay SB. Kök Hücre Plastisitesi ve Klinik Pratikte Kök Hücre Tedavisi. Türk Hematoloji-Onkoloji Dergisi. 2005; 1: 48-56.
33. Young HE, Black AC. Adult Stem Cells. The Anatomical Record Part A. 2004; 276A: 75-102.
34. Matur İ, Solmaz S. Kök Hücre Üretiminde Güncel Yaklaşımlar. ARŞİV 2011; 20: 168-186.
35. Shenghui H, Daisuke N, Sean JM. Mechanisms of Stem Cell Self-Renewal. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2009; 25: 377-406.
36. Kim M, Habiba A, Doherty JM et. al. Regulation of mouse embryonic stem cell neural differentiation by retinoic acid. Developmental Biology. 2009; 328: 456-471.
37. Zeev Estrov. Stem Cells and Somatic Cells: Reprogramming and Plasticity. Biology of Leukemia. Clinical Lymphoma & Myeloma. 2009; 9: 319-328.
38. Brignier AC, Gewirtz AM. Embryonic and adult stem cell therapy. J Allergy Clin Immunol. 2010; 125: 336-344.
39. İnan S, Özbilgin K. Kök Hücre Biyolojisi. Sağlıkta Birikim Dergisi. 2008; 5: 11-23.

40. Stewart Sell Editor. Division of Translational Medicine. Stem Cells Handbook. Wadsworth Center New York State Department of Health Albany, NY, USA; 2013.
41. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981; 292: 154-156.
42. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981; 78: 7634-7638.
43. Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*. 1984; 309: 255-256.
44. Lin T, Chao C, Saito S, Mazur SJ, Maureen E et.al. p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nature Cell Biology*. 2004; 7: 165-171.
45. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS et. al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998; 282: 1145-1147.
46. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol*. 2000; 18: 399-404.
47. Rippon HJ, Bishop AE. Embryonic stem cells. *Cell Proliferation*. 2004; 37: 23-34.
48. Bishop AE, Buttery LDK, Polak JM. Embryonic stem cells. *Journal of Pathology*. 2002; 197: 424-429.
49. Landry DW, Zucker HA. Embryonic death and the creation of human embryonic stem cells. *The Journal of Clinical Investigation*. 2004; 114: 1184-1186.
50. Stewart MH, Bendall SC, Bhatia M. Deconstructing human embryonic stem cell cultures: niche regulation of self-renewal and pluripotency. *J Mol Med*. 2008; 86: 875-886.
51. Tartarini D, Mele E. Adult Stem Cell Therapies for wound Healing: Biomaterials and Computational Models. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2016; 3: 1-7.
52. Suzuki E, Fujita D, Takahashi M, Oba S, Nishimatsu O. Adult stem cells as a tool for kidney regeneration. 2016; 5: 43-52.

53. Şimşek Ö. Yetişkin Kök Hücrelerin Dünü ve Bugünü. Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg. 2012; 7: 231-236.
54. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. J. Embryol. Exp. Morph. 1966; 16: 381-390.
55. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD et. al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. Science. 1999; 284: 143-147.
56. Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. TRENDS in Molecular Medicine. 2001; 7: 259-264.
57. Vaananen HK. Mesenchymal stem cells. Annals of Medicine. 2005; 37: 469–479.
58. Rankin S. Mesenchymal stem cells. Chest clinic. 2012; 67: 565-566.
59. Gonzalez A, Gonzalez-Rey E, Rico L, Büscher D, Delgado M. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Alleviate Experimental Colitis by Inhibiting Inflammatory and Autoimmune Responses. Gastroenterology. 2009; 136: 978 –989.
60. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Quinn G et. al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. 2007; 46: 219–228.
61. Locke M, Windsort J, Dunbar PR. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. ANZ J Surg. 2009; 79: 235-244.
62. Minter D, Marra KG, Rubin JP. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: Biology and Potential Applications. Adv Biochem Eng Biotechnol. 2013; 129: 59-71.
63. Locke M, Windsor J, Dunbar PR. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. ANZ J Surg. 2009; 79: 235–244.
64. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine. Circulation Research. 2007; 100: 1249-1260.
65. Tobita M, Orbay H, Mizuno H. Adipose-Derived Stem Cells: Current Findings and Future Perspectives. Discovery Medicine. 2011; 11: 160-170.
66. El-Badri NS, Maheshwari A, Sanberg PR. Mesenchymal stem cells in autoimmune disease. Stem Cells Dev. 2004; 13: 463-72.

67. Figueroa FE, Carrión F, Villanueva S, Khoury M. Mesenchymal stem cell treatment for autoimmune diseases: a critical review. *Biol Res*. 2012; 45: 269-77.
68. Han Z, Jing Y, Zhang S, Liu Y, Shi Y, Wei L. The role of immunosuppression of mesenchymal stem cells in tissue repair and tumor growth. Han et al. *Cell & Bioscience*. 2012; 2-8.
69. Groh ME, Maitra B, Szekely E, Koç ON. Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells. Elsevier. *Experimental Hematology*. 2005; 33: 928-934.
70. Sato K, Ozaki K, Oh L, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T et. al. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood*. 2007; 109: 228-234.
71. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI et. al. Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide. *Cell Stem Cell*. 2008; 2: 106-108.
72. Shi M, Liu ZW, Wang FS. Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. *Clinical and Experimental Immunology*. 2011; 164: 1-8.
73. Karakükcü M, Çetin M. Graft Versus Host Hastalığında Mezenkimal Kök Hücre Uygulamaları. *Türkiye Klinikleri J Hematol-Special Topics*. 2014; 7: 31-8.
74. Vianello F, Dazzi F. Mesenchymal stem cells for graft-versus-host disease: a double edged sword? *Leukemia*. 2008; 22: 463–465.
75. Blanc KL, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, Ringden O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *THE LANCET*. 2004; 363: 1439-1441.
76. Ograczyk E, Kowalewicz-Kulbat M, Wawrocki S, Fol M. Immunosuppression - tough ally in torrid time. *Postepy Hig Med Dosw*. 2015; 69: 1299-1312.
77. Ayna TK, Çiftçi HŞ, Tozkır H, Gürtekin M, Çarin M. İmmüsupresif İlaçların Etki Mekanizmaları. *Gaziantep Tıp Dergisi*. 2009; 15: 42-47.
78. Rathee P, Chaudhary H, Rathee S, Rathee D, Kumar V. Immunosuppressants: A Review. *The Pharma Innovation – Journal*. 2012; 1: 90-101.

79. Taylor AL, Watson CJE, Bradley JA. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. Elsevier. Critical Reviews in Oncology/Hematology. 2005; 56: 23-46.
80. Dilek K. Günümüzde En Sık Kullanılan İmmünsüpresif Ajanların Özellikleri. ANKEM Dergisi. 2002; 16: 199-202.
81. Aydın F, Şentürk N, Cantürk T, Turnalı AY. Takrolimus ve Dermatolojide Kullanımı. TÜRKDERM. 2002; 36: 152-156.
82. Burton LL, Lazo JS, Parker KL, editörler. Tedavinin farmakolojik temeli. New Haven, Connecticut: 1940.
83. Lan CCE, Yu HS, Wu CS, Kuo HY, Chai CY, Chen GS. FK506 inhibits tumour necrosis factor- α secretion in human keratinocytes via regulation of nuclear factor- κ B. British Journal of Dermatology. 2005; 153: 725-732.
84. Ellouk-Achard S, Martin C, Duc Ht, Dutertre-Catella H, Thevenin M, Warnet JM et. al. FK506 (Tacrolimus) decreases the cytotoxicity of cyclosporin A in rat hepatocytes in primary culture: implication of CYP3A induction. Arch Toxicol. 1998; 72: 257-263.
85. Ruzicka T, Assmann T, Homey B. Tacrolimus, The Drug for the Turn of the Millenium? Arch Dermatol. 1999; 135: 574-580.
86. Sır G, Arısu E, Yiğittürk G, Çavuşoğlu T, Avcı ÇB, Çelik S et. al. Oksitosinin hücrel tedavide kullanılma potansiyeli. FNG & Bilim Tıp Dergisi. 2015; 1: 163-169.
87. Kabilan A. Pharmacological Role of Oxytocin – A Short Review. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 2014; 6: 220-223.
88. Vigneaud VD. A trail of sulfa research: from insulin to oxytocin. Nobel Lecture. 1955; 446-465.
89. Uzun M, Sulu N. Oksitosin ve Fizyolojik Etkileri. Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi. 2002; 8: 91-97.
90. Erbaş O. Oksitosinin fizyolojik etkileri ve klinik uygulama alanları. İzmir Üniversitesi Tıp Dergisi. 2013; 1: 45-56.
91. Khazipov R, Tyzio R, Ben-Ari Y. Effects of oxytocin on GABA signalling in the foetal brain during delivery. Elsevier. Progress in Brain Research. 2008; 170: 243-257.

92. Young KA, Gobrogge KL, Liu Y, Wang Z. The Neurobiology of Pair Bonding: Insights from a Socially Monogamous Rodent. *Front Neuroendocrinol.* 2011; 32: 53-69.
93. Cassoni P, Sapino A, Fortunati N, Munaron L, Chini B, Bussolati G. Oxytocin Inhibits the Proliferation of MDA-MB231 Human Breast-Cancer Cells via Cyclic Adenosine Monophosphate and Protein Kinase A. *Int. J. Cancer.* 1997; 72: 340-344.
94. Cassoni P, Sapino A, Munaron L, Deaglio S, Chini B, Graziani A et. al. Activation of Functional Oxytocin Receptors Stimulates Cell Proliferation in Human Trophoblast and Choriocarcinoma Cell Lines. *The Endocrine Society.* 2001; 142: 1130-1136.
95. Sapino A, Macri L, Tonda L, Bussolati G. Oxytocin enhances myoepithelial cell differentiation and proliferation in the mouse mammary gland. *Endocrinology.* 1993; 133: 838-842.
96. Gutowska J, Jankowski M, Antunes-Rodrigues J. The role of oxytocin in cardiovascular regulation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2014; 47: 206-214.
97. Noiseux N, Borie M, Desnoyers A, Menaouar A, Stevens LM, Mansour S et. al. Preconditioning of Stem Cells by Oxytocin to Improve Their Therapeutic Potential. *Endocrinology.* 2012; 153: 5361-5372.
98. Demcehnko AP. The Change of Cellular Membranes on Apoptosis: Fluorescence Detection. *Exp Oncol.* 2012; 34: 3-2.
99. Lee WS, Lee SI, Lee MS, Kim SI, Lee SS, Yoo WH. Efficacy and safety of low-dose tacrolimus for active rheumatoid arthritis with an inadequate response to methotrexate. *The Korean Journal of Internal Medicine.* 2016; 10: 1-9.
100. Kino T, Hatanaka H, Miyata S, et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *J Antibiot. Tokyo.* 1987; 40: 1256-1265.
101. Yılmaz VT, Gürkan A, Dinçkan A, Koçak H, Süleymanlar G, Ersoy F. Böbrek Nakli Hastalarında Nakil Sonrası Erken Dönemde Sirolimus-Tacrolimus Kombinasyonu Sirolimus-Siklosporin Kombinasyonundan Üstündür? *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi.* 2012; 21: 45-52.
102. Squifflet JP, Backman L, Claesson K, et al. European Tacrolimus-MMF Renal Study Group., Dose optimization of mycophenolate mofetil when administered with

a low dose of tacrolimus in cadaveric renal transplant recipients. *Transplantation*. 2001; 1: 63–9.

103. Ho S, Clipstone N, Timmermann L, et al. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clin Immunol Immunopathol*. 1996; 80: 40–5.

104. Hasdemir E, Mousa U, Nar A, Başçıl Tütüncü N. Böbrek Nakli Sonrası Takrolimus Toksisitesine Bağlı Gelişen Hiperozmolar Hiperglisemik Durum. *Türkiye Klinikleri Journal of Case Reports*. 2013; 21: 161-3.

105. Randhawa PS, Starlz TE, Demetris AJ. Tacrolimus (FK506)-Associated Renal Pathology. *Adv Anat Pathol*. 1997; 4: 265–276.

106. McCauley J, Farkas Z, Prasad S, Plummer H, Starzl T, Murray S. Cyclosporine A and FK506 induced inhibition of renal cell (LLC-PKI) proliferation in culture. *Transplant Proc*. 1991; 23: 2829–2830.

107. Akar AR, Arat M, Beksaç M, Can A, Çamurdanoğlu BZ, Çetinkaya DU et. al. *Türkiye Bilimler Akademisi Raporları*. Ankara. 2009; 20: 113.

108. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal Stem Cells: Clinical applications and biological characterization. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2004; 36: 568-584.

109. Hekimoglu AT, Toprak G, Akkoc H, Evliyaoglu O, Ozekinci S, Kelle I. Oxytocin Ameliorates Remote Liver Injury Induced by Renal Ischemia-Reperfusion in Rats. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2013; 17: 169-173.

110. İşeri SÖ, Şener G, Sağlam B, Gedik N, Ercan F, Yeğen BÇ. Oxytocin Protects Against Sepsis-Induced Multiple Organ Damage: Role of Neutrophils. *Journal of Surgical Research*. 2005; 126: 73–81.

111. Leuner B, Caponiti JM, Gould E. Oxytocin stimulates adult neurogenesis even under conditions of stress and elevated glucocorticoids. *Hippocampus*. 2012; 22: 861-868.

112. Deing V, Roggenkamp D, Kühnl J, Gruschka A, Stäb F, Wenck H et. al. Oxytocin modulates proliferation and stress responses of human skin cells: implications for atopic dermatitis. *Exp Dermatol*. 2013; 22: 399-405.

113. Tsuji W, Schnider JT, McLaughlin MM, Schweizer R, Zhang W, Solari MG et. al. Effects of immunosuppressive drugs on viability and susceptibility of adipose- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Frontiers in Immunology*. 2015; 6: 1-8.

114. Sadraei H, Asghari GH, Andishah M. Antispasmodic effects of *Pycnocycla spinosa* seed and aerial part extracts on rat ileum and uterus smooth muscle contractions. *DARU*. 2008; 16: 160-163.
115. Sadraei H, Shokoohinia Y, Sajjadi S, Ghadirian B. Antispasmodic effect of osthole and *Prangos ferulacea* extract on rat uterus smooth muscle motility. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 2012; 7: 815-819.
116. Mai S, Lin L, Yang W, Deng X, Xie Z, Zong Y et. al. In vitro and in vivo release characteristics of Tacrolimus (FK506) from an episcleral drug-delivery implant. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 2014; 30: 670-680.
117. Moutabarrik A, Ishibashi M, Kameoka H, Kawaguchi N, Takano Y, Kokado Y et. al. In vitro FK506 kidney tubular cell toxicity. *Transplant International*. 1992; 5: 87-92.
118. Hoogduijn MJ, Crop MJ, Korevaar SS, Peeters AM, Eijken M, Maat LP et. al. Susceptibility of human mesenchymal stem cells to tacrolimus, mycophenolic acid, and rapamycin. *Transplantation*. 2008; 86: 1283-91.
119. Erbas O, Anil Korkmaz H, Oltulu F, Aktug H, Yavasoglu A, Akman L et. al. Oxytocin alleviates cisplatin-induced renal damage in rats. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2014; 17: 747-752.
120. Choi SJN, You HS, Chung SY. Tacrolimus-Induced Apoptotic Signal Transduction Pathway. *Transplantation Proceedings*. 2008; 40: 2734 –2736.
121. Hökl J, Cerny J, Ondrasek J, Bedanova H, Osmerova M, Studenik P. Apoptosis of peripheral T cells in stable recipients with neoral or tacrolimus immunosuppression after heart transplantation. *SCRIPTA MEDICA (BRNO)*. 2003; 76: 379–384.
122. Horigome A, Hirano T, Oka K. Tacrolimus-induced apoptosis and its prevention by interleukins in mitogen-activated human peripheral-blood mononuclear cells. *Immunopharmacology*. 1998; 39: 21–30.
123. Cassoni P, Marrocco T, Bussolati B, Allia E, Munaron L, Sapino A et. al. Oxytocin induces proliferation and migration in immortalized human dermal microvascular endothelial cells and human breast tumor-derived endothelial cells. *Molecular Cancer Research*. 2006; 4: 351-359.
124. Whittington K, Connors B, King K, Assinder S, Hogarth K, Nicholson H. The Effect of Oxytocin on Cell Proliferation in the Human Prostate Is Modulated by

Gonadal Steroids: Implications for Benign Prostatic Hyperplasia and Carcinoma of the Prostate. *The Prostate*. 2007; 67: 1132-1142.

125. Elabd C, Basillais A, Beaupied H, Breuil V, Wagner N, Scheideler M et. al. Oxytocin controls differentiation of human mesenchymal stem cells and reverses osteoporosis. *Stem cells*. 2008; 26: 2399-2407.

126. Çelikezen FÇ, Ertekin A. Ratlarda Akciğer Fibrozisinde Lipid Peroksidasyonu (MDA), Antioksidan Madde (Glutasyon, Seruloplazmin) ve Bazı Antioksidan Vitamin (B-Karoten, Retinol) Düzeylerinin İncelenmesi. *Y. Y. Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2008; 2: 17-20.

127. Avunduk MC, Tavlı Ş, Yol S, Tavlı L, Yavuz A, Güngör S et. al. Mide karsinomlarında hücre proliferasyon belirleyicisi olarak pcna, ki-67 ve agnor kullanımı. *Ankara üniversitesi tıp fakültesi mecmuası*. 2000; 53: 11-15.

128. Seçkin S, Ergül G, Aksoy F. Endometrial ve endoservikal adenokarsinomların ayırımında vimentin pozitifliği. *Türk patoloji dergisi*. 1995; 11: 241-243.

129. Yousuf S, Atif F, Keshewani V, Agrawal SK. Neuroprotective effects of Tacrolimus (FK-506) and Cyclosporin (CsA) in oxidative injury. *Brain and behavior*. 2011; 87-94.

130. Perrea DN, Moulakakis KG, Poulakou MV, Vlachos IS, Papachristodoulou A, Kostakis AI. Correlation between oxidative stress and immunosuppressive therapy in renal transplant recipients with an uneventful postoperative course and stable renal function. *Int Urol Nephrol*. 2006; 38: 343–348.

131. Ferjani H, Achour A, Bacha H, Abid S. Tacrolimus and mycophenolate mofetil associations: Induction of oxidative stress or antioxidant effect? *Human and Experimental Toxicology*. 2015; 1-14.

132. Yarsan E. Lipid Peroksidasyon Olayı ve Önlenmesine Yönelik Uygulamalar. *Y. Y. Ü Veteriner Fakültesi Dergisi*. 1998; 9: 89-95.

133. Akbay E. Hipertiroidizmde Lipit Peroksidasyonu ve Antioksidan Düzeyleri. *C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi*. 2000; 22: 196-200.

134. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*. 1993; 49: 481-93.

135. Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of Action. *The American Journal of Medicine*. 1994; 97: 5-13.

136. Duve DC. Microbodies in the living cells. *Sci.Am*. 1983; 248: 42-52.

137. Master C, Holmes R. Peroxime: New aspects of cell physiology and biochemistry. *Physiol.Rew.* 1977; 57: 866-882.
138. Percy ME. Catalase an old enzyme with a new role? *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 1984; 62: 1006- 1014.
139. Sheng L, Zheng X, Tong H, Liu S, Du J, Liu Q. Purification and Characterization of Cytosolic Isoenzyme III of Cu, Zn- Superoxide Dismutase from Tobacco Leaves. *Plant Science.* 2004; 167: 1235-1241.
140. Kavas GÖ. Reaktif oksijen metabolitlerine fizyopatolojik yaklaşım. *Ankara Tıp Dergisi.* 1994; 47: 579-592.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı: SIR

Adı: Gözde

Mektup Adresi: Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı, 35100, Bornova-İzmir/TÜRKİYE

Tel: +90 312 223 11 11

Cep Tel: +90 312 223 11 11

E-posta:

Doğum Tarihi: .

Doğum Yeri:

EĞİTİM

Derecenin Tipi	Çalışma Alanı	Yıl	Üniversite
Lisans	Biyoloji/Zooloji	2006-2012	Ege Üniversitesi
Yüksek Lisans	Kök Hücre AD	2013-2016	Ege Üniversitesi

Yüksek Lisans Tezinin Adı :

Oksitosinin Takrolimusa Maruz Kalmış Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Hattı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi