



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



SUNİTİNİB'E MARUZ BIRAKILMIŞ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER ÜZERİNDE OKSİTOSİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Yüksek Lisans Tezi

Meliz SOFU

Kök Hücre Anabilim Dalı

İzmir
2021

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**SUNİTİNİB'E MARUZ BIRAKILMIŞ MEZENKİMAL
KÖK HÜCRELER ÜZERİNDE OKSİTOSİN
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Meliz SOFU

Danışman
Prof. Dr. Yiğit UYANIKGİL

Kök Hücre Anabilim Dalı
Tezli Yüksek Lisans Programı

İzmir
2021

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof. Dr. Yiğit UYANIKGİL

(Danışman)

Üye : Prof. Dr. Dilek TAŞKIRAN

Üye : Prof.Dr. Meltem KURUŞ

Yüksek Lisans Tezinin Kabul edildiği tarih:

ÖNSÖZ

Tez çalışmasının başlangıcında tüm dünyayı saran COVID-19 pandemisi maalesef bu çalışmanın da satın alma ve deneysel kısmında bir takım aksaklık ve gecikmelere neden oldu. Pandeminin izin verdiği ölçüde bu tezin gerçekleşmesinde emeği olan hocalarıma şükranlarımı sunarım.

Bu tezi hazırlamamda ve geçirmiş olduğum süreçte benden desteklerini esirgemeyen, tez konumun seçilmesinde çok yardımcı olan ve kendimi daha da geliştirmeme katkı sağlayan değerli hocam **Prof. Dr. YİĞİT UYANIKGİL**'e, **Doç. Dr. ÇIĞIR BİRAY AVCI**'ya **Arş. Gör. BAKİYE GÖKER BAĞCA**'ya, **Uzm. Biyo. DERYA TANRIÖVER**'e teşekkürü bir borç bilirim.

Tüm eğitim ve öğretim hayatım boyunca maddi ve manevi her zaman ve her koşulda yanımda olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İzmir, 23.03.2021

Meliz SOFU

ÖZET

SUNITİNİB'E MARUZ BIRAKILMIŞ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER ÜZERİNDE OKSİTOSİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Mezenkimal kök hücreler deneysel ve klinik çalışmalarda kullanılan önemli tedavi yöntemleridir. Günümüzde mezenkimal kök hücre tedavisi birçok hastalıkta uygulanmaktadır. Organ nakillerinden sonra kullanılan immünsupresif ilaç tedavisinin yanı sıra hastalarda mezenkimal kök hücre uygulaması da yapılmaktadır. Yapılan bu deneysel çalışmada organ nakillerinde immünsupresif amaçla kullanılan sunitinibin sıçan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerinin araştırılması ve antioksidant özelliği olduğu bilinen oksitosinin bu toksisite üzerindeki etkileri gözlemlenmiştir.

Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler hattı ticari olarak temin edilmiştir. Yapılacak çalışmaların gerektirdiği doğrultuda, mezenkimal kök hücreler yeterli sayıya ulaşana kadar özel besiyeri içerisinde 37⁰C'de inkübe edilmiştir. Etken maddelerin sitotoksik etkileri WST-1 testi ile zaman ve doz bağımlı olarak değerlendirilmiştir. Canlılık ve proliferasyon analizleri ışık mikroskobu kullanılarak ve hücre sayımı yapılarak belirlenmiştir. BD Accuri C6 flow sitometri cihazı kullanılarak apoptoz ve hücre canlılığı değerlendirmeleri yapılmıştır. Biyokimyasal yöntemlerle lipid peroksidasyonu, glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT) aktivitesi ve superoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ölçülmüştür.

Gruplara uygulanan ajanların sitotoksik dozları WST-1 testi ile değerlendirilmiştir. Anneksin V yöntemi ile nekrotik, erken apoptotik, geç apoptotik, toplam apoptotik ve canlı hücreler hem yüzde olarak hem de hücre/ml olarak hesaplanmıştır. Oksidatif stresle oluşan ve reaktif oksijen metabolitlerinin verdiği zararı belirlemek amacıyla lipid peroksidasyonu, glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT) aktivitesi ve superoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ölçülmüştür.

Sıçan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler için Sunitinib IC₅₀ dozu (48. saat) için 44, 57 µM olarak hesaplanmıştır. Oksitosin için ise çalışılan dozlarda sitotoksik etki

gözlemlenmemiştir. Bu yüzden en yüksek sabit doz olan 100 µM ile çalışmaya devam edilmiştir. BD Accuri C6 flow sitometri cihazı ile yapılan ölçümler ve yapılan hesaplamalar doğrultusunda kontrol grubundaki hücrelerde ölü hücre yüzdesi 1,03; canlı hücre yüzdesi 98,97 olarak hesaplanmıştır. Oksitosin grubundaki hücrelerde ölü hücre yüzdesi 2,59, canlı hücre yüzdesi 97,41 olarak hesaplanmıştır. Sunitinib grubunda erken apoptoz oranı %7,69; geç apoptoz oranı %4,31; ölü hücre %8,10; canlı hücre %79,90 olarak hesaplanmıştır. Sunitinib+Oksitosin kombine grup sonuçlarında ise erken apoptoz oranı %3,90; geç apoptoz oranı %1,34; ölü hücreler %7,81; canlı hücreler %25,5 olarak ölçülmüştür. Biyokimyasal bulgular ise MDA düzeylerinde Kontrol grubu, GSH-Px düzeyleri açısından Sunitinib grubu, CAT düzeyleri açısından oksitosin grubunda değişiklik olmadığı için güven aralıkları diğer gruplara göre hesaplandı, SOD düzeyleri bakımından ise kontrol ile diğer üç grup arasında farklar anlamlı bulunurken, diğer gruplar arasında hiçbir ikili farklılık anlamlı bulunmadı. Tüm gruplar arası ikili farkların tümü istatistiksel olarak anlamlı olarak saptanmıştır (p<0.001).

Çalışmada, literatür taraması sonucunda sunitinibin mezenkimal kök hücrelerde üzerinde apoptozu arttırması beklenmektedir. Oksitosinin hücre proliferasyonu düzenlediğini gösteren bulgular bulunmaktadır ancak, Oksitosinin antiapoptotik etkileri bu çalışmanın kombine grupta oksitosinin sunitinib etkisini baskılayamadığı görülmüştür.

Anahtar Kelimeler; Sunitinib; Oksitosin; Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre; Oksidatif Stres

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF OXYTOSIN ON MESENCIMAL STEM CELLS EXPOSED TO SUNITINIB

Mesenchymal stem cells are essential treatment methods used in experimental and clinical studies. Nowadays, mesenchymal stem cell therapy is used in many various diseases. In addition to immunosuppressive drug therapy used after organ transplants, a mesenchymal stem cell application can also be utilized in the patient's treatment. In this experimental study, the cytotoxic effects of Sunitinib drug, which is used for immunosuppressive purposes in organ transplants, on mesenchymal stem cells which is derivated from adipose tissue and the toxicity effect on oxytocin (known to have antioxidant properties) were inspected.

A mesenchymal stem cell line derived from mouse adipose tissue was commercially available. In line with the work to be done, stromal stem cells were incubated at 37°C in a special medium until they reached a sufficient number. The cytotoxic effects of the active ingredients were evaluated using the WST-1 assay in a time and dose-dependent manner. Viability and prevalence analyze were determined using light microscopy and cell counting. Apoptosis and cell viability were assessed with a BD Accuri C6 flow cytometer analyzer. Lipid peroxidation, glutathione peroxidase (GPx), catalase activity (CAT), and superoxide dismutase (SOD) activity were measured by biochemical methods.

The cytotoxic doses of agents applied to the groups were assessed by the WST-1 assay. Necrotic, early apoptotic, late apoptotic, total, and viable cells were calculated in both percentage and cell/ml by the Annexin V method. The effect of lipid peroxidation, glutathione peroxidase (GPx), catalase activity (CAT), and superoxide dismutase activity (SOD) was measured in order to determine the damage due to oxidative stress and reactive oxygen metabolites.

The IC₅₀ dose of Sunitinib in mesenchymal stem cells derived from adipose tissue of mice (48 h) was calculated as 44.57 µM. For oxytocin, no cytotoxic effect was observed at the studied doses. Therefore, the study continued with the highest stable dose of 100 µM. According to the measurements and calculations made with the BD Accuri C6 cellular device, the percentage of dead cells in cells in the control group was calculated at 1.03 and

the percentage of live cells was 98.97. The percentage of dead cells in the cells in the oxytocin group was 2.59 and the percentage of live cells was 97.41. In the sunitinib group, the rate of early apoptosis was 7.69%, late apoptosis rate 4.31%, dead cells 8.10%, and live-cell 79.90%. In the results of the pooled Sunitinib + oxytocin group, the rate of early apoptosis was 3.90%, the rate of late apoptosis was 1.34%, the percentage of dead cells 7.81, and the percentage of live cells 25.5. As for the biochemical results, confidence intervals were calculated according to the other groups as there was no change in MDA levels in the control group, GSH-Px levels in the Sunitinib group, and CAT levels in the oxytocin group, and there was no significant difference between the groups. All marital differences between all groups were statistically significant ($p < 0.001$).

In this study, as a result of a review of the literature, Sunitinib is expected to increase apoptosis over mesenchymal stem cells. There are results showing that oxytocin regulates cell proliferation, but the anti-inflammatory effects of oxytocin were found unable to suppress the sunitocin effect of oxytocin in the co-group for this study.

Keywords Sunitinib; Oxytosin; Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells; Oxidative Stress

İçindekiler

ÖNSÖZ.....	II
ÖZET.....	III
ABSTRACT	V
İçindekiler	VII
Tablolar Dizini.....	IX
Şekiller Dizini.....	X
Kısaltma Listesi	XII
Giriş	1
Genel Bilgiler	4
1.1 Kök Hücre Nedir?.....	4
1.2 Kök Hücrelerin Genel Özellikleri.....	6
1.2.1 Pluripotensi (Köklülük)	6
1.2.2 Kendini Yenileme	6
1.2.3 Farklılaşma	6
1.3 Kök Hücre Kaynakları.....	7
1.3.1 Erişkin Kök Hücreler.....	8
1.3.1.1 Mezenkimal Kök Hücreler	8
1.4 Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmün Sistem Üzerindeki Etkileri.....	10
1.4.1 Graft Versus Host Hastalığında Mezenkimal Kök Hücre Uygulaması	11
1.5 İmmüsupresyon.....	12
1.5.1 İmmüsupresif Ajanlar	13
1.5.1.1 Sunitinib ve Etki Mekanizması	13
1.6 Oksitosin ve Hücre Tedavideki Yeri.....	14
Gereç ve Yöntem	16
2.1 Hücre Kültürü Çalışmaları	16
2.1.1 Hücrelerin Kültür Ortamında Çoğaltılması.....	16
2.1.2 Hücre Canlılığının Hesaplanması.....	17
2.1.3 Hücrelerin Pasajlanması	18
2.1.4 Hücrelerin Dondurulması	19
2.2 Etken Maddelerin Kullanıma Hazırlanması.....	19
2.3 Sitotoksikite Testleri	20

2.4	Kombinasyon Gruplarının Oluşturulması	21
2.5	Annexin V Yöntemi ile Apoptotik Hücre Analizi	22
2.6	Oksidatif Stres Analiz Parametreleri.....	24
2.6.1	Lipit Peroksidasyonu (MDA) Ölçümü	25
2.6.2	Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Ölçümü	26
2.6.3	Katalaz (CAT) Aktivitesi Ölçümü	28
2.6.4	Superoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Ölçümü	30
2.7	İstatistiksel Değerlendirme Yöntemi	39
	Bulgular.....	40
3.1	Sunitinib ve Oksitosinin Sıçan ADKMKH Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi.....	40
3.2	Annexin V Yöntemi ile Yapılan Apoptoz Analizi Bulguları	41
3.3	Hücre Canlılık Analizlerinin İstatistiksel Değerlendirilmesi.....	43
3.3.1	Nekrotik Hücre Yüzdesi	43
3.3.2	Geç Apoptoz/Ölü Yüzdesi.....	44
3.3.3	Erken Apoptoz Yüzdesi	45
3.3.4	Canlı Hücre Yüzdesi	46
3.4	Oksidatif Stres Analiz Parametreleri Bulguları.....	47
3.4.1	Lipit Peroksidasyonu (MDA) Ölçümü Bulgusu	47
3.4.2	Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Ölçümü Bulgusu	48
3.4.3	Katalaz (CAT) Aktivitesi Ölçümü Bulgusu	50
3.4.4	Superoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Ölçümü Bulgusu	51
3.5	Oksidatif Stres Parametrelerinin İstatistiksel Değerlendirilmesi.....	52
3.5.1	Lipit Peroksidasyon (MDA) Düzeyi.....	52
3.5.2	Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Düzeyi.....	53
3.5.3	Katalaz (CAT) Düzeyi.....	54
3.5.4.	Superoksit Dismutaz (SOD) Düzeyi.....	55
	Tartışma	58
	Sonuç ve Öneriler	70
	KAYNAKLAR.....	71
	TEŞEKKÜR.....	81
	Özgeçmiş	82

Tablolar Dizini

Tablo 1 Sitotoksisite testi plak planı.....	21
Tablo 2. Kombinasyon grubunun oluşturulma planı.....	22
Tablo 3. Lipit peroksidasyonu ölçümü için hazırlanan plak yerleşim planı.	26
Tablo 4. Glutatyon peroksidaz ölçümü için hazırlanan plak yerleşim planı	27
Tablo 5. Katalaz aktivitesi ölçümü için hazırlanan plak yerleşim planı	29
Tablo 6. Superoksit dismutaz aktivitesi ölçümü için hazırlanan plak yerleşim planı.	30
Tablo 7. Hücre canlılığı analizlerinin istatistiksel değerlendirme tablosu.	56
Tablo 8. Biyokimyasal parametrelerin istatistiksel değerlendirme tablosu.....	57



Şekiller Dizini

Şekil 1. Farklılaşabilme yeteneklerine göre kök hücre türleri.	5
Şekil 2. Kök hücre kaynakları.....	7
Şekil 3. Mezenkimal kök hücre kaynakları.....	8
Şekil 4. Mezenkimal kök hücrelerin immünmodülatör özellikleri	11
Şekil 5. T hücre aktivasyonu için gereken 3 sinyal.....	12
Şekil 6. Spesifik RTK'ler Sunitinib tarafından bloke edilir (kimyasal yapı gösterilmiştir).	14
Şekil 7. MKH hücrelerinin kültüre edilmesinde kullanılan besiyeri	16
Şekil 8. 75- c m ² lik flasklara ekilen sıçan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler.....	17
Şekil 9. Sıçan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin üçüncü pasajdaki mikroskop görünümü.	19
Şekil 10. Deneysel çalışmada kullanılan etken maddeler (Oksitosin ve Sunitinib).....	20
Şekil 11. BD Accuri C6 Flow Sitometri Cihazının görünümü.	24
Şekil 12. Lipit Peroksidasyonu ölçümünde kullanılan plak	26
Şekil 13. Glutatyon Peroksidaz ölçümünde kullanılan plak.....	28
Şekil 14 . Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan plak.....	29
Şekil 15. Superoksit Dismutaz aktivitesi ölçümünde kullanılan plak.....	30
Şekil 16. Annexin V boyaması sonrası deney gruplarının mikroskopik olarak gösterilmesi.	42

Grafikler Dizini

Grafik 1. Kök hücrelerde Sunitinib ve Oksitosinin sitotoksik etkisi	40
Grafik 2. ADKMKH'lerinde Sunitinib ve Oksitosin kombinasyon dozları.	41
Grafik 3. Accuri C6 Flow Sitometri cihazı ile yapılan ölçümlerin gruplara göre dağılımı	41
Grafik 4. Nekrotik hücre yüzdesi istatistiksel grafiği.	43
Grafik 5. Geç apoptoz/ölü yüzdesi istatistiksel grafiği.	44
Grafik 6. Erken apoptoz yüzdesi istatistiksel grafiği.	45
Grafik 7. Canlı hücre yüzdesi istatistiksel grafiği.	46
Grafik 8. MDA standart eğrisi	47
Grafik 9. MDA aktivitesi grafiği.....	47
Grafik 10. MDA aktivitesi kat değişimi.....	48
Grafik 11 . NADPH standart eğrisi.	48
Grafik 12 . Total glutatyon grafiği	49
Grafik 13. Total glutatyon kat değişimi grafiği	49
Grafik 14. H ₂ O ₂ standart eğrisi	50
Grafik 15. Katalaz aktivitesi grafiği.....	50
Grafik 16. Katalaz aktivitesi kat değişim grafiği	51
Grafik 17. SOD aktivitesi.....	51
Grafik 18. SOD aktivitesi kat değişimi grafiği	52
Grafik 19. GSH-Px düzeyi istatistiksel grafiği.	53
Grafik 20. Katalaz düzeyi istatistiksel grafiği.....	54
Grafik 21. SOD düzeyi istatistiksel grafiği.	55

Kısaltma Listesi

CD	Clusters of Differentiation
HLA	İnsan Lökosit Antijeni
SVF	Stromal Vascular Fraction
CFU-F	Fibroblast kolonisi oluşturan birim
EKH	Embriyonik kök hücre
MKH	Mezenkimal kök hücre
ADKMKH	Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler
ECM	Hücre-hücre dışı matriks
EGF	Epidermal Growth Factor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Receptor
Flt3	Fms-like Tyrosine Kinase-3
FasL/FasR	Fas ligand/ Fas Reseptör etkileşimi
TCR	T hücre reseptörü
IL	İnterlökin
TNF	Tumor Necrosis Factor
NK	Naturel Killer
MHC	Major Histocompatibility Complex
IGN	Interferon
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
PG	Prostoglandin
NO	Nitric Oxide
Th T	Helper cells
Treg	Regulatory T Cells
Ig	İmmunoglobulin
RTK	Reseptör tirozin kinaz
RK	Reseptör kinazlar
NRK	Reseptör olmayan sitoplazmik kinazlar
APC	Antijen sunan hücreler

KIT	Kök hücre faktörü reseptörü
PNET	Primer primit nöroektodermal tümör
MDSC	Miyeloid türevi baskılayıcı hücreleri
DC	Dendritic cell
GVHD	Graft Versus Host Hastalığı
mRCC	Metastatic renal hücreli karsinom
GIST	Gastrointestinal stromal tümör
NET	Nöroendokrin tümör
OT	Oksitosin
OTR	Oksitosin reseptörü
PVN	Paraventriküler nukleus
SON	Supraoptik nukleus
DMSO	Dimetilsülfoksit
FBS	Fetal Bovine Serum
DMEM/F-12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture
PS	Phosphatidylserine
PBS	Phosphate buffered saline
MDA	Malondialdehit
D	Dilasyon Faktörü
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
CAT	Katalaz
SOD	Superoksit Dismutaz
ATP	Adenozin Trifosfat
LL/2	Lewis akciğer karsinom hücre hattı
MCF7	Meme kanseri hücre hattı
CML	Kronik miyelojen lösemi
ZFL	Zebrafish hücre hattı
HepG2	Hepataselüler hücre hattı

GİRİŞ

Organ ve doku nakli, modern tıpta en çok tercih edilen tedavilerdendir. Vücuttan çıkarılan bir organın veya dokunun hasarlı ya da eksik bir organ ve dokunun yerini almak için alıcının vücuduna yerleştirildiği tıbbi bir uygulamadır (Bezinover ve Saner, 2019). Çoğu zaman organ nakilleri sırasında karşılaşılan en büyük sorun dokunun alıcı vücut tarafından reddedilmesidir. Alıcının kendi doku ve hücrelerinin tekrar kendine nakledilmesinde bir sorun oluşmamaktadır. Çünkü alıcı vücut kendi doku ve hücrelerini tanımaktadır ve bağışıklık sisteminde sorun yaratmaz. Ancak başka kişilerden alıcıya yapılan transplantasyon uygulamalarında, alıcı vücuduna giren yabancı doku, organ ve hücreler alıcının bağışıklık sistemi tarafından tanınmayarak vücudu korumaya almaya çalışarak yabancı dokuları, organları ve hücreleri reddetmektedir. Bu sorunun ortadan kalkması organ nakillerindeki başarı düzeyinin artmasını sağlamaktadır (Progress ve Fishman, 2007).

Transplantasyon uygulamalarında, alıcının nakledilen yabancı dokulara karşı bağışıklık yanıtını baskılamak için immünsupresif ajanlar kullanılmaktadır. İmmünsupresif tedavinin amacı, greftin yıkıcı immün yanıtını önlemektir. Bağışıklık sisteminde yer alan T hücreleri immün yanıtın oluşturulmasında oldukça önemli bir alana sahiptirler. İmmünsupresif ajanlar vericiden alıcıya aktarılan transplantasyonlarda T hücrelerinin proliferasyonunu, farklılaşmasını, antikör üretmesini ve antijeni tanınması gibi işlevleri baskılamaktadır (Hartono, Muthukumar ve Suthanthiran, 2013; Wiseman, 2016).

Sunitinib, bu çalışmada kullanılan immünsupresif ajandır. Sunitinib, aynı zamanda Sutent ve SU11248 olarak da bilinen küçük molekül, çok hedefli bir reseptör tirozin kinaz (RTK) inhibitörüdür. Sunitinib etken maddesinin en çok bilinen işlevi anjiyogenez ve tümör büyümesini inhibe etmesidir ancak aynı zamanda bağışıklık sisteminin işlevi ile etkileşime girme potansiyeline sahiptir. Düzenleyici T hücreleri (Treg) sunitinib tedavisinden sonra baskılandığı gösterilmiştir (Finke ve ark., 2008). Ayrıca, sunitinib immün baskılayıcı sitokinlerin ve yardımcı uyarıcı moleküllerin ekspresyonunu azaltır. Sunitinib ile tedaviden elde edilen verilere göre T hücrelerinin daha güçlü sitotoksik aktivite sergilediği kanıtlanmıştır (Ozao-Choy ve ark., 2009).

Mezenkimal kök hücreler (MKH); mezoderm tabakasından gelişen erişkin dokuda bulunan kendi kendilerini yenileyebilen ve farklılaşabilen bir kök hücre türüdür. MKH'ler

günümüzde birçok farklı araştırma için umut vaat etmektedir. MKH'ler ortamda bulunan farklı koşullara göre farklılaşabilmektedirler. Birçok farklı kaynaktan kolayca elde edilebilir olması ve etik kısıtlaması bulunmadığı için araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Ullah, Subbarao ve Rho, 2015). MKH'ler, farklılaşabilme ve hasarlı doku hücresel progenitörlerinden doku yenilenmesini yapabilme yeteneklerinden dolayı rejeneratif tıpta sıklıkla kullanılmaktadır. Bu rejeneratif özelliklere ek olarak, MKH'ler bir immüno-regülasyon kapasitesine sahiptir ve bir dizi durumda immünsupresif etkiler ortaya çıkarmaktadır. *In vitro* çalışmalarda, MKH'ler T hücrelerinin, B hücrelerinin, doğal öldürücü hücrelerin (NK) ve dendritik hücrelerin (DC) hücre çoğalmasını inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca, MKH'ler T ve NK hücrelerinin sitokin salgılanması ve sitotoksitesisi; B hücresi olgunlaşması ve antikor salgılanması; DC olgunlaşması ve aktivasyonu; yanı sıra antijen sunumu gibi çeşitli immün hücre fonksiyonlarını durdurabilir (De Miguel ve ark., 2012). MKH'ler bu özellikleri sayesinde klinik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. MKH'lerin immünsupresyon etkileri olduğu için organ nakli sırasında kullanılan kimyasal ajanların yanı sıra MKH'ler de alıcıya nakledilmektedir ve bu durumun yaşam kalitesini artırdığı kanıtlanmıştır (Ghannam, Bouffi, Djouad, Jorgensen ve Noël, 2010). Bu çalışmada da kullanılan sunitinib uygulanan hastalar üzerinde toksik etki bırakabilmektedir (Hao ve Sadek, 2016). Ancak MKH'ler üzerinde kanıtlanmış toksik bir etkisi henüz bilinmemektedir.

Oksitosin, hipotalamusun paraventriküler ve supraoptik nükleuslardaki magnoselüler nöronlarda sentezlenen bir peptid hormonu ve nöropeptiddir. Oksitosin reseptörleri, amigdala, ventromedial hipotalamus, beyin sapı ve nucleus accumbens dâhil olmak üzere beyinde dağılmaktadır. Ayrıca, kalp, testis, uterus, plasenta, amniyon, korpus luteum ve adipoz doku gibi bazı diğer dokular oksitosin üretmektedir. Oksitosin ve MKH'ler üzerinde yapılan birkaç çalışmada oksitosinin, osteoblast/adiposit dengesini düzenlendiği belirtilmiştir. Ayrıca; hücre canlılığı ve proliferasyonunun oksitosin tedavisi sonrasında arttığı gözlemlenmiştir (Jones, Barrera, Brothers, Ring ve Wahlestedt, 2017).

Yapılan bu deneysel çalışma; organ ve doku nakilleri sırasında kullanılan immünsupresif ilaç görevi gören sunitinibin sıçan ADKMKH üzerinde sitotoksik etki yapıp yapmayacağı

ve antioksidan bir ajan olan oksitosinin, görülmesi olası toksik etkinin azaltılması için kullanılma potansiyelini araştırılmıştır.



GENEL BİLGİLER

1.1 KÖK HÜCRE NEDİR?

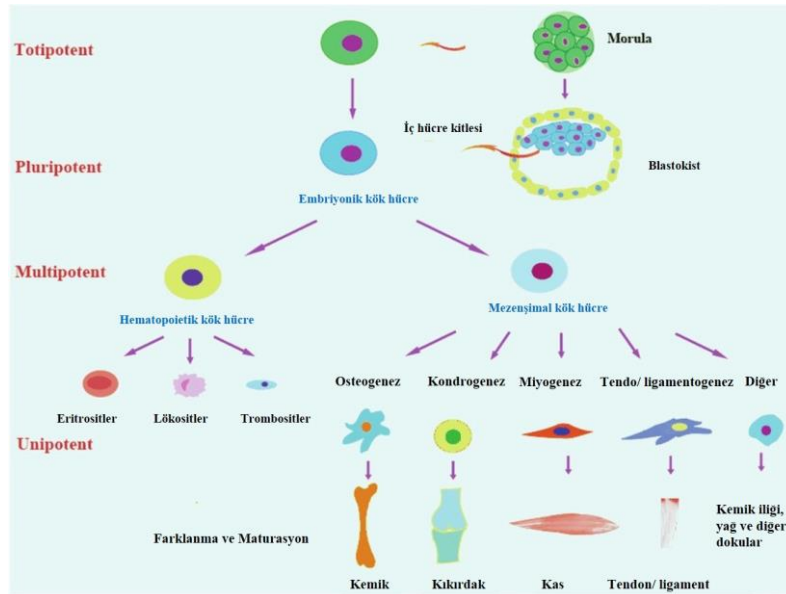
Kök hücreler vücutta bulunan özelleşmemiş hücre tipleridir. Bir organizmada bulunan herhangi bir hücre tipine farklılaşabilme ve kendini yenileme yeteneğine sahip hücrelerdir. Kök hücreler hem embriyolarda hem de yetişkin hücrelerde bulunmaktadır (Zakrzewski, Dobrzyński, Szymonowicz ve Rybak, 2019). Kök hücreler kaynak hücre ile tamamen aynı döl üretmek için sınırsız bir şekilde kendini yenilemektedir. Kök hücreler için bulundukları ortam çok önemlidir, örneğin, sağlıklı bir hayvanın bir parçası haline gelen özel bir hücre türüne yol açabilmektedirler (Biehl ve Russell, 2009). Kök hücreler sınırsız bölünebilme özelliğinden dolayı doğumda oluşan kusurlar, hastalık veya yaş nedeniyle oluşan dokuların ve organ anomalilerinin onarımını sağlamaktadır. Bu yüzden, rejeneratif tıp için oldukça önemli bir kaynaktır. Kök hücreler, vücudun tüm doku ve organ sisteminin temelini oluşturmaktadır ve konakçıdaki hastalık ilerlemesi, gelişimi ve doku onarım süreçlerinde çeşitli rollere aracılık etmektedir (Mahla, 2016).

Bir oositin spermatozoon ile döllenmesi zigot oluşturmaktadır. Birkaç ardışık hücre bölünmesi, 32-64 kez bölünerek morula üretir. Bu aşamadan sonra, içi boş bir hücre kitlesi oluşur ve blastosiste dönüşür. Blastosistin periferik hücreleri (trofoblast) embriyonik zarları ve plasentayı oluştururken iç hücre kütesinden fetüs gelişir. Embriyonun daha da gelişmesi, tam organizmanın geliştiği üç germ katmanından (ektoderm, mezoderm ve endoderm) oluşan gastrula oluşumuna yol açar (Chagastelles ve Nardi, 2011).

Kök hücrelerin özelleşmesi bazı adımlardan geçmektedir. Her bir adımda gelişimsel gücü azalmaktadır, bu da unipotent bir kök hücrenin pluripotent bir hücre kadar farklı hücre tipine ayrılamadığı anlamına gelir. *Totipotent kök hücreler* organizmadaki tüm hücre tiplerine farklılaşabilme potansiyelindedir. Totipotensi en yüksek farklılaşma potansiyeline sahip kök hücre türüdür ve hücrelerin hem embriyonal hem de ekstra embriyonik yapıların oluşumuna izin verir. Spermin yumurtayı döledikten sonra oluşturduğu zigot bu hücre tipine bir örnektir. Bu hücreler daha sonra üç germ katmanından herhangi birine dönüşebilir veya bir plasenta oluşturabilir. Yaklaşık 4 gün sonra, blastosist iç hücre kitlesi pluripotent hale gelir. Bu yapı pluripotent hücre kaynağıdır (Baker ve Pera, 2018).

Pluripotent kök hücreler, bölünerek kendi kendini yenileme kapasitesine sahip ve erken embriyonun üç primer germ katmanına ve dolayısıyla yetişkin vücudun tüm hücrelerine dönüşme kapasitesine sahip olan, ancak plasenta gibi ekstra embriyonik dokulara dönüşmeyen hücrelerdir. Embriyonik kök hücreler ve uyarılmış pluripotent kök hücreler pluripotent kök hücrelere örnektir (Romito ve Cobellis, 2016). *Multipotent kök hücreler*, bölünerek ve belirli bir doku veya organda bulunan çoklu özelleşmiş hücre tiplerine dönüşerek kendini yenileme kapasitesine sahip hücrelerdir. Çeşitli kan hücresi tiplerine dönüşebilen hematopoietik kök hücreler buna bir örnektir. Farklılaşmadan sonra, hematopoietik bir kök hücre bir oligopotent hücre haline gelir. Farklılaşma yetenekleri kendi soyundaki hücrelerle sınırlıdır (Díez Villanueva ve ark., 2012).

Oligopotent kök hücreler, belirli bir dokunun farklılaşma kapasitesine sahip kısıtlı soylar sergilerler. Miyeloid kök hücre, beyaz kan hücrelerine bölünebilen ancak kırmızı kan hücrelerine bölünemeyen hücreler buna bir örnektir (Xu, He, Zhang, Xu ve Wang, 2019). *Unipotent kök hücreler*, en az farklılaşma yeteneğine sahiptir ve bu hücrelerin en önemli özelliği tekrar tekrar bölünebilmesidir. İkinci özellikleri onları rejeneratif tıpta terapötik kullanım için umut verici bir aday yapmasıdır. Bu hücreler yalnızca bir hücre tipi oluşturabilir (Kolatkar ve ark., 2016).



Şekil 1. Farklılaşabilme yeteneklerine göre kök hücre türleri (Zhang, Hu ve Athanasiou, 2009).

1.2 KÖK HÜCRELERİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Kök hücreler diğer hücre türlerinden farklıdır. Kök hücreler genel olarak; pluripotensi (köklülük), kendi kendisini yenileyebilme ve farklı hücre tiplerine farklılaşabilme özelliği olan hücrelerdir.

1.2.1 Pluripotensi (Köklülük)

Kök hücreleri diğer hücrelerden ayıran en önemli özelliklerinden biri köklülüktür (stemness). Bu özellik sayesinde kök hücreler farklılaşmadan kalabilmektedir. Kök hücre proteinleri farklı bir gen kümesine sahiptir. Bunun sebebi hücre içinde ve dışında farklı sinyallere maruz kalmalarıdır. Kök hücre, çevreden gelen belirli sinyallere maruz kaldığında çoğalmayı, farklılaşmayı veya sessiz kalmayı sağlayan bazı “köklülük” genleri bulundurur. Hücre sinyal yollarında veya hücrelerin yüzeyinde bulunan bir takım hücre-hücre yapışma molekülleri olarak görev alan belirteçler bulunur. Bu belirteçlerin çoğu, farklılaştırma kümeleri (clusters of differentiation) “CD” olarak tanımlanmaktadır (Chen, You, Jiang ve Wang, 2017).

1.2.2 Kendini Yenileme

Kendini yenileme; hücrenin simetrik veya asimetrik bölünerek yeni hücreler meydana getirme işlemidir. Kök hücreler, yaşam boyunca kendi kendilerini yenileme potansiyeline sahip hücrelerdir. Bu özellikleri sayesinde, doku homeostazının korunmasında ve hasarların onarımında önemli rol oynamaktadır. Asimetrik hücre bölünmesi sırasında, her bir kök hücre, yeni bir kök hücre üretir ve bir tane de farklılaşmaya giden bir kök hücre üretir. Simetrik hücre bölünmesi sırasında ise, her bir kök hücre, iki yeni kök hücre veya iki farklı hücre oluşturmak için simetrik olarak bölünmektedir. Her bir kök hücre simetrik veya asimetrik olarak bölünebilir (Sada ve Tumber, 2013).

1.2.3 Farklılaşma

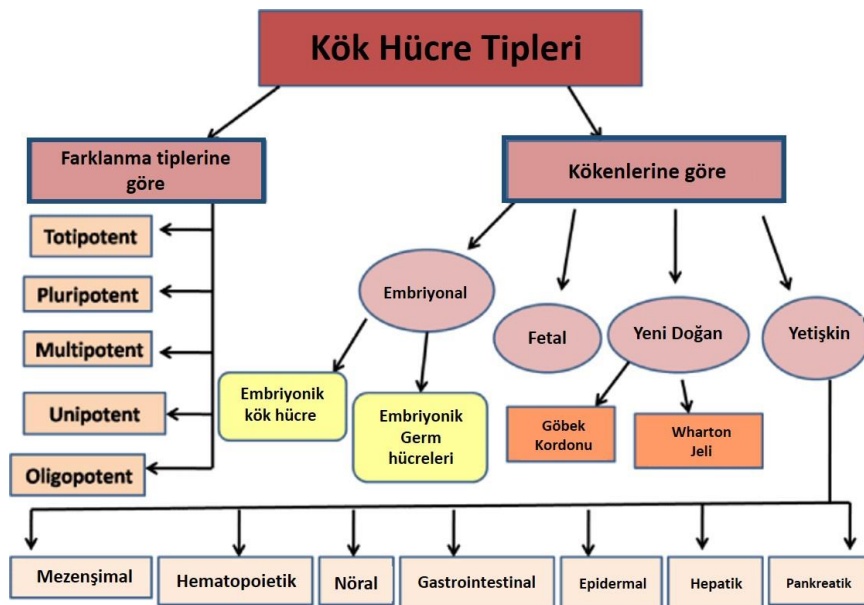
Farklılaşma, hücrenin bir hücre tipinden diğer hücre tipine değiştiği süreçtir. Spesifik kök hücrelerin veya progenitörlerin farklılaşması ve çoğalması arasındaki bağlantı ile düzenlenir. Kök hücreler, birçok farklı hücre tipine farklılaşma potansiyeli olan hücre türüdür. Bununla birlikte, kök hücre çoğalması, istenmeyen bir hücre tipinin, istenmeyen bir yerde veya zamanda, doğal fizyolojik durum üzerinde zararlı bir etkiye sahip olabilen istenmeyen farklılaşmasına da yol açabilir. Bu istenmeyen yanıtları önlemek için, kök

hücreler uygun biyolojik ortamda farklılaşma yanıtı sağlayan ayrıntılı mekanizmalar ve kontrol noktaları geliştirmiştir. Büyüme faktörleri ve sitokinler, hücre-hücre temasları, hücre-hücre dışı matris (ECM) temasları ve fiziksel kuvvetler dâhil olmak üzere kök hücre farklılaşmasında bir dizi faktörün rol oynadığı gösterilmiştir (Xu ve ark., 2019).

1.3 KÖK HÜCRE KAYNAKLARI

Multipotent kök hücreler sınırlı sayıda hücre tipine farklılaşma yeteneğine sahiptir. Pluripotent kök hücreler ise, yetişkin vücutta bulunan hücre tiplerinden herhangi birine farklılaşma yeteneğine sahiptir. Pluripotent kök hücreler embriyonik kök hücrelerdir. Bu durumda, kök hücre kaynakları embriyonik kök hücreler ile embriyonik kökenli olmayan kök hücreler olarak ayrılmaktadır.

Embriyonik kökenli olmayan kök hücreler, çeşitli gelişmekte olan fetal dokulardan veya yetişkin fonksiyonel dokularından türetilmektedir. Kadavradan elde edilen kök hücreler, fetal kök hücreler, plasenta ve göbek kordonu kök hücreleri bunlara örnektir. Ayrıca, nöroektodermal ve nöroektodermal olmayan soylardan köken alan kök hücreler de bulunmaktadır. Bu tür kök hücreler, yetişkin vücutta bulunan deri, kalp, kas, yağ, kemik, kan ve sinir gibi birçok doku ve organlarda meydana gelen hasarların onarımı ve iyileşmesini sağlamaktadır (Canto-Soler, Flores-Bellver ve Vergara, 2016).



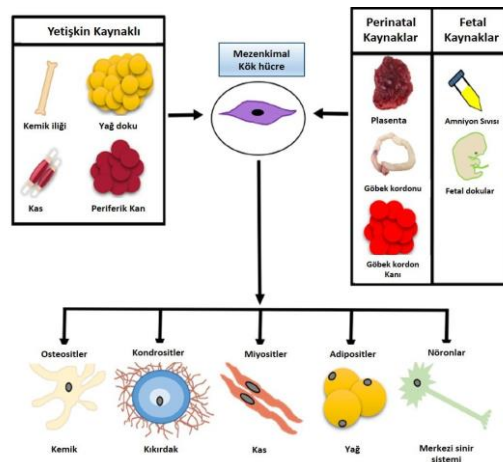
Şekil 2. Kök Hücre Kaynakları (EL Barky, 2017).

1.3.1 Erişkin Kök Hücreler

Yetişkin kök hücreleri doğum sonrası yaşamında vücutta bulunan farklılaşmamış hücrelerin oluşturduğu bir popülasyondur. Sınırlı bir farklılaşma potansiyeline sahip olan veya tek bir spesifik hücre tipi üretebilen progenitör hücrelerdir. Yetişkin kök hücreler aynı zamanda somatik kök hücreler veya doku kök hücreleri olarak da bilinir (Łos, Skubis ve Ghavami, 2018). Her üç germ katmanının hücre tiplerine farklılaşabilen pluripotent kök hücrelerin aksine, yetişkin kök hücreler, belirli bir dokunun çoklu hücre tiplerine neden olur. Yapılan çalışmalar yetişkin kök hücrelerde farklı germ katmanındaki hücrelerin birbirlerinden türevlendiğini göstermektedir. Bu durum da yetişkin kök hücrelerin plastisite özelliğinin korunduğunu belirtmektedir (Hansen ve Inselman, 2011; Nambisan, 2017).

1.3.1.1 Mezenkimal Kök Hücreler

1970 yılında Friedenstein ve arkadaşları kemik iliğinin hematopoietik kök hücre popülasyonu ve stromal hücre popülasyonu içerdiğini keşfetmişlerdir. Daha sonra, 1980’lerde Pittenger ve arkadaşları insan kemik iliğinde mezenkimal potansiyele sahip olan koloniler bulmuştur ve multipotent kök hücreler olan bir stromal hücre alt popülasyonu içerdiğini saptamıştır (Mizukami ve Swiech, 2018). Ortamda bulunan farklı koşullar sayesinde MKH’ler bulundukları organlarda farklı bir görünüm kazanma yeteneğine sahiptirler. MKH’lerin en büyük özelliklerinden biri ise hasarlı dokuya göç edip dokuda yapım ve onarımı sağlamasıdır. Böylece, birçok organda bulunan hasarı giderebilmektedir (Lindner ve Schlenke, 2010; Caplan, 2017).



Şekil 3. Mezenkimal Kök Hücre Kaynakları (Rui , 2019).

MKH'ler için belirlenmiş spesifik bir hücre yüzey belirteci bulunmamaktadır. CD105, CD90 ve CD73 belirteçlerinin bulunduğu CD45, CD34, CD14 ve CD11b gibi hematopoetik belirteçlerin bulunmadığı belirtilmiştir. Ayrıca MKH'lerin CD29, CD13, CD166, CD44 ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü bulundurdıkları belirtilmiştir. Standart kültür koşullarında plastik yüzeye uyum sağlamaktadır. Yüzeylerinde CD73 (SH3/4), CD90, CD105 (SH2) gibi hematopoetik olmayan yüzey belirteçlerini eksprese etmektedir. CD34, CD45, HLA-DR, CD14 veya CD11b, CD79a veya CD19 gibi hematopoetik olan yüzey belirteçlerini eksprese etmemektedir. MKH'ler *in vitro* koşullarda osteoblastlar, adipositler ve kondroblastlara farklılaşabilmektedir (Fitzsimmons, Mazurek, Soos ve Simmons, 2018).

Şu anda, dünya çapında MKH kullanılarak tedavi edilmeyi amaçlayan birçok kayıtlı farklı klinik araştırma bulunmaktadır. Klinik öncesi çalışmaların ilerlemesiyle MKH'lerin hem immün hastalıklar hem de immün olmayan hastalıklar dâhil olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir (Wei ve ark., 2013).

1.3.1.1.1 Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler

Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler (ADKMKH) her vücut bölümünden kolaylıkla hasat edilebildikleri ve daha az morbiditeye sahip oldukları için şimdiye kadar tanımlanan en umut verici kök hücre türü kabul edilmektedir. Yağ dokusu vücutta bol bulunduğundan dolayı ADKMKH'ler fazla sayıda elde edilebilmektedir. Deri altı (subkutan) yağ dokusu çok çabuk çoğalabilmesinden dolayı klinik çalışmalarda en çok tercih edilen ADKMKH kaynağıdır. Bu hücrelerin proliferasyon hızı ve kolay erişilebilir olması araştırmacılar için ilgi odağı olmuştur. Aynı zamanda, çeşitli soylara farklılaşabilmesi hücre terapisi ve doku mühendisliği alanları için büyük önem taşımaktadır (Si ve ark., 2019).

ADKMKH'ler mezoderm kökenli kök hücrelerdir. ADKMKH'ler adipojenik, osteojenik, kondrojenik, miyojenik, kardiyojenik ve nörojenik gibi farklı soylara farklılaşabilmektedir. Ancak göz kapağında bulunan yağ doku nöral krest ile benzer özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir ve ektodermal kökenlidir (Nepali, Park, Lew ve Kim, 2018). İzole edilen adipoz dokusunda stromal vasküler fraksiyon (SVF) bulunmaktadır. SVF, ADKMKH'ler, pre-adipositler, endotel hücreleri, fibroblastlar, endotel progenitör hücreleri, yerleşik monositler/makrofajlar, perisitler, vasküler düz kas hücreleri, lökositler, lenfositler ve

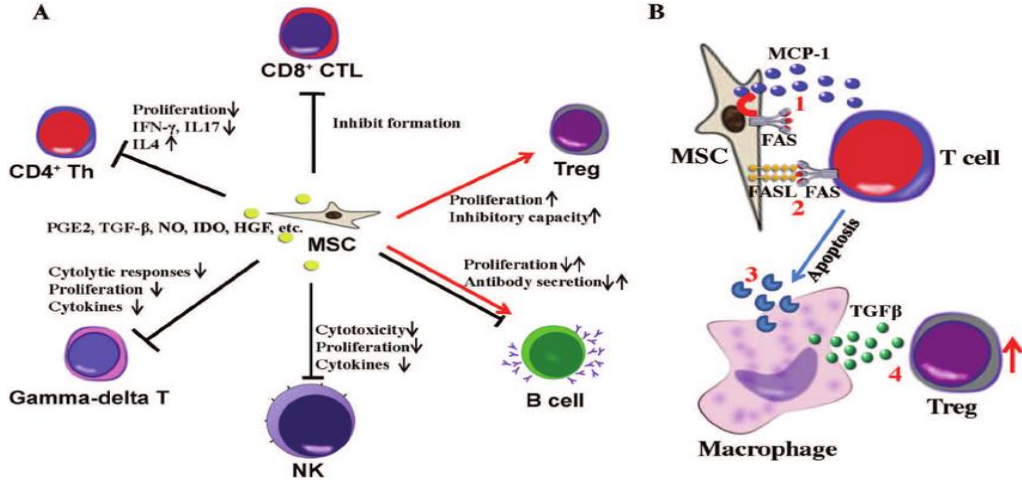
eritrositler içerir. SVF yağ hücrelerinden uzaklaştırılmaktadır. Adipoz dokuların bazı kriterleri bulunmaktadır. Bunlar;

- (1) Plastik yüzeye yapışma özelliği göstermeli,
- (2) Adipositlere, kondrositlere ve osteoblastlara farklılaşma potansiyeli olmalı,
- (3) Moleküler yüzey belirteçleri CD146, CD9, CD13, CD44, CD54, CD106, CD166, CD29, CD73, CD90, CD105, CD117, CD140b ve HLA I eksprese etmesi ve
- (4) CD19, CD45, CD133, CD144, CD11b, CD14, CD31, CD34 ve CD79 α eksprese etmemesidir (Francis, Duchi, Onofrillo, Di Bella ve Choong, 2018).

1.4 MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN İMMÜN SİSTEM ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Mezenkimal kök hücreler rejeneratif tıp ve doku tamiri alanlarında önemli birer aday olmalarının yanı sıra, diğer kök hücrelerden farklı olarak, benzersiz bağışıklık özellikleri taşımaktadır. Birçok organda transdiferansiye olma kapasitesi dışında, allojenik bariyerleri geçmesine izin veren immün-baskılayıcı etkileri bulunmaktadır (De Miguel ve ark., 2012).

MKH'ler ilk kez 2002'de Bartholomew ve arkadaşları tarafından immüsupresyonu modüle etme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir (Bartholomew ve ark., 2002). MKH'ler, B hücreleri, T hücreleri, dendritik hücreler (DC'ler), doğal öldürücü (NK) hücreler, nötrofil ve monositler/makrofajlar dâhil olmak üzere birçok çeşit bağışıklık hücresi ile etkileşime girebilir. Prostaglandin E2 (PGE-2), indoleamin 2,3-dioksijenaz (IDO) veya nitrik oksit (NO) gibi çözünür immün sekretomlar, MKH'ler tarafından immünregülasyonu aktive etmek için immün hücrelere yanıt verir. MKH'ler tarafından üretilen hücre dışı veziküller M2 makrofajların ve düzenleyici T hücrelerinin üretimini hızlandırırken, aynı zamanda monositlerin olgunlaşmasını, T hücreleri ve B hücrelerinin çoğalmasını baskılar. MKH'ler ayrıca inflamatuvar ilerlemeyi düzenleme ve inflamatuvar bölgelere yapışarak hasarlı hücreleri ve dokuları onarma yeteneğine sahiptir. Son çalışmalar apoptotik, metabolik olarak inaktive edilmiş ve parçalanmış MKH'lerin immünmodülatör kapasitelere sahip olduğunu göstermektedir (Wang, Yuan ve Xie, 2018; Weiss ve Dahlke, 2019).



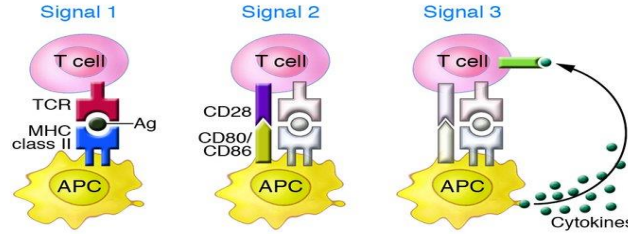
Şekil 4. Mezenkimal kök hücrelerin immünmodülatör özellikleri (Wang, Zhao ve Shi, 2012).

1.4.1 Graft Versus Host Hastalığında Mezenkimal Kök Hücre Uygulaması

Graft versus host hastalığı (GVHD), donörden alıcı hastaya kök hücreler ile birlikte nakil edildikten sonra donörden gelen immün hücreleri alıcı hasta konağının dokularına saldırdığında ortaya çıkan bağışıklık durumudur. Kök hücre nakli sonrası donörden alınan sağlıklı T hücreleri alıcı dokularına ciddi zarar vermektedir ve hayatı tehdit eden bir komplikasyon olarak tanımlanır. Bu sebepten dolayı immünsupresif ilaçlar GVHD için ciddi önem taşımaktadır. Yapılan birçok klinik çalışma mezenkimal kök hücrelerinin bağışıklık sistemi hücrelerinin proliferasyonunu ve sitotoksik aktiviteleri inhibe ettiği için GVHD tedavisinde etkili olduğunu bildirilmiştir (Introna ve ark., 2014). GVHD tedavisinde ilk kez mezenkimal kök hücre kullanılması Le Blanc ve arkadaşları tarafından başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Steroide dirençli akut GVHD tehşisi olan 9 yaşındaki bir çocukta haploidentik MKH infüzyonunun sonucunda hızlı iyileşme olduğu bildirilmiştir. Yapılan farklı çalışmalarda steroid dirençli akut GVHD tedavisinde MKH kullanımı sonrası tamamen iyileşme olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda MKH'ler GVHD tedavisi için önemli bir ajan haline gelmiştir (Amorin ve ark., 2014).

T hücresi özel bir antijen sinyali ve genel bir sinyal aldığında, sitokinler şeklinde daha fazla talimat alır. Bunlar, hücrenin ne tip yanıt vereceğini tanımlar- yardımcı T hücreleri durumunda, onları Th1 tipine (sitokin IL-12'ye maruz kalan hücreler), Th2 (IL-4) veya IL-17'ye (IL -6, IL-23). Bu hücrelerin her biri, dokuda ve daha fazla bağışıklık tepkisi üretmede belirli bir görevi yerine getirir (Jacobs ve ark., 2008).

Ortaya çıkan hücre popülasyonu, patojenle başa çıkmak için enfeksiyon veya inflamasyon bölgesine taşınır. Nötrofiller, mast hücreleri ve epitel hücreleri gibi inflamasyonun doku bölgesinde bulunan diğer hücreler de T hücrelerinin daha fazla aktivasyonunu ve proliferasyonunu indükleyen sitokinleri, kemokinleri, kısa peptidleri ve diğer molekülleri salabilir (Curtsinger ve Mescher, 2010).



Şekil 5. T hücre aktivasyonu için gereken 3 sinyal (Gutcher ve Becher, 2007).

1.5 İMMÜNSUPRESYON

Bağışıklık sistemi, patojenik mikroorganizmaları ve onları barındıran hücreleri ve dokuları tespit etmek ve yok etmek için uzmanlaşmış çok çeşitli hücre tipleri ve efektör molekülleri T ve B lenfositleri içerir. B hücreleri antikor üretmekte, T hücreleri ise yardımcı ve düzenleyici olarak çalışmaktadır. Bu son derece toksik koruyucu işlev, sıkı bir düzenleme ihtiyacını ortaya çıkarır, böylece enfeksiyon tehlikesi geçtikten sonra, sistem göreceli sakinleşebilir ve daha fazla hasar önlenebilir. Bu regülasyona, immün tepkiyi aktif olarak baskılamak üzere uzmanlaşmış hücre alt grupları ve immünsupresif moleküller aracılık eder (Ouyang, Rutz, Crellin, Valdez ve Hymowitz, 2011).

İmmünsupresyon, bir immün yanıtın kasıtlı olarak önlenmesi veya azaltılmasıdır. Bağışıklık sistemini baskılayıcı ajanların uygulanmasından veya bağışıklık hücrelerinin kasıtlı olarak tükenmesinden ve ayrıca yetersiz beslenme, kanserler ve HIV gibi bazı kronik enfeksiyonlardan kaynaklanabilir. İmmünsupresyonun istenmeyen bir yan etkisi immün yetmezliktir. İmmünsupresyon, patojenik enfeksiyöz ajanların temizlenmesine izin verirken inflamasyonun yıkıcı güçlerini dengeler. İmmünsupresyondaki başarısızlıklar kendilerini klinik olarak şiddetli akut inflamasyon ve sitokin fırtınaları şeklinde ortaya çıkarabilir ve eğer uygun şekilde kontrol edilmezse, sonuçta ölümle sonuçlanabilir (Ben-Baruch, 2006).

1.5.1 İmmüsupresif Ajanlar

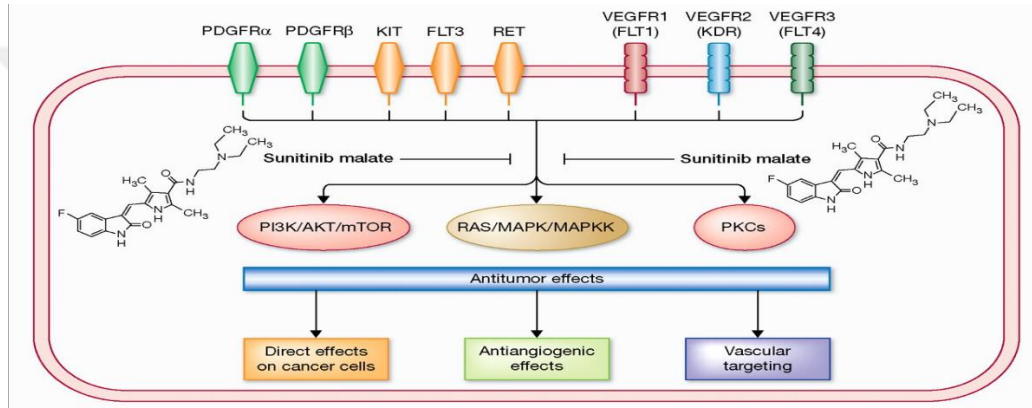
Organ nakli organ yetmezliği için uygulanan en iyi tedavi şeklidir. Ancak, organ nakli, sırasında oluşabilecek istenmeyen durumları önlemek için immüsupresif ajanların kullanımı önerilmiştir. Böylece, hastanın hayatta kalımı artar ve yaşam kalitesi yükselir. Organ nakli sırasında erken graft kaybının yaygın bir nedeni olan akut allograft reddi görülmekte ve organ naklinin başarısız olmasını sağlamaktadır. Başarısızlığı ortadan kaldırmak için immüsupresif ajanlar keşfedilmiştir. Mevcut immüsupresif ilaçlarla, bir yıllık graft sağkalımı %90 artmaktadır (Claeys, Vermeire ve Leuven, 2019).

1.5.1.1 Sunitinib ve Etki Mekanizması

Sunitinib, küçük molekül, çok hedefli bir reseptör tirozin kinaz (RTK) inhibitörüdür. Tirozin kinaz inhibitörleri transplantasyonda umut verici bir terapötik ajan olarak kabul edilmektedir. Yapılan çalışmalar, tirozin kinaz inhibitörlerinin anti-inflamatuar ve immüsupresif bir ajan olduğunu kanıtlamıştır (Dholakia, Fildes ve Friend, 2017). Tirozin kinazlar, protein kinaz sınıfının önemli bir alt grubudur. Özellikle onkoloji ve romatoloji alanındaki klinik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Tirozin kinaz iki ana alt gruptan oluşmaktadır. Reseptör kinazlar (RK), bir transmembran ile sitoplazmik katalik alana bağlı ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), epidermal büyüme faktörü (EGF) ve trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF) gibi çeşitli büyüme faktörleri tarafından aktive edilen bir hücre dışı ligand bağlayıcı alan içermektedir. Reseptör olmayan sitoplazmik kinazlar (NRK) hücre dışı bir bileşene sahip değildir ve sitozol, çekirdek ve plazma zarının iç yüzeyinde bulunur (Dholakia ve ark., 2017).

Sunitinib, vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü (VEGFR)-2, trombosit türevli büyüme faktörü reseptörü (PDGFR) - β , fibroblast büyüme faktörü reseptörü 1 ve epidermal büyüme faktörü reseptörü dâhil olmak üzere dört RTK'yı güçlü ve seçici bir şekilde inhibe etme kabiliyetine sahiptir. Hem biyokimyasal hem de hücrel deneylerde VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, KIT (kök hücre faktörü [SCF] reseptörü), PDGFR-a ve PDGFR-b'nin güçlü bir inhibitörü olarak tanımlanmıştır. Bu reseptörlerin tümü, iyi farklılaşmış PNET'lerin anjiyogenezinde rol oynar. Moleküler formülü C₂₂H₂₇FN₄O₂ ve moleküler ağırlığı 532,6 daltondur. Diğer adı SU11248 olan Sunitinib, L01XE04 kodu ile bilinmektedir.

Sunitinib, biyokimyasal ve hücre bazlı deneylerde çoklu RTK'ları inhibe eder ve hayvan deneylerinde güçlü anti-anjiyogenez ve anti-tümör etkileri uygular. *In vivo* olarak, Sunitinib, antitümör etkilerine de katkıda bulunduğu düşünülen miyeloid türevi baskılayıcı hücreleri (MDSC) aşağı doğru düzenler. Araştırmalar sonucunda, VEGFR1-2-3, PDGFR- α , PDGFR- γ ve fibroblast büyüme faktörü reseptörü 1 aktivitelerine karşı etkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca transfeksiyon sırasında yeniden düzenlenmiş proto-onkogen cKIT (KIT), fms ile ilişkili tirozin kinaz 3 (FLT3), RET proto-onkogen ve koloni uyarıcı faktör 1 reseptörü de inhibe edilmektedir (Seandel ve ark., 2006).



Şekil 6. Spesifik RTK'ler Sunitinib tarafından bloke edilir (kimyasal yapı gösterilmiştir) (Aparicio-Gallego ve ark., 2011).

Sunitinib, FLT3 ve RET dâhil olmak üzere antitümör etkileri ile ilgili diğer RTK'ları inhibe edebilir. FLT3 sıklıkla akut miyeloid lösemide aktive edilir ve RET, medullar tiroid karsinomlarının gelişimine katkıda bulunur. Yapılan klinik çalışmalar doğrultusunda, Sunitinib metastatik renal hücreli karsinom (mRCC) ve metastatik gastrointestinal stromal tümör (GIST) tedavisinde etkilidir. Ayrıca, Sunitinib lokal olarak ilerlemiş veya metastatik diferansiye olmuş nöroendokrin tümörler (NET) (akciğer, özefagus, tiroid, pankreas, mesane karsinomları, sarkomlar ve gliomalar gibi maligniteler) arasında progresyonsuz sağkalımın uzatılmasında etkilidir (Delbaldo, Faivre, Dreyer ve Raymond, 2012).

1.6 OKSİTOSİN VE HÜCRESEL TEDAVİDEKİ YERİ

Oksitosin ilk kez 1906 yılında Sir Henry Dale tarafından keşfedilen 9 aminoasitten oluşan bir nonapeptiddir. Yunanca oxus (keskin) ve tokos (doğum) kelimelerinden oluşur. 1953'te

oksitosin, sekanslanan ve sentezlenen ilk polipeptit hormonu olmuştur ve Vincent du Vigneaud bu başarısı için Nobel Ödülü kazanmıştır (Magon ve Kalra, 2011).

Oksitosin, hipotalamusun paraventriküler (PVN) ve supraoptik (SON) nukleusların magnoselüler nöronları tarafından sentezlenmektedir. Hipofizin posterior lobunda, hipotalamustan kaynaklanan ve dolaşımda salınması için oksitosin salgılayan aksonal çıkıntılar bulunur. Üretilen peptit daha sonra arka hipofiz bezinin aksonlarından aşağı taşınır ve burada fonksiyonunu modüle etmek için serbest bırakılır (Kim ve ark., 2017).

Oksitosin/Oksitosin reseptörü (OT/OTR) sistemi, üreme/ doğum, annelik davranışı, sosyal davranış, emzirme ve erektil disfonksiyon gibi birçok fizyolojik ve patolojik süreçlerde önemli rol oynamakla birlikte merkezi ve çevresel eylemleri de yönlendirebilir (Love, 2013; Jones ve ark., 2017). Genellikle, OT/OTR'nin hamilelik ve doğum sırasında miyometriyumda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. OT/OTR'nin en bilinen etkisi uterus kasılmalarını başlatmasıdır, ancak desidua, amniyon ve koryon gibi diğer gebelik dokularındaki prostaglandin (PG) sentezini de etkilediği belirtilmiştir (Kim ve ark., 2017; Jurek ve Neumann, 2018).

Günümüzde, oksitosin sosyal iletişim becerilerini ve duyguları, otizmi, şizofreniyi anlamaya yardımcı olan bir nöropeptid olarak kabul edilmektedir. Son çalışmalar, nöronal fonksiyonun düzenlenmesinde ve nöroenezin uyarılmasında oksitosinin rolünü göstermiştir. Yapılan çalışmalarda, oksitosinin yetişkin beyninin hipokampusunda nöroenez ve hücre proliferasyonunu indüklediği bildirildi. Oksitosin ayrıca streslerin hipokampal plastisite üzerindeki baskılayıcı etkilerine karşı da koruma sağlamaktadır (Jafarzadeh, Javeri, Khaleghi ve Taha, 2014). Gelecekte ise, oksitosin tedavisi ile obezitenin önlenileceğine inanılmaktadır. Ayrıca sentetik oksitosin, doğumun indüksiyonu ve doğum sonrası uterus kanamasının kontrolü için kullanılmaktadır (Lawson, 2018). Oksitosin tedavisi, kök hücrelerde hücre farklılaşmasını kontrol eder. Oksitosin ve MKH üzerinde yapılan birkaç çalışmada oksitosinin osteoblast/adiposit dengesinin düzenlendiğine rastlanmıştır. Ayrıca; hücre canlılığı ve proliferasyonunun oksitosin tedavisi sonrası arttığı gözlemlenmiştir (Noiseux ve ark., 2012).

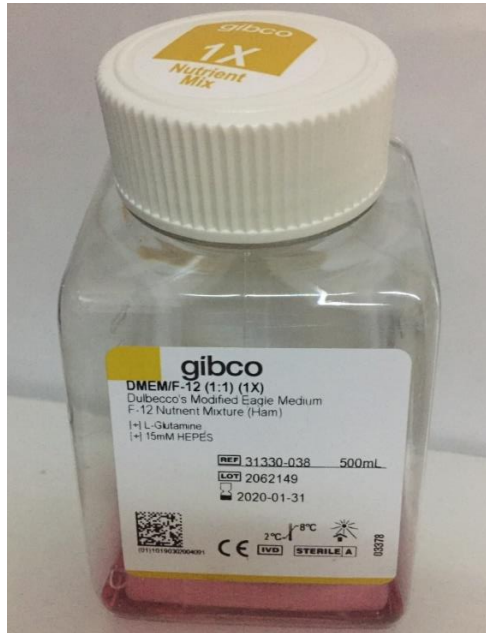
GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 HÜCRE KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI

Hücre kültürü; ticari olarak elde edilebilir oluşu, etik sorun oluşturmaması, *in vitro* da gerekli koşullar sağlandığında çoğalabilmesi, donmuş stoklar halinde bir süre depolanabilir olması, çözme işlemiyle tekrar kullanılabilir olması, ortamın kontrol altında tutulabiliyor oluşu, hücreler üzerindeki etkilerin doğrudan gözlemlenebilmesi gibi avantajlara sahiptir. Bunun yanında devam eden bir hücre kültüründe pasaj ilerledikçe hücre tipi değişmeyeceğinden homojenlik sağlanmış olur yani *in vitro* da *in vivo* ya en yakın ortam sağlanır. Bu gibi avantajları nedeniyle çalışma kapsamında test edilecek maddelerin *in vitro* ortamda çalışılmasına karar verilmiştir. Bu amaçla sıçan adipoz doku kaynaklı MKH hattı (Cat. No: SCC038, Millipore, Merck) ticari olarak temin edilmiştir.

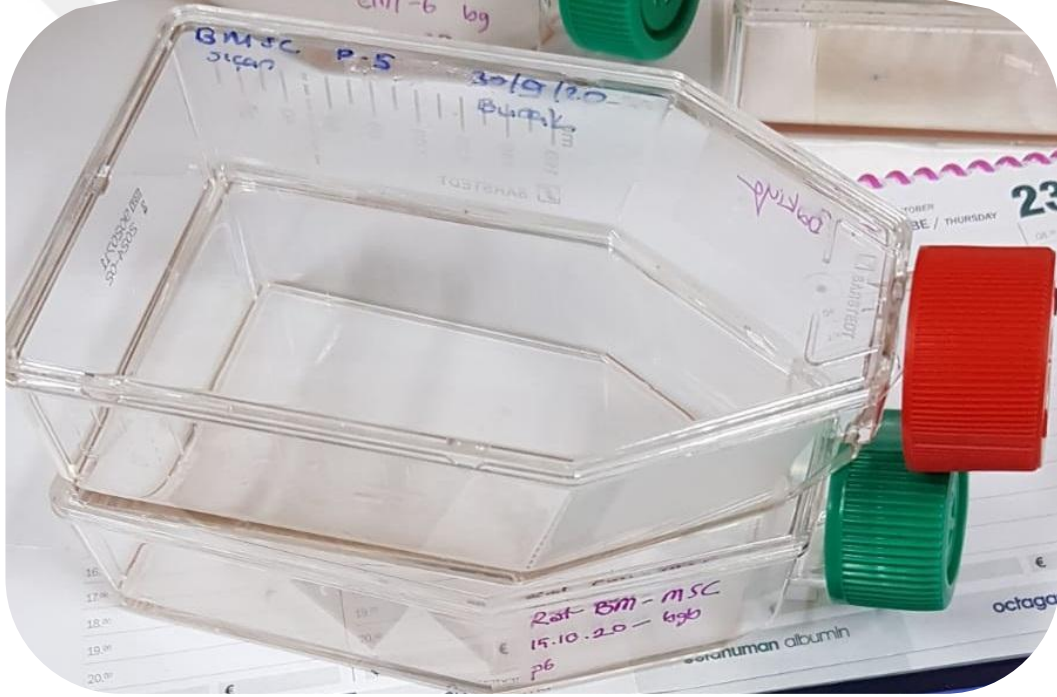
2.1.1 Hücrelerin Kültür Ortamında Çoğaltılması

Hücrelerin kültür ortamında yaşatılması için gereken maddeleri içeren besiyeri %1 penisilin/streptomisin, %1 L-glutamin, %10 FBS (Cat. No: 10270-106) içeren DMEM/F12 medyumunu (Cat. No: 11320033) kullanılmıştır.



Şekil 7. MKH hücrelerinin kültüre edilmesinde kullanılan besiyeri

Hücreler yatay konumdaki 75 cm²'lik filtreli kapaklı flasklar (Cat. No: 430639, Corning) içerisinde kültür edilmiştir. Yapılacak çalışmaların gerektirdiği doğrultuda, 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 dondurulup, -86°C'de saklanmışlardır. Hücrelerin canlılık ve proliferasyonlarını gözlemek amacıyla ışık mikroskobu (Olympus CH30, Japan) kullanılmıştır. Hücrelerin ortam değişimi, pasajlama, dondurma ve çözündürme ve yapılacak analizler için sürdürülmesi işlemleri 30 dk. ultraviyole ile sterilize edilen laminar hava akımlı kabinde (ESCO Class II, Biological Safety Cabinets) gerçekleştirilmiştir.



Şekil 8. 75 cm² lik flasklara ekilen sıçan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler.

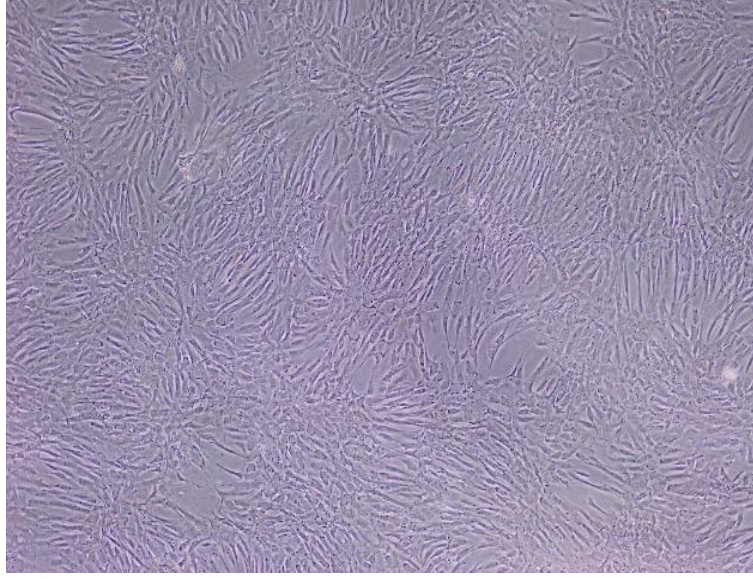
2.1.2 Hücre Canlılığının Hesaplanması

Çalışmada hücreler çözüldükten sonra ya da hücrelerin pasajlanması sırasında total hücre, canlı ve ölü hücre sayısına/yüzdesine ulaşmak Tripan mavisi (Biological industries Cat. No:03-102-1B) yöntemi uygulanmıştır. Tripan mavisi adı verilen boya negatif yüklü bir

boyadır. Eğer hücre canlı ise, boyanın hücre içine girmesine izin vermeyeceğinden hücreler şeffaf renkte görünürken canlı olmayan hücreler boyayı absorbe ederek mikroskop altında mavi renkte görülürler. Canlılık testi için 50 µl hücre ve 50 µl tripan mavisi boyası karıştırılarak Neubauer lamına aktarılmıştır. Neubauer lamında 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.

2.1.3 Hücrelerin Pasajlanması

Pasajlanma işlemine geçilmeden önce hücreler 1x PBS eklenerek yıkanmış ve daha sonra PBS uzaklaştırılmıştır. Hücreleri yüzeyden kaldırmak amacıyla % 0,25'lik tripsin-EDTA (Trypsin EDTA Solution, Cat. No: T4049, Sigma) hücre yüzeyini kaplayacak şekilde flaska eklenmiş (3-4 ml) ve 4 dakika inkübatörde bekletilmiştir. Hücreler yüzeyden ayrıldıktan sonra tripsini nötrleştirmek amacıyla hızlı bir şekilde üzerine serumlu besiyeri eklenmiş ve santrifüj tüplerine alınarak 1200 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi sonunda supernatant uzaklaştırılmış, hücre pelleti taze besiyeri ile süspanse edilmiştir. Daha sonra hücre sayımı gerçekleştirilmiş, hücreler sayılarına bağlı olarak uygun sayıdaki flaslara ekilmişlerdir. Hücreler çoğalma hızlarına bağlı olarak milimetredeki sayıları 10^5 - 10^6 aralığında kalacak şekilde pasajlanmış ayrıca 2 günde bir düzenli olarak ortam değişimleri yapılmıştır.



Şekil 9. Sıçan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin beşinci pasajdaki mikroskop görünümü.

2.1.4 Hücrelerin Dondurulması

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

2.2 ETKEN MADDEİN KULLANIMA HAZIRLANMASI

Bu çalışma kapsamında kullanılacak olan sunitinib (Sunitinib maleat; Cat. No.2097-25), Biovision'dan temin edilmiştir. Moleküler ağırlığı 398.47 g/mol olan Sunitinib son konsantrasyonu 100 mM olacak şekilde 628 µl DMSO içinde çözümüştür. Deneylerde kullanılacak diğer bir etken madde olan Oksitosin ≥99%, Sigma (Cat No: O4375)'dan temin edilmiştir. Oksitosin'in moleküler ağırlığı 392,57 g/mol'dür ve 1 mg'ı kullanılarak son konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde 1500 µl H₂O içersinde çözümüştür. Kullanıma hazır

hale gelen etken maddelerin çözeltisi sıçan ADKMKH'lara 1 nM ile 100 µM aralığında uygulanmıştır.



Şekil 10. Deneysel çalışmada kullanılan etken maddeler (Oksitosin ve Sunitinib)

2.3 SİTOTOKSİSİTE TESTLERİ

Hücre proliferasyonu, canlılığı ve sitotoksitesini ölçme amacıyla yapılan WST-1 (suda çözünebilir tetrazolium tuzu) testinin çalışma prensibi temel olarak; proliferasyona uğrayan hücrelerin mitokondrilerinde bulunan dehidrojenaz enzim aktivitesinin artması ile tetrazolyumu kullanarak formazan boya üretmesi sonucu görülen renk değişiminin absorbans olarak ELISA okuyucu ya da spektrofotometre (4250 ve 620 nm) ile ölçülmesine dayalıdır. Ölçülen absorbans değeri ne kadar yüksek ise canlı hücre sayısı da o kadar yüksek olur. Hücresel enzimler tetrazolium tuzlarını parçalar, bunun sonucunda soluk sarı renkli WST-1 boyası koyu turuncu formazan ürününe dönüşmektedir. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler turuncu renkte, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler sarı renkte görülmektedir.

Çalışma kapsamında ilk olarak doksanaltı kuyucuklu plaklara 1 ml'de 5×10^4 hücre olacak şekilde 60 kuyucuğa 100 µl hücre ekilip, üzerine 100 µl besiyeri ilave edilmiştir. Ekilen hücreler 37°C, %5 CO₂ içeren etüvde 1 gün inkübe edildikten sonra besi yerleri çekilmiştir. Daha sonra sunitinib ve oksitosin etken maddeleri 1 nM ile 100 µM doz aralığında her kuyucukta son hacim 100 µl olacak şekilde besiyeriyle birlikte hücreler üzerine eklenmiştir. Etken maddelerin uygulanmadığı son yatay sıradaki hücre grubu Kontrol grubu olarak alınmıştır. Etken maddelerin hücrelere eklendikten sonraki 24., 48. ve 72. saatlerinde her bir kuyucuğa 10 µl WST-1 solüsyonu (Cat.No: 11644807001, Roche) eklenerek 15 dakikada bir Multiskan FC (Thermo) mikropalak okuyucusu kullanılarak formazan boya oluşumu fotometrik olarak ölçülmüştür. Sunitinib ve oksitosin etken maddelerinin sıçan ADKMKH üzerindeki IC₅₀ değeri GraphPad (Prism) yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır.

Tablo 1 Sitotoksosite testi plak planı

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		100uM				100uM						
B		10uM				10uM						
C		1uM				1uM						
D		100nM				100nM						
E		10nM				10nM						
F		1nM				1nM						
G												
H												

Sunitinib
 Oksitosin
 Kontrol

2.4 KOMBİNASYON GRUPLARININ OLUŞTURULMASI

Sunitinib ve oksitosin etken maddelerinin kombinasyonlarının olası sinerjistik, additif, nötral veya antagonistik etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla 96 plaklara 1 ml'de 5×10^4 hücre olacak şekilde her kuyucuğa 100 µl hücre 100 µl besiyeri hacminde ekim yapılmıştır. Ekilen hücreler 37°C, %5 CO₂ içeren etüvde 1 gün inkübe edildikten sonra besiyerleri çekilmiş, yerine taze besiyeri içeren sunitinib ve oksitosin etken maddeleri IC₅₀ dozları dikkate alınarak farklı dozlarda her kuyucukta son hacim 100 µl olacak şekilde hücreler

üzerine eklenmiştir. Etken maddelerin uygulanmadığı son yatay sıradaki hücre grubu kontrol grubu olarak alınmıştır. Etken maddelerin hücrelere eklendikten sonraki 24., 48. ve 72. saatlerinde her bir kuyucuğa 10 µl WST-1 çözeltisi eklenerek 15 dakikada bir Multiskan FC (Thermo) mikropalak okuyucusu uygulanarak formazan boya oluşumu fotometrik olarak ölçülmüştür.

Tablo 2. Kombinasyon grubunun oluşturulma planı.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		100uM			100uM	100uM						
B		75uM			75uM	100uM						
C		50uM			50uM	100uM						
D		25uM			25uM	100uM						
E		10uM			10uM	100uM						
F						100uM						
G												
H												

	Sunitinib
	Oksitosin
	Kontrol
	Kombinasyon

Sunitinib için;

A: 100 µM
B: 75 µM
C: 50 µM
D: 25 µM
E: 10 µM
F: DMSO

Oksitosin için;

A: 100 µM
F: Ortam

Kombinasyon için;

A: R 100 µM + U 100 µM
B: R 75 µM + U 100 µM
C: R 50 µM + U 100 µM
D: R 25 µM + U 100 µM
E: R 10 µM + U 100 µM
F: Ortam

2.5 ANNEXIN V YÖNTEMİ İLE APOPTOTİK HÜCRE ANALİZİ

Apoptoz analizi, ticari firmadan temin edilen FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (Cat. 556547, BD) kullanılarak BD Accuri C6 flow sitometri cihazı ile yapılmıştır. Anneksin V hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanabilen bir proteindir ve floresan bir madde ile işaretlenerek apoptotik hücreyi görünebilir hale getirmektedir. Normalde canlı hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzeyinde fosfatidilserin (PS)

bulunmaktadır. Apoptotik hücrelerde bu moleküller hücre zarının dış yüzeyine transloke olmaktadır. Bu traslokasyon hücre ölümünün erken evrelerinde gerçekleşmektedir.

Yapılan çalışmada apoptoz analizi için 6'lı plağa 1 ml'de 1×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. 24 saat sonra ekim yapılan hücrelere WST-1 testinde bulunan IC_{50} dozunda Sunitinib ve en yüksek doz olan 100 μM oksitosin etken maddeleri ve bunların kombinasyonları uygulanmıştır. 25'lik flaskın sadece besiyeri değiştirilmiştir. Madde uygulanması işleminden sonra hücreler 37°C, %5 CO_2 içeren etüvde 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.

48 saatlik inkübasyon süresi sonunda apoptoz analizinde kullanılmak üzere her bir kuyucuktaki supernatant pipet yardımıyla ayrı ayrı 15'lik falkon tüplere aktarılmıştır. Önce her kuyucuğa 1'er ml 1xPBS eklenerek yıkama yapılmış ve bu PBS uzaklaştırılmıştır. Daha sonra plakta yapışık halde bulunan hücrelerin %0,25'lik tripsin ile 4 dk inkübasyonu sonucu kalkmaları sağlanmıştır. Hücrelerin kalkıp kalkmadıkları mikroskopla kontrol edilmiş ve kalkan hücreler daha önceden supernatantların alındığı 15'lik falkon tüplerine eklenmiş olup, tripsin inaktivasyonu için üzerine serum içeren besiyeri koyulmuştur. 15'lik falkon tüplerinde bulunan dört grup hücre 300g'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında supernatantı uzaklaştırılarak 100 μl 1x Annexin V Binding Buffer, 5 μl PI ve 5 μl Annexin-FITC eklenerek oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 20 dk beklemeleri sağlanmıştır. Bekleme süresi sonunda eppendorfların kapakları kesilmiş ve sırasıyla BD Accuri C6 flow sitometri kullanılarak erken-geç apoptoz, total apoptoz ve ölü hücre sayıları hesaplanmıştır.



Şekil 11. BD Accuri C6 Flow Sitometri Cihazının görünümü.

2.6 OKSİDATİF STRES ANALİZ PARAMETRELERİ

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

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

2.6.1 Lipit Peroksidasyonu (MDA) Ölçümü

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

Bu çalışmada lipit peroksidasyonunun ölçümü için temin edilen Lipid Peroxidation (MDA) Colorimetric/Fluorometric Assay Kit (Cat. No: K739-100, BioVision) kullanılmıştır ve firmanın önerdiği prosedüre bağlı kalınmıştır. Örnek hazırlamak için buz üzerindeki 1×10^6 sayıdaki hücre 300 µl MDA Lysis Buffer ve 3 µl BHT (X100) ile homojenize edildikten sonra 13000 g' de 10 dk santrifüjlenmiştir.

MDA standart eğrisi elde etmek amacıyla sırasıyla; 0.1 M MDA solüsyonu hazırlamak için 10 µl MDA standart 407 µl distile su ile seyreltilmiştir. Sonrasında 0.1 M MDA solüsyonunun 20 µl'si alınarak 980 µl distile su ile seyreltilerek 2 mM MDA standart solüsyonu hazırlanmıştır. Kolorimetrik analizler için eppendorflara 2 mM'lık MDA standart'tan 0,2,4,6,8,10 µl konularak son volüm 200 µl olacak şekilde distile su eklenmiş ve 0, 4, 8, 12, 16 ve 20 nmol standart elde edilmiştir. Florometrik analizler için ise 2 mM MDA standard 10-kez dilue edilmiştir. Daha sonra eppendorflara 0, 2, 4, 6, 8, 10 µl'lar

0.2 mM MDA standart ve son hacim 200 µl olacak şekilde distile su eklenerek 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 ve 2.0 nmol standart oluşturulmuştur.

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

Tablo 3. Lipit Peroksidasyonu ölçümü için hazırlanan plak yerleşim planı.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C	0µl MDA	4 µl MDA	8µl MDA	12µl MDA	16µl MDA	20µl MDA	Sunitinib	Oksitosin	Komb	Knt



Şekil 12. Lipit Peroksidasyonu ölçümünde kullanılan plak

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

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

2.6.2 Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Ölçümü

Yapısında dört selenyum (Se) atomu bulundurarak tetramerik bir enzim olan glutasyon peroksidaz hücrelerde sitozolde yer almaktadır. Hücre içindeki görevi hidrojen peroksit ile hidroperoksitlerin indirgenmesini sağlamaktır. Bunu membran fosfolipitlerinden, lipit hidroperoksitlere etki ederek yapmaktadır. Diğer bir önemli fonksiyonu ise solunum sırasında serbest radikal zarar sonucu fagositik hücrelerin bozulmasını engellemektir.

GSH- Px aktivitesindeki azalma hidrojen peroksitin birikerek, hücre bozulmasına yol açmasına sebep olmaktadır. GSH-Px, hem lipid peroksidasyonunun başlamasını önlemekte, hem de lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid hidroperoksitlerin metabolizmasını sağlamaktadır.

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

1. Örnek hazırlamak için 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. Daha sonra çalışma için supernatant kısmı toplanmış ve buz üzerinde bekletilmiştir. Örneklerin 2- 50 μl 'si 96 kuyucuklu plağa ekildikten sonra son volüm 50 μl olacak şekilde Assay Buffer eklenmiştir.

2. NADPH standart eğrisi için 1 mM NADPH standart oluşturmak amacıyla 40 mM NADPH solüsyonun 25 μl 'si 975 μl distile su ile seyreltilmiştir. 1 mM NADPH'nin de 0, 20, 40, 60, 80, 100 μl 'si kuyucukta 0, 20, 40, 60, 80, 100 nmol standart oluşturmak üzere 96 kuyucuklu plağa eklenmiştir. Daha sonra son volüm 100 μl olacak şekilde Assay Buffer eklenmiştir. Pozitif kontrol için 5-10 μl GPx pozitif kontrol istenen kuyucuklara eklendikten sonra Assay Buffer ile son volüm 50 μl 'ye tamamlanmıştır. Reaktif kontrolü için ise 50 μl Assay Buffer eklenmiştir.

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

1. Hesaplama için **GPx aktivitesi = $B / (T_2 - T_1) \times V_x$ Örnek Dilüsyonu = nmol/dk/ml = mU/mL** formülü kullanılmıştır (**B**: T_1 ve T_2 arasında nmol'deki azalan NADPH miktarı, **T_1** : İlk örneğin dk'daki ilk okunma anı, **T_2** : İkinci örneğin dk'daki ikinci okunması, **V**: Reaksiyon kuyucuğunda ml'deki işlenmiş örnek volümü).

Tablo 4. Glutatyon Peroksidaz ölçümü için hazırlanan plak yerleşim planı

	1	2	3	4	5	6	8	9	10	11
E	0 μ M NADPH	20 μ M NADPH	40 μ M NADPH	60 μ M NADPH	80 μ M NADPH	100 μ M NADPH	Sunitinib	Oksitosin	Komb	Knt
F	0 μ M NADPH	20 μ M NADPH	40 μ M NADPH	60 μ M NADPH	80 μ M NADPH	100 μ M NADPH				



Şekil 13. Glutatyon Peroksidaz ölçümünde kullanılan plak

2.6.3 Katalaz (CAT) Aktivitesi Ölçümü

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

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

Tablo 5. Katalaz aktivitesi ölçümü için hazırlanan plak yerleşim planı

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
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)	Sunitinib	Oksitosin	Komb	Knt



Şekil 14. Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan plak.

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

H₂O₂ Standart Eğrisi oluşturmak amacıyla da 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 Sunitinib, Oksitosin, Kombinasyon ve Kontrol grubu örneklerinin 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 dakika inkübe edilmişlerdir. Plak okuyucuda 570 nm'de okutulmuşlardır.

Hesaplama Katalaz Aktivitesi = $B/30 \times V \times \text{Örnek Dilüsyon Faktörü} = \text{nmol/dk/ml} = \text{mU/mL}$ 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)

2.6.4 Superoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Ölçümü

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

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

Tablo 6. Superoksit dismutaz aktivitesi ölçümü için hazırlanan plak yerleşim planı.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	S	O	Komb	Knt	S2 Boşluk2	O2 Boşluk2	Komb2 Boşluk2	Knt2 Boşluk2	Boşluk1	Boşluk3



Şekil 15. Superoksit dismutaz aktivitesi ölçümünde kullanılan plak.

(Örnek= Sunitinib: S, Oksitosin: O, Kombinasyon: Komb, Kontrol: Knt, Boşluk2=S2, U2, Komb2, Knt2)

1. Örneklerin bulunduğu kuyucuklara ve boşluk 2'lere 20 µl Sample Solution, boşluk 1 ve boşluk 3'e 20 µl 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 37⁰C'de 20 dk inkübe edilmiştir.
6. Örnekler mikropalak okuyucuda 450 nm'de okutulmuştur.

Hesaplama **SOD Aktivitesi** =
$$\frac{(A_{\text{boşluk1}} - A_{\text{boşluk3}}) - (A_{\text{örnek}} - A_{\text{boşluk2}})}{(A_{\text{boşluk1}} - A_{\text{boşluk3}})} \times 100$$
 formülü ile yapılmıştır.

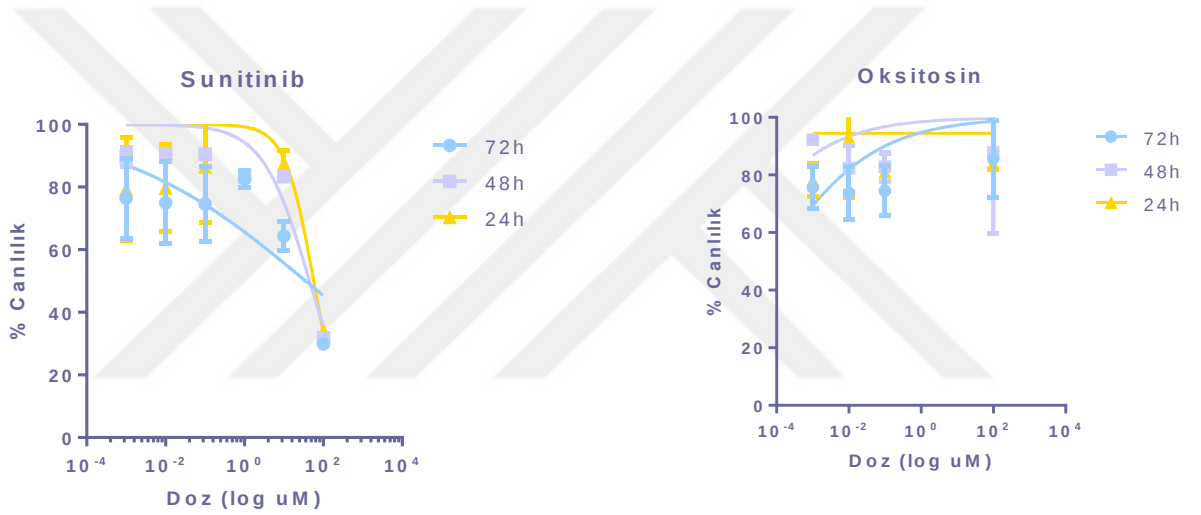
2.7 İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME YÖNTEMİ

BD Accuri C6 flow sitometri cihazı ile elde edilen ölü hücre yüzdesi, apoptoz/ölü hücre yüzdesi, erken apoptoz yüzdesi, canlı yüzde hücresi, eliza plaklarının okutması yapılan katalaz aktivitesi, SOD (% inhibisyon), MDA, GPx için her gruba ait veriler Microsoft Office Excel 2010 versiyonu üzerine yazılarak, IBM SPSS Statistics 23.00 (Statistical Package for Social Sciences) programında yaratılan veri tabanına aktarıldı ve istatistiksel analizler kullanılan bu program aracılığıyla yapılmıştır. Sürekli değişkenler ile ilgili; ortalama, standart sapma ve hata, minimum ve maksimum değerleri ve ortalamalar için %95 güven aralıkları sunulmuştur. Öncelikle 2x2 faktöriyel ANOVA uygulandı. Ancak iki faktör arasında etkileşim (interaction) anlamlı bulunduğu için 4 grup oluşturulup tek yönlü varyans analizi uygulandı. Çoklu karşılaştırmalar sonrası grupların ikili analizi için Dunnett T3 yöntemi kullanılmıştır. Tüm hipotez kontrolleri 0,05 önem seviyesinde gerçekleştirilmiş, yani $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

3.1 SUNİTİNİB VE OKSİTOSİNİN SIÇAN ADKMKH HATTI ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

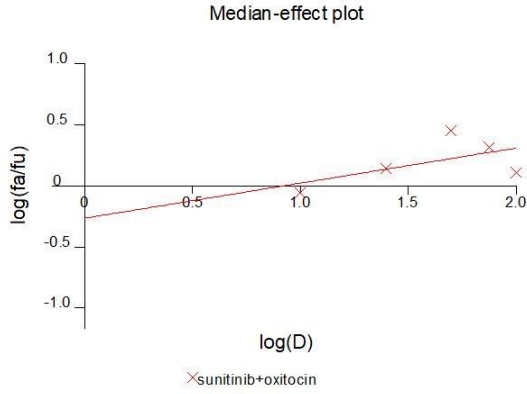
Sunitinib ve oksitosin etken maddelerinin sıçan ADKMKH hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla üç gün ve üç tekrarlı olacak şekilde kurulan WST-1 testi kullanılmıştır. Sunitinibin sıçan ADKMKH proliferasyonunu %50 oranında inhibe eden dozu yani IC₅₀ değeri GraphPad (Prism) yazılımı uygulanarak 48. saatte 44,57 µM olarak hesaplanmıştır. Oksitosinin sıçan ADKMKH üzerindeki sitotoksik etkisi belirlenememiştir. 100 µM'lık doza kadar hücreler üzerinde sitotoksik etkisi bulunmamaktadır.



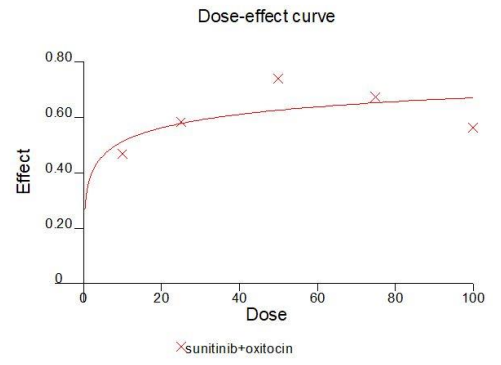
Grafik 1. Kök hücrelerde Sunitinib ve Oksitosinin sitotoksik etkisi

Sunitinib ve oksitosin kullanımı ile oluşturulan kombinasyon grubundaki etki değerlendirildiğinde 100 µM oksitosin ile birlikte uygulandığında IC₅₀ dozu 8,30 µM olarak belirlenmiştir.

Kombinasyon 48h

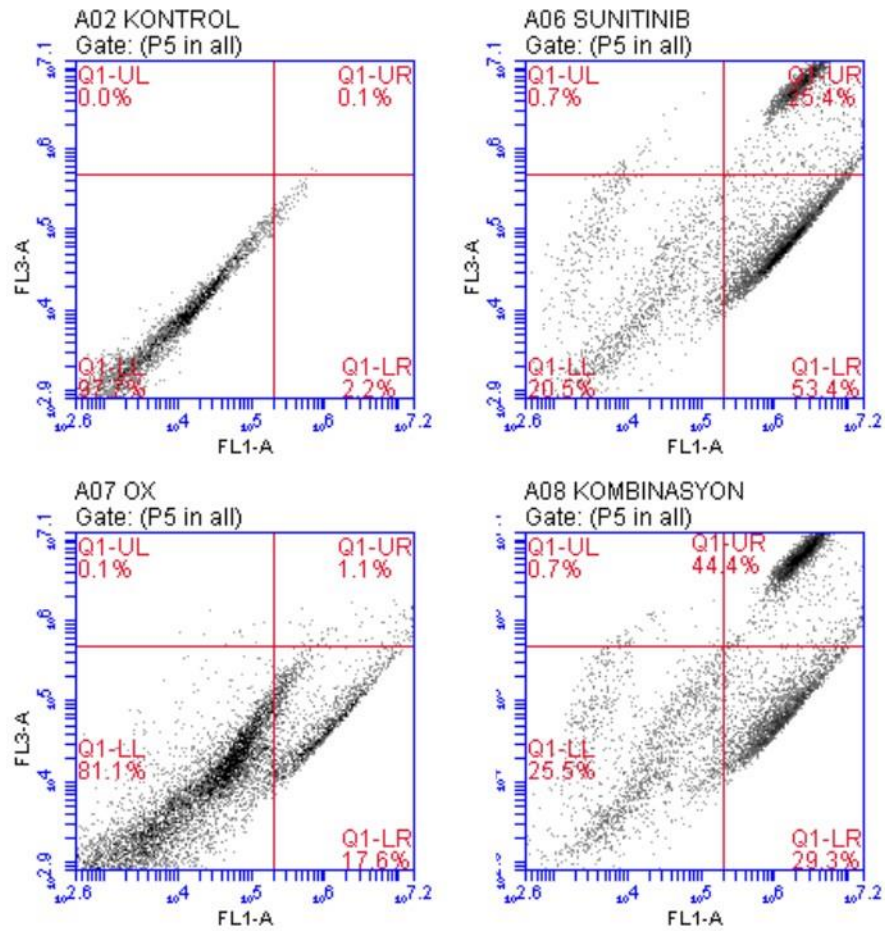


Kombinasyon 48h



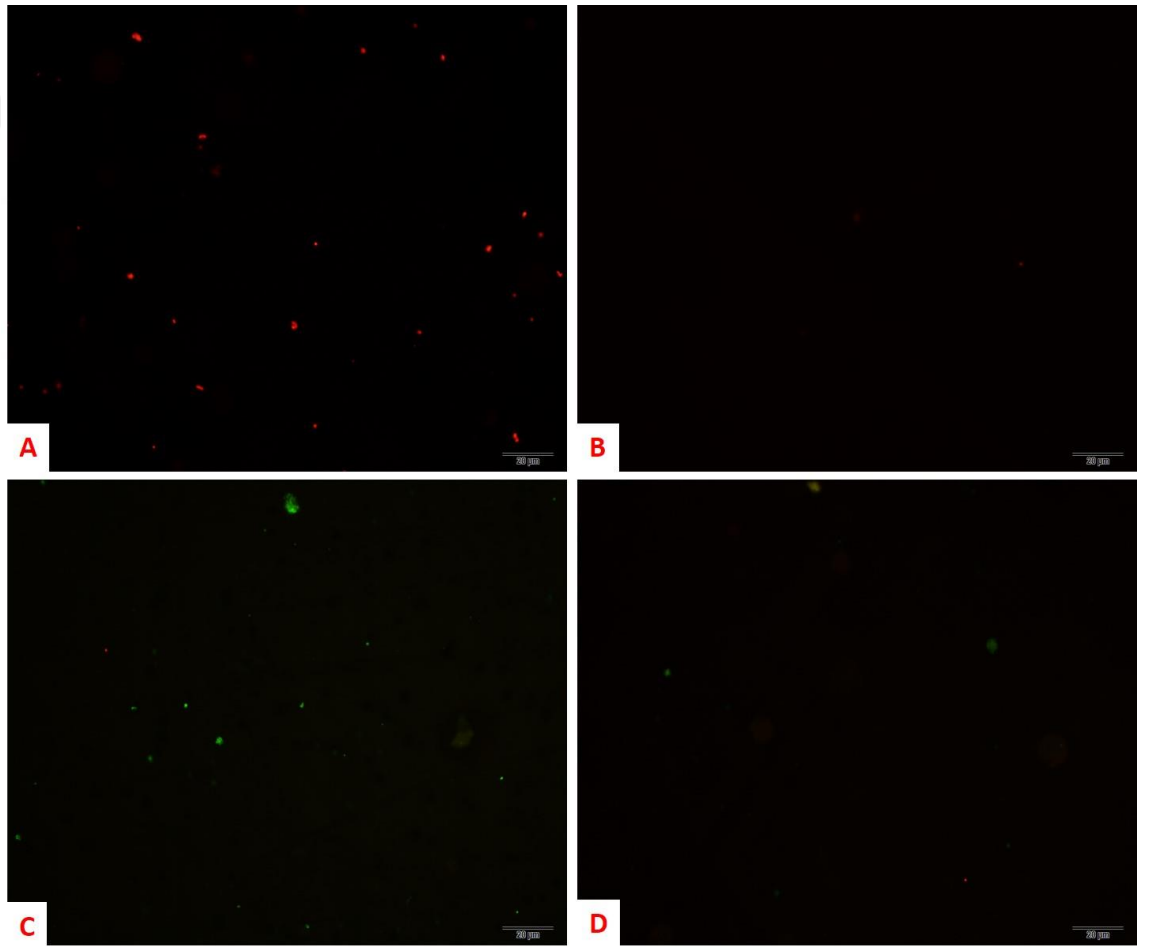
Grafik 2. ADKMKH'lerinde sunitinib ve oksitosin kombinasyon dozları.

3.2 ANNEXİN V YÖNTEMİ İLE YAPILAN APOPTOZ ANALİZİ BULGULARI



Grafik 3. Accuri C6 Flow Sitometri cihazı ile yapılan ölçümlerin gruplara göre dağılımı

Accuri C6 cell analyzer ile yapılan ölçümler ve yapılan hesaplamalar doğrultusunda etken maddeye maruz kalmayan kontrol grubundaki hücrelerde ölü hücre yüzdesi 1,03, canlı hücre yüzdesi 98,97 olarak hesaplanmıştır. Oksitosin grubundaki hücrelerde ölü hücre yüzdesi 2,59, canlı hücre yüzdesi 97,41 olarak hesaplanmıştır. Sunitinib grubunda erken apoptoz oranı %7,69; geç apoptoz oranı %4,31, ölü hücre % 8,10, canlı hücre %79,90 olarak hesaplanmıştır. Kombine grup sonuçlarında ise erken apoptoz oranı %3,90, geç apoptoz oranı %1,34; ölü hücre yüzdesi 7,81; canlı hücre yüzdesi 25,5 olarak ölçülmüştür.



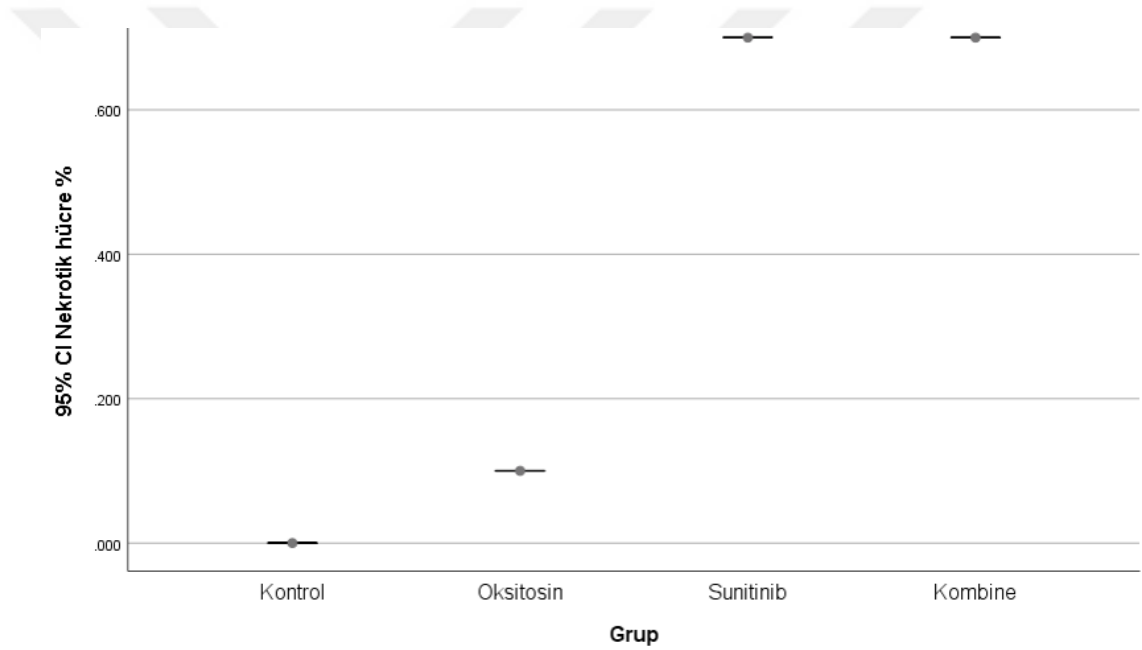
Şekil 16. Annexin V boyaması sonrası deney gruplarının mikroskopik olarak gösterilmesi.

A. Kontrol grubu **B.** Oksitosin grubu **C.** Sunitinib grubu **D.** Kombine grup. Kırmızı boyanan hücreler canlı, yeşil renkli hücreler ölü hücreleri göstermektedir. Kontrol-Oksitosin grupları arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0,001$). En az canlı hücre Sunitinib grubunda gözlemlenmiştir.

Annexin V ile yapılan immünfloresans incelemede Sunitinib grubunda Muse[®] analizi ile benzer şekilde boyanan hücre sayısı yüksek olarak saptanmıştır. Oksitosin ve Kombine grupta ise benzer görünümde ve yakın sayılarda Annexin V pozitif hücre sayısı elde edilmiştir.

3.3 HÜCRE CANLILIK ANALİZLERİNİN İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRİLMESİ

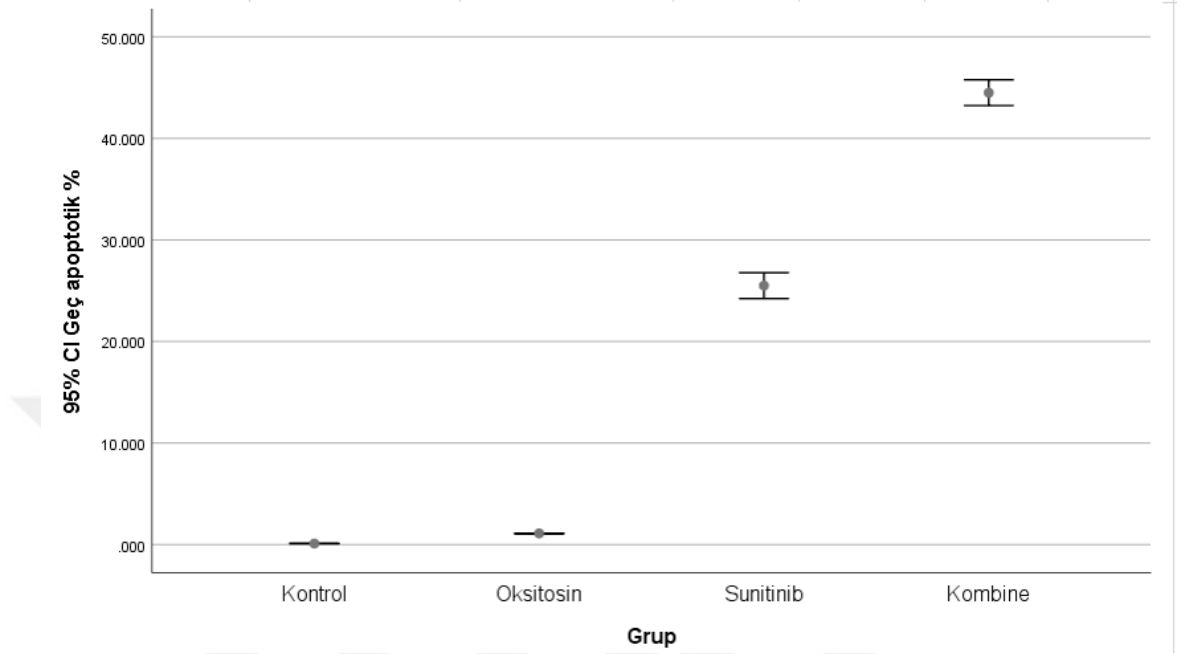
3.3.1 Nekrotik Hücre Yüzdesi



Grafik 4. Nekrotik hücre yüzdesi istatistiksel grafiği.

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

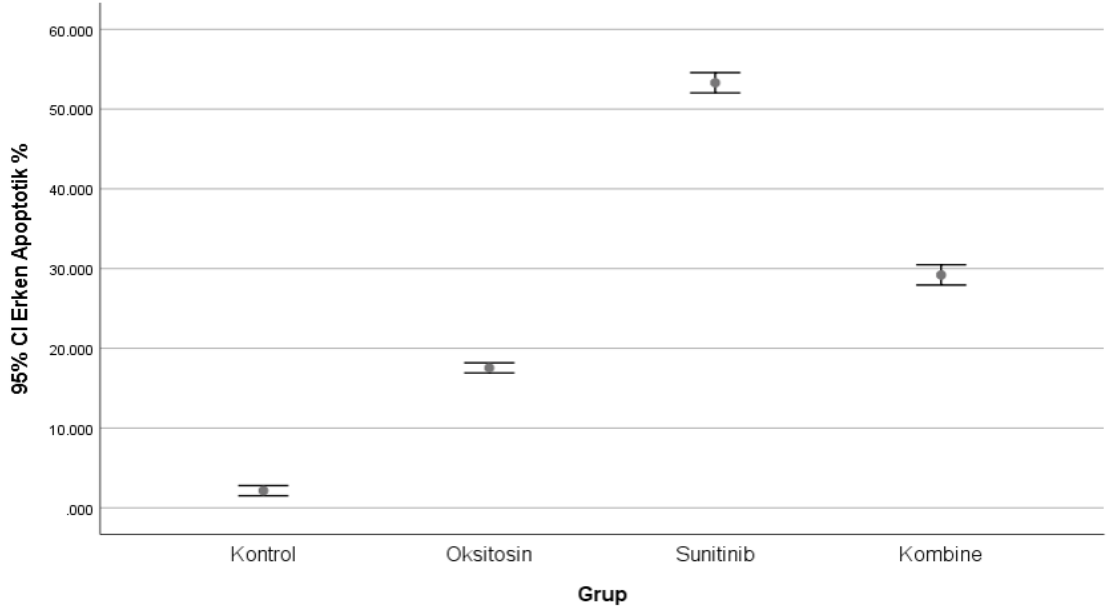
3.3.2 Geç Apoptoz/Ölü Yüzdesi



Grafik 5. Geç apoptoz/ölü yüzdesi istatistiksel grafiği.

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

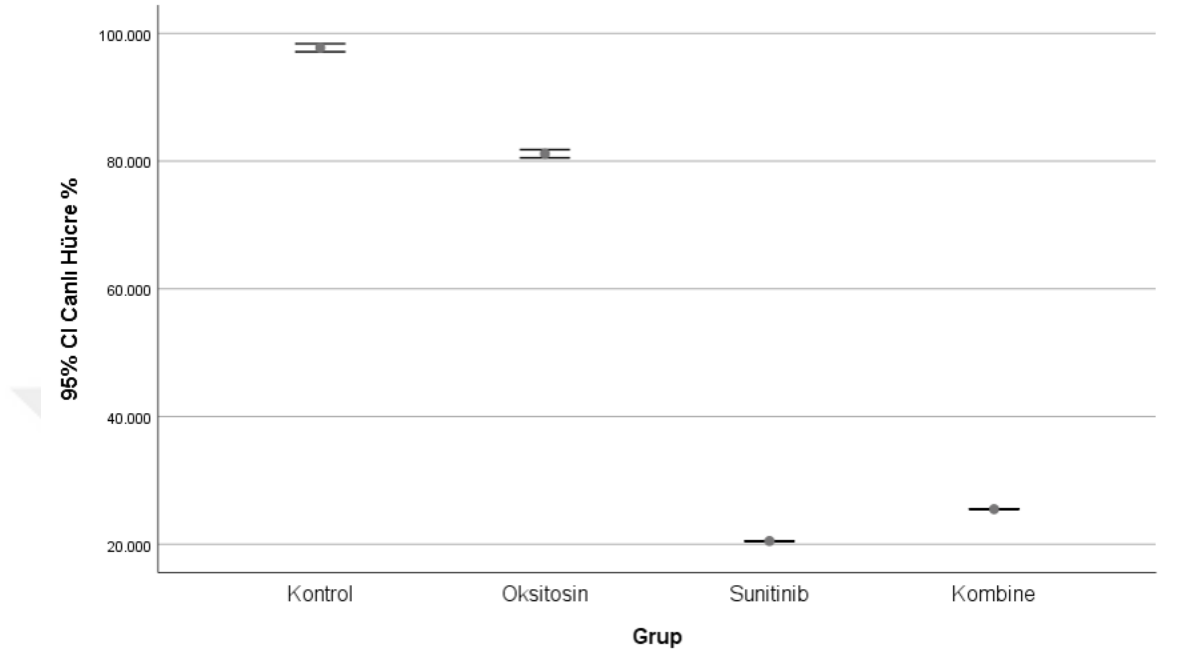
3.3.3 Erken Apoptoz Yüzdesi



Grafik 6. Erken apoptoz yüzdesi istatistiksel grafiği.

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

3.3.4 Canlı Hücre Yüzdesi

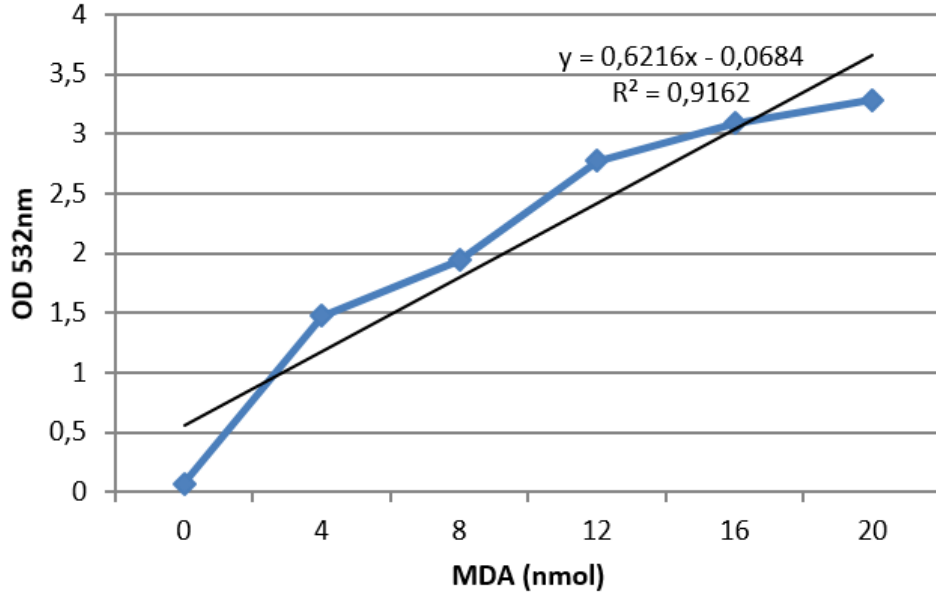


Grafik 7. Canlı hücre yüzdesi istatistiksel grafiği.

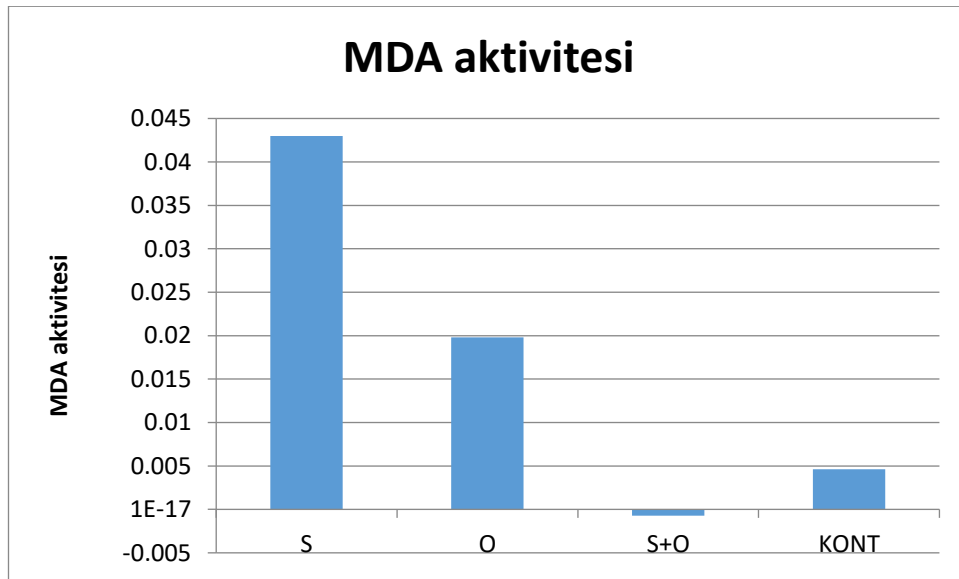
Gruplar arasında ikili farkların tümü istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,001$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında oksitosin etkisi de anlamlıdır. Kombine grupta oksitosin etkisi sunitinib etkisini baskılamıştır. En az canlı hücre sayısı, Sunitinib grubunda gözlemlenmiştir.

3.4 OKSİDATİF STRES ANALİZ PARAMETRELERİ BULGULARI

3.4.1 Lipit Peroksidasyonu (MDA) Ölçümü Bulgusu



Grafik 8. MDA standart eğrisi

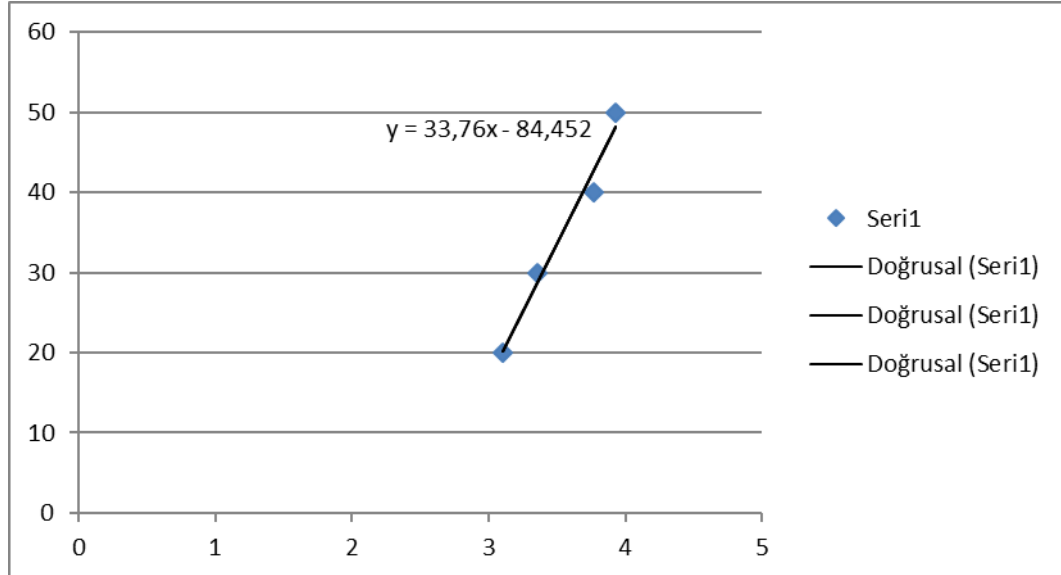


Grafik 9. MDA aktivitesi grafiği

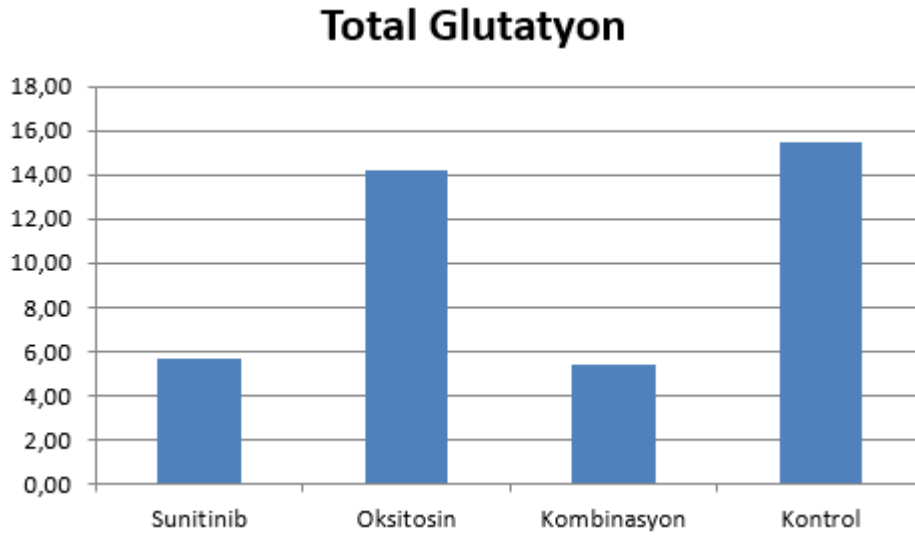


Grafik 10. MDA aktivitesi kat değişimi

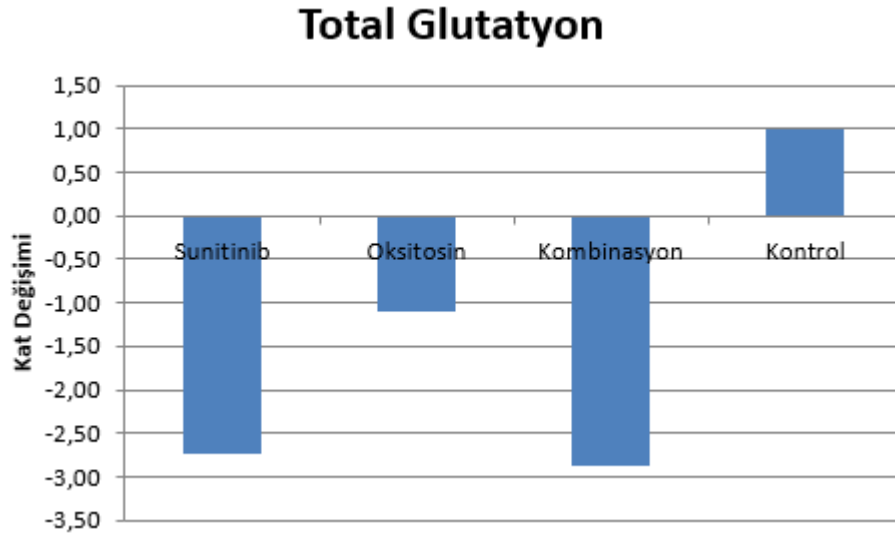
3.4.2 Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Ölçümü Bulgusu



Grafik 11 . NADPH standart eğrisi.

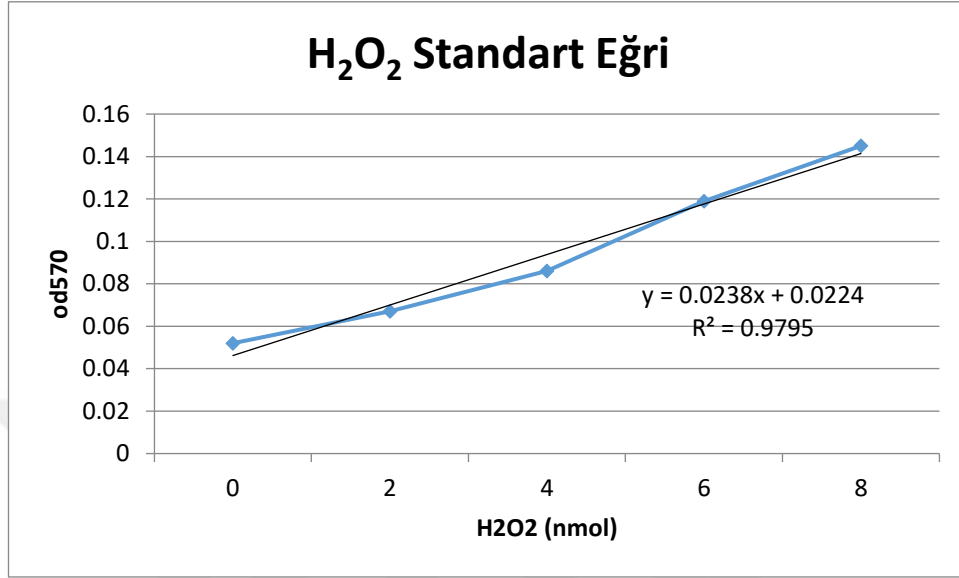


Grafik 12 . Total glutasyon grafiği

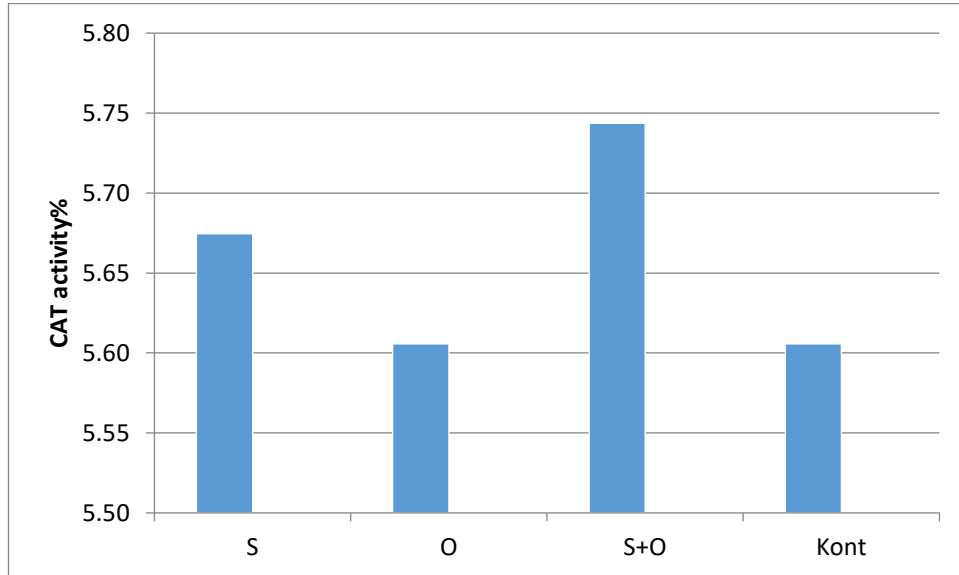


Grafik 13. Total glutasyon kat değişimi grafiği

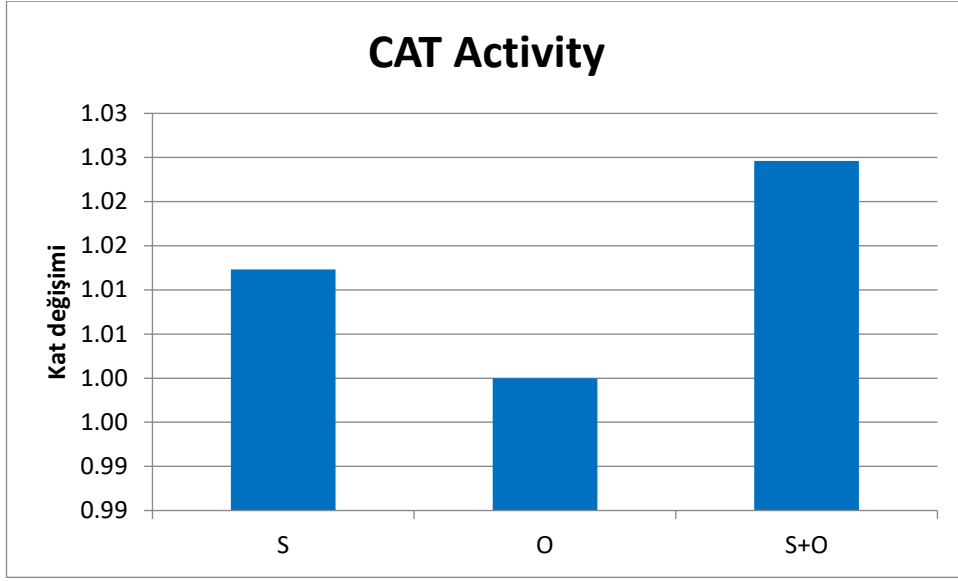
3.4.3 Katalaz (CAT) Aktivitesi Ölçümü Bulgusu



Grafik 14. H₂O₂ standart eğrisi

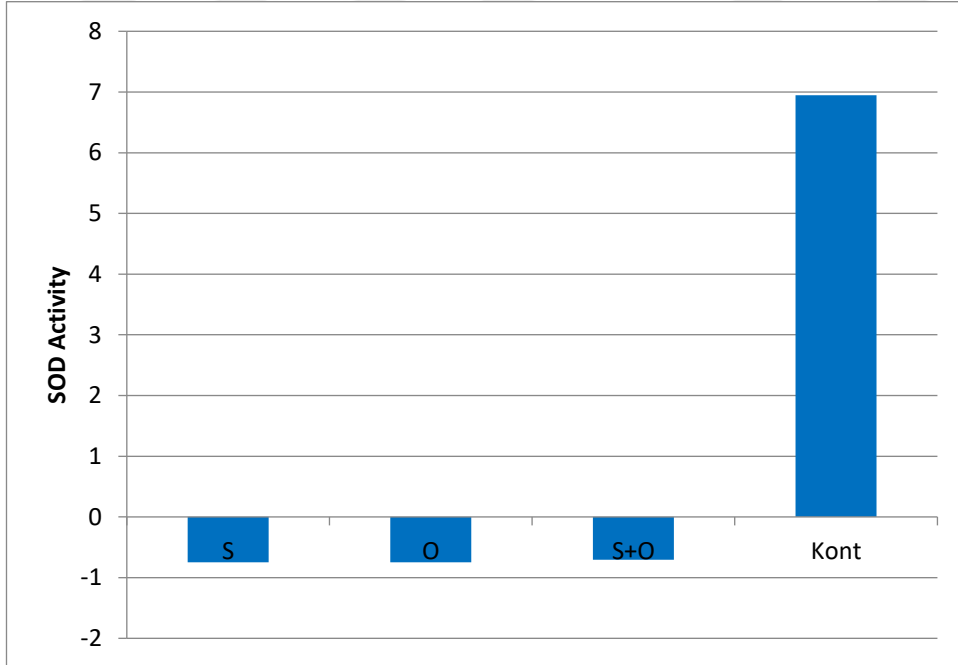


Grafik 15. Katalaz aktivitesi grafiği

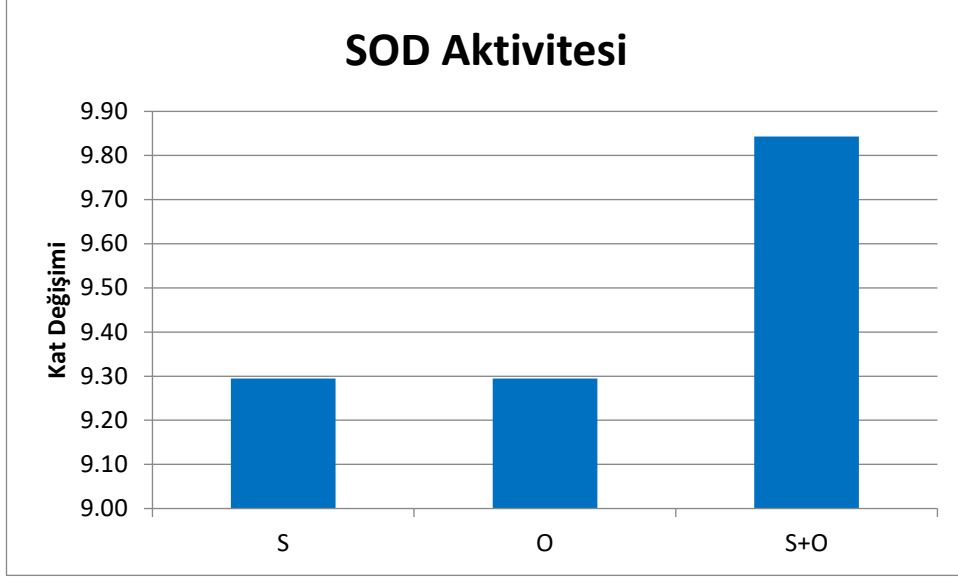


Grafik 16. Katalaz aktivitesi kat değışim grafiği

3.4.4 Superoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Ölçümü Bulgusu



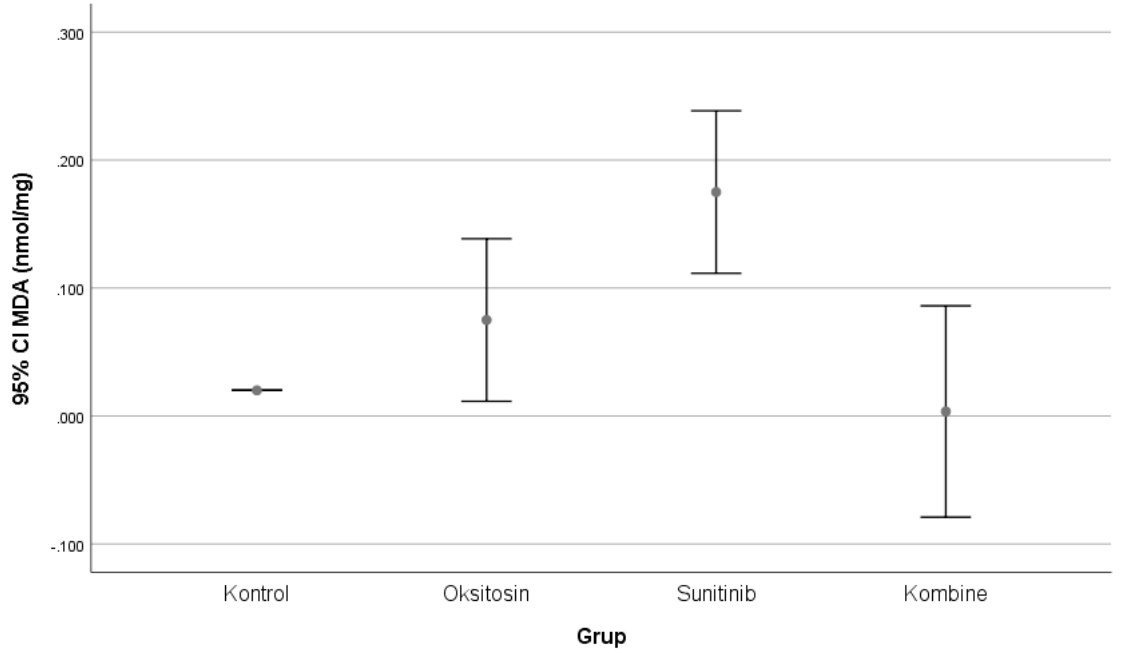
Grafik 17. SOD aktivitesi.



Grafik 18. SOD aktivitesi kat değişimi grafiği

3.5 OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİNİN İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRİLMESİ

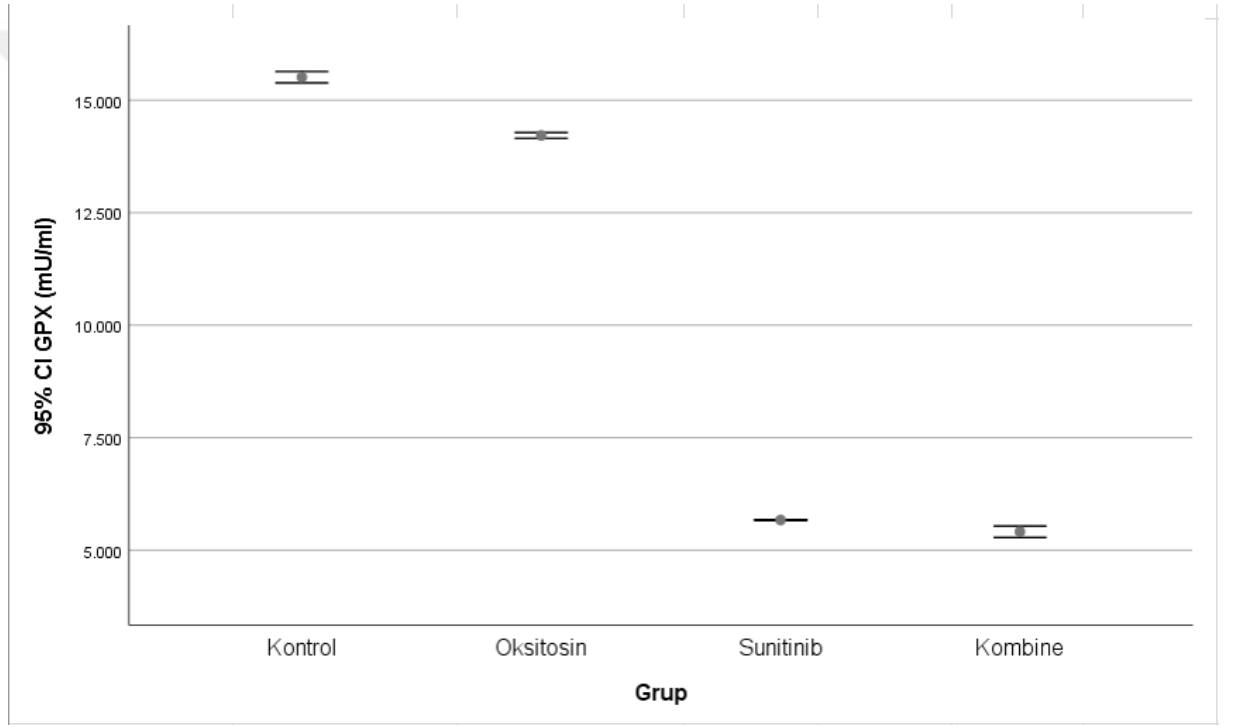
3.5.1 Lipit Peroksidasyon (MDA) Düzeyi



Grafik 19. MDA düzeyi istatistiksel grafiği (p=0.001).

Kontrol grubunda değişkenlik olmadığı için analize alınmadı. Diğer üç grup için hesaplanan güven aralıklarına göre incelendi. MDA düzeyi bakımından Kontrol-Sunitinib ($p<0,05$); Kontrol-Kombine ve Kontrol-Oksitosin ($p>0,05$) arası fark anlamsızdır; Oksitosin-Sunitinib ($p=0,010$); Oksitosin-Kombine ($p=0,032$); Sunitinib-Oksitosin ($p=0,006$) grupları arası fark anlamlıdır.

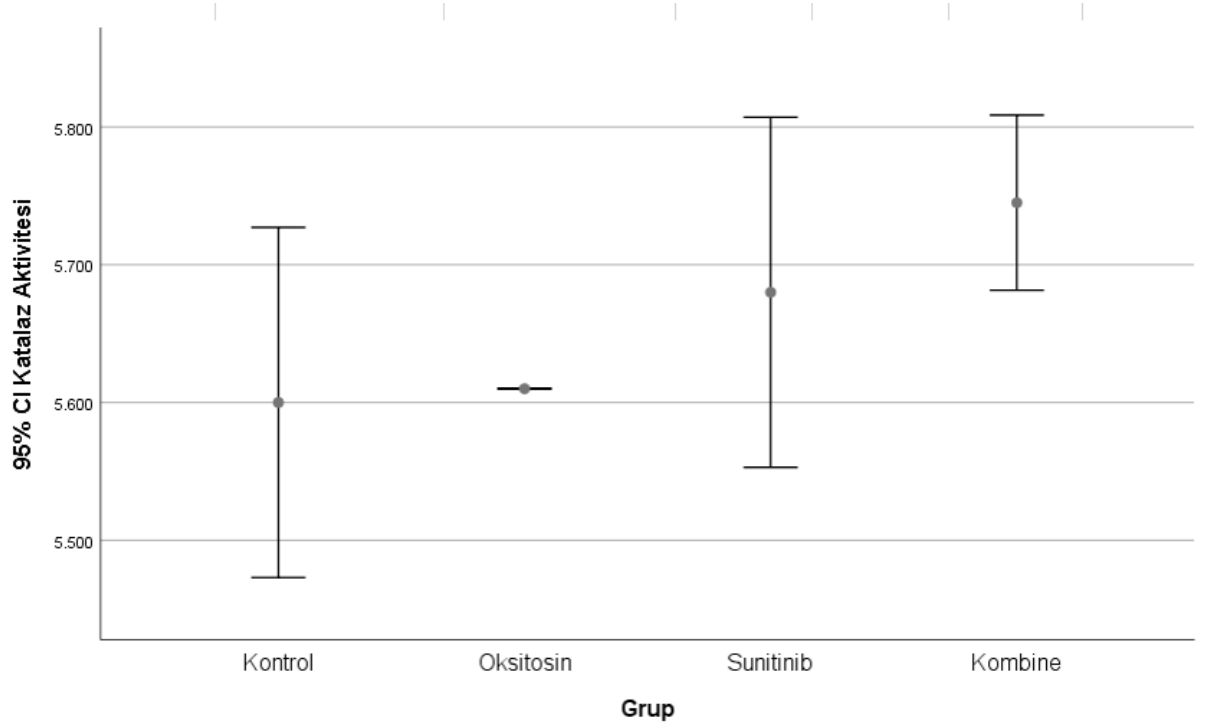
3.5.2 Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) düzeyi



Grafik 19. GSH-Px düzeyi istatistiksel grafiği.

GPX düzeyi ölçümlerinde Sunitinib grubunda iki tekrar arasında değişkenlik olmadığı için analize alınmadı. Diğer üç grup için hesaplanan güven aralıklarına göre incelendi. GPX düzeylerinde Sunitinib ile Kontrol, Oksitosin ve Kombine grupları arasında ($p<0,05$ güven aralıklarının dışında kalıyor) farklar anlamlı bulundu. Kontrol-Oksitosin ($p=0,001$), Kontrol-Kombine ve Oksitosin-Kombine ($p<0,001$) grupları arası farklar anlamlı bulundu.

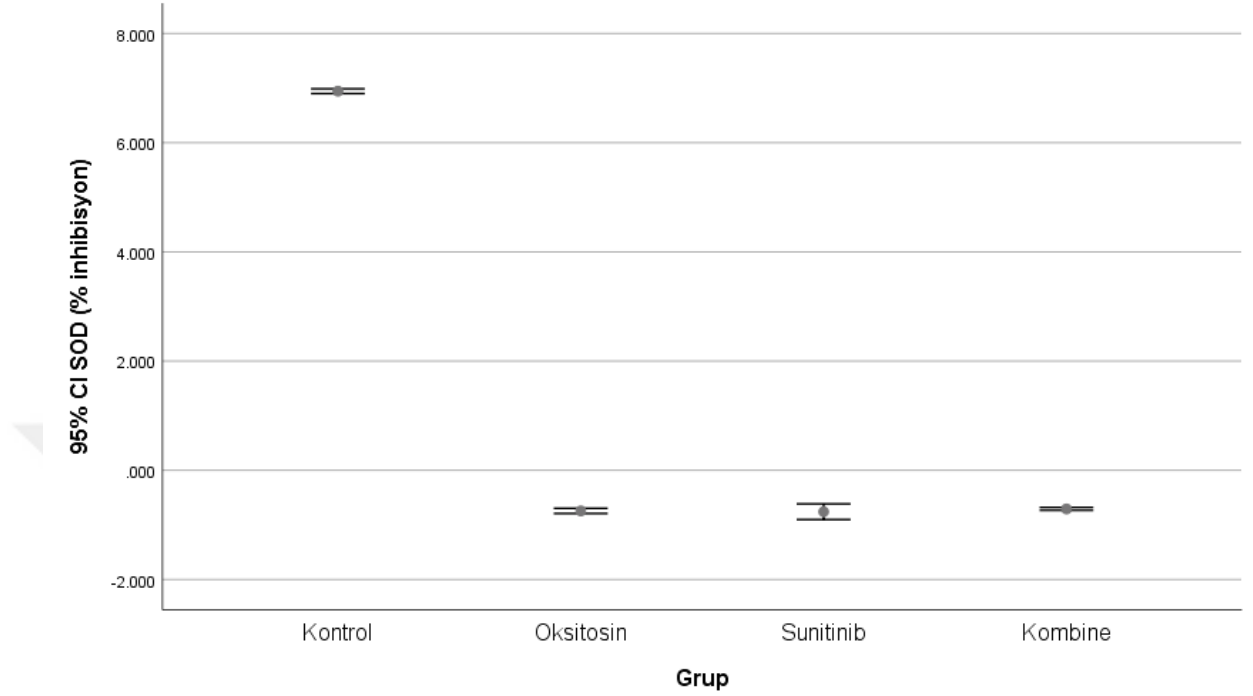
3.5.3 Katalaz (CAT) düzeyi



Grafik 20. Katalaz düzeyi istatistiksel grafiği.

Oksitosin grubunda değişkenlik olmadığı için analize alınmadı, diğer üç grup için hesaplanan güven aralıklarına göre incelendi. Katalaz düzeyleri bakımından Oksitosin-Kontrol ve Oksitosin-Sunitinib arasındaki fark anlamsızdır ($p > 0,05$). Oksitosin-Kombine grupları arasında anlamlı ($p < 0,05$); Kontrol-Sunitinib ($p = 0,062$) ve Sunitinib-Kombinasyon ($p = 0,103$) arasındaki farklar anlamsızdır. Kontrol-Kombine ($p = 0,032$) grupları arası fark anlamlı bulundu.

3.5.4. Superoksit Dismutaz (SOD) düzeyi



Grafik 21. SOD düzeyi istatistiksel grafiği.

SOD düzeyleri bakımından kontrol ile diğer üç grup arasında farklar anlamlı bulunurken, diğer gruplar arasında hiç bir ikili farklılık anlamlı bulunmadı. Elde edilen p değerleri; Kontrol-Oksitosin ve Kontrol-Kombine ($p<0,001$) Kontrol-Sunitinib ($p=0,001$), Oksitosin Sunitinib ($p=0,766$), Oksitosin-Sunitinib ($p=0,071$), Sunitinib-Kombine ($p=0,272$) olarak gerçekleşmiştir.

Tablo 7. Hücre canlılığı analizlerinin istatistiksel değerlendirme tablosu.

Grup		Canlı Hücre %	Nekrotik hücre %	Erken Apoptotik %	Geç apoptotik %
Kontrol	Mean	97,75000	0,00000	2,15000	0,10000
	N	2	2	2	2
	Std. Deviation	0,070711	0,000000	0,070711	0,000000
	Median	97,75000	0,00000	2,15000	0,10000
	Minimum	97,700	0,000	2,100	0,100
	Maximum	97,800	0,000	2,200	0,100
	Range	0,100	0,000	0,100	0,000
Oksitosin	Mean	81,15000	0,10000	17,55000	1,10000
	N	2	2	2	2
	Std. Deviation	0,070711	0,000000	0,070711	0,000000
	Median	81,15000	0,10000	17,55000	1,10000
	Minimum	81,100	0,100	17,500	1,100
	Maximum	81,200	0,100	17,600	1,100
	Range	0,100	0,000	0,100	0,000
Sunitinib	Mean	20,50000	0,70000	53,30000	25,50000
	N	2	2	2	2
	Std. Deviation	0,000000	0,000000	0,141421	0,141421
	Median	20,50000	0,70000	53,30000	25,50000
	Minimum	20,500	0,700	53,200	25,400
	Maximum	20,500	0,700	53,400	25,600
	Range	0,000	0,000	0,200	0,200
Kombine	Mean	25,50000	0,70000	29,20000	44,50000
	N	2	2	2	2
	Std. Deviation	0,000000	0,000000	0,141421	0,141421
	Median	25,50000	0,70000	29,20000	44,50000
	Minimum	25,500	0,700	29,100	44,400
	Maximum	25,500	0,700	29,300	44,600
	Range	0,000	0,000	0,200	0,200
Total	Mean	56,22500	0,37500	25,55000	17,80000
	N	8	8	8	8
	Std. Deviation	36,118406	0,349489	19,964039	19,743932
	Median	53,30000	0,40000	23,35000	13,25000
	Minimum	20,500	0,000	2,100	0,100
	Maximum	97,800	0,700	53,400	44,600
	Range	77,300	0,700	51,300	44,500

Tablo 8. Biyokimyasal parametrelerin istatistiksel değerlendirme tablosu.

Grup		Katalaz Aktivitesi	SOD (% inhibisyon)	MDA (nmol/mg)	GPX (mU/ml)
Kontrol	Mean	5,60000	6,94350	0,02000	15,51000
	N	2	2	2	2
	Std. Deviation	0,014142	0,004950	0,000000	0,014142
	Median	5,60000	6,94350	0,02000	15,51000
	Minimum	5,590	6,940	0,020	15,500
	Maximum	5,610	6,947	0,020	15,520
	Range	0,020	0,007	0,000	0,020
Oksitosin	Mean	5,61000	-0,74372	0,07500	14,21500
	N	2	2	2	2
	Std. Deviation	0,000000	0,005261	0,007071	0,007071
	Median	5,61000	-0,74372	0,07500	14,21500
	Minimum	5,610	-0,747	0,070	14,210
	Maximum	5,610	-0,740	0,080	14,220
	Range	0,000	0,007	0,010	0,010
Sunitinib	Mean	5,68000	-0,75872	0,17500	5,67000
	N	2	2	2	2
	Std. Deviation	0,014142	0,015952	0,007071	0,000000
	Median	5,68000	-0,75872	0,17500	5,67000
	Minimum	5,670	-0,770	0,170	5,670
	Maximum	5,690	-0,747	0,180	5,670
	Range	0,020	0,023	0,010	0,000
Kombine	Mean	5,74500	-0,70789	0,00350	5,41000
	N	2	2	2	2
	Std. Deviation	0,007071	0,002984	0,009192	0,014142
	Median	5,74500	-0,70789	0,00350	5,41000
	Minimum	5,740	-0,710	-0,003	5,400
	Maximum	5,750	-0,706	0,010	5,420
	Range	0,010	0,004	0,013	0,020
Total	Mean	5,65875	1,18329	0,06838	10,20125
	N	8	8	8	8
	Std. Deviation	0,063118	3,555338	0,071821	5,008038
	Median	5,64000	-0,72500	0,04500	9,94000
	Minimum	5,590	-0,770	-0,003	5,400
	Maximum	5,750	6,947	0,180	15,520
	Range	0,160	7,717	0,183	10,120

TARTIŞMA

Yapılan bu deneysel çalışmada, organ ve doku nakillerinde kullanılan immünsupresif ajan olan sunitinibin sıçan ADKMKH üzerindeki etkileri ve antioksidan bir ajan olan oksitosinin sunitinibin oluşturduğu toksik etkinin azaltılması için yeni bir ajan olarak kullanılma olasılığı araştırılmıştır.

Sunitinib küçük molekül, çok hedefli bir reseptör tirozin kinaz (RTK) inhibitörüdür ve renal hücreli karsinom, gastrointestinal stromal tümör (GIST), endokrin pankreas kanseri gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Sunitinib, tümör hücresinin büyümesini etkiler aynı zamanda anjiyogenezde de önemli rol oynar. Sunitinib, VEGFR-1 ve 2, PDGFR- α ve - β , c-KIT-reseptörü ve Flt-3 dâhil olmak üzere çoklu bölünmüş kinaz alan RTK'larını inhibe eder. Tirozin kinaz inhibitörünün APC'lerin ve T lenfositlerin fonksiyonu ve gelişimi üzerinde olumsuz etkilere sahip olduğu bilinmektedir (Hipp ve ark., 2008). Sunitinib, tirozin kinazların adenozin trifosfat (ATP) bağlayıcı oyuğu ile etkileşime girer ve rekabetçi bir ATP inhibitörü olarak işlev görür. Sunitinib, vasküler geçirgenlikte, yeni kan damarı oluşumunun inhibisyonunda ve mevcut tümör damarlanmasının gerilemesinde önemli bir azalmaya neden olur (Papaetis ve Syrigos, 2009). Tümör hücre çoğalmasını ve göçünü ortadan kaldırır ve Rb fosforilasyonunu azaltır, bu da G0/G1 fazında bir hücre döngüsü durmasına neden olur (Diaz, Nguewa, Redrado, Manrique ve Calvo, 2015).

Hücre hatlarındaki çalışmalarda, sunitinibin vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörü ve PDGF stimülasyonuna yanıt olarak ligand bağımlı RTK fosforilasyonunu, insan endotel hücreleri ve fare fibroblastlarının proliferasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. GIST hücre hattı kullanılarak yapılan çalışmalarda sunitinib, bu hücrelerde KIT'in fosforilasyonunu inhibe ederek büyüme durması ve apoptoz ile sonuçlandı (Seandel ve ark., 2006).

Yapılan *in vivo* deneylerde, hayvanlarda tümör oluşturulduktan sonra oral olarak sunitinib verilmiştir. Ksenograft olarak yerleştirilen birçok tümör büyümesi inhibe edilmiştir. VEGFR-2 ve PDGFR-y eksprese eden tümörlerde sunitinib, bu reseptörlerin ve kaskattaki fosforilasyonunu önemli ölçüde inhibe etmektedir.

İmmüsupresif ajanların tümü toksisite etkisine sahiptir. Bu yüzden tedavilerde genellikle farklı doz uygulamaları yapılmaktadır. Sunitinib çok hedefli bir ilaçtır ve bu da ilişkili hedef dışı ve geniş spektrumlu aktivite, onlara benzersiz bir toksisite profili sağlar. Örneğin; tümör hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini, normal hücreler üzerinde de sürdürmesi, tedavideki kullanımı açısından olumsuz bir özelliktir. Böylece, sunitinibin bağışıklık sistemi üzerindeki etkilerinin ve antijene özgü immün tepkilerinin indüksiyonunun analiz edilmesi ilerleyen klinik çalışmalar için önemlidir (Lemmon ve Schlessinger, 2010).

Litaretüre bakıldığında, sunitinibin mezenkimal kök hücreler üzerindeki toksik etkisini konu alan bir çalışmaya rastlanmamaktadır. Ancak yapılan bir çalışmada sunitinib benzeri bir tirozin kinaz inhibitörü olan imatinib'in insan mezenkimal kök hücrelerin proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Jönsson ve ark., 2012).

Mezenkimal kök hücreler (MKH) kemirgenlerden insanlara kadar birçok farklı erişkin canlıların dokularında bulunur. MKH'ler etik sorun oluşturmadıkları ve kolay erişilebilir olduğundan dolayı hücre terapisi, rejeneratif tıp ve doku onarımı gibi alanlarda araştırmacılar tarafından tercih edilmektedir. Ayrıca, MKH'lerin immüsupresif özelliklere sahip olduğunu kanıtlanmıştır (Res, 2009). Kemirgenler, tavşanlar ve babun maymunlarında kemik iliği, deri, kalp ve kornea nakli, GVHD, hepatik ve böbrek yetmezliği, akciğer hasarı, multipl skleroz, romatoid artrit, diyabet ve lupus hastalıkları için klinik öncesi çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan bazılarının ön sonuçları, şu anda yürütülmekte olan insan klinik denemelerine yol açmıştır. Bunlar arasında Crohn hastalığı, ülseratif kolit, multipl skleroz ve tip 1 diabetes mellitus gibi otoimmün hastalıkların tedavisi; allogreft reddinin önlenmesi ve kemik iliği ve böbrek greftlerinin hayatta kalmasının artırılması ve dirençli GVHD'nin tedavisi yer almaktadır (De Miguel ve ark., 2012).

In vitro çalışmalar MKH'lerin lenfositler üzerinde doğrudan bir immünmodülatör etkisi olduğunu göstermiştir. MKH'lerin lenfositlerle birlikte kültürlenmesi sırasında, aktive edilmiş CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinin ve B-lenfositlerin baskılanması gözlenmiştir. Ek olarak, MKH'ler, tümör nekroz faktörü (TNF)-a ve interferon (IFN) - γ gibi T-lenfositler tarafından sentezlenen pro-inflamatuar sitokinlerin seviyesini azaltır ve anti-inflamatuar sitokinlerin, örneğin IL-4'nin sentezini artırır. MKH'lerin varlığında, saf CD4⁺ T lenfositlerinin T yardımcı hücrelere (Th 17⁺) lenfositlere farklılaşmasının inhibisyonu

gözlenirken, CD4⁺ CD25⁺ düzenleyici T hücrelerine doğru farklılaşan T hücrelerinin yüzdesinin arttığı bulunmuştur. MKH'ler aktiveleştirilmiş B hücreleri tarafından salgılanan immünoglobulin (Ig) M, IgG ve IgA sınıfları gibi immünglobulinlerin sentezini sınırlama ve böylece bu hücrelerin plazma hücrelerine farklılaşmasını engelleme yeteneğine sahiptir. Ayrıca, kemokinlerin ve reseptörlerinin B lenfositlerinin yüzeyindeki ekspresyonunu azaltır böylece göç yetenekleri üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir (Andrzejewska, Lukomska ve Janowski, 2019).

In vivo çalışmalar, MKH'lerin bağışıklığı olan hastalıklarda ve nakledilen dokunun reddedilmesinde önemli bir rol oynayabileceğini göstermiştir. Allojeneik kök hücre naklinden kaynaklanan hayatı tehdit eden bir komplikasyon olan GVHD'de MKH hücrelerinin infüzyonu steroid dirençli GVHD'de umut verici sonuçlar göstermiştir. MKH'lerin doğuştan gelen ve uyarlanabilir bağışıklık hücrelerini baskıladığı gösterilmiştir (Williams ve Hare, 2011).

Yapılan bir çalışmada, GVDH fare modelinde MKH'lerin immünsupresif etkisinin, alıcının sitotoksik T hücresi aktivitesine bağlı olduğu bildirilmiştir. Alıcıdaki yüksek sitotoksik T hücrelerinin MKH apoptozunu indüklediği ve apoptotik MKH'lerin alıcının fagositleri tarafından temizlendiği bulunmuştur. Bu çalışmada, GVHD hastasının T hücrelerinin MKH'lere karşı sitotoksik aktivitesinin, klinik yanıtla pozitif korelasyona sahip olduğunu doğrulanmıştır (Godoy ve ark., 2019).

MKH'lerde yer alan birçok sinyal yoluna, immünmodulator etkiler, çözünebilir faktörlerin aracılık ettiği için, MKH'den kaynaklanan eksozomlara sahip olanlar gibi hücreler arası iletişim stratejileri de dikkate alınmaktadır. Eksozomlar, sitokinler, mRNA'lar ve düzenleyici miRNA'lar gibi önemli aktif molekülleri taşıyabilir. Kemik iliği MKH'leri tarafından salınan eksozomların, CD4⁺ T hücrelerini inhibe ederek, inflamatuvar sitokinleri azaltarak ve Treg hücrelerini eksprese eden IL-10'u artırarak farelerde GVHD'yi iyileştirdiği bildirilmiştir (Godoy ve ark., 2019).

Yapılan birçok araştırma ADKMKH'lerin hem *in vitro* hem de *in vivo* iyileşme hızını artırabileceğini ve iyileşme süresini azaltabildiğini göstermiştir. ADKMKH'ler, keratinositler, fibroblast benzeri hücreler ve endotelial hücreler gibi spesifik hücre soylarına, büyüme

faktörleri ve sitokinlerin salınmasıyla birlikte, anjiyogenezi, gelişimi, fibroblastların göçünü, fibronektin ve kollajen üretimini teşvik etmektedirler. Ayrıca adipoz kökenli bu hücreler T-hücresinin yanı sıra IL-10 salgılanması ve aktivitesi ile bağışıklık sisteminin dengesinin korunmasına yardımcı olmaktadır (Chu ve ark., 2019).

Çeşitli hücre tipleri oksitosin kullanımı sayesinde oksidatif strese dirençli hale gelmektedir (Szeto ve ark., 2008). Oksitosin tedavisi, ayrıca kök hücre farklılaşmasını da kontrol eder. Böylece, hücresel terapi uygulamaları için önemli sonuçlara sahip olabilir. Oksitosin ile hazırlanmış kök hücreler, hasarlı ortamı optimize ederek destekleyici bir rol oynayabilir ve hücre yanıtını değiştirerek iyileşmeyi hızlandırabilir (Cattaneo, Lucci ve Vicentini, 2009). Kim ve arkadaşlarının yaptığı örnek bir çalışmada, iskemi/reperfüzyon hasarı olan bir sıçan modelinde kardiyak onarımı güçlendirmek için insan MKH'nin oksitosin ile hazırlandığını bildirilmiştir. Bu daha sonraki çalışmada, oksitosin ile tedavi edilen MKH ile ifade edilen kardiyak belirteçler ve sıçan iskemik kalbine nakledildiğinde, MKH fibrozu azalttığı ve kardiyak fonksiyonel iyileşme sağladığı bildirilmiştir (Kim ve ark., 2012). Noiseux ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka örnek çalışmada, oksitosin ile uyarılan MKH'nin fonksiyonel analizi, artmış hücresel proliferasyon, hipoksinin ve serum yoksunluğunun sitotoksik ve apoptotik etkilerine karşı hücre koruması ve hücresel göç göstermiştir (Noiseux ve ark., 2012).

Sunitinibin hücrelerin canlılıklarını önemli ölçüde engellediğine dair çalışmalar bulunmaktadır. Hem *in vivo* hem de *in vitro* da hücreler üzerinde toksik etkilere sahip olduğu belirtilmiştir. Ancak, literatürde sunitinibe maruz kalmış ADKMKH için tespit edilmiş herhangi bir IC₅₀ değeri bulunmamaktadır.

Bu çalışmada sunitinibin ADKMKH hattı üzerindeki sitotoksik etkisine WST-1 testi ile bakılmıştır, hücreler üzerindeki IC₅₀ dozu 48. saatte 44,57 µM olarak tespit edilmiştir.

Literatürde sunitinibin ADKMKH hattı üzerinde tespit edilmiş herhangi bir IC₅₀ değerini gösteren veri bulunmamaktadır. Du ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, Lewis Akciğer Karsinomu hücre hattı (LL/2) üzerinde sunitinib etkisi incelenmiştir. LL/2- hücre hattı giderek artan konsantrasyonlarda 6 aydan fazla süreyle sunitinib ile tedavi edilmiştir. Son olarak, sunitinibe dirençli LL/2 hücre hattı, LL/2-R (alt LL/2 hücre hattı) oluşturulmuştur. LL/2 hücre

alt hatları için IC_{50} değerleri MTT ile belirlenmiştir. LL/2-R hücre hattının IC_{50} 'si, LL/2-P hücre hattına kıyasla yaklaşık 5 kat daha yüksek konsantrasyonlar göstermektedir: bunlar sırasıyla 10.03 μM 'ye karşı 1.94 μM olarak belirlenmiştir (Du ve ark., 2017).

Wu ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada, endotel hücreleri üzerinde sunitinibin *in vivo* ve *in vitro* etkileri araştırılmıştır. Sunitinib direncinin gelişiminde rol oynayan önemli bir mekanizma olan renal ve kolorektal kanser hücrelerinde lizozomal sekestrasyon olduğu gösterilmiştir. Daha sonra, endoteliyal HMEC-1 hücrelerinde Sunitinib lizozomal sekestrasyonunun ve bunun çoklu ilaç direnci ile ilişkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada sunitinibin hücre profilerasyonunu inhibe ettiği kanıtlanmıştır (Wu ve ark., 2020).

Yapılan çalışmamızda da sunitinibin IC_{50} dozunu 48. saatte saptanmış, maruziyet süresinin artmasının ADKMKH canlılığını azalttığını düşündürmektedir.

Sır ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, oksitosinin insan adipoz kökenli mezenkimal kök hücre hattı üzerindeki IC_{50} değerine bakılmıştır. Sonuç 72. saatte 13.43 μM olarak bildirilmiştir. Memeli hücreleri üzerinde oksitosinin IC_{50} değerlerinin birbirine yakın olabileceği tahmini yapılmıştır (Sir ve ark., 2018).

Çalışmamızda, oksitosinin sıçan ADKMKH hattı üzerindeki IC_{50} değeri incelendiğinde, 100 μM 'a kadar olan doz aralığında oksitosinin hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermediği belirlenmiştir.

Güncel çalışmalar, antioksidan olarak kullanılan oksitosinin hücreler üzerindeki toksisiteyi azalttığına dair verilere odaklanmaktadır. Oksitosin tedavisi, kök hücrelerde hücre farklılaşmasını kontrol eder. Oksitosin, hücresel terapi uygulamalarında önemlidir çünkü konakçı hücre ortamını optimize ederek destekleyici bir rol oynayabilir ve hücre tepkisini değiştirerek iyileşmeyi teşvik edebilir. Oksitosin ve MKH üzerinde yapılan çalışmalarda oksitosinin osteoblast/adiposit dengesinin düzenlendiğine rastlanmıştır. Ayrıca; hücre canlılığı ve proliferasyonunun oksitosin tedavisi sonrası arttığı gözlemlenmiştir (Elabd ve ark., 2008; Santos ve ark., 2018)

Yapılan literatür incelemeleri sonucunda, oksitosinin hücre proliferasyonunu arttırdığı yönündeki bulgulara rastlanmaktadır. Çalışmamızda MKH'ler üzerinde oksitosinin hücre proliferasyonunu artıracığına inanılmaktaydı ancak, sunitinib ve oksitosin kombinasyon halinde uygulandığında sunitinibin IC₅₀ dozunun 8,30 µM'a düştüğü, iki maddenin sinerjistik sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir.

Literatüre bakıldığında, sunitinibin kanser hücre tiplerinde apoptozu indüklediğine dair sonuçlar ile karşılaşılmaktadır. Korashy ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, sunitinibin apoptoz, hücre döngüsü tutuklaması ve oksidatif stres mekanizmaları yoluyla MCF7 insan meme kanseri hücre büyümesi inhibisyonunu indüklediğine dair güçlü kanıtlar göstermektedir. Hücre proliferasyonu ile ilgili genlerin inhibisyonu ve hücre döngüsünde G2/M fazında MCF7 hücrelerinin durdurulması, DNA onarım genlerinin aktivasyonuna izin verilmesi neden olmuştur (Korashy ve ark., 2017).

Literatürde sunitinibin toksik bir madde olarak kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. Oksitosinin ise antioksidan bir madde olarak kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. Ancak, iki maddenin bir arada kullanıldığı bir çalışmaya rastlanmamaktadır. Bu durum çalışmamızın literatüre yeni bilgiler kazandırmasını sağlamaktadır.

Sun ve ark. tarafından yapılan benzer bir çalışmada, bir tirozin kinaz inhibitörü olan İmatinib ve hücre proliferasyonunu artırıcı etkiye sahip doksoribucin'in birlikte kullanıldığı bir çalışmada kombine göbek kordonu-MKH ve imatinib tedavisi hem hassas hem de dirençli hücrelerde daha yüksek apoptoz indüksiyonu sergilemektedir. İmatinibe dirençli hücrelerin sitotoksik ilaçlara duyarlılığını ölçmek için yapılan deneyde kullanılan dirençli Kronik miyelojen lösemi (CML) hücre çizgisi K562-r hücreleri imatinib duyarlılığında bir azalma sergiledi ve doksokromisine çapraz direnç gösterdi (Jing Sun, Hulai Wei, Juan Yi, Jing Chen ve Key, 2018).

Novak ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada, sunitinib benzeri bir tirozin kinaz inhibitörü olan imatinibin hücre tiplerinde zamana ve doza bağlı sitotoksitesi gözlenmiştir. ZFL ve HepG2 hücrelerinin kullanıldığı çalışmada imatinibe maruz kalan bu hücrelerin canlılık oranı önemli ölçüde etkilenmiştir. Hücreler üzerinde sitotoksite

gözlenmiştir. 9,38 ve 18,75 g/mL'ye kadar olan konsantrasyonlarda imatinib sırasıyla ZFL ve HePG2 hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde etkilemiştir (Novak ve ark., 2017).

Çalışmamızda Sunitinib, Oksitosin, Kombine ve Kontrol'den oluşan dört deney grubuna Annexin V yöntemi uygulanarak canlı-ölü hücre yüzdesi ve erken, geç apoptoz oranları Accuri C6 Cell Analyzer ile belirlenmiştir. Yapılan hesaplamalar doğrultusunda etken maddeye maruz kalmayan kontrol grubundaki hücrelerde ölü hücre %1,03; canlı hücre %98,97 olarak hesaplanmıştır. Oksitosin grubundaki hücrelerde ölü hücre %2,59; canlı hücre %97,41 olarak hesaplanmıştır. Oksitosin ve kontrol grubu arasında bir kıyaslama yapılacak olursa her ikisinin de ölü ve canlı hücreleri arasında küçük farklar olduğu görülmektedir. Bu durum oksitosinin hücreler üzerinde apoptotik etki göstermediğini ispatlamaktadır. Sunitinib grubuna bakıldığında erken apoptoz oranı %7,69; geç apoptoz oranı %4,31; ölü hücre % 8,10, canlı hücre %79,90 olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubuna kıyasla canlı hücre yüzdesindeki bu düşüş sunitinibin hücreler üzerindeki apoptotik etkisini göstermektedir. Sunitinib ve Oksitosinin analizi ile belirlenen canlılık yüzdeleri, literatürde yer alan ve bu çalışmadaki WST-1 testi ile gözlemlediğimiz sunitinibin toksik etkisi nedeniyle hücreleri öldürdüğü yönündeki bulguları desteklemektedir.

Oksitosin+Sunitinib kombine grubu sonuçlarında ise erken apoptoz oranı %3,90; geç apoptoz oranı %1,34; ölü hücre yüzdesi 7,81; canlı hücre yüzdesi 25,5 olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlar, Sunitinib grubundaki sonuçlarla kıyaslandığında ölü hücre yüzdesinde düşüş ve canlı hücre yüzdesindeki artış olduğu gözlemlenmektedir. Kombine grubundaki ölü hücrelerdeki düşüş ve canlı hücrelerdeki artış oksitosinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çalışmada, Annexin V boyaması sonrası deney grupları mikroskopik olarak gösterilmiştir. Annexin V ile yapılan immünfloresans incelemede Sunitinib grubunda Accuri C6 ile benzer şekilde boyanan hücre sayısı yüksek olarak saptanmıştır. Oksitosin ve Kombine grubunda ise benzer görünümde ve yakın sayılarda Annexin V pozitif hücre sayısı elde edilmiştir. Hücre canlılık analizlerinin istatistiksel değerlendirmesinde, Sunitinib ve Kombine grup arası hariç diğer gruplar arası istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,0001$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında oksitosin etkisi de anlamlıdır.

Nekrotik hücre yüzdesi istatistiksel değerlendirilmesinde, Nekrotik hücre yüzdelerinde hiçbir grupta tekrarlar arası varyasyon olmadığı için istatistiksel değerlendirme yapılamadı. Kontrol grubu için %0,00; Oksitosin grubu için %0,10; Sunitinib ve Kombine grupları için %0,70 değerleri elde edildi. En çok nekrotik hücre Sunitinib ve Kombine gruplarında gözlemlenmiştir. Nekrotik hücre açısından oksitosin, Sunitinib etkisini giderememiştir.

Geç apoptoz yüzdesi istatistiksel değerlendirmesinde, geç apoptotik hücre yüzdesi oranı kontrol ve oksitosin grupları değişkenlik olmadığı için analize alınmadı, diğer iki grup için hesaplanan güven aralıklarına göre incelendi. Kontrol grubu için %0,10; Oksitosin için %1,10; Sunitinib için %25,50 ve Kombine grupları için %44,50 değerleri elde edildi. Geç apoptotik hücre yüzdesi oranı Kontrol-Sunitinib, Kontrol-Kombine, Oksitosin-Sunitinib ve Oksitosin-Kombine grupları güven aralıklarının dışında kalmaktadır ($p<0,05$). Sunitinib-Kombine grupları arası fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,001$). Kontrol ve Oksitosin gruplarında çok düşük oranda geç apoptotik hücre var iken en yüksek geç apoptotik hücre yüzdesine sahip olan grup kombine tedavi grubudur.

Erken apoptoz yüzdesi istatistiksel değerlendirmesinde, tüm gruplar arasında ikili farkların tümü istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). Kontrol grubu için %2,15; Oksitosin için %17,55; Sunitinib %53,30 ve Kombine grupları için %29,20 değerleri elde edildi. Kontrol-Oksitosin; Kontrol-Sunitinib ($p<0,001$); Kontrol-Kombine ($p=0,001$), Oksitosin-Sunitinib ($p<0,001$); Oksitosin-Kombine ($p=0,001$); Sunitinib-Kombine ($p<0,001$) grupları arası fark anlamlıdır. Erken dönem apoptotik hücre yüzdesi açısından en düşük oran kontrol grubunda görülmektedir. En yüksek oranda erken apoptotik hücre Sunitinib grubunda görülürken Kombine gruptaki erken dönem apoptotik hücre oranı Oksitosin ve Sunitinib uygulanan grupların arasında bir yüzdeye sahiptir.

Canlı hücre yüzdesi istatistiksel değerlendirmesinde, Sunitinib ve Kombine grupları değişkenlik olmadığı için analize alınmadı. Diğer iki grup için hesaplanan güven aralıklarına göre incelendi. Kontrol grubu için %97,75, Oksitosin için %81,15, Sunitinib %20,50 ve Kombine grupları için %25,50 değerleri elde edildi. Canlı hücre yüzdesi oranı Kontrol-Sunitinib; Kontrol-Kombine, Oksitosin-Sunitinib; Oksitosin-Kombine ($p<0,05$) güven aralıklarının dışında kalmaktadır; Kontrol-Oksitosin grupları arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,001$). Gruplar arasında ikili farkların tümü istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,001$). Kontrol

grubu ile karşılaştırıldığında oksitosin etkisi de anlamlıdır. Kombine grupta oksitosin etkisi sunitinibi etkisini baskılamıştır. En az canlı hücre Sunitinib grubunda gözlemlenmiştir.

Yapılan bu tez çalışmasında deney grupları lipit peroksidasyonu, glutatyon peroksidaz, katalaz ve superoksit dismutaz olmak üzere dört ayrı oksidatif stres parametresi ile enzimatik olarak değerlendirilmiştir. Oksidatif stres, hücrelerde ve dokularda oksijen reaktif türlerin (ROS) üretimi ve birikimi ile biyolojik bir sistemin bu reaktif ürünleri detoksifiye etme yeteneği arasındaki dengesizliğin neden olduğu bir fenomendir. ROS hücre sinyalleme yapar ve oksijen metabolizmasının yan ürünleri olarak üretilir; buna rağmen, çevresel stres faktörleri (UV, iyonlaştırıcı radyasyonlar, kirleticiler ve ağır metaller) ve ksenobiyotikler (antiblastik ilaçlar) ROS üretimini büyük ölçüde artırmaya katkıda bulunur, bu nedenle hücre ve doku hasarına ve oksidatif strese yol açan dengesizliğe neden olur (Pizzino ve ark., 2017). Hücreler, kendilerini ROS ile indüklenen hücresel hasardan korumak için esas olarak superoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimatik bileşenlere dayanan bir antioksidan savunma sistemi kullanır (Bahoran, Soobrattee, Luximon-Ramma ve Aruoma, 2007).

İmmüsupresif ajanların sitotoksik aktiviteleri genellikle artan ROS üretimi ile ilişkilidir. İnsan meme (MCF-7 ve T-47D), servikal (Hela), kolorektal (Caco-2 ve HCT116), hepatoselüler (HepG2), laringeal (HEp-2) ve prostat (PC3) kanser hücrelerinin kullanıldığı bir çalışmada sunitinib oksidatif stres parametrelerinden katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivitelerini önemli ölçüde yükselttiği gösterilmiştir (Imam ve ark., 2020).

Lipit peroksidasyonu genel olarak, serbest radikaller gibi oksidanların, karbon-karbon çift bağları içeren lipitlere, özellikle de çoklu doymamış yağ asitlerine saldırdığı bir işlem olarak tanımlanabilir. Lipit peroksidasyonu, temel olarak birkaç reaktif oksijen türünün (hidroksil radikali, hidrojen peroksit vb.) etkisiyle vücutta küçük miktarlarda doğal olarak üretilen bir süreçtir (Ayala, Muñoz ve Argüelles, 2014). Bu moleküllerden lipit peroksidasyonun en önemli ürünü olarak malondialdehit (MDA) kabul edilmektedir. MDA, klinik durumlarda oksidatif stresi belirleyen en popüler ve güvenilir belirteçlerden biridir. ROS'tan kimyasal olarak daha kararlı ve zar geçirendir. Enzim aktivitelerinin değişmesine sebep olabilmektedir (Esterbauer, Schaur ve Zollner, 1991).

Literatürde, sunitinib ile yapılan benzer bir çalışmaya rastlanmamıştır ancak bir başka tirozin kinaz inhibitörü olan imatinib ile Gajski ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, ZFL, HPBLs ve HePG2 hücrelerine uygulanan imatinib'in (IM) oksidatif stres parametreleri incelenmiştir. GSH seviyelerinde yüksek IM konsantrasyonları sayesinde düşüş oldu. MDA seviyelerinde IM maruziyeti nedeniyle önemli bir artış olmuştur. IM tüm oksidatif stres parametrelerini etkilemiştir. Düşük IM konsantrasyonları oksidatif stres savunmalarında bozulmaya işaret eden daha yüksek IM konsantrasyonlarındaki düşüşün ardından GSH seviyelerinde bir artışa neden olmuştur. GSH düşüşüne paralel olarak, test edilen hücrelerdeki lipidlerin ve proteinlerin oksidatif hasarına işaret eden MDA ve PC seviyelerinde artış gözlemlenmiştir (Gajski ve ark., 2019)

Bu çalışmada, malondialdehit miktarında kontrol verilerine göre uygulama gruplarında saptanan değişimlerde Kontrol grubunda 0,02000 nmol/mg, Oksitosin grubunda 0,07500 nmol/mg, Sunitinib grubunda 0,17500 nmol/mg, Kombine grupta 0,00350 nmol/mg olarak saptanmıştır. MDA düzeyi bakımından Kontrol-Sunitinib ($p<0,05$); Kontrol-Kombine, ve Kontrol-Oksitosin ($p>0,05$) arası fark anlamsız; Oksitosin-Sunitinib ($p=0,010$); Oksitosin-Kombine ($p=0,032$); Sunitinib-Oksitosin ($p=0,006$) grupları arası fark anlamlıdır.

Glutasyon peroksidaz-1 (GPx-1), zararlı etkilerini sınırlamak için hidrojen peroksidi enzimatik olarak suya indirgeyen hücre içi bir antioksidan enzimdir. Hücrelerin yapısını ve fonksiyonunu korumaktadır. Ayrıca peroksit radikallerinin alkollere ve oksijene indirgenmesini katalize edmektedir (Bienert ve ark., 2007).

Çalışmamızda, GSH-Px aktivitesi kontrol grubunda 15,51000 mU/ml, Oksitosin grubunda 14,21500 mU/ml, Sunitinib grubunda 5,67000 mU/ml, kombine grupta 5,41000 mU/ml olarak ölçülmüştür. GPX düzeylerinde Sunitinib ile Kontrol, Oksitosin ve Kombine grupları arasında ($p<0,05$ güven aralıklarının dışında kalıyor) farklar anlamlı bulundu. Kontrol-Oksitosin ($p=0,001$), Kontrol-Kombine ve Oksitosin-Kombine ($p<0,001$) grupları arası farklar anlamlı bulundu.

Katalaz, zararlı hidrojen peroksiti oksijene ve suya parçalayan bir enzimdir. Bu enzim, hidrojen peroksidin ayrışması yoluyla nötralizasyondan sorumludur, böylece hücrel

sinyalleme süreçleri için de gerekli olan, hücrede molekülün optimum seviyesini korur (Glorieux ve Calderon, 2017).

Ammar ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, hem IM dirençli hem IM dirençsiz KML hastalarında oksidan ve antioksidan durumları karşılaştırıldı. SOD ve CAT aktiviteleri, IM dirençli olmayan KML hastalarına karşı IM dirençli hastalarda artmıştır. CAT ve SOD aktivitelerini sunan IM tedavisi olan KML hastalarının direnç durumuna evrimleşme olasılığının daha yüksek olduğu düşünülmektedir (Ammar, Lobna Ben Mahmoud, Moez Medhaffar, Mseddi, Elloumi ve Zeghal, 2019).

Yapılan bu tez çalışmasında, katalaz aktivitesinin ölçümü sonucunda elde edilen bulgularda Kontrol grubu 5,60000, Oksitosin grubu 5,61000, Sunitinib grubu 5,68000, Kombine grup 5,74500 olarak bulunmuştur. Katalaz düzeyleri bakımından Oksitosin-Kontrol ve Oksitosin-Sunitinib arasındaki fark anlamsızdır ($p>0,05$). Oksitosin-Kombine grupları arasında anlamlı ($p<0,05$); Kontrol-Sunitinib ($p=0,062$) ve Sunitinib-Kombinasyon ($p=0,103$) arasındaki farklar anlamsızdır. Kontrol-Kombine ($p=0,032$) grupları arası fark anlamlı bulundu.

Superoksit dismutaz (SOD), vücutta oksidatif strese karşı çok önemli bir antioksidan savunma oluşturur. Enzim, reaktif oksijen türlerinin aracılık ettiği hastalıklara karşı iyi bir terapötik ajan görevi görür (Fukai ve Ushio-Fukai, 2011).

Çalışmamızda, SOD enzim aktivitesi ölçümünde inhibisyon yüzdeleri Kontrol grubunda 6,94350, Oksitosin grubunda -0,74372, Sunitinib grubunda -0,75872, Kombine grupta -0,70789 olarak ölçülmüştür. SOD düzeyleri bakımından kontrol ile diğer üç grup arasında farklar anlamlı bulunurken, diğer gruplar arasında hiç bir ikili farklılık anlamlı bulunmadı. Elde edilen p değerleri; Kontrol-Oksitosin ve Kontrol-Kombine ($p<0,001$) Kontrol-Sunitinib ($p=0,001$), Oksitosin-Sunitinib ($p=0,766$), Oksitosin-Sunitinib ($p=0,071$), Sunitinib-Kombine ($p=0,272$) olarak gerçekleşmiştir.

Elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda; Lipit peroksidasyon parametresi açısından bakıldığında yalnızca sunitinib kullanımının oksidatif stres yarattığı, yalnız oksitosin kullanımının oksidatif stresi azalttığı, birlikte kullanımlarında bir düşüş olduğu gözlemlenmektedir. Glutasyon peroksidaz parametreleri açısından bakıldığında yalnız

sunitinib kullanımının oksidatif stres yarattığı, yalnız oksitosin kullanımının oksidatif stresi azalttığı, ancak birlikte kullanımlarında anlamlı bir etkinin olmadığını gözlemlendi. Katalaz parametreleri açısından bakıldığında ise beklenen etkiyi gözlemlenmedi. Oksitosin ve sunitinibin kombinasyon halinde kullanılması katalaz aktivitesini oldukça yükseltmiştir. SOD, parametrelerine bakıldığında oksitosin kullanımının ciddi bir etkiye sahip olmadığı görülmektedir.



SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Sunitinib, ADKMKH üzerinde sitotoksik etkiye sahiptir.
2. Oksitosin hücre kültürü çalışmalarında hücrelerin hücre canlılığı ve proliferasyonu artırmaktadır.
3. Sunitinib-Oksitosin kombine grupta canlı hücre, ölü hücre, erken ve geç apoptoz yüzdeleri sunitinib grubu ile karşılaştırıldığında kombine gruptaki bulguların arttığı gözlemlenmiştir. Bu bulguların oksitosin etkisiyle olduğu düşünülmüştür.
4. Literatürde sunitinibin adipoz doku kaynaklı kök hücre hattı üzerinde tespit edildiği, herhangi bir IC₅₀ değerini gösteren veri bulunmamaktadır. Bu çalışmada sunitinibin sıçan ADKMKH üzerindeki sitotoksik etkisine WST-1 testi ile bakılmış, 48. saatte IC₅₀ dozu 44,57 μ M olarak tespit edilmiştir.
5. Doku ve organ nakilleri için uygulanan immünsupresif tedavi ve ADKMKH yanında oksitosinin kullanımı hastalarda, mezenkimal kök hücre popülasyonu üzerinde olumlu etkiler oluşturabileceği düşünülmektedir. Oksitosin klinik uygulamalar için önemli bir potansiyel ajandır. Ancak sunitinib ile birlikte kullanıldığında, sunitinibin apoptotik etkinliğini az miktarda baskılamakla birlikte sitotoksik olarak sinerjistik etki gösterdiğinden özellikle bu sonuca neden olan mekanizmaların araştırılması önemlidir.
6. Konu ile ilgili hayvan model çalışmalarında alınacak başarılı sonuçlar neticesinde klinik çalışmalar ve hücresel tedavilerde oksitosinin rutin kullanıma sunulması açısından önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Ammar M., Ben Mahmoud L, Medhaffar M., Mseddi H. G, Z. S. A. H. M., Elloumi, M. ve Zeghal, K. (2019). Relationship of oxidative stress in the resistance to imatinib in Tunisian patients with chronic myeloid leukemia: A retrospective study.
- Amorin, B., Alegretti, A. P., Valim, V., Pezzi, A., Laureano, A. M., da Silva, M. A. L., ... Silla, L. (2014). Mesenchymal stem cell therapy and acute graft-versus-host disease: a review. *Human Cell*, 27(4), 137–150. doi:10.1007/s13577-014-0095-x
- Andrzejewska, A., Lukomska, B. ve Janowski, M. (2019). Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost. *Stem Cells*. Wiley-Blackwell. doi:10.1002/stem.3016
- Aparicio-Gallego, G., Blanco, M., Figueroa, A., García-Campelo, R., Valladares-Ayerbes, M., Grande-Pulido, E. ve Antón-Aparicio, L. (2011,). New insights into molecular mechanisms of sunitinib-associated side effects. *Molecular Cancer Therapeutics*. American Association for Cancer Research. doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-1124
- Ayala, A., Muñoz, M. F. ve Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Landes Bioscience. doi:10.1155/2014/360438
- Bahoran, T., Soobrattee, M. A., Luximon-Ramma, V. ve Aruoma, O. I. (2007). Free Radicals and Antioxidants in Cardiovascular Health and Disease. *Internet Journal of Medical Update - EJOURNAL*, 1(2). doi:10.4314/ijmu.v1i2.39839
- Baker, C. L. ve Pera, M. F. (2018). Cell Stem Cell Review Capturing Totipotent Stem Cells. doi:10.1016/j.stem.2017.12.011
- Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, et al. (2002) Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental hematology*, 30:42–48.
- Ben-Baruch, A. (2006). Inflammation-associated immune suppression in cancer: The roles played by cytokines, chemokines and additional mediators. *Seminars in Cancer Biology*. Semin Cancer Biol. doi:10.1016/j.semcancer.2005.07.006

- Bezinover, D. ve Saner, F. (2019). Organ transplantation in the modern era. *BMC Anesthesiology*. doi:10.1186/s12871-019-0704-z
- Biehl, J. K. ve Russell, B. (2009). Introduction to Stem Cell Therapy. *Journal of Cardiovascular Nursing*, 24(2), 98–103. doi:10.1097/JCN.0b013e318197a6a5
- Bienert, G. P., Møller, A. L. B., Kristiansen, K. A., Schulz, A., Møller, I. M., Schjoerring, J. K. ve Jahn, T. P. (2007). Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 282(2), 1183–1192. doi:10.1074/jbc.M603761200
- Canto-Soler, V., Flores-Bellver, M. ve Vergara, M. N. (2016). Stem cell sources and their potential for the treatment of retinal degenerations. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 57(5), ORSFd1–ORSFd9. doi:10.1167/iovs.16-19127
- Caplan, A. I. (2017). Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! doi:10.1002/sctm.17-0051
- Cattaneo, M. G., Lucci, G. ve Vicentini, L. M. (2009). Oxytocin stimulates in vitro angiogenesis via a Pyk-2/Src-dependent mechanism. *Experimental Cell Research*, 315(18), 3210–3219. doi:10.1016/j.yexcr.2009.06.022
- Chagastelles, P. C. ve Nardi, N. B. (2011). Biology of stem cells: An overview. *Kidney International Supplements*, 1(3), 63–67. doi:10.1038/kisup.2011.15
- Chen, T., You, Y., Jiang, H. ve Wang, Z. Z. (2017). Epithelial-mesenchymal transition (EMT): A biological process in the development, stem cell differentiation and tumorigenesis. doi:10.1002/jcp.25797
- Chu, D.-T., Nguyen Thi Phuong, T., Tien, N. L. B., Tran, D. K., Minh, L. B., Thanh, V. Van, ... Thi Nga, V. (2019). Adipose Tissue Stem Cells for Therapy: An Update on the Progress of Isolation, Culture, Storage, and Clinical Application. *Journal of Clinical Medicine*, 8(7), 917. doi:10.3390/jcm8070917
- Claeys, E., Vermeire, K. ve Leuven, K. U. (2019). *Immunosuppressive drugs in organ transplantation to prevent allograft rejection: Mode of action and side effects*. *Journal of Immunological Sciences* (C. 3).
- Curtsinger, J. M. ve Mescher, M. F. (2010). Inflammatory Cytokines as a Third Signal for T Cell Activation. doi:10.1016/j.coi.2010.02.013
- De Miguel P., M., Fuentes-Julian, S., Blazquez-Martinez, A., Y. Pascual, C., A. Aller, M., Arias, J. ve Arnalich-Montiel, F. (2012). Immunosuppressive Properties of

- Mesenchymal Stem Cells: Advances and Applications. *Current Molecular Medicine*, 12(5), 574–591. doi:10.2174/156652412800619950
- Delbaldo, C., Faivre, S., Dreyer, C. ve Raymond, E. (2012). Sunitinib in advanced pancreatic neuroendocrine tumors: Latest evidence and clinical potential. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. doi:10.1177/1758834011428147
- Dholakia, S., Fildes, J. E. ve Friend, P. J. (2017). The use of kinase inhibitors in solid organ transplantation. *Transplantation Reviews*. W.B. Saunders. doi:10.1016/j.trre.2017.02.008
- Diaz, R., Nguewa, P. A., Redrado, M., Manrique, I. ve Calvo, A. (2015). Sunitinib reduces tumor hypoxia and angiogenesis, and radiosensitizes prostate cancer stem-like cells. *Prostate*, 75(11), 1137–1149. doi:10.1002/pros.22980
- Díez Villanueva, P., Sanz-Ruiz, R., ´ Uñez García, A. N., Eugenia, M., Santos, F., Sánchez, P. L. ve Fernández-Avilés, F. (2012). Functional Multipotency of Stem Cells: What Do We Need from Them in the Heart? *Stem Cells International*, 2012, 12. doi:10.1155/2012/817364
- Du, Y., Liu, J.-Q., Tang, J., Ge, J., Chen, Y., Cheng, K., ... Liu, J.-Y. (2017). *Acquired tumor cell resistance to sunitinib by increased invasion and epithelial-mesenchymal transition in LL/2 murine lung cancer*. www.impactjournals.com/oncotarget adresinden erişildi.
- Elabd, C., Basillais, A., Beaupied, H., Breuil, V., Wagner, N., Scheideler, M., ... Amri, E.-Z. (2008). Oxytocin Controls Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells and Reverses Osteoporosis. *Stem Cells*, 26(9), 2399–2407. doi:10.1634/stemcells.2008-0127
- EL Barky A.R, E. M. M. A. and T. M. M. (2017). Stem Cells, Classifications and their Clinical Applications. *American Journal of Pharmacology & Therapeutics*, 1(1), 1–7. www.scireslit.com adresinden erişildi.
- Esterbauer, H., Schaur, R. J. ve Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*. Free Radic Biol Med. doi:10.1016/0891-5849(91)90192-6
- Finke, J. H., Rini, B., Ireland, J., Rayman, P., Richmond, A., Golshayan, A., ... Bukowski, R. (2008). Sunitinib reverses type-1 immune suppression and decreases T-regulatory cells in renal cell carcinoma patients. *Clinical Cancer Research*, 14(20), 6674–6682. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-5212

- Fitzsimmons, R. E. B., Mazurek, M. S., Soos, A. ve Simmons, C. A. (2018). Mesenchymal stromal/stem cells in regenerative medicine and tissue engineering. *Stem Cells International*, 2018. doi:10.1155/2018/8031718
- Francis, S. L., Duchi, S., Onofrillo, C., Di Bella, C. ve Choong, P. F. M. (2018). Adipose-derived mesenchymal stem cells in the use of cartilage tissue engineering: The need for a rapid isolation procedure. *Stem Cells International*, 2018, 13–16. doi:10.1155/2018/8947548
- Fukai, T. ve Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide dismutases: Role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants and Redox Signaling*. Mary Ann Liebert, Inc. doi:10.1089/ars.2011.3999
- Ghannam, S., Bouffi, C., Djouad, F., Jorgensen, C. ve Noël, D. (2010). Immunosuppression by mesenchymal stem cells: Mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Research and Therapy*. BioMed Central. doi:10.1186/scrt2
- Glorieux, C. ve Calderon, P. B. (2017). Catalase, a remarkable enzyme: Targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biological Chemistry*. Walter de Gruyter GmbH. doi:10.1515/hsz-2017-0131
- Godoy, J. A. P., Paiva, R. M. A., Souza, A. M., Kondo, A. T., Kutner, J. M. ve Okamoto, O. K. (2019). Clinical Translation of Mesenchymal Stromal Cell Therapy for Graft Versus Host Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A. doi:10.3389/fcell.2019.00255
- Goran Gajski a,†, Marko Geric´ a, Ana-Marija Domijan b, Ivana Golubovic´ b, V. G.-V. (2019). Evaluation of oxidative stress responses in human circulating blood cells after imatinib mesylate treatment – Implications to its mechanism of action.
- Gutcher, I. ve Becher, B. (2007). APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *Journal of Clinical Investigation*. doi:10.1172/JCI31720
- Hansen, D. K. ve Inselman, A. L. (2011). *Applications of Stem Cells in Developmental Toxicology*. *Reproductive and Developmental Toxicology*. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-382032-7.10058-X
- Hao, Z. ve Sadek, I. (2016). Sunitinib: the antiangiogenic effects and beyond. *OncoTargets and Therapy*, Volume 9, 5495–5505. doi:10.2147/OTT.S112242
- Hartono, C., Muthukumar, T. ve Suthanthiran, M. (2013). Immunosuppressive drug

- therapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. doi:10.1101/cshperspect.a015487
- Hipp, M. M., Hilf, N., Walter, S., Werth, D., Brauer, K. M., Radsak, M. P., ... Brossart, P. (2008). Sorafenib, but not sunitinib, affects function of dendritic cells and induction of primary immune responses. *Blood*, 111(12), 5610–5620. doi:10.1182/blood-2007-02-075945
- Imam, F., Al-Harbi, N. O., Khan, M. R., Qamar, W., Alharbi, M., Alshamrani, A. A., ... Alharbi, K. S. (2020). Protective Effect of RIVA Against Sunitinib-Induced Cardiotoxicity by Inhibiting Oxidative Stress-Mediated Inflammation: Probable Role of TGF- β and Smad Signaling. *Cardiovascular Toxicology*, 20(3), 281–290. doi:10.1007/s12012-019-09551-8
- Introna, M., Lucchini, G., Dander, E., Galimberti, S., Rovelli, A., Balduzzi, A., ... Biagi, E. (2014). Treatment of graft versus host disease with mesenchymal stromal cells: A phase I study on 40 adult and pediatric patients. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 20(3), 375–381. doi:10.1016/j.bbmt.2013.11.033
- Jacobs, S. R., Herman, C. E., MacIver, N. J., Wofford, J. A., Wieman, H. L., Hammen, J. J. ve Rathmell, J. C. (2008). Glucose Uptake Is Limiting in T Cell Activation and Requires CD28-Mediated Akt-Dependent and Independent Pathways. *The Journal of Immunology*, 180(7), 4476–4486. doi:10.4049/jimmunol.180.7.4476
- Jafarzadeh, N., Javeri, A., Khaleghi, M. ve Taha, M. F. (2014). Oxytocin improves proliferation and neural differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Neuroscience Letters*, 564, 105–110. doi:10.1016/j.neulet.2014.02.012
- Jing Sun, Hulai Wei, Juan Yi, Jing Chen, B. T. ve Key. (2018). Human umbilical cord mesenchymal stem cells restore imatinib and doxorubicin sensitivity in drug-resistant chronic myeloid leukemia cells.
- Jones, C., Barrera, I., Brothers, S., Ring, R. ve Wahlestedt, C. (2017). Oxytocin and social functioning. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 19(2), 193–201.
- Jönsson, S., Hjorth-Hansen, H., Olsson, B., Wadenvik, H., Sundan, A. ve Standal, T. (2012). Imatinib inhibits proliferation of human mesenchymal stem cells and promotes early but not late osteoblast differentiation in vitro. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 30(1), 119–123. doi:10.1007/s00774-011-0323-3
- Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine | Wiley. (2020). 22 Şubat 2021 tarihinde <https://www.wiley.com/en->

us/Journal+of+Tissue+Engineering+and+Regenerative+Medicine-p-9780470122266

- Jurek, B. ve Neumann, I. D. (2018). The Oxytocin Receptor: From Intracellular Signaling To Behavior. *Physiol Rev*, 98, 1805–1908. doi:10.1152/physrev.00031.2017.-The
- Kim, S. H., Bennett, P. R. ve Terzidou, V. (2017). SC. *Molecular and Cellular Endocrinology*. doi:10.1016/j.mce.2017.01.034
- Kim, Y. S., Ahn, Y., Kwon, J. S., Cho, Y. K., Jeong, M. H., Cho, J. G., ... Kang, J. C. (2012). Priming of Mesenchymal Stem Cells with Oxytocin Enhances the Cardiac Repair in Ischemia/Reperfusion Injury. *Cells Tissues Organs*, 195(5), 428–442. doi:10.1159/000329234
- Kolatkari, P. R., Kishor Singh vim, V., Singh, V. K., Saini, A., Kalsan, M., Kumar, N. ve Chandra, R. (2016). Describing the Stem Cell Potency: The Various Methods of Functional Assessment and In silico Diagnostics. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* | www.frontiersin.org, 4, 134. doi:10.3389/fcell.2016.00134
- Korashy Hesham M., Zaid H. Maayah, Fawaz E. Al Anazi, Abdulaziz M. Alsaad, Ibrahim O. Alanazi, Osamah M. Belal¹, F. O. A.-A. and A. A. (2017). Sunitinib Inhibits Breast Cancer Cell Proliferation by Inducing Apoptosis, Cell-cycle Arrest and DNA Repair While Inhibiting NF- κ B Signaling Pathways.
- Lawson, E. A. (2018). humans, 13(12), 700–709. doi:10.1038/nrendo.2017.115.The
- Lemmon, M. A. ve Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 141(7), 1117–1134. doi:10.1016/j.cell.2010.06.011
- Lindner, U. ve Schlenke, P. (2010). Mesenchymal Stem or Stromal Cells : Toward a Better Understanding of Their Biology ?, 75–83. doi:10.1159/000290897
- Łos, M. J., Skubis, A. ve Ghavami, S. (2018). *Stem cells. Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine*. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-812258-7.00002-2
- Love, T. M. (2013). Oxytocin, Motivation and the Role of Dopamine. doi:10.1016/j.pbb.2013.06.011
- Magon, N. ve Kalra, S. (2011). The orgasmic history of oxytocin: Love, lust, and labor. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 15(7), 156. doi:10.4103/2230-8210.84851

- Mahla, R. S. (2016). Stem cells applications in regenerative medicine and disease therapeutics. *International Journal of Cell Biology*, 2016. doi:10.1155/2016/6940283
- Mizukami, A. ve Swiech, K. (2018). Mesenchymal stromal cells: From discovery to manufacturing and commercialization. *Stem Cells International*, 2018. doi:10.1155/2018/4083921
- Nambisan P (2017). Chapter 3-Stem cell research. *An Introduction to Ethical, Safety and Intellectual Property Rights Issues in Biotechnology*, 55(3), 3–29. doi:10.1016/B978-0-12-809231-6.00003-X
- Nepali, S., Park, M., Lew, H. ve Kim, O. (2018). Comparative Analysis of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells from Orbital and Abdominal Fat. *Stem Cells International*, 2018. doi:10.1155/2018/3932615
- Noiseux, N., Borie, M., Desnoyers, A., Menaouar, A., Stevens, L. M., Mansour, S., ... Gutkowska, J. (2012). Preconditioning of stem cells by oxytocin to improve their therapeutic potential. *Endocrinology*, 153(11), 5361–5372. doi:10.1210/en.2012-1402
- Novak, M., Žegura, B., Nunić, J., Gajski, G., Gerić, M., Garaj-Vrhovac, V. ve Filipič, M. (2017). Assessment of the genotoxicity of the tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate in cultured fish and human cells. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 814, 14–21. doi:10.1016/j.mrgentox.2016.12.002
- Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N. K., Valdez, P. A. ve Hymowitz, S. G. (2011). Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annual Review of Immunology*, 29, 71–109. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101312
- Ozao-Choy, J., Ma, G., Kao, J., Wang, G. X., Meseck, M., Sung, M., ... Chen, S.-H. (2009). The Novel Role of Tyrosine Kinase Inhibitor in the Reversal of Immune Suppression and Modulation of Tumor Microenvironment for Immune-Based Cancer Therapies HHS Public Access. *Cancer Res*, 69(6), 2514–2522. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4709
- Papaetis, G. S. ve Syrigos, K. N. (2009). Sunitinib: A multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor in the era of molecular cancer therapies. *BioDrugs*, 23(6), 377–389. doi:10.2165/11318860-000000000-00000

- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., ... Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. doi:10.1155/2017/8416763
- Progress, M. ve Fishman, J. A. (2007). Infection in Solid-Organ Transplant Recipients. *The new england journal of medicine* en engl j med 357;220,
- Romito, A. ve Cobellis, G. (2016). Pluripotent Stem Cells: Current Understanding and Future Directions. doi:10.1155/2016/9451492
- Rui L, R. (2019). *Cell & Tissue Engineering*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Sada, A. ve Tumbar, T. (2013). New Insights into Mechanisms of Stem Cell Daughter Fate Determination in Regenerative Tissues. doi:10.1016/B978-0-12-405210-9.00001-1
- Santos, L. F., Singulani, M. P., Stringhetta-Garcia, C. T., Oliveira, S. H. P., Chaves-Neto, A. H. ve Dornelles, R. C. M. (2018). Oxytocin effects on osteoblastic differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells from adult and aging female Wistar rats. *Experimental Gerontology*, 113, 58–63. doi:10.1016/j.exger.2018.09.023
- Seandel, M., Shia, J., Linkov, I., Maki, R. G., Antonescu, C. R. ve Dupont, J. (2006). The activity of sunitinib against gastrointestinal stromal tumor seems to be distinct from its antiangiogenic effects [1]. *Clinical Cancer Research*. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1292
- Si, Z., Wang, X., Sun, C., Kang, Y., Xu, J., Wang, X. ve Hui, Y. (2019). Adipose-derived stem cells: Sources, potency, and implications for regenerative therapies. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 114, 108765. doi:10.1016/j.biopha.2019.108765
- Sir, G., Goker Bagca, B., Yigitturk, G., Cavusoglu, T., Biray Avci, C., Gunduz, C. ve Uyanikgil, Y. (2018). Antagonistic effect of oxytocin and tacrolimus combination on adipose tissue – derived mesenchymal stem cells antagonistic effect of oxytocin and tacrolimus: Antagonistic effect of oxytocin and tacrolimus. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 97, 1173–1181. doi:10.1016/j.biopha.2017.10.076
- Szeto, A., Nation, D. A., Mendez, A. J., Dominguez-Bendala, J., Brooks, L. G., Schneiderman, N. ve McCabe, P. M. (2008). Oxytocin attenuates NADPH-

- dependent superoxide activity and IL-6 secretion in macrophages and vascular cells. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 295(6). doi:10.1152/ajpendo.90718.2008
- Ullah, I., Subbarao, R. B. ve Rho, G. J. (2015). Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Bioscience Reports*, 35(2), 1–18. doi:10.1042/bsr20150025
- Wang, L., Zhao, Y. ve Shi, S. (2012). Interplay between mesenchymal stem cells and lymphocytes: Implications for immunotherapy and tissue regeneration. *Journal of Dental Research*, 91(11), 1003–1010. doi:10.1177/0022034512460404
- Wang, M., Yuan, Q. ve Xie, L. (2018). Mesenchymal stem cell-based immunomodulation: Properties and clinical application. *Stem Cells International*. Hindawi Limited. doi:10.1155/2018/3057624
- Wei, X., Yang, X., Han, Z. P., Qu, F. F., Shao, L. ve Shi, Y. F. (2013). Mesenchymal stem cells: A new trend for cell therapy. *Acta Pharmacologica Sinica*. doi:10.1038/aps.2013.50
- Weiss, A. R. R. ve Dahlke, M. H. (2019). Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of action of living, apoptotic, and dead MSCs. *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A. doi:10.3389/fimmu.2019.01191
- Williams, A. R. ve Hare, J. M. (2011, 30 Eylül). Mesenchymal stem cells: Biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circulation Research*. NIH Public Access. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.243147
- Wiseman, A. C. (2016). Immunosuppressive medications. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. American Society of Nephrology. doi:10.2215/CJN.08570814
- Wu, S., Huang, L., Shen, R., Bernard-Cacciarella, M., Zhou, P., Hu, C., ... Lu, H. (2020). Drug resistance-related sunitinib sequestration in autophagolysosomes of endothelial cells. *International Journal of Oncology*, 56(1), 113–122. doi:10.3892/ijo.2019.4924
- Xu, M., He, J., Zhang, C., Xu, J. ve Wang, Y. (2019). Strategies for derivation of endothelial lineages from human stem cells. doi:10.1186/s13287-019-1274-1
- Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M. ve Rybak, Z. (2019, 26 Şubat). Stem cells: Past, present, and future. *Stem Cell Research and Therapy*. BioMed

Central Ltd. doi:10.1186/s13287-019-1165-5

Zhang, L., Hu, J. ve Athanasiou, K. A. (2009). The role of tissue engineering in articular cartilage repair and regeneration. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 37(1–2), 1–57. doi:10.1615/CritRevBiomedEng.v37.i1-2.10



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim sırasında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, her konuda yardım ve desteğini esirgemeyen ve tez konumun belirlenmesinde bana çok yardımcı olan danışmanım, değerli hocam **Sn. Prof. Dr. YİĞİT UYANIKGİL**'e, teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca yarattığı imkânlarla yardımlarını esirgemeyen değerli hocam **Sn. Doç. Dr. ÇIĞIR BİRAY AVCI**'ya teşekkür ederim.

Deneylerim süresince bana yardımcı olan, tecrübelerini ve emeğini paylaşan değerli arkadaşım **Sn. Arş. Gör. BAKİYE GÖKER BAĞCA**'ya teşekkür ederim.

Deneylerim süresince bana yardımcı olan ve elinden gelen emeği gösteren sevgili arkadaşım **Sn. Uzm. Biyo. DERYA TANRIÖVER**'e teşekkür ederim.

Tüm eğitim ve öğretim hayatım boyunca maddi ve manevi her zaman ve her koşulda yanımda olan sevgili aileme ve her zaman bana her konuda destek olan ve yol gösteren sevgili kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak bu çalışmanın gerçekleşmesi için gerekli maddi desteği TYL-2020-21772 nolu BAP projesi aracılığıyla sağlayan Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na teşekkür ederiz.

İzmir, 23.03.2021

Meliz SOFU

Özgeçmiş

□

Meliz SOFU

Eğitim Durumu: Üniversite Mezunu

Medeni Durum: Bekar

Uyruk: Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti ve Türkiye Cumhuriyeti

Üniversite: Doğu Akdeniz Üniversitesi /Kuzey Kıbrıs, Mağusa

Fen ve Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik – İngilizce (2011-16 yaz dönemi)

Yüksek lisans: Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre Anabilim Dalı

Yabancı Diller: Türkçe (ana dil), İngilizce (ileri derece)

Bilgisayar Bilgileri:

- ❖ Microsoft Office (Word Excel, PowerPoint, Access – Advanced)
- ❖ C++ programs
- ❖ Bioinformatics

İş Deneyimi / Staj:

Haziran 2015 – Genetik laboratuvarı Yakın Doğu Üniversitesi/ Kuzey Kıbrıs, Lefkoşa

- ❖ Genomik ve viral DNA izolasyonu üzerine çalışma
- ❖ PCR reaksiyonunu ayarlama ve PCR ürünlerini agaroz jel üzerinde çalıştırma
- ❖ Ters transkripsiyon ve cDNA sentezi
- ❖ Farklı PCR'ler (HLA, Menenjit, Trombofili)

Ağustos 2015 – Biyokimya Laboratuvarı Tıp Merkezi Hastanesi/ Kuzey Kıbrıs, Mağusa

- ❖ Kan tahlili gözlemi
- ❖ Yumurtalık patoloji gözlemi

Alınan Sertifikalar:

Mayıs 2, 3, 4, 2014 İstanbul Arel Üniversitesi / Türkiye, İstanbul

- ❖ Akış Sitometresi
- ❖ Western Blot
- ❖ Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR
 - 9 Mayıs 2014 1. Moleküler Biyoloji ve Genetik emu kulübü genetiği
 - 20 Mayıs 2014 Laboratuvardan Klinik Genetik'e Geçiş Yakın Doğu Üniversitesi
 - 21 Kasım 2014 1. DAÜ genomik ve proteomik araştırma toplantısı biyoloji bölümleri
 - Ocak 2015 Türkiye Savaş Sepetleri ve Kıbrıs emu kulübü genetiği
 - 29 Ocak 2016 1. Kış verileri geri çekilme emu kulübü genetiği
 - 7-8 Mayıs 2016 Bilgi Genetiği ve Biyomühendislik Öğrenci Kongresi '16

Özet Bilgi: Kazandığım teorik eğitim altyapısını ilgili pozisyonda kazanacağım pratik bilgilerle birleştirmeyi amaçlıyorum. Sürekli eğitime inanan, öğrenmeye açık ve çalışmayı seven biriyim. Hobilerim arasında spor yapmak, yemek yapmak, okumak ve bahçe işleriyle uğraşmak vardır.

