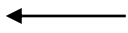


Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN İN VİTRO KOLON
KANSER HÜCRE HATLARINDAKİ ETKİLERİ

FİGEN ABATAY SEL

DANIŞMAN
PROF. DR. FATMA SAVRAN OĞUZ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2022

İTHAF

Her anımda yanımda olan sevgili ailem ve eşime ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimine başladığım andan itibaren tüm deneyim ve bilgilerini paylaşan, her türlü problemimle ilk günden beri yakından ilgilenen, tüm sorularıma cevap aramamda yardımcı olan, insani değerlerini örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum, tecrübelerinden faydalandığım benim için çok değerli olan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanımız ve Doktora Tez Danışmanım Sayın Prof. Dr. Fatma Savran Oğuz'a,

Bu çalışmanın yürütülmesi sırasında bilgi ve birikimini paylaşmaktan çekinmeyen, hücre kültürü konusundaki sorularıma net yanıtlar aldığım ve çalışma boyunca vermiş olduğu desteklerinden dolayı kendilerine çok şey borçlu olduğum Fizioloji Anabilim Dalı'ndan Sayın Prof. Dr. Dürdane Serap Kuruca'ya,

Anabilim dalında başladığım ilk günden itibaren birikimini benle paylaşan ve desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Çiğdem Kekik Çınar'a

Çalışma materyallerinin toplanmasında ve organizasyonunda desteğini bizden esirgemeyen Sayın Uz. Dr. Gökhan Demirayak'a,

Ekip olmanın ruhunu seneler sonra yeniden hissettiren, geç saatlere kadar laboratuvarında çalışma süresince destekleriyle yol aldığım, doktora tez çalışması süresince hayatımın belki de en önemli anlarını beraber paylaştığım Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan Sevgili Arkadaşlarım Öğretim Görevlisi Ayşe Erol ve Öğretim Görevlisi Mediha Süleymanoğlu'na,

Bilgi ve birikimlerinden faydalandığım anabilim dalı öğretim üyeleri ve geçmişten bugüne hem kişisel hem de akademik gelişimime katkı sağlayan tüm hocalarıma,

Beni bunca sene hem maddi hem manevi anlamda güçlü tutan, sahip oldukları pozitif enerji ile beni hep mutlu eden, çocukları olmaktan onur duyduğum annem Şengül Abatay, babam Erdal Abatay'a ve abim Emre Abatay'a,

Her konuda olduğu gibi, gece geç saatlere kadar süren çalışmalarına destek veren, maddi manevi her anlamda yanımda olan, farklı bakış açısı ile bana her alanda katkı sağlayan, hayatımdaki en büyük şansım olan biricik eşim Celal Sel'e teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi ve YÖK 100/2000 Doktora Burs Programı tarafından desteklenmiştir. (BAP Proje No: 37059)

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİİ
ÖZET	XİV
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. KÖK HÜCRELER.....	3
2.1.1. Kök Hücrelerin Sınıflandırılması.....	3
2.2. MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER.....	6
2.2.1. Kordon Kaynaklı Dokuların Histolojik Özellikleri	6
2.2.2. İnsan Kordon Kanı Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler	7
2.2.3. Wharton Jeli Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler	7
2.3. KOLOREKTAL KANSER.....	8
2.4. HÜCRESEL TEDAVİ KAYNAĞI OLARAK MEZENKİMAL KÖK HÜCRENİN KANSER TERAPİSİNDEKİ YERİ.....	9
2.5. HÜCRE ÖLÜMÜ	10
2.5.1. Apoptoz.....	10
2.5.1.1. Apoptozun Ekstrinsik Yolağı.....	11
2.5.1.2. Apoptozun İntersik Yolağı.....	12
2.5.1.3. Apoptozda Kaspaz-3 ve HTRA2/Omi Proteinleri	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	15
3.1. ÖRNEKLERİN TEMİNİ	15
3.2. ARAŞTIRMA GEREKÇESİ VE PLANI.....	15
3.3. KULLANILAN LABORATUVAR EKİPMANLARI.....	17

3.4. KULLANILAN KİMYASALLAR, SOLÜSYONLAR VE KİTLERİN İÇERİKLERİ	18
3.4.1. Kimyasal ve Solüsyonlar	18
3.4.2. Kullanılan Kitler	19
3.4.2.1. Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyonu İçin Kullanılan Kitinin İçeriği .19	
3.4.2.2. Flow Sitometrik Apoptoz Değerlendirmesi İçin Kullanılan Kitin İçeriği....19	
3.4.2.3. ELISA Kaspaz-3 Değerlendirmesi İçin Kullanılan Kitin İçeriği	20
3.4.2.4. ELISA HTRA2/Omi Değerlendirmesi İçin Kullanılan Kitin İçeriği	20
3.5. YÖNTEMLER.....	21
3.5.1. KULLANILAN BİYOMATERYALLERİN ELDESİ	21
3.5.1.1. İnsan Kordon Kanı Toplanması	21
3.5.1.2. İnsan Kordon Kanı İzolasyonu.....	21
3.5.1.3. İnsan Kordon Kanı Kültürü.....	22
3.5.1.4. İnsan Kordon Dokusu Toplanması.....	22
3.5.1.5. Kordon Dokusu İzolasyonu.....	22
3.5.1.6. Kordon Dokusu Kültürü.....	23
3.5.1.7. Kolon Kanseri Hücre Hatlarının Açılması ve Kültürü.....	24
3.5.1.8. PKMH Eldesi	25
3.5.2. DENEY HAZIRLIKLARI İÇİN KULLANILAN YÖNTEMLER	26
3.5.2.1. Tripan Mavisi ile Hücre Canlılığının Tayini ve Hücre Sayımı	26
3.5.2.2. Adherent Hücrelerin Tripsin Uygulaması ile Hücre Kaldırması	26
3.5.3. MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN KARAKTERİZASYONU.....	27
3.5.4. DENEY GRUBUNUN KO-KÜLTÜRLERİ	28
3.5.4.1. KK-MKH ile Kolorektal Kanser Hücrelerinin Kültürleri	28
3.5.4.2. WJ-MKH ile Kolorektal Kanser Hücrelerinin Kültürleri	29
3.5.5. KONTROL GRUBUNUN KO-KÜLTÜRÜ	29
3.5.5.1. KK-MKH ile PKMH'lerin Kültürü.....	29
3.5.5.2. WJ-MKH ile PKMH'lerin Kültürü	30
3.5.6. DENEY ve KONTROL GRUPLARININ APOPTOZ TESTLERİ.....	30
3.5.6.1. Annexin V/PI FITC Metoduyla Flow Sitometrik Testler	30
3.5.6.2. ELISA ile Kaspaz-3 Protein Değerlendirmesi Testleri	31
3.5.6.3. ELISA ile HTRA2/Omi Protein Değerlendirmesi Testleri	32
3.5.7. İSTATİSTİK DEĞERLENDİRMELER.....	34

4. BULGULAR.....	35
4.1. MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN KARAKTERİZASYONU	35
4.2. FLOW SİTOMETRİK APOPTOZ ANALİZLERİ	35
4.2.1. WJ-MKH'lerin Kolorektal Kanser Hücre Hatları ile PKMH'ler Üzerindeki Apoptoz Analizleri.....	35
4.2.2. KK-MKH'lerin Kolorektal Kanser Hücre Hatları ve PKMH'ler Üzerindeki Apoptoz Analizleri.....	37
4.2.3. WJ-MKH ve KK-MKH'lerin Kolorektal Kanser ve PKMH'ler Üzerindeki Apoptoz Analizleri.....	39
4.2.4. WJ-MKH ile KK-MKH'nin HCT-116 Kanser Hücreleri ve Sağlıklı PKMH'ler Üzerindeki Apoptoz Analizleri	40
4.2.5. WJ-MKH ile KK-MKH'nin HT-29 Kanser Hücreleri ve Sağlıklı PKMH'ler Üzerindeki Apoptoz Analizleri	41
4.3. ELISA KASPAZ-3 PROTEİN DEĞİŞİMLERİNİN ANALİZİ.....	42
4.3.1. WJ-MKH'lerin Kolorektal Kanser Hücre Hatları ile PKMH'ler Üzerindeki Kaspaz-3 Analizleri.....	42
4.3.2. KK-MKH'lerin Kolorektal Kanser Hücre Hatları ve PKMH'ler Üzerindeki Kaspaz-3 Değişimi Analizleri.....	43
4.3.3. WJ-MKH ve KK-MKH'lerin Kolorektal Kanser ve PKMH'ler Üzerindeki Kaspaz-3 Değişimi Analizleri.....	45
4.3.4. WJ-MKH ile KK-MKH'nin HCT-116 Kanser Hücreleri ve Sağlıklı PKMH'ler Üzerindeki Kaspaz-3 Değişimi Analizleri	46
4.3.5. WJ-MKH ile KK-MKH'nin HT-29 Kanser Hücreleri ve Sağlıklı PKMH'ler Üzerindeki Kaspaz-3 Değişimi Analizleri	47
4.4. ELISA HTRA2/Omi PROTEİN DEĞİŞİMLERİNİN ANALİZİ	48
4.4.1. WJ-MKH'lerin Kolorektal Kanser Hücre Hatları ile PKMH'ler Üzerindeki HTRA2/Omi Değişim Analizleri	48
4.4.2. KK-MKH'lerin Kolorektal Kanser Hücre Hatları ile PKMH'ler Üzerindeki HTRA2/Omi Değişim Analizleri	50
4.4.3. WJ-MKH ve KK-MKH'lerin Kolorektal Kanser ve PKMH'ler Üzerindeki HTRA2/Omi Değişim Analizleri	52
4.4.4. WJ-MKH ile KK-MKH'lerin HCT-116 Kanser Hücreleri ve Sağlıklı PKMH'ler Üzerindeki HTRA2/Omi Değişim Analizleri	53
4.4.5. WJ-MKH ile KK-MKH'lerin HT-29 Kanser Hücreleri ve Sağlıklı PKMH'ler Üzerindeki HTRA2/Omi Değişim Analizleri	54

5. TARTIŞMA	56
KAYNAKLAR	63
HAM VERİLER	73
FORMLAR	74
ETİK KURUL KARARI	75
PATENT HAKKI İZNİ	76
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	77
ÖZGEÇMİŞ	78



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Embriyonik Germ Hatlarından Oluşabilen Dokular	5
Tablo 4-1:WJ-MKH'lerin Kolorektal Kanser Hücre Hatları ve Sağlıklı PKMH Üzerine Flow Sitometrik Apoptotik Etkisi.....	36
Tablo 4-2:KK-MKH'lerin Kolorektal Kanser Hücre Hatları ve Sağlıklı PKMH Üzerine Flow Sitometrik Apototik Etkisi.....	38
Tablo 4-3:WJ-MKH ve KK-MKH'lerin Kolorektal Kanser Hücreleri ve Sağlıklı PKMH Üzerindeki Flow Sitometrik Apoptotik Etkisi	40
Tablo 4-4:WJ-MKH'lerin Kolorektal Kanser Hücre Hatları ve Sağlıklı PKMH Üzerindeki ELISA Kaspaz-3 Değişimleri	42
Tablo 4-5:KK-MKH'lerin Kolorektal Kanser Hücre Hatları ve Sağlıklı PKMH Üzerindeki ELISA Kaspaz-3 Değişimi.....	44
Tablo 4-6:WJ-MKH ve KK-MKH'lerin Kolorektal Kanser Hücreleri ve Sağlıklı PKMH Üzerindeki ELISA Kaspaz-3 Değişimleri	46
Tablo 4-7:WJ-MKH'lerin Kolorektal Kanser Hücre Hatları ve Sağlıklı PKMH Üzerine ELISA HTRA2/Omi Değişimi Etkisi	49
Tablo 4-8:KK-MKH'lerin Kolorektal Kanser Hücre Hatları ve Sağlıklı PKMH Üzerine ELISA HTRA2/Omi Değişimi Etkileri	51
Tablo 4-9:WJ-MKH ve KK-MKH'lerin Kolorektal Kanser Hücreleri ve Sağlıklı PKMH Üzerindeki ELISA HTRA2/Omi Değişimleri	53

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Kök Hücrelerin Sınıflandırılması	3
Şekil 2-2: Plastisitelerine Göre Kök Hücre Sınıflandırması	4
Şekil 2-3: Göbek Kordonunun Kısımları	7
Şekil 2-4: Kanser terapisinde MKH'nin kullanım stratejileri	10
Şekil 2-5: Hücrede apoptoz sırasında oluşan değişiklikler	11
Şekil 2-6: Apoptozun ekstrinsik yolağı	12
Şekil 2-7: Apoptozun intrinsik yolağı	13
Şekil 3-1: 7. ve 20. gün KK-MKH görüntüleri	22
Şekil 3-2:Kordon dokusundan Wharton Jeli eldesi	23
Şekil 3-3: 12. ve 21. gün WJ-MKH görüntüleri	24
Şekil 3-4: HCT-116 ve HT-29'un hücre kültürü sonrası görüntüsü.....	25
Şekil 3-5: Toma lamı ve lamdaki sayım alanları	26
Şekil 3-6: ELISA Kaspaz-3 testleri için standart buffer dilüsyon hazırlama	31
Şekil 3-7: ELISA HTRA2/Omi testleri için standart buffer dilusyon hazırlama	33
Şekil 4-1: MKH'lerin mikroskop altındaki konfluent görüntüleri	35
Şekil 4-2:WJ-MKH'nin HT-29 ve HCT-116 kanser hücreleri üzerine apoptotik etkisi .	37
Şekil 4-3:KK-MKH'nin HT-29 ve HCT-116 kanser hücreleri üzerine apoptotik etkisi.	39
Şekil 4-4: WJ-MKH ve KK-MKH'lerin HCT-116 deney grubu ile PKMH kontrol grubu üzerindeki apoptotik etkilerinin karşılaştırılması	41
Şekil 4-5:WJ-MKH ve KK-MKH'lerin HT-29 deney grubu ile PKMH kontrol grubu üzerindeki apoptotik etkilerinin karşılaştırılması	41
Şekil 4-6:WJ-MKH'nin HT-29 ve HCT-116 kanser hücreleri üzerine kaspaz-3 değişimi	43
Şekil 4-7:KK-MKH'nin HT-29 ve HCT-116 kanser hücreleri üzerine kaspaz-3 değişimi	45
Şekil 4-8:WJ-MKH ve KK-MKH'lerin HCT-116 deney grubu ile PKMH kontrol grubu üzerindeki kaspaz-3 değişimlerinin karşılaştırılması.....	47
Şekil 4-9:WJ-MKH ve KK-MKH'lerin HT-29 deney grubu ile PKMH kontrol grubu üzerindeki kaspaz-3 değişimlerinin karşılaştırılması.....	48
Şekil 4-10:WJ-MKH'nin HT-29 ve HCT-116 kanser hücreleri üzerine HTRA2/Omi değişimi etkisi	50

Şekil 4-11:KK-MKH'nin HT-29 ve HCT-116 kanser hücreleri üzerine HTRA2/Omi değişimi etkisi.....	52
Şekil 4-12:WJ-MKH ve KK-MKH'lerin HCT-116 deney grubu ile PKMH kontrol grubu üzerindeki HTRA2/Omi değişimlerinin karşılaştırılması.....	54
Şekil 4-13:WJ-MKH ve KK-MKH'lerin HT-29 deney grubu ile PKMH kontrol grubu üzerindeki HTRA2/Omi değişimlerinin karşılaştırılması.....	55



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

MKH	Mezenkimal kök hücreler
ATCC	Amerikan tip kültür koleksiyonu
KK-MKH	Kordon kanı kaynaklı mezenkimal kök hücre
WJ-MKH	Wharton jeli kaynaklı mezenkimal kök hücre
KRK	Kolorektal kanser
APC	Adenomatosis poliposis coli
APAF-1	Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
TNFR-1	Tümör nekroz faktör reseptörü-1
TRAIL	TNF-ilişkili apoptoz indükleyeci ligand
FADD	Fas-ilişkili ölüm domain
DISC	Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
AIF	Apoptoz indükleyici faktör
AIP	Apoptotik inhibitör proteinleri
PKMH	Periferal kan mononükleer hücreler
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
FBS	Fötal bovin serum
PBS	Phosphate buffered saline
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution

ÖZET

Abatay Sel F. Mezenkimal Kök Hücrelerin İn Vitro Kolon Kanser Hücre Hatlarındaki Etkisi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2022.

Mezenkimal kök hücre (MKH) kendini yenileme, plastik adherent ve multipotent özellikleri sebebiyle özel bir grup kök hücredir. MKH'ler birçok dokudan elde edilirler ve özellikle kordon kaynaklı dokulardan elde edilen MKH'ler, invazif olmayışlarından dolayı avantajlıdır. MKH'ler başlıca rejeneratif tıp alanında ve ayrıca kanser terapilerinde kullanımı konusunda birçok araştırma mevcuttur. Dünyada sıklığı bakımından üçüncü sırada yer alan kolorektal kanser (KRK) tedavisi hem hasta hem de sorumlu olan hekimler için oldukça zordur. Çalışmamızda MKH'lerin KRK hücreleri (KRKh) üzerindeki terapötik etkisinin incelenmesi amaçlanmaktadır.

Çalışmamızın amacı, KRK hücre hattı olarak HT-29 ve HCT-116 hücrelerinde, kordon kanı kaynaklı (KK-MKH) ve kordon dokusu olan Wharton jeli kaynaklı MKH (WJ-MKH)'lerin apoptotik etkisini incelemektir. 1/5 ve 1/10 (MKH:Kanser) hücre oranları ile 24 ve 72 saatlik inkübasyonlarda in vitro kültür olarak MKH'nin KRKh üzerindeki apoptotik etkisi araştırıldı. Aynı koşullarda sağlıklı periferik kan mononükleer hücreler kontrol grubu deneyi olarak oluşturuldu. İnkübasyon süreleri bittikten sonra Annexin/PI-FITC apoptoz metodu ile flow sitometrik analiz yapıldı. Hem WJ-MKH hem KK- MKH'lerde her iki KRKh'de, her iki oranda ve inkübasyon sürelerinde anlamlı ($p<0.05$) apoptotik etki gözlemlendi. Ayrıca ELISA yöntemi ile kaspaz-3 ve HTRA2/Omi protein değişimlerine bakıldı. Her iki hücre hattında 24 saat 1/5 oranının WJ-MKH terapisinin anlamlı ($p<0.05$) olarak daha yüksek olduğu tespit edildi. Bu veriler hem WJ-MKH'nin hem de KK-MKH'nin kolorektal kanserler için olası bir hücre tedavisi olabileceğini göstermiştir. Ayrıca ELISA ile yapılan çalışmalar hem mitotik hem de sitoplazmadaki apoptotik protein değişimlerini göstererek apoptozun indüklendiği yollar hakkında bilgi vermektedir.

Anahtar Kelimeler: Mezenkimal Kök Hücreler, Kordon Kanı, Wharton Jeli, Kolon Kanseri, Apoptoz

İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi ve YÖK 100/2000 Doktora Bursu Programı tarafından desteklenmiştir. İÜ BAP Proje No: TDK-2020-37059

ABSTRACT

Abatay Sel F. The Effect of Mesenchymal Stem Cells In Vitro Colon Cancer Cell Lines. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Medical Biology. Doctoral Thesis. İstanbul. 2022.

Mesenchymal stem cells (MSCs) are special group of stem cells due to their self-renewal, plastic adherent and multipotency. MSCs are obtained from many tissues, and MSCs obtained from cord-derived tissues have the advantage of being non-invasive. There are lots of researches on the use of MSCs mainly in the field of regenerative medicine and also in cancer therapies. The treatment of colorectal cancer (CRC), which is the third in the world, is quite challenging for both the patient and the physicians. In our study, it is aimed to examine the therapeutic effect of MSCs on CRC cells (CRCc).

The aim of our study was to examine the apoptotic effect of cord blood (CC-MSC) and cord tissue Wharton's jelly-derived-MSCs (WJ-MSCs) in HT-29 and HCT-116 cells. The apoptotic effect of MSC on CRCc was investigated as in vitro during 24 and 72 hour with 1/5 and 1/10 (MSC:Cancer) ratios. Peripheral blood mononuclear cells were used as a control group. After incubations, Annexin/PI-FITC-based flow cytometry was performed. In both CRCc for all rates, incubations, and MSC sources were found significant ($p<0.05$). Additionally, caspase-3 and HTRA2/Omi changes were analyzed by ELISA. In both cell lines, the ratio of 1/5, for 24 hours was found to be significantly ($p<0.05$) higher than the WJ-MSC therapy. These data indicated that both WJ-MSC and CC-MSC could be a possible cell therapy for CRC. In addition, studies with ELISA provide information about the pathways in which apoptosis is induced by showing apoptotic protein changes in both mitotic and cytoplasm.

Key Words: Mesenchymal Stem Cells, Cord Blood, Wharton's Jelly, Colon Cancer, Apoptosis

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University and CoHE 100/2000 PhD Scholarship Program. İÜ BAP Project No. TDK-2020-37059

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kök hücreler kendini yenileyebilme ve özelleşmiş birçok hücre tipine dönüşebilme kapasitesine sahip özel hücreler olarak bilinmektedir. Asimetrik olarak mitoz bölünme ile ikiye bölünerek bir yandan kendi özelliklerini ve potansiyelini devam ettirirken, diğer yandan köken aldıkları dokuların özelleşmiş hücrelerine farklılaşabilmektedirler (1). Kök hücreler, farklılaşma potansiyelleri ve embriyonel kökenlerine göre sınıflandırılmaktadır. Son yıllarda birçok kök hücre çeşidi sahip oldukları potansiyelleri sebebiyle rejeneratif tıp alanında hücresel tedavi yöntemi olarak kullanılmaktadır.

Her üç embriyonel germ tabakasından kaynaklanmış olan dokulara dönüşebilen mezenkimal kök hücre (MKH) kendini yenileyebilme özelliğine sahip, plastik adherent ve multipotent özellikleri ile diğer kök hücrelerden ayrılmaktadır. Bu özellikleri dışında, hücre yüzeylerinde oldukça yüksek oranda (%95 ve üstünde) “CD73, CD90 ve CD105” ifade ederken “CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79 α ve HLA-DR” belirteçlerini ise düşük oranda (%2 ve altında) ifade etmektedirler (2). MKH’ler kemik iliği, adipoz, deri, kordon kanı ve Wharton jeli gibi birçok dokudan elde edilebilmektedirler. Kordon kanı ve Wharton jeli MKH kaynağı açısından oldukça zengin, non-invaziv ve eldesi kolay kök hücre kaynaklarıdır. MKH’ler rejeneratif tıp alanında son zamanlarda birçok çalışmada kullanılmış olup özellikle kanser çalışmalarında kanser hücrelerini apoptoza yönlendirmesi sebebiyle önem kazanmıştır (3-6).

Kolon ya da diğer adıyla kolorektal kanser dünyada hem erkek hem de kadında üçüncü sıklıkta görülen kanser türüdür ve gastrointestinal sistemin en sık rastlanan tümörüdür (7, 8). 4 evreden oluşmakta olup 4. evresi en malign evredir. Ayrıca çevredeki kan damarları ve lenf nodları aracılığıyla diğer organlara metastaz yapabilmesi sebebiyle oldukça agresif bir kanser türü olarak kabul edilmektedir.

Günümüzde kanserler genel olarak standardize edilmiş olan kemoterapi, radyoterapi, cerrahi işlemler, immünoterapi uygulanarak tedavi edilmeye çalışılmaktadır. Geleneksel olarak kabul edilen bu tedavilerin her birinin çeşitli kısıtlamaları mevcuttur. Kanser tedavilerindeki son gelişmeler, insan kök hücrelerinin anti-kanser özelliklerini araştırma yönündedir. Kök hücrelerin tümör hücreleri ile interaksiyonunun, kök hücrelerin salgıladıkları anti-inflamatuar moleküllerin, anti-

kanser mekanizmaları için kullandıkları yolakların daha ayrıntılı çalışılması ve keşfedilmesi gerekmektedir.

Tüm bu bilgiler ışığında projemizde, kordon kanı ve Wharton jelinden izole edilen MKH'lerin karakterizasyonu ardından, farklı iki kolorektal hücre hatlarıyla (HCT-116 ve HT-29) farklı iki kaynaktan elde edilen MKH'nin trans-well sistemi ile ko-kültür edilerek MKH kaynaklarının kolon kanserleri üzerindeki apoptotik etkileri karşılaştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda kanser hücreleri ve MKH oranı 1/5 ve 1/10 olacak şekilde testler tasarlanmış, 24. ve 72. saatlerdeki kültür örnekleri flow sitometri yöntemi ile apoptoz tayinleri analiz edilmiştir. Deney grubu dışında çalışmamızda iki kontrol grubu oluşturulmuştur. Birinci grup, aynı oranlar ve inkübasyon süresinde MKH eklenmemiş, yalnızca kanser hücrelerinin kültürü ile oluşturulmuştur. İkinci grupta ise MKH'nin sağlıklı hücrelerdeki apoptotik etkisini gözlemleyebilmek için periferik kan mononükleer hücreler ile MKH, deney grupları ile aynı koşullarda kültürleri yapılarak çalışmaya dahil edilmiştir. Tüm deney ve kontrol gruplarının flow sitometri sonuçlarından sonra, saklanmış olan süpernatantlar kullanarak ELISA yöntemi ile Kaspaz-3 enzim ve HtrA2/Omi protein değişimleriyle hem mitotik hem de sitoplazmik düzeydeki apoptoz değerleri tespit edilmiştir. Çalışmamız, hücre canlılığına bakılarak MKH'nin terapötik etkisinin değerlendirmesinin hedeflendiği MKH kaynağı ve kanser hücre hatları çeşitliliği açısından önem arz etmektedir. Çalışmanın sonunda elde edilen sonuçlar ile kolorektal kanser tedavisinin verimliliğini arttırmak için toksik olmayan, kolay elde edilebilir, deneyleri tekrarlanabilir ve ucuz yeni hücresel tedavilerin ortaya konmasının ilk basamağının aşılması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

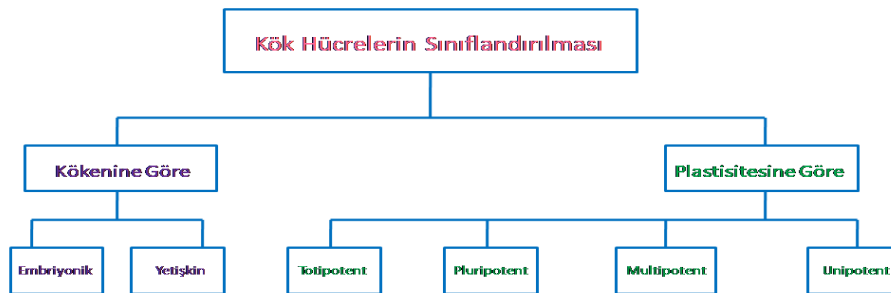
2.1. KÖK HÜCRELER

Kök hücreler mitoz bölünme sırasında simetrik ve/veya asimetrik bölünebilme yeteneğine ve sahip oldukları farklılaşma potansiyelleri sebebiyle 21. yüzyılın yeni sağlık alanı olan rejeneratif tıpta yerini alan eşsiz bir hücre grubudur (1, 9). Asimetrik bölünme ile bir yandan kendi özelliklerini ve organizmadaki miktarlarını sabit tutmaya çalışırken kendilerini yenileyerek, diğer yandan doku hasarı varlığında doku onarımına katkıda bulunmak için doku kökeninden gelen hücelere farklılaşarak rejeneratif özellik gösterebilmektedirler.

1960'ların başlarında hematopoetik stromal mikroçevre araştırmaları sırasında keşfedilmiştir ve bu özel hücre grubunun gelişebilmesi için stromal mikroçevre yani nişe ihtiyacı olduğu bulunmuştur (10). Bu keşif, birçok hematolog, onkolog ve immunoloğun ilgisini çekmiş ve o zamandan beri kök hücre biyolojisi, hücrel tedaviler alanında dikkat çeker hale gelmiştir. Günümüze geldiğimizde ise kök hücrenin oluşumu, çoğalması, pluripotent özellikleri ve farklılaşmasına dair kök hücreye ait özelliklerin birçoğu gün yüzüne çıkarılmıştır (11-13).

2.1.1. Kök Hücrelerin Sınıflandırılması

Kök hücreler, orijin aldıkları kökene ve farklılaşma potansiyellerine (plastisite) göre sınıflandırılmaktadırlar. Şekil 2-1'de kök hücrelerin sınıflandırılması gösterilmiştir (14).



Şekil 2-1: Kök Hücrelerin Sınıflandırılması

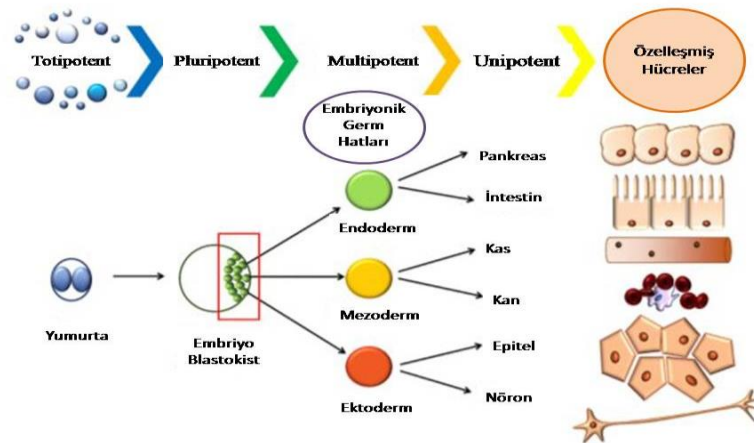
“Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*. 2013;85(1):3 10.’dan derlenerek (14)”

Kökenine göre kök hücreler, embriyonik ve yetişkin kök hücreler olmak üzere ikiye ayrılmaktadırlar. Embriyonik kök hücreler, yumurta ve spermin fertilizasyonu ardından oluşan zigotun 5-7 günlük blastokist evresine kadar süreçteki plastisiteleri en güçlü olan hücrelerdir (15). Bu kök hücre yapısı tüm organ ve dokuları oluşturabilme potansiyeline sahiptir. Zigottan sonraki yapıda bulunan tüm kök hücreler ise embriyonik olmayan yani yetişkin kök hücreler grubuna girmektedir.

Kök hücreler, plastisite özelliklerine göre farklılaşma kapasitesi en güçlü olandan en düşük olana;

1. Totipotent
2. Pluripotent
3. Multipotent

4. Unipotent kök hücreler şeklinde sıralanmaktadırlar (14, 16). Şekil 2-2’de plastisitesine göre kök hücreler gösterilmektedir (17).



Şekil 2-2: Plastisitelerine Göre Kök Hücre Sınıflandırması

“Arrighi N, editor. *Stem Cells*. London, UK: Elsevier Press; 2018”

Kök hücrelerin totipotent özellikli olandan, özelleşmiş hücelere doğru farklılaşması gösterilmektedir.

Totipotent kök hücreler, embriyo ve embriyo sonrası oluşan her tür doku ve 200 kadar hücreye farklılaşabilen ve izole edilebildiğinde bir bireyi oluşturabilecek

potansiyele sahip çok özel bir hücre grubudur (18). Bu kadar güçlü bir potansiyeli olmasına rağmen çeşitli etik, dini, ekonomik tartışmalar sebebiyle totipotent özellikli bu embriyonik kökenli hücrelerin kullanımı yasaklanmıştır (19).

Yumurta ve sperm hücresinin birleşmesi ve art arda mitoz geçirmesi ardından oluşturduğu embriyonun en primitif hali olan sekiz hücreli yapıya blastokist adı verilir. Fertilizasyon sonrası 5.-6. günlerde oluştuğu bilinmektedir (20). Blastokist evresindeki hücreler, pluripotent özelliktedir. Pluripotent kök hücreler her üç embriyonik germ hattı olan ektoderm, mezoderm ve endoderm tabakalardan köken aldığı için çoklu anlamına gelen “pluri-” ön ekini almaktadır (Tablo 2-1).

Tablo 2-1: Embriyonik Germ Hatlarından Oluşabilen Dokular

Germ Hatları	Oluşabilen Dokular
Endoderm	Akciğer, karaciğer, pankreas, gastrointestinal sistem
Mezoderm	Kan, damar, kas, kalp, kemik, kıkırdak
Ektoderm	Epitel dokular, tırnak, saç, diş, göz, beyin

Multipotent kök hücreler ise tek bir germ hattından köken alan, kordon kanı, fetal dokular ve spesifik özelleşmiş erişkin dokularda bulunabilmektedir. Tek tip hücre oluşturabilen ve oldukça özelleşmiş olan kök hücrelere unipotent kök hücreler adı verilmektedir. Unipotent kök hücreler, artık yalnızca bir kökenden gelen dokuları oluşturabilme potansiyeline sahip olup plastisitesi en düşük olan kök hücre grubudur. 2012 yılına kadar plastisitesi daha düşük olandan daha yüksek olana bir kök hücrenin oluşması kabul edilmeyorken Takahashi ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışma ile bu hiyerarşik durum değişmiştir (21). Nobel ödülüne layık oldukları çalışmayla “Yamanaka kokteyli” adı verilen “Oct3/4, Sox2, Klf4 ve c-myc” dört transkripsiyon faktörünü gen aktarım metoduyla yetişkin fare fibroblast deri hücrelerine aktararak, deri hücrelerini pluripotent hale dönüştürmeyi başarmışlardır (21). Bu çalışmanın hemen akabinde ise aynı işlem insan deri hücrelerinde başarıyla çalışılmış ve yeniden

programlama metodu ile plastisitesi güçlendirilmiş hücre grubuna “indüklenabilir pluripotent kök hücreler” adı verilmiştir (22).

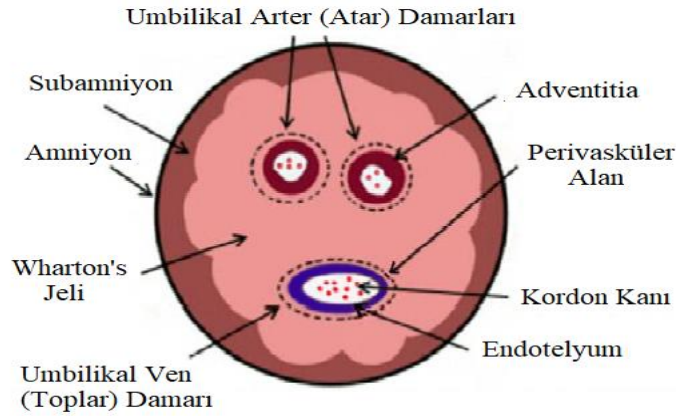
2.2. MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER

Mezenkimal kök hücreler plastik adherent, kendini yenileyebilen ve erişkin tipte olan özel bir kök hücre grubudur (23, 24). Bu eşsiz özelliklerinin yanında, her üç embriyonik germ hattından köken alan hücrelere farklılaşabilme yeteneğine sahip multipotent hücrelerdir (25). MKH’lerin bir diğer ayırtedici özelliği ise sahip oldukları yüzey belirteçleridir. Hücre yüzeylerinde oldukça yüksek bir oranda (% 95 ve üstünde) “CD73, CD90 ve CD105” ifade ederken “CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79 α ve HLA-DR” belirteçlerini oldukça düşük oranda (% 2 ve altında) ifade etmektedirler (23, 24).

Mezenkimal kök hücreler kemik iliği, kas, adipoz doku, dental pulpa, kordon kanı ve kordon dokusu olan Wharton jelinden elde edilirler. Bu erişkin doku ve organlardan elde edilen MKH’ler osteosit, kondrosit, epitel ve nöronal hücrelere dönüşebilme kapasitesine sahiptirler (24, 26-28). Kemik iliği, kas, adipoz doku gibi insandan alınan dokulardan MKH eldesi invaziv bir işlem gerektirirken, kordon kanı ve kordon dokusu doğum sırasında doğal yollarla elde edilmektedir. Ağrılı bir işlem olmaması, anne ve bebeğe zarar vermemesi ve enfeksiyon riski taşınamaması sebebiyle, diğer MKH kaynaklarına göre, insan kordon kanı ve dokusundan elde edilen MKH’yi daha avantajlı kılmaktadır (29, 30).

2.2.1. Kordon Kaynaklı Dokuların Histolojik Özellikleri

Plasentanın bebeğin gelişimi sırasında bebeği dış etkenlere karşı koruması yanında besin, enzim, oksijen ve birçok maddenin temininde hayati rolü vardır. Fetüsün plasenta ile bağlantısını göbek kordonu sağlamaktadır ve maddelerin taşınmasında görevlidir. Kordon dokusu amniyon ve Wharton jeli kısımlarından oluşur. Wharton jeli kısmında iki adet arter ile bir adet ven damarları bulunur. Damarların çevresi adventita denen bağ ile dokusu çevrilidir. Şekil 2-3’te göbek kordonu kısımları gösterilmiştir (31).



Şekil 2-3: Göbek Kordonunun Kısımları

“Kim DW, Staples M, Shinozuka K, Pantcheva P, Kang SD, Borlongan CV. Wharton jelly-derived mesenchymal stem cells: phenotypic characterization and optimizing their therapeutic potential for clinical applications. *Int J Mol Sci* 2013;**14**(6):11692-11712”

2.2.2. İnsan Kordon Kanı Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler

İnsan kordon kanı, sezaryen ya da normal doğum ile elde edilen MKH kaynağıdır ve senelerce atık bir ürün olduğu düşünülmüş ancak zaman içerisinde kordon kanından kök hücre elde edilmesiyle transplantasyon, çeşitli hemoglobinopatiler, immun yetersizlikler ve konjenital hastalıklarda başarılı bir şekilde kullanmasıyla kordon kanının önemi artmıştır (31, 32).

Kordonun perivasküler alanında, bir ven ile iki arter damar bulunmaktadır ve her üç damar adventitia denen bağ dokusu ile çevrilidir (31). Ven damarından alınan kordon kanı kaynaklı MKH (KK-MKH), arter damarından elde edilen MKH'den daha bol olduğu bilinmektedir ve Fikol paque dansite gradiyentine bağlı santrifügasyon metodu ile izole edilmektedir (33).

2.2.3. Wharton Jeli Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler

Kordonun amniyon tabakasının altındaki jel benzeri, mukozal doku Wharton jeli olarak bilinmektedir (Şekil 2-3). Esasen hyaluronan açısından bol miktarda bulunan Wharton jeli, ayrıca kollajen lifleri ve dağınık şekilde bulunan fibroblastlardan oluşan mukoid jelatinimsi yapı özelliği gösterir (34). Wharton jelinin görevi glikoprotein, glikozaminoglikanlar, mukopolisakkarit ve ekstraselüler matriks proteinleri salgılamasının yanı sıra, bu jelatinimsi yapının içinde bulunan ven ve arter damarlarını

korurken diğer yandan da bu damarların düğümlenmesini engellemek olduğuna inanılmaktadır (31, 35). Wharton jeli kök hücre bakımından oldukça zengindir ve bu bölgede bol miktarda kök hücre bulunmasına dair iki teori ortaya atılmıştır. Bunlardan ilkinе göre, embriyonun erken gelişim zamanında oluşan MKH'lerin bu bölgeye göçü sırasında, jelatinimsi yapıdaki Wharton jeline yakalanıp buraya yerleşmeleriyle açıklanırken ikinci teoriye göre ise kordon dokusu içerisinde embriyonel gelişimin başlangıcından beri varolan “primitif mezenkimal kök hücreler” olduğu şeklindedir (31, 36).

Wharton jeli kaynaklı MKH (WJ-MKH), enzimatik sindirim veya eksplant kültür yöntemi ile elde edilmektedir (23, 33). WJ-MKH'ler, KK-MKH'lere göre daha proliferatif ve daha güçlü multipotent özellikli olduğu öne sürülmektedir (37, 38).

2.3. KOLOREKTAL KANSER

Kanser, dünya çapında yılda 10 milyondan fazla ölümün nedenlerinden biridir. Bir hücrenin kontrolsüz büyümeye başlayıp başka doku ve organlara yayılması (metastazı) şeklinde tanımlanmaktadır (39). Metastaz, kanserin malignitesini etkileyen başlıca faktörlerden biridir ve ilk defa İngiliz cerrah Stephen Paget tarafından metastaz, “tohum ve toprak” teorisi fenomeni ile açıklanmıştır (40, 41). Bu teoriye göre metastaza sebep olacak kanser hücresi ortam koşulları ideal hale geldiğinde, kanser proliferatör olup metastaza neden olmaktadır. Burda bahsedilen kanser hücresi tohum olurken, kanser hücresinin bulunduğu ortam da tümör mikroçevresine benzetilmektedir. Kanser oluşumunda metastaz ve tümör mikroçevresini, sınırsız anjiyogeneze oluşumu, tümör süpresör genlerinin inhibisyonu, kanser başlatıcı olan onkogenlerin aktivasyonu, programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptozun baskılanması ve dolayısıyla sınırsız büyüme gibi mekanizmalar etkilemektedir (42).

Kolorektal kanserler (KRK) dünya çapında sıklığı üçüncü sırada olan ve sindirim sisteminin son kısmı olan gastrointestinalin en sık rastlanan kanser türüdür (8, 43). Gastrointestinal sistemin kolon ve rektum epitellerinde birçok mutasyonun birikmesi ve preneoplastik hücrelerin adenomlara dönüşmesiyle başladığına inanılmaktadır (44, 45). Ayrıca sigara ve alkol kullanımı, sağlıksız beslenme ve spordan uzak bir yaşam gibi çevresel faktörlerin de genetik faktörleri etkileyerek KRK epidemiyolojisinde rol aldığı düşünülmektedir (46).

Ailesel, kalıtsal ve sporadik olmak üzere üç farklı türü vardır (47, 48). Her bir türünde kolorektal kanser için koruyucu bir gen olan “Adenomatosis Poliposis Coli” (APC)’nin mutasyonunun birikimi ortaktır (49). Tanı genel olarak kolonoskopi, sigmoidoskopi ve bilgisayarlı tomografi yöntemleri ile konmaktadır (50). Tanı koyma zamanı KRK’lerde oldukça hayati öneme sahiptir. Dört evreden oluşan bir kanser türü olup dördüncü evre en malign ve en metastatik evresidir (49).

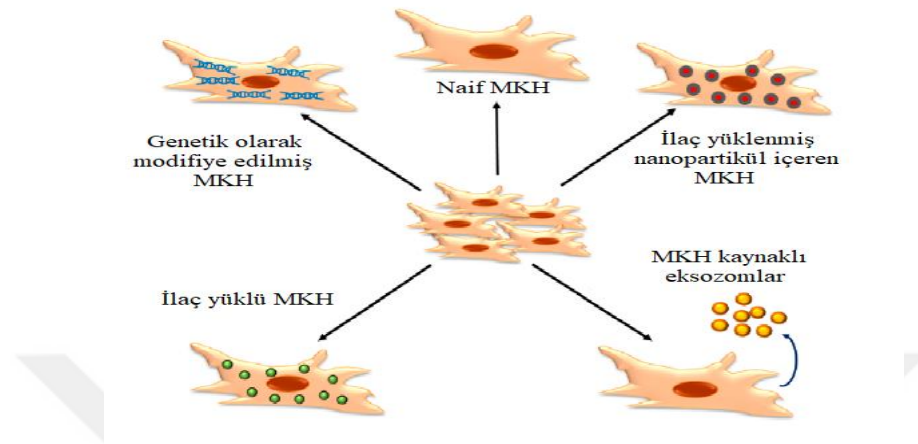
Tanı ardından tedavide genellikle “5-Florourasil, oksaliplatin, irinotekan ve kapesitabin” gibi kemoterapötik ilaçlarla, radyoterapi ve çoğu zaman ise neoplastik bölgeye cerrahi operasyon gibi seçenekler kullanılmaktadır (51, 52). Bu geleneksel tedavi yöntemleri hem hasta hem hekim için zahmetli uygulamalar olup kanserli hücreler yanında sağlıklı hücrelerin de ölümüne sebep olmaktadır. Ayrıca oldukça karışık bir mekanizması olan bu kanser türüne uygulanan geleneksel tedavi yöntemleri, tümör mikroçevresinde tedaviye direnç kazandırıp kanserin nüksüne neden olabilmektedir (51). Bundan dolayı KRK için hücresel kaynaklı alternatif terapi seçeneklerinin gelecekte ümit vaad edici olacağı öngörülmektedir (53).

2.4. HÜCRESEL TEDAVİ KAYNAĞI OLARAK MEZENKİMAL KÖK HÜCRENİN KANSER TERAPİSİNDEKİ YERİ

Sıklıkla doku rejenerasyonunda kullanılmakta olan MKH’ler sahip oldukları anti-tümörijenik özellikleri sebebiyle kanser tedavileri için oldukça önemli bir hücresel tedavi potansiyeline sahiptir. Özellikle birincil ve metastatik tümör bölgelerine göçerek tümörü hedefleyen ve tümör mikroçevresine anti-tümörijenik ajanlar salgılayan MKH’ler çeşitli kanser tedavileri için umut verici olmaktadır (54). Tümör bölgelerinde gösterdikleri anti-tümörijenik etkiyi, anti-inflamatuvar ve parakrin etkileri ile birlikte anti onkogenik miRNA, sitokin ve kemokinlerin sekresyonlarını arttırarak göstermektedir (54-56).

Mezenkimal kök hücrelerin anti-tümörijenik etkisi üzerinde, MKH kaynağı, tümörlerin bulunduğu evre, tümör mikroçevresinin tümöre kazandırmış olduğu sertlik ve yine tümör mikroçevresinin ekstraselüler matriks ile oluşturmuş olduğu etkileşim sebepleriyle açıklanabilen tartışmalı durumlar mevcuttur (57, 58). MKH’ler tümör bölgesine hedeflenirken naif, ilaç yüklü veya genetik olarak modifiye edilip kullanılabilir. Şekil 2-4’te MKH’lerin kanser tedavisinde tümör hedefli kullanım

seçenekleri gösterilmektedir (59). Kanser terapisinde hücresel kaynaklı MKH'lerin seçilmesindeki amaç pro-apoptotik etkilerinden faydalanmaktır.



şekil 2-4: Kanser terapisinde MKH'nin kullanım stratejileri

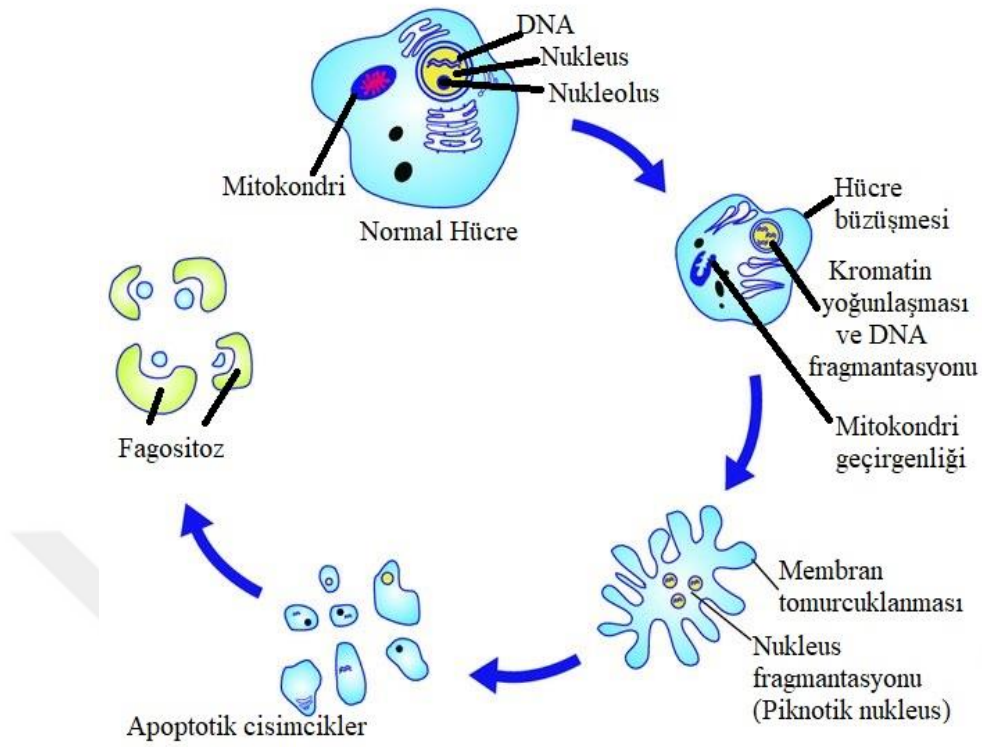
“de la Torre P, Perez-Lorenzo MJ, Alcazar-Garrido , Flores AI. Cell-based nanoparticles delivery systems for targeted cancer therapy: Lessons from anti-angiogenesis treatments. *Molecules* 2020;25(3):715”

2.5. HÜCRE ÖLÜMÜ

Hücre lm embriyogenez döneminden itibaren homeostazın sağlanması, morfogeneze hasarlı olan hücrelerin yok edilmesinde rol oynayan bir hücresel yanıttır (60). Entoz, otofaji ve apoptoz gibi farklı hücre ölüm türleri bulunmaktadır (61).

2.5.1. Apoptoz

İlk olarak 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından “ağaçtan düşen yaprak” anlamına gelen apoptoz, “kontrollü ya da programlı hücre ölümü” olarak bilinmektedir (62). Apoptoz piknotik görünümlü kromatin yoğunlaşması, hücrenin büzüşmesi ve apoptotik cisimciklerin oluşması gibi bir dizi olay ile karakterizedir. şekil 2-5’te apoptozda oluşan hücresel değişiklikler gösterilmektedir (63).



Şekil 2-5: Hücrede apoptoz sırasında oluşan değişiklikler

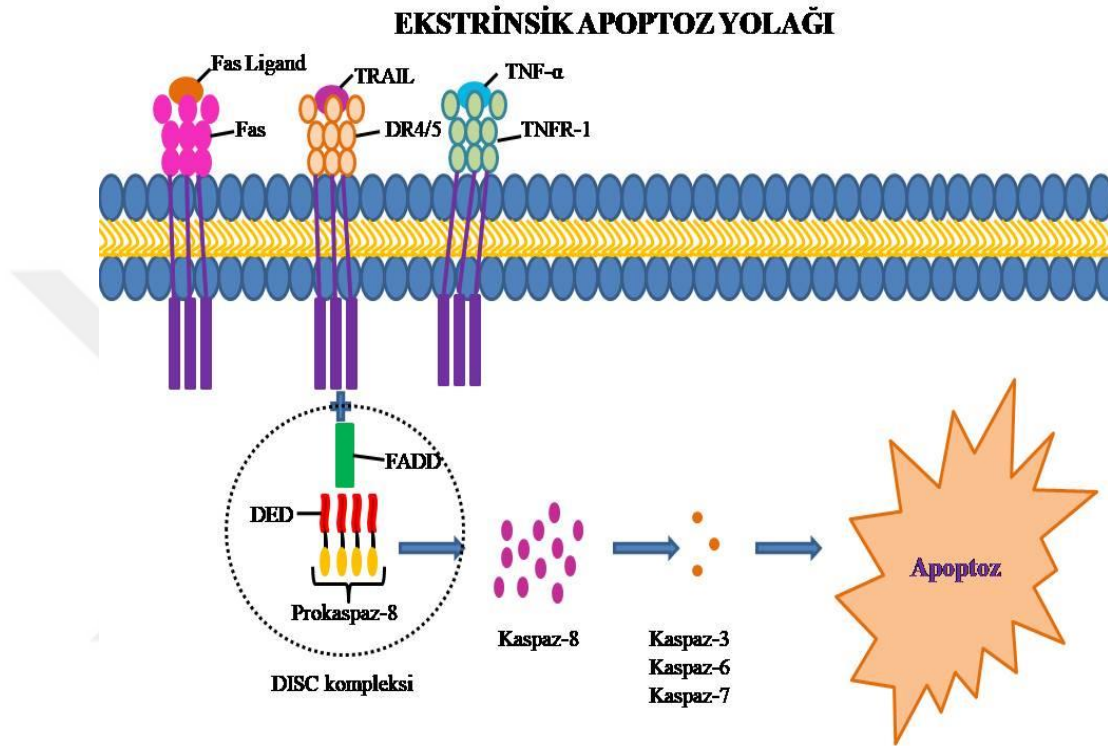
“Guerin MB, McKernan DP, O'Brien CJ, Cotter TG. Retinal ganglion cells: dying to survive. *Int J Dev Biol* 2006;50(8):665-674”

Memelilerde apoptoz sırasında gerçekleşen hücresel değişiklikler, apoptoz mekanizmasında yer alan bir dizi regülatör protein olan kaspazlar, Bcl-2 ailesi ve apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (APAF-1) tarafından yönetilir (64). Apoptozun intrinsik ve ekstrinsik olmak üzere iki ana apoptoz yolağı ve bir de alternatif perforin/granzim yolağı vardır (65).

2.5.1.1. Apoptozun Ekstrinsik Yolağı

Ekstrinsik yolak, bir dizi kaspaz ailesi mediatör proteinlerinin dahil olduğu ve hücre membran yüzeyinde bulunan reseptöre, ölüm reseptör ligandının bağlanması ile aktifleşen yoldur. Ölüm reseptörü olan tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1)'e TNF- α bağlanarak, Fas reseptörüne Fas ligand bağlanarak ya da DR4/5 reseptörüne TNF-ilişkili apoptoz indükleyeci ligandın (TRAIL) bağlanması ile sinyal yolağı açılır. Bu bağlantıya Fas-ilişkili ölüm domaini (FADD) aracılık etmektedir. FADD, içerdiği ölüm efektör domainleri (DED) ile prokaspaz-8'lerle etkileşime geçerek ölüm

indükleyici sinyal kompleksi (DISC) denen yapıyı oluşturur (66). Bu kompleks oluştuğunda toplanmış olan prokaspaz-8'ler otokatalitik aktiveleriyle aktif kaspaz-8 yolunu aktifleştirerek kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7 aktivasyonuna sebep olurlar (67). Bu yolak oldukça güçlü olup kaspaz-8 aktivasyonu, apoptozun başlaması için yeterlidir. Şekil 2-6'da ekstrinsik yolak gösterilmektedir.

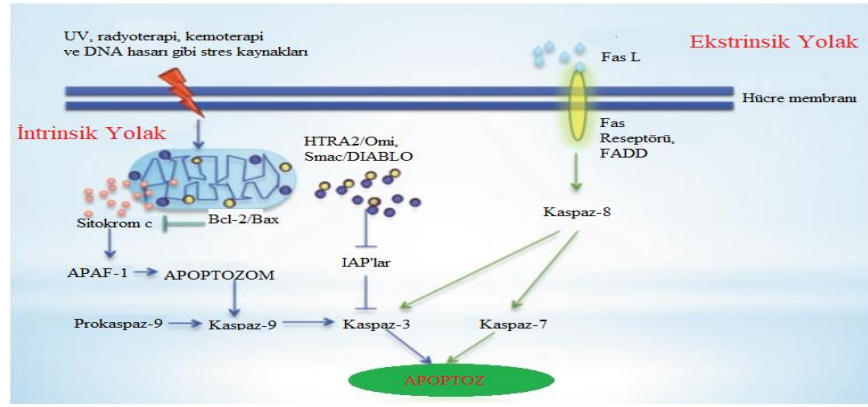


Şekil 2-6: Apoptozun ekstrinsik yolağı

2.5.1.2. Apoptozun İntrensik Yolağı

Reseptör bağımsız intrinsik yolak UV, gama ışınları ve hipoksi gibi DNA hasarına sebep olan faktörlerle aktive olmaktadır (68, 69). İntrensik yolak kaspaz-8'in Bid'i, kesilmiş-Bid (tBid)'e dönüştürmesi sayesinde ekstrinsik yolak ile bağlantı kurmaktadır. Bcl-2 aile üyesi olan Bax/Bak mitokondri dış zarında oligamer yapı oluşturup intrinsik yolağın en önemli basamaklarından biri olan mitokondri dış membranının geçirgenliğini arttırırlar (70). Membran geçirgenliğinin açılmasının ardından sitokrom c, apoptoz indükleyici faktör (AIF), endonükleaz G, Smac/DIABLO ve HTRA2/Omi gibi moleküllerin mitokondriyal iç zardan geçip mitokondriyal

depolarizasyona, ATP harcanmasına ve bir takım zincirleme reaksiyon sonucu en nihayetinde kaspaz-bağımsız apoptoza neden olmaktadır. Diğer yandan kaspaz-bağımlı intrinsik yolda, mitokondriden salınan sitokrom c, APAF-1 ile apoptozom kompleksini oluştururlar. Ardından bu komplekse, proteolitik parçalanmanın gerçekleşmesi için kaspaz-9 bağlanır ve kaspaz-9'un aktivasyonu kaspaz-3'ün parçalanmasını tetikleyerek apoptozun aktivasyonu sağlanır. Şekil 2-7'de intrinsik yolağ gösterilmektedir (71).



Şekil 2-7: Apoptozun intrinsik yolağı

“Zhu S, Li ZF. Proteases and Cancer Development. In Dhalla NS and Chakraborti S, editor. Role of proteases in cellular dysfunction, advances in biochemistry in health and disease. Springer Science+Business Media; New York; 2014. Pp. 129-145”

2.5.1.3. Apoptozda Kaspaz-3 ve HTRA2/Omi Proteinleri

Kaspaz-3, hem ekstrinsik hem de intrinsik yolağa dahil olan 12 ile 17 kDa büyüklüğünde iki küçük alt birimden oluşan bir proteindir ve apoptozdaki en önemli rolü apoptoza giden hücreleri parçalamak için ekstrinsik yolda kaspaz-6 ile kaspaz-7'yi, intrinsik yolda kaspaz-9'u parçalayıp apoptozun aktivasyonunu sağlamaktır (72). Kaspaz-6, kaspaz-7 ve kaspaz-9'un aktivasyonunu sağladıktan sonra kaspaz-3 parçalanır. Bu parçalanma sıraları ve aktivasyonları apoptozun başlaması ve devamı için oldukça önemlidir (65).

Apoptozun intrinsik yolağında yer alan mitokondri membranları arasında bulunan HTRA2/Omi, bir serin proteazdır. Mitokondriyal membran üzerinde membran geçirgenliğini regüle ederek mitokondriyal homeostazın ve hücrenin hayatta kalmasında önemli rol oynamaktadır. Apoptotik inhibitör proteinleri (IAP)'ni inhibe ederek pro-

apoptotik etki göstermektedir (73). HTRA2/Omi ve IAP etkileşimi, IAP'ların degradasyonuna ve kaspaz-3 bağımlı apoptoza yol açmaktadır (74).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ÖRNEKLERİN TEMİNİ

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 27/05/2020-62261 tarih ve sayılı izni ile onaylandı. Çalışmada kullanılacak insan kaynaklı kordon kanları ve kordon dokusu, T.C. Sağlık Bakanlığı İstanbul Bakırköy Dr.Sadi Konuk Eğitim Araştırma Hastanesi Kadın Doğum Polikliniği merkezinden sağlık açısından sorunsuz bir hamilelik geçiren ve herhangi bir kronik hastalığı olmayan anne adayının bilgilendirilmiş gönüllü olur formunu okuyup, onaylamasından sonra resmi izinle elde edildi. 24 Eylül 2020 İ.Ü. BAP onayı ardından Aralık 2020 tarihinde laboratuvarda kullanılacak olan tüm malzemelerin teslim edilmesi ile birlikte kordon kan ve dokularının toplanmasına başlandı ve Haziran 2021 tarihine kadar MKH kaynaklarının toplanmasına devam edildi. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılacak olan kolon kanseri hücre hatları (HCT-116 ve HT-29) Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC) temin edildi. Hücre kültürü çalışmalarının tümü İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Esnaf Hastanesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü Araştırma Laboratuvarı'nda Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Fatma Savran Oğuz'un izniyle gerçekleştirildi. Hücre kültürü sonrasında yapılmış olan Flow Sitometri ve ELISA deneyleri, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Fatma Savran Oğuz'un izniyle Flow Sitometri Laboratuvarı'nda yapıldı.

3.2. ARAŞTIRMA GEREKÇESİ VE PLANI

Bu tez araştırmasında kordon kanı ve kordon dokusu olan Wharton jelinden elde edilen ve hücre kültürü ile çoğaltılan MKH'lerin HCT-116 ve HT-29 kolorektal kanser hücre hatlarındaki terapötik etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla projemizde;

1. İnsan kordon kanı ve Wharton jelinden izole edilen MKH'ler çalışmaya dahil edildi.
2. İnsan kordon kanından ve Wharton jelinden izole edilen MKH'ler flow sitometri yöntemi ile karakterize edildi.

3. HCT-116 ve HT-29 hücre hattından kültür ile elde edilen kolon adenokarsinoma hücreleri çalışmaya dahil edildi.
4. Kolon kanseri hücre hatları ile kordon kanından ve kordon dokusundan izole edilen MKH'ler transwell sistemde 1/5 ve 1/10 (Kanser:MKH) oranında kültür edildi.
5. 1/5 ve 1/10 oranlarında oluşturulan deney grupları 24 ve 72 saat boyunca etüvde inkübe edildi.
6. Her iki inkübasyon sonrası kolon adenokarsinom hücreleri Annexin V-FITC/PI yöntemiyle flow sitometri cihazında apoptoz deneyleri ve analizleri yapıldı.
7. Araştırmanın kontrol grubu için tam kandan Fikol paque density gradient metodu ile periferel kan mononükleer hücreler (PKMH) ayrılarak çalışmaya dahil edildi.
8. PKMH'ler, deney grubuyla aynı koşullarda, 1/5 ve 1/10 (PKMH:MKH) ile 24 ve 72 saat MKH'lerle birlikte inkübe edildi.
9. Her iki inkübasyon sonrası PKMH'ler Annexin V-FITC/PI yöntemiyle flow sitometri cihazında apoptoz deneyleri ve analizleri yapıldı.
10. Hem deney hem de kontrol grubundaki testlerin 24 ve 72. saatleri sonunda medyumlarından 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine örnek alınarak -20°C'de saklanarak çalışmaya dahil edildi.
11. Tüm flow sitometri deneyleri bittikten sonra saklanmış olan süpernatant ELISA yönteminde Kaspaz-3 protein değişimi deneyleri ve analizi yapıldı.
12. Tüm flow sitometri deneyleri bittikten sonra saklanmış olan süpernatantlardan ELISA yönteminde HTRA2/Omi protein değişimi deneyleri ve analizi yapıldı.

Hücre kültürü çalışmalarından önce ve sonra laboratuvarın ve laminar kabinin UV ışığı açılıp dezenfektan ile laboratuvarın sterilizasyonu sağlandı. Hücre kültürü çalışmalarında tek kullanımlık kapalı ambalajlarda gelen hücre kültürü malzemeleri kullanıldı. Hücre kültürü aşamaları laminar kabinde ve steril koşullarda yapıldı.

3.3. KULLANILAN LABORATUVAR EKİPMANLARI

Steril pudrasız eldiven

15 mililitre (ml) falkon tüp

50 ml falkon tüp

2 ml dondurma tüpü

1,5 ml mikrosantrifüj tüpü

10-100 mikrolitrelik (μ l) otomatik pipet (Nichipet EX)

10-100 μ l'lik otomatik pipet ucu

1000 μ l'lik otomatik pipet (Nichipet EX)

1000 μ l'lik otomatik pipet ucu

3 ml'lik plastik pastör pipeti

10 ml'lik cam pastör pipeti

Puar

Steril pensler ve bistüri uçları

Doku parçalama makası

Doku taşıma kabı

Heparinli kan alma tüpü (Yeşil kapaklı)

25cm²' lik hücre kültür flaskları (Sarstedt)

75cm²' lik hücre kültür flaskları (Sarstedt)

24 kuyucuklu plaklar (Sarstedt)

Steril transwell (Sarstedt)

Thoma lamı (Neubauer)

Lamel (22x22mm)

Işık mikroskobu (Olympus, CX22)

Invert mikroskop (Motic, AE21)

Santrifüj (Heraeus-Labofuge-400R)

+4 Buzdolabı (Regal)

-20 derece derin dondurucu (Regal)

Vorteks (Velp Scientifica)

CO₂ inkübatörü (New Brunswick, Galaxy 170R)

CO₂ tüpü

Laminar kabin (Fagus)

Flow sitometri cihazı (Beckman Coulter, Navios)

Flow sitometri test tüpleri

Shaker (Orbital Shaker)

ELISA plak okuyucu (Allsheng, FlexA-200)

UV ışık

3.4. KULLANILAN KİMYASALLAR, SOLÜSYONLAR VE KİTLERİN İÇERİKLERİ

3.4.1. Kimyasal ve Solüsyonlar

Dezenfektan

Steril distile su

% 0,5 tripan mavisi solüsyonu

RPMI-1640 (HyClone, AF29498412)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (BİOSERA-MS00FG100E)

Fötal Bovin Serum (FBS) (HyClone-RE00000006)

Penisilin-Streptomisin (HyClone)

Amphotericin B (Sigma A2942)

Fikol paque (Biosera-MS00ET100J, Lymphocyte Separation Media)

Phosphate Buffered Saline (PBS) (HyClone-AE29431651)

Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) (Hyclone)

Trypsin 0.25% / EDTA (HyClone)

3.4.2. Kullanılan Kitler

3.4.2.1. Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyonu İçin Kullanılan Kitin İçeriği

Mezenkimal kök hücre karakterizasyonu için Human MSC Analysis Kiti (BD Stemflow, AB2869404) kullanıldı.

- **Kitin içeriği:**
- ✓ **MKH Pozitif Kokteyl:** CD73 APC, CD90 FITC, CD105 PerCP-Cy5.5
- ✓ **MKH Pozitif İzotip Kontrol Kokteyli:** IgG1 FITC, IgG1 PerCP-Cy5.5, IgG1 APC
- ✓ **MKH Negatif Kokteyl:** CD11b PE, CD19 PE, CD34 PE, CD45 PE, HLA-DR PE
- ✓ **MKH Negatif Kokteyl Kontrol:** IgG1 PE, IgG1 α

Kompanzasyon ayarı için kullanılan boncukların özellikleri:

- ✓ FITC Mouse Anti-human CD90
- ✓ PE Mouse Anti-human CD44
- ✓ PerCP-Cy5.5 Mouse Anti-human CD105
- ✓ APC Mouse Anti-human CD73

İzotip kompanzasyon kontrolü için kullanılan boncuğun özelliği:

- ✓ PE Mouse IgG2 β

3.4.2.2. Flow Sitometrik Apoptoz Değerlendirmesi İçin Kullanılan Kitin İçeriği

Flow sitometrik apoptoz değerlendirme için ApoFlowEx FITC kiti (Exbio, ED7044) kullanıldı.

- **Kitin içeriği:**
- ✓ 15 mM sodyum azotür içeren PBS'te stabilize edilmiş Annexin V-FITC
- ✓ 0,1 mg/ml deiyonize suda kullanıma hazır Propidyum İyodür
- ✓ 10X konsantride bulunan Annexin V Binding Buffer solüsyonu (0,1 M HEPES/NaOH, pH 7.4, 1,4 M NaCl, 25 mM CaCl₂)

3.4.2.3. ELISA Kaspaz-3 Değerlendirmesi İçin Kullanılan Kitin İçeriği

ELISA Kaspaz-3 değerlendirme için Human Caspase-3 (Casp3) ELISA kiti (AbbKine, KT62614) kullanıldı.

- **Kitin İçeriği:**
 - ✓ Human Casp3 mikropate
 - ✓ Human Casp3 standard
 - ✓ HRP-Konjugate Human Casp3 antikor
 - ✓ Standard diluent
 - ✓ Sample diluent
 - ✓ Kromojen A solüsyonu
 - ✓ Kromojen B solüsyonu
 - ✓ Stop solüsyonu
 - ✓ Yıkama buffer
 - ✓ Plate kapatıcısı

3.4.2.4. ELISA HTRA2/Omi Değerlendirmesi İçin Kullanılan Kitin İçeriği

ELISA HTRA2/Omi değerlendirme için Human HTRA2 (OMI) ELISA kiti (Thermo Fisher Scientific-Invitrogen, EHHTRA2) kullanıldı.

- **Kitin İçeriği:**
 - ✓ Human HTRA2 antikor kaplı plate
 - ✓ Human HTRA2 biyotin konjugat
 - ✓ Human HTRA2 standart
 - ✓ Yıkama buffer (20X)
 - ✓ D dilüenti (5X)
 - ✓ B dilüenti (5X)
 - ✓ Streptavidin-HRP
 - ✓ TMB substratı

- ✓ Stop solüsyonu
- ✓ Plate kapatici

3.5. YÖNTEMLER

3.5.1. KULLANILAN BİYOMATERYALLERİN ELDESİ

3.5.1.1. İnsan Kordon Kanı Toplanması

Mezenkimal kök hücre kaynağı olarak insan kordon kanları antikoagülan içeren heparinli tüplere alındı ve yaklaşık 3 saat içinde hücre kültürü laboratuvarında Fikol paque density gradient yöntemi ile mononüklear hücreler izole edildi.

3.5.1.2. İnsan Kordon Kanı İzolasyonu

İnsan kordon kanından mononüklear hücreler Fikol-paque yöntemi ile izole edildi (75). Gönüllü onam formu anne tarafından okunup imzalandı. Doğum sonrasında ortalama 50-60 cc kadar (8-10 adet 8cc'lik tüp) kordon kanı doğumhaneden sorumlu hekim tarafından toplandı. En kısa süre içerisinde hücre kültürü laboratuvarına ulaştırılan örnekler steril kabin içerisinde işleme alındı. Bu yöntemde sırasıyla yapılanlar;

1. 50 ml'lik steril falkonlara aktarılan kan örneği 1:1 oranında HBBS solusyonuyla karıştırıldı.
2. 15ml'lik steril falkonlara 5cc fikol paque solusyonu konuldu.
3. HBSS ve kordon kanı karışımı dikkatli ve yavaşça fikol üzerine yüklendi.
4. Santrifüj freni kapalı olarak 2600 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonrası fikolün üstüne toplanan buffy coat (mononüklear hücrelerin toplandığı alan) alındı ve 15 ml falkon tüpe aktarıldı.
6. 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı döküldü.
7. Peletin üzerine 5-6 ml HBSS konuldu ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
8. Santrifüj ardından süpernatant döküldü ardından kültür işlemine geçildi.

3.5.1.3. İnsan Kordon Kanı Kültürü

Fikol paque yöntemi ile edilen mononükleer hücreler 75cm² flasklara ekilerek daha önceden hazırlanmış %10 FBS, %1 penisilin+streptomisin içerikli antibiyotikli L-glutaminden zengin DMEM besiyeri eklenerek, 37⁰ C'de %5 CO₂ inkübatörde çoğaltılmaya bırakıldı ve gerektiğinde medyumunu tazelandı (76).

Kordon kanından elde edilen mononükleer hücrelerin flaska ekimi ardından 10-12 saat sonra diğer monositik hücrelerin uzaklaştırılması için medyum tazelandı. Hücrelerin ortalama 7 günde fibroblastik hale dönüşüp yapıştığı gözlemlendi. Ortalama 20 günde %80-90 konfluent olan hücreler tripsinizasyonla kaldırılarak karakterizasyon için hazırlandı. Deneyde kullanılmak üzere alınan her örnek için aynı işlemler uygulandı ve aynı zamanda her karakterizasyon sonrası hücreler Pasaj 3'e kadar beklendikten sonra deneye konuldu. Şekil 3-1'de 7. ve 21.gündeki MKH'ler gösterilmektedir.



Şekil 3-1: 7. ve 20. gün KK-MKH görüntüleri

3.5.1.4. İnsan Kordon Dokusu Toplanması

Mezenkimal kök hücre kaynağı olarak insan kordon dokusu steril bir kap içerisine alınıp yaklaşık 3 saat içinde hücre kültürü laboratuvarında mekanik doku parçalama (eksplant) yöntemi ile dokunun Wharton jeli kısımları izole edildi.

3.5.1.5. Kordon Dokusu İzolasyonu

İnsan kordon dokusundan Wharton jeli dokusu mekanik parçalama yöntemi ile izole edildi (77). Sezaryen doğum sonrasında insan kordonundan 20 cm uzunluğunda kesilen kordon dokusu yetkili klinisyen tarafından steril kaba aktarıldı. En kısa süre içerisinde hücre kültürü laboratuvarına getirilen örnekler steril kabin içerisinde işleme alındı. Bu yöntemde sırasıyla yapılanlar;

1. Steril laminar flow içerisinde alınan yaklaşık 10 cm'lik parçalara ayrıldı.
2. Doku parçaları 4 adet 50 ml falkona önceden hazırlanmış 15 ml antibiyotik ve antifungal karışımı (Streptomisin, Penisilin, Anfoterisin B) falkonların içerisine aktarma ve çalkalama işlemiyle yıkanarak falkon 1 saat 37°C etüvde inkübe edildi.
3. Hücre kültürü laboratuvarında laminar kabin içerisinde, en iyi parçası bir petriye konuldu.
4. Parçalama esnasında steril bisturi, makas ve pens kullanıldı.
5. Wharton jelini saf bir şekilde elde etmek için dikkatlice dokunun içerisindeki 2 arter ve 1 ven damarı dokudan çıkarılarak uzaklaştırıldı (Şekil 3-2).
6. Saf doku mümkün olduğunca küçük parçalar olacak şekilde bisturi yardımıyla kesildi.
7. Doku parçaları cımbız yardımıyla 6 kuyucuklu plate'e düzenli aralıklarla yerleştirildi.
8. Steril koşullarda plate'in kapağı kapatılmadan dokunun etrafındaki sıvının kurumaması beklendi.
9. Kuruyan doku parçalarının üzerine cam lamel kapatılıp kurutmaya devam edildi.

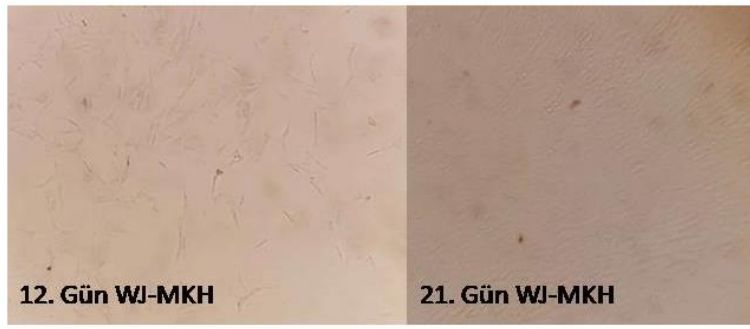


Şekil 3-2:Kordon dokusundan Wharton Jeli eldesi

3.5.1.6. Kordon Dokusu Kültürü

Lamel ile üzerileri kapalı olan Wharton jeli dokusunun üzerine %10 FBS içeren 4 ml DMEM eklenip 37°C'de % 5 CO₂ inkübatörde çoğalmaya bırakıldı (76). İnkübasyonun 12. gününde proliferasyon olması beklenmekte olup eğer olmazsa 15., 20., 25. ve 30. günlerde kontrol edildi ve maksimum 40 güne kadar bekletildi.

Çalışmamızda MKH'ler ortalama 20 günde flaskın yüzeyine yapışmıştı ve ortalama inkübasyonun 7.-10. günde doku parçalarının üzerine kapatılan lameller kaldırıldı ve medyumları değiştirildi. Hücrelerin proliferasyon olup olmadıkları mikroskopta gözlemlendi. Yeterince proliferasyon olan hücreler 75cm²'lik flaska pasajlandı. Hücreler %70-80 konfluent olduklarında tripsinizasyonla kaldırıldı ve karakterizasyon için hazırlandı. Deneyde kullanılmak üzere alınan her örnek için aynı işlemler uygulandı ve aynı zamanda her karakterizasyon sonrası hücreler Pasaj 3'e kadar beklendikten sonra deneye konuldu. Şekil 3-3'de 12. ve 21.gündeki MKH'ler gösterilmektedir.

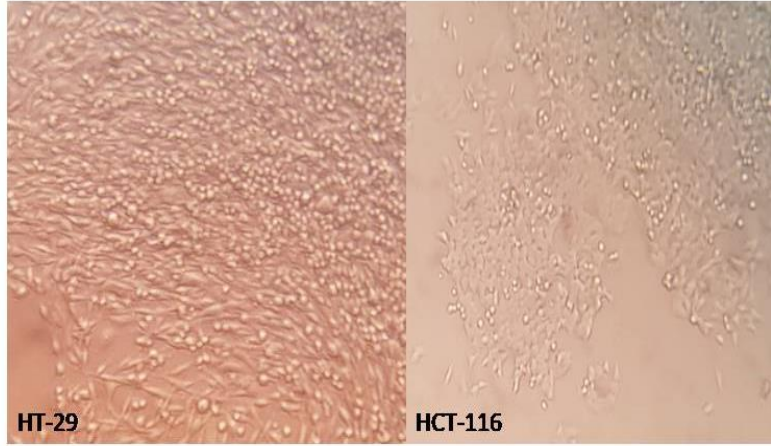


Şekil 3-3: 12. ve 21. gün WJ-MKH görüntüleri

3.5.1.7. Kolon Kanseri Hücre Hatlarının Açılması ve Kültürü

Deneylerde kullanılacak olan HT-29 ve HCT-116 kolon adenokarsinoma hücre hatları ATCC'den elde edildi.

- 1) 15 ml'lik falkona 5 ml DMEM ve mikrosantriüj tüpünde çözündürülmüş olan hücreler 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
- 2) Santrifüjden çıkan falkonun üzerindeki süpernatant atıldı ve üzerine 1000 µl DMEM konuldu ve hücre sayımı yapıldı.
- 3) Falkon içerisindeki DMEM+hücre karışımı pipetaj yapılarak 75cm²'lik flaska aktarıldı.
- 4) Flasktaki hücrelerin üzerine 9 cc'ye kadar DMEM eklenerek 37°C'de % 5 CO₂ inkübatörde çoğalmaya bırakıldı (78). Şekil 3-4'de HT-29 ve HCT-116 hücre kültürleri sonrası hücre morfolojileri gösterilmektedir.



Şekil 3-4: HCT-116 ve HT-29'un hücre kültürü sonrası görüntüsü

3.5.1.8. PKMH Eldesi

Kontrol deneyleri için sağlıklı bir kişiden yaklaşık 20-30 cc kadar heparinli tüplere alınan periferik kandan steril kabin içerisinde Fikol-paque density gradient metoduyla PKMH elde edildi (75).

1. 50 ml'lik steril falkonlara aktarılan kan örneği 1:1 oranında PBS solusyonuyla karıştırıldı.
2. 15ml'lik steril falkonlara 5cc fikol paque solusyonu konuldu.
3. PBS ve perifik kan karışımı dikkatli ve yavaşça fikol üzerine yüklendi.
4. Santrifüj freni kapalı olarak 2600 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonrası fikolün üstüne toplanan buffy coat (mononükleer hücrelerin toplandığı alan) kısmı toplandı ve 15 ml falkon tüpe aktarıldı.
6. 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı döküldü.
7. Peletin üzerine 12 ml PBS konuldu.
8. Hücreler mikroskopta incelenerek yaklaşık 15 milyon hücre sayıldı.
9. Sayım sonrasında tüp 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
10. Santrifüj ardından süpernatant döküldü, pelet tüpün dibinde kaldı.

11. Dipte kalan peletin üzerine 1 ml PBS eklenerek hücre sayımı yapıldı.

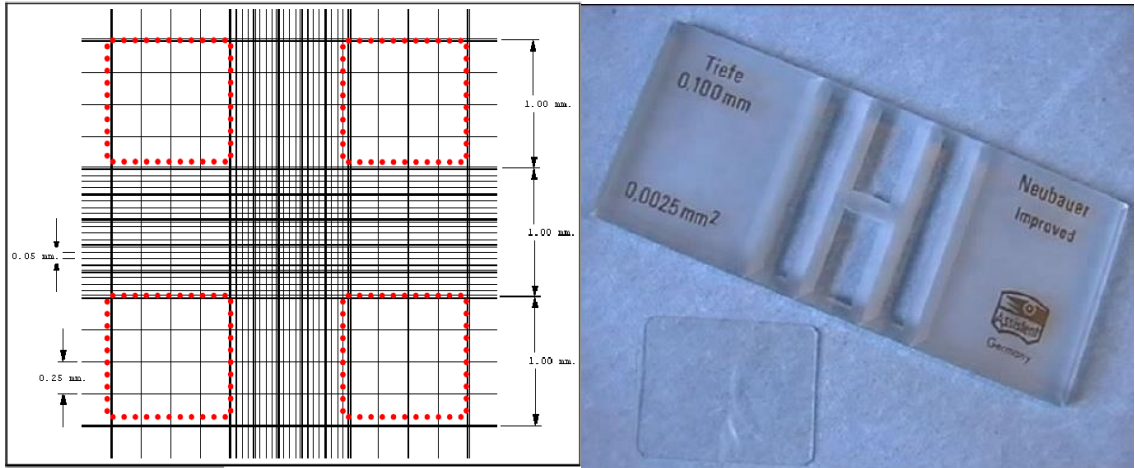
3.5.2. DENEY HAZIRLIKLARI İÇİN KULLANILAN YÖNTEMLER

3.5.2.1. Tripan Mavisi ile Hücre Canlılığının Tayini ve Hücre Sayımı

Süspanse hücreler (PKMH) 1500 rpm’de 5 dakika santrifüj edilip süpernatant bir şekilde uzaklaştırıldı. Ardından yapışan hücreler (KK-MKH, WJ-MKH, HCT-116 ve HT-29 hücreleri) ise tripsin ile kaldırıldıktan sonra santrifüj edilip süpernatantları hassas bir şekilde uzaklaştırıldı.

1. Hücre canlılığının ve miktarının belirlenmesinde Tripan mavisi ile boyama yöntemi uygulandı (79).
2. Santrifüj sonrasında dibe çöken hücreler medyum ile sulandırılarak Tripan mavisi boyası ile (1 hacim boya + 1 hacim hücre) boyandı.
3. Mikroskopta Toma lamında hücreler sayıldı. Boyayı alan hücreler mavi renkte ve ölü olarak değerlendirilip, boya almayan canlı hücreler mikroskopta sayıldı.
4. Hücre canlılığı aşağıdaki denkleme göre hesaplandı (Şekil 3-5).

Toplam hücre= Sayılan hücre x Dilüsyon faktörü x Toplam hacim x 10.000 (lam faktörü).



Şekil 3-5: Toma lamı ve lamdaki sayım alanları

3.5.2.2. Adherent Hücrelerin Tripsin Uygulaması ile Hücre Kaldırması

Steril laminar kabinde, plastik adherent olan KK-MKH, WJ-MKH, HCT-116 ve HT-29 tripsinizasyon işlemi ile deneylerde kullanılmak için flasktan kaldırıldı (80).

- 1- 75cm²'lik flasklardaki 9cc kadar medyum 15'lik falkona aktarıldı.
- 2- Tüm medyumunu boşaltılmış olan flaska 3 ml tripsin eklendi.
- 3- 1-2 dakika kadar etüvde 37°C'de inkübe edildi.
- 4- İnvert mikroskop altında hücrelerin kalkmış olduğu gözlemlendikten sonra kullanılan tripsinin 3 katı kadar medyum flaska eklenerek tripsin aktivasyonu durduruldu.
- 5- Ardından flastaki medyum+tripsin+hücre karışımı 15'lik falkona aktarılıp 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
- 6- Santrifüj sonrası süpernatant dökülüp hücrelerin üzerine DMEM eklenerek hücre sayımına ve ardından deneylere geçildi.

3.5.3. MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN KARAKTERİZASYONU

Hem kordon kanı hem de Wharton jelinden elde edilen mezenkimal kök hücrelerin proliferasyonları sonrası flask yüzeyi kaplama oranı yeterli seviyeye gelince hücre sayımları gerçekleştirilip karakterizasyonu flow sitometri cihazında gerçekleştirildi ve NaviosEX software sayesinde analizleri yapıldı (24).

1) Tripsinizasyonla kaldırılan hücreler PBS ile 1 kere yıkanarak 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.

2) Yıkanan hücrelerin üzerine 1 ml PBS eklenerek sayıldı. 1ml'de yaklaşık 5 milyon hücre olacak şekilde ayarlandı.

3) Flow tüpleri aşağıdaki sıraya göre hazırlanıp etiketlendi ve gerekli tüplere hücre ve antikorları eklendi.

- a) Boyasız negatif tüpe: 100 µl hücre
- b) Negatif kontrol isotip tüpe: 100 µl hücre +20 µl antikor
- c) Negatif kokteyl tüpe: 100 µl hücre +20 µl antikor
- d) Pozitif kontrol isotip tüpe: 100 µl hücre +20 µl antikor
- e) Pozitif kokteyl isotip tüpe: 100 µl hücre +20 µl antikor
- f) IgG PE isotip tüpe: 100 µl hücre +5 µl antikor
- g) CD44 PE tüpe: 100 µl hücre +5 µl antikor

- 4) Hücre ve antikor 30 dakika karanlıkta ve +4'te inkübe edildi.
- 5) PBS ile 2 defa yıkandı, her yıkama sonrası 1900 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- 6) 500 µl PBS eklendi uygun protokolde, en az 30.000 hücre flow sitometri cihazında okutulup analiz edildi.

3.5.4. DENEY GRUBUNUN KO-KÜLTÜRLERİ

3.5.4.1. KK-MKH ile Kolorektal Kanser Hücrelerinin Kültürleri

Kolorektal kanser hücrelerinin ve KK-MKH'lerin her ikisi de plastik adherent özellikte olduğu için transwell sistem kullanarak deney kültürleri yapıldı (81).

1. Her iki kolorektal kanseri hücre hattı da KK-MKH'de deney öncesinde tripsin ile flasktan kaldırıldı.
2. Tripsinizasyon işlemi sonrasında hücrelerin canlılık tayini ve sayımları Tripan mavisi ile yapıldı.
3. Her doz oranı için 1ml'de olacak şekilde hücreler aşağıdaki gibi hazırlandı.
 - a. 1/5 için 50.000 Kolorektal Kanser Hücresi: 250.000 KK-MKH
 - b. 1/10 için 50.000 Kolorektal Kanser Hücresi: 500.000 KK-MKH ayarlandı.
4. Kontrol grubu olarak 24 kuyulu plate'in 12'sine 750 µl kanser hücresi ve 250 µl DMEM eklendi.
5. Diğer 12 kuyuya 750 µl kanser hücresi ekildi. Ardından üzerine steril transwell insert konulup 1/5 oranı olan grup için 250.000 KK-MKH, 1/10 oranı olan grup için 500.000 KK-MKH olacak şekilde 250 µl KK-MKH, transwell'lere eklendi.
6. Hücre kültürü plate'lerinin kapakları ateşten geçirilip deney gruplarına göre 24 saat ve 72 saat inkübasyon için 37°C'de % 5 CO₂ etüvde inkübasyona bırakıldı.

3.5.4.2. WJ-MKH ile Kolorektal Kanser Hücrelerinin Kültürleri

WJ-MKH ve kolorektal kanser hücrelerinin her ikisi de plastik adherent özellikte olduğu için transwell sistem kullanarak deney kültürleri yapıldı (81).

1. Her iki kolorektal kanseri hücre hattı da WJ-MKH'de deney öncesinde tripsin ile flasktan kaldırıldı.
2. Tripsinizasyon işlemi sonrasında hücrelerin canlılık tayini ve sayımları Tripan mavisi ile yapıldı.
3. Her doz oranı için 1ml'de olacak şekilde hücreler aşağıdaki gibi hazırlandı.
 - c. 1/5 için 50.000 Kolorektal Kanser Hücresi: 250.000 WJ-MKH
 - d. 1/10 için 50.000 Kolorektal Kanser Hücresi: 500.000 WJ-MKH ayarlandı.
4. Kontrol grubu olarak 24 kuyulu plate'in 12'sine 750 µl kanser hücresi ve 250 µl DMEM eklendi.
5. Diğer 12 kuyuya 750 µl kanser hücresi ekildi. Ardından üzerine steril transwell insert konulup 1/5 oranı olan grup için 250.000 WJ-MKH, 1/10 oranı olan grup için 500.000 WJ-MKH olacak şekilde 250 µl WJ-MKH, transwell'lere eklendi.
6. Hücre kültürü plate'lerinin kapakları ateşten geçirilip deney gruplarına göre 24 saat ve 72 saat inkübasyon için 37°C'de % 5 CO₂ etüvde inkübasyona bırakıldı.

3.5.5. KONTROL GRUBUNUN KO-KÜLTÜRÜ

3.5.5.1. KK-MKH ile PKMH'lerin Kültürü

KK-MKH'ler tripsinizasyonla kaldırıldıktan sonra PKMH'lerle ko-kültür sistemiyle kültürleri yapıldı (82).

1. PKMH'ler ficol paque density gradient metodu ile izole edildi.
2. PKMH ve KK-MKH'lerin canlılık tayini ve sayımları Tripan mavisi ile yapıldı.
3. Her doz oranı için 1ml'de olacak şekilde hücreler aşağıdaki gibi hazırlandı.
 - e. 1/5 için 50.000 PKMH: 250.000 KK-MKH
 - f. 1/10 için 50.000 PKMH: 500.000 KK-MKH ayarlandı.

4. Kontrol grubu olarak 24 kuyulu plate'in 12'sine 1000 µl PKMH ve 1000 µl DMEM eklendi.
5. Diğer 12 kuyuya önce 1000 µl KK-MKH ekildi. Ardından üzerine 1000 µl PKMH eklendi.
6. Hücre kültürü plate'lerinin kapakları ateşten geçirilip deney gruplarına göre 24 saat ve 72 saat inkübasyon için 37°C'de % 5 CO₂ etüvde inkübasyona bırakıldı.

3.5.5.2. WJ-MKH ile PKMH'lerin Kültürü

WJ-MKH'ler tripsinizasyonla kaldırıldıktan sonra PKMH'lerle ko-kültür sistemiyle kültürleri yapıldı (82).

1. PKMH'ler fikol paque density gradient metodu ile izole edildi.
2. PKMH ve WJ-MKH'lerin canlılık tayini ve sayımları Tripan mavisi ile yapıldı.
3. Her doz oranı için 1 ml'de olacak şekilde hücreler aşağıdaki gibi hazırlandı.
 - g. 1/5 için 50.000 PKMH: 250.000 WJ-MKH
 - h. 1/10 için 50.000 PKMH: 500.000 WJ-MKH ayarlandı.
4. Kontrol grubu olarak 24 kuyulu plate'in 12'sine 1000 µl PKMH ve 1000 µl DMEM eklendi.
5. Diğer 12 kuyuya önce 1000 µl WJ-MKH ekildi. Ardından üzerine 1000 µl PKMH eklendi.
6. Hücre kültürü plate'lerinin kapakları ateşten geçirilip deney gruplarına göre 24 saat ve 72 saat inkübasyon için 37°C'de % 5 CO₂ etüvde inkübasyona bırakıldı.

3.5.6. DENEY ve KONTROL GRUPLARININ APOPTOZ TESTLERİ

3.5.6.1. Annexin V/PI FITC Metoduyla Flow Sitometrik Testler

Deney inkübasyon süreleri sonunda deney grubunda bulunan 24 kuyucuğa yapışan kolon kanser hücreleri tripsinizasyon ile kaldırıldı.

Kit içerisinde bulunan 10X'lik olan binding buffer, deneyde kullanılacak miktar kadar 1X'lik hale getirilip stok yapıldı (83).

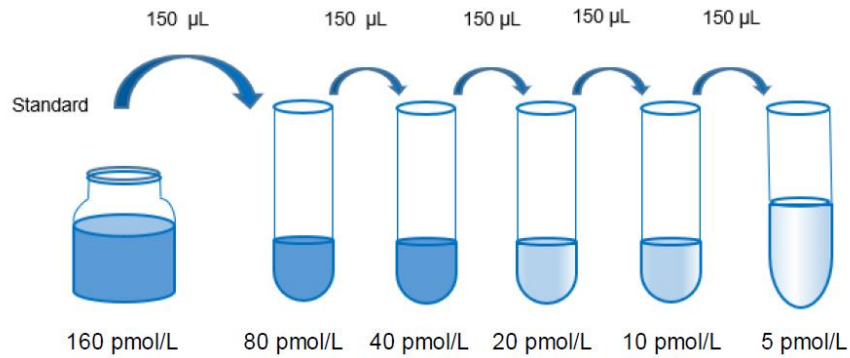
1. Hücrelerin üzerine 1000 µl PBS konarak 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
2. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı.

3. Hücre peleti üzerine 200 μ l Annexin V binding buffer eklendi.
4. Flow sitometri tüplerine etiketleme yapıldı ve her bir örnek için boyalı ve boyasız deney tüpü hazırlandı.
5. Boyalı deney tüpüne 5 μ l Annexin V ve 5 μ l PI antikorları konup üzerine 100 μ l binding buffer'la sulandırılmış hücrelerden eklendi.
6. Boyasız olan deney tüpüne yalnızca 100 μ l Annexin V binding buffer eklendi.
7. Boyalı ve boyasız deney tüpleri 15 dakika, karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edildi.
8. İnkübasyon sonrası 500 μ l Annexin V binding buffer eklenip cihazda okutuldu ve analizleri yapıldı.

3.5.6.2. ELISA ile Kaspaz-3 Protein Değerlendirmesi Testleri

Her deney öncesi ve sonrası toplanıp saklanmış olan hücre kültürü süpernatantları ELISA yönteminde kullanıldı (84). Örnekler teste geçmeden önce 20 dakika 1000 rpm'de santrifüj edildi. Testte kullanılacak olan tüm reaktifler deney öncesi oda sıcaklığına getirildi. Testlere başlamadan önce tüm solüsyon ve reaktiflerin uygun dilüsyonları hazırlandı.

1. Standart bufferı oluşturmak için 5 tüpün her birine 150 μ l standart dilüent eklendi ve üzerine 1:1 oranında stok solüsyonu ile ilk tüpe eklenip pipetaj yapıldı. Pipetaj sonrası bir sonraki tüpe 150 μ l karışımdan alınarak işlem son tüpe kadar tekrar edildi (Şekil 3-6).



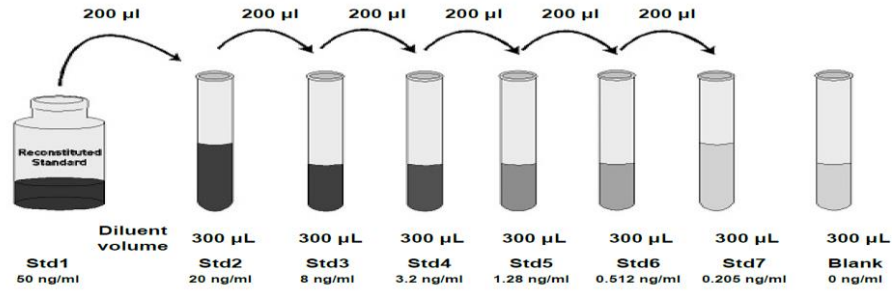
Şekil 3-6: ELISA Kaspaz-3 testleri için standart buffer dilüsyon hazırlama

2. Standart, blank ve test kuyucukları belirlendi. Standart kuyuların her birine 50 µl hazırlanmış olan standartlar eklendi.
3. Test kuyularına 40 µl sample dilüent, 10 µl örneklerden eklendi.
4. Blank kuyusuna yalnızca 50 µl sample dilüent eklendi.
5. Plate kapatıcısı ile plate kapatılıp 45 dakika 37°C’de inkübe edildi.
6. İnkübasyon sonrası her kuyu aspire edilerek 250 µl yıkama buffer kullanılarak yıkandı ve bu işlem 4 defa tekrarlanarak 5 yıkama tamamlandı.
7. Blank kuyusu hariç tüm kuyulara HRP-konjugatından 50 µl eklendi.
8. Plate kapatıcısı ile plate kapatılıp 30 dakika 37°C’de inkübe edildi.
9. Bu basamakta 6. basamaktaki yıkama işlemleri aynı şekilde gerçekleştirildi.
10. Yıkama işlemleri sonrasında her kuyuya 50 µl Kromojen A ve ardından 50 µl Kromojen B eklenip pipetajla karıştırıldı. 15 dakika 37°C’de ışıktan koruyarak karanlıkta inkübe edildi.
11. İnkübasyon bitiminde 50 µl stop solüsyonu eklenerek kuyulardaki rengin maviden sarıya dönmesi gözlemlendi.
12. Renk değişimi sonrasında 15 dakika içerisinde 450 nm’de Allsheng FlexA-200 cihazında okutuldu.

3.5.6.3. ELISA ile HTRA2/Omi Protein Değerlendirmesi Testleri

Her deney öncesi ve sonrası toplanıp saklanmış olan hücre kültürü süpernatantları ELISA yönteminde kullanıldı (85). Örnekler teste geçmeden önce 20 dakika 1000 rpm’de santrifüj edildi. Testte kullanılacak olan tüm reaktifler deney öncesi oda sıcaklığına getirildi. Testlere başlamadan önce tüm solüsyon ve reaktiflerin uygun dilüsyonları hazırlandı.

1. Standart bufferı oluşturmak için 7 tüpün her birine 300 µl dilüent D eklendi ve üzerine 1:1 oranında stok solüsyonu ile ilk tüpe eklenip pipetaj yapıldı. Pipetaj sonrası bir sonraki tüpe 300 µl karışımdan alınarak işlem son tüpe kadar tekrar edildi. Son tüpe aktarma yapılmayıp blank tüp olarak etiketlendi (Şekil 3-7).



Şekil 3-7: ELISA HTRA2/Omi testleri için standart buffer dilüsyon hazırlama

2. Standart, blank ve test kuyucukları belirlendi. Standart kuyuların her birine 100 µl hazırlanmış olan standartlar eklendi.
3. Dilüent D ile önceden 1:1 oranında seyreltilmiş örneklerden, örnek kuyularına 100 µl eklendi.
4. Kuyular plate kapatıcı ile kapatılıp 2,5 saat oda sıcaklığında çalkanarak inkübe edildi.
5. Süre dolduktan sonra süpernatant atıldı ve 1X hazırlanmış yıkama bufferı ile 4 kez yıkama gerçekleştirildi. Her yıkamada tüm kuyucuklara 300 µl yıkama bufferı kullanıldı ve yıkama sonrasında iyice aspire edildi.
6. Yıkama işleminin ardından her kuyucuğa daha önceden hazırlanmış 100 µl Biotin konjugat eklendi.
7. Oda sıcaklığında, çalkalanarak 1 saat inkübe edildi.
8. İnkübasyon süresi dolduktan sonra 5. adımdaki yıkama işlemleri tekrarlandı.
9. Her kuyucuğa 100 µl TMB substratından eklendi ve kuyucukların diplerinde mavi renk oluşumları gözlemlendi.
10. Oda sıcaklığında, karanlıkta çalkalanarak 30 dakika inkübe edildi.
11. Her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklenerek pipetaj yapıldı.
12. Kuyucuklardaki mavi rengin sarıya döndüğü gözlemlendi.
13. Renk değişimi sonrasında 30 dakika içerisinde 450 nm’de Allsheng FlexA-200 cihazında okutuldu.

3.5.7. İSTATİSTİK DEĞERLENDİRMELER

Verilerin tanımlayıcı istatistiklerinde ortalama, standart sapma, medyan değerleri kullanılmıştır. Değişkenlerin dağılımı Kolmogorov Simirnov test ile ölçüldü. Nicel bağımsız verilerin analizinde Mann-Whitney U test, bağımlı nicel verilerin analizinde Wilcoxon testi kullanıldı. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Analizlerde SPSS 28.0 programı kullanılmıştır.



4. BULGULAR

4.1. MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN KARAKTERİZASYONU

Hem kordon kanı hem de Wharton jelinden elde edilen MKH'lerin, kültür flaskındaki plastik adherent ve mikroskop altındaki fibroblastik görüntüsünün ardından uygun konfluent görüntüye gelince hücre sayımları gerçekleştirildi. Şekil 4-1'de mikroskop altındaki konfluent fibroblastik yapısı gösterilmiştir. Hücre sayımı ardından MKH karakterizasyonu, Bölüm 3.5.3'te bahsedildiği şekilde flow sitometri cihazında gerçekleştirildi.



Şekil 4-1: MKH'lerin mikroskop altındaki konfluent görüntüleri

Pasaj 3 WJ-MKH ve KK-MKH örneklerinin her biri CD45, CD73, CD90 ve CD105 ($\geq$ %95) antijenleri pozitifken, CD11b, CD19, CD34, CD45 ve HLA-DR antijenleri düşük ($\leq$ %2) eksprese etmişlerdi. MKH karakterizasyonuna ait verilerin analizi, NaviosEX software sayesinde yapıldı.

4.2. FLOW SİTOMETRİK APOPTOZ ANALİZLERİ

4.2.1. WJ-MKH'lerin Kolorektal Kanser Hücre Hatları ile PKMH'ler Üzerindeki Apoptoz Analizleri

Flow sitometri sonuçları üzerinden WJ-MKH'lerin KRK hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri karşılaştırıldığında, WJ-MKH (+) eklenmiş HCT116 /24-1-5, /24-1-10, /72-1-5, /72-1-10 ve toplam ölçümlerinde, WJ-MKH (-) eklenmemiş ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti.

Diğer kolorektal kanser hücre hattı olan HT-29 üzerine apoptotik etkilerinin flow sitometrik sonuçları analiz edildiğinde ise WJ-MKH (+) HT29 /24-1-5, /24-1-10,

/72-1-5, /72-1-10 ve toplam ölçümlerinde WJ-MKH (-) ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti.

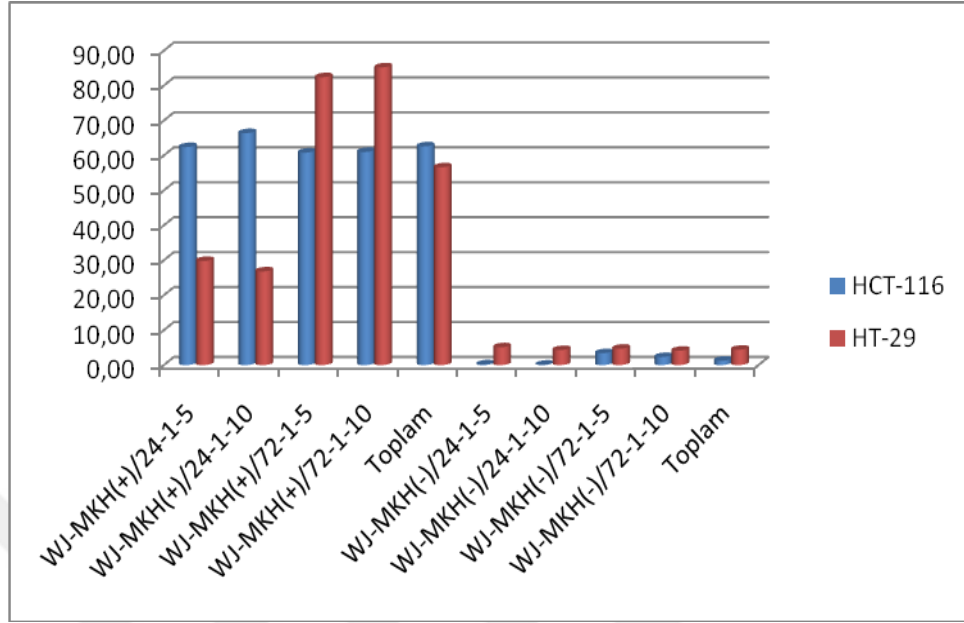
Flow sitometrik olarak WJ-MKH'nin sağlıklı bir hücre grubu olan PKMH'ler üzerindeki apoptotik etkileri analiz edildiğinde PKMH WJ-MKH (+) /24-1-5, /72-1-10 ve toplam ölçümlerinde WJ-MKH (-) ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. PKMH WJ-MKH (+) /24-1-10, /72-1-5 ölçümleri, WJ-MKH (-) ölçümlerine göre anlamlılık ($p > 0.05$) saptanamadı (Tablo 4-1).

Tablo 4-1: WJ-MKH'lerin Kolorektal Kansere Hücre Hatları ve Sağlıklı PKMH Üzerine Flow Sitometrik Apoptotik Etkisi

		Apoptoz				
		WJ-MKH (+)		WJ-MKH (-)		
		Ort.±ss	Medyan	Ort.±ss	Medyan	
HCT-116	/24-1-5	62,43 ± 0,30	62,40	0,23 ± 0,05	0,20	0,007
	/24-1-10	66,47 ± 1,99	66,40	0,13 ± 0,05	0,10	0,007
	/72-1-5	64,93 ± 8,63	60,80	3,27 ± 0,36	3,40	0,007
	/72-1-10	56,23 ± 10,46	61,00	2,30 ± 0,09	2,30	0,007
	Toplam	62,52 ± 7,66	62,60	1,48 ± 1,38	1,25	0,000
HT-29	/24-1-5	29,43 ± 3,26	29,80	4,87 ± 0,43	5,10	0,007
	/24-1-10	28,17 ± 2,13	26,80	3,93 ± 0,71	4,30	0,007
	/72-1-5	81,93 ± 1,35	82,40	4,83 ± 0,28	4,70	0,007
	/72-1-10	85,67 ± 1,35	85,20	4,13 ± 0,05	4,10	0,007
	Toplam	56,30 ± 28,00	56,60	4,44 ± 0,59	4,40	0,000
PKMH	/24-1-5	3,23 ± 0,89	3,50	1,93 ± 0,66	1,60	0,007
	/24-1-10	1,57 ± 0,13	1,60	2,03 ± 0,80	1,60	0,857
	/72-1-5	2,37 ± 0,78	2,30	1,80 ± 0,52	1,80	0,857
	/72-1-10	1,60 ± 0,38	2,40	2,40 ± 0,26	1,80	0,024
	Toplam	2,19 ± 0,91	1,95	2,04 ± 0,61	1,85	0,000

Her iki kanser hücre gruplarına WJ-MKH'nin apoptoz ölçümleri karşılaştırıldığında, HCT-116 WJ-MKH (+) /24-1-5, /24-1-10 ölçümleri HT-29 WJ-MKH (+) grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. HCT-116 WJ-MKH (+) /72-1-5, /72-1-10 deney grubunda apoptoz ölçümleri, HT-29 WJ-MKH (+) grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü. Toplam gruplarındaki karşılaştırmada bir anlamlılık bulunmadı. Diğer yandan her iki kanser hücresi grubuna MKH kaynağı eklenmeden oluşturulan kontrol grubundaki değerler karşılaştırıldığında, HCT-116 WJ-

MKH (-) /24-1-5, /24-1-10, /72-1-5, /72-1-10 ve toplam ölçümleri HT-29 grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü (Şekil 4-2).



Şekil 4-2: WJ-MKH'nin HT-29 ve HCT-116 kanser hücreleri üzerine apoptotik etkisi

4.2.2. KK-MKH'lerin Kolorektal Kanser Hücre Hatları ve PKMH'ler Üzerindeki Apoptoz Analizleri

Flow sitometri sonuçları üzerinden KK-MKH'lerin KKK hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri karşılaştırıldığında, HCT116 KK-MKH (+) /24-1-5, /24-1-10, /72-1-5, /72-1-10, **toplam** ölçümlerinde, KK-MKH (-) ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti.

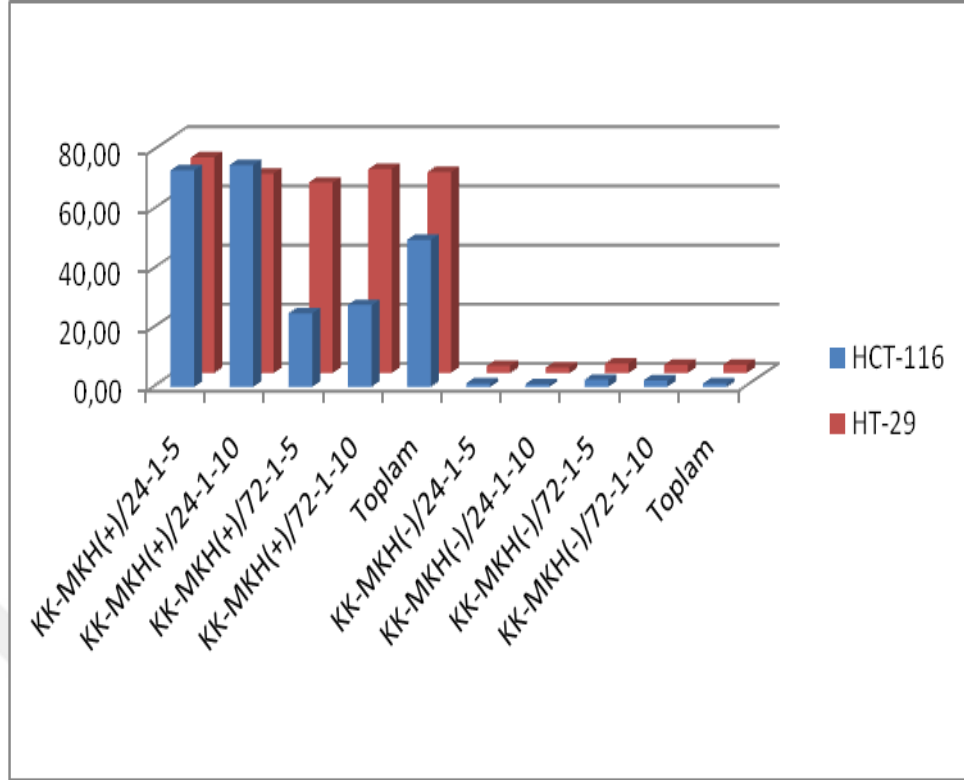
Diğer kolorektal kanser hücre hattı olan HT-29 üzerine apoptotik etkilerinin flow sitometrik sonuçları analiz edildiğinde ise HT29 KKMSC (+) /24-1-5, /24-1-10, /72-1-5, /72-1-10, **toplam** ölçümlerinde, KK-MKH (-) ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti.

Flow sitometrik olarak KK-MKH'nin sağlıklı bir hücre grubu olan PKMH'ler üzerindeki apoptotik etkileri analiz edildiğinde PKMH KKMSC (+) /24-1-5, /24-1-10, /72-1-5, /72-1-10, **toplam** ölçümlerinde, KK-MKH (-) ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti (Tablo 4-2).

Tablo 4-2:KK-MKH'lerin Kolorektal Kanser Hücre Hatları ve Sağlıklı PKMH Üzerine Flow Sitometrik Apototik Etkisi

		Apoptoz				
		KK-MKH (+)		KK-MKH (-)		p
		Ort.±ss	Medyan	Ort.±ss	Medyan	
HCT-116	/24-1-5	71,43 ± 2,88	73,20	1,20 ± 0,17	1,20	0,007
	/24-1-10	73,77 ± 2,00	75,00	0,93 ± 0,13	0,90	0,007
	/72-1-5	25,10 ± 1,48	24,90	2,07 ± 1,07	2,40	0,007
	/72-1-10	28,13 ± 3,09	27,70	1,67 ± 0,88	2,20	0,007
	Toplam	49,61 ± 23,48	49,75	1,47 ± 0,80	1,15	0,000
HT-29	/24-1-5	74,47 ± 6,30	72,90	2,93 ± 1,78	2,40	0,007
	/24-1-10	61,27 ± 9,50	67,40	2,33 ± 1,55	1,90	0,007
	/72-1-5	66,30 ± 7,37	64,40	3,53 ± 0,82	3,20	0,007
	/72-1-10	63,17 ± 9,28	69,00	3,10 ± 0,77	2,80	0,007
	Toplam	66,30 ± 9,38	67,95	2,98 ± 1,32	2,80	0,000
PKMH	/24-1-5	1,10 ± 0,23	1,20	0,30 ± 0,09	0,30	0,006
	/24-1-10	1,40 ± 0,69	1,40	0,13 ± 0,05	0,10	0,007
	/72-1-5	1,90 ± 0,53	2,20	0,17 ± 0,05	0,20	0,006
	/72-1-10	2,17 ± 1,06	1,90	0,17 ± 0,10	0,10	0,002
	Toplam	1,64 ± 0,79	1,35	0,19 ± 0,10	0,20	0,000

Kordon kanı kaynaklı MKH'lerin kanser hatları üzerine apoptotik etkileri karşılaştırıldığında ise HCT-116 KK-MKH (+) /**24-1-10** ölçümleri HT-29 KK-MKH (+) grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. HCT-116 KK-MKH (+) /**72-1-5**, /**72-1-10** deney gruplarında apoptoz ölçümleri HT-29 grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü. HCT-116 KK-MKH (+) /**24-1-5** ve **toplam** grubunda ölçümleri HT-29 grubundan anlamlılık ($p > 0.05$) saptanamadı. Diğer yandan her iki kanser hücresi grubuna MKH kaynağı eklenmeden oluşturulan kontrol grubundaki değerler karşılaştırıldığında, HCT-116 KK-MKH (-) /**24-1-5**, /**72-1-5**, /**72-1-10** ve **toplam** deney gruplarının ölçümleri HT-29 grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü. HCT-116 KK-MKH (-) /**24-1-10** ölçümleri HT-29 grubuna göre anlamlılık ($p > 0.05$) saptanamadı (Şekil 4-3).



Şekil 4-3:KK-MKH'nin HT-29 ve HCT-116 kanser hücreleri üzerine apoptotik etkisi

4.2.3. WJ-MKH ve KK-MKH'lerin Kolorektal Kanser ve PKMH'ler Üzerindeki Apoptoz Analizleri

Farklı MKH kaynaklarının, HCT-116 KKK hücrelerinin deney analizi yapıldığında, KK-MKH (+) grubunda HCT-116 /24-1-5, /24-1-10 deney grubu WJ-MKH (+) deney grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. KK-MKH (+) grubunda HCT-116 /72-1-5, /72-1-10 ve toplam WJ-MKH (+) grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü.

Diğer KKK hattı HT-29 için, KK-MKH (+) HT29 /24-1-5, /24-1-10 ve toplam gruplarında WJ-MKH (+) grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. KK-MKH (+) grubunda HT-29 /72-1-5, /72-1-10 WJ-MKH (+) grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü.

Sağlıklı hücre hattı olarak PKMH kontrol grubunun deneylerinin analizi yapıldığında, KK-MKH (+) grubunda PKMH /24-1-5, /24-1-10, /72-1-5, /72-1-10 ve toplam WJMSC (+) grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü (Tablo 4-3).

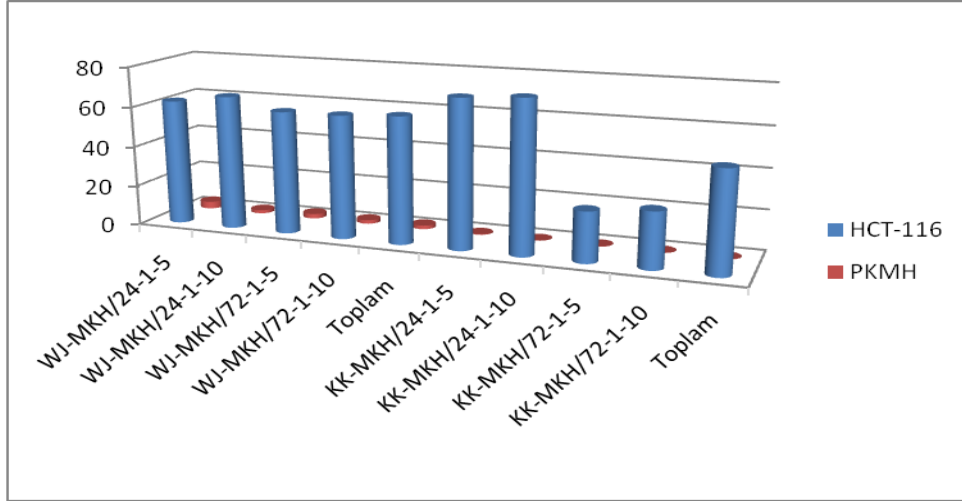
Tablo 4-3: WJ-MKH ve KK-MKH'lerin Kolorektal Kansere Hücresi ve Sağlıklı PKMH Üzerindeki Flow Sitometrik Apoptotik Etkisi

		Apoptoz					
		WJ-MKH (+)		KK-MKH (+)		p	
		Ort.±ss	Medyan	Ort.±ss	Medyan		
HCT-116	/24-1-5	62,43 ± 0,30	62,40	71,43 ± 2,88	73,20	0,000	
	/24-1-10	66,47 ± 1,99	66,40	73,77 ± 2,00	75,00	0,000	
	/72-1-5	64,93 ± 8,63	60,80	25,10 ± 1,48	24,90	0,000	
	/72-1-10	56,23 ± 10,46	61,00	28,13 ± 3,09	27,70	0,000	
	Toplam	62,52 ± 7,66	62,60	49,61 ± 23,48	49,75	0,000	
HT-29	/24-1-5	29,43 ± 3,26	29,80	74,47 ± 6,30	72,90	0,000	
	/24-1-10	28,17 ± 2,13	26,80	61,27 ± 9,50	67,40	0,000	
	/72-1-5	81,93 ± 1,35	82,40	66,30 ± 7,37	64,40	0,000	
	/72-1-10	85,67 ± 1,35	85,20	63,17 ± 9,28	69,00	0,000	
	Toplam	56,30 ± 28,00	56,60	66,30 ± 9,38	67,95	0,000	
PKMH	/24-1-5	3,23 ± 0,89	3,50	0,30 ± 0,09	0,30	0,000	
	/24-1-10	1,57 ± 0,13	1,60	0,13 ± 0,05	0,10	0,000	
	/72-1-5	2,37 ± 0,78	2,30	0,17 ± 0,05	0,20	0,000	
	/72-1-10	1,60 ± 0,38	1,80	0,17 ± 0,10	0,10	0,000	
	Toplam	2,19 ± 0,91	1,85	0,19 ± 0,10	0,20	0,000	

4.2.4. WJ-MKH ile KK-MKH'nin HCT-116 Kanser Hücreleri ve Sağlıklı PKMH'ler Üzerindeki Apoptoz Analizleri

Farklı iki MKH kaynağının HCT-116 kanser hücreleri ve sağlıklı PKMH hücrelerinin apoptotik değerlerinin analizi kıyaslandığında, WJ-MKH (+) /24-1-5, /24-1-10, /72-1-5, /72-1-10 ve toplam gruplarında ölçümleri PKMH kontrol grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti.

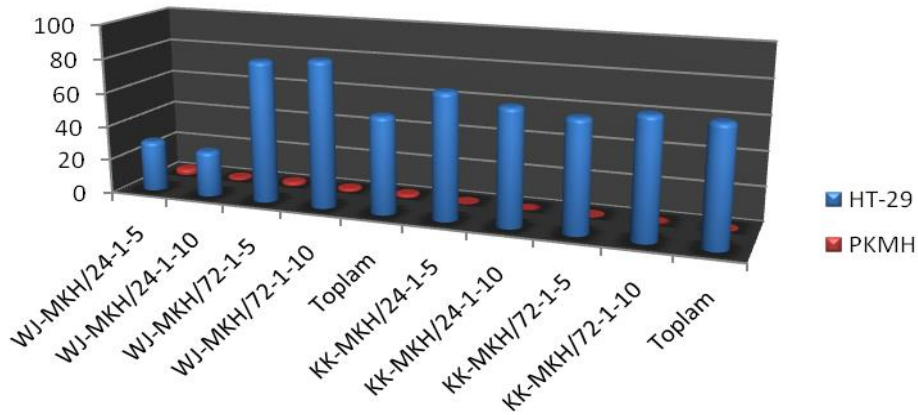
Diğer yandan, KK-MKH (+) HCT-116 /24-1-5, /24-1-10, /72-1-5, /72-1-10 ve toplam gruplarında ölçümlerin apoptoz sonuçları PKMH grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti (Şekil 4-4).



Şekil 4-4: WJ-MKH ve KK-MKH'lerin HCT-116 deney grubu ile PKMH kontrol grubu üzerindeki apoptotik etkilerinin karşılaştırılması

4.2.5. WJ-MKH ile KK-MKH'nin HT-29 Kanser Hücreleri ve Sağlıklı PKMH'ler Üzerindeki Apoptoz Analizleri

Farklı iki MKH kaynağının HT-29 kanser hücreleri ve sağlıklı PKMH hücrelerinin apoptotik değerlerinin analizi kıyaslandığında, WJ-MKH (+) HT-29 /24-1-5, /24-1-10, /72-1-5, /72-1-10 ve **toplam** gruplarının ölçümleri PKMH grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. Diğer yandan, HT-29 grubunda KK-MKH (+) /24-1-5, /24-1-10, /72-1-5, /72-1-10 ve **toplam** gruplarındaki ölçümleri PKMH kontrol grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti (Şekil 4-5).



Şekil 4-5: WJ-MKH ve KK-MKH'lerin HT-29 deney grubu ile PKMH kontrol grubu üzerindeki apoptotik etkilerinin karşılaştırılması

4.3. ELISA KASPAZ-3 PROTEİN DEĞİŞİMLERİNİN ANALİZİ

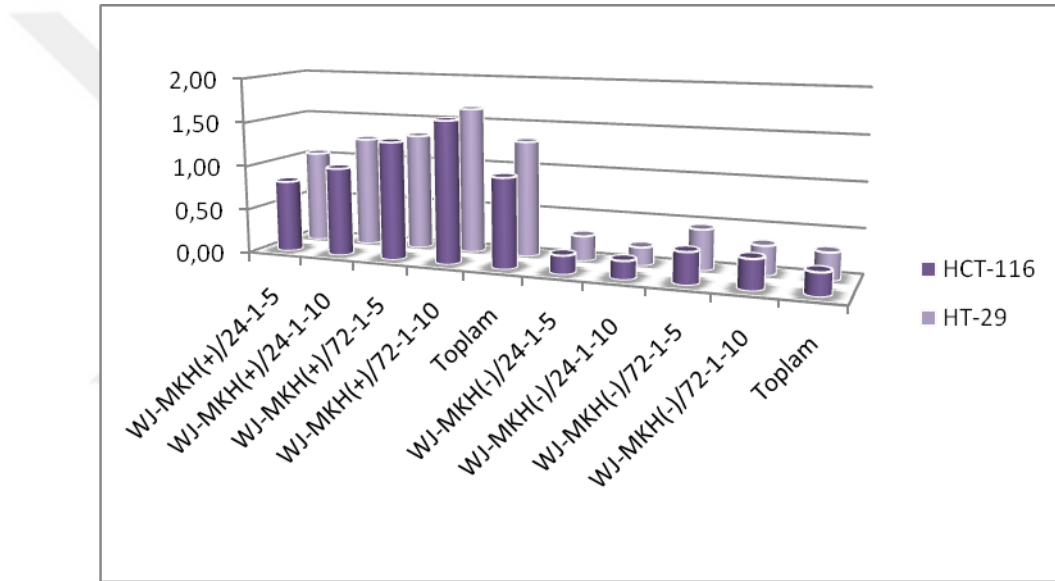
4.3.1. WJ-MKH'lerin Kolorektal Kanser Hücre Hatları ile PKMH'ler Üzerindeki Kaspaz-3 Analizleri

Kaspaz bağımlı apoptotik yolların değerlendirmesinde ELISA kaspaz-3 protein değişimi üzerinden analizler yapıldı. WJ-MKH'lerin KRK hücreleri ve sağlıklı PKMH üzerindeki kaspaz-3 protein değişimi karşılaştırıldığında, HCT-116 WJ-MKH (+) /24-1-5, /24-1-10, /72-1-5, /72-1-10 ve toplam deney grupları kaspaz-3 değişimi WJ-MKH (-) ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. Diğer kolorektal kanser hücrelerinden elde edilen deney grubunda ise HT-29 WJ-MKH (+) /24-1-5, /24-1-10, /72-1-5, /72-1-10 ve toplam deney gruplarının ölçümlerinde kaspaz-3 değişimi, WJ-MKH (-) grupları ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. Kontrol grubu olan PKMH'nin kaspaz-3'ün protein değişim analizleri değerlendirildiğinde, PKMH WJ-MKH (+) /24-1-5, /24-1-10, /72-1-5, /72-1-10 ve toplam grubu ölçümlerinde kaspaz-3 değişimi, WJ-MKH (-) ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti (Tablo 4-4).

Tablo 4-4:WJ-MKH'lerin Kolorektal Kanser Hücre Hatları ve Sağlıklı PKMH Üzerindeki ELISA Kaspaz-3 Değişimleri

		Kaspaz-3 Değişimi				
		WJ-MKH (+)		WJ-MKH (-)		p
		Ort.±ss	Medyan	Ort.±ss	Medyan	
HCT-116	/24-1-5	0,81 ± 0,01	0,81	0,21 ± 0,01	0,21	0,006
	/24-1-10	1,00 ± 0,01	1,00	0,21 ± 0,01	0,21	0,007
	/72-1-5	1,03 ± 0,60	1,33	0,36 ± 0,05	0,36	0,048
	/72-1-10	1,55 ± 0,08	1,60	0,35 ± 0,05	0,34	0,007
	Toplam	1,10 ± 0,40	1,01	0,28 ± 0,08	0,26	0,000
HT-29	/24-1-5	1,04 ± 0,23	1,05	0,34 ± 0,13	0,28	0,007
	/24-1-10	1,24 ± 0,10	1,25	0,19 ± 0,08	0,21	0,007
	/72-1-5	1,28 ± 0,06	1,32	0,42 ± 0,06	0,46	0,006
	/72-1-10	1,63 ± 0,05	1,65	0,32 ± 0,02	0,33	0,007
	Toplam	1,30 ± 0,25	1,31	0,32 ± 0,12	0,31	0,000
PKMH	/24-1-5	0,24 ± 0,01	0,24	0,13 ± 0,00	0,13	0,007
	/24-1-10	0,18 ± 0,05	0,21	0,08 ± 0,05	0,11	0,007
	/72-1-5	0,30 ± 0,01	0,30	0,13 ± 0,00	0,13	0,007
	/72-1-10	0,31 ± 0,04	0,31	0,12 ± 0,00	0,12	0,024
	Toplam	0,26 ± 0,06	0,26	0,12 ± 0,03	0,12	0,000

Yalnızca deney grupları olan KKK hücre hatları ile MKH kaynaklarının kaspaz-3 değişimleri değerlendirildiğinde, HCT-116 WJ-MKH (+) /24-1-10, /72-1-10 ve **toplam** gruplarında kaspaz-3 değişimi ölçümleri, HT29 grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü. HCT-116 WJ-MKH (+) /24-1-5, /72-1-5 gruplarında kaspaz-3 ölçümleri, HT-29 grubuna göre anlamlılık ($p > 0.05$) saptanamadı. Diğer yandan MKH eklenmeyen kontrol grupları değerlendirildiğinde ise HCT-116 WJ-MKH (-) /24-1-5, /72-1-5 ve /72-1-10 kaspaz-3 ölçümleri, HT-29 grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü. HCT-116 WJ-MKH (-) /24-1-10 ve **toplam grubu değerleri**, HT-29 grubuna göre anlamlılık ($p > 0.05$) saptanamadı (Şekil 4-6).



Şekil 4-6:WJ-MKH'nin HT-29 ve HCT-116 kanser hücreleri üzerine kaspaz-3 değişimi

4.3.2. KK-MKH'lerin Kolorektal Kanser Hücre Hatları ve PKMH'ler Üzerindeki Kaspaz-3 Değişimi Analizleri

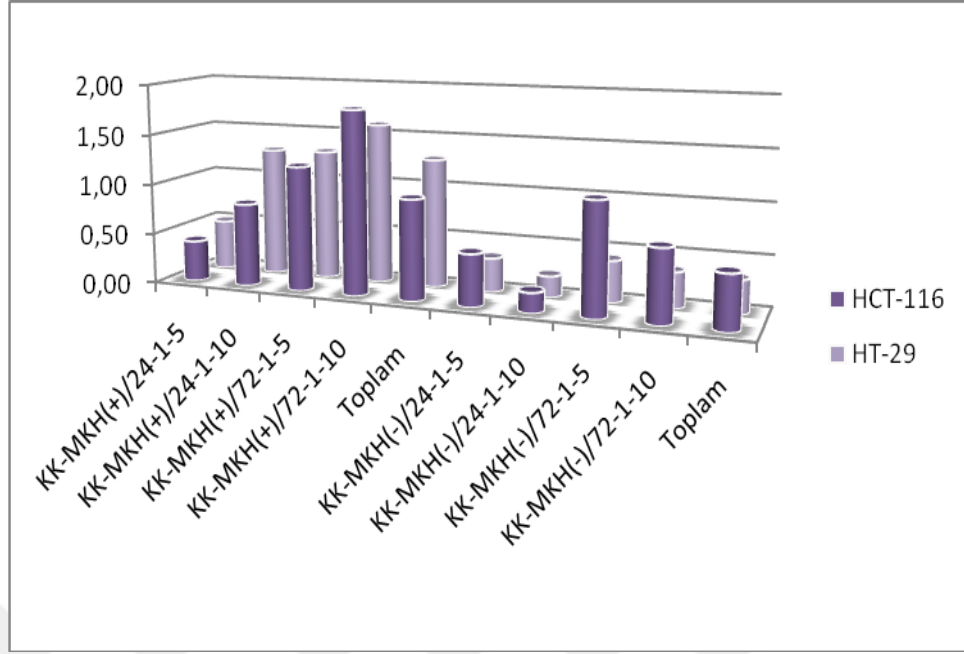
Kaspaz-3'ün KK-MKH ile yapılmış deney ve kontrol grubularının bulgularının analizi yapıldığında ise HCT-116 KK-MKH (+) /24-1-5 ölçümlerinde kaspaz-3 değişimi, KK-MKH (-) ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü. HCT-116 KK-MKH (+) /24-1-10 , /72-1-5, /72-1-10 ve **toplam** ölçümlerinde kaspaz-3 değişimi, KK-MKH (-) ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. Diğer kanser hattı değerlendirildiğinde HT-29 KK-MKH (+) /24-1-5, /24-1-10 , /72-1-5, /72-1-10 ve **toplam** ölçümlerinde kaspaz-3 değişimi, KK-MKH (-) ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$)

olarak daha yüksekti. PKMH KK-MKH (+) /24-1-5, /24-1-10 , /72-1-5, /72-1-10 ve **toplam** kontrol gruplarının ölçümlerinde ELISA kaspaz-3 değişimi, KK-MKH (-) ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti (Tablo 4-5).

Tablo 4-5:KK-MKH'lerin Kolorektal Kansere Hücresel Hatları ve Sağlıklı PKMH Üzerindeki ELISA Kaspaz-3 Değişimi

		Kaspaz-3 Değişimi				
		KK-MKH (+)		KK-MKH (-)		p
		Ort.±ss	Medyan	Ort.±ss	Medyan	
HCT-116	/24-1-5	0,41 ± 0,01	0,41	0,49 ± 0,07	0,51	0,048
	/24-1-10	0,83 ± 0,09	0,82	0,20 ± 0,00	0,20	0,007
	/72-1-5	1,19 ± 0,11	1,23	1,07 ± 0,13	1,10	0,007
	/72-1-10	1,80 ± 0,11	1,81	0,67 ± 0,13	0,71	0,007
	Toplam	1,06 ± 0,53	0,99	0,61 ± 0,34	0,53	0,000
HT-29	/24-1-5	0,50 ± 0,00	0,50	0,34 ± 0,01	0,34	0,007
	/24-1-10	1,28 ± 0,01	1,28	0,21 ± 0,00	0,21	0,007
	/72-1-5	1,28 ± 0,13	1,30	0,40 ± 0,17	0,41	0,007
	/72-1-10	1,51 ± 0,22	1,60	0,37 ± 0,11	0,35	0,007
	Toplam	1,14 ± 0,41	1,28	0,33 ± 0,12	0,33	0,000
PKMH	/24-1-5	0,22 ± 0,03	0,21	0,12 ± 0,00	0,12	0,007
	/24-1-10	0,22 ± 0,01	0,21	0,11 ± 0,00	0,11	0,007
	/72-1-5	0,31 ± 0,07	0,29	0,10 ± 0,05	0,13	0,007
	/72-1-10	0,29 ± 0,05	0,27	0,09 ± 0,05	0,12	0,002
	Toplam	0,26 ± 0,06	0,23	0,11 ± 0,04	0,12	0,000

Kaspaz-3 değişiminin KKK hücreleri üzerindeki KK-MKH'nin etkileri değerlendirildi. HCT-116 KK-MKH (+) /24-1-5, /24-1-10, **toplam gruplarında** kaspaz-3 ölçümleri, HT-29 grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü ve HCT-116 KK-MKH (+) /72-1-10 grubunda HT-29 grubuna göre anlamlı ($p < 0.05$) olarak yüksek saptandı. HCT-116 KK-MKH (+) /72-1-5 kaspaz-3 ölçümleri HT-29 grubuna göre anlamlılık ($p > 0.05$) saptanamadı. Aynı koşullarda MKH eklenmeyen kontrol grupları değerlendirildiğinde ise HCT-116 KK-MKH (-) /24-1-5, /72-1-5, /72-1-10 ve **toplam** kaspaz-3 değişim ölçümleri HT-29 grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. HCT-116 KK-MKH (-) /24-1-10 grubunda ELISA kaspaz-3 ölçümleri ise HT-29 grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü (Şekil 4-7).



Şekil 4-7:KK-MKH'nin HT-29 ve HCT-116 kanser hücreleri üzerine kaspaz-3 değişimi

4.3.3. WJ-MKH ve KK-MKH'lerin Kolorektal Kanser ve PKMH'ler Üzerindeki Kaspaz-3 Değişimi Analizleri

Farklı iki MKH'nin, her iki kanser hücresinde ve sağlıklı PKMH'ler üzerindeki kaspaz-3 değişimlerinin bulguları da analiz edildi. HCT-116 KK-MKH (+) /24-1-5 ve /24-1-10 kaspaz-3 ölçümü, WJ-MKH (+) grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü. HCT-116 KK-MKH (+) /72-1-10 kaspaz-3 değişimi, WJ-MKH (+) grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. HCT-116 KK-MKH (+) /72-1-5 ve toplam grubundan kaspaz-3 ölçümü, WJ-MKH (+) grubundan anlamlılık ($p > 0.05$) saptanmadı.

Diğer yandan HT-29 KK-MKH (+) /24-1-5 ölçümlerinde kaspaz-3 ölçümleri, WJ-MKH (+) grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü. HT-29 KK-MKH (+) /24-1-10, /72-1-5, /72-1-10 ve toplam grupları ölçümlerinde kaspaz-3 değişimi, WJ-MKH (+) grubuna göre anlamlılık ($p > 0.05$) saptanamadı.

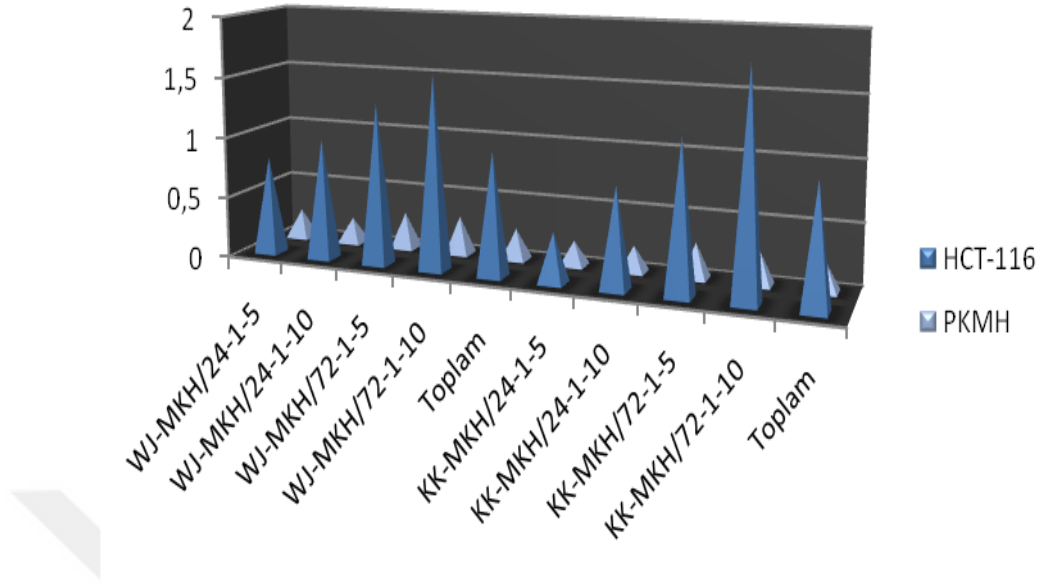
Kontrol grubu olan PKMH KK-MKH (+) /24-1-5, /24-1-10 , /72-1-5, /72-1-10 ve toplam gruplarının ölçümlerinde kaspaz-3 değişimi, WJ-MKH (+) grubuna göre anlamlılık ($p > 0.05$) saptanamadı (Tablo 4-6).

Tablo 4-6: WJ-MKH ve KK-MKH'lerin Kolorektal Kansere Hücreleri ve Sağlıklı PKMH Üzerindeki ELISA Kaspaz-3 Değişimleri

		Kaspaz-3 Değişimi				
		WJ-MKH (+)		KK-MKH (+)		p
		Ort.±ss	Medyan	Ort.±ss	Medyan	
HCT-116	/24-1-5	0,81 ± 0,01	0,81	0,41 ± 0,01	0,41	0,000
	/24-1-10	1,00 ± 0,01	1,00	0,83 ± 0,09	0,82	0,000
	/72-1-5	1,03 ± 0,60	1,33	1,19 ± 0,11	1,23	0,227
	/72-1-10	1,55 ± 0,08	1,60	1,80 ± 0,11	1,81	0,000
	Toplam	1,10 ± 0,40	1,01	1,06 ± 0,53	0,99	0,761
HT-29	/24-1-5	1,04 ± 0,23	1,05	0,50 ± 0,00	0,50	0,000
	/24-1-10	1,24 ± 0,10	1,25	1,28 ± 0,01	1,28	0,227
	/72-1-5	1,28 ± 0,06	1,32	1,28 ± 0,13	1,30	0,687
	/72-1-10	1,63 ± 0,05	1,65	1,51 ± 0,22	1,60	0,687
	Toplam	1,30 ± 0,25	1,31	1,14 ± 0,41	1,28	0,128
PKMH	/24-1-5	0,24 ± 0,01	0,24	0,22 ± 0,03	0,21	0,227
	/24-1-10	0,18 ± 0,05	0,21	0,22 ± 0,01	0,21	0,102
	/72-1-5	0,30 ± 0,01	0,30	0,31 ± 0,07	0,29	0,414
	/72-1-10	0,31 ± 0,04	0,31	0,29 ± 0,05	0,27	0,414
	Toplam	0,26 ± 0,06	0,26	0,26 ± 0,06	0,23	0,335

4.3.4. WJ-MKH ile KK-MKH'nin HCT-116 Kansere Hücreleri ve Sağlıklı PKMH'ler Üzerindeki Kaspaz-3 Değişimi Analizleri

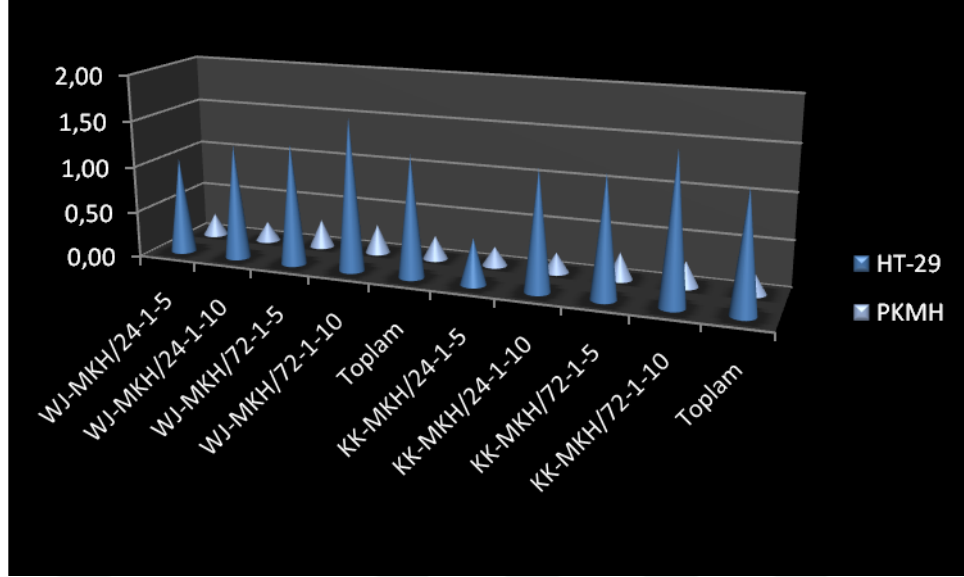
Deney gruplarından HCT-116 ile aynı koşullarda oluşturulmuş PKMH kontrol gruplarının verileri de karşılaştırıldı. HCT-116 WJ-MKH (+) /24-1-5, /24-1-10, /72-1-5, /72-1-10 ve toplam gruplarındaki kaspaz-3 değişimleri ise PKMH grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. HCT-116 KK-MKH (+) /24-1-5, /24-1-10, /72-1-5, /72-1-10 ve toplam gruplarında kaspaz-3 ölçümleri, PKMH grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti (Şekil 4-8).



Şekil 4-8:WJ-MKH ve KK-MKH'lerin HCT-116 deney grubu ile PKMH kontrol grubu üzerindeki kaspaz-3 değişimlerinin karşılaştırılması

4.3.5. WJ-MKH ile KK-MKH'nin HT-29 Kanser Hücreleri ve Sağlıklı PKMH'ler Üzerindeki Kaspaz-3 Değişimi Analizleri

Deney gruplarından HT-29 ile aynı koşullarda oluşturulmuş PKMH kontrol gruplarının verileri de karşılaştırıldı. HT-29 WJ-MKH (+) /24-1-5, /24-1-10, /72-1-5, /72-1-10 ve **toplam** gruplarının kaspaz-3 değişimi ölçümleri, PKMH grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. HT-29 KK-MKH (+) /24-1-5, /24-1-10, /72-1-5, /72-1-10 ve **toplam** gruplarının kaspaz-3 ölçümleri, PKMH grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti (Şekil 4-9).



Şekil 4-9: WJ-MKH ve KK-MKH'lerin HT-29 deney grubu ile PKMH kontrol grubu üzerindeki kaspaz-3 değişimlerinin karşılaştırılması

4.4. ELISA HTRA2/Omi PROTEİN DEĞİŞİMLERİNİN ANALİZİ

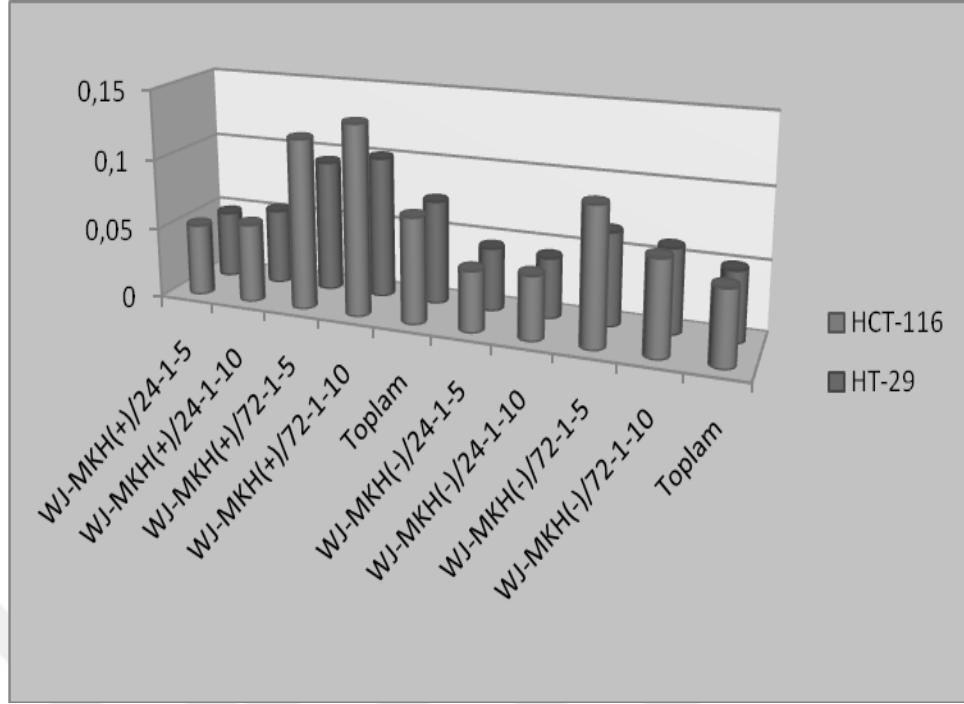
4.4.1. WJ-MKH'lerin Kolorektal Kanser Hücre Hatları ile PKMH'ler Üzerindeki HTRA2/Omi Değişim Analizleri

Kolorektal kanser hücre hatları ile sağlıklı PKMH'lerle yapılan deney gruplarında WJ-MKH'nin HTRA2/Omi protein değişimlerinin analizi de gerçekleştirildi. HCT-116 WJ-MKH (+) /24-1-5, /24-1-10 , /72-1-10 ve toplam gruplarının HTRA2/Omi ölçümlerinde, WJ-MKH (-) ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. HCT-116 WJ-MKH (+) /72-1-5 HTRA2/Omi değişimi, WJ-MKH (-) ölçümlerine göre anlamlılık ($p > 0.05$) saptanamadı. HT-29 WJ-MKH (+) /72-1-5, /72-1-10 ve toplam ölçümlerinde HTRA2/Omi, WJ-MKH (-) ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. HT-29 WJ-MKH (+) /24-1-5 ve /24-1-10 ölçümlerinde HTRA2/Omi değişimi, WJ-MKH (-) ölçümlerine göre anlamlılık ($p > 0.05$) saptanamadı. Sağlıklı PKMH WJ-MKH (+) /24-1-10 , /72-1-5, /72-1-10 ve toplam ölçümlerinde HTRA2/Omi değişimi, WJ-MKH (-) ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. PKMH WJ-MKH (+) /24-1-5 ölçümlerinde HTRA2/Omi değişimi, WJ-MKH (-) ölçümlerine göre anlamlılık ($p > 0.05$) saptanamadı (Tablo 4-7).

Tablo 4-7:WJ-MKH'lerin Kolorektal Kanser Hücre Hatları ve Sağlıklı PKMH Üzerine ELISA HTRA2/Omi Değişimi Etkisi

		HTRA2/Omi Değişimi				p
		WJ-MKH (+)		WJ-MKH (-)		
		Ort.±ss	Medyan	Ort.±ss	Medyan	
HCT-116	/24-1-5	0,054 ± 0,005	0,051	0,043 ± 0,003	0,043	0,007
	/24-1-10	0,055 ± 0,005	0,056	0,044 ± 0,003	0,045	0,007
	/72-1-5	0,114 ± 0,019	0,121	0,093 ± 0,028	0,097	0,141
	/72-1-10	0,124 ± 0,023	0,135	0,069 ± 0,009	0,067	0,007
	Toplam	0,087 ± 0,036	0,075	0,062 ± 0,025	0,053	0,000
HT-29	/24-1-5	0,050 ± 0,008	0,048	0,045 ± 0,005	0,045	0,369
	/24-1-10	0,054 ± 0,004	0,054	0,158 ± 0,182	0,043	0,857
	/72-1-5	0,093 ± 0,005	0,094	0,062 ± 0,010	0,066	0,007
	/72-1-10	0,100 ± 0,001	0,101	0,056 ± 0,007	0,060	0,007
	Toplam	0,074 ± 0,023	0,074	0,080 ± 0,098	0,050	0,000
PKMH	/24-1-5	0,059 ± 0,001	0,060	0,059 ± 0,002	0,060	0,335
	/24-1-10	0,203 ± 0,223	0,060	0,052 ± 0,002	0,052	0,048
	/72-1-5	0,073 ± 0,005	0,070	0,067 ± 0,002	0,067	0,024
	/72-1-10	0,064 ± 0,002	0,064	0,056 ± 0,005	0,058	0,024
	Toplam	0,100 ± 0,123	0,063	0,059 ± 0,006	0,059	0,000

Yalnızca deney grupları olan KKK hücre hatları ile WJ-MKH kaynağının HTRA2/Omi değişimleri değerlendirildiğinde, HCT-116 WJ-MKH (+) **/72-1-5, /72-1-10** HTRA2/Omi ölçümleri, HT-29 grubundan anlamlı ($p<0.05$) olarak daha yüksekti. HCT-116 WJ-MKH (+) **/24-1-5, /24-1-10** HTRA2/Omi değişimi ölçümleri, HT-29 grubuna göre anlamlılık ($p>0.05$) saptanamadı. HCT-116 WJ-MKH (-) **/72-1-5** HTRA2/Omi değişimi ölçümleri, HT-29 grubundan anlamlı ($p<0.05$) olarak daha yüksekti. HCT-116 WJ-MKH (-) **/24-1-5, /24-1-10, /72-1-10 ve toplam** HTRA2/Omi değişimi ölçümleri, HT-29 grubuna göre anlamlılık ($p>0.05$) saptanamadı (Şekil 4-10).



Şekil 4-10:WJ-MKH'nin HT-29 ve HCT-116 kanser hücreleri üzerine HTRA2/Omi değişimi etkisi

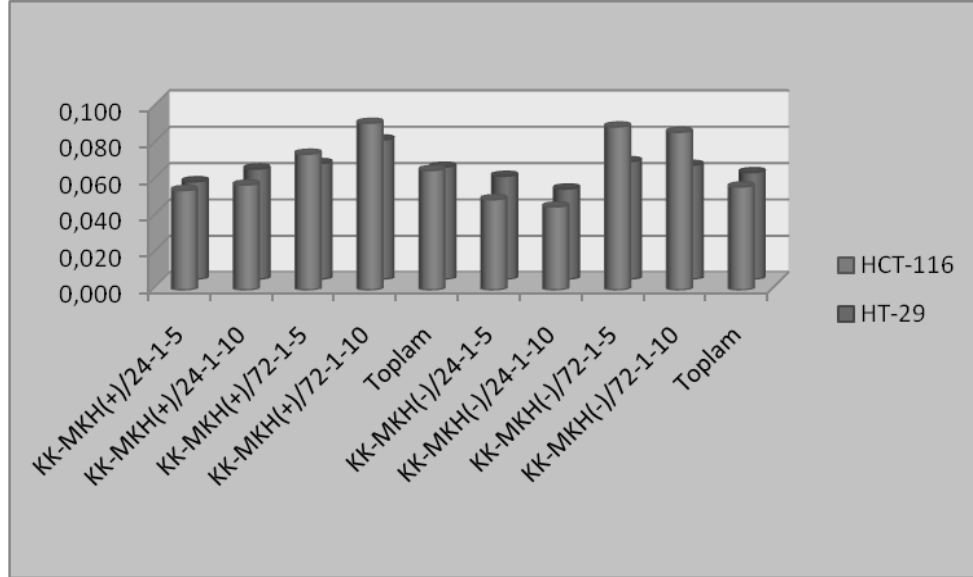
4.4.2. KK-MKH'lerin Kolorektal Kanser Hücre Hatları ile PKMH'ler Üzerindeki HTRA2/Omi Değişim Analizleri

Çalışmada KRK hücre hatları ile sağlıklı PKMH'lerle yapılan deney gruplarında KK-MKH'nin HTRA2/Omi protein değişimlerinin analizi de gerçekleştirildi. HCT-116 KK-MKH (+) /24-1-5, /24-1-10, /72-1-10 ve toplam ölçümlerinde, HTRA2/Omi değişimi KK-MKH (-) ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. HCT-116 KK-MKH (+) /72-1-5 ölçümlerinde HTRA2/Omi değişimi, KK-MKH (-) ölçümleriyle karşılaştırıldığında anlamlılık ($p > 0.05$) saptanamadı. HT-29 KK-MKH (+) /24-1-10, /72-1-10 ve toplam ölçümlerinde HTRA2/Omi değişimi, KK-MKH (-) ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. HT-29 KK-MKH (+) /72-1-5 ölçümlerinde HTRA2/Omi değişimi, KK-MKH (-) ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü. HT-29 KK-MKH (+) /24-1-5 ölçümlerinde HTRA2/Omi değişimi, KK-MKH (-) ölçümlerine göre anlamlılık ($p > 0.05$) saptanamadı. PKMH KK-MKH (+) /24-1-5, /24-1-10, /72-1-5, /72-1-10, toplam ölçümlerinde HTRA2/Omi değişimi, KK-MKH (-) ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti (Tablo 4-8).

Tablo 4-8:KK-MKH'lerin Kolorektal Kanser Hücre Hatları ve Sağlıklı PKMH Üzerine ELISA HTRA2/Omi Değişimi Etkileri

		HTRA2/Omi Değişimi				
		KK-MKH (+)		KK-MKH (-)		p
		Ort.±ss	Medyan	Ort.±ss	Medyan	
HCT-116	/24-1-5	0,057 ± 0,003	0,055	0,051 ± 0,002	0,050	0,006
	/24-1-10	0,057 ± 0,012	0,058	0,046 ± 0,003	0,046	0,048
	/72-1-5	0,072 ± 0,010	0,075	0,084 ± 0,013	0,090	0,141
	/72-1-10	0,091 ± 0,003	0,092	0,079 ± 0,014	0,087	0,048
	Toplam	0,069 ± 0,016	0,066	0,065 ± 0,019	0,057	0,000
HT-29	/24-1-5	0,054 ± 0,001	0,054	0,056 ± 0,004	0,057	0,369
	/24-1-10	0,061 ± 0,002	0,061	0,050 ± 0,001	0,050	0,007
	/72-1-5	0,064 ± 0,003	0,064	0,067 ± 0,007	0,065	0,024
	/72-1-10	0,076 ± 0,008	0,077	0,060 ± 0,008	0,063	0,007
	Toplam	0,064 ± 0,009	0,062	0,058 ± 0,008	0,059	0,004
PKMH	/24-1-5	0,086 ± 0,007	0,084	0,063 ± 0,005	0,060	0,007
	/24-1-10	0,081 ± 0,008	0,083	0,057 ± 0,006	0,057	0,007
	/72-1-5	0,083 ± 0,001	0,083	0,068 ± 0,004	0,068	0,007
	/72-1-10	0,314 ± 0,357	0,080	0,057 ± 0,005	0,059	0,002
	Toplam	0,141 ± 0,199	0,083	0,061 ± 0,007	0,061	0,000

Yalnızca deney grupları olan KKK hücre hatları ile KK-MKH kaynağının HTRA2/Omi değişimleri değerlendirildiğinde, HCT-116 KK-MKH (+) **/72-1-5, /72-1-10** HTRA2/Omi değişimi ölçümleri, HT-29 grubundan anlamlı ($p<0.05$) olarak daha yüksekti. HCT-116 KK-MKH (+) **/24-1-5, /24-1-10 ve toplam** HTRA2/Omi değişimi ölçümleri, HT-29 grubuna göre anlamlılık ($p>0.05$) saptanamadı. HCT-116 KK-MKH (-) **/24-1-5 ve /24-1-10** HTRA2/Omi değişimi ölçümleri, HT-29 grubundan anlamlı ($p<0.05$) olarak daha düşüktü. HCT-116 KK-MKH (-) **/72-1-5 ve /72-1-10** HTRA2/Omi değişimi ölçümleri, HT-29 grubundan anlamlı ($p<0.05$) olarak daha yüksekti. HCT-116 KK-MKH (-) **toplam** HTRA2/Omi değişimi, HT-29 grubundan anlamlı ($p<0.05$) olarak daha düşüktü (Şekil 4-11).



Şekil 4-11:KK-MKH'nin HT-29 ve HCT-116 kanser hücreleri üzerine HTRA2/Omi değişimi etkisi

Öndeki açık gri sütunlar HCT-116, arkadaki koyu gri sütunlar HT-29'ları göstermektedir.

4.4.3. WJ-MKH ve KK-MKH'lerin Kolorektal Kanser ve PKMH'ler Üzerindeki HTRA2/Omi Değişim Analizleri

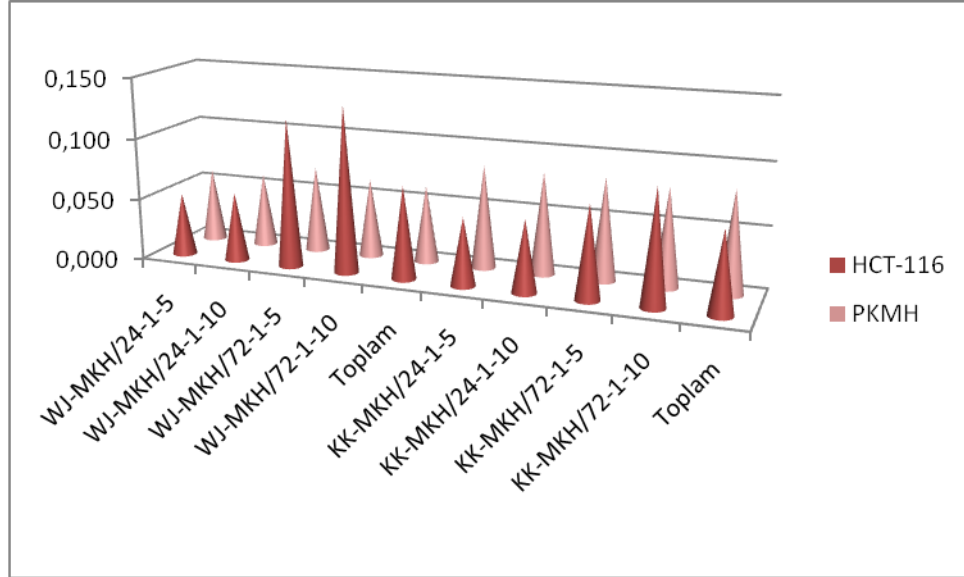
Farklı iki MKH'nin, her iki kanser hücresinde ve sağlıklı PKMH'ler üzerindeki HTRA2/Omi değişimlerinin bulguları da analiz edildi. HCT-116 KK-MKH (+) /24-1-5 HTRA2/Omi değişimi, WJ-MKH (+) grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. HCT-116 KK-MKH (+) /72-1-5, /72-1-10 HTRA2/Omi değişimi, WJ-MKH (+) grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü. HCT-116 KK-MKH (+) grubunda /24-1-10 ve toplam HTRA2/Omi değişimi, WJ-MKH (+) grubundan anlamlılık ($p > 0.05$) saptanmadı. HT-29 KK-MKH (+) /24-1-10 ölçümlerinde HTRA2/Omi değişimi WJ-MKH(+) grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. HT-29 KK-MKH (+) /72-1-5, /72-1-10 ve toplam ölçümlerinde HTRA2/Omi değişimi, WJ-MKH (+) grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü. HT-29 KK-MKH (+) /24-1-5 ölçümlerinde HTRA2/Omi değişimi, WJ-MKH (+) grubuna göre anlamlılık ($p > 0.05$) saptanmadı. PKMH KK-MKH (+) /24-1-5, /72-1-5, /72-1-10 ve toplam ölçümlerinde HTRA2/Omi değişimi, WJ-MKH (+) grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. PKMH KK-MKH (+) /24-1-10 ölçümlerinde HTRA2/Omi değişimi, WJ-MKH (+) grubundan anlamlılık ($p > 0.05$) saptanmadı (Tablo 4-9).

Tablo 4-9: WJ-MKH ve KK-MKH'lerin Kolorektal Kanser Hücreleri ve Sağlıklı PKMH Üzerindeki ELISA HTRA2/Omi Değişimleri

		HTRA2/Omi Değişimi					
		WJ-MKH (+)		KK-MKH (+)		p	
		Ort.±ss	Medyan	Ort.±ss	Medyan		
HCT-116	/24-1-5	0,054 ± 0,005	0,051	0,057 ± 0,003	0,055	0,044	
	/24-1-10	0,055 ± 0,005	0,056	0,057 ± 0,012	0,058	0,687	
	/72-1-5	0,114 ± 0,019	0,121	0,072 ± 0,010	0,075	0,000	
	/72-1-10	0,124 ± 0,023	0,135	0,091 ± 0,003	0,092	0,001	
	Toplam	0,087 ± 0,036	0,075	0,069 ± 0,016	0,066	0,171	
HT-29	/24-1-5	0,050 ± 0,008	0,048	0,054 ± 0,001	0,054	0,227	
	/24-1-10	0,054 ± 0,004	0,054	0,061 ± 0,002	0,061	0,005	
	/72-1-5	0,093 ± 0,005	0,094	0,064 ± 0,003	0,064	0,000	
	/72-1-10	0,100 ± 0,001	0,101	0,076 ± 0,008	0,077	0,000	
	Toplam	0,074 ± 0,023	0,074	0,064 ± 0,009	0,062	0,000	
PKMH	/24-1-5	0,059 ± 0,001	0,060	0,086 ± 0,007	0,084	0,000	
	/24-1-10	0,203 ± 0,223	0,060	0,081 ± 0,008	0,083	0,227	
	/72-1-5	0,073 ± 0,005	0,070	0,083 ± 0,001	0,083	0,000	
	/72-1-10	0,064 ± 0,002	0,064	0,314 ± 0,357	0,080	0,000	
	Toplam	0,100 ± 0,123	0,063	0,141 ± 0,199	0,083	0,000	

4.4.4. WJ-MKH ile KK-MKH'lerin HCT-116 Kanser Hücreleri ve Sağlıklı PKMH'ler Üzerindeki HTRA2/Omi Değişim Analizleri

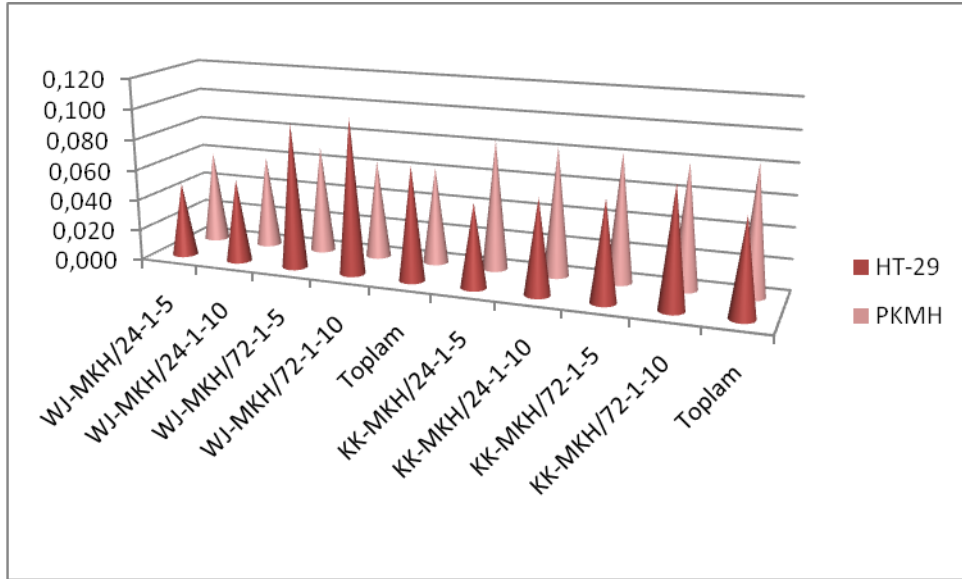
Deney gruplarından HCT-116 ile aynı koşullarda oluşturulmuş PKMH kontrol gruplarının verileri de karşılaştırıldı. HCT-116 WJ-MKH (+) /24-1-5 HTRA2/Omi değişimi ölçümleri PKMH grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü. HCT-116 WJ-MKH (+) /72-1-5 ve /72-1-10 HTRA2/Omi değişimi ölçümleri PKMH grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. HCT-116 WJ-MKH (+) /24-1-10 ve toplam HTRA2/Omi değişimi ölçümleri PKMH grubuna göre anlamlılık ($p > 0.05$) saptanamadı. HCT-116 KK-MKH (+) /24-1-5, /24-1-10, /72-1-5 ve toplam HTRA2/Omi değişimi ölçümleri, PKMH grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü. HCT-116 KK-MKH (+) /72-1-10 HTRA2/Omi değişimi ölçümleri, PKMH grubuna göre anlamlılık ($p > 0.05$) saptanamadı (Şekil 4-12).



Şekil 4-12: WJ-MKH ve KK-MKH'lerin HCT-116 deney grubu ile PKMH kontrol grubu üzerindeki HTRA2/Omi değişimlerinin karşılaştırılması

4.4.5. WJ-MKH ile KK-MKH'lerin HT-29 Kanser Hücreleri ve Sağlıklı PKMH'ler Üzerindeki HTRA2/Omi Değişim Analizleri

Deney gruplarından HT-29 ile aynı koşullarda oluşturulmuş konulan PKMH kontrol gruplarının verileri de karşılaştırıldı. HT-29 WJ-MKH (+) /24-1-5 HTRA2/Omi değişimi ölçümleri, PKMH grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü. HT-29 WJ-MKH (+) /72-1-5 ve /72-1-10 HTRA2/Omi değişimi ölçümleri, PKMH grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. HT-29 WJ-MKH (+) /24-1-10 ve toplam HTRA2/Omi değişimi ölçümleri, PKMH grubuna göre anlamlılık ($p > 0.05$) saptanamadı. HT-29 KK-MKH (+) /24-1-5, /24-1-10, /72-1-5 ve toplam HTRA2/Omi değişimi ölçümleri, PKMH grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü. HT-29 KK-MKH (+) /72-1-10 HTRA2/Omi değişimi ölçümleri, PKMH grubuna göre anlamlılık ($p > 0.05$) saptanamadı (Şekil 4-13).



Şekil 4-13: WJ-MKH ve KK-MKH'lerin HT-29 deney grubu ile PKMH kontrol grubu üzerindeki HTRA2/Omi değişimlerinin karşılaştırılması

5. TARTIŞMA

Kök hücreler sahip oldukları birçok özellik ve potansiyeller sebebiyle kullanım alanları gün geçtikçe artmaktadır. Özellikle asimetrik bölünme yetenekleri rejeneratif tıp için onları, sınırsız bir kaynak haline getirmektedir (1). Özellikleri arasında bulunan kendini yenileme, birçok hücre tipine dönüşebilme ve implante edildiği dokunun hücreleri mikroçevresi ile iletişime girip ihtiyaç duyulan tedavi doğrultusunda yanıt oluşturmaları sebebiyle kök hücreler, bulunduğumuz yüzyılın sağlık ve biyoloji biliminin odak konusu haline gelmiştir.

Embriyonik germ tabakasının her üçünün oluşturduğu dokulara dönüşebilen, diğer kök hücrelerden farklı hücre yüzey belirteçleri olan, plastik adherent ve multipotent erişkin tipteki MKH'ler son zamanların dikkat çeken kök hücre grubudur. Birçok erişkin dokudan izole elde edilebilirken özellikle kordon kanı ve kordon dokusu doğum sırasında kolay ulaşılabilir ve özel bir invaziv işlem gerektirmemesi sebebiyle bu iki kaynak, diğer MKH kaynaklarından kullanım açısından avantajlı olmaktadır. Bu eşsiz özelliklerinin yanı sıra çeşitli kanser çalışmalarında kanser hücrelerini apoptoza yönlendirmesi ve kültürü sonrasında bol miktarda elde edilmesi sebebiyle kullanımı önem kazanmıştır (3-6).

Dünyada sıklığı üçüncü sırada yer alan kolorektal kanserler karışık mekanizması, kullanılan kemoterapilere kazandığı tolerans, tümör çevresinde oluşan neoanjyogenez ve lenf nodları aracılığıyla yüksek metastazla agresif-progresif bir kanser türü olması sebebiyle birçok biliminsanı tarafından bu karmaşık mekanizmaları ve oluşumu gibi soruların yanıtları halen karşılık bulamamıştır. Şu ana kadar KRK tümörleri ile ilgili sahip olduğumuz bilgiler kısıtlıdır. Gastrointestinal sistemin kolon ve rektum epitellerinde birçok mutasyonun birikmesi sonucu bu dokuların, adenomlara dönüşmesiyle başladığı düşünülmektedir (44, 45). KRK tümörleri 4 evreden oluşup 4. evrenin en malign türü olduğu ve erken tarama testlerinin bu bağlamda oldukça önemli olduğu bilinmektedir (49, 50, 86). Ayrıca genetik, ailesel ve kalıtsal olmak üzere üç farklı türü vardır (47, 48). Birçok kanser türünde olduğu gibi KRK tedavisinde kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi operasyonlar sıklıkla kullanılan yöntemler arasındadır. Ancak bu yöntemler, tedaviyi uygulayan hekim ve tedaviyi alan hasta için oldukça zahmetli işlemlerdir.

Günümüzde standardize edilmiş olan mevcut kanser tedavileri kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi operasyonlardır. Geleneksel olarak kabul edilen bu tedavilerin her birinin çeşitli kısıtlamaları mevcuttur. Kanser tedavilerindeki son gelişmeler, insan kök hücrelerinin anti-kanser özelliklerini araştırma yönündedir (87). Kök hücrelerin tümör hücreleri ile interaksiyonunun, kök hücrelerin salgıladıkları anti-inflamatuar moleküllerin, anti-kanser mekanizmaları için kullandıkları yolların daha ayrıntılı çalışılması ve keşfedilmesi kök hücrelerin anti-kanser tedavisinde kullanılması, keşfedilmesi ve araştırılması büyük önem arz etmektedir.

Tüm bu bilgiler ışığında tez çalışmamızda, kordon kanı ve Wharton jelinden MKH'ler izole edilerek hücre kültürü ile çoğaltılmıştır. Her iki MKH eldesi, üçüncü pasajından sonra flow sitometri ile karakterizasyonu yapılmıştır. Karakterizasyonda MKH belirteçleri olarak CD45, CD73, CD90, CD105, CD11b, CD19, CD34, CD45 ve HLA-DR kullanılmıştır. KRK hücre hattı olarak HCT-116 ve HT-29 hücreleri uygun medyum kullanarak hücre kültüründe çoğaltılmıştır. Ardından KRK:MKH oranları 1/5 ve 1/10 olacak şekilde 24 ve 72 saatlik inkübasyonlarla trans-well sistemde kök kültür edilerek MKH kaynaklarının kolon kanserleri üzerindeki apoptotik etkileri karşılaştırılmıştır. Ayrıca sağlıklı bir kişiden alınan PKMH'lerle deneyler grupları ile aynı şartlar altında kontrol grupları oluşturulmuş ve MKH'lerin sağlıklı hücrelerdeki apoptotik etkisi de deney gruplarıyla karşılaştırılmıştır. Apoptoz değerlendirmek için flow sitometri ile Annexin V/PI-FITC yöntemi 24 ve 72 saatlik inkübasyonlar değerlendirilmiştir. Ayrıca her inkübasyon süresi sonunda hem deney gruplarının hem de kontrol gruplarının süpernatantları saklanıp ELISA ile apoptoz belirteçleri olan HTRA2/Omi ve Kaspaz-3 proteinlerinin değişimleri değerlendirilmiştir. Nicel bağımsız verilerin analizinde Mann-Whitney U test, bağımlı nicel verilerin analizinde Wilcoxon testi kullanılmıştır. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Çalışmamız, hücre canlılığına bakılarak MKH'nin terapötik etkisinin değerlendirmesinin hedeflendiği MKH kaynağı ve kolon kanser hücre hatları çeşitliliği açısından önem arz etmektedir.

Çalışmamızda hem WJ-MKH hem de KK-MKH ile HCT-116 ve HT-29 KRK hücre hatlarının trans-well kültürlerinden oluşturulan tüm deney grupları (1/5, 1/10 oranları ile 24 ve 72 saatlik kültür inkübasyonları) ve MKH konulmadan oluşturulan

kontrol gruplarıyla apoptotik değerlerin karşılaştırılması yapıldığında, deney grubunda istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) bir apoptotik belirteçlerinde artış olduğu bulunmuştur. Konumuz ile ilgili yapmış olduğumuz literatür taramalarında şimdiye kadar kolon kanserlerinin hücrel in vitro tedavilerinde WJ-MKH ve KK-MKH'lerin kullanıldığı bir çalışmaya rastlanılmamıştır. De Boeck ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada HCT-116 ve HT-29 üzerinde kemik iliği kaynaklı MKH'lerin tümör oluşumuna katkı sağladığı gösterilmiştir (88). Diğer yandan başka bir çalışmada ise adipoz kaynaklı MKH'nin KKK hücrelerinin proliferasyonunu ve metastazını arttırdığı bulunmuştur (89). Farklı kaynaklardan elde edilen MKH'ler ile yapılan in vitro çalışmalarda, yapmış olduğumuz çalışmadan farklı sonuçlar olduğu şeklinde raporlanmıştır. Her ne kadar farklı MKH kaynaklarından çalışmamızdan farklı sonuçlar raporlanmış olsa da, sonuçlarımızı destekleyen çalışmalar da mevcuttur. François ve arkadaşlarının yapmış olduğu in vivo kemik iliği kaynaklı MKH tedavisi çalışmasında ise, mevcut tez çalışmamızı destekler nitelikte olup kemik iliği kaynaklı MKH'nin KKK tümör mikroçevresini düzenleyip kanser büyümesini durdurduğunu göstermişlerdir (90). Bu çalışmayı destekler nitelikte WJ-MKH'nin hem in vitro hem de in vivo'da mesanede ve in vitro olarak da osteosarkoma, meme ve ovaryum kanserlerinde tümör büyümesini zayıflattığını gösteren çalışmalar mevcuttur (91, 92). Bir diğer yandan Jing ve arkadaşları ise KK-MKH'nin farelerde pankreas tümörü çevresine çekilip anti-tümör etki göstererek potansiyel bir tedavi olabileceğine dikkat çekmektedir (93).

Kaspaz-3 apoptoz sırasında proteolitik degradasyonda oldukça önemli olup apoptozda aktifleşerek önemli bir rol oynamaktadır. Mevcut çalışmamızda deney grupları ve MKH eklenmeden oluşturulan kontrol grupları incelendiğinde, HCT-116:WJ-MKH deney grubu için /24-1-5, /24-1-10, /72-1-10 ve toplam gruplarında kaspaz-3 protein seviyesinin anlamlı ($p<0.05$) şekilde arttığı gösterilmiştir. Bu bulgu, Fu ve arkadaşlarının HCT-116 hücre hatlarında anti-kanser etkili olduğu ileri sürülen ekstratı kullanmaları sonucu anlamlı kaspaz-3 seviyesinin artış tespiti bilgisi ile uyumaktadır (94).

Apoptoz, intrinsik ve ekstrinsik yolak olmak üzere birbirine bağlı iki yolak tarafından tetiklenebilmektedir ve intrinsik yolak mitokondriyal apoptotik proteinlerin salınımı ile indüklenir. Bu apoptotik proteinlerden biri olan HTRA2/Omi, AIP'leri inaktive ederek apoptozun indüklenmesine sebep olmaktadır. HTRA2/Omi protein değişimi, kaspaz-3 proteinleri ile benzer şekilde, aynı gruplarda, protein seviyesinin

anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir. Bu veriler WJ-MKH'nin HCT-116 üzerinde hem flow sitometrik apoptoz sonuçları hem de ELISA kaspaz-3 ve HTRA2/Omi protein değişimleri ile apoptozun varlığını göstermekle birlikte apoptozun hem intrinsik hem de ekstrinsik yoldan çalıştığını göstermektedir. /72-1-5 deney grubunda, kontrole göre kaspaz-3 protein değişimi anlamlı ($p<0.05$) derecede yüksek iken HTRA2/Omi verilerinde anlamlılık bulunamamıştır. Bu veri HCT-116:WJ-MKH 72 saatlik 1/5 oranlı deney grubu için gerçekleşen apoptozun, efektör kaspaz-3 etkileşimi ile gerçekleşebildiğini göstermektedir. Tüm HCT-116:WJ-MKH deneyleri değerlendirildiğinde en etkili kolorektal kanser tedavisinin 72 saat 1/10 oranında olduğunu tespit ettik. Sonuçlarımızla benzer şekilde Abbasi ve arkadaşlarının yapmış olduğu insan WJ-MKH kullanıldıkları in vitro gastrik kanser çalışmasında, WJ-MKH'lerin gastrik kanser hücrelerinin apoptozunu indüklediğini göstermişlerdir (95).

Çalışmamıza dahil ettiğimiz bir diğer KRK hücre hattı HT-29 için HT-29:WJ-MKH /72-1-5, /72-1-10 ve toplam deney gruplarında WJ-MKH eklenmeden oluşan kontrol grupları karşılaştırıldığında deney gruplarında anlamlı derecede hem kaspaz-3 hem de HTRA2/Omi seviyelerinin arttığı gözlemlenmiştir. Diğer yandan /24-1-5 ve /24-1-10 gruplarında kaspaz-3 seviyesi kontrol grubuna göre önemli derecede anlamlı ($p<0.05$) artış varken HTRA2/Omi değişiminde bu gruplarda anlamlılık bulunmamıştır. Bu veri bize, HT-29:WJ-MKH deneylerinde özellikle 24 saatlik kültürlerin her iki oranındaki apoptozun kaspaz bağımlı apoptoz yolağından gerçekleşebileceğini göstermiştir. Deneylerimize göre etkin tedavinin HCT-116:WJ-MKH deney gruplarında olduğu gibi 72 saat 1/10 olduğunu saptadık. Ayrıca bu deney grubuyla daha önce apoptotik etkisi gösterilmiş olan solid tümörlerden meme ve mesane tümörlerindeki gibi kolorektal kanserlerde de WJ-MKH'nin apoptotik etkisinin benzer olduğunu göstermiş olduk (92, 96).

İkinci KRK hattımız olan HT-29:KK-MKH deney grubu sonuçları ile MKH eklenmeden oluşturulan kontrol gruplarımız karşılaştırıldığında, /24-1-10 ve /72-1-10 gruplarında hem kaspaz-3 hem de HTRA2/Omi protein seviyelerinin anlamlı olarak arttığını tespit ettik. Diğer yandan /72-1-5 grubunda kaspaz-3 seviyesinin arttığı, HTRA2/Omi'nin ise azaldığını bulduk. Ayrıca tüm deney gruplarında kaspaz-3 seviyesi anlamlı olarak artmış olduğunu gözlemledik. Böylece HT-29:KK-MKH tedavisi için tüm deney gruplarında kaspaz bağımlı yoldan apoptozun gerçekleştiğini tespit ettik. HT-29:KK-MKH sonuçları için, HCT-116 deney gruplarındaki bulguyla benzer olarak,

72 saat 1/10 oranının ideal olduğunu tespit ettik. Böylece her iki KRK hücre hattında KK-MKH'nin anti-tümörijenik etkisi olduğunu saptadık. Akimoto ve arkadaşları, KK-MKH'nin ciddi progresif bir beyin tümörü olan glioblastomalarda da aynı etkiyi gösterdiğini, KK-MKH'nin salgıladığı çeşitli kemokinlerin salınması ile TRAIL yolağının aktive edilip ekstrinsik yolak üzerinden kaspaz-3 aktivasyonunuyla apoptozu indüklediğini ileri sürmüşlerdir (97). Bu bilgi, bizim bulgumuzu destekler niteliktedir.

Ayrıca mevcut deney gruplarıyla aynı koşullarda oluşturduğumuz sağlıklı PKMH:MKH kontrol gruplarıyla deney gruplarının tümünü karşılaştırdığımızda ise her iki KRK hücre hattı ve her iki MKH kaynaklarıyla oluşturduğumuz deney gruplarındaki apoptoz belirteç seviyesinin, sağlıklı kontrol grubumuza göre ciddi anlamda ($p<0.05$) yüksek olduğunu tespit ettik. Böylece KK-MKH'nin de WJ-MKH'nin de sağlıklı hücreler üzerinde anlamlı bir apoptotik etkisinin olmadığını göstermiş olduk. Çalışma amaçlarımızdan biri doğrultusunda bu bulgu, kemoterapi, radyoterapi gibi kanser tedavilerinde kullanılan, hasta açısından oldukça zahmetli süreçler yaşanmasına sebebiyet veren ve tümör çevresi dışında çevre dokunun da tahribatına sebep olan geleneksel tedavilerin aksine sağlıklı hücrelerde apoptoza sebebiyet vermeyen MKH kaynaklı hücresel tedavilerin gelecek için umut vaadeden potansiyel bir yöntem olduğu görüşünü destekler niteliktedir.

Lukomska ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada çeşitli hastalıkların tedavisinde, MKH'nin elde edileceği kaynak seçimi ve yapılan deneylerin tekrar edilebilir oluşu gibi kriterlerin önemini vurgulamışlardır (98). Biz de çalışmamızı kaynak seçimi açısından değerlendirdiğimizde, HCT-116 24 saatlik KK-MKH tedaviler, WJ-MKH tedavilere göre anlamlı derecede yüksek apoptoz değerleri gösterirken, 72 saatlik inkübasyon sonuçlarında bu durum tam tersine olduğu gözlenmiştir. ELISA sonuçlarına değerlendirdiğimizde bu farklılığı gösterebilecek anlamlı bir kaspaz-3 değeri olmamasına karşın HTRA2/Omi artışının 72 saatte anlamlı ($p<0.05$) derecede WJ-MKH'de etkili olduğunu gördük. Aynı şekilde HT-29 tedavisi için MKH kaynakları değerlendirildiğinde, HCT-116 tedavisi ile benzer şekilde, 24 saatlik KK-MKH tedavisinde anlamlı derecede apoptozun arttığını, buna karşılık 72 saatlik inkübasyon sonucunda ise WJ-MKH'nin HT-29 hücreleri üzerinde daha yüksek apoptotik değer artışının olduğunu saptadık. 72 saatlik WJ-MKH tedavileri sonucunda, HCT-116 sonuçlarında olduğu gibi, anlamlı ($p<0.05$) derecede artış göstermiş HTRA2/Omi protein seviyesini gözlemledik. Bu sonuçlarla özellikle, bu tez çalışmasına benzer in

vitro ve in vivo araştırmalarda MKH hücre tedavisi ve KRK gibi solid tümörler için farklı inkübasyon süresi ve farklı oranlarda hazırlanacak gelecekte yapılacak anti-kanser terapi çalışmaları için göz önünde bulundurulmalıdır.

Sporadik tip KRK'ların bir dizi mutasyon ve delesyonun birikimi sonucu oluşması sebebiyle oldukça karmaşık bir oluşum mekanizması olduğu bildirilmiştir (99). Çalışmamızda seçmiş olduğumuz HT-29 sporadik ve kalıtsal kökenli KRK çeşididir. HT-29 flow sonucuna göre her ne kadar apoptoz oranı yüksek olsa da, ELISA ile elde edilen sonuçlar da HTRA2/Omi protein seviyesinin HCT-116 hücre hattına göre görece düşük çıkması bu özelliğinin bir sonucu olabilir. Gelecekte yapılacak olan çalışmalarda, KRK tedavisinin verimliliği düşünülüyorsa, verilerimize göre MKH kaynaklı in vitro hücre tedavileri her ne kadar başarılı görünse de, KRK çeşidi ve evresi ile MKH kaynağının eldesi sırasındaki tüm aşamaların uygun standartlarda olmasının önemli olduğu göz önünde bulundurulması gerektiği kanaatindeyiz.

Hogan ve arkadaşlarının kemik iliği kaynaklı MKH kullandıkları bir çalışmada HCT-116 tüm konsantrasyonlarda düşük proliferasyon gösterirken, HT-29 ise artış göstermiştir (100). Bu sonuç kısmen çalışmamızla uyumlu olup bizim çalışmamızda hem HCT-116'nın hem de HT-29'un MKH kaynakları tarafından apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Diğer yandan kemik iliği kaynaklı MKH'lerin KRK'ların progresyonunu durduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (90, 101, 102). Bu sonuçlardaki farklılığın seçilmiş olan MKH kaynağının farklılığından dolayı olabileceğini ileri sürmekteyiz.

Mezenkimal kök hücrelerin farklılıkları izole edildikleri doku çeşitliliği haricinde, dışarıdan gelen etkilerle de değişebilmektedir. Yani naif olan MKH in vitro ortamda farklı özellikler elde edebilir. Örneğin, MKH izolasyonunda kullanılan yöntem değişiklikleri, kültürde kullanılan medyumun içeriği ve hatta kültür ortamının farklı pH, hipoksi, pasaj sayısı gibi durumları dahi MKH'nin etkisini değiştirebilmektedir (103, 104). Ayrıca tümör mikroçevresiyle kurmuş olduğu adaptif ilişkiler sonucu naif olan MKH'ler karsinoma ilişkili fibroblastlara dönüşüp tümör formasyonuna katılabilmektedirler (105). Bu sebeplerden dolayı MKH'nin özellikle kanser tedavilerindeki tartışmalı sonuçların sebebi olabileceği görüşüne katılmakta olup bu konuda daha net ve kesin sonuçların elde edilmesi için daha geniş kapsamlı çalışmaların yapılması gerektiğini öngörmekteyiz.

Çalışmamızda hem WJ-MKH'nin hem de KK-MKH'nin her iki KRK hücre hattı, doz ve inkübasyonda elde edilen terapötik etkisi düşünüldüğünde tekrar edilebilir

yeni bir hücre terapisi geliştirilmesi bakımından ümit vaat edicidir. Bu çalışma ile daha önce kolorektal kanserler için kullanılmamış iki ayrı mezenkimal kök hücre kaynağı hücre terapisi olarak kullanılmış ve bunların kolorektal kanser hücre hatları üzerindeki terapötik etkisi in vitro incelenmiş ve ileriye yönelik in vivo veya geliştirilmiş in vitro araştırmalar için kaynak oluşturabilecek bilgiler elde edilmiştir. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlarımızla kolorektal kanserde toksik olmayan, kolay elde edilebilir ve ucuz yeni hücresel tedavilere yeni bir bakış açısı kazandırması açısından bir adım olacağını ve gelecekte yapılacak klinik çalışmalara ışık tutabileceğini öngörmekteyiz.



KAYNAKLAR

1. Berika M, Elgayyar ME, El-Hashash AHK. Asymmetric cell division of stem cells in the lung and other systems. *Front Cell Dev Biol* 2014;**2**:33.
2. Lin CS, Xin ZC, Dai J, Lue TF. Commonly used mesenchymal stem cell markers and tracking labels: Limitations and challenges. *Histol Histopathol*. 2013;**28**(9):1109-1116.
3. Lin W, Huang L, Li Y, Fang B, Li G, Chen L, et al. Mesenchymal stem cells and cancer: Clinical challenges and opportunities. *Biomed Res Int* 2019;2019:2820853.
4. Kostadinova M, Antonov B, Kinov P, Oreshkova T, Mourdjeva M. Mesenchymal stem cells inhibit the growth of prostate carcinoma cells in a long term cultivation. *Biotechnol biotechnol equip* 2020;**34**(1):354-360.
5. Loebinger M, Sage E, Davies D, Janes SM. TRAIL-expressing mesenchymal stem cells kill the putative cancer stem cell population. *Br J Cancer* 2010;**103**:1692-1697.
6. Lee MW, Ryu S, Kim DS, Lee JW, Sung KW, Koo H, et al. Mesenchymal stem cells in suppression or progression of hematologic malignancy: current status and challenges. *Leukemia* 2019;**33**(3):597-611.
7. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 2019;**1**:7-34.
8. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;**71**(3):209-249.
9. Stoltz JF, de Isla N, Li YP, Bensoussan D, Zhang L, Huselstein C, et al. Stem cells and regenerative medicine: Myth or reality of the 21th century. *Stem cells international* 2015; **734731**.
10. Little MT, Storb R. History of haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat Rev Cancer* 2002;**2**(3):231-238.
11. Chacón-Martínez CA, Koester J, Wickström SA. Signaling in the stem cell niche: regulating cell fate, function and plasticity. *Development* 2018;**145**(15):dev165399.

12. Liu L, Michowski W, Kolodziejczyk A, Sicinski P. The cell cycle in stem cell proliferation, pluripotency and differentiation. *Nat Cell Biol* 2019;**21**(9):1060-1067.
13. Mens MMJ, Ghanbari M. Cell cycle regulation of stem cells by microRNAs. *Stem Cell Rev and Rep* 2018;**14**:309-322.
14. Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration* 2013;**85**(1):3-10.
15. Rippon HJ, Bishop AE. Embryonic stem cells. *Cell Prolif* 2004;**37**(1):23-34.
16. Biehl JK, Russell B. Introduction to stem cell therapy. *J Cardiovasc Nurs* 2009;**24**(2):98-105.
17. Arrighi N, editor. *Stem Cells*. London, UK: Elsevier Press; 2018.
18. Baker CL, Pera MF. Capturing Totipotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 2018;**22**(1):25-34.
19. Murugan V. Embryonic stem cell research: a decade of debate from Bush to Obama. *Yale J Biol Med* 2009;**82**:101-103.
20. Geber S, Sampaio M. Blastomere development after embryo biopsy: a new model to predict embryo development and to select for transfer, *Human Reproduction* 1999; **14**(3):782-786.
21. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;**126**(4):663-676.
22. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;**131**(5):861-872.
23. Mushahary D, Spittler A, Kasper C, Weber V, Charwat V. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry A* 2018;**93**(1):19-31.
24. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;**8**(4):315-317.
25. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;**284**(5411):143-147.

26. Alhadlaq A, Mao JJ. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem Cells Dev* 2004;**13**(4):436-448.
27. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;**97**(25):13625-13630.
28. Bharti D, Shivakumar SB, Subbarao RB, Rho GJ. Research advancements in porcine derived mesenchymal stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther* 2016;**11**(1):78-93.
29. Fan CG, Zhang QJ, Zhou JR. Therapeutic potentials of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord. *Stem Cell Rev Rep* 2011;**7**(1):195-207.
30. Rubinstein P, Rosenfield RE, Adamson JW, Stevens CE. Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Blood*. 1993;**81**(7):1679-1690.
31. Kim DW, Staples M, Shinozuka K, Pantcheva P, Kang SD, Borlongan CV. Wharton jelly-derived mesenchymal stem cells: phenotypic characterization and optimizing their therapeutic potential for clinical applications. *Int J Mol Sci* 2013;**14**(6):11692-11712.
32. Waller-Wise R. Umbilical cord blood: information for childbirth educators. *J Perinat Educ* 2011;**20**(1):54-60.
33. Ishige I, Nagamura-Inoue T, Honda MJ, Harnprasopwat R, Kido M, Sugimoto M, et al. Comparison of mesenchymal stem cells derived from arterial, venous, and Wharton jelly explants of human umbilical cord. *Int J Hematol* 2009;**90**:261-269.
34. Mesher AL. *Junqueira's basic histology: Text and atlas*. 15th ed. Indiana, USA: McGraw Hill Medical Books; 2018.
35. Bongso A, Fong CY. The therapeutic potential, challenges and future clinical directions of stem cells from the Wharton jelly of the human umbilical cord. *Stem Cell Rev Rep* 2013;**9**(2):226-240.
36. Wang XY, Lan Y, He WY, Zhang L, Yao HY, Hou CM, et al. Identification of mesenchymal stem cells in aorta-gonad-mesonephros and yolk sac of human embryos. *Blood* 2008;**111**(4):2436-2443.
37. Kamal MM, Kassem DH. Therapeutic potential of Wharton Jelly mesenchymal stem cells for Diabetes: Achievements and challenges. *Front Cell Dev Biol* 2020;**8**:16.

38. El-Demerdash RF, Hammad LN, Kamal MM, El Mesallamy HO. A comparison of Wharton jelly and cord blood as a source of mesenchymal stem cells for diabetes cell therapy. *Regen Med* 2015;**10**(7):841-855.
39. Zaimy MA, Saffarzadeh N, Mohammadi A, Pourghadamyari H, Izadi P, Sarli A, et al. New methods in the diagnosis of cancer and gene therapy of cancer based on nanoparticles. *Cancer Gene Ther* 2017;**24**(6):233-243.
40. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* 1989;**8**(2):98-101.
41. Ribatti D, Mangialardi G, Vacca A. Stephen Paget and the 'seed and soil' theory of metastatic dissemination. *Clin Exp Med* 2006;**6**(4):145-149.
42. Sarkar S, Horn G, Moulton K, Oza A, Byler S, Kokolus S, et al. Cancer development, progression, and therapy: an epigenetic overview. *Int J Mol Sci* 2013;**14**(10):21087-21113.
43. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Prz Gastroenterol* 2019;**14**(2):89-103.
44. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;**61**(5):759-767.
45. Calvert PM, Frucht H. The genetics of colorectal cancer. *Ann Intern Med* 2002;**137**(7):603-612.
46. Marley AR, Nan H. Epidemiology of colorectal cancer. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2016;**7**(3):105-114.
47. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med* 2000;**343**(2):78-85.
48. Burn J, Mathers J, Bishop DT. Genetics, inheritance and strategies for prevention in populations at high risk of colorectal cancer (CRC). *Recent Results Cancer Res* 2013;**191**:157-183.
49. Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet* 2014;**383**(9927):1490-1502.
50. Simon K. Colorectal cancer development and advances in screening. *Clin Interv Aging* 2016;**11**:967-976.

51. Van der Jeught K, Xu HC, Li YJ, Lu XB, Ji G. Drug resistance and new therapies in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2018;**24**(34):3834-3848.
52. Florescu-Tenea RM, Kamal AM, Mitruț P, Mitrur M, Ilie DS, Nicolaescu AC, et al. Colorectal cancer: An update on treatment options and future perspectives. *Curr Health Sci J* 2019;**45**(2):134-141.
53. Hmadcha A, Martin-Montalvo A, Gauthier BR, Soria B, Capilla-Gonzalez V. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for cancer therapy. *Front Bioeng Biotechnol* 2020;**8**:43.
54. Kostadinova M, Mourdjeva M. Potential of mesenchymal stem cells in anti-cancer therapies. *Curr Stem Cell Res Ther* 2020;**15**(6):482-491.
55. Gantier MP, Stunden HJ, McCoy CE, Behlke MA, Wang D, Kaparikis-Liaskos M, et al. A miR-19 regulon that controls NF- κ B signaling. *Nucleic Acids Res* 2012;**40**(16):8048-8058.
56. Kallmeyer K, Pepper MS. Homing properties of mesenchymal stromal cells. *Expert Opin Biol Ther*. 2015;**15**(4):477-479.
57. Fu X, Liu G, Halim A, Ju Y, Luo Q, Song AG. Mesenchymal stem cell migration and tissue repair. *Cells*. 2019;**8**(8):784.
58. Vakhshiteh F, Atyabi F, Ostad SN. Mesenchymal stem cell exosomes: a two-edged sword in cancer therapy. *Int J Nanomedicine* 2019;**14**:2847-2859.
59. de la Torre P, Perez-Lorenzo MJ, Alcazar-Garrido Á, Flores AI. Cell-based nanoparticles delivery systems for targeted cancer therapy: Lessons from anti-angiogenesis treatments. *Molecules* 2020;**25**(3):715.
60. Penalzoza C, Orlanski S, Ye Y, Entezari-Zaher T, Javdan M, Zakeri Z. Cell death in mammalian development. *Curr Pharm Des* 2008;**14**(2):184-196.
61. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 2009;**16**(1):3-11.
62. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;**26**(4):239-257.
63. Guerin MB, McKernan DP, O'Brien CJ, Cotter TG. Retinal ganglion cells: dying to survive. *Int J Dev Biol* 2006;**50**(8):665-674.
64. Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 2006;**25**(34):4798-4811.

65. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007;**35**(4):495-516.
66. Sessler T, Healy S, Samali A, Szegezdi E. Structural determinants of DISC function: new insights into death receptor-mediated apoptosis signalling. *Pharmacol Ther* 2013;**140**(2):186-199.
67. Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 1999;**17**:331-367.
68. Lee CH, Wu SB, Hong CH, Yu HS, Wei YH. Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis and its effects on skin residential cells: The implication in UV-based phototherapy. *Int J Mol Sci* 2013;**14**(3):6414-6435.
69. Weinmann M, Jendrossek V, Handrick R, Güner D, Goecke B, Belka C. Molecular ordering of hypoxia-induced apoptosis: critical involvement of the mitochondrial death pathway in a FADD/caspase-8 independent manner. *Oncogene* 2004;**23**:3757–3769.
70. Peña-Blanco A, García-Sáez AJ. Bax, Bak and beyond - mitochondrial performance in apoptosis. *FEBS J* 2018;**285**(3):416-431.
71. Zhu S, Li ZF. Proteases and Cancer Development. İçinde Dhalla NS and Chakraborti S, editor. *Role of proteases in cellular dysfunction, advances in biochemistry in health and disease*. Springer Science+Business Media; New York; 2014. pp. 129-145.
72. Miller DK. The role of the Caspase family of cysteine proteases in apoptosis. *Semin Immunol* 1997;**9**(1):35-49.
73. van Loo G, van Gurp M, Depuydt B, Srinivasula SM, Rodriguez I, Alnemri ES, et al. The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ* 2002;**9**(1):20-26.
74. Verhagen AM, Silke J, Ekert PG, Pakush M, Kaufmann H, Connolly LM, et al. HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* 2002;**277**(1):445-454.
75. Tan YS, Lei YL. Isolation of tumor-infiltrating lymphocytes by ficoll-paque density gradient centrifugation. *Methods Mol Biol* 2019;**1960**:93-99.

76. Bieback K, Netsch P. (2016) Isolation, Culture, and Characterization of Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stromal Cells. In Gnechi M editor. *Mesenchymal Stem Cells. Methods in Molecular Biology*. Humana Press: New York; pp 245-258.
77. Skiles ML, Marzan AJ, Brown KS, Shamonki JM. Comparison of umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells isolated from cryopreserved material and extracted by explantation and digestion methods utilizing a split manufacturing model. *Cytotherapy* 2020;**22**(10):581-591.
78. Richard SM, Martinez Marignac VL. Sensitization to oxaliplatin in HCT116 and HT29 cell lines by metformin and ribavirin and differences in response to mitochondrial glutaminase inhibition. *J Cancer Res Ther* 2015;**11**(2):336-340.
79. Strober W. Trypan Blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol* 2015;111:A3.B.1-A3.B.3.
80. Morata-Tarifa C, Jimenez G, Garcia MA, Entrena JM, Grinan-Lison C, Aguilera M, et al. Low adherent cancer cell subpopulations are enriched in tumorigenic and metastatic epithelial-to-mesenchymal transition-induced cancer stem-like cells. *Sci Rep* 2016;**6**:18772.
81. Rüster B, Grace B, Seitz O, Seifried E, Henschler R. Induction and detection of human mesenchymal stem cell migration in the 48-well reusable transwell assay. *Stem Cells Dev* 2005;**14**(2):231-235.
82. Bertolo A, Pavlicek D, Gemperli A, Baur M, Pötzel T, Stoyanov J. Increased motility of mesenchymal stem cells is correlated with inhibition of stimulated peripheral blood mononuclear cells in vitro. *J Stem Cells Regen Med* 2017;**13**(2):62-74.
83. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995;**184**(1):39-51.
84. Rosell A, Cuadrado E, Alvarez-Sabin J, Delgado P, Penalba A, Mendioroz M, et al. Caspase-3 is related to infarct growth after human ischemic stroke. *Neurosci Lett* 2008;**430**(1):1-6.
85. Darreh-Shori T, Rezaeianyzdi S, Lana E, Mitra S, Gellerbring A, Karami A, et al. Increased active OMI/HTRA2 serine protease displays a positive correlation

- with cholinergic alterations in the Alzheimer's Disease Brain. *Mol Neurobiol* 2019;**56**:4601–4619.
86. Brenner H, Stock C, Hoffmeister M. Colorectal cancer screening: the time to act is now. *BMC Med* 2015;**13**:262.
 87. Liu H, Deng S, Han L, Ren Y, Gu J, He L, et al. Mesenchymal stem cells, exosomes and exosome-mimics as smart drug carriers for targeted cancer therapy. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2022;**209**(Pt1):112163.
 88. De Boeck A, Pauwels P, Hensen K, Rummens JL, Westbroek W, Hendrix A, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote colorectal cancer progression through paracrine neuregulin 1/HER3 signalling. *Gut* 2013;**62**(4):550-560.
 89. Chen D, Liu S, Ma H, Liang X, Ma H, Yan X, et al. Paracrine factors from adipose-mesenchymal stem cells enhance metastatic capacity through Wnt signaling pathway in a colon cancer cell co-culture model. *Cancer Cell Int* 2015;**15**:42.
 90. François S, Usunier B, Forgue-Lafitte ME, L'Homme B, Benderitter M, Douay L, et al. Mesenchymal stem cell administration attenuates colon cancer progression by modulating the immune component within the colorectal tumor microenvironment. *Stem Cells Transl Med* 2019;**8**(3):285-300.
 91. Gauthaman K, Yee FC, Cheyyatraivendran S, Biswas A, Choolani M, Bongso A. Human umbilical cord Wharton jelly stem cell (hWJSC) extracts inhibit cancer cell growth in vitro. *J Cell Biochem* 2012;**113**(6):2027-2039.
 92. Wu S, Ju GQ, Du T, Zhu YJ, Liu GH. Microvesicles derived from human umbilical cord Wharton jelly mesenchymal stem cells attenuate bladder tumor cell growth in vitro and in vivo. *PLoS One* 2013;**8**(4):e61366.
 93. Jing W, Chen Y, Lu L, Hu X, Shao C, Zhang Y, et al. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells producing IL15 eradicate established pancreatic tumor in syngeneic mice. *Mol Cancer Ther* 2014;**13**(8):2127-2137.
 94. Fu X, Zhao W, Li K, Zhou J, Chen X. Cryptotanshinone inhibits the growth of HCT116 colorectal cancer cells through endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy. *Front Pharmacol* 2021;**12**:653232.
 95. Abbasi S, Bazayr R, Saremi MA, Alishiri G, Seyyedsani N, Jadid MFS, et al. Wharton jelly stem cells inhibits AGS gastric cancer cells through induction of

- apoptosis and modification of MAPK and NF- κ B signaling pathways. *Tissue Cell* 2021;**73**:101597.
96. Dzobo K, Vogelsang M, Thomford NE, et al. Wharton jelly-derived mesenchymal stromal cells and fibroblast-derived extracellular matrix synergistically activate apoptosis in a p21-dependent mechanism in WHCO1 and MDA MB 231 cancer cells in vitro. *Stem Cells Int* 2016;**2016**:4842134.
 97. Akimoto K, Kimura K, Nagano M, Takano S, Salazar GT, Yamashita T, et al. Umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells inhibit, but adipose tissue-derived mesenchymal stem cells promote, glioblastoma multiforme proliferation. *Stem Cells Dev* 2013;**22**(9):1370-1386.
 98. Lukomska B, Stanaszek L, Zuba-Surma E, Legosz P, Sarzynska S, Drela K. Challenges and controversies in human mesenchymal stem cell therapy. *Stem Cells Int* 2019;**2019**:9628536.
 99. Li SKH, Martin A. Mismatch repair and colon cancer: Mechanisms and therapies explored. *Trends Mol Med* 2016;**22**(4):274-289.
 100. Hogan NM, Joyce MR, Murphy JM, Barry FP, O'Brien T, Kerin MJ, et al. Impact of mesenchymal stem cell secreted PAI-1 on colon cancer cell migration and proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;**435**(4):574-579.
 101. Xu Y, Shen L, Li F, Yang J, Wan X, Ouyang M. microRNA-16-5p-containing exosomes derived from bone marrow-derived mesenchymal stem cells inhibit proliferation, migration, and invasion, while promoting apoptosis of colorectal cancer cells by downregulating ITGA2. *J Cell Physiol* 2019;**234**(11):21380-21394.
 102. Chen HL, Li JJ, Jiang F, Shi WJ, Chang GY. MicroRNA-4461 derived from bone marrow mesenchymal stem cell exosomes inhibits tumorigenesis by downregulating COPB2 expression in colorectal cancer. *Biosci Biotechnol Biochem* 2020;**84**(2):338-346.
 103. Selich A, Daudert J, Hass R, Philipp F, von Kaisenberg C, Paul G, et al. Massive clonal selection and transiently contributing clones during expansion of mesenchymal stem cell cultures revealed by lentiviral RGB-Barcode Technology. *Stem Cells Transl Med* 2016;**5**(5):591-601.
 104. Sacchetti B, Funari A, Remoli C, Giannicola G, Kogler G, Liedtke S, et al. No identical "Mesenchymal Stem Cells" at different times and sites: Human

committed progenitors of distinct origin and differentiation potential are incorporated as adventitial cells in microvessels. *Stem Cell Reports* 2016;**6**(6):897-913.

- 105.Hass R. Role of MSC in the tumor microenvironment. *Cancers (Basel)*. 2020;**12**(8):2107.



HAM VERİLER



FORMLAR

PATENT HAKKI İZİNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN İN VİTRO KOLON KANSER HÜCRE HATLARINDAKİ ETKİLERİ

Yazar Fıdgen Abatay Sel

MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN İN VİTRO KOLON KANSER HÜCRE HATLARINDAKİ ETKİLERİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 7	% 7	% 5	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	konuralptipdergi.duzce.edu.tr İnternet Kaynağı	% 2
2	acikerisim.baskent.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
3	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1
4	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<% 1
5	acikerisim.uludag.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	www.aai.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	jag.journalagent.com İnternet Kaynağı	<% 1
8	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
9	openaccess.ogu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1

Diğer Dergilerde Yayımlanan Makaleler

- I. **Abatay Sel F**, Savran Oğuz F. Moleküler kimerizm metodları: Geçmiş ve günümüz. *Akdeniz Tıp Dergisi* 2022;8(1):82-90. (Hakemli Üniversite Dergisi)
- II. **Abatay Sel F**, Savran Oğuz F. Endoplazmik retikulumda katlanmamış protein cevabı ile ilişkili hastalıklar. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi* 2022 (Kabul edilen, Hakemli Üniversite Dergisi)

Kitap & Kitap Bölümleri

- I. **Abatay Sel F**. Rejeneratif tıpta son dönem kök hücre uygulamaları. Ed.Can Özlü. 7. İnovatif Tıp, Ankara, Türkiye, Akademi Yayınları 2021:233-244.
- II. **Abatay Sel F**, Savran Oğuz F. A Rejeneratif tıpta yeni konsept: Deselülerizasyon işlemleri ve kullanım alanları. Ed. Can Özlü, Mehmet Ali Gedik, Hilmi Safa Yangal, Aysun Özlü, Aziz Rodan Sarohan, Yaşar Çöpelci. Sağlıkta Son Trendler, Ankara, Türkiye, Akademi Yayınları 2022.
- III. **Abatay Sel F**, Savran Oğuz F. Regenerative medicine application of mesenchymal stem cells. Advances in Experimental Medicine and Biology series in Cell Biology and Translational Medicine, Cham, Springer Nature, USA 2022.

Hakemli Kongre / Sempozyum Bildiri Kitaplarında Yer Alan Yayınlar

- I. **Abatay-Sel F**, Erol A, Suleymanoglu M, Demirayak G, Kekik-Cinar C, Kuruca DS, Oguz-Savran F. The Apoptotic Effect of Human Umbilical Cord Blood Derived Mesenchymal Stem Cell on Colorectal Cancer Cell Lines. Oral Presentation at VIII. International Congress of Molecular Medicine in November 2021.
- II. **Suleymanoglu M**, Erol A, **Abatay-Sel F**, Ozdemir IA, Oguz-Savran F, Kuruca DS, Oncul MO. Anti-Leukemic Effect of Wharton Jelly Derived Mesenchymal Stem Cells in vitro. Oral Presentation at VIII. International Congress of Molecular Medicine in November 2021.

- III. **Abatay-Sel F**, Erol A, Suleymanoglu M, Demirayak G, Kekik-Cinar C, Kuruca DS, Oguz-Savran F. Mesenchymal Stem Cell Derived Therapy Approach For the Colorectal Cancer. E-Poster Presentation at National Medical Biology and Genetics Congress in October 2021.
- IV. **Erol A, Abatay-Sel F**, Suleymanoglu M, , Demirayak G, Kekik-Cinar C, Kuruca DS, Oguz-Savran F. Detection of Intracellular Cytokines in Phytohemagglutinin Stimulated Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Comparative Analysis of Incubation Times. E-Poster Presentation at National Medical Biology and Genetics Congress in October 2021.
- V. **Suleymanoglu M**, Erol A, **Abatay-Sel F**, Ozdemir IA, Oguz-Savran F, Kuruca DS, Oncul MO. Inhibitory Effect of Wharton Jelly Derived Mesenchymal Stem Cells Co-Culture on K562 Cells. E-Poster Presentation at 6th European Congress of Immunology in September 2021.
- VI. **Abatay-Sel F**, Oguz SF, Besisik SK, Mastanzade M, Ogret YD, Hindilerden İY, Aydin F. Q-RT-PCR versus STR-PCR Chimerism Method Using After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Graphical Abstract&Oral Presentation at 11th EFIS-EJI Southeastern European Immunology School (SEEIS2019) in September 2019.
- VII. **Mastanzade M**, Hindilerden İY, **Abatay Sel F**, Öğret Y, Oguz FS, & Beşışık SK. Evaluation of B and T Cell Chimerism After Allogeneic Stem Cell Transplantation in Hematologic Malignancies. Oral Presentation at Eurasian Hematology Oncology Congress in October 2018.
- VIII. **Abatay Sel F**, Hindilerden İY, Mastanzade M, Öğret Y, Beşışık SK, & Oguz FS. qRT-PCR and STR-PCR Chimerism Method Using After allogeneic hematopoietic stem cell transplantation Oral Presentation at Eurasian Hematology Oncology Congress in October 2018.
- IX. **Kekik Ç**, Temurhan S, Akgül S, Çaliskan Y, Özlük MY, Ertan S, Demir E, **Abatay Sel F**, Yazıcı H, Türkmen A, Işık K, Sever MS, & Savran Oguz F. The Effect of HLA and SNPS on ESRD Development in IgAN patients. Poster Presentation at 25th Annual Meeting of the Italian

Society for Immunogenetics and Transplantation Biology (AIBT) in May 2018.

- X. Mastanzade M, Yönel Hindilerden İ, **Abatay Sel F**, Duvarcı Öğret Y, Savran Oğuz F, Kalayoglu Beşışık S. Investigation of B and T Cell Chimerism After Allogeneic Stem Cell Transplantation in Hematological Malignancies. Poster Presentation at 5th International Participation Experimental Hematology Congress in April 2018.
- XI. **Abatay F**, Hindilerden İY, Öğret YD, Beşışık SK, & Savran Oğuz F. Short Tandem Repeat-PCR and Quantitative Real Time PCR Method Comparison for Chimerism Analysis. Oral Presentation at 9th National Bone Marrow Transplantation and Stem Cell Therapy Congress in March 2016.
- XII. Kekik Ç, Erol A, **Abatay F**, Kıvanç D, & Savran Oğuz F. Effect of HLA Matching on Survival After Cord Blood Transplantation. Poster Presentation at Best of ASBMT Tandem Meetings in March 2015.
- XIII. Kekik Ç, **Abatay F**, Erol A, Özcan Ö, Kıvanç D, & Savran Oğuz F. The Effect of HLA Compatibility on Survival for Cord Blood Transplantation. Oral Presentation at 6. DETAE DAYS in November 2014.
- XIV. Öğret Y, Karaoğlu P, **Abatay F**, Şenol H, & Savran Oğuz F. HLA-A, -B, -C -DRB1 and DQB1 Polymorphism Defined by Sequence-Based Typing of the Bone Marrow Donors. Poster Presentation at the 27th EFI European Immunogenetics and Histocompatibility Conference in May 2013.

Ödül ve Burslar:

- | | |
|--|-----------|
| I. YÖK 100/2000 Doktora Burs Programı | 2019-2022 |
| II. South Eastern European Immunology School by EFIS
(€200) | 2019 |
| III. Tübitak Bursiyeri | 2015 |

IV. Best of ASBMT Tandem Meetings, 2. En iyi poster ödülü	2015
V. Tübitak Bursiyeri	2014
VI. Travel Grant for Long-Life Learning Program, Braşov, Romania (€220)	2013
VII. Erasmus Exchange Program by European Union, Nice, France (Up to €3000)	2007

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Kodlama (Web taban ağırlıklı, Java, Python, PHP, R)

Yüzme

Ukulele

Uzakdoğu sineması