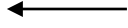


Adınızı soyadınızı giriniz

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**

**OKSİDATİF STRESE MARUZ KALAN MEZENKİMAL  
KÖK HÜCRELER ÜZERİNE MİRİSETİN'İN  
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**DR.MEHMET BERKER**

**DANIŞMAN  
DOÇ.DR. SİBEL KÖKTÜRK**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ**

**İSTANBUL-2021**

## ITHAF

Manevi desteklerini her zaman hissettiğim sevgili annem Meliha BERKER ve merhum babam Erdoğan BERKER'e; eğitim süreci boyunca yanımda olan ve desteğini esirgemeyen eşim Ayşe BERKER, çocuklarım Erdoğan, Serdar ve Sena BERKER'e ithaf ediyorum.



## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında bilgi ve görüşleriyle yanımda olan, yönlendiren ve bu tez çalışmasının ortaya çıkmasında başlangıcından son aşamasına kadar çok emek harcayan sayın hocam Doç. Dr. Sibel KÖKTÜRK'e teşekkür ederim.

Eğitimime ve çalışmama ilgi ve katkıları ile destek olan, eğitim sürem boyunca beraber olduğum saygıdeğer Anabilim Dalı Başkanı hocamız Prof. Dr. Seyhun SOLAKOĞLU'na, Doç. Dr. Tuğba KOTİL'e, Dr. Öğretim Üyesi Elif KERVANCIOĞLU DEMİRCİ ve Dr. Öğretim üyesi Tuğba EKİZ YILMAZ'a; emekli hocalarımız Prof. Dr. Leyla TAPUL ve Prof. Dr. Bülent AHİSHALI'ya

Tez çalışmalarına olan katkılarından dolayı Biyolog Sibel DOĞAN, Araş. Gör.Dr. Emel USTA, Araş. Gör. Feride KARAHAN ÖZDEMİR'e

Elektron mikroskobu ve laboratuvar çalışmalarında destek olan Biyolog Funda ONAR'a, Biyolog Fadime AKTAR'a ve Biyolog Ebru KARABULUT AKYÖN'e

Doktora eğitim sürecim boyunca her konuda yanımda olan Tıbbi. Bio. İlkay ÖZDEMİR'e , Araş. Gör. Aslı ERDOĞAN ve Araş. Gör. Hasan Serdar MUTLU'ya

Anabilim dalımız çalışanları Gülcan ÖZTÜRK'e, Selahattin ÜNAL, Mehmet ERENLER, Alaattin TAŞ, Arif ÇORUK'a teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

|                                                              |                                  |
|--------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| TEZ ONAYI .....                                              | HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ. |
| BEYAN.....                                                   | HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ. |
| İTHAF.....                                                   | İİ                               |
| TEŞEKKÜR.....                                                | İİİ                              |
| İÇİNDEKİLER .....                                            | İV                               |
| ŞEKİLLER LİSTESİ .....                                       | Vİ                               |
| SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....                        | İX                               |
| ÖZET .....                                                   | X                                |
| ABSTRACT.....                                                | Xİ                               |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ.....                                        | 1                                |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                      | 2                                |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM.....                                      | 13                               |
| 3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ .....                                     | 13                               |
| 3.2. HÜCRELERİN PROLİFERASYONU .....                         | 13                               |
| 3.3. HİDROJEN PEROKSİT ve MİRİSETİN DOZ BELİRLENMESİ.....    | 13                               |
| 3.4. HİDROJEN PEROKSİT ve MİRİSETİN UYGULANMASI .....        | 14                               |
| 3.5. İMMÜNOSİTOKİMYASAL BOYAMALAR.....                       | 15                               |
| 3.5.1. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BOYAMALAR.....                    | 15                               |
| 3.5.2. GÖRÜNTÜ ANALİZİ.....                                  | 15                               |
| 3.6. ELEKTRON MİKROSKOP YÖNTEMLERİ.....                      | 16                               |
| 3.7. İSTATİKSEL ANALİZLER .....                              | 17                               |
| 3.8. MALZEME LİSTESİ                                         |                                  |
| 3.8.1. Malzemeler ve Kimyasal Maddeler                       |                                  |
| 3.8.2. Cihazlar                                              |                                  |
| 4.BULGULAR.....                                              | 18                               |
| 4.1. CANLI VE ÖLÜ HÜCRE SAYIMLARI .....                      | 18                               |
| 4.2. İMMÜNOSİTOKİMYA BOYAMALARI .....                        | 19                               |
| 4.3. KASPAZ 3 ANTİKORU İMMÜNOSİTOKİMYA BOYAMALARI .....      | 21                               |
| 4.4. TIM17 ANTİKORU İMMÜNOSİTOKİMYA BOYAMALARI.....          | 24                               |
| 4.5. TNF- $\alpha$ ANTİKORU İMMÜNOSİTOKİMYA BOYAMALARI ..... | 32                               |

|                                          |                                         |
|------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 4.6. ELEKTRON MİKROSKOBU BULGULARI ..... | 37                                      |
| İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....          | 69                                      |
| ÖZGEÇMİŞ .....                           | <b>HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.</b> |



## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.1.1. Kontrol, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , mirisetin, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +mirisetin gruplarının canlı ve ölü hücre sayımlarını gösteren grafik.....                                                                            | 18 |
| Şekil 4.2.2. Kontrol grubu, mirisetin, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +mirisetin ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> gruplarının image J analiz programı kullanılarak, kaspaz-3 antikoru immünositokimyasal boyanma şiddetini gösteren grafik. ....      | 19 |
| Şekil 4.2.2. Kontrol grubu, mirisetin, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +mirisetin ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> gruplarının image J analiz programı kullanılarak, TIM17 antikoru immünositokimyasal boyanma şiddetini gösteren grafik. ....         | 20 |
| Şekil 4.2.3. Kontrol grubu, mirisetin, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +mirisetin ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> gruplarının image J analiz programı kullanılarak, TNF- $\alpha$ antikoru immünositokimyasal boyanma şiddetini gösteren grafik. .... | 20 |
| Şekil 4.3.1. Kontrol grubunun kaspaz-3 antikoru immünositokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı. ....                                                                                                                                  | 21 |
| Şekil 4.3.2. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> grubunun kaspaz-3 antikoru immünositokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı.....                                                                                                             | 22 |
| Şekil 4.3.3. Mirisetin grubunun kaspaz-3 immünositokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı. ....                                                                                                                                         | 23 |
| Şekil 4.3.4. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +mirisetin grubunun kaspaz-3 immünositokimya boyamasının ayrıntısını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı.....                                                                                              | 24 |
| Şekil 4.4.1. Kontrol grubunun TIM17 immünositokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı. ....                                                                                                                                              | 25 |
| Şekil 4.4.2 Kontrol grubunun TIM17 immünositokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı. ....                                                                                                                                               | 26 |
| Şekil 4.4.3. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> grubunun TIM17 immünositokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı.....                                                                                                                         | 27 |
| Şekil 4.4.4. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> grubunun TIM17 immünositokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı.....                                                                                                                         | 28 |
| Şekil 3.11.5. Mirisetin grubunun TIM17 immünositokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı.....                                                                                                                                            | 29 |
| Şekil 3.11.6. Mirisetin grubunun TIM17 immünositokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı.....                                                                                                                                            | 30 |
| Şekil 3.11.7. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +mirisetin grubunun TIM17 immünositokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı.....                                                                                                             | 31 |

|                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 3.11.8.</b> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +mirisetin grubunun TIM17 immünohistokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı.....            | 32 |
| <b>Şekil 4.5.1.</b> Kontrol grubunun TNF- $\alpha$ immünohistokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı.....                                      | 33 |
| <b>Şekil 4.5.2.</b> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> grubunun grubunun TNF- $\alpha$ immünohistokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı.....       | 34 |
| <b>Şekil 4.5.3.</b> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> grubunun TNF- $\alpha$ immünohistokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı.....                | 35 |
| <b>Şekil 4.5.4.</b> Mirisetin grubunun TNF- $\alpha$ immünohistokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı.....                                    | 36 |
| <b>Şekil 4.5.5.</b> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + mirisetin grubunun TNF- $\alpha$ immünohistokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı.....    | 37 |
| <b>Şekil 4.6.1.</b> Kontrol grubuna ait elektron mikroskobu fotoğrafında, MKH yüzeyinde filopodlar görülmektedir. ....                                      | 30 |
| <b>Şekil 4.6.2.</b> Kontrol grubuna ait elektron mikroskobu fotoğrafında, MKH'ler görülmektedir.....                                                        | 40 |
| <b>Şekil 4.6.3.</b> Kontrol grubu elektron mikroskobu fotoğrafı.....                                                                                        | 41 |
| <b>Şekil 4.6.4.</b> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> grubuna ait elektron mikroskobu fotoğrafında, MKH görülmektedir.                                          | 42 |
| <b>Şekil 4.6.5.</b> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> grubu elektron mikroskobu fotoğrafı.....                                                                  | 43 |
| <b>Şekil 4.6.6</b> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> grubu elektron mikroskobu fotoğrafı.....                                                                   | 44 |
| <b>Şekil 4.6.7.</b> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> grubu elektron mikroskobu fotoğrafı.....                                                                  | 45 |
| <b>Şekil 4.6.8.</b> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> grubu elektron mikroskobu fotoğrafı.....                                                                  | 46 |
| <b>Şekil 4.6.9.</b> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> grubu elektron mikroskobu fotoğrafı.....                                                                  | 47 |
| <b>Şekil 4.6.10.</b> Mirisetin grubuna ait elektron mikroskobu fotoğrafında, MKH görülmektedir.....                                                         | 48 |
| <b>Şekil 4.6.11.</b> Mirisetin grubu elektron mikroskobu fotoğrafı.....                                                                                     | 49 |
| <b>Şekil 4.6.12.</b> Mirisetin grubu elektron mikroskobu fotoğrafı.....                                                                                     | 50 |
| <b>Şekil 4.6.13.</b> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +mirisetin grubuna ait elektron mikroskobu fotoğrafında, MKH yüzeyinde mikrovilluslar görülmektedir..... | 51 |
| <b>Şekil 4.6.14.</b> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +mirisetin grubuna ait elektron mikroskobu fotoğrafında, MKH'ler görülmektedir.....                      | 52 |

|                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.6.15.</b> $H_2O_2$ + mirisetin grubu elektron mikroskobi fotoğrafı..... | 53 |
| <b>Şekil 4.6.16.</b> $H_2O_2$ +mirisetin grubu elektron mikroskobi fotoğrafı.....  | 54 |
| <b>Şekil 4.6.17.</b> $H_2O_2$ +mirisetin grubu elektron mikroskobi fotoğrafı.....  | 55 |
| <b>Şekil 4.6.18.</b> $H_2O_2$ +mirisetin grubu elektron mikroskobi fotoğrafı.....  | 56 |



## SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ALT: Alanin aminotransferaz

AST: Aspartat aminotransferaz

CK: Kreatin Kinaz

CD: Cluster of Differentiation

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medyum

DN: Diabetik Nefropati

FCS: Fetal Calf Serum

HD: Huntington Hastalığı

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: hidrojen peroksit

MKH: Mezenkimal Kök Hücre

OXPHOS: Oksidatif fosforilasyon

PBS: Phosphate Buffered Solution

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

SOD: Süperoksit Dismutaz

TGF: Transformin Growth Factor

TIM: Mitokondri iç membran translokaz

TOM: Mitokondri dış membran translokaz

TNF $\alpha$ : Tümör Nekroz Faktör alfa

## ÖZET

Berker M.Oksidatif Strese Maruz Kalan Mezenkimal Kök Hücreler Hücreler Üzerine Mirisetinin Etkilerinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji ABD. Doktora Tezi, İstanbul, 2021

Mezenkimal kök hücrelerin (MKH), hem prelinik hem de klinik terapilerde kullanımı gittikçe artmaktadır. Nakledilen MKH'lerin sağkalımını arttırmaya yönelik yeni stratejilerin geliştirilmesi, kök hücre tabanlı tedavilerin terapötik potansiyeli açısından önemlidir. Mirisetin antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik özellikleri olan bir flavonoiddir. MKH kültüründe hidrojen peroksit( $H_2O_2$ ) oksidatif stres modeli üzerinde, immünohistokimyasal ve elektron mikroskopik olarak mirisetinin etkilerini değerlendirmeyi amaçladık.

Çalışmada; kontrol,  $H_2O_2$ , mirisetin ve  $H_2O_2$ +mirisetin olmak üzere 4 ayrı grup oluşturulmuştur. Her grup tripan mavisi ile hücre kültürü canlılık düzeyleri, kaspaz-3, TIM17 ve Tümör Nekroz Faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ) antikorlarıyla immunositokimyasal ve elektron mikroskopi ile ultrastrüktürel düzeyde değerlendirildi.

Canlı ve ölü hücre sayıları bakımından kontrol grubu ile  $H_2O_2$  grubu arasındaki fark anlamlı bulundu. Kontrol grubu ile  $H_2O_2$  grubu arasında kaspaz-3 immunositokimya boyanma şiddeti bakımından aralarında anlamlı bir artış gözlemlendi. Kontrol grubu ile  $H_2O_2$  grubu arasındaki TIM17 immunositokimya boyanma şiddeti anlamlı şekilde azalmışken, mirisetin ve  $H_2O_2$ +mirisetin gruplarında anlamlı şekilde artmıştı. TNF- $\alpha$  immunositokimya boyanma şiddeti bakımından kontrol grubu ile  $H_2O_2$  grubu arasındaki fark anlamlı bulundu.

Sonuç olarak; MKH'lere uygulanan  $H_2O_2$  toksisitesi hasarına karşı mirisetinin etkilerine bakıldığında canlı hücre sayısında artış, kaspaz-3 ve TNF- $\alpha$  immünohistokimya boyamalarında azalma, TIM17 immünohistokimya boyamasında artış ve elektron mikroskopik değerlendirmede dejeneratif ve apoptotik hücre morfolojisinde azalma gözlemlendi. Mirisetin, MKH'ler üzerinde antiapoptotik ve anti-inflamatuvar etkileri sayesinde hücre canlılığı ve proliferasyonunu artırması nedeniyle, destekleyici alternatif bir tedavi seçeneği olarak görülebilir.

**Anahtar kelimeler:** Mezenkimal kök hücre, mirisetin, oksidatif stres, kaspaz-3, TIM17, TNF- $\alpha$

## ABSTRACT

Berker M. Investigation of the Effects of Myricetin on Mesenchymal Stem Cells Exposed to Oxidative Stress. Istanbul University Institute of Health Sciences, Histology and Embryology Department. Istanbul, 2021

Mesenchymal stem cells (MSC) have increasingly been used both in preclinical and clinical therapies. The development of new strategies to increase the survival of transplanted MSCs is important for the therapeutic potential of stem cell-based therapies. Myricetin is a flavonoid with antioxidant, anti-inflammatory and antiapoptotic properties. We aimed to evaluate the effects of myricetin on the hydrogen peroxide( $H_2O_2$ ) oxidative stress model in MSC culture, immunocytochemically and electron microscopically.

In the study; 4 different groups were formed as control,  $H_2O_2$ , myricetin and  $H_2O_2$ +myricetin. Cell culture viability levels of each group were evaluated with trypan blue, immunocytochemical with caspase-3, TIM17, and TNF- $\alpha$  antibodies, and ultrastructural level with electron microscopy.

The difference between the control group and the  $H_2O_2$  group was significant in terms of live and dead cell counts. A significant increase was observed between the control group and the  $H_2O_2$  group in terms of the intensity of caspase-3 immunocytochemistry staining. TIM17 immunocytochemistry staining intensity was significantly decreased between the control group and the  $H_2O_2$  group, while it increased significantly in the myricetin and  $H_2O_2$ +myricetin groups. In terms of TNF- $\alpha$  immunocytochemistry staining intensity, the difference between the control group and the  $H_2O_2$  group was significant.

As a result; considering the effects of myricetin against  $H_2O_2$  toxicity damage applied to MSCs, an increase in viable cell count, decrease in caspase-3 and TNF- $\alpha$  immunocytochemistry staining, increase in TIM17 immunocytochemistry staining and decrease in degenerative and apoptotic cell morphology in electron microscopic evaluation were observed. Myricetin can be seen as a supportive alternative treatment option because it increases cell viability and proliferation thanks to its anti-apoptotic and anti-inflammatory effects on MSCs.

**Keywords:** Mesenchymal stem cell, myricetin, oxidative stress, caspase-3, TIM17, TNF- $\alpha$

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mezenkimal kök hücrelerin(MKH), hem prelinik hem de klinik terapilerde kullanımı gittikçe artmaktadır. Nakledilen kök hücrelerin ölüm oranının yüksek olması, başarılı klinik hücre tedavileri için sınırlayıcı bir faktördür. Bu nedenle, nakledilen mezenkimal kök hücrelerin sağkalımı ve canlılığını artırmaya yönelik yeni stratejilerin geliştirilmesi, kök hücre tabanlı tedavilerin terapötik potansiyeli açısından oldukça önemlidir.

Son yıllarda kullanılan doğal bileşiklerden biri olan mirisetin antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik özellikleri olan flavonoidlerden biridir. Bu nedenle, MKH kültüründe hidrojen peroksit oksidatif stres modeli üzerinde, immünohistokimyasal ve elektron mikroskopik olarak mirisetinin etkilerini değerlendirmeyi amaçladık.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1.HİDROJEN PEROKSİT

Reaktif oksijen türleri oksidatif stres oluşturarak yaşlanma, ateroskleroz ve kanser gibi süreçlerde rol oynarlar. Hidrojen peroksit( $H_2O_2$ ), süperoksit, hidroksil reaktif oksijen türevlerinin (ROS) örnekleridir. Hücrede serbest radikal oluştuğunda süperoksit dismutaz enzimi aracılığıyla  $H_2O_2$  açığa çıkar.  $H_2O_2$  ise katalaz ve glutatyon peroksidazla zararlı olmayan ürünlere dönüşür veya fenton reaksiyonu ile OH radikaline dönüşebilir[1].

Hücrelerde oksidatif hasara yanıt olarak inflamatuvar süreç başlar. Bunun sonucunda hücrede geri dönüşümlü olan veya geri dönüşümsüz hasar meydana gelebilir. Geri dönüşümsüz hücre hasarı hücrenin ölümü ile sonuçlanır. Hücre hasarının engellenmesi için antioksidan savunma sistemi devreye girer. İnsan vücudunda katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon, alfa lipoik asit gibi doğal antioksidanlar vardır[2]. Bir de dışarıdan alınan ilaç formunda, vitamin türevi veya bitkisel kaynaklı antioksidanlar bulunmaktadır[3].

$H_2O_2$  deneysel çalışmalarda oksidatif hasar oluşturmak için sıklıkla kullanılan bir reaktif oksijen türevidir[4, 5]. MKH ile ilgili yapılan çalışmalarda kök hücrelerin nakil esnasında yaşadığı oksidatif hasarı taklit amacıyla  $H_2O_2$  kullanılmaktadır[6, 7].

Mitokondri, hücre içinde en çok bilinen ROS kaynağıdır. Mitokondride üretilen süperoksit, mitokondriyal matrikste ve zarlar arası boşlukta bulunan mitokondriyal süperoksit dismutazlar tarafından  $H_2O_2$  oluşturabilir. İç zar boşluğunda disülfid bağı oluşumunu kolaylaştıran enzimler de yan ürün olarak  $H_2O_2$  üretir[8].

### 2.2.MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER

Kadın oositi ve erkek sperminden oluşan zigot hücresi tek başına bir canlıyı oluşturabilecek kapasitededir ve bu hücreler totipotent kök hücreler adı verilir. Döllenmenin 5. Gününden sonra oluşan hücrelere pluripotent kök hücreler adı verilir ve mezoderm, endoderm, ektoderm adı verilen her 3 germ tabakasına farklılaşabilirler. Multipotent kök hücreler ise ait oldukları germ tabakasından (endoderm, ektoderm,

mezoderm) oluşan hücrelere farklılaşabilirler. Kök hücreler çoğalırken asimetrik ve simetrik olarak iki şekilde bölünebilirler[9].

Fibroblast benzeri hücrelerin varlığı ilk defa 1867 yılında Cohnheim tarafından gösterildi. İlk kök hücre kültürleri 1960 yılında Friedenstein tarafından yapıldı. Mezenkimal kök hücre teriminin literatüre girişi Caplan tarafından 1980 yılında yapıldı. Kök hücreler in vitro kültür şartlarında kendi kendini yenileyebilen, çoğalabilen ve farklılaşabilen hücrelerdir. MKH kültürde plastiğe yapışabilirler ve iğsi şekildedirler[10].

Uluslararası Kök Hücre Araştırma Komitesi tarafından MKH'lerin özellikleri tanımlanmıştır: 1.İğsi şekilde kültür kabına yapışabilirler, 2. MKH'lerde CD44, CD73, CD90, CD105 yüzey antijenleri pozitif ve CD34, CD31, CD11b, CD14, CD45, CD79A, HLA-DR yüzey antijenleri negatiftir[11].

MKH kondrosit, osteosit, adiposit, nöron benzeri hücre ve myositlere farklılaşabilirler. İn vitro çoğalma kültürüne eklenebilen farklı indüksiyon maddeleri ve medyumlarla istenilen yönde farklılaşabilirler[12].

MKH'ler yağ dokusu, kemik iliği, plasenta, endometrium, umbilikal kord, menstrüel kan, kas dokusu vb. dokulardan izole edilebilirler[13].

MKH'ler rejeneratif tıp ve doku mühendisliğinde kullanılmaktadır ve immünmodulator kapasiteleri vardır[14]. Son yıllarda, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, karaciğer bozuklukları ve kalp hastalıkları dahil olmak üzere otoimmün ve kronik inflamatuvar hastalıkların tedavisinde MKH'lerin olası klinik uygulamalarında olumlu gelişmeler gösterildi[15]. MKH'ler, hem hayvan modellerinde hem de insan klinik deneylerinde çeşitli dejeneratif hastalıklarda hasarlı dokuları onarmak için umut verici sonuçlar göstermiştir. MKH'lerin bir hedef arama yeteneği vardır, yani yaralı bölgelere göç edebilirler ve yaralı bölgelerin yerel bileşenlerine farklılaşma kapasitesine ve doku rejenerasyonuna yardımcı olan kemokinleri, sitokinleri ve büyüme faktörlerini salgılama yeteneğine sahiptirler. Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler, kemik iliğinde bulunan hematopoietik olmayan kök hücrelerdir ve çok potansiyelli farklılaşma potansiyeline sahiptir. Yaralanma sinyallerine yanıt olarak, MKH'ler potansiyel olarak nişlerinden periferik dolaşıma geçebilir ve hedef dokulara ulaşmak için damar duvarlarından geçebilirler[16].

### 2.3.MİRİSETİN

Mirisetin(Myricetin), bitki kaynaklı yaygın bir flavonoiddir ve nutrasötik değeri ile tanınmaktadır. Çeşitli yiyecek ve içeceklerin temel bileşenlerinden biridir. Bileşik, güçlü antioksidan, antikanser, antidiyabetik ve antienflamatuar aktiviteleri içeren geniş bir aktivite yelpazesi sergiler[17]. Merkezi sinir sistemi ile ilgili çeşitli aktiviteler sergiler ve çok sayıda çalışma, bileşiğin Parkinson ve Alzheimer hastalığı gibi hastalıklara karşı korunmada faydalı olabileceğini öne sürmüştür. Mirisetinin sıvı ve katı yağ içeren gıdaların raf ömrünü uzatmak için bir koruyucu madde olarak kullanılması, bileşiğin lipidleri oksidasyona karşı koruma kabiliyetine bağlanır. Mevcut literatürün ayrıntılı bir araştırması, şu anda bu önemli molekül hakkında kapsamlı bir inceleme bulunmadığını ortaya koymuştur. Bu nedenle, mevcut çalışma mirisetinin tarihçesi, sentezi, farmasötik uygulamaları ve toksisite çalışmalarını içermektedir. Bu rapor aynı zamanda çeşitli biyolojik faaliyetlerin ilişkilerini ve etki mekanizmalarını vurgulamaktadır[18].

Bir fenolik bileşik olan mirisetin; meyvelerde, sebzelerde ve çeşitli bitkilerden üretilen çaylarda ve şaraplarda çok yaygındır. Mirisetin-3-O-(3"-asetil) - $\alpha$ -l-arabinopyranoside, mirisetin-3-O- (4 "-asetil) - $\alpha$ -l- içeren hem serbest hem de glikosidik bağlı formlarda oluşur. Mirisetin suda zayıf bir şekilde çözünür; ancak bazik sulu ortamda ve dimetilformamid, dimetilasetamid, tetrahidrofuran ve aseton gibi bazı organik solventlerde protosuzlaştırıldığında hızla çözünür[19].

Mirisetin (Myricaceae), ilk olarak on sekizinci yüzyılın sonlarında Myrica nagi Thumb adı verilen bitkinin kabuğundan izole edilmiştir. Mirisetin, açık sarı renkli kristaller olarak Hindistan'da hasat edilmiştir. İzolasyon, öncelikle bileşiğin boyama özelliğine olan ilgiden kaynaklandı. Erime noktasını 357°C olarak belirleyen ve çeşitli bromo, metil, etil ve potasyum analogları hazırlayan Perkin'in bir çalışmasında iyi karakterize edilmiştir[20]. Bu rapor aynı zamanda bir mirisetin glikozit (mirisetin-3-O-ramnoside) olan mirisitrin'i ilk kez tanımladı. Sonraki bir çalışmada Perkin, mirisetinin hidrolizden sonra bir florosülinol ve gallik asit verdiğini ve bunun kimyasal yapısını doğrulamaya hizmet ettiğini buldu[21].

Mirisetin yapısal olarak kuersetin, morin, kaempferol ve fisetin olarak bilinen fenolik bileşiklerle ilişkilidir. Mirisetin, kuersetin ile yapısal benzerliği nedeniyle hidroksikuersetin olarak da adlandırılır. Mirisetinin nutrasötikler ve antioksidan özellikleri oldukça değerlidir. Bilimsel kanıtlar, bileşiğin antiinflamatuvar, analjezik, antitümör, hepatoprotektif ve antidiyabetik aktiviteler dahil olmak üzere çeşitli farmakolojik aktiviteler sergilediğini iddia etmektedir[22].

Mirisetin, birçok gıdada önemli bir bileşendir ve antioksidan aktivitesi ve lipidleri oksidatif hasara karşı koruma yeteneği nedeniyle bir gıda katkı maddesi olarak kullanılır. Mevcut literatür, bileşiği harika nutrasötikler olarak tasvir etmektedir ve molekülün kanser dahil yaşamı tehdit eden hastalıklara karşı koruma potansiyeline sahip olduğuna hiç şüphe yoktur. Mirisetin tek başına çeşitli aktiviteler sergilemesine rağmen, aktivitesi diğer biyoaktif bileşiklerle kombinasyon halinde olduğunda katkı maddesi veya sinerjistik etkileşimler yoluyla önemli ölçüde artabilir. Çeşitli araştırmacılar, bileşiğin kozmetik preparatlarda kullanılabileceğini öne sürerek cilt yaşlanmasına karşı koruyucu doğasını kanıtladılar. Ek olarak, in vivo modellerde kalsiyuma bağlı potasyum kanal akımını artırarak ve dorsal kök ganglionunun küçük nöronlarının uyarılabilirliğini inhibe ederek periferik analjezik etkisi, ağrı ve inflamasyondaki rolünü desteklemektedir. Bu nedenle, çeşitli in vivo çalışmalardan elde edilen sonuçlara dayanarak, mirisetin yakın gelecekte bir anti-enflamatuvar ve analjezik ajan olarak geliştirilebilir[23]. Hakkinen ve arkadaşları, mirisetinin yüksek sıcaklıklarda değişken olduğu ve belirli pH koşullarına duyarlı olduğu için bozunmaya yatkın olduğunu bulmuşlardır. Gıda işleme ve depolamanın da mevcut konsantrasyonu etkilediği bilinmektedir. Bu faktörler, belirli formülasyonlarda mirisetin kullanılmadan önce dikkate alınmalıdır[24].

Mirisetin; bağırsak hücrelerine bir derece toksisite bildirmesine rağmen, bileşiğin birçok in vivo modelde toksik olmadığı bulunmuştur. Bu molekül aynı zamanda daha yüksek konsantrasyonlarda pro-oksidan etki gösterir . Bu bulgular, mirisetin nutrasötiklere ve kozmetik preparatlara dahil edilmeden önce daha fazla toksisite çalışması yapılması gerektiğini göstermektedir[25].

İnflamasyonlar enflamatuvar bozuklukların patogenezinde kritik ve doğuştan gelen bağışıklık tepkisinde kritik rol oynayan sitozolik multiprotein kompleksleridir. Mirisetinin, bir inflamazom olan NLRP3'ün oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir.

Mirisetin meyvelerde, sebzelerde, çaylarda ve şaraplarda yaygın olarak bulunan bitki kaynaklı bir flavonoiddir. Bu bileşik antioksidan, anti-kanser, anti-diyabetik olmak üzere çeşitli farmakolojik özellikler sergiler. Mirisetinin ilk sinyal tarafından aktive edilen Nükleer Faktör kappa-B (NF-kB) yolunu baskılayarak iltihabı inhibe ettiği bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada mirisetinin, ROS'a bağlı yaygınlaşmasını azaltarak ve ROS'dan bağımsız NLRP3'ün bırakılmasını teşvik ederek NLRP3 inflamatuvar aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir[26]. Mirisetinin pankreas beta hücresi işlev bozukluğunu önlediği gösterilmiştir. Bu çalışmada beta hücre işlev bozukluğunu indüklemek için SERCA (Sarco / ER Ca<sup>2+</sup> + ATPas) inhibitörü olan tapsigargin kullanılmış ve mirisetinin pankreas beta hücrelerine doğrudan etkileri incelenmiştir[27].

Mirisetin fulminan hepatitten, ALT ve AST seviyelerini düşürerek oksidatif stresi, iltihabı ve hepatik apoptozu hafifleterek koruduğu gösterilmiştir. Mirisetinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile tetiklenen hepatotoksisteyi ve ROS oluşumunu önemli ölçüde azalttığını gösteren sonuçlar elde edilmiştir. Yaygın bitkilerde, sebzelerde, meyvelerde dağılmış doğal olarak oluşan bileşiklerin anti-oksidan ve anti-enflamatuvar rollere sahip olduğu ve potansiyel karaciğer koruyucu ajanlar olduğuna dair kanıtlar vardır. Mirisetin, ROS oluşumunu doğrudan baskılayabilir ve ayrıca antiapoptosis proteinlerini düzenleyerek apoptozisi baskılayabilir[28].

Mirisetin Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve serebral iskemi reperfüzyondan sonra beyin ödemi azalttığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Çeşitli nörolojik hastalıklarda sinir hücreleri üzerine koruyucu yönde etki gösterir. Mirisetin; mekanizma olarak mitokondriyal hasarı azaltır, ROS oluşumunu azaltır, serbest radikal oluşumunu azaltır, süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesini artırır[27]. *Salvadora Persica* yapraklarından elde edilen su bazlı ekstraktlar ve flavonoid bakımından zengin fraksiyonlar, geleneksel Afrika ve Asya tıbbında sıtma, iltihaplanma ve bronşiyal astım gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Diş fırçası olarak da kullanılan *Salvadora Persica*'nın kökü antiinflamatuvar ve antimikrobiyal aktivitelere sahiptir[29]. *Carica Papaya* genellikle yapraklarında, meyvelerinde ve tohumlarında yüksek miktarda doğal anti-oksidan içerdiği keşfedilen topikal bir bitki türüdür. Kafeik asit, mirisetin, quercetin  $\alpha$ - tokoferol, papain, benzil izotiyosonat ve kaferol gibi anti-oksidan özellikli çeşitli

kimyasal bileşikler içerir. Oksidatif stres hücre ve doku hasarına neden olan doğal bir fenomendir. *Carika Papaya* anti-oksidan özelliği ile oksidatif stresi azaltır. Bu bitki Malezya, Brezilya, Güney Amerika, Avustralya ve Endonezya gibi ülkelerde yetiştirilmektedir. Over kanseri kadınlarda malign tümörlere bağlı ölümlerin önde gelen sebeplerinden biridir. Yapılan bir çalışmada peritümoral yoldan uygulanan gallik asit ve mirisetinin antineoplastik aktiviteleri gösterilmiştir. Vaskülerite azalmış ve neoplastik stroma reaksiyonu ve apoptoz ile tümör lezyonları gelişimi üzerinde inhibitör etkiler gösterdiği tespit edilmiştir[30, 31].

Diyabetik nefropati (DN) diyabetli hastaların %30'unu etkileyen bir diyabet komplikasyonudur. Birçok çalışmada flavonoidlerin DN'yi hafifletebileceği gösterilmiştir. Flavonoidlerin diyabetik nefropatide esas olarak oksidatif stres ve inflamasyonu düzenlemede rol oynadığı gösterilmiştir[32]. Flavonoidler oksidatif stres enflamatuvar yolları baskılayarak diyabetik nefropatiyi hafifletir. Geleneksel Çin ilaçlarında kullanılan flavanoidler, DN tedavisi için önemli avantajlar göstermiştir. Hiperglisemide aşırı ROS birikir ve hücre içi kalsiyum artar. Buna bağlı birkaç apoptotik enzim ve inflamatuvar araçlar aktive olur ve glomerüler apoptotik hasar indüklenir. Flavanoid grubunda bulunan kuersetin glikozilasyonu ve metilasyonu, diyabetik sıçanlarda lipid peroksidasyonunu azaltarak ve süperoksit dismutaz ile katalaz aktivitesini arttırarak oksidatif stresi önemli ölçüde azaltır. Kuersetin etkisini nükleer faktor beta sinyal yolu tarafından etki ettiği anlaşılmıştır. Çayda, turpgillerde ve çeşitli meyvelerde yaygın olarak bulunan ve aktif bir flavanoid bileşik olan kaempferol hücre dışı matriks birikimini bloke ederek antiinflamatuvar, antioksidatif etkiler gösterdiği kanıtlanmıştır. RhoA/Rho kinazın aracılık ettiği inflamatuvar sinyali inhibe ederek DN'yi azaltabileceği gösterilmiştir. Çalışmalar mirisetinin antikanser, anti-enflamatuvar, anti-oksidan ve antiviral etkiler dahil olmak üzere çok çeşitli farmakolojik etkileri gösterilmiştir. Mirisetinin hiperglisemi ve hiperlipideminin azaltılmasında önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Streptozosinin ile indüklenen DN'li farelerin kan şekeri seviyesini düşürür ve böbrek dokusunda glutatyon peroksidaz aktivitesini iyileştirir, bu da mirisetinin DN tedavisi için potansiyel bir ajan olduğunu gösterir. [33]. Mirisetin elma portakal çilek ve sebzelerde bulunur. Antioksidan, anti-tümör, anti-anflamatuvar, nöro protektif ve antibakteriyel özelliklere sahip olduğu bulunmuştur. Mirisetinin hiperglisemiye inhibe ettiği ve serum lipid düzeylerini düşürdüğü gözlenmiştir[34].

Mirisetin konsantrasyon ve zamana bağı bir şekilde hepatoselüler karsinom hücrelerinin canlılığını azalttığı ve bu hücrelerin göçünü ve invazyonunu inhibe ettiği belirtilmiştir. Antitrombotik, antioksidan, antitümör, kan şekerini düşürme karaciğer ve böbreği koruma, antienflamatuar etki dahil olmak üzere geniş bir farmakolojik aktivite yelpazesine sahip olduğu bildirilmiştir[27].

İdiyopatik pulmoner fibroz miyofibroplast proliferasyonu ve hücre dışı matriks birikimi ile karakterize yüksek mortalite ve sınırlı tedavi ile ilerleyici fibrozan bir akciğer hastalığıdır. Mirisetin ısı şoku proteinini (HSP90) hedefleyerek TGF- $\beta$ 1(Transforming Growth Factor Beta) ile indüklenen akciğer fibroblast aktivasyonunu engeller ve aktif TGF- $\beta$ 1'in aşırı ekspresyonu sürekli pulmoner fibroz ile sonuçlanır. TGF $\beta$ 1'in inhibe edilmesi pulmoner fibrozu iyileştirir[35],[36]. Serin treonin kinaz (CK 2) tüm kanserlerde aşırı eksprese edilir. Doğal flavonoidlerden olan apigeninin CK2'yi inhibe ettiği uzun zamandır bilinmektedir. Apigenin, luteolin, kaempferol, kuersetin ve mirisetin CK2'yi inhibe edebilir. Birçok çalışmada kanser tedavisi için CK2 inhibitörleri olarak flavonların kullanılabileceği gösterilmiştir. Birçok çalışma CK2 inhibisyonunun Wnt-Beta-Katenin sinyalleşmesini azalttığı gösterilmiştir[37]. Gelişmiş glikasyon son ürünleri diyabetik retinopati gelişiminde rol oynamaktadır. Diyabetik retinopatide meydana gelen perisit göçü dikkat çekicidir ve mirisetinin, perisit göçünü önemli ölçüde bastırdığı gösterilmiştir[38].

#### **2.4.KASPAZ-3**

Apoptoz, inflamatuvar bir yanıt ortaya çıkarmadan hücrel parçalanmaya yol açan programlanmış hücre ölümünün aktif bir şeklidir. Kaspazlar, apoptozun karmaşık biyolojik sürecini düzenleyen bir sistein proteaz ailesidir. Kaspazlar, inaktif zimojenler olarak ifade edilir; ancak aktivasyonda kaspaz-2 ve -9 (içsel yol) ve kaspaz-8 ve -10 (dışsal yol) yoluyla başlatıcı kaspazlardır. Hücrede kaspaz-3 ve -7 yoluyla ölüm uyarılarını çoğaltır ve hücrenin parçalanmasına yol açar[39]. Kaspaz-3 ve -7'nin her ikisi de uygulayıcı kaspaz olmasına rağmen, apoptoz sırasında ana yürütücü kaspaz olarak kabul edilen kaspaz-3 ile farklı substrat tercihleri vardır. Geleneksel olarak kaspaz-3'ün aktivasyonu hücre ölümünün habercisi olmuştur.

Kaspaz-3'ün aktivasyonu, plazma membranının şişmesine, kromatin yoğunlaşmasına, DNA bölünmesine ve plazma zarının hücre dışı tarafında fosfatidilserinin açığa

çıkmasına neden olur. Böylece apoptotik hücrelerin morfolojik ve biyokimyasal özellikleri açığa çıkar[40].

## **2.5.TNF ALFA**

Tümör nekroz faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , kasektin olarak da bilinir), inflamasyon, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptoz sırasında bağışıklık sisteminde önemli rol oynayan güçlü bir proinflamatuvar sitokindir. İlk olarak 1975 yılında Carwell ve arkadaşları tarafından bağışıklık sisteminin uyarılmasından sonra önemli sitotoksik aktivite gösteren ve dolayısıyla tümör nekrozuna neden olan bir sitokin olarak tanımlandı. 1984 yılında TNF- $\alpha$  geni klonlandığında, lenfotoksin-a ile bir yapı homolojisi bulundu ve TNF- $\alpha$ , TNF ligand süper ailesi olarak bilinen sitokinler grubuna dahil edildi[41]. Üyeleri, hem zara bağlı hem de salgılanmış formlarda ifade edilebilen tip II transmembran proteinlerdir. TNF- $\alpha$  için reseptörler, üyeleri karakteristik bir hücre içi segmente, bir transmembran alanına ve bir hücre dışı ligand bağlama alanına sahip olan TNF reseptörü süper ailesinin parçasıdır. TNF- $\alpha$  büyük oranda makrofajlar ve T hücrelerinde üretilmesinin yanı sıra nötrofiller, B hücreleri, mast hücreleri, endotelial hücreler, NK hücreleri, düz kas hücreleri, kardiyomiyositler, osteoklastlar, osteoblastlar, fibroblastlar, astrositler, dendritik hücreler, keratinositler, adipositler ve adrenokortikal hücreler tarafından üretilir[42]. Tümör nekroz faktörü, apoptozun yanı sıra inflamasyon ve bağışıklığın ana aracıdır ve sepsis, diyabet, kanser, osteoporoz, multipl skleroz, romatoid artrit ve inflamatuvar bağırsak hastalıkları olmak üzere geniş bir hastalık yelpazesinin patogeneğinde rol oynar. TNF'nin TNF reseptörü-1 (TNF-R1) ile etkileşimi, birkaç sinyal iletim yolunu aktive eder[43].

## **2.6.TIM17**

Mitokondri hücresel ATP'nin %80'ini üretmeye ek olarak, kalsiyum homeostazında, doğuştan gelen bağışıklıkta, reaktif oksijen türlerinin düzenlenmesinde, kritik metabolik yollarda ve apoptozda rol oynar. Klasik mitokondri, iki zarla çevrili iki bölmeye sahiptir. En dıştaki zar, metabolitler ve iyonlar gibi küçük moleküllerin geçmesine izin veren voltaja bağlı anyon kanalları tarafından oluşturulan çoklu gözenekleri kullanan mitokondriyal dış zardır. İkinci zar, en içteki matriks bölmesini çevreleyen ve kristalardan oluşan mitokondriyal iç zardır[44]. Mitokondriyal iç zar, iyonlara karşı bile

geçirimsizdir, ancak birçok membran integral taşıyıcısı ve birincil olarak hücresel enerji üretiminden sorumlu enzimlerle kaplanmıştır. Zarlar arası boşluk, mitokondrial dış zar ve iç zarın birbirine yakın olduğu temas bölgelerinin yakınları dışında, iki zarı birbirinden ayırır. Mitokondri, proteinleri organelin doğru alt bölümüne ulaştırmak için birkaç moleküler yol kullanır. İç mitokondriyal bölmelerden birine yönlendirilen tüm nükleusta kodlanmış proteinler, mitokondri dış zar translokazı (TOM)40 kanalı yoluyla zarlar arası boşluğa girer ve daha sonra nihai hedeflerine ulaşmak için özel bir yola sapar. Proteinler, TOM40 kanalından mitokondriyal matrikse veya iç mitokondriyal membrana sırasıyla iç zar çoklu alt birim translokazları TIM23 ve TIM22 yoluyla taşınır. İki mitokondri iç zar translokazı (TIM)17 ailesi proteini, TIM23 ve TIM17, TIM23 kompleksinin kanalını oluştururken, TIM22 kanalı sadece TIM22 proteini tarafından oluşturulur[45].

Mitokondri, hücrelerin metabolik ve enerji üretim merkezleridir. Pürinler, pirimidinler, keton cisimleri, seks hormonları ve demir-kükürt kümeleri üretmenin yanı sıra kalsiyum dengesini korumak için gerekli olan kritik yolları barındırır. Sonuç olarak, mitokondrinin fizyolojik işlevi, 1000'den fazla farklı proteinin üretilmesini ve katlanmasını gerektirir, TIM, hücrede protein katlanması için en çok talep edilen yerlerden biridir; hücre dışından gelen proteinlerin Import üzerine hemen katlanması gerekir ve solunum kompleksleri durumunda, tamamen ayrı bir proteinden üretilen proteinlerin alt kümesiyle bir araya gelmesi gerekir[46]. Mitokondride doğru biyogenez, bu organel içindeki çoklu protein komplekslerini birleştiren bileşenlerin dengeli oranda üretilmesine bağlıdır. Mitokondriyal hasar ve işlev kaybı, yaşlanma, nörodejenerasyon ve miyopatilerin ayırt edici özellikleridir. Mitokondri, bugüne kadar tam olarak anlaşılmayan kendi farklı protein kalite kontrol sistemlerine sahiptir. Genomdan üretilen proteinler vazgeçilmez hücresel enerji üretimidir ve bu nedenle mitokondriyal protein sentezi yaşam için gereklidir ve bu süreçteki kusurlar etkili tedavileri olan yıkıcı hastalıklara yol açtığı gibi kanser, diyabet ve nöropatiye de neden olur. Mitokondriye protein alımı, mitokondriyal biyogenez sırasındaki kilit süreçlerden biridir ve nükleus kodlu/sitosol sentezlenmiş mitokondriyal proteinlerin tanınması ve organelle iletilmesi için gerekli bir dizi olayı içerir[47].

Mitokondriyal hedefleme sinyalleri, matrikse aktarıldıktan sonra bölünen ön diziler olarak adlandırılan N-terminalinde yer alan sinyallerdir. Bu ön diziler 15 ila 50 amino asitlik bir uzunluğa sahiptir ve bir tarafı pozitif yüklü kalıntılardan ve diğer tarafı

hidrofobik kalıntılardan zengin olan bir amfipatik  $\alpha$  sarmal oluşturur. Dış membran zar reseptörleri, hedefleme sinyallerini tanır ve mitokondriye hedeflenen proteinin ilk aşamalarına yardımcı olur. Çoğu mitokondriyal öncü protein, dış membranın Translokazını (TOM kompleksi) kullanarak organelere girer. Ön dizileri barındıran preproteinler için merkezi bir reseptör olan TOM22; ve kompleksin stabilizasyonu ve hücre döngüsünün fazına bağlı olarak biyogenezinin kontrol edilmesi için önemli olan küçük TOM5, TOM6 ve TOM7 alt birimleri ile ilişkilidir. Yüksek çözünürlüklü görüntüleme, kültürlenmiş insan hücrelerinde mitokondriyal protein sentezinin bölümlere ayrılmasını ortaya koyar[48]. İnsan mitokondrisi, mitokondriyal matrikste ifade edilen kendi genomu olan mitokondriyal DNA'yı içerir. Bu genom, oksidatif fosforilasyonu (OXPHOS) birleştiren çoklu alt birim komplekslerinin bileşenleri olan 13 hayati polipeptidi kodlar. Bu kompleksleri barındıran iç mitokondriyal zar, dış zara paralel uzanan iç sınır zarını, krista zarlarını oluşturan kıvrımları ve ikisini ayıran krista bağlantılarını içerir. OXPHOS komplekslerinin çeşitli türlerde bulunduğu bu kristal zarlarda gösterilmiştir. Transkripsiyon, mRNA işleme, olgunlaşma ve mitoribozom montaj sürecinin en azından bir kısmı nükleoidde ve uzamsal olarak yan yana yerleştirilmiş mitokondriyal RNA granüllerinde meydana gelir[49].

Huntington hastalığında (HD) nedensel protein olan mutant Huntingtin (mHTT), mitokondriyal iç zar 23 (TIM23) kompleksinin translokazıyla birleşir ve ilk olarak presemptomatik HD farelerde saptanan sinaptik mitokondriyal protein alımının inhibisyonu ile sonuçlanır[50]. mHTT eksprese eden hücre hatlarında, zara bağlı TIM23 ile aktarılan proteinler daha düşük intramitokondriyal seviyelere sahipken, dış zara entegre edilmiş TIM22 yolu proteinleri üzerinden aktarılan iç zar çok açıklıklı proteinler genellikle değişmeden kalır. Özetle, mitokondride, mHTT'nin TIM23'e yüksek afinite ile bağlandığını ve mHTT eksprese eden hücrelerden ve HD hastalarının beyin dokularından mitokondrinin, nükleusta kodlanmış proteinlerin alım seviyelerinin azaldığını, mitokondride, membranlar arası boşlukta yer alır. Mitokondriyal protein alışveriş mekanizması biyolojik önemini gösterir; nörodejeneratif hastalıklarla geniş ölçüde alakalı bir mekanizmadır. Mitokondrial stres mitokondriyal sitokrom c salınımı, kaspaz aktivasyonu, kalsiyum düzensizliği, enerjetik fonksiyonda azalma ve bozulmuş mitokondriyal dinamikler, TIM23 kompleksinin translokazına bağlanır ve mitokondriye ornitin transkarbamilaz (OTC) alımını engeller. Sinaptik mitokondri hücresel strese karşı aşırı hassastır [51].

Matriks için hedeflenen nükleusta kodlanan mitokondriyal proteinlerin iki zar boyunca taşınması gerekir. TOM ve TIM23 kompleksleri, öncü proteinlerin N-terminal hedefleme sinyalleriyle matrikse taşınmasını kolaylaştırır. Taşıma sırasında, öncüler, TOM kompleksinden geçiş için iç zardaki TIM23 kompleksi tarafından tanınır. TOM kompleksi (dış mitokondriyal membranın translokasyonu), mitokondriyal proteinler için genel giriş kapısı görevi görür[52]. İç zar translokasyonu için, öncü proteinlerin dış zar TOM kompleksinden iç zardaki TIM23 komplekslerine aktarılması gerekir. Haberci translokasyonu bir kez elde edildiğinde, bir TOM-TIM23-kapsayan öncünün geçici bir translokasyon ara maddesi oluşturulur ve bu, iki membran boyunca translokasyon işlemlerinin senkronize bir şekilde gerçekleştiğini gösterir. Buna göre, öncünün TOM'dan TIM23 kompleksine devri için, her iki kompleksin de birbirine yakın olması gerekir.[53]

Mitokondriyal proteinlerin %60'ından fazlası matriks bölmesine hedeflenir ve bileşenleri yüksek oranda korunan bir iç zara bağlı çok alt birimli makine olan presekans translokaz (TIM23 kompleksi) yoluyla yer değiştirir[54]. Ön dizi translokaz, esas olarak TIM23 proteini ile birlikte translokasyon gözenek bütünlüğünü koruyan merkezi kanal oluşturan bileşenlerden oluşurken, TIM50 ve TIM21 gibi zarlar arası büyük bir boşluğa maruz kalan alana sahip tek zar ötesi sarmal, TOM kompleksini translokazıyla etkileşim yoluyla ön proteinlerin önceden sınıflandırılmasına ve yönlendirilmiş kanallanmasına yardımcı olur. Kanal oluşturan bileşenlerin yanı sıra, TIM23 kompleksi, işlevleri matriks bölmesi için hedeflenen proteinlerin translokasyonu için gerekli olan çevresel olarak ilişkili bir bölge devreye girer. Bu ek temel olmayan bileşenler TIM23 kompleksinin organizasyonunda ve alımında yer alır. Filogenetik olarak TIM23, politopik bir membran proteindir[53].

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ**

#### **3.2. HÜCRELERİN PROLİFERASYONU**

Çalışmada Avrupa Tip Kültürü Koleksiyonu (ATCC), kaynaklı olan, normal umblikal kord kökenli mezenkimal kök hücre hattı (PCS500010) kullanıldı. Hücreler %10 'luk fetal sığır serumu (FCS), 0.2 µM glutamin, 100 µg/ml streptomisin, 100 IU/ml penisilin içeren DMEM-F12 medyumı ile (Dulbecco 'nun modifiye edilmiş Eagle medyumı ve besleyici F12 ham medyumı) %5 CO<sub>2</sub> ve % 95 hava içeren, 37 °C 'lık inkübatörde 25 ve 75 cm<sup>2</sup> 'lik flasklarda üretildi.

Hücreler flaskların yaklaşık % 70-80 'ini kapladıklarında pasajlandı. Medyum uzaklaştırıldıktan sonra flaskta kalan hücreler fosfat tamponu ile yıkandı. Flaska yapışan hücreler, % 2 'lik tripsin ile flask yüzeyinden kaldırıldı ve üzerine tripsin miktarı kadar medyum ilave edildi. Hücreler pipetaj aracılığıyla toplandı ve santrifüj tüpüne aktarıldı. Hücreler 1500 rpm 'de beş dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı ve 2 ml medyum ilave edilip pipetaj yapıldı. Hücreler medyum içeren flasklara ekilerek inkübe edildiler.

Çalışmamızda hücre sayısını hesaplayabilmek için Neubauer lamı kullanıldı. Hücreler tamponla yıkandı ve % 2 'lik tripsin konuldu. Hücreler inkübatörde kontrol edilerek bekletildi ve zeminden ayrıldığında medyum ilave edildi. Hücreler pipetaj yapılarak tüp içerisine alındı ve santrifüj edildiler. Daha sonra tripsinli medyum atılarak hücre miktarına göre medyum ilave edildi. Hücre süspansiyonu Neubauer lamına alındı ve dört kare sayılarak ortalaması, sulandırma katsayısıyla çarpılarak toplam hücre sayısı hesaplandı (Toplam hücre sayısı / ml = sayım ortalaması  $\times 10^4$   $\times$  medyum miktarı).

#### **3.3. HİDROJEN PEROKSİT ve MİRİSETİN DOZ BELİRLENMESİ**

Çalışmada kullanılacak uygun dozların belirlenebilmesi için yüksek, düşük ve orta konsantrasyonlar uygulanarak ön deneyler yapıldı. Uygun konsantrasyonlar ve uygulama saatleri ayarlandı. Çalışmada, Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 5, 10 ve 50 µl 'lık

konsantrasyonları, kullanıldı. Hücreler 6 kuyucuklu kültür kablarında 37 °C'de inkübe edildi. Yaklaşık % 70-80 oranında kültür yüzeyini kaplayan hücreler, farklı hücre hatlarıyla yapılan önceki çalışmalara göre belirlenen 5 µM (düşük) 50 µM (50-100 orta doz), 500 µM (hücre ölümü görülmeye başlar) ve 1000 µM (yüksek doz 200-400 – öldürücü doz) dozları referans alınarak 500, 1000 ve 5000 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [55-60] (% 30 (w/v) çözelti, ürün numarası /GBF No.:1.07209, Merch, Almanya) içeren ve/veya içermeyen medyumda 37°C'de 24 saat inkübe edildiler. Tüm gruplar sayım için PBS ile yıkandı, tripan mavisile boyandı ve sayıldı. Daha sonra lameller immünohistokimya boyamaları için fikse edildi.

Toz halinde bulunan mirisetin (TCI-M2131, Tokyo chemical industry), dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözüldü. Stok solüsyonlar hazırlanarak filtre edildi. Hazırlanan stok solüsyonları DMEM/F12 medyumuna ile dilüe edilerek hücrelere uygulanacak konsantrasyonlar hazırlandı. Mirisetin dozları farklı hücre hatlarıyla yapılan önceki çalışmalara göre belirlenen 1 µM, 5 µM ve 25 µM olacak şekilde çözündürülerek 24 saat uygulandı [61-67]. Hücreler tripan mavisı boyasıyla boyandı, sayıldı ve canlı hücre oranları saptandı. Lameller metanol ile 5 dk fikse edildiler. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve Mirisetin dozları olarak sırasıyla 500 µM ve 5 µM olarak belirlendikten sonra 24 saat deney gruplarına uygulandılar. Gruplar; kontrol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubu, Mirisetin grubu, Mirisetin+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubu olarak belirlendi.

### **3.4. HİDROJEN PEROKSİT ve MİRİSETİN UYGULANMASI**

Hücreler, yaklaşık % 70-80 yoğunluğa ulaştığında, % 2' lik tripsinle kaldırıldı ve 1:1 oranında medyum ilave edilerek, santrifüj tüpüne alındı. Santrifüj işleminden sonra süpernatant atıldı, pellet üzerine medyum eklenerek süspansiyon haline getirildi ve sayım işlemi yapıldı. Hücreler kuyucuklu (well plate) kültür kaplarına alındı ve her bir grup için üçer kuyucuğa DMEM-F12 medyum konuldu. Herbir kuyucuğa yaklaşık sayısı 10<sup>5</sup> olan mezenkimal hücre ekildi ve 24 saat sonra medyum uzaklaştırıldı. Gruplara H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve mirisetin içeren medyum karışımları uygulandı ve hücreler 37 C ° 'de % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 24 saat bekletildi. Deneyler her grup için üçer kez tekrarlandı. Daha sonra %0,1'lik tripan mavisı ile eşit miktarda hücre içeriği karıştırılarak sayıldı ve canlı hücre oranları belirlendi.

### 3.5. İMMÜNOSİTOKİMYASAL BOYAMALAR

Hücreler, yaklaşık % 70-80 yoğunluğa ulaştığında, % 2 'lik tripsinle kaldırıldı, 1:1 oranında medyum ilave edildi ve santrüfuj tüpüne alındı. Santrüfuj ve sayım işlemlerinden sonra, yuvarlak lamellere eşit miktarda olacak şekilde ekildi ve medyum ilave edilerek inkübatörde 24 saat bekletildi. Daha sonra gruplara H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve mirisetin içeren medyum karışımları uygulandı ve hücreler 37 C° 'de % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 24 saat bekletildi. Süre sonunda medyumlar uzaklaştırıldı, hücreler PBS ile yıkandı. Lameller metanol ile 5 dk tespit edildi ve boyama işlemine kadar dolapta +4 C° 'de bekletildi.

#### 3.5.1. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BOYAMALAR

Tespit edilmiş yuvarlak lameller immünohistokimyasal boyamalar için işleme alındı. Lameller önce distile su ile 3 kez 2 dk ardından PBS ile 3 kez 5 dk yıkandı. Endojen peroksidazı bloklamak için hidrojen peroksitte (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) bekletildi (5 dk). Daha sonra PBS ile yıkandı 3 kez 5 dk ve özgül olmayan antikor bağlanmalarını engellemek için 5 dakika blok serumda bekletildi. İmmünohistokimyasal boyamalar için TIM17 (Santa cruz, sc-271152, 1:100 dilusyon), TNF - $\alpha$  (Biorbyt Ltd, orb371962, 1:50 dilusyon) ve kaspaz-3 (sc-56053, 1:100 dilusyon) primer antikorları, HRP/AEC (ABC) IHC Kiti ve 3-amino-9-etilkarbazol (AEC) kromojeni kullanıldı.

Lamellere 1/50 oranında dilüe edilmiş olan primer antikorlar uygulandı ve bir gece +4 °C 'de buzdolabında bekletildi ve daha sonra 2 kez 2'şer dakika PBS'den geçirildi. Lamellere 10 dakika biyotinli anti-polivalent uygulandı ve 4 kez 2'şer dakika PBS 'den geçirildi. Lameller 10 dakika streptavidin peroksidaz 'da bekletilerek 4 kez 2'şer dakika PBS ile yıkandı. Lameller AEC kromojeniyle boyanarak distile su ile yıkandı. Zıt boyama Mayer's hematoksileni ve/veya metilen yeşili ile yapıldı, ardından çeşme suyu ile yıkandı ve su bazlı bir kapatıcı ile kapatıldı. Boyanan örnekler ışık mikroskopunda incelendi ve fotoğrafları çekildi.

#### 3.5.2. GÖRÜNTÜ ANALİZİ

İmmünohistokimyasal olarak boyanan ve lam üzerine alınan yuvarlak lameller bir DP72 Olympus kamera sistemli bir Olympus BX61 mikroskop ile X 40 objektif

kullanılarak fotoğraflandı ve görüntü kayıtları TIFF (Tagged Image File Format; Görüntü Dosyası Formatı) olarak saklandı. Analiz edilen alandaki pozitif piksel oranını ölçmek için image J analiz programı ile görüntü analizi yapıldı.

Image J analiz programında 8-bit 'lik boyanmış kesitlere renk dekonvolüsyon işlemi uygulandı. Renk dekonvolüsyon işlemi sonrasında elde edilen algoritmalar istatistiksel olarak değerlendirildi. Her grupta yer alan boyamalardan (n=5) x 40 büyütmede elde edilen 3 ayrı görüntüye renk dekonvolüsyon işlemi uygulandı [68-70]. Renk dekonvolüsyon işlemi sonrasında elde edilen algoritmalar istatistiksel olarak değerlendirildi.

### **3.6. ELEKTRON MİKROSKOP YÖNTEMLERİ**

Her deney grubundan elde edilen hücrelerin ince yapı özelliklerinin değerlendirilmesi için elektron mikroskopik inceleme yapıldı. Elektron mikroskobu için hücrelerin medyumunu atıldı, fosfat tamponu ile yıkandıktan sonra tripsinle toplanarak santrifüj edildi. Pellet halindeki hücreler % 2,5 'lik gluteraldehit solüsyonunda + 4 °C 'de 30 dakika tutularak tespit edildi. Hücreler fosfat tamponunda +4 °C 'de 10 dakika yıkama yapılarak % 1 'lik osmik asit içinde +4 °C 'de 1 saat bekletildi. Hücreler fosfat tamponunda +4 °C 'de 10 dakika yıkandı. Kontraslama için hücreler % 1 'lik uranil asetat 'da +4 °C 'de 30 dakika bekletildi ve fosfat tamponunda +4 °C 'de 10 dakika yıkandı. Hücreler % 30 'luk ve % 50 'lik alkol içinde 10 dakika bekletildi. Daha sonra hücreleri bir arada tutabilmek için yumurta akı kullanıldı ve hücreler santrifüj edildi. Hücreler, % 70 alkolde +4 °C 'de bir gece bekletildi. Ertesi gün oda sıcaklığında 10 dakika sırasıyla, % 90, % 100 alkol serilerinden geçirilerek 2 kez 10 dakika propilen oksitte bekletildi. Hücreler sırayla 1:1, 1:3 oranında propilen oksit epon karışımında ve saf eponda oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Daha sonra hücreler, epon içeren kapsüllere gömülerek etüvde 60°C 'de 18 saat bekletildi. Polimerize olan epon bloklardan Leica EM UC7 ultramikrotomda, elmas bıçak ile yaklaşık 60 nm kalınlıkta alınan kesitler bakır gridler üzerine alındı. Gride alınan kesitler, uranil asetat ve kurşun nitrat ile kontrastlanarak Jeol JEM 1011 transmisyon elektron mikroskobunda incelenendi. Mega View III dijital kamera ve Soft Imaging System AnalySIS programı ile görüntülendi.

### **3.7. İSTATİKSEL ANALİZLER**

İstatistik analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) programı kullanıldı. Sonuçlar, tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ve post- hoc TUKEY testleri kullanılarak değerlendirildi. İstatistik analizler için güven aralığı  $p < 0.05$  anlamlı olarak kabul edildi.

### **3.8. MALZEME VE CİHAZ LİSTESİ**

#### **3.8.1.Malzemeler ve Kimyasal Maddeler**

Ketalar (Pfizer), Rompun (Bayer), Etil Alkol (Merck,1.00983.2500), Toluol (Sigma,32249), Mikrotom Bıçağı (Feather A35), Metanol (Merck), Pozitif yüklü lam (Laborant), Anti TIM17 monoklonal primer antikorları (Santa Cruz sc-271152) Anti TNF- $\alpha$  monoklonal primer antikorları ( Biorbyt Ltd,orb371962) ve Anti Kaspaz 3 monoklonal primer antikorları (sc-56053), Ultra V Blok (Thermo,TA-125-UB), Biotinylated Goat Anti Polyvalent Sekonder Antikor (Thermo,TP-125-BN), Streptavidin Peroksidase (Thermo, TS-125-HR), AEC Substrate (Thermo,TA-125-HAS), AEC Chromogen (TA-007-HAC), Aqua Mount (Thermo,TA-125-AM), Glutaraldehit (Merck,104239), Osmium tetroksit (ESM), Epoxy Embedding Medium Kit (Sigma,45359-1EA-F), Bakır Grid (EMS G100-Cu), Jelatin Kapsül (Size 3) (EMS 70104).

#### **3.8.2.Cihazlar**

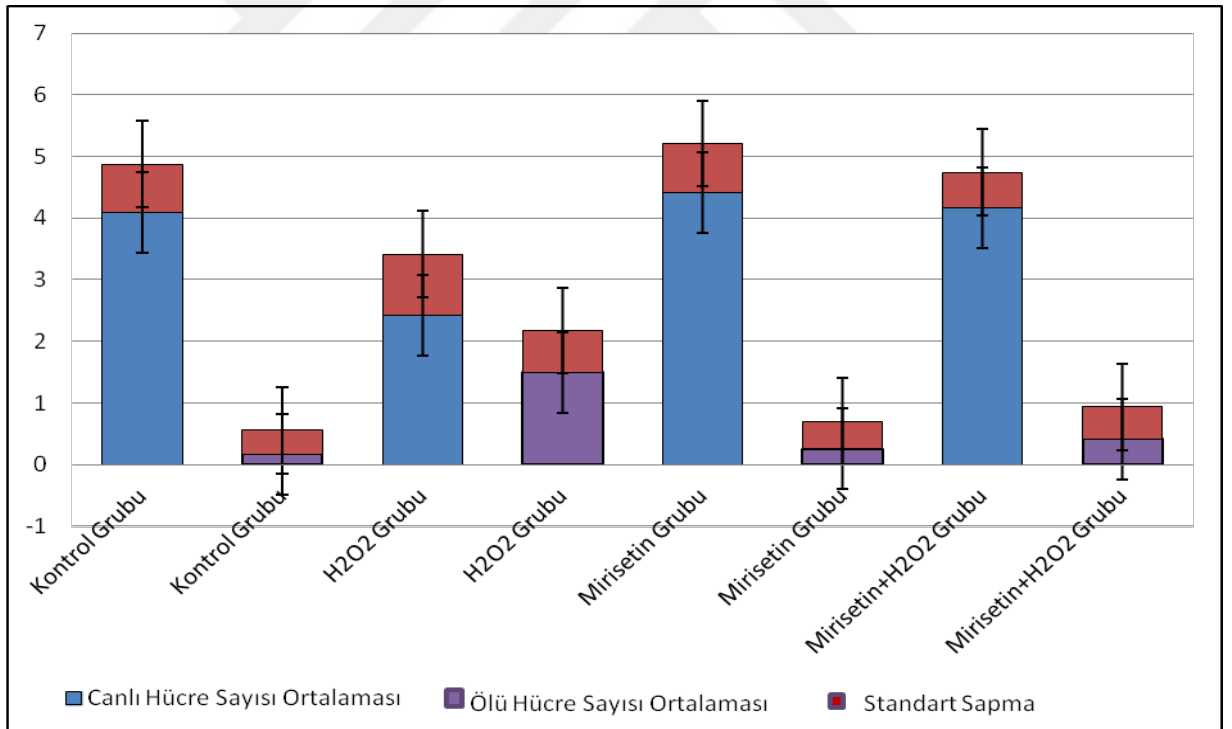
Doku takip cihazı (Leica TP1020) Mikrotom (Leica RM 2255),Ultramikrotom (EM UC7), Geçirimli Elektron Mikroskobu (JEOL-JEM 1011), Işık Mikroskobu (Olympus BX40).

## 4.BULGULAR

### 4.1. CANLI VE ÖLÜ HÜCRE SAYIMLARI

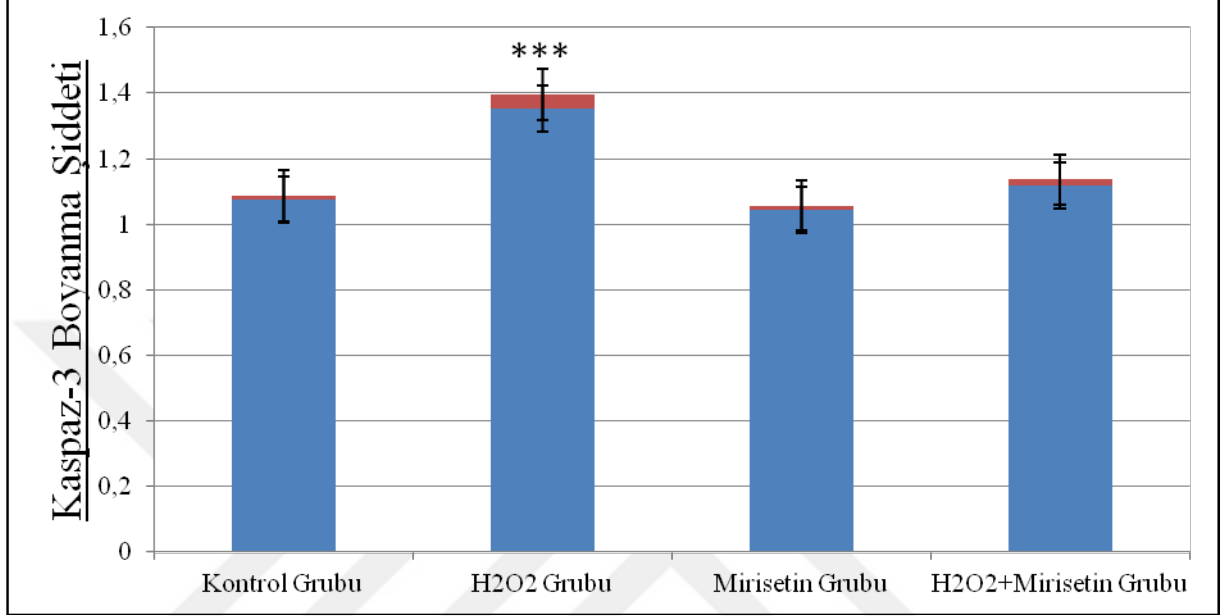
Kontrol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mirisetin ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+mirisetin gruplarının tripan mavisi boyamasıyla canlı ve ölü hücre sayımları istatistiksel olarak analiz edildi. Gruplar arasında canlı hücre sayıları bakımından H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubu ile kontrol, mirisetin ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+mirisetin grupları arasındaki fark anlamlıydı. Gruplar arasında canlı hücre sayıları bakımından kontrol grubu ile mirisetin ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ mirisetin grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı.

Gruplar arasında ölü hücre sayıları bakımından H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubu ile kontrol, mirisetin ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+mirisetin grupları arasındaki fark anlamlıydı. Gruplar arasında ölü hücre sayıları bakımından kontrol grubu ile mirisetin ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ mirisetin grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı. (Şekil 4.1.1).

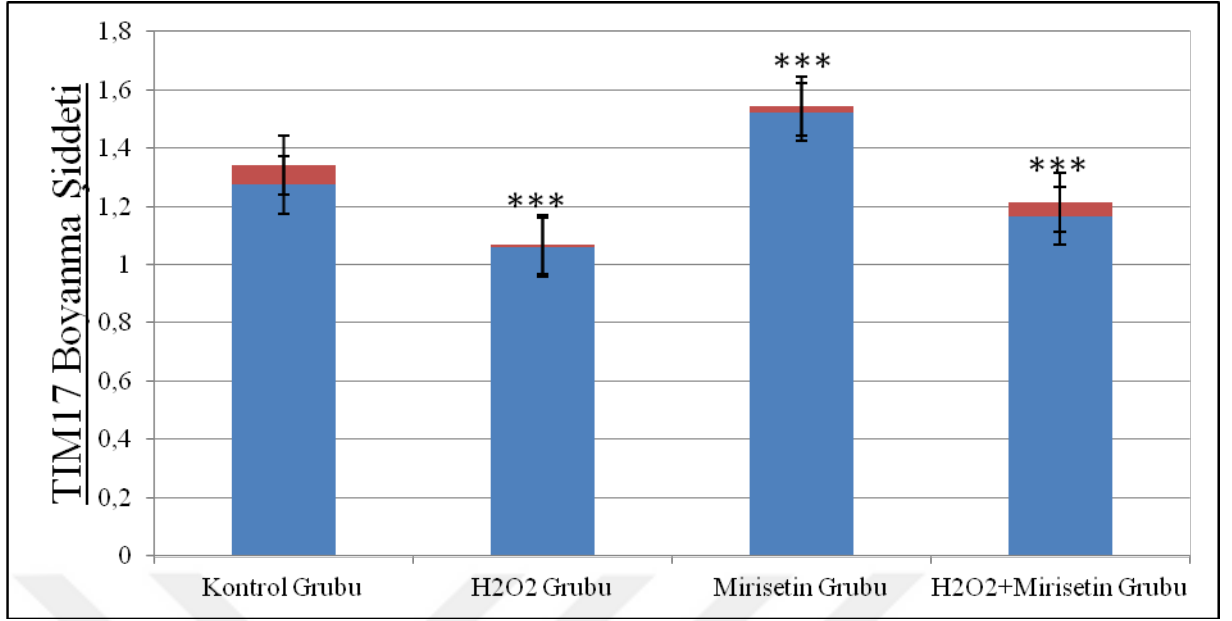


**Şekil 4.1.1.** Kontrol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mirisetin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+mirisetin gruplarının canlı ve ölü hücre sayımlarını gösteren grafik.

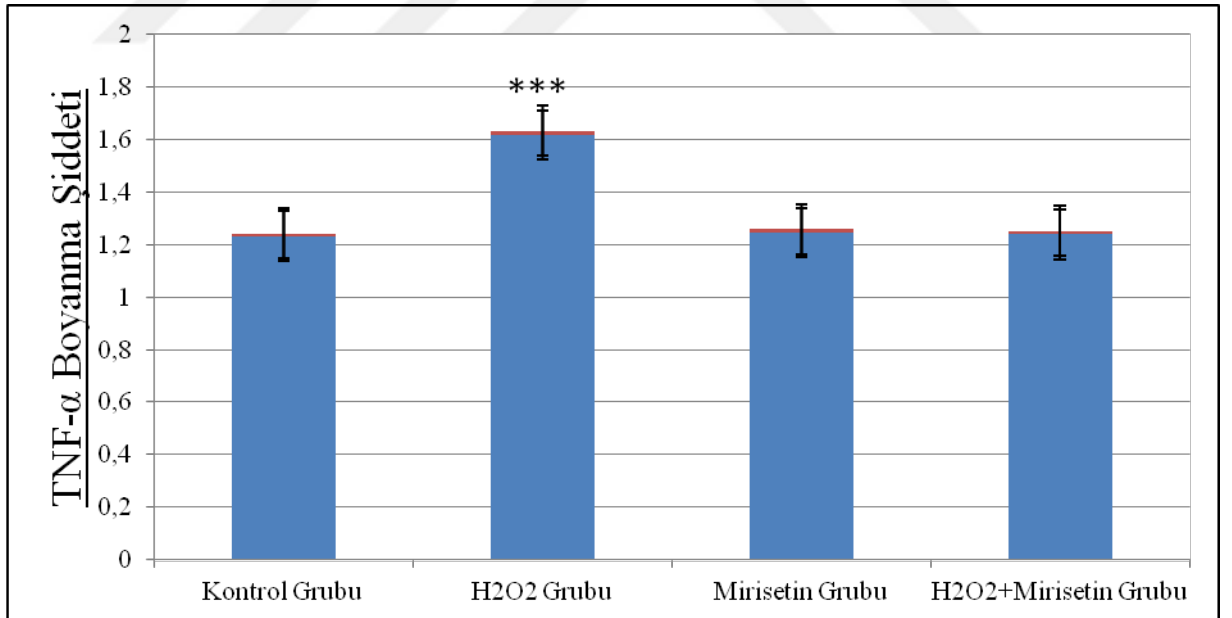
#### 4.2.İMMÜNOSİTOKİMYA BOYAMALARI



**Şekil 4.2.1.** Kontrol grubu, mirisetin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+mirisetin ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gruplarının image J analiz programı kullanılarak, kaspaz-3 antikoru immünohistokimyasal boyanma şiddetini gösteren grafik. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gösteren gruplar \*\*\* işareti ile belirtilmiştir (p< 0,001).



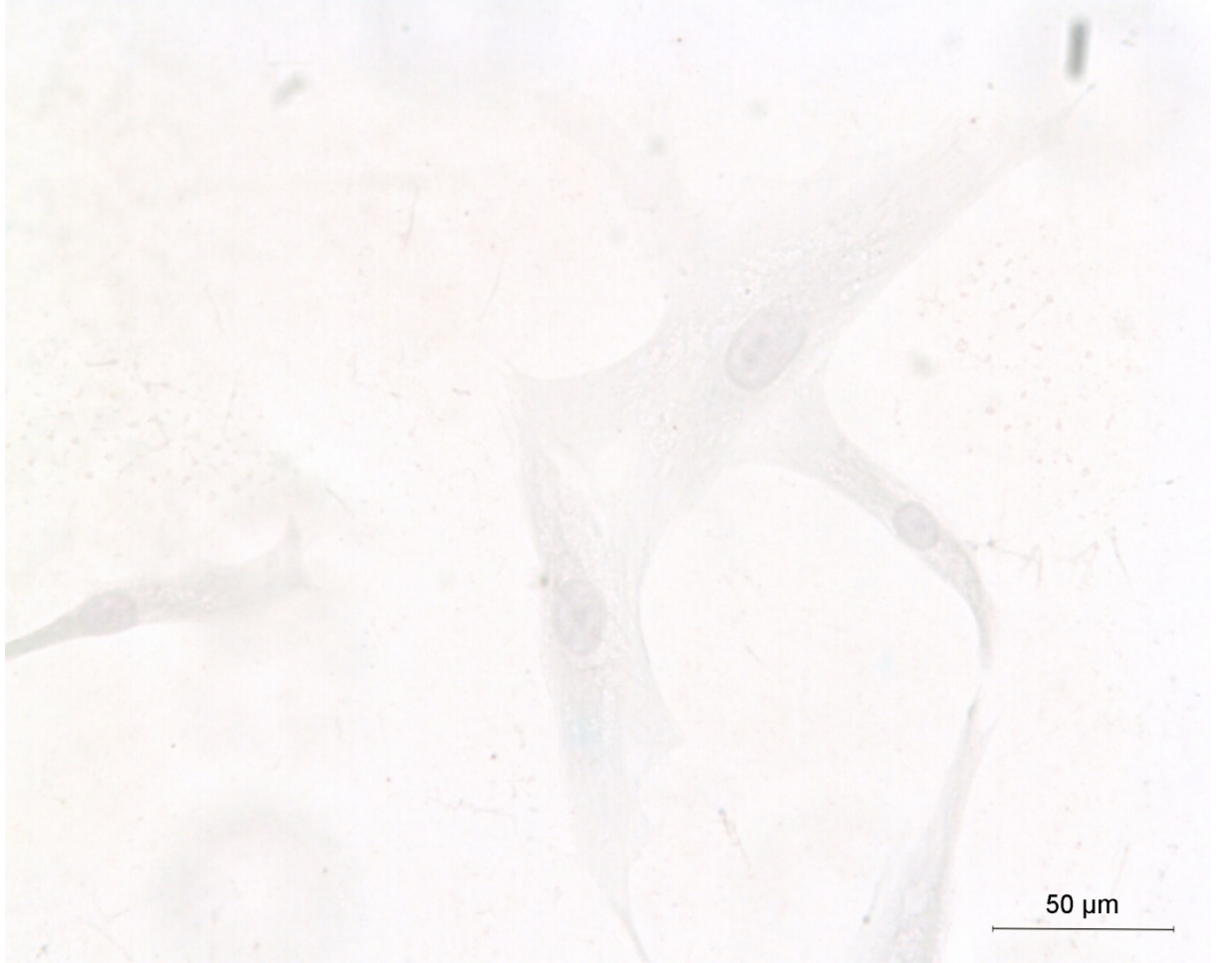
**Şekil 4.2.2.** Kontrol grubu, mirisetin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+mirisetin ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gruplarının image J analiz programı kullanılarak, TIM17 antikoruna immünohistokimyasal boyanma şiddetini gösteren grafik. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gösteren gruplar \*\*\* işareti ile belirtilmiştir (p< 0,001).



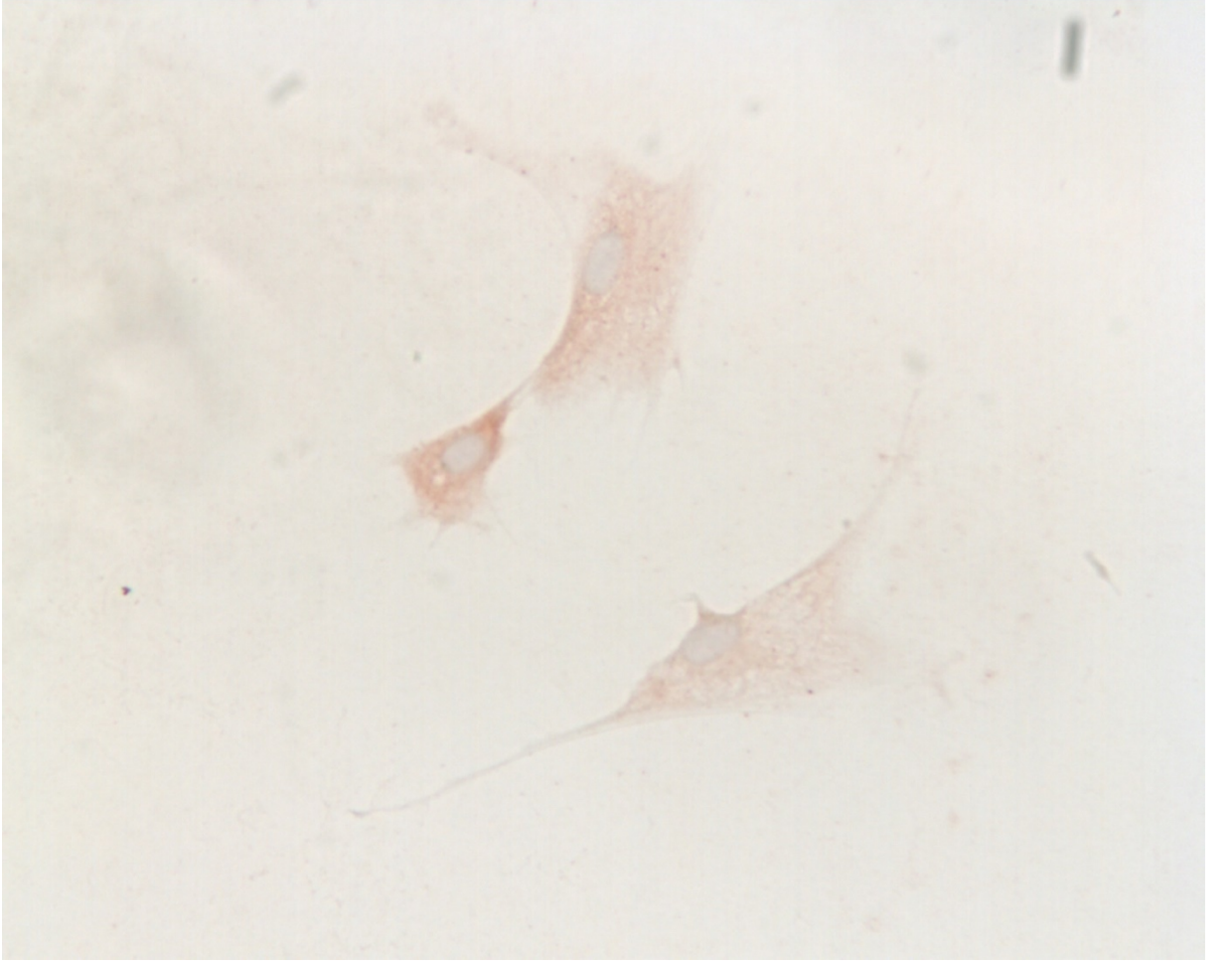
**Şekil 4.2.3.** Kontrol grubu, mirisetin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+mirisetin ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gruplarının image J analiz programı kullanılarak, TNF-α antikoruna immünohistokimyasal boyanma şiddetini gösteren grafik. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gösteren gruplar \*\*\* işareti ile belirtilmiştir (p< 0,001).

#### 4.3. KASPAZ-3 ANTİKORU İMMÜNOTOKİMYA BOYAMALARI

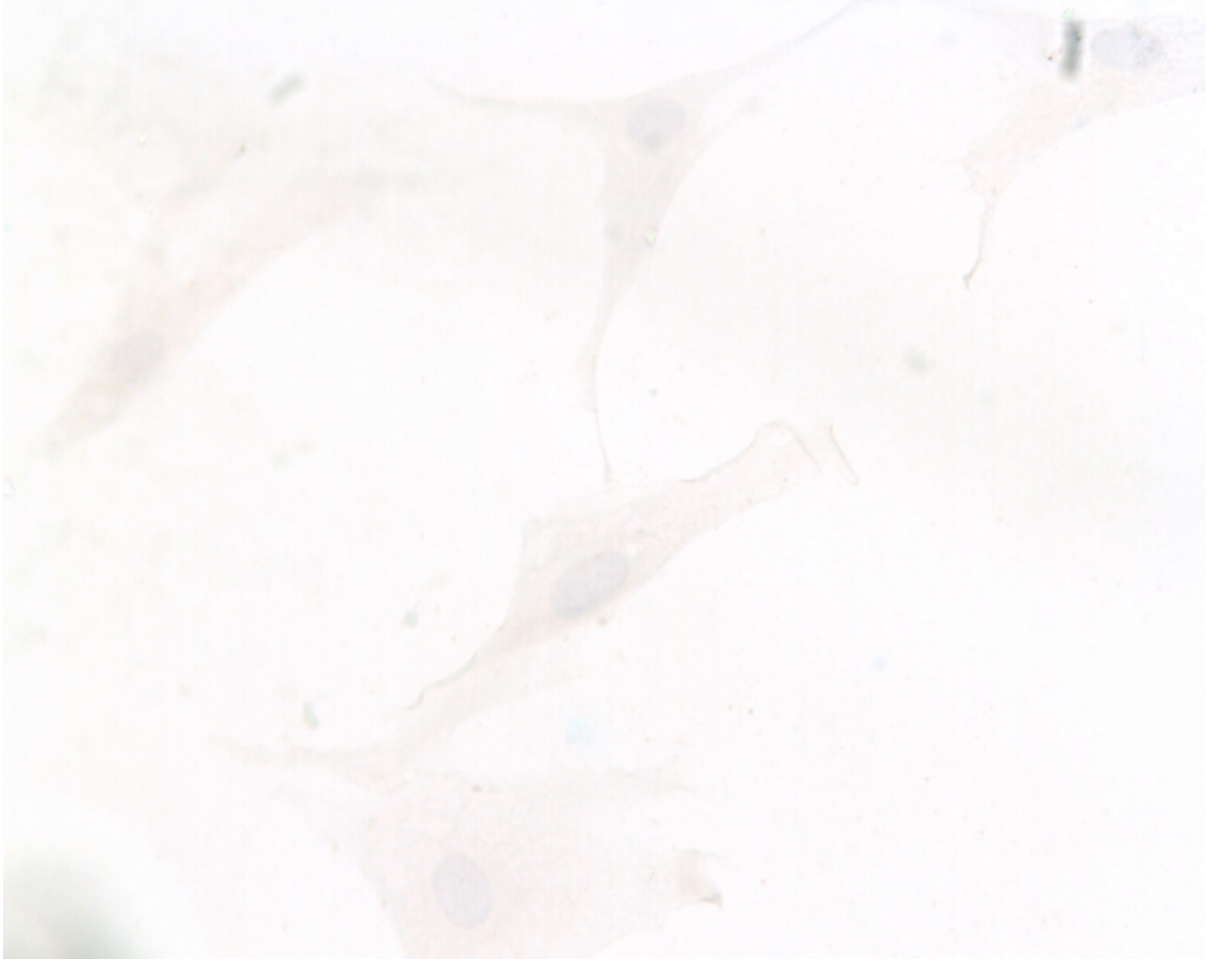
Görüntü analiz programı ile kaspaz-3, TIM17 ve TNF- $\alpha$  antikorlarının boyanma şiddetlerine bakıldı. Kontrol grubu ile mirisetin ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+mirisetin gruplarının kaspaz 3 antikoru boyanma şiddeti bakımından anlamlı bir fark bulunmadı ( $p= 0,0564$  ve  $p=0,098$ , Şekil 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3 ve 3.10.4). Kontrol grubu ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gruplarının kaspaz 3 antikoru boyanma şiddeti bakımından aralarındaki fark ise anlamlıydı (şekil 3.9.1  $p< .0001$ ).



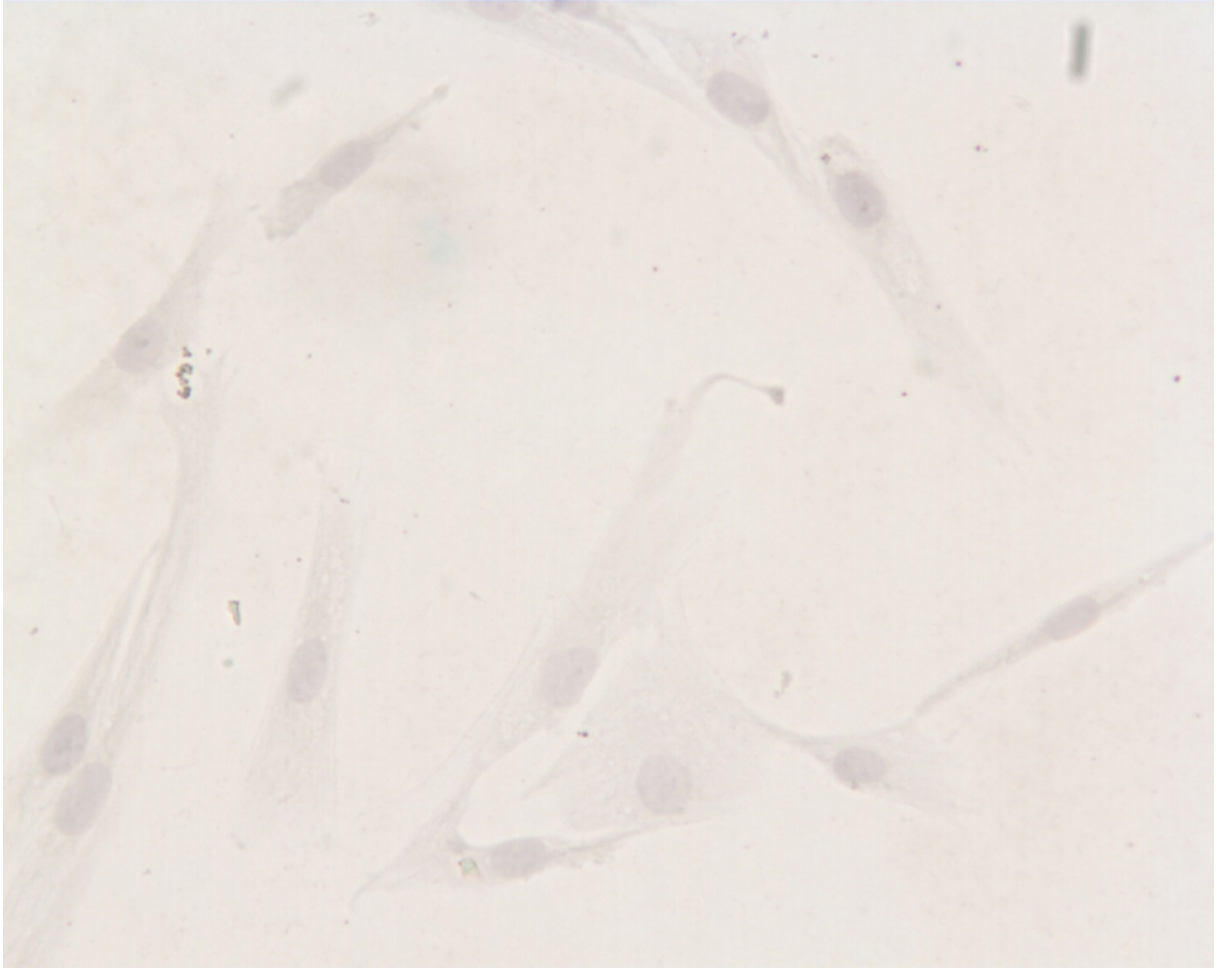
**Şekil 4.3.1.** Kontrol grubunun kaspaz-3 antikoru immünotokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı.



**Şekil 4.3.2.**  $H_2O_2$  grubunun kaspaz-3 antikoruna immünohistokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı.



**Şekil 4.3.3.** Mirisetin grubunun kaspaz-3 immünositokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı.

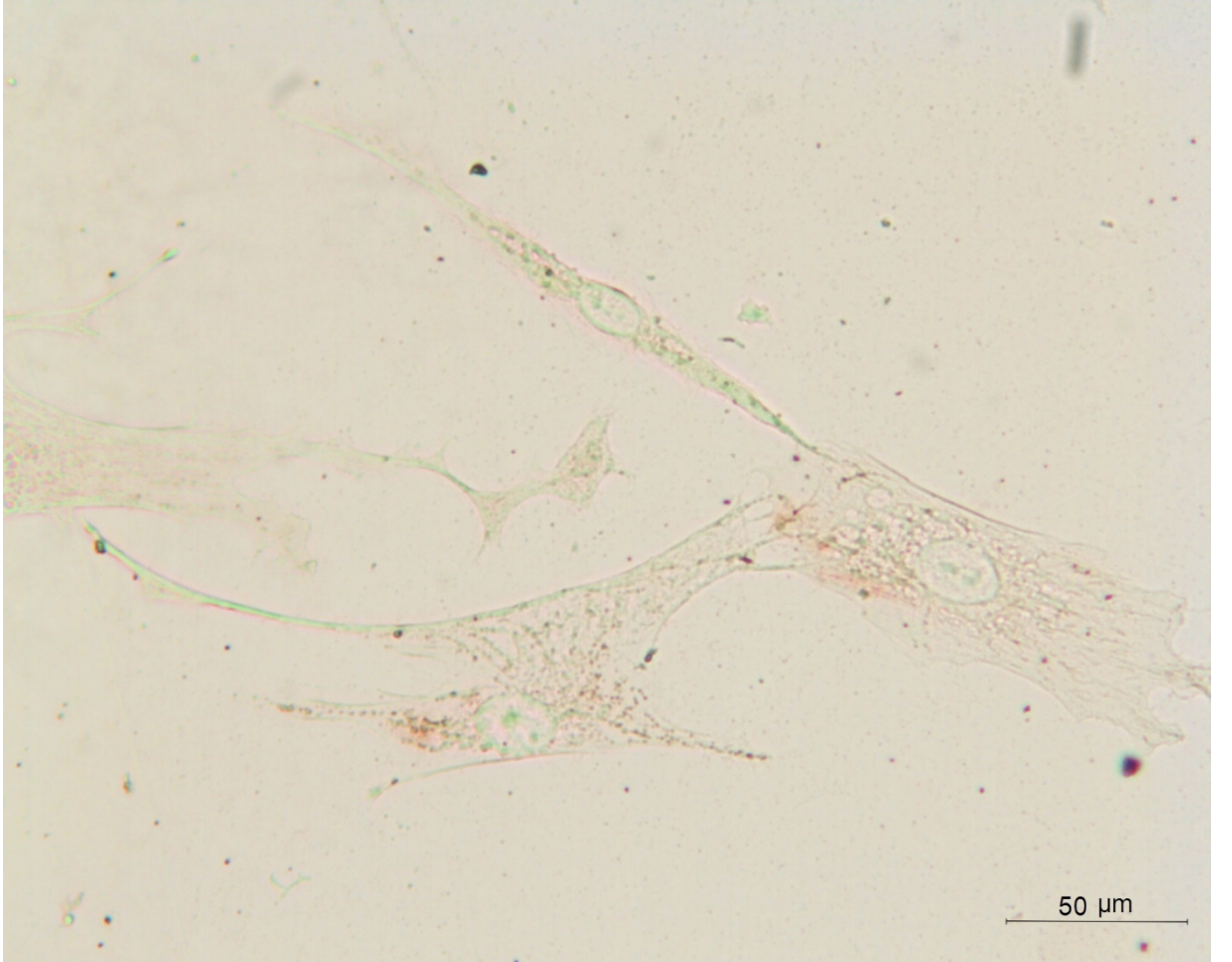


**Şekil 4.3.4.**  $H_2O_2$ +mirisetin grubunun kaspaz-3 immünositokimya boyamasının ayrıntısını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı.

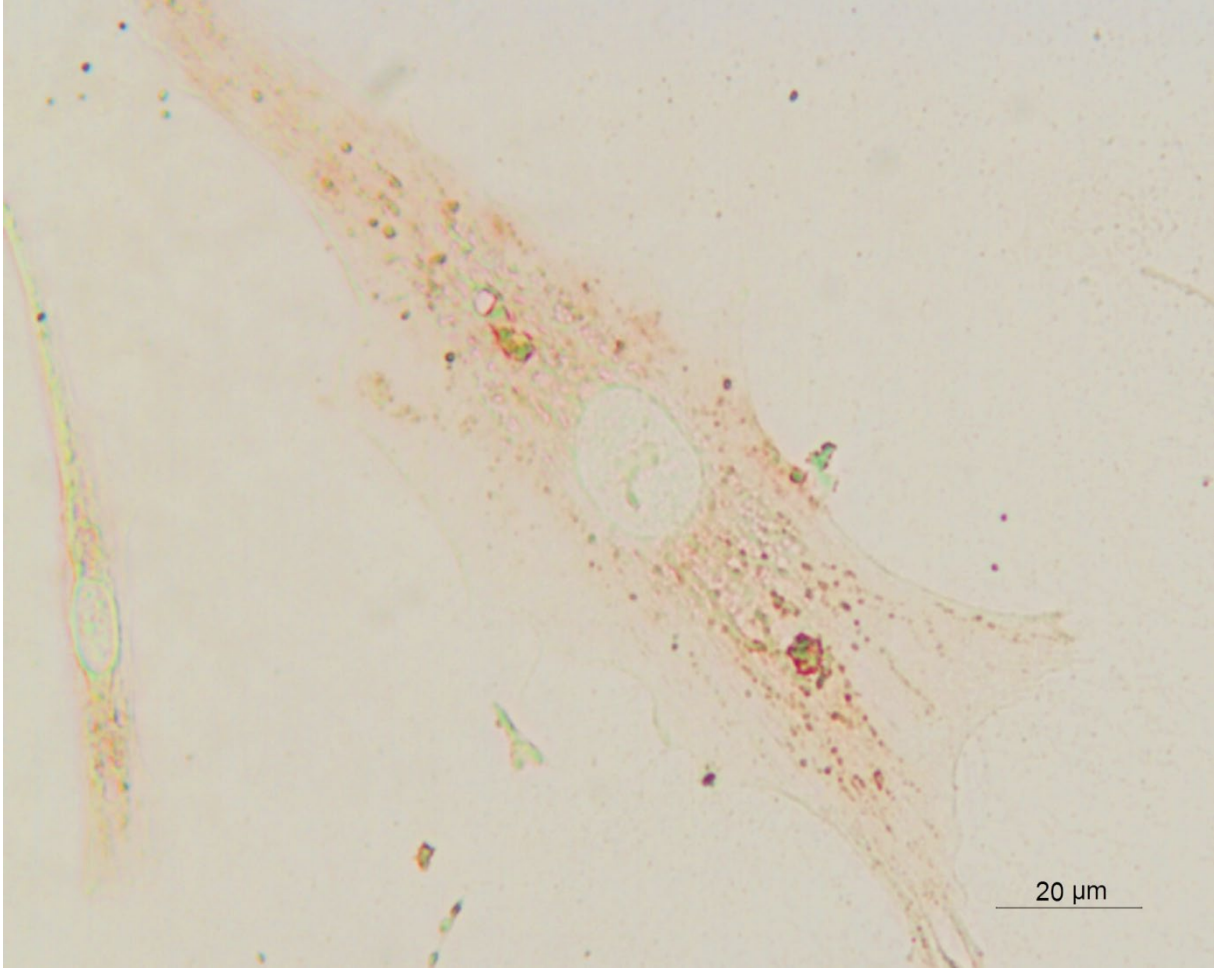
#### **4.4. TIM17 ANTİKORU İMMÜNOSİTOKİMYA BOYAMALARI**

Kontrol grubu ile  $H_2O_2$ , mirisetin ve  $H_2O_2$ +mirisetin gruplarının TIM17 antikoruna boyanma şiddetine bakıldığında aralarındaki fark anlamlıydı ( $p < 0,001$  Şekil 3.9.2, Şekil 4.4.1, 4.4.2, 4.4.3, 4.4.4, 4.4.5, 4.4.6, 4.4.7 ve 4.4.8).  $H_2O_2$  grubunun TIM17 antikoruna boyanma şiddetinin kontrol grubuna göre azaldığı gözlemlendi. TIM17 antikoruna immünositokimya boyamasıyla ışık mikroskobunda, MKH'lerin boyanma özellikleri incelendi. Kontrol grubunda TIM17 antikoruna immünositokimya boyamasıyla sitoplazmasında küçük oval ve yuvarlak granüller tarzda orta şiddette boyanmalar gözlemlendi.  $H_2O_2$  grubunun TIM17 antikoruna immünositokimya boyanması çok soluk veya yoktu. Mirisetin grubunun TIM17 antikoruna sitoplazmasında büyük ve yaygın granüller ve kaplan derisi tarzında ve nükleusunda da granüller tarzda koyu şiddetle

boyanmalar gözlemlendi. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+mirisetin grubunun TIM17 antikoruyla sitoplazmasında yaygın kaplan derisi tarzında orta ve koyu şiddetde bir boyanma gözlemlendi.



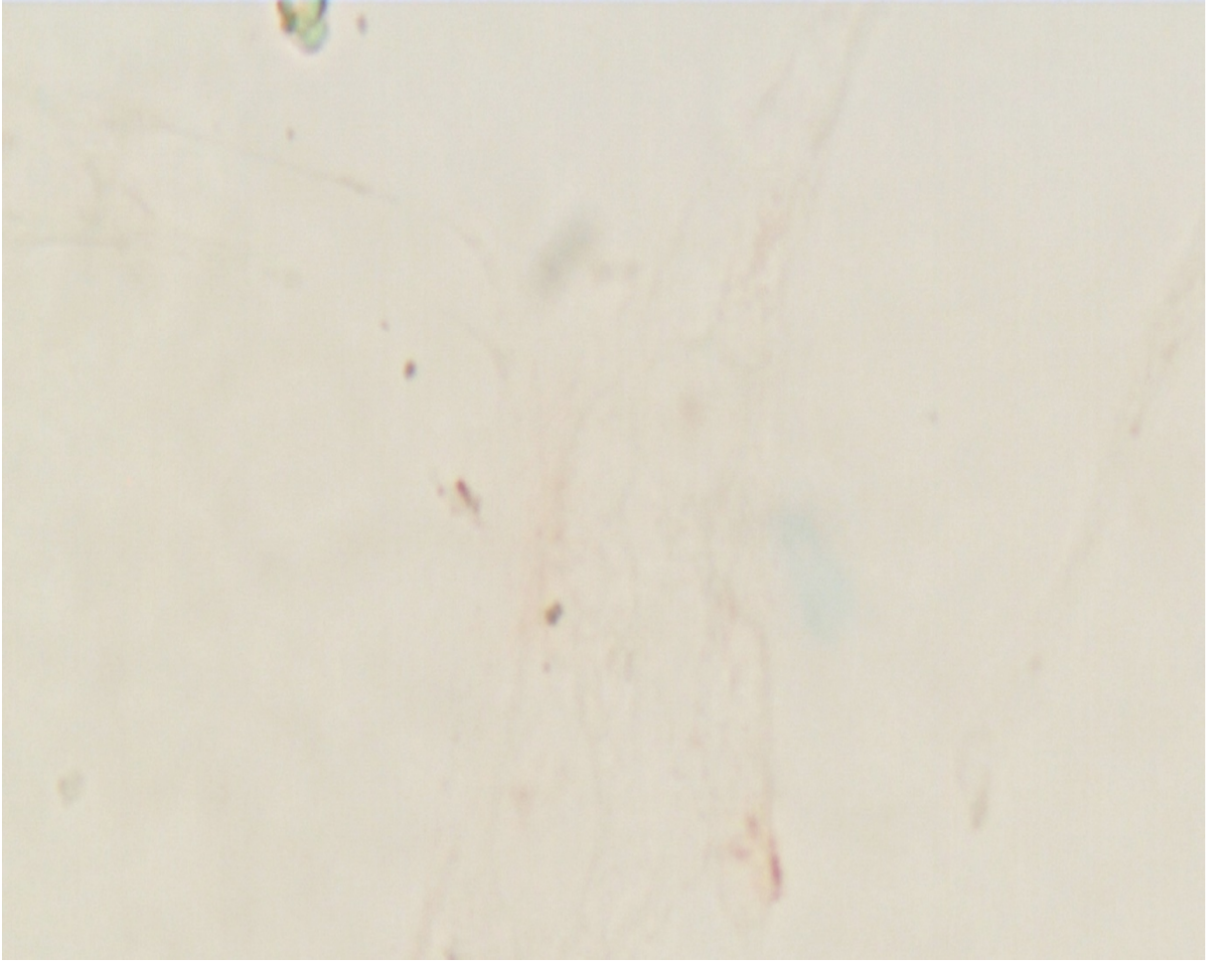
**Şekil 4.4.1.** Kontrol grubunun TIM17 immünohistokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı. A-D fotoğrafları için bar 50 µm.



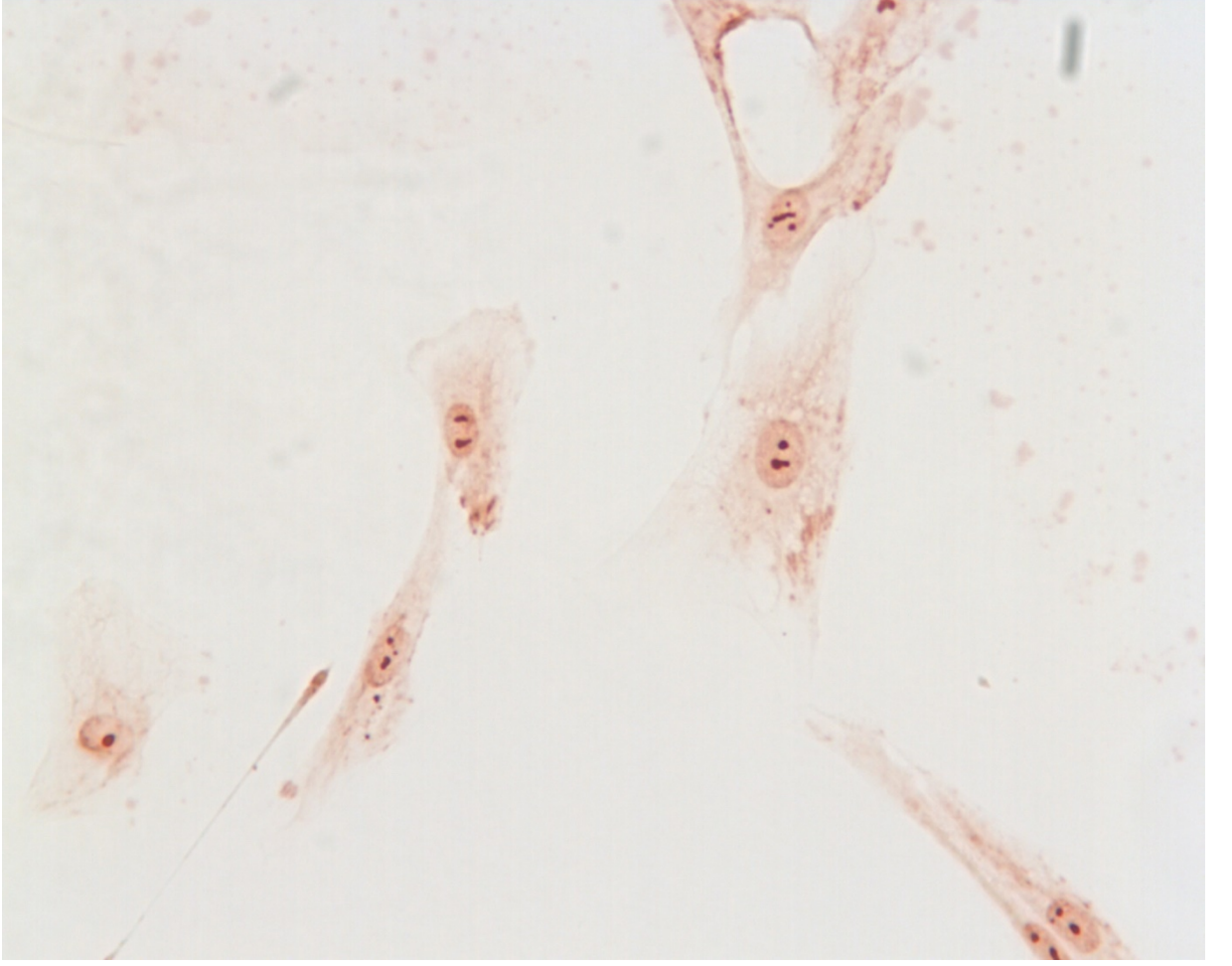
**Şekil 4.4.2.** Kontrol grubunun TIM17 immünohistokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı. A-D fotoğrafları için bar 20 µm.



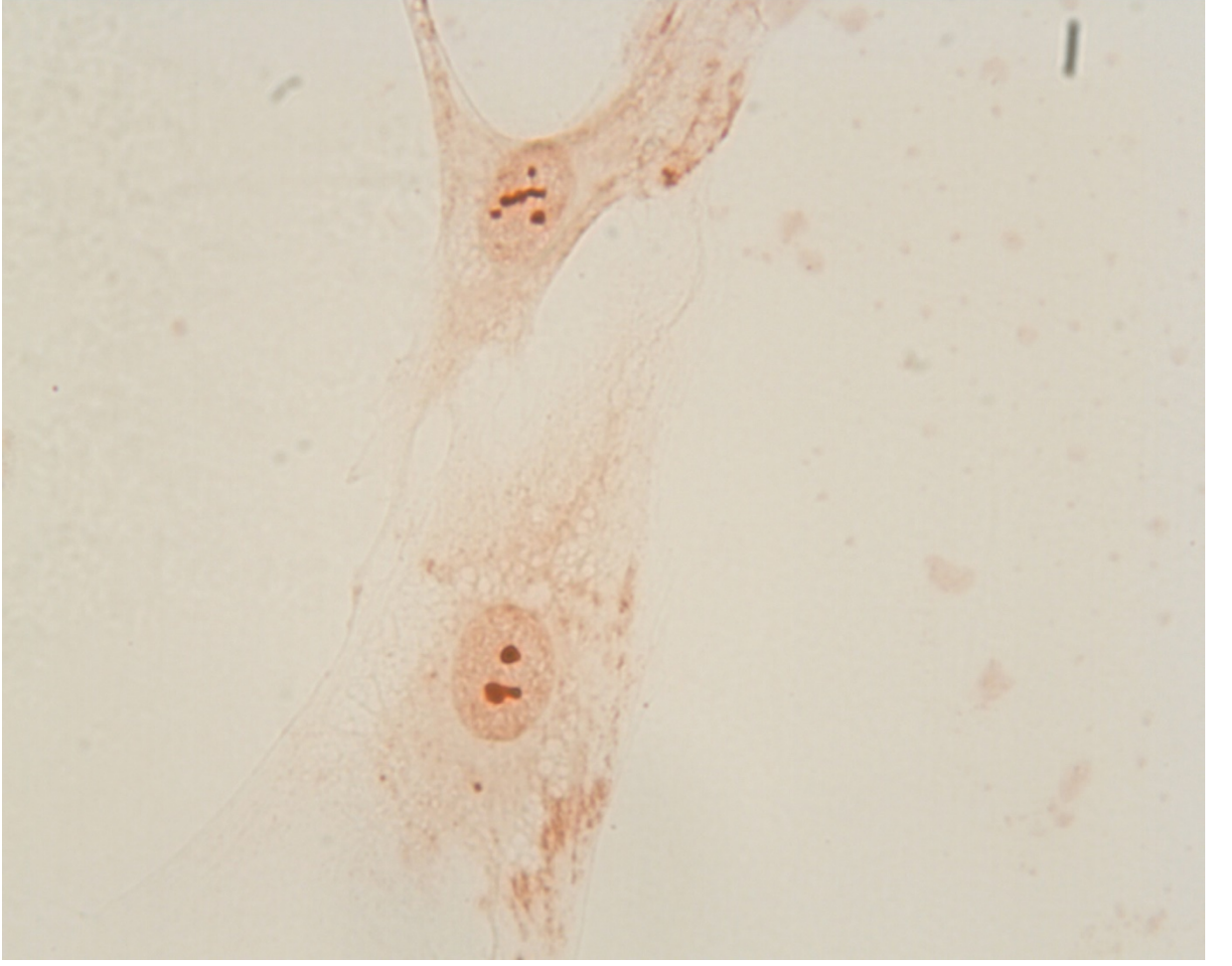
**Şekil 4.4.3.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubunun TIM17 immünositokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı.



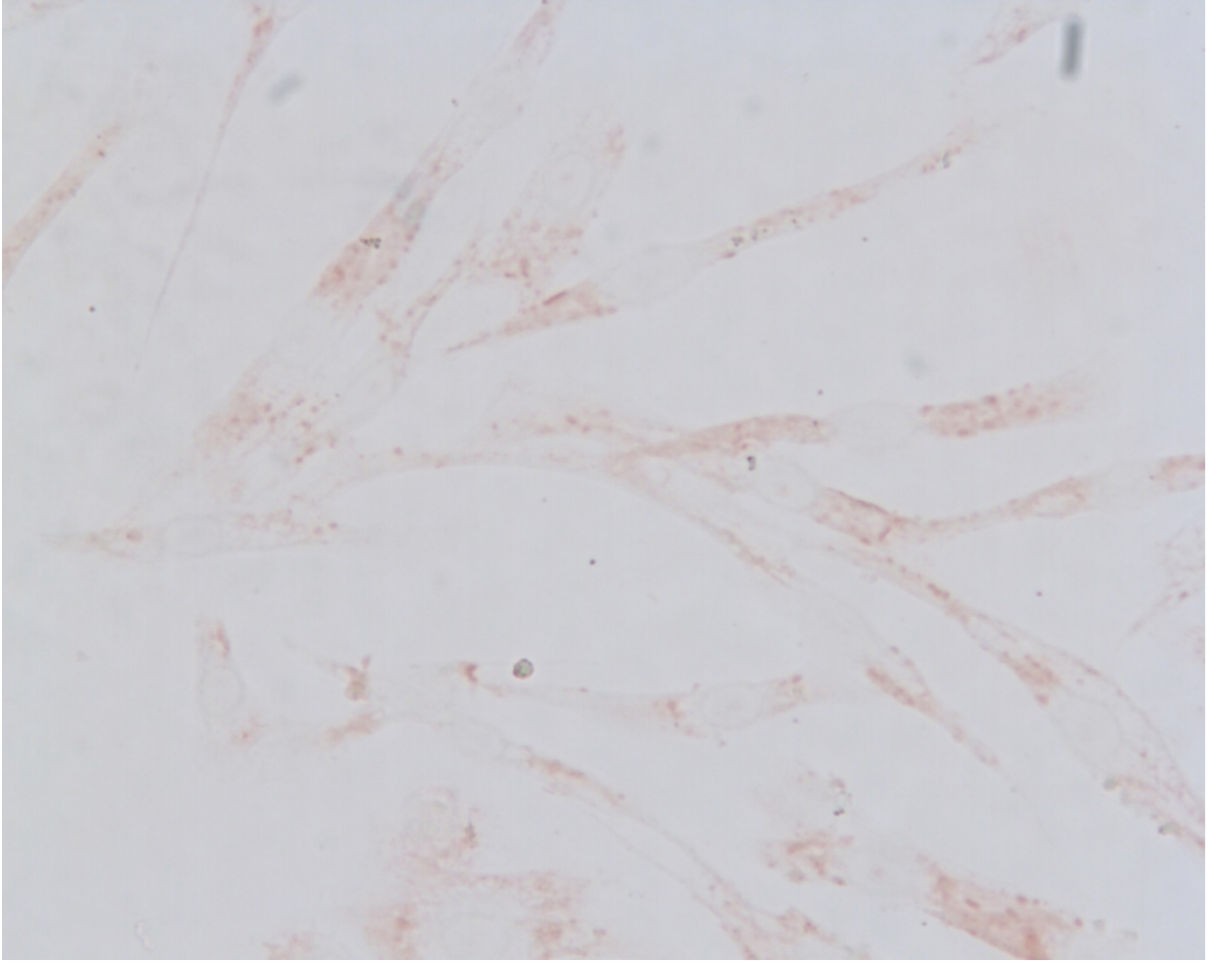
**Şekil 4.4.4.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubunun TIM17 immünohistokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı.



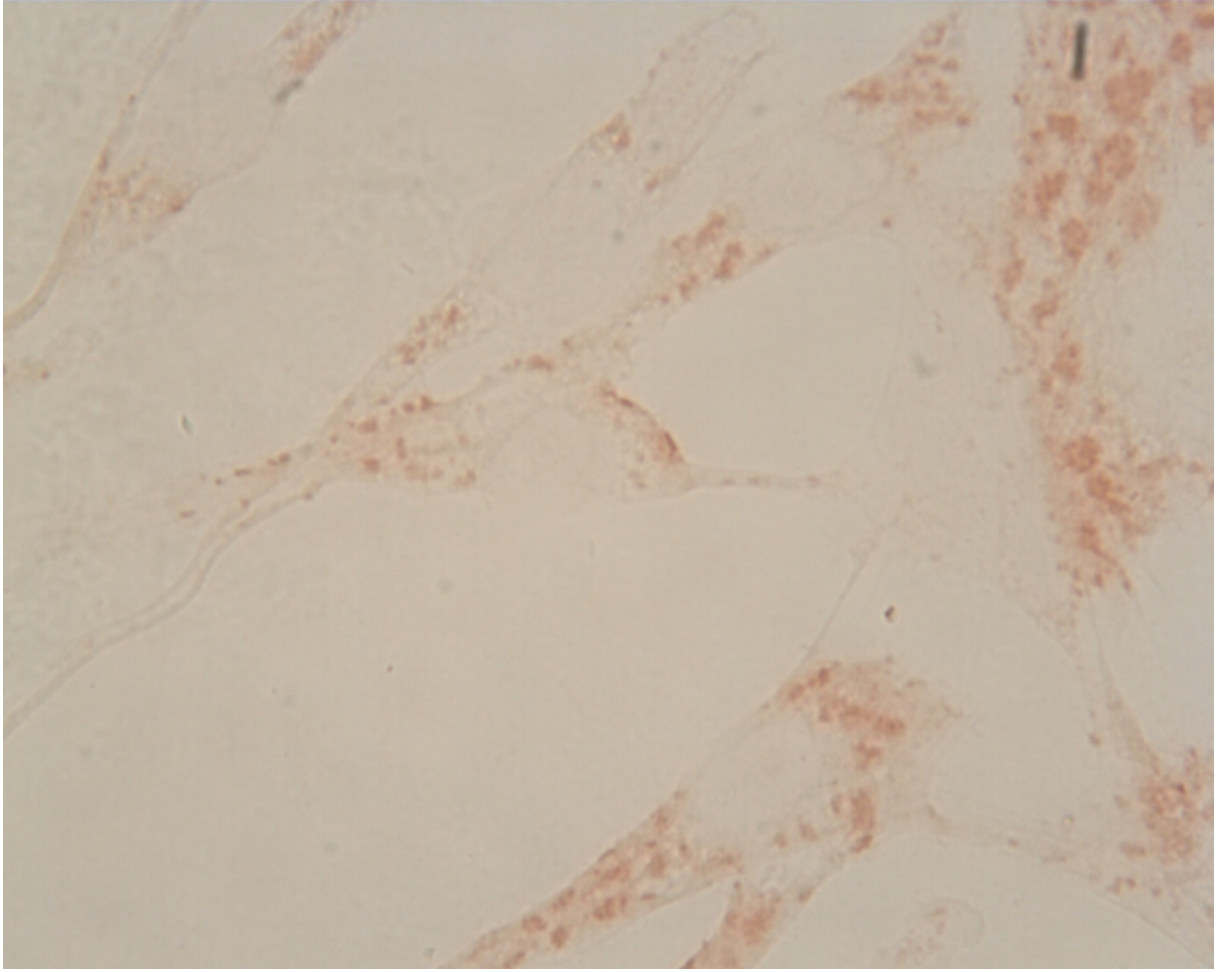
**Şekil 4.4.5.** Mirisetin grubunun TIM17 immünohistokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı.



**Şekil 4.4.6.** Mirisetin grubunun TIM17 immünohistokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı.



**Şekil 4.4.7.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+mirisetin grubunun TIM17 immünositokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı.



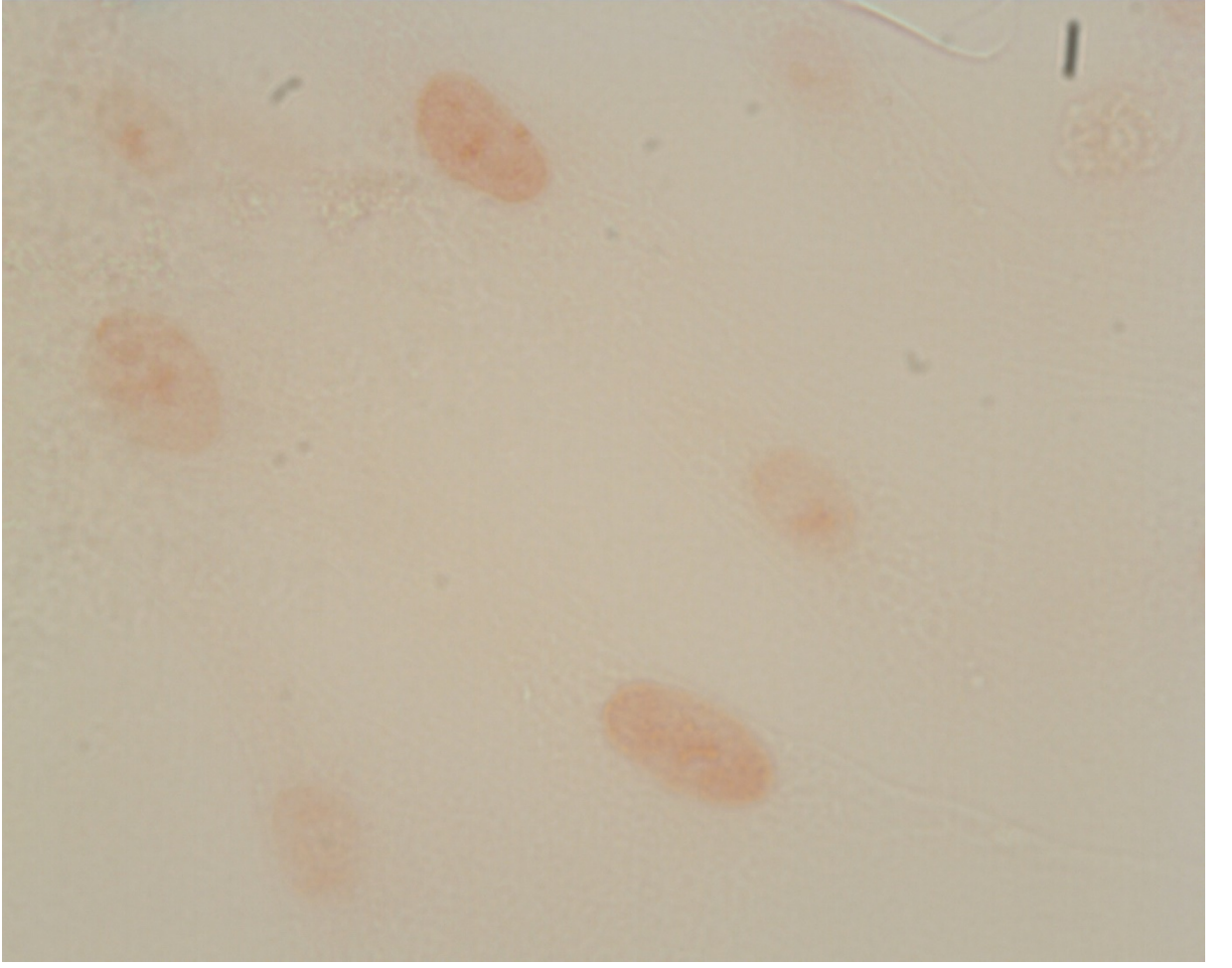
**Şekil 4.4.8.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+mirisetin grubunun TIM17 immünohistokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı.

#### **4.5. TNF- $\alpha$ ANTİKORU İMMÜNOSİTOKİMYA BOYAMALARI**

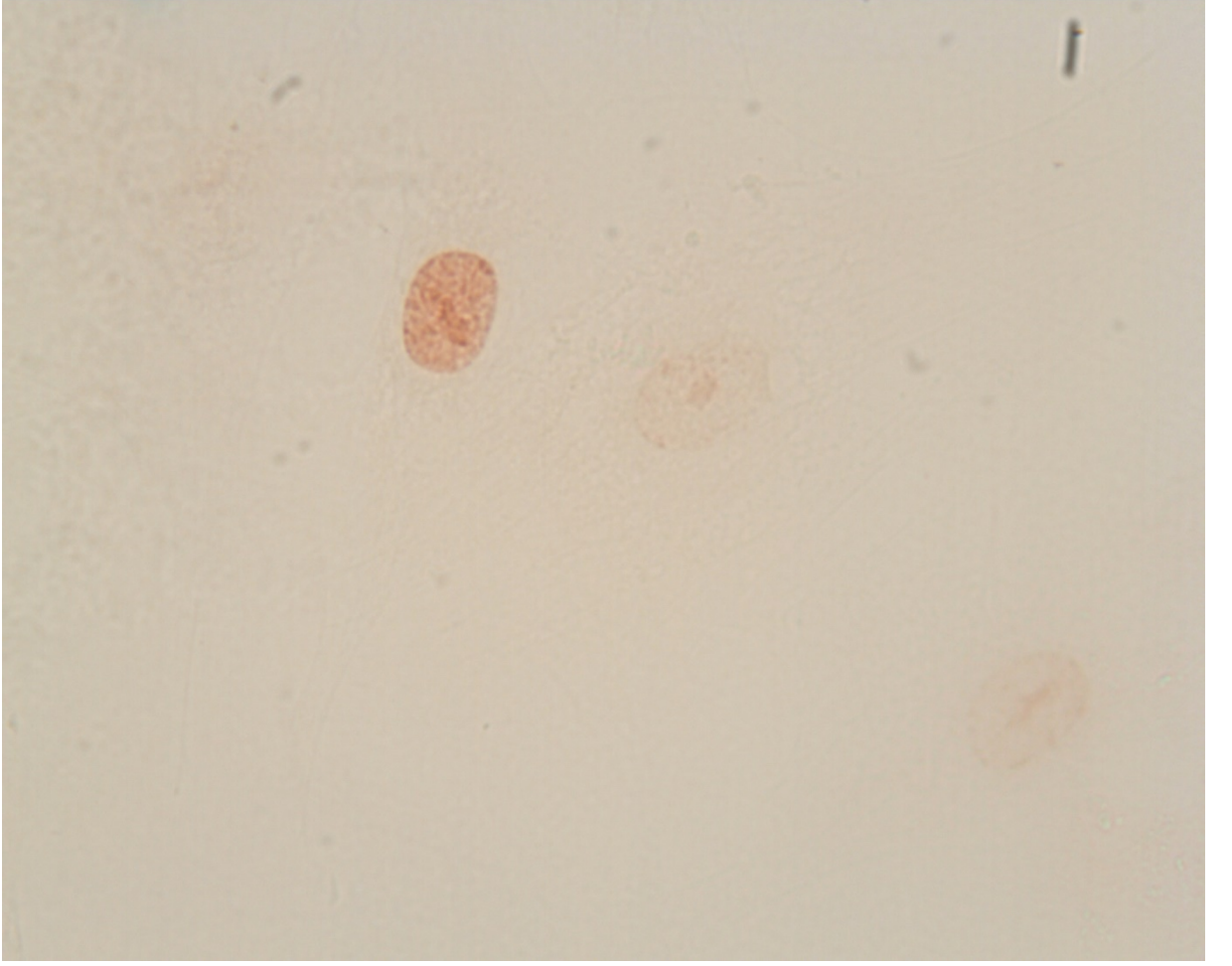
İmmünohistokimyasal olarak kontrol grubuyla mirisetin ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+mirisetin grupları arasındaki TNF- $\alpha$  antikor boyanma şiddetine bakıldığında aralarındaki fark anlamlı bulunmadı ( $p=0,1811$  ve  $p=0,7998$ , Şekil 4.5.1, 4.5.2, 4.5.3, 4.5.4 ve 4.5.5). Kontrol grubu ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gruplarının TNF- $\alpha$  antikor boyanma şiddeti bakımından aralarındaki fark ise anlamlıydı ( $p<0.001$ , Şekil 3.9.3).



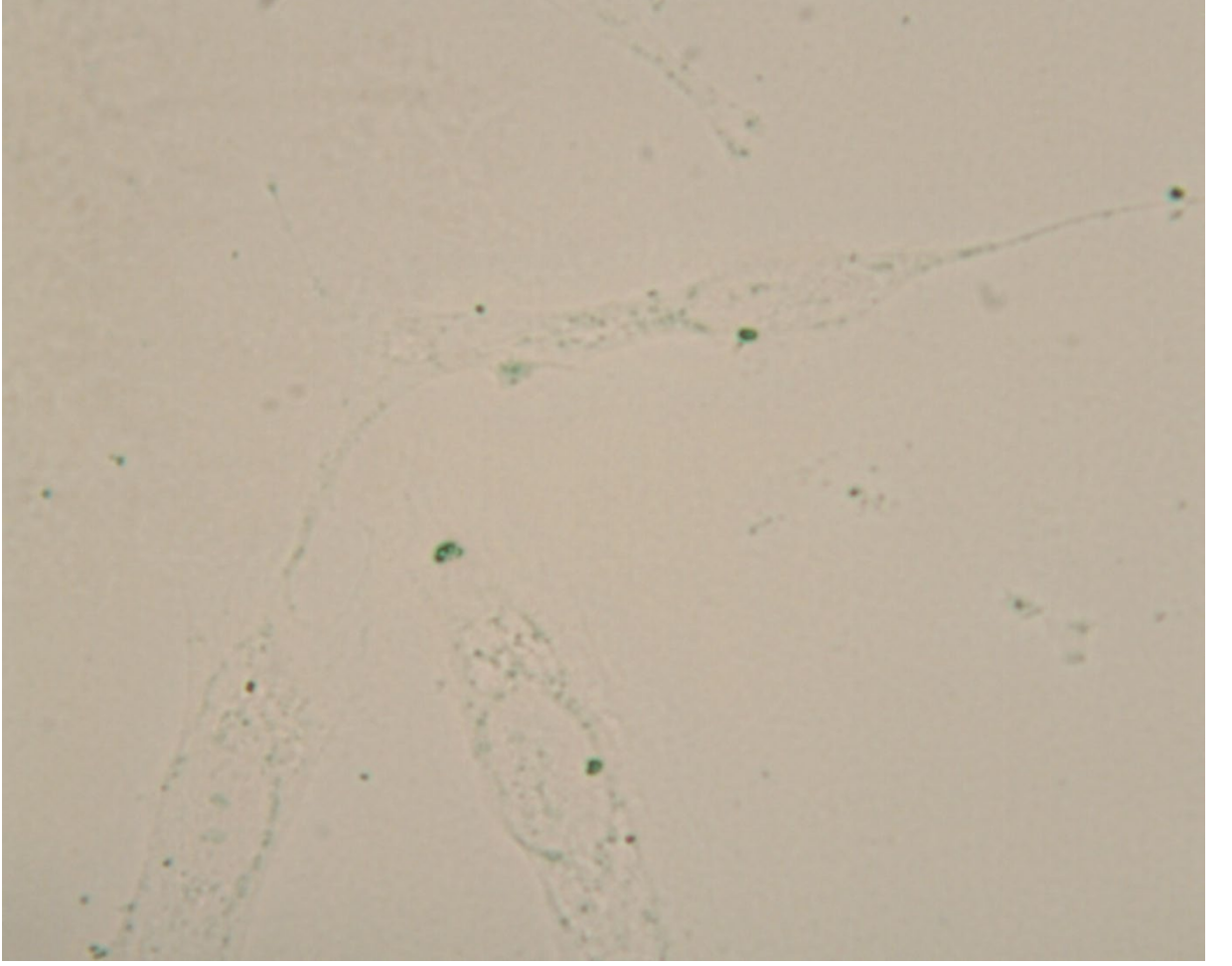
**Şekil 4.5.1.** Kontrol grubunun TNF- $\alpha$  immünositokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı.



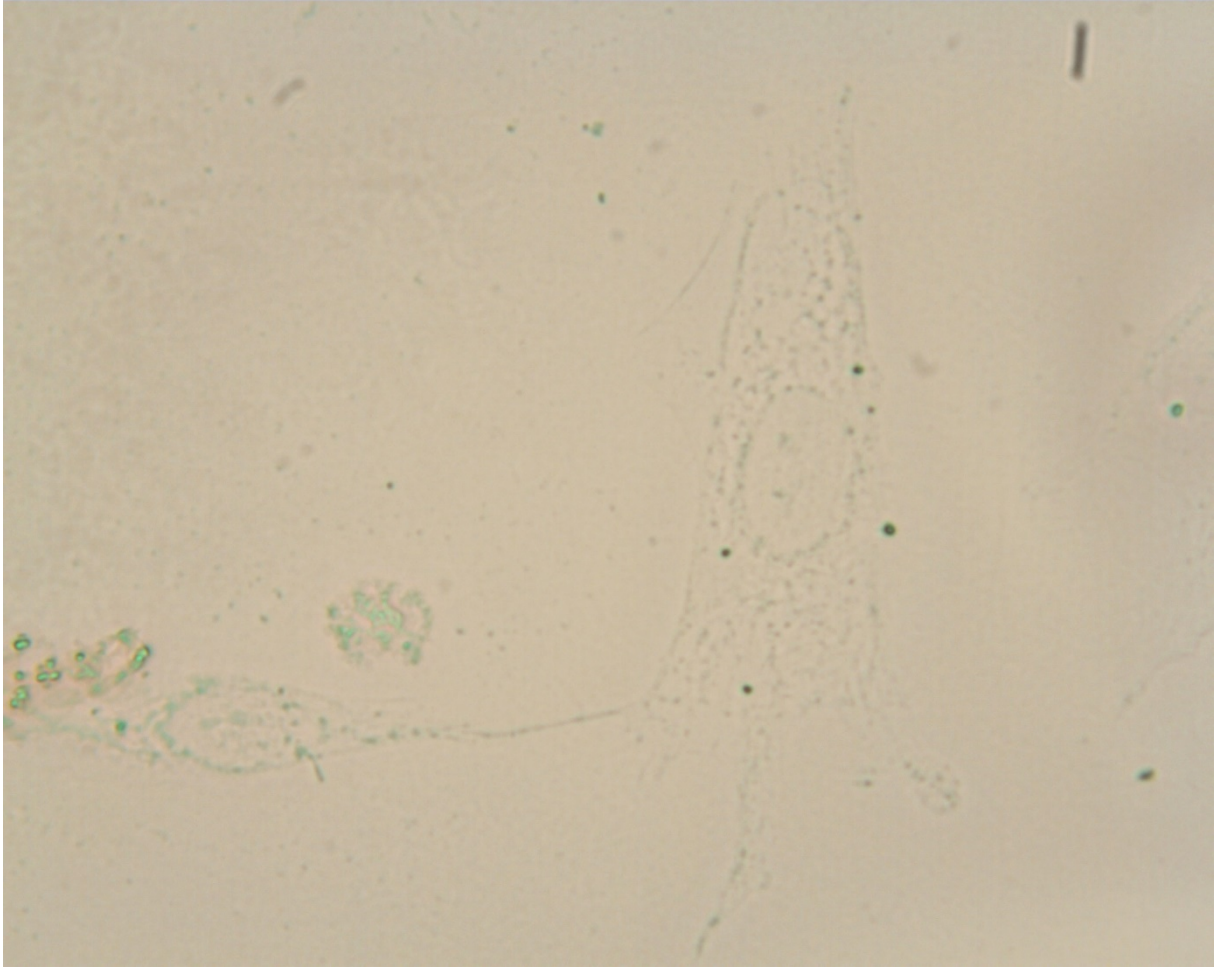
**Şekil 4.5.2.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubunun grubunun TNF- $\alpha$  immünohistokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı.



**Şekil 4.5.3.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubunun TNF- $\alpha$  immünositokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı.



**Şekil 4.5.4.** Mirisetin grubunun TNF- $\alpha$  immünohistokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı.



**Şekil 4.5.5.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + mirisetin grubunun TNF- $\alpha$  immünohistokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı.

#### **4.6. ELEKTRON MİKROSKOBU BULGULARI**

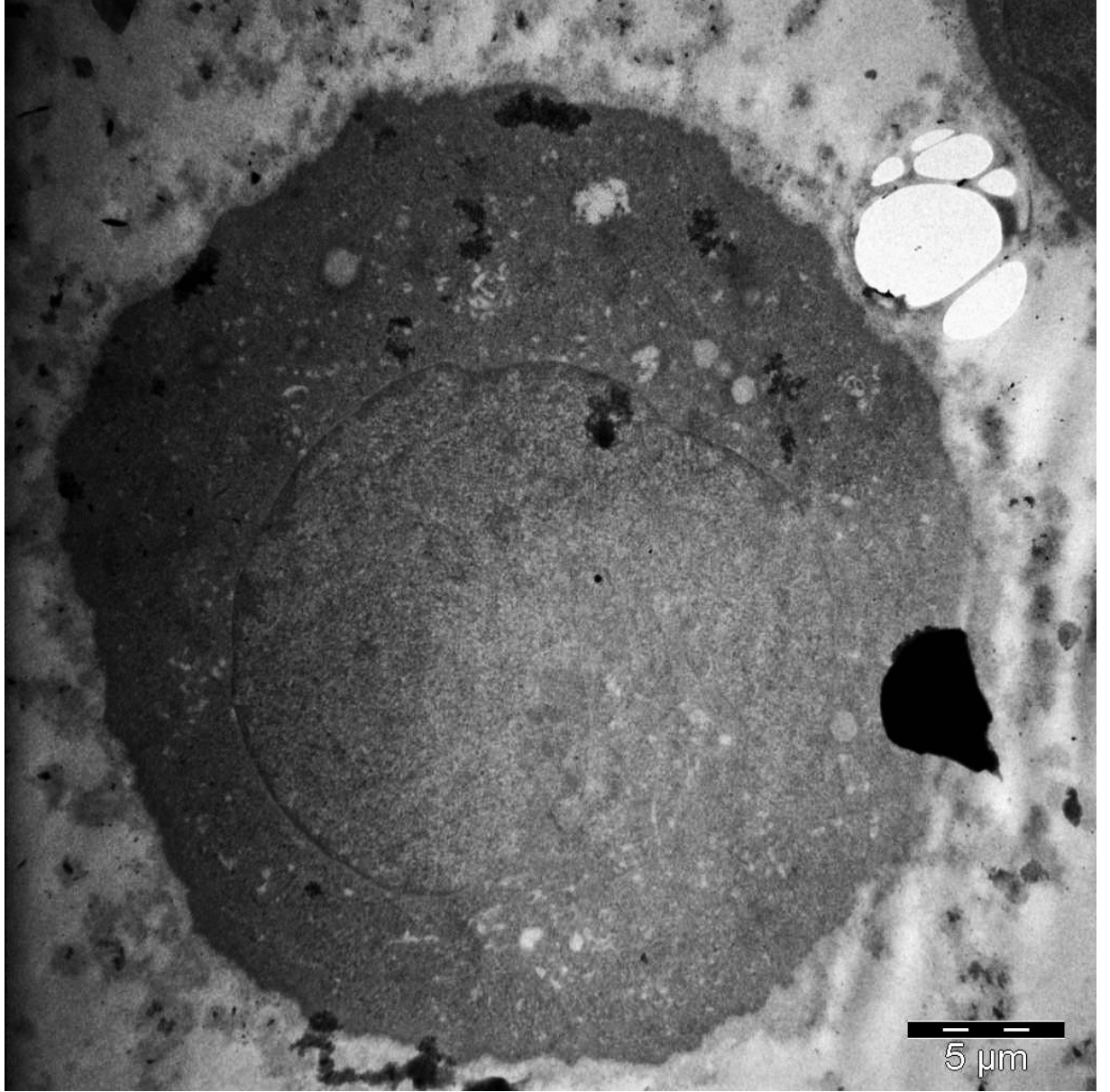
Kontrol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mirisetin ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+mirisetin gruplarının elektron mikroskopunda ultrastrüktürü incelendi ve değerlendirildi. Kontrol grubu MKH'in elektron mikroskopunda belirgin nükleolus içeren şekilsiz ve invajinasyonlar içeren ökromatik nükleuslara sahip olduğu gözlemlendi. Kontrol grubu MKH'in sitoplazmalarında, ribozomlar, endoplazmik retikulum sisternaları, mitokondriler ve az miktarda vakuol gözlemlendi. Kontrol grubu MKH'in yüzeyinde uzantılar (mikrovilli) mevcuttu (Şekil 4.6.1, 4.6.2 ve 4.6.3).

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, grubunda MKH'in sitoplazmasında çok sayıda ve büyük çaplı vakuoller gözlemlendi. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, grubunda MKH'de yuvarlak çıkıntılar şeklindeki tomurcuklanmada (bleb) ve çevrede apoptotik cisimcikler de (apoptotik bodies) saptandı. MKH'in

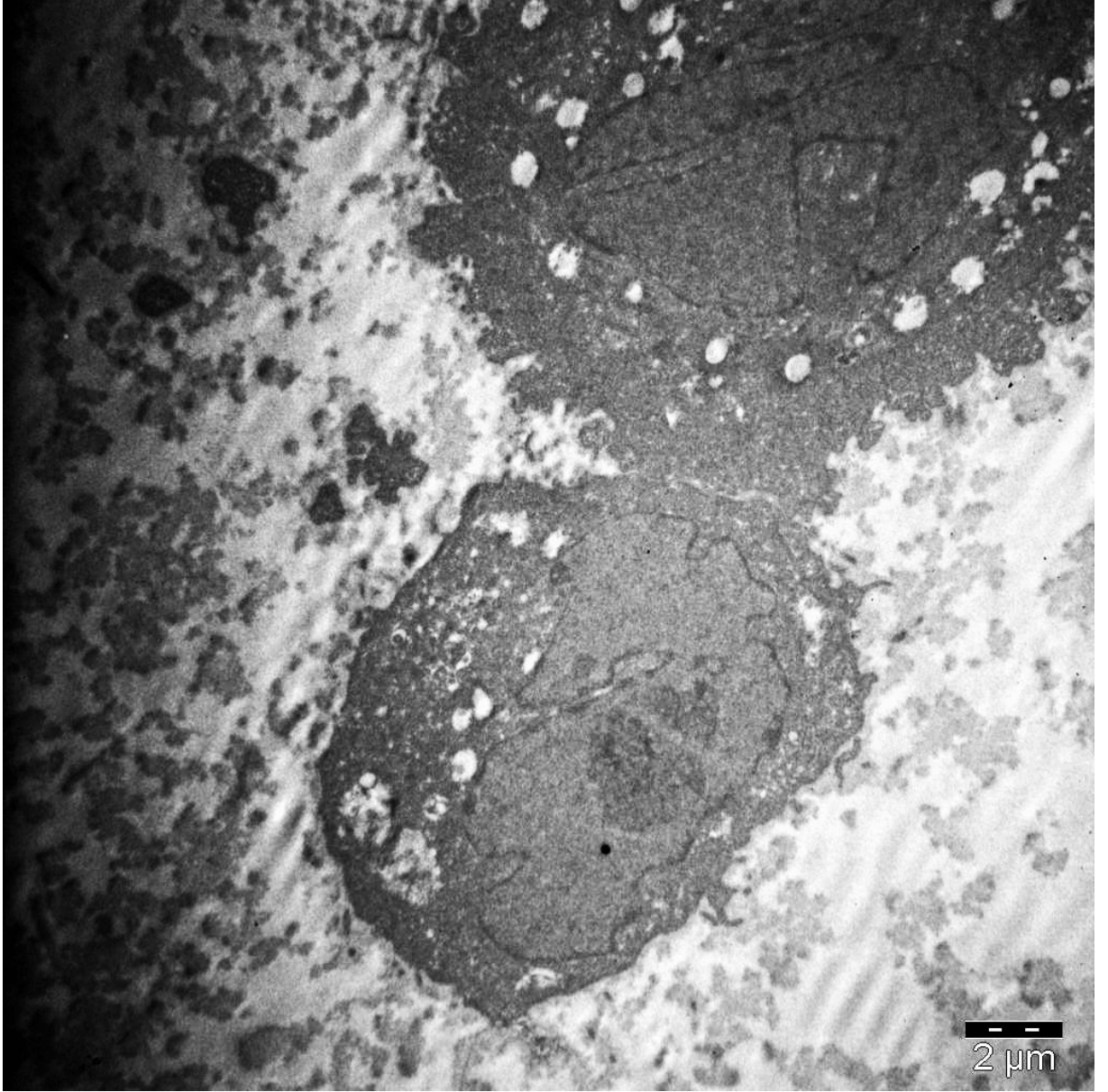
yüzeyindeki filopod sayısında azalma olduğu gözlemlendi (Şekil 4.6.4, 4.6.5, 4.6.6, 3.13.7, 4.6.8 ve 4.6.9).

Mirisetin grubunun grubunun MKH'in, belirgin nukleolus içeren, ökromatik nükleuslara sahip olduğu gözlemlendi. Mirisetin grubunun MKH'in sitoplazmasında, az sayıda küçük çaplı vakuoller, ribozom, endoplazmik retikulum sisternaları ve mitokondriler gözlemlendi. Mirisetin grubunun MKH'in yüzeyinde uzun ve fazla sayıda mikrovillus mevcuttu (Şekil 4.6.10, 4.6.11 ve 4.6.12 ).

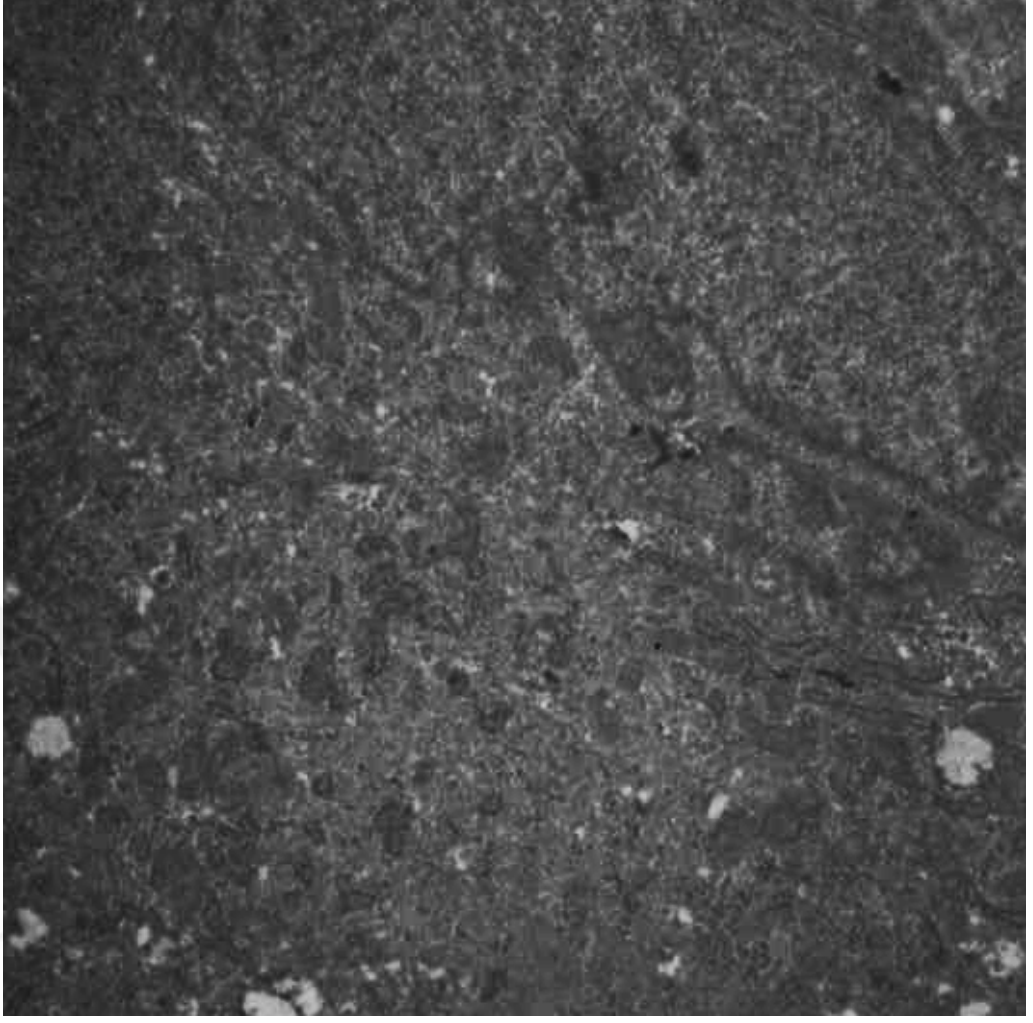
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+mirisetin grubunda da Mirisetin grubunda olduğu gibi MKH'in nispeten az sayıda vakuol ve hücre tomurcuklanması içerdiği gözlemlendi. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+mirisetin grubunun MKH'in, belirgin nukleolus içeren, ökromatik nükleuslara sahip olduğu gözlemlendi. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+mirisetin grubunun MKH'in sitoplazmasında, vakuoller, ribozomlar, endoplazmik retikulum sisternaları ve mitokondriler gözlemlendi. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+mirisetin grubunun MKH'in nispeten az sayıda ve küçük mikrovilluslar ve hücre tomurcuklanması içerdiği görüldü (Şekil 4.6.13, 4.6.14, 4.6.15, 4.6.16, 4.6.17 ve 4.6.18).



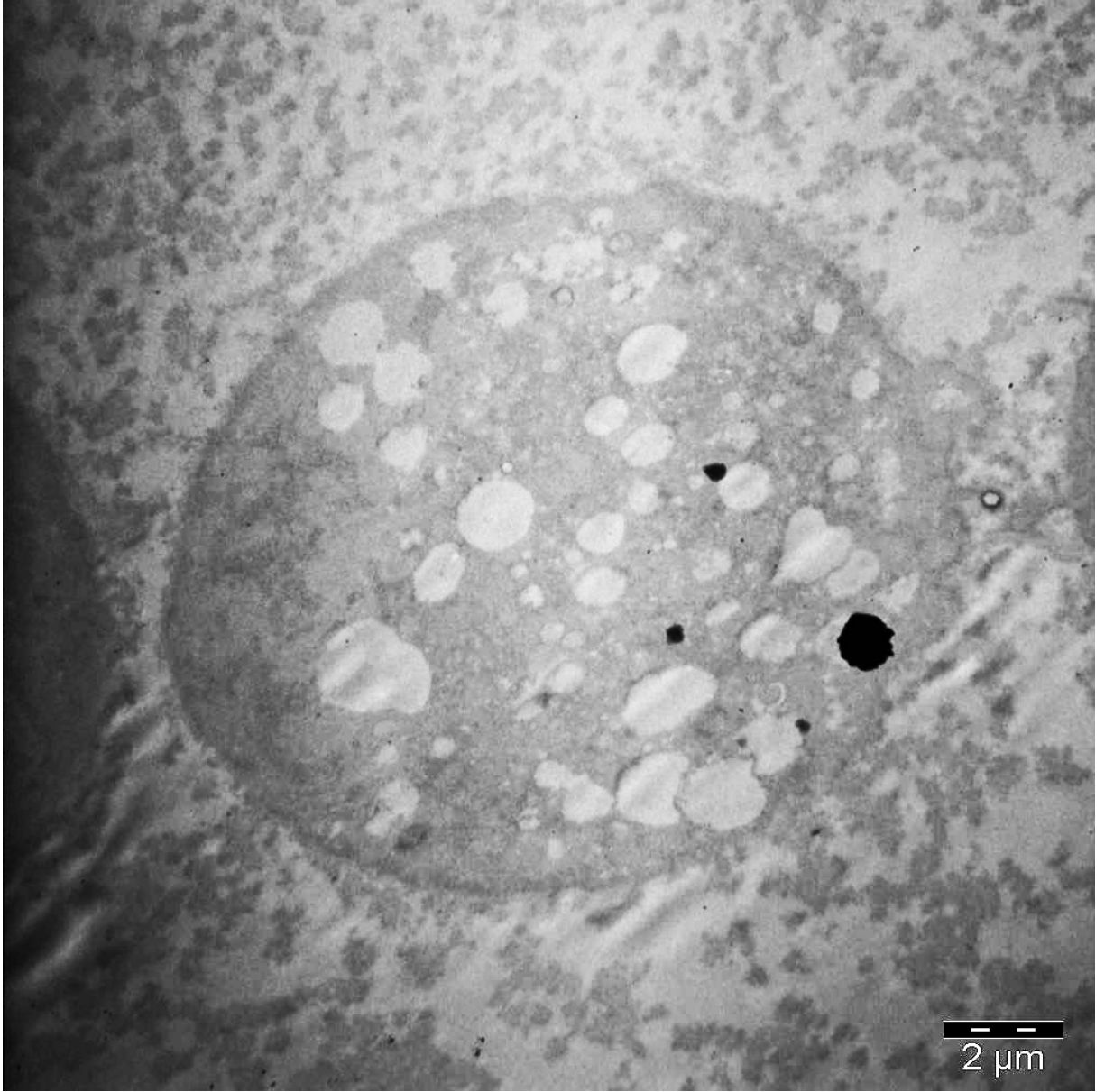
Şekil 4.6.1. Kontrol grubuna ait elektron mikroskobu fotoğrafında, MKH yüzeyinde filopodlar görülmektedir.



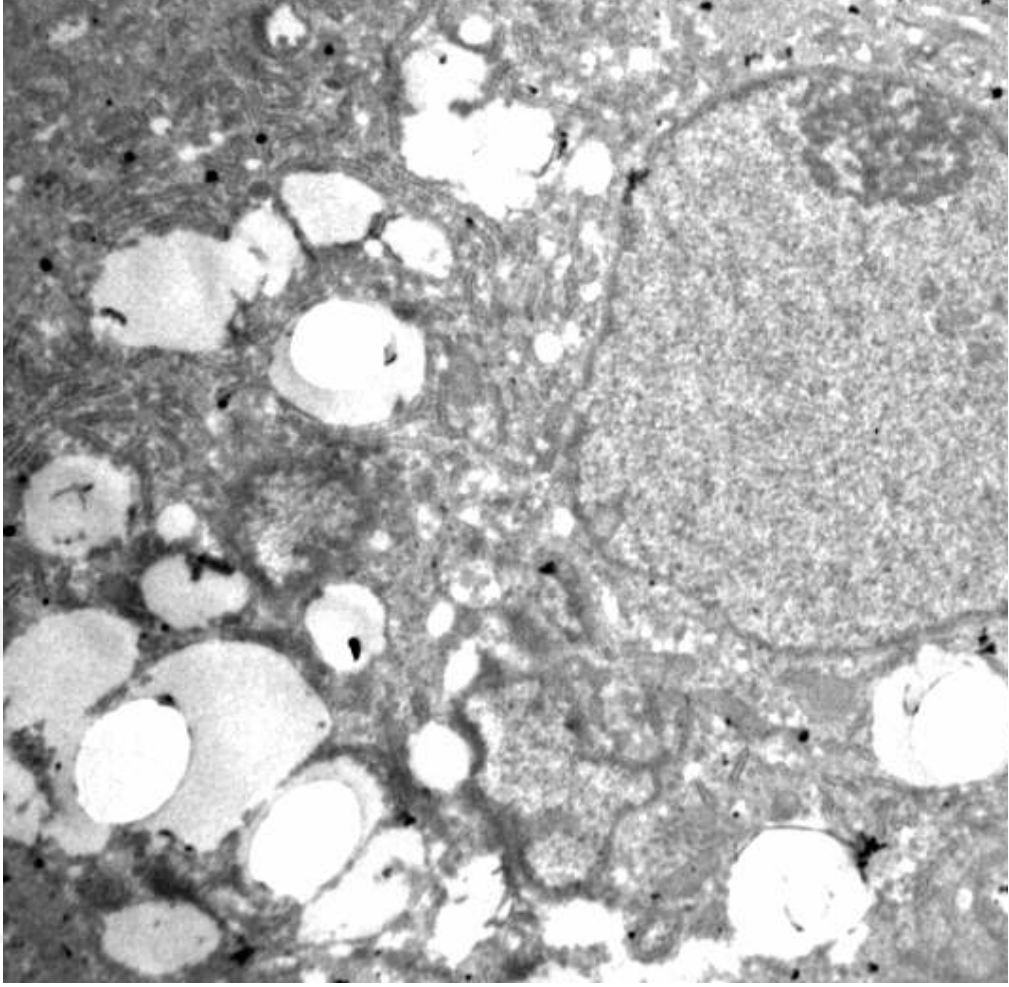
Şekil 4.6.2. Kontrol grubuna ait elektron mikroskobu fotoğrafında, MKH'ler görülmektedir.



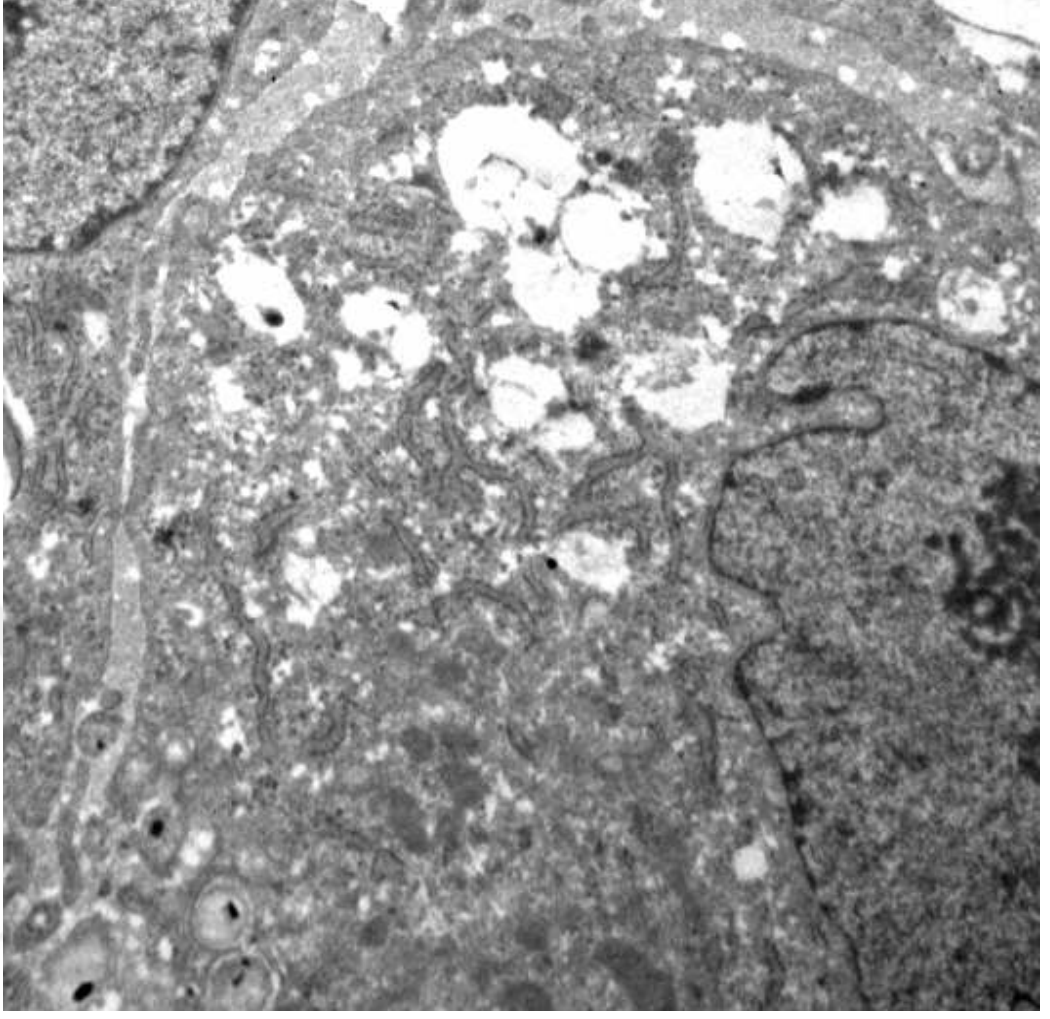
**Şekil 4.6.3.** Kontrol grubu elektron mikroskopi fotoğrafı



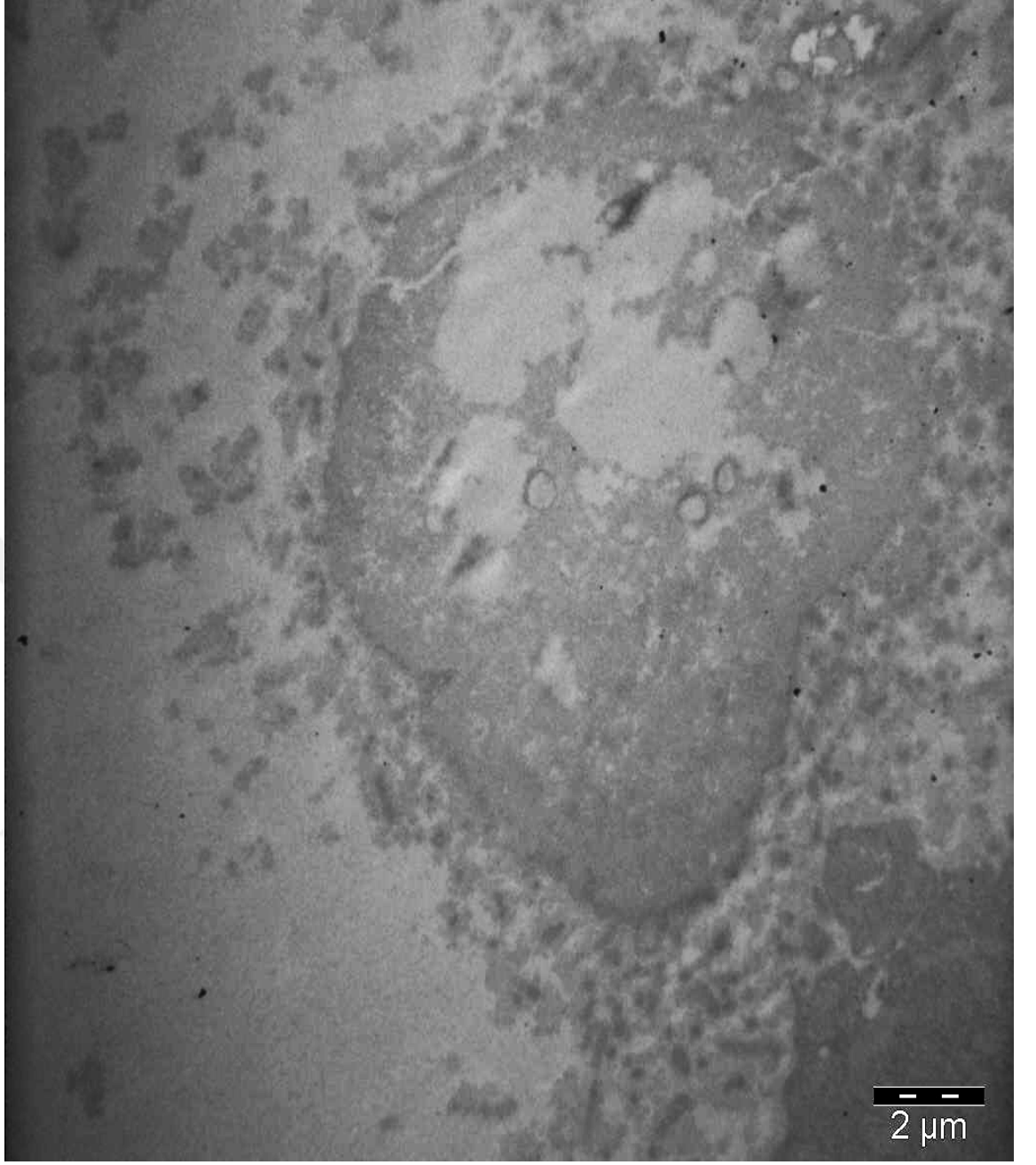
Şekil 4.6.4.  $H_2O_2$  grubuna ait elektron mikroskobu fotoğrafında, MKH görülmektedir.



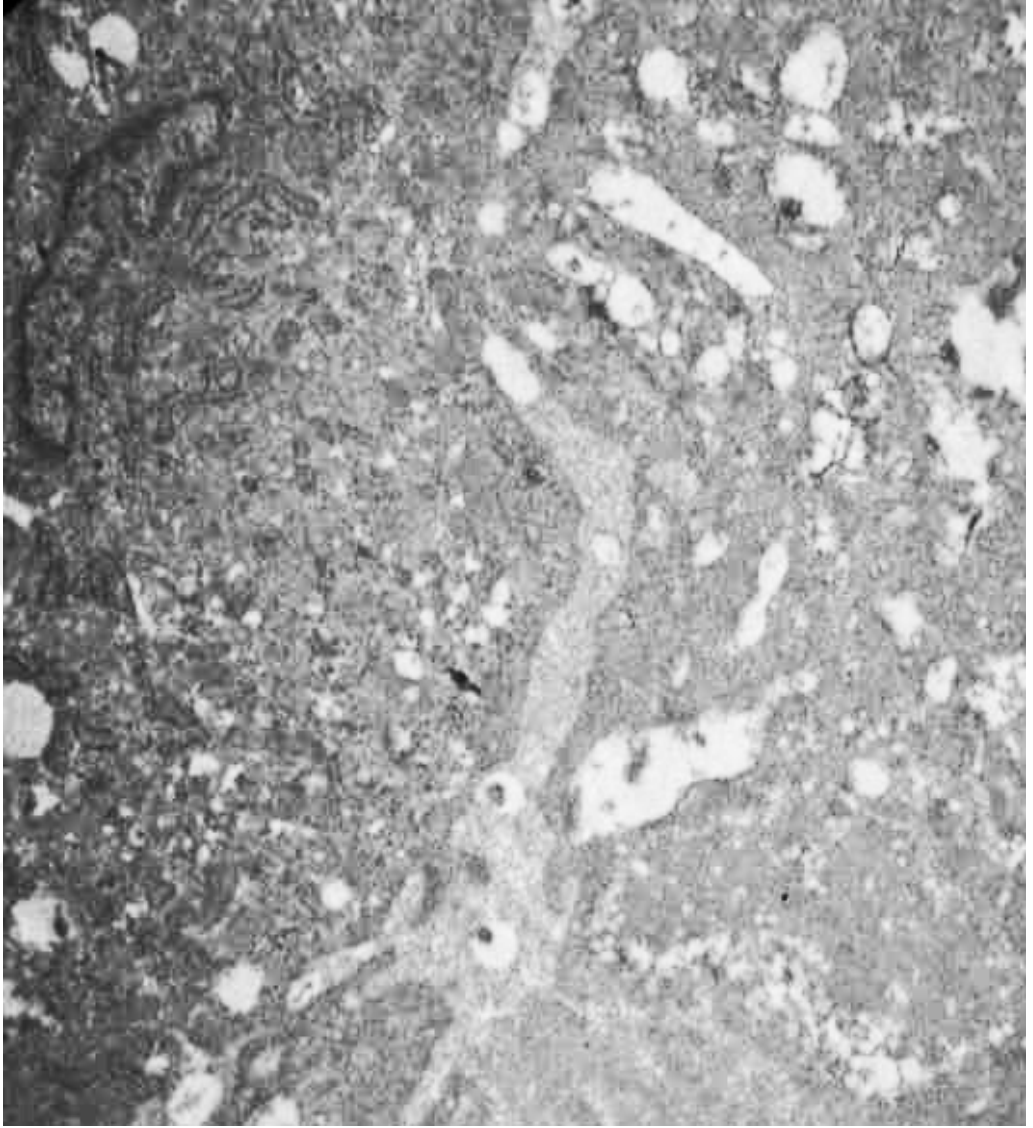
Şekil 4.6.5. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubu elektron mikroskopi fotoğrafı



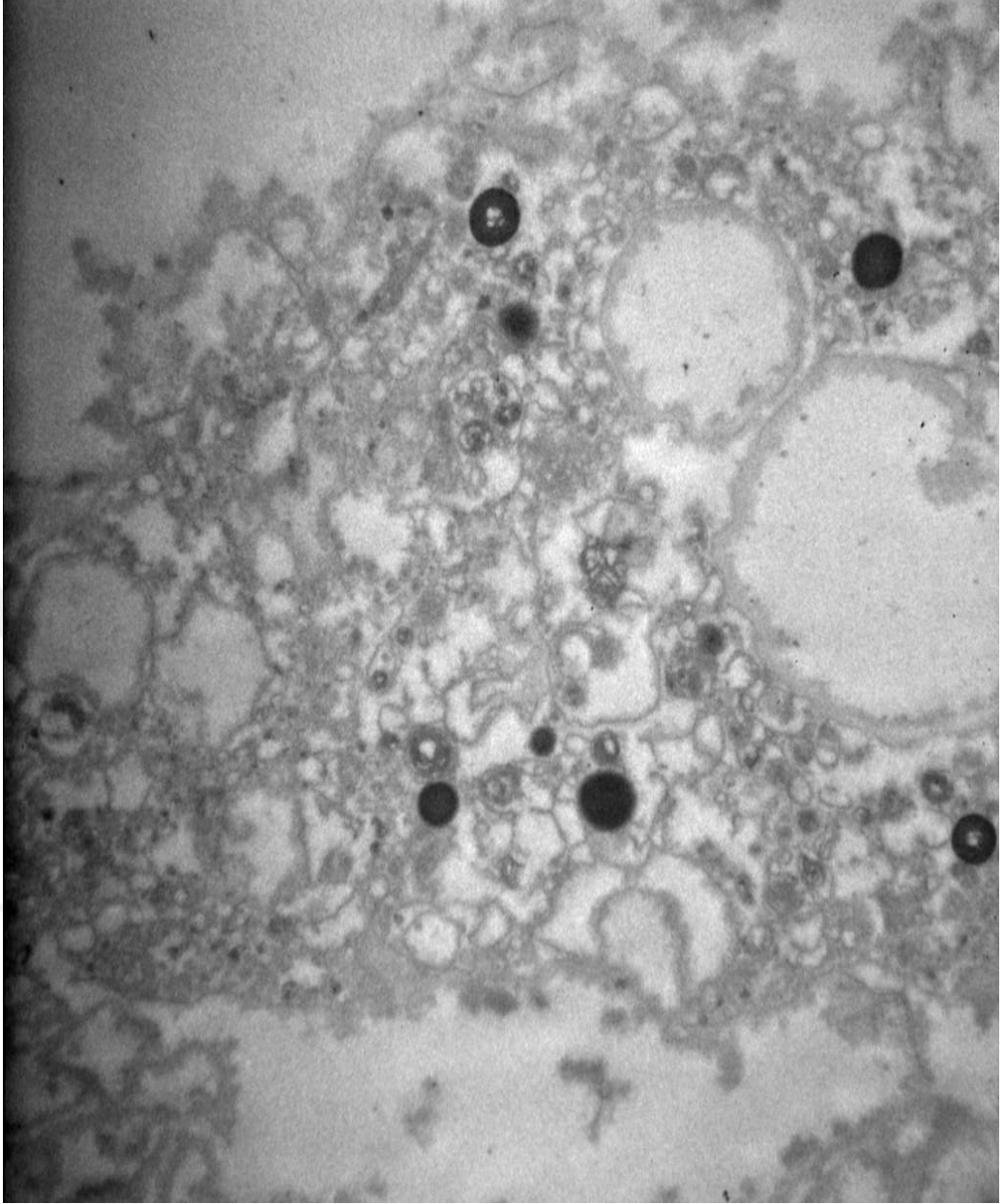
Şekil 4.6.6 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubu elektron mikroskopi fotoğrafı



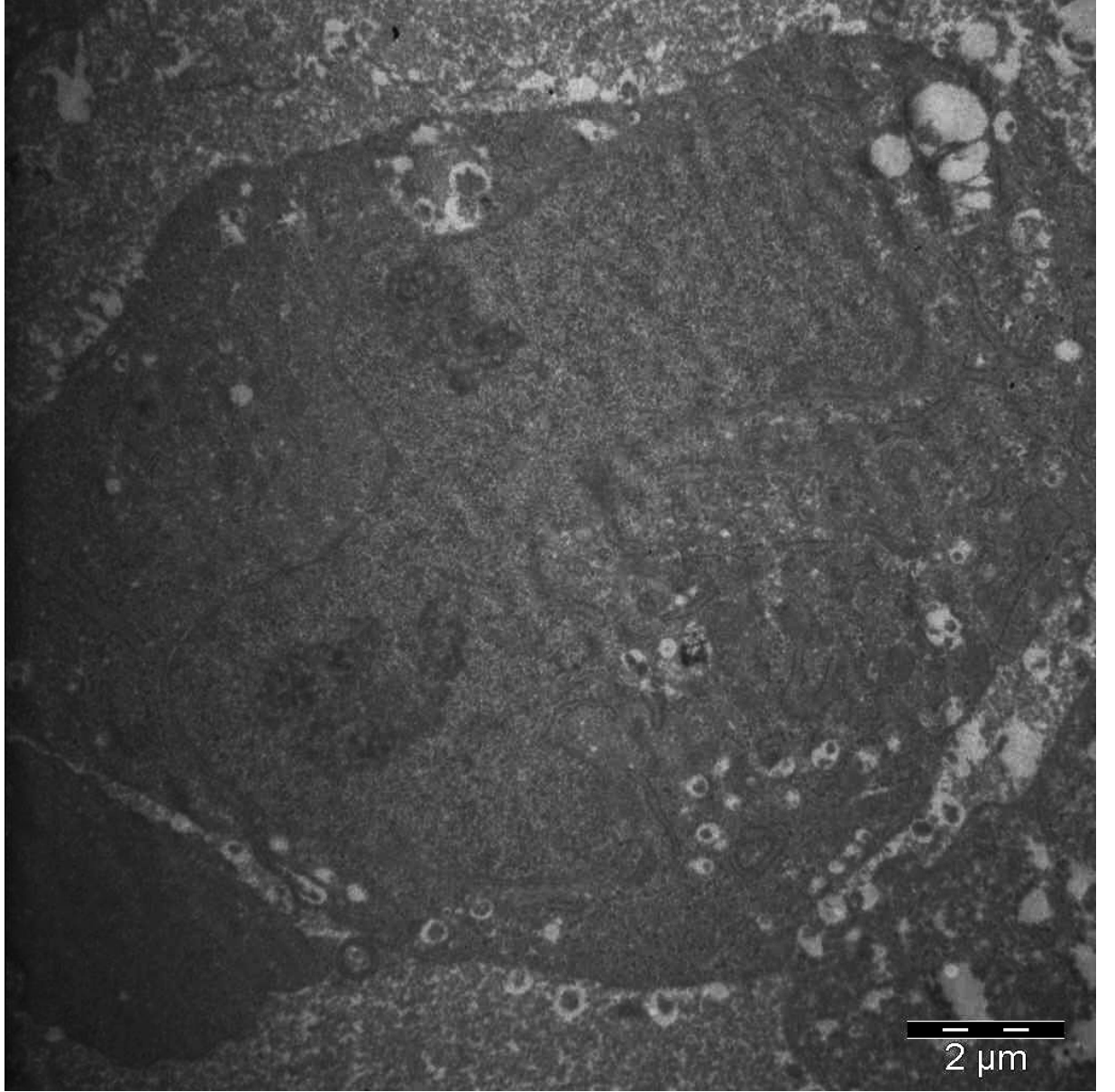
Şekil 4.6.7. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubu elektron mikroskopi fotoğrafı



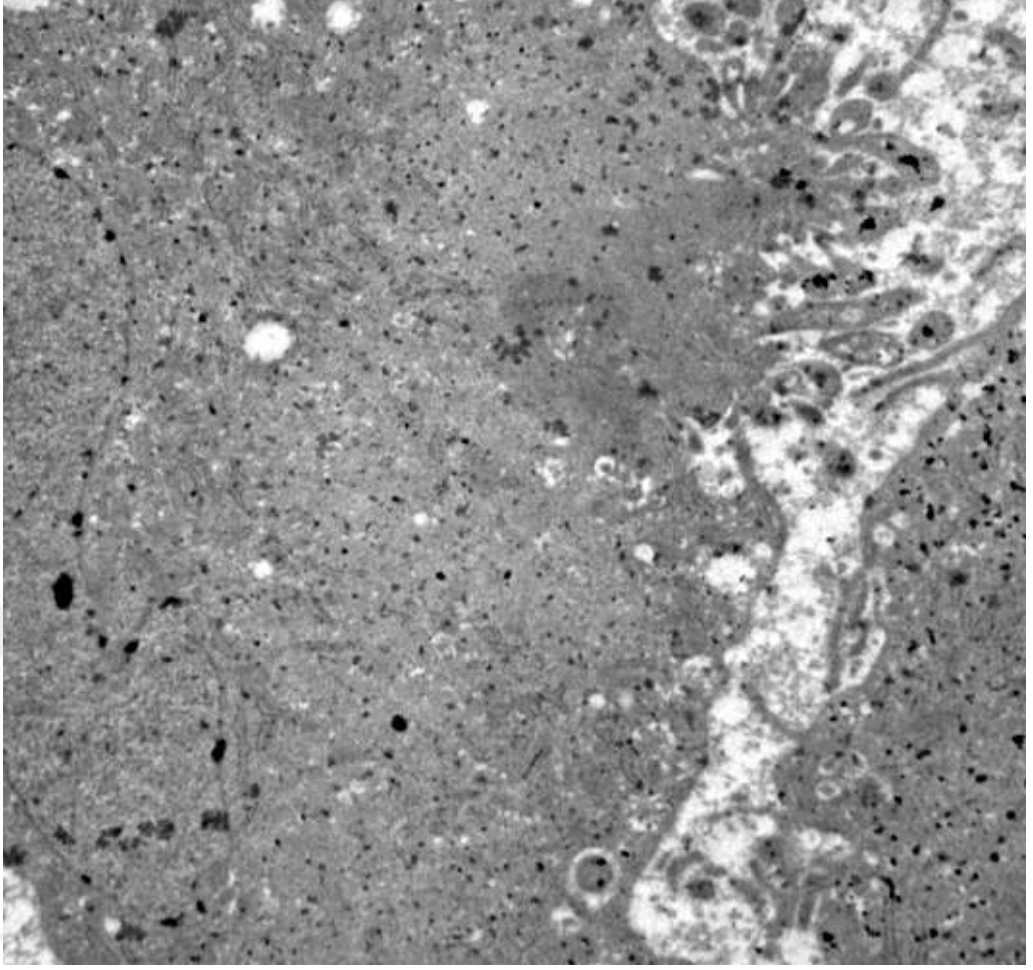
**Şekil 4.6.8.**  $H_2O_2$  grubu elektron mikroskobî fotoğrafı



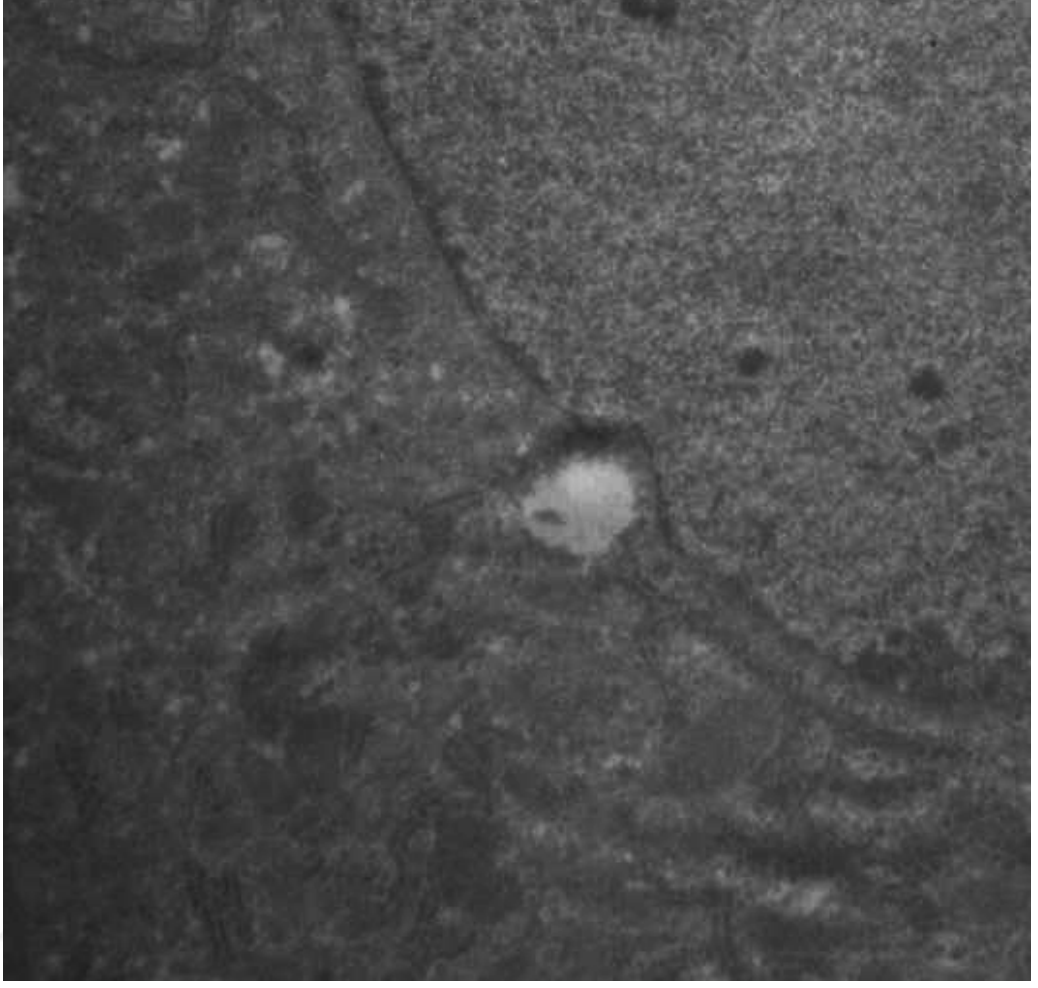
Şekil 4.6.9. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubu elektron mikroskobi fotoğrafı



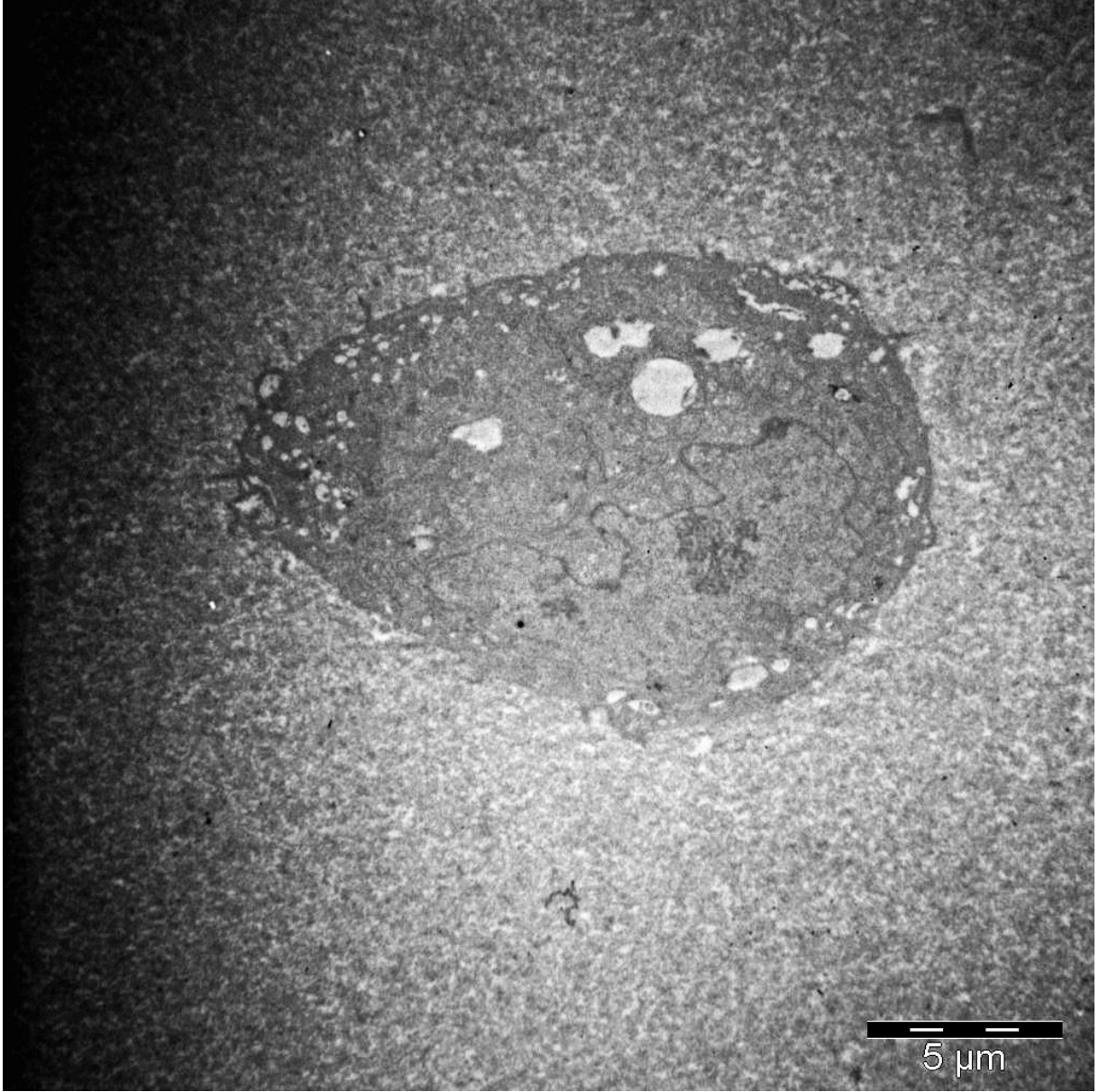
**Şekil 4.6.10.** Mirisetin grubuna ait elektron mikroskobu fotoğrafında, MKH görülmektedir.



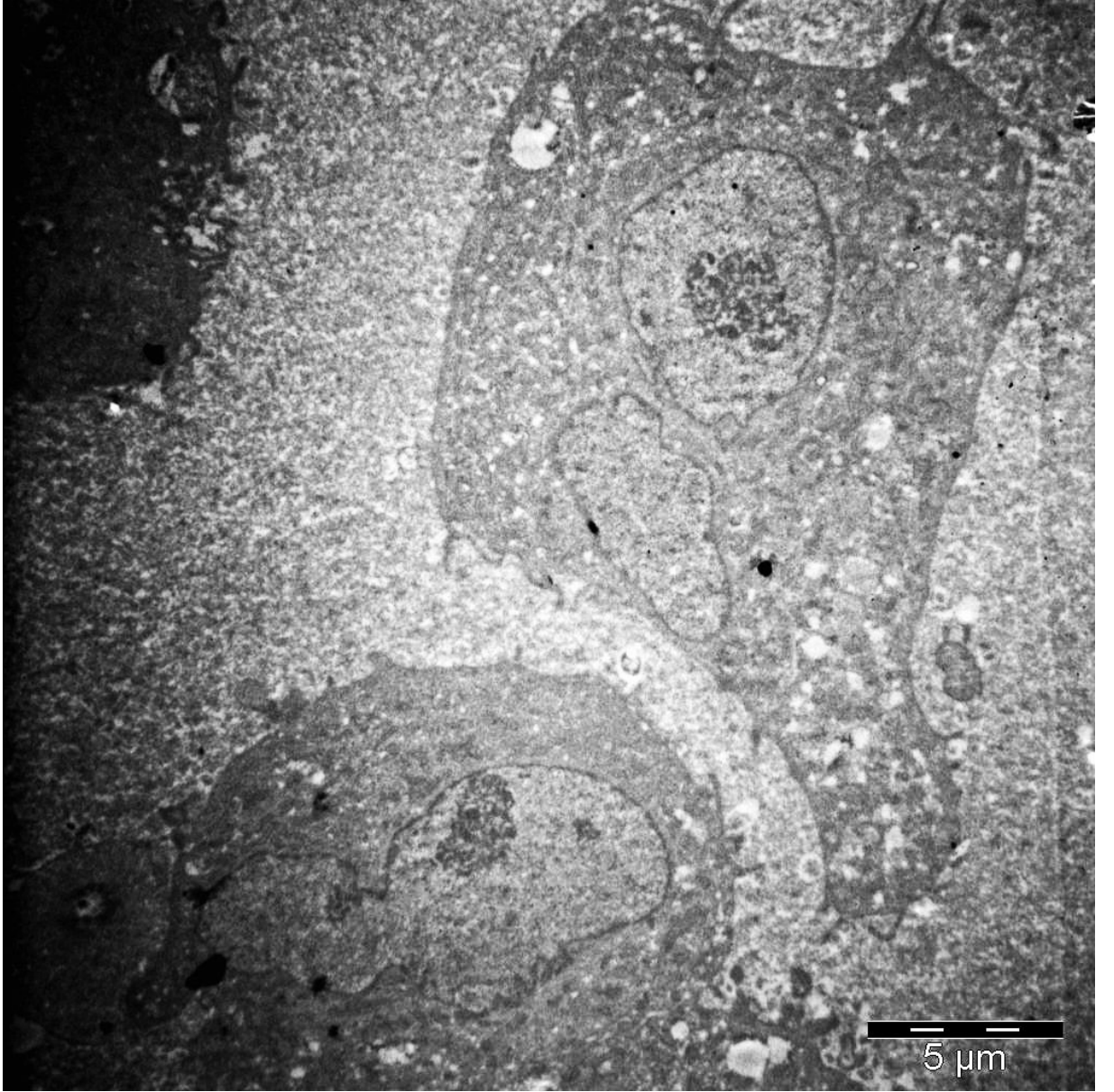
Şekil 4.6.11. Mirisetin grubu elektron mikroskopi fotoğrafı



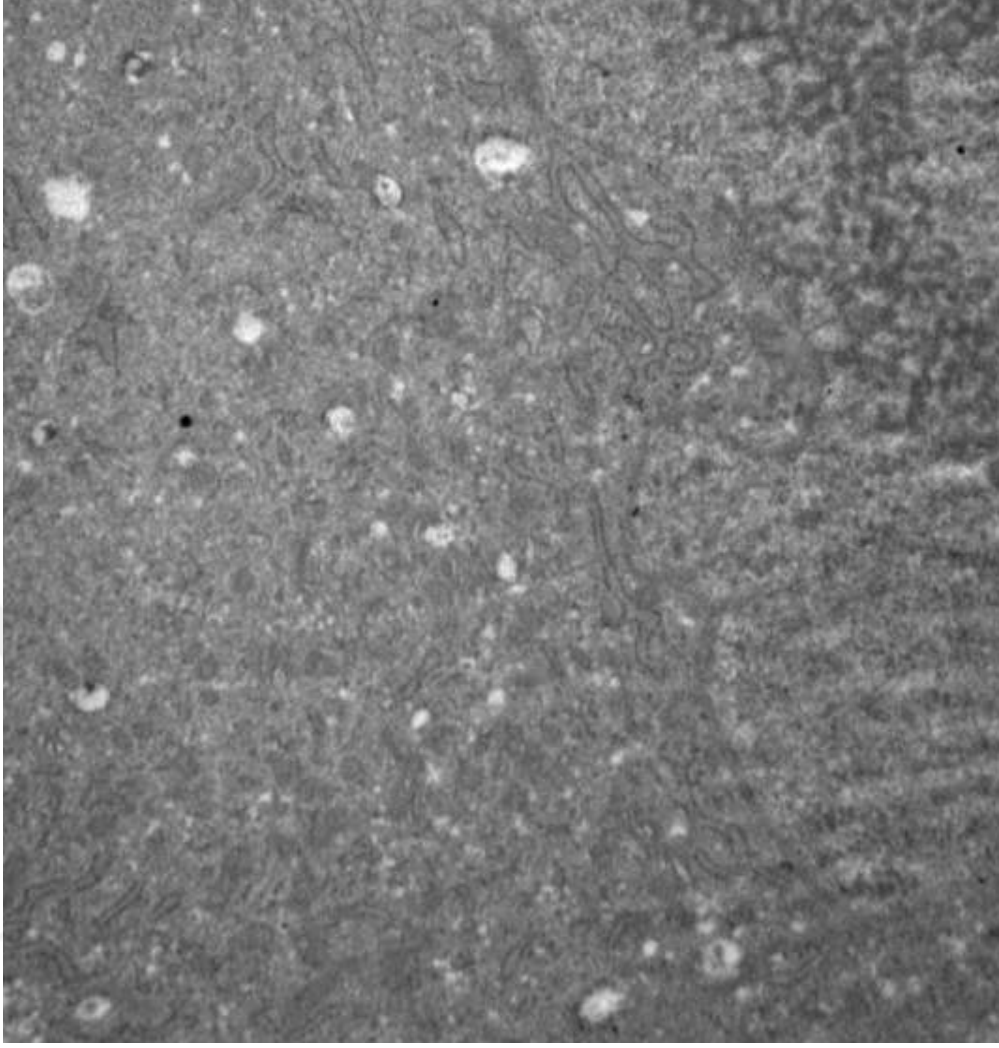
**Şekil 4.6.12.** Mirisetin grubu elektron mikroskopi fotoğrafı



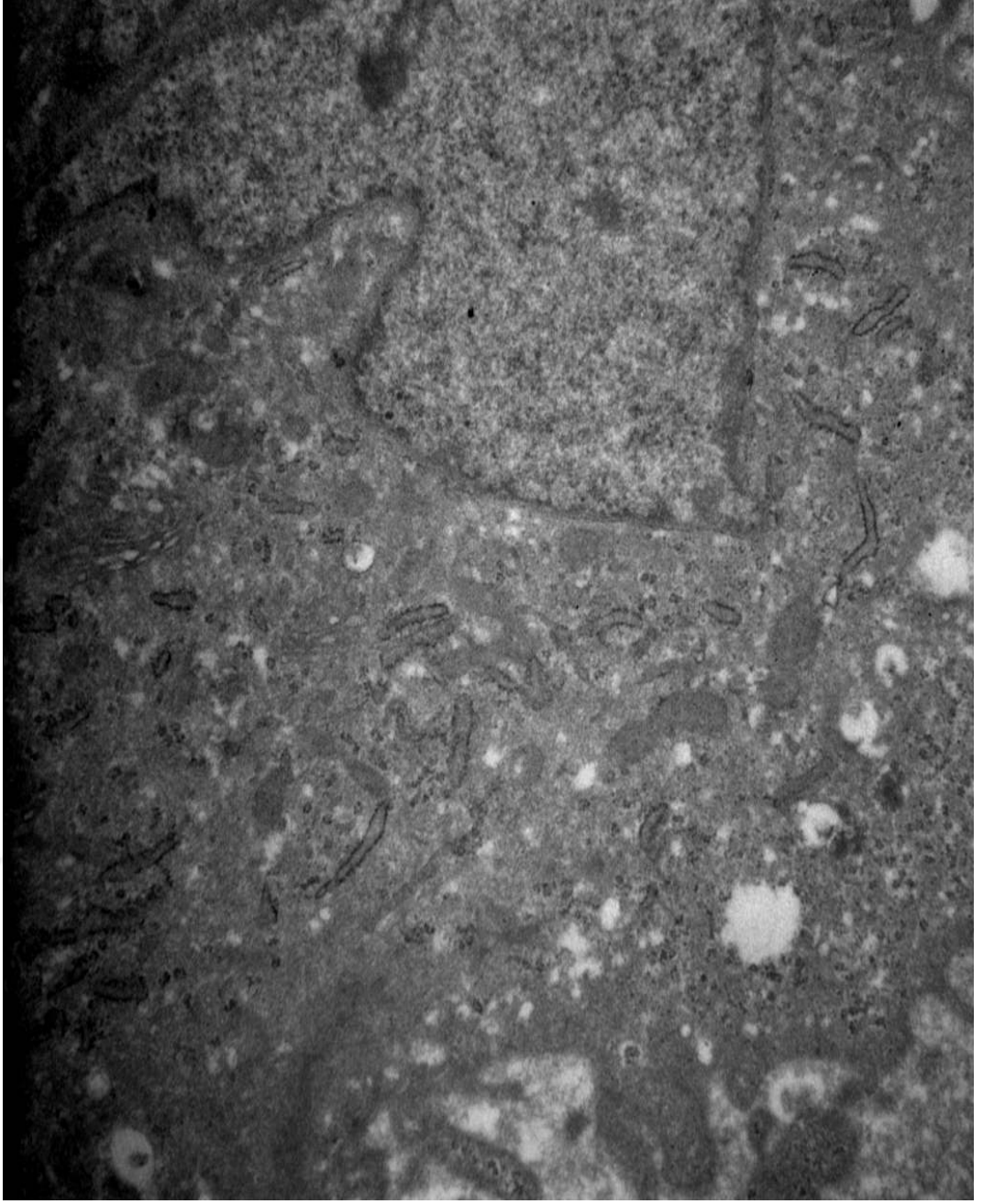
**Şekil 4.6.13.**  $H_2O_2$ +mirisetin grubuna ait elektron mikroskobu fotoğrafında, MKH yüzeyinde mikrovilluslar görülmektedir.



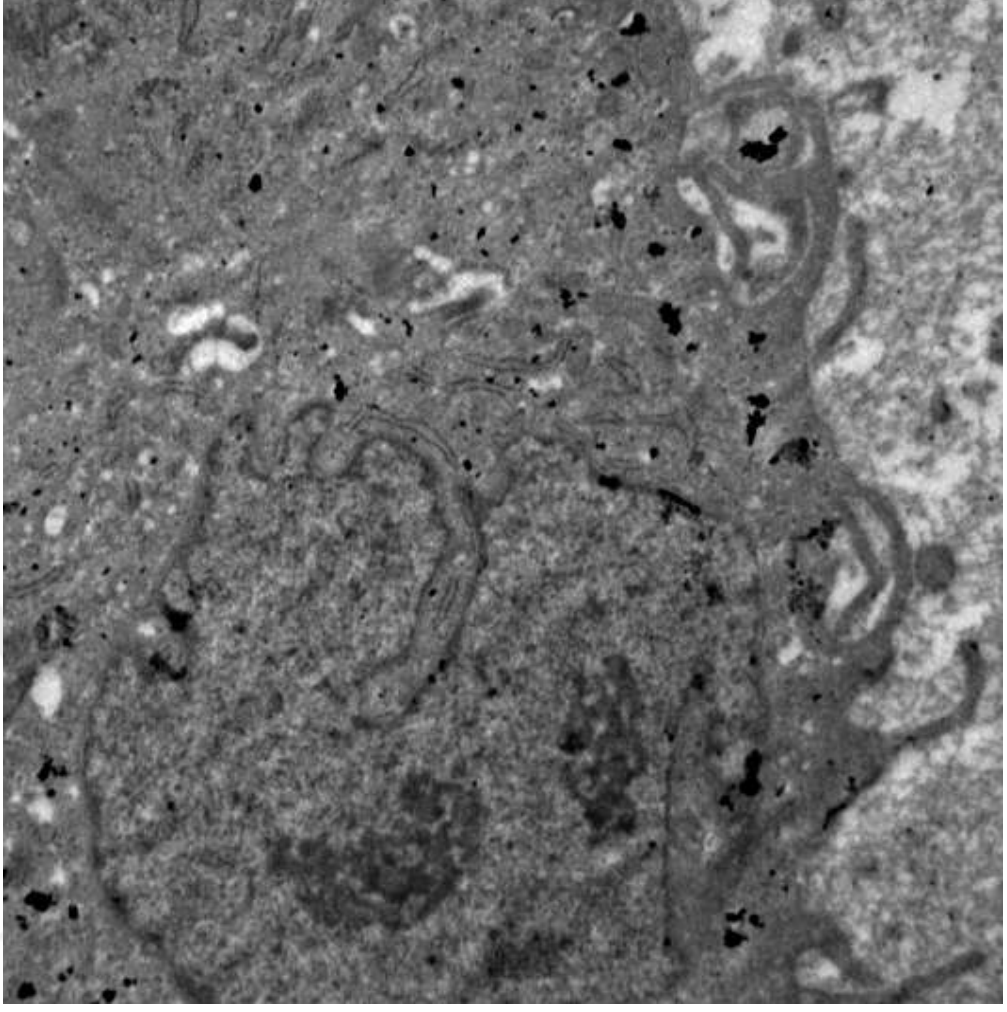
Şekil 4.6.14.  $H_2O_2$ +mirisetin grubuna ait elektron mikroskobu fotoğrafında, MKH'ler görülmektedir.



**Şekil 4.6.15.**  $H_2O_2$  + mirisetin grubu elektron mikroskobî fotoğrafı



Şekil 4.6.16. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+mirisetin grubu elektron mikroskobi fotoğrafı



Şekil 4.6.17.  $H_2O_2$ +mirisetin grubu elektron mikroskopi fotoğrafı



**Şekil 4.6.18.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+mirisetin grubu elektron mikroskopi fotoğrafı

## 5. TARTIŞMA

Mezenkimal kök hücreler [MKH] düşük immünojenik özellikleriyle beraber çok yönlü farklılaşma kabiliyetine sahip hücrelerdir [71]. MKH 'ler anti-enflamatuvar hasar ve doku hasarı [72] gibi çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılırlar [73, 74].

Nakledilen kök hücrelerin ölüm oranının yüksek olması, başarılı klinik hücre tedavisi için sınırlayıcı bir faktördür [75, 76]. Bu nedenle, nakledilen hücrelerin sağkalımını artırmaya yönelik yeni stratejilerin geliştirilmesi, kök hücre temelli tedavilerin terapötik potansiyelinin geliştirilmesi açısından oldukça önemlidir [77, 78]. Hücre bazlı terapi prosedürleri genellikle her tedavi için yüz milyonlarca MKH gerektirdiğinden, donörlerden izole edilen hücrelerin, transplantasyon öncesinde büyük miktarda hücre elde etmek için pasajlamayla in vitro çoğaltılmaları gerekir [79, 80].

Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) uygulaması, oksidatif strese olan duyarlılığı değerlendirmek için bir model olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. MKH'ler,  $H_2O_2$  'ye maruz kaldıklarında oksidatif stresle in vitro olarak erken yaşlanmaya uğrarlar [81, 82]. Oksidatif streste MKH kültürlerinde oksidatif strese bağlı erken yaşlanmanın nasıl erteleneceğini veya geri döndürülebileceğini araştırmak önemlidir.  $H_2O_2$  'ye maruz kalan hücreler morfolojik olarak tipik değişiklikler gösterirler ve çoğalmalarını yavaşlatırlar, bunun sonucunda da tipik yaşlanma ve apoptotik değişiklikler gösterirler [83-85]. Çalışmamızda  $H_2O_2$  grubunda, oksidatif stres hasarına bağlı olarak canlı hücre sayısında azalma, ölü hücre sayısında artış, apoptotik işaretleyici kaspaz-3 ve inflamatuvar faktör  $TNF-\alpha$  immünositokimya boyamalarında artış, mitokondrial işaretleyici TIM17 immünositokimya boyamasında azalma ve elektron mikroskopik incelemelerimizde dejeneratif ve apoptotik hücre morfolojisi bulguları gözlendi.

Antioksidanlar etkilerini serbest oksijen radikal [ROS] oluşumunu önleyerek ve/veya ROS 'larını temizleyerek gösterirler. İnsan sağlığı üzerinde olumlu etkileri olan, bitkilerde bulunan düşük molekül ağırlıklı doğal bileşiklerden olan ve flavonoidler sınıfında yer alan mirisetin [myrisetin, Myr] 'in antiapoptoz, anti-enflamatuvar ve antioksidan özellikler gösterdiği bilinmektedir [86-89]. Bu nedenlerle, gelecekte ROS üretimi nedeniyle hücre ölümü ve hasarına neden olan oksidatif strese karşı, çeşitli hastalıkların tedavisinde mirisetin ve MKH tedavisi gibi yeni ilaçların ve kombinasyonlarının kullanılması, yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkıda bulunacaktır.

Çalışmamızda, MKH'lere uygulanan  $H_2O_2$ 'in yol açtığı toksik hasara karşı  $H_2O_2$ +mirisetin grubu ile  $H_2O_2$  grubu karşılaştırıldığında canlı hücre sayısında artış, ölü hücre sayısında azalma, kaspaz-3 ve TNF- $\alpha$  immünohistokimya boyamalarında azalma, TIM17 immünohistokimya boyamasında artış ve elektron mikroskopik incelemelerimizde dejeneratif ve apoptotik hücre morfolojisinde azalma gözlemlendi. Mirisetin grubunda da canlı ve ölü hücre sayıları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi ve toksisiteye neden olmadığı saptandı. Mirisetin grubu kaspaz-3 ve TNF- $\alpha$  immünohistokimya boyamaları, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmadı. Mirisetin grubu ve kontrol grubu karşılaştırıldığında ise TIM17 immünohistokimya boyamasında anlamlı bir artış ve elektron mikroskopik incelemelerimizde dejeneratif ve apoptotik hücre morfolojisinde azalma gözlemlendi.

TIM17, hücre canlılığı ve protein girişi için gerekli olduğu gösterilmiş fakat işlevleri tam olarak saptanamamış bir translokazdır [90, 91]. Tüm fonksiyonları bilinmese de [92] TIM17'nin, mitokondriyal DNA(mtDNA) bütünlüğünün korunmasında kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir. MtDNA, DNA bağlayıcı proteinlere bağlanarak bir nükleoprotein kompleksi oluşturmak üzere, nükleoid yapılar şeklinde paketlenir [91]. Bu mtDNA bağlayıcı proteinlerin eksikliğinde TIM17 'nin aşırı ekspresyonu (overekspresyon) mtDNA kaybını engellemektedir [93, 94].

Çalışmamızda kullandığımız TIM17 (H1) antikorunu, TIM17 'nin C terminal ucuna yakın 117-157 aminoasitleri arasındaki bir epitop bölgesini haritalamak için spesifik. İmmünohistokimyasal çalışmalarla genellikle mitokondri iç zarı ve sitoplazmik boyanma göstermektedir. Bununla birlikte, sitoplazmik alana özgü antikorları kullanan diğer çalışmalar, TIM17 'nin transkripsiyonla nükleusa ve mitokondriye taşınabileceğini göstermektedir. Bazı patolojik koşullarda da TIM17 'nin muhtemel rolleri hakkında çok az şey bilinmektedir. Artan sayıda plazma membran proteininin, transkripsiyonun düzenlenmesi ve hücre çoğalması dahil olmak üzere çeşitli işlevlere sahip olarak nükleusa taşındığı gösterilmiştir[95]. Örneğin; Notch yolağı [96] veya  $\beta$ -distroglükanda [97], sitoplazmik bölüm plazma membranındaki ekstraselüler bölümden ayrıldıktan sonra nükleusa girer. Bir başka durumda ise; fibroblast büyüme faktörü reseptörü (FGFR1) [98] ve epidermal büyüme faktörü reseptöründe [99] olduğu gibi protein bütün halinde nükleusa taşınmaktadır. Ayrıca hipoksi ve genotoksik stresin, apoptozla ilişkili mitokondriyal proteinlerin seviyelerini nükleusta arttırdığı bildirilmiştir[100]. Bu

proteinler belirgin nükleus lokalizasyon sinyalleri içermezler, ancak potansiyel bir DNA ve RNA bağlanma motifleri içerirler ve hücreler hipoksik strese maruz kaldıklarında nükleusun içine yerleşirler. Son çalışmalar, bu proteinlerin hücre döngüsünün ilerlemesinde ve DNA onarımı süreçlerinde yer aldığını göstermiştir. Proteinlerin nükleusta lokalize olması, radyasyon ve ilaç direncini artırabilir. Ancak, bu proteinlerin nükleusa taşınma mekanizmaları henüz net olarak gösterilememiştir [101, 102].

Nükleus proteinlerinin çoğunun (yaklaşık %57), kromatin veya nükleolus içinde işlev gördüğü tahmin edilmektedir. Örneğin; MUC1, müsin epitel hücreleri tarafından eksprese edilen büyük bir transmembran proteindir, kanser hücrelerinde aşırı ifade edilir ve glikozillenir [103, 104]. Hücre dışı bölüm; MUC1-N ve sitoplazmik kuyruk; MUC1-C şeklinde 2 alt birime ayrılan MUC1, endoplazmik retikulumda tek bir polipeptit haline çevrilir. Oksidatif strese cevap, apoptozis direnciyle ilişkilidir. ZR-75 meme tümör hücrelerinin heregulin büyüme faktörü ile inkübasyonu, transmembran bir glikoprotein olan MUC1-C 'nin nükleusa translokasyonunu indüklediği gösterilmiştir [104]. Yapılan bazı çalışmalarda, MUC1-C'nin, plazma membran proteinleri grubundaki artışına bağlı olarak, plazma membranında proteolitik bölünme veya alt birim ayrışmasından sonra nükleusa taşınabileceği önerilmiştir [105, 106]. Ayrıca, sadece MUC1-N 'nin değil, MUC1-C'nin de nükleusa taşındığı yönünde sık sık ileri sürülen varsayımlar vardır [97]. Antikorların çoğu, MUC1-N 'nin 20 amino asitlik bir bölge içindeki epitoplarını tanır ve antikor reaktivitesi, genellikle O-bağımlı glikozilasyonun derecesine bağlı olarak değişir [107]. Boyamanın yoğunluğu kullanılan dokuya ve antikora bağlı olarak değişmekle birlikte, reaktivite beklendiği gibi genellikle çoğu normal dokuda apikal plazma membranı ile ilişkili olarak tanımlanır. Bazen de doku kesitlerinde nükleus lokalizasyonunun rapor edilememesi nükleus boyanmasının yeterli değerlendirilmesini engelleyen düşük büyütme görüntülerden kaynaklanır. Bununla birlikte, bazı durumlarda da nükleus boyanması, fotomikrograflarda mevcuttur ancak bunlar yazarlar tarafından belirtilmemiş veya tartışılmamıştır. MUC1 'in nükleusta ekspresyonu ve nükleus içi lokalizasyonu ile ilgili farklı sonuçlar, hücre tiplerindeki ve MUC1 glikozilasyonundaki farklılıklarını ve kullanılan farklı antikorların özgünlüklerini yansıtabilir [104, 108, 109].

Mahanta ve arkadaşları, MUC1 hücre dışı bölgesinin, ağırlıklı olarak normal fallop tüpü ve kanserli meme, akciğer ve kolon epitellerinin sitoplazmasında bulunduğunu bildirmişlerdir [110]. Farklı bir çalışmada, meme kanseri dokusunun Western blot

analizi, MUC1 'in hücre dışı bölgesinin membran, sitozol ve nükleusta immünoreaktivitesini göstermiştir [111]. Kumar ve arkadaşları MUC1-C 'yi nükleus matriksi, nükleolus ve nükleusun periferinde saptamışlardır [104]. Diğer çalışmalarda da, nükleolus veya nükleusta yaygın granüler ekspresyon gösterdikleri saptanmıştır [112]. Rabassa ve arkadaşları da, neoplastik meme, baş, boyun ve kolon örneklerinin hücre nükleuslarında MUC1 hücre dışı alt biriminin eksprese edildiğini göstermişlerdir [113]. Yine bir çalışmada, MUC1 'in transkripsiyon faktör p65 ile etkileşime girdiği ve bu kompleksin meme kanseri hücrelerinin nükleusundaki sitokin promotör bölgelerine bağlandığı sonucuna varılmıştır [114]. Bu bulgular, sadece MUC1-N 'nin nükleusa taşındığı ve gen düzenlemesinde yer aldığı fikrini de değiştirmektedir.

Nükleusta bulunan beneklerdeki bazı ribonükleoproteinlerin organizasyonu, RNA ile de bir etkileşim gerektirir. Bu nedenle MUC1 nükleus lokalizasyonunun RNA'ya bağımlılığı da incelenmiştir. İmmüno Floresanla, immüno presipitasyon gibi çeşitli analizlerle belirlenen nükleustaki beneklerde, MUC1 hücre dışı bölümünün varlığı ve bu lokalizasyonun RNA ile olan ilişkisi bu yapıların oluşturulması ve/veya organizasyonunda RNA 'nın da bir rolü olduğu önerilmiştir [104].

Ayrıca; MUC1 'in nükleusa nasıl girdiği ve yolunun ne olduğu da ayrı bir sorudur. Nükleusa giriş ile ilgili olarak, moleküler boyutu pasif difüzyonu engeller. Bu yüzden bir olasılık, MUC1 'nin başka bir protein aracılığıyla nükleusa girmesidir. Böyle bir "piggy-back" mekanizmasının örnekleri bilinmektedir. Örneğin, Cdk2'nin nükleusa girişi, siklinE gerektirir [115] ve EIF4E 'nin nükleusa girişi için ise 4E-T ile etkileşimi gerekir [104, 116]. MUC1-N 'nin nükleusa giriş yolu, sentez ve otoproteolizden sonra doğrudan taşınmasıyla veya proteinin plazma zarına yerleşmesinden sonra (endositoz yoluyla) meydana gelebilir. Salgılanan bazı proteinlerin (FGF gibi) endositoza uğradığı ve daha sonra nükleusa taşındığı bilinmektedir [95]. MUC1 'in nükleoplazmada bulunduğu ve işlev gördüğü bilinen hem proteazomlar hem de matriks-metalloproteinazları (MMP'ler) tarafından nükleusta parçalanabileceği de düşünülebilir [117]. Oppizzi ve arkadaşları da MUC1 ve diğer membrana bağlı musin ve b-distroglikan'ın da nükleusa taşındığını göstermişlerdir. Eğer deniz kestanesi-enterokinaz-agrin (SEA) alanının bölünmesi bloke edilmişse, bu proteinlerin yalnızca sitoplazmik bölümleri nükleusa ulaştığında otoproteolizis meydana gelir [97, 104].

Ek olarak, çalışmamızda ilk kez TIM17 'nin, nükleusta benekler (interkromatin granül kümeleri) şeklinde lokalize olduğunu gösterdik. Bu sonuçlar, TIM17 'nin, plazma

membran proteinlerindeki artışa bağlı olarak, plazma membranından proteolitik bölünme ve alt birim ayrışmasından sonra veya bütün halinde nükleusa taşınabileceğini düşündürmektedir [98, 105, 106]. Daha ileri çalışmalar, TIM17 ‘nin nükleustaki rolünü açıklamak ve doğrulamak için faydalı olacaktır. Sonuç olarak; mirisetinin in vitroda MKH’lerinde TIM17 üretimini arttırdığı görülmüştür. Bu sayede mirisetin, çeşitli hastalıklarda yeni bir tedavi edici ajan olarak kullanılabilir. Ayrıca mirisetin MKH üzerinde antiapoptotik ve anti-inflamatuvar etkileriyle, hücrelerin canlılığı ve proliferasyonu arttırması nedeniyle, MKH ile kombine edilerek destekleyici alternatif bir tedavi seçeneği olarak değerlendirilebilir. Fakat yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için in vivoda, in vitroda ve klinikte ileriye dönük olarak daha fazla araştırılması ve desteklenmesi gereklidir.

## KAYNAKLAR

1. Cao, Y., et al., Protective effect of carnosine on hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human kidney tubular epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2021. 534: p. 576-582.
2. Caio-Silva, W., et al., Characterization of the Oxidative Stress in Renal Ischemia/Reperfusion-Induced Cardiorenal Syndrome Type 3. *BioMed Research International*, 2020.
3. Sefi, M., et al., Zinc alleviates maneb-induced kidney injury in adult mice through modulation of oxidative stress, genotoxicity, and histopathological changes. *Environmental Science and Pollution Research*, 2020. 27(8): p. 8091-8102.
4. Sara, A., et al., Leaves of Lavender Protect Adult Mice from Hydrogen Peroxide-induced Injury: Evidence from in vitro and in vivo Tests. *Journal of Oleo Science*, 2020. 69(9): p. 1107-1115.
5. Yalçın, E., et al., In vivo protective effects of Ginkgo biloba L. leaf extract against hydrogen peroxide toxicity: cytogenetic and biochemical evaluation. *Environmental Science and Pollution Research*, 2020. 27(3): p. 3156-3164.
6. Chen, H.Y., et al., The protective effect of 17 $\beta$ -estradiol against hydrogen peroxide-induced apoptosis on mesenchymal stem cell. *Biomed Pharmacother*, 2012. 66(1): p. 57-63.
7. Alshabibi, M.A., et al., Human decidua basalis mesenchymal stem/stromal cells protect endothelial cell functions from oxidative stress induced by hydrogen peroxide and monocytes. *Stem Cell Res Ther*, 2018. 9(1): p. 275.
8. Roscoe, J.M. and C.S. Sevier, Pathways for Sensing and Responding to Hydrogen Peroxide at the Endoplasmic Reticulum. *Cells*, 2020. 9(10).
9. Ding, D.C., W.C. Shyu, and S.Z. Lin, Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*, 2011. 20(1): p. 5-14.
10. Bianco, P., Stem cells and bone: a historical perspective. *Bone*, 2015. 70: p. 2-9.
11. Wang, A.-T., et al., Application of mesenchymal stem cell therapy for the treatment of osteoarthritis of the knee: a concise review. 2019. 11(4): p. 222.
12. Lam, A.T., S. Reuveny, and S.K.-W.J.S.c.r. Oh, Human mesenchymal stem cell therapy for cartilage repair: review on isolation, expansion, and constructs. *Stem cell research*, 2020. 44: p. 101738.
13. Wang, J.-H., et al., Role of mesenchymal stem cell derived extracellular vesicles in autoimmunity: a systematic review. *World Journal of Stem Cells*, 2020. 12(8): p. 879.
14. Shang, F., et al., Advancing application of mesenchymal stem cell-based bone tissue regeneration. *Bioact Mater*, 2021. 6(3): p. 666-683.
15. Volarevic, V., et al., Ethical and Safety Issues of Stem Cell-Based Therapy. *Int J Med Sci*, 2018. 15(1): p. 36-45.
16. Fu, X., et al., Mesenchymal Stem Cell Migration and Tissue Repair. *Cells*, 2019. 8(8).
17. Song, X., et al., Myricetin: A review of the most recent research. *Biomed Pharmacother*, 2021. 134: p. 111017.
18. Gupta, G., et al., Current pharmacological trends on myricetin. *Drug Research*, 2020.

19. Hiermann, A., H. Schramm, and S.J.I.R. Laufer, Anti-inflammatory activity of myricetin-3-O- $\beta$ -D-glucuronide and related compounds. *Inflammation research*, 1998. 47(11): p. 421-427.
20. Perkin, A.G.J.J.o.t.C.S., *Transactions*, XXI.—Myricetin. Part II. 1902. 81: p. 203-210.
21. Perkin, A.G.J.J.o.t.C.S., *Transactions*, CXCI.—Myricetin. Part III. 1911. 99: p. 1721-1725.
22. Miesan, K.H., S.J.J.o.a. Mohamed, and f. chemistry, Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2001. 49(6): p. 3106-3112.
23. Semwal, D.K., et al., Myricetin: A dietary molecule with diverse biological activities. *Nutrients*, 2016. 8(2): p. 90.
24. Häkkinen, S.H., et al., HPLC method for screening of flavonoids and phenolic acids in berries. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1998. 77(4): p. 543-551.
25. Sood, P.; Shri, R. A review on ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological aspects of *Myrica esculenta*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018, 80.1: 2-13.
26. Chen, H.Y., et al., The protective effect of 17 $\beta$ -estradiol against hydrogen peroxide-induced apoptosis on mesenchymal stem cell. *Biomed Pharmacother*, 2012. 66(1): p. 57-63..
27. Amanat, M., et al., *Zingiber roseum* Rosc. rhizome: A rich source of hepatoprotective polyphenols. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021. 139: p. 111673.
28. Lv, H., et al., The hepatoprotective effect of myricetin against lipopolysaccharide and D-galactosamine-induced fulminant hepatitis. *International journal of biological macromolecules*, 2020. 155: p. 1092-1104.
29. Kimura, A.M., et al., Myricetin prevents high molecular weight A $\beta$ 1-42 oligomer-induced neurotoxicity through antioxidant effects in cell membranes and mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine*, 2021. 171: p. 232-244.
30. Varela-Rodríguez, L., et al., Effect of Gallic acid and Myricetin on ovarian cancer models: a possible alternative antitumoral treatment. *BMC complementary medicine and therapies*, 2020. 20(1): p. 1-16.
31. Kong, Y.R., et al., Beneficial Role of *Carica papaya* Extracts and Phytochemicals on Oxidative Stress and Related Diseases: A Mini Review. *Biology*, 2021. 10(4): p. 287.
32. Kandasamy, N. and N. Ashokkumar, Renoprotective effect of myricetin restrains dyslipidemia and renal mesangial cell proliferation by the suppression of sterol regulatory element binding proteins in an experimental model of diabetic nephropathy. *Eur J Pharmacol*, 2014. 743: p. 53-62.
33. Hu, Q., et al., Flavonoids on diabetic nephropathy: advances and therapeutic opportunities. *Chinese medicine*, 2021. 16(1): p. 1-17.
34. Choi, H.N., et al., Ameliorative effect of myricetin on insulin resistance in mice fed a high-fat, high-sucrose diet. *Nutr Res Pract*, 2014. 8(5): p. 544-9.
35. Li, X., et al., Myricetin ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice by inhibiting TGF- $\beta$  signaling via targeting HSP90 $\beta$ . *Biochemical pharmacology*, 2020. 178: p. 114097.
36. Karadeniz, F., et al., Myricetin 3-O- $\beta$ -D-Galactopyranoside Exhibits Potential Anti-Osteoporotic Properties in Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal

- Stromal Cells via Stimulation of Osteoblastogenesis and Suppression of Adipogenesis. *Cells* 2021. 10(10): p. 2690.
37. McCarty, M.F., S.I. Assanga, and L.L.J.M.h. Lujan, Flavones and flavonols may have clinical potential as CK2 inhibitors in cancer therapy. *Cancer Stud. Mol. Med. Open J*, 2020. 141: p. 109723.
  38. Kim, Y.S., et al., Myricetin inhibits advanced glycation end product (AGE)-induced migration of retinal pericytes through phosphorylation of ERK1/2, FAK-1, and paxillin in vitro and in vivo. *Biochemical pharmacology* 2015. 93(4): p. 496-505.
  39. Suresh, K., et al., A nonapoptotic endothelial barrier-protective role for caspase-3. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2019. 316(6): p. L1118-11126.
  40. Jiang, M., et al., The caspase-3/GSDME signal pathway as a switch between apoptosis and pyroptosis in cancer. *Cell Death Discov*, 2020. 6: p. 112.
  41. Idriss, H.T. and J.H. Naismith, TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech*, 2000. 50(3): p. 184-95.
  42. Zelová, H. and J. Hošek, TNF- $\alpha$  signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. *Inflamm Res*, 2013. 62(7): p. 641-51.
  43. Chen, G. and D.V. Goeddel, TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*, 2002. 296(5573): p. 1634-5.
  44. Frey, T.G. and C.A. Mannella, The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci*, 2000. 25(7): p. 319-24.
  45. Žárský, V. and P. Doležal, Evolution of the Tim17 protein family. *Biol Direct*, 2016. 11(1): p. 54.
  46. Chaudhuri, M., et al., Tim17 Updates: A Comprehensive Review of an Ancient Mitochondrial Protein Translocator. *Biomolecules*, 2020. 10(12).
  47. Ferreira, N., et al., Stress signaling and cellular proliferation reverse the effects of mitochondrial mistranslation. 2019. 38(24): p. e102155.
  48. Avendaño-Monsalve, M.C., J.C. Ponce-Rojas, and S.J.B.c. Funes, From cytosol to mitochondria: The beginning of a protein journey. 2020. 401(6-7): p. 645-661.
  49. Zorkau, M., et al., High-resolution imaging reveals compartmentalization of mitochondrial protein synthesis in cultured human cells. 2021. 118(6).
  50. Browne, S.E., Mitochondria and Huntington's disease pathogenesis: insight from genetic and chemical models. *Ann N Y Acad Sci*, 2008. 1147: p. 358-82.
  51. Yablonska, S., et al., Mutant huntingtin disrupts mitochondrial proteostasis by interacting with TIM23. 2019. 116(33): p. 16593-16602.
  52. Waegemann, K., et al., Cooperation of TOM and TIM23 complexes during translocation of proteins into mitochondria. *J Mol Biol*, 2015. 427(5): p. 1075-84.
  53. Gomkale, R., et al., Mapping protein interactions in the active TOM-TIM23 supercomplex. 2021. 12(1): p. 1-17.
  54. Bajaj, R., et al., Molecular basis of the dynamic structure of the TIM23 complex in the mitochondrial intermembrane space. *Structure*, 2014. 22(10): p. 1501-11.
  55. Khatlani, T., et al., Preconditioning by Hydrogen Peroxide Enhances Multiple Properties of Human *Decidua Basalis* Mesenchymal Stem/Multipotent Stromal Cells. *Stem Cells International*, 2018. 2018: p. 6480793.
  56. Zhang, F., et al., New strategy of bone marrow mesenchymal stem cells against oxidative stress injury via Nrf2 pathway: oxidative stress preconditioning. *J Cell Biochem*, 2019. 120(12): p. 19902-19914.

57. Facchin, F., et al., Comparison of Oxidative Stress Effects on Senescence Patterning of Human Adult and Perinatal Tissue-Derived Stem Cells in Short and Long-term Cultures. *Int J Med Sci*, 2018. 15(13): p. 1486-1501.
58. Ransy, C., et al., Use of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to Cause Oxidative Stress, the Catalase Issue. *Int J Mol Sci*, 2020. 21(23).
59. Xiang, J., et al., Is Hydrogen Peroxide a Suitable Apoptosis Inducer for All Cell Types? *BioMed Research International*, 2016. 2016: p. 7343965.
60. Millionig, G., et al., Sustained submicromolar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels induce hepcidin via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). *J Biol Chem*, 2012. 287(44): p. 37472-82.
61. Jiang, M., et al., Anti-tumor effects and associated molecular mechanisms of myricetin. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019. 120: p. 109506.
62. Feng, J., et al., Myricetin inhibits proliferation and induces apoptosis and cell cycle arrest in gastric cancer cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2015. 408(1): p. 163-170.
63. Huang, H., et al., Myricetin inhibits proliferation of cisplatin-resistant cancer cells through a p53-dependent apoptotic pathway. *Int J Oncol*, 2015. 47(4): p. 1494-1502.
64. Seydi, E., et al., Myricetin Selectively Induces Apoptosis on Cancerous Hepatocytes by Directly Targeting Their Mitochondria. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2016. 119(3): p. 249-258.
65. Fideles, S.O.M., et al., Effect of cell source and osteoblast differentiation on gene expression profiles of mesenchymal stem cells derived from bone marrow or adipose tissue. *Journal of cellular biochemistry*, 2019. 120(7): p. 11842-11852.
66. Park, H., et al., Myricetin treatment induces apoptosis in canine osteosarcoma cells by inducing DNA fragmentation, disrupting redox homeostasis, and mediating loss of mitochondrial membrane potential. *Journal of Cellular Physiology*, 2018. 233(9): p. 7457-7466.
67. Zhao, H.-F., et al., A Multi-targeted Natural Flavonoid Myricetin Suppresses Lamellipodia and Focal Adhesions Formation and Impedes Glioblastoma Cell Invasiveness and Abnormal Motility. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 2018. 17(7): p. 557-567.
68. Ueshima, E., et al., Hepatic Artery Embolization Induces the Local Overexpression of Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 in a Rat Hepatoma Model. *Liver Cancer*, 2020. 9(1): p. 63-72.
69. Keitel, U., et al., Bcl-xL mediates therapeutic resistance of a mesenchymal breast cancer cell subpopulation. *Oncotarget*, 2014. 5(23).
70. Au - Azzarito, G., et al., Mammary Epithelial and Endothelial Cell Spheroids as a Potential Functional In vitro Model for Breast Cancer Research. *JoVE*, 2021(173): p. e62940.
71. Zhu, C., et al., Co-culture of the bone and bone marrow: a novel way to obtain mesenchymal stem cells with enhanced osteogenic ability for fracture healing in SD rats. *J Orthop Surg Res*, 2019. 14(1): p. 293.
72. Sir, G., et al., Antagonistic Effect of Oxytocin and Tacrolimus Combination on Adipose Tissue - Derived Mesenchymal Stem Cells: Antagonistic effect of oxytocin and tacrolimus. *Biomed Pharmacother*, 2018. 97: p. 1173-1181.

73. Yang, M., et al., Hypoxia reduces the osteogenic differentiation of peripheral blood mesenchymal stem cells by upregulating Notch-1 expression. 2019: p. 1-14.
74. Mu, K., et al., Cord-derived mesenchymal stem cells therapy for liver cirrhosis in children with refractory Henoch-Schonlein purpura: A case report. *Medicine (Baltimore)*, 2018. 97(47): p. e13287.
75. Zawada, W.M., et al., Growth factors improve immediate survival of embryonic dopamine neurons after transplantation into rats. *Brain Res*, 1998. 786(1-2): p. 96-103.
76. Tavakol, S., et al., Thermogel nanofiber induces human endometrial-derived stromal cells to neural differentiation: In vitro and in vivo studies in rat. *J Biomed Mater Res A*, 2014. 102(12): p. 4590-7.
77. Tavakol, S., et al., The effect of Noggin supplementation in Matrigel nanofiber-based cell culture system for derivation of neural-like cells from human endometrial-derived stromal cells. *J Biomed Mater Res A*, 2015. 103(1): p. 1-7.
78. Nouri, F., S.N. Nematollahi-Mahani, and A.M. Sharifi, Preconditioning of Mesenchymal Stem Cells with Non-Toxic Concentration of Hydrogen Peroxide Against Oxidative Stress Induced Cell Death: The Role of Hypoxia-Inducible Factor-1. *Adv Pharm Bull*, 2019. 9(1): p. 76-83.
79. Samsonraj, R.M., et al., Concise Review: Multifaceted Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells for Use in Regenerative Medicine. *Stem Cells Transl Med*, 2017. 6(12): p. 2173-2185.
80. Turinetto, V., E. Vitale, and C. Giachino, Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell-Based Therapy. *Int J Mol Sci*, 2016. 17(7).
81. Valle-Prieto, A. and P.A. Conget, Human mesenchymal stem cells efficiently manage oxidative stress. *Stem Cells Dev*, 2010. 19(12): p. 1885-93.
82. Denu, R.A. and P. Hematti, Effects of Oxidative Stress on Mesenchymal Stem Cell Biology. *Oxid Med Cell Longev*, 2016. 2016: p. 2989076.
83. Choo, K.B., et al., Oxidative stress-induced premature senescence in Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Int J Med Sci*, 2014. 11(11): p. 1201-7.
84. Wajid, N., et al., Lovastatin protects chondrocytes derived from Wharton's jelly of human cord against hydrogen-peroxide-induced in vitro injury. *Cell Tissue Res*, 2013. 351(3): p. 433-43.
85. Nimsanor, N., et al., Inhibitory effect of oxidative damage on cardiomyocyte differentiation from Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Exp Ther Med*, 2017. 14(6): p. 5329-5338.
86. Lv, H., et al., The hepatoprotective effect of myricetin against lipopolysaccharide and D-galactosamine-induced fulminant hepatitis. *Int J Biol Macromol*, 2019.
87. Sun, F., et al., New micelle myricetin formulation for ocular delivery: improved stability, solubility, and ocular anti-inflammatory treatment. *Drug Deliv*, 2019. 26(1): p. 575-585.
88. Meng, Z., et al., Myricetin ameliorates atherosclerosis in the low-density-lipoprotein receptor knockout mice by suppression of cholesterol accumulation in macrophage foam cells. *Nutr Metab (Lond)*, 2019. 16: p. 25.
89. Lou, D., et al., Inhibitory Mechanisms of Myricetin on Human and Rat Liver Cytochrome P450 Enzymes. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2019. 44(5): p. 611-618.

90. Chacinska, A., et al., Mitochondrial presequence translocase: switching between TOM tethering and motor recruitment involves Tim21 and Tim17. *Cell*, 2005. 120(6): p. 817-29.
91. Matta, S.K., et al., Role of Tim17 Transmembrane Regions in Regulating the Architecture of Presequence Translocase and Mitochondrial DNA Stability. *Mol Cell Biol*, 2017. 37(6).
92. Demishtein-Zohary, K., et al., Role of Tim17 in coupling the import motor to the translocation channel of the mitochondrial presequence translocase. *Elife*, 2017. 6.
93. Spelbrink, J.N., Functional organization of mammalian mitochondrial DNA in nucleoids: history, recent developments, and future challenges. *IUBMB Life*, 2010. 62(1): p. 19-32.
94. Iacovino, M., et al., The conserved translocase Tim17 prevents mitochondrial DNA loss. *Hum Mol Genet*, 2009. 18(1): p. 65-74.
95. Planque, N., Nuclear trafficking of secreted factors and cell-surface receptors: new pathways to regulate cell proliferation and differentiation, and involvement in cancers. *Cell Commun Signal*, 2006. 4: p. 7.
96. Struhl, G. and A. Adachi, Nuclear access and action of notch in vivo. *Cell*, 1998. 93(4): p. 649-60.
97. Oppizzi, M.L., et al., Nuclear translocation of beta-dystroglycan reveals a distinctive trafficking pattern of autoproteolyzed mucins. *Traffic*, 2008. 9(12): p. 2063-72.
98. Bryant, D.M. and J.L. Stow, Nuclear translocation of cell-surface receptors: lessons from fibroblast growth factor. *Traffic*, 2005. 6(10): p. 947-54.
99. Lin, S.Y., et al., Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol*, 2001. 3(9): p. 802-8.
100. Koop, E.A., et al., Expression of BNIP3 in invasive breast cancer: correlations with the hypoxic response and clinicopathological features. *BMC Cancer*, 2009. 9(1): p. 175.
101. Burton, T.R., D.D. Eisenstat, and S.B. Gibson, BNIP3 (Bcl-2 19 kDa interacting protein) acts as transcriptional repressor of apoptosis-inducing factor expression preventing cell death in human malignant gliomas. *J Neurosci*, 2009. 29(13): p. 4189-99.
102. Regula, K.M., K. Ens, and L.A. Kirshenbaum, Inducible expression of BNIP3 provokes mitochondrial defects and hypoxia-mediated cell death of ventricular myocytes. *Circ Res*, 2002. 91(3): p. 226-31.
103. Kufe, D.W., Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat Rev Cancer*, 2009. 9(12): p. 874-85.
104. Kumar, P., et al., The MUC1 extracellular domain subunit is found in nuclear speckles and associates with spliceosomes. *PLoS One*, 2012. 7(8): p. e42712.
105. Planque, N., Nuclear trafficking of secreted factors and cell-surface receptors: new pathways to regulate cell proliferation and differentiation, and involvement in cancers. *Cell Communication and Signaling*, 2006. 4(1): p. 7.
106. Hiesberger, T., et al., Proteolytic cleavage and nuclear translocation of fibrocystin is regulated by intracellular Ca<sup>2+</sup> and activation of protein kinase C. *J Biol Chem*, 2006. 281(45): p. 34357-64.
107. Schut, I.C., et al., MUC1 expression, splice variant and short form transcription (MUC1/Z, MUC1/Y) in prostate cell lines and tissue. *BJU Int*, 2003. 91(3): p. 278-83.

108. Yamada, N., et al., MUC1 expression is regulated by DNA methylation and histone H3 lysine 9 modification in cancer cells. *Cancer Res*, 2008. 68(8): p. 2708-16.
109. Wang, P., J.A. Julian, and D.D. Carson, The MUC1 HMFG1 glycoform is a precursor to the 214D4 glycoform in the human uterine epithelial cell line, HES. *Biol Reprod*, 2008. 78(2): p. 290-8.
110. Mahanta, S., et al., A minimal fragment of MUC1 mediates growth of cancer cells. *PLoS One*, 2008. 3(4): p. e2054.
111. Croce, M.V., et al., Patterns of MUC1 tissue expression defined by an anti-MUC1 cytoplasmic tail monoclonal antibody in breast cancer. *J Histochem Cytochem*, 2003. 51(6): p. 781-8.
112. Bitler, B.G., A. Goverdhan, and J.A. Schroeder, MUC1 regulates nuclear localization and function of the epidermal growth factor receptor. *J Cell Sci*, 2010. 123(Pt 10): p. 1716-23.
113. Rabassa, M.E., et al., Nuclear localization of MUC1 extracellular domain in breast, head and neck, and colon cancer. *Int J Biol Markers*, 2015. 30(3): p. e294-300.
114. Cascio, S., L. Zhang, and O.J. Finn, MUC1 protein expression in tumor cells regulates transcription of proinflammatory cytokines by forming a complex with nuclear factor- $\kappa$ B p65 and binding to cytokine promoters: importance of extracellular domain. *J Biol Chem*, 2011. 286(49): p. 42248-42256.
115. Moore, J.D., et al., Nuclear import of Cdk/cyclin complexes: identification of distinct mechanisms for import of Cdk2/cyclin E and Cdc2/cyclin B1. *J Cell Biol*, 1999. 144(2): p. 213-24.
116. Dostie, J., et al., A novel shuttling protein, 4E-T, mediates the nuclear import of the mRNA 5' cap-binding protein, eIF4E. *Embo j*, 2000. 19(12): p. 3142-56.
117. Yang, Y., et al., Increased intranuclear matrix metalloproteinase activity in neurons interferes with oxidative DNA repair in focal cerebral ischemia. *J Neurochem*, 2010. 112(1): p. 134-49.

## İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

### OKSİDATİF STRESE MARUZ KALAN MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER ÜZERİNE MİRİSETİN'İN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

#### ORJİNALLİK RAPORU

|                   |                     |            |                  |
|-------------------|---------------------|------------|------------------|
| % <b>7</b>        | % <b>6</b>          | % <b>2</b> | %                |
| BENZERLİK ENDEKSİ | İNTERNET KAYNAKLARI | YAYINLAR   | ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ |

#### BİRİNCİL KAYNAKLAR

|          |                                                                                                                |             |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>1</b> | <a href="http://www.docstoc.com">www.docstoc.com</a><br>İnternet Kaynağı                                       | % <b>2</b>  |
| <b>2</b> | <a href="http://acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr:8080">acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr:8080</a><br>İnternet Kaynağı | <% <b>1</b> |
| <b>3</b> | <a href="http://nek.istanbul.edu.tr:4444">nek.istanbul.edu.tr:4444</a><br>İnternet Kaynağı                     | <% <b>1</b> |
| <b>4</b> | <a href="http://istanbultip.istanbul.edu.tr">istanbultip.istanbul.edu.tr</a><br>İnternet Kaynağı               | <% <b>1</b> |
| <b>5</b> | <a href="http://acikerisim.dicle.edu.tr">acikerisim.dicle.edu.tr</a><br>İnternet Kaynağı                       | <% <b>1</b> |
| <b>6</b> | <a href="http://yxsj.smmu.edu.cn">yxsj.smmu.edu.cn</a><br>İnternet Kaynağı                                     | <% <b>1</b> |
| <b>7</b> | <a href="http://www.quintessence-publishing.com">www.quintessence-publishing.com</a><br>İnternet Kaynağı       | <% <b>1</b> |
| <b>8</b> | <a href="http://acikerisim.istinye.edu.tr">acikerisim.istinye.edu.tr</a><br>İnternet Kaynağı                   | <% <b>1</b> |
| <b>9</b> | <a href="http://apb.tbzmed.ac.ir">apb.tbzmed.ac.ir</a><br>İnternet Kaynağı                                     | <% <b>1</b> |