

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ROSİGLATAZONUN MİNİMAL REZİDÜEL
HASTALIK MODELİNDE NÖRONAL KÖK
HÜCRE DİFERANSİASYONU
ÜZERİNE ETKİSİ**

MERAL AYLA KOYUN

**TEMEL ONKOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İZMİR-2019

TEZ KODU: DEÜ.HSI.MSc-2012970159

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ROSİGLATAZONUN MİNİMAL REZİDÜEL
HASTALIK MODELİNDE NÖRONAL KÖK
HÜCRE DİFERANSİASYONU
ÜZERİNE ETKİSİ**

**TEMEL ONKOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

MERAL AYLA KOYUN

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Zekiye Sultan ALTUN

(Bu araştırma Türk Pediatrik Onkoloji Grubu Derneği'nden proje desteği almıştır.)

TEZ KODU: DEÜ.HSI.MSc-2012970159

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onkoloji Anabilim Dalı, Temel Onkoloji Yüksek Lisans Programı öğrencisi Meral AYLA KOYUN ‘ROSİGLATAZONUN MİNİMAL REZİDÜEL HASTALIK MODELİNDE NÖRONAL KÖK HÜCRE DİFERANSİYASYONU ÜZERİNE ETKİSİ’ konulu Yüksek Lisans tezini 29/05/2019 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.



Prof. Dr. Zekiye Sultan ALTUN

BAŞKAN

(Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü)



Prof. Dr. Safiye AKTAŞ

ÜYE

(Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü)



Dr. Öğr. Üye. Ayşe Banu DEMİR

ÜYE

(İzmir Ekonomi Üniversitesi Tıp Fakültesi)

Prof. Dr. Hatice Nur OLGUN

YEDEK ÜYE

(Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü)

Doç. Dr. Ayşe Gülden DİNİZ ÜNLÜ

YEDEK ÜYE

(İzmir Demokrasi Üniversitesi Tıp Fakültesi)

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İÇİNDEKİLER	i
TABLO DİZİNİ	iv
ŞEKİL DİZİNİ	v
KISALTMALAR	viii
TEŞEKKÜR	ix
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
1.1 Giriş:	5
1.2 Araştırmanın amacı.....	6
1.3 Araştırmanın hipotezi.....	6
2. GENEL BİLGİLER.....	7
2.1 Nöroblastom Tanım ve Özellikleri	7
2.1.1 Nöroblastom	7
2.2 Peroksizom Proliferatör Aktive Reseptörler (PPAR)	10
2.2.1 Ppargama (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma)	10
2.3 Sisplatin.....	11
2.4 Rosiglatazon	11
2.5 Nöral kök hücre farklılaşma belirteçleri	12
2.5.1 Oct-4	12
2.5.2 Sox2	12
2.5.3 Nestin	13
2.5.4 S-100.....	13
2.6 Apoptotik hücre ölümünün flow sitometri ile belirlenmesi	14
2.7 Kaspaz 3- 8 ve 9	15

2.8	Hücre siklusu	17
3.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
3.1	Araştırmanın Tipi	19
3.2	Araştırmanın yeri ve zamanı	19
3.3	Araştırmanın evreni ve örnekleme	19
3.4	Çalışma Materyali.....	19
3.4.1	Deney Grupları	19
3.5	Araştırmanın değişkenleri	20
3.6	Cihazlar ve Sarf malzemeler	21
3.6.1	Cihazlar	21
3.6.2	Gerekli Sarf ve Malzemeler	22
3.7	Araştırma Planı ve Takvimi	23
3.8	Verilerin Değerlendirilmesi.....	24
3.9	Araştırmanın Sınırlılıkları	24
3.10	Etik Kurul Onayı	24
3.11	YÖNTEMLER	25
3.11.1	Hücre kültürü.....	25
3.11.2	LD ₅₀ Doz Deneyleri.....	28
3.11.3	<i>İn-vitro</i> Minimal Rezideül Hastalık Modeli.....	28
3.11.4	EKSPRESYON ANALİZLERİ	29
3.11.5	Apoptotik hücre ölümünün flow sitometri ile belirlenmesi	34
3.11.6	Protein tayini	35
3.11.7	Kaspaz-3, 8 ve 9 aktivitelerinin belirlenmesi.....	36
3.11.8	Hücre siklusu	37
3.11.9	Nöronal kök hücre diferansiasyon belirteçlerinin flowsitometrik analizi ..	38
3.11.10	Nöronal kök hücre diferansiasyon belirteçlerinin immunohistokimyasal analizi	39

4.	BULGULAR.....	41
4.1	LD50 Doz Deney ve WST analiz bulguları	41
4.2	<i>İn-vitro</i> Minimal Rezidüel Hastalık Modeli bulguları.....	46
4.3	PHOX2B mRNA ekspresyon bulguları	47
4.4	Apoptotik hücre ölümünün flow sitometri bulguları	51
4.5	Kaspaz-3 bulguları.....	53
4.6	Kaspaz-8 bulguları.....	54
4.7	Kaspaz-9 bulguları.....	55
4.8	Hücre siklusu bulguları	56
4.8.1	Dirençli-MRH gelişmiş KELLY hücre siklusu bulguları.....	56
4.8.2	Dirençsiz KELLY hücre siklusu bulguları.....	58
4.8.3	Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y hücre siklusu bulguları.....	60
4.8.4	Dirençsiz SH-SY5Y hücre siklusu bulguları	62
4.9	Nöronal kök hücre diferansiasyon belirteçlerinin flowsitometrik analiz bulguları 64	
4.9.1	Dirençli-MRH gelişmiş KELLY kök hücre diferansiasyon bulguları.....	64
4.9.2	Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y kök hücre diferansiasyon bulguları	66
4.10	CD133 belirtecinin bulguları.....	68
4.11	S-100 belirtecinin bulguları.....	72
5.	TARTIŞMA	76
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	82
7.	KAYNAKLAR	83
8.	EKLER	88
8.1	Etik Kurul Raporu.....	88
8.2	Özgeçmiş.....	91

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Uluslararası çocukluk çağı kanser sınıflaması (ICCC, 1996)	5
Tablo 2. İlk Ulusal Pediatrik Kanser Kayıt Defteri T.Kutluk: A Turkish Pediatric Oncology Group (TPOG). Study Pediatr Blood and Cancer. 43(4): 452, 2004.....	6
Tablo 3. Lenfoma ve solid tümörlü çocuklarda tümör tipleri T. Kutluk, TPOG Pediatrik Tümör Kayıtları, 2002.....	7
Tablo 4. Uluslararası nöroblastom evreleme sistemi (International neuroblastoma staging system, INSS)	9
Tablo 5. Mevcut Cihazlar	21
Tablo 6. Gerekli Sarf Ve Malzemeler	22
Tablo 7. Çalışma izlem şeması	23
Tablo 8. cDNA Sentezi için eklenen bileşenler	30
Tablo 9. Reaksiyonda 7 µl hacimde önerilen bileşen miktarları.....	31
Tablo 10. Primer ara stok 10µl total reaksiyon hacmi	32

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Türkiye’deki kanserli çocukların yaşam süreleri (T. Kutluk, TPOG Pediatrik Tümör Kayıtları, 2002).....	8
Şekil 2. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Etki Mekanizması	10
Şekil 3. Obesity and Metabolic Syndrome Diabetes & Metabolism	12
Şekil 4. FITC Annexin kit Etki Mekanizması.....	14
Şekil 5. Propidium iyodüre karşı üç farklı popülasyon gözlemlenmesi.	15
Şekil 6. Kaspazların yapısı ve aktivasyonu.....	15
Şekil 7. Retina ganglion hücre ölümü ve akson rejenerasyonunda kaspazlar.....	17
Şekil 8. Hücre Siklusu	18
Şekil 9. Tabana tutunarak üreyen SH-SY5Y hücrelerinin 25 cm ² flasklarda çoğaltılmasının mikroskopik görüntüsü (X10)	26
Şekil 10. EVE Automatic Cell Counter cihazında flaskda bulunan canlı hücre sayısının belirlenmesi	27
Şekil 11. Protein standart eğrimiz.....	36
Şekil 12. DISCOVERY XT Ventana Medical Systems, Inc. cihaz	40
Şekil 13. Dirençsiz KELLY 24h CDDP WST analizi.....	41
Şekil 14. Dirençsiz KELLY CDDP+RZG kombinasyon 24h WST analizi.	42
Şekil 15. Dirençsiz SH-SY5Y CDDP,RZG veCDDP+RZGkombinasyonu 24h WST analizi	43
Şekil 16. Dirençli-MRH gelişmiş KELLY CDDP, RZG ve CDDP+RZG kombinasyonu WST analizi	44
Şekil 17. Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y CDDP,RZG ve CDDP+RZG kombinasyonu 24h WST analizi.....	45
Şekil 18. KELLY Minimal rezidüel hastalık model oluşumu.....	46
Şekil 19. SH-SY5Y Minimal rezidüel hastalık model oluşumu	47
Şekil 20. Gapdh gen amplifikasyon eğrisi	48
Şekil 21. PHOX2B genin amplifikasyon eğrisi.....	48
Şekil 22. Dirençsiz SH-SY5Y hücrelerinde PHOX2B gen analizi.....	49
Şekil 23. Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y hücrelerinde PHOX2B gen analizi	49
Şekil 24. Dirençsiz KELLY hücrelerinde PHOX2B gen analizi	50
Şekil 25. Dirençli-MRH gelişmiş KELLY hücrelerinde PHOX2B gen analizi	50

Şekil 26. Dirençli-MRH gelişmiş KELLY 24 saat canlılık ve total apoptoz oranları.....	51
Şekil 27. Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y 24 saat canlılık ve apoptoz oranları	52
Şekil 28. Dirençsiz ve Dirençli-MRH gelişmiş KELLY hücre hatlarının 24h Kaspaz-3 aktiviteleri.....	53
Şekil 29. Dirençsiz ve Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y hücre hatlarının 24h Kaspaz-3 aktiviteleri.....	53
Şekil 30. Dirençsiz ve Dirençli-MRH gelişmiş KELLY hücre hatlarının 24h Kaspaz-8 aktiviteleri.....	54
Şekil 31. Dirençsiz ve Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y hücre hatlarının 24h Kaspaz-8 aktiviteleri.....	54
Şekil 32. Dirençsiz ve Dirençli-MRH gelişmiş KELLY hücre hatlarının 24h Kaspaz-9 aktiviteleri.....	55
Şekil 33. Dirençsiz ve Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y hücre hatlarının 24h Kaspaz-9 aktiviteleri.....	55
Şekil 34. Dirençli-MRH gelişmiş KELLY hücre siklus flow sitometre görüntüsü	56
Şekil 35. Dirençli-MRH gelişmiş KELLY hücre siklus grafiği.....	57
Şekil 36. Dirençsiz KELLY hücre siklus flow sitometre görüntüsü	58
Şekil 37. Dirençsiz KELLY hücresinin hücre siklus ölçüm grafiği	59
Şekil 38. Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y hücre siklus flow sitometre görüntüsü	60
Şekil 39. Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y hücresinin hücre siklus ölçümü.	61
Şekil 40. Dirençsiz SH-SY5Y hücre siklus flow sitometre görüntüsü.....	62
Şekil 41. Dirençsiz SH-SY5Y hücresinin hücre siklus ölçümü.	63
Şekil 42. Dirençli-MRH gelişmiş KELLY hücresi nestin flowsitometrik analizi	64
Şekil 43. Dirençli-MRH gelişmiş KELLY hücresi Sox2 flowsitometrik analizi.....	64
Şekil 44. Dirençli-MRH gelişmiş KELLY hücresi OCT 3-4 flowsitometrik analizi.....	65
Şekil 45 Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y hücresi nestin flowsitometrik analizi	66
Şekil 46. Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y hücresi Sox2 flowsitometrik analizi.....	66
Şekil 47. Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y hücresi OCT3-4 flowsitometrik analizi.....	67
Şekil 48. Dirençsiz SH-SY5Y hücre CD133 immünohistokimyasal analizi	68
Şekil 49. Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y CD133 immünohistokimyasal analizi.....	69
Şekil 50. Dirençsiz KELLY hücre CD133 immünohistokimyasal analizi	69
Şekil 51. Dirençli-MRH gelişmiş KELLY hücre CD133 immünohistokimyasal analizi.....	70

Şekil 52. SH-SY5Y hücrelerinin nöron benzeri hücrelere farklılaşması.....	70
Şekil 53. KELLY hücrelerinin nöron benzeri hücrelere farklılaşması	71
Şekil 54. Dirençli-MRH gelişmiş ve Dirençsiz KELLY hücrelerinin S-100 grafiği	72
Şekil 55. Dirençli-MRH gelişmiş ve Dirençsiz SH-SY5Y hücrelerinin S-100 grafiği	73
Şekil 56. Dirençli-MRH gelişmiş KELLY hücrelerinde S-100 uygulaması.....	74
Şekil 57. Dirençsiz KELLY hücrelerinde S-100 uygulaması.	74
Şekil 58. Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y hücrelerinde S-100 uygulaması.	75
Şekil 59. Dirençsiz SH-SY5Y hücrelerinde S-100 uygulaması.	75



KISALTMALAR

Ark: Arkadařları

NB: Nöroblastom

MRH: Minimal Rezidüel Hastalık

TPOG: Türk Pediatrik Onkoloji Grubu

DNA: Deoksiribonükleik Asit

PPAR: Peroksizom Proliferatör Aktive Reseptörler

EKH: Embriyonik Kök Hücre

MSS: Merkezi Sinir Sistemi

RGZ: Rosiglatazon

CDDP: Sisplatin

PS: Fosfatidilserin

PI: Propidyum İyodür

CAD: Kaspazla Aktive Edilen DNaz

CDK: Cyclin-Dependent Kinase

FBS: Fetal Bovine Serum

RT: Real Time

RT-PCR: Real Time – Polimeraz Zincir Reaksiyonu

GADPH: Gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz

μ M: Mikromolar

rpm : (revolution per minute) Dakikadaki devir sayısı

LD₅₀: Letal Doz 50

LD₉₀: Letal Doz 90

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Zekiye Sultan ALTUN'a ilgisini ve önerilerini göstermekten kaçınmayan Temel Onkoloji Ana Bilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Safiye AKTAŞ'a, laboratuvar çalışmalarında ve bilgi paylaşımında desteğini esirgemeyen Araştırma Görevlisi Dr. Ayşe Pınar ERÇETİN ÖZDEMİR'e, deneylerin her aşamasında yardımcı olan her türlü sorunumda yardım elini uzatan değerli arkadaşım Ayça PAMUKOĞLU KAYNAR'a, ve Yenal GÖKPEK'e, manevi desteklerini benden esirgemeyen ve tezimi bitirebilmem için beni teşvik eden eşim Erdal KOYUN'a ve beni sürekli motive edip çalışma ortamı sağlayan ANNEME, tez çalışmama proje kapsamında maddi destek sağlayan TPOG'a, teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Meral AYLAKOYUN

ROSİGLATAZONUN MİNİMAL REZİDÜEL HASTALIK MODELİNDE NÖRONAL KÖK HÜCRE DİFERANSİASYONU ÜZERİNE ETKİSİ

Meral AYLAK KOYUN

**Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onkoloji Anabilim Dalı
Balçova, İzmir**

ÖZET

Nöroblastom (NB) nöral krestten köken alan embriyonik bir tümördür. Klinik remisyon elde edilen ileri evre hastalıkta en büyük sorun minimal rezidüel hastalığın (MRH) varlığıdır. Peroksizom proliferatör-aktive edici reseptör nükleer transkripsiyon faktörü olup hücre çoğalması ve diferansiasyonu regüle etmektedir. Rosiglatazon (RZG) peroksizom proliferatör-aktive edici reseptör agonisti antidiyabetik bir ajandır.

Bu çalışmada amacımız; Nöroblastom Minimal rezidüel hastalık hücre modeli oluşturmak ve rosiglatazonun (RZG) minimal rezidüel hastalık modelinde (MRH) nöronal kök hücre diferansiasyonu üzerinde etkili olup olmadığının belirlenmesiydi.

Çalışmada N-Myc pozitif **KELLY** ve N-Myc negatif hücre hattı **SH-SY5Y** kullanılmıştır. Hücrelerin canlılıkları WST-1 ile analiz edilerek LC₅₀ dozları belirlendi. NB hücrelerine tekrarlı sisplatin (CDDP) uygulamaları ile arta kalan hücrelere dayalı MRH modeli oluşturuldu. PHOX2B gen ekspresyonunun 2 kat ve daha fazla artış/azalışı hücrelerin MRH modelinin oluşmasının bir göstergesi olarak kullanıldı. PHOX2B gen ekspresyonu RT-PCR yöntemi ile belirlendi. MRH modeli oluşturulan NB hücrelerinde CDDP ve RZG hücre canlılığı, apoptoz, nöronal kök hücre farklılaşması ile ilişkili S-100, Oct-3, Nestin, Sox2 ve CD133 protein ekspresyonları aracılığı ile farklılaşma üzerine etkisi değerlendirildi. Bulguların, SPSS22 programında non-parametrik Mann-Whitney-U testi ile istatistik analizi yapılmıştır. $p < 0,05$ değeri istatistiksel anlamlı kabul edilmiştir.

SH-SY5Y ve KELLY hücrelerinde RZG LD₅₀ dozları; 50, 100 µM, CDDP LD₉₀ dozları KELLY’de 80 µM, SH-SY5Y’de 50 µM olarak belirlenmiştir. 400 µM CDDP ve CDDP+RGZ kombinasyonları NB hücre hatlarında hücre canlılıklarını azaltmış ve hücreleri apoptoza sürüklemiştir. Hücre siklusunda hücrelerin büyük kısmı SubG1’de tutuklanmıştır.

Dirençli-MRH gelişmiş hücrelerde CD133+ gözlenmemiştir. Dirençli-MRH gelişmiş KELLY ve SH-SY5Y hücrelerinin kontrole göre; CDDP+RGZ kombinasyonlarında PHOX2B gen ve OCT3-4 ekspresyonu artmış, Sox2 ekspresyonu azalmıştır.

MRH modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde CDDP+RZG kombinasyonu CDDP'e göre daha fazla apoptotik etki oluştururken farklılaşma belirteçlerinin azalması, KELLY hücrelerinde tersi durum gözlenmesi ve RZG etkisinin nöronal farklılaşma ile ilişkili olarak da gerçekleştiğini göstermiştir.

Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y hücrelerinde CD133+ hücre sayılarının dirençsizlere göre artması CDDP direnci ve MRH modelinde CD133+ kanser kök hücrelerinin de rolü olduğunu göstermiştir. N-MYC(-) ve (+) NB hücrelerinde farklı CD133 hücre oranlarının ortaya çıkması nöroblastomun heterojen tümör olduğunu ve bu heterojenitenin kök hücre profiliyle de karşımıza çıktığını desteklemiştir.

RZG, nöroblastom ana tedavi ajanı CDDP ile birlikte nöroblastomun MRH modelinde PPRgama reseptörü olan tümörlerde tedaviyi destekleyecek bir ajan olarak *in-vivo* NB modellerinde değerlendirilmesi gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: Rosiglatazon, Minimal reziduel hastalık *in-vitro* modeli, nöroblastom, nöronal kök hücre diferansiasyonu

THE EFFECT OF ROSIGLATAZONE ON DIFFERENTIATION OF NEURAL STEM CELLS IN MINIMAL RESIDUAL DISEASE MODEL OF NEUROBLASTOMA

Meral AYLAKOYUN

**Dokuz Eylul University Graduate School of Health Science Department of
Oncology Balçova, Izmir, Turkey**

ABSTRACT

Neuroblastoma (NB) is an embryonic tumor originating from the neural crest. The most important problem in advanced stage disease with clinical remission is the presence of minimal residual disease (MRD). Peroxisome proliferator-activating receptor is a nuclear transcription factor that regulates cell proliferation and differentiation. Rosiglitazone (RZG) peroxisome proliferator-activating receptor agonist is an antidiabetic agent.

The aim of this study was to establish the MRD model and to determine whether rosiglitazone has any effect on the differentiation of neuronal stem cell in minimal residual disease model.

In this study N-Myc positive KELLY and N-Myc negative SH-SY5Y cell lines were used. By analysing the viability of the cells WST-1 and LD₅₀ doses were determined. NB cells were generated by MRH model based on residual cells with repeated cisplatin (CDDP) treatments. A 2-fold or greater increase/decrease in PHOX2B gene expression was used as an indicator that the cells reached the minimal residual disease model. PHOX2B gene expression was determined by RT-PCR method. The effects of cisplatin (CDDP) and RZG cell viability, apoptosis and neuronal stem cell differentiation of neuroblastoma cells in the MRD model were investigated by using S-100, Oct-3, Nestin, Sox2 and CD133 protein expression. The statistical analysis was performed using the non-parametric Mann-Whitney-U test in the SPSS22 program. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

In SH-SY5Y and KELLY cells RZG LD₅₀ doses were determined as 50, 100 μ M; CDDP LD₉₀ doses were determined as 80 μ M in KELLY and 50 μ M in SH-SY5Y. 400 μ M CDDP and CDDP+RZG combinations reduced cell viability in NB cell lines and induced cells to apoptosis. In the cell cycle, most of the cells were imprisoned during the SubG1 phase. CD133+ in resistant cells not observed. Resistant MRD KELLY and SH-SY5Y cell according

to the control; in CDDP + RGZ combinations, expression of PHOX2B gene and OCT3-4 increased and Sox2 expression decreased.

The combination of CDDP+RZG in SH-SY5Y cells with MRD model showed more apoptotic effect when compared with CDDP, decrease in differentiation markers, observed opposite situation in KELLY cells, and effect of RZG in relation to neuronal differentiation.

Increased CD133+ cell counts in resistant MRH SH-SY5Y cells compared to non-resistant. Showed resistance to CDDP and CD133+ cancer stem cells in MRD model. The emergence of different CD133 cell ratios in N-MYC (-) and (+) NB cells supported the fact that neuroblastoma was a heterogeneous tumor and this heterogeneity was encountered with stem cell profile.

Rosiglatzone should be evaluated as an agent with CDDP main therapeutic of neuroblastoma and as a supportive agent at PPRgamma expressing tumors in MRD *in-vivo* NB model.

Key Words: Rosiglatzone, Minimal residual disease *in-vitro* model, neuroblastoma, neuronal stem cell differentiation

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1 Giriş:

Çocukluk çağında karşımıza çıkan kanserler, erişkin çağda karşımıza çıkan kanserden daha nadirdir. Tüm kanser çeşitlerinin % 0.5'i 15 yaşından küçük çocuklarda görülmektedir. Çocuk çağında ölüm nedeni olarak ilk 4 sırada kanser hastalıkları karşımıza çıkmaktadır (Kutluk T 2006).

Çocukluk çağı kanserleri, uluslararası çocuk kanserleri sınıflamasına göre 12 ana başlık altında incelenir. Çoğu embriyonel dönemde karşımıza çıkan tümörlerin dışında lenfoma, lösemi ve sinir sistemi tümörleri de sıklıkla karşımıza çıkar. Kromozomal bozukluklar veya immün yetmezlikler kanserlere yatkınlık sağlayan durumlardan bazılarıdır (Tablo 1).

Tablo 1. Uluslararası çocukluk çağı kanser sınıflaması (ICCC, 1996)

1	Lösemiler
2	Lenfomalar
3	Beyin ve spinal kanal tümörleri
4	Sempatik sistem tümörleri
5	Retinoblastoma
6	Böbrek tümörleri
7	Karaciğer tümörleri
8	Kemik tümörleri
9	Yumuşak doku sarkomları
10	Gonad ve germ hücreli tümörler
11	Epitelyal tümörler
12	Diğer malign neoplasmlar

Önceki yıllarda çocukluk kanserlerinin dağılımı hakkındaki bilgi Sağlık Bakanlığı ve gelişmiş merkezlerin kanser veri tabanı kayıtlarından elde edilirdi. Günümüzde ise ülkemizde 2002 yılından itibaren TPOG'un başlattığı Pediatrik Tümör kayıtları önemli bir gelişmedir. 2005 yılından bu zamana kadar TPOG ve Türk Pediatrik Hematoloji Derneği çocukluk çağı kanser kayıtlarını birlikte tutmaya başlamışlardır (Tablo 2).

Tablo 2. İlk Ulusal Pediatrik Kanser Kayıt Defteri T.Kutluk: A Turkish Pediatric Oncology Group (TPOG). Study Pediatr Blood and Cancer. 43(4): 452, 2004

Ülkemizde Çocukluk Çağı Malignitelerinin Sıklığı
Akut lösemi
Malign lenfomalar
SSS tümörleri
Nöroblastoma
Yumuşak doku sarkomları
Wilms tümörü
Germ hücreli tümörler
Malign kemik tümörleri
Retinoblastoma
Diğer tümörler

1.2 Araştırmanın amacı

Bu çalışmamızın amacı; insan nöroblastom hücre hatlarından PPAR γ eksprese eden SH-SY5Y ve etmeyen KELLY hücre hatlarını kullanarak minimal rezidüel hastalık (MRH) modeli oluşturmak, MRH gelişimi özellikle hücrelerde PHOX2B ekspresyonunun artışı ile değerlendirmek ve daha sonra nöroblastom gibi kanserlerin tedavisi için denenmekte olan ve diferansiye edici etkileri bildirilen PPAR γ agonisti rosiglatazonun minimal rezidüel hastalık modelinde nöronal kök hücreleri diferansiye edici özelliğinin olup olmadığı belirlemektir. Bu çalışma sonucunda erken ya da geç evre nöroblastom hastalarında önemli bir problem olan MRH tedavisinde rosiglatazon değerlendirilebilecektir.

1.3 Araştırmanın hipotezi

Bu çalışmanın hipotezi rosiglatazon, oluşturulacak MRH modeli nöroblastom hücrelerinde nöronal kök hücreleri diferansiye ederek MRH modelinde anti-tümoral etkiye sahiptir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Nöroblastom Tanım ve Özellikleri

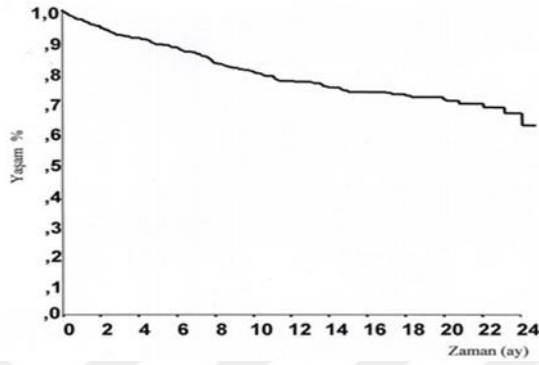
2.1.1 Nöroblastom

Nöroblastom, çocukluk çağında sıklıkla karşılaşılan ekstrakraniyel solid tümördür. Nöroblastom, adrenal medulla veya sempatik ganglionlarda bulunan primordial nöral krest hücrelerinden köken almaktadır (1-2). Tüm çocukluk çağı malign tümörlerinin % 8-10'unu oluşturmaktadır (Tablo 3).

Tablo 3. Lenfoma ve solid tümörlü çocuklarda tümör tipleri T. Kutluk, TPOG Pediatrik Tümör Kayıtları, 2002

Tümör Tipi	Erkek/Kız	Sayı	%
Lenfoma	195/92	287	26,80
NHL	124/57	181	16,90
Hodgkin.	71/35	106	9,90
M. histiositozis	M	1	0,10
SSS tümörleri	134/93	227	21,10
Sempatik sinir sist. tümörleri	49/52	101	9,40
Yumuşak doku tümörleri	46/35	81	7,50
Böbrek tümörleri	35/41	76	7,10
Osteosarkom	37/23	60	5,60
Ewing tümörü	27/18	45	4,20
Kondrosarkom	M	1	0,10
Retinoblastom	18/31	49	4,60
Germ hücreli tümörler	34/31	65	6,10
Karsinoma/Diğer	47/33	80	7,40
Toplam	624/449	1073	100,00

Pediyatrik kanserin tedavisinde uygulanan kemoterapi, radyoterapi, kemik iliği transplantasyonu yaşama oranını %40'ların altında çekmektedir (Demirkaya ve Sevinir 2006). Nöroblastom da dahil olmak üzere sinir sistemi kökenli tümörlerde cerrahi müdahale ve tedavi aşamasında sağlıklı sonuçlar alınmadığından moleküler araştırmalar devam etmektedir (Olshan vd 1999, Matthey vd 2012).



Şekil 1. Türkiye'deki kanserli çocukların yaşam süreleri (T. Kutluk, TPOG Pediyatrik Tümör Kayıtları, 2002)

Nöroblastom (NB), 15 yaşından küçük hastalarda malignitenin % 7 den fazla ve tüm pediyatrik onkoloji ölümlerin yaklaşık % 15 olduğu çocuklarda en sık görülen tümördür. Spontan remisyondan hızlı tümör ilerlemesi ve ölüme kadar çeşitli klinik davranışları sergiler. NB nöral krest sympaticoadrenal bir hastalık olduğundan tümörler sempatik sinir sisteminin herhangi bir yerinde gelişebilir (36-37).

NB tümör dokusundaki farklı genetik değişikliklerin prognoz üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (4). 1980'lerin başında, nöroblastomlarda MYCN geninin amplifiye olduğu bildirildi. MYCN, temel heliko-halka-sarmal (bHLH) transkripsiyon faktörlerinin MYC ailesinin bir üyesidir. Bu protein ailesi, proliferasyon, apoptoz ve farklılaşma dahil olmak üzere çeşitli hücresel işlemlerin düzenlenmesinde rol oynamaktadır ve MYC proteinlerinin tüm protein kodlayan genlerin % 15'ini düzenleyebileceği tahmin edilmektedir (20). MYCN gen onkojenler olarak bilinen bir gen sınıfına aittir. Mutasyona uğradığında, onkojenler normal hücrelerin kansere dönüşmesine neden olma potansiyeline sahiptir (20). Triploidi iyi prognozla ilişkili iken, MYCN onkogen amplifikasyonu, 17q dengesiz fazlalığı, 1p veya 11q allelik kaybı daha agresif ve kötü prognozla ilişkilidir (43).

İleri evre hastalıkta güçlü bir kemoradyoterapi, otolog hematopoetik kök hücre transplantasyonu ve otolog periferik kök hücre transplantasyonu ile hastaların prognozları düzeltilmeye çalışılmaktadır(2) (Tablo 4).

Klinik remisyon elde edilen ileri evre hastalıkta en büyük sorun minimal rezidüel hastalığın (MRH) varlığıdır (3-4). Hastalarda kür elde edebilmek için minimal rezidüel hastalığın önceden tesbiti önemlidir. NB'da MRH'nin tesbitine yönelik olarak birkaç belirteç önerilmektedir. Bunlar arasında Tirozin hidroksilaz ve PHOX2B ekspresyonunun saptanması yer almaktadır (2-4).

Tablo 4. Uluslararası nöroblastom evreleme sistemi (International neuroblastoma staging system, INSS)

Hastalık evreleri	Tanım
Evre 1	Tamamen çıkarılabilmiş tümör
Evre 2 a	Tamamen çıkarılamamış tümör. Hastalık omurga çizgisinde vücudun sadece bir yarımında (orta hattı geçmemiş). Tümörün çevresindeki lenf bezlerinde tutulum yok.
Evre 2 b	Tamamen çıkarılmış veya çıkarılamamış tümör. Hastalık omurga çizgisinde vücudun sadece bir yarımında (orta hattı geçmemiş). Tümörün komşuluğundaki lenf bezlerinde de tutulum var.
Evre 3	Tümör tamamen çıkarılamamış ve orta hattı geçiyor veya tümörün karşı tarafındaki lenf bezlerinde de tutulum var.
Evre 4	Uzak metastaz var (örneğin kemik iliğinde, kemiklerde, karaciğerde, ciltte, çıkarılan lenf bezlerinde veya diğer organlarda).
Evre 4 S	Sadece süt çocukluğu döneminde (yeni kriterlere göre sadece 18 ay altındaki bebekler) sadece deride, karaciğer ve/veya kemik iliğinde metastaz var.

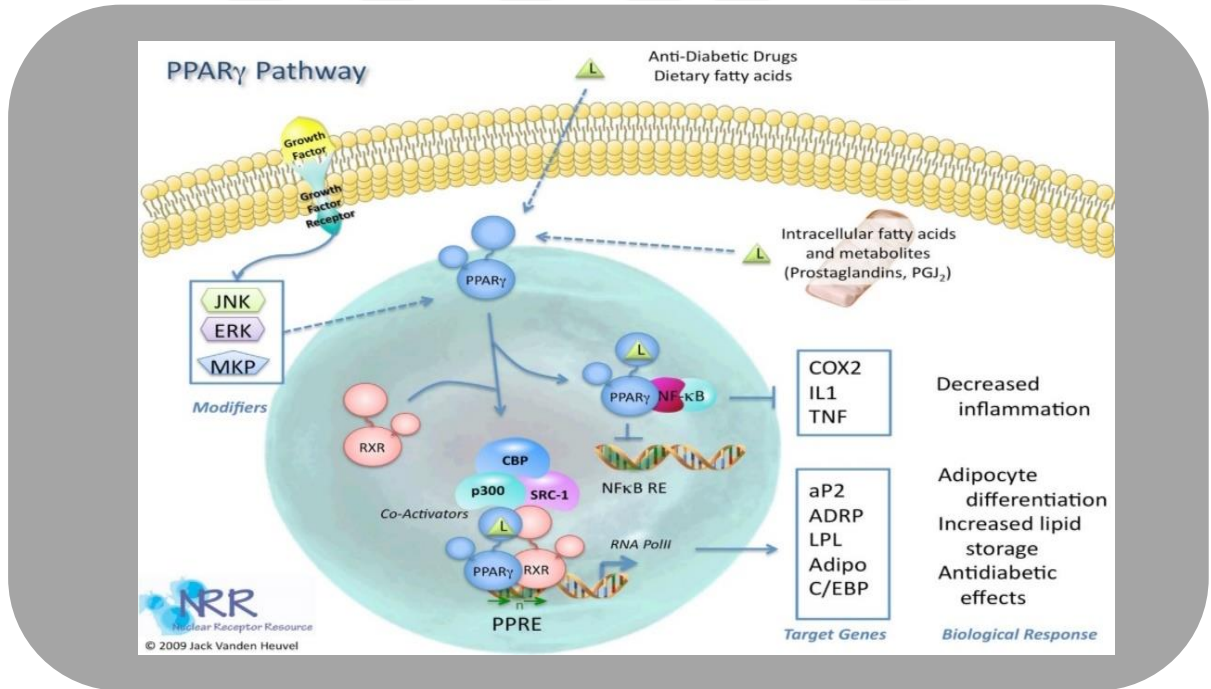
2.2 Peroksizom Proliferatör Aktive Reseptörler (PPAR)

Streoid Hormon Nükleer Reseptör ailesinin 3 İzofonu vardır.

- PPAR α
- PPAR γ (varyantları $\gamma 1$, $\gamma 2$)
- PPAR δ

2.2.1 Ppargama (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma)

PPARgama (PPARg) öncelikle yağ dokuda tesbit edilmiş adipost turnoverı, glukoz ve yağ metabolizma regülasyonu ile ilgili bir nükleer transkripsiyon faktörüdür. PPARgama'nın enflamasyona ve ateroskleroz karşı olan rolüne ek olarak antitümöral etkileri de vardır(6-8). PPAR γ çeşitli beyin hastalıklarında nöroproteksiyon için çok önemli bir transkripsiyon faktörüdür. PPAR sinyalizasyonu hücre çoğalmasını inhibe etmekte ve apoptozu indüklemektedir(9). Bu nedenle PPARg antikanser tedavide iyi bir tedavi hedefi olarak görünmektedir.



Şekil 2. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Etki Mekanizması

2.3 Sisplatin

Erişkin ve çocukluk çağındaki Nöroblastom başta olmak üzere birçok solid kanserlerin tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajandır (1 Olgun N). Sisplatin DNA'ya bağlanıp sisplatin-DNA eklentileri oluşturarak apoptoz gelişmesine neden olmaktadır.

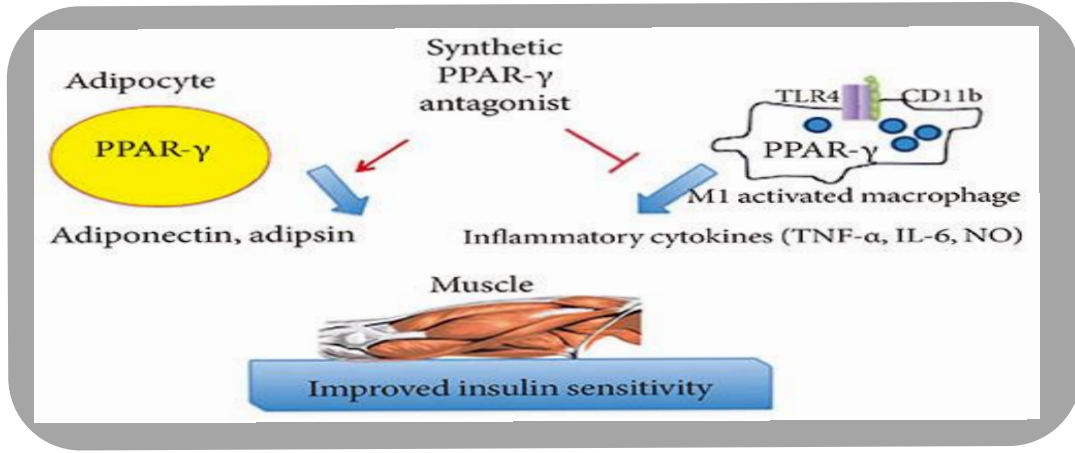
Sisplatinin nefrotoksisite, ototoksisite ve periferik nörotoksisite gibi doz sınırlayıcı etkileri bulunmaktadır (2 Altun Z, 2010; 3 Gunes D, 2011).

Pek çok çocukluk çağı tümörünün tedavisinde:

- ✓ Nöroblastom,
- ✓ Wilms tümörü,
- ✓ Germ hücreli tümör,
- ✓ Hepatoblastoma,
- ✓ Beyin tümörleri,
- ✓ Osteosarkoma gibi kemoterapi protokollerinde yer alır.

2.4 Rosiglatazon

Rosiglatazon peroksizom proliferatör- aktive edici reseptör agonisti antidiyabetik bir ajandır. Rosiglatazon tiyazolidindiyon grubu PPARg agonisti olan bir ajan olup, tiyazolidindiyon grubu ajanlar prostat, kolon, meme, akciğer ve yağ dokusu gibi farklı organ ve doku tümörlerinin tedavisinde denenmektedir (9-14). Farklı NB hücrelerinin PPARg eksprese ettiği ve bu hücrelerde PPARg endojen ya da sentetik ligandlarının hücre diferansiasyonu, apoptoz, hücre büyümesinde durma ve invazyonu inhibe etme gibi anti-neoplastik etkileri gösterilmiştir (15-18). Ayrıca PPARg ekspresyonunun astrositoma, glioblastoma ve NB gibi sinir sistemini etkileyen tümörlerde artığı saptanmıştır (19-20).



Şekil 3. Obesity and Metabolic Syndrome Diabetes & Metabolism

Journal 2013; 37(6): 395-403. Published online: 12 December 2013

2.5 Nöral kök hücre farklılaşma belirteçleri

Nöroblastom blastik bir tümör olması nedeniyle retinoik asit gibi tedavi rejiminde diferansiye edici ajanlar da kullanılmakta ve blastik hücrelerin matür hücrelere diferansiasyonu önem arz etmektedir. Nöronal kök hücreleri başlıca Sox-2, nestin, Oct3/4 ve gibi birtakım molekülleri eksprese etmesiyle tanınmaktadır (21). Oct-4 ve Sox-2 ekspresyonunun nöroblastom tümör örneklerinde aşırı eksprese olduğu ve kemoterapi ile bu ekspresyonun azaldığı tesbit edilmiştir (21).

2.5.1 Oct-4

Oct-4 proteini embriyonik kök hücrelerin (EKH) pluripotansiyel özelliğini korumasında görevi olduğundan bu hücrelerde belirteç özelliğindedir. Bu belirtecin eksik veya fazla eksprese olması EKH'lerinin farklılaşmasına neden olmaktadır.

2.5.2 Sox2

Sox2 gen kromozom 3q26.3-S27 üzerinde yer almaktadır (41). Sox2 proteini 317 amino asitten oluşur ve 34.3 kDa'lık bir kütleye sahiptir (41). Sox2 intronsuz gen olarak embriyonik

hücrelerin gelişiminde, EKH'lerin pluripotansiyel özelliğinin korunmasında rol oynayan önemli bir gendir (Kamachi et al. 2000; Masui et al. 2007).

Adachi ve ark.larının yaptığı çalışmada (2010) trofoektodermal ve kısmen de endodermal farklılaşmayı engelleyerek EKH'lerin pluripotansiyel özelliğinin sürdürülmesinde Sox2'nin eksprese olması gereklidir.

2.5.3 Nestin

Nestin başlangıçta, merkezi sinir sisteminin gelişimi (MSS) sırasında ortaya çıkan nöral kök / progenitör hücre markeri ve sınıf VI ara filament proteini olarak nitelendirildi. (Lendahl ve diğ. 1990). Merkezi sinir sistemi kök / progenitör hücreler nöronlara veya glial hücrelere farklılaştığında Nestin ekspresyonu baskılanmaktadır. (Frederiksen ve McKay 1988; Dahlstrand ve ark. 1995) Nestin proteininin ekspresyonunun hem *in-vitro* hem de *in-vivo* yetişkin MSS kök / progenitör hücrelerinde gözlemlendiğini belirttiler. (Reynolds and Weiss 1992; Morshead et al. 1994). Embriyonik ve yetişkin MSS kök / progenitör hücrelerine ek olarak, nestin MSS tümör hücrelerinde eksprese edilir ve nestin ekspresyonunun derecesi, MSS tümörünün malignitesi ile ilişkilidir. (Tohyama et al. 1992).

Nestin, MSS tümör dokularının endotel hücrelerinde ve anjiyogenez ile yenilenen yetişkin dokuların içinde sentezlenir (30)

2.5.4 S-100

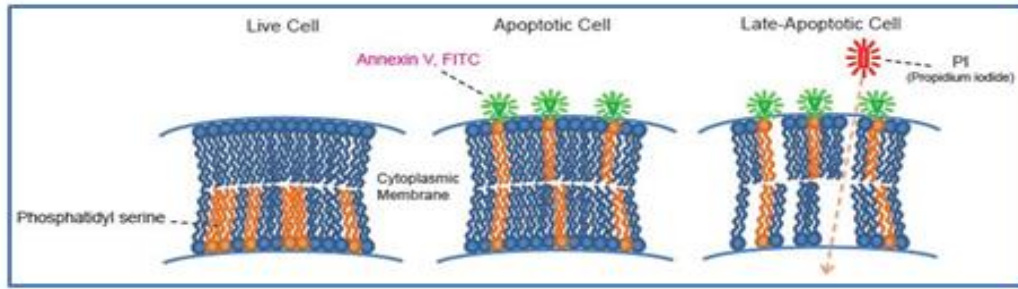
S-100 protein ailesinin üyeleri, çeşitli hücresel işlemlerde düzenleyici rolü olan çok işlevli proteinlerdir. Zn^{2+} ve Cu^{2+} 'nin biyolojik aktivitelerini düzenlediği gösterilmiş olmasına rağmen, eylemlerini genellikle kalsiyum bağlanması yoluyla uygulurlar. Bu proteinler, nötr pH'da amonyum sülfat ile % 100 doymuş bir çözelti içinde çözünebilmesinden S100 olarak adlandırılır (38-39).

S-100 ailesinin birden fazla üyesinin düzensiz ekspresyonu, insan kanserlerinin ortak bir özelliğidir, her kanser türü benzersiz bir S-100 protein profili gösterir. S-100 proteinleri karmaşık ve çok faktörlüdür ve bu proteinlerin aktif olarak hücre proliferasyonu, metastaz,

anjiyogenez gibi tümörijenik işlemlere aktif olarak katkıda bulunduğunu yapılan *in-vivo* çalışmalarda göstermişlerdir (38-39).

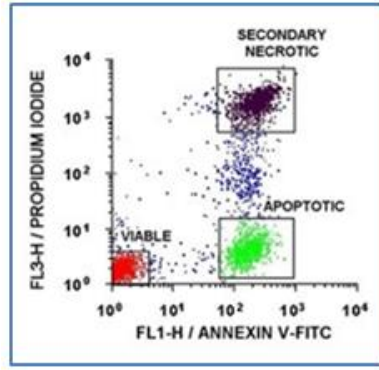
2.6 Apoptotik hücre ölümünün flow sitometri ile belirlenmesi

Normal bir hücrenin sitoplazmik yüzeyinde membran lipidlerinden olan fosfatidilserin (PS) bulunur. Hücrenin apoptoza gitmesiyle PS hücre zarının dış yüzüne transloke olur. Anneksin-V dış yüzeye transloke olan PS'ye bağlanabilen bir proteindir. Apoptotik hücreyi görünür hale getirebilmek için floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenir. FITC Anneksin kiti özellikle apoptotik ve nekrotik hücrelerin tanımlanması için tasarlanmıştır. Bu nedenle, nekroza giden hücrelerin yüzeylerine Anneksin-V bağlanabildiğinden ikinci boya olan propidyum iyodür (PI) ile işaretleme yapılır (27).



Şekil 4. FITC Annexin kit Etki Mekanizması

<http://www.dojindo.com/store/p/847-Annexin-V-FITC-Apoptosis-Detection-Kit.html>



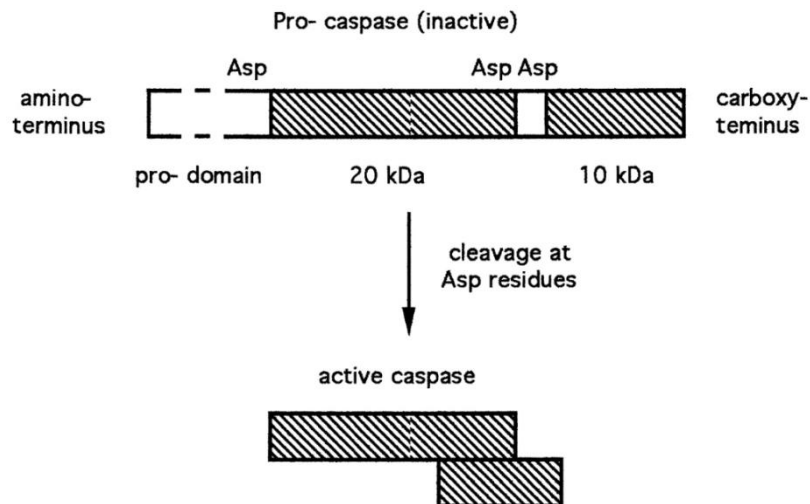
Şekil 5. Propidium iyodüre karşı üç farklı popülasyon gözlemlenmesi

<https://www.bio-rad-antibodies.com/annexin-v-kit.html>

2.7 Kaspaz 3- 8 ve 9

Kaspazlar, sistein aspartat proteazlardır. İnterlökin (IL) -1 β dönüştürücü enzim (iltihaplı) ve memeli CED-3 benzeri (apoptotik) kaspazlar olarak iki büyük filogenik alt familyaya bölünebilir (26). Kaspazlar apoptotik sinyalleme kaskadının ana bileşenleridir. İnflamasyon da dahil olmak üzere apoptotik olmayan diğer rollere de sahiptirler (26). Yüksel ve ark. 2008 kaspaz intrasellüler proteazların; apoptozisin gerek direkt, gerekse indirekt morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerinden sorumlu olduğu ortaya koymuştur.

Kaspazlar prekürsör (inaktif) zimojen olarak üretildikten sonra proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirirler.



Şekil 6. Kaspazların yapısı ve aktivasyonu

Blood, Vol 93, No 11 (June 1), 1999: pp 3587-3600

Kaspazlar 3 tiptir:

I- Başlatıcı; (Kaspaz 2,8,9,10)

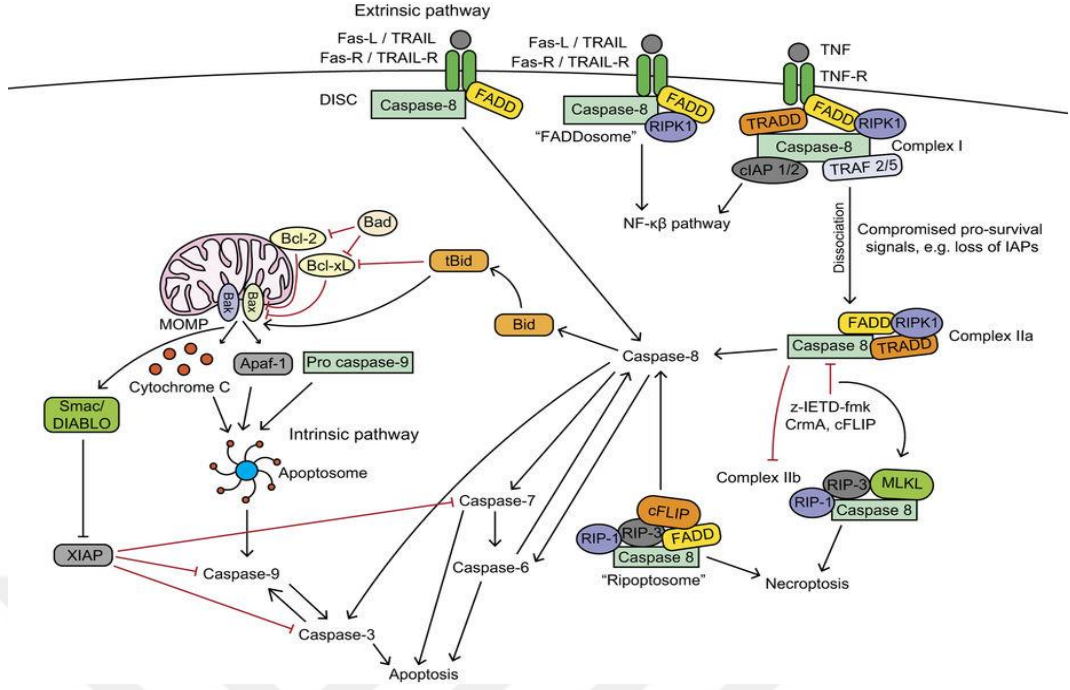
II- Efektör (Kaspaz 3,6,7)

III- İnflamatuar (Kaspaz 1,4,5,11,12,13,14)

Kaspaz 3, hücrenin ölmesine neden olacak şekilde, DNA onarımı ve regülasyonu ile ilgili bileşenler de dahil olmak üzere, çok sayıda hücrel substratı ayıran bir anahtar proteaz kaspazdır (26).

Apoptotik olmayan hücrelerde prokaspaz 8 ve prokaspaz 3, inaktif sistein proteazlarıdır. Apoptozun aktivasyonu üzerine, prokaspaz 8'in aktif kaspaz 8 proteaza bölündüğü bir sinyal kaskadı meydana gelir. Kaspaz 8 hızla prokaspaz 3'ü aktif kaspaz 3'e dönüştürür. Kaspaz 3 aktive edildiğinde, çekirdeğin içindeki DNA'yı parçalayan ve kromatin yoğunlaşmasını başlatan CAD (Kaspazla Aktive Edilen DNaz) endonükleaz aktivasyonu dahil olmak üzere hücrenin ölümüne yol açan bir dizi geri dönüşümsüz olay harekete geçirilir (26).

Aktiflenen kaspaz 8 iki yolu izleyerek aktif hal alabilir. İlk yol; doğrudan kaspaz 8 kaspaz 3'ü aktive eder. Bir diğer yol da Bid'i keserek dolaylı olarak intrinsik mekanizmada kaspaz 9'u aktive ettikten sonra kaspaz 3'ü aktive eder. Her iki yolla da aktive olabilen kaspaz 3, CAD aktivasyonu ile DNA fragmente olur (26).



Şekil 7. Retina ganglion hücre ölümü ve akson rejenerasyonunda kaspazlar

Cell Death Discovery 3, Article number:17032(2017)

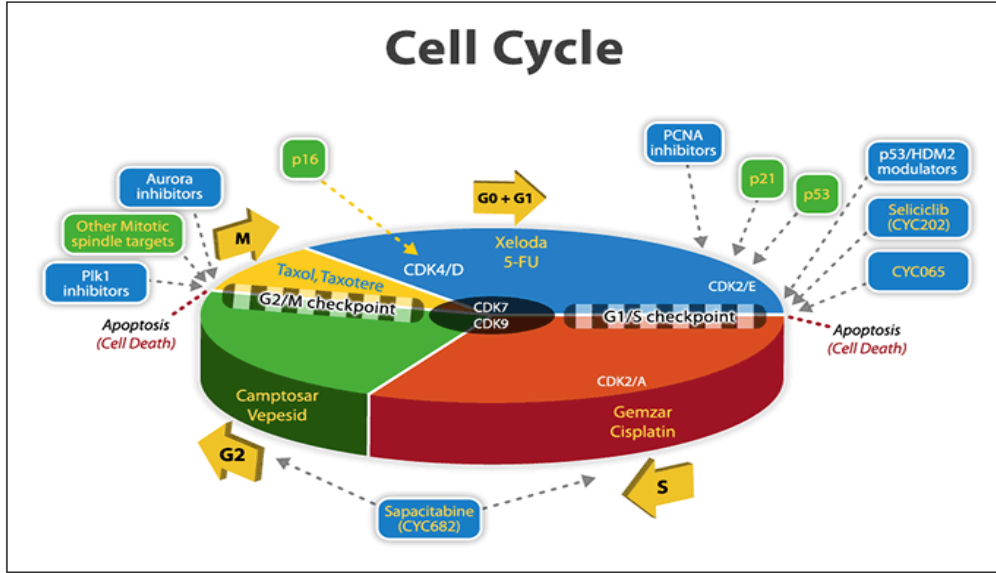
2.8 Hücre siklusu

İki mitotik bölünme arasındaki period'a "hücre siklusu" denir.

- G0 fazında (istirahat fazı)**, spesifik bir işlev için hazırlanırlar.
- G1 fazında (ara faz, interfaz)**, gereken proteinler ve RNA sentezlenir. Geç G1 fazında bol miktarda RNA ve DNA sentezi için gerekli olan çeşitli enzimler üretilir.
- S fazında (DNA sentez fazı)**, DNA miktarı iki katına çıkar.
- G2 fazında** DNA sentezi durur, protein ve RNA sentezi devam eder, mitotik 'spindle'ların mikrotübüler prekürsörleri üretilir.
- M fazında (mitozis)** protein ve RNA sentezi yavaşlayarak genetik materyal iki yeni hücreye dağılır. Yeni oluşan hücreler G0 ya da G1 fazına girerler.

Siklinler, siklin bağımlı kinazlar ve siklinlerin inhibitörleri hücre döngüsünün sistemli bir şekilde çalışması için hücre döngüsünün denetleyicisi görevindedirler.

Siklin bağımlı kinaz'lar hücre döngüsünün bir sonraki evreye geçebilmesi için gerekli proteinlerin fosforilasyonunu sağlar. Siklinlerin görevi Siklin bağımlı kinaz'ları aktiflemektir. İnaktif Siklin bağımlı kinaz'lar, 'Siklin' protein ailesine bağlandığında fosforile olarak aktif hale geçer (Şekil 8) (31).



Şekil 8. Hücre Siklusu

http://www.cyclacel.com/research_science_cell-cycle.shtml

p53, hücre döngüsünü durduran veya askıya alan kontrol noktasıdır. Hücrede oluşan hasar hücrenin onarabileceği durumda ise hasarı giderebilmesi için zaman verir, hasar giderilmezse p53 hücreyi apoptoza tetikler. Tümör supresör gen olan p53, çoğu kanserde mutasyona uğramıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Araştırmanın Tipi

Metodolojik

3.2 Araştırmanın yeri ve zamanı

Projenin gerçekleştirilmesi için gereken tüm cihazlar ve hücre hatları DEU Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji AD'da mevcut olup, çalışma DEU Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji AD laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Çalışma literatür tarama Ocak 2013 tarihi ile başlamış olup 29.05.2019 tarihinde sonlandırılmıştır.

3.3 Araştırmanın evreni ve örneklemi

Laboratuvar çalışması olup gönüllü yoktur.

3.4 Çalışma Materyali

Hücre ve doku kültürleriyle yapılacak **in-vitro** çalışmalar; bu çalışmada insan kökenli **SH-SY5Y** ve **KELLY** nöroblastom hücre hatları kullanıldı.

Çalışmada kötü prognozu temsil eden N-Myc geni pozitif olan insan nöroblastom hücre hattı **KELLY** , iyi prognozu temsil eden N-Myc geni negatif olan insan nöroblastom hücre hattı **SH-SY5Y** kullanılmıştır.

3.4.1 Deney Grupları

3.4.1.1 KELLY Kontrol grubu: Herhangi bir ajan kullanılmayan normal şartlarda üretilen KELLY hücreleri

3.4.1.2 Minimal rezidüel hastalık modeli oluşturulan KELLY hücre grubu: Tekrarlı LD₅₀ dozunda sisplatin uygulanan KELLY hücreleri

3.4.1.3 Rosiglatazon uygulanan Minimal rezidüel hastalık modeli oluşturulan KELLY hücre grubu: Minimal rezidüel hastalık modeli geliştiği tesbit edilen KELLY hücreleri

3.4.1.4 SH-SY5Y Kontrol grubu: Herhangi bir ajan kullanılmayan normal şartlarda üretilen SH-SY5Y hücreleri

- 3.4.1.5 Minimal rezidüel hastalık modeli oluşturulan SH-SY5Y hücre grubu: Tekrarlı LD₉₀ dozunda sisplatin uygulanan SH-SY5Y hücreleri
- 3.4.1.6 Rosiglatazon uygulanan Minimal rezidüel hastalık modeli oluşturulan SH-SY5Y hücre grubu: Minimal rezidüel hastalık modeli geliştirdiği tesbit edilen SH-SY5Y hücreleri

3.5 Araştırmanın değişkenleri

Non parametrik testler kullanıldığından bağımlı ve bağımsız değişkenler bulunmamaktadır.



3.6 Cihazlar ve Sarf malzemeler

3.6.1 Cihazlar

Tablo 5. Mevcut Cihazlar

Akım Sitometri (BD Accury C6)	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji ABD Laboratuvarı
Hassas Terazı (Sartorius BP221S)	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji ABD Laboratuvarı
ELISA Reader (Thermo)	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji ABD Laboratuvarı
Real time PCR	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji ABD Laboratuvarı
Manyetik Karıştırıcı (Velp Scientifica)	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji AB. Laboratuvarı
Vorteks(Velp Scientifica ZX3)	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji ABD Laboratuvarı
pH-metre (Hanna HI 9321)	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji ABD Laboratuvarı
Saf su sistemi	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji ABD Laboratuvarı
Mikroskop olympus bx50	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji ABD Laboratuvarı
Derin dondurucu (Sanyo)	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji ABD Laboratuvarı.
Sıvı azot tankı	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji ABD Laboratuvarı
Laminar Flow	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji ABD Laboratuvarı
Mikrosantrifüj (Thermo)	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji ABD Laboratuvarı
CO ₂ inkübatörü (Thermo)	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji ABD Laboratuvarı
Pastör fırın (Thermo)	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji ABD Laboratuvarı
-80°C derin dondurucu	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji ABD Laboratuvarı
Otomatik pipet 0.5-10 µl (Isolab) Otomatik pipet 20-200 µl (Isolab) Otomatik pipet 100-1000 µl (Isolab)	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji ABD Laboratuvarı

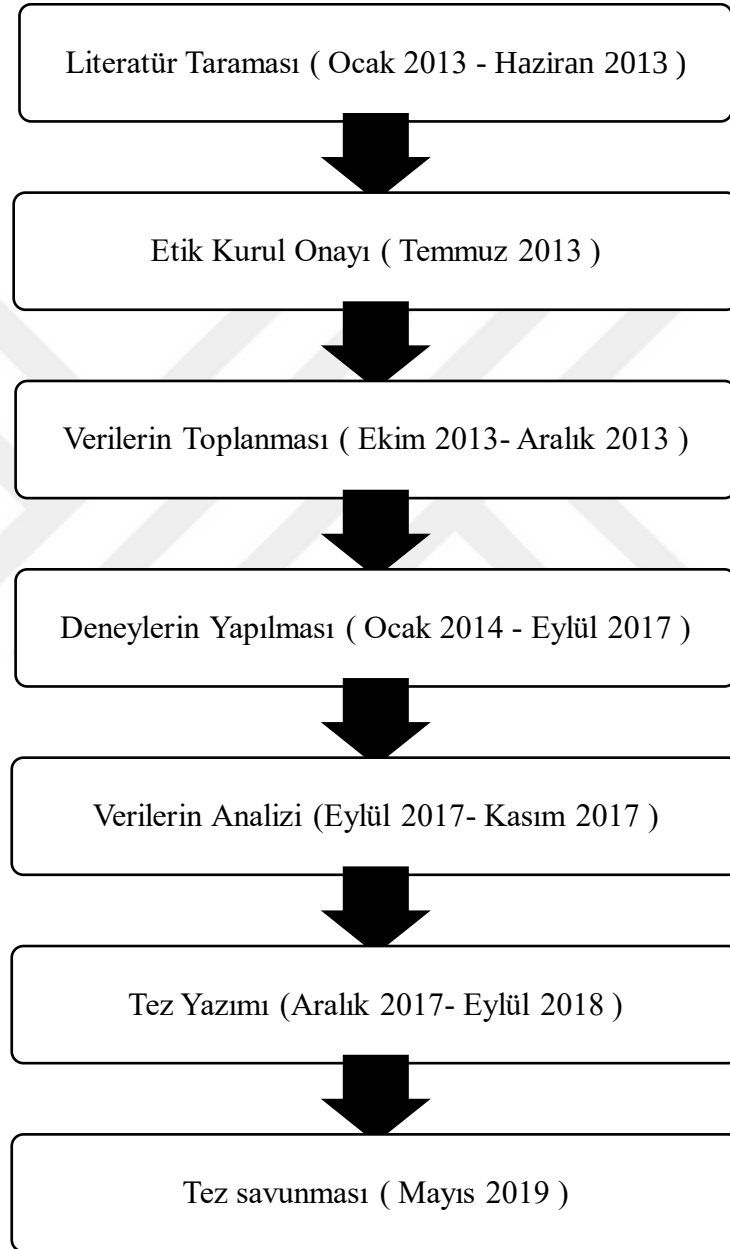
3.6.2 Gerekli Sarf ve Malzemeler

Tablo 6. Gerekli Sarf Ve Malzemeler

Hücre kültür flaskları (25 ve 75 cm ²)
Steril pipetler (2, 5, 10 ve 25 mL)
Fetal bovine serum (FBS) (Biochrom)
L-Glutamin (Biochrom)
Trypsin-EDTA
DMEM hücre kültür ortamı
Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) ortamı (Gibco)
Penisilin/ Streptomisin (Gibco)
Hücre proliferasyon reaktifi, WST-1 (Roche)
LDH ^{plus} kit
Cell Death Detection ^{PLUS} ELISA kit
GSSG ELISA kit
GSH ELISA kit
Cisplatin 100 mg (Ebewe)
Rosiglatzone Cayman (71740) 10 mg
Alexa Fluor® 488 Mouse anti-Oct3/4 (BD)
Alexa Fluor® 647 anti-SOX2 Antibody (BD)
Alexa Fluor® 647 Mouse Anti-Nestin (BD)
Dimetil sülfoksit (DMSO)
96 kuyucuklu plate(Greiner)
Pipet ucu (mavi, sarı)
RNA izolasyon kiti (Qiagen)
PHOX2B Primer (Metabion)
Annexin V-FITC apoptosis detection kit (BD)
5-(and 6)-carboxyl-2',7'-dichlorodihydro fluorescein diacetate (DCFDA; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) probu
5,5 V,6,6 V-tetrachloro-1,1 V 3,3 V-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1; Molecular Probes probu)
Propidyum İodid
Flow sitometri tüpleri
10x Permeabilizasyon Solüsyonu, 30 ml (BD Bioscience)
Caspase-3/CDDPP32 Colorimetric Assay Kit (BioVision)
Caspase-8 Colorimetric Assay Kit (BioVision)
Caspase-9 Colorimetric Assay Kit (BioVision)
Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific)

3.7 Araştırma Planı ve Takvimi

Tablo 7. Çalışma izlem şeması



3.8 Verilerin Değerlendirilmesi

İstatiksel analizler için SPSS 22 programı kullanıldı. Veriler non-parametrik Mann-Whitney-U testi kullanılarak değerlendirildi. Gen ekspresyonları kontrol grubuna göre kat artış/azalışları olarak en az 2 ve üstü katlarda değerlendirilmeye tabii tutuldu. $p<0.05$ istatistiksel anlamlı kabul edildi.

3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları

- *In-vitro* Minimal Rezideül Hastalık Modeli oluşumunu sağlayabilmek için ekim yapılan flaskların 3 ay boyunca kullanılması flaskların enfeksiyonlara maruz kalmasına sebep olmaktadır. Titiz çalışmamız sonucunda bu durum aşılmıştır.

3.10 Etik Kurul Onayı

Bu proje, Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu

Tarafından 25.07.2013 tarih ve 1090-GOA protokol numaralı 2013/28-01 karar numarası

ile onaylanmıştır (EK 1).

3.11 YÖNTEMLER

3.11.1 Hücre kültürü

3.11.1.1 Hücre Hatları

Çalışmamızda insan **SH-SY5Y** ve **KELLY** nöroblastom hücre hatları kullanıldı. Hücreler %5 CO₂'li ve 37°C nemli koşullarda çoğaltıldı. İnsan SH-SY5Y ve KELLY insan nöroblastom hücreleri sırasıyla **DMEM** ve **RPMI** ortamlarına %10 FBS, %1 Penisilin/Streptomisin ve %1 L-glutamin eklenerek oluşturulan hücre çoğalma ortamları kullanılarak çoğaltıldı. Hücrelerin ortamları 2 günde bir değiştirilerek çoğalmaları sağlandı.

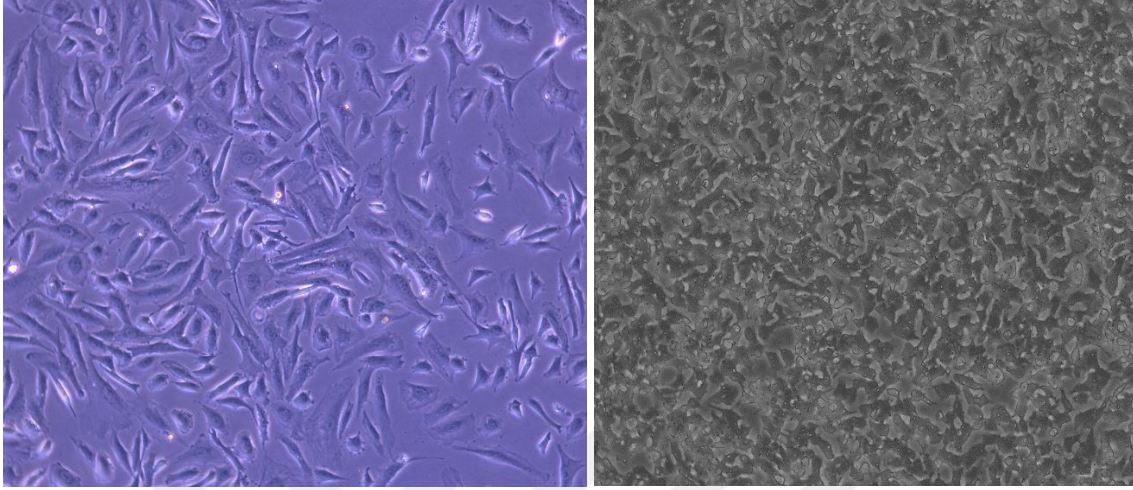
3.11.1.2 Hücrelerin Pasajlanması

Komplet hücre kültür ortamı, PBS ve tripsin-EDTA su banyosunda 37°C'ye ısıtıldı. %90 konflüense ulaşan hücreler CO₂ inkübatöründen alınıp mikroskopta değerlendirildi. Flask dik konuma getirilerek ve hücre tabakasının olduğu yüzeye pipet değdirilmeden ortam yavaşça çekilip atıldı. Hücre tabakasına pipet değdirilmeden flask alt köşesine PBS eklendi. Yüzey yıkanarak PBS yavaşça çekilerek hücre artıkları/ölü hücrelerden uzaklaştırıldı. Yeni bir pipet ile ortama Tripsin-EDTA eklenip flask 2-3 dakika CO₂ inkübatöründe tutuldu. Mikroskopta hücrelerin flask tabanından serbestleşip serbestleşmediği kontrol edildi. Hücreler serbest ise flaskta komplete ortam eklenip santrifüj tüpüne hücreler aktarıldı. Hücreler 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Supernatan tüpün tabanında 1 mL kadar bırakılacak şekilde uzaklaştırıldı. Hücre pelletini çözmek için tüpün dibine birkaç defa hafifçe vurulup tüpe taze ortam eklenerek 1/3-1/4 oranında pasajlandı. Flask üzerine hücre hattı ismi, pasaj numarası, pasaj tarihi yazılıp hücreler mikroskopta incelendikten sonra Flasklar CO₂ inkübatörüne yerleştirilip çoğaltılması sağlandı.

3.11.1.3 Hücre hatlarının dondurulması

Hücrelerin dondurulma işlemi cryo tüpler içerisine DMSO (Dimetil sülfoksit) bırakılarak gerçekleştirildi. Hücrelerin dondurulmasında pasajlama basamakları uygulandı. Hücreler tripsinize edildikten sonra santrifüjlendi. Santrifüj sonrası supernatan uzaklaştırıldı. Pelet 1 ml besiyerinde sulandırılarak sayım işlemi gerçekleştirildi.

Dondurma tüpleri içerisine 1:1 oranında DMSO ve hücre çözeltisi konuldu. Tüpler dondurma kabına yerleştirildi ve kap -80°C derin dondurucuya konuldu.



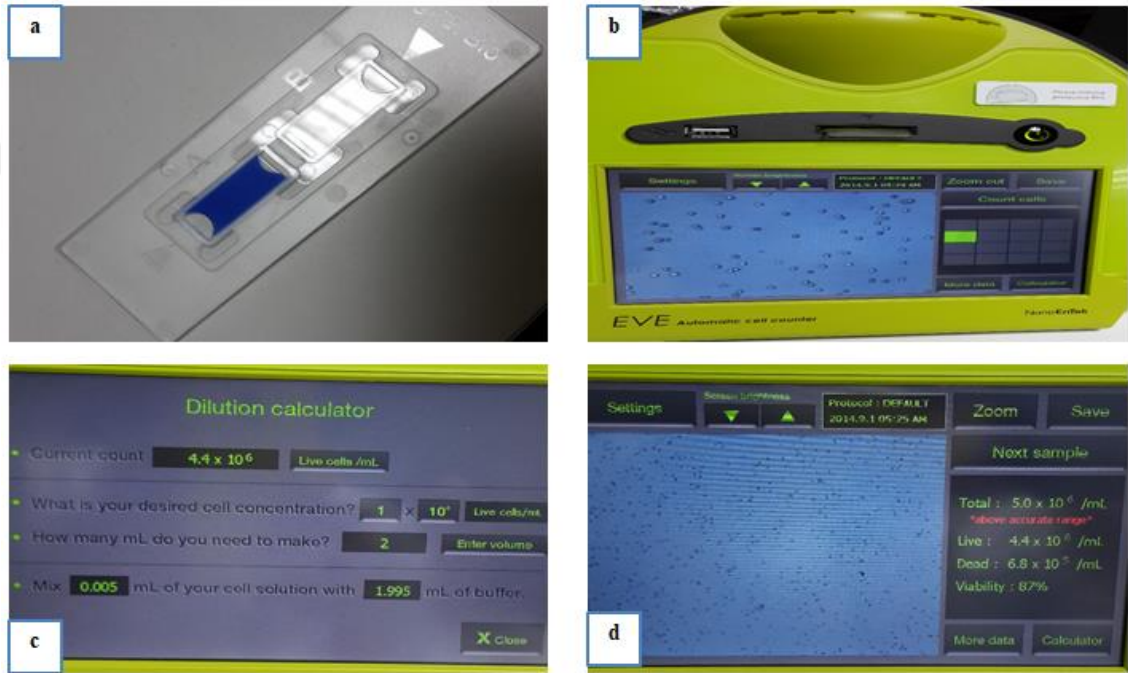
Şekil 9. Tabana tutunarak üreyen **SH-SY5Y** hücrelerinin 25 cm² flasklarda çoğaltılmasının mikroskopik görüntüsü (X10)

3.11.1.4 WST-1 Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Hücre canlılığı WST-1 testi kullanılarak değerlendirildi. Sisplatinin %90 hücreleri öldürücü letal doz (LD₉₀) ve rosiglazonun hücreleri diferansiye edici dozları WST-1 testi kullanılarak saptandı.

Hücre canlılığının belirlemek için hücre sayımı **EVE Automatic Cell Counter** cihazında yapıldı. %90 konflüense ulaşan hücrelere pasajlama basamakları uygulandı. Santrifüj sonrası supernatan tüpün tabanında 1 mL kadar bırakılacak şekilde uzaklaştırıldı. 15 ml'lik falconda bulunan hücreler üzerine 1 ml komplete ortam eklendi. Pipetaj yapıp 10 µl hücre süspansiyonundan 10 µl trypan **blue'dan (EVE Automatic Cell Counter cihazına ait trypan blue)** alınarak 2 ml ependorf içerisinde karıştırılıp cihaza ait lam içerisine bırakılıp sayım yapıldı. Trypan blue negatif yüklü boya olduğundan ölü hücreler boyayı absorbe eder ve mikroskop altında mavi görünürler. Hücre membranı zarar görmemiş ya da canlı bir hücrelerin içine boya girmez.

SH-SY5Y ve **KELLY** hücre hatları için 96 well platelerde her kuyucuğa 10^4 hücre olacak şekilde 200 μ l ortam bırakıldı. 24 saat sonra plateler yeterli konflüense ulaşıncaya ortamlar pipetle çekilerek her bir konsantrasyondan 200 μ l kuyucuklara bırakılarak 24, 48, 72h deney setleri oluşturuldu. Kuyucuklardan bir tanesi kontrol grubu oluşturularak diğer 4 tanesi için de yedek kuyucuk çalışması yapıldı.



Şekil 10. EVE Automatic Cell Counter cihazında flaskda bulunan canlı hücre sayısının belirlenmesi

a) Hücreler lam içerisine bırakıldı.

b) Görüntü optimizasyonu için **Zoom** düğmesine basılarak ve görüntüyü ayarlandı.

c) Hücreler sayılarak sonuçlar kaydedildi.

d) Canlı ve ölü hücrelerin doğru analiz edilmesi gerekir. Canlı hücreler parlak merkezlere ve koyu renkli kenarlara sahiptir.

3.11.2 LD₅₀ Doz Deneyleri

3.11.2.1 Sisplatin LD₅₀ Doz Deneyleri

Stok 100 mg/ml Sisplatin'den (Ebewe) 50 µM hazırlanılarak 10, 50, 100, 200, 400 µM konsantrasyonlara dilüe edilerek 96 well platelerde bulunan hücrelere hazırlanan dozlar uygulandı.

3.11.2.2 Rosiglatazon LD₅₀ Doz Deneyleri

Çalışmamızda Rosiglatazone Cayman (71740) 10 mg kullanıldı. Hücrelerin canlılığının %50 dozunda azalttığı dozu belirlemek için literatür araştırması yapıldı (Li WANG, Chun-jiang YU, Wei LIU, Lu-yang CHENG, Yi-na ZHANG). Rosiglatazon dozları 0.1, 1, 10, 20, 50, 100 µM olarak belirlendi. 1 ml DMSO'da 10 mg ana stok RZG çözüldü. Yapılan hesaplamalar sonucu ara stok olarak hazırlanan Rosiglatazon'dan 0.1, 1, 10, 20, 50, 100 µM dozları hazırlandı. Hücre çoğalma ortamlarında hazırlanmış 96 well plate hücrelere uygulandı.

3.11.3 *İn-vitro* Minimal Rezideül Hastalık Modeli

Uygulama basamakları:

KELLY (N-myc pozitif) ve **SH-SY5Y** (N-myc negative) insan nöroblastom hücreleri RPMI 1640 ve DMEM ortamlarında 37°C ve %5 CO₂ 'lik ortamda kültüre edildi. Minimal rezidüel hastalık modeli oluşturmak için %90 öldürücü doz sisplatin hücrelere uygulandı. KELLY hücrelerinde %90 öldürücü doz; 80 µM, SH-SY5Y hücrelerinde ise 50 µM olarak belirlendi. Her iki hücre hattına aynı hücrelere %90 öldürücü dozda sisplatin kronik olarak tekrarlı dozlar şeklinde yaklaşık 3-4 aylık peryodlar boyunca uygulandı.

3.11.4 EKSPRESYON ANALİZLERİ

3.11.4.1 RNA izolasyonu

Human hücre kültür örneklerinden RNA izolasyonu; Tripure Isolation Reagent (Roche) kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre yapılmıştır.

Uygulama basamakları:

- Hücreler içinde bulundukları saklama solusyonundan ayrılır. Üzerlerine 100 ul Lysis buffer eklenir ve 5 dakika beklenir. Ardından Green Beads tüplerin içine aktarılır.

- Tüplere 700 ml tripure eklenir ve tüpler MAGNA Lyser Homojenizatörde 45 saniye 4500 rpm’de döndürülür. Böylece tüpteki beadslerinde yardımıyla hücre hatları homojen bir görünüm alarak parçalanır ve tripure reagent etkisiyle de pembe bir renk görünümünü alır.

- Homojenizatörden çıkarılan tüpler cihazla birlikte gelen cooling block’a alınır ve 2 dakika bekletilir. Homojenizatörde o hızın ve sürenin etkisiyle ısınan tüpleri soğutmak için bu işleme başvurulur.

- 5 dakika oda ısısında bekletilir.

- Tüplere 200 ul kloroform eklenir ve 5 dakika beklenir.

- ❖ **Kloroform**; homojen hale gelen örnekte faz oluşumunu sağlar. Böylece RNA, DNA ve protein elde edilir.

- 12.000 rpm’de 4°C’de 20 dakika santrifüj yapılır.

- Santrifüj sonunda 3 faz oluşur:

- ✓ **1.FAZ (Sulu faz):** RNA içerir. (Renksizdir.)

- ✓ **2.FAZ:** DNA içerir. (Beyaz renklidir.)

- ✓ **3.FAZ (Organik faz):** Protein içerir. (Kırmızı renktedir.)

- RNA izolasyonu için renksiz olan 1.faz yeni tüpe aktarılır.

- Yeni tüpe 500 ul izopropanol eklenir. Oda ısısında 10 dakika inkube edilir.

- İzopropanol RNA’yı DNA ve diğer safsızlıklardan arındırmak için kullanılır.

- 12.000 rpm’de 4°C’de 10 dakika santrifüjlenir. Süpernatant atılır.

- Oluşan çökelek üzerine 1 ml %75 EtOH eklenir.

- 7.500 rpm’de 4°C’de 5 dakika santrifüjlenir.

- Santrifüj sonunda süpernatant atılır.

- 57°C’de EtOH uçurulur.

- Kalan çökeleğe 50-100 ul RNase free su eklenerek pipetaj yapılır.

Bu şekilde RNA örnekleri -70°C’de saklanabilir.

İzolasyonun ardından RNA konsantrasyonları spektrofotometrik yöntemlerle ölçüldü. Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflıkları 260 ve 280 nm dalga boylarında absorbanslarının oranı ile kontrol edildi.

İdeal saflıktaki kaliteli RNA’nın A260/ A280 absorbans oranının yaklaşık 1,8-2,0 olması beklenir.

3.11.4.2 cDNA Sentezi

cDNA Sentezi; Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR kiti ile çalışılır.(-20°C de saklanmalıdır)

❖ cDNA Sentezi için her bir RNA örneği 45-50 ng/μl olacak şekilde seyreltilir.

- 0,2μl lik pcr tüpleri örnek sayısı kadar çıkartılır ve soğutma kabına yerleştirilir.
- Üzerlerine aşağıda belirtilen bileşenler eklenir.

Bileşenler (tek reaksiyon için)	Hacim	Son Hacim Konsantrasyonu
<i>Total RNA veya mRNA</i>	10 μl	Üretici firma tarafından önerilen; total RNA;10 -5000ng mRNA;1- 100ng
<i>Anchored oligo(dt)</i>	1 μl	2,5 μM
<i>Random Hexamer Primer</i>	2 μl	60 μM

Tablo 8. cDNA Sentezi için eklenen bileşenler

Toplam Hacim =13 μl

•Tüpler thermalcycler'a yerleştirilir. 65°C'de 10 dakika RNA'lar denatüre edilir. Sonrasında tüpler hızlı şekilde buz üzerine alınır. 2 dakika beklenir.

•Mastermix hazırlanır.(Bu miktarlar örnek sayısıyla çarpılarak hazırlanır)

Bileşenler (tek reaksiyon için)	Hacim	Son Hacim Konsantrasyonu
<i>Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer(5x)</i>	4 µl	1x (8 mM MgCl ₂)
<i>Protector RNase Inhibitor(40 U / µl)</i>	0,5 µl	20 U
<i>Deoxynucleotide mix(10 mM each)</i>	2 µl	1 mM
<i>Transcriptor Reverse Transcriptase (20 U / µl)</i>	0,5 µl	10 U

Tablo 9. Reaksiyonda 7 µl hacimde önerilen bileşen miktarları

Toplam Hacim =7 µl

•Her tüpe 7 µl mix'den dağıtılır ve pipetle 3-4 kez karıştırılır.

•Tüpler Thermalcycler'a yerleştirilir ve daha önce kaydedilmiş program çalıştırılır.

Program: 10 dakika 25°C

60 dakika 50°C

4°C'de bekleme

cDNA lar RealTime PCR için hazırdır. (-20°C'de saklanabilir.)

3.11.4.3 Real Time PCR aşaması

3.11.4.3.1 Primerler ve Sybr green I(Roche) için optimizasyon

Öncelikle primerlere yanında gelen kullanım klavuzlarında yazan 100µM için gerekli su miktarı eklenerek 100 µM'a (yani 100pmol/ µl'ye) sulandırılır. Sonra her parametre için aşağıda tek tek belirtilen ara stoklar oluşturularak çalışılır.

3.11.4.3.1.1 Primer ara stok hazırlanışı

- F ve R yazan primerler kullanılır.
- F ve R primerden 10µM (100µM'lık ana stoktan 10ul alınıp üzerine 90ul su eklenerek) ara stok oluşturulur.
- 8µl Mix + 2µl cDNA = 10µl total reaksiyon Hacmi

LightCycler ® 480 SYBR Green I Master		
Tek reaksiyon (hacim)	Tek reaksiyon (konsantrasyon)	Bileşenler
2,4µl	-	Su, PCR-grade (LightCycler 480 SYBRGreen I ile birlikte sağlanmaktadır)
0,3 µl	0,3 µM	Forward Primer(F)(ara stok 10 µM)
0,3 µl	0,3 µM	Reverse Primer(R)(ara stok 10 µM)
5 µl	x	Enzim Karışımı (Roche LightCycler 480 SYBRGreen I Master)

Tablo 10. Primer ara stok 10µl total reaksiyon hacmi

3.11.4.3.1.2 Kullanılan Primer dizileri

Target ;

PHOX2B

Fwd: 5'-GGCACCTCAGGGACCA-3'

Rvs: 5'-CTGCGCGCTCCTGCTT-3'

Reference:

GAPDH

Fwd: 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'

Rvs: 5'-AATACGACCAAATCCGTTGACT -3'

3.11.4.3.1.3 Primer Dizaynı

Primer dizaynı için PHOX2B ,GAPDH genleri , NCBI ve Ensemble gen bankaları kullanılarak kontrol edilmiştir.Ve bu gen bölgelerine uygun dizayn clustal Waling ve Oligo7 yazılımları kullanılarak , Human spesifik yapılmıştır. Elde edilen primer dizaynlarının blast programı ile spesifikliğı kontrol edilmiş ve üretilmiştir.

3.11.4.3.1.4 Real-Time PCR (Q-PCR)

Hücre Kültürü örneklerinin RNA izolasyonu TriPure Isolation Reagent(Roche) ardından cDNA sentezi Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit(Roche) kullanılarak gerçekleştirildi ve belirtilen gen bölgeleri için dizayn edilip üretilen primerler ile LightCycler® 480 SYBR Green I Master kullanılarak Roche LightCycler 480II cihazı ile çalışılmıştır.

Çalışmada belirtilen GAPDH geni referans (kontrol) gen alınmış, PHOX2B geni ile birlikte reaksiyon hazırlanmış ve cihaza yüklenmiştir.

3.11.5 Apoptotik hücre ölümünün flow sitometri ile belirlenmesi

3.11.5.1 Uygulama Basamakları

Rosiglatazonun apoptotik etkisi Anneksin-V testi (Annexin V-FITC apoptosis detection kit BD) ile akış sitometrik analiz ile belirlendi.

- Flaskdaki hücreler tripsinize edilerek kaldırıldı.
- Hücreler 1200 rmp'de 7 dakika +4°C'de santrifüj edilerek süpernatant atıldı. (Bundan sonraki her aşama buz kalıpları üzerinde çalışıldı).
- Üzerine 200 ml PBS eklenip resüspanse edildikten sonra 2 tane flow tüplerine (bir boyalı bir boyasız) 100 er ml olarak dağıtıldı. Tüplere 100 µl Annexin-V Binding Buffer eklendi.
- Kontrol grubu +4'e bırakıldı.
- Diğer örneklerle 5 µl Annexin-V, 10 µl PI eklenerek folyo ile sarınan tüpler 15dk +4°C'de bekletildi.
- 15dk sonunda her bir tüpe 300 µl Annexin-V Binding Buffer eklenerek her bir tüp Akım Sitometri (BD Accury C6) cihazında okutuldu.

3.11.6 Protein tayini

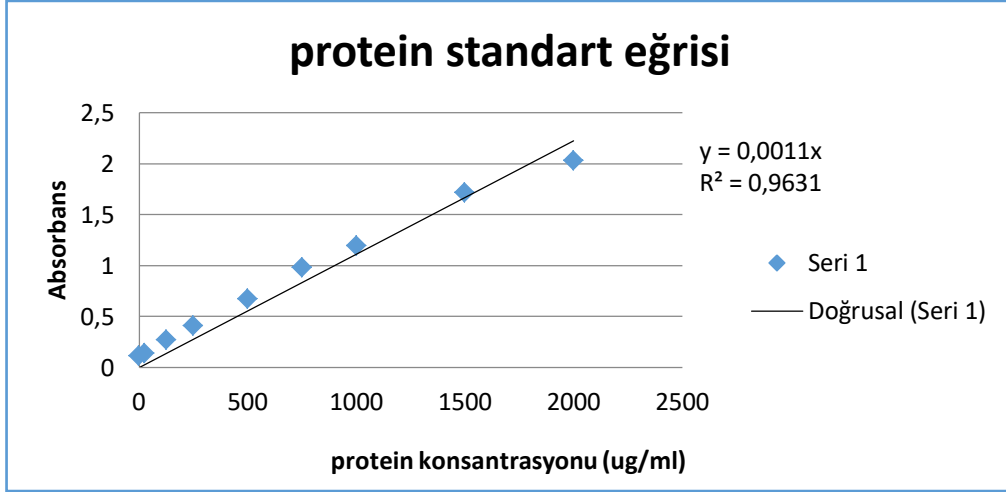
Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Testi, toplam proteinin kolorimetrik testidir. Bisiklonin asit (BCA) temelli bir çözeltilidir. Bakır katyonun oldukça hassas ve selektif, alkalın bir ortamda bisinkoninik asit ihtiva eden bir tek reaktif kullanılarak Cu^{+2} 'nin Cu^{+1} 'ye indirgenmesini protein ile birleştirir. Bu tepkimenin mor-renkli reaksiyon ürünü bir bakır iyonu ile iki molekül BCA molekülünün şelasyonuyla oluşturulur.

Protein tayini için Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) kullanıldı.

3.11.6.1 Uygulama Basamakları

Protein tayini Pierce™ BCA Protein Assay Kit protokolüne uygun olarak yapıldı.

- Seyreltilmiş Albumin (BSA) standartları hazırlandı.
- BCA Çalışma Reaktifi hazırlandı (WR).
- 96 well plate kullanıldı, her standart için 2 kuyucuk olacak şekilde hazırlandı. Kuyucuklara her standart örnekten 25µl eklendi. (Standartlar 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25, 0 µg/ml konsantrasyonlarıdır.)
- Standart eklediğimiz her kuyucuğa 200µl WR ilave edildi ve plakayı plaka çalkalayıcıda 30 saniye boyunca iyice karıştırıldı.
- 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.
- ELISA okuyucu ile 562 nm'de absorbansı ölçüldü.
- Örneklerin protein düzeyi, aşağıdaki şekilde verilen Standart grafik eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 11. Protein standart eğrimiz

3.11.7 Kaspaz-3, 8 ve 9 aktivitelerinin belirlenmesi

Çalışma Caspase-3/CDDPP32 Colorimetric Assay Kit (**BioVision**), FLICE/Caspase-8 Colorimetric Assay Kit (**BioVision**), Caspase-9 Fluorometric Assay Kit (**BioVision**) protokolüne uygun olarak yapıldı.

3.11.7.1 Uygulama Basamakları

- Hücre sayımı yapıldı pellet içi hücre konsantrasyonu 3×10^6 olarak ayarlandı.
- Hücreler 50 µl Cell lysis buffer ile süspanse edilip 10 dakika buz üzerinde inkübe edildi.
- Mikrosatirifüj ile 1 dakika santrifüj edildi. (10,000*g)
- Süpernatant temiz tüpe alınarak alikodlandı ve -80'e kaldırıldı.
- Deney protein konsantrasyonu yapıldı.
- Her deney için 50-200 µg protein 50 µl Cell lysis buffer içinde seyreltildi.
- Her örneğe 50 µl 2X Reaksiyon Tamponu (10 mM DTT içeren) ilave edildi.
- 5 µl 4 mM DEVD-pNA substratı (200 µM son konsantrasyon) ekleyip ve 37°C'de 2 saat inkübe edildi.
- Örnekler 400-nm dalga boyunda spektrofotometre ile okuldu.

3.11.8 Hücre siklusu

Rosiglatazonun ve MRH modeli ile nöroblastom hücrelerinde oluşan hücre siklus değişiklikleri akış sitometrik olarak cell cycle test ile belirlendi. BD Cycletest Plus DNA Reagent Kit prokole göre uygulandı.

3.11.8.1 Uygulama Basamakları

- Hücreler -80°C'den çıkarılıp çözündürüldü.
- 2 ml ependorf tüpünde bulunan hücreler 8000 rpm'da 1 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı.
- Pellet üzerine 200 µl Buffer Solution (Dimethyl sulfoxide (DMSO) in sucrose-sodium citrate) eklenerek pellet iyice çözündürüldü.
- Pellet tekrar 8.000 rpm'da 1 dakika santrifüj edildi, süpernatant atıldı.
- Pellet üzerine 200 µl Solution A (Trypsin in spermine tetrahydrochloride detergent buffer) eklendi iyice çözüldükten sonra oda sıcaklığında (20°C - 25°C) 10 dakika inkübe edildi.
- Pellet üstü dökülmeden 150 µl Solution B (RNase A and trypsin inhibitor in spermine buffer) eklenerek hafifçe vurularak karıştırıldı. Oda sıcaklığında (20°C - 25°C) 10 dakika inkübe edildi.
- A ve B solüsyonları eklenen pellet üzerine 100 µl soğuk (2°C-8°C) Solution C (Propidium iodide (PI) in spermine buffer) eklenerek (bu aşama karanlıkta yapıldı.) buzdolabında 10 dakika inkübe edildi. (2°C-8°C)
- Tüpler Akım Sitometri (BD Accury C6) cihazında okutuldu.

3.11.9 Nöronal kök hücre diferansiasyon belirteçlerinin flowsitometrik analizi

Akım Sitometre, süspansiyon içindeki hücre ya da partiküller lazer ışığı ile aydınlatılan bir bölmeden geçer. Hücreler lazer ışınından geçtikten sonra verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilmesine dayanan bir yöntemdir (28,29). Oluşan sinyallerin kaynağı, hücrenin büyüklük, granülarite gibi fiziksel özelliklerinin dışında hücreye bağlanan çeşitli florokromlar da olabilir. Akım sitometre ile analizi yapılan örneğin immunfenotipi, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli, canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanabilir (29).

3.11.9.1 İntrasellüler flow boyama aşamaları

- Flaskdaki hücreler tripsinize edilerek kaldırıldı.
- Hücreler 1200 rpm'de 7 dakika +4°C'de santrifüj edilerek süpernatant atıldı.
- Pellet 1000 µl PBS'de resüspanse edildi.
- Pellet Flow tüplerine 100 µl olacak şekilde eklendi.
- 500 µl %4 paraformaldehit eklenerek +4°C'de 10 dakika bekletildi.
- 1 ml PBS eklenip 1200 rpm'de 7 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı.
- 500 µl 1X permeabilizing solüsyonu eklendi +4°C'de 10 dakika bekletildi.
- 1 ml PBS eklenip 1200 rpm'de 7 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı.
- 100 µl PBS eklendi.
- Her tüpe 10 µl antikorları eklendi.
- 20 dakika karanlık oda ısısında inkübe edildi.
- 1 ml PBS eklenip 1200 rpm'de 7 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı.
- 500 µl PBS eklenip flow sitometri cihazında ölçüldü.

3.11.10 Nöronal kök hücre diferansiasyon belirteçlerinin immunohistokimyasal analizi

Mezenkimal kök hücreler; başlıca kemik iliğinde bulunan kemik, kas, kıkırdak, tendon, yağ ve kemik iliği stromal hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip olan multipotent progenitor hücrelerdir. Kanser kök hücreleri pluripotenttir, kendini yenileme yeteneğine sahiptir, sitotoksik tedavilere karşı yüksek dirençlidir ve tümör oluşumunu hızlandırır (28).

CD133, tek zincirli, 866 aminoasitlik bir moleküldür. İlk olarak insan hematopoetik kök ve progenitor hücreleri olarak tarif edilmiştir. Beyin, prostat, pankreas, akciğer, kolon ve over kanser kök hücrelerinden identifiye edilerek bu kanserlerin tanısında biyobelirteç olarak kullanılmıştır.

Bir hücrenin farklı dokulardaki hücelere dönüşebilme yeteneğine '**Plastisite**' ya da '**Differansiyasyon**'; o hücrenin farklı hücre tiplerine farklılaşma potansiyeline '**Farklılaşma Kapasitesi**' olarak adlandırılır (28). Farklılaşma öncesinde kök hücreler sürekli olarak bölünerek sayılarını arttırlar. Kök hücrelerin çevredeki diğer kök hücrelerle ve farklılaşmış hücrelerle arasındaki ilişkileri adezyon molekülleri, ekstraselüler matriks bileşenleri, büyüme faktörleri, sitokinler, mikroçevrenin fizyokimyasal koşulları kök hücrelerin kendi kendilerine çoğalması veya farklılaşmalarında etkili olmaktadır (28).

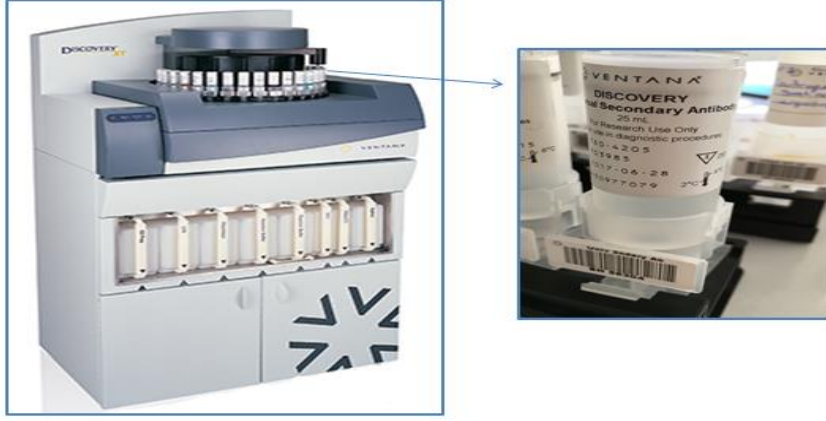
3.11.10.1 S-100 belirtecinin kullanılması

S-100, sığır kökenli saflaştırılmış beyin S-100 proteinine karşı geliştirilmiş bir fare monoklonal antikordur.

Çalışmamızda SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC sc-56477 kit kullandık.

3.11.10.2 CD133 belirtecinin kullanılması

Çalışmamızda RBPAB to CD133 100 mg ABCAM kiti kullandık.



Şekil 12. DISCOVERY XT Ventana Medical Systems, Inc. cihaz

İmmünohistokimyasal çalışmalarımızı DISCOVERY XT Ventana Medical Systems, Inc. cihazında gerçekleştirdik.

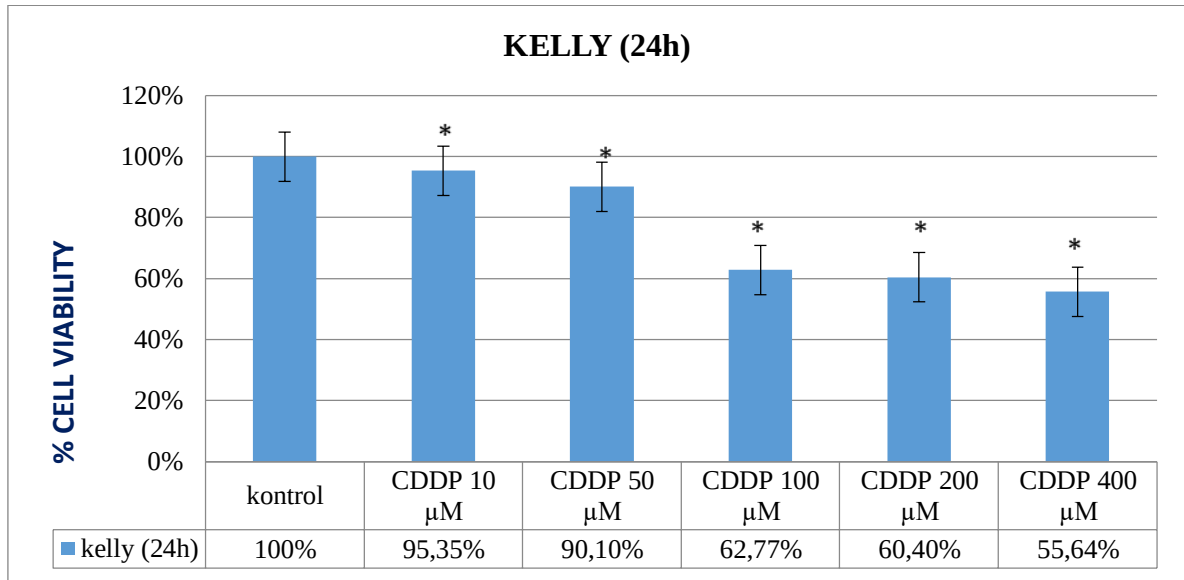
3.11.10.2.1 İmmünohistokimyasal Uygulama Basamakları

- Hücreler -80°C 'den çıkarılıp çözündürüldü.
- Hücreler 1200 rpm'de 7 dakika $+4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj edilerek süpernatant atıldı.
- Pellet 100 μl PBS'de resüspanse edildi.
- Resüspanse edilen pellet lamlara yayıldı.
- Uygun metanol ve %4 paraformaldehit solüsyonları ile fiksasyon ardından İnraselüler boyama için hücre permeabil hale getirilip;
 - bloklama
 - primer antikorlarla inkübasyon
 - sekonder antikorlarla inkübasyon
 - uygun yıkama adımları
 - hematoksilen ile boyama
 - ksilol ile muamele ardından lamel ile kapatılıp mikroskop altında değerlendirildi.

4. BULGULAR

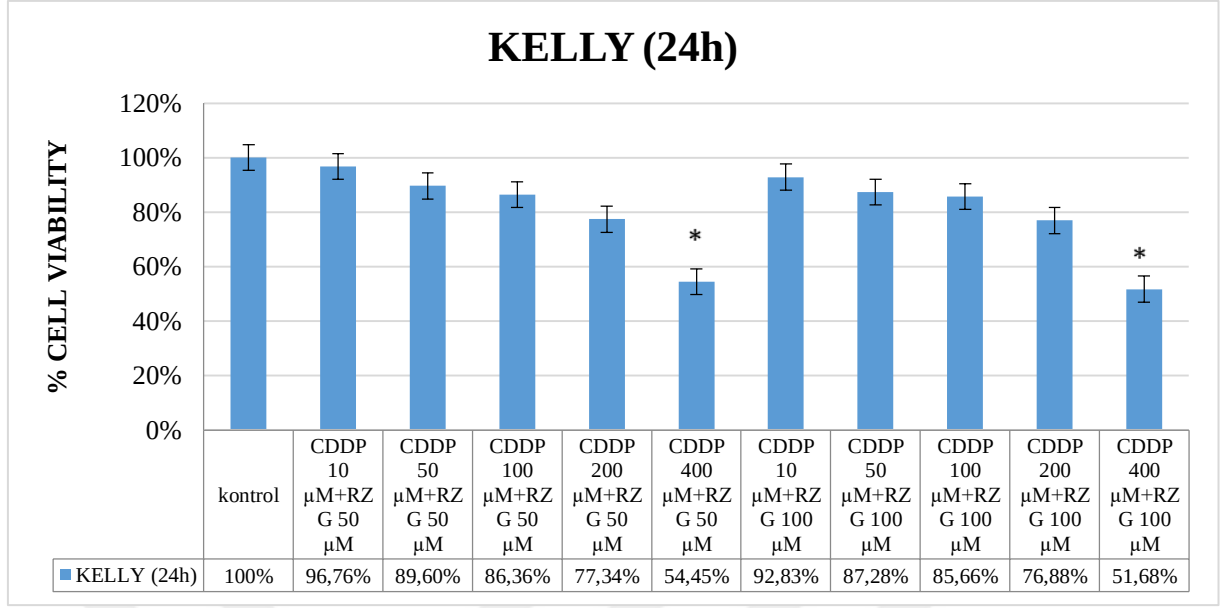
4.1 LD50 Doz Deney ve WST analiz bulguları

Tekrarlanan canlılık testleri sonrasında Rosiglatazon hücrelerin canlılığının %50 dozunda azalttığı dozlar 50, 100 μ M konsantrasyonu olarak belirlendi. Sisplatin 10, 50, 100, 200, 400 μ M dozları ile Rosiglatazon 50, 100 μ M dozlarının 24, 48, 72 saatlik kombinasyonları oluşturuldu.



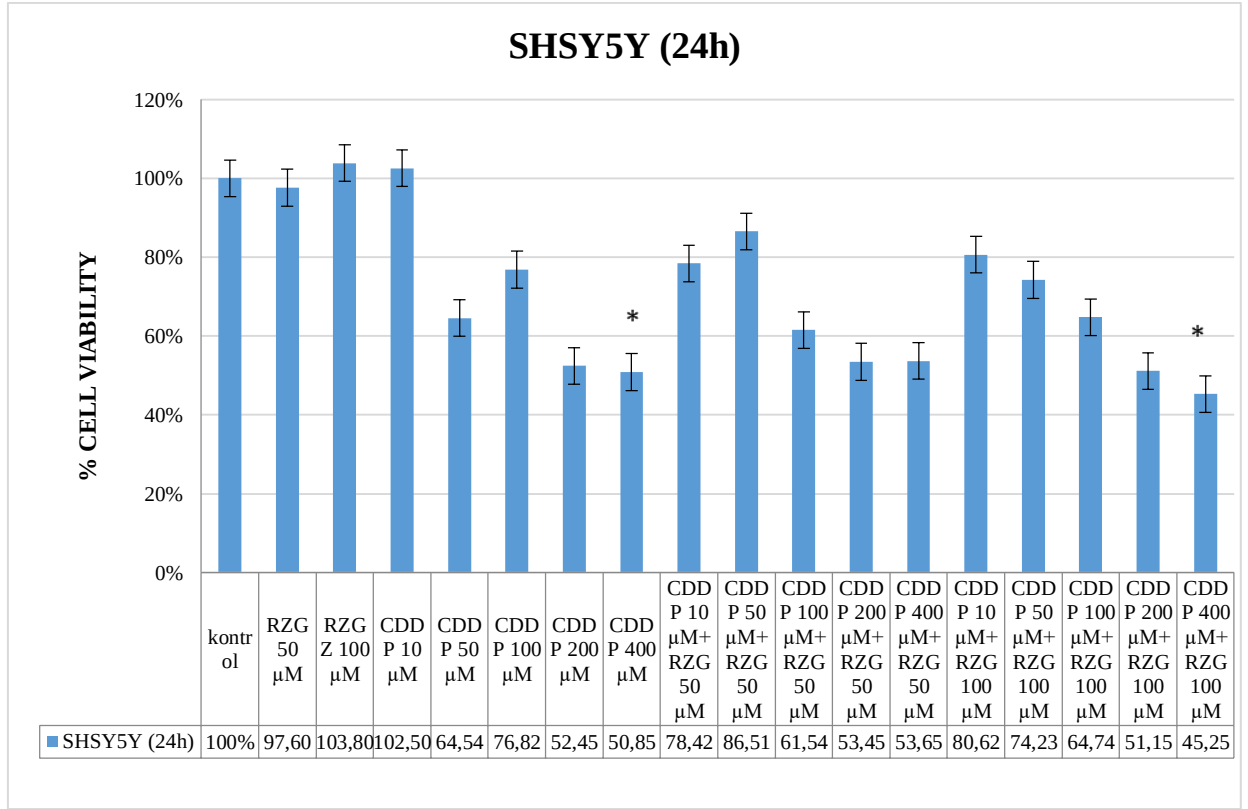
Şekil 13. Dirençsiz KELLY 24h CDDP WST analizi

Kontrol grubuna göre CDDP 10 μ M, CDDP 50 μ M, CDDP 100 μ M, CDDP 200 μ M ve CDDP 400 μ M uygulamaların da hücre canlılığı istatistiksel anlamlı olarak azalmıştır (*p < 0,05).



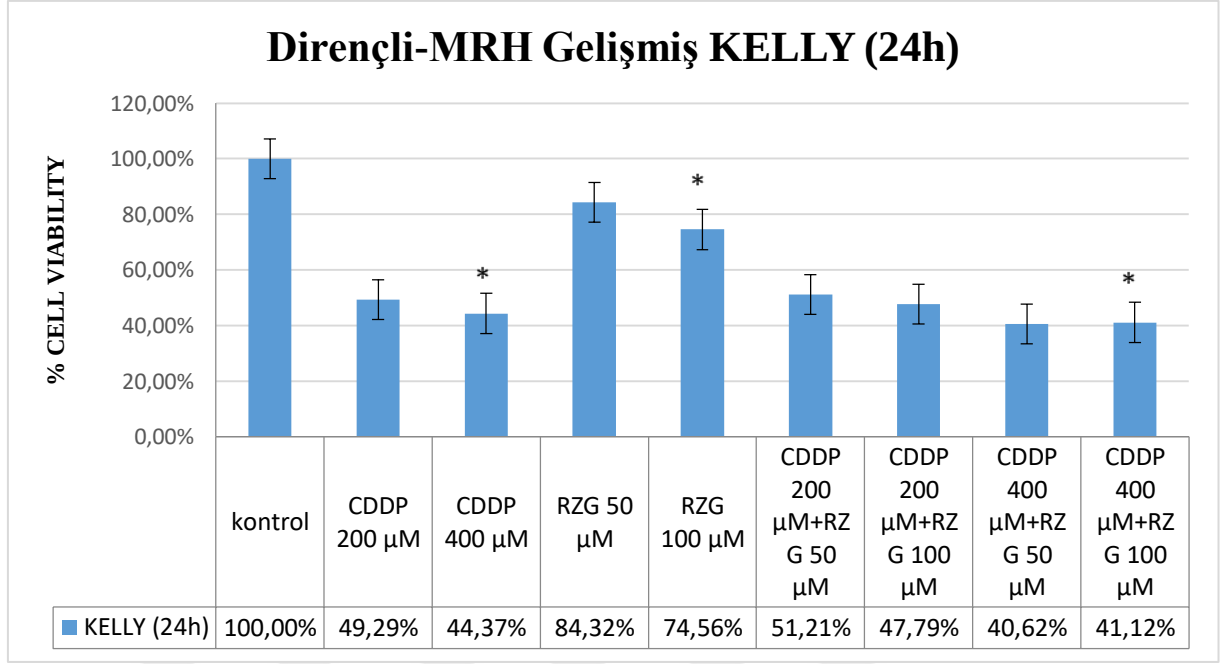
Şekil 14. Dirençsiz KELLY CDDP+RZG kombinasyon WST analizi

Kontrol grubuna göre tüm CDDP+RZG kombinasyon uygulamaları hücre canlılığını istatistiksel anlamlı olarak azaltmıştır (*p < 0,05).



Şekil 15. Dirençsiz SH-SY5Y CDDP,RZG ve CDDP+RZG kombinasyon WST analizi

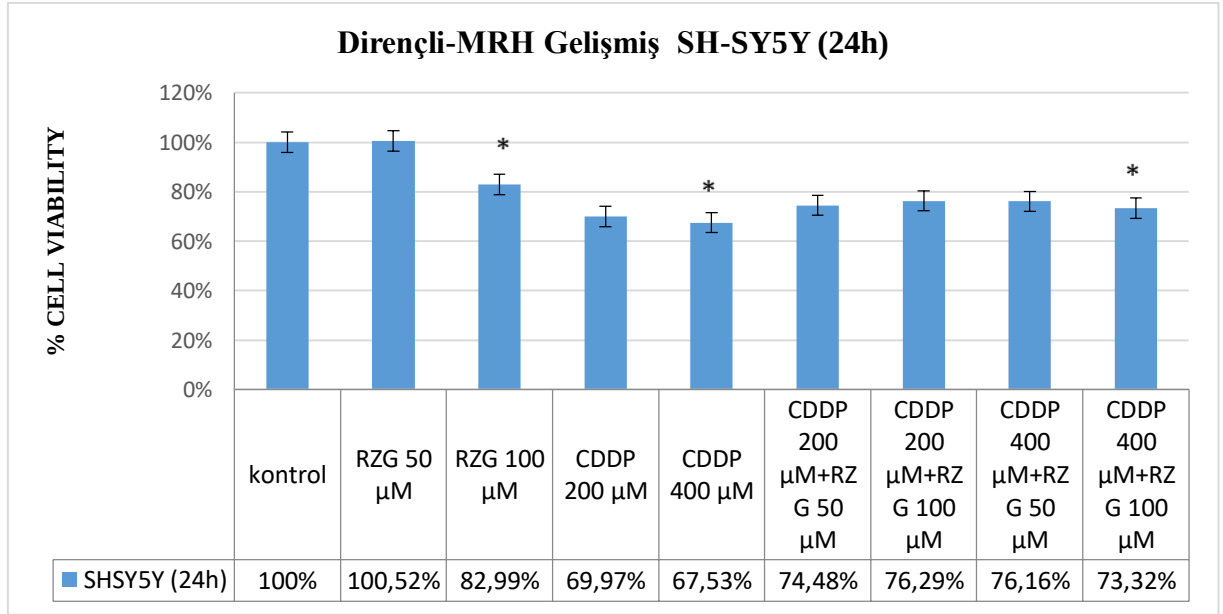
Kontrol grubuna göre RZG 100 μM uygulanan grupta hücre canlılığı istatistiksel anlamlı olarak artarken ($*p < 0,05$), CDDP 400μM ve CDDP+RZG kombinasyon uygulamaları hücre canlılığını istatistiksel anlamlı olarak azaltmıştır ($*p < 0,05$).



Şekil 16. Dirençli-MRH gelişmiş KELLY CDDP, RZG ve CDDP+RZG kombinasyonu WST analizi

MRH modeli oluşturulan **KELLY** hücrelerinde 24. saatte CDDP400 ile canlılık %44.37, tek başına RGZ100 ile canlılık %74.56, CDDP+RZG kombinasyonu ile ise canlılık %41.12 olarak saptadık.

Kontrol grubuna göre RGZ 100 µM, CDDP 400 µM ve CDDP+RZG kombinasyon uygulamaları hücre canlılığını istatistiksel anlamlı olarak azaltmıştır (*p < 0,05). RGZ 100 µM uygulanan grup CDDP 400 µM uygulanan grup ve CDDP+RGZ kombinasyon uygulanan grup ile karşılaştırıldığında hücre canlılığı istatistiksel anlamlı olarak azalmıştır (*p < 0,05). CDDP 400 µM uygulanan grup ve CDDP+RGZ kombinasyon uygulanan grup ile karşılaştırıldığında hücre canlılığı istatistiksel anlamlı olarak azalmıştır (*p < 0,05).



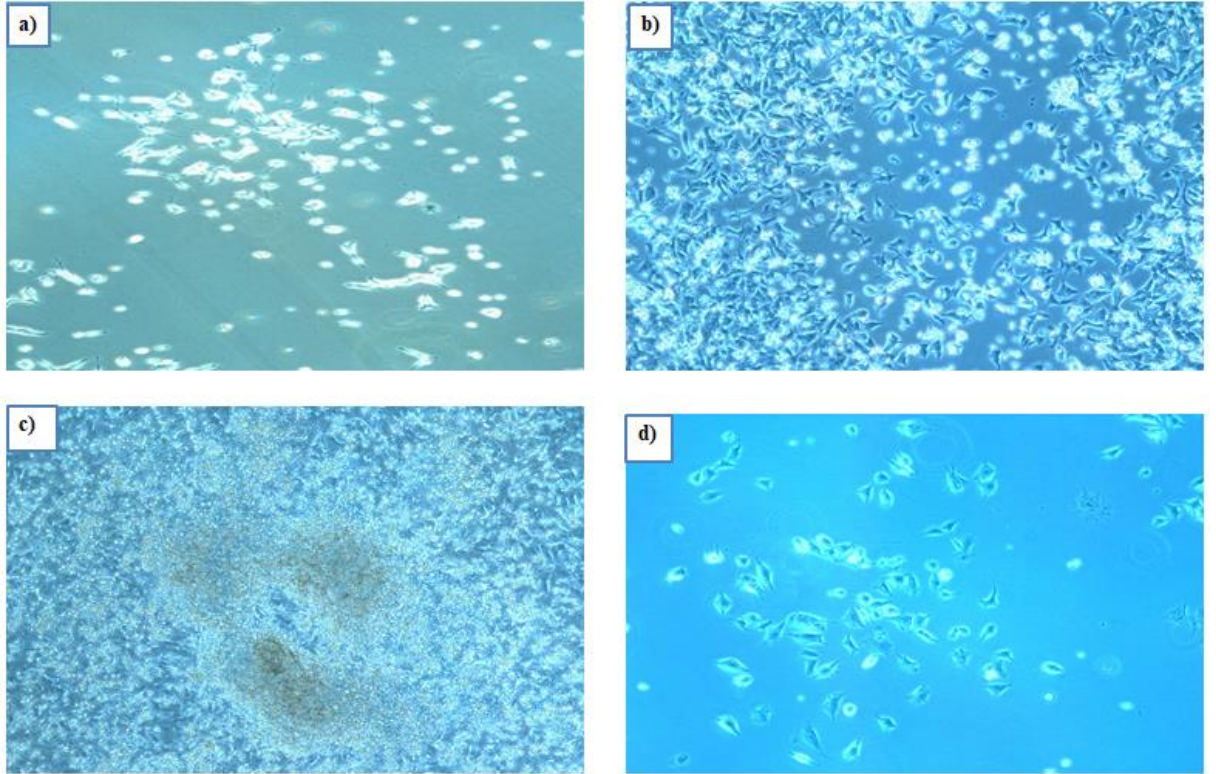
Şekil 17. Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y CDDP, RZG ve CDDP+RZG kombinasyonu WST analizi

MRH modeli oluşturulan **SH-SY5Y** hücrelerinde 24. saatte CDDP400 ile canlılık %67,53, tek başına RGZ100 ile canlılık %82,99, CDDP+RZG kombinasyonu ile ise canlılık %73,32 olarak saptadık.

Kontrol grubuna göre RGZ 100 µM, CDDP 400 µM ve CDDP+RZG kombinasyon uygulamaları hücre canlılığını istatistiksel anlamlı olarak azaltmıştır (* $p < 0,05$). RGZ 100 µM uygulanan grup CDDP 400 µM uygulanan grup ve CDDP+RZG kombinasyon uygulanan grup ile karşılaştırıldığında hücre canlılığı istatistiksel anlamlı olarak azalmıştır (* $p < 0,05$).

4.2 *In-vitro* Minimal Rezidüel Hastalık Modeli bulguları

Her sisplatin LD90 doz uygulaması ile geriye sisplatin etkisine dayalı hücreler kaldı. Böylece tıpkı insan vücudunda tedaviden kaçan hücrelerin çoğalması gerçekleştirildi. Bu şekilde **KELLY** hücrelerinde 4.doz uygulaması yapılabilirken **SH-SY5Y** hücrelerine ancak 2. Doz sisplatin uygulaması yapılabildi. Minimal rezidüel hastalık gelişimi hücrelerde **PHOX2B** mRNA ekspresyonlarının artışı ile değerlendirildi.



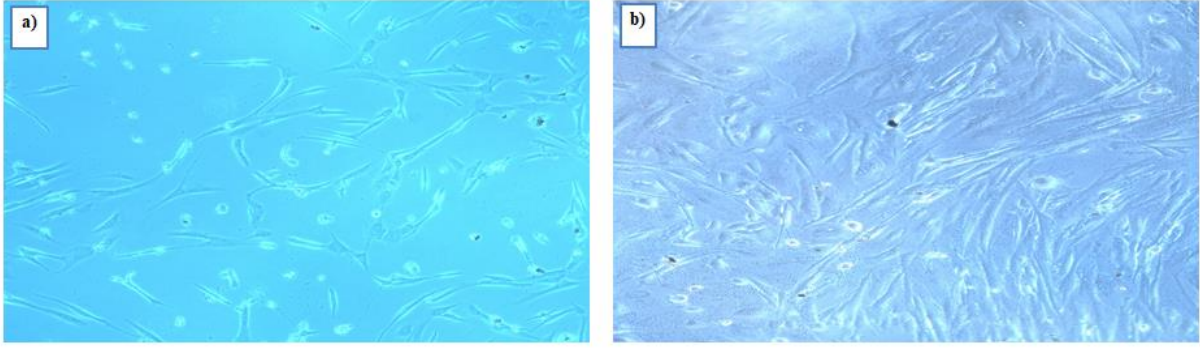
Şekil 18. KELLY Minimal rezidüel hastalık model oluşumu

a) 1. doz 80 µM sisplatin uygulanmış **KELLY** hücreleri

b) Sisplatin sonrası tekrar hücrelerin çoğalması

c) Hücrelerin tekrar konflüense ulaşmaları.

d) Konflüense ulaşan **KELLY** hücrelerine **2. doz 80 µM** sisplatin uygulanması sonucu geriye sisplatin etkisine dayalı hücrelerin kalması.



Şekil 19. SH-SY5Y Minimal rezidüel hastalık model oluşumu

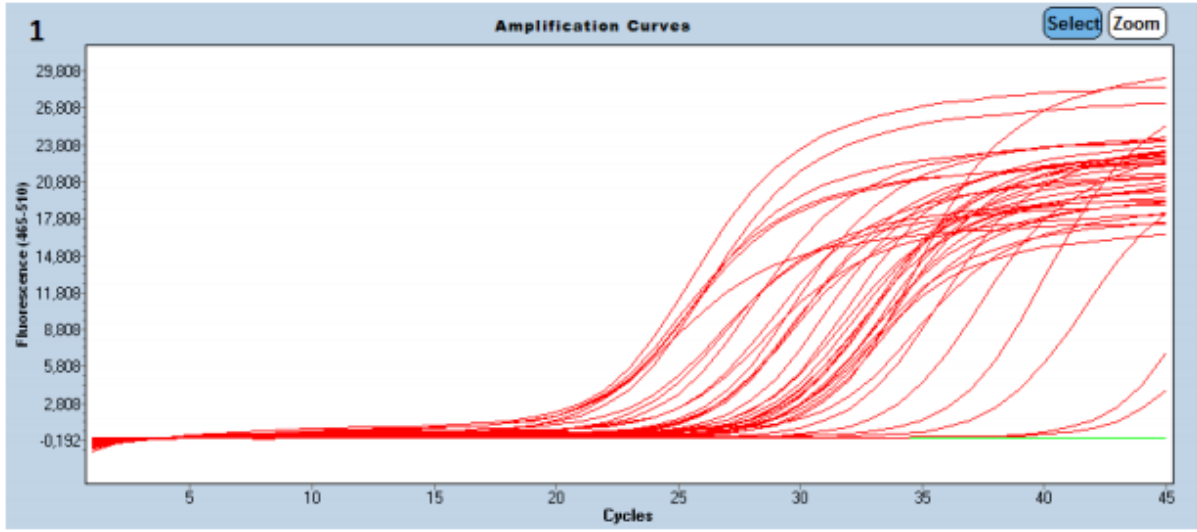
a) 1.doz 50 µm CDDP sonrası **SH-SY5Y** hücreleri,

b) 2.doz 50 µm CDDP sonrası **SH-SY5Y** hücreleri.

4.3 PHOX2B mRNA ekspresyon bulguları

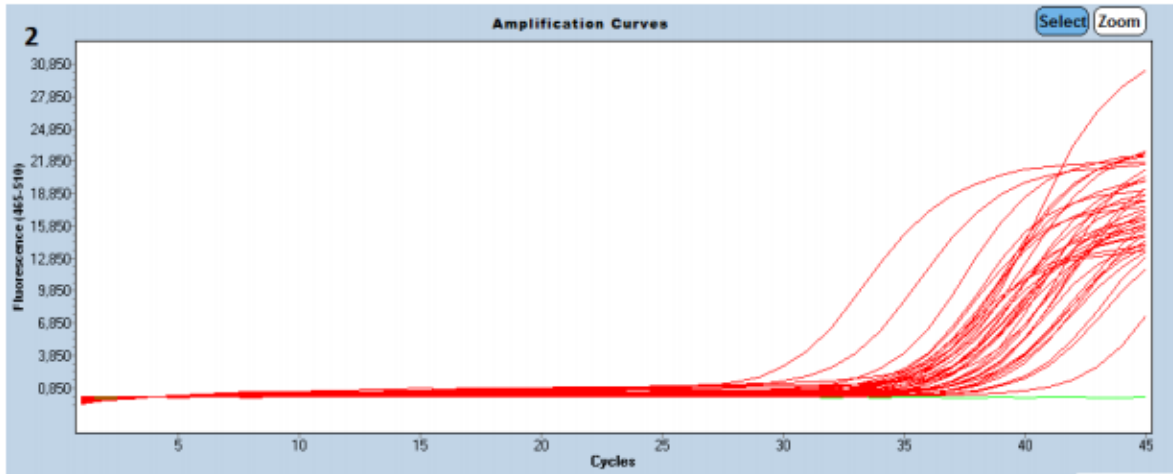
- RT-PCR analizinde dirençsiz ve Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y hücrelerinde RZG dozları kontrole göre **-2 kat** gen ekspresyon ifadesini azaltmıştır.
- Sadece CDDP ile **184** ve **23** kat artış
- Dirençsiz **KELLY** de Rosiglatozon dozları kontrole göre, **-9 kat azalırken**
- Dirençli-MRH gelişmiş **KELLY** de ise; **-4,** kat azaldığından anlamlı değişimin gerçekleştiğini belirledik.
- Sadece CDDP ile **4** ve **9,5** kat artış saptandı.

PHOX2B ekspresyon artışı özellikle tek başına **CDDP** ve **CDDP+RZG** kombinasyonlarında artış ile Minimal Rezidüel hastalık gelişimi konfirme edilmiş oldu.



Şekil 20. Gapdh gen amplifikasyon eğrisi

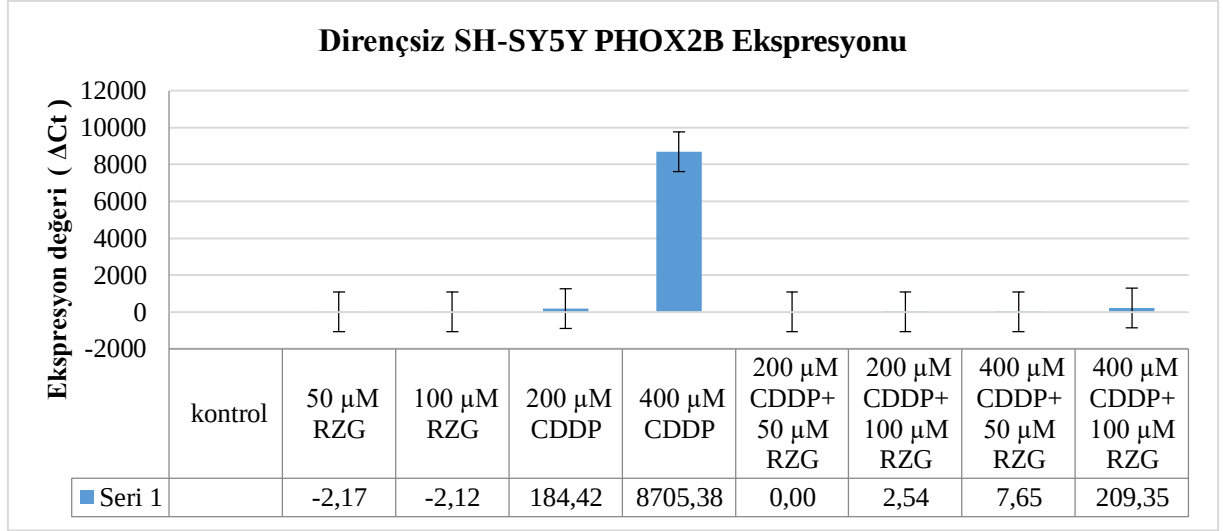
Real Time PCR çalışmasından elde edilen veriler Absolute Quantification ve Advanced Relative Quantification yöntemi ile analiz edildi.



Şekil 21. PHOX2B genin amplifikasyon eğrisi

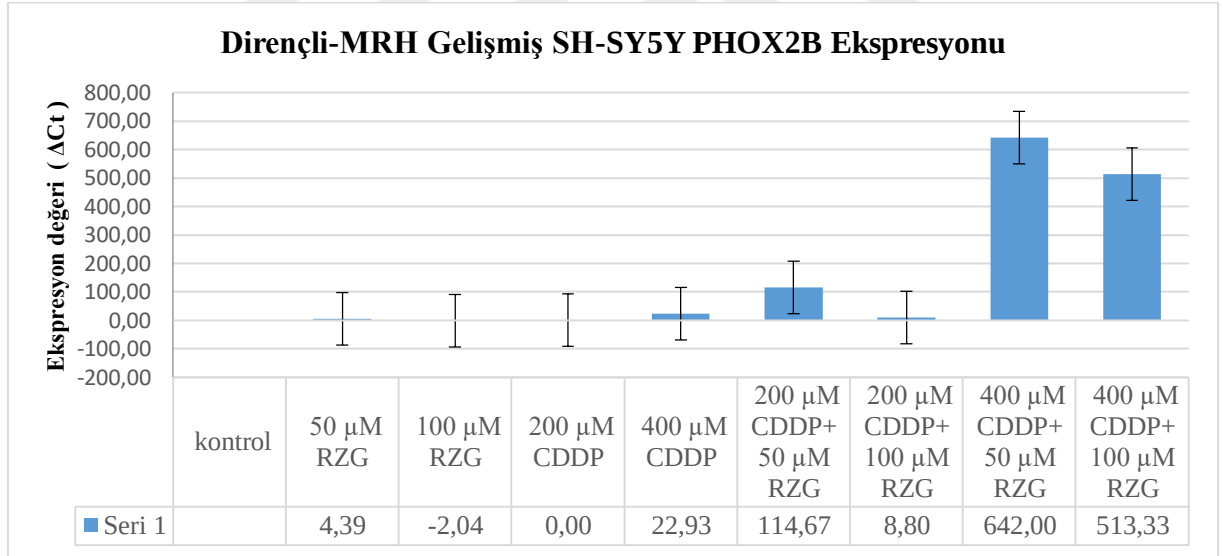
Real Time PCR çalışmasından elde edilen veriler Absolute Quantification ve Advanced Relative Quantification yöntemi ile analiz edildi. Absolute Quantification'a göre 37 Human Hücre Kültüründen elde edilen cDNA Örneklerinin 2 gen bölgesi için amplifikasyon eğrileri şekillerde gösterildiği gibidir. (gapdh;1, phox2b;2)

Advanced Relative Quantification analiz sonucu için referans gen (kontrol) olarak **GAPDH** alınmış ve **PHOX2B** geninin verileri bu referans gene göre analiz edilmiştir.



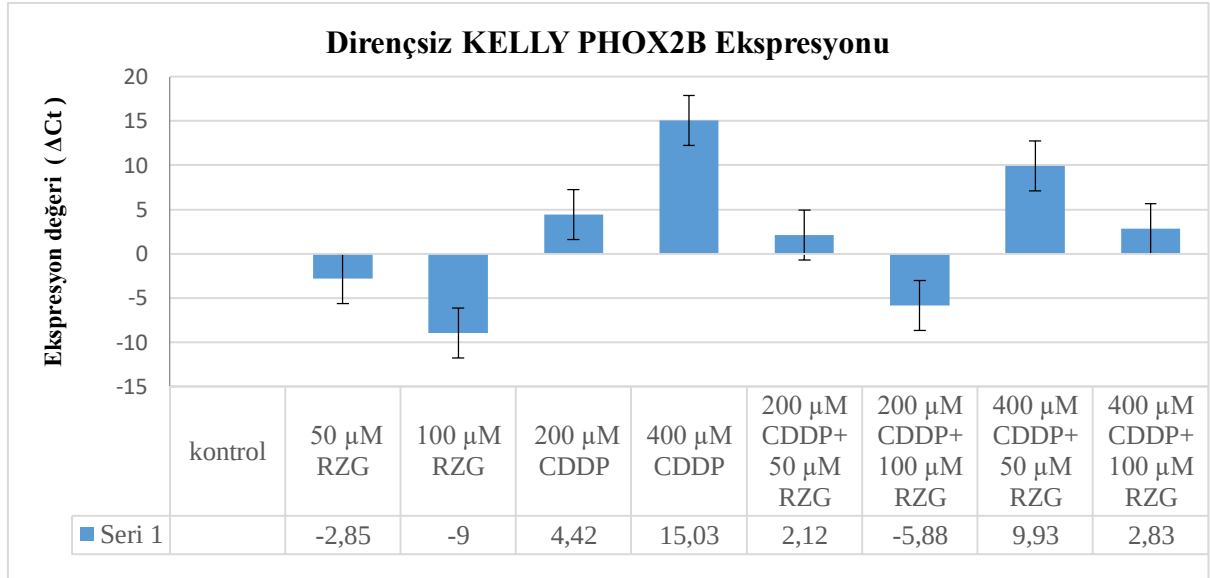
Şekil 22. Dirençsiz SH-SY5Y hücrelerinde **PHOX2B** gen analizi

Dirençsiz SH-SY5Y Kontrolüne göre; **100 μM RZG** -2,12 kat , **50 μM RZG** -2,17 kat gen ekspresyon ifadesi azalmıştır.



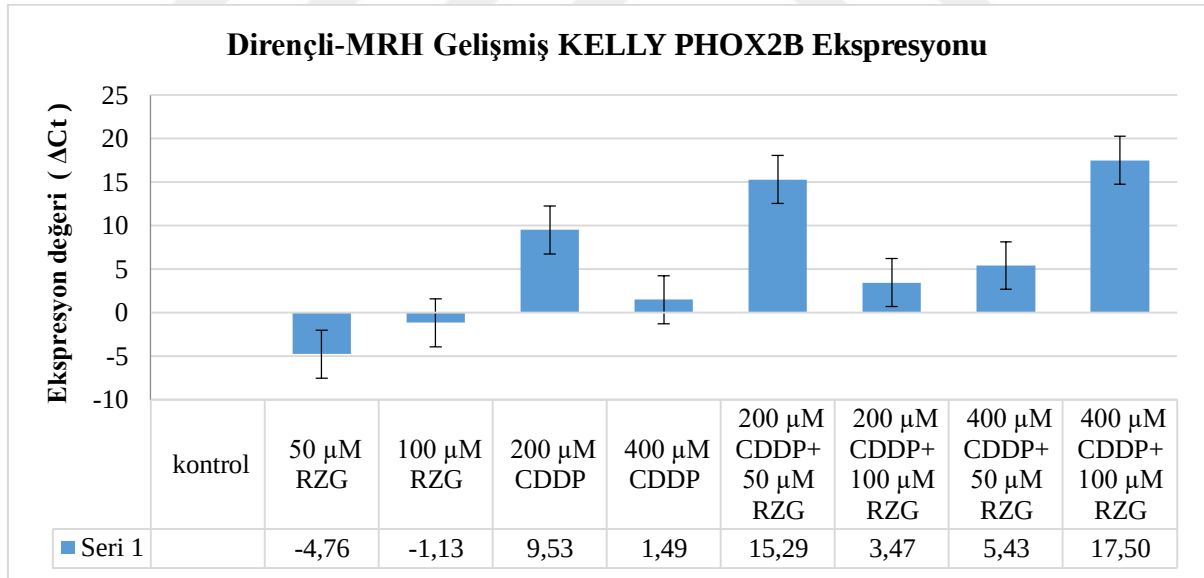
Şekil 23. Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y hücrelerinde **PHOX2B** gen analizi

Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y Kontrolüne göre, **100 μM RZG** -2,04 kat gen ekspresyon ifadesi azalmıştır.



Şekil 24. Dirençsiz KELLY hücrelerinde **PHOX2B** gen analizi

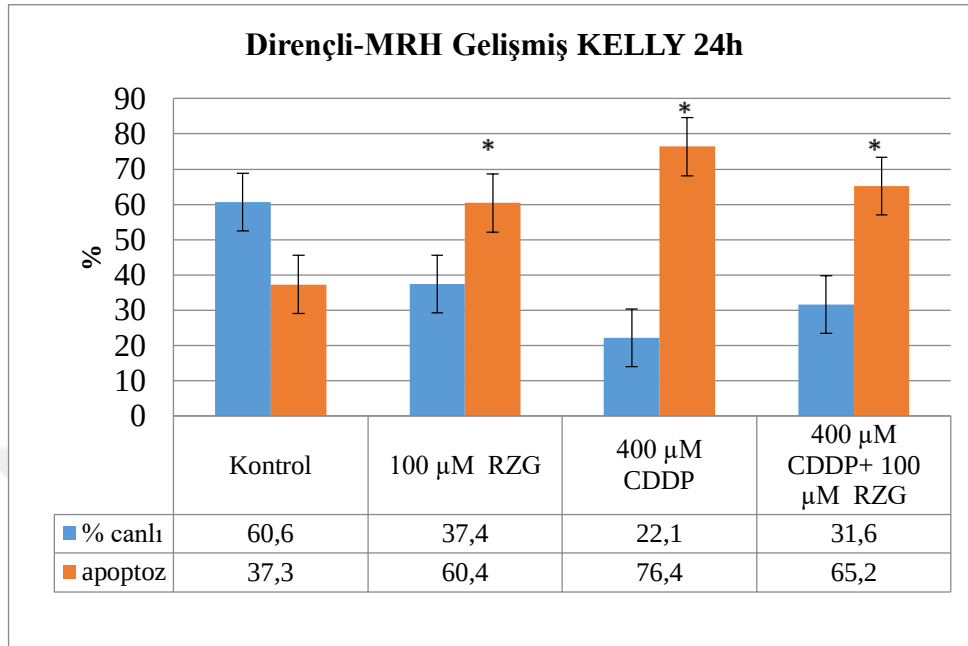
Dirençsiz KELLY Kontrolüne göre, **200 μ M CDDP+ 100 μ M RZG** -5,88 kat, **100 μ M RZG** -9 kat, **50 μ M RZG** ise -2,85 kat gen ekspresyon ifadesi azalmıştır.



Şekil 25. Dirençli-MRH gelişmiş KELLY hücrelerinde **PHOX2B** gen analizi

Dirençli-MRH gelişmiş KELLY kontrolüne göre; **50 μ M RZG** -4,76 kat, **100 μ M RZG** ise -1,13 kat gen ekspresyon ifadesi azalmıştır.

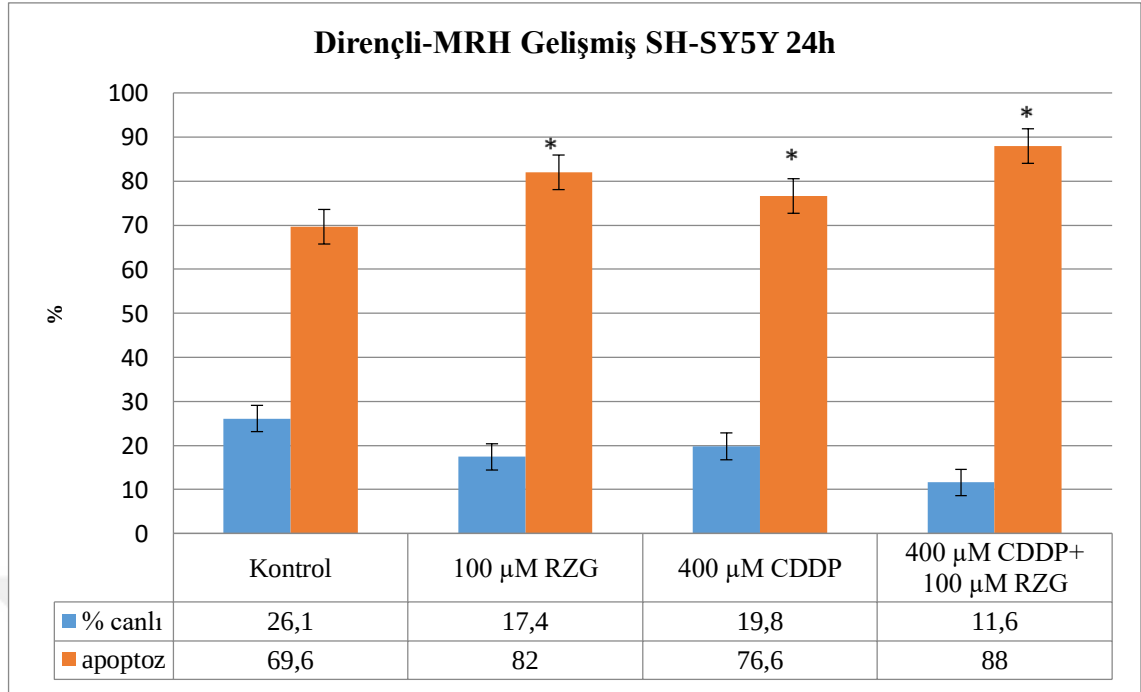
4.4 Apoptotik hücre ölümünün flow sitometri bulguları



Şekil 26. Dirençli-MRH gelişmiş KELLY 24 saat canlılık ve total apoptoz oranları

Dirençli-MRH gelişmiş KELLY hücrelerinde 24. saatte CDDP 400µM ile canlılık %22,1 iken apoptoz % 76,4 olarak saptandı. Tek başına RGZ100 µM ile %37,4 canlılık ve apoptoz %60,4 olarak saptanırken CDDP+RGZ kombinasyonu ile % 31,6 canlılık ve apoptoz ise % 65,2 olarak tespit ettik.

Kontrol grubuna göre RGZ 100 µM, CDDP 400 µM ve CDDP+RGZ kombinasyon uygulamaları hücre canlılığını istatistiksel anlamlı olarak azaltmıştır (*p < 0,05). Kontrol grubuna göre RGZ 100 µM, CDDP 400 µM ve CDDP+RGZ kombinasyon uygulamaları hücre apoptozunu istatistiksel anlamlı olarak arttırmıştır (*p < 0,05).

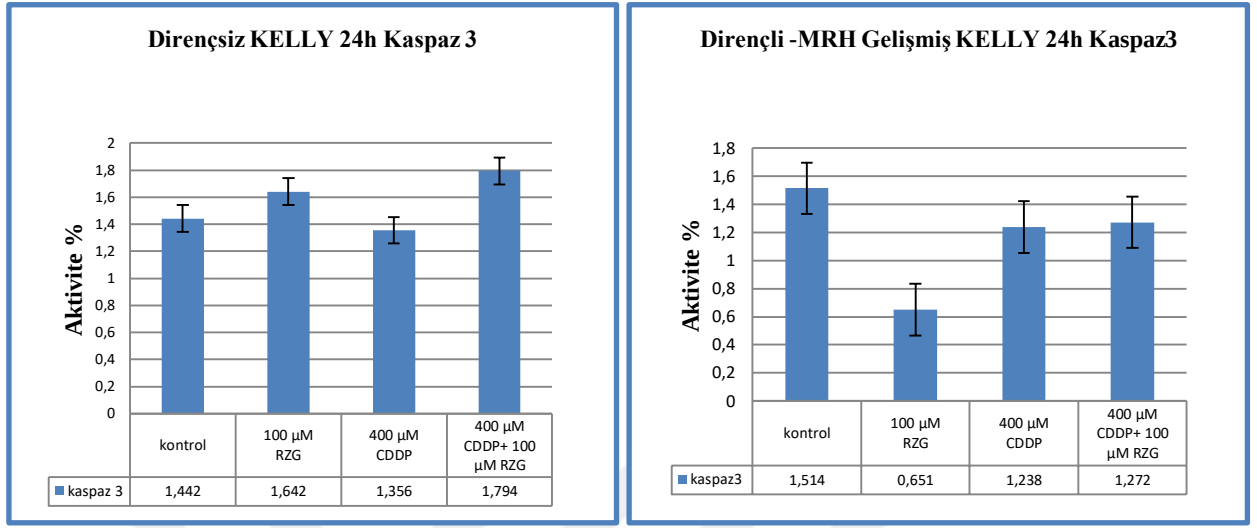


Şekil 27. Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y 24 saat canlılık ve apoptoz oranları

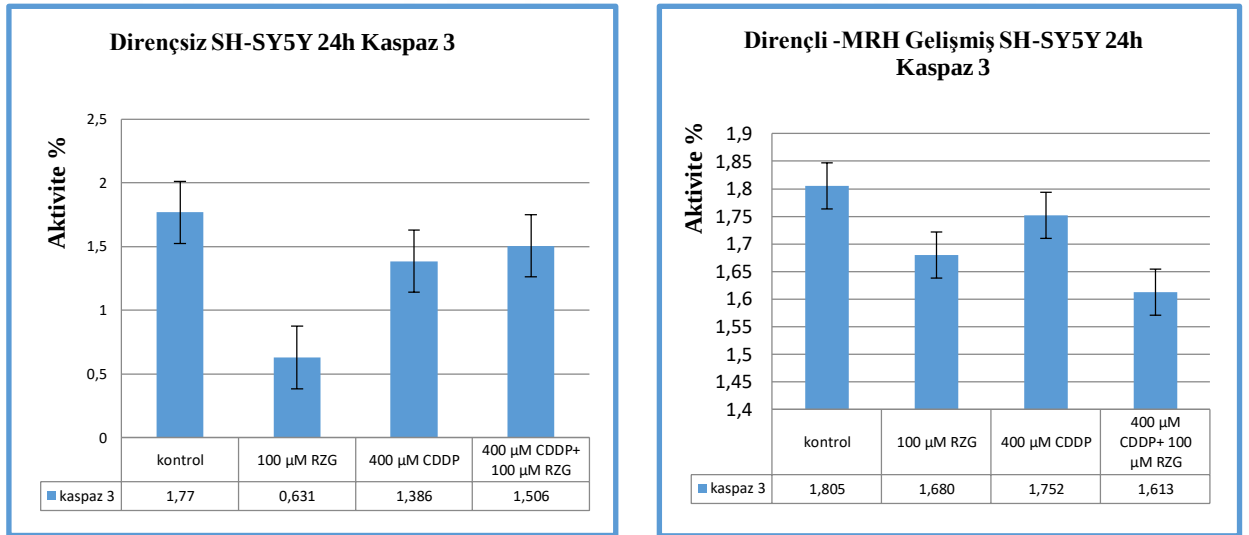
Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y 24. saatte CDDP 400 µM ile canlılık %19,8 iken apoptoz %76.6 olarak saptandı. Tek başına RGZ 100 µM ile canlılık %17,4 ve apoptoz % 82 olarak saptanırken CDDP+RGZ kombinasyonu ile %11,6 canlılık ve apoptoz %88 olarak saptadık.

Kontrol grubuna göre RGZ 100 µM, CDDP 400 µM ve CDDP+RGZ kombinasyon uygulamaları hücre canlılığını istatistiksel anlamlı olarak azaltmıştır (*p < 0,05). Kontrol grubuna göre RGZ 100 µM, CDDP 400 µM ve CDDP+RGZ kombinasyon uygulamaları hücre apoptozunu istatistiksel anlamlı olarak arttırmıştır (*p < 0,05).

4.5 Kaspaz-3 bulguları

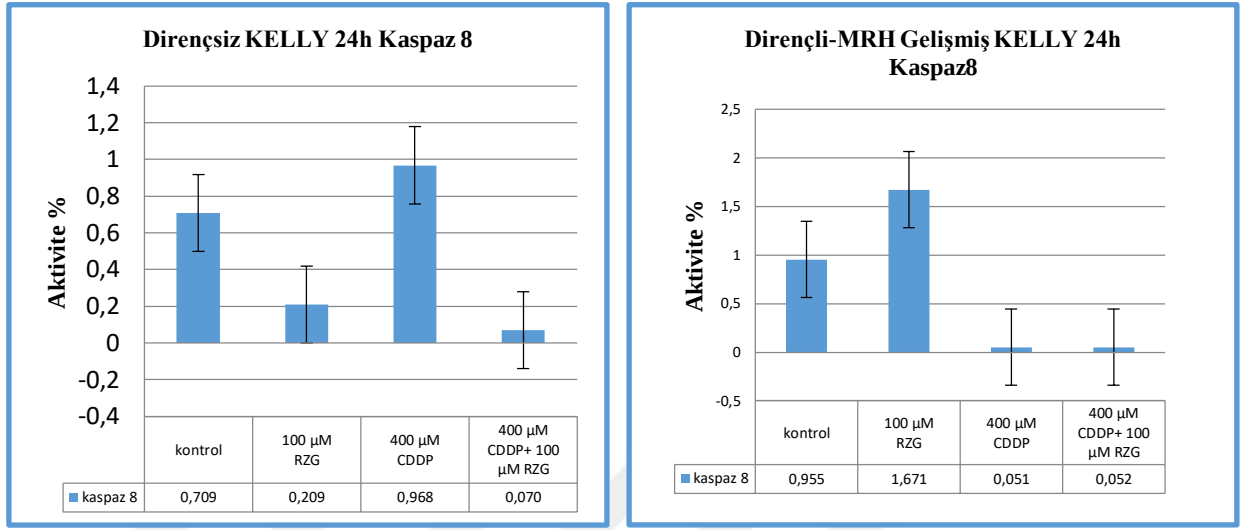


Şekil 28. Dirençsiz ve Dirençli-MRH gelişmiş KELLY hücre hatlarının 24h Kaspaz-3 aktiviteleri

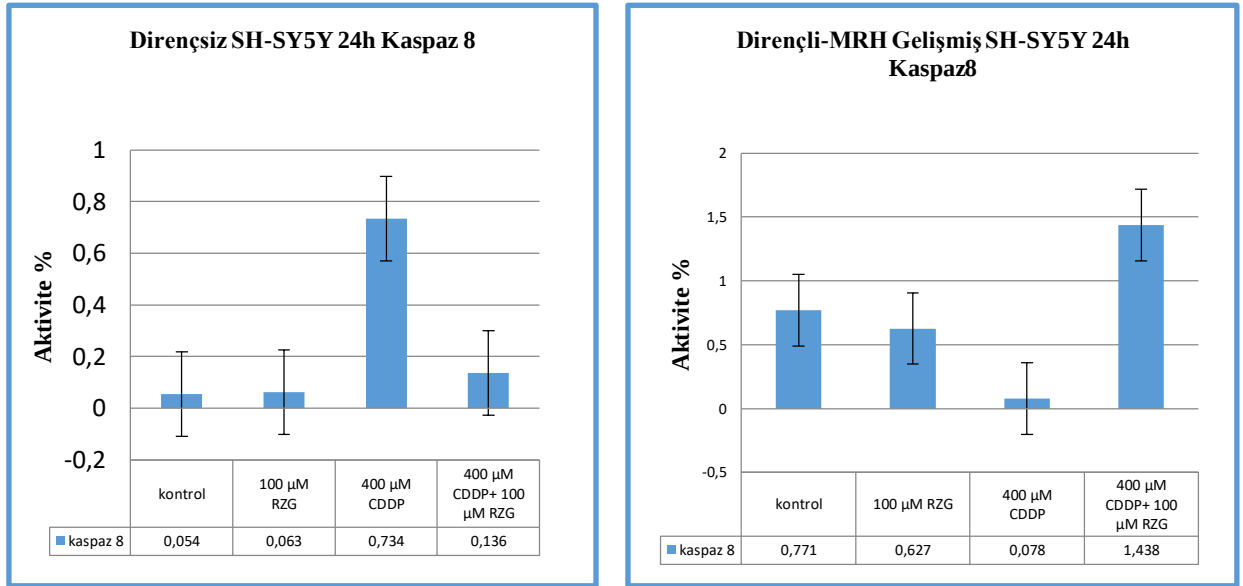


Şekil 29. Dirençsiz ve Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y hücre hatlarının 24h Kaspaz-3 aktiviteleri

4.6 Kaspaz-8 bulguları

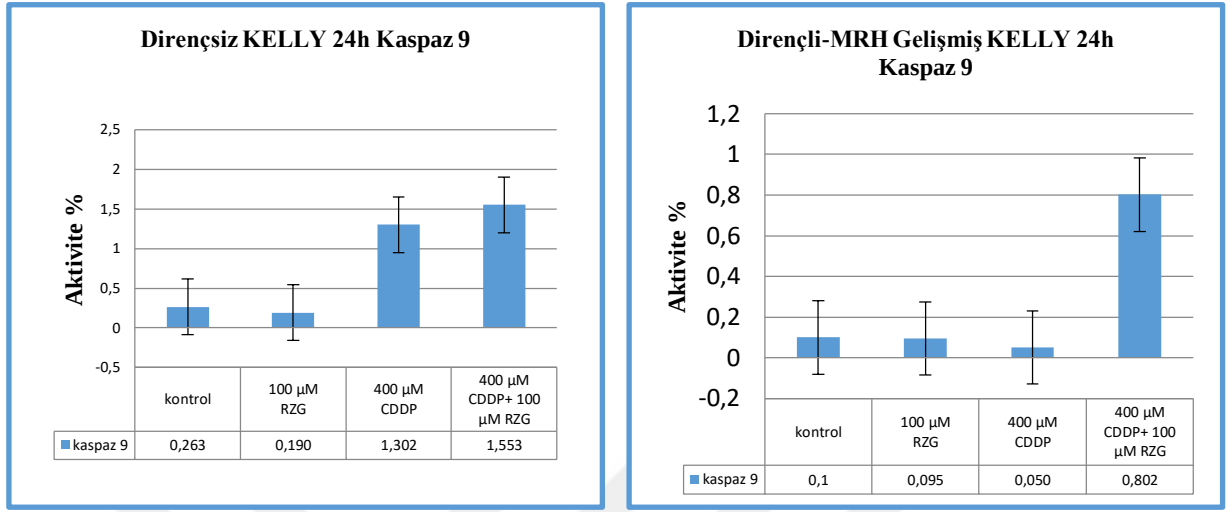


Şekil 30. Dirençsiz ve Dirençli-MRH gelişmiş KELLY hücre hatlarının 24h Kaspaz-8 aktiviteleri

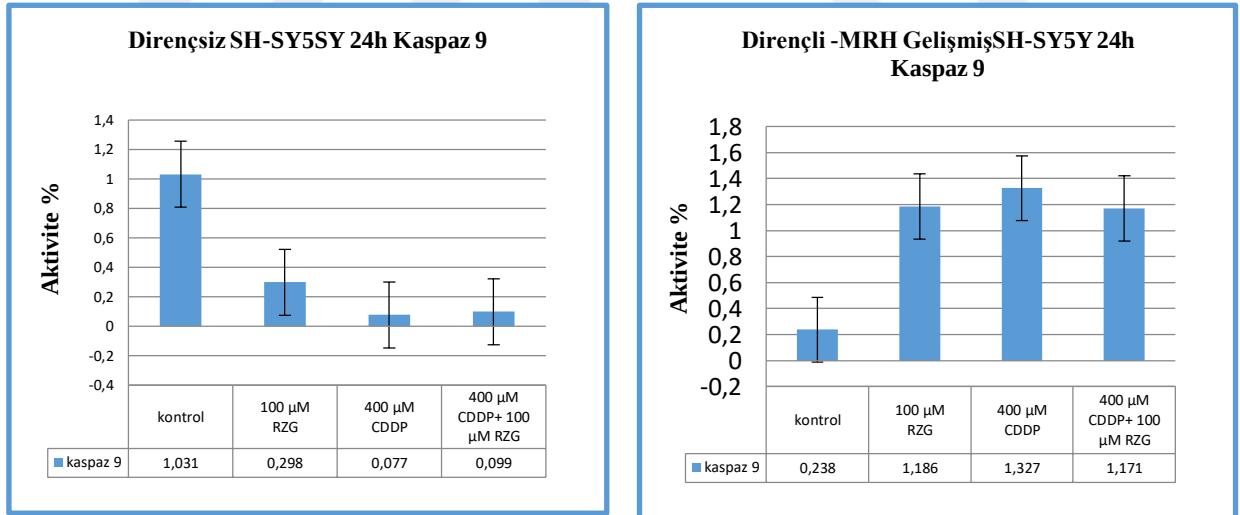


Şekil 31. Dirençsiz ve Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y hücre hatlarının 24h Kaspaz-8 aktiviteleri

4.7 Kaspaz-9 bulguları



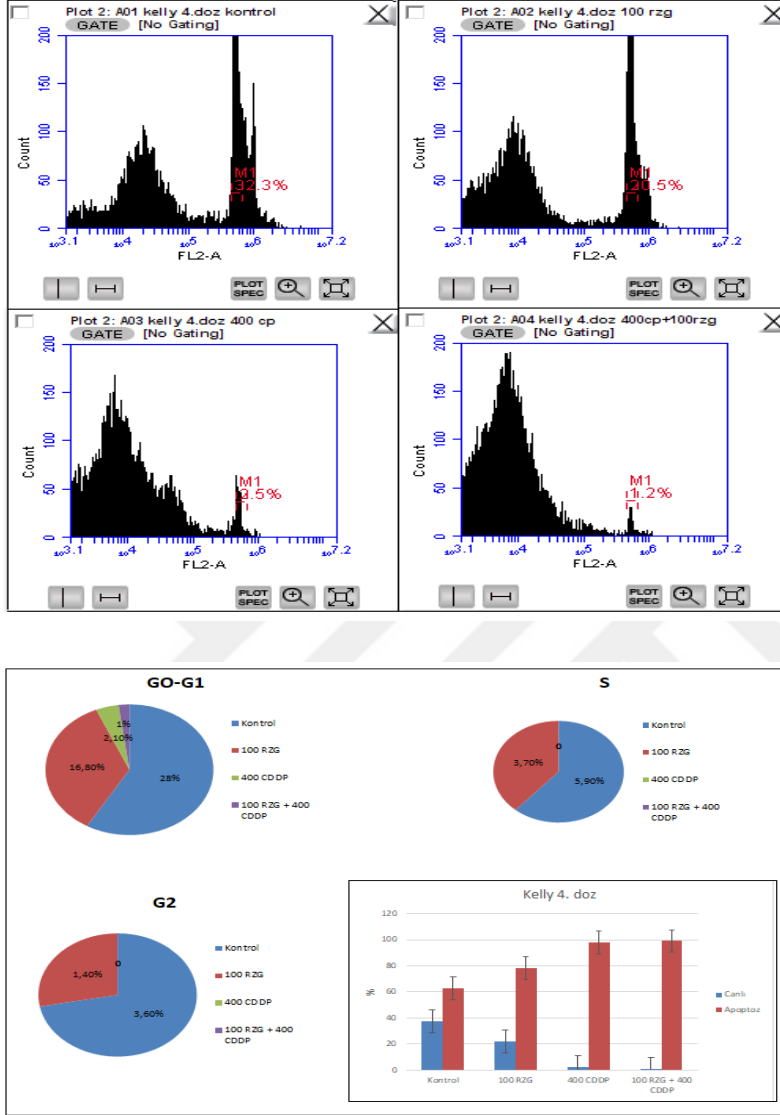
Şekil 32. Dirençsiz ve Dirençli-MRH gelişmiş KELLY hücre hatlarının 24h Kaspaz-9 aktiviteleri



Şekil 33. Dirençsiz ve Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y hücre hatlarının 24h Kaspaz-9 aktiviteleri

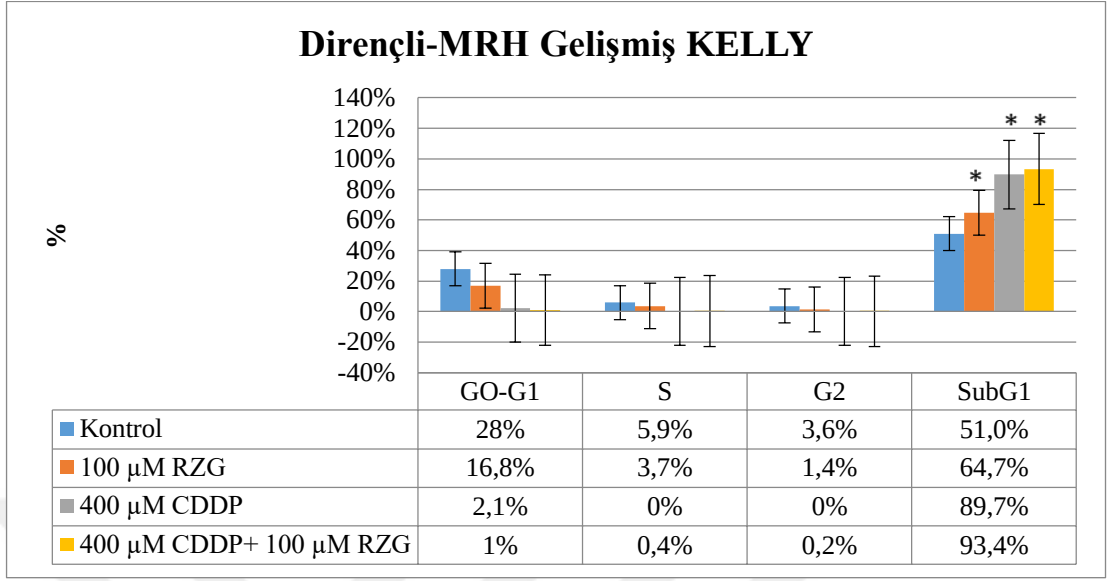
4.8 Hücre siklusu bulguları

4.8.1 Dirençli-MRH gelişmiş KELLY hücre siklusu bulguları



Şekil 34. Dirençli-MRH gelişmiş KELLY hücre siklusu flow sitometre görüntüsü

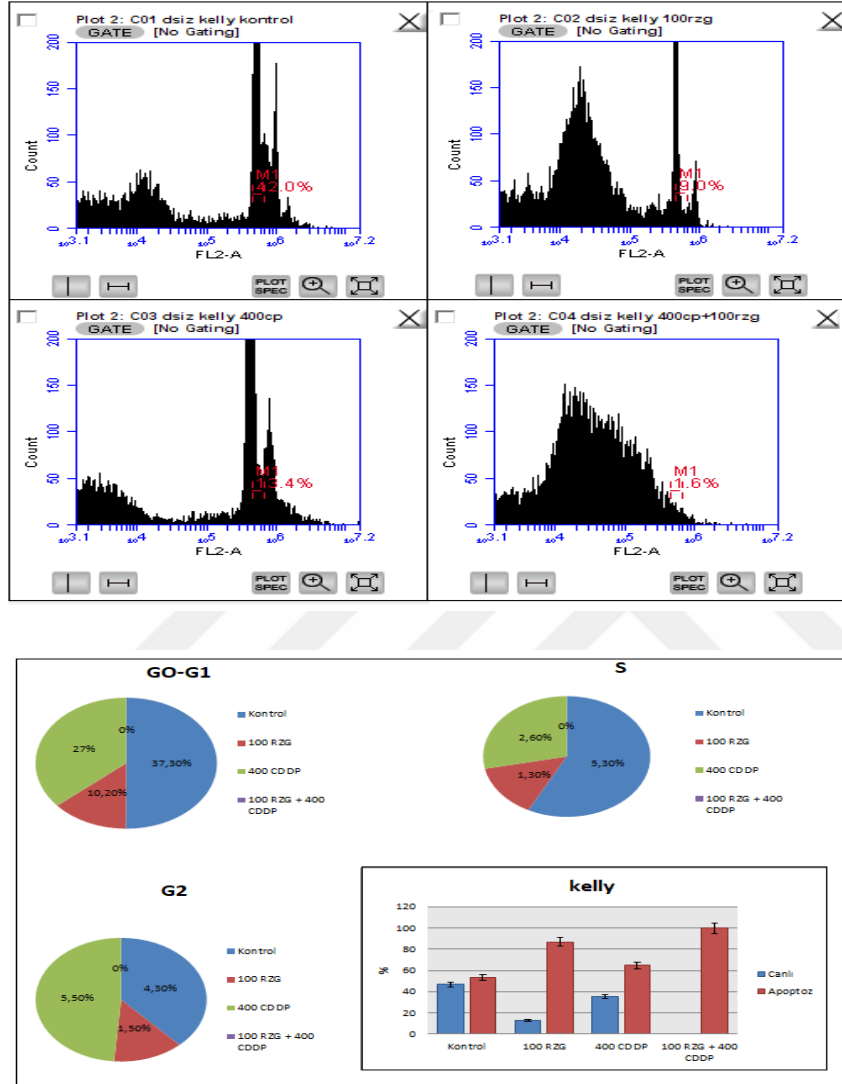
Dirençli-MRH gelişmiş KELLY hücresinin akım sitometrik cihazında yapılan ölçüm sonucunda 400 μ M CDDP ve 400 μ M CDDP+100 μ M RZG kombinasyon dozlarında yüksek oranda apoptoz görüldü.



Şekil 35. Dirençli-MRH gelişmiş KELLY hücre siklus grafiği

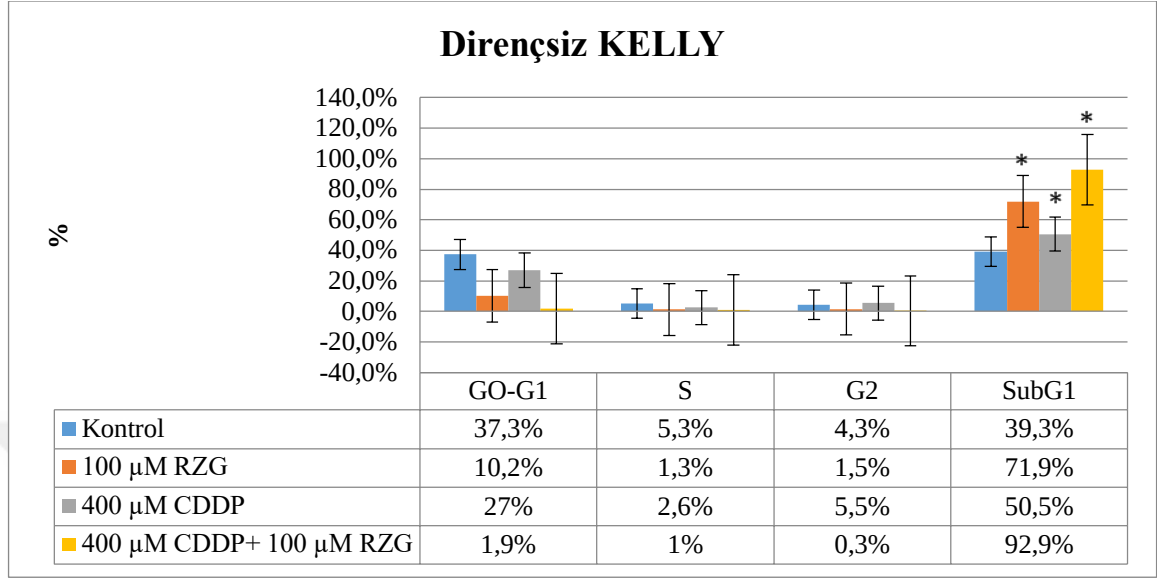
Kontrol grubuna göre RGZ 100 µM, CDDP 400 µM ve CDDP+RGZ kombinasyon uygulamaları GO- G1, S ve G2 evrelerinde bulunan hücre sayısını istatistiksel anlamlı olarak azaltmıştır (*p < 0,05). SubG1 evresindeki hücre sayısı Kontrol grubuna göre RGZ 100 µM, CDDP 400 µM ve CDDP+RGZ kombinasyon uygulamaların da istatistiksel anlamlı olarak artmıştır (*p < 0,05).

4.8.2 Dirençsiz KELLY hücre siklusu bulguları



Şekil 36. Dirençsiz KELLY hücre siklusu flow sitometre görüntüsü

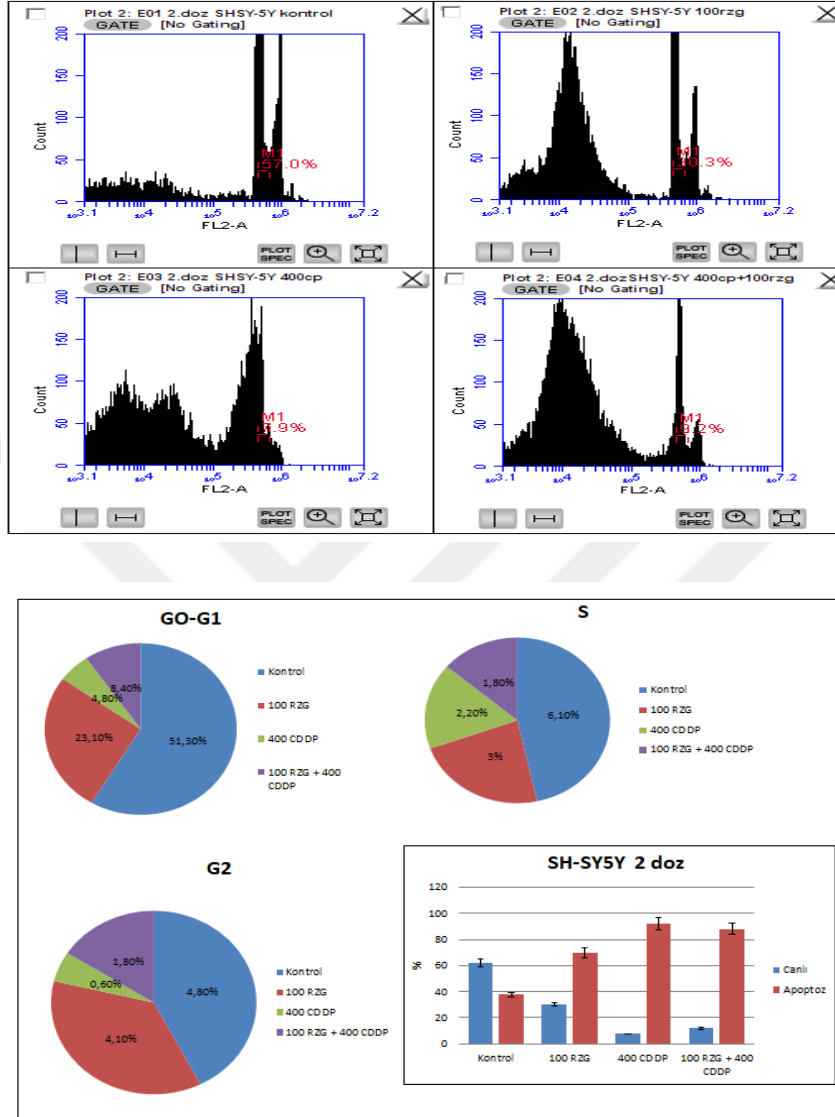
Dirençsiz KELLY hücresinin akım sitometrik cihazında yapılan ölçüm sonucunda 400 μ M CDDP+100 μ M RZG kombinasyon uygulanmasında yüksek oranda apoptoz görüldü.



Şekil 37. Dirençsiz KELLY hücre siklus grafiği

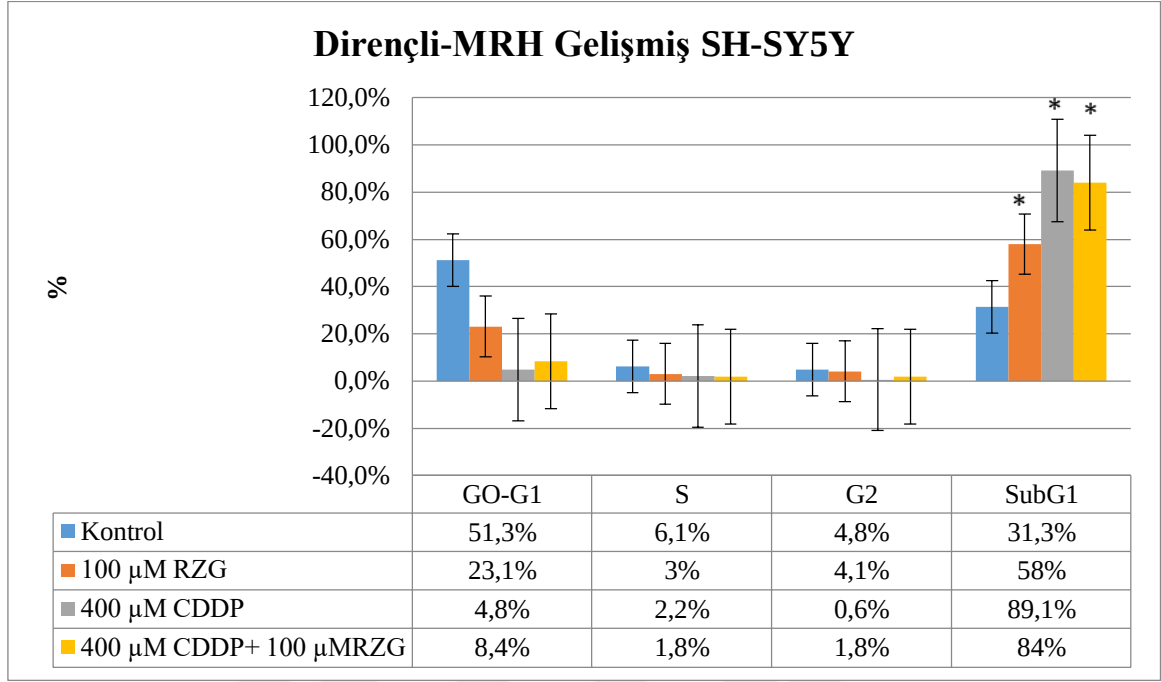
Kontrol grubuna göre RGZ 100 µM, CDDP 400 µM ve CDDP+RZG kombinasyon uygulamaları GO- G1, S ve G2 evrelerinde bulunan hücre sayısını istatistiksel anlamlı olarak azaltmıştır (*p < 0,05). SubG1evresindeki hücre sayısı Kontrol grubuna göre RGZ 100 µM, CDDP 400 µM ve CDDP+RZG kombinasyon uygulamaları istatistiksel anlamlı olarak artmıştır (*p < 0,05).

4.8.3 Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y hücre siklusu bulguları



Şekil 38. Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y hücre siklus flow sitometre görüntüsü

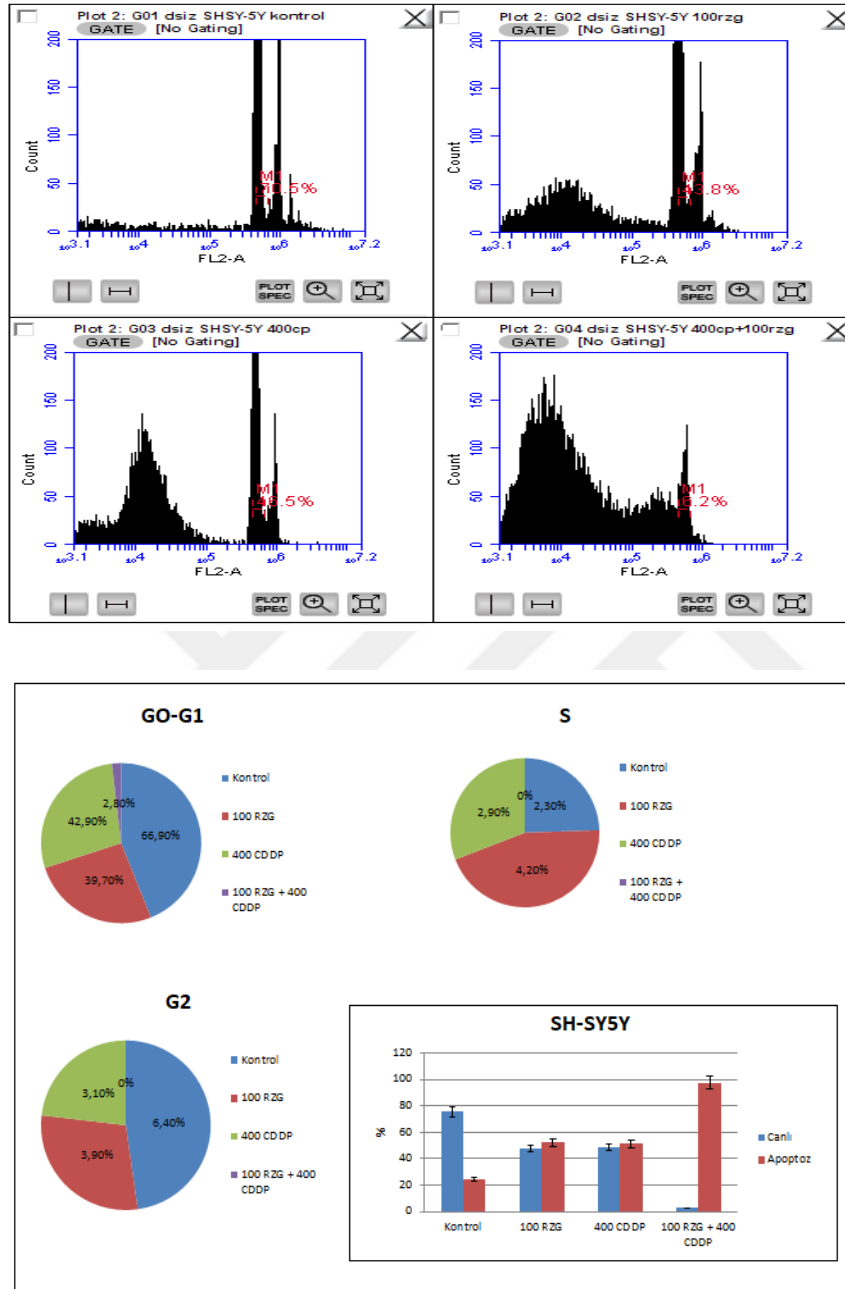
Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y hücresinin akım sitometrik cihazında yapılan ölçüm sonucunda **400 μ M CDDP** de yüksek oranda apoptoz, **400 μ M CDDP+100 μ M RZG** da ise çok fazla ölü hücre görüldü.



Şekil 39. Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y hücresinin hücre siklus ölçümü.

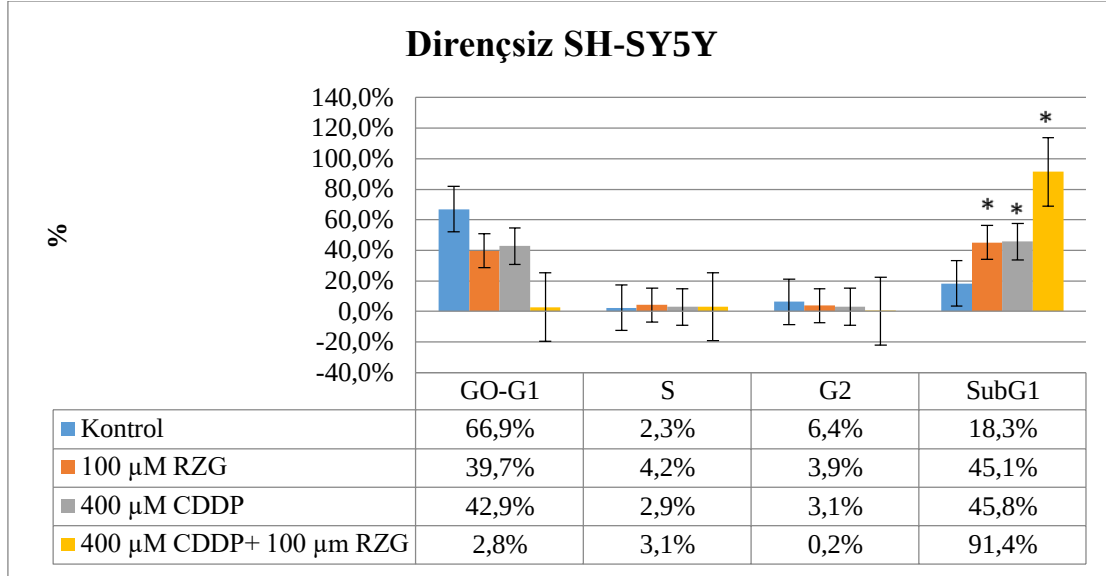
Kontrol grubuna göre RGZ 100 µM, CDDP 400 µM ve CDDP+RGZ kombinasyon uygulamaları sonucu GO- G1, ve S evrelerinde bulunan hücre sayısı istatistiksel anlamlı olarak azalmıştır (*p < 0,05). SubG1 evresindeki hücre sayısı Kontrol grubuna göre RGZ 100 µM, CDDP 400 µM ve CDDP+RGZ kombinasyon uygulamaları istatistiksel anlamlı olarak artmıştır (*p < 0,05).

4.8.4 Dirençsiz SH-SY5Y hücre siklusu bulguları



Şekil 40. Dirençsiz SH-SY5Y hücre siklusu flow sitometre görüntüsü

Dirençsiz SH-SY5Y hücresinin akım sitometrik cihazında yapılan ölçüm sonucunda **400 μ M CDDP+100 μ M RZG** kombinasyon uygulanmasında yüksek oranda apoptoz görüldü.

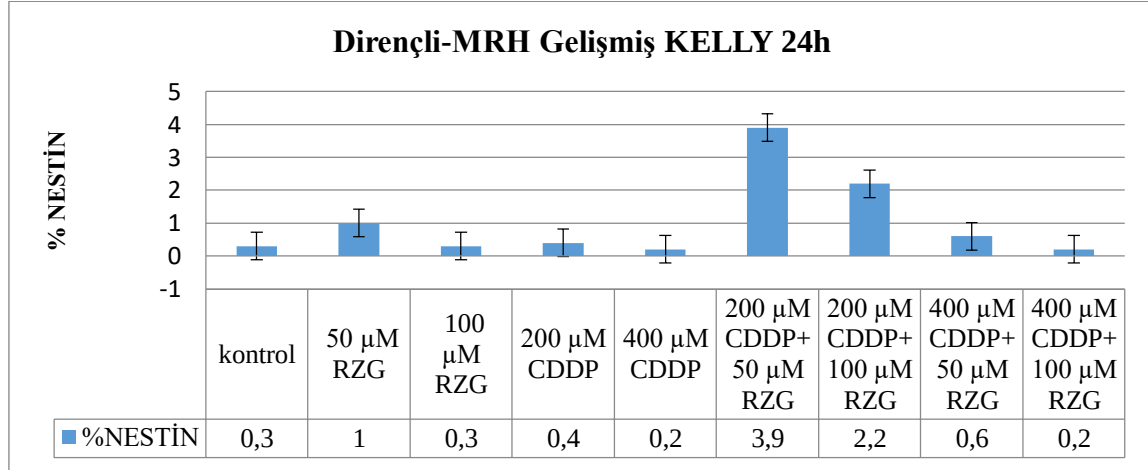


Şekil 41. Dirençsiz SH-SY5Y hücresinin hücre siklus ölçümü.

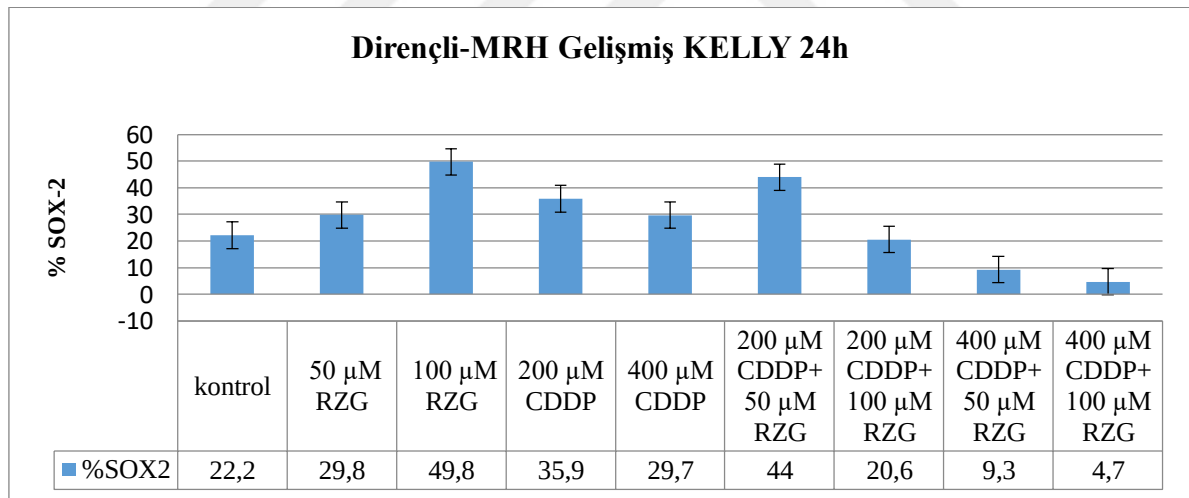
Dirençsiz SH-SY5Y hücresinde kontrol grubuna göre RGZ 100 µM, CDDP 400 µM ve CDDP+RGZ kombinasyon uygulamaları G0- G1, ve G2 evrelerinde bulunan hücre sayısı istatistiksel anlamlı olarak azalmıştır (*p < 0,05). SubG1evresindeki hücre sayısı Kontrol grubuna göre RGZ 100 µM, CDDP 400 µM ve CDDP+RGZ kombinasyon uygulamaları istatistiksel anlamlı olarak artmıştır (*p < 0,05).

4.9 Nöronal kök hücre diferansiasyon belirteçlerinin flowsitometrik analiz bulguları

4.9.1 Dirençli-MRH gelişmiş KELLY kök hücre diferansiasyon bulguları



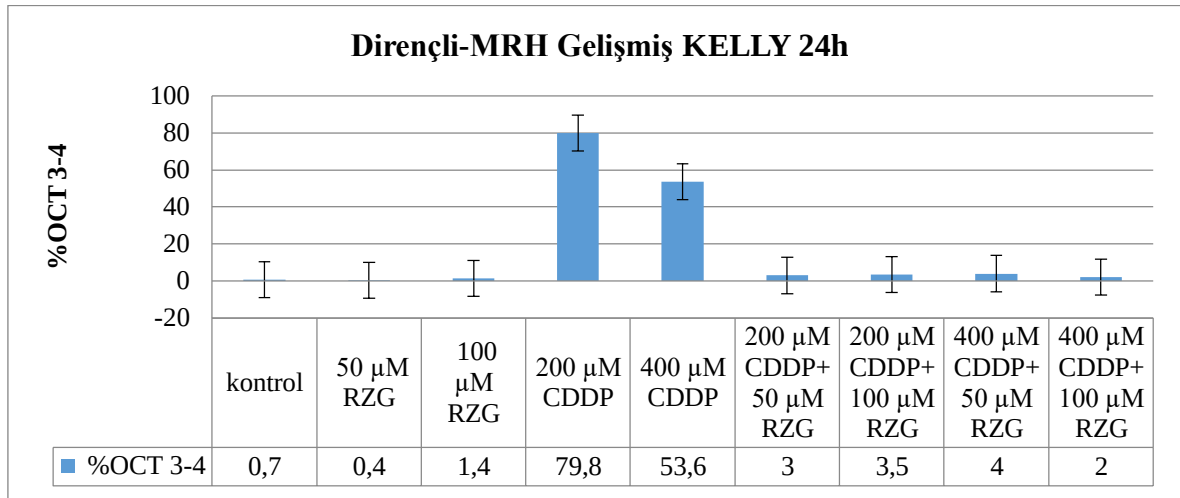
Şekil 42. Dirençli-MRH gelişmiş KELLY hücresi nestin flowsitometrik analizi



Şekil 43. Dirençli-MRH gelişmiş KELLY hücresi Sox2 flowsitometrik analizi

Kontrol grubuna göre RZG 100 µM, CDDP 400 µM uygulamalarında Sox2 ekspresyonu istatistiksel anlamlı olarak artarken (*p < 0,05), CDDP+RZG kombinasyon uygulamasında Sox2 ekspresyonu istatistiksel anlamlı olarak azalmıştır (*p < 0,05).

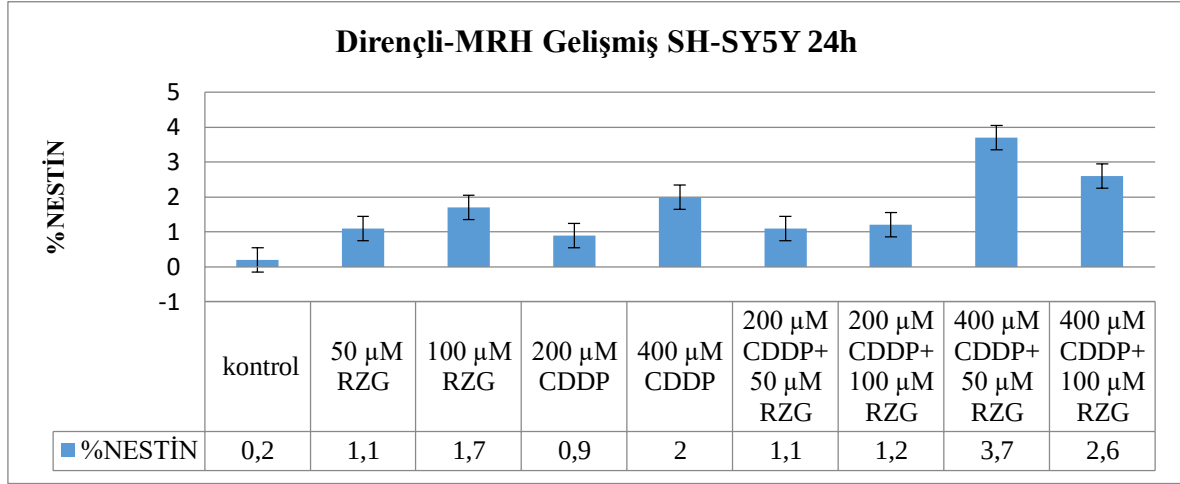
Dirençli-MRH gelişmiş KELLY hücresinin CDDP+RZG kombinasyonu MRH modelinde nöronal kök hücre diferansiasyon belirteçlerinden nestin ve Sox2 ekspresyonlarını azaltarak etki gösterdi.



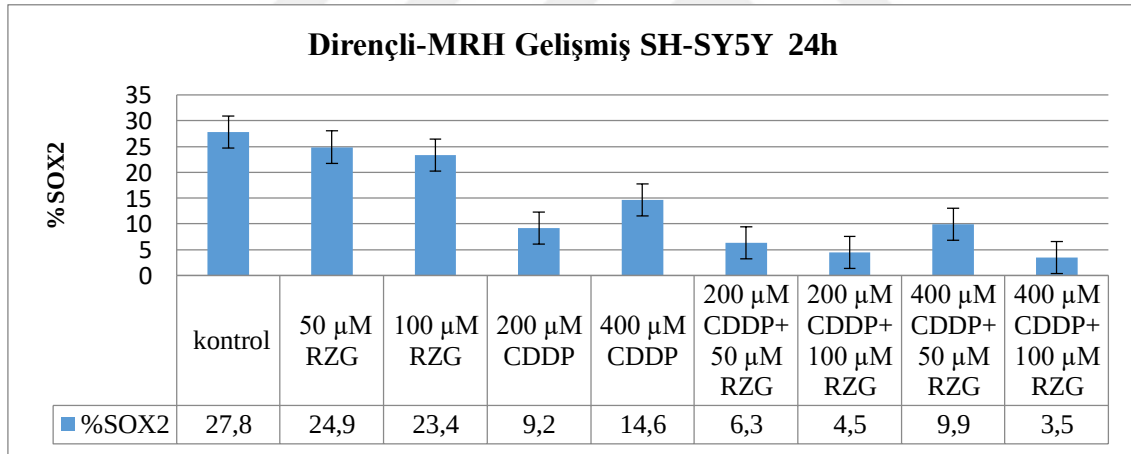
Şekil 44. Dirençli-MRH gelişmiş KELLY hücresi OCT 3-4 flowsitometrik analizi

Kontrol grubuna göre RGZ 100 µM, CDDP 400 µM ve CDDP+RZG kombinasyon uygulamalarında OCT 3-4 ekspresyonu istatistiksel anlamlı olarak artmıştır (*p < 0,05).

4.9.2 Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y kök hücre diferansiasyon bulguları

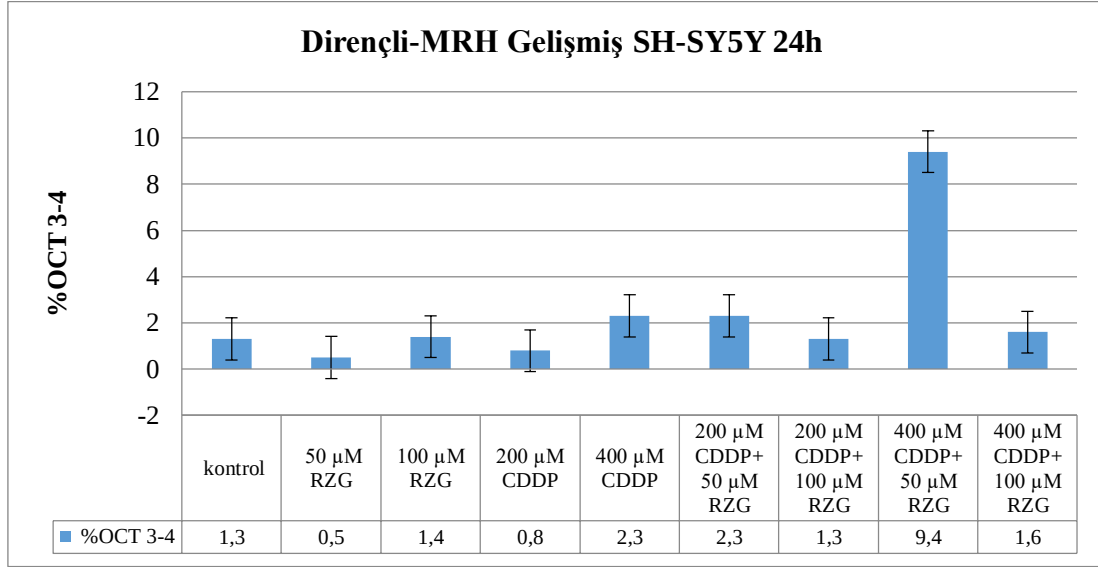


Şekil 45 Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y hücresi nestin flowsitometrik analizi



Şekil 46. Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y hücresi Sox2 flowsitometrik analizi

Kontrol grubuna göre RGZ 100 µM, CDDP 400 µM ve CDDP+RGZ kombinasyon uygulamaları Sox2 ekspresyonu istatistiksel anlamlı olarak azalmıştır (* $p < 0,05$). RGZ 100 µM ile CDDP 400 µM ve RGZ 100 µM ile CDDP+RGZ kombinasyon arasında ayrıca CDDP 400 µM ile CDDP+RGZ kombinasyon arasında Sox2 ekspresyonu istatistiksel anlamlı olarak azalmıştır (* $p < 0,05$).



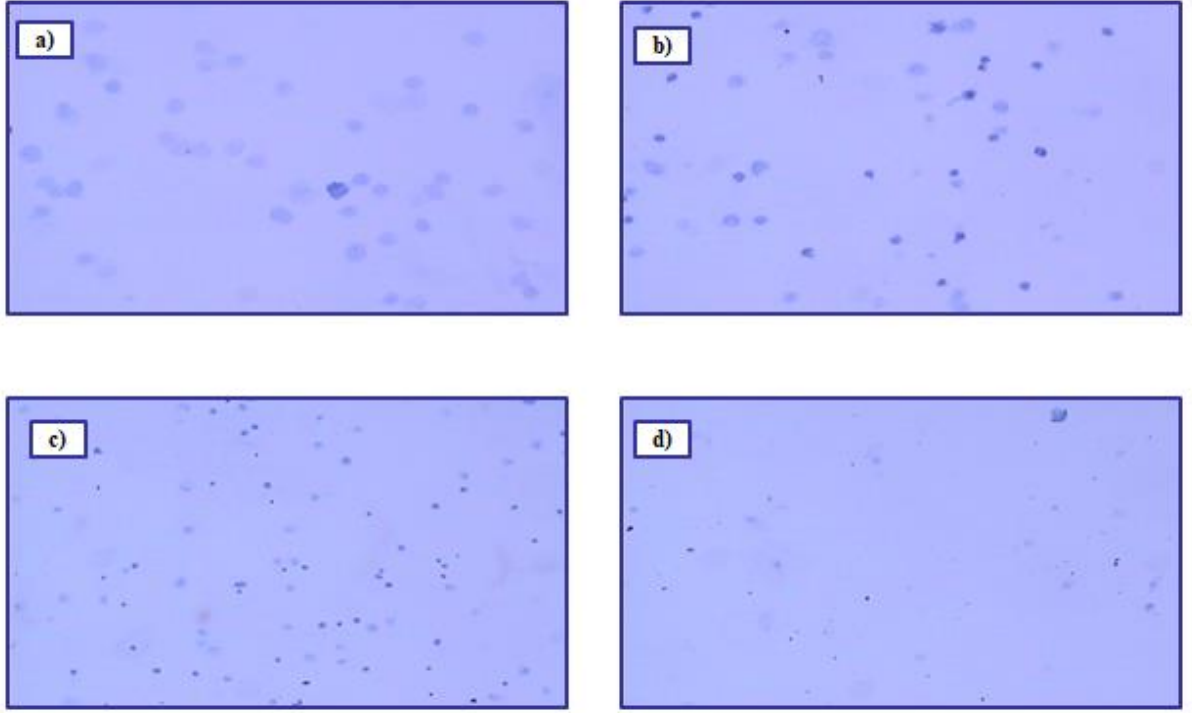
Şekil 47. Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y hücresi OCT3-4 flowsitometrik analizi

Kontrol grubuna göre CDDP 400 µM ve CDDP+RZG kombinasyon uygulamalarında OCT 3-4 ekspresyonu istatistiksel anlamlı olarak arttırmıştır (*p < 0,05). RZG 100 µM ile CDDP 400 µM arasında istatistiksel anlamlı olarak artarken (*p < 0,05), RZG 100 µM ile CDDP+RZG kombinasyon arasında istatistiksel olarak bir değişim gözlenmemiştir (*p > 0,05).

4.10 CD133 belirtecinin bulguları

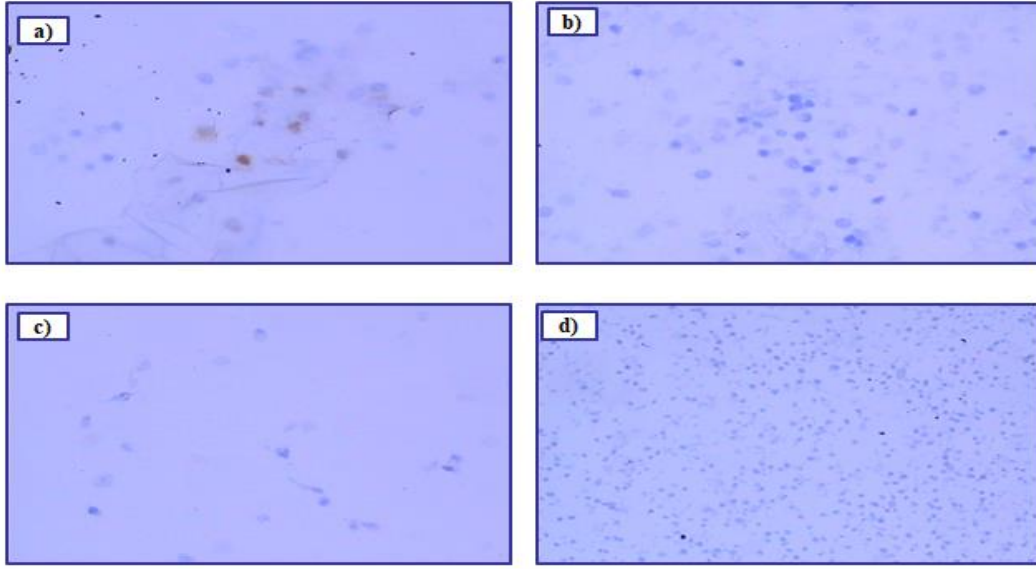
Dirençsiz SH-SY5Y kontrolde %1 oranında CD133 + kanser kök hücre görülürken CDDP **direnci** sonrası boyanan hücrelerin %12 sinde CD133 + hücre gördük. Bu bulgu SH-SY5Y’de CDDP direncinde CD133 + kanser kök hücrelerinin de rolü olduğunu göstermektedir. Tüm doz uygulamalarında RZG, CDDP ve CDDP+RZG kombinasyonlarında CD133 + hücrelerinin kaybolması kanser kök hücrelerine bu iki ajanın da etki ettiğini göstermektedir. Dirençsiz KELLY kontrolde %3 oranında CD133 + kanser kök hücre tespit ettik. Bu oran 400 μ M CDDP’de % 0’a inmektedir.

Dirençli-MRH gelişmiş hücrelerin hiç birinde CD133 pozitifliği gözlenmedi.



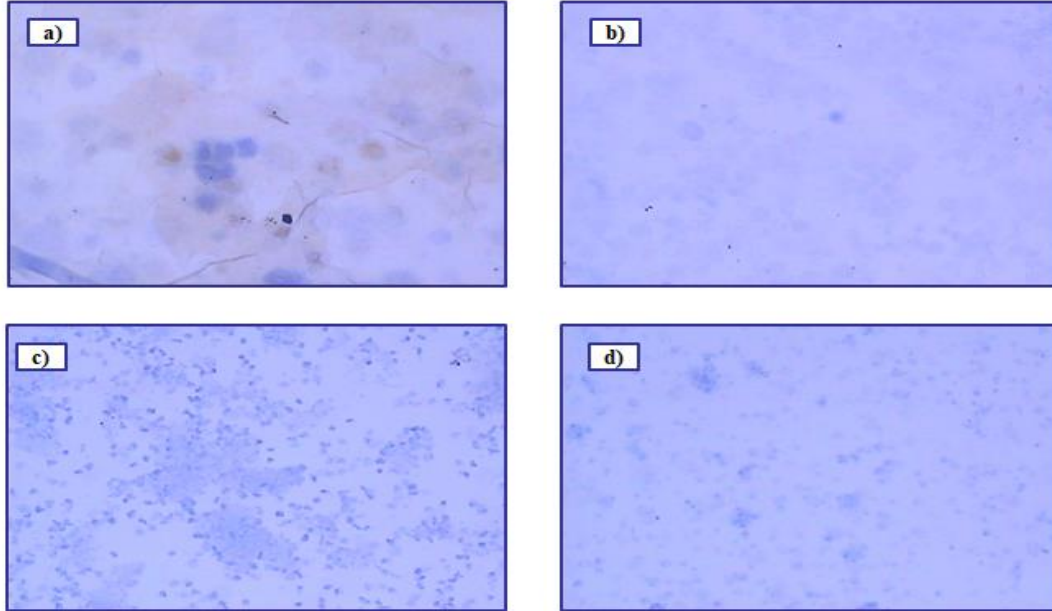
Şekil 48. Dirençsiz **SH-SY5Y** hücre CD133 immünohistokimyasal analizi

Dirençsiz **SH-SY5Y** hücrelerinde; **a)** Kontrol grubu **b)** 100 μ M RZG doz uyguladığımız grup **c)** 400 μ M CDDP doz uyguladığımız grup **d)** 400 μ M CDDP+100 μ M RZG doz uyguladığımız grup



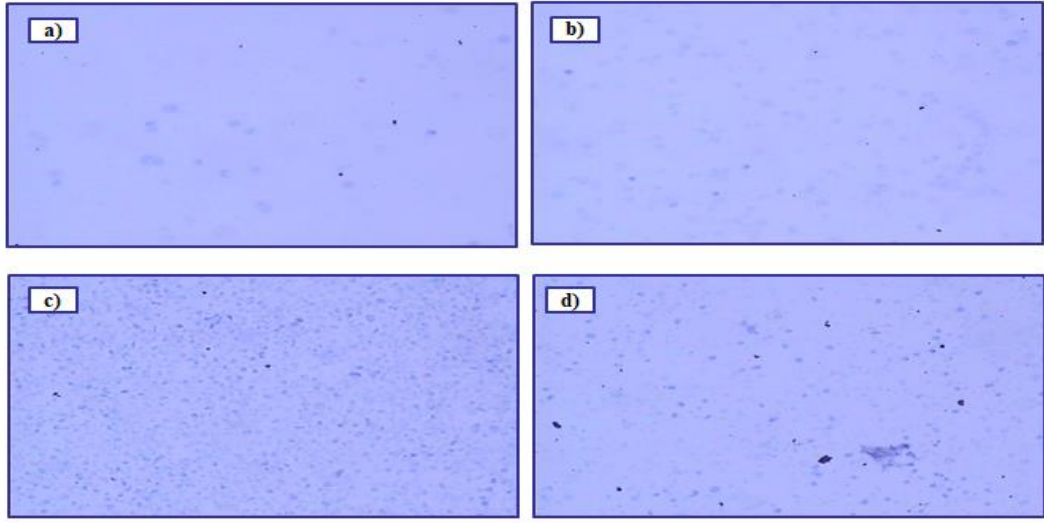
Şekil 49. Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y CD133 immünohistokimyasal analizi

Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y hücrelerinde ; **a)** Kontrol grubu **b)** **100 µM RZG** doz uyguladığımız grup **c)** **400 µM CDDP** doz uyguladığımız grup **d)** **400 µM CDDP+100 µM RZG** doz uyguladığımız grup



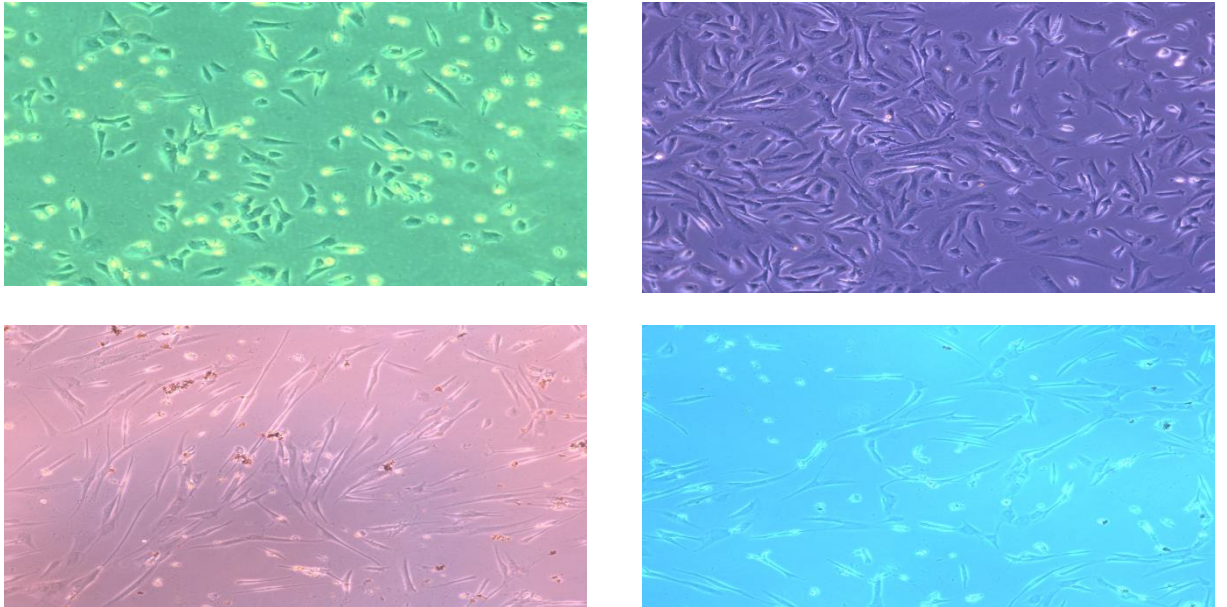
Şekil 50. Dirençsiz **KELLY** hücre CD133 immünohistokimyasal analizi

Dirençsiz **KELLY** hücrelerinde; **a)** Kontrol grubu **b)** **100 µM RZG** doz uyguladığımız grup **c)** **400 µM CDDP** doz uyguladığımız grup **d)** **400 µM CDDP+100 µM RZG** doz uyguladığımız grup

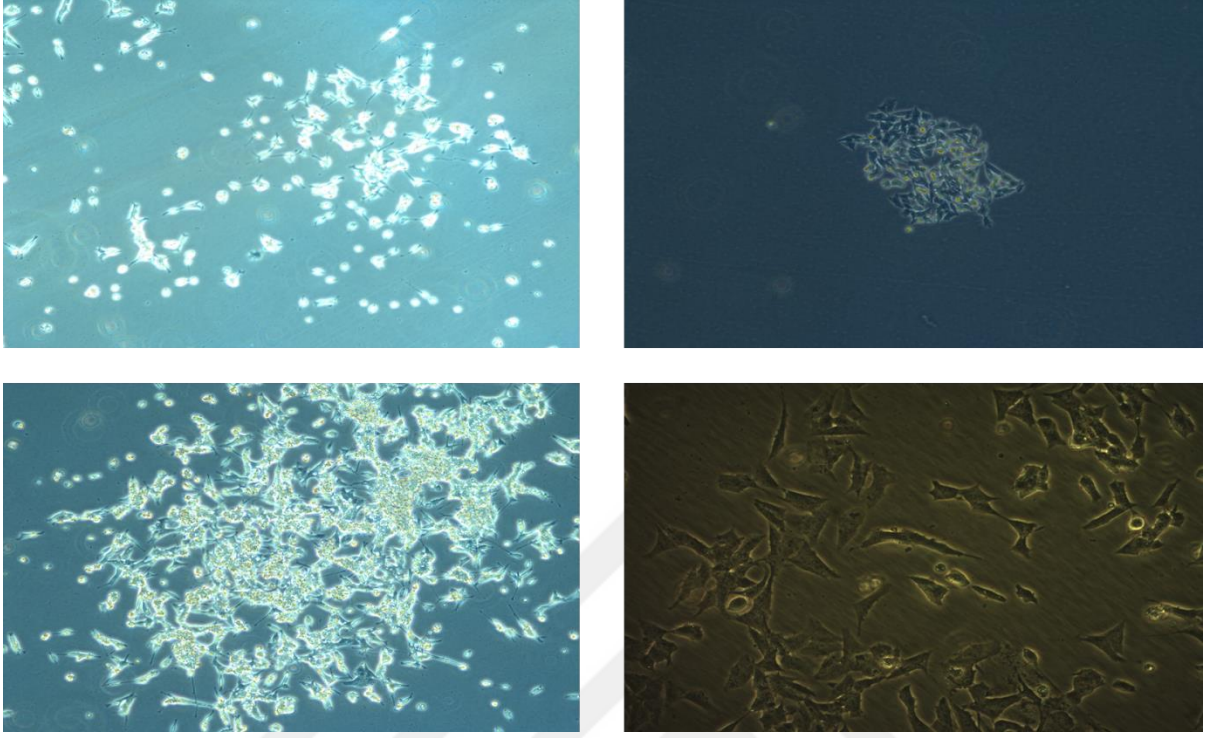


Şekil 51. Dirençli-MRH gelişmiş KELLY hücre CD133 immünohistokimyasal analizi

Dirençli-MRH gelişmiş KELLY hücrelerinde; **a)** Kontrol grubu **b)** 100 µM RZG doz uyguladığımız grup **c)** 400 µM CDDP doz uyguladığımız grup **d)** 400 µM CDDP+100 µM RZG doz uyguladığımız grup

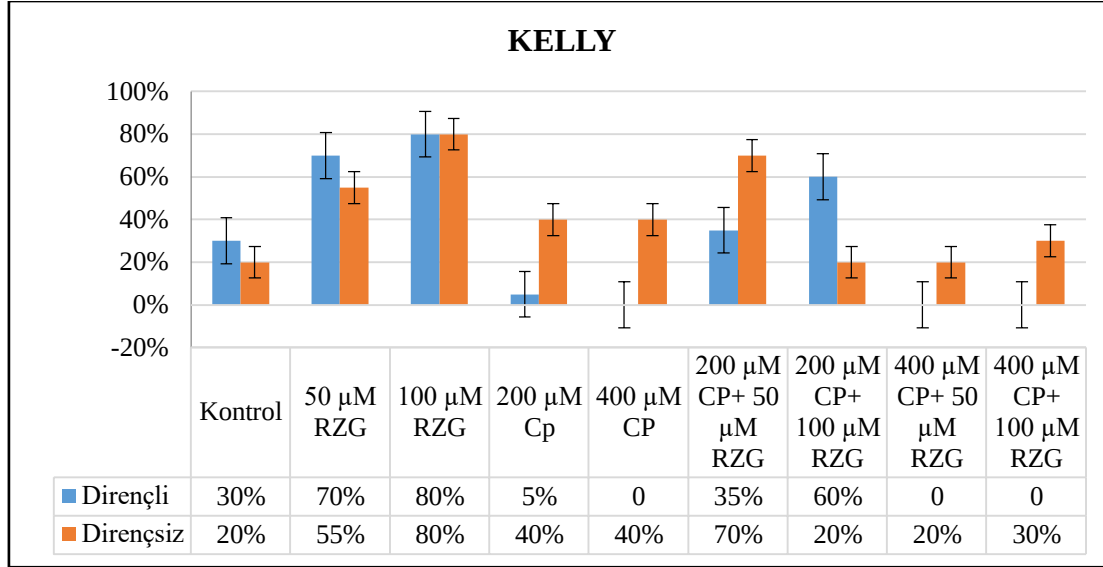


Şekil 52. SH-SY5Y hücrelerinin nöron benzeri hücrelere farklılaşması



Şekil 53. KELLY hücrelerinin nöron benzeri hücrelere farklılaşması

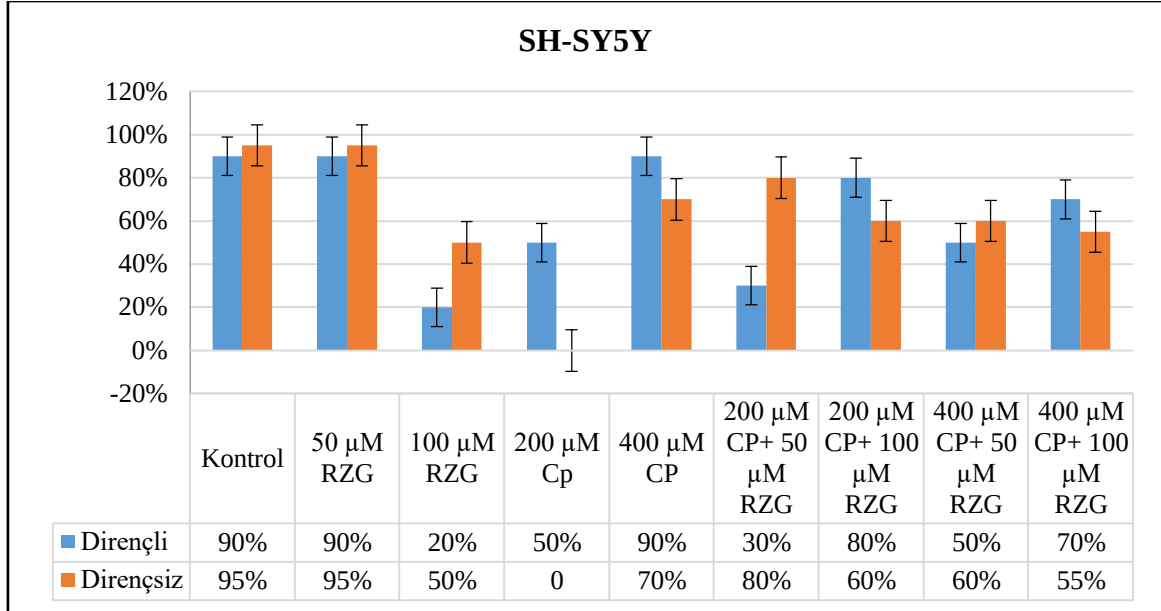
4.11 S-100 belirtecinin bulguları



Şekil 54. Dirençli-MRH gelişmiş ve Dirençsiz KELLY hücrelerinin S-100 grafiği

Dirençli-MRH gelişmiş KELLY hücrelerinde Kontrol grubuna göre RGZ 100 μ M uygulamasında S-100 ekspresyonu istatistiksel anlamlı olarak artarken (* $p < 0,05$), CDDP 400 μ M ve CDDP+RZG kombinasyon uygulamalarında S-100 ekspresyonu istatistiksel anlamlı olarak azalmıştır (* $p < 0,05$). CDDP 400 μ M ile CDDP+RZG kombinasyon arasında istatistiksel olarak bir değişim gözlenmemiştir (* $p > 0,05$). Dirençsiz KELLY hücrelerinde Kontrol grubuna göre RGZ 100 μ M ,CDDP 400 μ M ve CDDP+RZG kombinasyon uygulamalarında S-100 ekspresyonu istatistiksel anlamlı olarak artmıştır (* $p < 0,05$).

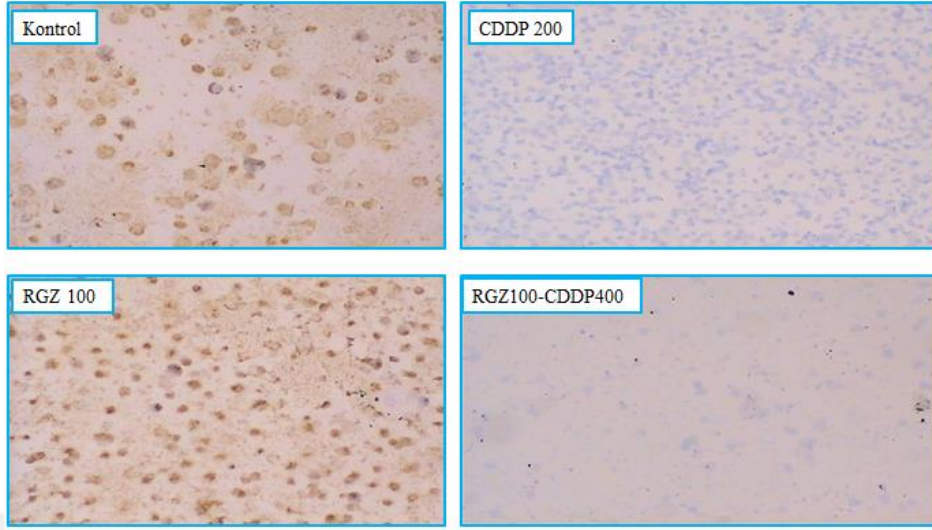
MRH modeli oluşturulan **Dirençli-MRH gelişmiş KELLY** hücrelerinde tek başına RGZ uygulaması dirençsiz hücrelerle benzer S-100 ekspresyonu gösterdi. (Dirençli-MRH gelişmiş%80 ve Dirençsiz %80) **Dirençsiz KELLY** hücrelerinde CDDP uygulaması ile KELLY hücrelerinde dirençsiz grupta sağ kalan hücre miktarı daha fazla olduğu için farklılaşmanın da biraz daha fazla olduğu görülmektedir. **CDDP+RZG** kombine uygulamada ise CDDP uygulamasına göre belirgin diferansiasyon farkı (CDDP ile %40, CDDP+RZG ile %30) saptamadık.



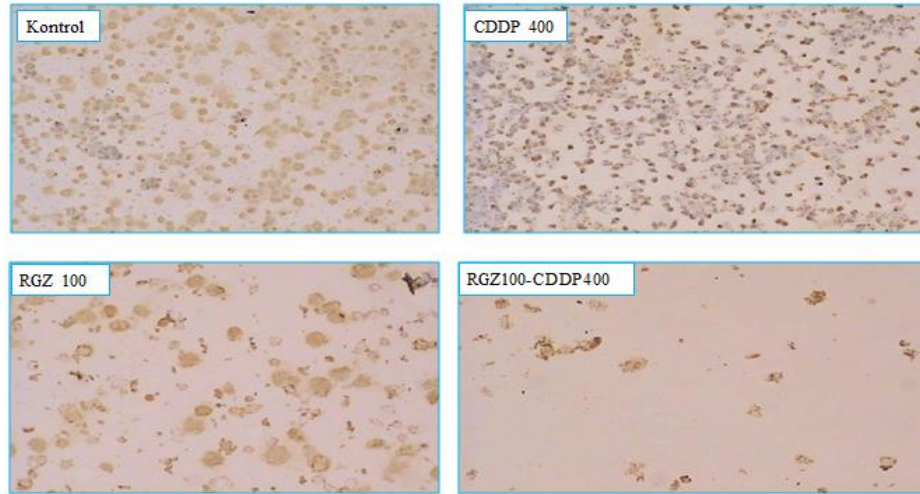
Şekil 55. Dirençli-MRH gelişmiş ve Dirençsiz SH-SY5Y hücrelerinin S-100 grafiği

Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y hücrelerinde, Kontrol grubuna göre RGZ100 µM ve CDDP+RZG kombinasyon uygulaması S-100 ekspresyonunu istatistiksel anlamli olarak azaltmıştır (*p < 0,05). Kontrol grubu ile CDDP 400 µM arasında istatistiksel olarak bir değişim gözlenmemiştir (*p > 0,05). Dirençsiz SH-SY5Y hücrelerinde Kontrol grubuna göre RGZ100 µM, CDDP 400 µM ve CDDP+RZG kombinasyon uygulamaları S-100 ekspresyonu istatistiksel anlamli olarak azalmıştır (*p < 0,05).

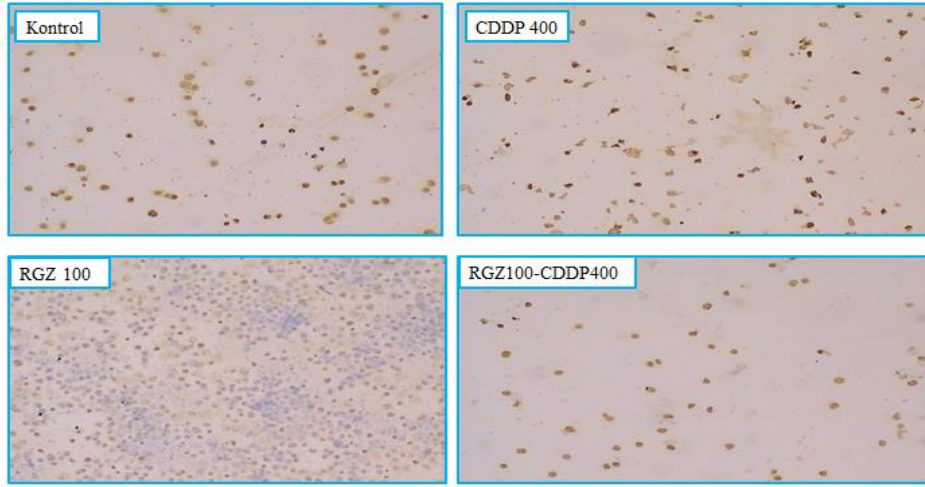
MRH modeli oluşturulan **Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y** ve **Dirençsiz SH-SY5Y** hücrelerinde tek başına RGZ uygulaması daha az oranda diferansiye gösterdi. **Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y** hücrelerinde CDDP uygulaması ile sağ kalan hücrelerde kontrol hücreleri ile benzer oranda diferansiye gösterdi. Kombine CDDP+RZG uygulaması ile kalan hücrelerin tek başına CDDP verilenden daha az diferansiye olduğunu saptadık.



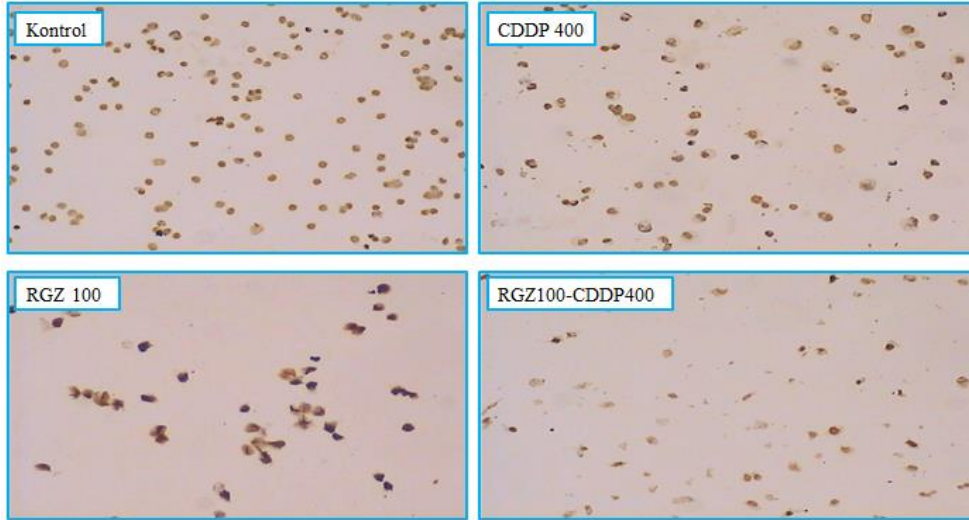
Şekil 56. Dirençli-MRH gelişmiş KELLY hücrelerinde S-100 uygulaması.



Şekil 57. Dirençsiz KELLY hücrelerinde S-100 uygulaması.



Şekil 58. Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y hücrelerinde S-100 uygulaması.



Şekil 59. Dirençsiz SH-SY5Y hücrelerinde S-100 uygulaması.

5. TARTIŞMA

Nöroblastom, küçük çocuklarda prevalansı yüksek olan en sık görülen ekstrakranial solid tümör türüdür. Bir yaş üstü çocuklarda nöroblastomlar hızlı ve kontrolsüz büyür. Kan dolaşımı veya lenfatik sistem üzerinden bütün vücuda dağılarak özellikle kemik iliği ve kemikler içinde, ciltte ve uzaktaki lenf düğümlerinde, karaciğerde metastaz oluştururlar. Bu yüzden, tanıda hastaların büyük bir kısmında evre IV metastatik görülür. Laboratuvar testleri tanının konulmasında çok önemlidir. Hastaların çoğunun kanında veya idrarında tümör belirteçlerine yüksek değerlerde rastlanır. Metastatik NB'li hastaların kan ve kemik iliğinde NB minimal rezidüel hastalık tespiti için PHOX2B gen ekspresyon ölçümü kullanılmaktadır (40).

Peroksizom proliferatör aktive edici reseptör, nükleer reseptör süper ailesinin bir üyesidir. Lipogenez, glikoz metabolizması, insülin duyarlılığı, mitokondriyal biyogenez, anti inflamatuvar ve nöroproteksiyon dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçler sırasında gen ekspresyonunu düzenleyen anahtar transkripsiyon faktörü olarak görev yapar(35). RGZ, PPRg reseptör agositi bir ajan olup, literatürde nöroblastom ve rosiglitazone ile ilgili 2015 yılında gerçekleşen bir çalışmada rosiglitazonun nöroproteksiyonuna aracılık eden çok önemli bir transkripsiyon faktörü olduğu gösterilmiştir (35).

Bu çalışmada; nöroblastomda hücre proliferasyonu ve farklılaşmasını düzenleyen maddelerden biri olan peroksizom proliferatörü aktive edici reseptör agonisti, antidiyabetik, rosiglitazon'un minimal rezidüel hastalık modelinde nöronal kök hücre farklılaşması üzerinde etkili olup olmadığının sisplatin ile karşılaştırmalı olarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla; *in-vitro* minimal rezideül hastalık modelinin hücre kültüründe sisplatin LD₉₀ dozunun tekrarlı uygulamaları ile geriye sisplatin etkisine dayanıklı hücrelerin kalması ve insan vücudunda tedaviden kaçan hücrelerin çoğalması şeklinde MRH model oluşumu gerçekleştirildi. MRH modeli konfirmasyonu yine tekrarlayan sisplatin dozları uygulanmış SH-SY5Y ve KELLY nöroblastom hücrelerinde PHOX2B mRNA ekspresyonun artışı ile yapıldı. MRH modeli oluşturulan nöroblastom hücrelerinde CDDP ve RZG hücre canlılığı, apoptoz, nöronal kök hücre farklılaşması ile ilişkili S-100, Oct-3, Nestin, Sox2 ve CD133 protein ekspresyonları aracılığı ile farklılaşma üzerine etkisi değerlendirildi.

CDDP, RGZ ve kombinasyonları KELLY ve SH-SY5Y her iki nöroblastom hücre hattında hücre canlılıklarını azaltmış ve hücreleri apoptoza sürüklemiştir. Bizim çalışmamızın bu sonuçları ile uyumlu olarak Jia-Jun Liu ve ark.larının yapmış olduğu çalışmada Rosiglitazon'un 72 saat uygulamasında HL-60 lenfoma hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği ve büyük ölçüde apoptoza sürüklediği saptanmıştır (33).

Hücre siklusu sonuçlarımız ajanlara bağlı apoptoz sonuçlarımız ile desteklenerek benzer özellikler ortaya çıkarmıştır. Apoptoz deneylerimizde, rosiglitazon ve sisplatin uygulanmış hücrelerde sisplatin dozu arttıkça apoptotik hücre ölümü orantılı olarak artış gerçekleşti. Tek başına RGZ, CDDP kullanımı ve CDDP RZG kombinasyonunda da canlılık oranında azalma, apoptoz oranında artış görüldü. Hücre siklusunda apoptotik hücreler G0-G1 evresindeki hücelere göre daha az PI bağlayıp subdiploid floresan yoğunluğu gösterir. Sub G1 piki apoptotik hücreleri gösterdiğinden hücrelerin büyük kısmı Sub G1 evresinde tutuklu kaldı. Tüm hücre hatlarında doza bağımlı olarak apoptoz arttığından her grupta en fazla hücre Sub G1 evresinde görüldü. Diğer evrelerde doza bağımlı olarak daha az hücre tespit edildi.

Yine H. Zhao ve ark. da kullanmış oldukları RZG dozları ve kombinasyonlarının K562- kronik myloid lösemi hücre çoğalmasını inhibe ettiğini göstermişlerdir (34). Başka bir çalışmada rosiglitazon'un, nöronlar ve glial hücreler dahil bir dizi hücre tipinde doz ve zamana bağlı bir şekilde hücre çoğalmasını inhibe ederken, hücre göçünü engelleyen tümör baskılayıcı gen olan PTEN ekspresyonunu arttırdığını göstermişlerdir (32). Bizim çalışmamızda ise; PPAR γ eksprese eden SH-SY5Y nöroblastom hücrelerinde PHOX2B gen ekspresyonu indüklenmiştir. PHOX2B, nöral krest hücrelerinde farklılaşmayı ve gelişimi destekleyen bir transkripsiyon faktörüdür (23,36,37). PHOX2B aşırı ekspresyonu nöroblastomda prognostik bir belirteç olup ayrıca klinisyenler tarafından minimal rezidüel hastalığı izlemek için kullanılır (37). Nöronal farklılaşmanın PHOX2B ekspresyonunun aşağı yönde ekspresyonuna bağlı olduğu bildirilmektedir. Yine Stutterheim ve ark.ları PHOX2B'nin NB tümörlerinde yüksek oranda ekspresyonu olduğunu deneysel olarak doğrulamışlardır (23).

Çalışmamızda dirençli-MRH gelişmiş ve dirençsiz SH-SY5Y nöroblastom hücreleri karşılaştırıldığında CDDP ile dirençsiz hücrelerde aşırı PHOX2B ekspresyonu saptanırken, dirençli-MRH hücrelerde değişmediği saptandı. RGZ uygulaması ile dirençsiz ve Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y hücrelerde PHOX2B ekspresyonunda 2 kat azalma belirlendi.

RGZ+CDDP kombinasyonunda dirençsiz hücrelerde doz bağımlı artış var iken, Dirençli-MRH gelişmiş hücrelerde belirgin düzeyde ekspresyon artışı gözlenmemekle birlikte, RGZ'nin 100 µM dozuna bağlı olarak dirençsiz hücreye göre ekspresyonda azalma saptandı. Bu anlamda RGZ'nin Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y hücrelerde PHOX2B aracılığı ile minimal rezidüel hastalığı azaltmış ve düzenlemiştir.

Dirençli-MRH gelişmiş ve dirençsiz KELLY hücre hatlarında ise; 200 µM CDDP ile dirençsiz hücrelerde PHOX2B ekspresyon artışı saptanırken, Dirençli-MRH gelişmiş hücrelerde bu ekspresyon daha da artış göstermiştir. Bunun yanında 400µM CDDP ile dirençsiz hücrelerde PHOX2B ekspresyonu artış gösterirken Dirençli-MRH gelişmiş hücrelerde bu ekspresyonda azalma saptanmıştır.

Bunun yanında PHOX2B ekspresyonunda dirençsiz KELLY hücre hatlarında ise RGZ ile 9 kat azalma, Dirençli-MRH gelişmiş KELLY 100µM RZG ile artışı saptandı. RGZ-CDDP kombinasyonunda dirençsiz hücrelerdeki indüksiyon Dirençli-MRH gelişmiş hücrelerde doz bağımlı ekspresyon artışına yol açmıştır. PHOX2B ekspresyon artışı özellikle tek başına CDDP ve CDDP+RZG kombinasyonlarındaki artış nöroblastom hücrelerinde minimal Rezidüel hastalık modeli gelişiminin literatür ile uyumlu olduğunu göstermektedir (37). Nöroblastomdaki nöronal farklılaşmanın, PHOX2B ekspresyonunun nöroblastomda bir hedef olarak kabul edilebileceğini doğrulayan PHOX2B ekspresyonunun aşağı regülasyonuna bağlı olduğu önerilmektedir (37). İnsan nöroblastom hücre hatlarından IMR32 hücrelerinde PHOX2B'nin aşırı ekspresyonunun proliferasyonu baskıladığı ve nöronal farklılaşmayı arttırdığı gösterilmiştir.

Oct3-4 embriyogenez ve farklılaşmanın erken aşamalarını belirlemede önemli rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür (42). Oct3-4 farklılaşmamış hücrelerde eksprese edilir, hücreler farklılaşmaya başlayınca kaybolur ve yetişkin dokularında eksprese edilmez(42). Nöronal diferansiasyon belirteçlerimizden OCT 3-4 Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y hücrelerinde RGZ ile belirgin bir ekspresyon artışı gözlenmezken, CDDP ve CDDP+RZG kombinasyonlarında OCT 3-4 ekspresyon artışı gözlenmektedir. Dirençli-MRH gelişmiş KELLY hücrelerinde RZG, ve CDDP+RZG kombinasyonlarında 2 kat OCT 3-4 ekspresyon artışı görülmüştür. CDDP uygulamasında ise aşırı OCT 3-4 ekspresyon artışı gözlenmektedir. Bu anlamda nöronal embriyonik OCT-3'ün hem SH-SY5Y hem de KELLY N-Myc pozitif

hücrelerde MRH modeli-Dirençli-MRH gelişmişnöroblastom gelişmesinde etkili olduğu söylenebilir.

KELLY hücrelerinde ne RGZ ne de CDDP diferansiasyon açısından etkili olmazken, SH-SY5Y hücrelerinde kısmi etki gösterdiği etkili olduğu söylenebilir.

Sox2 nöral ve meme kök hücrelerde, karaciğer, pankreas ve midede kök popülasyonlarında eksprese edilir (42). Sox2 aşırı ekspresyonu, tümör oluşumunu artırır ve nöroblastomda farklılaşmasını inhibe eder. MRH gelişmiş-Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y hücrelerinde RGZ, CDDP ve CDDP+RZG kombinasyonları ile Sox2 ekspresyonunun azaldığı gözlenmektedir. Dirençli-MRH gelişmiş KELLY hücrelerinde RGZ ve CDDP ile ekspresyon artışı gözlenirken, CDDP+RZG kombinasyonlarında Sox2 ekspresyonunun azaldığı gözlenmektedir. Hem MRH gelişmiş-Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y hem de KELLY nöroblastom hücrelerinde özellikle RGZ-CDDP kombinasyonunun Sox2 ekspresyonunu azaltarak nöroblastom tedavisinde etkili olduğu söylenebilir.

İlaç direnci ve metastatik yayılım, kanseri ortadan kaldırmayı zorlaştıran tümörlerin iki temel özelliğidir. Tümörler, heterojen hücre alt popülasyonlarından oluşur ve bu alt kümeler, çeşitli terapötik maddelere farklı tepki verir (42). Kanser kök hücreleri pluripotenttir. Sitotoksik tedavilere dirençlidir ve tümör oluşumunu tetikler (42). Kanser alanında yapılan son çalışmalar kanser kök hücreleri olarak adlandırılan azınlık hücrelerin kanserin değişik safhalarında kanseri düzenlediği ve hiyerarşik bir organizasyonla karakterize olduğunu göstermiştir. Kanser kök hücreleri, tümör hücrelerinin <1% ini oluşturur ve kendini yenileyebilme özelliğine sahiptir, böylece bir tümörün heterojen soy hücrelerini oluşturur (41). CD133, transmembran bir hücre yüzeyi glikoproteinidir. NB hücrelerinde CD133'ün yıkılması, hücre büyümesini etkili bir şekilde geciktirir. Zhi-Yong Zhong ve ark.ları yapmış oldukları çalışmada hem NB tümör dokusunda CD133 pozitif kanser kök hücrelerinin varlığını hem de bu hücrelerin nöron benzeri hücrelere farklılaştığını ve CD133 pozitif hastaların, CD133 negatif hastalarından kemoterapiye anlamlı olarak daha zayıf cevap verdiğini göstermişlerdir (41). Bizim çalışmamızda MRH-direnç oluşturulan SH-SY5Y hücre gruplarında CDDP direncindeki CD133 pozitif hücre sayılarının CDDP direnci olmayan hücrelere göre artması CDDP direncinde CD133 pozitif kanser kök hücrelerinin de rolü olduğunu göstermektedir. RZG ve CDDP kombinasyonlarının uygulanması ile CD133 pozitif

hücrelerinin azalması, SH-SY5Y kanser kök hücrelerinin üzerine bu iki ajanın da etkili olduğuna işaret etmektedir.

KELLY hücrelerinde ise; CDDP direnci-MRH oluşturulan hücrelerde CD133 hücre oranlarında bir değişiklik görülmemesi, KELLY hücreleri CDDP direncinde CD133'un rölü olmadığını düşündürmektedir. Dirençsiz hücrelerde ise CDDP uygulanması ile CD133 pozitif hücre oranının azalması, CDDP'nin KELLY hücrelerinin kanser kök hücre oranını doz bağımlı olarak azalttığı izlenimini vermektedir. N-MYC negatif ve pozitif NB hücrelerinde CDDP direnci oluşu ile farklı CD133 hücre oranlarının ortaya çıkması NB heterojen tümör yapısını ve bu heterojenitenin kök hücre profiliyle de karşımıza çıktığını desteklemektedir. Bunun yanında RZG ve CDDP'nin farklılaşma ve sitotoksik etki ile NB kanser kök hücre oranlarını düşürmektedir bu da tedavide CDDP nin halen en uygun ajan olduğunu, RZG nin de farklılaşma için uygun adaylardan biri olarak değerlendirilebileceğini olduğunu ortaya koymaktadır.

CDDP ve RGZ birlikte dimetilbenzantrazen indüklü meme kanser modelinde sisplatinin etkisini sinerjize ederken renal hasarı düzelttiği gösterilmiştir (Tikoo K, 2009). Bizim çalışmamızda hücelere CDDP+RZG kombinasyonu uygulandığında canlılık oranında azalma, apoptoz oranında artış görülmüştü. Dirençli-MRH gelişmiş gruplara CDDP uygulandıktan sonra sağ kalan hücrelerin sayısı oldukça az ve bunlarda da farklılaşma oranı oldukça düşüktü. Farklılaşmış hücreler CDDP'nin ve CDDP+RZG kombinasyonun ile farklılaşma yönünde ayırıcı bir özellikten çok hücelere genel olarak öldürücü olduğu yönünde olduğunu desteklemektedir. SK-N-SH hücreleri kullanılarak ksenograft metastatik NB modeli yapılan bir çalışmada RGZ ile hafif antitümoral etki saptanması bizim sonuçlarımızla uyumludur (Krieger-Hinck, Nina, 2009).

Dirençsiz SH-SY5Y hücrelerinde, dirençsiz KELLY hücrelerine göre daha fazla farklılaşma görülmesinin sebebi; SH-SY5Y hücreleri N-MYC negatif daha iyi huylu ve daha fazla farklılaşmış bir NB dokusundan köken almış olmasından kaynaklanması olasıdır. Dirençli-MRH gelişmiş ve dirençsiz SH-SY5Y ve KELLY hücreleri arasında çok büyük bir fark olmaması bize ilaç direncinin sonucunda farklılaşmada büyük bir değişiklik olmadığına işaret etmektedir.

Bu çalışma sonucunda; MRH gelişmiş Dirençli-MRH gelişmiş SH-SY5Y hücrelerinde CD133+ hücre sayılarının dirençsizlere göre artması CDDP direnci ve MRH modelinde CD133+ kanser kök hücrelerinin de rolü olduğunu göstermiştir.

N-MYC(-) ve (+) NB hücrelerinde farklı CD133 hücre oranlarının ortaya çıkması nöroblastomun heterojen tümör olduğunu ve bu heterojenitenin kök hücre profiliyle de karşımıza çıktığını desteklemiştir. RGZ, nöroblastom ana tedavi ajanı CDDP ile birlikte nöroblastomun MRH modelinde PPRgama reseptörü eksprese eden tümörlerde farklılaşma yönünden tedaviyi destekleyecek bir ajan olarak *in-vivo* nöroblastom modellerinde değerlendirilmesi gerekmektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

NB, yenidoğanlarda spontan regresyondan hayati tehlike arz eden metastatik hastalığa kadar heterojen bir klinik seyir sergilediğinden; NB'li birçok hasta, kemoterapiye çok iyi bir yanıt verdikten sonra nüks yaşayabilir. Bu, NB tümör dokusunda kendi kendini yenileyebilen, çok noktalı kanser kök hücrelerin bulunduğunu ve bu hücrelerin kemorezistant olduğunu göstermektedir.

1. Bu çalışma ile; Nöroblastom hücre kültüründe tekrarlı CDDP uygulamaları ile MRH modeli oluşturuldu.
2. Nöroblastom MRH modelinde KELLY N-Myc pozitif hücrelerde CDDP, RGZ ve CDDP+RGZ kombinasyonları benzer düzeylerde hücre ölümüne neden oldu.
3. CDDP+RGZ kombinasyonu SH-SY5Y nöroblastom hücrelerinde MRH modelinde nöronal kök hücre diferansiasyon belirteçlerinden nestin ve Sox-2 ekspresyonlarını azaltarak etki gösterdi.

Rosiglatazon gibi PPR-agonisti antidiyabetik ajanların metastatik nöroblastom *in-vivo* modellerinde özellikle CDDP ile kombine kullanımda ki etkilerinin incelenmesi nöroblastom tedavisine yeni bir bakış açısı getirebilecektir.

7. KAYNAKLAR

- 1-Olgun N, Kansoy S, Aksoylar S, Cetingul N, Vergin C, Oniz H, Sarialioglu F, Kantar M, Uysal K, Tuncyurek M, Kargi A, Aktas S, Bayol U, Karaca I, Arikan A, Balik E, Aktug T, Elmas N, ovanlikaya A, Kinay M, Anacak Y, Degirmenci B, Burak Z. Experience of the Izmir Pediatric Oncology Group on Neuroblastoma: IPOG-NBL-92 Protocol. *Pediatr Hematol Oncol*. 2003 Apr-May;20(3):211-8.
- 2- Cheung IY, Lo Piccolo MS, Kushner BH, Cheung NK. Early molecular response of marrow disease to biologic therapy is highly prognostic in neuroblastoma. *J Clin Oncol*. 2003 Oct 15;21(20):3853-8.
- 3- Burchill SA, Kinsey SE, Picton S, Roberts P, Pinkerton CR, Selby P, Lewis IJ. Minimal residual disease at the time of peripheral blood stem cell harvest in patients with advanced neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol*. 2001 Jan;36(1):213-9.
- 4- Ootsuka S, Asami S, Sasaki T, Yoshida Y, Nemoto N, Shichino H, Chin M, Mugishima H, Suzuki T. Useful markers for detecting minimal residual disease in cases of neuroblastoma. *Biol Pharm Bull*. 2008 Jun;31(6):1071-4.
- 5- Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*. 1998 Jan 1;391(6662):82-6.
- 6- Ricote M, Huang J, Fajas L, Li A, Welch J, Najib J, Witztum JL, Auwerx J, Palinski W, Glass CK. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jun 23;95(13):7614-9.
- 7- Kersten S, Wahli W. Peroxisome proliferator activated receptor agonists. *EXS*. 2000;89:141-51. Review.
- 8- Grommes C, Landreth GE, Heneka MT. Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Lancet Oncol*. 2004 Jul;5(7):419-29.

- 9- Hisatake J, Ikezoe T, Carey M, Holden S, Tomoyasu S, Koeffler HP (2000). Downregulation of prostate-specific antigen expression by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human prostate cancer. *Cancer Res* 60: 5494–5498.
- 10- Mueller E, Smith M, Sarraf P, Kroll T, Aiyer A, Kaufman DS, Oh W, Demetri G, Figg WD, Zhou XP, Eng C, Spiegelman BM, Kantoff PW (2000) Effects of ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 10990– 10995.
- 11- Kulke MH, Demetri GH, Sharpless NE, Ryan DP, Shivdasani R, Clark JS, Spiegelman BM, Kim H, Mayer RJ, Fuchs CS (2002) A phase II study of troglitazone, an activator of the PPAR γ receptor, in patients with chemotherapy-resistant metastatic colorectal cancer. *Cancer J* 8: 395–399
- 12- Burstein HJ, Demetri GD, Mueller E, Sarraf P, Spiegelman BM, Winer. EP Use of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ ligand troglitazone as treatment for refractory breast cancer: a phase II study. *Breast Cancer Res Treat* (2003).79: 391–397.
- 13-Demetri GD, Fletcher CD, Mueller E, Sarraf P, Naujoks R, Campbell N, Spiegelman BM, Singer S (1999) Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor- γ ligand troglitazone in patients with liposarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 3951–3956.
- 14- Debrock G, Vanhentenrijk V, Sciot R, Debiec-Rychter M, Oyen R, Van Oosterom A. A phase II trial with rosiglitazone in liposarcoma patients. *Br J Cancer* 89:1409–1412.13 (2003)
- 15-Emmans VC, Rodway HA, Hunt AN, Lillycrop KA. Regulation of cellular processes by PPAR γ ligands in neuroblastoma cells is modulated by the level of retinoblastoma protein expression. *Biochem Soc Trans.* 2004 Nov;32(Pt 5):840-2.
- 16- Servidei T, Morosetti R, Ferlini C, Cusano G, Scambia G, Mastrangelo R, Koeffler HP. The cellular response to PPAR γ ligands is related to the phenotype of neuroblastoma cell lines. *Oncol Res.* 2004;14(7-8):345-54.
- 17- Cellai I, Benvenuti S, Luciani P, Galli A, Ceni E, Simi L, Baglioni S, Muratori M, Ottanelli B, Serio M, Thiele CJ, Peri A. Antineoplastic effects of rosiglitazone and PPAR γ transactivation in neuroblastoma cells. *Br J Cancer.* 2006 Oct 9;95(7):879-88.

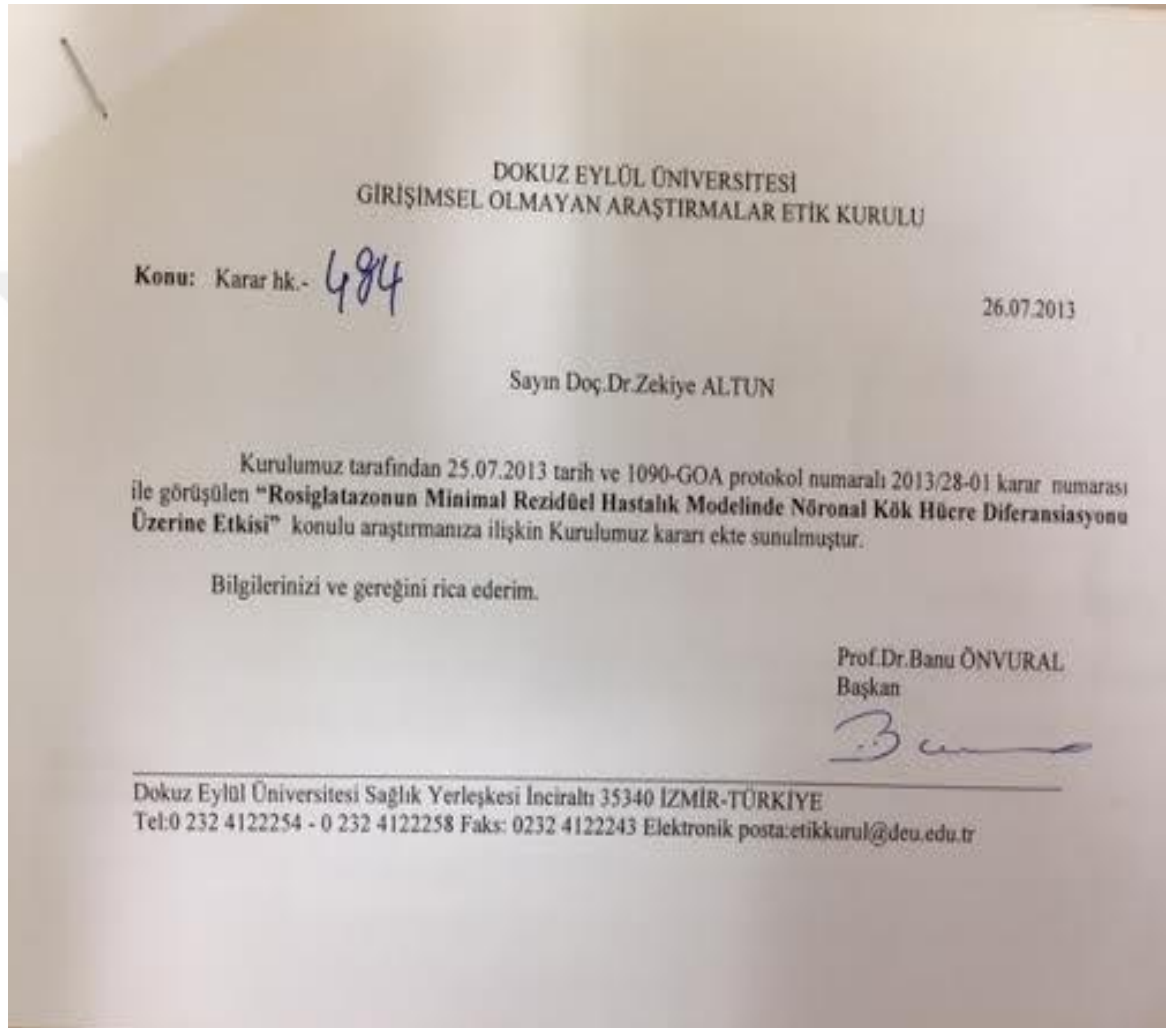
- 18- Peri A, Cellai I, Benvenuti S, Luciani P, Baglioni S, Serio M. PPARgamma in Neuroblastoma. PPAR Res. 2008;2008:917815. doi: 10.1155/2008/917815.
- 19- Chattopadhyay N, Singh DP, Heese O, Godbole MM, Sinohara T, Black PM, Brown EM. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARS) in human astrocytic cells: PPARgamma agonists as inducers of apoptosis. J Neurosci Res. 2000 Jul 1;61(1):67-74.
- 20-Han SW, Greene ME, Pitts J, Wada RK, Sidell N (2001) Novel expression and function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARg) in human neuroblastoma cells. Clin Cancer Res 7: 98–104.
- 21- Yang S, Zheng J, Ma Y, Zhu H, Xu T, Dong K, Xiao X. Oct4 and Sox2 are Over expressed in human neuroblastoma and inhibited by chemotherapy. Oncol Rep. 2012 Jul;28(1):186-92. doi: 10.3892/or.2012.1765.
- 22- Wang L, Yu CJ, Liu W, Cheng LY, Zhang YN. Rosiglitazone protects neuroblastoma cells against advanced glycation end products-induced injury. Acta Pharmacol Sin. 2011 Aug;32(8):991-8. doi: 10.1038/aps.2011.81.
- 23- Stutterheim J, Gerritsen A, Zappeij-Kannegieter L, Kleijn I, Dee R, Hooft L, van Noesel MM, Bierings M, Berthold F, Versteeg R, Caron HN, van der Schoot CE, Tytgat GA. PHOX2B is a novel and specific marker for minimal residual disease testing in neuroblastoma. J Clin Oncol. 2008 Nov 20;26(33):5443-9. doi:10.1200/JCO.2007.13.6531.
- 24- Kutluk T. Herkes İçin Çocuk Kanserlerinde Tanı Sempozyum Dizisi No: 49 Mayıs 2006; s.11 – 15 Çocukluk Çağı Kanserlerinin Epidemiyolojisi
- 25- MEDICAL ONCOLOGY& PRINCIPLES OF CANCER BIOLOGY Barry B. Lowitz ve Dennis A. Casciato
- 26- Chloe N Thomas, Martin Berry, Ann Logan, Richard J Blanch & Zubair Ahmed. Caspases in retinal ganglion cell death and axon regeneration. Cell Death Discovery (2017) 3, 17032;
- 27- GÜLEŞ Ö, EREN Ü. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi, 2008 (2) 73-78

- 28- Ateş U. Kök hücreyi tanıyalım FNG & Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi (2016); 1(1): 19-28
- 29- DALVA K. Hematoloji’de Akım Sitometri Kullanımı. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı, Ankara. Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komitesi temel moleküler hematoloji kursu
- 30- Suzuki S, Namiki J , Shibata S , Mastuzaki Y , Okano, H . The Neural Stem/Progenitor Cell Marker Nestin Is Expressed in Proliferative Endothelial Cells, but Not in Mature Vasculature. J Histochem Cytochem. 2010 Aug; 58 (8): 721-30.
- 31- Aktuğ H. Apoptosis and cell cycle. Ege Tıp Dergisi / Ege Journal of Medicine 2014;53(1):60-64
- 32- Wen Zhang, Nan Wu, Zengxia Li, Liying Wang, Jiawei Jin, Xi-Liang Zha. PPARgamma activator rosiglitazone inhibits cell migration via upregulation of PTEN in human hepatocarcinoma cell line BEL-7404 Cancer Biology & Therapy 5:8, 1008-1014, August 2006.
- 33- J. Liu, X. Yan, Y. Zhang, R. Xiao, D. Lin. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-gamma) agonist rosiglitazone (RGZ) inhibits HL-60 cell growth by induction of apoptosis, Lab. Med. 40 (2009) 297–302.
- 34- Han Zhao, Huihui Gu, Han Zhang, Jun-Hui Li, Wen-En Zhao. PPAR γ -dependent pathway in the growth-inhibitory effects of K562 cells by carotenoids in combination with rosiglitazone. Biochimica et Biophysica Acta 1840 (2014)
- 35- Chiang MC, Cheng YC, Nicol CJ, Lin KH, Yen CH, Chen SJ, Huang RN. Rosiglitazone activation of PPAR γ -dependent signaling is neuroprotective in mutant huntingtin expressing cells. Elsevier Volume 338, Issue 2, 183-193 (2015)
- 36- Osnat Naftali, Shelly Maman, Tsipi Meshel, Orit Sagi-Assif, Ravit Ginat, Isaac P. Witz. PHOX2B is a suppressor of neuroblastoma metastasis. Oncotarget, Vol. 7, No. 9 (2016)
- 37- Di Zanni, Bianchi G, RAVAZZOLO R, Raffaghello L, Ceccherini I, Bachetti T. Targeting of PHOX2B expression allows the identification of drugs effective in counteracting neuroblastoma cell growth. Oncotarget, 2017, Vol. 8, (No. 42), pp: 72133-72146.

- 38- F Sedaghat, A Notopoulos. S100 protein family and its application in clinical practice. Hippokratia 2008 Oct-Dec; 12(4): 198–204.
- 39- Anne R. Bresnick, David J. Weber & Danna B. Zimmer. S100 proteins in cancer. Nature Reviews Cancer volume 15, pages 96–109 (2015)
- 40- Grèze V, Kanold J, Chambon F, Halle P. RT-qPCR for PHOX2B mRNA is a highly specific and sensitive method to assess neuroblastoma minimal residual disease in testicular tissue 2017. 10.3892/ol.2017.6238
- 41- Zhi-Yong Zhong, Bao-Jun Shi, Hui Zhou, and Wen-Bo Wang. CD133 expression and MYCN amplification induce chemoresistance and reduce average survival time in pediatric neuroblastoma. Journal of International Medical Research Vol. 46(3) 1209–1220 (2018)
- 42- Kaufhold, Garbán, Bonavida. Yin Yang 1 is associated with cancer stem cell transcription factors (SOX2, OCT4, BMI1) and clinical implication. Journal of Experimental and Clinical Cancer Research DOI 10.1186/s13046-016-0359-2 (2016)
- 43- Erbayraktar Z, Zadeoğluları Z, Aktaş S, Olgun N. The role of p14ARF methylation in neuroblastoma minimal residual disease. Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem (2012) ; 37 (2) ; 129–138

8. EKLER

8.1 Etik Kurul Raporu



DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
ACIK ADRES	GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
TELEFON	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat Inciraltı-İZMİR
FAKS	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	1090-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Rosiglataxonun Minimal Rezidüel Hastalık Modelinde Nöronal Kök Hücre Diferansiasyonu Üzerine Etkisi
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	-
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Doç.Dr.Zekiye ALTUN Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji A.D
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐	İngilizce ☒	Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2013/28-01	Tarih: 25.07.2013
	Doç.Dr.Zekiye ALTUN'un sorumlusu olduğu "Rosiglatazonun Minimal Rezidüel Hastalık Modelinde Nöronal Kök Hücre Diferansiasyonu Üzerine Etkisi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
ETİK KURUL ÜYELERİ	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Banu</i>
Prof.Dr.Besti ÜSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Psikiyatri Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Besti</i>
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Ş.Reyhan</i>
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Nejat</i>
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Ece</i>
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Hüseyin Baskin</i>
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Vesile</i>
Prof.Dr.Bilgin CÖMERT	İç Hastalıkları (Yoğun Bakım B.D)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Bilgin</i>
Prof.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Mukaddes</i>
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Ayşe</i>
Prof.Dr.Nihal GELECEK	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Nihal</i>
Doç.Dr.İşıl TEKME	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>İşıl</i>
Doç.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Müge</i>
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Ahmet Can</i>
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐	H ☒	<i>İhsan</i>

8.2 Özgeçmiş



MERAL AYLA KOYUN

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

Kimlik Numarası	27439565696
Doğum Tarihi	03/01/1984
İletişim Adresi	784 Sok No 12
Telefon	(507) 586 92 55
E-posta	meralayla@gmail.com
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri

12 Şubat 2013 - Şu Anda (6 yıl 3 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TEMEL ONKOLOJİ (YL)
Diploma Numarası: -
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.6 / 4.0

08 Eylül 2009 - 03 Eylül 2010 (1 yıl)
DİĞER, DİĞER, EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, FEN VE MATEMATİK ALANLAR EĞİTİMİ (YL)
Diploma Numarası: 955
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 84.66 / 100.0

12 Eylül 2005 - 03 Temmuz 2009 (3 yıl 10 ay)
Lisans, İkinci Öğretim, DİCLE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
BİYOLOJİ BÖLÜMÜ, BİYOLOJİ PR. (İÖ)
Diploma Numarası: 8334
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 71.22 / 100.0

Deneyim / İşyeri Bilgileri

01 Mart 2016 - Şu Anda (3 yıl 2 ay) (Tam Zamanlı)
ÖĞRETMEN, BORNOVA İLÇE MİLLİ EĞİTİM MÜDÜRLÜĞÜ

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: Orta, Yazma: Orta, Konuşma: Orta)

Ar-Ge Yetkinlik

Bildiriler

Z. S. ALTUN, M. AYLA KOYUN, S. AKTAŞ, A. PAMUKOĞLU KAYNAR & A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, The Effect Of Rosiglatzone On Differantiaton Of Neural Stem Cells In Minimal Residual Disease Model Of Neuroblastoma, Poster Sunumu, 49th Congress Of The International Society Of Paediatric Oncology (siop), 12 Ekim 2017, 15 Ekim 2017.

M. AYLA KOYUN, Z. S. ALTUN, S. AKTAŞ, A. PAMUKOĞLU KAYNAR & A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, Rosiglatazonun Minimal Rezidüel Hastalık Modelinde Nöronal Kök Hücre Diferansiasyonu Üzerine Etkisi, Sözlü Sunum, 22. Ulusal Kanser Kongresi, 19 Nisan 2017, 23 Nisan 2017.

A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, A. PAMUKOĞLU KAYNAR & M. AYLA KOYUN, Üçlü Negatif Meme Kanseriinde Tacrolimusun In Vitro Ve In Vivo Değerlendirilmesi, Poster Sunumu, IX. Aydın Onkoloji Günleri- Klinik Onkolojide Güncel Tedaviler Sempozyumu, 23 Mayıs 2014, 26 Mayıs 2014.

A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, A. PAMUKOĞLU KAYNAR, M. AYLA KOYUN, H. N. OLGUN, S. AKTAŞ & Z. S. ALTUN, Silmarinin Siplatin Kombinasyonu İle Nöroblastom Hücrelerine Etkisi, Poster Sunumu, XVIII. Ulusal Pediatrik Kanseri Kongresi, 13 Mayıs 2014, 17 Mayıs 2014.

Yönetilen Tezler

M. AYLA KOYUN (Tez Yazarı) , Z. S. ALTUN (Tez Danışmanı) , Rosiglatazonun Minimal Rezidüel Hastalık Modelinde Nöronal Kök Hücre Diferansiasyonu Üzerine Etkisi, TEMEL ONKOLOJİ (YL), SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE, 2013.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

BİDEB Destekleri

MERAL AYLA KOYUN, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2224-B Yurt İçi Bilimsel Etkinliklere Katılım Desteğı Programı, Başvurusu Reddedildi, 2014 - 3, 24.04.2014 - 27.04.2014.
MERAL AYLA KOYUN, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2210-A Genel Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı, Başvurusu Reddedildi, 2014 - 1, 01.03.2014 - 28.02.2015.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0