



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KAFEİK ASİT FENETİL ESTER (CAPE)'İN
MULTİPL MYELOM KANSER KÖK
HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ANTİTÜMÖRAL
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Pelin KÜÇÜK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU

TRABZON-2013



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KAFEİK ASİT FENETİL ESTER (CAPE)'İN
MULTİPL MYELOM KANSER KÖK
HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ANTİTÜMÖRAL
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Pelin KÜÇÜK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU

TRABZON-2013

ONAY

Bu tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur.

Prof. Dr. Fahri UÇAR

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

.....

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Pelin KÜÇÜK’ün hazırladığı “KAFFEİK ASİT FENETİL ESTER (CAPE)’İN MULTİPL MYELOM KANSER KÖK HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ANTİTÜMÖRAL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU

Yüksek Lisans/Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Fahri UÇAR

Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU

Prof. Dr. Mehmet SÖNMEZ

Tarih: .../.../201

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun/.../.... tarih ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. Ahmet KALKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

06/05/2013

Pelin KÜÇÜK

İthaf

Yüksek lisans tezimi, geçirdiğim bu zorlu süreçte, maddi ve manevi olarak her zaman yanımda olan çok değerli aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Çalışmamı, engin bilgi ve tecrübeleriyle kurduğu ve muhafaza ettiği mükemmel bir çalışma ortamında yürütmemi sağlayan Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Ahmet KARAGÜZEL'e ve bu çalışmayı gerçekleştirmeme imkan sunan; girdiğim her çıkmazda daima farklı bir yol gösteren çok değerli tez danışmanım ve hocam Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Çalışmamın temelini oluşturmamda değerli fikirleri ve önerilerini esirgemeyen Prof. Dr. Mehmet SÖNMEZ, Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI ve Prof. Dr. Murat ERTÜRK'e ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Doç. Dr. Ersan KALAY, Prof. Dr. Fahri UÇAR ve Yrd. Doç. Dr. Tuba DİNÇER'e teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım süresince yaşadığım tüm sorunlara ortak olan değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Ceren SÜMER, Arş. Gör. Burcu YÜCEL, Sibel MOLLAMEHMETOĞLU, Figen SEYMEN, Banu ÖZTÜRK, Arş. Gör. Orhan SEZGİN, Abide CANSIZ ve tüm diğer bölüm arkadaşlarıma, şefkat ve desteklerini esirgemeyen Kimyager Fatmagül YENİSEY, Biyolog Tülay KÖSEAHMET ve Öğr. Gör. Dr. Bayram TORAMAN'a; yurt dışında bulunduğum tez yazım sürecimde beni yalnız bırakmayan değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Gülden YORGANCIOĞLU ve Arş. Gör. Adem YILDIRIM'a en içten minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımındaki destekleri için Hematoloji Laboratuvarı personeline, İstanbul Üniversitesi DETAE İmmünoloji Bilim Dalı başkanı Prof. Dr. Günnur DENİZ, öğretim üyesi Doç. Dr. Gaye ERTEN ve İmmünoloji Bilim Dalı personeline, GATA Hematoloji Bilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Ferit AVCU'ya, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Ahmet ALVER'e, Arş. Gör. Hüseyin ŞAHİN, Arş. Gör. Selim DEMİR ve Arş. Gör. Bekir BULUT'a teşekkürlerimi sunarım.

Aldığım tüm kararlarda fedakârlık ve hoşgörülerini esirgemedi her zaman yanımda olan; varlıkları sayesinde ayakta durduğum çok değerli aileme sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım.

Son olarak bu araştırmayı 111S322 kodlu proje ile destekleyen TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu (SBAG)'na teşekkür ederim.

Arş. Gör. Pelin KÜÇÜK

İÇİNDEKİLER

ONAY	ii
BEYAN	iii
TEŞEKKÜR	v
KISALTMA, SİMGE VE FORMÜLLER DİZİNİ	ix
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	4
4.1. Multipl Myelom (MM)	4
4.1.1. İnsidans ve Epidemiyoloji	4
4.1.2. Klinik Bulgular ve Evrelendirme	5
4.1.3. MM Etiyolojisi	6
4.2. Kanser Kök Hücre	7
4.2.1. Plazma Hücresinin Hematopoetik Gelişimi	9
4.2.2. MM Kök Hücre	12
4.3. Propolis ve CAPE	15
4.3.1. Propolis	15
4.3.2. CAPE (Kafeik Asit Fenetil Ester)	15
4.3.3. Propolis ve CAPE'in Antitümöral Etkileri	16
4.4. Hücrelerin Yüzey Antijenlerine Göre Ayırıştırılması	17
4.5. Flow Sitometrik Analizle Hücre Yüzey Antijenlerinin Belirlenmesi	18
4.6. MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)	
Analizi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi	18
4.7. Koloni Formasyonu Analizi	19
5. GEREÇ ve YÖNTEM	20
5. 1. Gereç	20
5.1.1. Çalışma Grubu	20
5.1.2. Kimyasallar	20
5.1.3. Kitler	21
5.1.4. Cihazlar	21

5.1.5. Sarf Malzemeleri	22
5.1.6. Solüsyonlar	22
5.2. Yöntem	23
5.2.1. Fikol İle Mononuklear Hücrelerin İzolasyonu	23
5.2.2. MM Hücrelerinin Saflaştırılması	24
5.2.3. MM Hücrelerinin Primer Kültürü	24
5.2.4. RPMI8226 Hücrelerinin Kültürü	24
5.2.5. MM Kök Hücrelerinin İzolasyonu	25
5.2.6. Flow Sitometri İle Yüzey Antijenlerinin Tayini	26
5.2.7. Rho123 Püskürtme Analizi	26
5.2.8. Koloni Formasyonu Analizi	27
5.2.9. Hücre Sayımı ve Canlılık Analizi	27
5.2.10. MTT Analizi	28
5.2.11. Annexin V – PI Testi	28
5.2.12. Hücre Döngüsü Analizi	29
5.2.13. Propolis ve CAPE'in Hazırlanması ve Hücrelere Muamelesi	29
5.2.13.1. Propolis'in Hazırlanması ve Hücrelere Muamelesi	29
5.2.13.2. CAPE'in Hazırlanması ve Hücrelere Muamelesi	30
5.2.14. İstatistiksel analiz	30
6. BULGULAR	31
6.1. MM Hücrelerinin Primer Kültürü	31
6.2. RPMI8226 Hücrelerinin Morfolojik Ve Fenotipik Özellikleri	33
6.3. RPMI8226 Hücrelerinin <i>ABC Taşıyıcı</i> Ekspresyonu ve Rho123 Püskürtme Analizi	35
6.4. CD34+ RPMI8226 Hücrelerinin Morfolojik Ve Fenotipik Özellikleri	36
6.5. CD34+ RPMI8226 Hücrelerinin <i>ABC Taşıyıcı</i> Ekspresyonu ve Rho123 Püskürtme Analizi	39
6.6. CD34+ RPMI8226 Hücrelerinin Koloni Oluşturma Yeteneği	40
6.7. Propolis Muamelesiyle RPMI8226 ve CD34+ RPMI8226 Hücrelerinin Plazma Hücresine Dönüşmesi	40
6.8. CAPE Muamelesiyle CD34+ RPMI8226 Hücrelerinin Hücre Yüzey Antijenleri ve <i>ABC Taşıyıcı</i> Ekspresyonlarındaki Değişimler	42

6.9. Apoptoz ve Canlılık Analizleri	44
6.9.1. Propolis ve CAPE'in CD34+ RPMI8226 Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi	44
6.9.2. Propolis ve CAPE'in Malign Olmayan Periferel Kan Mononuklear Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi	45
6.9.3. CAPE'in CD34+ RPMI8226 Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi	46
6.9.4. CAPE'in Malign Olmayan Periferel Kan Mononuklear Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi	48
6.10. Propolis ve CAPE'in CD34+ RPMI8226 Hücrelerinin Mitotik Aktivitesi Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi	49
6.11. İstatistiksel Analiz	53
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	56
8. SONUÇLAR	59
9. KAYNAKLAR	62
10. ETİK KURUL ONAYI	71
11. ÖZGEÇMİŞ	73

KISALTMA, SİMGE VE FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

ABC	ATP Bağlayıcı Kaset
ABCG2	ATP Bağlayıcı Kaset Ailesi G2
ALDH1	Aldehid dehidrogenaz 1
APC	Allofikosiyanin
ATCC	Amerikan Kültür Koleksiyonu
CAPE	Kafeik Asit Fenetil Ester
CD	Farklılaşma grubu
DNA	Deoksiribonukleik asit
DMSO	Dimetil sülfoksit
DSS	Durie-Salmon Evreleme Sistemi
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EtOH	Etanol
FACS	Floresan aktif hücre ayırıştırma
FBS	Fötal bovin serum
FITC	Floresan izotiyosiyanat
FGFR3	Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 3
G-CSF	Granulosit koloni stimüle edici faktör
GM-CSF	Granulosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör
hT	Yardımcı T Hücresi
Ig	İmmünglobulin
IL	Interlökin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
ISS	Uluslararası Evrelendirme Sistemi
MHC	Major histokompatibilite kompleksi
MM	Multipl myelom
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NFkB	Nuklear Faktör Kappa B
PBS	Fosfat tampon solusyonu
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PE	Fikoeritrin
Pen-Strep	Penisilin-Streptomisin
PerCp	Peridinin-klorofil-protein kompleksi
PI	Propidyum iyodid
Rho123	Rhodamine123
SDS	Sodyum dodesil sülfat

1. ÖZET

Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE)'in Multipl Myelom Kanseri Kök Hücreleri Üzerindeki Antitümöral Etkilerinin Araştırılması

Çalışmamızda, Multipl Myelom (MM)'da hastalığın relapsından sorumlu olduğu düşünülen kanser kök hücreleri izole edilerek, bu hücrelerin farklılaşma aşamaları ve tedavi direnciyle ilişkili yüzey antijenleri karakterize edilmiştir. MM kök hücreleri; Propolis ve özellikle etken bileşenlerinden CAPE ile muamele edilerek, bu maddelerin antitümöral etkileri araştırılmıştır. 50µg/ml Propolis'in, 24 saatte MM kök hücrelerinin %63'ünü öldürdüğü ve 100µg/ml Propolis'le 4 saat muamele edilen hücrelerin plazma hücre morfolojisi aldığı tespit edilmiştir. 25µM CAPE ile 48 saat muamele sonunda, hücrelere ilaç direnci sağlayan *P-glikoprotein* ve *ABCG2* ekspresyonlarını kaybettiği; 96. saatte ise hücrelerin %48'inin öldüğü tespit edilmiştir. Hücre döngüsü analizleri sonucunda Propolis ve CAPE'in hücrelerin daha hızlı bölünmesini indüklediği gösterilmiştir. Bu bulgunun, hücrelerin Propolis muamelesine yanıt olarak plazma hücrelerine farklılaşmasıyla uyumlu olabileceği düşünülmüştür. Propolis ve CAPE ile malign olmayan mononükleer periferik kan hücreleri 72 saat muamele edildiğinde, 50µg/ml Propolis, hücrelerin canlılığını %49'a düşürmesine rağmen, 25µM ve 50µM CAPE, canlılığı sırasıyla %92 ve %93'e düşürmüştür. Elde edilen bu bulgular, Propolis'in etken maddesi olan CAPE'in kanser kök hücrelerini seçici olarak öldürebilen etkili bir ajan olabileceğini düşündürmüştür.

Anahtar Sözcükler: Apoptoz, Flow Sitometri, Hematopoetik malignansiler, Tedavi direnci, Tümör başlatıcı hücre

2. SUMMARY

Investigation of Antitumoral Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) on Multiple Myeloma Cancer Stem Cells

In our study, cancer stem cells which is thought to be responsible for relaps in Multiple Myeloma (MM) were isolated and cell surface antigens related with differentiation stages and therapy resistance of these cells were characterised. MM stem cells were treated with Propolis and CAPE and antitumoral effects of these components were investigated. It was demonstrated that 50µg/ml Propolis killed 63% of myeloma stem cells in 24 hours and cells treated with 100µg/ml Propolis for 4 hours gained plasma cell morphology. It was also demonstrated that cells treated with 25µM CAPE lost their *P-glycoprotein* and *ABCG2* ekspression in 48 hours and 48% of the cells died in 96 hours. Cell cycle analyses showed that both Propolis and CAPE induced myeloma stem cells to divide rapidly. It is thought that, this finding is compatible with differentiation of cells to plasma cells in response to Propolis treatment. When nonmalignant mononuclear peripheral blood cells were treated with Propolis and CAPE for 72 hours, despite 50µg/ml Propolis decreased cell viability to 49%, 25µM and 50µM CAPE decreased cell viability to 92% and 93%, respectively. Our results indicate that CAPE could be an effective agent that kills cancer stem cells selectively.

Key words: Apoptosis, Flow Cytometry, Hematopoietic malignancies, Therapy resistance, Tumor initiating cell

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünyada kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra ölüm sebebi olarak 2. sırada yer almaktadır (1). Günümüzde, medikal yöntemler kanseri etkin bir şekilde tedavi etmede hala yetersiz kalmakta ve son yıllarda yapılan pek çok araştırma, kanserde tedaviye direnç sağlayan kanser kök hücrelerini işaret etmektedir. Günümüzde kanser tedavilerinde kullanılan standart radyoterapi ve kemoterapi ajanları kanser kök hücresinden köken alan ve tümör kitlesini oluşturan hücreleri öldürebilmekte ve bu şekilde tümör kitlesini küçültebilmektedir. Ancak, bu tedaviler kanser kök hücreleri üzerinde etkisiz kalmaktadır. Kendini yenileme ve uzun süreli proliferasyon yeteneği sayesinde kanser kök hücreleri, tedavi sonrasında da tümörün yeniden oluşmasına sebep olmakta ve hastalık sıklıkla nüksetmektedir (2). Bu nedenle yeni kemoterapötiklerin geliştirilmesinde veya kanser tedavisine yönelik yeni stratejilerin oluşturulmasında göz önünde bulundurulması gereken önemli bir unsur da kanser kök hücreleridir. Güncel kanser tedavilerinde kullanılan toksik ajanlar, kanser hücrelerini öldürürken sağlıklı hücrelere de zarar verebilmekte ve hastaların yaşam kalitesini düşürmektedir. Bunun yanında kemoterapötik ajanlara maruz kalan sağlıklı hücreler, kanserde tedaviye direnci desteklemektedir (3). Bu sebeple kanser hücrelerini seçici olarak hedefleyen etkili bir ajanın keşfi, hastalığın tedavisi açısından çok önemlidir. Biz de, bu kıymetli malzemenin doğada gizli olduğuna inanarak, daha önce pek çok araştırmayla, kanser hücreleri üzerine seçici antitümöral etkileri gösterilmiş olan Propolis ve özellikle Propolisin etkin bir bileşeni olan CAPE'in, sağlıklı hücrelere zarar vermeden, MM kök hücreleri üzerinde göstereceği seçici antitümöral etkileri incelemeyi amaçladık.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Multipl Myelom (MM)

MM, kontrolsüzce üretilen malign plazma hücrelerinin kemik iliğinde birikimiyle karakterize bir B hücre neoplazisidir. Plazma Hücreli Myelom, Myelomatozis veya Kahler Hastalığı olarak da adlandırılan MM, her hastada farklı bir progresyon gösterebilmektedir. Kemik iliğinde tek bir bölgede belirgin olarak tespit edilen “Soliter myelom”; kemik iliği dışındaki organlarda tutulum gösteren “Ekstramedullar myelom”, asemptomatik bir gelişim gösteren “Smoldering myelom” veya malign plazma hücrelerinin bir veya birkaç bölgede klonal olarak oluşturduğu “Plazmasitom” ve bunun çeşitleri olan “Soliter plazmasitom” ve “Ekstramedüller plazmasitom” myelomun bazı alt tipleridir (4).

Günümüzde, birçok kanser türünde olduğu gibi, MM’nin de etkin tedavisi halen mümkün olmamakta ve hastalık sıklıkla nüksetmektedir. Hastalığın etkin bir şekilde tedavi edilememesinden, “kanser kök hücreleri”nin sorumlu olduğu düşünülmekte ve son yıllardaki pek çok çalışma bu konuya odaklanmış bulunmaktadır (5).

4.1.1. İnsidans ve Epidemiyoloji

MM, görülme sıklığı bakımından tüm neoplastik hastalıkların %1’ini, hematolojik malignansilerin ise %10’unu oluşturmaktadır (6). National Cancer Institute istatistiklerine göre MM, Amerika Birleşik Devletleri’nde en yaygın hematolojik malignansiler arasında Non-Hodgkin Lenfomadan sonra 2. sırada yer almaktadır (7). Genellikle ileri yaşlarda ortaya çıkan MM’nin teşhis edildiği yaş ortalaması erkeklerde 69; kadınlarda ise 71 olarak bildirilmiştir (8). MM’nin yıllık insidansı ortalama olarak 4.5/100 000’dir. Bu oran beyaz ırkta 4.2 iken; siyah ırkta 9.3’e ulaşmaktadır (9, 10).

American Cancer Society’nin 2013 yılı için öngördüğü teşhis edilecek yeni MM vakalarının sayısı 22,350 (12,440 erkek; 9,910 kadın) olarak tahmin edilirken; 10,710 MM kaynaklı yeni ölüm beklenmektedir (6,070 erkek; 4,640 kadın). MM’de sağkalım süresi, hastalığın teşhis edildiği evre ve uygulanan tedaviye göre değişiklik göstermekle beraber ortalama olarak 3-5 yıl arasındadır (11). MM kaynaklı ölüm oranı ise Kuzey

Avrupa, Kuzey Amerika, Avustralya ve Yeni Zelanda’da nispeten yüksekken, Japonya, Yugoslavya ve Yunanistan’da daha düşüktür (12).

4.1.2. Klinik Bulgular ve Evrelendirme

MM’de başlıca bulgular; kemik ağrıları, anemi, kilo kaybı ve infeksiyonlardır. Sağlıklı bireylerin kemik iliği aspiratında tespit edilen plazma hücre oranı %5’in altında iken; MM’li hastalarda bu oran %10’un üzerine çıkmaktadır (13). Hastalığın ilerlemesiyle beraber osteoporoz, kemiklerde litik lezyonlar ve kırıklar tespit edilmektedir. Kemik lezyonlarıyla beraber açığa çıkan kalsiyum, hiperkalsemi olarak kendini göstermektedir. Aşırı sıvı atılımına sebep olan hiperkalsemi, renal yetmezliği beraberinde getirmektedir. Bununla beraber, anemi ve beraberinde kilo kaybı; lökopeni ve immün yetmezlik ve dolayısıyla infeksiyonlar; trombositopeni ve kanama zamanının uzaması gibi durumlar ortaya çıkmaktadır (14, 15). MM tanısında değerlendirilen kriterler Tablo 1’de özetlenmiştir.

Tablo 1. MM’de tanı kriterleri (Artan’dan, 4)

Majör kriterler	Minör kriterler
• Doku biyopsisinde plazmositom varlığı • Kemik iliğinde >%30 plazma hücresi • Artmış M komponent varlığı - IgG >3.5 gr/dl - IgA > 2 gr/dl - İdrarda $\geq$ 1gr/dl 24 saatlik idrarda κ veya λ ekspresyonu	• Kemik iliğinde %10-30 arası plazmositom • Litik kemik lezyonları • Düşük Ig düzeyleri - IgM < 50 mg/dl - IgA < 100 mg/dl - IgG <600 mg/dl

MM’de başlıca 2 evrelendirme sistemi bulunmaktadır. Bunlardan ilki 1975 yılında Brian Durie ve Sydney Salmon tarafından belirlenen kriterlere göre uygulanan “Durie-Salmon Evreleme Sistemi (DSS)”dir (16). Durie-Salmon evreleme sistemi, serum ya da idrardaki anormal monoklonal Ig (İmmünoglobulin) düzeyi, kandaki kalsiyum ve hemoglobin düzeyi ile kemiklerdeki litik lezyonların çeşitliliğini dikkate alarak hastalığı 3 evrede değerlendirmektedir (Tablo 2).

Tablo 2. Durie-Salmon evreleme sistemi (Artan’dan, 4)

Evre-I	Evre-II	Evre-III
• Hemoglobin > 10 g/dl • Normal kalsiyum düzeyi (< 12 mg/dl) • Normal kemik grafileri veya soliter kemik plazmasitomu veya sadece osteoporoz varlığı • Düşük M komponent IgG < 5g/dl IgA < 3g/dl idrar hafif zincir M komponenti < 4 gr/dl	Bulgular evre I’dekiler kadar düşük ve evre III’teki kadar yüksek değil	• Hemoglobin <8.5 g/dl • Serum kalsiyum > 12 mg/dl • 3 veya daha fazla ilerlemiş litik kemik lezyonu • Artmış M komponent varlığı IgG > 7 g/dl IgA > 5 g/dl idrar hafif zincir M komponenti >12gr/dl/24 h

MM’deki bir diğer evrelendirme sistemi ise “Uluslararası Evrelendirme Sistemi (ISS)”dir (17). Uluslararası evrelendirme sistemi, serum beta-2 mikroglobulin ve serum albumin düzeylerine göre MM’yi 3 evrede incelemektedir (Tablo 3).

Tablo 3. Uluslararası evrelendirme sistemi, (beta-2 mikroglobulin mg/L, albümin g/L) (Artan’dan, 4)

Evre-I	Evre-II	Evre-III
• beta-2 mikroglobulin < 3.5 • albumin <3.5	• beta-2 mikroglobulin 3.5 - 5.5 arasında • herhangi bir albumin değeri veya • albumin <3.5 • beta-2 mikroglobulin < 3.5	• beta-2 mikroglobulin > 5.5.

4.1.3. MM Etiyolojisi

MM’de etiyolojik faktörler arasında yaş, cinsiyet, ırk, sigara ve alkol gibi alışkanlıklar, alerjik ve otoimmün hastalıklar, kimyasal ve radyoaktif maddelere maruziyet yer almakta olup, hastalık sitogenetik ve moleküler düzeyde kompleks

genetik anomalilerle birlikte ortaya çıkmaktadır. MM tanı ve teşhisinde sitogenetik bulgular önemli yer tutmasına rağmen, kemik iliği biyopsilerinde plazma hücre yüzdesinin ve kültürde mitotik indeksin düşük olması gibi sorunlardan dolayı hastaların ancak %35 kadarında sayısal ve/veya yapısal kromozom anomalileri tanımlanabilmiştir (18). En sık rastlanan anormal karyotipler arasında 48-74 kromozom sayısının bulunduğu ve özellikle 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 21 trizomilerinin görüldüğü hiperploidi yer almaktadır. Hiperploidi karyotipe sahip olgular genellikle iyi prognoz göstermektedir. Hiperploidiye eşlik eden 13q delesyonu ve/veya kromozom 1'in amplifikasyonu ile 14q32'deki *IgH* lokusunu içeren translokasyonlar ise kötü prognozu işaret etmektedir. Ayrıca 6q, 8, 13q, 14, 16, X ve Y kromozomlarının monozomisine de rastlanmaktadır (4).

MM'de yapısal kromozom anomalilerinden özellikle translokasyonlar ve farklı mutasyonlar sıklıkla gen ekspresyonlarının bozulmasına sebep olmaktadır. Ekspresyonunun bozulması kötü prognozla ilişkilendirilen genler arasında, 11q32 delesyonuyla hücre döngüsünde rol alan *Siklin D1*, 13q14 delesyonuyla tümör baskılayıcı olan *Retinoblastom* ve 17p13 delesyonuyla tümör baskılayıcı olan *p53*, t(4;14) ile bir büyüme faktörü olan *FGFR3* (Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 3), t(14;16) ile bir proto-onkogen olan ve *C-MAF* ve immün yanıt oluşumunda görevi olan *IgH* yer almaktadır. Bununla beraber *C-myc*, *N-ras* ve *K-ras* onkogenlerinin mutasyonu da MM'de kısa süreli sağkalımla ilişkilendirilmiştir (19). MM'deki genetik değişimlerin sonucunda hücre döngüsü ve apoptoz mekanizmalarında anormallikler kendini göstermektedir (4, 20).

4.2. Kanser Kök Hücresi

Sınırsız çoğalma potansiyeli ve farklılaşma yeteneğiyle özelleşmiş hücre tiplerini oluşturabilen kök hücreler, hasarlı doku ve organların onarılması ve yenilenmesinde birincil rol oynamaktadır. Farklılaşmış ve özelleşmiş hücrelerde bulunmayan asimetric bölünme yeteneği sayesinde kök hücreler kendi kopyalarını oluşturabilmekte, böylece klonal olarak çoğalabilmekte ve organizmadaki kök hücre havuzunu muhafaza edebilmektedir. Ayrıca, kök hücreler hücre döngüsünün G0 fazında çoğalma ve farklılaşma için bir uyarı alana kadar durağan olarak kalabilmekte ve maruz kalınan

toksik ajanları aktif olarak hücre dışına taşıyarak sitotoksik hasardan kendilerini koruyabilmektedir (21).

1960'lı yıllarda tümör kitlesi içindeki hücreler arasında fonksiyonel bir heterojenite olduğu ve tümör kitlesi içindeki yalnızca çok küçük bir populasyonun klonal çoğalma ve yeni bir tümör oluşturabilme yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir (22). Ortak klonal orjinlerine rağmen, fonksiyonel olarak farklı özelliklere sahip bu hücreler, kanserde agresif progresyon, relaps ve mortaliteyle ilişkilendirilmiştir (23). Kemoterapi ve radyoterapiyle tümör hücrelerinin öldürülebilmesine rağmen, hastalığın nüksetmesinden sorumlu tutulan bu dirençli hücreler “kanser kök hücresi” olarak adlandırılmıştır ve günümüze kadar bu hücrelerin fenotipik ve fonksiyonel özellikleriyle ilgili pek çok veri literatüre kazandırılmıştır (2, 24, 25).

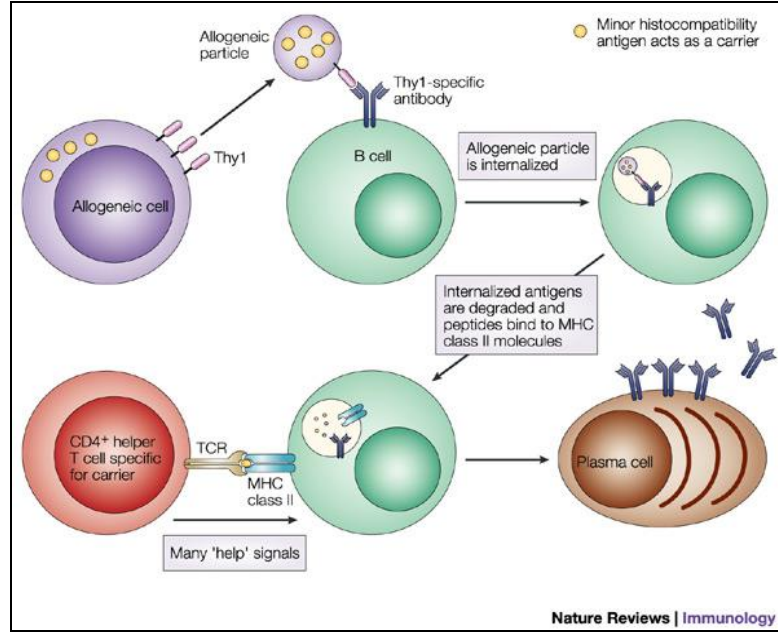
Kanser kök hücresinin orjiniyle ilgili literatürde farklı görüşlerden bahsetmek mümkündür. Bunlardan biri, pluripotent kök hücrenin veya öncü hücrenin mutasyona uğrayarak, kök hücre özelliklerini taşıyan kanser hücresine dönüşmesidir. Farklı bir görüş ise, farklılaşmış, erişkin bir hücrenin mutasyona uğrayarak geriye dönük farklılaşmasıyla kanser kök hücresini oluşturmasıdır (26).

Kanser kök hücreleri normal erişkin kök hücrelerle fonksiyonel olarak pek çok ortak özellik göstermektedir. Son yıllarda yapılan pek çok çalışma, kanser hücreleri arasında, sınırsız çoğalma yeteneğinin yalnızca kanser kök hücrelerine özgü olduğunu göstermektedir. Kanser kök hücrelerindeki bu uzun süreli proliferasyon yeteneği, asimetrik bölünme, kendini yenileme ve telomeraz aktivitesi gibi “stemness”; yani kök hücre benzeri özelliklerle ilişkilendirilmektedir (2, 27-29). Kanser kök hücrelerinde, tıpkı sağlıklı kök hücrelerdeki gibi, toksik ajanları hücre dışına püskürten ve dolayısıyla hücrelerin tedaviye direnç göstermesini sağlayan *ABC (ATP bağlayıcı kaset) taşıyıcılar* ailesine ait hücre yüzey antijenleri eksprese edilmektedir (30). Kanser kök hücrelerinin, yine sağlıklı kök hücrelerde olduğu gibi sıklıkla dormant fazla bulunması da tedaviye dirençte önemli bir mekanizmadır (31). Normal erişkin kök hücrelerde ekspresyonu yüksek olarak bulunan *ALDH1 (Aldehid dehidrojenaz 1)*'in, kanser kök hücreleri için de selektif bir markır olduğu bilinmektedir (32). Ayrıca, normal kök hücrelerde aktif olarak eksprese edilen ve erişkin dokularda baskılanan *Notch*, *Wnt*, *Hedgehog* gibi genlerin MM dahil olmak üzere kanser kök hücrelerinde aktive olduğu da bilinmektedir. Ancak

aktivasyon mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Yapılan çalışmalar kanser kök hücrelerindeki “*stemness*” özelliklerin sağlıklı kök hücrelerle ortak yollar üzerinden düzenlendiğini kanıtlar niteliktedir (33).

4.2.1. Plazma Hücresinin Hematopoetik Gelişimi

Plazma hücreleri humoral bağışıklık sisteminin önemli bir parçasıdır. Kemik iliğindeki hematopoetik kök hücre, kemik iliği mikroçevresince indüklenerek, bir antijene bağımlı olmaksızın, Ig ağır ve hafif zincir genlerindeki V (değişken), D (çeşitli) ve J (katılım) segmentlerinin farklı şekilde rekombinasyonları ve adhezyon molekülleri ve sitokin reseptörlerinin ekspresyonu gibi aktif bir moleküler süreçle beraber olgun B hücresine dönüşmektedir. Bu aşamada kemik iliğinden ayrılarak perifere salınan olgun B hücresinin bir antijenle karşılaşmasından sonra, antijen B hücresi tarafından peptid fragmanları haline getirilmekte ve B hücresindeki MHC (Major histokompatibilite kompleksi) moleküllerine bağlanmaktadır. MHC-Peptid kompleksi B hücre yüzeyinde eksprese edilmekte ve bu komplekse yardımcı T hücresinin bağlanmasıyla B hücresi aktive olmaktadır. Yardımcı T hücresinin ürettiği sitokinlerle indüklenen B hücresi aktif bir proliferasyon sürecine girerek plazma hücresine farklılaşmaktadır. Bu plazma hücreleri patojenlere karşı oluşturulacak immün yanıt için hızlı bir başlangıç yapılmasını sağlamakta ve kısa süre içinde apoptozla öldürülmektedir (34). B hücresinin plazma hücresine farklılaşma aşamaları Şekil 1’de şematize edilmiştir.

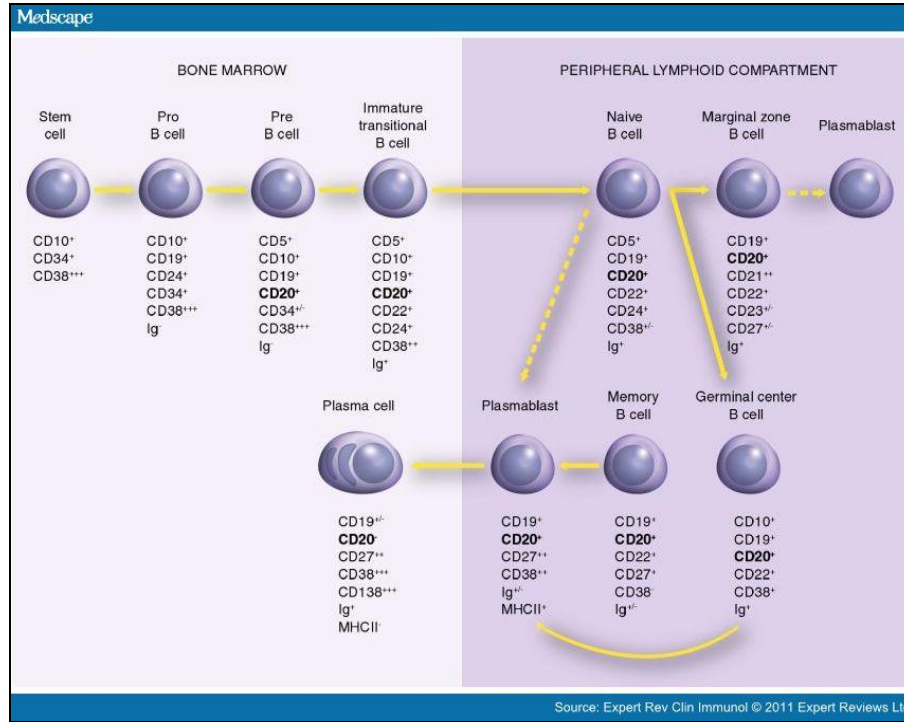


Şekil 1. B hücresinin plazma hücreğine farklılaşması (Mitchison'dan, 35)

Yardımcı T hücresinin indükleyerek aktifleştirdiği olgun B hücresi ayrıca lenf nodlarında immün yanıtın ve Ig ağır ve hafif zincirlerindeki somatik mutasyonların gerçekleştiği germinal merkezlere girerek plazmablastlara dönüşmektedir. Plazmablastlar tekrar kemik iliğine göç ederek plazma hücreğine dönüşmektedir. Kemik iliğinde oluşan bu plazma hücrelerinin sağkalım süresi, periferde oluşturulan plazma hücrelerine göre daha uzundur ve patojene karşı oluşan antijenik yanıtın uzun süre sürdürülmesini sağlamaktadır (36).

B hücrelerinin farklılaşma evreleri Flow sitometrik analizle, hücre yüzeyinde eksprese edilen CD (farklılaşma grubu) antijenleri ve immüoglobulinlere göre tespit edilebilmektedir. Buna göre, B220+ CD43+ hücreleri pro-B; B220+ CD43- IgM- hücreleri pre-B; B220+ IgM+ IgD- hücreleri immatur *Naif* B hücreleri ve B220+ IgM+ IgD+ hücreleri de olgun B hücreleri olarak sınıflandırmak mümkündür. Kök hücre antijeni olarak bilinen CD34, B hücre farklılaşmasının erken aşamalarında eksprese edilmektedir. CD19 ve CD20 antijenleri ise pro-B hücrelerinde başlayarak, plazma hücreğine farklılaşmaya kadar eksprese edilmektedir. Immatur B hücresi oluşuncaya kadar yüksek düzeyde eksprese edilen CD38, periferdeki farklılaşma basamaklarında eksprese edilmemekte ancak, CD56 gibi farklılaşmanın son basamaklarında eksprese edilmektedir. Bellek B hücrelerinde eksprese edilmeye başlanan CD27, farklılaşmanın

son aşamasında da eksprese edilmektedir. CD138 ise, spesifik olarak farklılaşmanın son aşamasındaki plazma hücresinde eksprese edilmektedir (37). B hücre farklılaşmasının farklı aşamalarında eksprese edilen hücre yüzey antijenleri Şekil 2’de gösterilmiştir.



Şekil 2. B hücre farklılaşmasının farklı aşamalarında eksprese edilen hücre yüzey antijenleri (Feldman RJ’dan, 37)

İmmün sistemde, çeşitli antijenlere spesifik antikorların oluşturulması; Ig ağır ve hafif zincir genlerindeki V, D ve J segmentlerinin farklı şekilde rekombinasyonları, B hücreler üzerindeki antijen bağlanma bölgelerindeki somatik mutasyonlar ve Ig’lerin kendi arasındaki izotipik dönüşümü sayesinde gerçekleştirilmektedir. VDJ rekombinasyonları aynı zamanda B hücrenin farklılaşma basamaklarında belirleyici rol oynamaktadır. Ağır zincirdeki D ve J segmentleri arasındaki değişim (DJ_H) pro-B hücrelerinde tespit edilirken; V segmenti ve DJ_H bölgesi arasındaki değişim (VDJ_H) pre-B hücrelerinde tespit edilmektedir. Kappa ve Lambda zincirlerindeki rekombinasyonlar (VJ_k, VJ_λ) ise erişkin B hücrelerine özgüdür (38).

4.2.2. MM Kök Hücresi

Kemik iliğinde oluşan B hücreleri, dalak ve lenf nodları gibi periferel dokularda aktif bir proliferasyon sürecinden geçerek olgunlaşmakta ve farklılaşmanın son basamağında tekrar kemik iliğine göç ederek plazma hücrelerini oluşturmaktadır. Kemik iliğindeki plazma hücrelerinin bölünme yeteneği yoktur. Ancak, 1968 yılında Bergsagel ve Valeriote, sıçanda Adj. PC5 MM hücre hattıyla yaptıkları çalışmada, myelomatöz plazma hücreleri arasındaki oldukça küçük bir populasyonun klonal çoğalma yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir (39). Hamburger ve Salmon da, MM hastalarına ait kemik iliği materyalleri ile yaptıkları çalışmada, plazma hücreleri arasında klonal çoğalma yeteneği olan hücreler olduğunu göstermiştir (40). 2000’li yıllara gelindiğinde, MM’deki bu klonal çoğalma yeteneğindeki hücreler, Flow sitometri gibi daha ileri tekniklerle karakterize edilebilmiştir. Robillard N. ve arkadaşları; bu hücrelerin, taşıdığı yüzey antijenleriyle büyüme özelliklerini ilişkilendirmiştir. Maturasyonla paralel olarak azalan CD45 ekspresyonu, MM hastalarına ait kemik iliği örneklerindeki hücrelerin %12’sinde gösterilirken; tümör kitlesinin çoğunluğunu oluşturan hücrelerde (%88) tespit edilmemiştir. Bu iki ayrı hücre populasyonu, büyüme özelliklerine göre incelendiğinde; CD45 ekspresyonu gösteren hücrelerin, klonal olarak çoğalma yeteneğine sahip olduğu ve bu hücrelerin çoğalarak, uzun süreli bölünme yeteneği olmayan majör hücre populasyonunu oluşturduğu tespit edilmiştir (41). 2004 yılında Matsui ve arkadaşları, MM hücre hattındaki bazı hücrelerin (<%5) hem myelomatöz plazma hücreleri ve hem de sağlıklı plazma hücreleri için karakteristik bir yüzey antijeni olan CD 138 (*Syndecan-1*)’i, eksprese etmediği ve bu hücrelerin klonal çoğalma yeteneğinde olduğunu göstermiştir. *In vivo* veya *in vitro* MM hücre populasyonlarında 1/100-100 000 oranında bulunan bu hücreler, “Multiple myelom kök hücresi” olarak tanımlanmıştır (2, 24, 25). Başka bir çalışmayla, CD34-CD138+ hücreler, obez olmayan-immün yetersizliği olan farelerde yeni bir tümör oluşturamazken; CD34- CD138- hücrelerin yeni bir tümör oluşturabildiği tespit edilmiştir (42).

Matsui ve arkadaşları, MM kök hücresinin, kök hücreye spesifik antijen olan CD34’ün eksprese edilmediği daha ileri bir farklılaşma basamağında olduğunu düşünürken; başka bir grup, CD138+ MM hücrelerinin CD34 eksprese eden bir alt

populasyonu olduğunu iddia etmiştir (43). MM hücrelerinin fenotipik karakterizasyonu ile ilgili çalışmalarda, CD138- hücrelerin karakteristik olarak, CD19, CD20, CD22, CD27, CD45 ve CD52 gibi B hücre antijenlerini de eksprese ettiği ve klonalitenin bu antijenlerin ekspresyonu ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Malign CD138- hücrelerin farklılaşarak CD 138+ malign plazma hücrelerine dönüşebildiği de rapor edilmiştir (2, 42, 44, 45). Bir başka çalışmada, MM hastalarının, Ig gen dizileri incelendiğinde erişkin plazma hücreleriyle klonal olarak bağlantılı olduğu anlaşılan, farklılaşmanın ilkel safhalarındaki B hücrelerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Hastalığın seyrindeki rolü tam olarak bilinmeyen bu hücrelerin, tedaviye direnç oluşturan ve çoğalan hücre populasyonunu teşkil eden “myelom kök hücreleri” olduğu düşünülmüştür (46).

Standart MM tedavisi için kullanılan Dexamethasone, Bortezomib, Lenalidomide ve 4-hydroxycyclophosphamide'in CD138- ve CD138+ hücre populasyonları üzerindeki etkileri *in vitro* incelendiğinde, CD138+ hücrelerin bu ajanlarla baskılanabildiği ancak CD138- hücrelerin etkilenmediği gözlemlenmiştir. CD138- MM kök hücrelerinin, malign olmayan kök hücrelerde olduğu gibi, ilaçları hücre dışına pompalama kapasitesinin oldukça yüksek olduğu da Flow sitometrik analizlerle tespit edilmiştir (2). Yapılan bir başka çalışmada ise, Hoechst33342 boyasını hücre dışına püskürten ve bu yüzden ilaca dirençli olduğu düşünülen MM hücre populasyonunun Lenalidomide ile baskılanabildiği iddia edilmiştir (47). MM'de ilaç direncine yönelik araştırmalarda, B hücre fenotipi taşıyan MM hücrelerinin, önemli bir *ABC taşıyıcı* olan *P-glikoprotein*'i eksprese ettiği gösterilmiştir. *ABC taşıyıcılar*, hücre membranında yer alan ATP bağımlı taşıyıcı proteinlerdir ve özellikle sağlıklı kök hücrelerin sitotoksik ajanlara karşı korunmasında fonksiyoneldir (30, 48). Henüz tedavisine başlanmamış MM hastalarında majör MM populasyonunu teşkil eden plazma hücrelerinin; standart MM tedavileri (ör. Melphalan, Prednisone vb) ile önemli oranda yok edilebildiği; tedavi sonrası relapstaki hastalarda ise, tedaviye dirençli ve çoğalarak majör populasyonu meydana getiren hücrelerin daha yüksek oranda tespit edildiği ve relaptik vakaların bu sebeple daha agresif seyrettiği bildirilmiştir (49). MM plazma hücreleri de fenotipik olarak *P-glikoprotein*'i eksprese ediyor olmasına rağmen; Rho123 (Rhodamine123) boyası ile boyandığında veya kemoterapötik bir ajan olan Adriamycin'le muamele edildiğinde; plazma hücrelerinin bu ajanları hücre dışına püskürtmedikleri gözlenmiştir.

İlaç direnci gösteren hücreler ise fenotipik olarak analiz edildiğinde, bu hücrelerin CD34+ olduğu gözlenmiştir (50). Yine önemli bir *ABC taşıyıcı* olan *ABCG2*’nin de MM hücrelerinde eksprese edildiği bildirilmiştir (51).

Embriyonik kök hücrelerde klonal çoğalmadan sorumlu *SOX-2* ekspresyonunun, MM kök hücrelerinde gözlenirken, MM plazma ve sağlıklı plazma hücrelerinde gözlenmemesi, MM kök hücrelerinin klonalite yeteneğiyle ilişkilendirilmiştir. Yapılan çalışmalarda, MM kök hücrelerinin, *in vitro*, klonal çoğalması *anti-SOX-2* muamelesi ile baskılanabilmiştir (52). Evolusyonel olarak oldukça korunmuş olan ve embriyonik kök hücrelerin göç ve farklılaşması gibi mekanizmaları düzenleyen *Hedgehog (Hh)*, *Wnt (Wingless)* ve *Notch* yolakları, erişkin dokularda inaktifken; MM kök hücrelerinde aktiftir. Bu durum, MM kök hücreleri ve embriyonik kök hücrelerin de ortak fonksiyonları olduğunu ve aynı yolaklar üzerinden regüle edildiğini kanıtlamaktadır (33).

G0 fazında tutulum, normal erişkin kök hücrelerde çeşitli kimyasallara karşı direnç sağlanmasında majör mekanizmadır (51). MM hücrelerinde yapılan hücre döngüsü analizlerinde, kök hücre fenotipine sahip hücrelerin çoğunlukla G0’da olduğu gösterilmiştir (2).

Tüm bu bulguların aksine; bir başka çalışma; CD138- ve CD138+ hücre popülasyonlarının her ikisinde de CD138 gen ekspresyonunun aynı düzeyde aktif olduğunu; CD138- popülasyonun ise apoptotik hücre markırı olan Annexin V yönünden daima pozitif olduğunu göstermiştir. Plazma hücrelerinin apoptoza girmesiyle CD138 ekspresyonunu kaybettiği CD138- olarak ayrıştırılan hücrelerin yalnızca apoptotik bir kalıntı olduğu iddia edilmiştir (53). Bir başka çalışma ise; klonal CD138- CD19- plazma hücre popülasyonun, CD19+ B hücre popülasyonu ile ilişkili olmadığını; farklılaşmanın erken aşamasındaki CD19+ hücrelerin kültürde koloni oluşturmadığını göstermiştir. İmmüitesi baskılanmış tavşan modelinde *in vivo* MM oluşumu incelendiğinde ise; CD138- CD19- hücrelerin MM oluşturduğu; hatta CD138+ hücrelerin de CD138-’lere göre daha yavaş olsa da MM oluşturduğu ancak CD19+ hücrelerin MM oluşturmadığı gösterilmiştir. Sonuç olarak, CD138- klonal çoğalma yeteneğindeki hücrelerin, plazma hücrelerinin farklı bir alt grubu olabileceği; ancak farklılaşmanın erken aşamasındaki B hücreleri olmadığı iddia edilmiştir (54). Bu konunun yapılacak daha detaylı çalışmalarla

değerlendirilerek literatüre kazandırılması gerekmektedir. Biz de bu düşünceyle, MM hücrelerini yüzey antijenlerine göre karakterize ederek ve önerilen kanser kök hücresi fenotipini taşıyıp taşımasına göre ayırıştırarak gösterdikleri kök hücre karakteristiklerini belirlemeyi amaçladık.

4.3. Propolis ve CAPE

4.3.1. Propolis

Arıların çeşitli bitkilerden topladığı özütlerle, reçinemsi bir madde haline getirdiği Propolis; arılar tarafından kovanların onarılmasında ve dezenfeksiyonunda kullanılmaktadır (55). Halk arasında ve alternatif tıpta ise pek çok hastalığın tedavi edilmesinde kullanılan Propolis, 1950’li yıllardan bu yana bilim çevrelerince de ilgilenilen bir madde olmuştur. Ham propolisin kompozisyonu, genel olarak %50 reçine ve bitkisel balsam, %30 balmumu, %10 esansiyel ve aromatik yağlar, %5 polen ve %5 diğer organik maddelerden oluşmaktadır. Kimyasal yapısını ise, aminoasitler, fenolik asitler, fenolik asit esterler ve flavonoidler, sinamik asit, kumarik asit, terpenler, hesperatin, nikotinik asit, kafeik asit ve kafeik asit fenil ester (CAPE) oluşturmaktadır (56). Bu maddelerin analjezik, antienflamatuar, antibakteriyel, antifungal, antiviral antioksidan ve antitümöral etkileri gösterilmiştir (57-60).

4.3.2. CAPE (Kafeik Asit Fenetil Ester)

Propolis’in önemli bir bileşeni olan CAPE, molekül formülü $C_{17}H_{16}O_4$; molekül ağırlığı 284,31 olan flavonoid benzeri bir moleküldür (Sigma-Aldrich, C8221). Yapısındaki hidroksil grupları, aktif bir şekilde elektron alıp vererek oksitleyici ve redükleyici özellik göstermektedirler. Çok uzun aromatik ve alifatik yapıda karbon grupları taşıdığı için aynı zamanda lipofilik özelliktedir. Böylelikle, hücre membranında kolayca geçmesi mümkün olmaktadır (61). CAPE’in proliferasyonu indükleyen ve pek çok kanserde overeksprese olduğu bilinen NFkB’yi inhibe ettiği bildirilmiştir (62). Ayrıca CAPE’in antioksidan, antienflamatuar, antiviral ve antiproliferatif etkileri de gösterilmiştir (63-65).

4.3.3. Propolis ve CAPE'in Antitümöral Etkileri

Propolis'in tümör hücreleri üzerindeki antiproliferatif, antiklonal ve apoptotik etkileri *in vitro* ve *in vivo* olmak üzere pek çok çalışmada gösterilmiştir (66). Farklı bölgelerde, farklı biktlerden elde edilen Propolis ekstraktlarının kanser hücreleri üzerindeki etkileri farklılık gösterebildiği gibi, farklı kanser dokularına ait hücrelerin de Propolis'e yanıtı değişkenlik gösterebilmektedir. Ancak yapılan tüm çalışmalar Propolis'in antitümöral bir ajan olabileceği yönünde yorumlanmaktadır. Irak Propolis'inin HL-60 ve HCT-116 hücreleri üzerindeki antitümöral etkileri araştırıldığı çalışmada, Propolis'in antiproliferatif, antitümöral ve apoptotik etkileri tespit edilmiştir. HCT-116 hücreleri ile *in vivo* tümör oluşturulan farelerde, Propolis'in oral yolla alımının toksisite oluşturmadığı ve tümör kitlesindeki mitotik hücre oranının azaldığı tespit edilmiştir (67). Skuamöz hücreli baş ve boyun kanseri hücre hatlarında Propolis'in antitümöral etkilerinin araştırıldığı çalışmada ise, Propolis'in doz ve zamana bağımlı olarak proliferasyonu ve klonaliteyi baskıladığı ve apoptoza yol açtığı tespit edilmiş; 3 hücre hattından 1'inde Propolis'in radyoterapiye karşı hassasiyet oluşturduğu gösterilmiştir (68). Propolis ekstraktlarının spesifik olarak apoptoza yol açtığı gösterilen bir diğer çalışmada ise, MCF-7 hücrelerinde, Propolis'in apoptotik etkisinin endoplazmik retikulum stresi ve kaspaz sinyalizasyonunun indüklenmesi ile gerçekleştiği gösterilmiştir (69). Bu durum, Propolis'in kanser hücrelerinde yol açtığı ölümün toksik olarak değil, fizyolojik bir ölüm şeklinde gerçekleştiğini göstermektedir. Literatürde, Propolis'in MM hücreleri üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışma henüz bulunmamaktadır.

Günümüze kadar, CAPE'in MM hücreleri üzerindeki etkisinin araştırıldığı tek çalışmada, CAPE'in ARH-77 MM hücrelerini sitotoksik olarak etkilediği bildirilmiştir (70). Ancak yapılan pek çok araştırma ise; CAPE'in tümör hücreleri üzerindeki öldürücü etkisinin sitotoksik olarak değil; apoptozu indükleyerek, fizyolojik bir şekilde gerçekleştiğini göstermekle beraber, CAPE'in selektif apoptotik etkisinin moleküler mekanizması hala tam olarak aydınlatılamamıştır (71-75).

CAPE'in, tümör hücrelerinde kemoterapi ve radyoterapiye karşı hassasiyet oluşturarak, tedavinin etkinliğini arttırdığı da rapor edilmiştir. Bunun yanında CAPE'in, sağlıklı hücelere zarar vermeden, kanser hücreleri üzerinde seçici antitümöral etkiler

gösterdiği de literatürde yer almaktadır. CAPE'in sağlıklı hücelere herhangi bir zarar vermeden kanser hücrelerinde spesifik olarak apoptozu indüklemesi, kemoterapi ve radyoterapinin zararlı etkileri göz önüne alındığında oldukça dikkat çekici bir özelliğidir (76-78).

CAPE ile kanser kök hücreleri üzerinde yapılan ilk ve tek çalışmada, CAPE muamelesine yanıt olarak meme kanseri kök hücrelerinin klonalite yeteneğini kaybettiği gözlenmiştir. Apoptotik etkinin gözlenmemiş olması, kök hücrelerin kimyasal ajanlara direnciyle ilişkilendirilmiştir. Ancak CAPE, G0'daki hücrelerin siklusa devam ederek farklılaşmasını indüklemiş ve hücrelerin kimyasal ajanlara hassasiyeti arttırılmıştır. Yapılan çalışmada CAPE, MDA-231 meme kanseri hücre hattından izole edilen kanser kök hücreleri üzerinde etkili bir inhibitör ajan olarak gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, klonal B hücreleri ve MM hücreleri tarafından da eksprese edilen *ABC taşıyıcılar* gen ailesine ait *Mdr1 (P-glikoprotein)* ekspresyonunun, MDA-231 meme kanseri hücre hattında CAPE tarafından baskılanabildiği bildirilmiş, ancak bu konudaki araştırma detaylı olarak literatüre kazandırılmamıştır (79).

4.4. Hücrelerin Yüzey Antijenlerine Göre Ayırıştırılması

Bir süspansiyon içindeki farklı hücre grupları pek çok yöntemle ayırıştırılarak saf bir hücre popülasyonu elde edilebilmektedir. Tam kan, kemik iliği veya dalak aspiratındaki hücre popülasyonundan uzaklaştırılmak istenen hücrelerin, yüzey antijenlerine spesifik tetramerik antikor kompleksiyle işaretlenerek santrifüjasyonla çöktürülmesi prensibine dayanan saflaştırma (*Enrichment*) işlemiyle, elde edilmek istenen hücreler süspansiyon içinden toplanabilmektedir. Bunun yanında nanometre boyutundaki manyetik parçacıklar taşıyan antikorlarla işaretlenen hücreler manyetik bir alana maruz bırakılarak işaretlenmemiş hücrelerden ayırıştırılabilmektedir. İstenen hücrelerin manyetik parçacıklarla işaretlenerek manyetik alanda tutulması ve işaretlenmemiş hücrelerin süspansiyondan uzaklaştırılması “pozitif seçim”; istenmeyen hücrelerin manyetik parçacıklarla işaretlenerek manyetik alanda tutulması ve süspansiyondaki hücrelerin toplanması “negatif seçim” olarak adlandırılmaktadır (80).

4.5. Flow Sitometrik Analizle Hücre Yüzey Antijenlerinin Belirlenmesi

Flow sitometri, hücrelerin, taşıdığı yüzey antijenleri veya sitoplazmik antijenlerin spesifik floresan bağlı antikörlerle işaretlenmesi ile farklı kanallardan gönderilen bir ışın demeti içindeki kapillerden hücrelerin tek tek süzülerek yaptığı ışımların analizine dayanan bir sistemdir. Bu sistemle hücrenin büyüklüğü, granülitesi, immünofenotipi, DNA içeriği, enzim aktivitesi ve canlılığı gibi pek çok özelliği belirlenebilir. Flow sitometrik analiz sistemi, hücrelerin yaptığı ışıma göre, bir histogram üzerindeki farklı bölgelere dağılımını sağlamaktadır. Bu dağılıma göre hücrelerin ilgili antijenleri ne oranda eksprese ettiği tespit edilebilmektedir. Boyut, granülite gibi özelliklerinin ve farklılaşma aşamaları ve pek çok fonksiyonel özelliklerle ilişkili antijenlerin belirlenmesiyle hücreler karakterize edilebilmektedir. Hücre canlılığı ölçümü ise, canlı hücrelerin sitozolik yüzünde bulunan Fosfatidilserin gruplarının, apoptotik hücrelerde membranın dış yüzüne göç etmesi ve floresan bağlı Annexin V'in bu gruplara spesifik olarak bağlanması prensibine dayanmaktadır. Erken apoptotik aşamadaki hücrelerde, PI (Propidyum iyodid) hücre membranı tarafından dışarı atılabilirken, geç apoptotik aşamada ve ölü hücrelerde membran bütünlüğünün bozulmasıyla hücreler PI eksprese edilebilmektedir. Bu nedenle hücrelerde apoptotik analiz yapılırken, Annexin V ve PI genellikle birlikte kullanılmaktadır. Flow sitometride hücrelerin hücre döngüsünün hangi fazında olduğu da analiz edilebilmektedir. Bu yöntemde, DNA'ya bağlanma özelliğindeki floresan boyalar kullanılmakta ve hücrenin DNA içeriği boyanma oranıyla doğru orantılı olarak tespit edilebilmektedir. Diploid hücreler G0/G1 fazında, tetraploid hücreler G2 ve mitoz fazında ve diploid ve tetraploid arasındaki hücreler S fazında olarak değerlendirilmektedir. S+G2+M toplamı S fazı fraksiyonu (SPF) olarak değerlendirilmekte ve SPF'nin yüksek olması çoğalma hızının yüksek olduğunu göstermektedir (81).

4.6. MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) Analizi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi

MTT, hücre canlılığı, sitotoksosite, mitokondriyal aktivite ve çoğalma özelliklerinin incelendiği kolorimetrik bir metoddur. Sarı renkli tetrazolyum tuzlarının, yalnızca canlı hücrelerde, MTT muamelesiyle mor renkli formazan kristallerine dönüşmesi prensibine dayanmaktadır. Formazan kristallerinin oluşumu,

spektrofotometrik okuyucu ile 570nm dalga boyunda okutularak belirlenmektedir. Hücrelere verilen bir maddenin sitotoksik etkilerini incelemek üzere yapılan MTT analizinde hücrelerin canlılık oranı, kontrol grubu hücrelerinin absorbansıyla kıyaslanarak,

$$\text{Canlılık oranı} = \frac{\text{muameleli hücrelerin absorbansı} \times 100}{\text{muamelesiz hücrelerin absorbansı}}$$

formülü ile hesaplanmaktadır (82).

4.7. Koloni Formasyonu Analizi

Koloni formasyonu analizi, farklılaşmamış öncü hücrelerin, yarı katı bir besiyerindeki ortak bir hücreden orjinlenerek hücre kolonisi oluşturma yeteneğine göre büyüme ve farklılaşma özelliklerini incelemek için kullanılan bir metoddur. Yarı katı besiyerinin prensibi, hücrelerin süspansiyon kültür sisteminde olduğu gibi besiyeri içindeki hareketinin önlenmesi ve aynı kökene ait hücrelerin bir arada kalmasına dayanmaktadır. Belirli sayıdaki hücre ile başlatılan kültürde, 14-21 günde oluşan hücre kolonilerinin sayısı ve morfolojisi, hücrelerin koloni oluşturma yeteneğinin olup olmadığını göstermektedir. Bununla beraber, oluşan hücre kolonileri toplanarak Giemsa boyama ile morfolojik özelliklerine göre ve Flow sitometrik analizle farklılaşma aşamalarına göre karakterize edilebilmektedir. Bu sayede öncü bir hücrenin farklılaşarak hangi tip hücre serisini oluşturduğunu tespit etmek mümkün olmaktadır (83).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5. 1. Gereç

5.1.1. Çalışma Grubu

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yürütülen bu çalışmada, 03.02.2012-08.06.2012 tarihleri arasında Hematoloji Polikliniği'nde MM tanısı almış 11 hasta (MM01-MM11) ve 2 sağlıklı donör (MK07, MK08) çalışma grubunu oluşturdu. Çalışmaya dahil edilen her birey çalışmayla ilgili bilgilendirilerek onayları alındı. Alınan kemik iliği aspiratları ve kan örneklerinden primer kültür yapıldı. RPMI8226 (ATCC[®], CCL-155[™]) hücre hattı, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Hematoloji Bilim Dalı'ndan temin edildi.

Çalışma grubunu oluşturan bireyler, KTÜ Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik kurulundan 04.07.2011 tarih ve 2011/86 sayılı belge ile alınan izin doğrultusunda çalışmaya dahil edilmiştir.

Bu çalışma, 111S322 numaralı proje kapsamında TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

5.1.2. Kimyasallar

CAPE	Sigma Aldrich, C8221
DMSO	Sigma Aldrich, 472301
EDTA	Sigma Aldrich, E-5134
EtOH	Sigma Aldrich, 32221
FBS	Invitrogen, 10270-098
CD138-FITC	BD Bioscience, 347214
CD34-PerCp	BD Bioscience, 345803
CD19-PE	BD Bioscience, 345777
CD27-APC	BD Bioscience, 337169
P-gp-PE	BD Bioscience, 340555
CD338-APC	BD Bioscience, 561451
Histopaque	PAA, J11-004

Izotipik kontrol:IgG1/IgG1	BD Bioscience, 349526
Izotipik kontrol:IgG1 PERCP	BD Bioscience, 345817
Izotipik kontrol:IgG1 APC	BD Bioscience, 345818
IMDM	Biological Industries, 01-058-14
Methocult metilselüloz besiyeri	StemCell Tec, H4535
PBS	Invitrogen, 14190
Pen-Strep	Invitrogen, 15140-148
Rhodamine123	Sigma Aldrich, R8004
RPMI1640 Fenol red'siz	Biological Industries, 01-103-1A
RPMI1640	Invitrogen, 21875-034
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide	Sigma Aldrich, M2128
Tripan mavisi	Sigma Aldrich, T8154

5.1.3. Kitleler

CycleTEST™ PLUS DNA Reagent Kit	BD Biosciences, 340242
DNA QC Particles	BD Bioscience, 349523
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD Biosciences, 556547
Human CD138 Selection Kit	StemCell Tec, 18357
Human CD34 Selection Kit	StemCell Tec, 18056
Multiple Myeloma Enrichment Cocktail	StemCell Tec, 15129

5.1.4. Cihazlar

Buzdolabı (+4°C)	Arçelik, Türkiye
Derin dondurucu (-20°C)	Bosh, Türkiye
Elisa Plate Reader	Eppendorf, Almanya
Etüv (37°C)	Memmert, Almanya
FACS Calibur	BD Biosciences, Kanada
Hassas terazi	Ahaus, ABD
Invert mikroskop	Nikon, Japonya
Lamin air flow hood	Heraeus, Almanya
Magnet	StemCell, Kanada

Mikrosantrifüj	Thermo I EC, ABD
Otomatik pipet seti	Gilson, ABD
Ph metre	Hanna, Portekiz
Pipet aid	Drummond Scientific, ABD
Soğutmalı yüksek devirli santrifüj	Eppendorf, Almanya
Su banyosu	Memmert, Almanya
Vorteks	Labinco L-46, Hollanda

5.1.5. Sarf Malzemeleri

10ml enjektör	Ayset, Türkiye
Falkon Tüpler (15ml, 50ml)	Greiner, Almanya
Serolojik pipetler (5, 10, 25ml)	Greiner, Almanya
Pasteur pipetleri	Isolab, Almanya
Kültür flaskları (T25, T75)	Greiner, Almanya
12x75mm polisitren tüpler	BD Biosciences, Kanada
Pipet uçları (10, 200, 1000µl)	Greiner, Almanya
Petri kapları (35mm, 100mm)	Greiner, Almanya
Plak (6 ve 96 kuyucuklu)	Greiner, Almanya
Eppendorf tüpler (1,5ml)	Greiner, Almanya
70µm nylon mesh	BD Biosciences, Kanada
Thoma lamı	Marienfeld, Almanya

5.1.6. Solüsyonlar

1. EDTA Solüsyonları

372,24mg EDTA 100ml PBS içinde çözülerek ve otoklavlanarak 100ml 10mM EDTA solüsyonu hazırlandı. 20ml 10mM EDTA solüsyonu 80ml PBS ile dilue edilerek 100ml 2mM EDTA solüsyonu hazırlandı. EDTA solüsyonları oda sıcaklığında muhafaza edildi.

2. Seçilim Solüsyonu

88ml PBS'e 2ml FBS (Fötal bövin serum) ve 10ml 10mM EDTA solüsyonu ilave edilerek, %2 FBS, 1mM EDTA olacak şekilde, 100ml seçilim solüsyonu hazırlandı ve +4°C'de muhafaza edildi.

3. Kültür Besiyeri

420ml RPMI1640 besiyerine 75ml FBS ve 5ml Pen-Strep ilave edilerek %15 FBS, %1 Pen-Strep olacak şekilde, 500ml kültür besiyeri hazırlandı ve +4°C'de muhafaza edildi.

4. Rho123

5mg Rho123 5ml %100 EtOH ile suspanse edilerek 5ml 1mg/ml Rho123 hazırlandı ve +4°C'de muhafaza edildi.

5. MTT solüsyonu

1g Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide 6ml DMSO içinde çözülerek MTT solüsyonu hazırlandı ve -20°C'de muhafaza edildi.

6. Propolis (100mg/ml)

Türkiye Arıcılar Birliği'nden elde edilen 10g ham Propolis, 100ml saf EtOH içinde çözülerek, 100ml 100mg/ml stok Propolis hazırlandı. Stok Propolis solüsyonu +4°C'de muhafaza edildi.

7. CAPE (100 mM)

Toz halinde satın alınan 1g CAPE 35,17ml DMSO içinde çözülerek 100mM stok CAPE hazırlandı. Stok CAPE solüsyonu -20°C'de muhafaza edildi.

5.2. Yöntem

5.2.1. Fikol İle Mononuklear Hücrelerin İzolasyonu

1. Kemik iliği örneği, içerisinde 1ml 10mM EDTA bulunan enjektöre alındı.
2. Kemik iliği PBS ile 1:1 oranında dilue edildi.
3. 15ml'lik falkon tüpe 5ml Fikol konuldu ve 5ml kemik iliği enjektör yardımıyla falkon tüpün kenarından 45° açıyla süzdürülerek Fikol üzerine yayıldı.

4. Falkon tüp 445x g'de 35dk santrifüj edildi.
5. Santrifüjden sonra mononuklear hücreler Pasteur pipeti yardımıyla toplanarak temiz bir falkon tüpe aktarıldı.
6. Mononuklear hücrelere 1:1 oranında PBS ilave edilerek 2-3 kez pipetlendi ve 400x g'de 10dk santrifüj edildi.
7. Supernatant uzaklaştırılarak elde edilen hücre pelleti saflaştırma, hücre seçilimi ve kültür için hazır hale geldi.

5.2.2. MM Hücrelerinin Saflaştırılması

RosetteSep® Multiple Myeloma Enrichment Cocktail kullanılarak, kemik iliği aspiratında bulunan MM hücreleri saflaştırıldı.

1. 10ml kemik iliği aspiratı içinde 1ml 2mM EDTA bulunan tüpe alındı.
2. Kemik iliği aspiratına 200µL *Enrichment* kokteyli eklenerek ve iyice karıştırıldı.
3. Oda sıcaklığında 20dk inkübe edildi.
4. 5ml seçim solusyonu ilave edildi.
5. Elde edilen süspansiyon 15ml Falkondaki 5ml Fikol üzerine yayıldı.
6. 1200xg'de 20dk santrifüj edildi.
7. Santrifüjden sonra mononuklear hücreler Pasteur pipeti yardımıyla toplanarak ayrı bir falkon tüpe aktarıldı.
8. Hücreler seçim solusyonu ile yıkanarak santrifüj edildi.
9. Supernatant uzaklaştırılarak elde edilen hücre pelleti hücre seçilimi ve kültür için hazır hale geldi.

5.2.3. MM Hücrelerinin Primer Kültürü

Fikol ile izolasyonu yapılan mononuklear hücreler 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde kültür besiyeri ile yatay flasklarda ve 37°C %5 CO₂ içeren ortamda kültüre edildi.

5.2.4. RPMI8226 Hücrelerinin Kültürü

RPMI8226 hücreleri 500 000 hücre/ml olacak şekilde kültür besiyeri ile yatay flasklarda ve 37°C %5 CO₂ içeren ortamda kültüre edildi. Hücreler 48 saatte 1 mikroskop altında kontrol edilerek besiyeri, taze besiyeri ile değiştirildi.

5.2.5. MM Kök Hücrelerinin İzolasyonu

5.2.5.1. CD138 Negatif Seçilimi

Human CD138 Selection Kit kullanılarak, hücre popülasyonundaki CD138 yönünden negatif olan hücreler izole edildi.

1. Hücreler seçim solusyonu ile 1×10^8 hücre/ml olacak şekilde suspanse edildi.
2. 1ml hücre süspansiyonu 12x75mm polistren tüpe alındı.
3. Tüpe 250µl seleksiyon kokteyli eklenerek pipetlendi.
4. Oda sıcaklığında 15dk inkübe edildi.
5. Manyetik nanopartiküller en az 5 kez pipetaj yapılarak iyice karıştırıldı ve 125µl manyetik nanopartikül hücre süspansiyonuna eklenerek 2-3 kez pipetlendi.
6. Oda sıcaklığında 10dk inkübe edildi.
7. Hücre süspansiyonuna total hacim 2,5ml olacak şekilde seçim solusyonu eklendi ve 2-3 kez pipetajla yavaşça karıştırıldı.
8. Tüpün kapağı açık şekilde magnete yerleştirildi ve oda sıcaklığında 10dk inkübe edildi.
9. İnkübasyon sonunda tüpteki süspansiyon yeni bir tüpe aktarılarak yeni tüp tekrar magnete yerleştirildi ve oda sıcaklığında 10dk inkübe edildi.
10. Bir önceki adım son kez tekrarlanarak supernatant yeni tüpe aktarıldı.
11. 400xg'de 10dk santrifüj edilen tüpteki supernatant uzaklaştırıldı ve hücreler kültüre edilmek üzere istenen besiyeri ile suspanse edildi.

5.2.5.2. CD34 Pozitif Seçilimi

Human CD34 Selection Kit kullanılarak, hücre popülasyonundaki CD34 yönünden pozitif olan hücrelerin izole edilmesi amaçlandı.

1. Hücreler seçim solusyonu ile 1×10^8 hücre/ml olacak şekilde suspanse edildi.
2. 1ml hücre süspansiyonu 12x75mm polistren tüpe alındı.
3. 100µl seleksiyon kokteyli eklenerek pipetlendi.
4. Oda sıcaklığında 15dk inkübe edildi.
5. Manyetik nanopartiküller en az 5 kez pipetlenerek iyice karıştırıldı ve 50µl manyetik nanopartikül hücre süspansiyonuna eklenerek 2-3 kez pipetlendi.
6. Oda sıcaklığında 10dk inkübe edildi.

7. Hücre süspansiyonuna total hacim 2,5ml olacak şekilde seçilim solusyonu eklendi ve 2-3 kez yavaşça pipetlendi.
8. Tüpün kapağı açık şekilde magnete yerleştirildi ve oda sıcaklığında 10dk inkübe edildi.
9. İnkübasyon sonunda hücre süspansiyonu magnetteki tüpten uzaklaştırıldı ve tüpe 2,5ml seçilim solusyonu ilave edilerek tüp yeniden magnete yerleştirildi.
10. Oda sıcaklığında 5dk inkübasyondan sonra 8 ve 9. adımlar tekrar edildi.
11. Supernatant uzaklaştırıldıktan sonra tüpün çeperinde kalan hücreler kültüre edilmek üzere besiyeri ile süspanse edildi.

5.2.6. Flow Sitometri İle Yüzey Antijenlerinin Tayini

1. Antijen tayini yapılacak hücreler PBS ile 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde suspanse edildi.
2. Kontrol grubu ve işaretli hücreler için 2 ayrı tüp hazırlandı.
3. Kontrol tüpüne 10µl IgG1/IgG1, 10µl IgG1-PerCp ve 5µl IgG1-APC izotipik kontrol konuldu.
4. Floresan işaretli markırlarla boyanacak hücreler için tüpe 20µl CD138-FITC, 20µl CD19-PE, 20µl CD34-PerCp, 5µl CD27 APC konuldu.
5. Her 2 tüpe 100'er µl hücre süspansiyonu ilave edildi.
6. Tüpler düşük hızda 4-5 saniye vorteksenerek, oda sıcaklığında ve karanlıkta 20dk inkübe edildi.
7. 4 renkli flow sitometri cihazında her bir tüpte 50 000 hücre saydırıldı.
8. Sayılan hücrelerin analizi CellQuest analiz programında (BD Biosciences, Kanada) yapıldı.

ABC Taşıyıcı ekspresyonlarının analizi için yukarıdaki protokol uygulandı. 20µl CD243-PE ve 5µl CD338-APC kullanılarak hücreler boyandı.

5.2.7. Rho123 Püskürtme Analizi

1. Kontrol grubu ve boyanacak hücreler için 2 ayrı tüp hazırlandı.
2. Hücreler PBS ile 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde suspanse edildi.
3. Kontrol tüpüne 100µl hücre süspansiyonu konuldu.
4. 1ml hücre süspansiyonuna 5µl Rho123 ilave edilerek hücreler boyandı.

5. Tüpler düşük hızda 4-5 saniye vortekslenerek, oda sıcaklığında ve karanlıkta 15dk inkübe edildi.
6. 4 renkli flow sitometri cihazında her bir tüpte 50 000 hücre saydırıldı.
7. Rho123 işaretli hücreler FL1 kanalında okutuldu.
8. Sayılan hücrelerin analizi CellQuest analiz programında (BD Biosciences, Kanada) yapıldı.

5.2.8. Koloni Formasyonu Analizi

Hücrelerin koloni oluşturma yeteneğini analiz etmek için metilselüloz içeren yarı katı besiyeri Methocult kullanıldı.

1. Besiyeri +4°C’de bir gece inkübe edilerek çözüldü.
2. CD34+ hücreler %2 FBS içeren IMDM besiyerinde 500 000 hücre/ml olacak şekilde süspanse edildi.
3. 0.3ml hücre süspansiyonu 3ml besiyeri üzerine eklenerek ve vortekslendi.
4. 1.1ml hücre süspansiyonu 16ga uçlu enjektörle 35mm petri kabına yayıldı ve bu şekilde 3 petri hazırlandı.
5. 100mm petri kabına 4-5ml steril distile su konularak, 35mm petriler su içine yerleştirildi ve 37°C %5 CO₂’li etüvde 14-21 gün inkübasyona bırakıldı.
6. İnkübasyon süresi sonunda oluşan koloniler invert mikroskop altında sayıldı. Bir arada bulunan en az 40 hücre 1 koloni olarak değerlendirildi.

5.2.9. Hücre Sayımı ve Canlılık Analizi

1. Eppendorf tüpe 10µl hücre süspansiyonu alındı ve 10µl Tripan mavisini eklenerek pipetlendi.
2. Oda sıcaklığında 5dk inkübe edildi.
3. Thoma lamının her 2 tarafına 10’ar µl hücre-boya karışımı yüklenerek invert mikroskopta 10X objektifle sayım yapıldı.
4. Tripan mavisini hücre içine alarak mavi boyanmış hücreler ölü; parlak görünen hücreler canlı olarak değerlendirildi.
5. Hücre sayısı, Thoma lamının her 2 alanındaki hücrelerin tamamı sayılarak, dilüsyon faktörü x sayılan hücre sayısı/ml x 10⁴ formülü ile hesaplandı.

5.2.10. MTT Analizi

1. Hücreler, 96 kuyucuklu plaklara, her kuyucukta 5000 hücre olacak şekilde ekildi.
2. Plaklar 400xg'de 10dk santrifüj edilerek besiyeri uzaklaştırıldı.
3. Her kuyucuğa 10µl MTT boyası ve 190µl RPMI1640 fenol kırmızısı içermeyen besiyeri ilave edilerek plaklar 37°C'de 2 saat inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonunda plaklar 400xg'de 10dk santrifüj edilerek besiyeri uzaklaştırıldı.
5. Her kuyucuğa 200µl DMSO ilave edildi.
6. Sarı renkli tetrazolium tuzlarının, yalnızca canlı hücrelerde mor renkli formazan kristallerine dönüşmesiyle oluşan mor renk şiddetinin absorbansı 570nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü.
7. Hücrelerin canlılık oranı, kontrol grubu hücrelerinin absorbansı ile kıyaslanarak şu şekilde hesaplandı:

$$\text{Canlılık oranı} = \frac{\text{muameleli hücrelerin absorbansı} \times 100}{\text{muamelesiz hücrelerin absorbansı}}$$

5.2.11. Annexin V – PI Testi

Apoptotik ve ölü hücrelerin tespiti için FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I kullanıldı. Deneyin optimizasyonu için öncelikle 1 grup ölü hücre ve 1 grup canlı hücre cihaza tanıtıldı.

1. Hücreler 2 kez soğuk PBS'le yıkandı ve 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde 1X Annexin Binding Buffer ile suspanse edildi.
2. Biri kontrol tüpü, ikincisi 2.5µl Annexin V, üçüncüsü 5µl PE ve dördüncüsü 2.5µl Annexin V ve 5µl PI olmak üzere 4 deney tüpü hazırlandı.
3. Tüplere 100µl hücre süspansiyonu eklenerek düşük hızda 4-5sn vortekslendi.
4. Tüpler oda sıcaklığında ve karanlıkta 15dk inkübe edildi.
5. 4 renkli flow sitometri cihazında her bir tüpte 50 000 hücre saydırıldı.
6. Annexin V, FL1; PI, FL-2 kanalında okutuldu.
7. Sayılan hücrelerin analizi CellQuest analiz programında (BD Biosciences, Kanada) yapıldı.

8. Annexin V yönünden pozitif olan hücreler; erken apoptotik, PI yönünden ve hem PI hem de Annexin V yönünden pozitif olan hücreler ölü hücreler olarak değerlendirildi.

5.2.12. Hücre Döngüsü Analizi

Hücrelerin, çoğalma postansiyeliyle ilgili olarak, hücre döngüsünün hangi evresinde bulunduğunu araştırmak için CycleTEST™ PLUS DNA Reagent Kit kullanıldı.

1. 1×10^6 hücre tampon solusyonu ile 3 kez yıkandı.
2. $300 \times g$ 'de 5dk santrifüj edilerek supernatant uzaklaştırıldı.
3. 250µl solusyon A eklenerek çalkalanan tüp oda sıcaklığında 10dk inkübe edildi.
4. 200µl solusyon B eklenerek çalkalanan tüp oda sıcaklığında 10dk inkübe edildi.
5. 200µl solusyon C eklenerek çalkalanan tüp oda sıcaklığında 10dk inkübe edildi.
6. İnkübasyon sonunda hücreler 70µm naylon filtreden süzüldü.
7. 4 renkli flow sitometri cihazında her bir tüpte 50 000 hücre saydırıldı.
8. Hücrelerin içerdiği DNA miktarları Modfit analiz programı (BD Biosciences, Kanada) kullanılarak analiz edildi.

5.2.13. Propolis ve CAPE'in Hazırlanması ve Hücrelere Muamelesi

5.2.13.1. Propolis'in Hazırlanması ve Hücrelere Muamelesi

10ml kültür besiyerine 5µl 100mg/ml Propolis ilave edilerek 50µg/ml; 10µl 100mg/ml Propolis ilave edilerek 100µg/ml ve 20µl 100mg/ml Propolis ilave edilerek 200µg/ml Propolis hazırlandı.

1. Propolis muamelesi için kullanılan 6 kuyucuklu plakta kontrol grubu olarak, muamele edilen Propolis oranına eşdeğer oranda saf alkol ilave edilen hücreler kullanıldı.
2. Propolis'in 50µg/ml, 100µg/ml ve 200µg/ml dilüsyonları kullanılarak hücreler 24, 48, 72 ve 96 saat muamele edildi.

5.2.13.2. CAPE'in Hazırlaması ve Hücrelere Muamelesi

10ml kültür besiyerine 2,5µl 100mM CAPE ilave edilerek 25µM; 5µl 100mM CAPE ilave edilerek 50µM CAPE hazırlandı. Stok solüsyon +4°C'de muhafaza edildi.

1. CAPE muamelesi için kullanılan 6 kuyucuklu plakta kontrol grubu olarak, muamele edilen CAPE oranına eşdeğer oranda DMSO ilave edilen hücreler kullanıldı.
2. CAPE'in 25µM ve 50µM dilüsyonları kullanılarak hücreler 24, 48, 72 ve 96 saat muamele edildi.

5.2.14. İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler, SPSS programı (IBM, ABD) kullanılarak, aynı hücre gruplarının kendi içinde farklı konsantrasyonlardaki Propolis ve/veya CAPE ile muamele edilmesiyle elde edilen verilerin karşılaştırmaları için *McNemar's* testi; aynı konsantrasyonlardaki Propolis ve/veya CAPE ile muamele edilen farklı hücre gruplarının karşılaştırılması için *Student's t Test* ve *Ki Kare* testi kullanıldı. Parametrik olmayan 2'den fazla veri değerinin bulunduğu ölçümlerde *Kruskal Wallis* analizi ve *Mann Whitney U* testi kullanıldı. *p* değeri 0.05'ten küçük olan istatistikler anlamlı; 0.05'ten büyük olanlar ise anlamsız olarak değerlendirildi.

6. BULGULAR

Bu çalışmaya MM hasta popülasyonundan alınan kemik iliği aspiratlarından kök hücrelerin izole edilmesi amaçlanarak 11 MM hastası dahil edildi. Kontrol olarak sağlıklı 2 bireyden kan örnekleri alındı. Hasta materyallerinden kök hücre izolasyonu için yeterli hücre sayısı elde edilemediğinden çalışmaya tipik bir MM hücre hattı olan RPMI8226 ile devam edildi. Bu hücrelerden kök hücre izolasyonu yapıldı ve kök hücreler Flow sitometrik analizlerle CD19, CD27, CD34 ve CD138 hücre yüzey antijenleri ve ilaç direnciyle ilişkili *ABC taşıyıcılar* ailesinden olan *P-glikoprotein* ve *ABCG2* ekspresyonları yönünden karakterize edildi. *ABC taşıyıcıların* fonksiyonelliğini incelemek için hücrelerin Rho123 boyasını püskürtme yeteneği analiz edildi. Hücrelerin metilselüloz içeren yarı katı kültür besiyerindeki klonal çoğalma yeteneği incelendi. Hücreler Propolis ve CAPE ile muamele edilerek hücre yüzey antijenleri, *P-glikoprotein* ve *ABCG2* ekspresyonlarında gerçekleşen değişimler incelendi. Propolis ve CAPE'in hücreler üzerindeki apoptotik etkisini incelemek için MTT ve Annexin V-PI analizi yapıldı. Sağlıklı bireylerden alınan kan örneklerine ait mononuklear hücreler de aynı oranda Propolis ve CAPE ile muamele edilerek malign ve sağlıklı hücrelerin canlılığı üzerindeki etkisi karşılaştırıldı. Propolis ve CAPE'in hücre döngüsü üzerindeki etkileri yapılan hücre döngüsü analizi ile incelendi.

6.1. MM Hücrelerinin Primer Kültürü

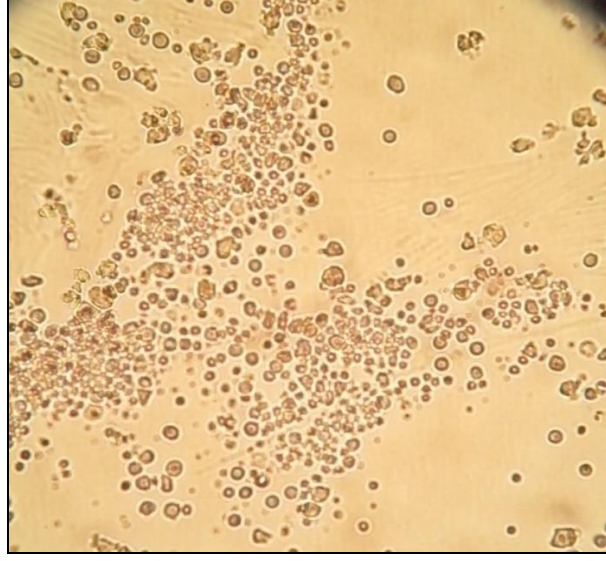
MM öntanısı ile Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Polikliniği'ne gelen 11 hastanın (MM1-MM11) onayı alınarak, teşhis için aspire edilen kemik iliği materyallerinin bir kısmı primer kültür yapılmak üzere temin edildi. Alınan aspirasyon materyalinden sırasıyla, Fikol ile mononuklear hücre izolasyonu, Tripan mavisi ile hücre sayımı ve CD34 ve CD138 taşıyıcılığına göre hücrelerin ayrıştırılması ile uzun süreli hücre kültürü denemeleri yapıldı. Hem MM1, hem de MM2'de CD34+ ve CD34- olarak ayrıştırılan hücrelerden, CD138+ ve CD138- hücreler ayrıştırılarak elde edilen hücre gruplarının kültürü başarılı bir şekilde devam etmediği için, sonraki denemelerde (MM3 ve MM4) Fikol seperasyonundan sonra hücrelerin 1 haftalık kültürünü takiben manyetik ayrıştırma yapıldı. Manyetik hücre ayrımıyla elde edilen hücreler yeterli sayıda olmadığı için bu hücrelerle Flow sitometrik analiz gerçekleştirmek mümkün olmadı. MM5 kodlu hasta materyali, 20 mM 1ml EDTA

içersinde laboratuara getirilmesine rağmen şiddetli koagülasyon sebebiyle mononükleer hücre izolasyonu yapılamadı. Bir sonraki denemede (MM6) kültür koşullarını iyileştirebileceği düşünülerek, %10 oranında FBS'le başlanan kültüre paralel olarak, %20 FBS içerikli kültür denendi. Bir sonraki hastaya ait hücrelerin (MM7) kültürü süresince, belirli aralıklarla hücre sayımı yapıldı ancak kültürdeki hücrelerin çoğalmadığı gözlemlendi.

Sonraki denemelerde (MM8 ve MM9) MM saflaştırıcı kit (Human Multiple Myeloma Cell Enrichment Cocktail, Stem Cell Tec.) kullanılarak, seçici olarak MM B lenfosit ve plazma hücreleri saflaştırıldı. İzole edilen hücreler, manyetik ayırma yöntemiyle CD138+ ve CD138- olmak üzere ayrıştırıldı. Ancak bu ayırma sonucunda yeterli sayıda canlı hücre elde edilemedi.

Sonraki hasta materyali (MM10), koloni formasyonu analizinde kullanacağımız, IL3, IL-6 ve koloni stimüle edici faktörler ilaveli besiyeri (MethoCult, Stem Cell Tec.) ile kültüre edildi. Bu besiyerinin standart besiyerimize belirli oranlarda ilavesiyle sürdürülen kültürlerde hücrelerimiz başlangıç için sağlıklı bir gelişim göstermesine rağmen, gelişimleri uzun süreli olmadı.

MM10 ile yapılan diğer denemede, stromal hücreler flask yüzeyine tutundurulularak, MM hücrelerinin kültürü desteklemesi amaçlandı. Bu hücrelerin kültürü, sürekli aynı flasklarda, tripsinizasyon yapılmadan sürdürüldü. Takip edilen kültürler, hücrelerin en iyi büyüme koşullarının 500 000 hücre/ml ile kültüre başlanması ve flask yüzeyinde stromal hücrelerin mevcut bulunmasıyla sağlanacağını gösterdi (Resim 1). Bu şartlarda onsekiz günlük kültürde büyüyen hücreler, yüzeyde stromal hücrelerin bulunmadığı yeni flasklara aktarıldıktan 2 gün sonra canlılıklarını kaybetti. Tekrarlayan denemeler, stromal hücrelerle oluşturulan destekleyici tabakanın, kültürün canlı kalma süresini uzattığını ancak hücre sayısında herhangi bir artış olmadığını gösterdi.



Resim 1. Primer MM hücrelerinin kültürde 10. Günü (MM10)

Bir sonraki hasta materyalinin (MM11) kültüründe, FBS yerine insan AB serumu kullanıldı. Başlangıçta sağlıklı bir gelişim gösteren hücreler, kısa sürede canlılığını yitirdiğinden kültür sonlandırıldı.

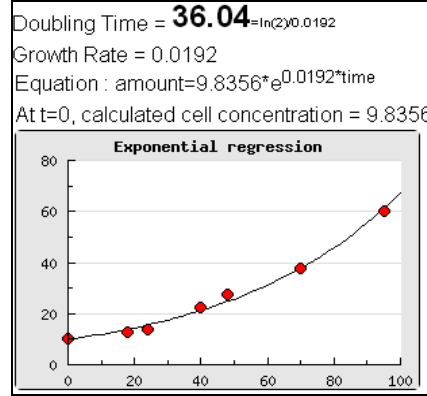
Yapılan denemeler, primer MM kültürünün, pek çok bilimsel kaynakta ifade edilen aksine, pek çoğu transforme ve immortalize edilmiş hücre hatlarında olduğu gibi standart besiyeri kullanılarak gerçekleştirilemeyeceğini gösterdi (2, 30, 39, 44). Ancak ilave büyüme faktörleri, sitokinler ve ekstra bir stromal tabaka ile desteklenerek primer MM kültürünü sürdürmenin mümkün olacağını düşünmekteyiz.

MM hastalarına ait kemik iliğinden yapılan hücre kültürü denemelerinin ardından, çalışmamızın tipik bir MM hücre hattı olan RPMI 8226 ile sürdürülmesine karar verildi.

6.2. RPMI8226 Hücrelerinin Morfolojik Ve Fenotipik Özellikleri

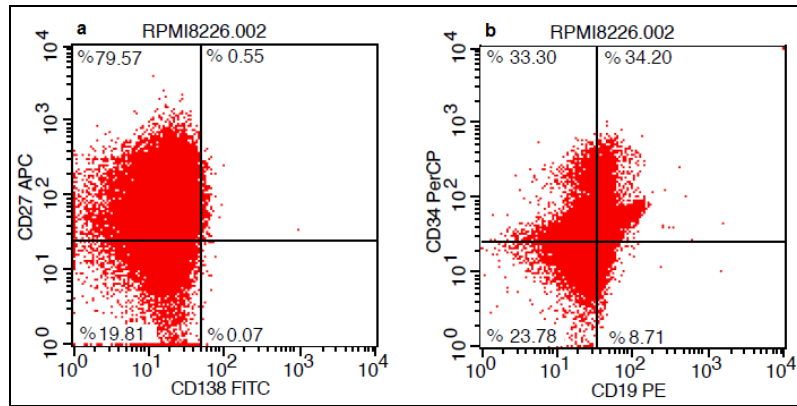
61 yaşındaki erkek MM hastasının periferik kanından izole edilerek 1966 yılında üretilen RPMI8226 hücre hattı, hücrelerin transforme olmaması bakımından MM çalışmaları için kıymetli bir örnektir. Ticari sağlayıcısı tarafından verilen bilgilere göre (ATCC® CCL-155™) RPMI8226 hücreleri B-lenfosit kökenlidir. Antijen profiline bakıldığında ise, CD19 ve CD20 yönünden negatif; CD38 yönünden pozitifdir. CD34, CD27, CD45 ve CD138 antijenleri hakkında ise bu kaynakta bilgi verilmemiştir (87).

Çalışmamıza RPMI8226 hücrelerinin morfolojik ve fenotipik özellikleri ile büyüme karakteristikleri belirlenerek başlandı. RPMI8226 hücrelerinin ikilenme zamanını (doubling time) hesaplamak için 96 saat içinde 7 kez hücre sayımı yapılarak büyüme eğrisi çizildi ve hücrelerin ikilenme zamanı 36 saat olarak bulundu (Şekil 3).



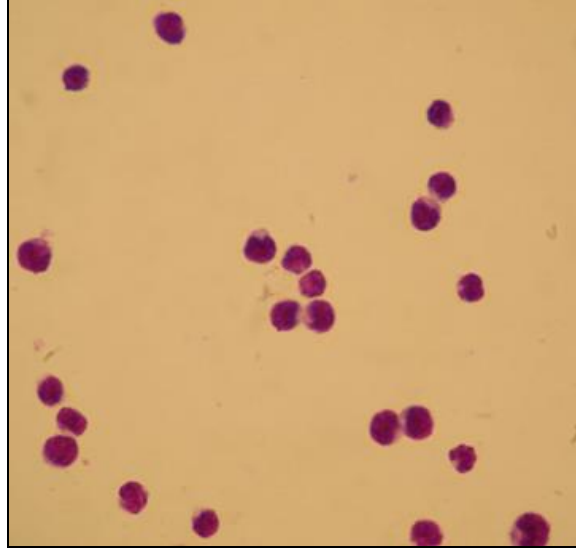
Şekil 3. RPMI8226 hücrelerinin büyüme eğrisi

RPMI8226 hücreleri CD19, CD27, CD34 ve CD138 antijenleri yönünden Flow sitometrik olarak analiz edildi. Hücrelerin CD138 antijenini eksprese etmediği ancak farklılaşmanın erken aşamasından başlayarak plazma hücresinde de ekspresyonu devam eden CD27 antijenini %80 oranında eksprese ettiği belirlendi (Şekil 4.a). Hücrelerin tipik bir B hücre yüzey antijeni olan CD19'u da %43 oranında eksprese ederken, farklılaşmasının en erken aşamalarında eksprese edilen ve kök hücre antijeni olarak bilinen CD34'ün ekspresyonunun da %65 oranında eksprese edildiği tespit edildi (Şekil 4.b).



Şekil 4. RPMI8226 hücrelerinin fenotipik özellikleri, a) CD138 ve CD27 ekspresyonu, b) CD19 ve CD34 ekspresyonu

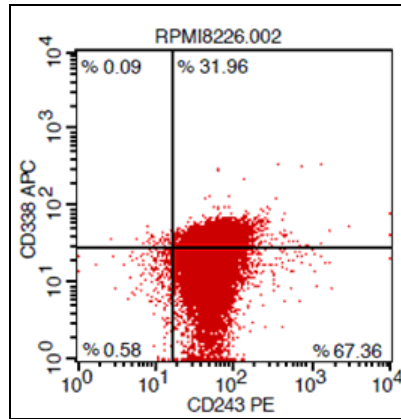
RPMI8226 hücreleri %4'lük Giemsa boyası ile boyanarak mikroskopik olarak incelendiğinde, hücrelerin lenfosit morfolojisi taşıdığı gözlemlendi (Resim 2).



Resim 2. RPMI8226 hücrelerinin ışık mikroskopunda görünümü (10X)

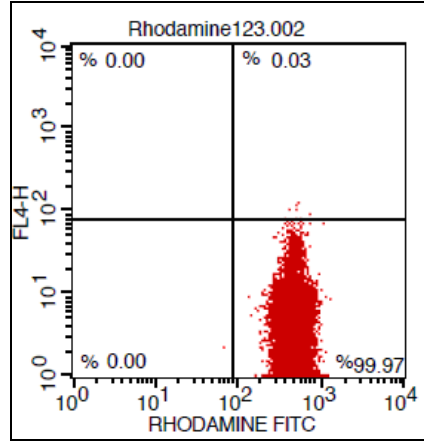
6.3. RPMI8226 Hücrelerinin *ABC Taşıyıcı* Ekspresyonu ve Rho123 Püskürtme Analizi

RPMI8226 hücreleri, *ABC taşıyıcı* ekspresyonu yönünden analiz edildiğinde *P-glikoprotein* (CD243) ekspresyonu %99 oranında; *ABCG2* (CD338) ise %32 oranında bulundu (Şekil 5).



Şekil 5. RPMI8226 Hücrelerinin *ABC taşıyıcı* ekspresyonu

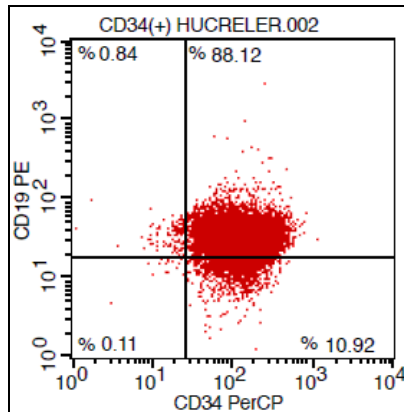
Rho123 püskürtme potansiyeli yönünden analiz edilen RPMI8226 hücrelerinin, Rho123'ü hücre dışına püskürtmediği belirlendi. Boyamada Rho123'ün 100ng/ml, 2µg/ml ve 5µg/ml gibi farklı konsantrasyonlarda kullanılmasıyla sonucun değişmediği gözlemlendi (Şekil 6).



Şekil 6. RPMI8226 hücrelerinin Rho123 püskürtme analizi

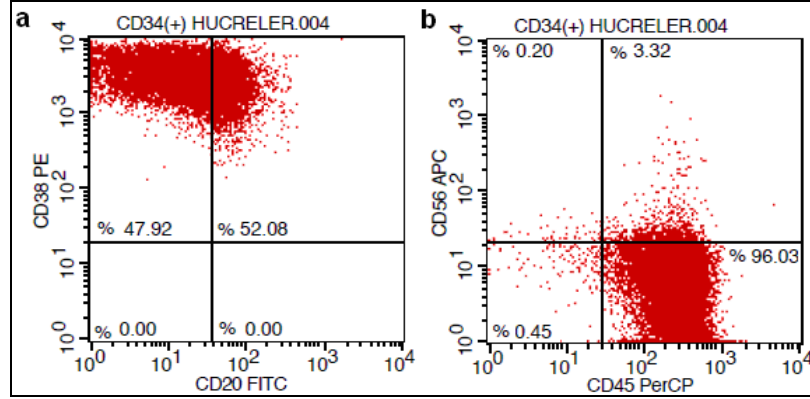
6.4. CD34+ RPMI8226 Hücrelerinin Morfolojik Ve Fenotipik Özellikleri

CD34+ hücrelerin seçiliminden sonra, hücreler yüzey antijenlerine göre analiz edildiğinde seçilimin %99 oranında başarılı olduğu belirlendi. Ayrıca RPMI8226 hücrelerinde ekspresyonu %43 olarak bulunan tipik B hücre markırı CD19'un ekspresyonu bu hücrelerde %89 olarak belirlendi (Şekil 7).



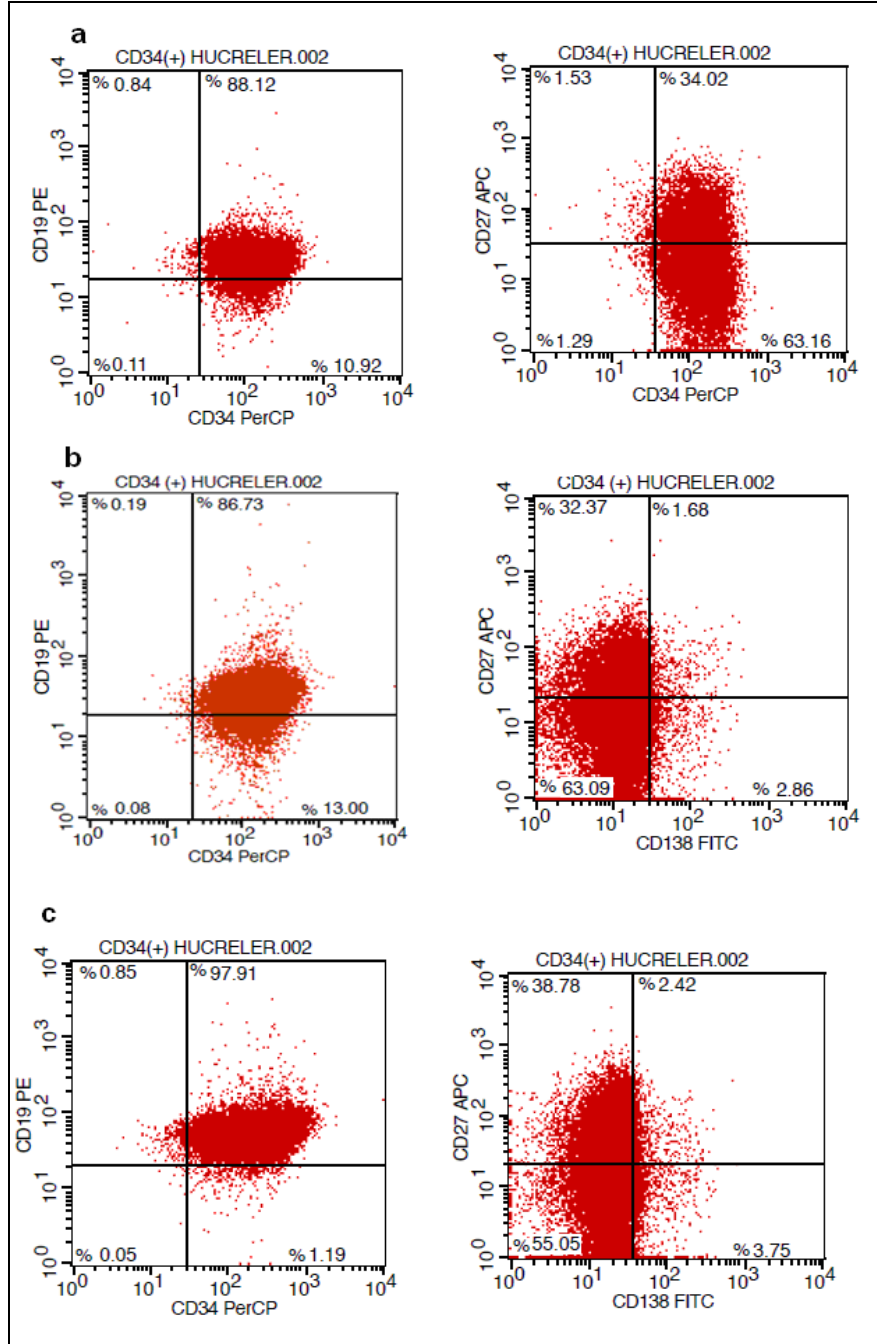
Şekil 7. CD34+ hücre seleksiyonu sonrası hücrelerin CD34 ve CD19 ekspresyonu

CD34+ hücrelerde CD38'in %100 oranında, lenfoma ve MM tedavilerinde hedeflenen bir markır olan CD20'nin ise %52 oranında eksprese edildiği belirlendi (Şekil 8.a). Ayrıca klonaliteyle ilişkili CD45 ekspresyonu %100 olarak bulunan hücrelerin, B hücre farklılaşmasının geç evrelerinde eksprese edilen CD56 yönünden negatif olduğu belirlendi (Şekil 8.b).



Şekil 8. CD34+ RPMI8226 hücrelerinin fenotipik özellikleri, a) CD38 ve CD20 ekspresyonu, b) CD27 ve CD56 ekspresyonu

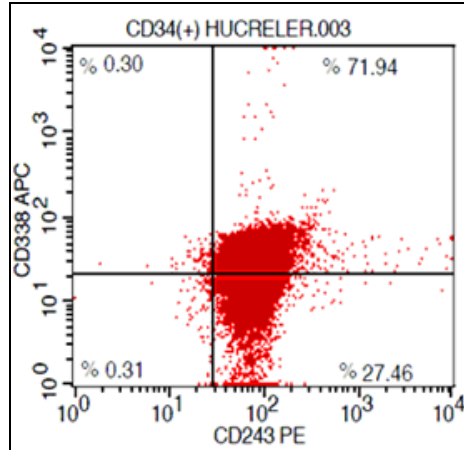
RPMI8226 hücrelerinde %80 oranında bulunan CD27 antijen ekspresyonunun CD34+ hücrelerde %34'e düştüğü tespit edildi. CD34+ hücreler, RPMI8226 hücreleri ile aynı koşullarda (RPMI1640 %15 FBS) kültüre edildi ve hücrelerin uzun süreli kültürü esnasında yüzey antijenlerindeki değişimi incelemek için 0, 4 ve 8. günlerde Flow sitometrik analizler tekrarlandı. Çoğalan hücrelerde yüzey antijenlerinin değişmediği tespit edildi (Şekil 9).



Şekil 9. CD34+ RPMI8226 hücrelerinin 0, 4 ve 8.günüdeki ekspresyon profilleri, a) 0.gün b) 4.gün, c) 8.gün

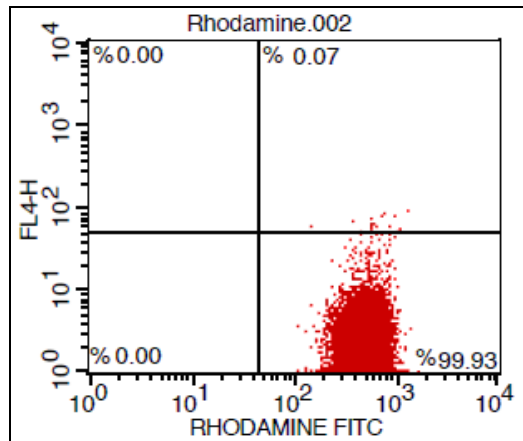
6.5. CD34+ RPMI8226 Hücrelerinin ABC Taşıyıcı Ekspresyonu ve Rho123 Püskürtme Analizi

CD34+ seleksiyonundan sonra ise CD34+ hücrelerin *P-glikoprotein*'i yine %99 oranında, *ABCG2*'yi ise %72 oranında eksprese ettiği belirlendi (Şekil 10).



Şekil 10. CD34+ RPMI8226 hücrelerinde ABC Taşıyıcı ekspresyonu

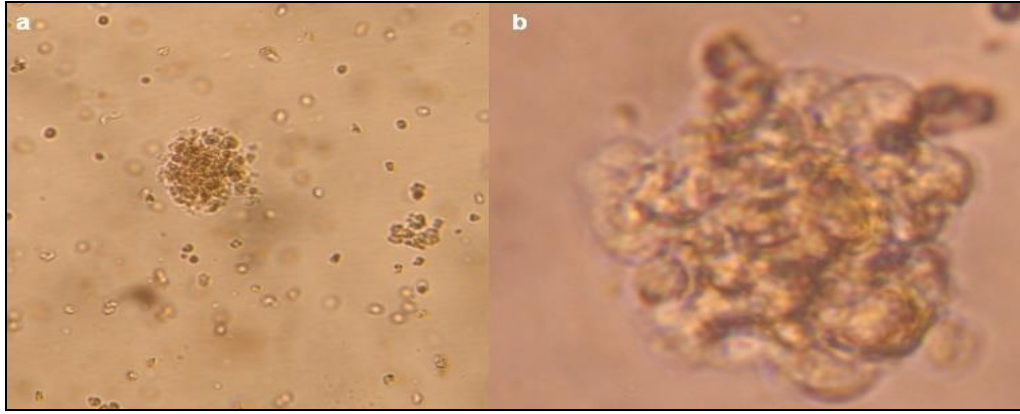
Rho123 püskürtme potansiyeli yönünden analiz edilen CD34+ RPMI8226 hücrelerinin de, Rho123'ü hücre dışına püskürtmediği belirlendi (Şekil 11).



Şekil 11. CD34+ RPMI8226 hücrelerinin Rho123'ü hücre dışına püskürtme potansiyeli

6.6. CD34+ RPMI8226 Hücrelerinin Koloni Oluşturma Yeteneği

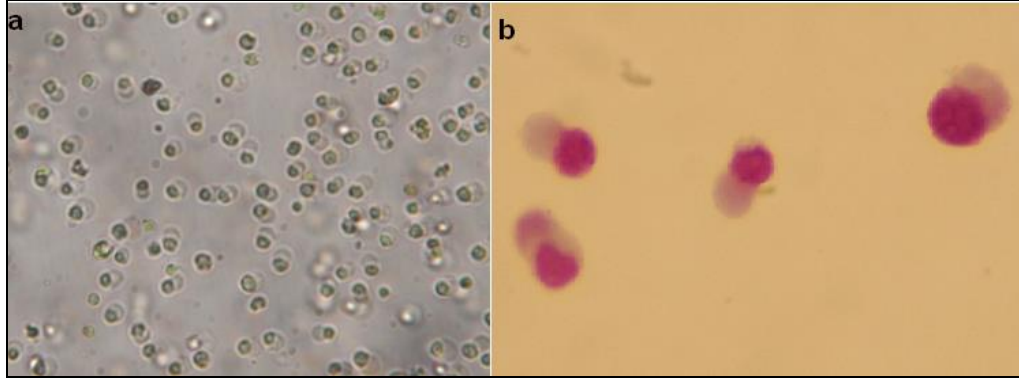
CD34+ RPMI8226 hücrelerinin, IL-3, IL-6 ve koloni stimüle edici faktörler içeren metilselüloz besiyerindeki 21 günlük kültürü sonucunda; bu hücrelerin, kanser kök hücresinin karakteristik özelliği olan koloni oluşturma yeteneğine sahip olduğu tespit edildi (Resim 3). Yapılan üçlü kültürde koloni sayıları 1.petride 30, 2.petride 60 ve 3.petride 73 olarak bulundu.



Resim 3. CD34+ RPMI8226 hücrelerinin metilselüloz besiyerinde 22.günü, a) 10X büyütme, b) 20X büyütme

6.7. Propolis Muamelesiyle RPMI8226 ve CD34+ RPMI8226 Hücrelerinin Plazma Hücresine Dönüşmesi

100µg/ml ve 200µg/ml Propolis ile 24 saat muamele edilen hücreler Tripan mavisi ile boyandığında, hücrelerin yüksek oranda ölü olduğu ve hücrelerin farklı bir morfolojiye sahip olduğu gözlemlendi. Wright-Giemsa boyaması yapıldığında, bu hücrelerin plazma hücresi morfolojisi gösterdiği tespit edildiği (Resim 4).



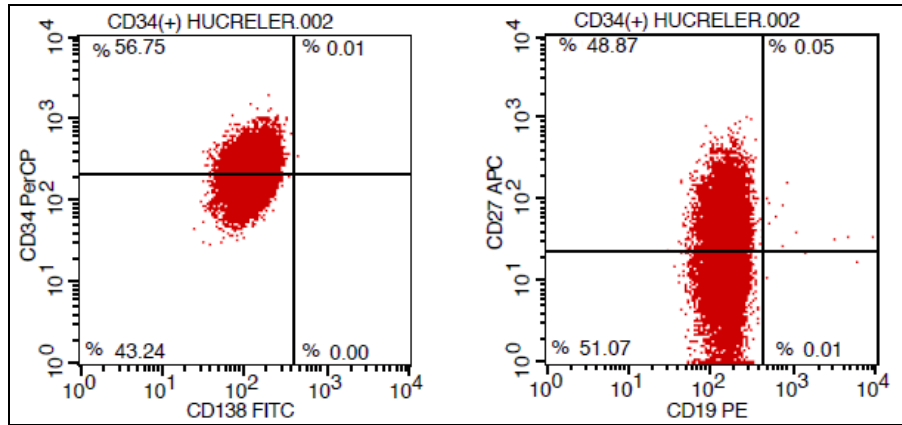
Resim 4. 100µg/ml Propolis ile 24 saat muamele edilen RPMI8226 hücrelerinin plazma hücre morfolojisi, a) invert mikroskop (10X), b) %4 Giemsa, ışık mikroskobu (100X)

100µg/ml Propolis'le muamele edilen hem RPMI8226, hem de CD34+ RPMI8226 hücreleri muamelenin 3. saatinde Tripan mavisi ile boyandığında hücrelerin yüksek oranda canlı olduğu belirlendi ve 4. saatte invert mikroskopta gözle görülür şekilde plazma hücre morfolojisi oluştuğu gözlemlendi (Resim 5).



Resim 5. 100µg/ml Propolis ile 3 saat muamele edilen CD34+ hücrelerin Tripan mavisi ile boyandığında ışık mikroskobu altındaki görüntüsü (100X)

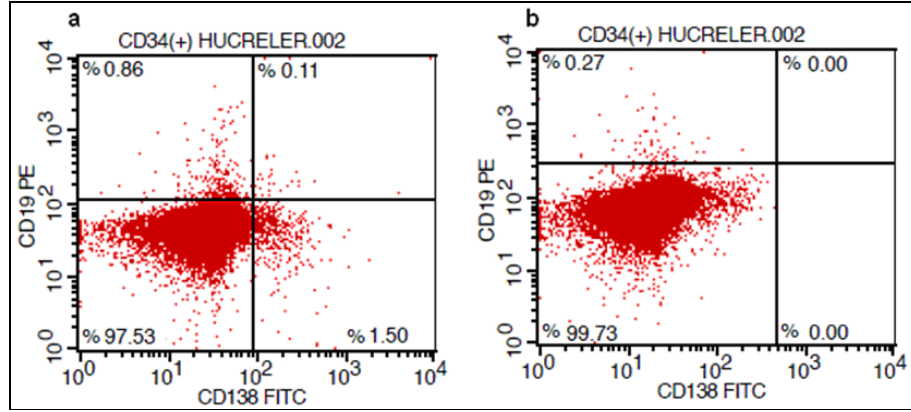
Ancak Flow sitometride hücre yüzey antijenleri incelendiğinde; hücrelerin tipik bir plazma hücre yüzey antijeni olan CD138 yönünden yine negatif olduğu gözlemlendi. Tekrarlanan deneylerle de, 100µg/ml Propolis muamelesi ile plazma hücre morfolojisi kazandırılan hücrelerin CD138'i eksprese etmediği tespit edildi. Hücrelerin, Propolis muamelesinden sonra CD19 ekspresyonunu kaybettiği; %34 olan CD27 ekspresyonunun %49'a yükseldiği, CD34 ekspresyonunun ise %57'ye düştüğü belirlendi (Şekil 12).



Şekil 12. 100µg/ml Propolis ile 3 saat muamele edilen CD34+ RPMI8226 hücrelerinin Flow sitometrik analizi

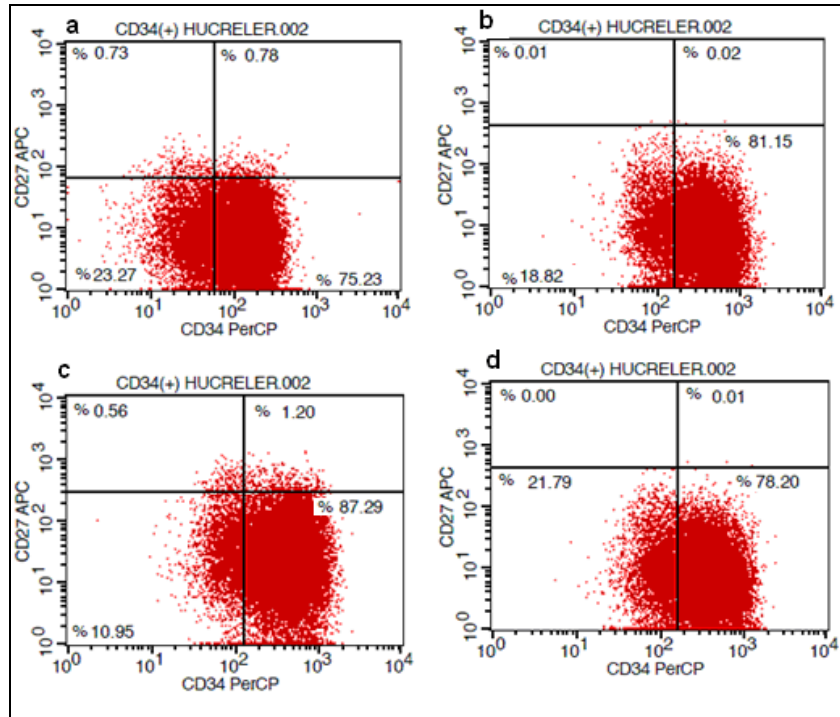
6.8. CAPE Muamelesiyle CD34+ RPMI8226 Hücrelerinin Hücre Yüzey Antijenleri ve ABC Taşıyıcı Ekspresyonlarındaki Değişimler

CD34+ hücreler, 25µM ve 50µM CAPE ile muamele edilerek yüzey antijenlerinde meydana gelen değişimler analiz edildi. 25µM ve 50µM CAPE muamelesi, 24. saatte hücrelerin; %88 oranında eksprese ettiği CD19 ekspresyonunu kaybetmesine neden oldu (Şekil 13).



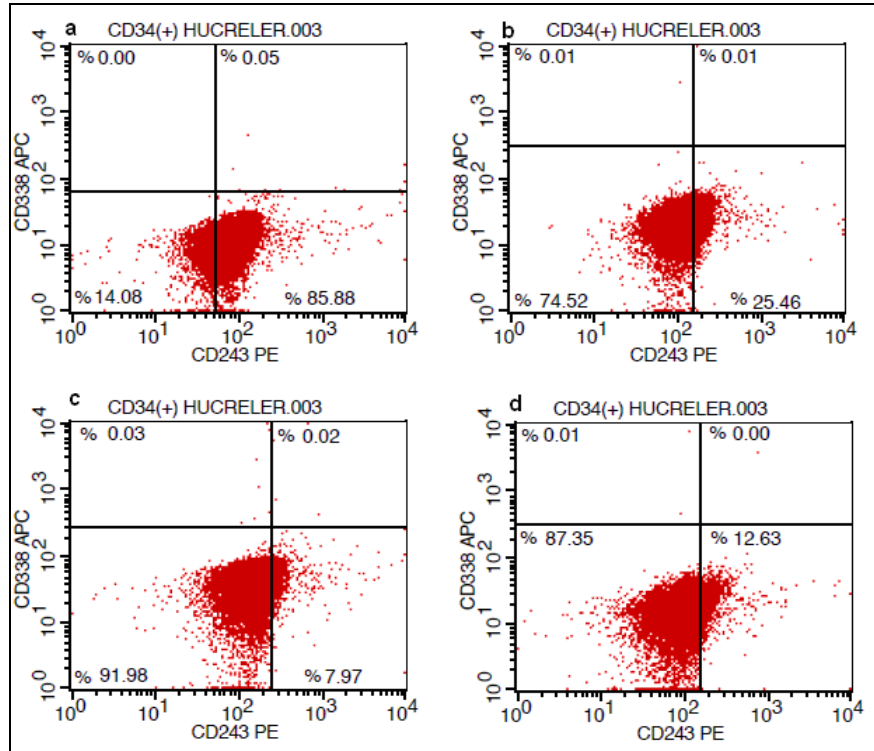
Şekil 13. CD34+ hücrelere 25 ve 50 μ M CAPE muamelesinin 24. saatinde CD19 ve CD138 ekspresyonu, a) 25 μ M CAPE muamelesi, b) 50 μ M CAPE muamelesi

24 ve 48. saatlerde, 25 μ M ve 50 μ M CAPE muamelesiyle, CD34 ekspresyonunda belirgin bir değişim olmadığı gözlenirken; 25 μ M CAPE ile 24 saat muamele sonucunda CD27 ekspresyonu tamamen negatifleşti (Şekil 14).



Şekil 14. 25 ve 50 μ M CAPE muamelesi sonrası CD34+ RPMI8226 hücrelerinde CD34 ve CD27 ekspresyonu, a) 25 μ M CAPE, 24. saat, b) 25 μ M CAPE, 48. saat, c) 50 μ M CAPE, 24. saat, d) 50 μ M CAPE, 48. saat

%72 oranında eksprese edilen *ABCG2* (CD338) ekspresyonunun 25µM ve 50µM CAPE muamelesinin 24. saatinde negatifleştigi gözlemlendi. *P-glikoprotein* (CD243) ekspresyonunda 25µM CAPE muamelesiyle 24. saatte %86'ya düşerken, 48. saatte %25'e düştüğü tespit edildi. 50µM CAPE muamelesiyle 24. saatte *P-glikoprotein* ekspresyonunun %8'e kadar düştüğü tespit edilirken, 48. saatte ekspresyonu %13 olarak belirlendi (Şekil 15).



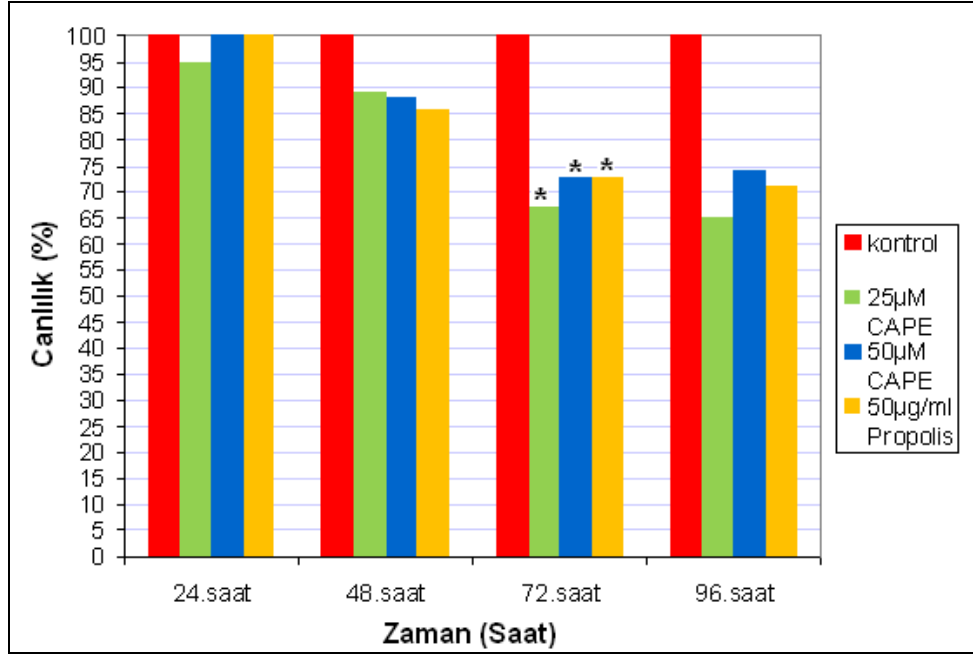
Şekil 15. 25 ve 50 µM CAPE muamelesi sonrası CD34+ RPMI8226 hücrelerinde *ABC taşıyıcı* ekspresyonları, a) 25 µM CAPE, 24. saat, b) 25 µM CAPE, 48. saat, c) 50 µM CAPE, 24. saat, d) 50 µM CAPE, 48. saat

6.9. Apoptoz ve Canlılık Analizleri

6.9.1. Propolis ve CAPE'in CD34+ RPMI8226 Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi

CD34+ RPMI8226 hücrelerine 25µM ve 50µM CAPE ile 50µg/ml Propolis muamelesinin 24, 48, 72 ve 96. saatinde yapılan MTT testi sonucunda, CAPE muamelesinin zamana bağlı olarak canlılığı düşürdüğü gözlemlendi. CD34+ RPMI8226

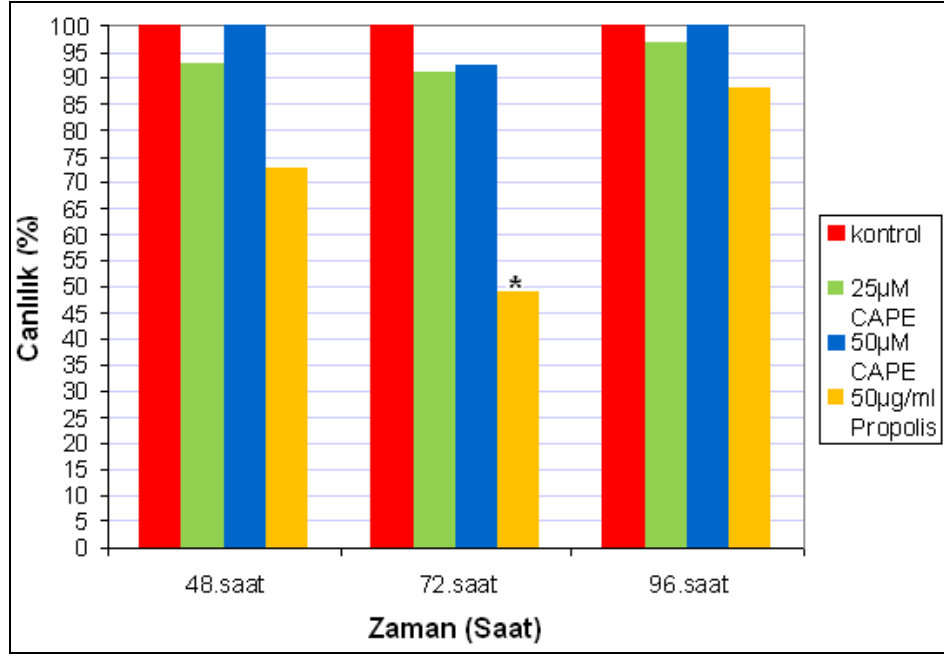
hücrelerinin canlılığı 24, 48, 72 ve 96. saatlerde 25µM CAPE muamelesine yanıt olarak sırasıyla, %95, %89, %67 ve %65'e; 50µM CAPE muamelesine yanıt olarak %100, %88, %73 ve %74 şeklinde değişirken; 50µg/ml Propolis ile hücrelerin canlılığının, %100, %86, %73 ve %71 şeklinde değiştiği tespit edildi (Şekil 16).



Şekil 16. CD34+ RPMI8226 hücrelerine CAPE ve Propolis muamelesi

6.9.2. Propolis ve CAPE'in Malign Olmayan Periferik Kan Mononükleer Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi

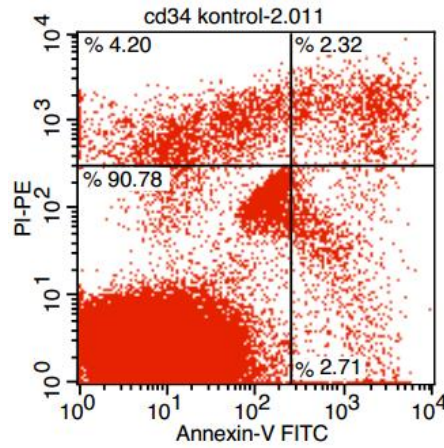
25 ve 50µM CAPE'in 72 saatte, MK07 hücrelerinin canlılığı üzerinde anlamlı bir etki oluşturmazken, 50µg/ml Propolis'in, bu hücrelerin canlılığını anlamlı şekilde düşürdüğü belirlendi. 25µM CAPE muamelesi ile, 48. saatte canlılık oranı %93 olan MK07 hücrelerinin canlılığı 72. saatte %92'ye düştü. 50µM CAPE muamelesinin 48. saatinde MK07 hücrelerinin canlılık oranı %100 olarak belirlenirken 72. saatte bu oran %91'e düştü. 50µg/ml Propolis muamelesi ise malign olmayan hücrelerin canlılığını 48 ve 72. saatlerde sırasıyla %73 ve %49'a düşürdü. 96. saatte ise MK07 hücrelerinin canlılık oranlarının yeniden yükseldiği tespit edildi. MK07 hücrelerinin 96 saatlik 25µM CAPE, 50µM CAPE ve 50µg/ml Propolis muamelesi sonrasında canlılık oranları sırasıyla %97, %100 ve %88 olarak tespit edildi (Şekil 17).



Şekil 17. MK07 hücrelerine CAPE ve Propolis muamelesi

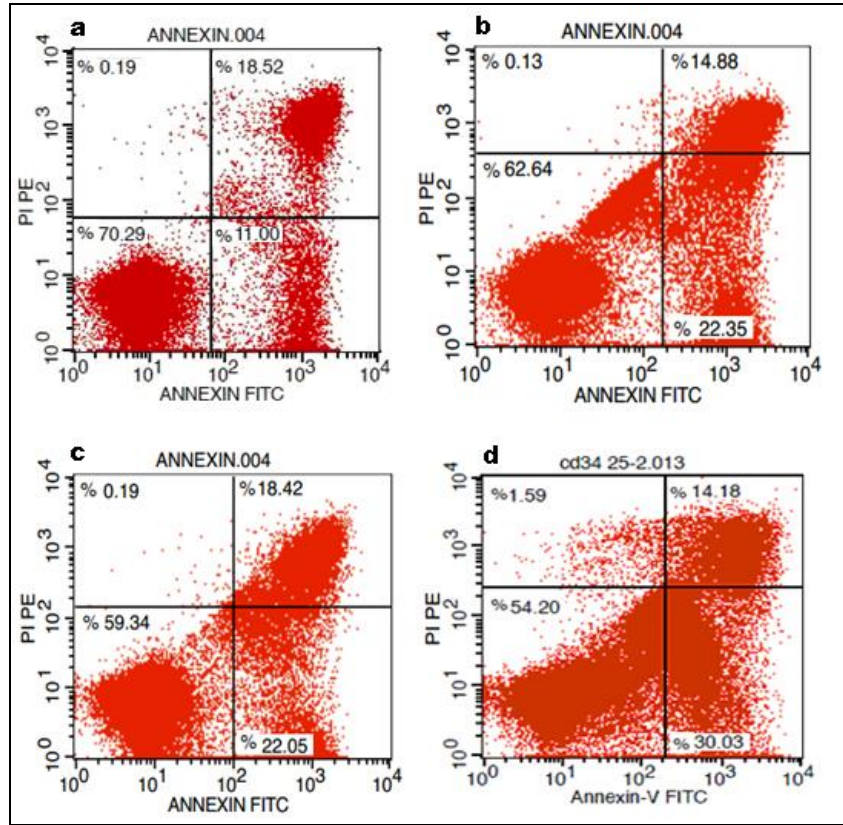
6.9.3. CAPE'in CD34+ RPMI8226 Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi

Annexin V-PI testiyle ilk olarak CD34+ RPMI8226 hücrelerindeki bazal apoptotik hücre oranı %9 olarak belirlendi (Şekil 18).



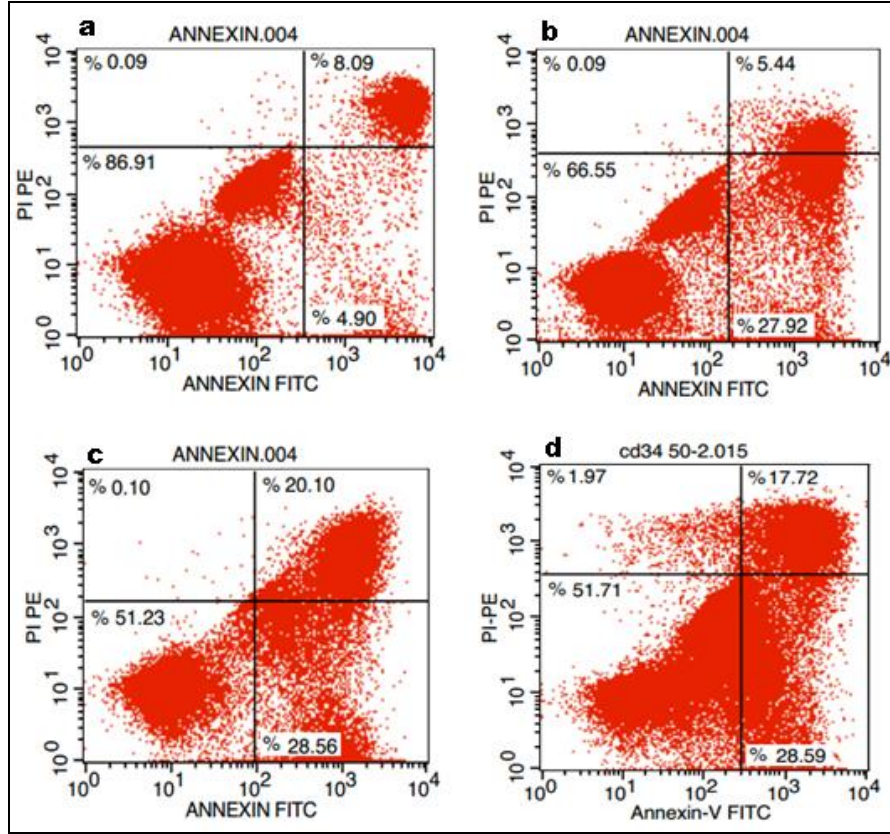
Şekil 18. 0. saatte CD34+ RPMI8226 hücrelerinde bazal apoptotik hücre oranı

Apoptotik ve ölü hücre oranının 25 μ M CAPE muamelesi ile 24, 48, 72 ve 96. saatlerde zamana bağımlı olarak arttığı tespit edildi. 0. saatte %9 olan apoptotik ve ölü hücre oranı 24. saatte %30 olarak tespit edilirken, 48. saatte %37; 72. saatte %40 ve 96. saatte %46 olarak belirlendi (Şekil 19). Bazal apoptotik hücre oranı göz önünde tutularak, 25 μ M CAPE'in 24, 48, 72 ve 96. saatlerde sırasıyla %23, %31, %35 ve %41 oranında hücre ölümüne neden olduğu belirlendi.



Şekil 19. CD34⁺ RPMI8226 hücrelerine 25 μ M CAPE muamelesi, a) 24. saat, b) 48. saat, c) 72. saat, d) 96. saat

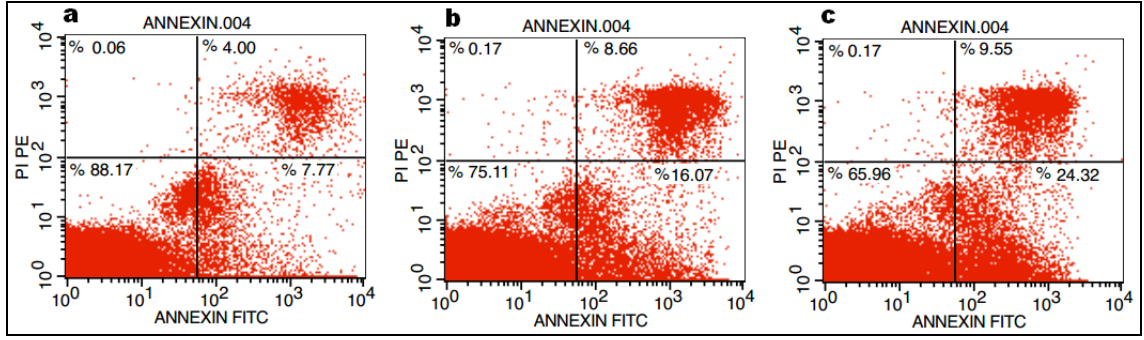
50 μ M CAPE muamelesinin CD34⁺ RPMI8226 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi ise 24, 48, 72 ve 96. saatlerde daha belirgin olarak tespit edildi. 0. saatte %9 olan apoptotik ve ölü hücre oranı 24. saatte %12, 48. saatte %33, 72. saatte %49, 96. saatte ise %48 olarak belirlendi (Şekil 20). Bazal apoptotik hücre oranı göz önünde tutularak, 50 μ M CAPE'in 24, 48, 72 ve 96. saatlerde sırasıyla %4, %26, %44 ve %43 oranında hücre ölümüne neden olduğu belirlendi.



Şekil 20. CD34+ RPMI8226 hücrelerine 50µM CAPE muamelesi, a) 24. saat, b) 48. saat, c) 72. saat, d) 96. saat

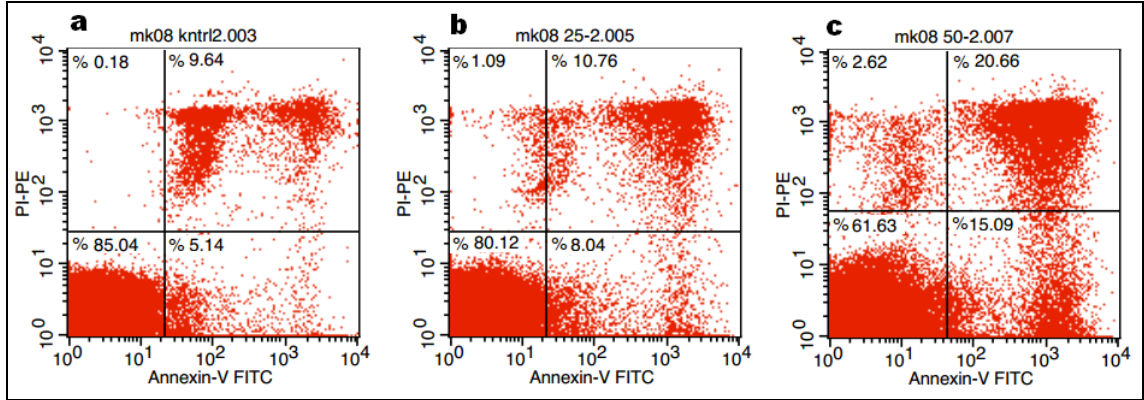
6.9.4. CAPE'in Malign Olmayan Periferel Kan Mononuklear Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi

Malign olmayan mononuklear hücreler 25 ve 50µM CAPE ile 72 saat muamele edildiğinde, kontrol grubunda %12 oranında bulunan apoptotik ve ölü hücre oranı, 25µM CAPE ile %25'e; 50µM CAPE ile %34'e yükseldiği tespit edildi (Şekil 20). Bazal apoptotik hücre oranı göz önünde tutularak, 72. saatte 25µM CAPE'in %6, 50µM CAPE'in ise %27 oranında hücre ölümüne neden olduğu belirlendi (Şekil 21).



Şekil 21. MK07 hücrelerine CAPE muamelesinin 72. saati, a) CAPE muamelesiz, b) 25 μ M CAPE, c) 50 μ M CAPE

MK08 hücrelerinin ise 25 ve 50 μ M CAPE ile 96 saatlik muamelesi sonucu apoptotik hücre oranının %15'ten; 25 μ M CAPE ile %19'a; 50 μ M CAPE ile %38'e yükseldiği belirlendi (Şekil 22). Bazal apoptotik hücre oranı göz önünde tutularak, 96. saatte 25 μ M CAPE'in %12, 50 μ M CAPE'in ise %25 oranında hücre ölümüne neden olduğu belirlendi.

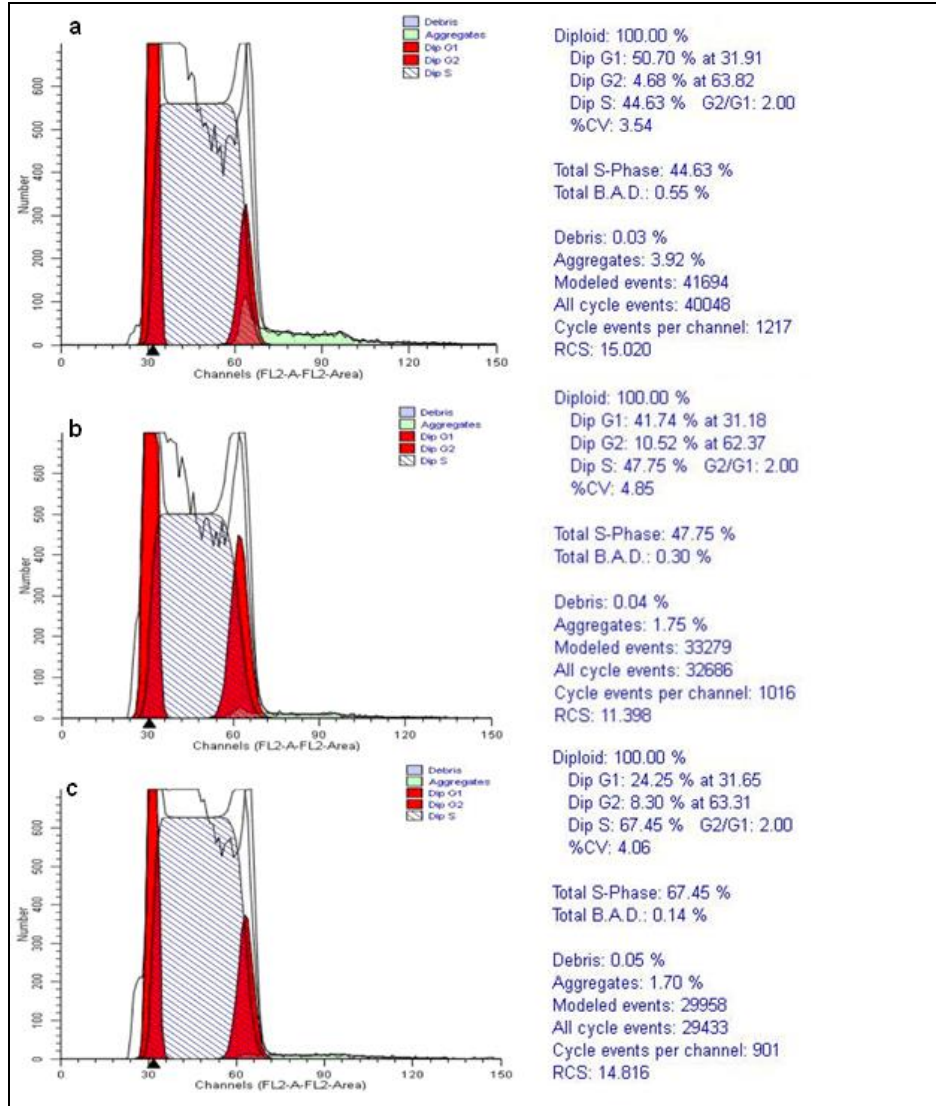


Şekil 22. MK08 hücrelerine CAPE muamelesinin 96. saati, a) CAPE muamelesiz, b) 25 μ M CAPE, c) 50 μ M CAPE

6.10. Propolis ve CAPE'in CD34+ RPMI8226 Hücrelerinin Mitotik Aktivitesi Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi

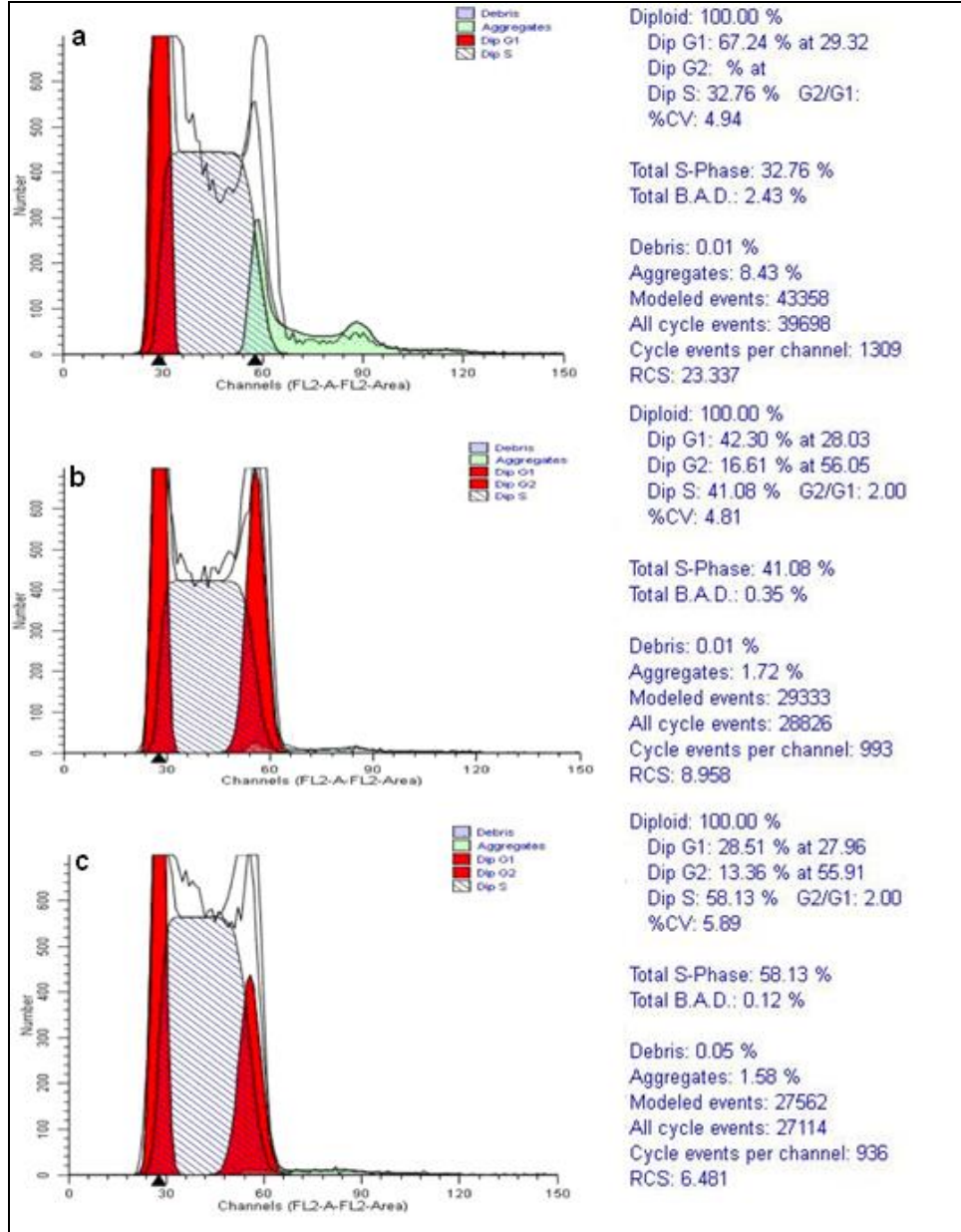
Yapılan hücre döngüsü analizleri, hem Propolis hem de CAPE'in, CD34+ RPMI8226 hücrelerinde proliferasyonu indüklediğini gösterdi. CAPE muamelesi

yapılmayan hücrelerin %44'ü S fazında tespit edilirken (Şekil 23. a); 48. saatte 25µM CAPE ile muamele edilen hücrelerin %47'sinin (Şekil 23. b); 50µM CAPE ile muamele edilen ise hücrelerin %67'sinin S fazında olduğu tespit edildi (Şekil 23. c).



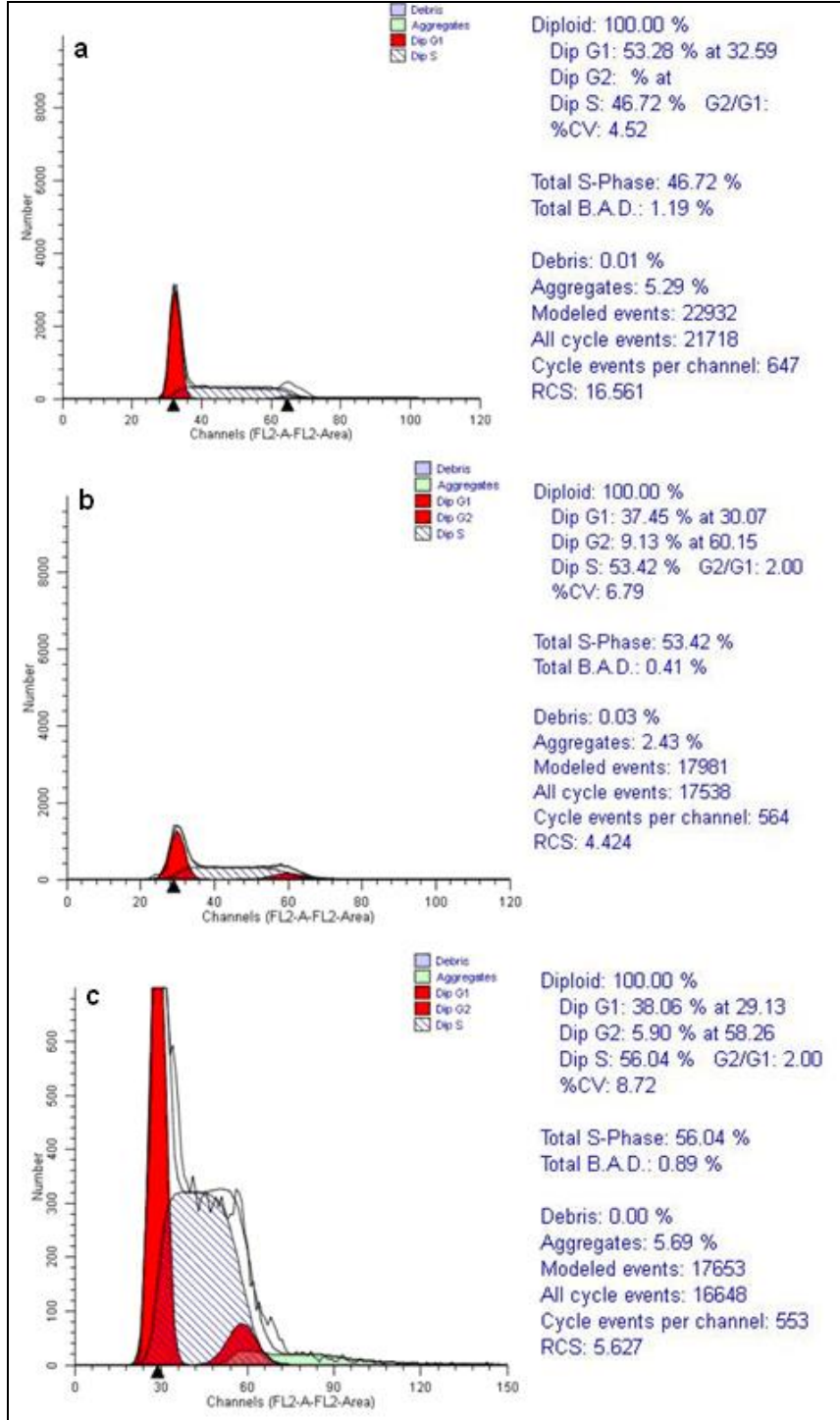
Şekil 23. CD34+ RPMI8226 hücrelerine 25 ve 50µM CAPE muamelesinin 48. saatinde hücre döngüsü analizi, a) Kontrol, b) 25µM CAPE muamelesi, c) 50µM CAPE muamelesi

72. saatte, kontrol grubu hücrelerinin %32'si S fazında tespit edilirken (Şekil 24. a), bu oran 25µM CAPE muamelesiyle %41'e (Şekil 24. b), 50µM CAPE muamelesiyle ise %58'e yükseldi (Şekil 24. c).



Şekil 24. CD34+ RPMI8226 hücrelerine 25 ve 50µM CAPE muamelesinin 72. saatinde hücre döngüsü analizi, a) Kontrol, b) 25µM CAPE muamelesi, c) 50µM CAPE muamelesi

Kontrol grubunda %46 oranında bulunan S fazındaki hücrelerin oranı 50µg/ml Propolis muamelesinin 24. saatinde %53'e; 48. saatte ise %56'ya yükseldi (Şekil 25).



Şekil 25. CD34+ RPMI8226 hücrelerine 50µg/ml Propolis muamelesinin 24 ve 48. saatlerinde hücre döngüsü analizi, a) 0. saat, b) 24. saat, c) 48. saat

6.11. İstatistiksel Analiz

CD34+ RPMI8226 hücreleri ile MK07 hücrelerine 25µM CAPE, 50µM CAPE ve 50µg/ml Propolis muamelesinin 72. saatinde yapılan MTT sonuçları istatistiksel olarak analiz edildiğinde; 25µM ve 50µM CAPE'in CD34+ RPMI8226 hücrelerinde canlılığı anlamlı olarak düşürdüğü; MK07 hücrelerinin canlılığındaki düşüşün ise anlamlı olmadığı tespit edildi. 50µg/ml Propolis'in ise hem CD34+ RPMI8226 hem de MK07 hücrelerinin canlılığını anlamlı olarak düşürdüğü belirlendi (Tablo 4).

Tablo 4. CD34+ RPMI8226 hücreleri ile MK07 malign olmayan mononuklear hücrelere 25µM CAPE, 50µM CAPE ve 50µg/ml Propolis muamelesinin 72. Saatinde MTT ile canlılık analizi, a) CD34+ RPMI8226 hücreleri, b) MK07 malign olmayan mononuklear hücreler c) istatistiksel analiz (n=5) (B2-F2 kontrol, B3-F3 25µM CAPE, B4-F4 50µM CAPE, B5-F5 50µg/ml Propolis)

a	1	2	3	4	5	6
A	0.046	0.047	0.047	0.047	0.046	0.048
B	0.047	0.102	0.074	0.077	0.078	0.047
C	0.050	0.091	0.069	0.074	0.087	0.047
D	0.047	0.113	0.067	0.072	0.067	0.048
E	0.061	0.078	0.066	0.075	0.075	0.047
F	0.047	0.135	0.073	0.082	0.074	0.047
G	0.047	0.051	0.048	0.046	0.047	0.047
H	0.048	0.047	0.072	0.047	0.048	0.048

b	1	2	3	4	5	6
A	0.047	0.048	0.047	0.047	0.047	0.046
B	0.047	0.150	0.138	0.140	0.081	0.047
C	0.047	0.169	0.132	0.146	0.079	0.047
D	0.048	0.159	0.157	0.166	0.082	0.048
E	0.047	0.158	0.154	0.154	0.078	0.048
F	0.048	0.170	0.160	0.140	0.077	0.047
G	0.047	0.047	0.047	0.049	0.047	0.048
H	0.048	0.047	0.047	0.047	0.048	0.059

c

MTT analizi						
CAPE/ Propolis	25µM CAPE		50µM CAPE		50µg/ml Propolis	
Hücre grupları	CD34+ RPMI8226	MK07	CD34+ RPMI8226	MK07	CD34+ RPMI8226	MK07
İstatistiksel analiz	$p=0.008^*$	$p=0.151$	$p=0.016^*$	$p=0.095$	$p=1^*$	$p=0.008^*$

Annexin V-PI testi sonuçlarına göre, 25µM CAPE'in CD34+ hücreler üzerindeki apoptotik etkisi anlamlı bulunurken ($p < 0.001$); MK08 hücreleri üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı ($p=0.063$) tespit edildi. Analizler, 25µM CAPE ile 96 saatlik muamelenin, MM kök hücreleri üzerinde, sağlıklı hücrelere kıyasla anlamlı bir apoptotik etkisinin olduğunu gösterdi (Tablo 5).

Tablo 5. 25µM CAPE muamelesinin 0 ve 96. saatlerinde hücrelerin canlılığı

25µM CAPE (Annexin V-PI)	Apoptotik ve ölü hücre oranı (%)		İstatistiksel analiz
	0. saat	96. saat	
CD34+ RPMI8226	9	46	$p < 0.001^*$
MK08	15	19	$p=0.46$

İstatistiksel analizler, CAPE muamelesinin CD34+ RPMI8226 hücrelerinin çoğalmasını anlamlı bir şekilde arttırdığını gösterdi (Tablo 6).

Tablo 6. 25µM ve 50µM CAPE muamelesi yapılan CD34+ RPMI8226 hücrelerinin 0 ve 72. saatlerinde S fazındaki hücre yüzdesi

Hücre döngüsünün S fazındaki hücre oranı (%)		
	25µM CAPE	50µM CAPE
0. saat	44	44
72. saat	47	67
İstatistiksel analiz	$p=0.004^*$	$p<0.001^*$

İstatistiksel analiz, 50µg/ml Propolis'in de CD34+ RPMI8226 hücrelerinin çoğalmasını anlamlı bir şekilde indüklediğini gösterdi (Tablo 7).

Tablo 7. 50µg/ml Propolis muamelesi yapılan CD34+ RPMI8226 hücrelerinin 0 ve 48. saatlerinde S fazındaki hücre yüzdesi

Hücre döngüsünün S fazındaki hücre oranı (%)	
Zaman (Saat)	50µg/ml Propolis
0. saat	46
48. saat	56
İstatistiksel analiz	$p=0.002^*$

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanserde agresif progresyon, tedaviye direnç ve relapstan sorumlu olduğu düşünülen kanser kök hücresi, bazı araştırmacılar tarafından varlığına hala şüpheyile yaklaşıl原因 tartışmalı bir kavramdır (53, 54). Buna rağmen, tümör hücreleri arasında fonksiyonel bir heterojenite olduğu bilinmekte ve farklı fonksiyonel özelliklere sahip bir hücre popülasyonu tedavi direnciyle ilişkilendirilmektedir (5, 23). Bunun yanında standart kemoterapi ve radyoterapi ajanları ile kanser hücrelerinin önemli ölçüde öldürülebilmesine rağmen hastalığın nüksetmesi, kansere öncülük eden dirençli bir hücre popülasyonunun varlığını işaret etmektedir (24). Bu bulgular doğrultusunda, çalışmamızda, kanserde etkili bir tedavinin kanser kök hücrelerini seçici olarak hedeflemesi gerektiği kanaatiyle, daha önceki çalışmalarda kanser hücrelerini seçici olarak öldürdüğü bildirilen Propolis ve özellikle etken maddesi olan CAPE'in MM kök hücreleri üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır (76-78).

Çalışmamızda ilk olarak RPMI8226 hücreleri morfolojik ve fenotipik olarak analiz edilmiştir. RPMI8226 hücrelerinin morfolojik olarak incelenmesi ile ilgili bulgularımız, lenfoblastik MM hücrelerinin Giemsa boyanma özellikleri ve RPMI8226 hücrelerinin ticari sağlayıcısı olan ATCC (Amerikan Kültür Koleksiyonu, Katalog No. CCL-155™)'nin verdiği bilgilerle örtüşmektedir (87). RPMI8226 hücreleri fenotipik olarak incelendiğinde ise; tipik bir plazma hücresi markırı olan CD138 yönünden negatif bulunmuştur. Ancak bu hücrelerin uzun süreli kültürü ve dondurma-çözme işlemleri sırasında CD138 ekspresyonunu kaybedebileceği bildirilmiştir (44). Bununla beraber, hücrelerin yüzey antijenleri yönünden heterojen bir popülasyon teşkil ettiği ve hücreler arasında bellek B hücrelerine özgü yüzey antijenlerini taşıyan bir alt grup olduğu, ayrıca klonal MM hücreleriyle ilişkilendirilmiş kök hücre antijeni CD34'ün %63 oranında eksprese edildiği belirlenmiştir. Bu bulgular, kanser kök hücresi oluşumunda erişkin bir hücrenin öncü hücrelerine farklılaşabileceği fikriyle örtüşmektedir (88).

RPMI8226 hücreleri arasında kök hücre antijeni olan CD34'ü eksprese eden bir alt grup bulunması ve daha önceki çalışmalarda klonalite ve ilaç direncinin CD34+ fenotipiyle ilişkilendirilmiş olması sebebiyle, çalışmamızda MM kök hücrelerinin izolasyonu için CD34 antijeni esas alınmıştır (43, 50). CD34+ hücrelerin

izolasyonundan sonra yapılan fenotipik analizlerde CD19, CD38 ve CD45 ekspresyonlarının yüksek oranda tespit edilmesi klonal MM fenotipiyle uyumlu olarak değerlendirilmiştir. Ancak bu hücrelerde, CD20 ekspresyonunun %52; CD27 ekspresyonunun ise %34 oranında bulunması; Matsui ve arkadaşlarının klonal MM hücresi fenotipiyle tam olarak örtüşmemektedir. Matsui ve arkadaşları'na göre, bellek B hücre markırları olan CD20 ve CD27 eksprese eden hücreler *in vitro* ve *in vivo*, klonal MM oluşumuna sebep olmaktadır (2). Ancak, yapılan bir diğer araştırma ise, Matsui ve arkadaşları'nın, CD20 antagonisti olan Rituximab'ın, MM hücrelerinde klonal büyümeyi baskıladığı için CD20'yi kanser kök hücresi fenotipiyle ilişkilendirdiğini; ancak klinikte Rituximab'ın sağkalıma destek sağlamadığını bildirmiştir. Ayrıca, bu çalışma CD20- hücrelerin, CD20+ hücrelere göre daha fazla kök hücre özelliği taşıdığını göstermiş ve CD20'nin kanser kök hücresiyle ilişkili bir markır olamayacağını iddia etmiştir (89). Çalışmamızda, CD34+ MM hücrelerinin, kanser kök hücresi için tipik bir özellik olan koloni oluşturma yeteneğine sahip olduğu koloni formasyonu analiziyle gösterilmiştir. Ayrıca, RPMI8226 hücreleri bir *ABC taşıyıcı* olan *P-glikorotein*'i eksprese etmesine rağmen; %32 olan *ABCG2* ekspresyonu, CD34+ hücrelerde %72 olarak belirlenmiştir. Bulgularımız daha önceki çalışmalarda bildirilen MM kök hücresinin fenotipik ve fonksiyonel özellikleriyle önemli ölçüde uyumlu bulunmuş ve bu hücrelerde Propolis ve CAPE'in antitümöral etkileri araştırılmıştır.

100µg/ml Propolis'le muamele edilen RPMI8226 ve CD34+ RPMI8226 hücrelerinin 4 saat içinde plazma hücresi morfolojisi kazandığı belirlenmiştir. Bu hücreler Flow sitometrik olarak analiz edildiğinde gözlenen CD34 ve CD19 negatifliği plazma hücre fenotipiyle örtüşmekteyse de CD138 pozitifliği gösterilememiştir. Propolis'in B lenfosit tipindeki MM hücrelerini plazma hücresine dönüştürmesi, üzerinde daha fazla ve detaylı araştırma yapılarak aydınlatılması gereken önemli bir bulgudur. Çalışmamızda ayrıca, hem Propolis hem de CAPE'in CD34+ hücrelerde hücre döngüsünü indükleyerek hücrelerin daha hızlı çoğalmasını sağladığı tespit edilmiştir. Hücrelerin farklılaşması için aktif bir proliferasyon fazına girmeleri gerektiğinden, hücrelerin plazma hücrelerine farklılaşması ve hücre döngüsü analizleri birbirini desteklemekte ve bu bulgular, daha önce meme kanser kök hücrelerinde CAPE etkisinin araştırıldığı çalışmadaki bulgularla örtüşmektedir. Bu çalışmada CAPE'in, tedaviye dirençli ve daha uzun süreli bölünme yeteneğine sahip kanser kök hücrelerinin;

tedaviye karşı hassas olan ve sınırlı bölünme yeteneğine sahip kanser hücrelerine farklılaşmasını sağlayarak agresif progresyonu baskıladığı ve sitotoksik ajanlara karşı hassasiyet oluşturduğu şeklinde yorumlanmıştır. Bu çalışmada, CAPE'in meme kanseri kök hücrelerini öldürmediği ancak hücrelerin klonal olarak çoğalma yeteneğinin baskılandığı bildirilmiştir (79). Bizim çalışmamızda ise, 25µM ve 50µM CAPE'in MM kök hücrelerinin canlılığını anlamlı bir şekilde düşürdüğü tespit edilmiştir. Çalışmamızın en can alıcı noktası ise; aynı oranlardaki CAPE'le muamele edilen malign olmayan periferik kan mononükleer hücrelerinin canlılığında anlamlı bir düşüş gözlenmemesidir. Bulgularımız; CAPE'in, kanser hücrelerine yönelik seçici bir apoptotik etkisi olduğu yönündedir.

Hücre döngüsü analizleri, Propolis'in hücreleri plazma hücrelerine farklılaştırması ve bununla beraber hücrelerin canlılığını yitirmesi, CAPE'in antitümöral etki mekanizmasının hücre döngüsü üzerinden gerçekleşiyor olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda ayrıca, CAPE muamelesinden sonra canlılığını hala sürdürmekte olan hücrelerde *P-glikoprotein* ve *ABCG2* ekspresyonları negatifleşmiştir. Görevi, hücrelerin ilaç direncini sağlamak olan bu proteinlerin ekspresyonuyla ters orantılı olarak canlılığın azalması bulgularının, CAPE'in, dirençli hücrelerde kemoterapi ve radyoterapiye hassasiyet oluşturduğunu bildiren daha önceki çalışmalarla ilişkilendirilebileceğini ve CAPE'in etki mekanizmasının, ilaç direncini oluşturan yollarla da ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz (77, 90).

CAPE'in kanser ve özellikle kanser kök hücreleri üzerindeki seçici antitümöral etkileriyle ilgili bulgularımızın ilave yöntemlerle desteklenmesi, *in vivo*'da gösterilmesi ve etki mekanizmasının moleküler düzeyde aydınlatılmasıyla CAPE, yüzyıllardır süregelen kanserde etkin tedavi arayışlarını sonlandıracak kıymetli bir malzeme sayılabilecektir.

8. SONUÇLAR

Ölümcül bir hematolojik malignansi olan MM’de, tedaviye dirençli kanser kök hücrelerinin, doğal bir arı ürünü olan Propolis ve Propolis’in etken bileşeni CAPE muamelesine yanıt olarak gösterebileceği antitümöral etkileri araştırdığımız bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar ve öneriler şunlardır:

1. MM hastalarına ait kemik iliği materyali ile başlatılan primer kültürlerde, MM hücrelerinin uzun süreli kültürü ve kültür ortamında çoğaltılması için ilave büyüme faktörleri ve sitokinler gerektiği kanısına varılmıştır. Yapılacak yeni çalışmalarda, farklı kültür koşulları oluşturularak MM hücrelerinin primer kültürü için optimum koşullar araştırılmalıdır.

2. CD34+ RPMI8226 hücrelerinin yarı katı besiyeri ortamında koloni oluşturma yeteneği olduğu gösterilmiştir, ancak aynı kolonideki hücrelerin ortak klonal kökene sahip olduğunun kanıtlanması için Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tabanlı moleküler yöntemler kullanılarak hücrelerin Ig gen dizileri incelenmelidir. Bu hücrelerin hematopoetik farklılaşmanın hangi evresinde olduğunun belirlenmesi için de deney immünohistokimyasal ve Flow sitometrik yöntemlerle desteklenmelidir. Ayrıca CD34+ RPMI8226 hücrelerindeki, kanser kök hücreleri için tipik bir markır olan *ALDH* ekspresyonu da incelenerek, bu hücrelerin kanser kök hücresi fenotipiyle ilişkisi daha sağlıklı bir şekilde ortaya konabilir.

3. CD34+ hücrelerin önemli birer *ABC taşıyıcı* olan *P-glikoprotein* ve *ABCG2*’yi eksprese ediyor olmasına rağmen, Rho123’ü hücre dışına püskürtmediği belirlenmiştir. Bu *ABC taşıyıcı*ların işlevsel olup olmadığının araştırılması için, hücreler MM tedavisinde kullanılan Lenalidomide, Dexamethasone, Bortezomib ve 4-hydroxycyclophosphamide gibi kemoterapötiklerle muamele edilerek, hücrelerin bu ajanlara verdiği yanıt araştırılmalıdır. MM hücrelerinin tedavi direnciyle ilişkili olduğu bilinen diğer mekanizmalar da araştırılarak, bu mekanizmaların farklılaşmış MM hücreleri ve MM kök hücreleri üzerinde farklı etkiler gösterip göstermediği araştırılmalı ve böylece MM’de tedavi direncinde kanser kök hücresinin kesin rolü aydınlatılmalıdır. Bu konuda gen ekspresyonu düzeyinde analizler yapılarak daha detaylı sonuçların elde edilmesi mümkün olacaktır.

4. Propolis'in lenfosit morfolojisindeki RPMI8226 hücrelerine plazma hücre morfolojisi kazandırdığı tespit edilmiştir. Propolis'in hücreler üzerindeki bu etkisinin aydınlatılması için öncelikle, ilave Flow sitometrik markılar ve immünohistokimyasal analizler kullanılarak plazma hücre morfolojisindeki hücreler karakterize edilmelidir. Ayrıca, yapılacak gen ekspresyon çalışmaları ile, Propolis'in hücre metabolizmasındaki hangi yolağı etkileyerek hücreleri farklılaşmak için indüklediği ve Propolis muamelesine yanıt olarak gerçekleşen hücre ölümünün, hücrelerin farklılaşmasıyla ilişkili olup olmadığı da araştırılmalıdır.

5. Hücre döngüsü analizlerimiz, Propolis ve CAPE muamelesinin hücre bölünmesini indüklediğini göstermiştir. Bölünmekte olan hücrelerin mutajenik ajanlara karşı daha hassas olması dolayısıyla (91), bu sürecin Propolis ve CAPE aracılı hücre ölümünün temel mekanizması olabileceği ve tedaviye karşı hassasiyet geliştirilmesine katkı sağlayabileceği düşünülmüştür. Ayrıca CAPE'in, MM kök hücrelerindeki *ABC taşıyıcıların* ekspresyonunu baskıladığı da tespit edilmiştir. Yapılan daha önceki çalışmalarda CAPE'in kanser hücrelerinde radyoterapiye hassasiyet oluşturduğu bildirilmiştir (77, 90). Tüm bu bulgulardan yola çıkarak, MM kök hücrelerinin direnç gösterdiği bilinen radyoterapötik ve de kemoterapötik ajanların (2, 42, 50), CAPE ile kombine olarak verildiğinde hücrelerde hassasiyet oluşturabileceğini ve yapılacak deneylerde beklenen sonucun elde edilmesi halinde MM tedavileri için farklı bir yaklaşım önerisi getirilebileceğini düşünmekteyiz.

6. Çalışmamızda, CAPE muamelesiyle malign olmayan periferik kan mononükleer hücrelerinde anlamlı bir apoptotik aktivite gözlenmezken; aynı orandaki CAPE'in CD34+ RPMI8226 hücrelerinde canlılığı anlamlı bir şekilde düşürdüğü tespit edilmiştir. Bu bulgu, CAPE'in kanser kök hücrelerini seçici olarak öldürebilecek bir ajan olacağını göstermektedir. CAPE'in seçici etki mekanizmasının moleküler düzeyde aydınlatılması MM'de tedavi stratejilerine yeni bir yaklaşım getirebilecektir. Ayrıca standart MM tedavilerinde kullanılan Lenalidomide, Dexamethasone, Bortezomib ve 4-hydroxycyclophosphamide gibi kemoterapötiklerin MM kök hücresi ve malign olmayan hücreler üzerindeki etkileri incelenerek, CAPE'in bu hücreler üzerindeki etkileriyle karşılaştırılması gerekmektedir. Bu şekilde CAPE'in standart kemoterapötiklere göre etkinliğini ve kanser hücrelerine yönelik seçiciliğini belirlemek mümkün olabilecektir.

Ayrıca, CAPE etkisiyle gözlenen hücre ölümünün sitotoksik veya fizyolojik yollardan hangisiyle gerçekleştiğinin belirlenebilmesi için DNA fragmentasyon analizi gibi ilave deneylere ihtiyaç vardır. Sitotoksik hücre ölümünde, dokuda inflamasyon oluşabileceği ve çevredeki hücrelerin de sitotoksiteden etkilenebileceğinden dolayı, hücre ölümünün fizyolojik bir şekilde gerçekleştiğinin gösterilmesi de bulgularımıza önemli bir yön verecektir.

CAPE'in MM kök hücreleri üzerinde gösterdiği seçici apoptotik etkinin *in vivo* deneylerle de kanıtlanması halinde CAPE'in, günümüzde hala etkin bir şekilde tedavi edilemeyen kansere karşı doğanın bir mucizesi olarak tanıtılabileceğini düşünmekteyiz.

9. KAYNAKLAR

1. World Health Organization (2004). The Global Burden of Disease: 2004 Update. Geneva, [online]. Available from: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf.
2. Matsui W, Wang Q, Barber JP, Brennan S, Smith BD, Borrello I, McNiece I, Lin L, Ambinder AF, Peacock C, Watkins DN, Huff CA, Jones RJ (2008). Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance. *Cancer Res* 68(1), 190-7.
3. Sun Y, Campisi J, Higano C, Beer TM, Porter P, Coleman I, True L, Nelson PS (2012). Treatment-induced damage to the tumor microenvironment promotes prostate cancer therapy resistance through WNT16B. *Nat Med*.18(9):1359-68.
4. Artan B (2009). Multiple Myeloma'da Kromozomal Düzensizliklerin Sitogenetik ve FISH Yöntemleri İle Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Trabzon Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
5. Calderwood SK (2013). Tumor heterogeneity, clonal evolution, and therapy resistance: an opportunity for multitargeting therapy. *Discov Med*. 15(82):188-94.
6. Williams JW, Beutler E, Erslev A.J, Lichtman MA (1991). *Hematology*, 4th ed, New York:McGraw-Hill Publishing Company, 1101-1108.
7. National Cancer Institute, The Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program [online]. Available from: <http://seer.cancer.gov/>
8. Campagnaro EL, Jacobus SJ, Uno H (2011). Survival outcomes in elderly patients with plasma cell myeloma: the three-decade Eastern Cooperative Oncology Group experience. *J Clin Oncol*;29(suppl): 8021.
9. Riedel DA, Pottern LM (1992). The epidemiology of multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am* (6): 225-47.
10. Bergsagel D, (1995), The incidence and epidemiology of plasma cell neoplasms., *Stem Cells*;13 Suppl 2:1-9.
11. Kuehl WM, Bergsagel PL, (2002). Multiple myeloma: evolving genetic events and host interaction. *Nat Rev*, 2: 175-187.
12. Khuder SA, Mutgi AB, (1997). Meta analysis of multiple myeloma and farming. *Am J Ind Med*, 1997; 32: 512-516.

13. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE (2003). Review of 1.027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. Mayo Clin Proc; 78: 21-33.
14. Boccadoro M, Pileri A (1997). Diagnosis, prognosis, and standard treatment of multiple myeloma. Hematol Oncol Clin North Am;11(1):111-31.
15. Kara İÖ (2005). Multiple Myelomalı Hastalarda Periferik Kan ve Kemik İliği Hepatosit Growth Faktör (HGF). Platelet Growth Faktör-AB (PDGF-AB) Ve Transforming Growth Faktör-A (TGF-A) Ekspresyonu Ve Klinik Önemi, Yan Dal Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adana.
16. Durie BG, Salmon SE (1975). A clinical staging system for multiple myeloma: correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. Cancer 36, 842-54.
17. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, Boccadoro M, Child JA, Avet-Loiseau H, Kyle RA, Lahuerta JJ, Ludwig H, Morgan G, Powles R, Shimizu K, Shustik C, Sonneveld P, Tosi P, Turesson I, Westin J (2005). International staging system for multiple myeloma. J Clin Oncol 23(15):3412-20.
18. Catley L, Tai Y, Chauhan D, Anderson KC (2005). Perspectives for combination therapy to overcome drug resistant multiple myeloma. Drug Resist Updat 8:205-218.
19. Bergsagel PL, Kuehl WM (2001). Chromosome translocations in multiple myeloma. Oncogene 20:5611-5622.
20. Erçetin AP (2010). Multipl miyelomda düzenleyici T hücrelerin ve Programlı ölüm-1'in rolü, Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
21. National Institutes of Health. (2009) Stem Cell Basics [online]. Available from: <http://stemcells.nih.gov/info/basics/Pages/Default.aspx>
22. Hamburger AW, Salmon SE (1977). Primary bioassay of human tumor stem cells. Science 197(4302):461-3.
23. Spremulli EN, Dexter DL (1983). Human tumor cell heterogeneity and metastasis. J Clin Oncol 1(8):496-509.
24. Sharma B, Singh RK (2011). Emerging candidates in breast cancer stem cell maintenance, therapy resistance and relapse. J Carcinog 36. doi: 10.4103/1477-3163.
25. Hu Y, Fu L (2011). Targeting cancer stem cells: a new therapy to cure cancer patients. Am J Cancer Res;2(3):340-56.

26. Goldthwaite CA (2011). Are Stem Cells Involved in Cancer? National Institutes of Health (NIH) resources for stem cell research [online]. Available from: <http://stemcells.nih.gov/>
27. Huff CA, Matsui W (2008). Multiple myeloma cancer stem cells. *J Clin Oncol* 26(17), 2895-900.
28. Agarwal JR, Matsui W (2010). Multiple myeloma: a paradigm for translation of the cancer stem cell hypothesis. *Anticancer Agents Med Chem* 10(2), v116-20.
29. Brennan SK, Wang Q, Tressler R, Harley C, Go N, Bassett E, Huff CA, Jones RJ, Matsui W (2010). Telomerase inhibition targets clonogenic multiple myeloma cells through telomere length-dependent and independent mechanisms. *PLoS One* 5(9).
30. Dean M (2009). ABC Transporters, Drug Resistance, and Cancer Stem Cell, *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 14(1), 3-9.
31. Facompre N, Nakagawa H, Herlyn M, Basu D (2012). Stem-like cells and therapy resistance in squamous cell carcinomas. *Adv Pharmacol* 65:235-65.
32. Dounille J, Beaulieu R, Balicki D (2009). ALDH1 as a functional marker of cancer stem and progenitor cells. *Stem Cells Dev* 18(1), 17-25.
33. Peacock CD, Wang Q, Gesell GS, Corcoran-Schwartz IM, Jones E, Kim J, Devereux WL, Rhodes JT, Huff CA, Beachy PA, Watkins DN, Matsui W (2007). Hedgehog signaling maintains a tumor stem cell compartment in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 4048–4053.
34. Kurosaki T (2010). B-lymphocyte biology, *Immunological Reviews* Vol 237: 5–9.
35. Mitchison NA (2004). T-cell-B-cell cooperation. *Nat Rev Immunol* 4(4):308-12.
36. Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC (1998). Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* 91(1):3-21.
37. Feldman RJ, Ahmed AR (2011). Relevance of rituximab therapy in pemphigus vulgaris: analysis of current data and the immunologic basis for its observed responses. *Expert Rev Clin Immunol* 7(4):529-41.
38. LeBien TW, Tedder TF (2008). B lymphocytes: how they develop and function, *Blood* 112: 1570-1580.
39. Bergsagel DE, Valeriote FA (1968). Growth characteristics of a mouse plasma cell tumor. *Cancer Res* 28(11), 2187-96.

40. Hamburger AW, Salmon SE (1977). Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 197(4302):461-3.
41. Robillard N, Pellat-Deceunynck C, Bataille R (2005). Phenotypic characterization of the human myeloma cell growth fraction. *Blood* 105(12):4845-8.
42. Matsui W, Huff CA, Wang Q, Malehorn MT, Barber J, Tanhehco Y, Smith BD, Civin CI, Jones RJ (2004). Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood* 103, 2332–2336.
43. Kuranda K, Berthon C, Dupont C, Wolowiec D, Leleu X, Polakowska R, Jouy N, Quesnel B (2010). A subpopulation of malignant CD34+CD138+B7-H1+ plasma cells is present in multiple myeloma patients. *Exp Hematol* 38: 124-131.
44. Reid S, Yang S, Brown R, Kabani K, Aklilu E, Ho PJ, Woodland N, Joshua D (2010). Characterisation and relevance of CD138-negative plasma cells in plasma cell myeloma. *Int J Lab Hematol* 32, e190-6.
45. Kovarova L, Buresova I, Buchler T, Suska R, Pour L, Zahradova L, Penka M, Hajek R (2009). Phenotype of plasma cells in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Neoplasma* 56(6), 526-32.
46. Billadeau D, Ahmann G, Greipp P, Van Ness B (1993). The bone marrow of multiple myeloma patients contains B cell populations at different stages of differentiation that are clonally related to the malignant plasma cell. *J Exp Med* 178:1023- 1031.
47. Jakubikova J, Adamia S, Kost-Alimova M, Klippel S, Cervi D, Daley JF, Cholujoa D, Kong SY, Leiba M, Blotta S, Ooi M, Delmore J, Laubach J, Richardson PG, Sedlak J, Anderson KC, Mitsiades CS (2011). Lenalidomide targets clonogenic side population in multiple myeloma: pathophysiologic and clinical implications. *Blood* 117(17):4409-19.
48. Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* 11(7):1156-66.
49. Drewinko B, Alexanian R, Boyer H, Barlogie B, Rubinow SI (1981) The growth fraction of human myeloma cells. *Blood*;57(2):333-8.
50. Pilarski LM, Szczeppek AJ, Belch AR (1997). Deficient Drug Transporter Function of Bone Marrow – Localized and Leukemic Plasma Cells in Multiple Myeloma. *Blood* 90(9):3751-9.

51. Turner JG, Gump JL, Zhang C, Cook JM, Marchion D, Hazlehurst L, Munster P, Schell MJ, Dalton WS, Sullivan DM (2006). ABCG2 expression, function, and promoter methylation in human multiple myeloma. *Blood* 108, 3881-3889.
52. Spisek R, Kukreja A, Chen LC, Matthews P, Mazumder A, Vesole D, Jagannath S, Zebroski HA, Simpson AJ, Ritter G, Durie B, Crowley J, Shaughnessy JD Jr, Scanlan MJ, Gure AO, Barlogie B, Dhodapkar MV (2007). Frequent and specific immunity to the embryonal stem cell-associated antigen SOX2 in patients with monoclonal gammopathy. *J Exp Med* 204(4), 831-40.
53. Christensen JH, Jensen PV, Kristensen IB, Abildgaard N, Lodahl M, Rasmussen T (2012). Characterization of potential CD138 negative myeloma "stem cells". *Haematologica* 97(6):e18-20.
54. Hosen N, Matsuoka Y, Kishida S, Nakata J, Mizutani Y, Hasegawa K, Mugitani A, Ichihara H, Aoyama Y, Nishida S, Tsuboi A, Fujiki F, Tatsumi N, Nakajima H, Hino M, Kimura T, Yata K, Abe M, Oka Y, Oji Y, Kumanogoh A, Sugiyama H (2012). CD138-negative clonogenic cells are plasma cells but not B cells in some multiple myeloma patients. *Leukemia* 26(9):2135-41.
55. Paulino N, Teixeira C, Martins R, Scremin A, Dirsch VM, Vollmar AM, Abreu SR, de Castro SL, Marcucci MC (2006). Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of a Brazilian green propolis. *Planta Med* 72(10), 899-906.
56. Tekeli A (2007). Etlik civciv rasyonlarında doğal büyüme uyarıcı olarak bitkisel ekstraktların ve propolisin kullanım olanakları, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
57. Takaisi-Kikuni NB, Schilcher H (1994). Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Med* 60(3), 222-7.
58. Dota KF, Consolaro ME, Svidzinski TI, Bruschi ML (2011). Antifungal Activity of Brazilian Propolis Microparticles against Yeasts Isolated from Vulvovaginal Candidiasis. *Evid Based Complement Alternat Med* 201953.
59. Nolkemper S, Reichling J, Sensch KH, Schnitzler P (2010). Mechanism of herpes simplex virus type 2 suppression by propolis extracts. *Phytomedicine* 17(2):132-8.

60. Watanabe MA, Amarante MK, Conti BJ, Sforcin JM (2011). Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. *J Pharm Pharmacol* 63(11):1378-86.
61. Çam H (2007). Sıçanlarda aspirin ile uyarılan gastritin önlenmesinde kafeik asit fenetil ester'in etkinliğinin araştırılması.Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Isparta.
62. Grunberger D, Banerjee R, Eisinger K, Oltz EM, Efros L, Caldwell M, Estevez V, Nakanishi K (1988). Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia* 44, 230-232.
63. Sud'ina GF, Mirzoeva OK, Pushkareva MA, Korshunova GA, Sumbatyan NV, Varfolomeev SD (1993). Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. *FEBS Lett* 329, 21-24.
64. Fesen MR, Pommier Y, Leteurtre F, Hiroguchi S, Yung J, Kohn KW (1994). Inhibition of HIV-1 integrase by flavones, caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and related compounds. *Biochem Pharmacol* 48, 595-608.
65. Zheng ZS, Xue GZ, Grunberger D, Prystowsky JH (1995). Caffeic acid phenethyl ester inhibits proliferation of human keratinocytes and interferes with the EGF regulation of ornithine decarboxylase. *Oncol. Res* 7, 445-452.
66. Sawicka D, Car H, Borawska MH, Nikliński J (2012). The anticancer activity of propolis. *Folia Histochem Cytobiol* 50(1):25-37.
67. Sulaiman GM, Ad'hiah AH, Al-Sammarrae KW, Bagnati R, Frapolli R, Bello E, Ubaldi S, Romano M, Panini N, Scanziani E, Pezzolato M, Erba E, D'Incalci M (2012). Assessing the anti-tumour properties of Iraqi propolis in vitro and in vivo. *Food Chem Toxicol* 50(5):1632-41.
68. Hehlhans S, Lange I, Eke I, Kammerer B, Cordes N (2011). Human head and neck squamous cell carcinoma cell lines are differentially radiosensitised by the honeybee product Propolis. *Int J Radiat Biol* 87(3):243-53.
69. Kamiya T, Nishihara H, Hara H, Adachi T (2012). Ethanol Extract of Brazilian Red Propolis Induces Apoptosis in Human Breast Cancer MCF- 7 Cells through Endoplasmic Reticulum Stress. *J Agric Food Chem* 60(44):11065-70.

70. Koru Ö, Avcu F, Tanyüksel M, Ural AU, Araz RE, Şener K (2009). Cytotoxic effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on the human multiple myeloma cell line. *Turk J Med Sci*; 39(6): 863-870.
71. Vatansever HS, Sorkun K, İsmet Deliloğlu Gurhan S, Ozdal-Kurt F, Turkoz E, Gencay O, Salih B (2010). Propolis from Turkey induces apoptosis through activating caspases in human breast carcinoma cell lines. *Acta Histochem* 112(6), 546-56.
72. Avcı CB, Gündüz C, Baran Y, Sahin F, Yılmaz S, Dogan ZO, Saydam G (2011). Caffeic acid phenethyl ester triggers apoptosis through induction of loss of mitochondrial membrane potential in CCRF-CEM cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 137(1), 41-7.
73. Chen MJ, Chang WH, Lin CC, Liu CY, Wang TE, Chu CH, Shih SC, Chen YJ (2008). Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis of human pancreatic cancer cells involving caspase and mitochondrial dysfunction. *Pancreatology* 8(6):566-76.
74. JiN UH, Song KH, Motomura M, Suzuki I, Gu YH, Kang YJ, Moon TC, Kim CH (2008). Caffeic acid phenethyl ester induces mitochondria-mediated apoptosis in human myeloid leukemia U937 cells. *Mol Cell Biochem* 310(1-2):43-8.
75. Xiang D, Wang D, He Y, Xie J, Zhong Z, Li Z, Xie J (2006). Caffeic acid phenethyl ester induces growth arrest and apoptosis of colon cancer cells via the beta-catenin/T-cell factor signaling. *Anticancer Drugs* 17(7):753-62.
76. Su ZZ, Lin J, Prewett M, Goldstein NI, Fisher PB (1995). Apoptosis mediates the selective toxicity of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) toward oncogene-transformed rat embryo fibroblast cells. *Anticancer Res* 15(5B):1841-8.
77. Lee YY, Kao CL, Tsai PH, Tsai TH, Chiou SH, Wu WF, Ku HH, Wong TT (2008). Caffeic acid phenethyl ester preferentially enhanced radiosensitizing and increased oxidative stress in medulloblastoma cell line. *Childs Nerv Syst* 24(9):987-94.
78. Cavaliere V, Papademetrio DL, Lorenzetti M, Valva P, Preciado MV, Gargallo P, Larripa I, Monreal MB, Pardo ML, Hajos SE, Blanco GA, Alvarez EM (2009). Caffeic Acid Phenylethyl Ester and MG-132 Have Apoptotic and Antiproliferative Effects on Leukemic Cells But Not on Normal Mononuclear Cells. *Transl Oncol* 2(1):46-58.

79. Omene CO, Wu J, Frenkel K (2012). Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) derived from propolis, a honeybee product, inhibits growth of breast cancer stem cells. *Invest New Drugs* 30(4):1279-88.
80. Peters CE, Woodside SM, Eaves AC (2005) Isolation of subsets of immune cells. *Methods Mol Biol*; 302:95-116.
81. Dalva K (2005). Hematoloji’de Akım Sitometri Kullanımı. Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komitesi, Temel Moleküler Hematoloji Kursu, 12-13 Mart 2005.
82. Oktar N (2009). K562 Hücre Dizisinde Fosfin Bileşiklerinin Sitotoksik Etkisinin MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2- Yl]-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide; Thiazolyl Blue) İle Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana.
83. Wognum B, Yuan N, Lai B, Miller CL (2013). Colony forming cell assays for human hematopoietic progenitor cells. *Methods Mol Biol*;946:267-83.
84. Ridley RC, Xiao H, Hata H, Woodliff J, Epstein J, Sanderson RD (1993). Expression of syndecan regulates human myeloma plasma cell adhesion to type I collagen. *Blood* 81(3):767-74.
85. Strandmann EP, Hansen HP, Reiners KS, Schnell R, Borchmann P, Merkert S, Simhadri VR, Draube A, Reiser M, Purr I, Hallek M, Engert A (2006). A novel bispecific protein (ULBP2-BB4) targeting the NKG2D receptor on natural killer (NK) cells and CD138 activates NK cells and has potent antitumor activity against human multiple myeloma in vitro and in vivo. *Blood* 107(5):1955-62.
86. Cahu J, Bustany S, Sola B (2012). Senescence-associated secretory phenotype favors the emergence of cancer stem-like cells. *Cell Death Dis* 3:e446.
87. American Type Culture Collection (1966). RPMI 8226 (ATCC® CCL-155™) Manassas, [online]. Available from: http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-155.aspx?geo_country=tr
88. Chaffer CL, Brueckmann I, Scheel C, Kaestli AJ, Wiggins PA, Rodrigues LO, Brooks M, Reinhardt F, Su Y, Polyak K, Arendt LM, Kuperwasser C, Bieri B, Weinberg RA (2011). Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(19):7950-5.
89. Paino T, Ocio EM, Paiva B, San-Segundo L, Garayoa M, Gutiérrez NC, Sarasquete ME, Pandiella A, Orfao A, San Miguel JF (2012). CD20 positive cells are

undetectable in the majority of multiple myeloma cell lines and are not associated with a cancer stem cell phenotype. *Haematologica* 97(7):1110-4.

90. Chen MF, Wu CT, Chen YJ, Keng PC, Chen WC (2004). Cell killing and radiosensitization by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in lung cancer cells. *J Radiat Res* 45(2):253-60.
91. Holtz MS, Forman SJ, Bhatia R (2005). Nonproliferating CML CD34+ progenitors are resistant to apoptosis induced by a wide range of proapoptotic stimuli. *Leukemia* 19(6):1034-41.

10. ETİK KURUL ONAYI

**T.C. KARADENİZ
TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ YEREL
ETİK KURUL BAŞKANLIĞI**



**KARADENİZ
TECHNICAL UNIVERSITY
FACULTY OF MEDICINE
ETHIC COUNCIL**

Sayı : 539
Konu:

Tarih: 06.07.2011

Sayın; Yük.Lis.Öğr.Pelin KÜÇÜK
Tıbbi Biyoloji ABD.

“Propolis ve Kafeik Asit Fenetil Esterleri (Cape)’nin Multipl Myelom Kanseri Kök Hücreleri Üzerindeki Antiproliferatif Etkisi” başlıklı etik kurul 2011/86 no’lu tez çalışmasının raporör ve etik kurul görüşleri doğrultusunda; tıbbi etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilginizi ve gereğini rica ederim.

Prof.Dr.Faruk AYDIN
Etik Kurul Başkanı

Eki : 1 onay belgesi



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI

ETİK KURUL ONAY BELGESİ

Çalışmasının Adı: "Propolis ve Kafeik Asit Fenetil Esterleri (Cape)'nin Multipl Myelom Kanser Kök Hücreleri Üzerindeki Antiproliferatif Etkisi"

Çalışmacılar: Yük.Lis.Öğr.Pelin KÜÇÜK, Prof.Dr.Figen CELEP, Doç.Dr.Sevgi KOLAYLI, Doç.Dr.Mehmet SÖNMEZ, Prof.Dr.Murat ERTÜRK, Y.Doç.Dr.Rezzan ALİYAZICIOĞLU, Arş.Gör.Hüseyin ŞAHİN

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji ABD.

Etik Kurul
Dosya No
2011/86

Etik Kurul
Toplantı Tarihi
04.07.2011

Etik Kurul
Toplantı No
2011/17

Etik Kurul
Karar No
8

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu, Tıp Fakültesi Dekanlığı Toplantı Salonu'nda Prof.Dr.Faruk AYDIN'ın başkanlığında "Propolis ve Kafeik Asit Fenetil Esterleri (Cape)'nin Multipl Myelom Kanser Kök Hücreleri Üzerindeki Antiproliferatif Etkisi" başlığını taşıyan tez çalışmasının, araştırmanın dosyada belirtilen haliyle tıbbi etik açıdan uygun olduğuna; Etik Kurul üyelerinin oybirliğiyle karar verilmiştir. (04.07.2011)

Prof.Dr. Faruk AYDIN

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Tıp Fakültesi Etik Kurul Başkanı
Tıbbi Mikrobiyoloji Abd

11. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

T.C. Kimlik/Pasaport : 30221386454

Soyadı, Adı : KÜÇÜK, Pelin

Uyruğu : T.C.

Doğum tarihi ve yeri : 16/06/1987, TRABZON

Medeni hali : Bekar

Telefon : 506 966 21 04

E-Posta : p.kucuk@hotmail.com

Yazışma adresi : KTÜ SABE Tıbbi Biyoloji AD 61080 TRABZON

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	: KTÜ SABE Tıbbi Biyoloji AD	2013
Lisans	: Marmara Üniversitesi, Biyoloji	2010
Lise	: Şişli Lisesi, Yabancı Dil Ağırlıklı	2005

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre(Yıl-Yıl)
1. Araştırma görevlisi	KTÜ SABE Tıbbi Biyoloji AD	2012-halen

YABANCI DİL

İngilizce (Upper intermediate)