



T.C.  
İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**Dinamik Hücre Kültürü Modelinde Doğal Bileşiklerin Kök Hücre  
Yaşlanması Üzerindeki Protektif Etkisi**

**FİKRİYE FULYA KAVAK**  
**ORCID ID: 0000-0003-0278-7188**  
**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**DOÇ. DR. MELEK PEHLİVAN**

**İKİNCİ DANIŞMAN**  
**PROF. DR. MARGHERITA MAIOLI**

**İZMİR-2024**

T.C.  
İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**Dinamik Hücre Kültürü Modelinde Doğal Bileşiklerin Kök Hücre  
Yaşlanması Üzerindeki Protaktif Etkisi**

**FİKRİYE FULYA KAVAK**  
**ORCID ID: 0000-0003-0278-7188**  
**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**DOÇ. DR. MELEK PEHLİVAN**

**İKİNCİ DANIŞMAN**  
**PROF. DR. MARGHERITA MAIOLI**

Bu tez çalışması, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) kapsamında 2023-TDR-SABE-0006 proje numarası ile desteklenmiştir.

**İZMİR-2024**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Programı Anabilim Dalı tarafından yürütülmüş olan “Dinamik Hücre Kültürü Modelinde Doğal Bileşiklerin Kök Hücre Yaşlanması Üzerindeki Protaktif Etkisi” başlıklı bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 16 / 01 / 2024

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Melek PEHLİVAN (0000-0001-8755-4812) İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi (İMZA)

Üye : Prof. Dr. İbrahim PİRİM (0000-0001-8485-3286) (İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi) (İMZA)

Üye : Doç. Dr. Mümin Alper ERDOĞAN (0000-0003-0048-444X) (İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi) (İMZA)

Üye : Prof. Dr. H. Ogün SERCAN (0000-0002-2449-1794) (Dokuz Eylül Üniversitesi) (İMZA)

Üye : Prof. Dr. Feyzan Özdal Kurt (0000-0001-6070-3742) (Celal Bayar Üniversitesi) (İMZA)

ONAY: Bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

(İMZA)

(Prof. Dr. Hatice YILDIRIM SARI)

Enstitü Müdürü

## İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI .....	ii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI.....	v
ETİK BEYAN .....	vi
TEŞEKKÜR .....	vii
ÖZET .....	viii
ABSTRACT .....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
ŞEKİLLER .....	xv
TABLOLAR.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi .....	1
1.2. Araştırmanın Amacı.....	2
1.3. Araştırmanın Hipotezleri.....	2
1.4. Araştırmanın Önemi ve Yaygın Etkisi.....	2
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kök Hücre .....	4
2.1.1. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH) .....	6
2.2. Deri ve Fonksiyonu .....	6
2.3. Derideki Hücre Popülasyonları .....	8
2.3.1. Fibroblast.....	8
2.3.2. Deri Kök Hücreleri (DKH) .....	9
2.3.3. Diğer Hücreler .....	10
2.4. Yaşlanma ve Derinin Değişimi .....	10
2.4.1. Wnt Sinyal İleti Yolağı.....	11
2.5. Doğal Moleküllerin Geleneksel Tıpta ve Kozmetikte Kullanımı .....	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
3.1 Araştırmanın Türü: .....	19
3.2 Araştırmanın Yapıldığı Yer ve Zaman: .....	19
3.3 Araştırmanın Evreni ve Örneklemi .....	19
3.4. Deri Kök Hücre İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Kültürü .....	19
3.4.1. Alizarin Kırmızı Boyaması .....	21
3.4.2. Yağ Kırmızısı Boyaması .....	22
3.4.3. Büyüme Eğrisi ve Canlılık Testi.....	22

3.5.	Balın HFF1 Hücreleri ve DKH Üzerindeki Sitotoksik Etkisi.....	23
3.5.1.	Bal Konsantrasyonlarının Hazırlanması.....	23
3.5.2.	MTT Hücre Canlılık Analizi .....	23
3.6.	İnsan Derisi Dinamik Hücre Kültürü Modelinde balın deri üzerindeki koruyucu etkisi	24
3.6.1.	Biyoreaktör ve Kültür Koşullarının oluşturulması.....	24
3.6.2.	Hücelere Bal Uygulanması .....	26
3.6.3.	UV ile Yaşlanmanın İndüklenmesi .....	26
3.6.4.	Biyoreaktörün Sökülmesi ve Örneklerin Toplanması .....	27
3.6.5.	DKH ve HFF1 Hücrelerinde Gen İfade Analizi .....	27
3.7.	İstatistiksel Analiz .....	32
3.8.	Etik İzinler.....	32
4.	BULGULAR.....	33
4.1.	DKH İzolasyonu, Kültürü ve Farklılaşma Potansiyelinin Kontrolü .....	33
4.1.1.	DKH İzolasyonu .....	33
4.1.2.	DKH'nin Farklılaşma Potansiyeli .....	33
4.1.3.	Spesifik Kültür Ortamının Hücre Büyümesine Etkisi .....	33
4.1.4.	Spesifik Kültür Ortamının Hücre Canlılığına Etkisi.....	33
4.2.	Balın DKH ve HFF1 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin MTT Analizi ile Belirlenmesi.....	34
4.2.1.	Balın DKH Üzerindeki Sitotoksik Etkisi .....	34
4.2.2.	Balın HFF1 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi.....	36
4.3.	DKH ve HFF1 Hücrelerinde Gen İfade Analizi .....	37
4.3.1.	Kök Hücre ve Hücre Döngüsü İlişkili Genlerin Gen İfade Analizi Sonuçları.....	39
4.3.2.	Kök Hücrede Wnt Sinyal İleti Yolağı Genlerinin İfade Analizi Sonuçları.....	41
4.3.3.	HFF1 Hücrelerinde Hücre Dışı Matriks, Stres ve Apoptoz İlişkili Genlerin İfade Analizi Sonuçları.....	44
4.3.4.	HFF1 Hücrelerinde Wnt Sinyal İleti Yolağı Genlerinin İfade Analizi Sonuçları .....	45
5.	TARTIŞMA.....	48
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	62
7.	KAYNAKLAR .....	63
EKLER.....		74
ÖZGEÇMİŞ.....		75

## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kâğıt) ve elektronik formatta arşivleme ve dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir şekilde kullanıma açma iznini İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi'ne verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır. Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

16/01/2024

Fikriye Fulya Kavak

## ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, “Dinamik Hücre Kültürü Modelinde Doğal Bileşiklerin Kök Hücre Yaşlanması zerindeki Protektif Etkisi” başlıklı çalışmamın, Tez Danışmanım Doç. Dr. Melek PEHLİVAN danışmanlığında tarafımdan retilindiğini ve İzmir Kâtip elebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığımı beyan ederim.

16/01/24

Fikriye Fulya Kavak

## TEŞEKKÜR

Doktora tezimin bütün süreçlerinde benden desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleri ile katkı sağlayan tez danışmanım Doç. Dr. Melek PEHLİVAN'a, Erasmus programı kapsamında gittiğim Sassari Üniversitesi Biomedikal Bilimler Anabilim Dalında bana çalışmam için imkân sağlayan ve desteğini esirgemeyen, aynı zamanda ikinci danışmanım olan Prof. Dr. Margherita MAIOLI'ye,

İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı hocalarım Prof. Dr. İbrahim PİRİM, Prof. Dr. Tülay KILIÇASLAN AYNA ve Prof. Dr. Mustafa SOYÖZ'e ve bu süreçte bana destek olan bütün laboratuvar arkadaşlarıma,

Sassari Üniversitesi Biyomedikal Bilimler Anabilim Dalı laboratuvarında birlikte çalıştığım ve bana çalışmalarım dahil her konuda destek olan başta Emanuella BELLU, PhD ve Sara CRUCIANI, PhD olmak üzere bütün laboratuvar arkadaşlarıma, Laboratuvar olanaklarını ve kıymetli bilgileri ile bu süreçte desteklerini esirgemeyen Dokuz Eylül Üniversitesi Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. H. Ogün SERCAN'a

Erasmus Staj Hareketliliği kapsamından faydalanmamı sağlayan Ulusal Ajans'a ve gittiğim Sassari Üniversitesi'nde bana her konuda destek olan hocam Klinik Genetik Anabilim Dalı Ord. Prof. Dr. Andrea MONTELLA'ya,

Maddi ve manevi her konuda daima beni motive eden ve destek olan, hayatım boyunca örnek aldığım ve almaya çalışacağım sevgili annem ve babama, aynı zamanda meslektaşım olan sevgili kardeşime,

Bu süreçte bana destek olan arkadaşlarım ve ailemin diğer fertlerine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Fikriye Fulya Kavak

İzmir-2024



## ÖZET

### DİNAMİK HÜCRE KÜLTÜRÜ MODELİNDE DOĞAL BİLEŞİKLERİN KÖK HÜCRE YAŞLANMASI ÜZERİNDEKİ PROTEKTİF ETKİSİ

Fikriye Fulya KAVAK

İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve  
Genetik Anabilim Dalı /Doktora Tezi, İzmir, Türkiye, 2024

**Amaç:** Bal uygulamasının dinamik hücre kültürü modelinde, Mezenkimal kökenli deri kök hücreleri (DKH) ve insan deri fibroblastları (HFF1) üzerindeki UV kaynaklı yaşlanmaya karşı koruyucu etkisini ve bu süreçte rol oynayan kök hücre, hücre döngüsü, stres, apoptoz ve HDM ilişkili genlerin ve Wnt sinyal ileti yolağı genlerinin rolünü araştırmaktır.

**Yöntem:** Deri modellemesi yapmak amacıyla sağlıklı bireylerden deri biyopsileri alındı. Biyopsilerden elde edilen Mezenkimal kökenli DKH'leri, HFF1 ve keratinosit (HaCaT) hücre hatları ile birlikte biyoreaktör (Live Flow 2) aracılığıyla kültüre edilip %1 bal ile 48 saat ön işleme tabi tutuldu. Bal uygulamasının ardından HFF1 ve DKH'leri yaşlanmayı indüklemek için UV hasarına maruz bırakıldı. Balın hücrelerdeki UV hasarı kaynaklı yaşlanma karşıtı etkisi ve Wnt sinyal ileti yolağı ile ilişkisi RT-qPCR yöntemi kullanılarak incelendi.

**Bulgular:** Öncesinde bal uygulanan DKH'sinde UV hasar sonrası, bal uygulanmayan gruba göre pluripotensi genleri Oct4 ve Sox2 ifadelerinde artış gözlenirken, hücre döngüsü genleri p16, p21 ve p53 gen ifadelerinde azalma gözlenmiştir. Bu süreçte bal uygulanan kök hücrede UV hasar sonrası Wnt3a ve Wnt5a ifadeleri artarken  $\beta$ -katenin ifadesinde azalma gözlemlendi. Bal ön uygulaması UV hasara karşı HFF1 hücrelerinde Hsp70 ve HAS2 ifadelerini arttırdı ve Kaspaz 8 ifadesini azalttı. UV hasar öncesi bal uygulanan HFF1 hücrelerinde, bal uygulanmayan HFF1 hücrelere göre Wnt genleri genel olarak artma eğilimindeyken  $\beta$ -katenin ifadesinde azalma gözlemlendi.

**Sonuçlar:** Bal ön uygulamasının deri kök hücreleri genlerinin ifadesini arttırarak hücreleri UV kaynaklı yaşlanmadan koruyabildiği, kök hücre genlerinin ifadesinin artışıyla beraber hücre döngüsü genlerin ifadesinin azaldığı gözlenmiştir. Kök hücrenin kendini yenileme ve soya bağlı öncül hücreleri üretmeye yönelik Wnt sinyal ileti yollarında yer alan genlerin ifade değişimleri, bal varlığında UV hasarının etkilerinden korumaya yönelik hipotezimiz ile paralellik göstermektedir. Deri

fibroblastlarında da bal uygulamasının UV hasar sonrası hücreleri koruyabildiği ve saç kalımını destekleyebildiği yönünde veriler elde edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Deri, kök hücre, bal, biyoreaktör, Wnt sinyal iletimi, yaşlanma.

## ABSTRACT

### PROTECTIVE EFFECT OF NATURAL COMPOUNDS ON STEM CELL AGING IN A DYNAMIC CELL CULTURE MODEL

**Fikriye Fulya KAVAK**

**Izmir Katip Celebi University, Graduate School of Health Science Medical  
Biology And Genetic Department /Doctoral Degree Thesis, Izmir, Türkiye, 2024**

**Aim:** The aim of the study is to investigate the protective effect of honey application in a dynamic cell culture model on Mesenchymal Stem Cells (MSCs) and Human Skin Fibroblasts (HFF1) against UV-induced aging. The study focuses on exploring the role of stem cell-related genes, cell cycle regulation, stress, apoptosis, Human Dermal Matrix (HDM)-related genes, and the Wnt signaling pathway during this process.

**Methods:** Mesenchymal-derived skin stem cells obtained from skin biopsies taken from healthy individuals for skin modeling were cultured with fibroblast (HFF1) and keratinocyte (HaCaT) cell lines in a bioreactor (Live Flow 2) and pre-treated with 1% honey for 48 hours. After pretreatment, cells were exposed to UV damage to induce oxidative stress. The UV damage-induced anti-aging effect of honey on cells and its relationship with Wnt signaling were examined using RT-qPCR.

**Results:** Following the application of honey to skin stem cells before exposure to UV damage, there was an observed upregulation in the expression of pluripotency genes Oct4 and Sox2, compared to the group that did not get honey treatment. Additionally, the expression of aging-related cell cycle genes p16, p21, and p53 exhibited a downregulation. During this procedure, skin stem cells that were treated with honey showed an augmentation in the levels of Wnt3a and Wnt5a gene expression, as well as a reduction in the production of  $\beta$ -catenin, following exposure to UV radiation. Prior application of honey alleviated UV-induced damage in HFF1 cells by augmenting the expressions of Hsp70 and HAS2, while diminishing the expression of caspase 8. Pre-treating HFF1 cells with honey before exposing them to UV light resulted in an increase in Wnt proteins and a decrease in  $\beta$ -catenin expression, in comparison to HFF1 cells that were not treated with honey.

**Conclusion:** The pre-application of honey has been observed to protect skin stem cells by increasing the expression of skin stem cell genes, thereby preventing UV-induced

aging. The increase in the expression of stem cell genes, along with a decrease in the expression of cell cycle genes, was observed. The changes in gene expression in the Wnt signaling pathways, which are involved in the self-renewal of stem cells and the production of lineage-committed precursor cells, parallel our hypothesis of protection against the effects of UV damage in the presence of honey. In skin fibroblasts, honey application has been observed to protect cells after UV damage and support their survival.

**Keywords:** Skin, Stem cell, Honey, bioreactor, Wnt signaling, anti-aging.

## SİMGELER VE KISALTMALAR

- APC:** Adenomatöz Polipozis Koli
- Bmi1:** Polycomb Kompleks Proteini 1
- Ca<sup>+2</sup>:** Kalsiyum
- CamKII:** Kalmodulin Kinaz II
- CK1:** Kazein Kinaz 1
- CO<sub>2</sub>:** Karbondioksit
- Ct:** Cycle of Threshold
- DAG:** Diaçilgliserol
- ddH<sub>2</sub>O:** Damıtılmış Su
- DeKH:** Dermal Kök Hücreler
- DeMKH:** Dermal Mezenkimal Kök Hücreler
- DKH:** Deri Kök Hücresi
- DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium
- DNA:** Deoksiriboz Nükleik Asit
- DVL1:** Dishevelled 1
- DVL2:** Dishevelled 2
- DVL3:** Dishevelled 3
- EKH:** Embriyonik Kök Hücre
- FBS:** Fetal Bovin Serum
- Fzd:** Frizzled
- GAPDH:** Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrojenaz
- GSK3 $\beta$ :** Glikojen Sentaz Kinaz 3 $\beta$
- GTP:** Guanozin Trifosfat
- HA:** Hyalüronik Asit

**HaCaT:** İnsan İmmortalize Keratinosit Hücresi

**HDM:** Hücre Dışı Matriks

**HFF1:** İnsan Fibroblast Hücre Hattı

**HFKH:** Kıl Folikülü Kök Hücreleri

**HLA:** İnsan Lökosit Antijenleri

**Hsp70:** Isı Şok Proteini 70

**IFEKH:** İnterfoliküler Epidermis Kök Hücresi

**IP3:** İnozitol-Fosfat 3

**iPKH:** İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre

**JNK:** JUN N-Terminal Kinaz

**K:** Kontrol

**Klf4:** Kruppel Benzeri Faktör 4

**LRP5/6:** Low-density Lipoprotein Receptor-Related Protein 5 veya 6

**MeKH:** Melanosit Kök Hücreleri

**MKH:** Mezenkimal Kök Hücre

**ml:** Mililitre

**MTT:** Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide Testi

**Oct4:** Octamer-Binding Transcription Factor 4

**PCP:** Planar Hücre Polaritesi

**PCR:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu

**PKC:** Protein Kinaz C

**PLC:** Fosfolipaz C

**RAC1:** Rac Family Small GTPase 1

**RHOA:** Ras Homolog Aile Üyesi A

**ROR1/ ROR2:** Tirozin-Protein Kinaz Transmembran Reseptör1 and 2

**RPMI:** Roswell Park Memorial Institute

**SAHF:** Yaşlanma ile İlişkili Heterokromatin Odakları

**SKO:** Spesifik Kültür Ortamı

**Sox2:** SRY-box 2

**TB:** Temel Besiyeri

**TCF/LEF:** T Hücre Faktörü /Lenfoid Güçlendirici Bağlayıcı Faktör

**TERT:** Telomeraz Ters Transkriptaz

**TO:** Transfer Ortamı

**UV:** Ultraviyole

**Uv+B:** UV- Bal

**UvK:** UV-Kontrol

**Wnt16:** Wnt Gen Ailesi Üyesi 6

**Wnt3a:** Wnt Gen Ailesi Üyesi 3a

**Wnt5a:** Wnt Gen Ailesi Üyesi 5a

**Wnt7b:** Wnt Gen Ailesi Üyesi 7b

## ŞEKİLLER

Şekil 1: Simetrik ve Asimetrik Kök Hücre Bölünmesi .....	5
Şekil 2: Derinin Yapısı .....	7
Şekil 3: Kanonik ve Kanonik Olmayan Wnt Sinyal İleti Yollarına Genel Bakış .....	13
Şekil 4: Biyoreaktör Odasının Kurulumu .....	25
Şekil 5: Biyoreaktör Odasına Hücre Ekimi .....	25
Şekil 6: Biyoreaktörün Şeması (a) ve Resmi (b).....	26
Şekil 7: 21 gün boyunca spesifik bir adipojenik veya osteojenik ortamda kültürlenmiş deri kök hücrelerinin farklılaşması. ....	33
Şekil 8: Büyüme eğrisi ve MTT tahlili .....	34
Şekil 9: DKH'lerin Bal1 (A) ve Bal2 (B) ile 24. ve 48. Saat Muamelesi Sonucundaki MTT Sonuçları: .....	35
Şekil 10: HFF1 24 ve 48. Saat Bal1 (A) ve Bal2 (B) Muamelesi Sonucundaki MTT Sonuçları: .....	37
Şekil 11: DKH'de Oct4, Sox2, Bmi1 ve TERT Genlerinin İfade Analizi.....	39
Şekil 12: DKH' de p16, p21 ve p53 Genlerinin İfade Analizi.....	40
Şekil 13: DKH' de Wnt3a, Wnt5a, Wnt7b, Wnt16 ve $\beta$ -katenin Genlerinin İfade Analizi.....	41
Şekil 14: DKH' de Dvl1, Dvl2 ve Dvl3 Genlerinin İfade Analizi. ....	42
Şekil 15: DKH' de Axin1, Axin2, APC ve GSK3 $\beta$ Genlerinin İfade Analizi. ....	43
Şekil 16: HFF1' de HAS2, Hsp70 ve KAS8 Genlerinin İfade Analizi. ....	44
Şekil 17: HFF1' de Wnt3a, Wnt5a, Wnt7b, Wnt16 ve $\beta$ -katenin Genlerinin İfade Analizi.....	45
Şekil 18: HFF1' de Dvl1, Dvl2 ve Dvl3 Genlerinin İfade Analizi.....	46
Şekil 19: HFF1' de Axin1, Axin2, APC, GSK3 $\beta$ Genlerinin İfade Analizi.....	47
Şekil 20: DNA Hasarında p53/p21/p19/p16 Tümör Baskılayıcı Genlerinin Hücre Döngüsü Kontrol Noktalarının Düzenlenmesi .....	50
Şekil 21: DKH ve HFF1 Hücrelerinde, UvK Grubuna Göre Uv+B Gruplarında Artış veya Azalış Gösteren Genlerin Şematik Gösterimi .....	51
Şekil 22: Kanonik ve Kanonik Olmayan Wnt Sinyal İleti Yolu Etkileşimi.....	58



## TABLULAR

<b>Tablo 1:</b> Deneyler Sırasında Kullanılan Kültür Ortamlarının İçeriği .....	21
<b>Tablo 2:</b> Biyoreaktör Düzeneginde HaCaT, HFF1 ve DKH'ler İçin Analiz Edilen Gruplar .....	26
<b>Tablo 3:</b> DKH Hücrelerinde İfadeleri Araştırılan Genler .....	27
<b>Tablo 4:</b> HFF1 Hücrelerinde İfadeleri Araştırılan Genler .....	27
<b>Tablo 5:</b> Luna One-Step RT-qPCR Kit İçeriği .....	28
<b>Tablo 6:</b> Luna One-Step RT-qPCR Protokolü.....	29
<b>Tablo 7:</b> Ters Transkripsiyon Kit İçeriği.....	30
<b>Tablo 8:</b> Ters Transkripsiyon Kit Protokolü .....	30
<b>Tablo 9:</b> Luna Universal qPCR Master Mix Kit İçeriği.....	30
<b>Tablo 10:</b> Luna Universal qPCR Master Mix Protokol Koşulları .....	31
<b>Tablo 11:</b> Primer Dizileri .....	31
<b>Tablo 12:</b> DKH ve HFF1 hücrelerinin UvK ve Uv+B Gruplarının K'ya Göre Normalize Edilmiş Kat Değişim Oranları (K=1).....	38

## 1. GİRİŞ

Deri, organizmanın dış çevre ile ilk temas noktası olup çeşitli faktörlere karşı koruyucu bir bariyer işlevi görmektedir. Bu faktörlerin başında güneş ışınları gelmektedir. Güneş ışınları, özellikle ultraviyole (UV) B ve C dalga boylarında, deri üzerinde doğrudan etki eden zararlı elektromanyetik radyasyon biçimindedir. Güneş ışınları cildin biyolojik ve moleküler yapısında önemli değişikliklere neden olarak yaşlanma sürecini hızlandırabilmektedir. UV ışınları, deri hücrelerinde DNA hasarına yol açarak genetik bütünlüğü bozabilmekte ve bu durum deri hücrelerinin normal fonksiyonlarını ve yenilenme yeteneklerini olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Aynı zamanda kök hücre üretimindeki önemli düşüş, homeostazın sürdürülmesi, çok soylu farklılaşma, hücre dışı matris (HDM) sentezi ve yeniden şekillenmesi, hücreler arası iletişim ve vücudumuzdaki immünomodülasyon dahil olmak üzere çok sayıda zararlı olayın başlamasına neden olmaktadır. Bu nedenle, yaşlanma belirtilerinin ortaya çıkmasında ve deri kanseri gibi hastalıkların gelişiminde güneş ışınlarının rolü büyüktür. Bu bağlamda, güneş ışınlarına maruziyetin ve cildin yaşlanma sürecinin karmaşıklığı, deri sağlığına yönelik koruyucu önlemler ve etkili tedavi stratejileri üzerine odaklanan araştırmaların önemi giderek artmaktadır. Bu çalışma, balın UV hasarı kaynaklı mezenkimal Deri Kök Hücre (DKH) yaşlanması üzerindeki potansiyel koruyucu etkisini araştırmaktadır.

### 1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

İnsan vücudunun en büyük organı olan deri, iç organlar ve çevre arasında ana bariyer görevi görmektedir. Deri, vücudumuzda sert ama esnek bir örtü olarak koruyucu bir rol oynamaktadır. Hem içsel hem de çevresel faktörler, cildin ilerleyen yaşla birlikte bozulmasına neden olur. Cildin rejeneratif kapasitesinde rol oynayan kök hücreler bu süreçten olumsuz etkilenir ve kök hücre potansiyellerini kaybedebilirler. Güneş ışınlarından yayılan UV ışınları çevresel faktörlerden en önemlisidir ve dışsal yaşlanmanın önemli bir kısmından sorumludur. Bu hasar sonucunda deri doku elastikiyetini ve nemini kaybedebilir, anormal pigmentasyonlar ve kırışıklıklar oluşabilir. UV hasarının neden olduğu estetik açıdan olumsuz sonuçlar dışında deri kanserleri ya da deri rahatsızlıkları gelişebilir. Bu noktada UV hasarının neden olduğu olumsuz etkilerin mekanizmalarını anlamak ve koruyucu tedaviler önerebilmek önemlidir.

## 1.2. Araştırmanın Amacı

Çalışmamızın birinci amacı cildin *in vivo* düzenini taklit etmek amacıyla bir biyoreaktör cihazı kullanarak, mezenkimal DKH'ler, insan deri fibroblastları (HFF1) ve keratinositlerin (HaCaT) yer aldığı hücreler arası diferansiyel karışmaya izin veren bir hücre kültürü modeli oluşturmaqdır. İkinci amacımız ise doğal bir bileşik olan balın, UV kaynaklı yaşlanmaya karşı protektif etkisini belirlemek amacıyla bu dinamik hücre kültürü modelindeki DKH'lerde kök hücre ve yaşlanma ile ilişkilendirilmiş genlerin, HFF1 hücrelerinde stres, apoptoz ve HDM ile ilişkilendirilmiş genlerin ve her iki hücre tipinde Wnt sinyal yolağı genlerinin ifadelerini araştırmaktır.

## 1.3. Araştırmanın Hipotezleri

Doğu Anadolu multifloral balı, UV hasarı kaynaklı mezenkimal DKH yaşlanması üzerinde protektif ve modüle edici etkiye sahiptir.

## 1.4. Araştırmanın Önemi ve Yaygın Etkisi

Doku homeostazındaki en önemli faktör, hasarlı elementleri onarma ve doku fonksiyonlarını eski haline getirme yeteneğine sahip kök hücrelerin aktivitesidir. Deri sürekli olarak çeşitli yaralanmalara maruz kalmaktadır, sonucunda deri özellikleri değişebilmektedir. Buna bağlı olarak hücre dışı matriksi içeren kök hücre soylarının özellikleri etkilenebilmektedir. Dolayısıyla gençlik fenotipini korumak önemlidir. Rejeneratif tıpta çeşitli faktörlerin sebep olduğu kök hücre yaşlanmasının mekanizmalarını aydınlatmak ve bu yaşlılık fenotipini önlemek için stratejiler geliştirilebilir. Bu nedenle, deride yer alan Mezenkimal Kök Hücreler (MKH), fibroblastlar ve keratinositler, deride özellikle dermiste doku homeostazını sürdürmek için gereklidir.

Rejeneratif tıp uygulamalarında önemli rolü olan MKH'lerin yaşlanma mekanizmaları ile ilgili çalışmalar mevcuttur ancak Doğu Anadolu multifloral balının UV hasar kaynaklı mezenkimal kökenli DKH yaşlanması üzerindeki protektif ve modüle edici etkisi dinamik hücre kültürü modelinde araştırılmamıştır. Bu nedenle Doğu Anadolu balının, DKH, HFF1 ve HaCaT hücrelerinin bir araya getirildiği dinamik hücre kültürü modelinde UV hasarında kök hücre ilişkili genler üzerindeki etkisini ve Wnt sinyal yolağındaki genlerin bu süreçte nasıl rol aldığı tanımlamak özgün olacaktır.

Bunun yanında etkinliği kanıtlanmış toksik olmayan doğal bileşiklerin nanoteknoloji gibi yeni teknolojik yöntemlerle kombine kullanımı sayesinde günümüzde çokça tercih edilen tedavi ve kozmetiğe yönelik ürün geliştirilme olanağı bir diğer bilimsel ve ekonomik katkıdır. Bu çalışma aynı zamanda Doğu Anadolu multifloral çiçek balını tıbbi bal kategorisinde ekonomiye kazandırmak adına önemli bir katkı sağlayabilecektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

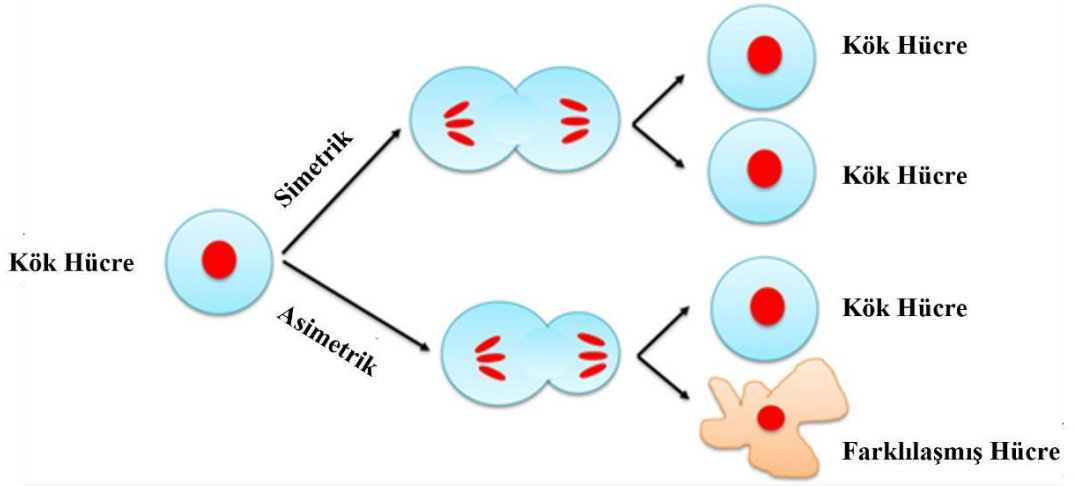
### 2.1. Kök Hücre

Kök hücre, vücutta belirli hücre tiplerine dönüşebilme potansiyeline sahip olan farklılaşmamış hücre grubudur. Bir hücrenin kök hücre olarak adlandırılabilmesi için iki özelliğe sahip olması gerekir. Öncelikle kendi kendini yenilemeli, aynı zamanda multipotent olmalıdır. Kendini yenileme, hücrenin kendisini aynı özelleşmemiş hücre tipinden daha fazla hücreye kopyalayabilmesi anlamına gelir. Kök hücreler bu özelliklerinden dolayı kendilerini sınırsız kopyalayabilirler. Bunun yanında multipotent olmalı yani, organları ve dokuları oluşturan birçok özel hücre tipine farklılaşabilmelidirler (1). Kök hücreler, farklılaşma yeteneklerine bağlı olarak totipotent, pluripotent, multipotent ve elde edildikleri kaynağa bağlı olarak yetişkin veya embriyonik olarak kategorize edilir. Bilim insanları 2006 yılında dört transkripsiyon faktörünün bir kombinasyonunu kullanarak fare somatik hücrelerinden (fibroblastlar) Embriyonik Kök Hücreleri (EKH'ler) başarıyla ürettiklerini bildirdiler. Bu hücreler aynı gen ifade modellerini sergilediler ve canlı hücrelere farklılaşabilme yeteneğine sahiptiler. Bunlar kök hücrelerin ek bir kaynağıdır. Söz konusu hücreler Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler (İPKH'ler) olarak tanımlanır ve yeniden programlama süreci, "Yamanaka faktörleri" (Oct4, Sox2, Klf4 ve Myc) olarak bilinen dört protein tarafından yönetilir (2,3).

Kök hücrelerin farklılaşma potansiyellerine bakıldığında ilk olarak, plasenta gibi destek dokular dahil tüm bir organizmayı eksiksiz meydana getirebilme potansiyeline sahip totipotent kök hücreler karşımıza çıkmaktadır. Zigot oluşumundan itibaren oluşan ilk birkaç hücre totipotent potansiyelindedir. Zigotun organizmayı oluşturmak için geçirdiği mitoz bölünmeler devam ettikçe farklılaşma potansiyeli azalır, pluripotent ve multipotent farklılaşma özelliği gösterirler. Pluripotent kök hücreler tek başına tüm bir organizmayı oluşturamazlar ancak vücutta bulunan ve endoderm, mezoderm ya da ektoderm kökenli 200'den fazla hücre tipine farklılaşabilirler. Bu tip farklılaşmanın erişkin dokularda bulunup bulunmadığı tartışmalıdır (4). Pluripotent farklılaşma potansiyeli daha çok zigot oluşumundan birkaç gün sonra oluşan, blastosit içinde yer alan yaklaşık 100-150 kadar embriyonik kök hücrenin sahip olduğu bir farklılaşma potansiyelidir. Multipotent kök hücreler ise yalnızca tek bir germ tabakasından kaynaklanan sınırlı sayıda hücrelere

farklılaşabilirler. Embriyonik ya da yetişkin kök hücreler bu farklılaşma potansiyeline sahip olabilir.

Kök hücreler normal hücrelerin aksine daha yavaş ve farklı şekilde bölünürler. Kök hücre asimetrik olarak bölünebilir (5). Mitoz sonucu oluşturduğu hücrelerden biri kendisi gibi bir kök hücre iken, bölünme sonucu oluşan diğer hücre kendini yenileme özelliğini kaybetmiş, özelleşmiş bir öncü hücredir. Bir diğer seçenek ise simetrik bölünmedir ve bu durumda oluşan her iki hücre de kendisi gibi bir kök hücredir (Şekil1). Bu şekilde kök hücreler kendilerini yenilerken aynı zamanda diğer dokuların yenilenmesi ve onarımına katkı sağlarlar. Ancak kök hücrelerin kendini yenileme ve farklılaşma potansiyelleri yaşlanma ile değişebilir (6).



**Şekil 1:** Simetrik ve Asimetrik Kök Hücre Bölünmesi (7).

Kök hücrelerin ölümsüzlüğü, telomer uzunluğu restorasyonu ve telomeraz aktivitesi ile ilişkilidir. Telomer kısalması, DNA hasarını ve apoptozu uyararak, yaşlanmayı indükler ve hücre döngüsünü durdurur. Kök hücrelerin telomer uzunluğu genellikle yaşla birlikte azalır. Oct4, Sox-2 ve Nanog, kök hücrelerin kendini yenileme kapasitesinin ve çeşitli hücre tiplerine farklılaşma yeteneklerinin düzenlenmesinde önemli rol oynayan transkripsiyon faktörleridir. Bu genler yaşlanma ve/veya telomeraz ters transkriptaz (TERT) aktivitesi ile ilgili genleri aşağı regüle eden ve erken yaşlanmayı önleyen genler olarak bilinmektedir (8). Oct4, Nanog ve TERT gibi kök hücre ile ilişkili genlerin ifadesi, kök hücre yaşlanması sırasında azalmaktadır (9).

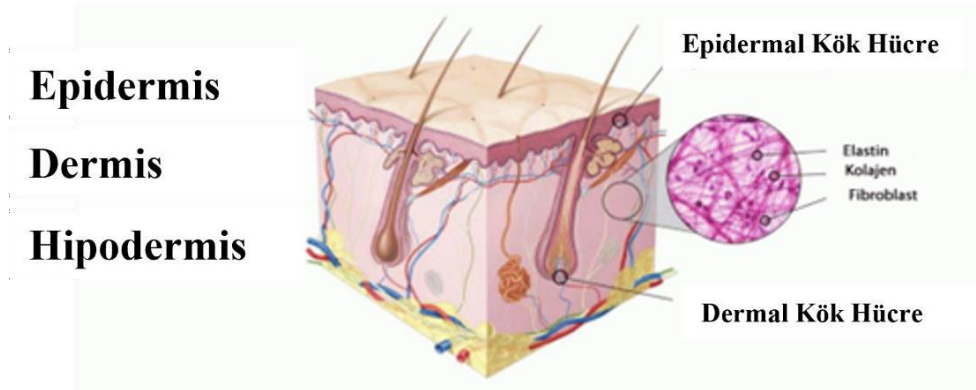
### 2.1.1. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH)

Mezenkimal kök hücreler, vücutta doğal olarak bulunan yetişkin kök hücrelerin bir alt kümesidir. "Mezenkimal" terimi, bağ dokusu ve destekleyici yapıları oluşturan hücre veya dokuları ifade eder. "Mezenkimal hücreler" terimi tam olarak mezenkimal dokudan köken alan hücreleri belirtir. Bu hücreler kemik iliği, yağ dokusu, göbek kordonu ve deri gibi çeşitli dokularda bulunur. MKH'ler, kemik, kıkırdak ve yağ hücreleri gibi çeşitli hücre soylarına farklılaşma kapasitesine sahiptir. Özellikle anti-inflamatuar ve immünomodülatör özellikleri ile rejeneratif tıp ve hücre tedavisi alanlarında kaynak olarak önemli bir değere sahiptirler (10). MKH'ler birbirlerinden önemli ölçüde farklılık gösterebilirler. Bu çeşitlilik donörler, doku kaynakları ve hücre tipleri arasında olabilir. Bu değişkenlik MKH'lerin rejeneratif sınırlandırabilir. Çoğu standart analiz, MKH özelliklerini toplu olarak değerlendirerek bu hücreden hücreye heterojenliğini maskeler (11). Bunların yanında MKH'ler her ne kadar İnsan Lökosit Antijen (HLA) moleküllerini düşük düzeyde ifade etmeleri sayesinde immünolojik olarak diğer yetişkin kök hücre çeşitlerine göre daha avantajlı görünse de en önemli endişelerden biri aşılınmış MKH'lerdeki anti-tümör bağışıklık fonksiyonunu engelleyebilecek ve tümörün büyümesini, yayılmasını artıran yeni kan damarları oluşturabilecek istenmeyen farklılaşma potansiyelleridir (12). MKH bazlı tedavinin uzun vadeli güvenilirliği hala tam olarak anlaşılammıştır ve bu durum, MKH'lerin klinik uygulamalarının önünde önemli bir engel olmaya devam etmektedir. Ayrıca MKH'ler genel olarak mevcut olan tümör oluşumu, istenmeyen farklılaşmalar gibi kök hücre uygulamaları risklerini taşımaktadır. Dolayısıyla mevcut klinik kök hücre tedavisi uygulamalarının olası zorluklarından ve risklerinden kaçınmak için dokulardaki MKH popülasyonlarının korunması önemlidir.

### 2.2. Deri ve Fonksiyonu

Ortalama 1,85 m<sup>2</sup> alan kaplayan deri, insan vücudundaki en büyük organdır. Toplam vücut ağırlığının yaklaşık %15'ini oluşturur. Fiziksel bir bariyer olarak vücudu zararlı bakteriler, toksinler, ultraviyole radyasyon ve mekanik hasar gibi etkilerden korur (13). İnsan derisini oluşturan üç benzersiz katman vardır. Bu katmanlar epidermis, dermis ve hipodermis'tir (Şekil2). Bu üç tabakanın her birinin özel bir işlevi vardır (14). Cildin en dış tabakası epidermistir. Epidermisin katmanları, içten dışa doğru; stratum bazale (bazal membran), stratum spinosum (dikensi tabaka), stratum

granulosum (tanecikli ya da granüler tabaka), stratum lucidum (önleyici tabaka) ve stratum corneum'dan (boynuzsu tabaka) oluşur (14,15). Tabakalı, skuamöz, keratinize epidermis; keratinositler, melanositler, Langerhans hücreleri ve Merkel hücreleri olmak üzere dört tip hücreden oluşur. Keratinositler en yaygın hücre tipidir. Bazı bölgelerde, daha az sayıdadır ve epitelyal olmayan hücreler keratinositlerin arasına serpiştirilmiştir. Melanin üreten melanositler, duyu alıcı Merkel hücreleri ve antijen sunan Langerhans hücreleri bu hücrelerin örnekleridir (16). Epitelin taban tabakası olan bazal membran sürekli yenilediğinden, epidermis bu tabakaların en yüzeysel ve fizyolojik olarak aktif olanıdır (14). Bazal membran, epidermisi, kolajen ve elastik lifler arasında fibroblastların bulunduğu dermisten ayırır (17). Bağ dokusunun papiller ve retiküler tabakaları, bazal membran seviyesinde epidermise bağlanan ve aralarında görünür bir sınır noktası olmadan birleşen iki bağ dokusu tabakasından oluşmuş dermisi meydana getirir. Papiller tabaka dermisenin en üst tabakasıdır ve daha ince kalınlığı, gevşek bağ dokusu bileşimi ve epidermise yakınlığı ile karakterize edilir. Retiküler tabaka bir sonraki tabakadır ve en derin, en kalın ve hücre sayısının en az olduğu tabakadır. Yoğun bağ dokusu ve kollajen lif demetlerinden oluşur. Ter bezleri, saç, kıl folikülleri, kaslar, duyu nöronları ve kan damarlarının tümü derinin dermis tabakasında bulunur (15). Dermis, derinin ana bileşeni ve derinin destekleyici yapısıdır. Vücudun mekanik kaynaklardan zarar görmesini önler, vücut ısısını kontrol eder ve duyu girdiler için bir reseptör görevi görür. Embriyogenezde onarım ve yeniden şekillenme sırasında normal deri yapısını korumak için epidermis ile etkileşime girer (17). Hipodermis ise derinin en derin tabakasıdır, yağ hücrelerinden oluşan yağ lobüllerine ve kıl gövdeleri, duyu nöronlar ve kan damarları gibi deri uzantılarına sahiptir.



Şekil 2: Derinin Yapısı (18)



## **2.3. Derideki Hücre Popülasyonları**

### **2.3.1. Fibroblast**

Deri fibroblastları, dermal hücre dışı matrisi oluşturur ve düzenler. Ayrıca birbirleriyle ve diğer hücre türleri ile iletişim kurarlar. Fibroblastlar deri fizyolojisinin düzenlenmesinde ve kutanöz yara iyileşmesinde esastır. Yetişkin insan derisi en az üç farklı fibroblast alt popülasyonu içerir: papiller, retiküler ve foliküler. Hücre dışı matris oluşumu ve yapısı, büyüme faktörlerinin/sitokinlerin oluşumu ve enflamatuvar yanıtlara katılım, bu fibroblast popülasyonları arasındaki fenotipik ayrımlardır (17). Fibroblastlar, kondrositler ve osteoblastlar gibi mezodermden gelen hücrelerdir ve glikozaminoglikanlar, elastin, fibronektin, laminin ve dermisin en önemli yapı parçası olan kolajeni oluşturur. Ek olarak fibroblastlar, prostaglandinler, lökotrienler ve sitokinler gibi humoral faktörleri salgılayabilirler (19). Dermisin bütünlüğü, hücre dışı matris ve fibroblastlar tarafından yapılan humoral kimyasallar tarafından korunur. Deri homeostazı, keratinositler, mast hücreleri ve fibroblastlar ile kombine bir şekilde gerçekleşir.

### **2.3.2. Keratinosit**

Keratinositler, bazal (tek katmanlı), dikenli, granüler ve kornifiye hücre katmanlarından oluşacak şekilde yapılanmıştır. Keratinositlerin morfolojisi, içinde buldukları epidermal katmanlara göre değişir. Aktif olarak bölünen keratinositler ve kök hücreler bazal membran ile fiziksel temas halinde olan bazal tabakada bulunur. Bazı keratinositler bazal membrandan ayrılır, proliferatif potansiyellerini kaybeder ve deri yüzeyine doğru hareket etmeye başlar. Bazal hücreler dikenli tabakaya hareket ettiğinde, meydana gelen ilk değişiklik, yeni ortama uyum sağlamak üzere hücresel gerilme direncini artırmak için ara filament ağlarının güçlendirilmesidir. Sonunda boynuzsu (kornifiye) katmanına ilerleyen keratinosit hücreleri bölünmeyi durdurur, ancak metabolik olarak aktif kalır. Tüm keratinositlerin en büyük boyutlarına sahip olan bu hücreler çekirdekten ve sitoplazmik organellerden yoksundur (17).

### 2.3.2. Deri Kök Hücreleri (DKH)

DKH'ler çoğunlukla epidermiste, kıl foliküllerinde ve dermiste depolanır. Nişlerinden bağımsız olarak, bu hücreler DKH 'leri olarak bilinir. Derinin içindeki kök hücreler genellikle içinde buldukları nişin adını alırlar. Kıl folikülü kök hücreleri (HFKH'ler), melanosit kök hücreleri (MeKH'ler), interfoliküler epidermis kök hücreleri (IFEKH'ler) ve dermal kök hücreler (DeKH'ler) kök hücre popülasyonlarına örnektir. DKH'lerin birincil amacı, kaybolan, yaralanan veya patolojik olarak kusurlu hale gelen epidermal hücreleri değiştirmek, eski haline getirmek ve yeniden oluşturmaktır (13).

DKH'ler deride çoğunlukla kıl folikülünün olduğu nişlerde bulunur ve kıl folikülünün anatomik bölgesine göre kıl folikülü kök hücreler (KFKH) ve dermal MKH'ler (DeMKH) gibi farklı kök hücre tiplerini barındırabilirler. Bu alt popülasyonlar belirli özelliklere sahiptir. Örneğin, HFKH'ler, soyları bitişik dermal hücreler tarafından tetiklenene kadar genellikle hareketsizdir. DeMKH'ler dermal papilla ve dermal kılıfa ek olarak bu hücreler kılcal damarların etrafındaki tüm dermiste dağılmışlardır (20,21). DeMKH'ler kıl folikülü hücreleri, adipositler ve osteoblastlar dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerine farklılaşma yeteneğine sahiptir ve hasarı onarmak için çoğalıp farklılaşırlar (22). Bu kök hücreler sadece doku homeostazını korumakla kalmaz aynı zamanda çevredeki hücrelerin tam işlevselliğini sağlamak için sitokinler ve büyüme faktörleri salgırlar (23). Dolayısıyla sayılarındaki ve aktivitelerindeki azalma yaşlanma sürecinde cildin ve saçın genel sağlığını ve görünümünü önemli ölçüde etkiler. MKH'ler, saç rejenerasyonu, kemik rejenerasyonu ve yara iyileşmesi dahil olmak üzere rejeneratif tıpta potansiyel uygulamalara sahiptir (23). Fakat, DeMKH'lerin özelliklerini ve potansiyel uygulamalarını tam olarak anlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Hem simetrik hem de asimetric hücre bölünmesi, kök hücre havuzunu korumak ve soya bağlı hücre öncüllerini üretmek için dikkatlice düzenlenmelidir. Miktarlarının zamanla azalmadığı gerçeğinden dolayı, önceki yıllarda DKH'lerin yaşa dayanıklı olduğu varsayılmıştır. Uzatılmış ömürlerine rağmen, DKH'ler sonunda farklılaşma ve kendini yenileme yeteneklerinin azalmasıyla dengesiz veya işlevsiz hale gelir (13).

Her bir kök hücre popülasyonu, genellikle, homeostatik koşullar altında kendi alanında meydana gelen farklılaşma programına özel olarak katkıda bulunur. Bununla birlikte, hasarın ardından, sistemik ve yerel çevre büyük ölçüde değiştiğinde, bu kök hücre popülasyonları, olağanüstü bir uyum yeteneği sergiler. Kendi nişleri etkilenmeden kalsa bile, komşu kök hücreler yara kaynaklı uyarılar nedeniyle nişlerinden ayrılır ve hasarlı dokuyu yeniden epitelize etmeye yardım edecek yanıtlar geliştirir. Bazı durumlarda, bunu yapmak için hasarın türüne bağlı olarak geçici veya kalıcı olabilen doku rejenerasyon programlarını değiştirmeleri gerekir. Derideki yerleşik kök hücrelerin plastisitesinden yararlanmak, bu bağlamda yara tedavileri için çekici bir alternatif yol sunar. Ancak bunu yapmak hem normal hem de patolojik koşullarda kök hücre davranışının anlaşılmasını gerektirir (24).

### **2.3.3. Diğer Hücreler**

Melanositler epidermiste bulunan ve taşıdıkları melanosit pigmenti sayesinde UV radyasyona karşı koruma sağlayan bir başka hücre tipidir. Ayrıca antijen sunan dendritik hücreler olarak sınıflandırılan Langerhans hücreleri, epidermiste ayrı bir hücre popülasyonu oluşturur. Epidermal homeostazın sürdürülebilmesi için tüm bu hücreler bileşenlerin uyum içinde birlikte çalışması gerekir (25).

### **2.4. Yaşlanma ve Derinin Değişimi**

Deri, insan vücudunun doğal bir bariyeridir ve yaşlanma sürecinin bir göstergesidir. Yaşlanma ile deride kırışıklıklar, kolajen ve elastin kaybı, pigmentasyon değişiklikleri meydana gelir. Yaşlı derinin yapısındaki değişiklikler hem içsel hem de dışsal faktörlerin neden olduğu yaşlanmanın birleşik ve kümülatif etkilerinin sonucudur (26). Yaşlanma süreci iki kategoriye ayrılabilir: içsel ve dışsal yaşlanma. Görünümünden ziyade işlevdeki değişiklikler, içsel yaşlanma olarak değerlendirilir ve yavaş ilerler, genellikle kronolojik yaşlanma olarak bilinir. Foto yaşlanma olarak da bilinen dışsal yaşlanma ise, güneş ışığına uzun süre maruz kalmanın getirdiği yapısal ve fizyolojik değişikliklerle karakterize edilir (26). Deri yaşlanmasına bağlı sorunların yaklaşık %80'i kümülatif güneş ışığına maruz kalmayla ilişkilendirilmiştir (27).

Kronolojik yaşlanma sürecinde dermis ve epidermiste yaşlanan hücrelerin birikmesi gözlenir. Biriktirme süreci, DNA hasarı ve mitokondriyal fonksiyonun bozulması gibi bir dizi hücreler bozulması ile başlatılabilir ve hızlandırılabilir. X ışınları, UV radyasyon ve sigara dumanı gibi DNA'ya zarar veren kimyasallar dahil

olmak üzere çeşitli eksojen uyaranlar hem epidermiste hem de dermiste yaşlanmayı tetikleme yeteneğine sahiptir. UV radyasyon, derinin yaşlanması ve deri kanserinin gelişmesi sürecinde önemli bir faktördür (25,28). UV, fotonların dalga boyuyla tanımlanan üç ana bileşenden oluşur: en uzun dalga boylarıyla (315-400 nm) karakterize edilen UVA, orta aralığı (290-320 nm) kaplayan UVB ve en kısa dalga boylarını (100–280 nm) kapsayan UVC. UV'nin tüm türleri, çevresel mutajenler olarak işlev görme potansiyeline sahiptir ve oksidatif serbest radikallerin artan üretimi yoluyla hem doğrudan hem de dolaylı olarak DNA hasarına neden olur (25). Aşırı UV radyasyonu proteinlere, lipitlere ve DNA'ya zarar vererek doğrudan deri dokusu hasarına neden olabilir, aynı zamanda makromoleküler maddeleri, özellikle lipitleri ve DNA'yı oksitleyebilir ve Reaktif Oksijen Türleri (ROS) aracılı oksidatif stres reaksiyonları yoluyla dolaylı deri hasarına neden olacak bir dizi sinyal yolunu etkileyebilir. Aynı zamanda hücresel yapıya biyokimyasal destek sağlamada çok önemli bir rol oynayan HDM bileşenlerinin bozulmasına yol açabilir (28,29).

#### **2.4.1. Wnt Sinyal İleti Yolağı**

Embriyogenez, çoğalma, yara onarımı, hücre yapışması, göç, apoptoz, hücre polarizasyon, kök hücre homeostazisi, sinirsel gelişim, bağışıklık tepkisi ve hastalık patogenezi dahil olmak üzere birçok biyolojik süreç, evrimsel olarak korunmuş bir yol olan Wnt sinyal yolu tarafından düzenlenir (30). Kıvrımlı (Frizzled-Fzd) proteinler, hücre zarını yedi kez kat eden ve hücre içinde parakrin/otokrin iletişimi başlatmak üzere salgılanan Wnt proteinleri tarafından aktive edilen bir reseptör ailesidir. Memelilerde 19 Wnt proteini ve 10 Fzd proteini bulunur, ancak her bir ligand-reseptör çiftinin benzersiz hücre içi sinyal ileti yollarını nasıl aktive ettiği henüz net değildir. Wnt sinyallerinin indüksiyonu, hem kanonik yoldan hem de kanonik olmayan  $\beta$ -katenin bağımsız yollardan gerçekleşir (31). (Şekil3)

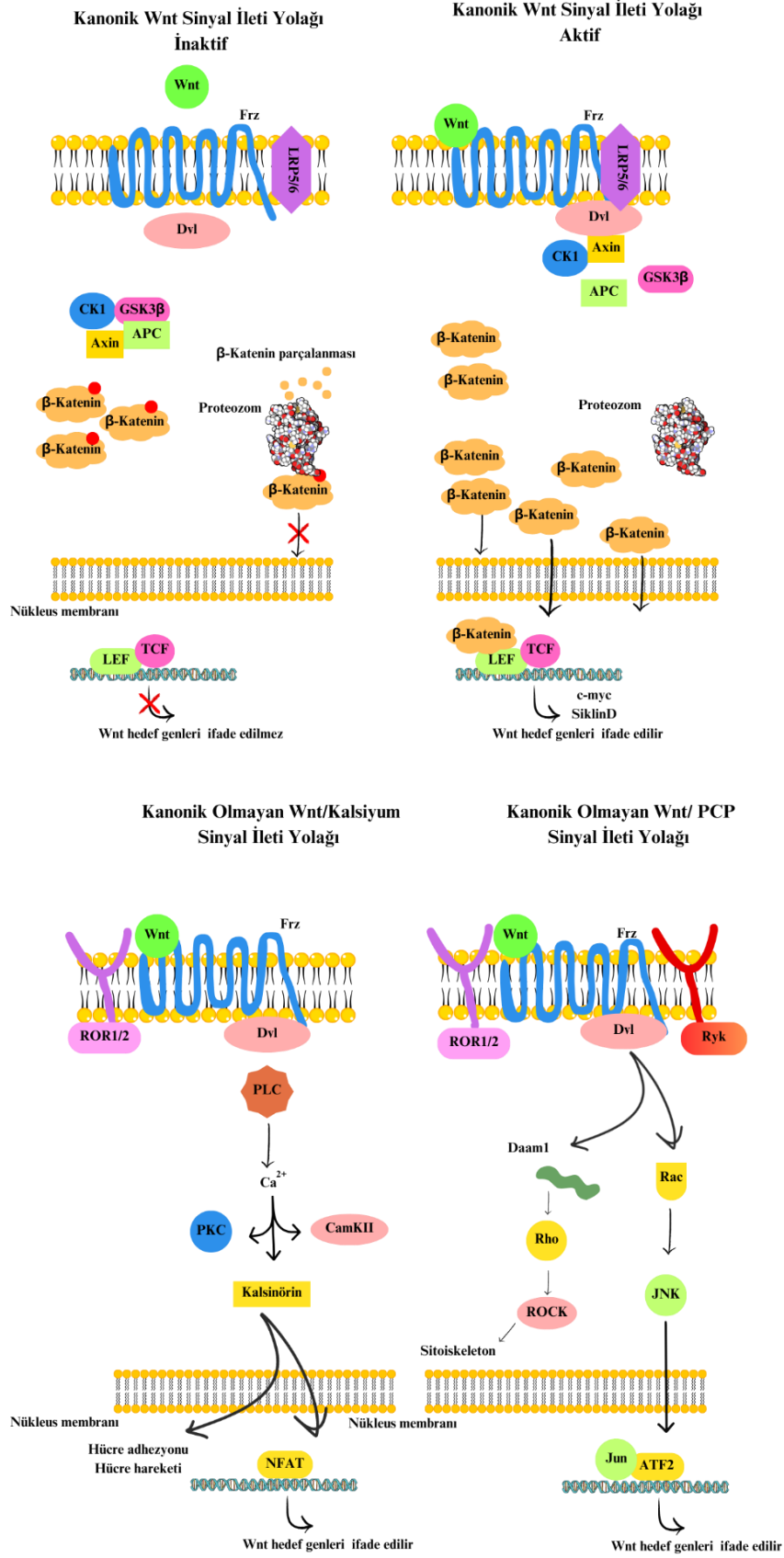
#### **Kanonik Wnt Sinyal İletimi**

Wnt sinyal iletiminin kanonik yolağına, hücre içi protein  $\beta$ -katenin aracılık eder (31). Wnt ligandları-reseptör etkileşiminin yokluğunda; yani Wnt sinyali inaktif iken, hücresel  $\beta$ -katenin'in yıkım kompleksi tarafından fosforilasyonla tetiklenen proteazom degradasyonu gerçekleşir. Wnt sinyali aktivasyonu başladığında, Wnt ligandları Fzd ve Low-density Lipoprotein Receptor-Related Protein 5 veya 6 (LRP5/6) reseptörlerine bağlanır, böylece sitoplazmik Dishevelled (Dvl) proteinini

aktive eder. Dvl daha sonra Axin, Adenomatöz polipozis koli (APC), Glikojen sentaz kinaz-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) serin/treonin kinazları ve Kazein kinaz 1 (CK1) proteinlerinden oluşan  $\beta$ -katenin yıkım kompleksini inhibe eder. Fosforile edilmeyen  $\beta$ -katenin sitoplazmada birikir ve çekirdeğe girer, burada Wnt hedef genlerini düzenlemek üzere T hücre faktörü (TCF)/Lenfoid güçlendirici bağlayıcı faktör (LEF) transkripsiyon faktörleri ailesi ile etkileşime girer (31).

### **Kanonik Olmayan Wnt Sinyal İletimi**

Wnt sinyal iletimi,  $\beta$ -katenin'den bağımsız, kanonik olmayan yollar aracılığıyla da iletilebilir. Şu ana kadar tanımlanmış on bir farklı kanonik olmayan yolak mevcuttur (32). Bu yolakların en bilinenlerinden biri olan kanonik olmayan Wnt/PCP yolağı, gelişim sırasında hücrelerin bir düzlem içindeki yönelimini ve hücre hareketlerinin koordinasyonunu kontrol ederken, bir diğer kanonik olmayan Wnt/Ca<sup>+2</sup> sinyal yolağı aşağı akıştaki bazı kinazların aktivasyonunu sağlayarak hücre içindeki kalsiyum miktarını kontrol eder. Wnt/PCP sinyal iletimi, hücrelerin yapısal polarizasyonunun ve hareketinin kontrolünde rol oynar. Wnt kanonik olmayan Wnt sinyal yolağındaki ligandlar Fzd ailesi reseptörlerine veya ROR1, ROR2 veya Ryk gibi diğer koreseptörlere bağlandığında, Wnt/PCP yolunu aktive eder. Bu aktifleşme, RHOA ve RAC1 gibi küçük GTPaz'ların Dvl aracılı GTP'ye bağımlı aktivasyonuna yol açar. Aktive olan GTPaz'lar JUN N-terminal kinazın (JNK) aktivasyonunu uyarır (33). Kanonik olmayan diğer Wnt sinyal ileti yolağı, G-proteinleri yoluyla hücre içi Ca<sup>+2</sup> salınımına yol açan Wnt/Ca<sup>+2</sup> sinyal ileti olağıdır. Wnt ve Fzd'nin birleşmesi fosfolipaz C'nin (PLC) aktivasyonunu tetikleyerek hücreler arası sinyal molekülü diaçilgliserol (DAG) ve inositol-fosfat (IP3) seviyelerinde geçici bir artışa yol açar. Sonuç olarak, hücre içindeki Ca<sup>+2</sup> seviyesi yükselir ve Kalmodulin kinaz II (CamKII), PKC ve Ca<sup>+2</sup>'nin aktivasyonuna yol açar. Bu yol, hücre yapışmasının kontrolünde önemli rol oynamasıyla tanınmaktadır. (32).



**Şekil 3:** Kanonik ve Kanonik Olmayan Wnt Sinyal İleti Yollarına Genel Bakış (Canva Kullanılarak Çizilmiştir)

### **Wnt Genleri: Wnt3a, Wnt5a, Wnt16, Wnt7b, $\beta$ -katenin**

Wnt proteinleri, çeşitli gelişimsel ve fizyolojik süreçlerde önemli roller oynayan, yüksek düzeyde korunmuş sinyal molekülleri ailesidir. 19 adet Wnt geni bulunmaktadır. Deride kök hücre biyolojisi ve Wnt sinyal yolağı genleri arasındaki ilişki incelendiğinde Wnt3a, Wnt5a, Wnt7b ve Wnt16'nın bu süreçlerde rolü olduğu gözlenmektedir. Bu genlerin her biri farklı dokularda tanımlanmıştır ve farklı işlevlere sahiptir. Wnt3a'nın hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve embriyonik gelişimi düzenleyen kanonik Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal iletiminde rol aldığı bilinmektedir (34). Wnt3a'nın ayrıca kanonik Wnt sinyal yolunun aktivasyonu yoluyla bazı kanserlerde tümör ilerlemesini teşvik ettiği de gösterilmiştir (35). Wnt3a'nın, epidermal Wnt ligandlarına yanıt olarak fibroblast proliferasyonu ve kıl folikülü başlatılması için gerekli olduğu bilinmektedir, bu durum Wnt3a'nın dermal hücre fonksiyonu ve doku gelişimindeki önemine işaret etmektedir (36). Öte yandan Wnt5a, kanonik olmayan bir Wnt ailesi üyesi olarak sınıflandırılır ve reseptör bağlanması ile ilişkili olarak  $\beta$ -katenin-TCF sinyalini aktive ettiği veya inhibe ettiği gösterilmiştir (37). Örneğin; Wnt5a'nın insan dermal papilla hücrelerinde Wnt/ $\beta$ -katenin sinyalini zayıflattığı ispatlanmıştır (38). Sedef hastalığı olan hastalarda UV uygulaması sonrası lezyonlu deride Wnt7b ve Wnt16 ifadesinin değiştiği belirtilmiştir (39). Genel olarak değerlendirildiğinde Wnt3a, Wnt5a, Wnt16 ve Wnt7b, embriyonik gelişim, doku morfogenezi, kök hücre spesifikasyonu ve hastalık patogenezi dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerde kritik rol oynadığı bilinmektedir.

### **Dvl Genleri: Dvl1, Dvl2, Dvl3**

Dvl1, Dvl2 ve Dvl3, memelilerdeki Disheveled (Dvl) gen ailesinin üyeleridir özellikle Wnt sinyal ileti yolağının majör proteinlerindedir. Yapısal olarak bu genler, her biri Wnt sinyaline ve diğer hücrel aktivitelere aracılık etme fonksiyonları için gerekli olan N-terminal DAX, merkezi PDZ ve C-terminal DEP alanlarını içeren benzerlikleri paylaşır (40,41). Toplam Dvl havuzunun çoğunluğunu Dvl2 oluştururken, geri kalanını Dvl1 ve Dvl3 oluşturmaktadır (42). Dvl1, Dvl2 ve Dvl3'ü kodlayan genler farklı kromozomlar üzerinde bulunur; Dvl1 kromozom 1'de, Dvl2 kromozom 17'de ve Dvl3 kromozom 3'te bulunur. Çalışmalar, memelilerde erken nöral tepe tespiti ve somit segmentasyonu için Dvl1 ve Dvl2'nin gerekliliğini ortaya koymuş ve bunların

embriyonik gelişimdeki kritik rollerini vurgulamıştır (43). Dvl1, Dvl2 ve Dvl3 arasındaki yapısal ve işlevsel benzerlikler, bunların evrimsel olarak korunduğunu göstermektedir.

### **Yıkım Kompleksi Genleri**

Axin, APC, GSK3 $\beta$  ve CK1'den oluşan yıkım kompleksi,  $\beta$ -katenin'in fosforilasyonundan ve ardından bozunmasından sorumludur, böylece çekirdeğe translokasyonunu ve Wnt hedef genlerinin aktivasyonunu önler. GSK3 $\beta$ , çeşitli hücrel işlemlerde ve sinyal yollarında rol oynayan çok yönlü bir kinazdır. Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunda  $\beta$ -katenin stabilitesini düzenleyerek merkezi bir rolü oynamaktadır. Aktif olmayan durumlarda, GSK3 $\beta$ , APC ve Axin gibi diğer proteinlerle birlikte,  $\beta$ -katenin'in proteozomal bozunmasını destekleyen bir yıkım kompleksi oluşturur. Bu süreç hücredeki  $\beta$ -katenin düzeylerini regüle ederek Wnt sinyal ileti yolağının aktivitesini kontrol eder. Yıkım kompleksi genlerinden APC, Wnt sinyalini birden fazla mekanizma aracılığıyla düzenlemektedir. İlk olarak, APC,  $\beta$ -katenin ile etkileşime girerek ve yıkımını teşvik ederek kanonik Wnt yolunun negatif bir düzenleyicisi olarak hareket eder (44). Ek olarak, APC, bozunma amacıyla  $\beta$ -katenin'i hedeflemek için Axin, GSK3 $\beta$  ve CK1 ile yıkım kompleksine katılır (45). APC, Axin multimerizasyonunu teşvik eder ve GSK3 $\beta$  ile Axin arasındaki etkileşimi düzenleyerek  $\beta$ -katenin' in yıkımını kolaylaştırır (46). Ayrıca, APC, DNA onarım proteinleri, DNA replikasyon proteinleri ve tübülün ile etkileşime girerek, kanser hücrelerinde kemodirenci etkileyen DNA onarım ve replikasyon süreçlerine katılır (47). Bununla birlikte APC, Wnt reseptör aktivasyonu için gerekli olan klatrin aracılı endositozda da rol oynar. Genel olarak, APC'nin çeşitli proteinlerle etkileşimleri ve  $\beta$ -katenin yıkılmasını düzenlemedeki rolü, Wnt sinyalinin düzenlenmesine katkıda bulunur. Axin proteinleri, kanonik Wnt sinyal yolunun önemli bileşenleridir, çeşitli hücrel süreçlerin düzenlenmesinde önemli roller oynarlar ve bunların düzensizliği, kanser de dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (56). Axin ailesinin homolog bir proteini olan Axin2, Axin1 ile yüksek derecede yapısal ve işlevsel benzerlik paylaşır (57,58). Axin1 ve Axin2'nin başlangıçta işlevsel olarak eşdeğer olduğu düşünülürken, son çalışmalar Axin1'in sinyalozom oluşumunu teşvik etmede daha önemli olduğunu ve Axin2'nin Wnt sinyalinin aktivitesini azaltmada baskın olduğunu göstermektedir (56). Özellikle Axin2'nin, Wnt sinyal iletiminin doğrudan hedef geni olduğu bilinmektedir.



## **MKH'ler ve Wnt Sinyal İletimi İlişkisi**

Wnt sinyali aktivasyonu hücre proliferasyonunu, kök hücre homeostazını ve önemli gelişim süreçlerini düzenlemekten sorumlu genler dahil, farklı hücre fonksiyonları için önemli birçok genin ifadesini yönlendirir (48). Wnt/ $\beta$ -katenin sinyali iletiminin aktivasyonu kök hücre tedavisi ve rejeneratif tıpta ilgi duyulan bir hedefdir. Wnt/ $\beta$ -katenin sinyali iletiminin, ROS'un hücre içi üretimini teşvik ederek MKH yaşlanmasını indükleyebileceği ve ROS'un, Wnt/ $\beta$ -katenin sinyali iletiminin aşırı aktivasyonu tarafından indüklenen MKH yaşlanmasının ana araçları olabileceği gösterilmiştir (49). 2004 yılında Sato ve ark. tarafından GSK3 $\beta$ 'nin inhibisyonu yoluyla Wnt sinyali iletiminin aktivasyonunun artarak hem insan hem fare EKH tipinde farklılaşmamış fenotipi koruduğu ve ifadesini sürdürdüğü bulunmuştur (50). Bununla birlikte birkaç çalışma, GSK3 $\beta$  inhibitörü olan CHIR 99021'in hem fare hem de insan ESKH'lerinde kendi kendini yenilemeyi desteklediğini göstermiştir (51). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada ise yine CHIR 99021 ile ön işleme tabi tutulan MKH'lerde, Oct4, Sox2 ve Nanog 'un yukarı regüle edilmiş gen ifadesi ile sonuçlanan  $\beta$ -katenin'in çekirdeğe sürekli translokasyonu gözlenmiştir. Bunun sonucu olarak MKH'lerin hücre bazlı rejeneratif tedaviye çok uygun, gelişmiş farklılaşma yeteneklerine sahip kök hücre kaynakları olabileceği yorumu yapılmıştır (51). Wnt ligandlarından olan Wnt3a'nın MKH üzerindeki etkisine bakıldığında, Wnt3a'ya maruz kalan insan MKH kültürlerinde hem MKH proliferasyonunda anlamlı bir artış gözlenmiş hem de osteojenik farklılaşmanın geri dönüşümlü bir şekilde baskılandığı görülmüştür (52). Lui ve ark. osteojenik farklılaşma sırasında düşük Wnt3a konsantrasyonları ile teşvik edici bir etki gözlemlerken, daha yüksek konsantrasyonlarda Wnt3a'nın hem osteogenezi hem de adipogenezi baskıladığını öne sürmüştür (53,54). Ek olarak Wnt/ $\beta$ -katenin sinyali iletiminin hücre yaşlanma ile yakından bağlantılı olabileceği düşünülüp Wnt3a ligandının insan MKH hücrelerine maruz bırakılmasının yaşlanmayı geciktirerek canlılığı ve proliferatif potansiyeli iyileştirdiği bulunmuştur (55). Lehman ve arkadaşları 2022 yılında yaptıkları çalışmada Wnt3a'nın, yaşlanan MKH'ler tarafından yaşlanmaya neden olan faktörlerin üretimini bastırdığını ve MKH'lerin yaşlanmaya girişini engellediğini göstermişlerdir (56). Genellikle kanonik yolda rol aldığını bildiğimiz Wnt3a'nın kanser hücrelerinde Wnt/ $Ca^{+2}$  ve Wnt/ $\beta$ -katenin yollarını aynı anda aktive edilebildiği tespit edilmiştir (57). İnsan akciğer fibroblastlarında hibrit bir RNA kullanılarak baskılanan Wnt2 ifadesinin, yaşlılık

belirteci olan yaşlanma ile ilişkili heterokromatin odakları (SAHF) oluşumunu indüklediği tespit edilmiştir (58). Bunun yanında Wnt10b'nin aşırı ifadesinin deride saç folikülü kök hücrelerini aktive edebileceğini ve böylece insan kıl folikülü rejenerasyonunu indüklediği bildirilmiştir (39). Wnt7b ve ROR2 saç folikülü kök hücre homeostazının ve saç folikül döngüsünün bir diğer önemli düzenleyicisidir (59). Wnt sinyal ileti yolağının temel komponenti Dvl proteinleri kanonik ve kanonik olmayan Wnt sinyal iletiminde rol oynayan çok önemli bir proteindir. Farklı Wnt sinyal ileti yolları arasındaki dallanma noktası olarak kabul edilir ve Wnt sinyal ileti yollarını düzenleyen çoklu ortak proteinlerle dinamik olarak etkileşime girer. Hücre içi konumlanma ve efektör moleküllerle etkileşimler, Dvl'nin hangi Wnt sinyal yolağı ile ilişkili olduğunu belirler. Hücre içi lokalizasyon söz konusu olduğunda, kanonik yol, Dvl sitoplazmadayken bağlandığı en yaygın yoldur. Öte yandan, eğer membrana bağımlı ise, kanonik ve PCP yolak aktivasyonu ile ilişkilidir. Araştırmalara göre, bu iki yolak antagonistik bir şekilde çalışıyor, yani biri aktifken diğerinin etkisi azalmaktadır. (30). Holloway ve arkadaşları kök hücre yaşlanmasında önemli rolleri olan SIRT1'in üç Dvl ailesi üyesinin hepsinin protein seviyelerini pozitif olarak düzenlediğini göstermişlerdir (60).

## **2.5. Doğal Moleküllerin Geleneksel Tıpta ve Kozmetikte Kullanımı**

Bal, 2000 yılı aşkın bir süredir tıbbi ve besleyici özellikleriyle tanınmaktadır. Tıpta uzun zamandan beri kullanılmasına rağmen, son zamanlarda balın tıbbi nitelikleri ile ilgili araştırmalar ivme kazanmıştır (61). Bal, bal arıları tarafından yapılan doğal bir ürün olup, büyük ölçüde şeker ve sudan oluşur. Ayrıca kaynağına bağlı olarak proteinler, vitaminler, mineraller, flavonoidler, fenolik asitler, enzimler ve diğer fitokimyasallar gibi bileşenleri de içerir (62). Oksidatif stres, inflamasyon ve apoptoz pek çok hastalığın prevalansını etkileyen en önemli üç fizyolojik mekanizmadır. Balda tespit edilen, krisin ve diğer fenolik bileşikler, bu mekanizmaların modülasyonunu ve ilişkili sinyal yollarını etkileyebilir. Araştırmalar, balın çeşitli kanser türleri, doku hasarı, diyabetes mellitus, nörolojik, solunum, gastrointestinal, kardiyovasküler bozukluklar, böbrek yaralanmaları, karaciğer hastalıkları ve oksidatif stres, inflamatuvar süreç ve apoptoz ile katkıda bulunan çeşitli moleküler mekanizmalar yoluyla diğer birçok fizyolojik işlev bozukluğuna karşı terapötik potansiyeli olabileceğini göstermiştir (62). Balın kanser ve deri

rejenerasyonu üzerindeki modüle edici etkisi bilinmektedir ve tedavi için faydalı bir biyomateryal olabileceği de gösterilmiştir. Ancak balın modülasyon yeteneğinin kök hücre ve kök hücre bazlı tedavilerde kombine kullanımları ile ilgili araştırmalar sınırlıdır. Ahmed ve arkadaşları balın yağ kök hücrelerinin canlılığını koruduğunu tespit etmişlerdir (63). Kök hücreler, hasarlı elementleri değiştirme ve doku fonksiyonunu geri kazanma yetenekleri nedeniyle doku homeostazının korunmasında merkezi bir rol oynar, dolayısıyla kök hücre canlılığının korunması yaşlanmaya bağlı deri fenotipini olumsuz yönde etkileyen mekanizmalara karşı koyabilir. Nitekim Ankita ve ark. bal içeren nanofiberlerin göbek kordonundan türetilen mezenkimal kök hücrelerin replikatif yaşlanmasını azalttığını tespit etmişlerdir (64).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Araştırmanın Türü:

Araştırma deneysel özellikte in vitro bir çalışmadır.

#### 3.2 Araştırmanın Yapıldığı Yer ve Zaman:

Bu çalışma, 2021-2023 yılları arasında Sassari Üniversitesi Biyomedikal Bilimler Anabilim Dalı Laboratuvarında ve İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkezi Araştırma laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

#### 3.3 Araştırmanın Evreni ve Örneklemi:

Çalışmada kullanılan kök hücre kaynağı; Sassari Üniversitesi Dermatoloji departmanından Protokol No :4837t58347t kararlı etik kurul izni ile kadın (n:2) ve erkek (n:4) yetişkin bireylerin deri biyopsi örneklerinden temin edildi (Tablo 1). Biyopsi örneklerinden primer kök hücre kültürü, Sassari Üniversitesi Biyomedikal Bilimler Anabilim Dalı Laboratuvarında yapıldı.

#### 3.4. Deri Kök Hücre İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Kültürü

- Biyopsiler 15 ml 'lik falkonlar içerisinde transfer ortamına (Tablo1) alındı ve laboratuvara getirildi.
- Biyopsi örnekleri, yaklaşık 2 mm x 4 mm boyutuna ulaşana kadar bir petri kabında steril bir bisturi yardımıyla mekanik olarak küçük parçalar haline getirildi.
- Parçalanmadan sonra doku parçaları petri kabı tabanına yerleştirilip %10'luk FBS ve 100 unit/ml penisilin/streptomisin içeren DMEM (spesifik kültür ortamı) ortamı içerisinde transfer edildikten sonra 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübe edildi. (Her biyopsi örneği için farklı petri kabı kullanıldı.)
- Hücre kültürü besi ortamı 4 günde bir değiştirildi.
- İzolasyon işleminden bir hafta sonra optik mikroskop altında (Leica ICC50 HD) hücre göçü gözlemlendiğinde, biyopsi parçaları çıkarıldı ve hücreler konfluent hale gelene kadar kültürlendi.
- Konfluent hale gelen hücreler T75 (Euroclone, Italy) kültür kaplarına aktarıldı.

- DKH'ler, bir birincil monoklonal Anti-c/kit (CD117) antikorunu (Miltenyi Biotec, Minneapolis, MN, ABD) kullanılarak manyetik hücre sınıflandırması ile pozitif olarak seçildi ve daha sonra hücreler, doğrudan konjuge edilmiş ikincil bir antikorla (Macs Miltenyi, No:130-048-502) sütunlarda manyetik olarak etiketlendi.

Mezenkimal belirteçlerin yüzdesini ve izole edilmiş popülasyonun homojenliğini değerlendirmek için akış sitometrisi analizinden yararlanıldı;

- Oda sıcaklığında 10 dakika süreyle %1 formaldehit (Bilgram Chemie, GmbH) kullanılarak fiksasyonun ardından hücreler, 4°C' de 30 dakika süreyle bir yıkama tamponu (eBioscience, Milano, İtalya) kullanılarak yıkandı.
- Bir yıkama adımından sonra hücreler, 4°C' de 1 saat boyunca CD73, CD90 (BD Biosciences, San Jose, CA, ABD), CD105 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Almanya), CD45 ve CD31'e (Sigma-Aldrich, Münih, Almanya) (1 µg/10<sup>6</sup> hücrede) karşı yönlendirilen birincil antikorlarla inkübe edildi.
- Ardından 1 µg floresan izotiyosiyanat konjuge sekonder antikorla (Santa Cruz, F2911) 1 saat süreyle 4°C' de karanlıkta inkübe edildi.
- Yıkamadan sonra 10.000 hücre toplanarak akış sitometresinde (CytoFlex, Beckman Coulter, Milano, İtalya) analiz edildi (65).

**Tablo 1: DeneYler Sırasında Kullanılan Kùltür Ortamlarının İÇeriği**

Ortam*	İÇerik
<b>Transfer Ortamı</b>	RPMI1640 (Lonza Bioscience) 100 U/ml penisilin (Invitrogen) 100 µg/ml streptomisin (Invitrogen)
<b>Spesifik Kùltür Ortamı</b>	DMEM (Gibco) % 15 of Fetal bovine serum (FBS) % 1 L-glutamin (Euroclone, Milano, Italy), % 1 Esansiyel olmayan amino asit (Gibco), 200 U/ml Penisilin (Invitrogen) 0.1 mg/ml Streptomisin (Invitrogen) FGF (Gibco).
<b>Temel Besiyeri</b>	DMEM (Gibco) % 10 FBS, 200 U/ml Penisilin 0.1 mg/ml Streptomisin

\*Deri kùk hùcre izolasyon aşamalarında, Büyüme eğrisi ve Canlılık testi analizlerinde spesifik kùltür ortamı kullanıldı.

\*Kùk hùcrelerin Büyüme eğrisi ve Canlılık testi, farklılaşma kapasiteleri analiz edilirken ve biyoreaktör kurulumlarında kontrol olarak temel besiyeri kullanıldı.

Osteojenik farklılaşma sürecini uyarmak için alizarin kırmızı boyama, adipojenik farklılaşmayı uyarmak için yağ kırmızısı boyamaları yapıldı. Ayrıca kùk hùcre ortamının kullanılabilirliğini tanımlamak için hùcre proliferasyonunu değerlendirmek üzere bir hùcre büyüme eğrisi gerçekleştirildi (66).

#### **3.4.1. Alizarin Kırmızı Boyaması**

Osteojenik fenotip için farklılaşma sürecini uyarmak üzere; önceden dondurularak saklanan DKH'leri, osteojenik farklılaşma ortamının (StemPro™

Osteogenesis Differentiation) varlığında veya yokluğunda (kontrol) 24 kuyulu plakada (BD-falcon) 21 gün boyunca kültürlendi. Osteojenik ortamda kültürlenmiş DKH'ler pozitif kontrolü temsil eder. Numuneler önceden uygulanan protokole göre hazırlandı (67):

- Hücreler, oda sıcaklığında 15 dakika süreyle %10 formalinle sabitlendi.
- Üç kez damıtılmış suda (ddH<sub>2</sub>O) yıkandı.
- Oda sıcaklığında 20 dakika boyunca %2 alizarin kırmızısı (Santa Cruz Biotechnology) çözeltisi ile boyandı.
- Numuneler üzerinde fazla çözelti kalmasını önlemek için ddH<sub>2</sub>O içerisinde birkaç kez yıkandı ve çeker ocakta havayla kurutulmadan önce 15 dakika boyunca PBS içerisinde inkübe edildi.
- Ardından kalsiyum depolarını analiz etmek için bir ışık mikroskobu altında gözlemlendi.
- Mineralizasyon analizi, ImageJ analiz yazılımı (ImageJ, Ulusal Sağlık Enstitüleri) kullanılarak yapıldı (66).

### **3.4.2. Yağ Kırmızısı Boyaması**

Adipojenik farklılaşmayı uyarmak için hücreler, adipojenik farklılaşma ortamında (StemPro™ Adipogenic Differentiation Kit Gibco™) 24 kuyulu plakada (BD-falcon) 21 gün boyunca kültürlendi. Kültürün ardından hücreler, %10 formalinde 30 dakika fikse edildi ve ardından iki kez damıtılmış su ve %60 izopropanol içinde 5 dakika yıkandı. Yıkandıktan sonra, hücreler 15 dakika yağ kırmızısı solüsyonunda boyandı, H<sub>2</sub>O ile yıkandı ve Mayer'in hematoxilen solüsyonunda 2 dakika zıt boyandı. Hücreler daha sonra yıkandı ve adipogenez optik mikroskopi ile değerlendirildi. Lipid birikiminin analizi, ImageJ kullanılarak yapıldı (66).

### **3.4.3. Büyüme Eğrisi ve Canlılık Testi**

Spesifik kültür besiyeri (SKB) ortamının kullanılabilirliğini tanımlamak için, hücre proliferasyonunu değerlendirmek üzere bir hücre büyüme eğrisi çizildi.

- Birinci pasajda bulunan DKH'leri iki gruba ayrıldı:

- Birinci grubun hücreleri spesifik kültür ortamında (SKO) kültürlendi, ikinci grubun hücreleri ise temel besiyeri ortamında (TB) tutuldu ve kontrol olarak kabul edildi.
- Her 24 saatte bir hücre/kuyu sayısı, Luna otomatik hücre sayacı kullanılarak sayıldı.
- İki farklı kültürleme koşulunda izole edilmiş DKH'lerinin metabolik aktivitesi, MTT Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide testi (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, ABD) ile değerlendirildi. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), hücrelerin metabolik aktivitesini ve hücre canlılığını değerlendirmek için kullanılan bir biyolojik deneydir.
- Hücreler 24, 48 ve 72 saat boyunca 96 kuyulu plakada 6000 hücre/kuyu konsantrasyonunda ekildi.
- 24 saat %5 CO<sub>2</sub> ve 37°C koşullarındaki inkübatörde yüzeye yapışmaları beklendi.
- 24, 48 ve 72. saatler sonunda ilgili kuyulara 5 mg/ml'lik bir konsantrasyonda MTT eklendi. MTT testinin sonuçları bir plaka okuyucu (OD470) tarafından tespit edildi, ardından hücre canlılığı kontrol (TB) ile karşılaştırıldı (66).

### **3.5. Balın HFF1 Hücreleri ve DKH Üzerindeki Sitotoksik Etkisi**

#### **3.5.1. Bal Konsantrasyonlarının Hazırlanması**

Ham bal Elâzığ-Maden bölgesindeki arıcılardan direkt olarak temin edildi. Işıktan korunarak oda sıcaklığında muhafaza edildi.

- Konsantrasyonlar bal çözeltilisinden DMEM ile seyreltilerek %10 w/v olacak şekilde hazırlandı.
- Hassas terazide 1gr bal 15ml steril falkon tüp içerisinde tartıldı.
- 10 ml DMEM'de çözüldü.
- Her deneyden önce ana stok çözeltiden  $M1 \times V1 = M2 \times V2$  formülü kullanılarak farklı konsantrasyonlarda 1 ml bal hazırlandı.

#### **3.5.2. MTT Hücre Canlılık Analizi**

HFF1 ve DKH'leri, her bir kuyuda 5000 hücre olacak şekilde 96 kuyulu plağa ekildi ve 96 plaktaki kuyular gruplara ayrılarak, test hücreleri 24 ve 48 saat süreyle çeşitli konsantrasyondaki iki farklı yıl elde edilen bal çözeltileri ile muamele edildi. 24 ve 48.



saatler sonunda kuyulara MTT solüsyonu eklendi ve 2 saat inkübe edildikten sonra kuyulardaki reaksiyon 570 nm dalga boyunda plaka okuyucu kullanılarak ölçüldü. MTT sonuçlarına göre en uygun zaman aralığı ve bal konsantrasyon yüzdesine göre karar verildi.

### **3.6. İnsan Derisi Dinamik Hücre Kültürü Modelinde balın deri üzerindeki koruyucu etkisi**

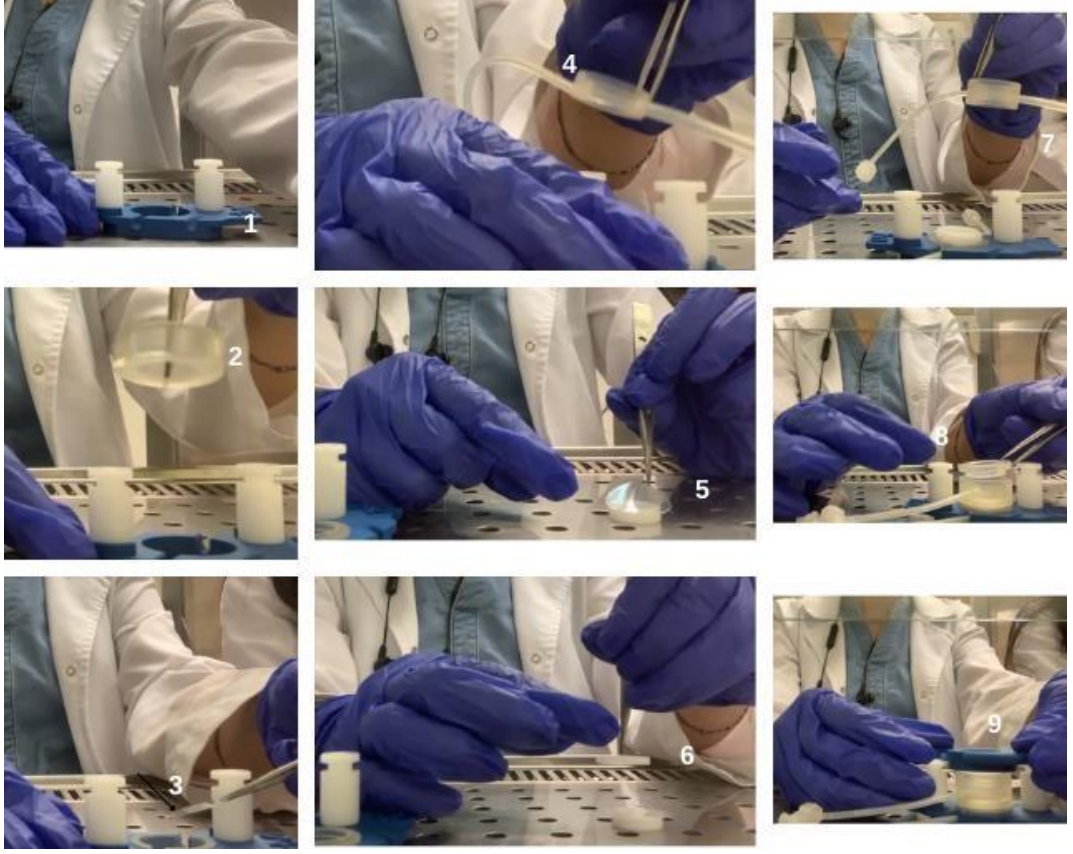
#### **3.6.1. Biyoreaktör ve Kültür Koşullarının oluşturulması**

Biyoreaktör, sürekli ortam akışı sayesinde hücre ortamlarının karışmasını sağlarken farklı hücre tiplerinin ayrı ayrı kültürlenmesine izin veren bir sistemdir. Deri katmanlarını taklit etmek için hücreler, Live Box2 (IVTech, İtalya) hazneleriyle dinamik akış içeren biyoreaktörde kültürlendi (Şekil 4).

Her hücre tipinin örnekleri Tablo 2'de açıklandığı gibi gruplara ayrıldı ve her grubun deneyleri farklı zamanlarda yapıldı.

- Hücreler insan derisi dokusunun izometrik oranına göre kültürlenmek üzere otomatik bir hücre sayacıyla (LUNA, Logos biosystems) sayıldı.
- 80.000 HaCaT, 40.000 HFF1 ve 10.000 DKH olacak şekilde biyoreaktörün odalarına ekildi (Şekil 5).
- 24 saat yapışmaları beklendi.
- 24 saat sonunda biyoreaktörün odaları birbirine bağlanarak bağlantı borularından kültür ortamının akışı sağlandı (Şekil 6).

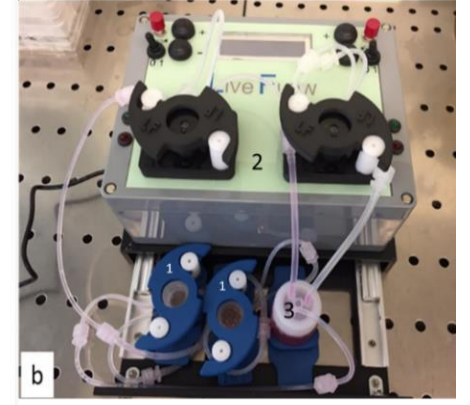
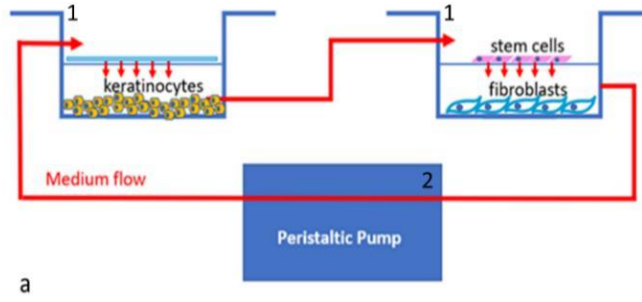
Kök hücreler, fibroblastlar ve keratinositler, bağlantılı odalar ve 0,45 µm membran (ipCELLCULTURE™, it4ip, Belçika) sayesinde birbiri ile ilişki içinde kültürlenir. Odalar, hazneye ve peristaltik pompaya bağlıdır (8). Kültür ortamının akış hızı 0,1 ml/dak olarak ayarlandıktan sonra hücreler 48 saat boyunca kültürde bırakıldı.



**Şekil 4:**Biyoreaktör Odasının Kurulumu



**Şekil 5:** Biyoreaktör Odasına Hücre Ekimi



**Şekil 6:** Biyoreaktörün Şeması (a) ve Resmi (b): Şekil a, Odacıkları (Live Box2; mavi çizgiler (1)) ve Her Odacıkta Kültürlenen Hücreleri Temsil Etmektedir. Kırmızı Çizgiler ve Oklar Hazne ve Pompa (Live Flow (2)) Bağlantıları ve Ortam Akışını Gösterir. Şekil b Kullanılan Biyoreaktörün Resmidir (IVTech, İtalya) Live Box2 (mavi) (1), 2 Numara Pompayı ve 3 Numara Kültür Ortamı İçin Rezervuarı Göstermektedir (8).

### 3.6.2. Hücelere Bal Uygulanması

Bal uygulamasından sonra UV uygulanacak olan gruba (Uv+B) MTT sonuçlarına göre belirlenen %1'lik bal çözeltisi eklenerek biyoreaktör sayesinde dinamik koşullarda 48 saat süreyle kültürlendi.

**Tablo 2: Biyoreaktör Düzeneginde HaCaT, HFF1 ve DKH'ler İçin Analiz Edilen Gruplar**

Deney grupları	Bal uygulaması	UV hasarı
<b>Kontrol (K)</b>	Hayır	Hayır
<b>UV Kontrol (UvK)</b>	Hayır	Evet
<b>UV Bal (Uv+B)</b>	Evet	Evet

### 3.6.3. UV ile Yaşlanmanın İndüklenmesi

Biyoreaktör düzenegi söküldükten sonra 48 saat %1 oranında bal uygulanan ve uygulanmayan hücreleri içeren odalar steril kabin içerisinde UV lambası 10 cm mesafede olacak şekilde sabitlendi ve 2-3 dk boyunca dalga boyu 280-320 nm arasındaki UVB ışığına maruz bırakıldı.

### 3.6.4. Biyoreaktörün Sökülmesi ve Örneklerin Toplanması

Hücrelerin ekildiği biyoreaktör odaları Şekil 4'te açıklanan kurulumun aksi yönünde sökülüp her bir hücre tipi ayrı biyoreaktör odasının yüzeyinden 200µl tripsin ile kaldırılıp pelet halinde -80 °C'de mRNA izolasyonu yapılmak üzere saklandı. Tablo 2'de belirtilen bütün grupların deneyleri yapıldıktan sonra gen ekspresyon analizleri için mRNA izolasyonları yapıldı.

### 3.6.5. DKH ve HFF1 Hücrelerinde Gen İfade Analizi

Tez çalışması kapsamında deney ve kontrol grubunu içeren DKH ve HFF1 hücrelerinde kök hücre, hücre döngüsü ve Wnt sinyal yolağı ilişkili genlerin ifade düzeyi araştırıldı (Tablo 3, Tablo 4).

**Tablo 3: DKH Hücrelerinde İfadeleri Araştırılan Genler**

DKH	
<b>Kök Hücre İlişkili Genler</b>	Oct4, Sox2, Bmi1, TERT
<b>Hücre Döngüsü Genleri</b>	p16, p21, p53
<b>Wnt Genleri</b>	Wnt3a, Wnt5a, Wnt7b, Wnt16, β-katenin
<b>Dvl Genleri</b>	Dvl1, Dvl2, Dvl3
<b>Yıkım Kompleksi Genleri</b>	Axin1, Axin2, APC, GSK3β

**Tablo 4: HFF1 Hücrelerinde İfadeleri Araştırılan Genler**

HFF1	
<b>HDM, Stres ve Apoptoz İlişkili Genler</b>	HAS2, Hsp70, KAS8
<b>Wnt Genleri</b>	Wnt3a, Wnt5a, Wnt7b, Wnt16, β-katenin
<b>Dvl Genleri</b>	Dvl1, Dvl2, Dvl3
<b>Yıkım Kompleksi Genleri</b>	Axin1, Axin2, APC, GSK3β

### **Kök Hücre ve Hücre Döngüsü Genlerinin İfade Analizi**

Tablo 2’de belirtilen grupların (K, UvK, Uv+B) elde edilen peletlerinden RNeasy Mini Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak üretici protokolüne göre total mRNA izolasyonu yapıldı. RNA'nın miktarı ve saflığı Nanodrop (Thermo Scientific) kullanılarak OD 260/280nm ile ölçüldü. Gen ifade seviyelerini tespit etmek için, üç kopya halinde her numuneden Luna One-Step RT-qPCR kit (Tablo 5) kullanılarak gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) cihazında (Bio-Rad, Hercules, CA, ABD) amplifiye edildi (Tablo 5).

RT-qPCR analizi kök hücreler için; kök hücre belirteçleri, Oct4 ve Sox2, hücre döngüsüyle ilgili genler; p16, p21 ve p53 ve Bmi1, TERT için gerçekleştirildi. HFF1 hücrelerinde ise HAS2, KAS8 ve Hsp70 genlerinin ifade analizi için qPCR gerçekleştirildi. Elde edilen Ct (Cycle of threshold) değerleri, referans gen olarak GAPDH kullanılarak normalize edildi ve mRNA seviyeleri, kontrole (K) kıyasla değişim kat sayısı ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) olarak ifade edildi.

**Tablo 5:Luna One-Step RT-qPCR Kit İçeriği**

<b>İçerik</b>	<b>20µl Reaksiyon</b>	<b>Final konsantrasyon</b>
<b>Luna Universal One-Step Reaksiyon Karışımı (2X)</b>	10 µl	1X
<b>Luna WarmStart® RT Enzim Karışımı (20X)</b>	1 µl	1X
<b>İleri primer (10 µM)</b>	0.8 µl	0.4 µM
<b>Geri primer (10 µM)</b>	0.8 µl	0.4 µM
<b>Kalıp RNA</b>	2 µl	< 1 µg (total RNA)
<b>Nükleaz-içermeyen Su</b>	5.4 µl	

**Tablo 6: Luna One-Step RT-qPCR Protokolü**

Döngü adımı	Sıcaklık	Zaman	
<b>Ters Transkriptaz Enzimi</b>	55°C*	10 dakika	1
<b>Başlangıç Denatürasyonu</b>	95°C	1 dakika	1
<b>Denatürasyon</b>	95°C	10 saniye	40
<b>Uzama</b>	60°C	30 saniye	
<b>Erime eğrisi</b>	60°C		1

3.4, 3.5, 3.6 başlıklarında belirtilen yöntemler İtalya Sassari Üniversitesi Biyomedikal Bilimler bölümünde gerçekleştirilmiştir. Bu aşamadan sonra açıklanan yöntemler İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Merkezi Araştırmalar Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

### **Wnt Sinyal Yolağı İlişkili Genlerin İfade Analizi**

İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesindeki laboratuvarında çalışılmak üzere Tablo 2’de belirtilen grupların (K, UvK, Uv+B) elde edilen peletlerinden RNeasy Mini Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak üretici protokolüne göre total mRNA izolasyonu yapıldı. RNA'nın miktarı ve saflığı Nanodrop (Thermo Scientific) kullanılarak OD 260/280nm ile ölçüldü. İzole edilen RNA’lardan High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) kullanılarak cDNA dönüşümü yapıldı (Tablo 7, Tablo 8). Elde edilen cDNA’lar gen ifade seviyelerini tespit etmek için Thermo Scientific PikoReal Real-Time PCR System (Thermo Scientific, Finlandiya) cihazı ve Luna Universal qPCR Master Mix Protokol Koşulları (Tablo 9) kullanılarak RT-qPCR analizleri yapıldı (Tablo 10). Her örnek için PCR reaksiyonu en az 3 kez tekrar edildi. Elde edilen Ct değerleri, referans gen GAPDH kullanılarak normalize edildi ve mRNA seviyeleri, kontrole kıyasla değişim kat sayısı ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) olarak ifade edildi.

**Tablo 7: Ters Transkripsiyon Kit İçeriği**

<b>İçerik</b>	<b>Hacim/Reaksiyon (μL)</b>
<b>10× RT Tampon 2.0</b>	2.0
<b>25× dNTP Karışımı (100 mM)</b>	0.8
<b>10× RT Random Primerler</b>	2.0
<b>MultiScribe™ Ters Transkriptaz</b>	1.0
<b>RNase İnhibitor</b>	1.0
<b>Nükleaz-içermeyen su</b>	3.2
<b>Total</b>	10.0

**Tablo 8: Ters Transkripsiyon Kit Protokolü**

	<b>1. Adım</b>	<b>2. Adım</b>	<b>3. Adım</b>	<b>4. Adım</b>
<b>Sıcaklık</b>	25	37	85	4
<b>Zaman</b>	10 dakika	120 dakika	5 dakika	∞

**Tablo 9: Luna Universal qPCR Master Mix Kit İçeriği**

<b>İçerik</b>	<b>25μl Reaksiyon</b>	<b>Final konsantrasyon</b>
<b>Master Mix</b>	10 μl	1X
<b>İleri primer (10 μM)</b>	0.5 μl	0.25 μM
<b>Geri primer (10 μM)</b>	0.5 μl	0.25 μM
<b>PCR-grade H2O</b>	7 μl	
<b>Kalıp cDNA</b>	2 μl	<100 ng
<b>Total</b>	20 μl	

**Tablo 10: Luna Universal qPCR Master Mix Protokol Koşulları**

Döngü	Sıcaklık	Zaman	Döngü
<b>Başlangıç Denatürasyon</b>	95°C	60 saniye	1
<b>Denatürasyon</b>	95°C	15 saniye	40
<b>Uzama</b>	60°C	30 saniye	
<b>Erime Eğrisi</b>	60°C	60 saniye	1

**Tablo 11: Primer Dizileri**

	İleri Primer	Geri primer
<b>β-katenin</b>	5'-CTTACACCCACCATCCCCT-3'	5'-CCTCCACAAATTGCTGCTGT-3'
<b>Dvl1</b>	5'-CCACCCTGAACCTCAACAGT-3'	5'-CCTTACTCTGCTGACTCCC-3'
<b>Dvl2</b>	5'-GCCTATCCAGGTTCCCTCCTC-3'	5'-GCCTATCCAGGTTCCCTCCTC-3'
<b>Dvl3</b>	5'-GCGAGACCAAGATCATCTACC-3'	5'-ATCTCCTCCTTACCCTCC-3'
<b>GAPDH</b>	5'-GCACCACCAACTGCTTA-3'	5'-AGTAGAGGCAGGGATGAT-3'
<b>Wnt3a</b>	5'-ACCTGAAGGCAGGGCTCCTC-3'	5'-GCGTACGTGAAGGCCGTCTC-3'
<b>Wnt5a</b>	5'-TTTCTCCTTCGCCAGGTTG-3'	5'-GCGTACGTGAAGGCCGTCTC-3'
<b>Wnt7b</b>	5'-AGAAGACCGTCTTCGGGCAAGA-3'	5'-AGTTGCTCAGGTTCCCTTGGCT-3'
<b>Wnt16</b>	5'-CGCTGAACAGCCGCCAGAAG-3'	5'-ACAGCACAGGAGCCGAAAC-3'
<b>GSK3β</b>	5'-AATGAACCCAACTACACAGAATTTAAA-3'	5'-CAATTGCCTCCGGTGGAGT-3'
<b>APC</b>	5'-GCCCTGACCAAAAAGGAAC-3'	5'-TGGCAGCAACAGTCCCCTA-3'
<b>Axin1</b>	5'-AGCCGTGTCCGACATGGA-3'	5'-AAGTAGTACGCCACAACGATGCT-3'
<b>Axin2</b>	5'-TGTGAGGTCCACGGAAACTG-3'	5'-CGTCAGCGCATCACTGGATA-3'
<b>Oct4</b>	5'-CTCACCTGGGGTTCTATT-3'	5'-CTCCAGGTTGCCTCTACTC-3'
<b>Sox2</b>	5'-GCACATGAACGGCTGGAGCAACG-3'	5'-TGCTGCGAGTAGGACATGCTGTAGG-3'
<b>p16</b>	5'-CATGAGTGTGGATCCAGCTTG-3'	5'-CCTGAATAAGCAGATCCATGG-3'
<b>p19</b>	5'-CAACGCACCGAATAGTTACGG-3'	5'-AACTTCGTCTCCAGAGTCGC-3'
<b>p21</b>	5'-GCCTTCGGCTGACTGGCTGG-3'	5'-TCGTCTCCAGAGTCGCCG-3'
<b>p53</b>	5'-CAAAGGCCCGCTCTACATCTT-3'	5'-AGGAACCTCTATTACCCGA-3'
<b>Bmi1</b>	5'-TGGCCTTGAAACCACCTTTT-3'	5'-AACTACCAACCCACCAGCCAA-3'
<b>TERT</b>	5'-GCCAACAGCCCAGCAGGAGG-3'	5'-TTGGTGGTTACCGCTGGGGC-3'
<b>HAS2</b>	5'-GACGTGGAAGATGAGCGTG-3'	5'-GACGACGTACACTCATC-3'
<b>KAS8</b>	5'-TCCACGAAAAGGTTCCCGGTGA-3'	5'-TCGTCCCAGTGCTCTGAAGGCT-3'
<b>Hsp70</b>	5'-AGGAGGAGATGGAAAGGGAACCTT-3'	5'-ACCTCAATTCTGATCTGCTCACTTCT-3'



### **3.7. İstatistiksel Analiz**

Bu çalışmanın istatistiksel analizleri, GraphPad Prism yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Üç farklı grup örneği üzerinde Two-Way ANOVA testi uygulandı ve ( $p<0,05$ ) elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### **3.8. Etik İzinler**

Bu çalışma Sassari Üniversitesi Etik kurulu tarafınca onaylanan 4837t58347t numaralı protokol kararıyla etik kurul izni alınarak yapılmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. DKH İzolasyonu, Kültürü ve Farklılaşma Potansiyelinin Kontrolü

#### 4.1.1. DKH İzolasyonu

Analiz edilen DKH'ler CD73, CD90 ve CD105 için pozitif, CD31 ve CD45 için negatiftir, bu da onların MKH kaynaklı olduklarını göstermektedir (66).

#### 4.1.2. DKH'nin Farklılaşma Potansiyeli

İzole edilen hücreler, osteojenik ve adipojenik fenotiplere farklılaşabildikleri için mezenkimal bir fenotip sergilediği gözlemlendi. Bu özellik dondurulduktan sonra da korundu 21 gün boyunca adipojenik ortamda büyütülen hücrelerin, sitoplazmalarında lipit birikimi olduğu görüldüğü fa. Osteojenik ortamla büyütülen hücreler ise sitoplazmik mineralizasyon sergiledi (Şekil7).



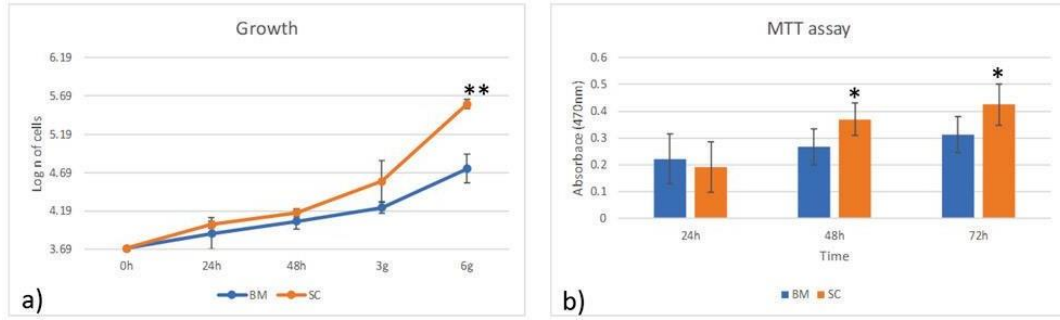
**Şekil 7:** 21 gün boyunca spesifik bir adipojenik veya osteojenik ortamda kültürlenmiş deri kök hücrelerinin farklılaşması. Farklılaşmamış hücreler, temel büyüme ortamında kültürlenir. Görüntüler üç farklı deneyi temsil etmektedir. Ölçek çubuğu=100 µm (66).

#### 4.1.3. Spesifik Kültür Ortamının Hücre Büyümesine Etkisi

Büyüme eğrisi (Şekil 8, Panel a), TB ile karşılaştırıldığında SKO ortamının in vitro hücre proliferasyonu üzerindeki pozitif katkısını göstermektedir. Bir hafta sonra TB ve SKO'deki hücre büyümesi arasındaki fark anlamlı derecede artmıştır (66).

#### 4.1.4. Spesifik Kültür Ortamının Hücre Canlılığına Etkisi

MTT tahlilinin grafiği (Şekil 8, Panel b), TM'de kültürlenmiş aynı hücrelerle karşılaştırıldığında, SC ortamında kültürlenmiş DKH'lerde artan bir metabolik aktivite gösterir. Canlılıktaki bu fark, kültürde yalnızca 48 saat sonra anlamlı hale gelir (66).



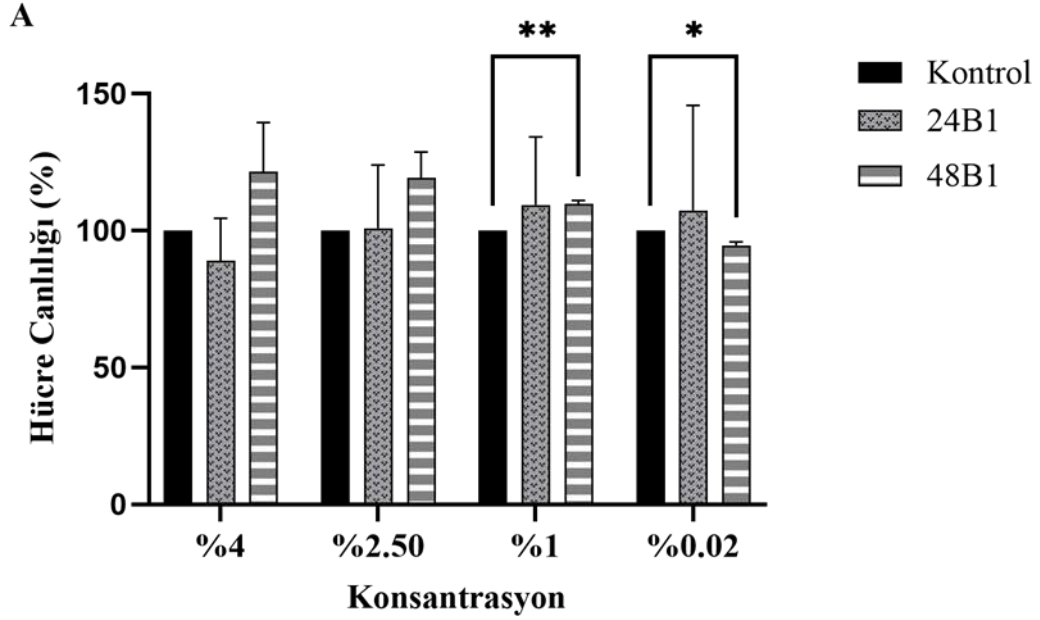
**Şekil 8:** Büyüme eğrisi ve MTT tahlili. SC ortamında kültürlenene ve/veya temel besiyeri ortamında (TB) tutulan pasaj 1'deki deri kök hücreleri Anova testiyle (P değeri > 0,05) hesaplandı ve hücreler her 24 saatte bir sayıldı. Panel b'de, temel büyüme ortamında kültürlenene aynı numunelerle karşılaştırıldığında, DKH'ler Spesifik kültür ortamında kültürlendiğinde hücre canlılığının arttığını göstermektedir(66).

## 4.2. Balın DKH ve HFF1 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin MTT Analizi ile Belirlenmesi

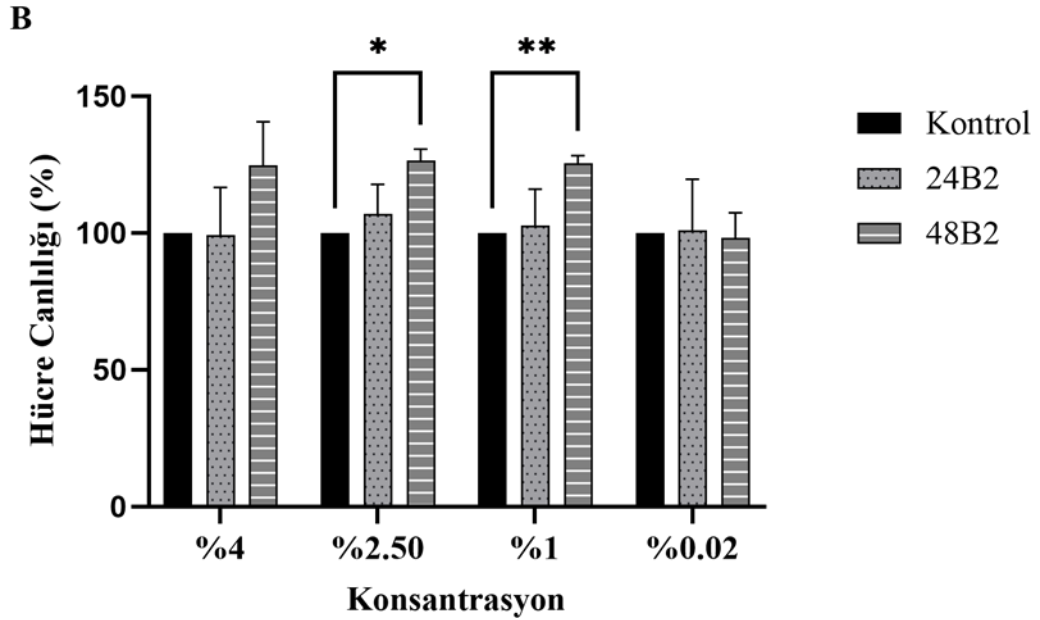
### 4.2.1. Balın DKH Üzerindeki Sitotoksik Etkisi

Kök hücrelerin 24 ve 48 saat boyunca farklı zamanlarda hasat edilmiş 2 çeşit bal (Bal1: B1 ve Bal2: B2) ile muamele edilmesinin etkilerine bakıldığında, her iki balın kök hücreler üzerinde sitotoksik etkisinin olmadığı ve genellikle hücre canlılığını artırma ya da koruma eğiliminde olduğu görülmektedir. Her iki bal çeşidinde de %1'lik konsantrasyonun anlamlı olduğu ( $p < 0,005$ ) ve Bal2'deki %1'lik konsantrasyonun kök hücrelerde daha yüksek bir metabolik aktivite sağladığı görülmektedir. Bu nedenle deneylere Bal2'nin %1 konsantrasyonu ile devam edilmiştir.

**DKH 24. ve 48. saat  
MTT Sonuçları  
Bal1**



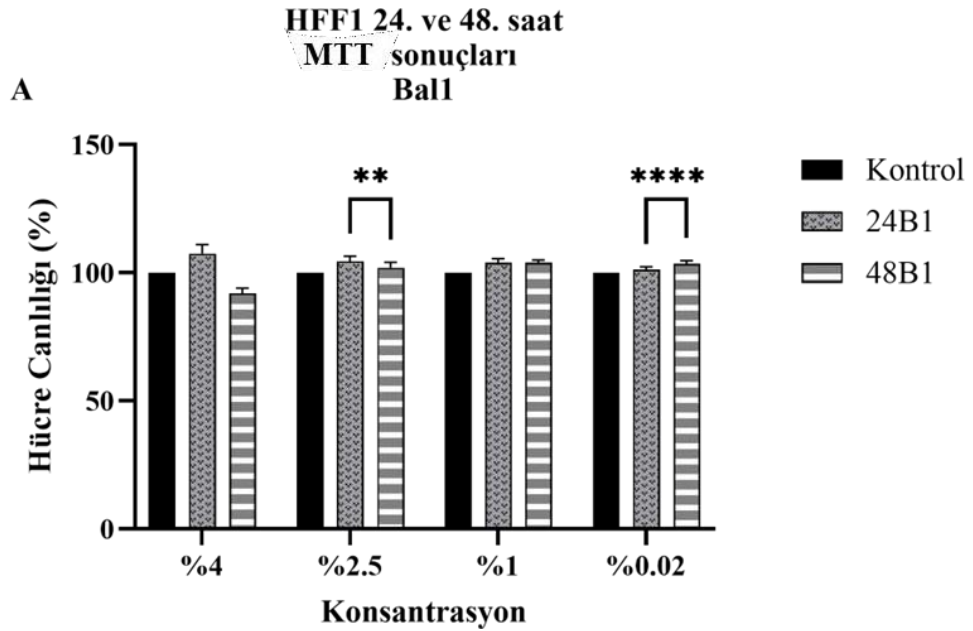
**DKH 24. ve 48. saat  
MTT Sonuçları  
Bal2**

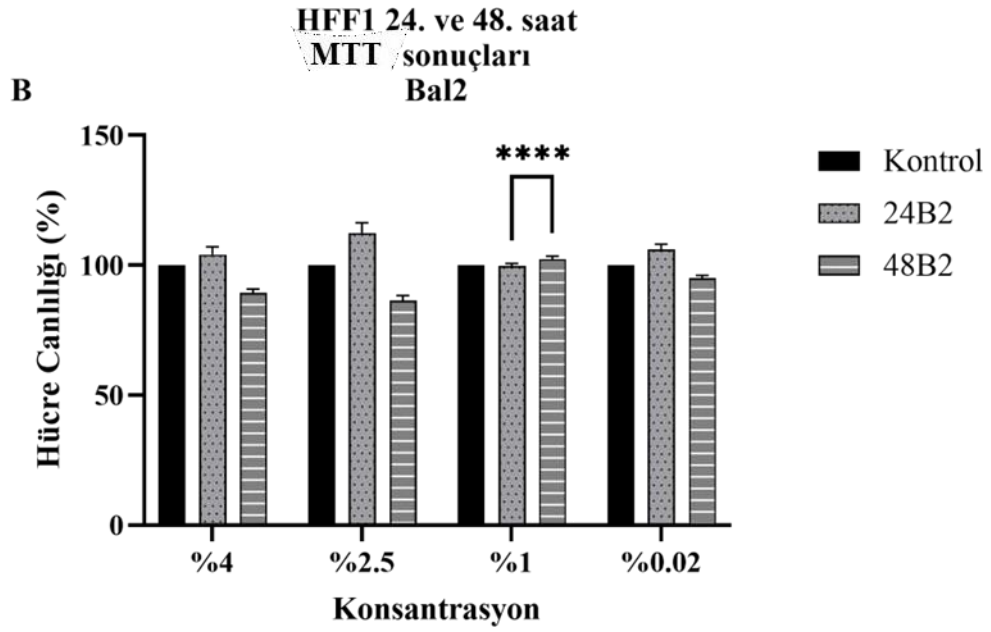


**Şekil 9:**DKH'lerin Bal1 (A) ve Bal2 (B) ile 24. ve 48. Saat Muamelesi Sonucundaki MTT Sonuçları: Analizler Graphpad Programı Kullanılarak Two-Way Anova Yöntemi İle Yapılmıştır. Bal Verilen Gruplar Hiçbir Muamele Yapılmayan Kontrol İle Karşılaştırılmıştır. (Kontrol= 100)

#### 4.2.2. Balın HFF1 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi

HFF1 fibroblast hücrelerinin 24 ve 48 saat boyunca farklı zamanlarda hasat edilmiş iki çeşit bal ile muamele edilmesinin etkilerine bakıldığında, her iki balın HFF1 üzerinde sitotoksik etkisinin olmadığı ve genellikle hücre canlılığını arttırma ya da koruma eğiliminde olduğu görülmektedir. Kök hücrelerin MTT sonuçlarına göre seçilen Bal2 çeşidi ve %1'lik konsantrasyon HFF1 hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlıdır. Sitotoksik bir etki göstermemiştir bu nedenle sonraki deneyler için seçilmiştir.





**Şekil 10:** HFF1 24. ve 48. Saat Bal1 (A) ve Bal2 (B) Muamelesi Sonucundaki MTT Sonuçları: Analizler GraphPad Programı Kullanılarak Two-Way Anova Yöntemi İle Yapılmıştır. Bal Verilen Gruplar Hiçbir Muamele Yapılmayan Kontrol ile Karşılaştırılmıştır. (Kontrol= 100)

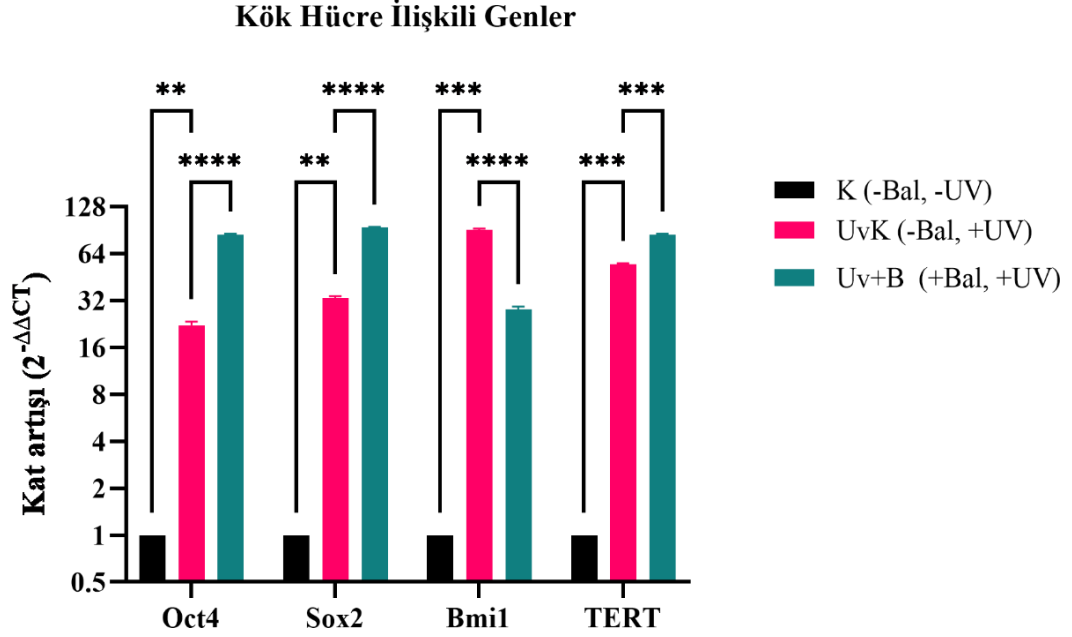
### 4.3. DKH ve HFF1 Hücrelerinde Gen İfade Analizi

DKH ve HFF1 hücrelerinin UvK ve Uv+B gruplarının K' ya göre normalize edilmiş kat değişim oranları Tablo 12' da verilmiştir.

**Tablo 12: DKH ve HFF1 hücrelerinin UvK ve Uv+B Gruplarının K'ya Göre Normalize Edilmiş Kat Değişim Oranları (K=1)**

DKH			HFF1		
Genler	UvK	UV+B	Genler	UvK	Uv+B
Wnt3a	0,66	25,40	Wnt3a	0,24	2,94
Wnt5a	0,26	1,12	Wnt5a	0,17	0,27
Wnt7b	0,56	1,21	Wnt7b	1,35	1,07
Wnt16	1,51	1,37	Wnt16	1,72	1,05
Dvl1	6,29	0,68	Dvl1	0,11	0,21
Dvl2	0,55	0,46	Dvl2	1,24	0,92
Dvl3	0,96	2,38	Dvl3	1,10	1,29
$\beta$ -katenin	4,63	1,23	$\beta$ -katenin	1,10	0,60
Axin1	1,83	1,04	Axin1	0,87	0,50
Axin2	1,03	2,09	Axin2	0,93	1,27
APC	0,30	0,44	APC	0,23	0,44
GSK3 $\beta$	5,04	4,53	GSK3 $\beta$	0,05	0,07
Oct4	22,21	84,64	HAS2	0,16	5,27
Sox2	33,13	93,92	Hsp70	0,84	1,58
Bmi1	91,14	28,05	KAS8	25,90	22,71
p16	31,56	6,19			
p21	30,91	6,23			
p53	119,43	87,43			
TERT	54,82	84,45			

### 4.3.1. Kök Hücre ve Hücre Döngüsü İlişkili Genlerin Gen İfade Analizi Sonuçları

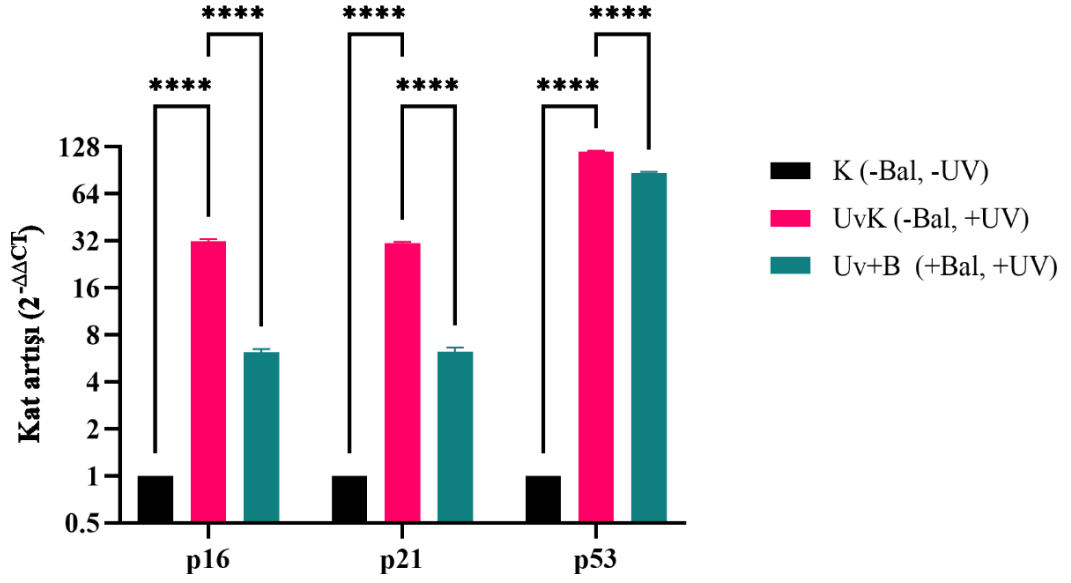


**Şekil 11:** DKH’de Oct4, Sox2, Bmi1 ve TERT Genlerinin İfade Analizi. K (siyah), UvK (pembe) ve Uv+B’deki (yeşil) mRNA Seviyeleri, Kontrol (K=1) Göre Kıyaslandı. Kat Değişimi ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) Olarak İfade Edildi.

RT-qPCR sonuçlarının analizlerine göre kök hücre genleri olan Oct4, Sox2 ve TERT ifadeleri 48 saat bal ile ön işleme tabi tutulduktan sonra UV’ye maruz bırakılan Uv+B grubunda, UvK grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ( $P < 0,05$ ) bir şekilde artış gösterirken Bmi1 ifadesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi. Tüm kök hücre ilişkili genlerin ifadesi UvK grubunda K grubuna göre anlamlı oranda artış gösterdi.



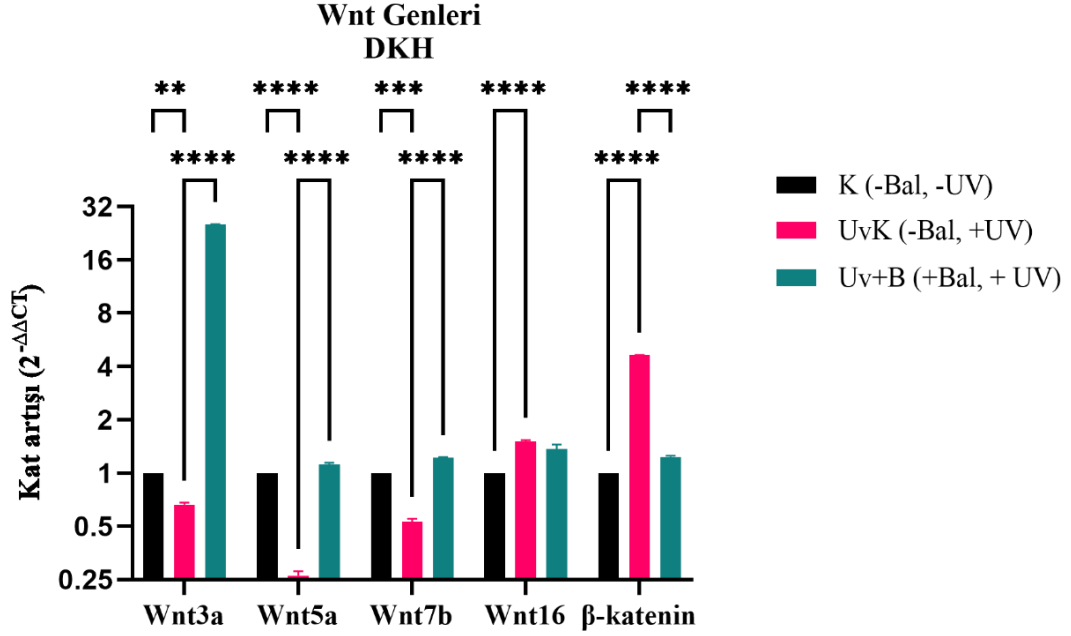
### Hücre Döngüsü Genleri



**Şekil 12:** DKH' de p16, p21 ve p53 Genlerinin İfade Analizi. K (siyah), UvK (pembe) ve Uv+B'deki (yeşil) mRNA Seviyeleri, Kontrole (K=1) Göre Kıyaslandı. Kat Değişimi (2<sup>-ΔΔCt</sup>) Olarak İfade Edildi.

RT-qPCR sonuçların analizlerine göre yaşlanma ve hücre döngüsü ilişkili genler olan p16, p21 ve p53 ifadelerinin Uv+B grubunda UvK grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha az ifade edildiği gözlemlendi. Tüm yaşlanma ve hücre döngüsü ilişkili genlerin ifadesi UvK grubunda K grubuna göre anlamlı derecede artış gösterdi.

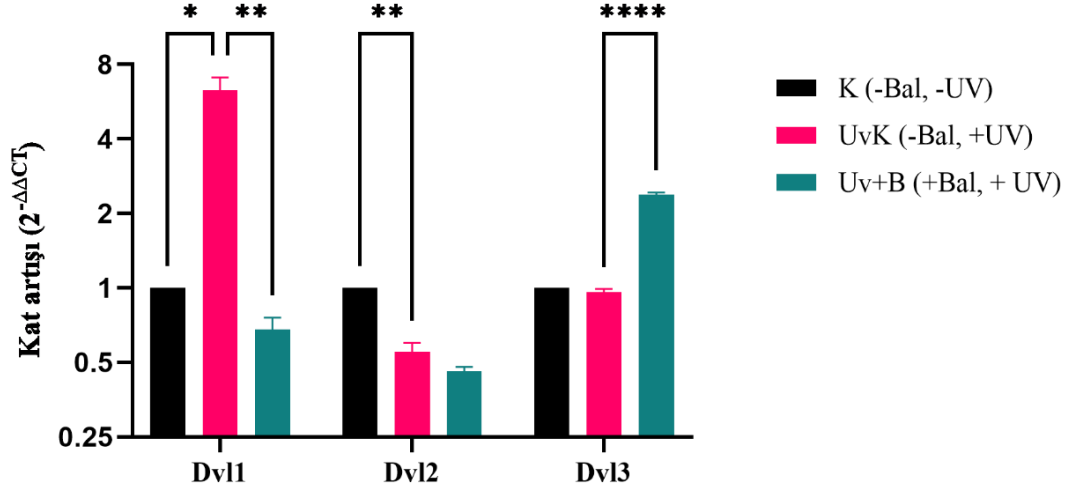
#### 4.3.2. Kök Hücrede Wnt Sinyal İleti Yolağı Genlerinin İfade Analizi Sonuçları



**Şekil 13:** DKH' de Wnt3a, Wnt5a, Wnt7b, Wnt16 ve  $\beta$ -katenin Genlerinin İfade Analizi. K (siyah), UvK (pembe) ve Uv+B'deki (yeşil) mRNA Seviyeleri, Kontrole (K=1) Göre Kıyaslandı. Kat değişimi ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) Olarak İfade Edildi.

RT-qPCR sonuçlarının analizlerine göre kök hücrede Uv+B grubunda Wnt3a, Wnt5a ve Wnt7b ifadelerinde UvK grubuna göre anlamlı artış gözlemlendi. Wnt16 ifadesinde ise anlamlı bir değişim gözlemlenmedi.  $\beta$ -katenin ifadesinde Uv+B grubunda UvK grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede bir düşüş gözlemlendi. Wnt16 ve  $\beta$ -katenin dışındaki diğer Wnt genlerinin ifadesi UvK grubunda K grubuna göre anlamlı derecede azaldı.

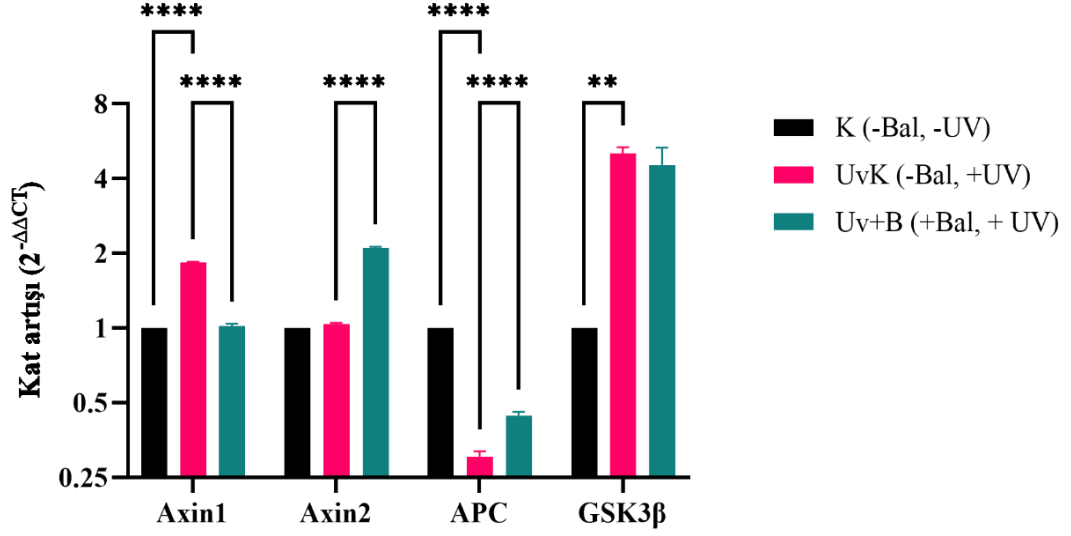
### Dvl Genleri DKH



**Şekil 14:** DKH' de Dvl1, Dvl2 ve Dvl3 Genlerinin İfade Analizi. K (siyah), UvK (pembe) ve Uv+B'deki (yeşil) mRNA Seviyeleri, Kontrol (K=1) Göre Kıyaslandı. Kat Değişimi ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) Olarak İfade Edildi.

RT-qPCR sonuçlarının analizlerine göre UvK grubunda Dvl1 geni ifadesi K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda artarken Dvl2 ifadesinin azaldığı gözlemlendi. Uv+B grubunda DKH'ler, UvK ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0,05$ ) şekilde düşük Dvl1 seviyeleri sergiledi. Dvl3 ise Dvl1'in aksine kök hücrede Uv+B grubunda UvK grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış gösterdi. Kök hücrelerde Dvl2 ifadesinde UvK ve Uv+B grupları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi.

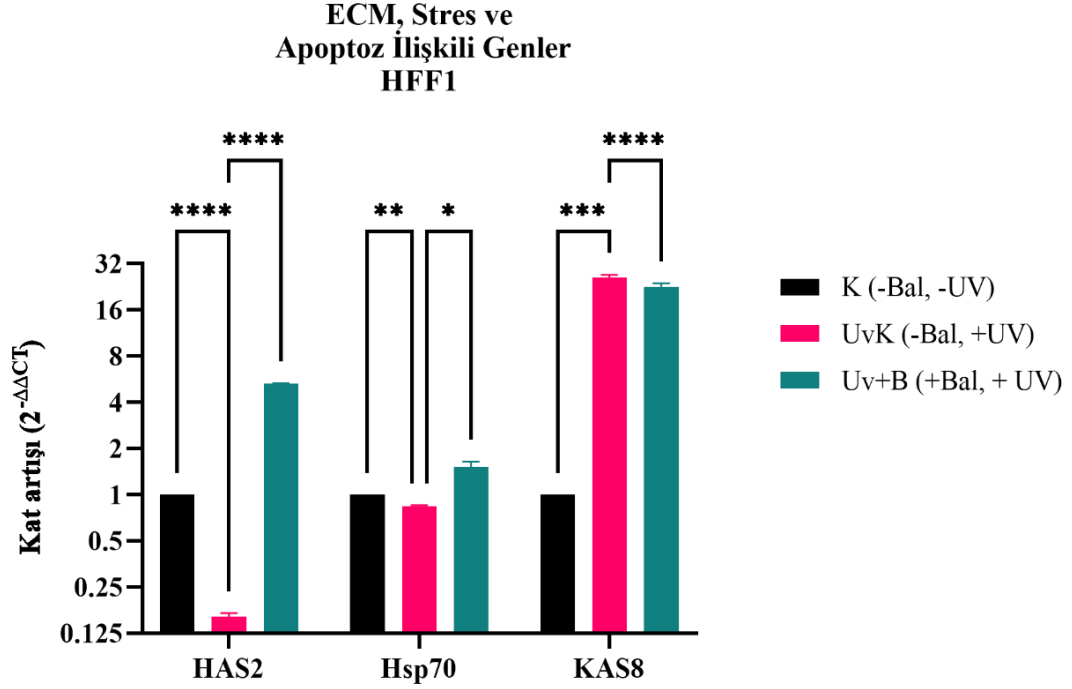
### Yıkım Kompleksi Genleri DKH



**Şekil 15:** DKH' de Axin1, Axin2, APC ve GSK3β Genlerinin İfade Analizi. K (siyah), UvK (pembe) ve Uv+B'deki (yeşil) mRNA Seviyeleri, Kontrol (K=1) Göre Kıyaslandı. Kat Değişimi ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) Olarak İfade Edildi.

RT-qPCR sonuçlarının analizlerine göre DKH'lerde Uv+B grubunda Axin1 ifadesinde UvK grubuna göre anlamlı bir düşüş gözlemlendi, benzer bir düşüş GSK3β ifadesinde görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi. Axin2 ve APC ifadelerinin ise UvK grubuna kıyasla Uv+B grubunda anlamlı derecede arttığı gözlemlendi. Axin ve GSK3β ifadesi UvK grubunda anlamlı derecede artarken APC ifadesi baskılandı.

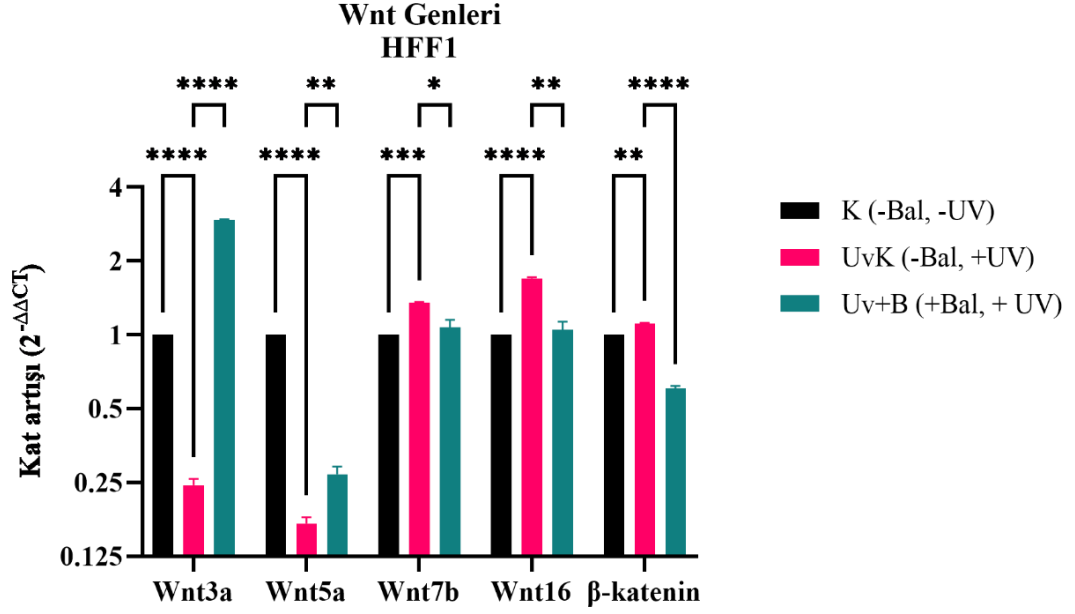
#### 4.3.3. HFF1 Hücrelerinde Hücre Dışı Matriks, Stres ve Apoptoz İlişkili Genlerin İfade Analizi Sonuçları



**Şekil 16:** HFF1’ de HAS2, Hsp70 ve KAS8 Genlerinin İfade Analizi. K (siyah), UvK (pembe) ve Uv+B’deki (yeşil) mRNA Seviyeleri, Kontrol (K=1) Göre Kıyaslandı. Kat Değişimi ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) Olarak İfade Edildi

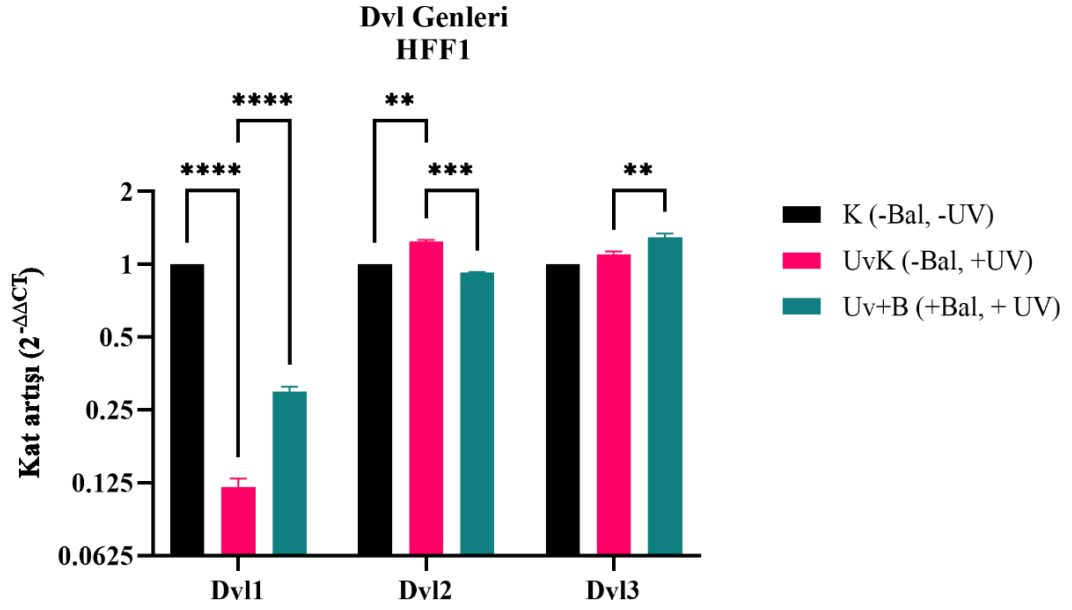
RT-qPCR sonuçlarının analizlerine göre HAS2 ve Hsp70 genlerinin ifadesi K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda baskılandı. Buna karşın HAS2 ve Hsp70 genlerinin ifadesi UvK grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde ( $p < 0,005$ ) Uv+B grubunda artmıştır. KAS8 ifadesi UvK grubunda K grubuna göre anlamlı oranda daha fazla ifade edilirken, Uv+B grubunda UvK grubuna göre anlamlı bir şekilde düşüş gözlemlendi.

#### 4.3.4. HFF1 Hücrelerinde Wnt Sinyal İleti Yolağı Genlerinin İfade Analizi Sonuçları



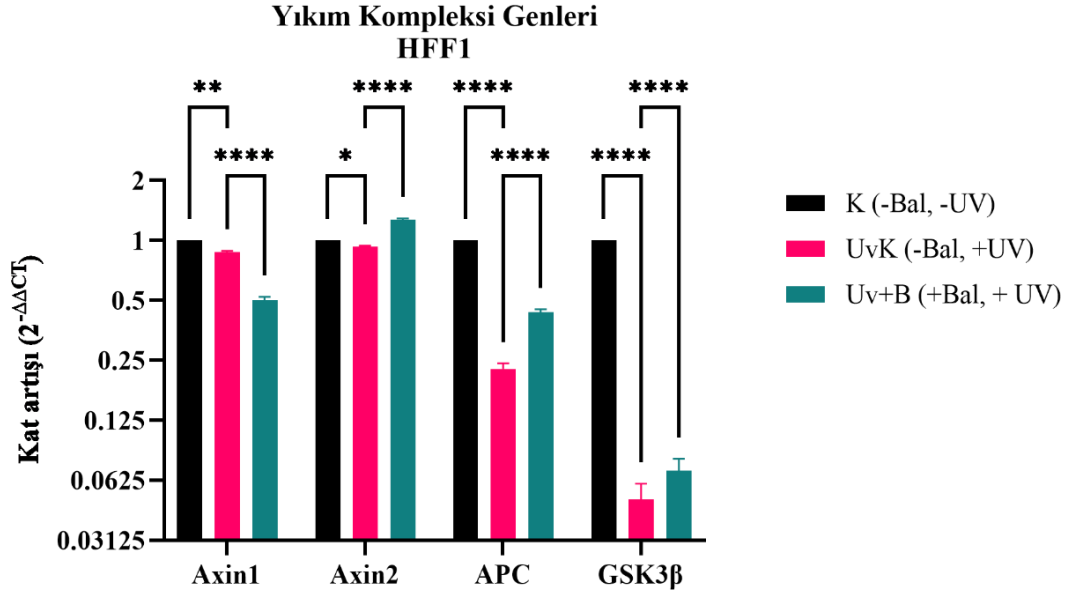
**Şekil 17:** HFF1’ de Wnt3a, Wnt5a, Wnt7b, Wnt16 ve β-katenin Genlerinin İfade Analizi. K (siyah), UvK (pembe) ve Uv+B’deki (yeşil) mRNA Seviyeleri, Kontrole (K=1) Göre Kıyaslandı. Kat Değişimi ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) Olarak İfade Edildi.

RT-qPCR sonuçlarının analizlerine göre HFF1 hücresinde Uv+B grubunda UvK grubuna göre Wnt3a ve Wnt5a ifadesi anlamlı bir şekilde artarken, Wnt7b, Wnt16 ve β-katenin ifadelerinde azalma gözlenmiştir. β-katenin, Wnt7b ve Wnt16 UvK grubunda K grubuna göre anlamlı derecede artarken Wnt3a ve Wnt5a ifadesi baskılandı.



**Şekil 18:** HFF1' de Dvl1, Dvl2 ve Dvl3 Genlerinin İfade Analizi. K (siyah), UvK (pembe) ve Uv+B'deki (yeşil) mRNA Seviyeleri, Kontrole (K=1) Göre Kıyaslandı. Kat Değişimi ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) Olarak İfade Edildi.

RT-qPCR sonuçlarının analizlerine göre HFF1 hücresinde Dvl1 ifadesi UvK grubunda K grubuna göre anlamlı derecede azalırken, Dvl2 ifadesi arttı. Uv+B grubunda UvK grubuna göre Dvl1 ve Dvl3 ifadesi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artarken aksine Dvl2 ifadesi ise anlamlı bir şekilde azaldı.



**Şekil 19:** HFF1’ de Axin1, Axin2, APC, GSK3β Genlerinin İfade Analizi HFF1’ de Axin1, Axin2, APC, GSK3β Genlerinin İfade Analizi. K (siyah), UvK (pembe) ve Uv+B’deki (yeşil) mRNA Seviyeleri, Kontrole (K=1) Göre Kıyaslandı. Kat Değişimi ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) Olarak İfade Edildi.

RT-qPCR sonuçlarının analizlerine göre UvK grubunda K grubuna göre yıkım kompleksi genlerinin ifadesi anlamlı derecede azaldı. Uv+B grubunda UvK grubuna göre Axin2, APC ve GSK3β ifadeleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış sergiledi. Axin1 ifadesi ise diğer genlerin aksine UvK grubuna göre Uv+B grubunda azaldı.



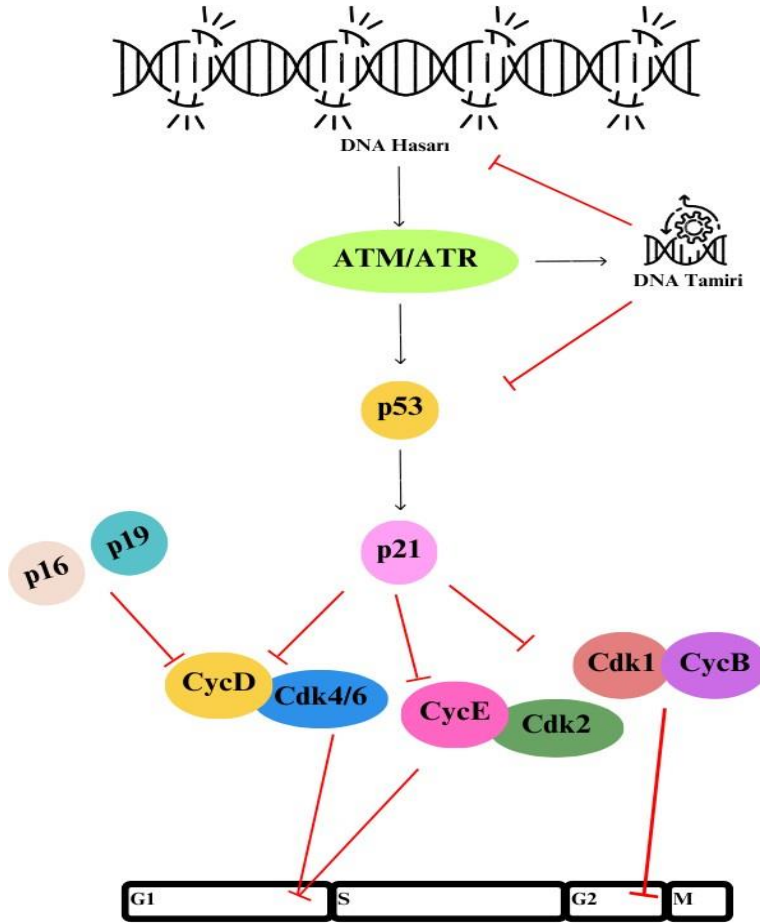
## 5. TARTIŞMA

Deri insan vücudundaki en büyük organdır. Etkili bir şekilde çalışmak ve vücudu korumak için deri kendini düzenli olarak onarır. Çeşitli çevresel stres faktörleri deri hücrelerinin DNA' sına zarar verir. Bu durumlarda epidermisteki epidermal kök hücreler ve dermisteki mezenkimal kök hücreler deri stabilitesini korurlar. Derideki azalan kök hücre sayısı ve işlevi, erken yaşlanma ve kanser gibi deri homeostazisi sorunlarıyla bağlantılıdır. UV, kök hücrelerde DNA hasarına neden olan birincil faktördür. Bu hasar, kök hücrelerin azalmasına ve buldukları çevreye zarar vermesine neden olabilir ve sonuçta foton kaynaklı deri yaşlanmasına yol açabilir (68). UV kaynaklı deri yaşlanması, kök hücre niş hasarı ile embriyonik ve mezenkimal kök hücre kaybından oluşabilmektedir.

Günümüzde başta deri kanseri riski olmak üzere, UV kaynaklı deri fotohasarının önlenmesi için polifenoller de dahil olmak üzere doğal moleküllerin kullanımına ilgi artmıştır. Polifenollerce zengin içeriğe sahip bal, binlerce yıldır tıbbi olarak kullanılmaktadır. Birçok faydalı amino ve organik asit, vitamin, mineral ve antioksidanlara ek olarak bal, başta glikoz ve fruktoz olmak üzere invert şekerlerin konsantre sulu bir çözeltisidir. Yüksek oranda fenolik asitler (kafeik asit, gallik asit), flavonoidler (apigenin, kersetin, galangin, kaempferol, pinocembrin, akasetin) ve kafeik asit, fenetil ester ve karotenoidler içerir (69). Anti-inflamatuar, immünomodülatör ve antioksidan özelliklere sahip olan polifenoller, genel olarak çeşitli deri bozuklukları için ideal kemopreventif ajanlar olarak kullanılabilen en umut verici bileşik grupları arasında yer almaktadır (70). Bu çalışmada balın dinamik hücre kültürü deri modelinde DKH'ndeki UV hasar kaynaklı yaşlanmaya karşı koruyucu etkisinin araştırılması amaçlandı. Deri homeostazının, farklı yerleşik hücre popülasyonları arasındaki çapraz etkileşimlerle düzenlendiği bilindiğinden bu tez çalışmasında biyoreaktör (Live Flow 2) kullanılarak, hücreler arası iletişime olanak sağlayacak *in vivo* gözlemlenene benzer bir mikro ortam oluşturuldu. Böylece sistem, *in vivo* etkileri taklit ettiğinden dolayı, ilaçların ve aktif moleküllerin dokudaki tüm hücre popülasyonuna simultane olarak uygulanmasının etkilerini incelemek için uygun hale getirildi.

Balın, DKH'lerinde UV hasar kaynaklı yaşlanmaya karşı koruyucu etkisini araştırmak için ilk olarak kök hücre ilişkili genlerin ve hücre döngüsü genlerinin ifade değişimleri incelendi. DNA hasarı, genetik bilginin bütünlüğünü tehdit ettiğinden memeli hücreleri, genomik stabiliteyi yeniden sağlamak amacıyla DNA hasarını tespit etmek ve onarmak için karmaşık bir sinyal ağını kullanır. Yaşlanan hücreler, özellikle ATR (Ataksi Telanjiektazi ve Rad3 ile ilişkili protein) ve ATM' yi (Ataksi Telanjiektazi Mutant kinaz) içeren DNA hasarı tepkisinin kalıcı aktivasyonunu sergiler. Bu aktivasyon, hücre döngüsünün durmasına ve p53/p21 ve p16/pRb yollarının aktivasyonu yoluyla yaşlanmanın başlamasına yol açar (71). Bu proteinler, hücrelerin G1 fazından S fazına ilerlemesinin kontrol edilmesine yardımcı olan G1/S hücre döngüsü kontrol noktasının önemli düzenleyicileridir. P53 stabil hale geldiğinde, p21' in transkripsiyonunu tetikler ve bu da CDK4/6-siklin D (siklin-bağımlı Kinaz 4/6) ve CDK2-siklin E komplekslerinin p21 tarafından baskılanmasına yol açar (Şekil 20). Yaşlanmaya neden olan faktörlere maruz kaldığında p16 seviyeleri artarak CDK4/6-siklin D komplekslerinin aktivitesini engeller. p53' ün stres kaynaklı stabilizasyonu sonucunda artan p21 ifadesi G2/M hücre döngüsünün durdurulmasını destekleyebilir (72). Lopez ve arkadaşları UV ışınlaması üzerine MKH' lerde ve fibroblastlarda p53 stabilizasyonunu ve p21 ifadesinin arttığını gözlemlemişlerdir (73). Bu bağlamda tez çalışmamda yalnızca UV' ye maruz kalan hücrelerle karşılaştırıldığında (UvK), bal ile ön işleme tabi tutulmuş ve daha sonra UV stresine (Uv+B) maruz bırakılmış kök hücrelerde, p16, p21, p53 hücre döngüsü genlerinin ifadesinin azaldığı gözlemlendi. Agric ve arkadaşları balda doğal olarak bulunan bir flavonoid olan krisinin UV tarafından tetiklenen ve her iki kontrol noktasının (G1/S ve G2/M) indüksiyonunda rol oynayan p38 aktivasyonunu düşük derecede inhibe edebildiğini ve bunun yanında UV tarafından indüklenen apoptozu, ROS üretimini ve siklooksijenaz 2 (COX-2) ifadesini zayıflatabildiğini bildirmişlerdir (74). 2020 yılında Karapetsas ve arkadaşları yeniden yapılandırılmış bir insan derisi dokusu modeli kullanılarak yaptıkları bir çalışmada balın, UV' nin neden olduğu şiddetli foto-hasarlara karşı koruma sağladığı ve UV' nin neden olduğu MMP (Matriks Metalloproteinaz) ifadesinin artışını zayıflattığını bildirmişlerdir (69). Güçlü anti-oksidan ve anti-inflamatuar özelliklere sahip olduğu bilinen Tualang balı ile yapılan bir diğer çalışmada, Tualang balının foto-karsinogenin DNA hasarı gibi erken biyobelirteçlerini modüle ederek UV radyasyonunun olumsuz etkilerinden önemli ölçüde koruma sağladığını tespit etmişlerdir (75). Tualang balı uygulamasının deri

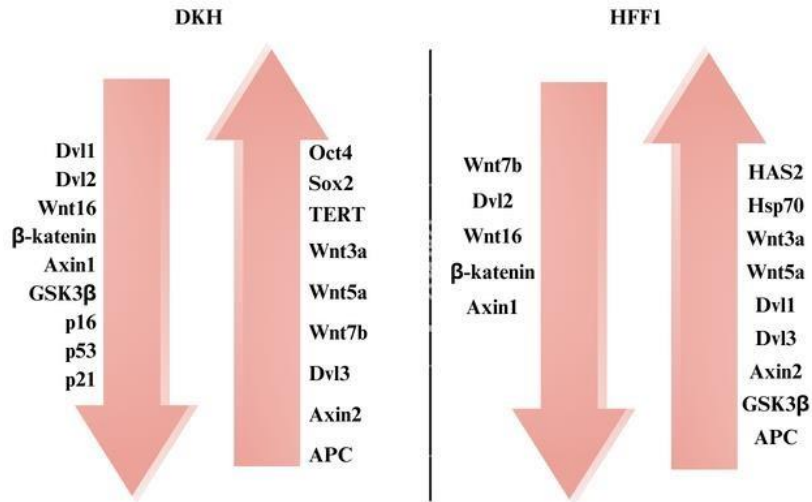
hücrelerinde UV kaynaklı DNA hasarını inhibe ettiği, UV aracılı çeşitli DNA hasarlarının onarımını arttırdığı ve G1/S fazında önemli olan siklin E ifadesini inhibe edebilen (76) p65'i baskılayabildiği gösterilmiştir (75). Literatür incelendiğinde doğal moleküllerin UV hasara karşı oluşan DNA hasarına ve dolayısıyla yaşlanmaya karşı çeşitli yollarla koruyucu etki gösterdiği görülmektedir. Analiz sonuçlarımıza göre %1 bal çözeltisi ile 48 saat inkübe edilen hücrelerin, UvK grubuna göre, UV hasar kaynaklı hücre döngüsü genlerinin önemli ölçüde azalmasını sağladığı ve yaşlanmaya karşı koruyucu bir etkisinin olduğu gözlenmektedir.



**Şekil 20:** DNA Hasarında p53/p21/p19/p16 Tümör Baskılayıcı Genlerinin Hücre Döngüsü Kontrol Noktalarının Düzenlenmesi (Canva Kullanılarak Çizilmiştir).

DKH'ler, kendilerini yenileyebilme yetenekleri ve çeşitli deri hücrelerine dönüşebilme kapasiteleriyle bilinir. Bu hücreler, pluripotensi adını verdiğimiz çok yönlülük yeteneklerini Oct4, Sox2, Bmi1 ve TERT genlerin ifadelerindeki değişimlerle korurlar. Bu genlerin azalan ifadesi, kök hücrelerin farklılaşmasını ve pluripotens özelliklerinin kaybını tetikleyebilir (77). Verilere göre DKH'lerde Uv+B grubunda Oct4 ve Sox2 ifadeleri UvK grubuna göre anlamlı oranda daha fazla ifade

edildi. Kök hücrede DNA hasarına karşı Oct4 cevabını inceleyen bir çalışmada; UV maruziyeti sonrasında Oct4 protein seviyelerindeki değişim floresan işaretleme metodu ile ölçülmüştür. Araştırmada Oct4' ün UV' den zarar görmüş bölgelerde ışınlanmadan hemen sonra adenosin trifosfata bağımlı bir şekilde biriktiği ve beraberinde H3K9 deasetilasyonu ve H2AX fosforilasyonu tespit edilmiştir (78). Burada önemli nokta Oct4' ün UV-hasarlı kromatinde birikmesinin, DNA onarımında kritik rolleri olan H3K9 deasetilasyonuna neden olduğu böylece hasarlı DNA bölgelerinde transkripsiyonu baskılayabildiği ve aynı zamanda transkripsiyonun DNA onarım sürecine müdahale etmesini engelleyebildiği bildirilmiştir (79,80). Sonuç olarak, ışınlanmadan sonra gözlenen bu durum Oct4' ün UV ile hasar görmüş kromatini tanıma yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir. Analiz sonuçlarına göre DKH'ların 48 saat %1 bal çözeltisi uygulanan grubunun (Uv+B), UvK grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek Oct4 ve Sox2 ifadesi sergilediği gözlenmiştir (Şekil 21). Dolayısıyla balın UV hasarından kaynaklanabilecek DNA hasarı durumunda DKH'nin genomik kararlılığı ve farklılaşma potansiyeli üzerinde koruyucu etkisi olabileceği görülmektedir. DNA hasarının tamir edilememesi durumunda hücre p53' ün indüklediği hücre döngüsü durması yoluyla hücre yaşlanmasına veya apoptoza sürüklenir (80). Bu durumda bal uygulamasının, kök hücrelerde UV hasar sonrasında kök hücre belirteçlerinin ifadesini önemli oranda arttırırken aynı zamanda hücre döngüsü genlerinin ifadesini azalttığı görülmektedir.



**Şekil 21:** DKH ve HFF1 Hücrelerinde, UvK Grubuna Göre Uv+B Gruplarında Artış veya Azalış Gösteren Genlerin Şematik Gösterimi (Canva Kullanılarak Çizilmiştir)

Bmi1, kısmen hücresel yaşlanmayı ve hücre ölümünü indükleyen genleri baskıladığından dokulardaki yetişkin kök hücrelerin korunması için gerekli olmakla birlikte lenfoma, akciğer ve meme kanseri gibi bazı kanser türlerinde de kötü prognoz ile ilişkili bir gen dir (81). Bmi1 ifadesi p16 ve p19 ifadelerini baskılayarak hücreyi yaşlanma ve apoptoza karşı korur (81). Sağlıklı bir hücre açısından Bmi1 geni ifadesi replikatif kapasiteyi arttırıp bazı hücrelerde TERT aktivitesini arttırması açısından faydalı görünse de hasar alan bir hücredeki bu etkilerinin onkogenik fonksiyonlara yol açabildiği bilinmektedir. Bmi1 DNA hasarı durumunda farklı etkiler gösterebilmektedir (82). Bmi1, DNA onarımı sırasında bölgedeki transkripsiyonun baskılanmasına katkıda bulunarak onarım sürecini desteklerken, aynı zamanda ATM aktivasyonunu azaltarak hasar durumunda hücre kontrol noktası genlerinin aktivasyonunu azaltır. Buna bağlı olarak, DNA lezyonlarının varlığında hücre proliferasyonunu güçlendirir, bu da genomik istikrarsızlığa ve tümör ilerlemesine katkıda bulunabilir (82). Dolayısıyla hasarlı hücredeki ifadesinin sonuçları karmaşık olabilmektedir. Analiz sonuçlarına bakıldığında UvK grubunda Bmi1 ifadesinin Uv+B grubuna göre yüksek olduğu görülmektedir. Her iki grupta da artan Bmi1 ifadesi DNA hasarına verilen tepki olarak beklenen bir sonuçtur. Ancak Bmi1 ifadesinin UvK grubundaki önemli artışı, UV hasarı sonrası hücrelerde genomik bir kararsızlığın ve istenmeyen bir proliferasyon aktivasyonunun habercisi olabilir.

TERT, telomerlerin korunması ve kök hücrelerin uzun süreli hayatta kalabilmesi açısından önemli bir rol oynar. Telomeraz aktivitesi, UV radyasyonu veya mekanik yaralanma nedeniyle insan cildinde belirgin şekilde artar ve bu artış ağırlıklı olarak hasar sonucu aktive edilen kök hücrelerde meydana gelir (83). Analiz sonuçları incelendiğinde Uv+B grubundaki TERT ifadesi, UvK grubuna göre anlamlı derecede artmıştır. Dolayısıyla bal uygulamasının hasar sonucu uyarılan kök hücrelerin kapasitelerini koruyabileceği ve deri homeostazına katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

Tez kapsamında balın DKH'lerinde UV hasarına karşı koruyucu etkisini araştırırken, mikroçevresinde bulunan fibroblast hücrelerindeki HDM, stres ve apoptoz ilişkili genlerinde ifade değişimlerini değerlendirdik. Bilindiği üzere hücreler stres etkenlerine maruz kaldığında, bu etkenlere karşı savunma sağlamak üzere bir takım stres proteinleri (ısı şok proteinleri) aktive olmaktadır. Isı şok proteinleri (HSP) stres proteinleridir ve özellikle Hsp70' in ifadesinin hücresel düzeyde artması, reaktif

oksijen türleri de dahil olmak üzere stres etkenlerinin neden olduğu denatüre proteinleri yeniden katlayarak veya parçalayarak hücrelerin hasara direnmesine yardımcı olur (84). Hsp70'in UV hasarına karşı hücredeki rolü, doğrudan UV hasarının onarılmasına katkıda bulunması ve hücrenin sağkalımını desteklemesiyle ilişkilidir (85). Bu protein, hasar görmüş proteinleri düzeltebilir veya zararlı proteinlerin hücre içindeki yıkımını tetikleyebilir. Bu şekilde, hücre UV hasarı sonrasında sağlıklı bir duruma dönebilir. Hsp70 ifadesini indüklemenin farelerde UV kaynaklı kırışıklık oluşumu üzerindeki etkisini araştıran bir çalışmada, Hsp70'in UV radyasyonu sonucunda aktive olabilen ve kırışıklık oluşumunda önemli rol oynayan MMPler ve elastazların aktivasyonunu inhibe edebilen, böylece HDM 'nin dejenerasyonunu önleyebilen ve kırışıklık oluşumunu azaltabilen sitoprotektif ve anti-inflamatuar aktivitelere sahip olduğu gözlenmiştir (85). Ek olarak çalışma, Hsp70 ifadesinin, makrofajların ve nötrofillerin cilde UV kaynaklı infiltrasyonunu inhibe ederek MMP-9 aktivitesini baskıladığını bildirmişlerdir (85). Farklı bir çalışmada Hsp70 susturulmuş farelerin UV kaynaklı epidermal ve dermal hasara karşı duyarlı bir fenotipi rapor edilmiştir (84). Dolayısıyla deri hücrelerindeki Hsp70 ifadesinin stabilitesi, deri sağlığının korunmasında önemli bir faktördür. Analiz sonuçlarında Hsp70 ifadesi Uv+B grubunda, UvK grubuna göre anlamlı bir artış sergiledi. Bu sonuçlar, balın UV radyasyonuna maruz kalan deri fibroblastlarındaki (HFF1) Hsp70 ifadesinde foto-yaşlanmayı geciktirme potansiyeli açısından önemlidir.

Hücre dışı matriks dermisin yaşlanma sürecinde modifiye olur. UV hasarı olan hücrelerde kolajen yeniden şekillenmesi indüklendiğinden deri kök hücre ve fibroblast davranışı değişmektedir. Hyalüronik asit (HA) sentezinin, MMP-1 ifadesini inhibe ederek, tip I kolajen birikimini ve özellikle epidermis ve dermis hücre-matriks etkileşimlerinde hem yapısal destek hem de spesifik bir sinyalleme nişi olarak görev yapan dermal-epidermal bağlantı proteinlerinin ifadesini artırarak *in vitro* deri yaşlanmasını önleyici etkiler sergilediği gösterilmiştir (86). Hyalüronan sentetaz 2 matriks üretiminde görev alır ve fibroblastlarda HAS2 geni tarafından eksprese edilir. HAS2' nin artan ifadesi aynı zamanda HA ifadesinin artışı olarak yorumlanabilir (87). Analiz sonuçlarımıza göre fibroblastlarda Uv+B grubunda UvK grubuna göre HAS2 ifadesi anlamlı derecede arttı. Dolayısıyla Uv+B grubundaki HAS2 ifadesinin artışına istinaden balın, hyalürinan üretimini artırması, fibroblastlarda genç bir deri fenotipinin korunması, hücre döngüsünün ilerlemesi ve hücre yenilenmesine katkıda

bulunabileceği söylenebilir. Zhang ve arkadaşlarının HA 'nın fonksiyonlarını incelemek için yaptıkları bir çalışmada HAS2 genini aşırı eksprese eden transgenik bir fare üreterek yaşlanma üzerindeki etkilerini incelemişler, bu transgenik – HAS2 geni taşıyan farelerin hem doğal hem de kimyasal olarak indüklenen kanserlere karşı daha az duyarlılık gösterdiklerini ortaya koymuşlardır. Ayrıca, bu farelerde bağışıklık hücrelerinin doğrudan immün düzenleyici etkisi gözlenmiş, oksidatif stres karşısında koruyucu bir etki sergilenmiş ve yaşlanma sürecinde epigenetik yaşları, kronolojik yaşlarından daha genç kalmıştır (88). Ek olarak HA apoptozun ve hücrenin strese verdiği yanıtın düzenlenmesi açısından da önemlidir (66). Analiz sonuçlarında bal uygulanan Uv+B grubunda UvK grubuna göre apoptozun başlatılmasında önemli rol oynayan KAS8 ifadesi anlamlı derecede azalmıştır.

Farklı botanik kökenli beş çeşit balın antioksidan aktivitesi ve hidrojen peroksit kaynaklı DNA hasarına karşı koruyucu etkisini araştıran bir çalışmada baldaki fenolik asitlerin lenfositlere nüfuz edebildiği ve demir iyonlarını şelatlayarak DNA' yı oksidatif hasardan koruyabildiği sonucuna varılmıştır (89). Ayrıca baldaki bileşiklerin antimutajenik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir, bu nedenle bal önemli antikanser potansiyele sahiptir (90). Alleva ve arkadaşları, çeşitli bitkisel organik kaynaktan elde edilen bal ekstraktlarının pestisitlere kronik olarak maruz kalan bir yerleşim popülasyonunda DNA onarım aktivitesini arttırdığını ve pestisit kaynaklı DNA lezyonlarında belirgin bir azalmanın gözlemlendiğini tespit etmişlerdir (91). Dünya' nın en büyük Mangrov ormanı olan Sundarban bölgesinden toplanan Sundarban balının hidrojen peroksit ve UV' nin neden olduğu pBR322 (plazmit DNA) hasarına karşı koruyucu etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (92). Çeşitli ballar ile yapılan benzer bir çalışma farklı bal türleri arasında antioksidan içerikleri ve aktivitelerinin yanı sıra DNA hasarına karşı koruyucu etkileri açısından da önemli farklılıklar olduğunu göstermiştir (93). Çalışmaya göre; kurak bölgelerden elde edilen balın, kurak olmayan bölgelerden değerlendirilen bal türleriyle karşılaştırıldığında daha yüksek miktarlarda fenolik bileşik içeriğine sahip olduğu ve daha yüksek serbest radikal temizleme potansiyeli sergilediği veya DNA hasarına karşı daha etkili koruma sağladığı tespit edilmiştir (93). Prasetyo ve arkadaşları balın, endojen kök hücrelerin uyarılması yoluyla protein enerji yetersizliğinden kaynaklanan karaciğer dokusundaki hasarı onarabildiğini göstermişlerdir (94). Balın tedavi edici özelliğinin vurgulandığı bir diğer çalışmada ise dişi sıçan modelinde, yetersiz beslenmeye bağlı yumurtalık

yetmezliği için orman balının 10 gün boyunca uygulanmasının; antioksidan enzim aktivitesinde artışa, IL-13 gibi anti-inflamatuar sitokin ifadesinde artışa, pro-inflamatuar sitokinlerden biri olan TNF $\alpha$ 'nın ifadesinde ve oksidatif stres seviyelerinde azalmaya yol açtığı, ayrıca büyüyen folikül sayısında artışa neden olduğu ve yumurtalık dokusunun yenilenmesinde etkili olabileceği belirtilmiştir (95). Tan ve arkadaşlarının Tualang Balı ile yaptıkları araştırmaya göre, bal insan kornea epitel öncül hücre göçünü ve *in vitro* oksidatif strese karşı hücre sel direnci iyileştirmiştir (96). Bal içeren matrislerin MKH yaşlanmasını azaltmak için kullanılıp kullanılmayacağını araştıran bir çalışmada, bal içeren polivinil alkol (PVA) ile elektrospinleme yöntemi kullanılarak matrisler hazırlanmıştır. Araştırma sonucunda standart koşullar altında balla harmanlanmış PVA matrisi üzerinde kültürlenmiş MKH'lerin ROS yükünün azaldığı ve ROS yükü azaldıkça yaşlanan hücrelerin oranının da azaldığı gösterilmiştir (64). Das ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışma balın kök hücrenin replikatif yaşlanması üzerindeki etkisinin incelenmesi açısından önemlidir. Süreç içerisinde yaşla beraber veya çeşitli dış etkenlerden kaynaklanan yaşlanma sürecinde, dokudaki kök hücrelerinin sayısal ve yapısal olarak korunması önemlidir. Bunun yanında kök hücreler rejeneratif tıpta ilgi çekici bir adaydır. Dolayısıyla tedavi amaçlı uygulanacak kök hücrelerin, *in vitro* koşullarda pasajlama esnasında oluşan replikatif yaşlanmasının da azaltılması ve farklılaşma potansiyellerinin korunması rejeneratif tıp uygulamalarından alınacak verim açısından önemlidir ve bal, koruyucu stratejiler geliştirilmesi açısından faydalı bir bileşendir.

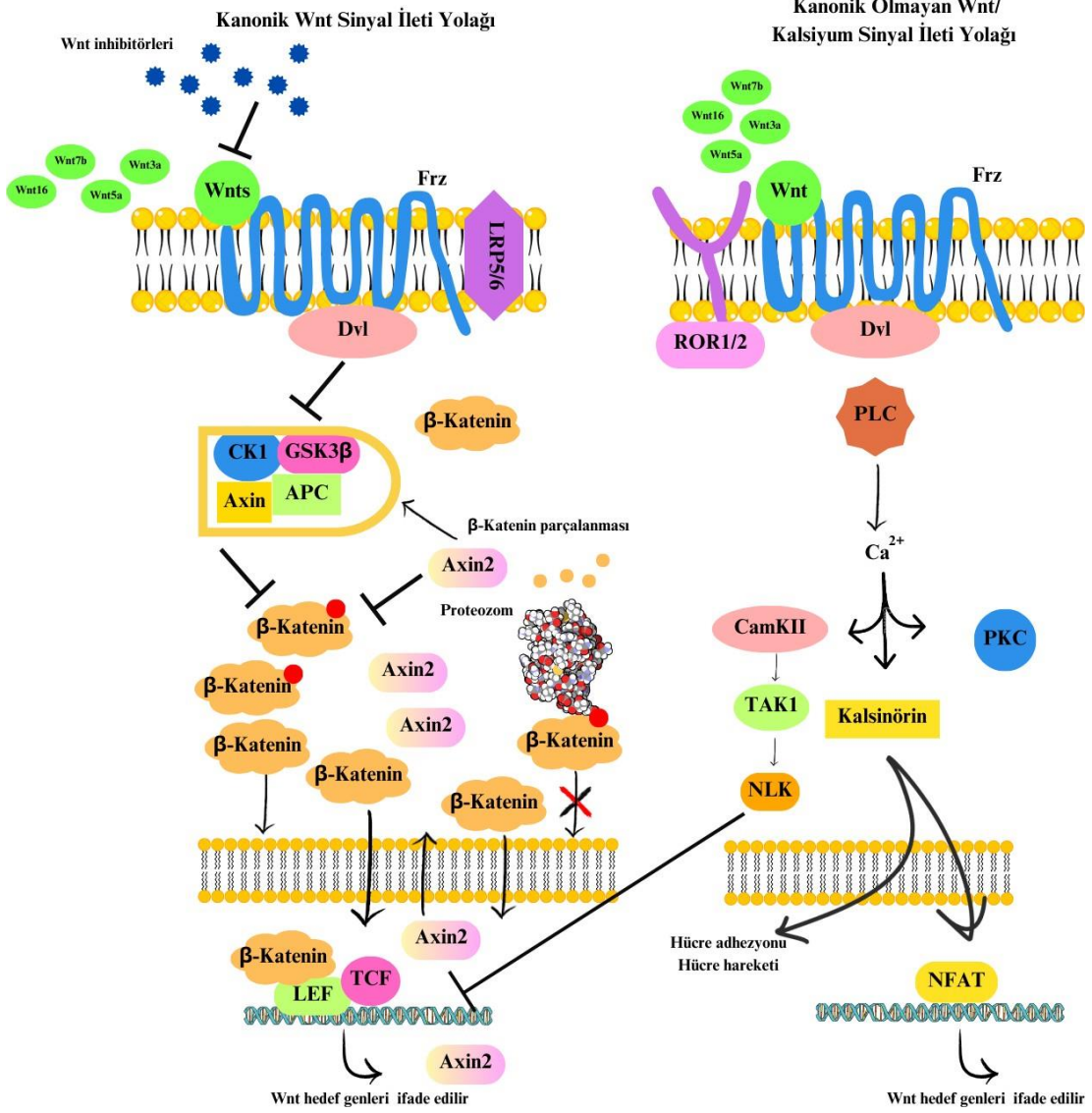
Wnt sinyal ileti yolağında rol alan Wnt proteinleri, hücrelerden salınan ve diğer hücrelerin yüzeyindeki reseptörlere bağlanan sinyal molekülleridir. Bu proteinler gelişimde kritik bir rol oynarlar ve ortaya çıkan kanıtlar, yaşlanma süreciyle bağlantılı kök ve öncül hücrelerin özelliklerini de etkileyebileceklerini göstermiştir. Wnt sinyal iletiminin kök hücrelerin kendi kendini yenileme ve soya bağlı öncül hücreleri üretmeye yönelik süreçlerde rol oynadığı bilinmektedir (97). Kök hücrelerde önemli bir pluripotenslik faktörü olan Oct4'ün, kendini yenileyen embriyonik kök hücrelerde Wnt/ $\beta$ -katenin sinyalini işlevsel olarak baskılayabildiği bildirilmiştir (98,99). Lim ve arkadaşları Axin2 ekspres eden DKH'lerin, parakrin olarak Wnt inhibitörlerini aktive edebildiğini göstermişlerdir(100). Bu, kök hücrelerin otonom Wnt sinyalleme yoluyla kendini yenilemesi için bir mekanizma sağlar ve bu süreç, Wnt sinyallerinin farklılaşma ve kendini yenileme arasındaki dengeyi sağlamasıyla kontrol edilir. Lim



ve arkadaşlarının yine DKH çeşidi ve inaktif bulunan Saç folikülü kök hücreleri (HFSC) ile yaptıkları bir çalışmada HFSC'lerin kendi kendini yenileyen Wnt sinyallerini ve kök hücre bölünmesinin dışında farklılaşmayı destekleyen inhibitörlerini salgıladıklarını göstermiş ve daha önceki çalışmalarından farklı olarak Wnt inhibisyonunun farklılaşmayı güçlendirdiğini bildirmişlerdir (101). Wnt sinyali, kendini yenileme ve terminal farklılaşma arasındaki dengeyi koruyarak kök hücre biyolojisinin düzenlenmesinde kritik roller oynar (102). Wnt'in MKH proliferasyonu ve kendini yenileme üzerindeki etkisi de doza bağlı olabilmektedir, düşük Wnt aktivasyonunun MKH proliferasyonunu arttırdığı tespit edilirken, yüksek Wnt aktivasyonu varlığında MKH proliferasyonunun azaldığı tespit edilmiştir (103). Aksine araştırma verileri sunulsa da genel olarak Wnt/ $\beta$  katenin sinyal ileti yolağının kök hücrenin kendi kendini yenilemesi ile birlikte farklılaşmada da baskın rolü olduğu görülmektedir (99). Wnt ligandları ile farklılaşma arasındaki ilişkinin de dikkatli bir şekilde analiz edilmesi gerekmektedir. Örneğin Wnt5a'nın osteojenik farklılaşmaya katkıda bulunduğunu bildiren birçok çalışma olmasına rağmen istisna örnekleri de literatürde mevcuttur.

Deri kök hücrelerinde UV hasarı oluşturulduğunda hücrelerde Wnt sinyal ileti genlerinden Wnt3a, Wnt5a ve Wnt7b ifadelerinin azaldığı gözlenmektedir.  $\beta$ -katenin düzeyi ise hücrenin UV'ye verdiği tepki olarak yükselmiştir. UV hasarlı hücrelerde bal uygulamasının Wnt3a, Wnt5a ve Wnt7b ifadelerini UvK grubuna kıyasla anlamlı derecede arttırdığı görülmektedir. Özellikle Wnt3a geninin ifadesinde ciddi bir artış söz konusudur. Wnt3a kanonik Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal iletiminin önemli oyuncularından biridir. Bal uygulanan DKH hücrelerinde UV hasar sonrası  $\beta$ -katenin düzeyi hücrelerin koruma mekanizması ile azalma eğilimindedir. Bal uygulamasının DKH hücrelerinin UV kaynaklı strese gösterdiği tepkiyi azaltmış olabileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda bal uygulaması yapılan UV hasarlı hücrelerde, Dvl1 ifadesinin azaldığı buna karşılık Dvl3 ifadesinin artış gösterdiği bulunmuştur. Burada Uv+B grubunda Wnt ligandlarının aktivasyonuna rağmen kanonik Wnt sinyal ileti yolağının aktivasyonunun kontrol altında tutulduğu görülmektedir. Literatürden bilindiği üzere Axin2 ifade eden kök hücreler  $\beta$ -katenin'i baskılayarak ya da Wnt inhibitörleri salgılayarak kanonik Wnt sinyal ileti yolağı aktivasyonunun otokontrolünü sağlayabilirler. Uv+B grubundaki yıkım kompleksi genlerinin ifadeleri incelendiğinde Axin2 ifadesinin UvK grubuna göre anlamlı oranda arttığı

görülmektedir. Bu veri Uv+B grubunda Wnt ligandlarının artan ifadesine rağmen  $\beta$ -katenin düzeyinin neden düştüğünü açıklayabilir. Bir diğer olasılık ise bal uygulanan UV hasarlı hücrelerde artan Wnt3a, Wnt5a ve Dvl3 ifadesi  $\beta$ -katenin'den bağımsız nonkanonik yolların aktivasyonunu düşündürmektedir. Wnt ailesinin bazı üyeleri hücre yüzeyinde hangi reseptörlerin mevcut olduğuna bağlı olarak kanonik yol dışındaki sinyal yollarını aktive edebilir (104). Örneğin Wnt5a ve Wnt3a hem kanonik hem de kanonik olmayan Wnt sinyal yollarını aktifleştirebilir (57). Feng ve arkadaşları, MKH'lerde Wnt3a'nın aşırı ekspresyonunun, farklı Wnt3a kaynaklı sonuçlardan sorumlu olan hem kanonik hem de kanonik olmayan Wnt yollarını aktive ettiğini tespit etmişlerdir (105). Çalışmada, Wnt3a;  $\beta$ -katenin aracılı kanonik Wnt yoluyla MKH çoğalmasını teşvik ederken,  $Ca^{+2}$ /CaMKII aracılı kanonik olmayan Wnt yolu ile MKH'lerin kondrojenezini inhibe etmiştir (105). Wnt3a'nın Wnt/ PCP sinyal ileti yolağında rol oynayan RhoA ve ROCK'ı aktive edebildiği bildirilmiştir (106). Wnt3a'nın pleiotropik fonksiyonları Sha ve arkadaşları tarafından da bildirilmiştir (107). Nemeth ve arkadaşları, kanonik olmayan Wnt5a'nın, hematopoetik kök hücrelerde (HKH) Wnt3a aracılı kanonik Wnt sinyalini inhibe ettiğini ve kök hücrenin farklılaşması ile ilişkili genleri inaktive ederek HKH'lerin fonksiyonlarını koruduğunu bildirmişlerdir (104). Görüldüğü üzere Wnt3a ile aktive edilmiş kanonik ve kanonik olmayan yollar, MKH farklılaşmasının ve pluripotensisinin düzenlenmesinde birbirine karşı koymaktadır. Dolayısıyla Uv+B verilerine bakıldığında UvK grubuna göre Wnt3a ve Wnt5a ifadelerindeki değişimin Wnt/ $\beta$ -katenin yolundan bağımsız olarak non-kanonik yolak üzerinden de rol oynayabileceği öngörülmektedir. Wnt5a'nın Wnt/ $\beta$ -katenin yolağını birden fazla sistemde kanonik olmayan mekanizmalarla olumsuz etkilediği de bildirilmiştir. Wnt5a tarafından aktive edilen Wnt5a/ $Ca^{+2}$  yolağının  $\beta$ -katenin yolağını antagonize edebildiği ve Wnt5a'nın, TCF/LEF transkripsiyon faktörlerini fosforile edebilen, DNA bağlanma yeteneklerine müdahale edebilen ve  $\beta$ -katenin sinyalini baskılayan nonkanonik yolak olan TAK/NLK yolunu da aktive ettiği bildirilmiştir (108) (Şekil 22).



**Şekil 22:** Kanonik ve Kanonik Olmayan Wnt Sinyal İleti Yolağı Etkileşimi (Canva Kullanılarak Çizilmiştir)

Memeli hücreleri Dvl1, Dvl2 ve Dvl3 olmak üzere üç izoformunu değişen seviyelerde eksprese eder (109). Dvl izoformları hem birbirinin kısmen işlevini yaparken hem de farklı işlevsellik sergileyebilirler (110). Yokoyama ve arkadaşları Dvl3' ün Dvl1 ve Dvl2 'ye kıyasla hücresel dağılımı ve nükleer lokalizasyonu açısından farklılık gösterdiğini ve Wnt3a stimülasyonuna yanıt olarak, Dvl3' ün nükleer birikiminin belirgin şekilde arttığını (~3 kat) tespit etmişlerdir. Bu nedenle, Dvl3' ün Wnt sinyal ileti yolunda özel bir rolü olabileceği düşünülmektedir (111). Verilere bakıldığında UvK ve Uv+B grubunda Dvl2 ifadeleri arasında anlamlı bir fark yoktur ancak her iki grupta da ifade baskılanmıştır. Uv+B grubunda Dvl3 ifadesinde

anlamli derecede artiş gözlenmiştir. Yokoyama ve arkadaşlarına göre Dvl3, Dvl1 ve Dvl2'ye göre nükleer lokalizasyonla daha çok ilişkilendirilmiştir. Dolayısıyla farklı bir işlevinin olabileceği vurgulanmıştır. Pruller ve arkadaşları Dvl1 ve Dvl3'ün,  $\beta$ -katenin'den bağımsız olarak insan miyoblastlarında hücre bölünmesinin sürdürülmesinde hayati bir rol oynadığını keşfetmişlerdir. Ayrıca Dvl1 veya Dvl3 'ün hücre çekirdeğindeki lokalizasyonunun hücrenin düzgün işleyişi açısından kritik öneme sahip olduğunu vurgulamışlardır (112). Nükleer Dvl'ın, gen ifadesini etkilemek için transkripsiyon düzenleyici bölgelerdeki epigenetik enzimlerle etkileşime girebileceği keşfedilmiştir (113). Uv+B grubundaki Dvl1 ve Dvl2'nin ifadesindeki azalma,  $\beta$ -katenin ifadesinin azalmasını desteklerken; Dvl3 ifadesinin artışı, nükleer lokalizasyonu ile ilgili bir mekanizmayla beraber  $\beta$ -katenin' den bağımsız bir proliferasyonun gerçekleşmesi ile ilişkili olabilir.

Wnt sinyal iletim yolağındaki yıkım kompleksi genlerine bakıldığında Axin1'in aksine, Axin2 ifadesinin Uv+B grubunda anlamlı derecede arttığı görülmektedir. Axin1 ve Axin2,  $\beta$ -katenin'in aktivitesini düzenleyen protein ağlarının önemli bileşenleri olmalarına rağmen, proteomik bağlantılarının ve protein etkileşim ağlarının farklılıkları nedeniyle görevlerinde bazı farklılıklar içermektedir. Örneğin, Axin1,  $\beta$ -katenin'in fosforilasyonu ile hücre proteoliz yoluyla düzenlenirken, Axin2  $\beta$ -katenin'i daha hızlı bir şekilde yıkarak düzenlenir. Bu nedenle Axin1 ve Axin2, benzer görevlere sahip olsalar da, farklı stratejilerle  $\beta$ -katenin aktivitesini düzenleyebilirler (114). Wnt sinyal yolağında, Wnt ligandının hangi varyantı veya ne kadar ifade edildiğine bağlı olarak Axin1 ve Axin2 ifadelerinde değişiklikler oluşabilir. Moshkovsky ve arkadaşları Wnt3a varyantının dozajının, hedef genlerin ifadesinde farklı etkiler gösterdiğini tespit etmiştir. Örneğin, bir çalışma, yüksek dozajlarda Wnt3a'nın Axin2 geninin ifadesini artırdığını, ancak Axin1 geninin ifadesinde bir farklılık olmadığını göstermektedir (114). Bu nedenle, hedef genlerin ifadesindeki bu değişiklikler, belirli bir hücre tipi veya doku hedefi için özel bir düzenleme sağlayarak, Wnt sinyal ileti yolağının uyarılmasından kaynaklanan farklı hücre fonksiyonlara yönelik özel bir yanıt oluşturabilir. Kanonik yolağı ilişkili Wnt3a ligandının anlamlı artışına rağmen, Axin2'nin artan ifadesinin, çeşitli Wnt inhibitörleri salgılanmasını uyararak ve/veya  $\beta$ -katenin aktivitesi üzerindeki sınırlayıcı etkisinin ortaya çıkışı gibi çeşitli mekanizmalarla Wnt sinyalini kontrol altında tutabileceği düşünülmektedir.

Kök hücrede UvK grubunda Uv+B grubuna göre yüksek ifade gösteren yaşlılık ilişkili genler ve Uv+B grubuna göre ifadesi düşük olan kök hücre pluripotensi genleri; UvK grubunda Wnt aktivasyonunun kök hücrelerin farklılaşmalarını indükleyebileceğini gösterdiği gibi UvK grubundaki önemli Bmi1 ifadesindeki artışla birlikte değerlendirildiğinde Wnt sinyalinin farklı Wnt ligandları aracılığı ile UV hasarla kontrolsüz proliferasyonunun indüklenmiş olabileceğini de düşündürmektedir. Yamada ve arkadaşları, UV ışınlamasının, bir deri kök hücre çeşidi olan melanosit kök hücrelerinde Wnt/ $\beta$ -katenin sinyalinin aktivasyonunu indükleyebileceğini ve bu aktivasyonun kök hücrelerin epidermal melanositlere farklılaşmasına yol açabileceğini ayrıca Wnt1 yoluyla Wnt sinyal ileti yolağının UV kaynaklı aktivasyonunun hiperpigmentasyona ve anormal melanosit proliferasyonuna yol açabileceğini bildirmişlerdir (115). Bu nedenle, normal kök hücre farklılaşması ve deri rejenarasyonu için Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal ileti yolağının aktivasyonu gerekli olsa da aşırı veya düzensiz aktivasyonun olumsuz sonuçlarının olabileceği de unutulmamalıdır.

Balın, fibroblastlarda UV hasar kaynaklı yaşlanmaya karşı koruyucu etkisini araştırmak için HFF1 hücrelerindeki gen ekspresyon değişikliklerine bakıldığında kök hücrelere benzer şekilde Uv+B grubunda UvK grubuna göre artmış Wnt3a ifadesi gözlenmektedir. Wnt5a ifadesi ise kontrol grubuna göre Uv+B ve UvK gruplarında baskılanmasına rağmen, Uv+B grubunda UvK grubuna göre artış gösterdi. Wnt3a tedavisi hücrel büyüme ve fibronektin ekspresyonunu desteklemektedir. Wnt3a'nın, çeşitli çalışmalarda fibroblast aktivasyonunu indüklediği ve hücrel büyüme, göç ve hücre dışı matris üretimini desteklediği gösterildiği için genel olarak fibroblast aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir (116,117). Ragnoni ve arkadaşları, UV maruziyetinin, hem insan hem de fare derisinde papiller fibroblastların sayısında azalmaya yol açtığını ve bu kaybın en önemli sebebinin öncelikle apoptoz olduğunu bildirmişlerdir (118). UV sonucu artmış papiller fibroblast tükenmesi, nötrofillerin ve T hücresi alt popülasyonlarının infiltrasyonunu tetikler ve bu deride DNA hasarı ve pro-inflamatuar prostaglandinlerle sonuçlanır (118). Çalışmada UV'nin deride Wnt sinyalini güçlü bir şekilde aktive etmesine rağmen, bu epidermal  $\beta$ -katenin stabilizasyonu ile fibroblast çoğalmasının uyarılmasının, papiller dermis onarımını arttırmadığı tespit edilmiştir (118). Kök hücrede olduğu gibi fibroblastlarda da

özellikle kanonik Wnt sinyal ileti yolağının etkisi karmaşıktır. HFF1 hücrelerinde Wnt5a ifadesi UvK ve Uv+B gruplarında kontrole göre baskılandı ancak Uv+B grubunda ifadesi daha iyi korunmuştur. Kök hücrede gördüğümüz sonuçlara benzer şekilde yıkım kompleksinde görev alan Axin2 ifadesi Uv+B grubunda UvK grubuna göre artış gösterirken Axin1 için durum tam tersidir. Burada yine Uv+B grubunda artan Wnt3a ifadesine rağmen UvK grubuna göre daha az  $\beta$ -katenin hatta kontrol grubuna göre baskılanan  $\beta$ -katenin ifadesi gözlemlendi. Daha önce de bahsedildiği gibi buradaki kanonik Wnt ligandının artışına rağmen kontrol altında tutulan  $\beta$ -katenin aktivitesi Axin2'nin Wnt sinyal ileti yolağı üzerindeki otokontrol mekanizmasından kaynaklanıyor olabilir. Uv+B grubundaki KAS8 ifadesi,  $\beta$ -katenin baskılanmasına rağmen UvK grubuna göre daha düşüktür. UvK grubunda Rognoni ve arkadaşlarının öne sürdüğü gibi UV kaynaklı fibroblastların apoptoza girmesi söz konusu olabilir. UvK grubundaki artan KAS8 ifadesi bu olasılığı desteklemektedir. Uv+B grubunda ise KAS8 seviyesindeki azalmanın, Wnt5a'nın, Rho-JNK, PKC ve TAK-NLK gibi kanonik olmayan yolların aktivasyonu gibi çoklu mekanizmalar yoluyla apoptozu önleme mekanizması ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (119). Fibroblastlarda doku yenilenmesinde önemli rol oynayan HAS2 ve Hsp70 ifadesi artmıştır. Fibroblastlarda bal uygulamasının UV kaynaklı uyarılabilen  $\beta$ -katenin aktivitesini kontrol altında tutarken nonkanonik yollar aracılığı ile Wnt aktivasyonunu sağladığı, böylece fibroblast aktivasyonunu tetikleyerek HAS2 ve Hsp70 ifadesi ile UV maruziyetine yanıt olarak fibroblast hücre ölümü üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olabileceği ve potansiyel olarak cildin HDM'sinin bütünlüğünü koruyabileceği söylenebilir. Fibroblastlarda, kök hücrede olduğu gibi Dvl genlerinin ifadelerinde değişkenlik gözlemlendi. Uv+B grubunda Dvl2 ifadesi UvK'ya göre azalırken, Dvl1 ve Dvl3 ifadesinde artış gözlemlenmiştir. Wnt sinyal ileti yolağının negatif düzenleyicileri olan yıkım kompleksi genlerinden APC ve GSK3 $\beta$ , Uv+B grubunda artış göstermiştir. Bu da Uv+B grubunda azalan  $\beta$ -katenin ifadesiyle uyumludur.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma balın, DKH'lerinde UV hasarına karşı potansiyel bir koruyucu etki sergileyebileceğini göstermektedir. Bal uygulaması DKH'lerde UV hasar sonrasında kök hücre ilişkili Oct4 ve Sox2 genlerin ifadelerini arttırdığı gibi p16, p21, p53 gibi hücre döngüsü genlerin ifadelerini azaltmaktadır. Bu durum balın, DKH'lerinde UV hasarını azaltma kapasitesine sahip olabileceğini ve aynı zamanda hücreyi koruyabileceğini işaret edebilir. DKH'lerinin kendi kendine yenileme ve soya bağlı öncül hücreleri üretmesine yönelik Wnt sinyal ileti yollarında yer alan genlerin ifade değişimleri de bal varlığında UV hasarının etkilerinden korumaya yönelik hipotezimizi destekler niteliktedir. DKH'lerinin mikro çevresinde bulunan fibroblast hücrelerinde, balın kanonik Wnt sinyal ileti yolağını baskılayan faktörlerin ekspresyonunu artırarak anormal Wnt/ $\beta$ -katenin aktivasyonunu engelleyebileceği ve HFF1 hücrelerinde HDM moleküllerinin salınımını destekleyip hücre sağkalımını artırırken Hsp70 ifadesini indükleyerek hasara karşı verilen koruyucu mekanizma cevabını arttırabileceği öngörülmektedir. Bu da balın deri hücrelerinde çeşitli koruyucu mekanizmaları tetikleyerek anormal hücre proliferasyonunu önleyebileceği olasılığını gösterir. Bu sonuçlar, doğal ürünlerin sağlık ve tıp alanında etkili bir rol oynayabileceğini vurgular. Balın içerdiği doğal bileşenlerin, hücresel düzeyde çeşitli sinyal yollarını etkileyerek hücre koruma mekanizmalarını uyarabileceği ve bu sayede deri sağlığını olumlu yönde etkileyebileceği düşünülmektedir. Bu tür doğal ürünlerin, gelecekte deri bakımı ve tedavi stratejilerinde kullanılabilme potansiyeline sahip olduğunu gösteren bu çalışma, doğal ürün temelli yaklaşımların önemini vurgulamaktadır. Bu elde edilen sonuçlar, çalışmanın doğruluğunu ve güvenilirliğini arttırmaktadır; ancak, bu bulguların protein düzeyinde de doğrulanması gerekmektedir. Protein düzeyindeki doğrulama, yapılan deneylerin moleküler düzeyde nasıl etkileşimlere neden olduğunu daha ayrıntılı bir şekilde ortaya koyarak elde edilen verileri güçlendirecektir. Bu nedenle, ilerleyen aşamalarda protein düzeyinde yapılacak analizler, elde edilen genetik verilerin doğruluğunu teyit etme ve moleküler mekanizmaların daha derinlemesine anlaşılmasına katkı sağlama potansiyeline sahiptir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Biehl JK, Russell B. Introduction to Stem Cell Therapy. *J Cardiovasc Nurs* [Internet]. 2009 Mar;24(2):98–103. Available from: <https://journals.lww.com/00005082-200903000-00005>
2. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* [Internet]. 2006 Aug;126(4):663–76. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867406009767>
3. Chandy M, Obal D, Wu JC. Elucidating effects of environmental exposure using human-induced pluripotent stem cell disease modeling. *EMBO Mol Med* [Internet]. 2022 Nov 8;14(11). Available from: <https://www.embopress.org/doi/10.15252/emmm.202013260>
4. Labusca L, Mashayekhi K. Human adult pluripotency: Facts and questions. PG - 1-12 LID - 10.4252/wjsc.v11.i1.1 [doi]. National Institute of Research and Development for Advanced Technical Physics Iasi, Iasi 700349, Romania. llabusca@phys-iasi.ro. FAU - Mashayekhi, Kaveh;
5. Wang QZ, Lu YH, Jiang N, Diao Y, Xu RA. The asymmetric division and tumorigenesis of stem cells. *Chin J Cancer* [Internet]. 2010 Mar 5;29(3):248–53. Available from: <http://www.cjcsysu.cn/abstract.asp?idno=16761>
6. Mummery C, Wilmut SI, van de Stolpe A, Roelen BAJ. What Are Stem Cells? In: *Stem Cells* [Internet]. Elsevier; 2011. p. 45–57. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123815354100036>
7. Chen X, Ye S, Ying QL. a. *BMB Rep* [Internet]. 2015 Dec 31;48(12):668–76. Available from: <http://koreascience.or.kr/journal/view.jsp?kj=E1MBB7&py=2015&vnc=v48n12&sp=668>
8. Bellu E, Garroni G, Cruciani S, Balzano F, Serra D, Satta R, et al. Smart Nanofibers with Natural Extracts Prevent Senescence Patterning in a Dynamic Cell Culture Model of Human Skin. *Cells* [Internet]. 2020 Nov 24;9(12):2530. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/12/2530>
9. Zhou X, Hong Y, Zhang H, Li X. Mesenchymal Stem Cell Senescence and Rejuvenation: Current Status and Challenges. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2020 Jun 3;8. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2020.00364/full>
10. Lee SH. The advantages and limitations of mesenchymal stem cells in clinical application for treating human diseases. *Osteoporos Sarcopenia* [Internet]. 2018 Dec;4(4):150. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405525518300943>
11. McLeod C, Mauck R. On the origin and impact of mesenchymal stem cell heterogeneity: new insights and emerging tools for single cell analysis. *Eur Cells Mater* [Internet]. 2017 Oct 27;34:217–31. Available from: <http://www.ecmjournal.org/papers/vol034/pdf/v034a14.pdf>
12. Gopalarethinam J, Nair AP, Iyer M, Vellingiri B, Subramaniam MD. Advantages of mesenchymal stem cell over the other stem cells. *Acta*



- Histochem [Internet]. 2023 May;125(4):152041. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065128123000478>
13. Díaz-García D, Filipová A, Garza-Veloz I, Martinez-Fierro ML. A Beginner's Introduction to Skin Stem Cells and Wound Healing. Vol. 22, International Journal of Molecular Sciences. 2021.
  14. Wong R, Geyer S, Weninger W, Guimberteau JC, Wong JK. The dynamic anatomy and patterning of skin. *Exp Dermatol* [Internet]. 2016 Feb;25(2):92–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/exd.12832>
  15. Yousef H, Alhadj M, Sharma S. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. BTI - StatPearls. NYIT-COM FAU - Alhadj, Mandy: StatPearls Publishing;
  16. Arda O, Göksügür N, Tüzün Y. Basic histological structure and functions of facial skin. *Clin Dermatol* [Internet]. 2014 Jan;32(1):3–13. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0738081X13000886>
  17. Dellambra E, Dimri GP. Cellular Senescence and Skin Aging. In: *Skin Aging Handbook* [Internet]. Elsevier; 2009. p. 129–48. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780815515845500119>
  18. Barış R. Kök Hücre [Internet]. Available from: <http://ruserbaris.com/kok-hucre/>
  19. Zouboulis CC, Adjaye J, Akamatsu H, Moe-Behrens G, Niemann C. Human skin stem cells and the ageing process. *Exp Gerontol* [Internet]. 2008 Nov;43(11):986–97. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0531556508002921>
  20. Mistriotis P, Andreadis ST. Hair Follicle: A Novel Source of Multipotent Stem Cells for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Tissue Eng Part B Rev* [Internet]. 2013 Aug;19(4):265–78. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.teb.2012.0422>
  21. Blais M, Parenteau-Bareil R, Cadau S, Berthod F. Concise Review: Tissue-Engineered Skin and Nerve Regeneration in Burn Treatment. *Stem Cells Transl Med* [Internet]. 2013 Jul 1;2(7):545–51. Available from: <https://academic.oup.com/stcltm/article/2/7/545-551/6385674>
  22. Botchkarev VA, Millar SE, editors. *Epigenetic Regulation of Skin Development and Regeneration* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2018. (Stem Cell Biology and Regenerative Medicine). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-16769-5>
  23. EI ZZ, MUTIRANGURA A, ARUNMANEE W, CHANVORACHOTE P. The Role of Box A of HMGB1 in Enhancing Stem Cell Properties of Human Mesenchymal Cells: A Novel Approach for the Pursuit of Anti-aging Therapy. *In Vivo (Brooklyn)* [Internet]. 2023 Aug 31;37(5):2006–17. Available from: <http://iv.iarjournals.org/lookup/doi/10.21873/invivo.13298>
  24. Gonzales KAU, Fuchs E. Skin and Its Regenerative Powers: An Alliance between Stem Cells and Their Niche. *Dev Cell* [Internet]. 2017 Nov;43(4):387–401. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580717308146>
  25. Domaszewska-Szostek A, Puzianowska-Kuźnicka M, Kuryłowicz A. Flavonoids in Skin Senescence Prevention and Treatment. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Jun 25;22(13):6814. Available from:

<https://www.mdpi.com/1422-0067/22/13/6814>

26. Ho CY, Dreesen O. Faces of cellular senescence in skin aging. *Mech Ageing Dev* [Internet]. 2021 Sep;198:111525. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004763742100097X>
27. KIROĞLU O, GÜLLÜ H. Cilt Yaşlanmasında Prebiyotik ve Probiyotiklerin Rolü. *Arşiv Kaynak Tarama Derg* [Internet]. 2023 Sep 30;32(3):130–6. Available from: <http://dergipark.org.tr/tr/doi/10.17827/aktd.1312140>
28. Chen X, Yang C, Jiang G. Research progress on skin photoaging and oxidative stress. *Adv Dermatology Allergol* [Internet]. 2021;38(6):931–6. Available from: <https://www.termedia.pl/doi/10.5114/ada.2021.112275>
29. Cheong Y, Kim C, Kim MB, Hwang JK. The anti-photoaging and moisturizing effects of *Bouea macrophylla* extract in UVB-irradiated hairless mice. *Food Sci Biotechnol* [Internet]. 2018 Feb 12;27(1):147–57. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10068-017-0276-y>
30. Tibb KAN, Tez D. Kronik miyeloid lösemide dishevelled proteinlerinin onkojenik etkisinin araştırılması. 2016;
31. Wang Y, Zhou CJ, Liu Y. Wnt Signaling in Kidney Development and Disease. In 2018. p. 181–207. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877117317301977>
32. Kokolus K, Nemeth MJ. Non-canonical Wnt signaling pathways in hematopoiesis. *Immunol Res* [Internet]. 2010 Mar 10;46(1–3):155–64. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12026-009-8116-7>
33. Akoumianakis I, Polkinghorne M, Antoniadis C. Non-canonical WNT signalling in cardiovascular disease: mechanisms and therapeutic implications. *Nat Rev Cardiol* [Internet]. 2022 Dec 13;19(12):783–97. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41569-022-00718-5>
34. Zheng W, Yao M, Fang M, Pan L, Wang L, Yang J, et al. Oncogenic Wnt3a: A Candidate Specific Marker and Novel Molecular Target for Hepatocellular Carcinoma. *J Cancer* [Internet]. 2019;10(23):5862–73. Available from: <http://www.jcancer.org/v10p5862.htm>
35. Shi J, Li F, Luo M, Wei J, Liu X. Distinct Roles of Wnt/  $\beta$ -Catenin Signaling in the Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2017;2017:1–16. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2017/3520581/>
36. Chen D, Jarrell A, Guo C, Lang R, Atit R. Dermal  $\beta$ -catenin activity in response to epidermal Wnt ligands is required for fibroblast proliferation and hair follicle initiation. *Development* [Internet]. 2012 Apr 15;139(8):1522–33. Available from: <https://journals.biologists.com/dev/article/139/8/1522/45673/Dermal-catenin-activity-in-response-to-epidermal>
37. Mikels AJ, Nusse R. Purified Wnt5a Protein Activates or Inhibits  $\beta$ -Catenin–TCF Signaling Depending on Receptor Context. Arias AM, editor. *PLoS Biol* [Internet]. 2006 Apr 4;4(4):e115. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.0040115>
38. Kwack MH, Kim MK, Kim JC, Sung YK. Wnt5a attenuates Wnt/ $\beta$ -catenin signalling in human dermal papilla cells. *Exp Dermatol* [Internet]. 2013 Mar

- 12;22(3):229–31. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/exd.12101>
39. Assarsson M, Söderman J, Duvetorp A, Mrowietz U, Skarstedt M, Seifert O. Narrowband UVB treatment induces expression of WNT7B, WNT10B and TCF7L2 in psoriasis skin. *Arch Dermatol Res* [Internet]. 2019;311(7):535–44. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00403-019-01931-y>
  40. Sharma M, Castro-Piedras I, Simmons GE, Pruitt K. Dishevelled: A masterful conductor of complex Wnt signals. *Cell Signal* [Internet]. 2018 Jul;47:52–64. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0898656818300688>
  41. Kafka A, Bašić-Kinda S, Pećina-Šlaus N. The cellular story of dishevelleds. *Croat Med J* [Internet]. 2014 Oct;55(5):459–46667. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4228291/>
  42. Lee YN, Gao Y, Wang H yu. Differential mediation of the Wnt canonical pathway by mammalian Dishevelleds-1, -2, and -3. *Cell Signal* [Internet]. 2008 Feb;20(2):443–52. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0898656807003415>
  43. Etheridge SL, Ray S, Li S, Hamblet NS, Lijam N, Tsang M, et al. Murine Dishevelled 3 Functions in Redundant Pathways with Dishevelled 1 and 2 in Normal Cardiac Outflow Tract, Cochlea, and Neural Tube Development. Beier DR, editor. *PLoS Genet* [Internet]. 2008 Nov 14;4(11):e1000259. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1000259>
  44. Stefanski CD, Prosperi JR. Wnt-Independent and Wnt-Dependent Effects of APC Loss on the Chemotherapeutic Response. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Oct 22;21(21):7844. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/21/7844>
  45. Hankey W, Chen Z, Bergman MJ, Fernandez MO, Hancioglu B, Lan X, et al. Chromatin-associated APC regulates gene expression in collaboration with canonical WNT signaling and AP-1. *Oncotarget* [Internet]. 2018 Jul 27;9(58):31214–30. Available from: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.25781>
  46. Saito-Diaz K, Benchabane H, Tiwari A, Tian A, Li B, Thompson JJ, et al. APC Inhibits Ligand-Independent Wnt Signaling by the Clathrin Endocytic Pathway. *Dev Cell* [Internet]. 2018 Mar;44(5):566–581.e8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580718301084>
  47. Pronobis MI, Rusan NM, Peifer M. A novel GSK3-regulated APC:Axin interaction regulates Wnt signaling by driving a catalytic cycle of efficient  $\beta$ catenin destruction. *Elife* [Internet]. 2015 Sep 22;4. Available from: <https://elifesciences.org/articles/08022>
  48. de Jaime-Soguero A, Abreu de Oliveira W, Lluís F. The Pleiotropic Effects of the Canonical Wnt Pathway in Early Development and Pluripotency. *Genes (Basel)* [Internet]. 2018 Feb 14;9(2):93. Available from: <http://www.mdpi.com/2073-4425/9/2/93>
  49. Zhang D yong, Pan Y, Zhang C, Yan B xi, Yu S shan, Wu D ling, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling induces the aging of mesenchymal stem cells through

- promoting the ROS production. *Mol Cell Biochem* [Internet]. 2013 Feb 3;374(1–2):13–20. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11010-012-1498-1>
50. Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou AH. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* [Internet]. 2004 Jan 21;10(1):55–63. Available from: <http://www.nature.com/articles/nm979>
  51. Govarthan K, Vidyasekar P, Gupta PK, Lenka N, Verma RS. Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  inhibitor- CHIR 99021 augments the differentiation potential of mesenchymal stem cells. *Cytotherapy* [Internet]. 2020 Feb;22(2):91–105. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1465324919309235>
  52. Boland GM, Perkins G, Hall DJ, Tuan RS. Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* [Internet]. 2004 Dec 15;93(6):1210–30. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcb.20284>
  53. Takam Kanga P, Bazzoni R, Dal Collo G, Cassaro A, Tanasi I, Russignan A, et al. The Role of Notch and Wnt Signaling in MSC Communication in Normal and Leukemic Bone Marrow Niche. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2021 Jan 8;8. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2020.599276/full>
  54. Liu G, Vijayakumar S, Grumolato L, Arroyave R, Qiao H, Akiri G, et al. Canonical Wnts function as potent regulators of osteogenesis by human mesenchymal stem cells. *J Cell Biol* [Internet]. 2009 Apr 6;185(1):67–75. Available from: <https://rupress.org/jcb/article/185/1/67/35344/Canonical-Wnts-function-as-potent-regulators-of>
  55. Jeoung JY, Nam HY, Kwak J, Jin HJ, Lee HJ, Lee BW, et al. A Decline in Wnt3a Signaling is Necessary for Mesenchymal Stem Cells to Proceed to Replicative Senescence. *Stem Cells Dev* [Internet]. 2015 Apr 15;24(8):973–82. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/scd.2014.0273>
  56. Lehmann J, Narcisi R, Franceschini N, Chatzivasileiou D, Boer CG, Koevoet WJLM, et al. WNT/beta-catenin signalling interrupts a senescence-induction cascade in human mesenchymal stem cells that restricts their expansion. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2022 Feb 20;79(2):82. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s00018-021-04035-x>
  57. Flores-Hernández E, Velázquez DM, Castañeda-Patlán MC, Fuentes-García G, Fonseca-Camarillo G, Yamamoto-Furusho JK, et al. Canonical and non-canonical Wnt signaling are simultaneously activated by Wnts in colon cancer cells. *Cell Signal* [Internet]. 2020 Aug;72:109636. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0898656820301133>
  58. Ray LB. Slowing Senescence with Wnt. *Sci STKE* [Internet]. 2007 Jul 24;2007(396). Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/stke.3962007tw263>
  59. Kandyba E, Kobiela K. Wnt7b is an important intrinsic regulator of hair follicle stem cell homeostasis and hair follicle cycling. *PG - 886-901 LID -*

- 10.1002/stem.1599 [doi]. Eli and Edythe Broad CIRM Center for Regenerative Medicine and Stem Cell Research, University of Southern California, Los Angeles, California, USA; Department of Pathology, University of Southern California, Los Angeles, California, USA. FAU - Kobiela, ;
60. Holloway KR, Calhoun TN, Saxena M, Metoyer CF, Kandler EF, Rivera CA, et al. SIRT1 regulates Dishevelled proteins and promotes transient and constitutive Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2010 May 18;107(20):9216–21. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0911325107>
  61. Jaganathan SK. Can flavonoids from honey alter multidrug resistance? *Med Hypotheses* [Internet]. 2011 Apr;76(4):535–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306987710005232>
  62. Talebi MM, Talebi MM, Farkhondeh T, Samarghandian S. Molecular mechanism-based therapeutic properties of honey. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2020 Oct;130:110590. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332220307836>
  63. Oryan A, Alemzadeh E, Mohammadi AA. Application of honey as a protective material in maintaining the viability of adipose stem cells in burn wound healing: A histological, molecular and biochemical study. *Tissue Cell* [Internet]. 2019 Dec;61:89–97. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040816619302484>
  64. Das A, Datta P, Chowdhury AR, Barui A. Honey-incorporated nanofibre reduces replicative senescence of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *IET Nanobiotechnology* [Internet]. 2020 Dec 2;14(9):870–80. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1049/iet-nbt.2019.0288>
  65. Basoli V, Santaniello S, Cruciani S, Ginesu G, Cossu M, Delitala A, et al. Melatonin and Vitamin D Interfere with the Adipogenic Fate of Adipose-Derived Stem Cells. *Int J Mol Sci*. 2017 May;18(5):981.
  66. Bellu E. Myrtus and its wasting materials as a source of antioxidants: from food to cosmesis. UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI; 2021.
  67. Maioli M, Basoli V, Santaniello S, Cruciani S, Delitala AP, Pinna R, et al. Osteogenesis from Dental Pulp Derived Stem Cells: A Novel Conditioned Medium Including Melatonin within a Mixture of Hyaluronic, Butyric, and Retinoic Acids. *Stem Cells Int* [Internet]. 2016;2016:1–8. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/sci/2016/2056416/>
  68. Panich U, Sittithumcharee G, Rathviboon N, Jirawatnotai S. Ultraviolet Radiation-Induced Skin Aging: The Role of DNA Damage and Oxidative Stress in Epidermal Stem Cell Damage Mediated Skin Aging. *Stem Cells Int* [Internet]. 2016;2016:1–14. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/sci/2016/7370642/>
  69. Karapetsas A, Voulgaridou GP, Iliadi D, Tsochantaridis I, Michail P, Kynigopoulos S, et al. Honey Extracts Exhibit Cytoprotective Properties against UVB-Induced Photodamage in Human Experimental Skin Models. *Antioxidants* [Internet]. 2020 Jun 30;9(7):566. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3921/9/7/566>

70. Nichols JA, Katiyar SK. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch Dermatol Res* [Internet]. 2010 Mar 7;302(2):71–83. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00403-009-1001-3>
71. Liu Y, Yang S, Wang K, Lu J, Bao X, Wang R, et al. Cellular senescence and cancer: Focusing on traditional Chinese medicine and natural products. *Cell Prolif* [Internet]. 2020 Oct 3;53(10). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cpr.12894>
72. Kulaberoglu Y, Gundogdu R, Hergovich A. The Role of p53/p21/p16 in DNA-Damage Signaling and DNA Repair. In: *Genome Stability* [Internet]. Elsevier; 2016. p. 243–56. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012803309800015X>
73. Lopez Perez R, Brauer J, Rühle A, Trinh T, Sisombath S, Wuchter P, et al. Human mesenchymal stem cells are resistant to UV-B irradiation. *Sci Rep* [Internet]. 2019 Dec 27;9(1):20000. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-56591-9>
74. Wu NL, Fang JY, Chen M, Wu CJ, Huang CC, Hung CF. Chrysin Protects Epidermal Keratinocytes from UVA- and UVB-Induced Damage. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2011 Aug 10;59(15):8391–400. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf200931t>
75. Ahmad I, Jimenez H, Yaacob NS, Yusuf N. Tualang Honey Protects Keratinocytes from Ultraviolet Radiation-Induced Inflammation and DNA Damage †. *Photochem Photobiol* [Internet]. 2012 Sep 21;88(5):1198–204. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1751-1097.2012.01100.x>
76. Janbandhu VC, Singh AK, Mukherji A, Kumar V. p65 Negatively Regulates Transcription of the Cyclin E Gene. *J Biol Chem* [Internet]. 2010 Jun;285(23):17453–64. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925819354870>
77. Yu K, Yang S, Jung J, Kim H, Ko K, Han DW, et al. CD49f Enhances Multipotency and Maintains Stemness Through the Direct Regulation of OCT4 and SOX2. *Stem Cells* [Internet]. 2012 May 9;30(5):876–87. Available from: <https://academic.oup.com/stemcells/article/30/5/876-887/6404438>
78. Bártová E, Šustáčková G, Stixová L, Kozubek S, Legartová S, Foltánková V. Recruitment of Oct4 Protein to UV-Damaged Chromatin in Embryonic Stem Cells. Cotterill S, editor. *PLoS One* [Internet]. 2011 Dec 2;6(12):e27281. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0027281>
79. Miller KM, Tjeertes J V, Coates J, Legube G, Polo SE, Britton S, et al. Human HDAC1 and HDAC2 function in the DNA-damage response to promote DNA nonhomologous end-joining. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. 2010 Sep 29;17(9):1144–51. Available from: <https://www.nature.com/articles/nsmb.1899>
80. Carusillo A, Mussolino C. DNA Damage: From Threat to Treatment. *Cells* [Internet]. 2020 Jul 10;9(7):1665. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/7/1665>

81. Park IK, Morrison SJ, Clarke MF. Bmi1, stem cells, and senescence regulation. *J Clin Invest* [Internet]. 2004 Jan 15;113(2):175–9. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/20800>
82. Lin X, Ojo D, Wei F, Wong N, Gu Y, Tang D. A Novel Aspect of Tumorigenesis—BMI1 Functions in Regulating DNA Damage Response. *Biomolecules* [Internet]. 2015 Dec 1;5(4):3396–415. Available from: <http://www.mdpi.com/2218-273X/5/4/3396>
83. Mattson MP, Zhang P FW. Roles for TERT and Telomerase in Cell Differentiation and Apoptosis [Internet]. *Madame Curie Bioscience Database* [Internet]. Landes Bioscience; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6129/>
84. Hoshino T, Matsuda M, Yamashita Y, Takehara M, Fukuya M, Minoda K, et al. Suppression of Melanin Production by Expression of HSP70. *J Biol Chem* [Internet]. 2010 Apr;285(17):13254–63. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820551028>
85. Matsuda M, Hoshino T, Yamakawa N, Tahara K, Adachi H, Sobue G, et al. Suppression of UV-Induced Wrinkle Formation by Induction of HSP70 Expression in Mice. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2013 Apr;133(4):919–28. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15361935>
86. Chen F, Guo X, Wu Y. Skin antiaging effects of a multiple mechanisms hyaluronan complex. *Ski Res Technol* [Internet]. 2023 Jun 28;29(6). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/srt.13350>
87. Kasai K, Kuroda Y, Takabuchi Y, Nitta A, Kobayashi T, Nozaka H, et al. Phosphorylation of Thr328 in hyaluronan synthase 2 is essential for hyaluronan synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2020 Dec;533(4):732–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X20316934>
88. Zhang Z, Tian X, Lu JY, Boit K, Abulaeva J, Zakusilo FT, et al. Increased hyaluronan by naked mole-rat Has2 improves healthspan in mice. *Nature* [Internet]. 2023 Sep 7;621(7977):196–205. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-023-06463-0>
89. Cheng N, Wang Y, Cao W. The Protective Effect of Whole Honey and Phenolic Extract on Oxidative DNA Damage in Mice Lymphocytes Using Comet Assay. *Plant Foods Hum Nutr* [Internet]. 2017 Dec 19;72(4):388–95. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11130-017-0634-1>
90. Rehman MU, Majid S, editors. *Therapeutic Applications of Honey and its Phytochemicals* [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2020. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/978-981-15-6799-5>
91. Alleva R, Manzella N, Gaetani S, Ciarapica V, Bracci M, Caboni MF, et al. Organic honey supplementation reverses pesticide-induced genotoxicity by modulating DNA damage response. *Mol Nutr Food Res* [Internet]. 2016 Oct 30;60(10):2243–55. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mnfr.201600005>
92. Afroz R, Tanvir EM, Paul S, Bhoumik NC, Gan SH, Khalil MI. DNA Damage

- Inhibition Properties of Sundarban Honey and its Phenolic Composition. *J Food Biochem* [Internet]. 2016 Aug;40(4):436–45. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfbc.12240>
93. Habib HM, Al Meqbali FT, Kamal H, Souka UD, Ibrahim WH. Bioactive components, antioxidant and DNA damage inhibitory activities of honeys from arid regions. *Food Chem* [Internet]. 2014 Jun;153:28–34. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814613019109>
  94. Prasetyo RH, Hestianah EP. Honey can repairing damage of liver tissue due to protein energy malnutrition through induction of endogenous stem cells. *Vet World* [Internet]. 2017 Jun;10(6):711–5. Available from: <http://www.veterinaryworld.org/Vol.10/June-2017/22.html>
  95. Safitri E, Purnobasuki H, Purnama MTE, Chhetri S. Effectiveness of forest honey (*Apis dorsata*) as therapy for ovarian failure causing malnutrition. *F1000Research* [Internet]. 2022 Oct 20;11:512. Available from: <https://f1000research.com/articles/11-512/v2>
  96. Tan JJ, Azmi SM, Yong YK, Cheah HL, Lim V, Sandai D, et al. Tualang Honey Improves Human Corneal Epithelial Progenitor Cell Migration and Cellular Resistance to Oxidative Stress In Vitro. Liu X, editor. *PLoS One* [Internet]. 2014 May 6;9(5):e96800. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0096800>
  97. Ray LB. Wnt, the Fountain of Youth? *Sci STKE* [Internet]. 2007 Aug 14;2007(399). Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/stke.3992007tw295>
  98. Van Camp JK, Beckers S, Zegers D, Van Hul W. Wnt Signaling and the Control of Human Stem Cell Fate. *Stem Cell Rev Reports* [Internet]. 2014 Apr 10;10(2):207–29. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12015-013-9486-8>
  99. Davidson KC, Adams AM, Goodson JM, McDonald CE, Potter JC, Berndt JD, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling promotes differentiation, not self-renewal, of human embryonic stem cells and is repressed by Oct4. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2012 Mar 20;109(12):4485–90. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1118777109>
  100. Lim X, Tan SH, Koh WLC, Chau RMW, Yan KS, Kuo CJ, et al. Interfollicular Epidermal Stem Cells Self-Renew via Autocrine Wnt Signaling. *Science* (80- ) [Internet]. 2013 Dec 6;342(6163):1226–30. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1239730>
  101. Lim X, Tan SH, Yu K Lou, Lim SBH, Nusse R. Axin2 marks quiescent hair follicle bulge stem cells that are maintained by autocrine Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2016 Mar 15;113(11). Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1601599113>
  102. Sarabia-Sánchez MA, Robles-Flores M. WNT Signaling in Stem Cells: A Look into the Non-Canonical Pathway. *Stem Cell Rev Reports* [Internet]. 2023 Oct 7; Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s12015-023-10610-5>
  103. Saraswati S, Bastakoty D, Young PP. Molecular and Signaling Pathways That Modulate Mesenchymal Stem Cell Self-renewal. In: *Stem Cells and Cancer*



- Stem Cells, Volume 6 [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2012. p. 131–41. Available from: [https://link.springer.com/10.1007/978-94-007-2993-3\\_12](https://link.springer.com/10.1007/978-94-007-2993-3_12)
104. Nemeth MJ, Topol L, Anderson SM, Yang Y, Bodine DM. Wnt5a inhibits canonical Wnt signaling in hematopoietic stem cells and enhances repopulation. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2007 Sep 25;104(39):15436–41. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0704747104>
  105. Liu Y. WNT3A modulates chondrogenesis via canonical and non-canonical Wnt pathways in MSCs. *Front Biosci* [Internet]. 2013;18(2):493. Available from: <https://imrpess.com/journal/FBL/18/2/10.2741/4116>
  106. Kim J, Kim M, Choi W, Moon M, Kim H, Lee J, et al. Wnt3A Induces GSK-3 $\beta$  Phosphorylation and  $\beta$ -Catenin Accumulation Through RhoA/ROCK. *J Cell Physiol* [Internet]. 2017 May 20;232(5):1104–13. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.25572>
  107. He S, Lu Y, Liu X, Huang X, Keller ET, Qian CN, et al. Wnt3a: functions and implications in cancer. *Chin J Cancer* [Internet]. 2015 Dec 14;34(3):50. Available from: <https://cancercommun.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40880-015-0052-4>
  108. Torii K, Nishizawa K, Kawasaki A, Yamashita Y, Katada M, Ito M, et al. Anti-apoptotic action of Wnt5a in dermal fibroblasts is mediated by the PKA signaling pathways. *Cell Signal* [Internet]. 2008 Jul;20(7):1256–66. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0898656808000685>
  109. Yokoyama N, Golebiewska U, Wang H yu, Malbon CC. Wnt-dependent assembly of supermolecular Dishevelled-3-based complexes. *J Cell Sci* [Internet]. 2010 Nov 1;123(21):3693–702. Available from: <https://journals.biologists.com/jcs/article/123/21/3693/31414/Wnt-dependent-assembly-of-supermolecular>
  110. Gentzel M, Schambony A. Dishevelled Paralogs in Vertebrate Development: Redundant or Distinct? *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2017 May 26;5. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2017.00059/full>
  111. Yokoyama N, Yin D, Malbon CC. Abundance, complexation, and trafficking of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling elements in response to Wnt3a. *J Mol Signal* [Internet]. 2007 Oct 25;2:11. Available from: <http://www.jmolecularsignaling.com/articles/10.1186/1750-2187-2-11/>
  112. Pruller J, Figeac N, Zammit PS. DVL1 and DVL3 require nuclear localisation to regulate proliferation in human myoblasts. *Sci Rep* [Internet]. 2022 May 19;12(1):8388. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-10536-x>
  113. Boligala GP, Yang M V., van Wunnik JC, Pruitt K. Nuclear Dishevelled: An enigmatic role in governing cell fate and Wnt signaling. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2022 Oct;1869(10):119305. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488922000970>
  114. Moshkovsky AR, Kirschner MW. The nonredundant nature of the Axin2

- regulatory network in the canonical Wnt signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 2022 Mar 23;119(9). Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.2108408119>
115. Yamada T, Hasegawa S, Iwata Y, Arima M, Kobayashi T, Numata S, et al. UV irradiation-induced DNA hypomethylation around WNT1 gene: Implications for solar lentigines. *Exp Dermatol [Internet]*. 2019 Jun 19;28(6):723–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/exd.13949>
  116. Chua AWC, Gan SU, Ting Y, Fu Z, Lim CK, Song C, et al. Keloid fibroblasts are more sensitive to Wnt3a treatment in terms of elevated cellular growth and fibronectin expression. *J Dermatol Sci [Internet]*. 2011 Dec;64(3):199–209. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923181111002830>
  117. Wasson CW, Caballero-Ruiz B, Gillespie J, Derrett-Smith E, Mankouri J, Denton CP, et al. Induction of Pro-Fibrotic CLIC4 in Dermal Fibroblasts by TGF- $\beta$ /Wnt3a Is Mediated by GLI2 Upregulation. *Cells [Internet]*. 2022 Feb 3;11(3):530. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/11/3/530>
  118. Rognoni E, Goss G, Hiratsuka T, Sipilä KH, Kirk T, Kober KI, et al. Role of distinct fibroblast lineages and immune cells in dermal repair following UV radiation-induced tissue damage. *Elife [Internet]*. 2021 Dec 23;10. Available from: <https://elifesciences.org/articles/71052>
  119. Almeida M, Han L, Bellido T, Manolagas SC, Kousteni S. Wnt Proteins Prevent Apoptosis of Both Uncommitted Osteoblast Progenitors and Differentiated Osteoblasts by  $\beta$ -Catenin-dependent and -independent Signaling Cascades Involving Src/ERK and Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT. *J Biol Chem [Internet]*. 2005 Dec;280(50):41342–51. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820589412>

## **EKLER**

**Ek 1: Etik Kurul Belgesi**

## ÖZGEÇMİŞ

### EĞİTİM