

AYŞE EROL

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2022

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER VE İMMÜN SİSTEM
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN İN VİTRO KOŞULLARDA
DEĞERLENDİRİLMESİ

AYŞE EROL

DANIŞMAN
PROF.DR.FATMA SAVRAN OĞUZ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2022

TEZ ONAYI



BEYAN



ITHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Akademik kariyerime başladığım andan itibaren yüksek lisans ve diğer tüm çalışmalarında tüm bilgi ve tecrübelerini paylaşan, bu yolda ilerlerken yanımda olmasından dolayı kendimi her zaman şanslı hissettiğim, sosyal hayatımda da desteğini eksik etmeyen, tecrübelerinden faydalandığım, çok saygı ve sevgi duyduğum saygılı mentorüm, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanımız ve Doktora Tez Danışmanım Sayın Prof. Dr. Fatma Savran Oğuz’a,

Bu tez çalışmasının yürütülmesi sırasında bilgi ve birikimini sınırsız paylaşan, hücre kültürü konusundaki sorularıma net yanıtlar aldığım, her an her problemde çok hızlı ulaşabildiğim, sorularımda beni geri çevirmeyen ve çalışma boyunca vermiş olduğu hem bilimsel hem akademik desteklerinden dolayı Fizyoloji Anabilim Dalı’ndan Sayın Prof. Dr. Dürdane Serap Kuruca’ya,

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

Bakırköy Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesinde Kadın Doğum Anabilim Dalı’nda bulunan, örnek aldığımız doğum kordon kanı ve dokusu için organizasyonda her an yanımda olan desteğini esirgemeyen Sayın Dr.Gökhan Demirayak’a,

Yüksek lisansa başladığım günden itibaren doktora bitene kadar tüm süreci birlikte yürüdüğümüz, sadece eğitim hayatımızın değil sosyal hayatımızda da her an birlikte hareket ettiğim, bu yolda birlikte büyüdüğüm, arkadaşım ablam kardeşim çok sevgili dostum Figen Abatay Sel, ve tüm sıkıntılı süreçlerde anlayışla karşılayıp destek olan sevgili Figen Abatay Sel’in çok sevgili eşi Celal Sel’e,

Yanımdayken birlikte ekip olarak koşulsuz kuralsız bilimsel çalışma yapabilmenin rahatlığını hissettiğim, bu yolda her zaman yanımda olmasını dilediğim, tez sürecim boyunca desteğini eksiksiz hissettiğim, yol arkadaşım diyebileceğim çok sevgili Öğretim Görevlisi Mediha Süleymanoğlu’na,

Uzaktan da olsa her an istisnasız her soruma cevap veren tüm sorunlarımı etik ve ahlak değerlere uygun çözümler bulan ve akademide iyi ki böyle insanlar var diyebileceğim çok sevgili arkadaşım Ümit Karakaş’a,

Tüm idari işleri titizlikle yapan ve manevi desteğini esirgemeyen çok sevgili kürsü sekreterimiz Ayşegül Kılıç'a,

Birlikte çalışmaktan keyif aldığım desteklerini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Güneş ve Dilşad'a,

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

Beni büyüten sevgisini saygısını esirgemeyen her an maddi manevi gece gündüz yanımda olan, gurur ve onur duyduğum canım babam Ahmet Erol'a, canım annem Saadet Erol'a, canım ablam en iyi arkadaşım Merve Erol Zengin'e, canım eniştem çok sevgili ablamın eşi Emrah Zengin'e, canım kardeşim Betül Erol'a, canım kardeşim Ömer Erol'a,

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 37060

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xiii
ÖZET	xv
ABSTRACT.....	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kök Hücreler.....	4
2.1.1. Kök Hücrelerin Tarihçesi.....	4
2.1.2. Kök Hücrelerin Karakteristik Özellikleri.....	5
2.1.3. Kök Hücrelerin Sınıflandırılması.....	5
2.1.4. Mezenkimal Kök Hücreler.....	7
2.1.4.1. Kordon Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler	10
2.1.5. Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmün Düzenleyici Özellikleri.....	11
2.1.5.1. Kordon Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmün Supresif Özellikleri	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	18
3.1. Çalışma Planının Özeti	18
3.2. Gerekli Malzeme ve Cihazlar	19
3.3. Gerekli Kimyasal, Solüsyon ve Kitler	20
3.4. Yöntemler	21
3.4.1. Örneklerin Toplanması	21
3.4.1.1. Kordon kanı örneklerinin toplanması, izolasyonu ve kültürü.....	21
3.4.1.2. Kordon dokusu (Wharton Jeli) toplanması, izolasyonu ve kültürü.....	23
3.4.2. Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyonu.....	25

3.4.3. Periferel Kan Mononükleer Hücreleri İzolasyonu ve Kültürü.....	26
3.4.4. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi ve Sayılması	27
3.4.4.1. Tripan Mavisi ile Boyama Yöntemi:.....	27
3.4.5. Periferel Kan Mononükleer Hücrenin Fitohemaglotinin (PHA) ile Stimülasyonu.....	27
3.4.6. Hücre Kültür Deneylerinin Düzenekleri	29
3.4.6.1. Kontrol Grubu Deney Düzenekleri	29
3.4.6.2. PKMH ve MKH Ko-kültürü Deney Düzenekleri Tablosu.....	29
3.4.7. PKMH ve MKH Ko-Kültür Deneylerinin Yapılması	30
3.4.7.1. İzole Edilen Kordon Kanı MKH; WJ-MKH ve PKMH Ko-Kültür Deney Planı.....	30
3.4.8. Hücre içi Sitokin Tayini ile IL-4, IFN- γ ve IL-17A Sitokin Seviyelerinin Belirlenmesi	31
3.4.8.1. Hücre içi sitokin tayini protokolü	33
3.4.9. Süpernatanttan IL-4, TGF- β , IFN- γ ve IL-17A Sitokin Seviyelerinin ELISA Yöntemiyle Belirlenmesi	34
3.4.9.1. ELISA Yöntemi:	36
3.5. Değerlendirme ve Analiz	38
3.6. İstatistiksel Analiz.....	38
4. BULGULAR.....	39
4.1. Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyonu.....	39
4.2. STI-PKMh ve STI+PKMH arasındaki Hücre içi ve Süpernatant Sitokin Seviyelerindeki Değişimi Karşılaştırması.....	41
4.3. WJ-MKH'ın STI-PKMh ile ko-kültür Öncesi ve Sonrası Hücre içi ve Süpernatanttan Bakılan Sitokin Seviyeleri Karşılaştırması	42
4.4. WJ-MKH'ın STI+PKMH ile ko-kültür Öncesi ve Sonrası Hücre içi ve Süpernatanttan Bakılan Sitokin Seviyeleri Karşılaştırması	44
4.5. KK-MKH'ın STI-PKMh ile ko-kültür Öncesi ve Sonrası Hücre içi ve Süpernatanttan Bakılan Sitokin Seviyeleri Karşılaştırması	46
4.6. KK-MKH'ın STI+PKMH ile ko-kültür Öncesi ve Sonrası Hücre içi ve Süpernatanttan Bakılan Sitokin Seviyeleri Karşılaştırması	48
4.7. WJ-MKH'ın STI+PKMH ile 1/5 ve 1/10 oranlarında Ko-kültürünün İnkübasyon Sürelerine Göre Sitokin Değerleri Değişimi	50

4.8. WJ-MKH'ın STI+PKMH ile 1/5 ve 1/10 Oranlarındaki Ko-Kültürlerinin 24 ve 72 Saat sonraki Sitokin Değişimleri	52
4.9. KK-MKH'ın STI+PKMH ile 1/5 ve 1/10 oranlarında Ko-kültürünün İnkübasyon Sürelerine Göre Sitokin Değerleri Değişimi	54
4.10. KK-MKH'ın STI+PKMH ile 1/5 ve 1/10 Oranlarındaki Ko-Kültürlerinin 24 ve 72 Saat sonraki Sitokin Değişimleri	56
5. TARTIŞMA	58
KAYNAKLAR	67
HAM VERİLER	79
FORMLAR	80
ETİK KURUL KARARI	81
PATENT HAKKI İZNİ	82
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	83

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: MKH tarafından sekrete olan solubl faktörler ve hedef hücreleri	14
Tablo 3-1:PHA süre ve doz belirlemesi için deney düzeneği.....	28
Tablo 3-2:Ko-kültür çalışma düzeneği	29
Tablo 4-1: STI-PKMH ve STI+PKMH Sitokin Seviyeleri Karşılaştırılması.....	41
Tablo 4-2: 1/5 oranında WJ-MKH/STI-PKMH Ko-kültür Öncesi ve Sonrası Sitokin Seviyesi Karşılaştırması.....	42
Tablo 4-3: 1/10 oranında WJ-MKH/STI-PKMH Ko-kültür Öncesi ve Sonrası Sitokin Seviyesi Karşılaştırması.....	43
Tablo 4-4: 1/5 oranında WJ-MKH/STI+PKMH Ko-kültür Öncesi ve Sonrası Sitokin Seviyesi Karşılaştırması.....	44
Tablo 4-5: 1/10 oranında WJ-MKH/STI+PKMH Ko-kültür Öncesi ve Sonrası Sitokin Seviyeleri Karşılaştırması	45
Tablo 4-6: 1/5 oranında KK-MKH/STI-PKMH Ko-kültür Öncesi ve Sonrası Sitokin Seviyeleri Karşılaştırması	46
Tablo 4-7: 1/10 oranında KK-MKH/STI-PKMH Ko-kültür Öncesi ve Sonrası Sitokin Seviyeleri Karşılaştırması	47
Tablo 4-8: 1/5 oranında KK-MKH/STI+PKMH Ko-kültür Öncesi ve Sonrası Sitokin Seviyeleri Karşılaştırması	48
Tablo 4-9: 1/10 oranında KK-MKH/STI+PKMH Ko-kültür Öncesi ve Sonrası Sitokin Seviyeleri Karşılaştırması	49
Tablo 4-10: 1/5 oranında WJ-MKH/STI+PKMH Ko-kültür Inkübasyon Sürelerindeki Sitokin Seviyeleri Karşılaştırılması	51
Tablo 4-11: 1/10 oranında WJ-MKH/STI+PKMH Ko-kültür Inkübasyon Sürelerindeki Sitokin Seviyeleri Karşılaştırması	51
Tablo 4-12: 24 saatlik WJ-MKH ve STI+PKMH Ko-Kültürlerinde Hücre Oranlarına Göre Sitokin Seviyeleri Karşılaştırması	53
Tablo 4-13: 72 saatlik WJ-MKH ve STI+PKMH Ko-Kültürlerinde Hücre Oranlarına Göre Sitokin Seviyeleri Karşılaştırması	53
Tablo 4-14: 1/5 oranında KK-MKH/STI+PKMH Ko-kültür Inkübasyon Sürelerindeki Sitokin Seviyeleri Karşılaştırması	55

Tablo 4-15: 1/10 oranında KK-MKH/STI+PKMH Ko-kültür Inkübasyon Sürelerindeki Sitokin Seviyeleri Karşılaştırması	55
Tablo 4-16: 24 saatlik KK-MKH ve STI+PKMH Ko-Kültürlerinde Hücre Oranlarına Göre Sitokin Seviyeleri Karşılaştırması	57
Tablo 4-17: 72 saatlik KK-MKH ve STI+PKMH Ko-Kültürlerinde Hücre Oranlarına Göre Sitokin Seviyeleri Karşılaştırması	57



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1-1: Kök hücre farklılaşmaları.....	1
Şekil 1-2:MKH'nin immünomodülasyon mekanizmaları	3
Şekil 2-1: Kök hücre sınıflandırılması.....	7
Şekil 2-2: Hematopoetik ve stromal hücrelerin farklılaşması	8
Şekil 2-3: Mezenkimal kök hücre kaynakları	10
Şekil 2-4: MKH kaynağı olarak kordon dokusu (Wharton Jeli) ve kordon kanı.....	10
Şekil 2-5: Göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerinin immünomodülatör işlevleri ..	12
Şekil 3-1:Kordon kanı MKH izolasyonu ve kültürü.....	23
Şekil 3-2: Wharton Jeli MKH izolasyonu ve kültürü	25
Şekil 3-3:PKMH stimülasyon öncesi ve sonrası.....	28
Şekil 3-4: Kordon kanı-MKH ve PKMH Ko-kültür deney şeması	30
Şekil 3-5: WJ-MKH ve PKMH ko-kültür deney şeması	30
Şekil 3-6: PKMH ve WJ-MKH ko-kültür mikroskopik görüntüsü	31
Şekil 4-1: MKH karakterizasyon akım sitometri analizi	39
Şekil 4-2: Kordon dokusu (WJ-MKH) mezenkimal kök hücre kültürünün 10 gün sonrası mikroskopik görüntüsü	40

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

MKH:	Mezenkimal kök hücreler
PKMH:	Periferik kan mononükleer hücreler
IL:	Interlökin
PHA:	Fitohemaglutinin
KK-MKH:	Kordon kanı mezenkimal kök hücre
Wharton Jelly-WJ-MKH:	Göbek kordon dokusu mezenkimal kök hücre
STİ-:	Stimüle olmayan
STİ+:	Stimüle olan
HLA:	Human lökosit antijen
ISCT:	Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği
NK:	Doğal öldürücü hücreler
DH:	Dendritik hücreler
ASH:	Antijen sunan hücreler
IDO:	Indoleamin-pirol 2,3-dioksijenaz
PEG2:	Prostaglandin E2
TGF:	Transforme edici büyüme factor
NO:	Nitrik oksit
TNF:	Tümör nekroz faktörü α
GM-CSF:	Granülosit makrofaj koloni uyarma faktörü
MCP-1 veya CCL2:	Monosit kemoatraktan protein-1
FGF:	Fibroblast büyüme faktörü
BMP:	Kemik morfogenetik proteini
C vitamin	Askorbik asit
COX-2	Siklooksijenaz-2
HGF:	Hepatosit büyüme faktörü
PDL-1	Programlanmış ölüm ligandı 1'in
SOCS1	Sitokin sinyalleme 1'in
CCL:	CC kemokin ligandı
MCP-1:	Monosit kemotaktik protein 1

RANTES:	Aktivasyona göre düzenlenir, normal T hücresi ifade edilir ve salgılanır
VEGF:	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
ICAM:	Hücreler arası yapışma molekülü
Mak:	Makrofajlar
Nöt:	Nötrofiller
Th:	T yardımcıları
Tregler:	T düzenleyici hücreler
Tr1:	T düzenleyici 1
Mo:	Monositler
Eo:	Eozinofiller
Bazo:	Bazofiller
Ly:	Lenfositler
EC:	Endotel hücreleri
PL:	Plazma hücreleri

ÖZET

Erol. A (2022). Mezenkimal Kök Hücreler ve İmmün Sistem Arasındaki İlişkinin İn vitro Koşullarda Değerlendirilmesi

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji, ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Mezenkimal kök hücreler (MKH)'lerin klinik uygulamalarından önce hücrelerin immünmodülatör özelliklerinin belirlenmesi gerekmektedir. Çalışmamızda MKH'lerin immün sistem hücreleri tarafından salgılanan sitokinlere olan etkisinin belirlenmesi hedeflendi.

Periferik kan mononükleer hücreler (PKMH) ve MKH ko-kültür öncesi ve sonrası CD4+ T hücrelerin hücre içi sitokin seviyeleri (İnterlökin-4 (IL-4), İnterferon- γ (IFN γ), and İnterlökin-17 (IL-17)) akım sitometri ile tespit edildi. Aynı zamanda Tümör büyüme faktörü (TGF)- β , IL-4, IL-17, IFN γ süpernatant sitokin seviyeleri ELISA ile ölçüldü. Çalışmamızda MKH'ler kordon kanı (KK) ve Wharton Jeli'nden (WJ) izole edilmiş olup plastik adherent olmaları mikroskopta ve yüzey belirteçleri (CD44 (%100), CD73 (%99,6), CD90 (%100), CD105 (%88)) akım sitometri yöntemiyle gösterilmiştir. Çalışmada, ko-kültür MKH/PKMH 1/5 ve 1/10 oranlarında, 24 saat ve 72 saat inkübasyon süreleri hem KK hem de WJ MKH'leri kullanıldı.

Çalışmada KK-MKH'lerle stimule edilen PKMH'leri ko-kültür sonuçları kültür öncesiyle karşılaştırıldığında farklı immünmodülatör özellikler gösterdikleri bulunmuştur. Pro-inflamatuvar sitokinlerden IFN γ ve IL-17 hem KK-MKH hem de WJ-MKH ve PKMH ko-kültürü sonrası hücre içi seviyeleri artış gösterirken süpernatanttaki sitokin seviyeleri anlamlı derecede düşmüştür ($p<0,05$). Anti-inflamatuvar sitokinlerden IL-4'ün ko-kültür sonrası hücre içi seviyesi anlamlı derecede artarken süpernatantta anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$). Anti-inflamatuvar sitokin olan TGF- β 'ın ise süpernatanttaki seviyesi hem KK-MKH hem de WJ-MKH için anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$).

MKH ve immün sistem hücrelerinin interaksyonu karmaşık bir süreci başlatmaktadır. Kordon kanı ve WJ-MKH ile PKMH'ler arasındaki ilişkilerin belirlendiği bu çalışma ile MKH'lerin uygulanma öncesi ve sonrasında pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar özellikleri tespit edilerek en uygun MKH kaynağının seçilmesi ve immünmodülasyon etkilerinin belirlenmesi açısından klinik çalışmalara ışık tutacaktır.

Anahtar Kelimeler: Göbek Kordon Kanı, Göbek Kordon Dokusu, İmmün Sistem Hücreleri, Mezenkimal Kök Hücre, İmmunomodülasyon

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 37060

ABSTRACT

EROL A. (2022). **Evaluation of the Relationship Between Mesenchymal Stem Cells and Immune System in In vitro Conditions**

İstanbul University, Institute of Health Science, Medical Biology Department.
Doctorate Thesis. İstanbul.

Determination the immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells (MSCs) is necessary before clinical applications. In this study, it was aimed to determine the effect of MSCs on cytokines secreted by immune system cells.

Intracellular cytokine levels (Interleukin-4 (IL-4), Interferon- γ (IFN γ), and Interleukin-17 (IL-17)) detected by akım cytometry before and after co-culture between peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and MCSs. At the same time, tumor growth factor (TGF)- β , IL-4, IL-17, IFN γ supernatant cytokine levels were measured by ELISA. In our study, MSCs were isolated from cord blood (CB) and Wharton's Jelly (WJ), and their plastic adherence was observed under the microscope and surface markers (CD44 (100%), CD73 (99.6%), CD90 (100%), CD105 (88%)) shown by akım cytometry method. In the study, both CB and WJ-MSCs were used in co-culture MSC/PBMC ratios of 1/5 and 1/10, incubation times of 24 hours and 72 hours.

In this study, it was found that PBMCs stimulated with CB-MSCs showed different immunomodulatory properties when the results of co-culture were compared with those before culture. While the intracellular levels of pro-inflammatory cytokines IFN γ and IL-17 increased after both CB-MSC and WJ-MSC and PBMC co-culture, cytokine levels in the supernatant decreased significantly ($p<0.05$). Among the anti-inflammatory cytokines, IL-4 increased significantly after co-culture, but decreased significantly from the supernatant ($p<0.05$). The level of TGF- β , which is an anti-inflammatory cytokine, in the supernatant was significantly decreased for both CB-MSC and WJ-MSC ($p<0.05$).

It was reached with the results obtained, the effects of cord blood and WJ-MSC on PBMC were determined and the pro-inflammatory and anti-inflammatory properties of MSCs were determined before and after the application, contributing to the scientific platform. The interaction of MSC and immune system cells initiates a complex process. Therefore, more comprehensive studies are needed to select the most appropriate MSC source and to determine its immunomodulation effects for future clinical researches.

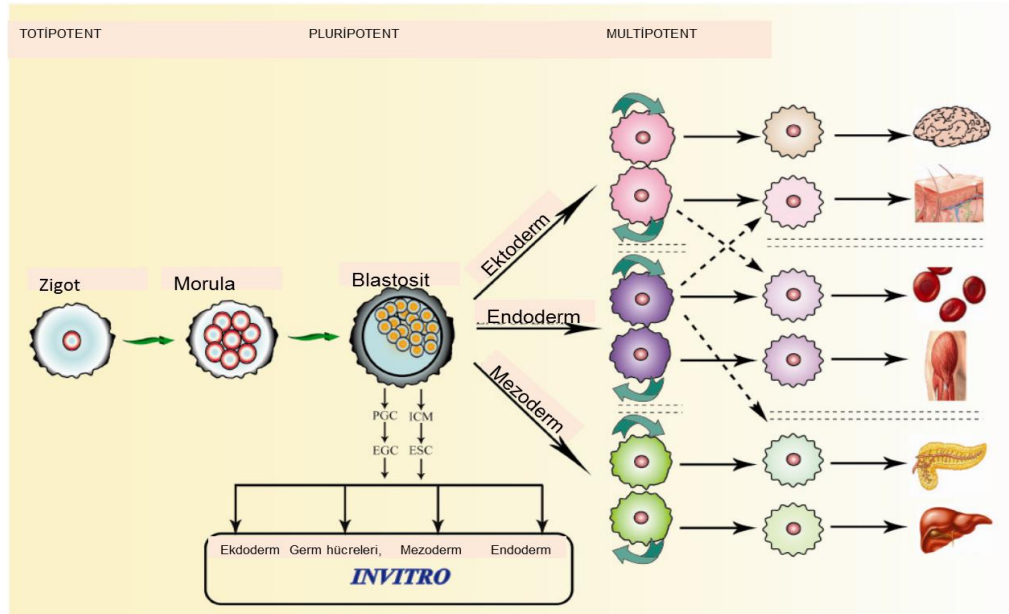
Key Words: Umbilical Cord Blood, Umbilical Cord Tissue (Wharton Jelly), Immune System Cells, Mesenchymal Stem Cells, Immunomodulation

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 37060

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Canlı vücudunda sınırsız çoğalma, rejenerasyon ve plastisite yetenekleri olan hücelere kök hücreler denir. Farklılaşma kapasitelerine göre de totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent olarak sınıflandırılırlar. Totipotent hücreler farklılaşma kapasiteleri (her türlü doku ve organa dönüşme yetenekleri) en fazla olan ve ilk dört günlük embriyonik dönemde bulunan kök hücrelerdir. Pluripotent kök hücreler embriyo içinde 5-6. günden itibaren sinir dokusu, beyin, iç organlar, kemik ve kıkırdak, kan yapıcı sistem, deri, bağ dokusu, yağ dokusu gibi sistemlerin gelişmesini sağlayan 3 embriyonik germ tabakalarına (Ektoderm, Endoderm, Mezoderm) farklılaşabilme özelliğine sahiptir. Multipotent kök hücreler ise, farklı hücre tiplerine daha sınırlı farklılaşabilme potansiyeline sahiptir (Şekil 1-1) (1-4).

Kök hücreler elde edildikleri kaynağa göre embriyonik kök hücreler (insan embriyonik kök hücreler, amniyonik epitelyal kök hücreler (erken gelişim sürecinde blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilir)) ve embriyonik olmayan kök hücreler (erişkin kök hücreleri; (hematopoetik, mezenkimal, nöral, pankreatik, deri kök hücreleri) ve göbek kordonu kök hücreleri) olarak iki gruba ayrılır (2,5,6).



Şekil 1-1: Kök hücre farklılaşmaları

"Ramakrishna V., Janardhan P. B., Sudarsanareddy L., Stem Cells and Regenerative Medicine – A Review. Annual Review & Research in Biology, 2011;1(4): 79-110".

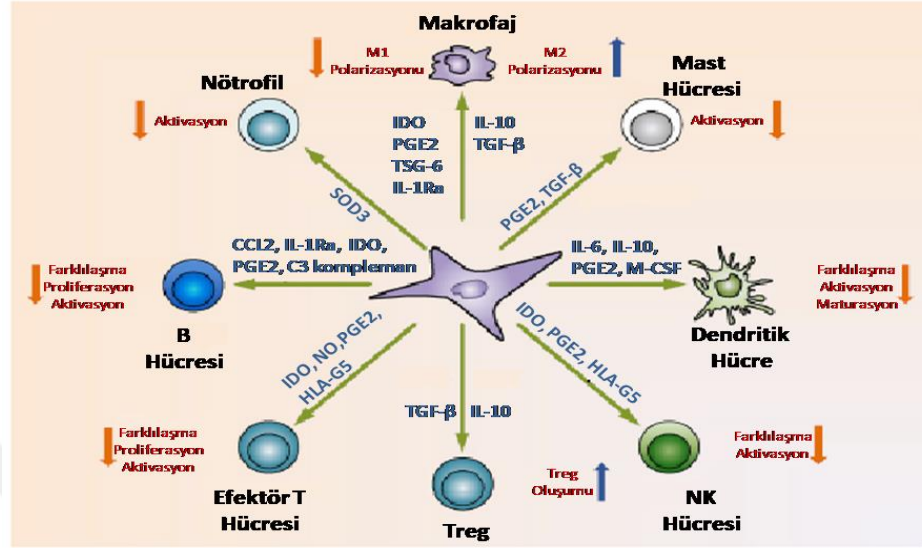
Rejeneratif tıpta yeni terapötik protokollerin geliştirilmesi için kapasiteleri ve her dokuya dönüşebilmeleri nedeniyle embriyonik kök hücrelerin kullanılması gerektiği bilim adamları tarafından vurgulansa da etik ve ahlaki tartışmalardan dolayı alternatif kök hücre kaynakları tercih edilmektedir. Göbek kordon kanı ve dokusu, bu uygulamalar için önemli ve kolayca temin edilebilen birer kök hücre kaynağıdır (7-9).

Kordon kanı ve dokusu, kök hücreleri mezenkimal kök hücreler (MKH) açısından zengin olan multipotent kök hücrelerdir. MKH'ler kendini yenileme kapasitesine sahiptir ve birçok farklı dokudan izole edilebilirler. Bu dokular arasında kemik iliği, adipoz doku, göbek kordon kanı, periferik kan, dermis, karaciğer, deri ve iskelet kası" bulunmaktadır (10,11). Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (ISCT) mezenkimal kök hücreleri tanımlamak için minimum kriterler (plastik adherent, spesifik yüzey belirteçlerinden CD73, CD90, CD105 ifade ederken; CD14, CD34, CD45, Human Lökosit Antijen (HLA)-DR ifade etmemektedir, in vitro ortamda osteoblast, adiposit ve kondrositlere farklılaşabilirler) belirlemiştir (12,13).

Mezenkimal kök hücreler rejeneratif tıp ve immün sistem için yeni bir bakış açısı getirmiştir. İzole edilmeye elverişlidir, kendini yenileme ve farklılaşma yeteneklerine sahiptirler. Birçok çalışma, MKH'lerin uygulanması yoluyla karaciğer, böbrek, kalp ve pankreas dahil olmak üzere birçok doku rejenerasyonunda başarılı olduğunu bildirmiştir (14-18). En önemlisi, MKH'ler, immün-düzenleyici özellikleri yoluyla doku yenilenmesini ve çeşitli immün sistem hücrelerini modüle eder. Bu etkileşimler doğrudan hücre-hücre teması veya çeşitli büyüme faktörleri ve immünomodülatör faktörlerden oluşan spesifik sekretomlar yoluyla meydana gelir. MKH, immün cevabı dengeleyebilme ve bu cevabın profillerini düzenleyebilme yetenekleri sebebiyle immün sistem ile ilişkili çeşitli hastalıkların tedavisine yönelik çalışmalarda tercih edilmektedir (19,20). Göbek kordon kanı ve dokusu MKH'leri, daha belirgin bir sitokin sekresyon profili sergilerler ve ürettikleri birçok büyüme faktörü ve sitokinler nedeniyle immünsüpresif ve trofik etki potansiyeline de sahiptir (21-23). MKH'ler ayrıca T hücreleri, B hücreleri, NK hücreler ve antijen sunan hücreler (ASH) gibi immün sistem hücrelerin çoğalmasını ve kompleman sistem aktivasyonunu baskılayarak immün cevabı azaltırlar (23,24).

Mezenkimal kök hücrenin immün sistemi düzenlediği mekanizma hala bir tartışma konusudur. En çok çalışılan, immünsüpresif faktörler arasında indoleamin-pirol 2,3-dioksijenaz (IDO), prostaglandin E2 (PEG2), transforme edici büyüme faktör-γ

(TGF- γ) ve nitrik oksit (NO) bulunur (Şekil 1-2) (18,25-28). Bu çözünür faktörlerin salgılanması MKH'nin mikroçevresine bağlıdır.



Şekil 1-2:MKH'nin immünomodülasyon mekanizmaları

"Na Li, Jinlian Hua. Interactions between mesenchymal stem cells and the immune System. Cell. Mol. Life Sci. 2017 Jul;74(13):2345-2360"

Mezenkimal kök hücrenin, daha düşük seviyelerde interlökin-2 (IL-2), IFN- γ , TNF- α ve daha yüksek konsantrasyonlarda IL-4, IL-5, IL-10 ve IL-13 ile karakterize edilen, Th1 aracılı immün cevabından Th2 immün cevabına geçişe aracılık ettiği bildirilmiştir (25,29,30).

Bu bilgiler ışığında, bu çalışmada, MKH'nin immün sistem hücrelerine olan etkisi araştırıldı. PKMH ve MKH ko-kültür öncesi ve sonrası CD4⁺ T hücrelerin hücre içi sitokin seviyeleri (IL-4, Interferon- γ (IFN- γ) ve IL-17A) akım sitometri ile tespit edilmesi ve TGF- β , IL-4, IL-17A, IFN- γ süpernatant sitokin seviyeleri ELISA ile teyit edilmesi amaçlandı.

MKH ve immün sistem arasındaki ilişkiyi belirleyen mekanizmalar hala tam net ortaya konulamamıştır. Çalışmanın sonunda elde edilen sonuçlar ile MKH'lerin immünomodülatör özelliklerinin belirlenmesi, MKH'lerin özellikle immün sistem hastalıkları üzerine olan etkilerinin araştırılması ve gelecekte klinik çalışmalar için bir ön çalışma olarak ilk basamağın aşılması amaçlandı. Bu etkileşimlerin aydınlatılması, bir çok immün sistem hastalığın tedavisinde mezenkimal kök hücrelerin etkin bir şekilde uygulanması için kilit öneme sahiptir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücreler

Sınırsız çoğalma, rejenerasyon ve başka hücelere farklılaşabilen hücelere kök hüceler denmektedir (1,2). Kök hüceler spesifik uyarı almadan doku hücelerine dönüşmemektedir. Kök hücelerin ihtiyaca göre ve kontrollü bir şekilde aldıkları sinyallerle genleri uyarılarak özelleşmiş bir hücreye dönüşümü sağlanır (31). Kök hücelerin yeteri miktarda bulunmaları, kolay elde edilmeleri, çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilmeleri, tedavilerde kişinin kendi hücelerinden alınıp yine kendisine tedavi amaçlı verilebilmesi veya kişiden kişiye hücre tedavisinin güvenli ve etkili uygulanabilirliği özelliklerinden dolayı rejeneratif tıp çalışmalarında tercih sebebidir ve önem kazanmıştır (3,4,32).

2.1.1. Kök Hücelerin Tarihçesi

1950’lerde hematopoetik kök hücelerin keşfedilmesiyle birlikte kök hücre çalışmaları başlamış ve devamında günümüze kadar gelmiştir (33). 1957 ilk hematopoetik kök hücre nakli Donnall Thomas tarafından gerçekleştirilmiş olup 1990 yılında Nobel ödülüne layık görülmüştür (34). Ülkemiz bilim adamlarından Prof. Dr.Süreyya Tahsin’in “Doğum sonrası atılan plasentalarla bulunan kordon hücelerinin kullanılması insan ömrünü uzatmanın yoludur” yönündeki söylemi ülkemizde bulunan kök hücre çalışmalarının öncüsü olmuştur. 1950-1960’larda çeşitli hastalıkların tedavisinde hayvanlarda fetal greftler ve kordon kanı greftleri kullanarak çalışmalar yapmış ve çeşitli tıp dergilerinde yayınlamıştır (35,36). Bilim dünyasında kök hücre çalışmaları için in vitro fertilizasyon merkezlerinden alınan embriyolardan elde edilen insan embriyonik kök hücelerinin üretilmesine yönelik çalışmalar da yapılmaya başlanmıştır. Embriyonik kök hüceleri ilk olarak 1981’de fare embriyolarından izole edilmiş ve “embriyonik kök hücre” kelimesi ilk olarak Gail R. Martin tarafından kullanılmıştır (37). Bununla birlikte, 1998’de Thomson ve ekibinin ilk kez insan embriyolarından insan embriyonik kök hücelerini izole etmek için kullandığı teknik ile dünya embriyonik kök hücreyi tanımaya başlamıştır (38,39,40). Bu çalışmalar ile kök hücelerin bazı hastalıklarda tedavi amaçlı kullanılmasının bilim dünyasında heyecan yaratması yanında çözümlenmemiş etik sorunlar çalışmaların önüne geçmiştir (41).

2.1.2. Kök Hücrelerin Karakteristik Özellikleri

Bir hücrenin kök hücre olarak tanımlanabilmesi için uzun süre bölünebilme ve kendi kendini yenileme yetenekleri olmalıdır (42). Bölünme sırasında kendi özelliklerine sahip yeni hücreler üretebilme kapasitelerinin yanı sıra kendi yedeğini de bölünme sırasında oluşturur. Kök hücrenin kendini yenilemesi; simetrik bölünme, asimetrik bölünme, mikro çevre, adezyon molekülleri, hücreler arası bağlantılar, büyüme faktörleri ve sinyal yollarıyla birlikte devam ettirilir. Kök hücrenin asimetrik bölünmesi, hücrenin algıladığı iç ve dış sinyallerin dengesiyle gerçekleşir. Simetrik bölünmesi, doku onarımı, embriyonun gelişimsel sürecindeki gerekli hücreyi karşılayabilmek için gerekmektedir. Ayrıca kök hücreler in vivo şartlarda doku hasarının olmadığı durumlarda birden fazla hücre tipine farklılaşabilirler. İn vitro koşullarında da çeşitli dışardan verilen sinyallerle kök hücrelerden farklı hücreler oluşturulabilir (3,43).

Bir hücrenin farklılaşması olgun hücre olana kadar geçen tüm biyokimyasal ve fenotipik özelliklerin bütününe kapsar. Kök hücre farklılaşması gen ifadesinin kontrolü, yönlendirilmesi veya kendi kendini programlamasıyla gerçekleşir. Kök hücrelerin farklılaşması hücre içerisinde ve dışarısından gelen sinyallerle; asimetrik hücre bölünmesi, epigenetik mekanizmaların kontrolü, sitoplazmadaki farklılıklar sinyal yollarının kombine etkisiyle gerçekleşir (32).

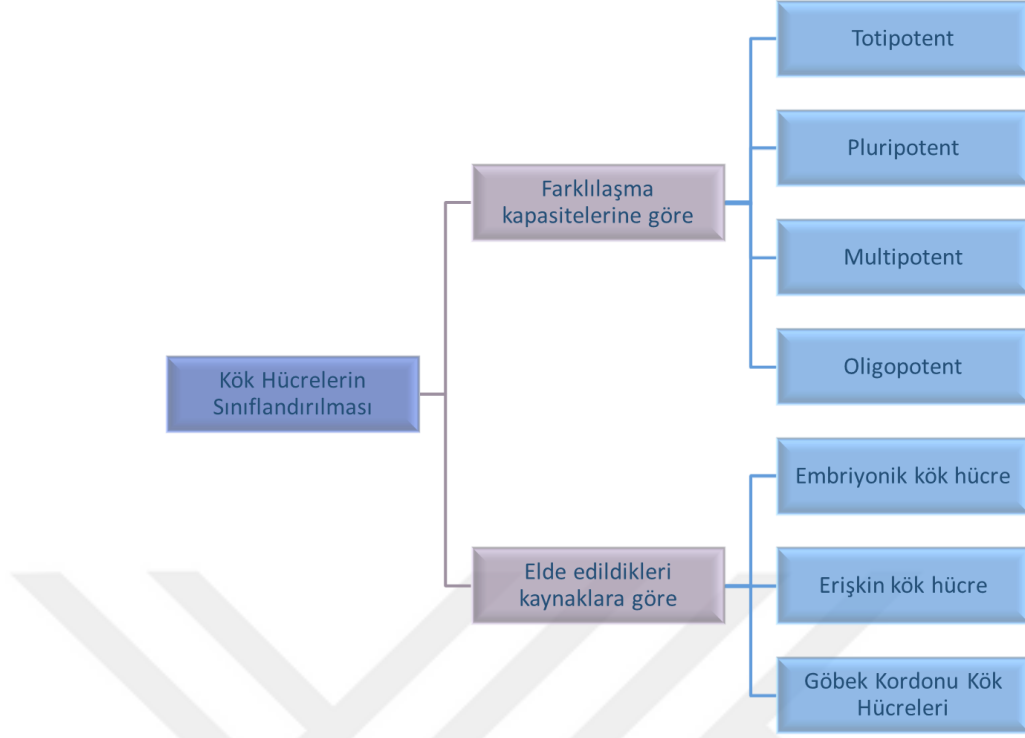
Kök hücreler farklılaşma kapasitelerine göre sırasıyla “totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent” olarak sınıflandırılırlar. Totipotent hücreler her türlü doku ve organa dönüşme yetenekleri olan embriyonik dönemde bulunan kök hücrelerdir. Pluripotent kök hücreler ise embriyo içinde 5-6. günden itibaren endoderm, mezoderm ve ektoderm tabakalarını oluşturan kök hücrelerdir. Multipotent kök hücreler ise, farklı hücre tiplerine daha sınırlı farklılaşabilme potansiyeline sahiptir (2-4). Köklülük terminolojisi, kök hücreleri diğer hücrelerden ayıran farklılıkları tanımlamak için kullanılır. Üç germ tabakaları ve türevlerine farklılaşabilme yeteneklerini gösterir (32, 44).

2.1.3. Kök Hücrelerin Sınıflandırılması

Embriyonik kök hücreler pluripotent özelliktedir ve üç embriyonik germ tabakasına farklılaşabilme yeteneğine sahiptirler. Embriyonik kök hücreler, bir blastosistin (çok erken bir embriyo) iç hücre kütesinden türetilir. Diğer yandan, yetişkin kök hücreler olarak da bilinen embriyonik olmayan kök hücreler sadece çok

potansiyellidir; farklı hücre tiplerine farklılaşma potansiyelleri daha sınırlı görünmektedir. Yetişkin hücreler, yerleşik dokuya özgü kök hücreler, kemik iliği kök hücreleri, embriyonik kök hücreler, indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin son zamanlardaki çıkış açan keşfi dahil olmak üzere, rejeneratif tıp için çok çeşitli hücre tipleri kullanılmaktadır (2,45,46).

Organizmanın yaşı ne olursa olsun gelişmiş dokuda bulunan kök hücrelere yetişkin kök hücreler denir. Yetişkin kök hücreler, farklılaşmamış hücrelerin çeşitli popülasyonlarını kapsar ve çoğu yetişkin dokuda bulunur ve bir organ veya dokunun normal döngüsü ve yenilenmesi sırasında rezervuar görevi görürler. Hem potensleri hem de proliferatif potansiyelleri tipik olarak embriyonik hücrelerden daha azdır. Yetişkin kök hücreler, milyonlarca hücreyle çevrili, organların derinliklerinde gizlidir ve gerektiğinde vücudun bazı hücrelerinin yenilenmesine yardımcı olabilir. Yetişkin bir kök hücre, birçok memeli dokusunda farklılaşmış hücreler arasında bulunan farklılaşmamış hücrelerdir, normal olarak kendi kendini yenileyebilen ve somatik hücreler üretebilen ve aynı zamanda mobilize olabilen, çoğalabilen ve farklılaşabilen kök hücre popülasyonlarını içerir. Yüksek çoğalma potansiyeli, önemli ölçüde kendi kendini yenileme kapasitesi, en az bir tür olgun fonksiyonel hücreye farklılaşma yeteneklerinden dolayı yetişkin kök hücrelerin hücre temelli tedavilerde kullanılması olasılığı, araştırmacılar tarafından aktif bir araştırma alanı haline gelmiştir (2,47,48) (Şekil 2-1).

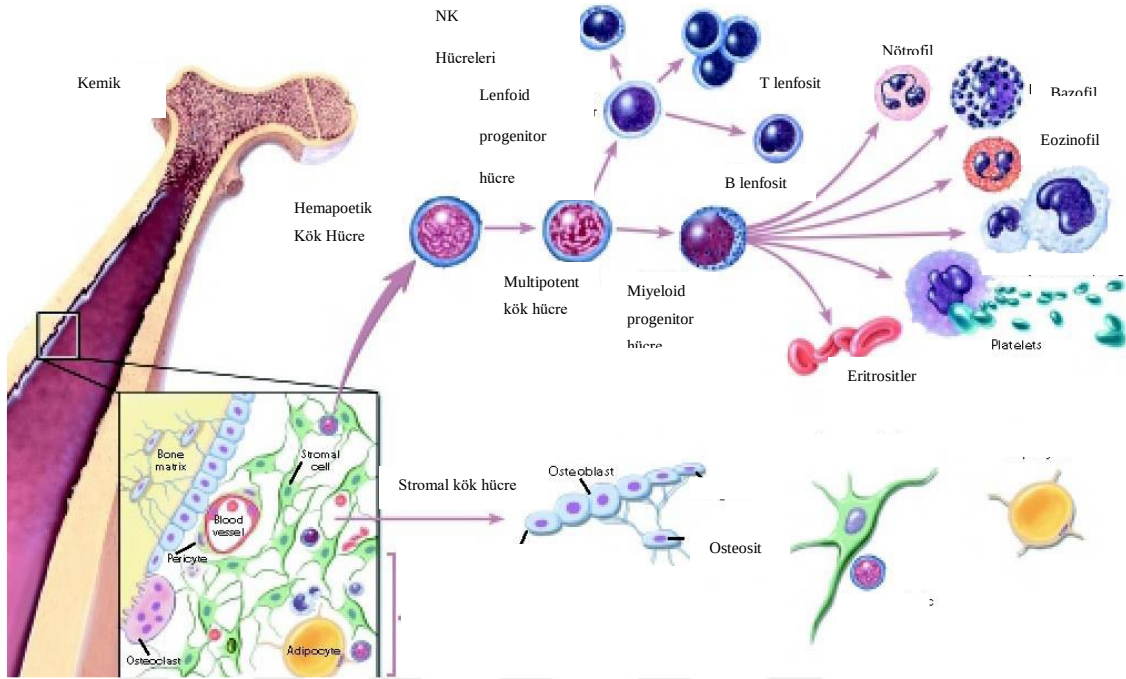


Şekil 2-1: Kök hücre sınıflandırılması

Yetişkin kök hücre sınıfına giren hematopoetik ve mezenkimal kök hücreler, hücresel tedavilere yönelik çalışmalarda en çok kullanılan hücre grubudur.

2.1.4. Mezenkimal Kök Hücreler

Yetişkin kök hücre araştırmalarının tarihi yaklaşık 50 yıl önce başladı. 1950'lerde araştırmacılar, kemik iliğinin en az iki tür kök hücre içerdiğini keşfettiler. Hematopoetik kök hücreler adı verilen bu popülasyon, vücuttaki tüm kan hücresi türlerini oluşturur. Birkaç yıl sonra, kemik iliği stromal kök hücreleri (ayrıca mezenkimal kök hücreler veya bazıları tarafından iskelet kök hücreleri olarak da adlandırılır) olarak adlandırılan ikinci bir popülasyon keşfedildi. Bu hematopoetik olmayan kök hücreler, kemik iliğindeki stromal hücre popülasyonunun küçük bir bölümünü oluşturur ve kemik, kıkırdak, yağ, kan oluşumunu destekleyen hücrelerdir ve fibröz bağ dokusu üretebilirler (Şekil 2-2) (2,45,46).



Şekil 2-2: Hematopoetik ve stromal hücrelerin farklılaşması

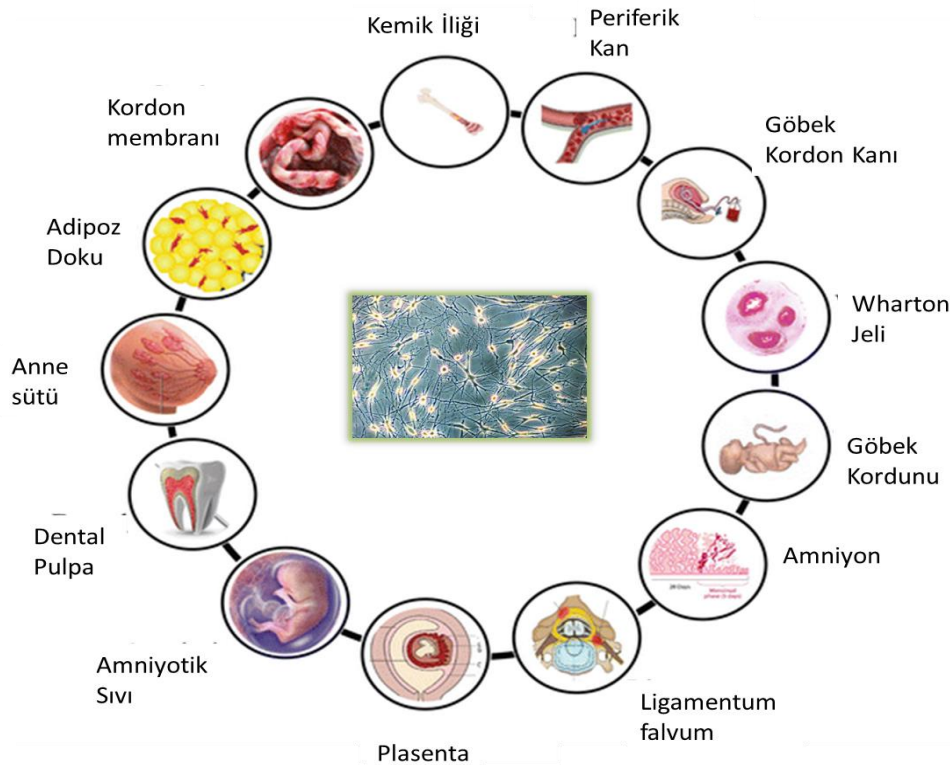
"Bryder, David, Derrick J. Rossi, and Irving L. Weissman. "Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell." *The American journal of pathology* 169.2 (2006): 338-346".

Mezenkimal kök hücrelerin, fare kemik iliği stromasının başka bir dokuya nakledilerek burada yağ, kıkırdak, kemik ve retikulum hücrelerine dönüşebildiği gösterilmiştir. Böylece kemik iliğinde hematopoetik kök hücrelerin dışında kök hücrelerin varlığı anlaşılmış ve bu hücreler fibroblastların öncüsü olarak tanımlanmıştır. 1999 yılında Pittenger ve ark. bu hücrelerin çoğaltılmaları ve farklılaşabilmeleri ile ilgili çalışmış ve in vitro ortamda adiposit, kondrosit ve osteoblasta farklılaştırmışlardır. MKH'lerin farklılaşması, TGF- β , fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve kemik morfogenetik proteini (BMP) gibi büyüme faktörleri ve sitokinler, deksametazon gibi hormonlar aracılığıyla gerçekleştirilir. Askorbik asit (C vitamini) ve β -gliserofosfat gibi kimyasallar da hücresel yanıtta çok önemli bir rol oynar. Ayrıca, Notch, Wnt, BMP gibi ana sinyal yollarının ve Runt homoloji alanı transkripsiyon faktörü (Runx) gibi transkripsiyonel faktörlerin hücre kaderinde rol oynadığını tanımlanmıştır (11,49).

Mezenkimal kök hücreler, mezoderm tabakasından köken almaktadır ve kemik iliği, adipoz doku, göbek kordonu, kordon kanı, fetal, beyin, diş pulpası gibi dokularda bulunan farklılaşmamış, yüksek çoğalma ve farklılaşma potansiyeline sahip hücrelerdir (Şekil 2-3). Farklılaşma potansiyellerinin yanında salgıladıkları sitokin ve bazı solubl faktörlerle immün baskılayıcı ve doku yenilenmesi etkileri bulunmaktadır (19). İnsan

yetişkin mezenkimal kök hücreleri hematopoetik olmayan, kendi kendini yenileme yeteneğine ve farklılaşma potansiyeline sahip adherent fibroblast benzeri hücrelerdir. Elde edildikleri kaynakların heterojen hücre toplulukları içermesi nedeniyle mezenkimal kök hücre karakterizasyonu ve sınıflandırılabilmesi için Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği tarafından bazı kriterler belirlenmiştir (12).

Bu kriterlere göre; in vitro koşullarda kültüre edilen MKH, plastik yapışık hücrelerdir (adherent), tek tabakada büyür ve iğ şeklinde bir morfolojiye sahiptir. Şimdiye kadar, MKH için CD29, CD44, CD73 (SH3/4), CD90 (Thy-1), CD105 (SH2), CD106 (VCAM-1), CD166 (ALCAM) ve HLA sınıf I hücre yüzeyi belirteci olarak tanımlanmıştır. Buna karşılık, CD14, CD31 veya CD45 gibi hematopoetik veya endotelial yüzey belirteçlerini ifade etmez. Diğer bir sınıflandırma kriteri; MKH'ler in vitro koşullarda kemik, yağ ve kıkırdak dokuya dönüşebilme potansiyellerine sahip olmalarıdır. Ek olarak, MKH'nin düşük immünojenik bir fenotipe sahip olduğu, yani HLA sınıf I'in düşük ifadesine sahip olduğu ve HLA sınıf II ile CD80 ve CD86 gibi yardımcı uyarıcı moleküllerin bulunmadığı öne sürülmüştür. Bu immünofenotip, MKH'yi potansiyel olarak immün ayrıcalıklı kılar (11,12,51,52). Mezenkimal kök hücreler aynı zamanda nestin, endotelial hücre belirteci olan CD146, CD105, TGF- β ve çeşitli integrinler ifade edebilir (52,53).

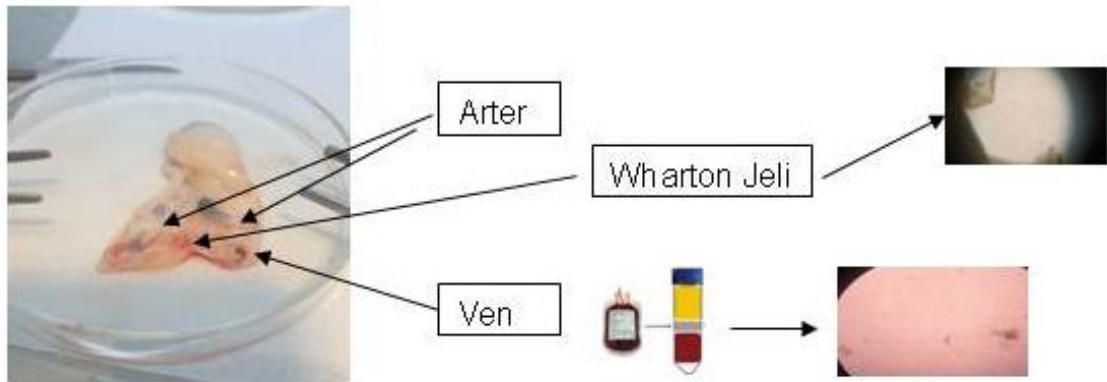


Şekil 2-3: Mezenkimal kök hücre kaynakları

2.1.4.1. Kordon Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücreler, kemik iliği, periferik kan ve yağ dokusu dahil olmak üzere çeşitli dokulardan ve ayrıca göbek kordonu kanı ve göbek kordonu dokusu gibi yenidoğan dokularından izole edilebilir. Elde edildikleri kaynaklara bakıldığında en çok koloni oluşturma yeteneği olan adipoz kaynaklı MKH'ler olduğu, en iyi izole edilebilene göre kemik iliği ve yağ dokusunun kordona göre daha başarılı olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Kemik iliği MKH elde edilmesi için uygun bir kaynak olmasına rağmen invaziv olması, farklılaşma potansiyellerinin yaşla birlikte azalması farklı kaynaklardan MKH elde edilmesini gündeme getirmektedir. Kordon kanı ve kordon dokusu non-invaziv olması, aynı morfolojik ve karakteristik özelliklere sahip olmaları ve yüksek plastisite yetenekleri yönünden alternatif MKH kaynağı olarak çalışılmaktadır (21).

Mezenkimal kök hücre çalışmalarının başlarında, göbek kordonu kanının ve dokusunun çok sayıda MKH içerip içermediği tartışmalıydı. Çalışmalar, göbek kordonu damarının alt endotel tabakasının in vitro olarak yeterli miktarlarda üretilen MKH'ler içerdiğini bildirmiştir (Şekil 2-4).



Şekil 2-4: MKH kaynağı olarak kordon dokusu (Wharton Jeli) ve kordon kanı

Göbek kordon kanının hematopoietik kök hücreler için bir kaynak olduğu ve kordon kanının transplantasyonu ve korunmasının 1990'ların sonlarından beri klinik uygulamanın bir parçası olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir. Geleneksel olarak, göbek kordon dokusu doğumdan sonra bir atık ürün olarak kabul edilir. Bu nedenle MKH'leri göbek kordon dokusundan izole etmek için etik bir tartışma yoktur. Morfolojik olarak, MKH'ler, uzun ve ince küçük bir hücre gövdesi ile karakterize edilir. Hücre gövdesi, homojen olarak dağılmış kromatin ile çevrili belirgin bir nükleolusa

sahip büyük, yuvarlak bir nukleus içerir. Sitoplazma, az sayıda Golgi aygıtı, endoplazmik retikulum, mitokondri ve poliribozomları içerir (55).

Morfoloji, immünofenotip, çoğalma ve çok yönlü farklılaşma özellikleri yönünden kordon kaynaklı MKH'ler diğer MKH kaynaklarına benzemektedir. Ancak kordon kaynaklı mezenkimal kök hücreler diğer MKH kaynaklarına göre daha yüksek proliferatif kapasiteye ve daha düşük HLA ifadesine sahiptir (21,56,57).

Kordon dokusu; yağ dokusu ve kemik iliği MKH'lerden üç ile dört kat daha fazla çoğalma potansiyeli sergilemektedir. Mennan ekibinin raporu, WJ-MKH'lerin nerden izole edildiğine bakılmaksızın çoğalma oranında önemli bir fark olmadığını ve WJ-MKH'lerin P0 ve P3 arasındaki ortalama iki katına çıkma süresinin 2-3 gün olduğunu ve kemik iliği MKH'lerden önemli ölçüde daha hızlı olduğunu göstermişlerdir. WJ-MKH'ler çok yönlü farklılaşma yeteneğine ve kemik, yağ, kıkırdak ve diğer dokulara farklılaşma potansiyeline sahiptir, bu nedenle çeşitli doku ve organları onarmak için kullanılabilir ve rejeneratif tıp alanında ideal hücreleridir. Çalışmalar, vücut dokularının iskemi-anoksi hasarları veya kronik inflamasyon hasarları olduğu durumlarda, hasarlı dokunun kemokinleri serbest bıraktığını, mobilize olduğunu ve MKH'lerin yaralanma bölgesine göçüne rehberlik ettiğini göstermiştir. İn vitro kültürde, WJ-MKH'ler belirli koşullar altında transdiferansiye olabilir, osteoblastlar ve kardiyomiyositler gibi mezoderm hücreleri, endotelial hücreler, hepatositler ve pankreatik hücrelere farklılaşabilirler. WJ-MKH'lerin düşük immünojenitesi, yüksek proliferasyonu ve farklılaşma potansiyelinden dolayı hücre replasman tedavisi için uygun hücreler olduğu düşünülmektedir (58,63).

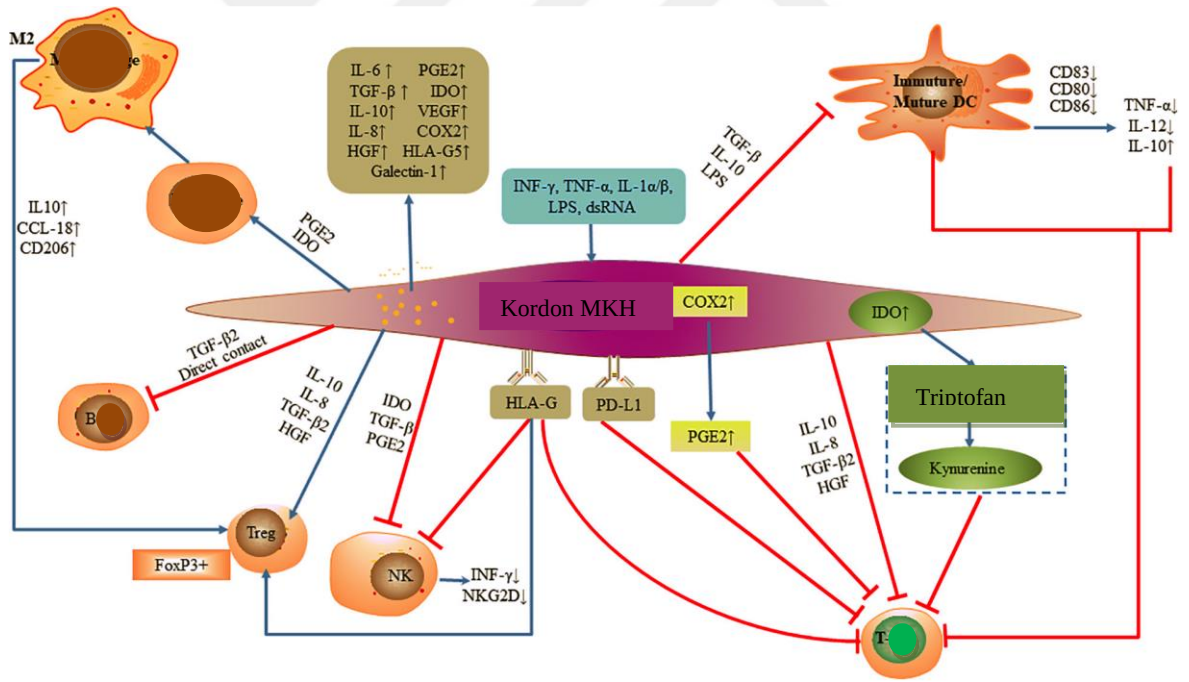
2.1.5. Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmün Düzenleyici Özellikleri

Organizmada immünolojik toleransın ve immün homeostazın sürdürülmesi, karmaşık bir immün düzenleme sürecinin kontrolü altındadır. İşlev bozukluğu, otoreaktif ve potansiyel olarak yaşamı tehdit eden koşulların gelişiminde kritik bir faktördür. Bu immün düzenleyici sürecin altında yatan kesin mekanizmaların derinlemesine anlaşılması, özellikle otoimmün hastalıklar ve diğer tüm hastalıklar için daha uygun ve verimli bir tedavi geliştirmeye zemin hazırlayabilir. MKH'ler tarafından immün yanıtın düzenlenmesine bir dizi hücre alt tipi ve salgılanan faktör aracılık eder.

Son zamanlarda çeşitli inflamatuvar ve otoimmün hastalıkların tedavisi için başarılı stratejiler olarak yeni hücre temelli terapötik yaklaşımlar ortaya çıkmıştır. Bir

tür yetişkin kök hücre olan mezenkimal kök hücreler, benzersiz immünomodülatör özellikleri, kendi kendini yenileme ve çok potansiyelli farklılaşma kapasitesi nedeniyle son derece umut verici hücre terapötik ajanları olarak büyük ilgi görmektedir. MKH'lerin, başta sitokin ve kemokin salgılaması olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla doğuştan gelen ve edinilmiş immün sistemlerinin hemen hemen tüm hücreleri üzerinde derin anti-inflamatuvar ve immünomodülatör etkiler uyguladığı gösterilmiştir (64,65).

Mezenkimal kök hücreler, T hücre, B hücre, NK hücre, makrofajlar, monositler, dendritik hücre, ve nötrofillerle direkt hücre-hücre bağlantısı kurarak veya parakrin etkiyle hem doğal immün sistemi hem de adaptif immün sistemi etkileyebilirler (Şekil 2-5) (58).



Şekil 2-5: Göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerinin immünomodülatör işlevleri

“Yufeng Shang, Haotong Guan, and Fuling Zhou. Biological Characteristics of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells and Its Therapeutic Potential for Hematological Disorders. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. May 2021 | Volume 9 | Article 570179”.

Mezenkimal kök hücrelerin, karışık lenfosit kültür deneylerinde veya antijenik stimüle edilen T hücresi ile yapılan deneylerde T hücre aktivasyonunu ve proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (66). MKH'ler ayrıca CD34+ progenitör

hücresinin baskılanması ve monosit türevli dendritik hücre farklılaşmasının yanı sıra antijen sunma işlevlerinin inhibisyonu yoluyla dolaylı olarak T hücre yanıtlarını etkileyebilir (67). Bir dizi çalışma, MKH'lerin B hücresi proliferasyonunu, farklılaşmasını ve immünoglobulin üretimini in vitro inhibe etme ve ayrıca NK hücrelerinin proliferasyonunu, sitokin üretimini ve sitotoksitesini aşağı regüle etme kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir (68-70). Ek olarak, MKH'ler, düşük-orta düzeylerde HLA sınıf I antijenleri ifade ettikleri ve CD80, CD86 ve CD40 yüzey belirteçleri gibi ihmal edilebilir düzeyde düşük HLA sınıf II antijenleri ifade ettikleri için yalnızca alloreaktif T hücrelerinin tanınmasından değil, aynı zamanda sitotoksik T lenfositler (STL'ler) ve yeni izole edilmiş alloreaktif NK hücreleri tarafından hücreye özgü lizisten de kaçabilmektedirler (71). Bu in vitro özelliklerden bazıları, akut graft-versus-host hastalığı (GVHD), multipl skleroz ve sistemik lupus eritematozus gibi bozuklukların tedavisinde klinik olarak başarıyla kullanılmıştır (72-75).

Mezenkimal kök hücrelerin immünomodülasyonunun altında yatan kesin mekanizmalar hala tam olarak anlaşılmamış olsa da, sürece dahil olan bir dizi solubl faktör tanımlanmıştır. Farklı dokulardan izole edilen MKH'ler, bazı ince noktalarla birbirlerinden ayrılırlar. Bununla birlikte, farklı MKH türleri tarafından salgılanan sitokinlerin profillerindeki önemli farklılıkları açıklayan bir çalışma yoktur. Çoğu çalışma, çeşitli MKH kaynakları tarafından salgılanan sitokin seviyelerinde ya farklılıklar olmadığını ya da bazı nicel farklılıklar bulunduğunu bildirmektedir. MKH'ler sitokinleri ya spontan olarak ya da diğer sitokinler tarafından indüklendikten sonra salgılar, en önemlileri $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ ve $IL-1\beta$ 'dir. MKH'lerin her zaman immünosupresif olmadığını altı çizilmelidir. Etkilerinin mikroçevrenin koşulları tarafından belirlendiği ve bazen pro-inflamatuvar $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ ve $IL-1\beta$ sitokinlerinin anti-inflamatuvar immünosupresif faktörlerin salgılanmasını indükleyebileceği varsayılmaktadır. MKH'ler tarafından ifade edilen belirli Toll-benzeri reseptörlerin (TLR) devreye girmesi, bunların pro veya anti-inflamatuvar etkilerini belirleyebilir. Sitokinlerin pro veya anti-inflamatuvar olarak tanımlanması, gerçek etkilerinden oldukça uzaktır, çünkü her iki reaksiyon tipinde de yer almayan tek bir sitokin olmadığı görülmektedir (Tablo 2-1) (64,76,77).

Tablo 2-1: MKH tarafından salınan çözünen faktörler ve hedef hücreleri

MKH tarafından sekrete olan Sitokinler	Hedef Hücreleri
IL-10	Mak, Nöt, DH, Th1, Treg, Tr1, tümör hücreleri,
IL-6	Nöt, Mo, DH, B, Th2, Treg, Th17, CD8+
TGF- β	Mak, NK, DH, B,T,Treg
Kemokinler	Nöt, Mo, NK, Eo, Bazo, DH, Ly
CCL-2/MCP-1	Mak, EC, PL, Th2, Th17
CCL-5/Rantes	Nöt, Mo, DH, Th1, Treg, CD8+
IDO	Mo, DH, B, T, Treg
VEGF	DH, EC, Th1, Th17, Treg
ICAM	T, MKH
PGE2	Mak, Mo, NK, DH, T, Tr1

TGF β : Dönüştürücü büyüme faktörü β ; CCL: CC kemokin ligandı; MCP-1: Monosit kemotaktik protein 1; RANTES: Aktivasyona göre düzenlenir, normal T hücresi ifade edilir ve salgılanır; IDO: İndoleamin-2,3-dioksijenaz; VEGF: Vasküler endotelial büyüme faktörü; ICAM: Hücreler arası yapışma molekülü; PGE2: Prostaglandin E2; Mak: Makrofajlar; Nöt: Nötrofiller; DH'ler: Dendritik hücreler; Th: T yardımcıları; Tregler: T düzenleyici hücreler; Tr1: T düzenleyici 1; Mo: Monositler; B: B hücreleri; NK: Doğal öldürücü; T: T hücreleri; Eo: Eozinofiller; Bazo: Bazofiller; Ly: Lenfositler; EC: Endotel hücreleri; PL: Plazma hücreleri.

Mezenkimal kök hücreler, immün sistem yeterince etkin olmadığında inflamasyonu indükleyebilir veya immün sistem aşırı aktifken inflamasyonu inhibe edebilir. Bu aktivite aynı zamanda immün sistemin sensörü ve değiştiricisi işlevi olarak da bilinir. MKH'ler, TLR'ler aracılığıyla farklı sinyallerini algılayabilir. MKH'ler TLR2, TLR3, TLR4, TLR7 ve TLR9'u eksprese eder. TLR'ler, immün savunma sisteminin ilk basamağı olarak hareket eden hasarlı hücrelerden veya patojenlerden gelen molekülleri tanır. TLR aktivasyonu, immün hücrelerini ve MKH'leri daha da uyarabilir. Aktive

MKH'ler, TLR ligandlarına yanıt verir ve anti-inflamatuar faktörleri serbest bırakır. Bu nedenle TLR'ler, MKH'ler tarafından immün tepkilerini algılamada ve değiştirmede önemli bir rol oynar.

Kemik iliği ve göbek kordonundan elde edilen MKH'ler, IFN- γ ve TNF- α ile aktive edildiklerinde iNOS veya IDO salgılanması için uyarılır, bu da T hücre proliferasyonunun inhibisyonu ve Treg indüksiyonu ile sonuçlanır. Bu nedenle, iNOS veya IDO seviyesi, MKH'lerin pro- ve anti-inflamatuar etkileri arasında anahtar rolü olduğu vurgulanmaktadır (58).

İnsanlar üzerinde yapılan klinik deneylerde, immünmodülasyon için biyolojik bir ajan olarak MKH'lerin kullanılmasının umut verici olduğu vurgulanmıştır. Clinical Trials.gov'un (Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık Enstitüleri'nin bir hizmeti) internet sitesine göre, çeşitli kaynaklardan izole edilen mezenkimal kök hücrelerin klinik etkilerini değerlendirmek için 1000'den fazla klinik çalışma yürütülmektedir (78). “Ülseratif kolit, multipl skleroz, primer Sjögren sendromu, sistemik skleroderma, Crohn hastalığı” gibi otoimmün hastalıklarda otolog veya allojenik transplantasyon sonrası oluşan GVHD vb. gibi durumlarda MKH'lerin immünomodülatör etkisini araştıran çalışmaların sayısı giderek artmaktadır (64).

Genel olarak, bu çalışmalardan elde edilen veriler, MKH'lerin hem hücreden hücreye temas yoluyla hem de biyolojik olarak aktif maddeler, büyüme faktörleri, sitokinler ve kemokinler salgılayarak immünomodülatör etkiler sergilediğini göstermiştir (58).

2.1.5.1. Kordon Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmün Supresif Özellikleri

Mezenkimal kök hücrelerin immünosupresif işlevi güçlüdür ve neredeyse tüm immün sistem üzerinde farklı derecelerde etkilere sahiptir. MKH'ler, kısmen pro-inflamatuar faktörleri aşağı regüle ederek ve anti-inflamatuar faktörleri yukarı regüle ederek inflamasyon sürecini baskılayabilir. Bu immünosupresyonu açıklamak için hücre temasına bağımlı veya bağımsız olabildiği öne sürülmüştür (63,79,80). Aktive edilmiş T lenfositlerin proliferasyonunu ve inflamatuvar faktörlerin salgılanmasını, B lenfositlerinin proliferasyonunu ve immünoglobulinlerin salgılanmasını, NK hücrelerinin öldürme aktivitesini inhibe etmek ve monositlerin DH'lere farklılaşmasını engellemektir (81). Kordon kaynaklı MKH'ler, IL-6, IL-8, TGF- β , IDO, VEGF ve siklooksijenaz-2 (COX-2) ve PGE2, hepatosit büyüme faktörü (HGF), Galectin-1 ve

HLA-G gibi immünosupresyon için etkili faktörleri salgılar (63). IL-10, IL-6, IL-8, TGF- β 2 ve HGF gibi inhibitör sitokinlerin salgılanması Th17 hücrelerini inhibe eder ve Treg hücrelerini uyarır, ayrıca kordon kaynaklı MKH'lerIDO salgılayarak aktive edilmiş T hücrelerinin proliferasyonunu da inhibe edebilir. PGE2'nin yanı sıra programlanmış ölüm ligandı 1'in (PD-L1) de ekspresyonu düzenler (82). Kordon kaynaklı MKH'lerin ve fitohemagglutinin (PHA) ile uyarılan PKMH'ler ortak kültürü tarafından üretilen süpernatantlar ve hücreler, kordon kaynaklı MKH'ler içermeyen PHA ile uyarılan PKMH'ler ile karşılaştırıldığında, IFN γ 'nın önemli derecede ekspresyonunun azaldığı; PGE2, TGF- β 1 ve IL-10'nun büyük ölçüde ekspresyonunun arttığı, ayrıca CD4+CD25(yüksek)CD45RA+Treg'ler arttığı saptanmıştır. Kordon kaynaklı MKH'lerin, T hücre farklılaşmasını düzenleyerek ve ilişkili baskılayıcı sitokinlerin üretimini artırarak lenfosit proliferasyonunu engelleyebileceği öne sürülmüştür (83). Kordon kaynaklı MKH'ler tarafından COX-2 ekspresyonunun aşırı regülasyonu ayrıca hücre içi cAMP seviyelerini artırarak T hücresi proliferasyonunu doğrudan engelleyen PGE2 üretimine de katkıda bulunur. MKH'ler ayrıca, çevreden triptofanı ortadan kaldırarak T hücresinin çoğalmasını engeller ve IFN γ ile aktive olan T hücreleriniIDO tarafından inhibe eder, bu da sadece T hücresi çoğalmasını etkilemekle kalmaz, aynı zamanda CD8+ T hücreleri tarafından endojen IFN γ üretimini de azaltır. Kordon kaynaklı MKH'ler ayrıca klasik olmayan HLA sınıf I molekülü HLA-G'yi de ifade eder. HLA-G, çoklu T hücresi alt tiplerini düzenler: sadece T hücresi proliferasyonunu inhibe etmekle kalmaz, aynı zamanda sitotoksisiteyi ve hücre aracılı sitolizi de azaltır. Ek olarak, HLA-G molekülleri CD4+ CD25 yüksek FOXP3+ düzenleyici T hücrelerini indükleyebilir ve NK hücrelerinin komşu hücrelere sitolitik fonksiyonunu inhibe edebilir ve NK hücreleri tarafından IFN γ salgılanmasını aşağı regüle edebilir. Kordon kaynaklı MKH'ler ayrıca DH olgunlaşmasını bloke eden, TLR4 sinyalini bozarak immün toleransa yol açan sitokin sinyalleme 1'in (SOCS1) baskılayıcısının IL-6 aracılı yukarı regülasyonu yoluyla DH'leri tolerojenik fenotip elde etmeye teşvik eder. MKH, CD3+ T hücre proliferasyonunu ve inflamatuvar faktör salgılanmasını indüklenme kapasitesini önemli ölçüde azalttığı, Th2 yanıtlarını indüklenme yeteneği göstermektedir (58,84).

İmmün sistemi bileşenleri, konağı eksojen patojen istilasına ve endojen kanser gelişimine karşı korur. Yetersiz uyarılmış immün sistem hücreleri konağı koruyamaz. Bununla birlikte, aşırı uyarılma, konakçının sağlıklı hücrelerine ve dokularına saldırarak

doku veya organ tahribatına neden olur. Bu nedenle, immün yanıt farklı yollarla sıkı bir şekilde düzenlenmelidir. Bu düzenleyici ağın ayrıntılı mekanizmalarını ortaya çıkarmak, immün disfonksiyonla ilişkili hastalıkların patogenezi anlamak ve yeni tedavi stratejileri geliştirmek için kritik öneme sahiptir.

Mezenkimal kök hücrelerin, farklı uyaranlarla farklı etkiler gösterebilecekleri immün düzenleyici işlevlerini gerçekleştirebilecekleri konusunda genel bir sonuç çıkarılabilir. Bu işlevleri uygulayan mekanizmalardan biri, efektör immün hücrelerini doğrudan etkileyebilen sitokinlerin salgılanmasıdır. Buna ek olarak, sitokinleri salgılayan MKH'ler, ağırlıklı olarak dendritik hücreler ve Treg'lerin farklı alt tipleri dahil olmak üzere karmaşık çok yönlü etkileşimlerde yer alır. Umut vaat eden tüm araştırmalara rağmen, MKH ile yapılan klinik çalışmalarda, MKH popülasyonlarının immün sistem üzerindeki değişkenliğinden kaynaklanan belirsiz sonuçların varlığı çalışmaların ilerlemesine engel olmaktadır. Bu etkileşimlerin aydınlatılması, bir çok immün sistem hastalığının tedavisinde mezenkimal kök hücrelerin etkin bir şekilde uygulanması için kilit öneme sahip olabilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, “İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu’nun” 27/05/2020-85426 tarih ve sayılı izni ile onaylandı. Çalışmada kullanılan insan göbek kordon kanları ve göbek kordon dokusu “T.C.Sağlık Bakanlığı İstanbul Bakırköy Dr.Sadi Konuk Eğitim Araştırma Hastanesi Kadın-Doğum Polikliniği” olmak üzere sağlık açısından sorunsuz hamilelik geçiren ve herhangi bir kronik hastalığı olmayan anne adayının bilgilendirilmiş gönüllü olur formunu okuyup onaylamasından sonra resmi izinle temin edildi. Hücre kültürü çalışmalarının tümü “İstanbul Tıp Fakültesi Esnaf Hastanesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü Araştırma Laboratuvarında” yapıldı. Hücre kültürü sonrasında yapılmış olan deneyler İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Fatma Savran Oğuz'un izniyle Akım Sitometri Laboratuvarında yapıldı.

3.1. Çalışma Planının Özeti

Bu tez çalışmasında göbek kordon dokusu ve kanından elde edilen ve çoğaltılan MKH’lerin immün sistem hücrelerine olan etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla çalışmada;

- 1) İnsan göbek kordon kanından ve göbek kordon dokusundan (Wharton Jeli) izole edilen mezenkimal kök hücreler çalışmaya dahil edildi.
- 2) İnsan göbek kordon kanından ve göbek kordon dokusundan (Wharton Jeli) izole edilen mezenkimal kök hücreler akım sitometri ile karakterize edildi.
- 3) Sağlıklı İnsan PKMH içerdiği T yardımcı hücre alt grubu akım sitometride hücre içi sitokin seviyeleri IL-4, IFN- γ ve IL-17A akım sitometri ile tespit edildi.
- 4) Aynı zamanda TGF- β , IL-4, IL-17A, IFN- γ süpernatant sitokin seviyeleri ELISA ile teyit edildi.
- 5) İnsan göbek kordon kanından ve göbek kordon dokusundan (Wharton Jeli) izole edilen MKH ile PKMH ko-kültür yapılarak, MKH’lerin immün sistem üzerine etkileri in vitro olarak araştırıldı.

6) Ko-kültür sonrası hücre grubundan akım sitometri ile sağlıklı insan periferik kan mononükleer hücrelerin (PKMH) içerdiği hücre içi sitokin seviyeleri IL-4, IFN- γ , ve IL-17A akım sitometri ile tespit edildi.

7) Aynı zamanda ko kültür sonrası toplanan süpernatantlarda TGF- β , IL-4, IL-17A, IFN- γ sitokin seviyeleri ELISA ile tayin edildi.

Hücre kültürü çalışmaları, sterilizasyonu gerçekleştirilmiş ve tek kullanımlık kapalı ambalajlarda gelen hücre kültürü malzemeleriyle gerçekleştirildi. Hücre kültürü aşamaları laminar akımda steril koşullarda yapıldı.

3.2. Gerekli Malzeme ve Cihazlar

15 mililitre (ml) ve 50 ml falkon tüp

2 ml dondurma tüpü

1,5 ml mikrosantrifüj tüpü

Otomatik pipet (1000 μ l'lik)

Otomatik pipet ucu (1000 μ l'lik)

Otomatik pipet (10-100 μ l'lik)

Otomatik pipet ucu (10-100 μ l'lik)

3 ml'lik plastik pastör pipeti

10 ml'lik cam pastör pipeti

Steril pensler ve bistüri uçları

Heparinli kan alma tüpü (Yeşil kapaklı)

25cm²' lik hücre kültür flaskları

75cm²' lik hücre kültür flaskları

6 kuyucuklu plaklar

24 kuyucuklu plaklar

Thoma lamı

Lamel (22x22mm)

Doku Parçalama Makası

Doku Taşıma kabı

Invert Mikroskop

Işık Mikroskobu

Santrifüj (Heraeus-Labofuge-400R)

-80 derece derin dondurucu

+4 Buzdolabı

-20 derece derin dondurucu

Vorteks

CO₂ İnkübatörü-(New Brunswick-Galaxy-170R)

CO₂ Tüpü

Steril Kabin

Akım sitometri Cihazı (Beckman Coulter-Navios)

Akım sitometri test tüpleri

ELISA Plak Okuyucu (FlexA-200)

3.3. Gerekli Kimyasal, Solüsyon ve Kitler

Steril distile su

Steril eldiven

%0,5 tripan mavisi solüsyonu

RPMI-1640-(HyClone-AF29498412)

DMEM (BİOSERA-MS00FG100E)

Fötal Bovin Serum (FBS)- (HyClone-RE00000006)

Penisilin-Streptomisin-(HyClone)

Fikol paque (Biosera-MS00ET100J, Lymphocyte Separation Media)

PBS (Phosphate buffered saline)-(HyClone-AE29431651)

Trypsin 0.25% / EDTA-(HyClone)

Amphotericin B

Phytohemagglutinin (PHA-M)-(Biosera-MS00DQ1016)

Penicillin-Streptomycin-(HyClone)

Human Th1/Th2/Th17 Fenotip Kiti (BD- AB_2869360)

-Kit içeriği:

Th1/Th2/Th17 kokteyl (CD4 PerCP-Cy5.5; IL-17A PE; IFN-Gama FITC; IL-4 APC)

BD Cytotfix Fiksasyon Buffer

BD Perm/Wash Buffer

BD GolgiStop Protein Transport Inhibitor

Human MSC Analysis Kit (BD- AB_2869404)

-Kit içeriği:

MSC Pozitif Kokteyl: CD90 FITC, CD105 PerCP-Cy5.5, CD73 APC

MSC Negatif Kokteyl: CD45, CD34, CD11b, CD19, HLA-DR PE

CD44 PE

Human IFN-gamma ELISA Kit (Diacclone- 950.000.192)

Human TGF-b ELISA Kit (Abbkine-Ket6030)

Human IL-4 ELISA Kit (Diacclone-950.020.192)

Human IL-17A ELISA Kit (Diacclone-850.940.192)

3.4. Yöntemler

3.4.1. Örneklerin Toplanması

3.4.1.1. Kordon kanı örneklerinin toplanması, izolasyonu ve kültürü

1. Kordon kanları antikoagülan içeren yaklaşık 10 tüpe (Heparinli) alındı ve 24 saat içinde hücre kültürü laboratuvarında Fikol paque gradient yöntemi ile mononükleer hücreler izole edildi.
2. Fikol paque gradient yöntemiyle Kordon Kanından Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu

- a) Sezeryan doğum sonrasında göbek kordonundan heparinli tüpe aktarılan kan heparinli tüplere yetkili klinisyen tarafından aktarıldı. Her örnek için ortalama 50-60 cc kadar (7-8 adet 8 cc'lik heparinli tüplere) kan doğumhaneden sorumlu hekimden teslim alındı. En kısa süre içerisinde hücre kültürü laboratuvarına getirilen örnekler steril kabin içerisinde işleme alındı.
- b) 50 ml'lik steril falkonlara aktarılan kan örneği 1:1 oranında PBS solüsyonuyla karıştırıldı.
- c) 15ml'lik steril falkonlara 5cc fikol paque solüsyonu konuldu.
- d) PBS ve kordon kanı karışımı dikkatli ve yavaşça fikol üzerine yüklendi.
- e) 2600 rpm'de 20 dk santrifüj edildi (Santrifüj fren ayarı kapatılarak kullanıldı).
- f) Santrifüj sonrası fikolün üstüne toplanan buffy coat kısmı PKMH toplandı ve 15 ml falkon tüpe aktarıldı.
- g) 1400 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. santrifüj sonrası süpernatant kısmı döküldü.
- h) Peletin üzerine 12 ml hazırlanmış olan PBS konuldu.
- i) Hücreler mikroskopta sayıldı ve ortalama 12 milyon/ml elde edildi.
- j) PBS konulmuş tüp 1400 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatant döküldü, pelet tüpün dibinde kaldı.

3. İzole edilen mononükleer katman içindeki hücreler 75 cm² flasklara ekilerek daha önceden hazırlanmış %10 FBS, %1 lik pen/strep antibiyotikli DMEM besiyeri eklenerek, 37⁰ C'de %5 CO₂ inkübatörde çoğaltılmaya bırakıldı ve gerektiğinde medyum tazelendi. Ekim yapıldıktan 24 saat sonra kordon kanındaki diğer mononukleer hücrelerin uzaklaştırılması için medyum tazelendi.

4. Hücrelerin ortalama 7 günde yapıştığı gözlemlendi. Ortalama 20 günde %80-90 konfluent olan hücreler tripsinizasyonla kaldırılarak karakterizasyon için hazırlandı.

5. Deneyde kullanılmak üzere aynı işlem, alınan örneklerin hepsinde uygulandı ve aynı zamanda her karakterizasyon sonrası hücreler Pasaj 3'e kadar pasajlandıktan sonra deneye konuldu (Şekil 3-1).



Şekil 3-1:Kordon kanı MKH izolasyonu ve kültürü

3.4.1.2. Kordon dokusu (Wharton Jeli) toplanması, izolasyonu ve kültürü

1. Doku bir steril kap içerisinde alınıp, 24 saat içerisinde hücre kültürü laboratuvarında steril laminar akım içerisinde yaklaşık 10 cm lik parçalara ayrıldı.
2. Doku parçaları 4 adet 50 lik falkona önceden hazırlanmış antibiyotik karışımı (Streptomisin, Penisilin, Anfot.B) içerisine aktarma ve çalkalama işlemiyle yıkanarak son falkon 1 saat 37 derecede shakerda inkübe edildi.
3. Wharton jelini elde edebilmek için dikkatlice dokunun içerisindeki 2 arter ve 1 ven damarı dokudan ayırma işlemi gerçekleştirildi.

4. Doku mümkün olduğunca küçük parçalara parçalandı.
5. Doku parçaları pens yardımıyla 6'lı kuyucuğa dikkatli ve düzenli aralıklarla yerleştirildi.
6. Steril koşullarda plate'in kapağı kapatılmadan dokunun etrafındaki sıvının kuruması beklendi.
7. Kuruyan doku parçalarının üzerine yuvarlak cam lamel kapatılıp kurutmaya devam edildi.
8. Üzerlerine %10 FBS içeren 4 ml DMEM eklenip, 37°C'de %5 CO₂ inkübatörde çoğalmaya bırakıldı.
9. İlk on iki günde proliferasyon olması beklenmekte olup, eğer olmazsa 15, 20, 25 ve 30. günlerde kontrol edildi. Maksimum 40 güne kadar bekletildi.
10. Çalışmada MKH'ler ortalama 20 günde flaskın yüzeyine yapışmıştı.
11. Çalışmada ortalama 7-10 günde doku parçalarının üzerine kapatılan lameller kaldırıldı ve medyumları değiştirildi.
12. Hücrelerin proliferasyon olup olmadıkları fotoğraflandı.
13. Yeterince proliferasyon olan hücreler 75 cm² 'lik flaska pasajlandı.
14. Hücreler %70-80 konfluent olduklarında tripsinizasyonla kaldırıldı ve karakterizasyon için hazırlandı.
15. Deneyde kullanılmak üzere aynı işlem, alınan örneklerin hepsinde uygulandı ve aynı zamanda her karakterizasyon sonrası hücreler Pasaj 3'e kadar pasajlandıktan sonra deneye konuldu (Şekil 3-2).



Şekil 3-2: Wharton Jeli MKH izolasyonu ve kültürü

3.4.2. Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyonu

- 1) Tripsinizasyonla kaldırılan hücreler PBS ile 1 kere yıkandı (santrifüj 2000 rpm de 10dk).
- 2) Yıkanan hücelere PBS eklenerek sayıldı. 1 ml de yaklaşık 5 milyon hücre olacak şekilde ayarlandı.
- 3) Akım tüpleri hazırlandı ve etiketlendi.
 - a) Boyasız negatif tüpe: 100 μ l hücre
 - b) Negatif kontrol isotip tüpe: 100 μ l hücre +20 μ l antikor
 - c) Negatif kokteyl tüpe: 100 μ l hücre +20 μ l antikor
 - d) Pozitif kontrol isotip tüpe: 100 μ l hücre +20 μ l antikor

- e) Pozitif kokteyl isotip tüpe: 100 µl hücre +20 µl antikor
- f) IgG PE isotip tüpe: 100 µl hücre +5 µl antikor
- g) CD44 PE tüpe: 100 µl hücre +5 µl antikor
- 4) Hücre ve antikor 30 dk karanlık ve soğukta inkübe edildi.
- 5) PBS ile X2 yıkandı. (Santrifüj 1900 rpm de 5 dk).
- 6) 500 µl PBS eklendi uygun protokolde akım sitometri cihazında okutulup analiz edildi.
- 7) En az 30000 hücre sayıldı.

3.4.3. Periferik Kan Mononükleer Hücreleri İzolasyonu ve Kültürü

Sağlık bir kişiden yaklaşık 20-30 cc kadar Heparinli tüplere alınan periferik kan steril kabin içerisinde işleme alındı.

50 ml'lik steril falkonlara aktarılan kan örneği 1:1 oranında PBS solüsyonuyla karıştırıldı.

15 ml'lik steril falkonlara 5cc ficol paque solüsyonu konuldu.

PBS ve periferik kan karışımı dikkatli ve yavaşça ficol üzerine yüklendi.

2600 rpm'de 20 dk santrifüj edildi (Santrifüj fren ayarı kapatılarak kullanıldı).

Santrifüj sonrası ficolün üstüne toplanan buffy coat kısmı (Periferik Kan Mononükleer Hücre (PKMH)) toplandı ve 15 ml falkon tüpe aktarıldı.

1400 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı döküldü.

Peletin üzerine 12 ml hazırlanmış olan PBS konuldu.

Hücreler mikroskopta sayıldı ve ortalama 12 milyon hücre elde edildi.

HBSS konulmuş tüp 1400 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatant döküldü, pelet tüpün dibinde kaldı.

Dipte kalan peletin üzerine 1 ml PBS eklenerek sayımı yapıldı.

20 cc kan örneğinden 32 milyon kadar lenfosit hücre elde edildi.

3.4.4. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi ve Sayılması

3.4.4.1. Tripan Mavisi ile Boyama Yöntemi:

1. Hücre canlılığı değerlendirilmesi ve hücrelerin miktarının belirlenmesinde Tripan mavisi ile boyama yöntemi uygulandı.
2. Santrifüj sonrasında, falkonun dibine çöken hücreler medium ile sulandırılarak Tripan mavisi boyası ile (1 hacim boya + 1 hacim hücre) boyandı.
3. Mikroskopta Neubaheuer lamda hücreler sayıldı. Boyayı alan hücreler mavi renkte ve ölü olarak değerlendirilip, boya almayan canlı hücreler mikroskopta sayıldı.
4. Hücre canlılığı aşağıdaki denkleme göre hesaplandı.

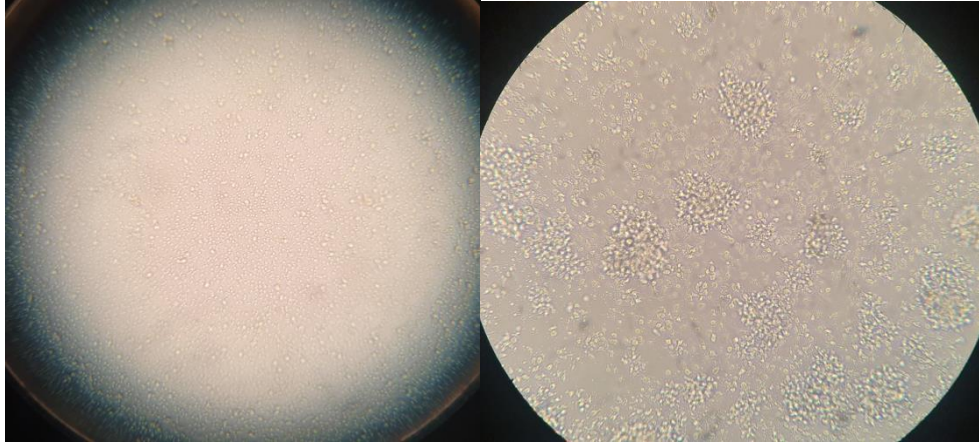
Toplam hücre= Sayılan hücre x Dilüsyon faktörü x Toplam hacim x 10.000 (lam faktörü).

3.4.5. Periferik Kan Mononükleer Hücrenin Fitohemaglotinin (PHA) ile Stimülasyonu

IL-4, IFN γ ve IL17 sitokinleri CD4 T yardımcı hücrelerden salgılanmaktadır ve bu sitokinlerin stimülasyonu ve hücre içi sitokin seviyesi tespiti için PHA mitojeni seçilmiştir. PHA diğer mitojenlerle karşılaştırıldığında CD4 membran proteinlerinin ekspresyonunu etkilemediği diğer mitojenlere göre daha uygun olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (85).

Deney gruplarına başlamadan önce PKMH'lerden sitokin salınımı için uygulanan PHA'nın en uygun dozu ve en uygun kültür süresi belirlendi. Optimum koşulları belirlemek için PKMH'ler izole edildikten sonra kuyu başına hücre sayısı 1×10^6 olacak şekilde ayarlandı. Hücreler 24'lü kuyucuklara ekildi.

Stimülasyon dozu belirlenmesi için hücrelere 2 farklı doz 5 μ g/ml ve 10 μ g/ml PHA uygulaması, stimülasyon sürelerinin belirlenmesi için 6, 12, 24, 72 saat inkübasyon süreleri belirlendi. Kontrol grubu için stimüle olmayan hücre grubu 6, 12, 24, 72 saat olarak inkübe edildi. Stimüle olan ve olmayan tüm gruplarda aynı hücre sayıları kullanıldı (Şekil 3-3).



Şekil 3-3:PKMH stimülasyon öncesi ve sonrası

Hücreler izole edildikten sonra RPMI ile hazırlanan besiyeri ile toplamda 24 ml’de 1×10^6 hücre sayısı olacak şekilde ayarlandı ve her kuyuya 1 ml eklendi. Stimüle edilen grubun $5 \mu\text{g/ml}$ doz için her kuyuya $1 \mu\text{L}$ PHA, $10 \mu\text{g/ml}$ doz grubu denemesi için $2 \mu\text{L}$ PHA eklendi. Deney grupları tablo 3-1’de verilmiştir. Ön çalışma sonunda IL-4, IFN γ ve IL17 sitokinleri için sitokin uyarımı toplanan süpernatantlardan ELISA ve toplanan hücrelerden hücre içi sitokin tayini kiti ile akım sitometri ile en uygun doz ve süre $10 \mu\text{g/ml}$ PHA- 72 saat olarak belirlendi.

Tablo 3-1:PHA süre ve doz belirlemesi için deney düzeneği

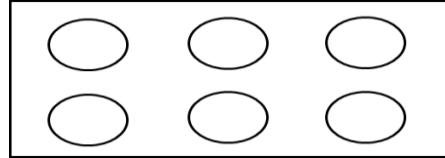
		İnkübasyon Süreleri			
		6sa	12sa	24sa	72sa
Stimüle olan (STI+)	$5 \mu\text{g/ml}$ PHA ($1 \mu\text{L}$)	1×10^6 PKMH X 24 kuyu	1×10^6 PKMH X 24 kuyu	1×10^6 PKMH X 24 kuyu	1×10^6 PKMH X 24 kuyu
	$10 \mu\text{g/ml}$ PHA ($2 \mu\text{L}$)				
Stimüle olmayan (STI-)		1×10^6 PKMH X 24 kuyu	1×10^6 PKMH X 24 kuyu	1×10^6 PKMH X 24 kuyu	1×10^6 PKMH X 24 kuyu

3.4.6. Hücre Kültür Deneylerinin Düzenekleri

3.4.6.1. Kontrol Grubu Deney Düzenekleri

1. Stimüle Olmayan Kontrol Grubu Deney Düzenegi:

İzole edilen PKMH stimüle olmayan 72 saat kültür
Kuyu başına 1.000.000 hücre olacak şekilde
Hücre içi sitokin tespiti için hücrelerin toplanması
ELISA için 72 saat sonunda süpernatant toplanması



2. Stimüle Kontrol Grubu Deney Düzenegi:

PKMH stimüle (PHA ile uyarılma) 72 saat kültür
Kuyu başına 1.000.000 hücre olacak şekilde
Hücre içi sitokin tespiti için hücrelerin toplanması
ELISA için 72 saat sonunda süpernatant toplanması

3. Stimüle ve Stimüle Olmayan Deney Grubu Düzenekleri:

MKH 72 saat kültür
Kuyu başına 1.000.000 hücre olacak şekilde
Hücre içi sitokin tespiti için hücrelerin toplanması
ELISA için 72 saat sonunda süpernatant toplanması

3.4.6.2. PKMH ve MKH Ko-kültürü Deney Düzenegi Tablosu

Her örnek için tüm deneyler 6 kuyulu kültür plaklarında aşağıdaki ko kültür çalışma planı Tablo 3-2'ye göre yapıldı.

Tablo 3-2:Ko-kültür çalışma düzenegi

		WHARTON JELİ MKH	KORDON KANI MKH
24sa	1:5	MKH+PKMH	MKH+PKMH
	1:10	MKH+PKMH	MKH+PKMH
72sa	1:5	MKH+PKMH	MKH+PKMH
	1:10	MKH+PKMH	MKH+PKMH

***PKMH:** Periferik Kan Mononükleer Hücre

***MKH:** Mezenkimal Kök Hücre

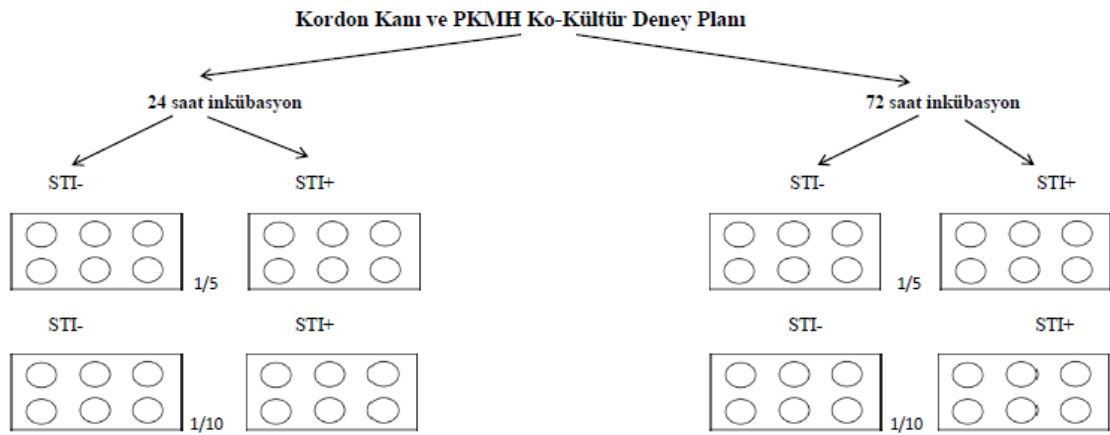
***1:5** : 1 MKH oranı/5 PKMH oranı

***1:10** : 1 MKH oranı/10 PKMH oranı

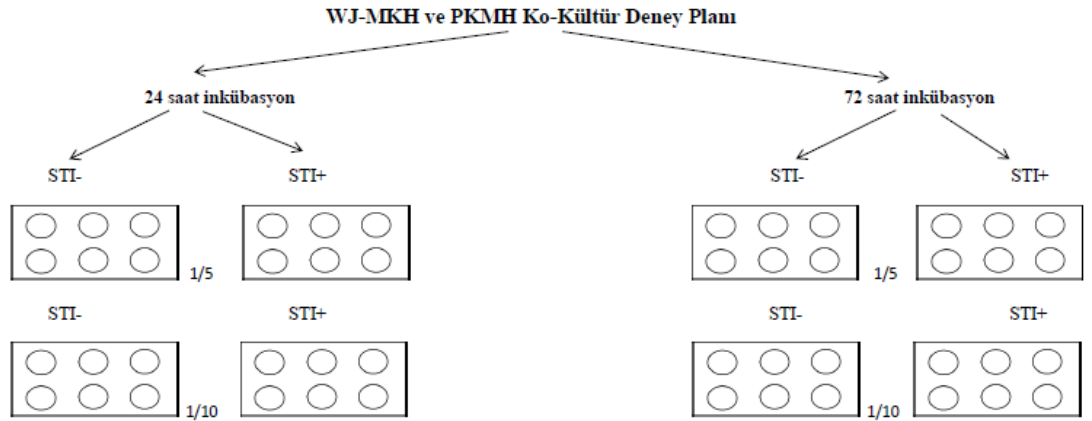
3.4.7. PKMH ve MKH Ko-Kültür Deneylerinin Yapılması

3.4.7.1. İzole Edilen Kordon Kanı MKH; WJ-MKH ve PKMH Ko-Kültür Deney Planı

Mezenkimal kök hücre elde edilmesi için kordon kanı ve kordon dokusu toplanmıştır. Tüm deneylerin deney planı aşağıdaki Şekil 3-4 ve Şekil 3-5'te gösterilmiştir.



Şekil 3-4: Kordon kanı-MKH ve PKMH Ko-kültür deney şeması



Şekil 3-5: WJ-MKH ve PKMH ko-kültür deney şeması

Göbek kordon kanı ve Wharton Jeli'nden izole edilen mezenkimal kök hücreleri akım sitometri ile karakterizasyon işleminden sonra 37°C'de %5 CO₂ ortamda 3.pasaja kadar çoğaltıldı. İzole edilen ve 72 saat inkübe edilen PKMH'leri farklı doz oranlarında 24 saat ve 72 saat olacak şekilde hem kordon kanı MKH ile hem de WJ-MKH ile ko-

kültürü %5 CO₂'li 37° C'de etüvde inkübe edildi. Kültür öncesi ve sonrası hücre oranları sayılarak ayarlandı ve canlılık oranlarına bakıldı.

Sayılan hücreler ko-kültür öncesi 1/5 ve 1/10 oranı olarak ayarlandı. Stimüle edilen ve edilmeyen PKMH'ler 300.000 hücre olacak şekilde ayarlanırken, 1/5 oranı için hem kordon kanı MKH hem WJ-MKH 60.000 hücre, 1/10 oranı için ise 30.000 hücre sayısı ayarlandı.

Hücre sayılarının ayarlanmasından sonra 6 kuyucuklu kültür plağında ko-kültür yapıldı. Öncelikle kordon kanı MKH ve WJ-MKH'lerinden 1'er ml olacak şekilde ekimi gerçekleştirildi, üzerlerine miktarı ayarlanmış stimüle ve stimüle olmayan PKMH'lerden 1'er ml ekildi. Ekilen hücrelerin üzerine 1 ml DMEM eklendi ve deney süreleri başlatıldı (Şekil 3-6).



Şekil 3-6: PKMH ve WJ-MKH ko-kültür mikroskopik görüntüsü

3.4.8. Hücre içi Sitokin Tayini ile IL-4, IFN- γ ve IL-17A Sitokin Seviyelerinin Belirlenmesi

Hücre içi sitokin tayini yapılan gruplar aşağıdaki gibidir:

1. PHA ile Stimüle (5 μ g/ml-PHA) PKMH (6saat inkübasyon) ko kültür öncesi
2. PHA ile Stimüle (10 μ g/ml) PKMH (6saat inkübasyon) ko kültür öncesi
3. PHA ile Stimüle (5 μ g/ml) PKMH (12 saat inkübasyon) ko kültür öncesi

4. PHA ile Stimüle (10µg/ml) PKMH (12 saat inkübasyon) ko kültür öncesi
5. PHA ile Stimüle (5µg/ml) PKMH (24saat inkübasyon) ko kültür öncesi
6. PHA ile Stimüle (10µg/ml) PKMH (24saat inkübasyon) ko kültür öncesi
7. PHA ile Stimüle (5µg/ml) PKMH (72 saat inkübasyon) ko kültür öncesi
8. PHA ile Stimüle (10µg/ml) PKMH (72 saat inkübasyon) ko kültür öncesi
9. Stimüle olmayan PKMH (6saat inkübasyon) ko kültür öncesi
10. Stimüle olmayan PKMH (12saat inkübasyon) ko kültür öncesi
11. Stimüle olmayan PKMH (24saat inkübasyon) ko kültür öncesi
12. Stimüle olmayan PKMH (72 saat inkübasyon) ko kültür öncesi
13. Kordon Kanı MKH ve STI-PKMH 1/5 oranında 24 saat inkübasyon ko kültür sonrası
14. Kordon Kanı MKH ve STI-PKMH 1/5 oranında 72 saat inkübasyon ko kültür sonrası
15. Kordon Kanı MKH ve STI-PKMH 1/10 oranında 24 saat inkübasyon ko kültür sonrası
16. Kordon Kanı MKH ve STI-PKMH 1/10 oranında 72 saat inkübasyon ko kültür sonrası
17. Kordon Kanı MKH ve STI+PKMH 1/5 oranında 24 saat inkübasyon ko kültür sonrası
18. Kordon Kanı MKH ve STI+PKMH 1/5 oranında 72 saat inkübasyon ko kültür sonrası
19. Kordon Kanı MKH ve STI+PKMH 1/10 oranında 24 saat inkübasyon ko kültür sonrası
20. Kordon Kanı MKH ve STI+PKMH 1/10 oranında 72 saat inkübasyon ko kültür sonrası
21. WJ-MKH ve STI-PKMH 1/5 oranında 24 saat inkübasyon ko kültür sonrası

22. WJ-MKH ve STI-PKMH 1/5 oranında 72 saat inkübasyon ko kültür sonrası

23. WJ-MKH ve STI-PKMH 1/10 oranında 24 saat inkübasyon ko kültür sonrası

24. WJ-MKH ve STI-PKMH 1/10 oranında 72 saat inkübasyon ko kültür sonrası

25. WJ-MKH ve STI+PKMH 1/5 oranında 24 saat inkübasyon ko kültür sonrası

26. WJ-MKH ve STI+PKMH 1/5 oranında 72 saat inkübasyon ko kültür sonrası

27. WJ-MKH ve STI+PKMH 1/10 oranında 24 saat inkübasyon ko kültür sonrası

28. WJ-MKH ve STI+PKMH 1/10 oranında 72 saat inkübasyon ko kültür sonrası

Tüm gruplar için inkübasyondan sonra PKMH'lerin tamamı kültür plaklarından pipet yardımıyla toplanarak akım sitometri hücre içi sitokin tayini için hazırlanmıştır.

3.4.8.1. Hücre içi sitokin tayini protokolü

- 1) Stimüle olan PKMH'ler için inkübasyon sonrası 4 µl BD GolgiStop (Her 6 kuyu için) eklenerek stimülasyon durduruldu.
- 2) Oda sıcaklığında 1500 rpm de 10 dk santrifüj edilerek 2 kez PBS ile yıkandı.
- 3) Hücreler sayıldı, test başına 1 milyon/ml olacak şekilde ayarlandı.
- 4) Yıkamalardan sonra 1ml BD Cytofix Fixation buffer ile süspanse edildi. Ve 10-20 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 5) 1500 rpm de 10 dk santrifüj edildi.
- 6) Hücreler PBS ile iki kez yıkandı.
- 7) 10X BD Perm/Wash buffer 1X e distile su ile dilüe edildi.
- 8) Pelet üzerine 1 ml BD Perm/Wash buffer eklendi ve 15 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- 9) 1500 rpm de 10 dk santrifüj edildi.

- 10) Her tüpe 50 µl BD Perm/wash buffer eklendi. Üzerlerine 20 µl kokteyl negatif kontrol konuldu.
- 11) Oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi.
- 12) 2 kere BD perm/wash buffer ile yıkandı. PBS eklenerek cihazda okutuldu ve analiz edildi.
- 13) Yaklaşık 20.000-30.000 CD4 pozitif hücre okutuldu ve analiz edildi.

3.4.9. Süpernatanttan IL-4, TGF- β , IFN- γ ve IL-17A Sitokin Seviyelerinin ELISA Yöntemiyle Belirlenmesi

Kültür sonrası süpernatantı toplanan ve ELISA yapılana kadar -20 derecede saklanan deney grupları aşağıdaki gibidir:

1. PHA ile Stimüle (5µg/ml-PHA) PKMH (6 saat inkübasyon) ko kültür öncesi
2. PHA ile Stimüle (10µg/ml) PKMH (6 saat inkübasyon) ko kültür öncesi
3. PHA ile Stimüle (5µg/ml) PKMH (12 saat inkübasyon) ko kültür öncesi
4. PHA ile Stimüle (10µg/ml) PKMH (12 saat inkübasyon) ko kültür öncesi
5. PHA ile Stimüle (5µg/ml) PKMH (24 saat inkübasyon) ko kültür öncesi
6. PHA ile Stimüle (10µg/ml) PKMH (24 saat inkübasyon) ko kültür öncesi
7. PHA ile Stimüle (5µg/ml) PKMH (72 saat inkübasyon) ko kültür öncesi
8. PHA ile Stimüle (10µg/ml) PKMH (72 saat inkübasyon) ko kültür öncesi
9. STI-PKMH (6 saat inkübasyon) ko kültür öncesi
10. STI-PKMH (12 saat inkübasyon) ko kültür öncesi
11. STI-PKMH (24 saat inkübasyon) ko kültür öncesi
12. STI-PKMH (72 saat inkübasyon) ko kültür öncesi
13. Kordon Kanı MKH ve STI-PKMH 1/5 oranında 24 saat inkübasyon ko kültür sonrası
14. Kordon Kanı MKH ve STI-PKMH 1/5 oranında 72 saat inkübasyon ko kültür sonrası

15. Kordon Kanı MKH ve STI-PKMH 1/10 oranında 24 saat inkübasyon ko kültür sonrası
16. Kordon Kanı MKH ve STI-PKMH 1/10 oranında 72 saat inkübasyon ko kültür sonrası
17. Kordon Kanı MKH ve STI+PKMH 1/5 oranında 24 saat inkübasyon ko kültür sonrası
18. Kordon Kanı MKH ve STI+PKMH 1/5 oranında 72 saat inkübasyon ko kültür sonrası
19. Kordon Kanı MKH ve STI+PKMH 1/10 oranında 24 saat inkübasyon ko kültür sonrası
20. Kordon Kanı MKH ve STI+PKMH 1/10 oranında 72 saat inkübasyon ko kültür sonrası
21. WJ-MKH ve STI-PKMH 1/5 oranında 24 saat inkübasyon ko kültür sonrası
22. WJ-MKH ve STI-PKMH 1/5 oranında 72 saat inkübasyon ko kültür sonrası
23. WJ-MKH ve STI-PKMH 1/10 oranında 24 saat inkübasyon ko kültür sonrası
24. WJ-MKH ve STI-PKMH 1/10 oranında 72 saat inkübasyon ko kültür sonrası
25. WJ-MKH ve STI+PKMH 1/5 oranında 24 saat inkübasyon ko kültür sonrası
26. WJ-MKH ve STI+PKMH 1/5 oranında 72 saat inkübasyon ko kültür sonrası
27. WJ-MKH ve STI+PKMH 1/10 oranında 24 saat inkübasyon ko kültür sonrası
28. WJ-MKH ve STI+PKMH 1/10 oranında 72 saat inkübasyon ko kültür sonrası

3.4.9.1. ELISA Yöntemi:**Örneklerin hazırlanması:**

Tüm deneyler sonrası toplanan ve -20°C’de saklanan süpernatantlar oda sıcaklığına getirildi.

Kit içerikleri:

IFN- γ Human ELISA 96 tests KİTİ

IL-17A Human ELISA 96 tests KİTİ

TGF- β Human ELISA 96 tests KİTİ

IL-4 Human ELISA 96 tests KİTİ

1 adet Monoklonal IFN- γ antikor kaplı Mikro Kuyucuklu Plate

1 adet Monoklonal IL-17A antikor kaplı Mikro Kuyucuklu Plate

1 adet Monoklonal TGF- β antikor kaplı Mikro Kuyucuklu Plate

1 adet Monoklonal IL-4 antikor kaplı Mikro Kuyucuklu Plate

100 μ l Biotin-Konjugat X4

150 μ l Streptavidin-HRP X4

Kitlerin Standartları

12 ml Örnek Dilüe Edici X4

5 ml Assay Buffer 20X (PBS , %1 ‘lik Tween ve %10’luk BSA) X4

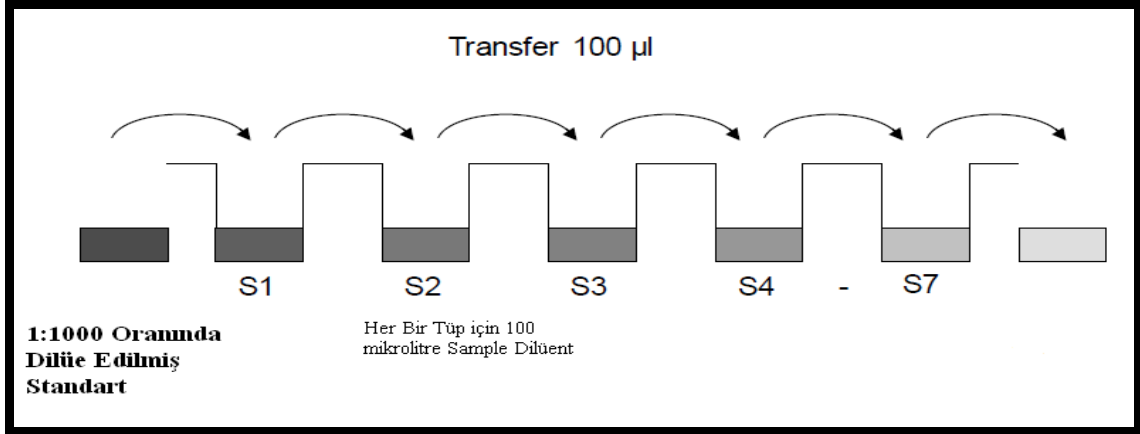
50 ml Yıkama Solüsyonu 20X (PBS ve %1 ‘lik Tween) X4

15 ml Substrat Solüsyonu (Tetrametil-Benzidin) X4

15 ml Durdurucu Solüsyon (1 M Fosforik asit) X4

4 adet Plate Örtücü X4

Standartların hazırlanması:



- 1) Mikro kuyucuklu plak hazırlanmış olan Yıkama Solüsyonu ile iki kere yıkandı.
- 2) Boş kuyulara 100 µl Örnek Dilüe Edici eklendi.
- 3) Örnek kuyularına 50 µl Örnek Dilüe Edici eklendi.
- 4) Her bir örnek Örnek Dilüe Edici konulmuş kuyulara 50 µl şeklinde bölündü.
- 5) Standartlar, örnekler konulduktan sonra daha önceden belirlenen standart kuyularına uygun şekilde konuldu.
- 6) Biotin konjugat hazırlanarak tüm kuyulara 50 µl konuldu.
- 7) Plâğın üstü kapatılarak 2 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- 8) Bu arada Streptavidin-HRP hazırlandı.
- 9) İnkübasyonu biten plate 3 kere yıkama solüsyonuyla yıkandı.
- 10) Hazırlanan Streptavidin-HRP 100 µl her bir kuyuya eklendi.
- 11) Plâğın üstü kapatılarak 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- 12) İnkübasyon sonrası 3 kere yıkama solüsyonuyla yıkandı.
- 13) TMB substrat solüsyonu 100 µl her bir kuyuya konuldu ve 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
- 14) İnkübasyon sonrası hızlı ve dikkatli bir şekilde 100 µl durdurucu solüsyon her bir kuyuya eklendi ve 2-8 derece karanlıkta bir süre beklendi.

Plaklar ELISA plak okuyucuda primer dalga boyu 450 nm, referans dalga boyu 620 nm olacak şekilde okutuldu. Test standartlar temel alınarak lineer regresyon analizi yapılarak değerlendirildi.

3.5. Değerlendirme ve Analiz

Çalışmamızda, mezenkimal kök hücrelerin immün sistem hücreleri ve bu hücrelerden salgılanan sitokinler üzerine olan etkisi araştırıldı. Sitokin salınımı değerlendirmesi için PKMH grupları stimüle edildi. Stimüle olan ve olmayan olarak iki grup arasındaki değerlendirmeden sonra MKH ile ko-kültürleri yapıldı. Alınan kordon kanı ve kordon dokusundan izole edilip çoğaltılan mezenkimal kök hücreler sağlıklı erişkin bir kişiden alınan PKMH ile kültüre edildi. Tüm çalışma; süre (24sa, 72sa), doz (1/5, 1/10), stimüle olan (PHA), stimüle olmayan, MKH olan ve MKH olmayan olarak tüm değişkenler göz önünde bulundurularak farklı kombinasyonlarda deneye konuldu ve analiz edildi.

Tüm deney gruplarında hücre içi sitokin tayini akım Sitometri cihazıyla, süpernatanttan sitokin tayini ELISA yöntemiyle gerçekleştirildi. akım sitometri cihazıyla çalışılan hücre içi sitokin seviyeleri % değer olarak değerlendirildi. Süpernatanttan bakılan sitokin seviyeleri ELISA plak okuyucudan absorbans değerleri alınarak pg/ml biriminde hesaplandı ve değerlendirildi.

3.6. İstatistiksel Analiz

Verilerin tanımlayıcı istatistiklerinde ortalama, standart sapma, medyan en düşük, en yüksek, frekans ve oran değerleri kullanılmıştır. Değişkenlerin dağılımı kolmogorov simirnov test ile ölçüldü. Nicel bağımsız verilerin analizinde mann-whitney u, bağımlı nicel verilerin analizinde wilcoxon testi kullanıldı. Analizlerde SPSS 28.0 programı kullanılmıştır.

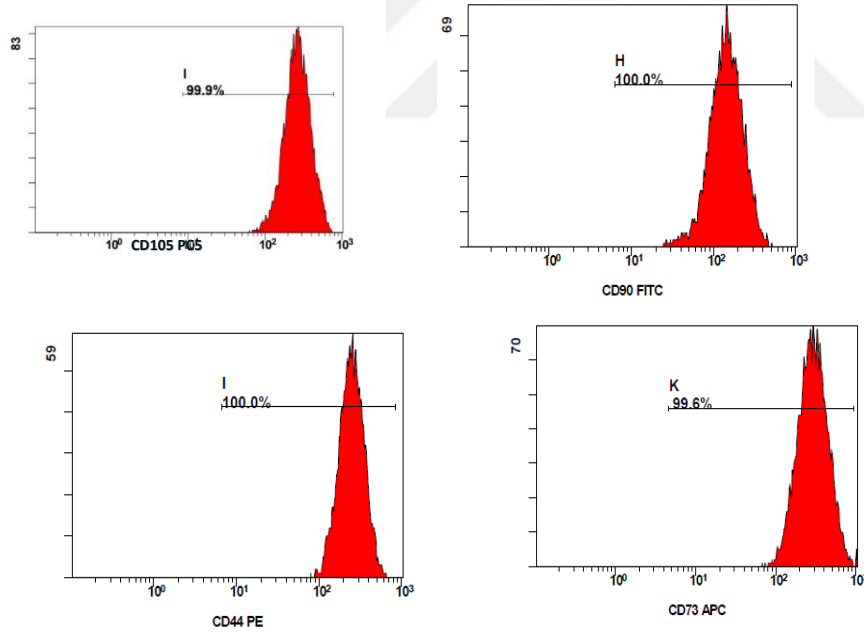
4. BULGULAR

4.1. Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyonu

Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (ISCT) mezenkimal kök hücreleri tanımlamak için minimum kriterler belirlemiştir. Buna göre MKH'ler:

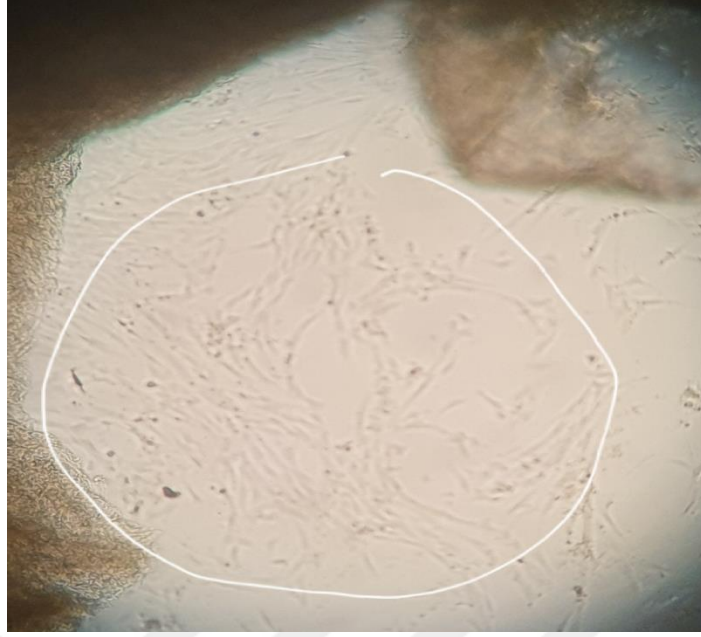
- 1) Plastik adherenttir.
- 2) Spesifik yüzey belirteçlerinden CD73, CD90, CD105 ifade ederken; CD14, CD34, CD45, HLA-DR ifade etmemektedir.
- 3) İn vitro ortamda osteoblast, adiposit ve kondrositlere farklılaşabilirler (11, 12).

Çalışmamızda kullanılan kordon kanı ve kordon dokusundan izolde edilen ve çoğaltılan mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonu için adherent oldukları ve spesifik yüzey belirteçleri belirlenerek yapılmıştır (Şekil 4-1).



Şekil 4-1: MKH karakterizasyon akım sitometri analizi

Kordon dokusu parçalandıktan 75cm² 'lik kültür flasklarına ekildi ve WJ-MKH'lerin yüzeye yapışması beklendi. WJ-MKH'lerin dokudan ayrılıp çoğalmaya başlamaları ortalama 10 gün sürdü (Şekil 4-2).



Şekil 4-2: Kordon dokusu (WJ-MKH) mezenkimal kök hücre kültürünün 10 gün sonrası mikroskopik görüntüsü

Hücreler çoğaldıktan sonra doku parçaları flasktan çıkartılıp medyum değişimi gerçekleştirildi. Hücrelerin çoğalma ve medyumun durumuna göre ortalama 4-5 günde bir medyum değiştirildi. %80-90 oranında flaskın yüzeyini kaplayınca hücreler tripsinle kaldırılıp sayılarak akım sitometri cihazında hücre yüzey belirteçleri MKH karakterizasyon kiti ile tespit edildi.

4.2. STI-PKMH ve STI+PKMH arasındaki Hücre içi ve Süpernatant Sitokin Seviyelerindeki Değişimi Karşılaştırması

STI+PKMH grubunda hücre içi IL-17, IFN- γ , IL-4 sitokin ölçümleri STI-PKMH grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti (Tablo 4-1).

STI+PKMH grubunda süpernatantta TGF β , IFN γ , IL-4, IL-17 sitokin ölçümleri STI-PKMH grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti (Tablo 4-1).

Tablo 4-1: STI-PKMH ve STI+PKMH Sitokin Seviyeleri Karşılaştırılması

		STI+PKMH		STI-PKMH		p
		Ort. $\pm$ ss	Medyan	Ort. $\pm$ ss	Medyan	
Hücre içi	CD4	56,90 $\pm$ 0,10	56,90	50,80 $\pm$ 0,20	50,80	0,000
	IL-17	0,38 $\pm$ 0,03	0,38	0,14 $\pm$ 0,01	0,14	0,000
	IFNγ	4,35 $\pm$ 0,01	4,35	0,05 $\pm$ 0,01	0,05	0,000
	IL-4	0,33 $\pm$ 0,02	0,33	0,01 $\pm$ 0,01	0,01	0,000
Süpernatant	TGF β	19,45 $\pm$ 0,63	19,38	10,50 $\pm$ 0,03	10,49	0,000
	IFNγ	536,46 $\pm$ 4,16	534,56	13,83 $\pm$ 0,01	13,83	0,000
	IL-4	7,70 $\pm$ 0,39	7,66	1,17 $\pm$ 0,01	1,17	0,000
	IL-17	649,37 $\pm$ 4,62	648,51	22,52 $\pm$ 0,02	22,51	0,000

4.3. WJ-MKH'nin STI-PKMH ile ko-kültür Öncesi ve Sonrası Hücre içi ve Süpernatanttan Bakılan Sitokin Seviyeleri Karşılaştırması

STI-PKMH hücre içi IL17, IFN γ sitokin ölçümleri WJ-MKH/STI-PKMH 1/5 oranında 24. saat ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü. STI-PKMH ve WJ MKH/STI-PKMH 1/5 oranında 24. saat hücre içi IL-4 ölçümleri karşılaştırıldığında farklılık saptanmadı ($p > 0.05$) (Tablo 4-2).

STI-PKMH süpernatant sitokin TGF β ölçümleri WJ MKH/STI-PKMH 1/5 oranında 24. saat ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü. STI-PKMH süpernatant sitokin IFN γ , IL4, IL17 ölçümleri WJ MKH UNS-/PKMH 1/5 oranında 24. saat ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti (Tablo 4-2).

STI-PKMH hücre içi IL-17 sitokin ölçümleri, WJ-MKH/STI-PKMH 1/5 oranında 72. saat ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. STI-PKMH hücre içi sitokin IFN γ ve IL-4 ölçümleri WJ-MKH/STI-PKMH 1/5 oranında 72. saat ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü (Tablo 4-2).

STI-PKMH süpernatant sitokin TGF β , IFN γ , IL-17 ölçümleri WJ-MKH/STI-PKMH 1/5 oranında 72. saat ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. STI-PKMH süpernatant sitokin IL-4 ölçümleri WJ-MKH/STI-PKMH 1/5 oranında 72. saat ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü (Tablo 4-2).

Tablo 4-2: 1/5 oranında WJ-MKH/STI-PKMH Ko-kültür Öncesi ve Sonrası Sitokin Seviyesi Karşılaştırması

		STI-PKMH		WJ MKH/ STI-PKMH 1/5-24 Saat		p	WJ MKH/ STI-PKMH 1/5-72 Saat		p
		Ort. $\pm$ ss	Medyan	Ort. $\pm$ ss	Medyan		Ort. $\pm$ ss	Medyan	
Hücre İçi	CD4	50,80 $\pm$ 0,20	50,80	56,63 $\pm$ 0,21	56,70	0,007	38,83 $\pm$ 0,12	38,90	0,007
	IL-17	0,14 $\pm$ 0,01	0,14	0,26 $\pm$ 0,02	0,25	0,006	0,11 $\pm$ 0,02	0,11	0,006
	IFN γ	0,05 $\pm$ 0,01	0,05	0,53 $\pm$ 0,03	0,54	0,007	0,08 $\pm$ 0,02	0,08	0,006
	IL-4	0,01 $\pm$ 0,01	0,01	0,02 $\pm$ 0,01	0,02	0,141	0,17 $\pm$ 0,12	0,10	0,007
Süpernatant	TGF β	10,50 $\pm$ 0,03	10,49	187,93 $\pm$ 0,56	188,21	0,007	3,43 $\pm$ 0,08	3,44	0,007
	IFN γ	13,83 $\pm$ 0,01	13,83	2,70 $\pm$ 0,05	2,69	0,007	3,54 $\pm$ 0,07	3,52	0,007
	IL-4	1,17 $\pm$ 0,01	1,17	0,19 $\pm$ 0,01	0,19	0,007	3,12 $\pm$ 0,08	3,10	0,007
	IL-17	22,52 $\pm$ 0,02	22,51	3,68 $\pm$ 0,31	3,69	0,007	5,07 $\pm$ 0,05	5,08	0,007

STI-PKMH hücre içi IL-7, IFN γ , IL-4 sitokin ölçümleri WJ-MKH/STI-PKMH 1/10 oranında 24. saat ölçümlerinden istatistiksel ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü (Tablo 4-3).

STI-PKMH süpernatant TGF β , IFN γ , IL-4, IL-17 sitokin ölçümleri WJ-MKH/STI-PKMH 1/10 oranında 24. saat ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti (Tablo 4-3).

STI-PKMH hücre içi IL7, IFN γ , IL-4 ölçümleri WJ-MKH/STI-PKMH 1/10 oranında 72. saat ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü (Tablo 4-3).

STI-PKMH ve WJ-MKH/STI-PKMH 1/10 oranında 72. saat süpernatantlarda sitokin TGF β ölçümleri arasında istatistiksel olarak ($p > 0.05$) farklılık saptanmadı. STI-PKMH süpernatant sitokin IFN γ , IL-4, IL-17 ölçümleri WJ-MKH/STI-PKMH 1/10 oranında 72. saat ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti (Tablo 4-3).

Tablo 4-3: 1/10 oranında WJ-MKH/STI-PKMH Ko-kültür Öncesi ve Sonrası Sitokin Seviyesi Karşılaştırması

		STI-PKMH		WJ MKH/ STI-PKMH 1/10-24 Saat		p	WJ MKH/ STI-PKMH 1/10-72 Saat		p
		Ort. $\pm$ ss	Medyan	Ort. $\pm$ ss	Medyan		Ort. $\pm$ ss	Medyan	
Hücre İçi	CD4	50,80 $\pm$ 0,20	50,80	35,97 $\pm$ 0,15	36,00	0,007	51,43 $\pm$ 0,40	51,50	0,007
	IL-17	0,14 $\pm$ 0,01	0,14	0,95 $\pm$ 0,03	0,96	0,006	0,39 $\pm$ 0,02	0,39	0,007
	IFNγ	0,05 $\pm$ 0,01	0,05	0,76 $\pm$ 0,02	0,76	0,007	0,32 $\pm$ 0,01	0,32	0,006
	IL-4	0,01 $\pm$ 0,01	0,01	0,26 $\pm$ 0,02	0,25	0,007	0,04 $\pm$ 0,01	0,04	0,006
Süpernatant	TGF β	10,50 $\pm$ 0,03	10,49	6,86 $\pm$ 0,14	6,81	0,007	10,59 $\pm$ 0,54	10,79	0,857
	IFNγ	13,83 $\pm$ 0,01	13,83	0,94 $\pm$ 0,08	0,93	0,007	1,14 $\pm$ 0,03	1,15	0,007
	IL-4	1,17 $\pm$ 0,01	1,17	0,55 $\pm$ 0,09	0,52	0,007	0,27 $\pm$ 0,00	0,27	0,007
	IL-17	22,52 $\pm$ 0,02	22,51	14,56 $\pm$ 0,06	14,56	0,007	4,90 $\pm$ 0,85	4,73	0,007

4.4. WJ-MKH'nin STI+PKMH ile ko-kültür Öncesi ve Sonrası Hücre içi ve Süpernatanttan Bakılan Sitokin Seviyeleri Karşılaştırması

STI+PKMH grubu hücre içi IL-17, IFN γ , IL-4 seviyeleri ölçümleri, WJ-MKH/STI+PKMH 1/5 oranında 24. saat ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü (Tablo 4-4).

STI+PKMH grubunda süpernatant TGF β ölçümleri WJ-MKH/STI+PKMH 1/5 oranında 24. saat ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü. STI+PKMH süpernatant IFN γ , IL-4, IL-17 ölçümleri WJ-MKH/STI+PKMH 1/5 oranında 24. saat ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti (Tablo 4-4).

STI+PKMH hücre içi IFN γ ölçümleri WJ-MKH/STI+PKMH 1/5 oranında 72. Saat ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. STI+PKMH hücre içi IL-17, IL-4 ölçümleri WJ-MKH/STI+PKMH 1/5 oranında 72. saat ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü (Tablo 4-4).

STI+PKMH süpernatant TGF β , IFN γ , IL-4, IL-17 ölçümleri WJ-MKH/STI+PKMH 1/5 oranında 72. saat ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti (Tablo 4-4).

Tablo 4-4: 1/5 oranında WJ-MKH/STI+PKMH Ko-kültür Öncesi ve Sonrası Sitokin Seviyesi Karşılaştırması

		STI+PKMH		WJ MKH/STI+PKMH 1/5-24 Saat		<i>p</i>	WJ MKH/STI+PKMH 1/5-72 Saat		<i>p</i>
		Ort. $\pm$ ss	Medyan	Ort. $\pm$ ss	Medyan		Ort. $\pm$ ss	Medyan	
Hücre içi	CD4	56,90 $\pm$ 0,10	56,90	27,77 $\pm$ 0,15	27,80	0,006	72,33 $\pm$ 0,21	72,40	0,007
	IL-17	0,38 $\pm$ 0,03	0,38	5,47 $\pm$ 0,06	5,48	0,007	2,05 $\pm$ 0,02	2,05	0,007
	IFNγ	4,35 $\pm$ 0,01	4,35	11,62 $\pm$ 0,02	11,62	0,006	1,32 $\pm$ 0,03	1,31	0,006
	IL-4	0,33 $\pm$ 0,02	0,33	8,94 $\pm$ 0,01	8,94	0,007	0,94 $\pm$ 0,02	0,95	0,007
Süpernatant	TGF β	19,45 $\pm$ 0,63	19,38	167,86 $\pm$ 0,11	167,80	0,007	0,69 $\pm$ 0,01	0,69	0,007
	IFNγ	536,46 $\pm$ 4,16	534,56	104,20 $\pm$ 0,21	104,28	0,007	90,88 $\pm$ 0,30	90,96	0,007
	IL-4	7,70 $\pm$ 0,39	7,66	0,02 $\pm$ 0,00	0,02	0,007	0,31 $\pm$ 0,00	0,31	0,007
	IL-17	649,37 $\pm$ 4,62	648,51	11,02 $\pm$ 0,02	11,02	0,007	11,04 $\pm$ 0,02	11,04	0,007

STI+PKMH hücre içi sitokin IL17, IFN γ , IL-4 ölçümleri WJ-MKH/STI+PKMH 1/10 oranında 24. saat ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü (Tablo 4-5).

STI+PKMH süpernatant TGF β , IFN γ , IL4, IL17 ölçümleri WJ-MKH/STI+PKMH 1/10 oranında 24. saat ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti (Tablo 4-5).

STI+PKMH hücre içi sitokin IL-17, IFN γ , IL-4 ölçümleri WJ-MKH/STI+PKMH 1/10 oranında 72. saat ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü (Tablo 4-5).

STI+PKMH süpernatant TGF β , IFN γ , IL-4, IL-17 ölçümleri WJ-MKH/STI+PKMH 1/10 oranında 72. saat ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti (Tablo 4-5).

Tablo 4-5: 1/10 oranında WJ-MKH/STI+PKMH Ko-kültür Öncesi ve Sonrası Sitokin Seviyeleri Karşılaştırması

		STI+PKMH		WJ MKH/STI+PKMH 1/10-24 Saat		<i>p</i>	WJ MKH/STI+PKMH 1/10-72 Saat		<i>p</i>
		Ort. $\pm$ ss	Medyan	Ort. $\pm$ ss	Medyan		Ort. $\pm$ ss	Medyan	
Hücre içi	CD4	56,90 $\pm$ 0,10	56,90	19,50 $\pm$ 0,10	19,50	0,007	65,17 $\pm$ 0,15	65,20	0,007
	IL-17	0,38 $\pm$ 0,03	0,38	16,93 $\pm$ 0,02	16,93	0,007	12,37 $\pm$ 0,03	12,36	0,006
	IFNγ	4,35 $\pm$ 0,01	4,35	10,24 $\pm$ 0,02	10,24	0,006	13,47 $\pm$ 0,06	13,50	0,007
	IL-4	0,33 $\pm$ 0,02	0,33	6,96 $\pm$ 0,01	6,96	0,006	2,15 $\pm$ 0,05	2,15	0,007
Süpernatant	TGFβ	19,45 $\pm$ 0,63	19,38	1,36 $\pm$ 0,36	1,30	0,007	5,28 $\pm$ 0,03	5,28	0,007
	IFNγ	536,46 $\pm$ 4,16	534,56	94,02 $\pm$ 0,11	94,04	0,007	103,28 $\pm$ 0,48	103,38	0,007
	IL-4	7,70 $\pm$ 0,39	7,66	2,24 $\pm$ 0,03	2,25	0,007	0,27 $\pm$ 0,00	0,27	0,007
	IL-17	649,37 $\pm$ 4,62	648,51	19,94 $\pm$ 0,14	19,87	0,007	16,50 $\pm$ 0,00	16,50	0,007

4.5. KK-MKH'nin STI-PKMH ile ko-kültür Öncesi ve Sonrası Hücre içi ve Süpernatanttan Bakılan Sitokin Seviyeleri Karşılaştırması

STI-PKMH hücre içi IFN γ , IL-4 ölçümleri KK-MKH/STI-PKMH 1/5 oranında 24. saat ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü. STI-PKMH hücre içi IL-17 ölçümleri KK-MKH/STI-PKMH 1/5 oranında 24. saat ölçümleri arasında anlamlılık ($p > 0.05$) saptanmadı (Tablo 4-6).

STI-PKMH süpernatant TGF β , IFN γ , IL-4, IL-17 ölçümleri KK-MKH/STI-PKMH 1/5 oranında 24. saat ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü (Tablo 4-6).

STI-PKMH ve KK-MKH/STI-PKMH 1/5 oranında 72. saat gruplarında hücre içi sitokin seviyeleri karşılaştırıldığında, MKH eklenmeyen STI-PKMH grubunda hücre içi IL-17, IFN γ , IL-4 ölçümleri seviyesi anlamlı olarak daha düşük olduğu saptandı ($p < 0.05$) (Tablo 4-6).

STI-PKMH süpernatant IL-4 ölçümleri KK-MKH/STI-PKMH 1/5 oranında 72. saat ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü. STI-PKMH süpernatant TGF β , IFN γ , IL-17 ölçümleri KK-MKH/STI-PKMH 1/5 oranında 72. saat ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti (Tablo 4-6).

Tablo 4-6: 1/5 oranında KK-MKH/STI-PKMH Ko-kültür Öncesi ve Sonrası Sitokin Seviyeleri Karşılaştırması

		STI-PKMH		KK-PKMH/ STI-PKMH 1/5-24 Saat		p	KK-MKH/ STI-PKMH 1/5-72 Saat		p
		Ort. $\pm$ ss	Medyan	Ort. $\pm$ ss	Medyan		Ort. $\pm$ ss	Medyan	
Hücre içi	CD4	50,80 $\pm$ 0,20	50,80	57,20 $\pm$ 0,10	57,20	0,007	49,67 $\pm$ 0,35	49,70	0,007
	IL-17	0,14 $\pm$ 0,01	0,14	0,13 $\pm$ 0,06	0,10	0,857	0,73 $\pm$ 0,01	0,73	0,006
	IFNγ	0,05 $\pm$ 0,01	0,05	0,65 $\pm$ 0,01	0,65	0,006	0,76 $\pm$ 0,03	0,76	0,007
	IL-4	0,01 $\pm$ 0,01	0,01	0,12 $\pm$ 0,02	0,12	0,007	0,13 $\pm$ 0,01	0,13	0,006
Süpernatant	TGF β	10,50 $\pm$ 0,03	10,49	8,95 $\pm$ 0,19	8,96	0,007	3,81 $\pm$ 0,17	3,75	0,007
	IFNγ	13,83 $\pm$ 0,01	13,83	3,86 $\pm$ 0,11	3,87	0,007	3,76 $\pm$ 0,08	3,76	0,007
	IL-4	1,17 $\pm$ 0,01	1,17	0,54 $\pm$ 0,04	0,56	0,007	3,88 $\pm$ 0,05	3,90	0,007
	IL-17	22,52 $\pm$ 0,02	22,51	5,27 $\pm$ 0,03	5,26	0,007	10,50 $\pm$ 0,02	10,50	0,007

STI-PKMH hücre içi IL-17, IFN γ , IL-4 ölçümleri KK-MKH/STI-PKMH 1/10 oranında 24. saat ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü (Tablo 4-7).

STI-PKMH süpernatant IL-4, TGF β , IFN γ , IL-17 ölçümleri KK-MKH/STI-PKMH 1/10 oranında 24. saat ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti (Tablo 4-7).

STI-PKMH hücre içi IL-17, IFN γ , IL-4 ölçümleri KK-MKH/STI-PKMH 1/10 oranında 72. saat ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü (Tablo 4-7).

STI-PKMH süpernatant IL-4 TGF β , IFN γ , IL-17 ölçümleri KK-MKH/STI-PKMH 1/10 oranında 72. saat ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti (Tablo 4-7).

Tablo 4-7: 1/10 oranında KK-MKH/STI-PKMH Ko-kültür Öncesi ve Sonrası Sitokin Seviyeleri Karşılaştırması

		STI-PKMH		KK-MKH/ STI-PKMH 1/10-24 saat		P	KK-MKH/ STI-PKMH 1/10-72 saat		P
		Ort. $\pm$ ss	Medyan	Ort. $\pm$ ss	Medyan		Ort. $\pm$ ss	Medyan	
Hücre içi	CD4	50,80 $\pm$ 0,20	50,80	31,90 $\pm$ 0,10	31,90	0,007	42,20 $\pm$ 0,26	42,10	0,007
	IL-17	0,14 $\pm$ 0,01	0,14	0,59 $\pm$ 0,01	0,58	0,007	0,89 $\pm$ 0,02	0,89	0,007
	IFNγ	0,05 $\pm$ 0,01	0,05	0,49 $\pm$ 0,02	0,49	0,006	1,31 $\pm$ 0,01	1,31	0,007
	IL-4	0,01 $\pm$ 0,01	0,01	0,07 $\pm$ 0,02	0,08	0,007	11,89 $\pm$ 20,01	0,34	0,007
Süpernatant	TGF β	10,50 $\pm$ 0,03	10,49	2,22 $\pm$ 0,02	2,22	0,007	1,00 $\pm$ 0,01	1,00	0,007
	IFNγ	13,83 $\pm$ 0,01	13,83	2,09 $\pm$ 0,12	2,11	0,007	2,82 $\pm$ 0,02	2,81	0,007
	IL-4	1,17 $\pm$ 0,01	1,17	0,64 $\pm$ 0,09	0,60	0,007	0,73 $\pm$ 0,02	0,73	0,007
	IL-17	22,52 $\pm$ 0,02	22,51	3,03 $\pm$ 0,06	2,99	0,007	2,61 $\pm$ 0,05	2,64	0,007

4.6. KK-MKH'nin STI+PKMH ile ko-kültür Öncesi ve Sonrası Hücre içi ve Süpernatanttan Bakılan Sitokin Seviyeleri Karşılaştırması

STI+PKMH hücre içi IL-17, IFN γ , IL-4 ölçümleri KK-MKH/STI+PKMH 1/5 oranında 24. saat grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü (Tablo 4-8).

STI+PKMH süpernatant TGF β , IFN γ , IL-4, IL-17 ölçümleri KK-MKH/STI+PKMH 1/5 oranında 24. Saat ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti (Tablo 4-8).

STI+PKMH hücre içi IL-17, IFN γ , IL-4 ölçümleri KK-MKH/STI+PKMH 1/5 oranında 72. saat grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü (Tablo 4-8).

STI+PKMH süpernatant TGF β , IFN γ , IL-4, IL-17 ölçümleri KK-MKH/STI+PKMH 1/5 oranında 72. saat ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti (Tablo 4-8).

Tablo 4-8: 1/5 oranında KK-MKH/STI+PKMH Ko-kültür Öncesi ve Sonrası Sitokin Seviyeleri Karşılaştırması

		STI+PKMH		KK-MKH/ STI+PKMH 1/5-24 saat		P	KK-MKH/ STI+PKMH 1/5-72 saat		P
		Ort. $\pm$ ss	Medyan	Ort. $\pm$ ss	Medyan		Ort. $\pm$ ss	Medyan	
Hücre içi	CD4	56,90 $\pm$ 0,10	56,90	20,10 $\pm$ 0,10	20,10	0,000	77,77 $\pm$ 0,15	77,80	0,000
	IL-17	0,38 $\pm$ 0,03	0,38	2,32 $\pm$ 0,15	2,24	0,000	14,54 $\pm$ 0,03	14,53	0,000
	IFNγ	4,35 $\pm$ 0,01	4,35	7,96 $\pm$ 0,06	7,99	0,000	31,05 $\pm$ 0,01	31,04	0,000
	IL-4	0,33 $\pm$ 0,02	0,33	10,22 $\pm$ 0,01	10,22	0,000	7,13 $\pm$ 0,03	7,13	0,000
Süpernatant	TGF β	19,45 $\pm$ 0,63	19,38	12,03 $\pm$ 0,06	12,02	0,000	6,62 $\pm$ 0,43	6,51	0,000
	IFNγ	536,46 $\pm$ 4,16	534,56	136,18 $\pm$ 0,16	136,24	0,000	63,35 $\pm$ 46,75	90,31	0,000
	IL-4	7,70 $\pm$ 0,39	7,66	2,35 $\pm$ 0,03	2,36	0,000	0,18 $\pm$ 0,00	0,18	0,000
	IL-17	649,37 $\pm$ 4,62	648,51	17,04 $\pm$ 0,02	17,04	0,000	19,30 $\pm$ 0,04	19,31	0,000

STI+PKMH hücre içi IL-17, IFN γ , IL-4 ölçümleri KK-MKH/STI+PKMH 1/10 oranında 24. saat grubundan anlamlı ($p<0.05$) olarak daha düşüktü (Tablo 4-9).

STI+PKMH süpernatant TGF β ölçümleri KK-MKH/STI+PKMH 1/10 oranında 24. saat ölçümlerinden anlamlı ($p<0.05$) olarak daha düşüktü (Tablo 4-9).

STI+PKMH süpernatant IFN γ , IL-4, IL-17 ölçümleri KK-MKH/STI+PKMH 1/10 oranında 24. saat ölçümlerinden anlamlı ($p<0.05$) olarak daha yüksekti (Tablo 4-9).

STI+PKMH hücre içi IL17, IFN γ , IL-4 ölçümleri KK-MKH/STI+PKMH 1/10 oranında 72. saat grubundan anlamlı ($p<0.05$) olarak daha düşüktü (Tablo 4-9).

STI+PKMH süpernatant TGF β , IFN γ , IL-4, IL-17 ölçümleri KK-MKH/STI+PKMH 1/10 oranında 72. saat ölçümlerinden anlamlı ($p<0.05$) olarak daha yüksekti (Tablo 4-9).

Tablo 4-9: 1/10 oranında KK-MKH/STI+PKMH Ko-kültür Öncesi ve Sonrası Sitokin Seviyeleri Karşılaştırması

		STI+PKMH		KK-MKH/ STI+PKMH 1/10-24 saat		P	KK-MKH/ STI+PKMH 1/10-72 saat		P
		Ort. $\pm$ ss	Medyan	Ort. $\pm$ ss	Medyan		Ort. $\pm$ ss	Medyan	
Hücre içi	CD4	56,90 $\pm$ 0,10	56,90	32,67 $\pm$ 0,58	33,00	0,000	66,00 $\pm$ 0,10	66,00	0,000
	IL-17	0,38 $\pm$ 0,03	0,38	6,17 $\pm$ 0,21	6,10	0,000	8,67 $\pm$ 0,02	8,68	0,000
	IFNγ	4,35 $\pm$ 0,01	4,35	5,33 $\pm$ 0,03	5,34	0,000	27,15 $\pm$ 0,05	27,16	0,000
	IL-4	0,33 $\pm$ 0,02	0,33	5,80 $\pm$ 0,02	5,80	0,000	6,46 $\pm$ 0,04	6,46	0,000
Süpernatant	TGF β	19,45 $\pm$ 0,63	19,38	23,40 $\pm$ 0,35	23,37	0,000	0,93 $\pm$ 0,12	1,00	0,000
	IFNγ	536,46 $\pm$ 4,16	534,56	126,77 $\pm$ 0,22	126,79	0,000	89,19 $\pm$ 0,04	89,21	0,000
	IL-4	7,70 $\pm$ 0,39	7,66	0,65 $\pm$ 0,03	0,64	0,000	0,76 $\pm$ 0,01	0,77	0,000
	IL-17	649,37 $\pm$ 4,62	648,51	17,92 $\pm$ 0,07	17,92	0,000	13,86 $\pm$ 0,01	13,87	0,000

4.7. WJ-MKH'ın STI+PKMH ile 1/5 ve 1/10 oranlarında Ko-kültürünün İnkübasyon Sürelerine Göre Sitokin Değerleri Değişimi

WJ-MKH/STI+PKMH 1/5 oranında 24. saat hücre içi IL17, IFN γ , IL-4 ölçümleri, WJ-MKH/STI+PKMH 1/5 oranında 72. saat ölçümlerinden anlamlı ($p<0.05$) olarak daha yüksekti (Tablo 4-10).

WJ-MKH/STI+PKMH 1/5 oranında 24. saat süpernatant TGF β , IFN γ ölçümleri, WJ-MKH/STI+PKMH 1/5 oranında 72. saat ölçümlerinden anlamlı ($p<0.05$) olarak daha yüksekti. WJ-MKH/STI+PKMH 1/5 oranında 24. saat süpernatant IL-4, IL-17 ölçümleri, WJ-MKH/STI+PKMH 1/5 oranında 72. saat ölçümlerinden anlamlı ($p<0.05$) olarak daha düşüktü (Tablo 4-10).

WJ-MKH/STI+PKMH 1/10 oranında 24. saat hücre içi IFN γ ölçümleri, WJ-MKH/STI+PKMH 1/10 oranında 72. saat ölçümlerinden anlamlı ($p<0.05$) olarak daha düşüktü. WJ-MKH/STI+PKMH 1/10 oranında 24. saat grubunda hücre içi IL-17, IL-4 ölçümleri, WJ-MKH/STI+PKMH 1/10 oranında 72. saat ölçümlerinden yüksek olması anlamlı ($p<0.05$) bulundu (Tablo 4-11).

WJ-MKH/STI+PKMH 1/10 oranında 24. saat süpernatant TGF β , IFN γ ölçümleri, WJ-MKH/STI+PKMH 1/10 oranında 72. saat ölçümlerinden istatistiksel ($p<0.05$) olarak daha düşüktü. WJ-MKH/STI+PKMH 1/10 oranında 24. saat süpernatant IL-4, IL-17 ölçümleri, WJ-MKH/STI+PKMH 1/10 oranında 72. saat ölçümlerinden istatistiksel ($p<0.05$) olarak daha yüksekti (Tablo 4-11).

Tablo 4-10: 1/5 oranında WJ-MKH/STI+PKMH Ko-kültür Inkübasyon Sürelerindeki Sitokin Seviyeleri Karşılaştırılması

		WJ-MKH/STI+PKMH 1/5-24 saat		WJ-MKH/STI+PKMH 1/5-72 saat		p
		Ort.±ss	Medyan	Ort.±ss	Medyan	
Hücre içi	CD4	27,77 ± 0,15	27,80	72,33 ± 0,21	72,40	0,007
	IL-17	5,47 ± 0,06	5,48	2,05 ± 0,02	2,05	0,007
	IFNγ	11,62 ± 0,02	11,62	1,32 ± 0,03	1,31	0,007
	IL-4	8,94 ± 0,01	8,94	0,94 ± 0,02	0,95	0,006
Süpernatant	TGFβ	167,86 ± 0,11	167,80	0,69 ± 0,01	0,69	0,007
	IFNγ	104,20 ± 0,21	104,28	90,88 ± 0,30	90,96	0,007
	IL-4	0,02 ± 0,00	0,02	0,31 ± 0,00	0,31	0,007
	IL-17	11,02 ± 0,02	11,02	11,04 ± 0,02	11,04	0,024

Tablo 4-11: 1/10 oranında WJ-MKH/STI+PKMH Ko-kültür Inkübasyon Sürelerindeki Sitokin Seviyeleri Karşılaştırması

		WJ-MKH/STI+PKMH 1/10-24 saat		WJ-MKH/STI+PKMH 1/10-72 saat		p
		Ort.±ss	Medyan	Ort.±ss	Medyan	
Hücre içi	CD4	19,50 ± 0,10	19,50	65,17 ± 0,15	65,20	0,007
	IL-17	16,93 ± 0,02	16,93	12,37 ± 0,03	12,36	0,006
	IFNγ	10,24 ± 0,02	10,24	13,47 ± 0,06	13,50	0,007
	IL-4	6,96 ± 0,01	6,96	2,15 ± 0,05	2,15	0,007
Süpernatant	TGFβ	1,36 ± 0,36	1,30	5,28 ± 0,03	5,28	0,007
	IFNγ	94,02 ± 0,11	94,04	103,28 ± 0,48	103,38	0,007
	IL-4	2,24 ± 0,03	2,25	0,27 ± 0,00	0,27	0,007
	IL-17	19,94 ± 0,14	19,87	16,50 ± 0,00	16,50	0,007

4.8. WJ-MKH'ın STI+PKMH ile 1/5 ve 1/10 Oranlarındaki Ko-Kültürlerinin 24 ve 72 Saat sonraki Sitokin Değişimleri

WJ-MKH/STI+PKMH 1/5 oranında 24. saat hücre içi IFN γ , IL-4 ölçümleri, WJ-MKH/STI+PKMH 1/10 oranında 24. saat ölçümlerinden anlamlı ($p<0.05$) olarak daha yüksekti. WJ-MKH/STI+PKMH 1/5 oranında 24. saat grubunda hücre içi IL-17 ölçümleri, WJ-MKH/STI+PKMH 1/10 oranında 24. saat ölçümlerinden anlamlı ($p<0.05$) olarak daha düşüktü (Tablo 4-12).

WJ-MKH/STI+PKMH 1/5 oranında 24. saat süpernatant TGF β , IFN γ ölçümleri, WJ-MKH/STI+PKMH 1/10 oranında 24. saat ölçümlerinden anlamlı ($p<0.05$) olarak daha yüksekti. WJ-MKH/STI+PKMH 1/5 oranında 24. saat süpernatant IL-4, IL-17 ölçümleri, WJ-MKH/STI+PKMH 1/10 oranında 24. saat ölçümlerinden anlamlı ($p<0.05$) olarak daha düşüktü (Tablo 4-12).

WJ-MKH/STI+PKMH 1/5 oranında 72. saat grubunda hücre içi IL-17, IFN γ , IL-4 ölçümleri WJ-MKH/STI+PKMH 1/10 oranında 72. saat ölçümlerinden anlamlı ($p<0.05$) olarak daha düşüktü (Tablo 4-13).

WJ-MKH/STI+PKMH 1/5 oranında 72. saat süpernatant TGF β , IFN γ , IL-17 ölçümleri, WJ-MKH/STI+PKMH 1/10 oranında 72. saat ölçümlerinden anlamlı ($p<0.05$) olarak daha düşüktü. WJ-MKH/STI+PKMH 1/5 oranında 72. saat süpernatant sitokin IL-4 ölçümleri, WJ-MKH/STI+PKMH 1/10 oranında 72. saat ölçümlerinden istatistiksel ($p<0.05$) olarak daha düşük bulundu (Tablo 4-13).

Tablo 4-12: 24 saatlik WJ-MKH ve STI+PKMH Ko-Kültürlerinde Hücre Oranlarına Göre Sitokin Seviyeleri Karşılaştırması

		WJ-MKH/STI+PKMH 1/5-24 saat		WJ-MKH/STI+PKMH 1/10-24 saat		p
		Ort.±ss	Medyan	Ort.±ss	Medyan	
Hücre içi	CD4	27,77 ± 0,15	27,80	19,50 ± 0,10	19,50	0,006
	IL-17	5,47 ± 0,06	5,48	16,93 ± 0,02	16,93	0,007
	IFNγ	11,62 ± 0,02	11,62	10,24 ± 0,02	10,24	0,007
	IL-4	8,94 ± 0,01	8,94	6,96 ± 0,01	6,96	0,006
Süpernatant	TGFβ	167,86 ± 0,11	167,80	1,36 ± 0,36	1,30	0,007
	IFNγ	104,20 ± 0,21	104,28	94,02 ± 0,11	94,04	0,007
	IL-4	0,02 ± 0,00	0,02	2,24 ± 0,03	2,25	0,007
	IL-17	11,02 ± 0,02	11,02	19,94 ± 0,14	19,87	0,007

Tablo 4-13: 72 saatlik WJ-MKH ve STI+PKMH Ko-Kültürlerinde Hücre Oranlarına Göre Sitokin Seviyeleri Karşılaştırması

		WJ-MKH/STI+PKMH 1/5-72 saat		WJ-MKH/STI+PKMH 1/10-72 saat		p
		Ort.±ss	Medyan	Ort.±ss	Medyan	
Hücre içi	CD4	72,33 ± 0,21	72,40	65,17 ± 0,15	65,20	0,006
	IL-17	2,05 ± 0,02	2,05	12,37 ± 0,03	12,36	0,007
	IFNγ	1,32 ± 0,03	1,31	13,47 ± 0,06	13,50	0,007
	IL-4	0,94 ± 0,02	0,95	2,15 ± 0,05	2,15	0,007
Süpernatant	TGFβ	0,69 ± 0,01	0,69	5,28 ± 0,03	5,28	0,007
	IFNγ	90,88 ± 0,30	90,96	103,28 ± 0,48	103,38	0,007
	IL-4	0,31 ± 0,00	0,31	0,27 ± 0,00	0,27	0,007
	IL-17	11,04 ± 0,02	11,04	16,50 ± 0,00	16,50	0,007

4.9. KK-MKH'nin STI+PKMH ile 1/5 ve 1/10 oranlarında Ko-kültürünün İnkübasyon Sürelerine Göre Sitokin Değerleri Değişimi

KK-MKH/STI+PKMH 1/5 oranında 24. saat hücre içi IL-4 ölçümleri, KK-MKH/STI+PKMH 1/5 oranında 72. saat ölçümlerinden anlamlı ($p<0.05$) olarak daha yüksekti. KK-MKH/STI+PKMH 1/5 oranında 24. saat grubunda hücre içi IL-17, IFN γ ölçümleri, KK-MKH/STI+PKMH 1/5 oranında 72. saat ölçümlerinden anlamlı ($p<0.05$) olarak daha düşüktü (Tablo 4-14).

KK-MKH/STI+PKMH 1/5 oranında 24. saat süpernatant TGF β , IFN γ , IL-4 ölçümleri, KK-MKH/STI+PKMH 1/5 oranında 72. saat ölçümlerinden anlamlı ($p<0.05$) olarak daha yüksekti. KK-MKH/STI+PKMH 1/5 oranında 24. saat süpernatant IL-17 ölçümleri, KK-MKH/STI+PKMH 1/5 oranında 72. saat ölçümlerinden anlamlı ($p<0.05$) olarak daha düşüktü (Tablo 4-14).

KK-MKH/STI+PKMH 1/10 oranında 24. saat grubunda hücre içi IL-4, IL-17, IFN γ ölçümleri, KK-MKH/STI+PKMH 1/10 oranında 72. saat ölçümlerinden anlamlı ($p<0.05$) olarak daha düşüktü (Tablo 4-15).

KK-MKH/STI+PKMH 1/10 oranında 24. saat süpernatant TGF β , IFN γ , IL-17 ölçümleri, KK-MKH/STI+PKMH 1/10 oranında 72. saat ölçümlerinden anlamlı ($p<0.05$) olarak daha yüksekti. KK-MKH/STI+PKMH 1/10 oranında 24. saat süpernatant IL-4 ölçümleri, KK-MKH/STI+PKMH 1/10 oranında 72. saat ölçümlerinden anlamlı ($p<0.05$) olarak daha düşüktü (Tablo 4-15).

Tablo 4-14: 1/5 oranında KK-MKH/STI+PKMH Ko-kültür Inkübasyon Sürelerindeki Sitokin Seviyeleri Karşılaştırması

		KK-MKH/STI+PKMH 1/5-24 saat		KK-MKH/STI+PKMH 1/5-72 saat		p
		Ort.±ss	Medyan	Ort.±ss	Medyan	
Hücre içi	CD4	20,10 ± 0,10	20,10	77,77 ± 0,15	77,80	0,006
	IL-17	2,32 ± 0,15	2,24	14,54 ± 0,03	14,53	0,007
	IFN γ	7,96 ± 0,06	7,99	31,05 ± 0,01	31,04	0,007
	IL-4	10,22 ± 0,01	10,22	7,13 ± 0,03	7,13	0,007
Süpernatant	TGF β	12,03 ± 0,06	12,02	6,62 ± 0,43	6,51	0,007
	IFN γ	136,18 ± 0,16	136,24	63,35 ± 46,75	90,31	0,007
	IL-4	2,35 ± 0,03	2,36	0,18 ± 0,00	0,18	0,007
	IL-17	17,04 ± 0,02	17,04	19,30 ± 0,04	19,31	0,007

Tablo 4-15: 1/10 oranında KK-MKH/STI+PKMH Ko-kültür Inkübasyon Sürelerindeki Sitokin Seviyeleri Karşılaştırması

		KK-MKH/STI+PKMH 1/10-24 saat		KK-MKH/STI+PKMH 1/10-72 saat		p
		Ort.±ss	Medyan	Ort.±ss	Medyan	
Hücre içi	CD4	32,67 ± 0,58	33,00	66,00 ± 0,10	66,00	0,007
	IL-17	6,17 ± 0,21	6,10	8,67 ± 0,02	8,68	0,007
	IFN γ	5,33 ± 0,03	5,34	27,15 ± 0,05	27,16	0,007
	IL-4	5,80 ± 0,02	5,80	6,46 ± 0,04	6,46	0,007
Süpernatant	TGF β	23,40 ± 0,35	23,37	0,93 ± 0,12	1,00	0,007
	IFN γ	126,77 ± 0,22	126,79	89,19 ± 0,04	89,21	0,007
	IL-4	0,65 ± 0,03	0,64	0,76 ± 0,01	0,77	0,007
	IL-17	17,92 ± 0,07	17,92	13,86 ± 0,01	13,87	0,007

4.10. KK-MKH'ın STI+PKMH ile 1/5 ve 1/10 Oranlarındaki Ko-Kültürlerinin 24 ve 72 Saat sonraki Sitokin Değişimleri

KK-MKH/STI+PKMH 1/5 oranında 24. saat hücre içi IFN γ ölçümleri, KK-MKH/STI+PKMH 1/10 oranında 24. saat ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü. KK-MKH/STI+PKMH 1/5 oranında 24. Saat grubunda hücre içi IL17, IL-4 ölçümleri, KK-MKH/STI+PKMH 1/10 oranında 24. saat ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti (Tablo 4-16).

KK-MKH/STI+PKMH 1/5 oranında 24. saat süpernatant IFN γ , IL4 ölçümleri, KK-MKH/STI+PKMH 1/10 oranında 24. saat ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. KK-MKH/STI+PKMH 1/5 oranında 24. saat süpernatant TGF β , IL-17 ölçümleri KK-MKH/STI+PKMH 1/10 oranında 24. saat ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü (Tablo 4-16).

KK-MKH/STI+PKMH 1/5 oranında 72. saat hücre içi IFN γ , IL-17, IL-4 ölçümleri, KK-MKH/STI+PKMH 1/10 oranında 72. saat ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti (Tablo 4-17).

KK-MKH/STI+PKMH 1/5 oranında 72. saat süpernatant TGF β , IL-17 ölçümleri, KK-MKH/STI+PKMH 1/10 oranında 72. saat ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. KK-MKH/STI+PKMH 1/5 oranında 72. saat süpernatant IL-4 ölçümleri, KK-MKH/STI+PKMH 1/10 oranında 72. saat ölçümlerinden anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü. KK-MKH/STI+PKMH 1/5 oranında 72. saat süpernatant IFN γ ölçümleri, KK-MKH/STI+PKMH 1/10 oranında 72. saat ölçümleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı ($p > 0.05$) (Tablo 4-17).

Tablo 4-16: 24 saatlik KK-MKH ve STI+PKMH Ko-Kültürlerinde Hücre Oranlarına Göre Sitokin Seviyeleri Karşılaştırması

		KKMKH/STI+PKMH 1/5-24 saat		KK-MKH/STI+PKMH 1/10-24 saat		p
		Ort.±ss	Medyan	Ort.±ss	Medyan	
Hücre içi	CD4	20,10 ± 0,10	20,10	32,67 ± 0,58	33,00	0,007
	IL-17	2,32 ± 0,15	2,24	6,17 ± 0,21	6,10	0,007
	IFNγ	7,96 ± 0,06	7,99	5,33 ± 0,03	5,34	0,007
	IL-4	10,22 ± 0,01	10,22	5,80 ± 0,02	5,80	0,007
Süpernatant	TGFβ	12,03 ± 0,06	12,02	23,40 ± 0,35	23,37	0,007
	IFNγ	136,18 ± 0,16	136,24	126,77 ± 0,22	126,79	0,007
	IL-4	2,35 ± 0,03	2,36	0,65 ± 0,03	0,64	0,007
	IL-17	17,04 ± 0,02	17,04	17,92 ± 0,07	17,92	0,007

Tablo 4-17: 72 saatlik KK-MKH ve STI+PKMH Ko-Kültürlerinde Hücre Oranlarına Göre Sitokin Seviyeleri Karşılaştırması

		KK-MKH/STI+PKMH 1/5-72 saat		KK-MKH/STI+PKMH 1/10-72 saat		p
		Ort.±ss	Medyan	Ort.±ss	Medyan	
Hücre içi	CD4	77,77 ± 0,15	77,80	66,00 ± 0,10	66,00	0,006
	IL-17	14,54 ± 0,03	14,53	8,67 ± 0,02	8,68	0,006
	IFNγ	31,05 ± 0,01	31,04	27,15 ± 0,05	27,16	0,007
	IL-4	7,13 ± 0,03	7,13	6,46 ± 0,04	6,46	0,007
Süpernatant	TGFβ	6,62 ± 0,43	6,51	0,93 ± 0,12	1,00	0,007
	IFNγ	63,35 ± 46,75	90,31	89,19 ± 0,04	89,21	0,857
	IL-4	0,18 ± 0,00	0,18	0,76 ± 0,01	0,77	0,007
	IL-17	19,30 ± 0,04	19,31	13,86 ± 0,01	13,87	0,007

5. TARTIŞMA

Mezenkimal kök hücreler, benzersiz immünomodülatör özellikleri, kendi kendini yenileme ve çok potansiyelli farklılaşma kapasiteleri nedeniyle hücresel tedavi alanında umut verici olarak çalışmalarda yer almaktadır. Mezenkimal kök hücrelerin in situ özellikleri ve biyolojik fonksiyonları henüz aydınlatılamamış olsa da, in vitro elde edilmiş hücrelerin, spesifik hücre soylarına farklılaşma potansiyeline sahip oldukları gösterilmiştir. MKH'lerin hücre homeostazında önemli rollere sahip olduğu tahmin edilmektedir. Son çalışmalar, çeşitli kökenlerden in vitro elde edilmiş MKH'lerin, immün sistem tepkilerini modüle etme ve farklı inflamatuvar hastalıkların ilerlemesini engelleme konusunda geniş bir kapasiteye sahip olduğunu göstermiştir. Doku yaralanmalarına sıklıkla inflamasyon eşlik ettiğinden, inflamatuvar faktörler, MKH'leri hasarlı doku bölgelerine mobilize etmek için ipuçları sağlayabilir. MKH'ler doku onarım fonksiyonlarını gerçekleştirmeden önce modülasyon yaparak mikro ortamı hazırlarlar. İnflamatuvar ve otoimmün hastalıkların tedavisi için başarılı stratejiler olarak yeni hücre temelli terapötik yaklaşımlarda da MKH'ler dikkat çekmektedir. MKH'lerin, başta sitokin ve kemokin salgılaması olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla doğuştan gelen ve edinilmiş immün sistemin tüm hücreleri üzerinde anti-inflamatuvar ve immünomodülatör etkiler gösterdiği pek çok çalışmada vurgulanmıştır (64,65). Mezenkimal kök hücrenin immün sistemi düzenlediği mekanizmalar hala bir tartışma konusudur, ancak immün sistem hücreleri ile doğrudan temas kurması ve çözünür faktörlerin salgılanmasını tetiklediği konuları çalışmalarda tartışılmaya devam etmektedir. MKH'nin IFN γ , IL-1, TNF veya IL-4 gibi pro ve anti inflamatuvar sitokinlere yanıt vermesi, salgıladığı mediatörler (TGF β , IDO, PGE2) ile CD4 $^{+}$ T yardımcı hücrelerini Treg hücre fenotipine dönüştürmesiyle olduğu gösterilmiştir (86).

Bu bilgiler ışığında, çalışmada, MKH'nin immün sistem hücrelerine olan etkisinin araştırılması amaçlandı. PKMH ve MKH ko-kültür öncesi ve sonrası CD4 $^{+}$ T hücrelerin hücre içi sitokin seviyeleri (IL-4, IFN γ ve IL-17) akım sitometri ile tespit edildi. Aynı zamanda TGF β , IL-4, IL-17, IFN γ süpernatant sitokin seviyeleri ELISA ile ölçüldü.

Mezenkimal kök hücreler kemik iliği, adipoz doku, kordon kanı, kordon dokusu gibi dokulardan izole edilebilir ve çoğaltılabilirler. Elde edilebilen hücrelerin plastik adherent olduklarının ve yüzeylerinde CD44, CD73, CD90 ve CD105 gibi belirteçlerin ekspresyonlarının gösterilmesi ile MKH oldukları kabul edilmektedir (11). Çalışmada MKH'ler kordon kanı ve Wharton Jeli'nden izole edilmiş olup mikroskopta plastik adherent oldukları saptanmış, yüzey belirteçleri de (CD44 (%100), CD73 (%99,6), CD90 (%100), CD105 (%99)) akım sitometri yöntemiyle analiz edilmiştir.

Sitokinler, enfeksiyona verilen immün yanıtın veya devam eden bir inflamatuvar yanıtın doğası hakkında değerli bilgiler sağlar. Sitokinlerin saptanması için hücrelerin uyarılması özellikle *in vitro* çalışmalarda büyük önem taşımaktadır. Çalışmada IL-17, IFN γ ve IL-4 sitokin salınımı hücre içi sitokin kiti ile analiz edildi ve her bir sitokin için en uygun doz 10 μ g/ml PHA ve en uygun inkübasyon süresi 72 saat olduğutespit edildi. Tajima ve ark'ları, mevcut çalışmamızı destekler nitelikte olup, yapmış oldukları çalışma ile PKMH stimülasyonu için PHA kullanılmasında en uygun sürenin 72 saat olduğunu göstermişlerdir (87).

Mezenkimal kök hücrelerin immünomodülatör potansiyeli, immün sistemde kilit rol oynayan T hücreler ve bu hücrelerden salgılanan sitokinler üzerinde gösterilmiştir (88,89). Çalışmalar adipoz kaynaklı MKH'lerin kemik iliği kaynaklı MKH'lerden daha güçlü immünomodülatör etkiler sergilediğini, bu da adipoz kaynaklı MKH'lerin immünomodülatör tedavi için daha iyi bir alternatif olacağını öne sürmüştür. Öte yandan WJ-MKH'lerin, *in vivo* uygulandıklarında allojenik bir immün yanıt başlatma riskinin minimum düzeyde olduğu öne sürülmüştür. Bu da, toplama kolaylığının yanı sıra kordon kaynaklı MKH'leri uygun terapötik adaylar haline getireceği belirtilmiştir (61).

In vitro, MKH'lerin antijen sunan hücrelerle iletişim kurmak için naif ve hafıza T-hücre yanıtlarını inhibe ettiği gösterilmiştir. MKH'ler ayrıca parakrin mekanizmalar yoluyla çok işlevli molekülleri salgılayarak immünomodülatör özelliklerini de gösterirler. Bu moleküller, immün sistem ve kanser hücrelerinin işlevini modüle etmek için bir araya gelen ve TGF- β 1, TNF- α , PGE2, IFN γ , HGF, FGF,IDO ve nitrik oksit gibi çok yönlü sitokinler, büyüme faktörleri ve kemokinlerden oluşan geniş bir repertuardır (18,90). Çalışmada MKH'lerin T hücre immün yanıtlarına olan etkisini pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar olarak araştırmak için Th1'den salgılanan IFN γ , Th17'den salgılanan IL-17, Th2 hücrelerinden salgılanan IL-4 sitokinlerinin hem hücre

içinde hem de hücre dışındaki ve Treg hücrelerinden salgılanan TGF- β 'nın hücre dışındaki seviyelerine bakılmıştır. Çalışmada kordon kaynaklı MKH'lerle stimüle olmayan ve stimüle olan PKMH'leri ile ko-kültür sonuçları kültür öncesiyle karşılaştırıldığında farklı immünmodülatör özellikler gösterdikleri bulunmuştur.

Mezenkimal kök hücrelerin mikroçevresi, MKH'leri pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar etkilerini değiştirebilir. MKH'ler, nötrofilleri etkileyerek inflamasyonun erken evresinde pro-inflamatuvar fonksiyonlara sahiptir. Pro-inflamatuvar MKH'ler, MIP-1, CCL5, CXCL9 ve CXCL10 salgılayarak T hücrelerini aktive eder. Bu aşamada, TNF α ve IFN γ gibi yalnızca düşük seviyelerde inflamasyon sinyalleri vardır. Kemik iliği ve göbek kordonundan elde edilen MKH'ler, lenfositleri baskılamak için yeterli iNOS veya IDO üretemeyen düşük seviyelerde IFN- γ ve TNF- α ile muamele edildiklerinde immün sistem cevabını desteklediği vurgulanmaktadır. Bununla birlikte, bu iki sitokin yüksek seviyeye ulaştığında, MKH'leri iNOS veya IDO salgılaması için uyarır, bu da T hücre proliferasyonunun inhibisyonu ve Treg indüksiyonu ile sonuçlanır. Bu sebeple, iNOS veya IDO seviyelerinin, MKH'lerin pro- ve anti-inflamatuvar etkileri arasında anahtar rol oynadığı gösterilmiştir (91-93).

T-hücre aracılı immün yanıt, adaptif immün sisteminin anahtar bileşenidir, enfeksiyonlara ve malignitelere karşı koruma sağlar, aynı zamanda bir dizi otoimmün hastalığa aracılık eder (94). MKH'lerin birkaç modelde T hücresi proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (95). T hücresi proliferasyonunu etkilemenin yanı sıra, MKH'ler, T hücrelerinin aktivasyon ve farklılaşma sürecini de değiştirebildiği söylenmiştir. Luz-Crawford ve ark. MKH'lerin IFN γ ve IL-17 salgılanmasını baskıladığını, ancak Th1 ve Th17 hücrelerinin farklılaşmasını antagonize ederek T hücrelerinin IL-10 üretimini desteklediğini ve böylece Treg oluşumunu indüklediğini vurgulamışlardır (96). Yang ve ark. WJ-MKH'lerin ve PHA ile uyarılan PKMH'ler ko-kültürü sonrası toplanan süpernatantlar ve hücrelerde tespit edilen immün sistem uyarılarına baktıklarında, WJ-MKH uygulanan PKMH'ler ile WJ-MKH'ler olmaksızın PHA ile uyarılan PKMH'ler karşılaştırıldığında, IFN γ 'nın önemli ölçüde baskıladığını göstermişlerdir (83). Bizim çalışmamızda IFN γ için, STI+PKMH ile farklı sürelerde ve oranlarda WJ-MKH'yle ko-kültürleri yapılan deneylerde hücre içi ve süpernatantta sitokin değerleri farklı çıkmıştır. WJ-MKH ile STI+PKMH 1/5 oranında yapılan ko-kültürde, WJ-MKH uygulanmayan STI+PKMH'lere göre 24 saat sonunda IFN γ hücre içinde artış gösterirken, 72 saat sonunda bu değer anlamlı derecede

azalmıştır. WJ-MKH ile STI+PKMH 1/10 oranında yapılan ko-kültürde ise, WJ-MKH uygulanmayan STI+PKMH'lere göre hem 24 saat hem de 72 saat sonunda IFN γ sitokin hücre içindeki artışı anlamlı olarak saptanmıştır. Ko-kültür sonrası süpernatantadaki IFN γ seviyesi, WJ-MKH uygulanmayan STI+PKMH'lere göre 24. saat ve 72. saat sonunda anlamlı derecede azaldığı görülmüştür. Hücre içi sitokin tayini için PKMH'ler kültür plaklarından elde edilip çalışılmıştır, süpernatant için ise ko-kültür sonrası MKH ve PKMH'nin birlikte olduğu kültür sıvısı toplanıp çalışılmıştır. Hücre içindeki sitokin miktarı ve hücre dışına salınan sitokin miktarının farklı olmasının nedeni olarak MKH'lerin PKMH'lerden hücre dışına sitokin salınımını inhibe ettiğini düşünmekteyiz. Wharton Jeli'nden izole edilen MKH'lerin pro-inflamatuvar bir sitokin olan hücre içi IFN γ salınımını sadece 1/5 oranın ko-kültürü yapılan WJ-MKH/PKMH 72. saat sonunda inhibe etmiştir. Kordon kanından izole edilen MKH'lerin IFN γ hücre içi ve süpernatant değerlerine her grup için ayrı ayrı bakıldığında; KK-MKH uygulanmayan gruba göre hem 24 saat hem de 72 saat sonunda hücre içi sitokin seviyesi anlamlı derecede artarken, süpernatanttaki sitokin seviyesi her grup için anlamlı derecede düşmüştür. Ko-kültürün 1/5 ve 1/10 oranlarında 24 saat sonundaki hücre içi IFN γ artışı 72 saat sonundaki artışa göre anlamlı derecede daha azdı. PKMH üzerine KK-MKH eklenmesi sadece süpernatanttaki IFN γ sitokin değerlerini inhibe etmiştir. Hücre içi IFN γ sitokin salınımını KK-MKH arttırmıştır.

İmmün yanıtta T hücresi alt grupları arasında yer alan Th17 hücreleri, IL-17A, IL-17F ve IL-22 sitokinleri yanı sıra kemokin reseptörü CCR6'yı ve bir Th17-spesifik T-hücresinin ayırt edici özelliği olarak transkripsiyon faktörü olan RAR ile ilişkili reseptör T'yi (ROR γ T) ifade eder. Yetersiz veya eksik bir T hücresi immün düzenlemesine yanıt olarak, Th17 hücreleri, romatoid artrit, tip 1 diyabet, multiple skleroz, sistemik lupus eritematozus ve bağırsak hastalıkları gibi birçok inflamatuvar ve otoimmün hastalığın patogenezinde rol oynamaktadır. İmmünomodülatör ve koruyucu özelliklerinden dolayı, MKH'ler, inflamatuvar ve otoimmün hastalıklardaki terapötik potansiyelleri için çalışılmaktadır. MKH'lerin farklı immün hücre popülasyonlarının, özellikle Th17 alt gruplarının yanıtını inhibe ettiği mekanizmalar tam olarak açıklanmasa da; bugüne kadar, birkaç veri rapor edilmiştir (97-101).

Mezenkimal kök hücreler Th17 farklılaşmasını ve fonksiyonlarını direkt veya indirekt yolla inhibe edebilirler (91-102). MKH'ler, PD-1, IL-10, CCL2 veya SOCS3'ü ifadesini arttırarak ve STAT3 yolunu inhibe ederek Th17 farklılaşmasını inhibe edebilir.

STAT3 yolu inhibisyonu, ROR γ t ve IL-17 ifadesini azaltarak Th17 farklılaşmasını azaltır. MKH'ler tarafından salgılanan PGE₂, Th17 inhibisyonuna katkıda bulunur. Bazı çalışmalar MKH'lerin aynı zamanda Th17 proliferasyonunu destekleyebileceğini göstermektedir (103-107). Guo ve arkadaşları, kemik iliği kaynaklı MKH'lerin, karışık lenfosit reaksiyon deneylerinde IL-17 ekspresyonunu ve Th17 hücre farklılaşmasını desteklediğini göstermişlerdir (108). Bizim çalışmamızda da, stimüle edilmiş PKMH üzerine farklı oranlarda eklenen WJ-MKH'yle yapılan farklı sürelerde ko-kültür sonrası IL-17'nin hücre içi ekspresyonunu anlamlı derecede arttırdığı gözlenmiştir. Hücre içi IL-17 artışı en az 1/5 (MKH/PKMH) hücre oranında 72 saat inkübe edilen ko-kültür sonucunda elde edilmiştir (%2,05). En fazla artış ise 1/10 (MKH/PKMH) hücre oranında 24 saat sonunda elde edilmiştir (%16,93). PKMH ve MKH'nin birlikte bulunma süreleri arttıkça hücre içi sitokin ekspresyonu azalmıştır. MKH ile daha fazla sayıda PKMH ko-kültür edildiğinde ise ilk 24 saatte hücre içi sitokin ekspresyonu çok fazla artarken, 72 saat sonunda bu seviye biraz daha azalmıştır. Kordon kaynaklı MKH ise tam tersi etki göstermiş ve 1/5 hücre oranında hücre içi IL-17 sitokin seviyesi daha fazla bir artış göstermiştir. MKH ve PKMH ko-kültür sonunda süpernatanttaki IL-17 sitokin seviyesine bakıldığında ise hem WJ hem de KK'da anlamlı derecede inhibisyon saptanmıştır. Yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında IL-17 süpernatant sitokin seviyesi MKH tarafından inhibe edilebilmektedir. Hücre içi sitokin seviyesi için ise daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. MKH'lerin kalitesi, nerden izole edildiği ve T hücreleriyle olan oran farkı, sitokin seviyeleri üzerine olan etkilerini değiştirebileceği düşünülmektedir.

Mezenkimal kök hücreler, triptofan tükenmesine ve triptofan metabolit üretimine neden olan IDO ekspresyonu yoluyla Th2 hücrelerinin farklılaşmasını, olgunlaşmasını ve Th2 hücrelerinden IL-4 salgılanmasını indükler. Gieseke ve ark. MKH'lerin, T hücrelerinin proliferasyonunu doğrudan engelleyebildiğini göstermişlerdir (89,109). MKH'ler immün sistem üzerine pro-inflamatuvar yönde arttırıcı etki yaparken anti-inflamatuvar yönde baskılayıcı özelliğe sahiptir. Aggarwal ve ark. kemik iliğinden izole ettikleri MKH'leri PKMH'ten izole ettikleri T hücrelerle 1/10 oranında ko-kültür yaptıktan sonra süpernatanttaki değerlerine baktıklarında IL-4 seviyesinin anlamlı derecede arttığını bulmuşlardır (110). Bizim çalışmamızda, WJ-MKH ile PKMH hücrelerinin farklı oranlarda ko-kültürü sonrası IL-4 hücre içi sitokin seviyesi 1/5 (MKH/PKMH) oranı 24 saat sonunda hızla anlamlı derecede artarken, 72 saat sonunda

başlangıca göre artmış, ancak 24 saate göre azalmıştır. 1/10 oranında ise 24 saatte artmış, 72 saat sonunda azalma göstermiştir ancak bu azalma 24 saate göre daha az olmuştur. KK-MKH kullanılan gruplarda ise hücre içi IL-4 oranı her grupta anlamlı derecede artmıştır. Her iki MKH hücre kaynağı kullanılan gruplarda süpernatanttaki IL-4 seviyesi anlamlı derecede baskılanmıştır.

Ana immün düzenleyici sitokinler olan TGF- β ve IL-10, MKH'ler tarafından üretilen sitokinlerdir. TGF- β , MKH'ler tarafından yapısal olarak salgılanır ve ayrıca IFN- γ , TNF- α gibi inflamatuvar faktörler tarafından seviyeleri artabilmektedir. TGF- β , DH'lerde ve T hücrelerinde IL-2, MHC-II (majör histouyumluluk kompleksi II) ve yardımcı uyarıcı faktör ekspresyonunu inhibe eder. Hem Th1 farklılaşması hem de Th2 farklılaşması, TGF- β tarafından inhibe edilebilir. TGF- β , Treg ve Breg üretimini teşvik eder. TGF- β , IFN- γ ve TNF- α ile uyarılan kemik iliği kaynaklı MKH'lerin iNOS ve IDO ekspresyonunu inhibe ederek immün baskılayıcı etkilerini ortadan kaldırdığı da gösterilmiştir (111-114) Yang ve ark. WJ-MKH'lerin ve PHA ile uyarılan PKMH'ler ko-kültürü sonrası toplanan süpernatantlarda tespit edilen PGE2, TGF- β 1 ve IL-10 ve Treg immün sistem uyarıcılarını incelediklerinde, WJ-MKH uygulanan PKMH'ler ile WJ-MKH'ler olmaksızın PHA ile uyarılan PKMH'ler karşılaştırıldığında, PGE2, TGF- β 1 ve IL-10 ve Treg hücrelerinin sayısının büyük ölçüde arttırdığını göstermişlerdir. Bu bulguyla birlikte WJ-MKH'lerin, baskılayıcı sitokinlerin üretimini artırarak immünosupresif etki gösterdiğini vurgulamışlardır (83). Wang ve ark. yaptıkları çalışmada, 1/5 oranında stimüle WJ-MKH/stimüle PKMH 5 günlük ko-kültür sonrası Th1 ve Th17 hücrelerinin baskılandığını ve Th2 ve Treg hücrelerinin ise artış gösterdiğini saptamışlardır (115). Bizim çalışmamızda, TGF- β sitokin seviyesi tüm deney gruplarında ko-kültür sonrası süpernatanttan ELISA ile tespit edilmiştir. 1/5 oranında WJ-MKH/PKMH 24 saatlik ko-kültür sonrasında süpernatanttaki TGF- β 1 sitokin seviyesi önemli ve anlamlı derece artış göstermiştir. 72 saat sonunda ise WJ-MKH eklenmeyen gruba göre anlamlı derecede azalmıştır. Yine 1/10 oranında WJ-MKH/PKMH yapılan ko-kültür sonrası hem 24 saatte hem de 72 saatte sitokin seviyesi anlamlı derecede düşmüştür. KK-MKH uygulanan gruplarda ise süpernatanttaki TGF- β sitokin seviyesi sadece 1/10 hücre oranında yapılan ko-kültür sonrası 24 saatin sonunda başlangıca göre artmış olup, diğer gruplarda anlamlı derecede azalmıştır. Wang ve ark. yaptığı çalışma bizim çalışmamızı destekler nitelikte olup, 1/5 hücre oranında Treg hücrelerinden salgılanan TGF- β sitokin seviyesi anlamlı derecede artmıştır (115).

Çalışmamızda diğer gruplardan farklı sonuçlar elde etme sebebimizin, MKH'lerin stimüle edilerek kullanılması ve ko-kültür sürelerinin daha uzun olmasından dolayı diğer gruplarımızda baskılanmış olabileceğini düşünmekteyiz.

Deuse ve ark.'ları, MKH oranı kullanılmasının T hücre proliferasyonunu engellediği ve daha az oranda MKH kullanımının T hücre proliferasyonuna pozitif yönde katkısı olduğunu vurgulamışlardır. Yaptıkları çalışmayla ko-kültürde PKMH ve MKH oranlarının T hücre proliferasyonunu etkileyerek farklı immünomodülasyon etkileri olabileceğini ve aynı zamanda hücre-hücre etkileşiminin zorunlu olmadığını öne sürmüşlerdir (97). Bizim çalışmamızda da direkt MKH/PKMH ko-kültüründe hücre oranları 1/5 ve 1/10 olarak 2 farklı oran kullanılmış olup, farklı oranlarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Krampera ve ark.'nın yaptığı çalışma da bizim çalışmamızı destekler nitelikte olup, yüksek oranda MKH'nin T hücre üzerine olan baskılama yeteneğinin daha fazla olduğunu vurgulamışlardır (116). Bu iki farklı oran karşılaştırıldığında hem hücre içi hem süpernatanttaki IFN γ sitokin seviyesi 24 saat sonunda 1/10 hücre oranında, 1/5 hücre oranına göre anlamlı derecede azalmıştır. 72 saat sonunda ise, 1/10 hücre oranında 1/5 hücre oranına göre anlamlı derecede artış gözlenmiştir. IL-17 sitokini için karşılaştırma yaptığımızda, 24 saat ve 72 saat sonunda hem hücre içi sitokin hem de süpernatanttaki sitokin seviyesi 1/10 hücre oranında 1/5 hücre oranına göre anlamlı derecede artmıştır. MKH'nin PKMH üzerine uygulanması IL-17 sitokini üretimini ve salgılanması baskılamamıştır. IL-4 sitokini için karşılaştırma yaptığımızda, 72 saat sonunda 1/10 hücre oranının 1/5 hücre oranına göre hücre içi sitokin seviyesinin arttığı, süpernatanttaki sitokin seviyesinin ise anlamlı derecede azaldığı gözlenmiştir. TGF β sitokini için karşılaştırdığımızda, 24 saat sonunda 1/10 hücre oranının 1/5 hücre oranına göre anlamlı derecede azaldığı, 72 saat sonunda ise anlamlı derecede arttığı bulunmuştur. Çalışmamızda MKH sayısı sabit kalırken oran olarak PKMH sayısı arttırılmıştır. MKH'ın oran olarak yüksek olduğu ko-kültürlerde T hücre proliferasyonunu stimule etmesiyle daha çok sitokin ekspresyonu ve salgılanmasına sebep olmuştur.

MKH'lerin etkileri her zaman immünosüpresif değildir, ancak MKH'ler belirli koşullar altında pro-inflamatuvar olarak da davranabilir. Örneğin, düşük IFN γ ve TNF seviyelerinin mevcudiyeti, MKH'lere immün sistemi uyarıcı potansiyel kazandırabilir, bu da pro-inflamatuvar sitokin seviyelerindeki varyasyonların, MKH'lerin immün düzenleyici modunu gösterir. İnflamatuvar hastalık modellerini kullanan diğer

alışmalar (rneğin, GvHD ve deneysel otoimmün ensefalomiyelit) hastalık seyrinin başlangıcında veya nüksetme sırasında, inflamasyon düşük olduğunda MKH'lerin uygulanmasının, bunların terapötik etkinliğini inhibe ettiğini göstermiştir. Bu bulgular, MKH'lerde immünosupresif özellikleri indüklemek için belirli bir düzeyde inflamasyonun gerekli olduğunu ve bu çalışmalardan öğrenilen derslerin terapötik metodolojilere rehberlik etmek için kullanılması gerektiğini göstermektedir. Hastalarda inflamatuvar sitokin seviyelerinin arttırılması kabul edilebilir olmasa da, MKH'leri infüzyondan önce inflamatuvar bir ortama maruz bırakmak gibi alternatif yaklaşımlar dşnlmelidir (117-122).

Mezenkimal kök hücrenin, immün sistem üzerine yapılan çalışmalarında genel olarak adipoz doku ve kemik iliği kaynaklı MKH'ler kullanılmaktadır. Bu alışmada, MKH kaynağı olarak Wharton Jeli ve Kordon kanı kullanılması ile immün sistem üzerine olan etkisinin araştırılması literature farklı bir bakış açısı kazandırmıştır. Çalışmada ki farklı MKH kaynağının immün sisteme etkisi; 1/5 ve 1/10 olarak iki farklı hücre oranlarının kullanılması, 24 saat ve 72 saat olarak iki farklı inkübasyon süresi şeklinde farklı kombinasyonlarda değerlendirilmiştir. Bu parametrelerin ayrı ayrı değerlendirilmesi, analiz edilmeleri ve karşılaştırılmaları yönünden, bu çalışma zgn değer taşıma niteliğindedir.

Umut vaad eden tüm araştırmalara rağmen, MKH ile yapılan klinik çalışmalarda, MKH popülasyonlarının immün sistem üzerindeki değişkenliğinden kaynaklanan belirsiz sonuçların varlığı, çalışmaların ilerlemesine engel olmaktadır. Bu amaçla çalışmamız da pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokinlerin hem hücre içi hem de süpernatant seviyelerinin araştırılması bu konuya yeni bir bakış açısı kazandırmıştır. MKH'nin, immün sistem hücrelerinde hücre içi sitokin seviyesini nasıl etkilediği ile ilgili daha önce yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır, çalışma bu açıdan zgn niteliktedir.

Çalışmada süpernatant ve hücre içi sitokin değerlerinin farklı çıkması; hücre içinde ifade olan sitokinlerin hücre dışına transportunun engellenmesinde MKH'lerin etkili olabileceğini düşündürmektedir. Hücre içinde ifade olan sitokinlerin, hala tam olarak belirlenemeyen hücre dışına transport yolu mekanizmalarının daha ileri çalışmalarla ortaya çıkarılması spernatantla hücre içi sitokin seviye farklılığının nedeninin anlaşılmasına katkıda bulunacaktır.

MKH ve immün sistem hücrelerinin interaksyonu karmaşık bir süreci başlatmaktadır. Bu karmaşık sürecin aydınlatılması için MKH kaynağının doğru ve uygun seçilmesi, immün sisteme ait hücrelerin alt gruplarının spesifik olarak belirlenmesi ile *in vitro* ve sonrasında *in vivo*  alışmalar yapıldıkça mümkün olabilecektir.



KAYNAKLAR

- 1) Arrighi N, editor. *Stem Cells*. London, UK: Elsevier Press; 2018.
- 2) Ramakrishna V, Janardhan PB, Sudarsanareddy L, Stem cells and regenerative medicine – A Review. *Annu Res & Rev Biol* 2011;**1**(4): 79-110.
- 3) Can A. A concise review on the classification and nomenclature of stem cells. *Turk J Haematol* 2008;**25**(2):57-59.
- 4) Fortier LA. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Vet Surg* 2005;**34**:415-423.
- 5) Can A. *Kök Hücre, Biyolojisi Türleri ve Tedavide Kullanımları*. Ankara, Türkiye: Akademisyen Kitabevi; 2014 327-426.
- 6) Lee EH, Hui JHP. The potential of stem cells in orthopaedic surgery. *J Bone Jt Surg* 2006;**88**(7):841-853.
- 7) Garbuzova-Davis S, Saporta S, Saberg P. *Intravenous infusions of human umbilical cord blood stem cells benefit rodents with ALS, spinal cord injury*, 2003; USF studies find.<http://www.hsc.usf.edu/publicaffairs/releases/cordbloodstudies03.html>
- 8) Seres KB, Hollands P. Cord blood: the future of regenerative medicine?. *Reprod Biomed Online* 2010;**20**(1):98-102.
- 9) Bhattacharya N, Stubblefield P. (Eds.) *Cord blood stem cells – the basic science*. In: Frontiers of Cord Blood Science. Springer-Verlag, London, 2009; pp.19–25.
- 10) Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000;**28**(8):875-884.
- 11) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;**284**(5411):143-147.
- 12) Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;**8**(4):315-317.

- 13) Abdal Dayem A, Lee SB, Kim K, Lim KM, Jeon TI, Seok J, et al. Production of mesenchymal stem cells through stem cell reprogramming. *Int J Mol Sci.* 2019;**20**(8):1922.
- 14) Cho KA, Ju SY, Cho SJ, Jung YJ, Woo SY, Seoh JY, et al. Mesenchymal stem cells showed the highest potential for the regeneration of injured liver tissue compared with other subpopulations of the bone marrow. *Cell Biol Int* 2009; **33**(7):772-777.
- 15) Qian H, Yang H, Xui WR, Yan YM, Chen QL, Zhu W, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells ameliorate rat acute renal failure by differentiation into renal tubular epithelial-like cells. *Int J Mol Med* 2008;**22**(3):325-332.
- 16) Rose RA, Jiang H, Wang X, Helke S, Tsoporis JN, Gong N, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells express cardiac- specific markers, retain the stromal phenotype, and do not become functional cardiomyocytes in vitro. *Stem Cells* 2008;**26**(11):2884-2892.
- 17) Han F, Wang CY, Yang L, Zhan SD, Zhang M, Tian K. Contribution of murine bone marrow mesenchymal stem cells to pancreas regeneration after partial pancreatectomy in mice. *Cell Biol Int* 2012;**36**(9):823-831.
- 18) Na Li, Jinlian Hua. Interactions between mesenchymal stem cells and the immune System. *Cell. Mol. Life Sci.* 2017;**74**(13):2345-2360.
- 19) Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol* 2014;**15**(11):1009-1016.
- 20) Munir H, McGettrick HM. Mesenchymal stem cell therapy for autoimmune disease: risks and rewards. *Stem Cells Dev* 2015;**24**(18):2091-2100.
- 21) Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006;**24**(5):1294-301.
- 22) Hu L, Hu J, Zhao J, Liu J, Ouyang W, Yang C, et al. Side-by-side comparison of the biological characteristics of human umbilical cord and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Biomed Res Int* 2013;2013:438243.

- 23) Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW and Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cell. *Blood* 2005;105:2821-2827.
- 24) Hendijani F, Sadeghi-Aliabadi H, Haghjooy Javanmard S. Comparison of human mesenchymal stem cells isolated by explant culture method from umbilical cord and Wharton's jelly matrix. *Cell Tissue Res*. 2014;15(4):555-565.
- 25) Bertolo A, Pavlicek D, Gemperli A, Baur M, Pötzel T, Stoyanov J. Increased motility of mesenchymal stem cells is correlated with inhibition of stimulated peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. *JSRM* 2017;13(2):62.
- 26) Gao F, Chiu SM, Motan DA, Zhang Z, Chen L, Ji HL, et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death Dis* 2016;7(1):e2062.
- 27) Francois M, Galipeau J. New insights on translational development of mesenchymal stromal cells for suppressor therapy. *J Cell Physiol* 2012;227(11):3535-3538.
- 28) English K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunol Cell Biol* 2013;91(1):19-26.
- 29) Batten P, Sarathchandra P, Antoniow JW, Tay SS, Lowdell MW, Taylor PM, et al. Human mesenchymal stem cells induce T cell anergy and downregulate T cell allo-responses via the TH2 pathway: relevance to tissue engineering human heart valves. *Tissue Eng* 2006;12(8):2263-2273.
- 30) Melief SM, Geutskens SB, Fibbe WE, Roelofs H. Multipotent stromal cells skew monocytes towards an anti-inflammatory interleukin-10-producing phenotype by production of interleukin-6. *Haematologica* 2013;98(6):888-895.
- 31) Yasuaki O, Yasuhide Y, Hiroe O, Mika T, Yoshihiro K, Mari S, et al. Induction of pluripotent stem cells from human third molar mesenchymal stromal cells. *J Biol Chem* 2010;285(38):29270-29278.
- 32) Rossant J. Stem cells and early lineage development. *Cell* 2008;132:527-31.

- 33) Little MT, Storb R. History of haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat Rev Cancer* 2002;**2**(3):231-238.
- 34) Thomas ED, Lochte HL Jr, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med* 1957;**257**(11),491-496.
- 35) Çetiner M., *Hücre Tedaviler Tarihi ve Süreyya Tahsin Aygün. 2. Ulusal Kök Hücre Kongresi Program ve Özet Kitabı*, Trabzon, 2006; Sayfa;29-34.
- 36) Şahin F, Saydam G, Omay SB. Kök hücre plastisitesi ve klinik pratikte kök hücre tedavisi. *Turk J Hematol Oncol* 2005;**15**(1),48-56.
- 37) Martin G. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;**78**(12);7634-7638.
- 38) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall MS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;**282**(5391):1145-1147.
- 39) Khan FA, Almohazey D, Alomari M, Almofty SA. Isolation, culture, and functional characterization of human embryonic stem cells: Current trends and challenges. *Stem Cells Int* 2018;**2018**:1429351.
- 40) Baharvand H, Jafary H, Massumi M, Ashtiani SK. Generation of insulin-secreting cells from human embryonic stem cells. *Dev Growth Differ* 2006;**48**(5):323-332.
- 41) Güneş AM. Kök hücre plastisitesi ve tıptaki kullanım alanları. *J Curr Pediatr* 2005;**3**(1):36-42.
- 42) Lanza, R., Gearhart, J., Hogan, B., Melton, D., Pedersen, R., Thomson, J. ve West, M. “*Handbook of Stem Cells*”, Embryonic Stem cells, 2004; Volume 1, Elsevier Academic Press.
- 43) Watt FM, Driskell RR. The therapeutic potential of stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010;**365**(1537):155-163.
- 44) Cavaleri F, Schöler H. Molecular Basis of Pluripotency. In: Lanza R, Editor. *Essential of Stem Cell Biology*. San Diego: Academic Press; 2009.P.36-60.

- 45) Guillott PV, Cui W, Fisk NM, Polak JM. Stem cell differentiation and expansion for clinical applications of tissue engineering. *J Cell Mol Med* 2007;**11**(5):935-944.
- 46) Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol* 2006;**169**(2):338-346.
- 47) Lensch MW. Cellular reprogramming and pluripotency induction cellular. *Br Med Bull* 2009;**90**(1):19-35.
- 48) Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 1997;**88**(3):287-298.
- 49) Abdelkrim H, Juan DB, Jane W, Mohamed A, Bernat S. The immune boundaries for stem cell based therapies: problems and prospective solutions. *J Cell Mol Med* 2009;**13**(8A):1464-1475.
- 50) Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970;**3**(4):393-403.
- 51) Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* 2006;**24**(2):376-85.
- 52) Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 1999;**181**(1):67-73.
- 53) Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant* 2011;**20**(1):5-14.
- 54) Majumdar MK, Thiede MA, Haynesworth SE, Bruder SP, Gerson SL. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. *J Hematother Stem Cell Res* 2000;**9**(6):841-848.
- 55) Brighton CT, Hunt RM. Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus. *J Bone Joint Surg Am* 1991;**73**(6):832-847.
- 56) Kobolak J, Dinnyes A, Memic A, Khademhosseini A, Mobasheri A. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization,

- biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. *Methods* 2016;**99**:62-68.
- 57) Thaweesapphithak S, Tantrawatpan C, Kheolamai P, Tantikanlayaporn D, Roytrakul S, Manochantr S. Human serum enhances the proliferative capacity and immunomodulatory property of MSCs derived from human placenta and umbilical cord. *Stem Cell Res Ther* 2019;**10**(1):79.
- 58) Shang Y, Guan H, Zhou F. Biological characteristics of umbilical cord mesenchymal stem cells and its therapeutic potential for hematological disorders. *Front Cell Dev Biol* 2021;**9**:570179.
- 59) Mennan C, Wright K, Bhattacharjee A, Balain B, Richardson J, Roberts S. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from different regions of the human umbilical cord. *Biomed Res Int* 2013;**2013**:916136.
- 60) Liu C, Zhang H, Tang X, Feng R, Yao G, Chn W, et al. Mesenchymal stem cells promote the osteogenesis in collagen-induced arthritic mice through the inhibition of TNF- α . *Stem Cells Int.* 2018;**2018**:4069032.
- 61) Kim JH, Jo CH, Kim HR, Hwang YI. Comparison of immunological characteristics of mesenchymal stem cells from the periodontal ligament, umbilical cord, and adipose tissue. *Stem Cells Int.* 2018;**2018**:8429042.
- 62) Richardson SM, Kalamegam G, Pushparaj PN, Matta C, Memic A, Khademhosseini A, et al. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: Focus on articular cartilage and intervertebral disc regeneration. *Methods* 2016;**99**:69-80.
- 63) Zhang H, Tao Y, Liu H, Ren S, Zhang B, Chen H. Immunomodulatory function of whole human umbilical cord derived mesenchymal stem cells. *Mol Immunol* 2017;**87**:293-299.
- 64) Kyurkchiev D, Bochev I, Ivanova-Todorova E, Mourdjeva M, Oreshkova T, Belemzova K, et al. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells* 2014;**6**(5):552-570.
- 65) Siegel G, Schäfer R, Dazzi F. The immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. *Transplantation* 2009;**87**:S45-S49.
- 66) Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-

lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002;**99**: 3838-3843.

- 67) Ivanova-Todorova E, Bochev I, Mourdjeva M, Dimitrov R, Bukarev D, Kyurkchiev S, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Immunol Lett* 2009;**126**(1-2):37-42.
- 68) Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 2006; **107**(1):367-372.
- 69) Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells* 2006;**24**(1):74-85.
- 70) Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 2008;**111**(3):1327-1333.
- 71) Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringden O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2003;**31**(10):890-896.
- 72) Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 2008;**371**(9624):1579-1586.
- 73) Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004;**363**(9419):1439-1441.
- 74) Karussis D, Kassis I, Kurkalli BG, Slavin S. Immunomodulation and neuroprotection with mesenchymal bone marrow stem cells (MSCs): a proposed treatment for multiple sclerosis and other

- neuroimmunological/neurodegenerative diseases. *J Neurol Sci* 2008;**265**(1-2):131-135.
- 75) Sun L, Akiyama K, Zhang H, Yamaza T, Hou Y, Zhao S, et al. Mesenchymal stem cell transplantation reverses multiorgan dysfunction in systemic lupus erythematosus mice and humans. *Stem Cells* 2009;**27**(6):1421-1432.
- 76) Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell* 2013;**13**(4):392-402.
- 77) Dazzi F, Krampera M. Mesenchymal stem cells and autoimmune diseases. *Best Pract Res Clin Haematol* 2011;**24**(1):49-57.
- 78) U.S. National Library of Medicine: *Mesenchymal Stem cells clinical projects*. (İnternette) Erişim:13.12.2021, <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>.
- 79) Yang ZX, Chi Y, Ji YR, Wang YW, Zhang J, Luo WF, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells increase interleukin-9 production of CD4(+) T cells. *Exp Ther Med* 2017;**14**(4):3541-3548.
- 80) Min H, Xu L, Parrott R, Overall CC, Lillich M, Rabjohns EM, et al. Mesenchymal stromal cells reprogram monocytes and macrophages with processing bodies. *Stem Cells* 2020;**39**(1):115-128.
- 81) Xie Q, Liu R, Jiang J, Peng J, Yang C, Zhang W, et al. What is the impact of human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation on clinical treatment? *Stem Cell Res Ther* 2020;**11**(1):519.
- 82) Song Y, Lim JY, Lim T, Im KI, Kim N, Nam YS, et al. Human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow exert immunomodulatory effects in different mechanisms. *World J Stem Cells* 2020;**12**(9):1032-1049.
- 83) Yang H, Sun J, Yan L, Duan WM, Bi J, Qu T. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells suppress proliferation of PHA-activated lymphocytes in vitro by inducing CD4 + CD25 high CD45RA + regulatory T cell production and modulating cytokine secretion. *Cell Immunol* 2016;**302**:26-31.
- 84) Yuan X, Qin X, Wang D, Zhang Z, Tang X, Gao X, et al. Mesenchymal stem cell therapy induces FLT3L and CD1c(+) dendritic cells in systemic lupus erythematosus patients. *Nat Commun* 2019;**10**(1):2498.

- 85) Baran J, Kowalczyk D, Ozog M, Zembala M. Three-color akim cytometry detection of intracellular cytokines in peripheral blood mononuclear cells: comparative analysis of phorbol myristate acetate-ionomycin and phytohemagglutinin stimulation. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;**8**(2):303-313.
- 86) Atoui R, Chiu RCJ. Concise Review: Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells in cellular transplantation: Update, controversies, and unknowns. *Stem Cells Transl Med* 2012;**1**(3):200-205.
- 87) Tajima M, Fujinaga T, Koike T, et al. Assay for Equine peripheral blood lymphocytes blastogenic response using ethidium bromide. *Jpn J Vet Sci* 1987;**49**(3):567-570.
- 88) Galipeau J, Sensébé L. Mesenchymal stromal cells: clinical challenges and therapeutic opportunities. *Cell Stem Cell* 2018;**22**(6):824-833.
- 89) Weiss ARR, Dahlke MH. Immunomodulation by mesenchymal stem cells (MSCs): Mechanisms of action of living, apoptotic, and dead mscs. *Front Immunol* 2019;**10**:1191.
- 90) Salgado AJ, Reis RL, Sousa NJ, Gimble JM. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther* 2010;**5**(2):103-110.
- 91) Jiang W, Xu J. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Cell Proliferation* 2020;**53**:e12712.
- 92) Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* 2008;**2**(2):141-150.
- 93) Miyara M, Ito Y, Sakaguchi S. TREG-cell therapies for autoimmune rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2014;**10**(9):543-551.
- 94) Dimeloe S, Burgener AV, Grahert J, Hess C. T-cell metabolism governing activation, proliferation and differentiation: A modular view. *Immunology* 2017;**150**(1):35-44.
- 95) Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 2002;**30**(1):42-48.

- 96) Luz-Crawford P, Kurte M, Bravo-Alegria J, Contreras R, Nova-Lamperti E, Tejedor G, et al. Mesenchymal stem cells generate a CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cell population during the differentiation process of Th1 and Th17 cells. *Stem Cell Res Ther* 2013;**4**(3):65.
- 97) Deuse T, Stubbendorff M, Tang-Quan K, Phillips N, Kay MA, Eiermann T. et al. Immunogenicity and immunomodulatory properties of umbilical cord lining mesenchymal stem cells. *Cell Trans* 2011;**20**(5):655-67.
- 98) Terraza-Aguirre C, Campos-Mora M, Elizondo-Vega R, Contreras-López RA, Luz-Crawford P, Jorgensen C, et al. Mechanisms behind the immunoregulatory dialogue between mesenchymal stem cells and Th17 cells. *Cells* 2020;**9**(7):1660.
- 99) Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med* 2009;**361**(9):888-898.
- 100) Yasuda K, Takeuchi Y, Hirota K. The pathogenicity of Th17 cells in autoimmune diseases. *Semin Immunopathol* 2019;**41**(3):283-297.
- 101) Lee GR. The Balance of Th17 versus Treg Cells in Autoimmunity. *Int J Mol Sci.* 2018;**19**(3):730.
- 102) Duffy MM, Pindjakova J, Hanley SA, McCarthy C, Weidhofer GA, Sweeney EM, et al. Mesenchymal stem cell inhibition of T-helper 17 cell-differentiation is triggered by cell-cell contact and mediated by prostaglandin E2 via the EP4 receptor. *Eur J Immunol* 2011;**41**(10):2840-2851.
- 103) Luz-Crawford P, Noël D, Fernandez X, Khoury M, Figueroa F, Carrion F, et al. Mesenchymal stem cells repress Th17 molecular program through the PD-1 pathway. *PLoS ONE.* 2012;**7**(9):e45272.
- 104) Rafei M, Campeau PM, Aguilar-Mahecha A, et al. Mesenchymal stromal cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting CD4 Th17 T cells in a CC chemokine ligand 2-dependent manner. *J Immunol* 2009;**182**(10):5994-6002.
- 105) Liu X, Ren S, Qu X, Ge C, Cheng K, Zhao RC. Mesenchymal stem cells inhibit Th17 cells differentiation via IFN-gamma-mediated SOCS3 activation. *Immunol Res* 2015;**61**(3):219-229.

- 106) Laurence A, Tato CM, Davidson TS, Kanno Y, Chen Z, Yao Z, et al. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 2007;**26**(3):371-381.
- 107) Obermajer N, Popp FC, Soeder Y, Haarer J, Geissler EK, Schlitt HJ, et al. Conversion of Th17 into IL-17A(neg) regulatory T cells: a novel mechanism in prolonged allograft survival promoted by mesenchymal stem cell supported minimized immunosuppressive therapy. *J Immunol* 2014;**193**(10):4988-4999.
- 108) Guo Z, Zheng C, Chen Z, et al. Fetal BM-derived mesenchymal stem cells promote the expansion of human Th17 cells, but inhibit the production of Th1 cells. *Eur J Immunol* 2009;**39**(10):2840-2849.
- 109) Gieseke F, Bohringer J, Bussolari R, Dominici M, Handgretinger R, Muller I. Human multipotent mesenchymal stromal cells use galectin-1 to inhibit immune effector cells. *Blood* 2010;**116**(19):3770-3779.
- 110) Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005;**105**(4):1815-1822.
- 111) Heath VL, Murphy EE, Crain C, Tomlinson MG, O'Garra A. TGFbeta1 down-regulates Th2 development and results in decreased IL-4-induced STAT6 activation and GATA-3 expression. *Eur J Immunol* 2000;**30**(9):2639-2649.
- 112) Gorelik L, Constant S, Flavell RA. Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *J Exp Med* 2002;**195**(11):1499-1505.
- 113) Xu C, Yu P, Han X, et al. TGF-beta promotes immune responses in the presence of mesenchymal stem cells. *J Immunol* 2014;**192**(1):103-109.
- 114) Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 2010;**10**(3):170-181.
- 115) Wang Q, Yang Q, Wang Z, Tong H, Ma L, Zhang Y, et al. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from fetal-bone marrow, adipose tissue, and Warton's jelly as sources of cell immunomodulatory therapy. *Hum Vaccin Immunother* 2016;**12**(1), 85-96.

- 116) Krampera M, Glennie S, Dyson J, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 2003;**101**(9):3722-3729.
- 117) Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PloS one* 2010;**5**(4), e10088.
- 118) Xu C, Yu P, Han X, Du L, Gan J, Wan Y, et al. TGF- β promotes immune responses in the presence of mesenchymal stem cells. *J Immunol* 2014;**192**(1):103-109.
- 119) Chen X, Gan Y, Li W, Su J, Zhang Y, Huang Y, et al. The interaction between mesenchymal stem cells and steroids during inflammation. *Cell Death Dis* 2014;**5**(1):e1009.
- 120) Shou P, Chen Q, Jiang J, Xu C, Zhang J, Zheng C, et al. Type I interferons exert anti-tumor effect via reversing immunosuppression mediated by mesenchymal stromal cells. *Oncogene* 2016;**35**(46):5953-5962.
- 121) Inoue S, Popp FC, Koehl GE, Piso P, Schlitt HJ, Geissler EK, et al. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in a rat organ transplant model. *Transplantation*. 2006;**81**(11):1589-1595.
- 122) Sudres M, Norol F, Trenado A, Gregoire S, Charlotte F, Levacher B, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro but fail to prevent graft-versus-host disease in mice. *J. Immunol.* 2006;**176**(12):7761–7767.

HAM VERILER

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

PATENT HAKKI IZNI

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER VE İMMÜN SİSTEM ARASINDAKİ İLİŞKİNİN İN VİTRO KOŞULLARDA DEĞERLENDİRİLMESİ

Yazar Ayşe Erol

Gönderim Tarihi: 03-Mar-2022 10:55AM (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1775411352
Dosya adı: s_ndaki_l_lis_kinin_l_n_vitro_Kos_ullarda_Deg_erlendirilmesi.pdf (2.05M)
Kelime sayısı: 20406
Karakter sayısı: 113854

ORJİNALLİK RAPORU

%8

BENZERLİK ENDEKSİ

%8

İNTERNET KAYNAKLARI

%4

YAYINLAR

%

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ