



**T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNSAN GÖBEK KORDONUNDAN
TÜRETİLEN MEZENKİMAL/STROMAL
KÖK HÜCRELERİN TİP 1 DİYABET
HASTALARINDAN ALINAN PERİFERİK
KAN T LENFOSİTLERİ ÜZERİNDEKİ
İMMÜNMODÜLATÖR ETKİSİ**

SELİN URSAVAŞ

**TEZ DANIŞMANI
DR. ÖĞR. ÜYESİ HALİME TUBA CANBAZ**

**İKİNCİ TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ERDAL KARAÖZ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANA BİLİM DALI
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI**

**DOKTORA TEZİ
EKİM/2024**

İTHAF



“Salih Ursavaş, Melahat Ursavaş ve Mürüvvet Ursavaş’a ithaf ediyorum”

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilimsel ve manevi anlamda beni destekleyen, öz verisini ve değerli zamanını esirgemeyen, her koşulda yanımda olup bana yol gösteren çok kıymetli danışmanım Dr. Öğretim Üyesi Halime Tuba CANBAZ'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Mentorluğuyla bu tez çalışmasının yaratım süreci, deneyler ve yazım aşamasının her anında bilgi ve hoşgörüsüyle yanımda olan ve her türlü imkânı bana sunan, bilimselliği ve çalışkanlığıyla bana her zaman örnek olan, yanında çalışmaktan onur duyduğum çok değerli hocam Prof. Dr. Erdal KARAÖZ'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim sırasında bilgi ve deneyimiyle yanımda olan ve yapıcı tavırlarıyla bana her zaman örnek olan değerli hocam Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Doç. Dr. Esra ÇIKLER'e; eğitimim sürecinde bilgi, birikim ve deneyimlerini cömertçe paylaşan değerli hocalarım Doç. Dr. Tansel SAPMAZ'a, Dr. Öğretim Üyesi Ayşe KÖSE VURUŞKAN'a saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Meslek hayatıma ve doktora sürecime akademik nosyonu ve tecrübesiyle katkıda bulunan, şefkati ve yol göstericiliğiyle hep yanımda olan çok kıymetli hocam Prof. Dr. Figen KAYMAZ'a sonsuz şükranlarımı sunarım.

Tezimin hazırlanması ve tüm deneysel planlama sürecinde değerli katkı ve yönlendirmelerini gördüğüm, tecrübe ve bilgisinden sınırsızca yararlandığım, göstermiş olduğu hoşgörü, inanç ve desteğinden dolayı çok kıymetli hocam Dr. Öğretim Üyesi Ebru Nur AY'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında deneysel aşamalardaki yardım ve desteklerinin yanı sıra manevi olarak hep yanımda olan İstinye Üniversitesi AR-GE departmanında birlikte çalıştığım çok kıymetli arkadaşlarım, Dr. Öğretim Üyesi Gökçe ERDEMİR CİLASUN, Dr. Öğretim Üyesi Merve ERKISA GENEL, Dr. Öğretim Üyesi Hilal ŞENTÜRK, Yağmur Ekin BOYOĞLU, Merve GİDEMEN ve sevgili öğrencilerim Simay AKPINAR ve Merve Nur HAYTA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Doktora sürecim boyunca kıymetli tecrübelerini benimle paylaşan, desteğini esirgemeyen değerli arkadaşım Muhammetnur TEKAYEV'e, deneysel süreçlerimde hem

mesleki tecrübesi ve hem de manevi olarak hep yanımda olan kıymetli arkadaşım Ezgi Yudum ŞENOL’a şükranlarımı sunarım.

Hayatımın her alanında olduğu gibi, doktora eğitimim sırasında da yanımda olan, beni her zaman yüreklendirip, bana sabır aşılayan ve desteklerini her daim hissettiren biricik aileme sonsuz şükranlarımı sunarım.

Bu çalışmayı, “Doktora Tez Projeleri” kapsamında 2022/117 proje numarası ile destekleyen Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi’ne, 222S280 numaralı proje ile “TÜBİTAK-ARDEB 1002-A Hızlı Destek Modülü” kapsamında destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu’na, 22928 numaralı proje ile A GRUBU ACİL AR-GE PROJE DESTEK PROGRAMI kapsamında destekleyen Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı’na teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
RESİMLER LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ÖZET	xv
ABSTRACT.....	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İMMÜN SİSTEM VE HÜCRELERİ	3
2.1.1. T Lenfositler	3
2.1.1.1. Yardımcı CD4 ⁺ T lenfositler.....	4
2.1.1.2. Sitotoksik CD8 ⁺ T lenfositler	4
2.1.1.3. Düzenleyici (regülatör) T lenfositler (Treg)	5
2.2. TİP 1 DİYABETES MELLİTUS	9
2.2.1. Epidemiyoloji.....	10
2.2.2. Tanı Kriterleri ve Klinik Bulgular	11
2.2.3. Tip 1 Diyabetes Mellitus Etiyopatofizyolojisi.....	12
2.3. MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER.....	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	16
3.1. GEREÇLER.....	16
3.1.1. Kimyasallar	16
3.1.2. Alet ve Teçhizat	17
3.1.3. Cihazlar	18
3.2. YÖNTEM	18
3.2.1. Hasta Seçimi ve Kan Örneklerinin Alınması.....	18
3.2.2. Kan Örneklerinden T Lenfosit Eldesi ve Karakterizasyonu	19
3.2.3. Mezenkimal Kök Hücre Eldesi ve Karakterizasyonu	22
3.2.4. Treg Hücrelerinin Mezenkimal Kök Hücreler ile Direkt ve İndirekt Kokültürünün Yapılması.....	23
3.2.5. Hücre Proliferasyon Analizi	26
3.2.6. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR).....	27

3.2.7. İmmünfloresan Boyama.....	29
3.2.8. İstatistiksel Analiz.....	31
4. BULGULAR.....	32
4.1. HASTA SEÇİMİ.....	32
4.2. T LENFOSİTLERİN KARAKTERİZASYONU	33
4.3. MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN ELDESİ VE KARAKTERİZASYONU ...	35
4.3.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Eldesi	35
4.3.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	35
4.4. T LENFOSİTLERİN PROLİFERASYON ANALİZİ	36
4.5. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PCR)	38
4.6. İMMÜNFLORESAN BOYAMA.....	40
5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	70
KAYNAKLAR	71
EKLER.....	79

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2. 1: Lenfosit sınıfları, fonksiyonu, spesifik belirteçleri ve periferik kandaki yüzdeleri	4
Tablo 2. 2: Tip 1 diyabet ve tip 2 diyabetin ayırıcı tanısı (76).	10
Tablo 2. 3: Diyabet tanı kriterleri (4,76,79,80).	11
Tablo 3. 1: Flow sitometri analizi için kullanılan antikor miktarları	21
Tablo 3. 2: Nucleogene RNA dönüştürücü cDNA karışım içeriği	27
Tablo 3. 3: RT-PCR karışım içeriği	28
Tablo 3. 4: RT-PCR Koşulları	28
Tablo 3. 5: İmmü floresan boyamada kullanılan primer ve sekonder antikor listesi.....	30
Tablo 4. 1: Sağlıklı ve tip 1 diyabetli bireylerin HbA1c ve serum glukoz değerleri	32
Tablo 4. 2: Tip 1 diyabetli bireylerin c-peptid ve otoantikor değerleri	33
Tablo 4. 3: FOXP3, TGF- β , IL-4, IL-10 gen ekspresyon düzeylerinin sağlıklı ve T1DM gruplarında farklı direkt ve indirekt kültür koşullarında istatistiksel değerlendirmesi.....	40
Tablo 4. 4: İmmü floresan fotomikrograf ölçümlerinin istatistiksel verileri	55

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3. 1: CFSE, PCR ve indirekt immünfloresan boyama için deney düzeneği	24
Şekil 3. 2: İmmünfloresan boyamanın gerçekleştirildiği deney düzeneği.	25
Şekil 4. 1: Sağlıklı ve T1DM bireylerin HbA1c yüzdesi ve glukoz serum seviyeleri	33
Şekil 4. 2: Sağlıklı gruptan 3 ve T1DM grubundan 9 nolu hastalardan izole edilen hücrelerin flow sitometri kapılama stratejisi	34
Şekil 4. 3: Sağlıklı ve T1DM gruplarına ait flow sitometri kapılama yöntemiyle belirlenen hücre popülasyon yüzdelerinin istatistiksel verileri	34
Şekil 4. 4: Eksplant izolasyon ile elde edilen MKH P6'nın pozitif (CD90, CD105, CD73 ve CD44) ve negatif (CD34, CD45, CD11b, CD19 ve HLA-DR antijenleri) belirteçlerine göre flow sitometri ile karakterizasyonu.....	36
Şekil 4. 5: 6 (A, B, C, D) ve 10 (E, F, G, H) nolu hastalara ait CFSE histogramları.....	37
Şekil 4. 6: FOXP3 geni çoğalma eğrileri	38
Şekil 4. 7: TGF- β geni çoğalma eğrileri.....	39
Şekil 4. 8: IL-4 geni çoğalma eğrileri.....	39
Şekil 4. 9: IL-10 geni çoğalma eğrileri.....	40
Şekil 4. 10: CD4 belirtecine ait floresan ışıma yoğunluğu ortalama değerleri	43
Şekil 4. 11: IL-2 belirtecine ait floresan ışıma yoğunluğu ortalama değerleri.....	46
Şekil 4. 12: TNF- α belirtecine ait floresan ışıma yoğunluğu ortalama değerleri.....	49
Şekil 4. 13: IL-10 belirtecine ait floresan ışıma yoğunluğu ortalama değerleri.....	52
Şekil 4. 14: BCL-2 belirtecine ait floresan ışıma yoğunluğu ortalama değerleri.....	55

RESİMLER LİSTESİ

Resim 3. 1: MACS ile CD4 ⁺ CD25 ⁺ regülatör T hücre izolasyonu	20
Resim 3. 2: 3 ve 9 nolu hastalardan izole edilen hücrelerin flow sitometri için hazırlanması	21
Resim 3. 3: İmmünfloresan boyamanın gerçekleştirildiği kültür plakası.	25
Resim 3. 4: Proliferasyon analizi için 6 nolu hastanın direkt indirekt pozitif ve negatif kontrol gruplarının hazırlanması.....	26
Resim 3. 5: Direkt kokültür kuyusundan çekilmiş bir fotomikrografta Zen.2.3 Pro programı ile alan ve boya yoğunluğunun ölçümü	30
Resim 4. 1: Eksplant kültür yöntemiyle izole edilen mezenkimal kök hücreler	35
Resim 4. 2: Sağlıklı grubundan 2 nolu hastanın CD4 belirtecine ait fotomikrograflar.	41
Resim 4. 3: T1DM grubundan 7 nolu hastanın CD4 belirtecine ait fotomikrograflar.	42
Resim 4. 4: Sağlıklı grubundan 1 nolu hastanın IL-2 belirtecine ait fotomikrograflar.....	44
Resim 4. 5: T1DM grubundan 10 nolu hastanın IL-2 belirtecine ait fotomikrograflar.	45
Resim 4. 6: Sağlıklı grubundan 5 nolu hastanın TNF- α belirtecine ait fotomikrograflar...	47
Resim 4. 7: T1DM grubundan 12 nolu hastanın TNF- α belirtecine ait fotomikrograflar. .	48
Resim 4. 8: Sağlıklı grubundan 4 nolu hastanın IL-10 belirtecine ait fotomikrograflar.....	50
Resim 4. 9: T1DM grubundan 11 nolu hastanın IL-10 belirtecine ait fotomikrograflar. ...	51
Resim 4. 10: Sağlıklı grubundan 6 nolu hastanın BCL-2 belirtecine ait fotomikrograflar.	53
Resim 4. 11: T1DM grubundan 8 nolu hastanın BCL-2 belirtecine ait fotomikrograflar. .	54

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADA	: American Diabetes Association
APC	: Antigen Presenting Cells
APC	: Allofikosiyanin
APG	: Admission Plasma Glucose Level
BCR	: B Cell Receptor
BSA	: Bovine Serum Albumin
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
CD	: Cluster of Differentiation
CFSE	: Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester
CTL	: Cytotoxic T Lymphocyte
CTLA-4	: Cytotoxic T Lymphocyte Associated Protein
DAPI	: 4',6-Diamidino -2-Fenilindol Dihidroklörür
DC	: Dendritic Cells
DMEM	: Eagle's Minimal Essential Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
FBS	: Fetal Bovine Serum
FITCH	: Floresan İzotiyosiyanat
FOXP3	: Forkhead Box P3
GAD65	: Glutamic Acid Decarboxylase 65
GALT	: Gut Associated Lymphatic Tissue
HbA1c	: Hemoglobin A1c
HLA	: Human Leukocyte Antigen
IA-2A	: Insulinoma Associated Protein-2 Autoantibodies
IAA	: Insulin Autoantibodies
IAPP	: Islet Amyloid Polypeptide

IDF	: International Diabetes Federation
IFN γ	: Interferon Gamma
Ig	: Immunoglobulin
IL	: Interlökin
IL-2Ra	: IL-2 Reseptör Alfa
IL-7Ra	: IL-7 Reseptör Alfa
IPEX	: Immünodisregülasyon Poliendokrinopati Enteropati X
ISCT	: International Society for Cell & Gene Therapy
iTreg	: Induced Regulatory T Cell
LADA	: Latent Autoimmune Diabetes in Adults
LAG-3	: Lymphocyte Aktivation Gene-3
MACS	: Magnetic Sorting
MHC	: Major Histocompatibility Complex
NK	: Natural Killer
OGTT	: Oral Glucose Tolerance Test
PBMC	: Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	: Phosphate-buffered saline
PE	: Fitoeritrin
PFA	: Paraformaldehit
pTreg	: Peripheral Regulatory T Cell
T1DM	: Tip 1 Diabetes Mellitus
Tconv	: Convansional T Cell
TCR	: T Cell Receptor
Teff	: Efektör T hücre
Tfh	: T Follicular Helper Cells
TGF-β	: Transforming Growth Factor Beta

TH : T Helper Cells

TH1 : T Helper 1 Cells

TH2 : T Helper 2 Cells

TNF- α : Tumor Necrosis Factor-Alpha

Treg : Regulatory T Cell

tTreg : Thymus-Derived Regulatory T Cells

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

WHO : World Health Organisation

WJ : Wharton Jelly

XLAAD : X-Linked Autoimmunity–Allergic Disregulation Syndrome

ZnT8A : Zinc Transporter 8 Autoantibodies

İNSAN GÖBEK KORDONUNDAN TÜRETİLEN MEZENKİMAL/STROMAL KÖK HÜCRELERİN TİP 1 DİYABET HASTALARINDAN ALINAN PERİFERİK KAN T LENFOSİTLERİ ÜZERİNDEKİ İMMÜNMODÜLATÖR ETKİSİ

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı, insan göbek kordonu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin (WJ-MKH'lar) sağlıklı bireylerin ve tip 1 diyabetli (T1DM) hastaların kanından izole edilen T düzenleyici hücreler (Treg) üzerindeki immünomodülatör etkisini değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem: Sağlıklı ve T1DM bireylerden alınan kandan Treg'ler izole edilmiştir. Treg'ler kontrol kuyusunda tek başına, WJ-MKH ile direkt ve indirekt kokültür koşullarında 7 gün boyunca kültürlenmiştir. Treg proliferasyon analizi için hücreler Karboksifloresin Diasetat Süksinimidil Ester (CFSE) ile işaretlenmiş ve flow sitometri ile analiz edilmiştir. FOXP3, IL-10, IL-4 ve TGF- β gen ekspresyonları RT-PCR yöntemiyle analiz edilmiştir. CD4, IL-2, TNF- α ve BCL-2 belirteçleri immünfloresan boyama ile gösterilmiştir.

Bulgular: MKH'ların hem T1DM hem de sağlıklı gruplarda Treg hücre proliferasyonu üzerinde önemli bir etkisi gözlenmedi. T1DM grubunda, TGF- β ve FOXP3 ekspresyonları özellikle direkt kültürde artmıştır. Sağlıklı grupta IL-4 ve TGF- β sentezi artmıştır. T1DM grubunun indirekt kuyusunda IL-10 seviyeleri daha yüksekken, direkt kuyusunda TNF- α seviyeleri daha yüksektir. CD4 sentezi gruplar arasında anlamlı bir fark göstermezken, sağlıklı grupta IL-2 sentezinin yüksek olduğu görülmüştür.

Sonuç: Bulgular, MKH'ların Treg proliferasyonunu indüklemeye doğrudan uyarıcı bir etkiye sahip olmadığını göstermektedir. MKH'ların bağışıklık sisteminin düzenlenmesi ve Treg hücrelerinin işlevleri üzerinde potansiyel etkileri olduğu gösterilmiştir. Ancak, bu etkilerin bağışıklık mikroçevresine ve kullanılan kültür koşullarına bağlı olarak değiştiği anlaşılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Mezenkimal Kök Hücre, Otoimmün Hastalık, Regülatör T Hücre, Sitokin, Tip 1 Diyabet

IMMUNOMODULATOR EFFECT OF HUMAN UMBILICAL CORD-DERIVED MESENCHYMAL/STROMAL STEM CELLS ON PERIPHERAL BLOOD T LYMPHOCYTES FROM TYPE 1 DIABETES PATIENTS

ABSTRACT

Aim: The aim of this study to evaluate the immunomodulatory effect of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (WJ-MSCs) on T regulatory cells (Treg) isolated from the blood of healthy individuals and patients with type 1 diabetes (T1DM).

Materials and Methods: Treg cells were isolated from the blood of healthy and T1DM individuals and cultured alone as a control and together with WJ-MSCs in direct and indirect co-culture conditions for 7 days. For Treg proliferation analysis, cells were labeled and analyzed in a flow cytometer. FOXP3, IL-10, IL-4, and TGF- β gene expressions were analyzed by RT-PCR. CD4, IL-2, TNF- α , and BCL-2 markers were demonstrated by immunofluorescence staining.

Results: No significant effect of MSCs on Treg cell proliferation was observed in both T1DM and healthy groups. In the T1DM group, TGF- β and FOXP3 expressions were increased, especially in direct culture. IL-4 and TGF- β synthesis was increased in the healthy group. IL-10 levels were higher in the indirect well of the T1DM group, while TNF- α levels were higher in the indirect well. While CD4 synthesis did not show a significant difference between the groups, IL-2 synthesis was observed to be high in the healthy group.

Conclusion: The findings show that MSCs do not have a direct stimulatory effect in inducing Treg proliferation. MSCs have been shown to have potential effects on the regulation of the immune system and the functions of Treg cells. However, it is understood that these effects vary depending on the immune microenvironment and the culture conditions used.

Key Words: Autoimmune Disease, Cytokine, Mesenchymal Stem Cell, Regulatory T Cell, Type 1 Diabetes

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tip 1 diyabet (T1DM) prevalansı yüksek ve yılda 100.000 kişi başına yaklaşık 16,8 yeni tanımlı bireyle insidansı hızla yükselmekte olan otoimmün bir hastalıktır (1,2). Diyabetes mellitus, pankreastaki β hücrelerinin insülin üretimindeki bozulma ya da üretilen insülini vücudun etkin olarak kullanamaması veya her ikisine bağlı ortaya çıkan metabolik bir hastalıktır (3,4). T1DM etiyolojisinde, genetik yatkınlık ve çevresel tetikleyiciler gibi pek çok faktör rol oynamaktadır (3,5).

Sitokinler, hücrelerel haberleşmede rol alan bağışıklık sistemindeki hücreler tarafından üretilen proteinlerdir. Hem bağışıklık sistemi düzeyinde hem de hedef β -hücreleri düzeyinde birtakım sitokinlerin tip 1 diyabet gelişimi için önemli olduğu gösterilmiştir (6,7). Genetik ve immünopatojenik çalışmalar, T1DM'nin patogenezi ile sitokinleri doğrudan ilişkilendirmiştir (8). Son dönemde yapılan çalışmalar bu hastalığın patogenezinde sitokinlerin anahtar rol oynadığını ortaya koymuş ancak mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır.

Regülatör T (Treg) hücreleri, yardımcı T hücrelerin bir alt popülasyonu olup, immün toleransta rol alan hücrelerdir (9–12). İnsan otoimmün hastalıklarında Treg hücre fonksiyonu ile ilgili olarak, hastalarla yapılan erken çalışmalar, bir dizi otoimmün bozuklukta, periferik kandan izole edilen Treg hücrelerinin sayısında veya işlevinde bir kusur olduğunu ortaya koymuştur ve bu veriler *in vivo* hastalık modelleri ile desteklenmiştir. Otoimmün hastalıklarla yapılan çalışmalarda, periferik kanda ölçülen Treg hücrelerinin sayısında ve/veya işlevinde kusurlar gösterdiğini açıkça göstermiştir (13–16). Tregler, periferik tolerans sistemindeki hassas düzenleyici rolünden dolayı bağışıklık sisteminin en güçlü bileşenlerinden biri olarak ön plana çıkmış ve otoimmün hastalıkların klinik tedavi yöntemleri için çekici bir hedef haline gelmiştir (17,18).

Mezenkimal kök hücreler (MKH'lar) çoğalma ve farklılaşma yeteneklerinin yanı sıra, terapötik kullanımlarla ilişkili göç ve hedefleme (homing), trofik, anti-apoptotik, anti-inflamatuar, antioksidan, anti-bakteriyel, anti-fibrotik, kemoatraktan, nöroprotektif ve immünosupresan gibi çok sayıda biyolojik özelliklere sahip olduğundan rejeneratif tıp için değerli hücrelerdir (19). MKH'lar hem doğal hem de edinilmiş bağışıklıkta rol oynar ve immünomodülatör işlevleri esas olarak T hücreleri, B hücreleri, NK hücreleri, makrofajlar, monositler, dendritik hücreler (DC'ler) ve nötrofilleri içeren hücre-hücre

teması ve parakrin aktivitesi yoluyla bağışıklık hücreleriyle etkileşimler yoluyla gerçekleşir (20). MKH immünomodülasyonunda Treg'lerin rolü tartışmalıdır. Birkaç çalışma, MKH'lerin Treg indüksiyonu yoluyla immün yanıtı dolaylı olarak modüle ettiğini öne sürerken, diğerleri MKH'lerin hiçbir rolü olmadığını öne sürmüştür. Genel görüş ise, MKH'ler tercihli olarak farklı düzenleyici fenotipleri barındıran T hücresi alt kümelerinin üretilmesine ve/veya genişlemesine neden olur. MKH'lerin, tolerojenik özelliklere sahip düzenleyici bağışıklık hücrelerinin oluşumunu indüklemek için bağışıklık hücrelerini yeniden eğitmesi muhtemeldir (21).

MKH'ların Treg hücreleriyle etkileşimleri altında yatan mekanizmalar iyi anlaşılmamıştır ve sonuç olarak, MKH-Treg çapraz kombinasyonunu kullanmak için en uygun stratejiler belirsizliğini korumaktadır. Hücreler arası temas, çözünür faktörlerin üretimi, antijen sunan hücrelerin tolerojenik fenotiplere yeniden programlanması ve parakrin faktörler yoluyla indüksiyonu ile ilgili çok farklı görüşler mevcuttur (22).

Bu bilgiler ışığında planlan çalışmamızda, T1DM hastaları ve sağlıklı bireylerden Treg hücreleri izole edilmiş ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen Treg hücreleri proliferasyon analizi için CFSE ile işaretlenerek göbek kordonu kökenli (WJ) MKH'lar ile 7 günlük direkt ve indirekt ko-kültürü gerçekleştirilmiştir. Sitokin profillerinin değerlendirilmesi için, WJ-MKH'lar ile indirekt ve direkt kokültürü gerçekleştirilen Tregler, kültür süresinin sonunda FOXP3, TGF- β , IL-4, ve IL-10 gen ekspresyon düzeyleri RT-PCR yöntemi ile ölçülmüş ve Ct değerleri analiz edilmiştir. Ayrıca kültür süresinin sonunda kültür plakalarında CD4, IL-2, IL-10 ve BCL2 belirteçleri için immünfloresan boyama gerçekleştirilmiş ve bu belirteçlerin floresan ışıma yoğunlukları ölçülmüştür. Elde edilen tüm veriler hem direkt ve indirekt kültür koşulları, hem de sağlıklı ve T1DM grupları arasında karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Böylece bu çalışmada, literatürde ilk defa, WJ-MKH'lerin T1DM hastalarından elde edilen Treg'ler üzerindeki immünmodulasyon etkilerinin direkt ve indirekt kültür koşullarında karşılaştırmalı değerlendirildiği ve MKH'ın Treg proliferasyonuna etkisinin incelendiği ilk çalışmadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İMMÜN SİSTEM VE HÜCRELERİ

Tüm canlı organizmalarda vücuda yabancı olan maddelere karşı immün sistem yanıtları iki şekilde olabilir. Bunlardan ilki, yabancı maddelere karşı ilk savunma hattını oluşturan spesifik olmayan doğuştan gelen bağışıklık iken, ikinci tip immün sistem yanıtı spesifik olup yabancı maddeler için gereken etkili savunma için yabancı maddeye özgü oldukça çeşitli ve değişken reseptörlere sahip lenfositler ve antikorların üretimi için öncelikle lenfositlerin çoğalmasını ve farklılaşmasını gerektirir (23,24). Spesifik yanıt doğrudan istilacı bir ajan üzerinde etki eden ve B lenfositleri tarafından sentezlenen antikorların aracılık ettiği humoral (antikor aracılı) ya da virüs bulaşmış konak hücrelere veya yabancı hücrelere saldıran ve onları yok eden spesifik T lenfositlerinin aracılık ettiği hücre aracılı olarak iki şekilde gerçekleşebilir (17).

İmmün sistem hücreleri lenfositler ve çeşitli destekleyici hücrelerden oluşur. Lenfositler, çeşitli antijenlere özgü reseptörler üreten hücrelerdir ve sağlıklı yetişkinler 0,5 ila 1×10^{12} lenfosit hücre sayısına sahiptir. Tüm lenfositler morfolojik olarak benzer olmalarına rağmen soy, fenotip ve fonksiyon açısından heterojenite sergiler. Bu heterojen lenfosit popülasyonu hücrenin farklılaşma aşamasını tanımlayan farklılaşma kümesi (CD) adı verilen yüzey proteinlerinin ekspresyonu ile B hücreleri, T hücreleri ve doğal öldürücü (NK) hücreleri olarak ayırt edilebilir (Tablo 2.1) (23). Destekleyici hücreler ise immün yanıtların düzenlenmesi için lenfositlere antijen sunan hücreler (APC) olan monositler, makrofajlar, nötrofiller, bazofiller, eozinofiller, retiküler hücreler, dendritik hücreler, foliküler dendritik hücreler, Langerhans hücreleri ve epitelyoretiküler hücrelerdir (17).

2.1.1. T Lenfositler

T lenfositleri timusta farklılaşır ve dolaşımdaki lenfositlerin %60 ila %80'ini oluşturur. T hücreleri, CD2, CD3, CD5 ve CD7 belirteçlerini ve T hücresi reseptörlerini (TCR'ler) ifade eder; bununla birlikte, CD4 ve CD8 belirteçlerinin varlığına göre alt sınıflara ayrılırlar (17).

2.1.1.1. Yardımcı CD4⁺ T lenfositler: Yardımcı CD4⁺ T (TH) lenfositleri, aynı zamanda CD4 belirteçlerini de ifade eden T hücreleridir. Bu hücreler ayrıca sitokin salgılama yeteneklerine göre alt bölümlere ayrılır. İnterlökin 2 (IL-2), interferon-gama (IFN- γ) ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) sentezleyen yardımcı T hücrelerine TH1 hücreleri denir. Bu hücreler, hücre aracılı bağışıklık tepkilerinde sitotoksik CD8 T lenfositleri (CTL), NK hücreleri ve makrofajlarla etkileşime girer ve virüsler ve belirli mikroorganizmalar gibi hücre içi patojenleri kontrol etmek için gereklidir. Yardımcı T hücrelerinin diğer grubu, IL-4, IL-5, IL-10 ve IL-13'ü sentezler ve TH2 hücreleri olarak adlandırılır. B lenfositleri ile etkileşime girerler ve hücre dışı patojenleri kontrol eden antikor aracılı bağışıklık tepkilerini başlatmak için gereklidirler (17).

2.1.1.2. Sitotoksik CD8⁺ T lenfositler: Sitotoksik CD8⁺ T lenfositleri (CTL'ler), aynı zamanda CD8 belirteçlerini de ifade eden T hücreleridir. Virüs bulaşmış hücreler, kansere dönüşmüş hücreler, hücre içi mikroorganizmalarla enfekte hücreler, parazitler ve nakledilen hücreler gibi diğer hedef hücreleri öldürürler (17).

Tablo 2. 1: Lenfosit sınıfları, fonksiyonu, spesifik belirteçleri ve periferik kandaki yüzdeleri

Sınıf	Fonksiyonlar	Antijen Reseptörü ve Özgüllük	Seçilmiş Fenotip Belirteçleri	Periferik Kan
CD4 ⁺ yardımcı T lenfositler	B hücresi aktivasyonu (hümmoral bağışıklık) Makrofaj aktivasyon (hücre aracılı bağışıklık) Uyarılması, iltihap	$\alpha\beta$ heterodimerler Peptit-sınıf II MHC kompleksleri için çeşitli özellikler	CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 ⁻	35-60
CD8 ⁺ sitotoksik T lenfositleri	Hücre içi mikroplarla enfekte olmuş hücrelerin, tümör hücrelerinin öldürülmesi	$\alpha\beta$ heterodimerler Peptit sınıf I MHC kompleksleri için çeşitli özellikler	CD3 ⁺ , CD4 ⁻ , CD8 ⁺	15-40
Düzenleyici T hücreleri (Treg)	Diğer T hücrelerinin fonksiyonunu baskılayın (bağışıklık tepkilerinin düzenlenmesi, kendi kendine toleransın sürdürülmesi)	$\alpha\beta$ heterodimerler Kendine ve bazı yabancı antijenlere spesifik (peptit sınıf II MHC kompleksleri)	CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD25 ⁺ , FoxP3 ⁺	1-2
Doğal öldürücü T (NK) hücreleri	Doğuştan gelen ve uyarılabilir bağışıklık tepkilerini baskılanması veya etkinleştirilmesi	$\alpha\beta$ heterodimerler Glikolipid-CD1 kompleksleri için sınırlı özgüllük	CD56, CD16	5-30

2.1.1.3. Düzenleyici (regülatör) T lenfositler (Treg): Düzenleyici (Treg) T lenfositleri, bağışıklık sistemindeki diğer hücrelerin aktivitesini etkileyerek yabancı ve kendi antijenine karşı bir bağışıklık tepkisini işlevsel olarak baskılayabilen fenotipik olarak çeşitli bir T lenfosit popülasyonunu temsil eder.

1970'lerin başlarında ilk kez Gershon ve Kondo tarafından yardımcı T hücrelerinden farklı biyolojik aktivite gösteren hücre olarak rapor edilen (25) düzenleyici (regülatör, Treg) T lenfositlerin fonksiyonu, 1995 yılında Sakaguchi'nin grubu tarafından interlökin reseptör alfa 2 (IL-2R α) zincirinin (CD25) yüksek ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir (18).

Treglerin keşfiyle birlikte, CD4⁺ T hücreleri artık Treg hücreleri ve geleneksel (Tconv) TH hücreleri olmak üzere yaygın iki farklı soya bölünmüştür (26–28). Diğer lenfositlerle birlikte timusta gelişmeye başlayan Tregler, timik stromal hücrelerle etkileşim ve mikroçevre içerisindeki IL-2 hem de IL-7 varlığıyla CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ hücelere kaderlenirler (29) ve CD4⁺ hücre popülasyonunun %1-2'sini oluşturur (30).

Çatal başlı aile transkripsiyon faktörlerinin ifadesi olan FOXP3 (fork head box protein 3) belirtecinin, Treg hücrelerinin gelişimi ve fonksiyonunun ana düzenleyicisi olduğu ortaya konmuş ve Treg hücre soy ayrımı için kullanılmaya başlanmıştır (31). İnsan Treg hücreleri, başlangıçta CD4⁺ T hücre bölmesinde yüksek seviyede CD25 (IL-2 reseptörü zinciri), düşük seviyede CD127 (IL-7 reseptörü) ve transkripsiyon faktörü FOXP3'ün hücre içi ekspresyonu ile tanımlanmıştır ve sınıflandırması hem orijinlerine (timus ve periferik) hem de yerleşim yerlerine (lenfoid ve dokuda yerleşik) göre yapılmaktadır (18).

Orijinal olarak insanlarda iki ana Treg hücresi tanımlanmıştır. Timus içerisinde gelişen popülasyon timik kökenli (tTreg) veya doğal Treg (nTreg) adını alırken, periferik antijen ile uyarılarak geleneksel T (Tconv) hücrelerinden gelişen periferik (pTreg) veya adaptif Treg (aTreg) adını alırlar. tTreg hücreleri, FOXP3'ü yapısal olarak eksprese eder ve olgunlaşmaları sırasında öz antijenin tanınması yoluyla timusta merkezi olarak gelişir; daha sonra kendi antijenlerine karşı zararlı bağışıklık tepkilerini önlemek için periferik dokulara geçerler. Periferik dokulardaki FOXP3⁺ T-geleneksel (Tconv) hücrelerin bir antijene maruz kalmasıyla gelişen pTreg hücreleri de FOXP3'ü eksprese eder (18). Hem tTreg'ler hem de pTreg'ler, IL-2'ye yüksek afiniteli bağlanma sağlayan IL-2 reseptörü α (IL-2R α) zincirini CD25 yüzey belirtecinin yapısal olarak eksprese eder. *In vitro* hücre

kültür koşullarında anti-CD3 veya Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta (TGF- β) ve IL-10 gibi bazı sitokinler ile uyarılarak çoğaltılan Tregler ise indüklenmiş Treg (iTreg) olarak bilinir. İndüklenmiş Treg'ler anti-CD28, TGF- β ve IL-2 kombinasyonlarının varlığına göre FOXP3 eksprese eder (32).

İnsanlarda FOXP3, hem doğal düzenleyici T hücreleri (tTreg'ler) hem de aktive edilmiş T hücrelerinde geçici olarak ifade edilebilir. Aktivasyon sırasında CD4⁺CD25⁻ T hücreleri FOXP3 ekspresyonu kazanabilir, ancak bu durum her zaman bu hücrelerin baskılayıcı yeteneğe sahip olacağı anlamına gelmez. FOXP3'ün geçici ifadesi, baskılayıcı olmayan hücrelerde gözlemlenirken, stabil FOXP3 ekspresyonu baskılayıcı fonksiyonla ilişkilidir (33).

Düzenleyici T hücrelerinin gelişimi ve fonksiyonu, bir dizi moleküler yolak tarafından düzenlenir. Bunlardan en önemlisi FOXP3 olup, Treg hücrelerinin gelişimi ve fonksiyonunu düzenleyen anahtar bir transkripsiyon faktörüdür. FOXP3 mutasyonları, otoimmün hastalıklara yol açar ve Treg hücrelerinin stabilitesinde önemli bir rol oynar. FOXP3'ün epigenetik düzenlemelerle kontrol edildiği ve bu düzenlemelerin Treg hücre fonksiyonunun sürdürülmesinde kritik olduğu bulunmuştur (31). FOXP3 ile sinerjistik olan IL-2 sinyalleme, FOXP3 ekspresyonunu stabilize ederek Treg hücrelerinin gelişiminde ve fonksiyonunda önemli bir rol oynar. Treglerin sahip olduğu IL-2R α (CD25) aracılığıyla aldığı sinyaller proliferasyonu ve baskılayıcı fonksiyonlarını düzenler (34). TGF- β sinyalleme, FOXP3⁺ Treg hücrelerinin indüksiyonunu sağlar. Periferde, özellikle inflamasyon ortamında, bu yolak FOXP3 ekspresyonunu artırarak Treg hücre gelişimini destekler (35) Sitotoksik T Lenfosit İlişkili Protein-4 (CTLA-4), Treg hücrelerinin baskılayıcı fonksiyonlarını artıran bir moleküldür, T hücre aktivasyonunu düzenleyen ve Treg gelişimi üzerinde dolaylı etkisi olan bir reseptör olan CD28 ile negatif geri besleme mekanizmalarıyla çalışır (34).

Düzenleyici T hücreleri, immünregülasyon işlevlerini gerçekleştirirken bu temel mekanizmaları ve sinyal yollarını kullanır. FOXP3, Treg hücrelerinin baskılayıcı işlevlerinin temel düzenleyicisidir. FOXP3'ün stabil ifadesi, Treg hücrelerinin baskılayıcı fonksiyonlarını sürdürmesini sağlar. Epigenetik mekanizmalar ve çeşitli transkripsiyon faktörleri FOXP3 ekspresyonunu düzenler (31,36). Treg hücreleri IL-10 ve TGF- β gibi immün baskılayıcı sitokinleri salgılayarak diğer immün hücrelerin aktivasyonunu baskılar. Özellikle TGF- β , CD4⁺ T hücrelerinin baskılanmasında önemli bir rol oynar

(37,38). Ayrıca Treg hücrelerinin yüzeyindeki yüksek CTLA-4 seviyeleri, APC'ler kostimülatör molekülleri aşağı düzenleyebilir ve APC'lerin Treg olmayan hücreleri aktive etme yeteneğini azaltmak için tolerojenik DC'leri indükleyebilir (28,38,39). Bağışıklık kontrol noktası olarak da bilinen lenfosit aktivasyon geni-3 (LAG-3), özellikle aktif Treg hücrelerinde ifade edilen bir yüzey molekülüdür ve bağışıklık yanıtlarını baskılayarak Treg hücre fonksiyonlarını artırır (40).

Düzenleyici T hücrelerin diğer hücrelerin aktivasyonunu kontrol etme ve periferik toleransı indükleme/sürdürme kapasiteleri, sentezledikleri özgül kemokin reseptör kombinasyonları sayesinde kemokine yanıt olarak spesifik dokulara konumlanması ile gerçekleşir. Bunu, IL-10, IL-35 veya TGF- β gibi antiinflamatuvar sitokinlerin sentezi, hedef hücrelerin doğrudan öldürülmesini sağlayan granzimler ve perforin sentezi veya metabolik yolları bozan Siklik Adenozin Monofosfat (cAMP), adenozin çözünabilir faktörlerin salınması yada yüksek IL-2 tüketimi takip eder (18).

Baskılayıcı aktiviteleri geleneksel T hücreleri ile sınırlı olmayıp, NK hücreleri, nötrofiller ve grup 2 doğuştan gelen lenfoid hücreler gibi diğer hücre tiplerine kadar uzanır (41–44). Alternatif olarak, Treg hücreleri, APC ve T-hücreleri arasındaki karşılıklı iletişimi, inhibitör moleküllerin (yani, CTLA4, LAG3) ekspresyonu yoluyla ve APC'nin antijen sunma kapasitesini (CD80/CD86'nın trans-endositozu) etkileyerek kontrol eder. Treg hücreleri, hem M2-makrofajlar hem de nötrofillerde gözlemlendiği gibi, diğer hücrelerin düzenleyici bir fenotipe doğru farklılaşmasını sağlayabilir (18).

Düzenleyici T hücrelerinin birincil işlevi kendi kendine toleransı koruyarak otoimmün hastalıkların önlenmesini olarak tanımlanmıştır (9–12). Diğer görevleri ise;

- Alerji ve astımın baskılanması (45–47).
- Diyet antijenlerine karşı oral tolerans indüksiyonu (48–50).
- Fetüse karşı maternal toleransın indüksiyonu (51).
- Patojenin neden olduğu immünopatolojinin baskılanması (37,52,53).
- İmmün yanıtın efektör sınıfının düzenlenmesi (54,55).
- Zayıf uyaranlarla tetiklenen T hücre aktivasyonunun baskılanması (56).
- Efektör T hücrelerinin başlattığı bağışıklık tepkisinin büyüklüğünü kontrol etme (39,57).

Doğal ve adaptif bağışıklık tepkilerinin bir diğer bileşeni olan sitokinler, otokrin, parakrin ve endokrin etki mekanizmaları ile hücreler arası stres iletişiminin protein araçlarıdır ve enflamasyonun ana itici güçleridir. Hemen hemen tüm çekirdekli hücreler, tanımlanmış koşullar altında, esas olarak stres sinyallerine yanıt olarak ve farklı işlevlerine paralel olarak sitokinleri üretir ve bunlara yanıt verir (58). Bu yüzden inflamatuvar sitokinlerin artan üretimi, bağışıklık sisteminin düzensizleşmesine ve immünopatolojiye yol açar (59,60).

CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ düzenleyici T lenfositleri, diğer lenfositlerin başlattığı bağışıklık tepkisinin büyüklüğünü IL-10 ve TGF-β gibi antienflamatuvar sitokinleri sentezleyerek bağışıklık kontrol etme ve yanıtını zamanında sona erdirmeye yeteneğine sahiptir (17). IL-10, makrofajlar, monositler ve TH2 hücreleri tarafından sentezlenir ve anti-inflamatuvar bir sitokin olarak kabul edilir. IL-10 Treg'leri indüklemeyi ancak monositler ve makrofajların pro-inflamatuvar sitokinlerin inhibisyonunu sağlayarak Treg'lerin baskılayıcı işlevlerini düzenler (61). TGF-β, makrofajlar ve T hücreleri tarafından üretilen ve bağışıklık düzenlemesinde kritik bir rol oynayan çok işlevli bir sitokindir. TGF-β, Treg'ler için önemli bir transkripsiyon faktörü olan FOXP3'ün ekspresyonunu uyarır böylece Treg'lerin oluşumunu teşvik eder (62). Treg'ler, IL-2 sentezlememesine rağmen, sahip olduğu IL-2 reseptör alfa zinciri (CD25) sebebiyle mikroçevredeki IL-2'yi yüksek oranda tüketerek dolaylı şekilde efektör T hücrelerinin (Teff'ler) çoğalmasını ve aktivasyonunu kısıtlamaya yardımcı olur (63), (64). TNF-α, makrofajlar, monositler, nötrofiller, CD4⁺ T hücreleri ve NK hücreleri tarafından salgılanır. TNF-α genellikle bağışıklık tepkilerini artırması ve inflamasyonu teşvik etmesiyle bilinir. Ayrıca TGF-β sinyal yolağını inhibe ederek Treg'lerin farklılaşmasını ve gelişimini baskılayarak sayılarında azalmaya yol açar (65).

Düzenleyici T hücreler sentezledikleri immünoregülatör sitokinler ile bağışıklık tepkilerini düzenlenmelerinin yanı sıra ana transkripsiyon faktörü olan FOXP3 ekspresyonunda immün homeostazda oldukça önemli olduğu ortaya konmuştur. FOXP3 kodlayan gendeki inaktivasyona yönelik mutasyonların, insan deneklerde X'e bağlı otoimmün-alerjik düzensizlik sendromu (XLAAD) adı verilen ve daha sonra immünodisregülasyon, poliendokrinopati, enteropati, X'e bağlı sendrom (IPEX) olarak adlandırılan şiddetli otoimmünitenin spontan gelişimine sebep olduğu ortaya konmuş ve Treg hücre fonksiyonunu ile otoimmünitenin gelişimi ilişkilendirilmiştir (66,67). T1DM

hastaları, bozulmuş Treg fonksiyonu (112, 113) ve Treg baskılanmasına karşı Teff direnci (114) dahil olmak üzere periferik toleransta kusurlar sergiler. T1DM'li hastalarda yapılan Treg analizleri, Treg hücrelerinin sayıca ve işlev yönünden kusurlar rapor etmiş ve bu veriler *in vivo* hastalık modelleri ile desteklenmiştir (13,14,68–71).

İnsan otoimmün hastalıklarında Treg hücre fonksiyonu ile ilgili olarak, hastalarla yapılan erken çalışmalar, bir dizi otoimmün bozuklukta, periferik kandan izole edilen Treg hücrelerinin sayısında veya işlevinde bir kusur olduğunu ortaya koymuştur ve bu veriler *in vivo* hastalık modelleri ile desteklenmiştir. Her ne kadar bu erken verilerden bazıları, Treg hücre tanımlaması için tek belirteç olarak CD25'in pozitif ekspresyonuna dayalı olarak insan Treg hücrelerinin tanımlanması nedeniyle çelişki sonuçlar öne sürse de, sonraki çalışmalar, T1DM (13,14), multipl skleroz, romatoid artrit (15), ve diğer (16) pek çok otoimmün hastalığın, periferik kanda ölçülen Treg hücrelerinin sayısında ve/veya işlevinde kusurlar gösterdiğini açıkça ortaya koymuştur. Treg hücrelerinin baskılayıcı kapasitesindeki kusurlar bir çok farklı bağışıklık aracılı hastalığın altında yattığından, toleransın biyobelirteçleri olarak Treg hücrelerinin sayısını ve işlevini izlemenin yollarını geliştirmeye ve terapötik olarak işlevlerini artırmanın yollarını tasarlamaya büyük ilgi duyulmaktadır (72).

2.2. TİP 1 DİYABETES MELLİTUS

Diyabetes mellitus, pankreastaki β hücrelerinin insülin üretimindeki bozulma ya da üretilen insülini vücudun etkin olarak kullanamaması veya her ikisine bağlı ortaya çıkan metabolik bir hastalıktır (3,4). Diyabetin sebep olduğu kronik hiperglisemi özellikle gözler, böbrekler, sinirler, kalp ve kan damarları olmak üzere çeşitli organların uzun vadede hasar görmesi, işlev bozukluğu ve organ yetmezliğine sebep olur (3). Diyabet vakalarının %90-95'ini oluşturan Tip 2 diyabet insülin direnci ve insülin eksikliğine bağlı olarak bireyin ilerleyen yaşlarında görülür ve bireylerin hayatta kalmak için genellikle yaşamları boyunca insülin tedavisine ihtiyaç duymadan sağlıklı beslenme, düzenli fiziksel aktivite ile tedavi edilebilir olduğu için insüline bağımlı olmayan diyabet ve veya erişkin başlangıçlı diyabet olarak adlandırılır (3,4,73). Vakaların yalnızca %5-10'unu oluşturan Tip 1 diyabet (T1DM) genellikle erken yaşta ortaya çıkan, bireyin immün sistem hücrelerinin pankreastaki β hücrelerine saldırması sonucu bu hücrelerin büyük oranda ya da tamamen yok edilmesi ve mutlak insülin eksikliğine sebep olarak bireylerin

hayatta kalmak için yaşam boyu ekzojen insülin tedavisine ihtiyaç duyduğu, bağışıklık aracılı diyabet veya Juvenil diyabet olarak da bilinir (Tablo 2.2) (74–76). Tip 1 diyabet vakalarının %95'i immün aracılıdır ve bu bireylerin %90'dan fazlasında adacık otoantikorları pozitifken, vakaların % 5'i insülinopeninin varlığına rağmen adacık antikorlarının negatif olduğu, etiyolojisi kesin olmayan idiyopatik formdadır (3,76). β hücrelerinin yıkım hızı özellikle bebeklerde, çocuklarda ve ergenlerde hızlı iken yetişkinlerde daha yavaştır ve uzun yıllar boyunca plazma C-peptidinin saptanabilir seviyeleri görülebilir (77). T1DM genellikle çocuklarda ve gençlerde görülmekle birlikte son yıllarda yetişkin yaşlarda saptanan Tip 1 diyabet olguları da artmaktadır. Erişkin yaşta (genellikle 30 yaşından sonra) görülen T1DM formu, 'erişkinde latent otoimmün diyabet' (LADA) olarak adlandırılmaktadır (76).

2.2.1. Epidemiyoloji

Tip 1 diyabetin hem insidansı hem de prevalansı küresel olarak artmaktadır. Uluslararası Diyabet Federasyonu'na (IDF) göre, T1DM küresel insidansı yılda 100.000 kişi başına yaklaşık 16,8 yeni vakadır ve 2022'de dünya çapında T1DM'li 8,75 milyon birey olduğu ortaya konmuştur (1,2).

Diyabet atlasında yayınlanan verilere göre dünya çapında T1DM vakalarının 1,52 milyonu (%17) 20 yaşın altında, 5,56 milyonu (%64,0) 20 ile 59 yaşları arasında ve 1,67 milyonu (%19,9) 60 yaş ve üzerindeki bireylerdir. IDF raporlarına göre Türkiye'de T1DM vaka sayısının 143.400 olduğu ve bunların 29,000'i 20 yaş altı bireylerden oluşurken, 96,478 kişi 20-59 yaş aralığında ve 17,919 kişinin 60 yaş ve üstü bireyler olduğu bildirilmiştir (1,78).

Tablo 2. 2: Tip 1 diyabet ve tip 2 diyabetin ayırıcı tanısı (76).

Klinik Özellikler	T1DM	T2DM
Başlangıç yaşı	Genellikle ≤ 30 yaş	Genellikle ≥ 30 yaş
Başlangıç şekli	Genellikle akut, semptomatik	Yavaş, çoğunlukla asemptomatik
Ketozis	Sıklıkla var	Sıklıkla yok
Başlangıç kilosu	Genellikle zayıf	Genellikle fazla kilolu/obez
Ailede diyabet yükü	Yok veya belirgin değil	Yoğun
C-Peptid	Düşük	Normal / Yüksek / Düşük
Otoantikor (ICA, GAD, IA2Ab, IAA)	Genellikle pozitif	Negatif
Otoimmün hastalık birlikteliği	Var	Yok

2.2.2. Tanı Kriterleri ve Klinik Bulgular

Diyabetin tanısında hem açlık plazma glikozu hem de iki saatlik plazma glikozunun ölçüldüğü 75 gram oral glikoz tolerans testi (OGTT), Dünya Sağlık Örgütü (WHO), IDF ve Amerikan Diyabet Derneği (ADA) tarafından onaylanmaktadır. En az 8 saat açlık sonrası ölçülen açlık plazma glukozu (APG) düzeyinin ≥ 126 mg/dl olması veya OGTT'de 2. saat plazma glukozu düzeyinin ≥ 200 mg/dl olması diyabet tanısı için yeterlidir. Ayrıca, açlık veya tokluk durumuna bakılmaksızın herhangi bir zamanda ölçülen rastlantısal plazma glukozu düzeyinin 200 mg/dl'nin üzerinde olması da diyabet tanısı koymak için yeterli kabul edilmektedir. Ek olarak, uluslararası standartlara göre ölçülen Hemogloblin A1c (HbA1c) düzeylerinin diyabet tanısında kullanılması WHO, ADA ve IDF tarafından önerilmektedir (4,79,80).

Tip 1 diyabet tanısında, klinik belirtilerden (Tablo 2.3) birkaçının varlığı durumunda, β hücrelerinin yıkımına bağlı olarak ortaya çıkan adacık hücresi otoantikorları ölçümü gerçekleştirilir (76) ve genellikle açlık hiperglisemisi tespit edilen bireylerin %85-90'ında bu otoantikordardan biri veya daha fazlası bulunmaktadır (3). İnsülin (IA) veya Glutamik asit dekarboksilaz-65 (GAD65) otoantikorları bebeklik ve erken çocukluk döneminde ortaya çıkarken, İnsülinoma ile ilişkili protein-2 (IA-2) veya Çinko taşıyıcı (ZnT8) antikor nadiren saptanır ve bu otoantikorların varlığı ileri otoimmünitenin göstergesi olabilir (81–83).

Tablo 2. 3: Diyabet tanı kriterleri (4,76,79,80).

Açlık Plazma Glukozu (APG)	≥ 126 mg/dl
Rastlantısal Plazma Glukozu+diyabet semptomları	≥ 200 mg/dl
Oral Glukoz Tolerans Testi (OGTT)'nde 2.st plazma glukozu	≥ 200 mg/dl
HbA1c	$\geq \%6.5$

Diyabet, karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasındaki bozukluklarla karakterize edilen kronik bir hastalıktır. Klinik semptomlar arasında ağız kuruluğu, aşırı yeme (polifaji) veya iştahsızlık, aşırı susama (polidipsi), sık idrara çıkma (poliüri), gece sık idrara çıkma (noktüri), kilo kaybı, bulanık görme, ayaklarda uyuşma, karıncalanma ve yanma hissi, idrar yolu enfeksiyonları, vulvovajinit, mantar enfeksiyonları, kaşıntı, ciltte kuruma ve yorgunluk gibi belirtiler bulunmaktadır (3,76). Kontrolsüz diyabet

durumunda ketoasidoz (genellikle Tip 1 diyabette görülür) veya hiperosmolar non-ketotik koma gibi ciddi komplikasyonlar gelişebilir. Nadir durumlarda ketoasidoz, Tip 2 diyabetli bireylerde de görülebilir. Özellikle Tip 2 diyabetli bireylerde, hiperglisemi hafif olduğunda semptomlar uzun yıllar boyunca hafif olabilir veya hiç görülmeyebilir. Bu nedenle, hastalık genellikle geç tespit edilir ve tanı anında doku hasarı ve vasküler komplikasyonlar mevcut olabilir (3,77).

2.2.3. Tip 1 Diabetes Mellitus Etiyopatofizyolojisi

Tip 1 diyabetin etiyolojisinde, genetik yatkınlık ve çevresel tetikleyiciler gibi birden fazla faktör rol oynamaktadır. İnsan lökosit antijeninin (HLA) Tip 1 diyabetin predispozisyonunda önemli olduğu ortaya konmuştur. HLA-DR-DQ genotipine sahip bireylerde, belirli varyantların Tip 1 diyabet geliştirme riskini artırırken diğer varyantların ise koruyucu özellikler taşıyabildiği ortaya konmuştur (3,5).

Maternal faktörler (gestasyonel enfeksiyonlar), bazı virüsler (Coxsackie virüs, Rubella virüsü, enterovirüsler), diyet (inek sütü/kısa emzirme, yüksek protein içeriği, D vitamini eksikliği) gibi çevresel faktörlerde T1DM oluşumunu tetikleyebilir (5,76,84).

Genetik yatkınlık ve çevresel tetikleyiciler, β -hücrelerinde hücrelerin işlevi bozan ve apoptozu (programlanmış hücre ölümü) tetikleyen bir stres durumu yaratır. Buna bağlı olarak β -hücrelerin insülin, GAD65 ve IA-2 otoantikor sentezinde miktar artışı ya da hücre dışına salınımı gibi anomalilere sebep olur (85). Bu otoantijenleri APC'ler tarafından alınarak HLA sınıf II molekülleri aracılığıyla ya lokal TH hücrelerine yüksek seviyelerde sunulur ya da APC lenf düğümüne göç ederek burada CD4⁺ T lenfositlere antijen sunumu ve aktivasyonu gerçekleşir (5). Aktive olan TH hücreleri, inflamasyona ve otoimmün yanıtın güçlenmesine neden olan proinflamatuvar sitokinlerin (IL-1, IL-6, TNF- α) sentezini gerçekleştirir ve sitotoksik T hücrelerini (CD8⁺) aktive eder. CD4⁺ ve CD8⁺ hücreler adacığı infiltre ederek, β hücre kaybıyla karakterize insülit olarak da bilinen adacık inflamasyonuna sebep olur. Bu süreç, yeni bir adacık otoantijen sunumu döngüsü oluşturur (75,86).

Otoimmün hastalıklarda görülen proinflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin aşırı üretimi ve salınımı, ciddi organ hasarına varan kritik durumlara neden olabilir (87). Hem bağışıklık sistemi düzeyinde hem de hedef β -hücreleri düzeyinde birtakım sitokinlerin T1DM gelişimi için önemli olduğu gösterilmiştir (6,7). Genetik ve immünopatojenik

çalışmalar, T1DM'nin patogenezi ile sitokinleri doğrudan ilişkilendirmiştir. Ayrıca sitokinler, inflamasyonun ana itici güçleridir ve devam eden β -hücresi yıkımını kontrol etmede çok önemli roller oynarlar (8). Sitokinlerin T1DM patogenezindeki anahtar rolleri, tümör nekroz faktörünün (TNF- α) blokajının yeni başlangıçlı T1DM'li çocuklarda β -hücre fonksiyonunun korunmasına yol açtığına ve IL-2 tedavisinin halihazırda T1DM'li hastalarda olumsuz etkiler olmaksızın Treg'lerin oranını artırabildiği bulgularla da vurgulanmıştır (88,89). Son dönemde yapılan çalışmalar bu hastalığın patogenezinde sitokinlerin anahtar rol oynadığını ortaya koymuş ancak mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır.

Bu mekanizmalar tam olarak açıklığa kavuşturulmasa da IL-10 ve IL-4 artışının IL-2 ve TNF- α ve IFN- γ baskıladığı gösterilmiştir (90,91). IL-2 yüksek seviyelerde efektör T hücreleri indüklerken, düşük seviyelerde ise TGF- β ile birlikte Treg sağkalımı ve çoğalmasını sağladığı için, baskılanması direkt ve dolaylı yoldan T1DM ilerlemesini önler (62,92).

Tregler, periferel tolerans sistemindeki bu hassas düzenleyici rolünden dolayı bağışıklık sisteminin en güçlü bileşenlerinden biri olarak ön plana çıkmış ve klinik müdahaleler için çekici bir hedef haline gelmiştir (17,18).

2.3. MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER

Mezenkimal kök hücreler (MKH'ler), hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak adipojenik, osteojenik, kondrojenik ve nörojenik soylara farklılaşabilen bir kök hücre tipi kavramını ifade eder (93). Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (ISCT), MKH'leri tanımlayan üç kriter belirlemiştir: bunlar, plastik yüzeylere yapışır; spesifik yüzey moleküllerini (CD73, CD90 ve CD105) ifade ederlerken hematopoietik belirteçleri (CD14, CD34, CD45 ve HLA-DR) ifade etmezler ve kondrojenik, adipojenik ve osteojenik yönde farklılaşırlar (19). MKH'ler yağ dokularından, kemik iliğinden, göbek kordonundan (WJ), diş özünden, periodontal ligamentten, hatta pankreas adacıklarından izole edilebilir (94,95). Ancak klinik kullanım için yüksek farklılaşma kapasiteleri nedeniyle yeni doğan göbek kordonu kökenli MKH önerilmektedir (96,97).

MKH'ler rejeneratif tıp için değerli hücrelerdir ve MKH plastisitesinin mekanizmasını anlamak için çok sayıda çalışma yapılmıştır (93,98,99). MKH'lerin

avantajlarından biri, donörden konakçıya nakledildiğinde tamamen uyumsuz hücreler kullanılmış olsa bile konakçı tarafından iyi tolere edilmeleridir ve bu MKH'lerin doku uyumluluğu kompleksi (MHC) ile sınırlandırılmadıklarını gösterir (19). Çoğalma ve farklılaşma yeteneklerinin yanı sıra, MKH'ler, terapötik kullanımlarla ilişkili göç ve hedefleme (homing), trofik, anti-apoptotik, anti-inflamatuar, antioksidan, anti-bakteriyel, anti-fibrotik, kemoatraktan, nöroprotektif ve immünosupresan gibi çok sayıda biyolojik özelliklere sahiptir.

MKH'lar hem doğal hem de edinilmiş bağışıklıkta rol oynar ve immünomodülatör işlevleri esas olarak T hücreleri, B hücreleri, NK hücreleri, makrofajlar, monositler, dendritik hücreler ve nötrofilleri içeren hücre-hücre teması ve parakrin aktivitesi yoluyla bağışıklık hücreleriyle etkileşimler yoluyla gerçekleşir (20). MKH'ların immünomodülasyon özellikleri $CD4^+$ ("yardımcı") ve $CD8^+$ ("sitotoksik") T hücrelerinin çoğalmasını engelleyerek doğrudan ve dendritik hücre (DC) aracılı antijen sunumunu düzenleyerek dolaylı olarak adaptif bağışıklık tepkilerini baskıladığı tutarlı bir şekilde gösterilmiştir (100). İnsan T hücre alt popülasyonlarının MKH'larla birlikte kültürlendiğinde Treg sıklığının ve baskılayıcı aktivitelerin arttığının pek çok çalışmada gösterilmesiyle MKH'ların Treglerin indüksiyonu üzerinden immünomodülasyonu yeni bir mekanizma olarak öne sürülmüştür (100).

Bu nedenle, graft-versus-host hastalığı, multipl skleroz, Crohn hastalığı ve T1DM gibi bağışıklıkla ilgili hastalıkların hücresel tedavisinde kullanılırlar (101). Salgıladıkları IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- γ , Prostaglandin E2 (PGE2), Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) ve TGF- β 1 gibi moleküller sebebiyle, MKH'ler hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak proinflamatuar davranış gösteren immün hücrelerin proliferasyonunu ve immün reaksiyonlarını baskılar (102–105).

MKH'lar MHC sınıf II, CD40, CD80 ve CD86 ekspresyonunu inhibe ederek ve proinflamatuar sitokin üretimini baskılayarak dendritik hücreleri olgunlaşmamış halde tutar (106) ve IL-10 sentezleyen makrofajları indükler (107). Bu etkileşimle hem sitokin profili hem de hücresel aktivite proinflamatuardan antiinflatuara doğru yön değiştirir (108–110). NK hücreleri de TGF- β ve PGE2 gibi çözünür faktörler yoluyla MKH'lar tarafından baskılanabilir (111). MKH'ların T hücresi çoğalmasını sitokin dozlarına bağımlı bir şekilde baskıladığı, IFN- γ üretimini azalttığı ve FOXP3 $^+$

düzenleyici T hücrelerini indüklediği bilinmektedir (112–117). MKH, PGE2, TGF- β ve IL-10 sentezini arttırarak Treg farklılaşmasını başlatmasının yanı sıra (118,119), IL-2 ve TNF- α üretimini baskılayarak Treg çoğalmasını destekleyebilir (120). Treg'in immünosüpresif aktivitelerini göstermelerini sağlayan adenozin üreten yolağı MKH'lar CD39 ve CD73 ekspresyonunu artırarak aktive eder (121,122).

Literatürde otoimmün hastalığı olan bireylerin Treg hücrelerinin MKH varlığında sayısının ve antiinflamatuvar sitokin sentezinin arttığı gösterildiği çalışmalar genellikle romatoid artrit ile üzerine yoğunlaşmış olup Tip 1 diyabet çalışmaları oldukça azdır. *In vivo* hayvan modellerinde diyabet tedavisi için MKH'ler kullanılmış ancak sitokinlerle ilişkilendirilmemiştir. Bu sebeple çalışmamızda MKH'lerin tip 1 diyabetli hastaların Treg hücrelerinin proliferasyon ve sitokin profilleri üzerindeki etkilerini incelemeyi amaçlıyoruz.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Kimyasallar

- Dulbecco'nun modifiye edilmiş Eagle medyum (DMEM/F12), Capricorn
- Fetal bovine serum (FBS), Isı ile inaktive edilmiş, GİBCO
- L-Glutamin 200 mM, Capricorn
- Penisilin+Streptomisin (100x), Diagnovum
- Tripsin/EDTA solüsyonu, Capricorn
- Fosfatla tamponlanmış tuz solüsyonu (PBS), Capricorn
- RPMI 1640 Medyum, Capricorn: RPMI-XXA
- Lenfosit ayırma medyum (yoğunluk 1.077), Capricorn
- PE anti Mouse/rat/human FOXP3, Biolegend: 320008
- PE Mouse IgG1, Biolegend: 400140
- FITCH Anti rat CD25, Biolegend: 202103
- FITCH Mouse IgG1 κ , Biolegend: 400108
- APC Anti rat CD4, Biolegend: 201509
- APC Mouse IgG1 κ , Biolegend: 400120
- CD4 Mouse monoklonal antikor, Santa Cruz: Sc-19641
- IL-2 Mouse monoklonal antikor, Invitrogen: MA5-23696
- IL-10 Rabbit monoklonal antikor, Invitrogen: MA5-42656
- BCL-2 Mouse monoklonal antikor, Santa Cruz: Sc-7882
- TNF- α Mouse monoklonal antikor, Santa Cruz: Sc-133192
- Anti Mouse-Alexa Flour 647, Cell Signaling: 4410S
- Anti Rabbit-Alexa Flour 647, Cell Signaling: 4414S
- Etil Alkol %96, Tekkim Kimya
- Paraformaldehit, Merck: 1.04005.1000
- Triton X-100, Bio Basics CAS 9002-93-1
- 4',6-Diamidino -2-fenilindol dihidroklorür (DAPI), Sigma&Aldrich

- Sığır Serum Albumini (BSA),
- DMSO, Sangon Biotech
- CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester), BD Horizon:565082
- CD4⁺CD25⁺ Regulator T hücre İzolasyon Kiti, Miltenyi Biotech: 5230609948
- NGE024 Nucleogene Quickex Total RNA Extraction Kit
- NGMM019 Nucleogene RNA dönüştürücü cDNA mix
- NGOT005 Nucleogene mRNA GAPDH Gene Expression Assay (Sybr Green)
- NGOT005 Nucleogene mRNA TGF- β Gene Expression Assay (Sybr Green)
- NGOT005 Nucleogene mRNA FOXP3 Gene Expression Assay (Sybr Green)
- NGOT005 Nucleogene mRNA IL4 Gene Expression Assay (Sybr Green)
- NGOT005 Nucleogene mRNA IL10 Gene Expression Assay (Sybr Green)
- NucleoGene qPCR Sybr Green Master Mix

3.1.2. Alet ve Teçhizat

- 2, 5, 10, 25 ve 50 ml serolojik pipet, Nest
- 1-10 μ l'lik mikropipet, Eppendorf
- 10-100 μ l'lik mikropipet, Eppendorf
- 10-200 μ l'lik mikropipet, Eppendorf
- 100-1000 μ l'lik mikropipet, Eppendorf
- 10 μ l, 100 μ l, 200 μ l ve 1000 μ l'lik mikropipet uçları, NEST
- 15 ml'lik steril dibi konik santrifüj tüpü, Laborant, Ant-L4615ST
- 50 ml'lik steril dibi konik santrifüj tüpü, Laborant, Ant-L4615ST
- 25, 75, 175 cm² 'lik kültür kabı, Nest
- 6, 12, 24 ve 48 kuyulu kültür plakaları, Nest
- 5 mL ve 10 mL hacimlerinde enjektörler, Set inject
- Transwell, (12 kuyu için por çapı 0.4 μ m), Falcon
- Steril tek kullanımlık filtreler (por çapı 0,2 μ m), Corning
- Neubauer lamı, Merienfeld
- Mikroskop lamı, Menzel Glaser
- 2, 4 ve 5mL'lik Kriyoviyal, Corning
- Tek kullanımlık filtre 100 μ m, pluriStainer, D191938

3.1.3. Cihazlar

- Floresans Mikroskobu, Zeiss Axio.Observer.A2
- pH Metre, Ohaus
- Hassas Terazi, SHIMADZU AUW220D
- Santrifüj, Hitachi, Japonya
- Etüv, Nüve FN055
- Hücre Kültürü İnkübatörü (CO2inkübatörü), Panasonic
- Steril Kabin, Telstar
- Otoklav, Nüve, OT120M
- Manyetik karıştırıcı, Jeitech
- Mikropipet, Rainin, Eppendorf, İsolab
- Sterile edilmiş sınıf II laminar havalandırılmalı tezgâh, Esco: Class II
- İnkübatör, Thermo Scientific, Heracell 150i
- Buzdolabı, Arçelik
- Vorteks, Biocote: Stuart SA8
- Dijital çalkalamalı sıcak su banyosu, Fisher Scientific
- Manyetik karıştırıcı, IKA Rct Basic
- Elektrikli pipet pompası, Ratiolab
- Flow sitometri, Beckman Coulter ve BD FACS Canto II
- Işık mikroskobu, Olympus BX61
- Distile su cihazı, Sartorius Stedim Biotech: arium pro VF

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Hasta Seçimi ve Kan Örneklerinin Alınması

Çalışmaya Bezmialem Vakıf Üniversitesi Dahiliye polikliniğine başvuran ve çalışmaya gönüllü olarak katılmayı kabul eden sigara, alkol ve ilaç kullanmayan, bilinen bir metabolik hastalığı olmayan sağlıklı 18-55 yaş aralığındaki 12 birey dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen Tip 1 diyabet tanısı almış 6 hastanın seçimi ADA kılavuzunda (2024) belirtilen aşağıdaki kriterlere göre belirlendi (80).

Diyabet tanısı için tanı kriterleri:

- Açlık plazma glukozu (APG) ≥ 126 mg/dl veya
- Oral glukoz tolerans testi 2. saat plazma glukozu (OGTT 2.st PG) ≥ 200 mg/dl veya
- HbA1c $\geq \%6.5$ veya
- Hiperglisemi semptomları olan hastada random plazma glukozu ≥ 200 mg/dl
- C-peptid ≤ 0.5 ng/mL
- Anti-GAD, Anti-ICA, Anti-insülin biri ya da birkaçının pozitif olması

Normal Glukoz Toleransı için tanı kriterleri:

- APG < 100 ve OGTT 2.st PG < 140
- HbA1c $\leq \%6.5$

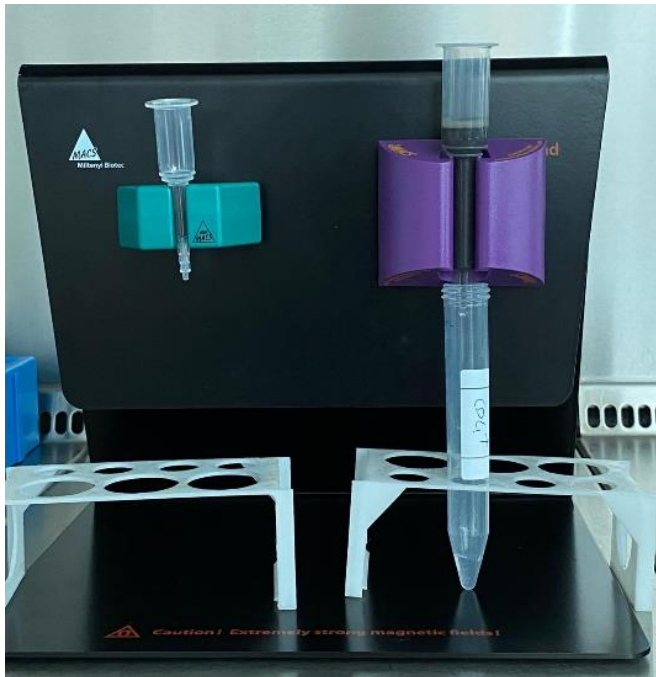
Bezmialem Vakıf Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan alınan 20.06.2022 tarihli E.66947 sayılı Klinik Araştırmalar Etik Kurul Onayı (EK-1) doğrultusunda hazırlanan Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu her katılımcıya çalışmayla ilgili gereken bilgi verildikten sonra imzalatıldı (EK-2).

Çalışmaya katılmayı kabul eden bireylerden 10 mL kan örneği steril koşullarda heparinize tüp içerisine alındı. Alınan kan örnekleri uygun koşullarda İstinye Üniversitesi Kök Hücre ve Doku Mühendisliği AUM (İSÜKÖK) laboratuvarına getirilerek çalışıldı.

3.2.2. Kan Örneklerinden T Lenfosit Eldesi ve Karakterizasyonu

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hastanesi Dahiliye polikliniğinden çalışmaya gönüllü olarak katılmayı kabul eden hastaların kan örnekleri taze olarak İstinye Üniversitesi Kök Hücre ve Doku Mühendisliği AUM laboratuvarına getirildi. Hastalardan alınan 10 mL periferik venöz kan örnekleri 1:1 oranında fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile dilüe edildikten sonra 3:4 oranında Ficoll-paque üzerine yerleştirildi. İlk santrifüj sonrası toplanan bulutsu tabaka (buffy coat) Ficoll-paque protokolüne uygun olarak ardışık santrifüj işlemlerinden geçirilerek periferik kan mononükleer hücreler (PBMC) izole edildi. Elde edilen PBMC Fetal Sığır Serum (FBS), L- glutamin ve penisilin-streptomisin takviye edilmiş RPMI 1640 ortamında yeniden süspanse edildi (123,124).

MACS üzerine yerleştirilen LD kolon 2 mL tampon ile yıkanarak kolon işlem için hazır hale getirildi. CD4⁺ olmayan hücrelerin manyetik etiketlemesi tamamlandıktan sonra LD kolon içerisine yerleştirilerek manyetik ayırması gerçekleştirildi. Kolondan geçen hücreler 2 kez 1 mL tamponla yıkanarak kolondan süzülmesi beklendi ve akış ile etiketlenmemiş CD4⁺ hücreler toplandı. Hücreler, Neubauer lamı ile tekrar sayıldı ve CD4⁺ hücre sayısı belirlendi. CD4⁺ hücreler akış sitometri analizi, proliferasyon analizi, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ve immünfloresan aşamaları için deney düzeneğine uygun olarak hesaplandı ve ayrıldı.



20

İzole edilen hücreler, hücre yüzey antijenleri ve hücre içi ekspresyonları açısından akış sitometrisi analizler ile değerlendirildi. Bu amaçla CD4, CD25 yüzey antijenleri ve FOXP3 transkripsiyon faktörü hücre içi belirteçleri ile analiz yapıldı. Her bir antikor için belirlenen izotip antikorlar, negatif kontrol olarak kullanıldı. PE (fitoeritrin) anti Mouse/rat/human FOXP3 için PE Mouse IgG1 izotip kontrol, FITCH (Floresan İzotiyosiyanat) Anti rat CD25 için FITCH Mouse IgG1κ izotip kontrol, APC (Allofikosiyanın) Anti rat CD4 için APC Mouse IgG1κ izotip kontrol kullanıldı (Tablo 3. 1). Fiksasyon için kullanılan Buffer A ve permabilizasyon için kullanılan Buffer C aşağıdaki formüle uygun olarak hazırlandı:

Buffer A (1X): Buffer A (10X): Distile su

Buffer C : Buffer B (50X): Buffer A (1X)

Tablo 3. 1: Flow sitometri analizi için kullanılan antikor miktarları

Antikor	Miktar
PE anti Mouse/rat/human FOXP3	5 µl
PE Mouse IgG1	5 µl
FITCH Anti rat CD25	5 µl
FITCH Mouse IgG1κ	5 µl
APC Anti rat CD4	20 µl
APC Mouse IgG1κ	20 µl



Resim 3. 2: 3 ve 9 nolu hastalardan izole edilen hücrelerin flow sitometri için hazırlanması

Flow sitometri analizi için protokol aşağıdaki gibi gerçekleştirildi (Resim 3. 2):

1. CD4⁺ hücreleri tüplerin içerisine yerleştirildi ve 20 µl CD4 ve 5 µl CD25 yüzey antikorları ile bunların izotipleri eklendikten sonra 20 dakika karanlıkta inkübe edildi.
2. Tüplerin içine 2 mL boyama solüsyonu (PBS içinde %10 FBS solüsyonu) eklendikten sonra 400g'de 10 dakika santrifüjlendi.
3. Süpernatant atıldıktan sonra pellete fiksasyon işlemi için hazırlanan Buffer A 51-2mL eklendi ve 10 dakika oda ısısında inkübe edildi.
4. 600g'de 5 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant atıldı.
5. Pellete 2 mL boyama solüsyonu eklendikten sonra 600g'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
6. Pellete permabilizasyon işlemi için hazırlanan Buffer C 0.5 mL eklenerek 30 dakika oda ısısında inkübe edildi.
7. 2 mL boyama solüsyonu eklendikten sonra 600g'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
8. Tüplere 5 µl FOXP3 antikor ve izotip kontrolü eklenerek 30 dakika oda ısısında inkübe edildi.
9. 2 mL boyama solüsyonu eklendikten sonra 600g'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
10. Pellete 0.5 mL PBS eklenerek analiz için Beckman Coulter cihazı ile Treg hücre popülasyonunun analizi gerçekleştirildi.

3.2.3. Mezenkimal Kök Hücre Eldesi ve Karakterizasyonu

Liv Hospital Kadın Doğum ve Hastalıkları bölümünde doğum yapmış anneden onam formu ile bağış olarak alınmış göbek kordonu hastane içerisinde yer alan Rejeneratif Tıp ve Kök Hücre Merkezinde bulunan İyi Üretim Uygulamaları Laboratuvarına uygun koşullarda getirilen göbek kordonu 3-5 cm²'lik parçalara bölündü ve bu parçalar boyuna kesilip içerisinde bulunan kan damarları ayrıştırılıp eksplant kültür yöntemi için 100 cm²'lik petrilere dokuların iç yüzeyi denk gelecek şekilde yapıştırıldı. Petriler %2 hAB serum, %0,5 pensilin/streptomisin içeren besiyeri ile %5 CO² içeren 37⁰C'lik inkübatörlerde 4 gün boyunca inkübe edildi. 4. günde petrilere bulunan dokuların besiyeri aspire edildi ve yerine taze besiyeri eklendi. Bu işlem her 4 günde bir

tekrar edildi. Dokulardan çıkan koloniler %80 konfluensiye ulaştığında (yaklaşık 16. gün) hücreler bulundukları petrilere kaldırıldı. İzole edilmiş ve çoğaltılmış mezenkimal kök hücreler kültür boyunca IX50 (Olympus, Japonya) invert mikroskobu ile görüntülendi.

%80 konfluensi durumuna ulaşan hücrelerin bulunduğu petrilere besiyeri aspire edildikten sonra petrilere %0,05 EDTA içeren tripsin eklenerek, hücrelerin petrilere ve doku parçalarından ayrılması sağlandı. Ayrılan hücreler 400 g'de 5 dakika santrifüjlendi. Hücreler ViCell XR cihazı ile sayılıp %2 human AB serum ve %0,5 Penisilin/Streptomisin içeren besiyeri ile kültür kaplarına ekimi yapıldı. Bu prosedür pasaj 1'den pasaj 6'ya kadar aynı şekilde devam ettirildi.

Mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonu spesifik yüzey antijenleri olan CD90, CD105, CD73 ve CD44 ve mezenkimal kök hücrelerde bulunmayan negatif kokteyl (CD34, CD45, CD11b, CD19 ve HLA-DR antijenleri) ile P2 ve P6'dan tripsin ile kaldırılan hücreler bu antikolar ile muamele edildi ve BD FACS cihazında yüzey antijenlerinin ölçümleri gerçekleştirildikten sonra BD FACS Diva programı ile analiz edildi.

3.2.4. Treg Hücrelerinin Mezenkimal Kök Hücreler ile Direkt ve İndirekt Kokültürünün Yapılması

Direkt ve indirekt kültürde gerçekleştirilecek proliferasyon analizi, RT-PCR ve immünfloresan boyama aşamaları için 12 ve 48 kuyulu kültür plakaları hazırlandı. Deneyde kullanılan MKH'lar pasaj 6 olarak seçildi. Kokültür grupları için L- glutamin ve antibiyotik-antimikotik takviye edilmiş DMEM F-12 ortamında mezenkimal kök hücreler ekildikten sonra 12 kuyulu kültür plakası için Treg:MKH oranı 3:1 ($0,3 \times 10^6$: $0,1 \times 10^6$ hücre/kuyu) olacak şekilde, 48 kuyulu kültür plakası için Treg:MKH oranı 3:1 ($0,09 \times 10^6$: $0,01 \times 10^6$ hücre/kuyu) olacak şekilde hücrelerin ekimi gerçekleştirildi. Kültür plakaları %5 CO₂ içeren steril bir ortamda ve nemlendirilmiş atmosferde 37°C'de 7 gün kültürlendi. Deney düzeneği her bir hasta için 12 kuyulu kültür plakasına şu şekilde tasarlandı (Şekil 3. 1):

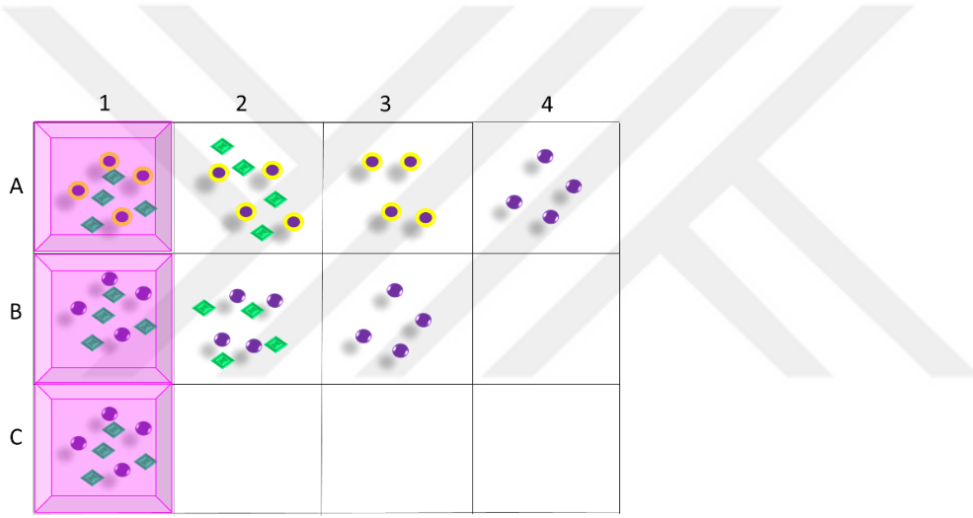
❖ **Hücre proliferasyon analizi için,**

A1 kuyusu: MKH ekilmiş kuyu içerisinde yerleştirilen transwell (por çapı 0,4 µm) içine CFSE ile işaretlenmiş Treg hücreleri yerleştirilerek oluşturulan indirekt kültür grubu,

A2 kuyusu: MKH ekilmiş kuyu içerisinde CFSE ile işaretlenmiş Treg hücreleri yerleştirilerek oluşturulan direkt kültür grubu,

A3 kuyusu: CFSE ile etiketlenmiş Treg hücreleri ekilerek oluşturulan pozitif kültür grubu,

A4 kuyusu: CFSE etiketlenmesi yapılmamış Treg hücreleri ekilerek oluşturulan negatif kültür grubu olarak hazırlandı.



Şekil 3. 1: CFSE, PCR ve indirekt immünfloresan boyama için deney düzeneği (MKH: yeşil, CFSE ile etiketlenmiş Treg: sarı, Treg: mor)

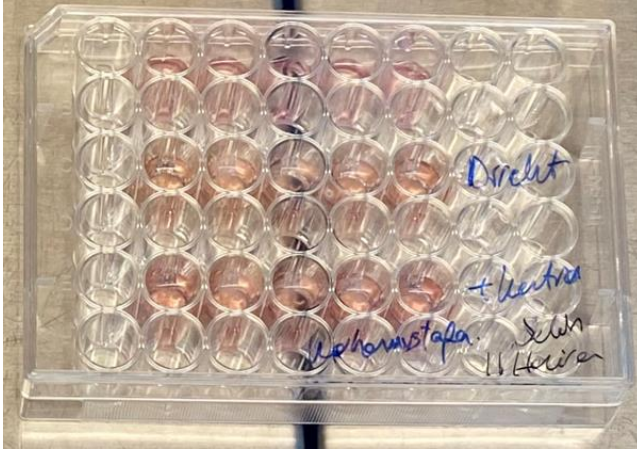
❖ **RT-PCR analizi için,**

B1 kuyusu: MKH ekilmiş kuyu içerisinde yerleştirilen transwell (por çapı 0,4 µm) içine Treg hücreleri yerleştirilerek indirekt kültür grubu,

B2 kuyusu: MKH ekilmiş kuyu içerisinde Treg hücreleri yerleştirilerek direkt kültür grubu,

B3 kuyusu: Yalnızca Treg hücreleri ekilerek negatif kültür grubu oluşturuldu.

7 günlük deney sonunda kuyulardaki hücreler toplanarak ependorflara kondu ve 300g'de 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atıldıktan sonra PBS eklenerek yeniden 300g'de 5 dakika santrifüjlendi ve hücre pelleti RT-PCR analizi için -20°C'de saklandı.

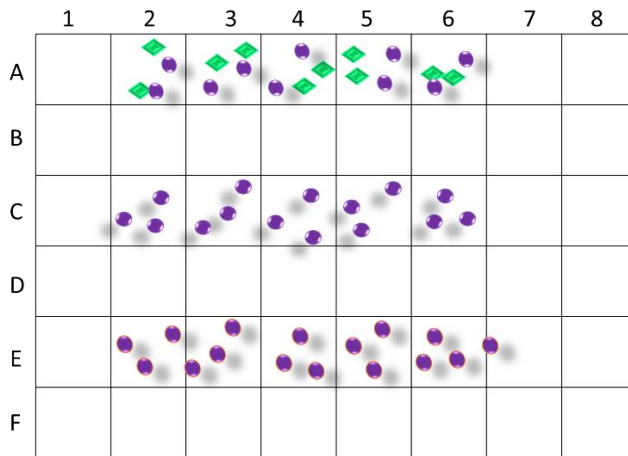


Resim 3. 3: İmmü floresan boyamanın gerçekleştirildiği kültür plakası.

❖ **İmmü floresan boyama için,**

C1 kuyusu: MKH ekilmiş kuyu içerisine yerleştirilen transwell (por çapı 0,4 μ m) içine Treg hücreleri yerleştirilerek indirekt kültür grubu oluşturuldu (Şekil 3. 2).

Ayrıca 48 kuyulu plakanın 5 kuyusuna MKH ekimi yapıldı ve üzerine Treg hücreleri yerleştirilerek direkt kokültür grubu oluşturuldu. 48 kuyulu plakanın 5 kuyusuna yalnızca Treg hücreleri ekilerek kontrol grubu oluşturuldu. 7 günlük deney sonunda 12 kuyulu kültür plakasında transwell içerisindeki hücreler toplanarak 48 kuyulu kültür plakasına aktarıldı (Resim 3. 3).



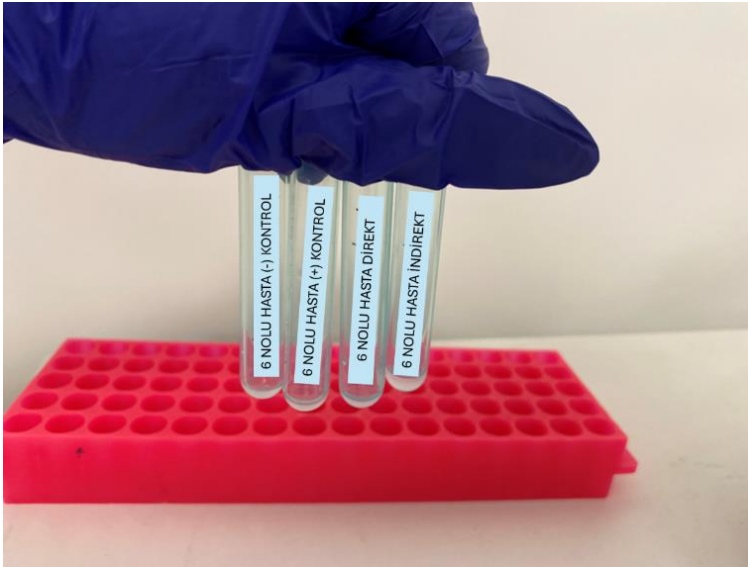
Şekil 3. 2: İmmü floresan boyamanın gerçekleştirildiği deney düzeneği. (MKH: yeşil, Treg: mor)

3.2.5. Hücre Proliferasyon Analizi

Proliferasyon analizinde kullanılan Karboksifloresin Diasetat Süksinimidil Ester (CFSE) kiti 1mM konsantrasyonda ara stoklar olarak hazırlandı. CFSE ile etiketleme aşağıdaki basamaklara göre gerçekleştirildi (Resim 3. 4):

1. İzole edilmiş Treg hücre pelletine 5 μ M ara stok eklendi.
2. 15 dakika sıcak su banyosunda inkübe edildi.
3. Üzerine 9x PBS eklenerek, 300g'de 5 dakika santrifüjlendi ve süpernatant atıldı.
4. Pellete 500 μ M besiyeri eklenerek tekrar 300g'de 5 dakika santrifüjlendi ve süpernatant atıldı.
5. Hücrelerin 12 kuyulu kültür plakalarına ekimleri gerçekleştirildi.

Proliferasyon ölçümü soy hücrelerde CFSE floresansı hücre bölünmesi ile kademeli olarak yarıya indirildiğinden 7 günlük deney sonunda kuyulardaki hücreler toplanarak 4 ayrı akış sitometri tüpüne aktarıldı ve Backman Coulter cihazı ile ölçülerek hücre proliferasyonu izlendi (125).



Resim 3. 4: Proliferasyon analizi için 6 nolu hastanın direkt indirekt pozitif ve negatif kontrol gruplarının hazırlanması

3.2.6. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) aşamaları her bir hasta için kontrol, direkt ve indirekt kültürlenmiş hücre pelletlerinde gerçekleştirildi. Numuneler kültür süresi sonunda toplanarak -20°C’de saklandı ve analiz için NUKLEOGENE Tamı ve Biyoteknoloji Ürünleri Arge Laboratuvarı’na gönderildi ve RNA İzolasyonu için, NGE024 Nucleogene Quickex Total RNA Extraction Kit’in talimatları doğrultusunda hücre örnekleri için kişileştirilmiş protokolü uygulandı.

1. Süspansiyon kültürdeki hücreler 14,000 g’de 10 dakika boyunca santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
2. 300 µl lizis tamponu eklendi, tamamen karışana kadar vortekslendi ve 5 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra 5 dakika boyunca 14,000 g’de santrifüj edildi.
3. Süpernatanttan 250 µl yeni bir santrifüj tüpüne aktarıldı ve aynı hacimde EtOH eklendi ve vortekslendi.
4. Karışım spin column’a aktarıldı ve 14,000 g’de 30 saniye santrifüj edildi. Biriken sıvı atıldı.
5. 500 µl Wash 1 Buffer spin column’a eklendi ve 14,000 g’de 30 saniye santrifüj edildi. Biriken sıvı atıldı. Bu adım iki kez gerçekleştirildi.
6. 600 µl Wash 2 Buffer spin column’a eklendi ve 14,000 g’de 30 saniye santrifüj edildi.
7. Filtre temiz mikrosantrifüj tüpüne alındı ve 50 µl Elution Buffer eklendi. 2 dakika inkübasyon ardından 14,000 g’de 2 dakika santrifüj edilerek DNA elde edildi.
8. Elde edilen DNA’ların saflık ve konsantrasyonları nanodrop cihazıyla ölçülmüş ve cDNA çevrimi için eşitlendi. cDNA çevrimi için NGMM019 Nucleogene RNA dönüştürücü cDNA Mix (cDNA Synthesis Kit) (5X) kullanıldı (Tablo 3. 2):

Tablo 3. 2: Nucleogene RNA dönüştürücü cDNA karışım içeriği

Bileşenler	20 µl reaksiyon için	Final Konsantrasyonu;
NucleoGene cDNA Synthesis Kit (5X)	hacim 4 µl	1X (1 µg to 10 pg total RNA)
RNA Template	16 µl	

9. Reaksiyon protokolü; 5 dakika -25°C, 30 dakika -50°C, 5 dakika-85°C
10. cDNA'ya çevrilen RNA'ların gen anlatımlarının incelenmesi için real-time PCR metodu, NGOT005 Nucleogene mRNA GAPDH Gene Expression Assay (Sybr Green), NGOT005 Nucleogene mRNA TGF- β Gene Expression Assay (Sybr Green), NGOT005 Nucleogene mRNA FOXP3 Gene Expression Assay (Sybr Green), NGOT005 Nucleogene mRNA IL4 Gene Expression Assay (Sybr Green), NGOT005 Nucleogene mRNA IL10 Gene Expression Assay (Sybr Green) kullanılarak gerçekleştirildi (Tablo 3. 3).

Tablo 3. 3: RT-PCR karışım içeriği

Bileşen	20 uL reaksiyon için hacim	Final konsantrasyon
NucleoGene qPCR Sybr Green Master Mix (2X)	10 uL	1X
Nucleogene mRNA Gene Expression Assay	5 uL	100-900 nM
Nuclease Free Water	3 uL	100-900 nM
Template DNA or cDNA	2 uL	
Final Volume (uL)	20 uL	Değişken

Tablo 3. 4: RT-PCR Koşulları

	Standard Cycling
Initialdenaturation	95°C 15 min
Denaturation	95°C 10 to 15s
Annealing	60°C, 30 to 60s

PCR protokol (Tablo 3. 4):

Cihaz protokolde belirtilen verilere göre polimeraz aktivitesi, denetürasyon/bozunma, bağlanma (annealing) aşamaları için hazır hale getirildikten sonra örnekler cihaza yerleştirildi. Analiz sonunda veriler Excel tablosuna aktarılarak Ct değeri hesaplandı. Veriler $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanılarak gen ekspresyonlarındaki değişiklikler analiz edildi.

3.2.7. İmmüfloresan Boyama

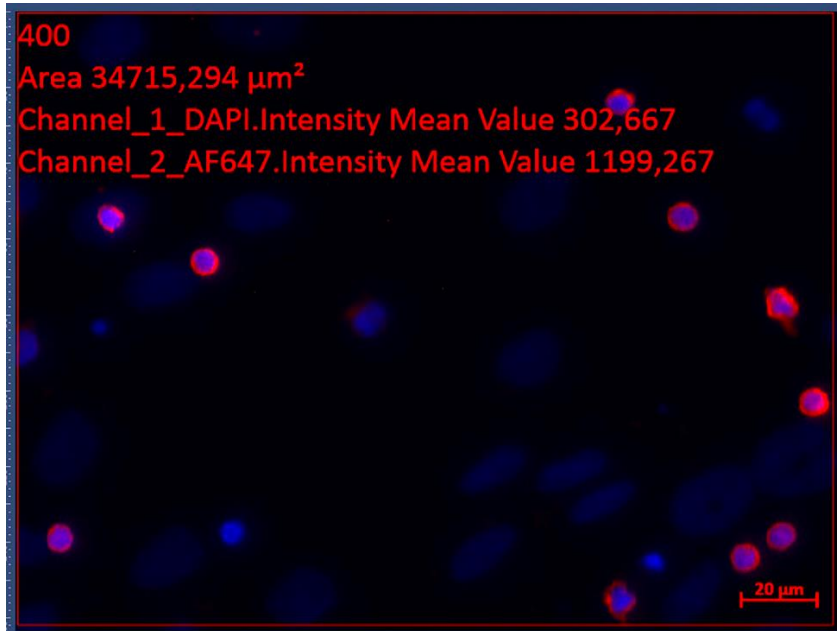
Mezenkimal kök hücreler ile direkt ve indirekt kokültüre edilmiş Treg hücreleri ile kokültüre edilmemiş hücrelerin anti-inflamatuar sitokin sentezi farkının gösterilmesi amacıyla 7 günlük deney süresinin sonunda 48 kuyulu kültür plakasında immüfloresan boyama aşağıdaki basamaklara göre gerçekleştirildi:

1. 48 kuyulu kültür plakası 400g'de 5 dakika santrifüjlendikten sonra besiyeri atıldı.
2. Kuyulara 400 µl PBS eklendikten sonra tekrar 400g'de 5 dakika santrifüjlendi ve PBS atıldı.
3. Kuyulara 500 µl soğuk %4 paraformaldehit (PFA) eklendi ve +4°C 2 saat inkübasyon sonrası 400g'de 5 dakika santrifüj yapılarak PFA ortamdan uzaklaştırıldı.
4. Kuyulara 400 µl PBS eklenerek yıkama işlemi gerçekleştirildi. PBS 10 dakika bekledikten sonra 400g'de 5 dakika santrifüj yapılarak ortamdan atıldı. Bu aşama 2 kere daha tekrarlandı.
5. Kuyulara 400 µl bloklama solüsyonu (%1 Triton+%1 BSA) eklendi ve 30 dakika oda ısısında inkübasyon sonrası 400g'de 5 dakika santrifüj yapılarak bloklama solüsyonu ortamdan uzaklaştırıldı.
6. Her bir kuyuya 200 µl %1 Triton eklenerek tabloda belirtilen primer antikolar kuyulara eklendi (Tablo 3. 5), plaka alimünyum folyo ile sarılarak +4°C bir gece inkübe edildi.
7. Kuyulara 400 µl PBS eklenerek yıkama işlemi gerçekleştirildi. PBS 10 dakika bekledikten sonra 400g'de 5 dakika santrifüj yapılarak ortamdan atıldı. Bu aşama 2 kere daha tekrarlandı.
8. Her bir kuyuya 200 µl %1 Triton eklenerek tabloda belirtilen sekonder antikolar kuyulara eklendi (Tablo 3. 5) ve plaka alimünyum folyo ile sarılarak oda ısısında 30 dakika inkübe edildi.

9. Kuyulara 400 µl PBS eklenerek yıkama işlemi gerçekleştirildi. PBS 10 dakika bekledikten sonra 400g'de 5 dakika santrifüj yapılarak ortamdan atıldı. Bu aşama 2 kere daha tekrarlandı.
10. 100 µl PBS içerisine DAPI damlatıldıktan sonra 48 kuyulu plakada Zeiss Axio.Observer.A2 floresan mikroskobu ile her bir kuyudan randomize olarak 5 alanın fotoğraf çekimi gerçekleştirildi ve Zen.2.3 pro yazılımı ile her bir fotoğrafın ölçümleri (Resim 3. 5) yapılarak istatistiksel analizi gerçekleştirildi (126).

Tablo 3. 5: İmmünfloresan boyamada kullanılan primer ve sekonder antikor listesi

Kuyu	Primer antikorlar	Sekonder antikorlar
A2-C2-E2	CD4 (Mouse)-Sc-19641	Anti Mouse- Alexa Flour 647 (4410S- CS)
A3-C3-E3	IL-2 (Mouse)-MA5-23696	Anti Mouse- Alexa Flour 647 (4410S- CS)
A4-C4-E4	IL-10 (Rabbit)-MA5-42656	Anti Rabbit-Alexa Flour 647 (4414S-CS)
A5-C5-E5	BCL-2 (Mouse)-Sc7882	Anti Mouse- Alexa Flour 647 (4410S- CS)
A6-C6-E6	TNF- α (Mouse)-Sc-133192	Anti Mouse- Alexa Flour 647 (4410S- CS)



Resim 3. 5: Direkt kokültür kuyusundan çekilmiş bir fotomikrografta Zen.2.3 Pro programı ile alan ve boya yoğunluğunun ölçümü (DAPI: çekirdek boyası, AF: kırmızı floresan ışıma yapan sekonder boyası)

3.2.8. İstatistiksel Analiz

Çalışmadaki nitel değişkenlere ait tanımlayıcı istatistikler sayı ve yüzde olarak, nicel değişkenlere ait tanımlayıcı istatistikler ise ortalama, standart sapma, medyan, minimum ve maksimum olarak verildi. Nicel değişkenlerin normal dağılıma uygunlukları Shapiro Wilk testi ile değerlendirildi. İki bağımsız grubun ortalama karşılaştırmasında student t testi, ortanca karşılaştırmasında ise Mann Whitney U testi kullanıldı. İki bağımlı grubun ortalama karşılaştırmasında Wilcoxon signed rank test kullanıldı. İki'den fazla bağımlı grubun ortalama karşılaştırmasında Friedman testi kullanıldı, ikili karşılaştırmalarda post hoc test olarak Bonferroni düzeltmesi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi 0,05 olarak alındı, hesaplamalarda SPSS (version 28) paket programı kullanıldı.

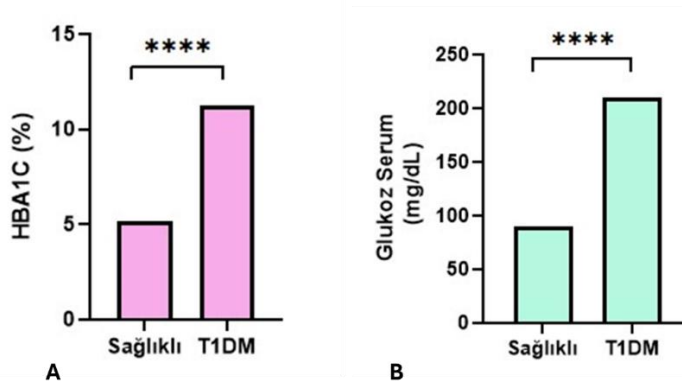
4. BULGULAR

4.1. HASTA SEÇİMİ

Deneye katılan bireylerin çalışma gruplarına uygunluğunu belirlemek için HbA1c ve serum glukoz ölçümleri gerçekleştirildi. T1DM grubuna dahil olan bireylerin ADA, IDF ve WHO tarafından belirlenen kriterlere uygun şekilde HbA1c değerlerinin $\geq 6,5$ ve serum glukoz değerlerinin ise ≥ 126 mg/dl olduğu görüldü. Sağlıklı grubuna dahil olan bireylerin HbA1c değerlerinin $\leq 6,5$ ve serum glukoz değerlerinin ise ≤ 126 mg/dl olduğu görüldü (Tablo 4.1). T1DM grubunun HbA1c ortalaması (mean=11,27) sağlıklı grubun ortalamasından (mean=5,15) istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0,002$). Ayrıca T1DM grubunun serum glukoz ortalaması (mean=210,50) sağlıklı grubun ortalamasından (mean=91,16) anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü ($p=0,002$) (Şekil 4. 1).

Tablo 4. 1: Sağlıklı ve tip 1 diyabetli bireylerin HbA1c ve serum glukoz değerleri

Hasta No	Grubu	Yaş	HbA1c	Serum Glukoz
1	Sağlıklı	39	5,12	88
2	Sağlıklı	26	5,06	102
3	Sağlıklı	30	5,02	81
4	Sağlıklı	30	5,37	91
5	Sağlıklı	30	5,07	99
6	Sağlıklı	37	5,3	86
7	T1DM	33	14	153
8	T1DM	51	11,98	239
9	T1DM	25	8,78	139
10	T1DM	25	13,54	379
11	T1DM	54	11,92	231
12	T1DM	46	7,40	122



Şekil 4. 1: Sağlıklı ve T1DM bireylerin HbA1c yüzdesi ve glukoz serum seviyeleri.

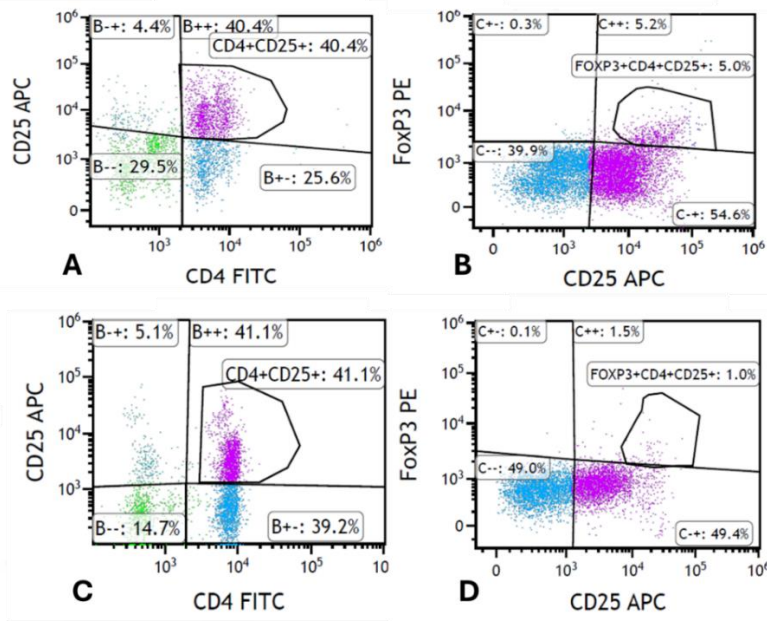
Çalışmaya katılan T1DM tanılı 7, 8, 9, 11 ve 12 nolu hastaların C-peptid değerleri $\leq 0,5$ ng/mL olarak tespit edilirken, 10 nolu hastaya ait C-peptid değeri 0,64 ng/mL olarak belirlendi. Tanı süresi 1-16 yıl arasında olan 7, 8, 9, 10 ve 11 nolu hastaların en az bir otoantikoru pozitif iken 27 yıllık tanısı olan 12 nolu hastanın otoantikorları negatif olarak tespit edildi (Tablo 4. 2).

Tablo 4. 2: Tip 1 diyabetli bireylerin c-peptid ve otoantikor değerleri

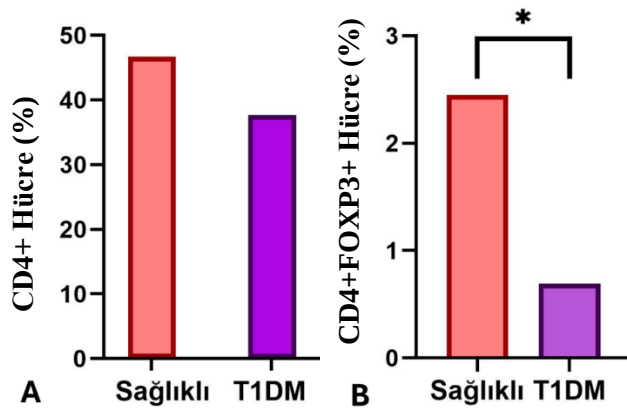
Hasta No	Tanı Yılı	C-Peptid	Anti-GAD	Anti-ICA	Anti-İnsülin
7	2022	0,4	POZİTİF	POZİTİF	POZİTİF
8	2012	0,17	POZİTİF	NEGATİF	X
9	2011	0,12	POZİTİF	NEGATİF	POZİTİF
10	2023	0,64	POZİTİF	POZİTİF	X
11	2008	0,33	POZİTİF	NEGATİF	POZİTİF
12	1997	0,11	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF

4.2. T LENFOSİTLERİN KARAKTERİZASYONU

Sağlıklı kontrol ve tip 1 diyabetli hastaların kanından izole edilen hücre popülasyonunda Treg hücre saflığını gözlemlemek için Treg hücrelerinin karakterizasyonu gerçekleştirildi ve hücre yüzdeleri belirlendi. Kapılama stratejisi CD4+ hücrelerin içerisinde CD25 ve FOXP3 pozitif hücreler belirlenerek gerçekleştirildi (Şekil 4. 2). Treg hücre popülasyon yüzdesinin tip 1 diyabetli hasta grubunda sağlıklı grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük olduğu ($p<0,05$) gözlemlendi (Şekil 4. 3).



Şekil 4. 2: Sağlıklı gruptan 3 ve T1DM grubundan 9 nolu hastalardan izole edilen hücrelerin flow sitometri kapılama stratejisi. **A.** 3 nolu hasta kanından izole edilen lenfositler içindeki CD4 ve CD25 pozitif hücre popülasyonu. **B.** 3 nolu hastanın CD4 ve CD25 pozitif popülasyonu içindeki FOXP3 pozitif hücreler. **C.** 9 nolu hasta kanından izole edilen lenfositler içindeki CD4 ve CD25 pozitif hücre popülasyonu. **D.** 9 nolu hastanın CD4 ve CD25 pozitif popülasyonu içindeki FOXP3 pozitif hücreler.

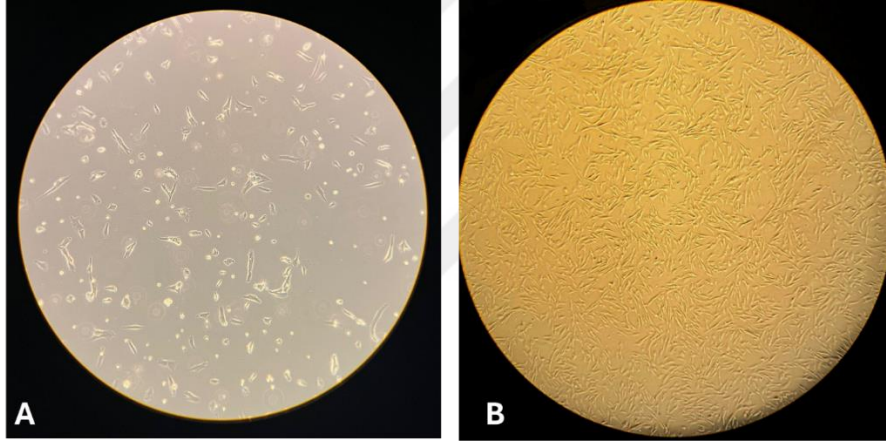


Şekil 4. 3: Sağlıklı ve T1DM gruplarına ait flow sitometri kapılama yöntemiyle belirlenen hücre popülasyon yüzdelерinin istatistiksel verileri **A.** Sağlıklı ve T1DM gruplarında CD4⁺ hücre popülasyon yüzdesi. **B.** Sağlıklı ve T1DM gruplarında CD4⁺ FOXP3⁺ hücre popülasyon yüzdesi

4.3. MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN ELDESİ VE KARAKTERİZASYONU

4.3.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Eldesi

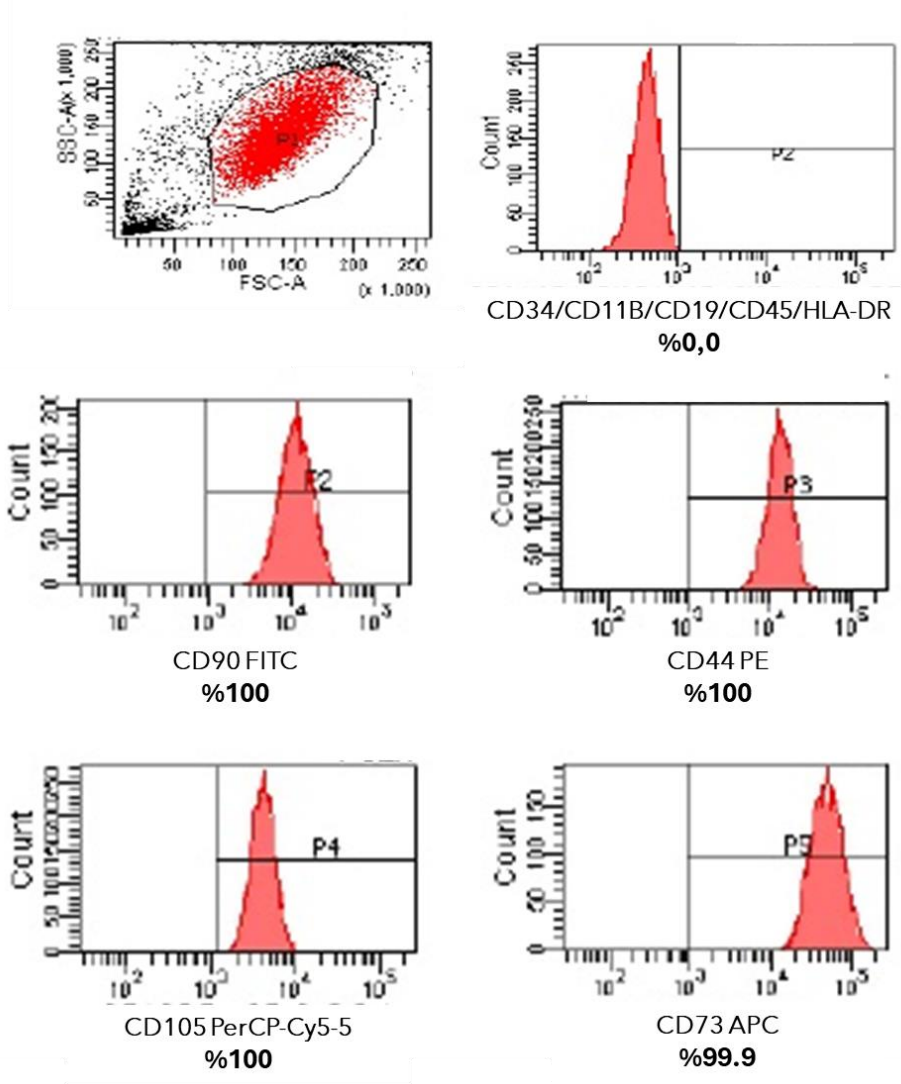
Eksplant kültür yöntemi ile göbek kordonundan mezenkimal kök hücre izolasyonu gerçekleştirildi. 15. Günde %80 yoğunluğa ulaşan hücreler petriden kaldırılarak kültür kaplarına aktarıldı ve pasaj 1 (P1) mezenkimal kök hücreler elde edildi. İnvert mikroskop ile incelendiğinde elde edilen hücrelerin MKH morfolojisi ile uyumlu yıldız şekilli morfolojiye sahip olduğu görüldü (Resim 4. 1).



Resim 4. 1: Eksplant kültür yöntemiyle izole edilen mezenkimal kök hücreler. **A.** 8. güne ait fotomikrograf, X10 **B.** 15. güne ait fotomikrograf, X10.

4.3.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

Mezenkimal Kök Hücrelerin karakterizasyonu spesifik yüzey antijenleri olan CD90, CD105, CD73 ve CD44 ve mezenkimal kök hücrelerde bulunmayan negatif kokteyl (CD34, CD45, CD11b, CD19 ve HLA-DR antijenleri) ile P2 ve P6'dan tripsin ile kaldırılan hücreler bu antikorlar ile muamele edildi ve BD FACS cihazında yüzey antijenlerinin ölçümleri gerçekleştirildikten sonra BD FACS Diva programı ile analiz edildi. Pozitif belirteçler olan CD90, CD105, CD44 flow sitometride %100, CD73 ise %99,9 pozitif alanda izlenirken, negatif kokteyl belirteçleri olan CD34, CD45, CD11b, CD19 ve HLA-DR antijenleri flow sitometride %100 negatif alanda izlendi (Şekil 4. 4).

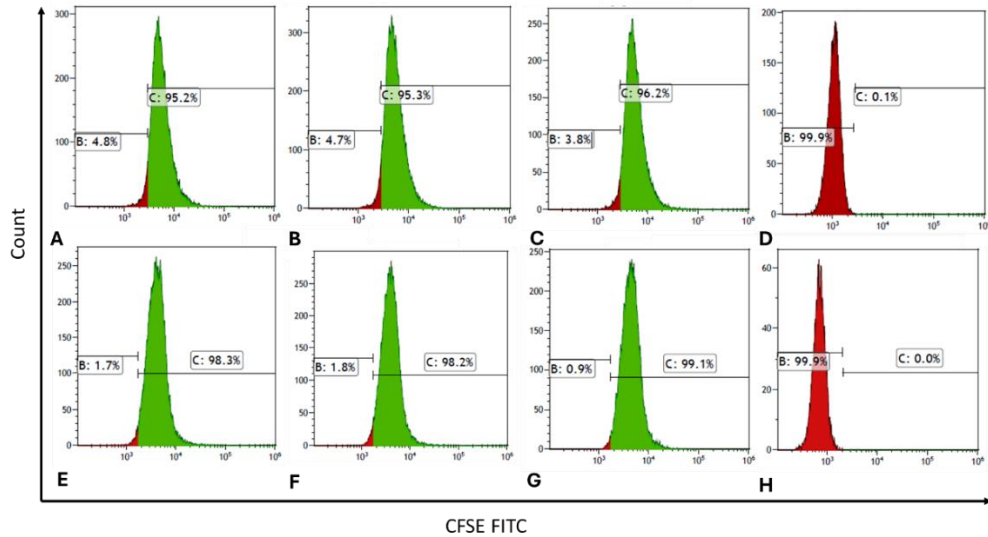


Şekil 4. 4: Eksplant izolasyon ile elde edilen MKH P6'nın pozitif (CD90, CD105, CD73 ve CD44) ve negatif (CD34, CD45, CD11b, CD19 ve HLA-DR antijenleri) belirteçlerine göre flow sitometri ile karakterizasyonu

4.4. T LENFOSİTLERİN PROLİFERASYON ANALİZİ

Mezenkimal kök hücrelerin T lenfosit çoğalması üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla, sağlıklı ve T1DM grubundaki hastaların izole edilen T lenfositleri CFSE ile işaretlenerek MKH ile 7 gün boyunca direkt ve indirekt olarak kokültüre edilmiştir. Her bir hastanın T lenfositleri kokültür süresi sonunda direkt, indirekt, pozitif ve negatif kontrol kuyularından ayrı tüplere toplanmış ve Beckman Coulter flow sitometri cihazında hücre proliferasyon analizi gerçekleştirilmiştir. Hücre plazma zarından geçerek süksinimidil ester gruplarının hücre içi aminlerle reaksiyonu sonucu floresan ışımaya yapan

CFSE, hücrenin her bölünmesi ile boya yoğunluğu yarıya indirgenerek ve flow sitometride oğul hücre neslini azalan pikler olarak ortaya çıkar (127). Sağlıklı gruptaki 6 nolu hastanın direkt, indirekt, pozitif kontrol gruplarında CFSE işaretli hücrelerin sırasıyla %95,2; 95,3; 96,2 oranında boyanmış olduğunu ancak proliferasyonu gösteren bir pik yapmadığı gözlemlendi. 6 nolu hastanın negatif kontrol grubundaki hücrelerin floresan ışığa göstermeyen negatif alanda %99,9 oranında bulunduğu ve bu hücrelerin de proliferasyonu gösteren herhangi bir pik yapmadığı görüldü (Şekil 4. 5). T1DM grubundaki 10 nolu hastanın benzer şekilde direkt, indirekt, pozitif kontrol gruplarında CFSE işaretli hücrelerin sırasıyla %98,3; 98,2; 99,1 oranında floresan ışığa gösterdiği ancak proliferasyonu gösteren bir pik yapmadığı gözlemlendi. 10 nolu hastanın negatif kontrol grubundaki hücrelerin floresan ışığa göstermeyen negatif alanda %99,9 oranında bulunduğu ve bu hücrelerin de proliferasyonu gösteren herhangi bir pik yapmadığı görüldü (Şekil 4. 5). Sağlıklı ve T1DM grupları arasında Treg proliferasyonu yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ($p=0,500$; $p=0,115$). Ayrıca Treg proliferasyonunun hem sağlıklı ve hem T1DM gruplarında direkt ve indirekt kültür koşulları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p=0,423$).

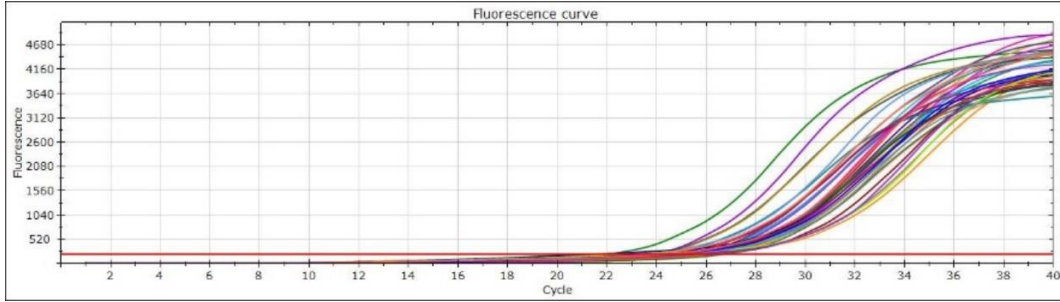


Şekil 4. 5: 6 (A, B, C, D) ve 10 (E, F, G, H) nolu hastalara ait CFSE histogramları. **A** ve **E** direkt kokültür, **B** ve **F**, indirekt kokültür, **C** ve **G**, pozitif kontrol, **D** ve **H**, negatif kontrol grupları.

4.5. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PCR)

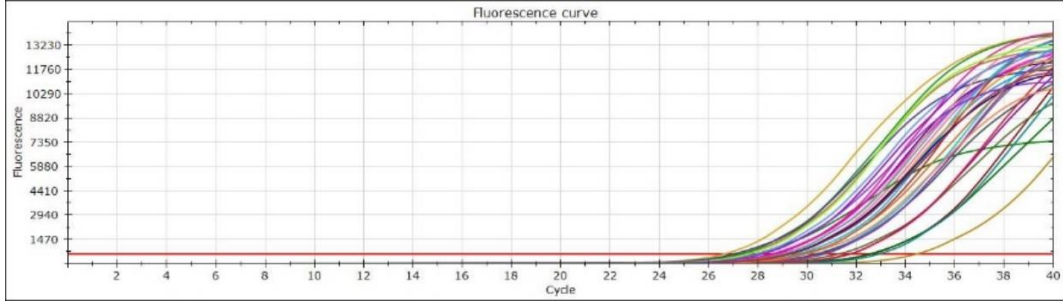
Mezenkimal kök hücrelerin T lenfositlerin sitokin profiline etkisini gözlemlemek için oluşturulan direk ve indirekt kokültür ile kontrol gruplarından toplanan hücrelerin antiinflamatuvar sitokin olan IL-4, IL-10 ve TGF- β gen ekspresyonları, Treg ana transkripsiyon faktörü olan FOXP3 ve housekeeping gen olarak kabul edilen GAPDH gen ekspresyonları RT-PCR ile analiz edildi. Elde edilen hedef genlere ait duplike çalışılmış ortalama Ct değerleri housekeeping olarak belirlenen GAPDH'e ait yine ortalama Ct değerlerinden çıkarılarak delta Ct değerleri hesaplanmıştır. Kat değişiminin ifadesi 2 üzeri delta delta Ct değerlerinin hesaplanmasıyla bulunmuş ve istatistiksel analiz gerçekleştirilmiştir (Tablo 4. 3).

FOXP3 gen ekspresyon düzeylerinin (Şekil 4. 6) sağlıklı ve T1DM gruplarında hem indirekt ($p=0,240$) hem direkt ($p=0,818$) kültür koşulları arasında istatistiksel olarak fark gözlenmedi. T1DM grubunda ise FOXP3 gen ekspresyon düzeyi direkt kültür koşullarında indirekt kültür koşullarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0,028$).



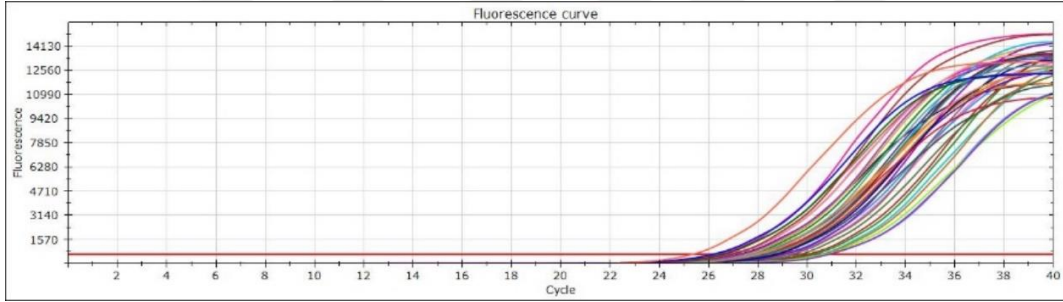
Şekil 4. 6: FOXP3 geni çoğalma eğrileri

Sağlıklı ve T1DM grupları arasında TGF- β gen ekspresyon (Şekil 4. 7) düzeylerinde direkt ($p=1,000$) ve indirekt ($p=0,485$) kültür koşullarında anlamlı fark olmamasına rağmen TGF- β gen ekspresyon düzeyleri direkt kültür koşulları indirekt kültür ortalamasından hem sağlıklı ve hem T1DM gruplarında istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0,046$; $p=0,046$).



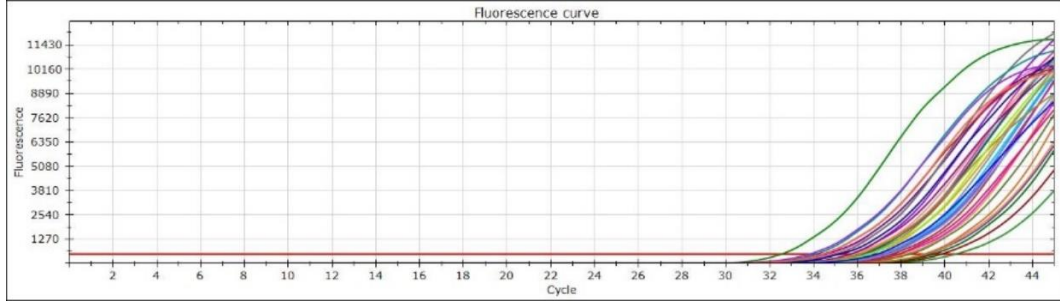
Şekil 4. 7: TGF- β geni çoğalma eğrileri

IL-4 gen ekspresyon düzeyleri (Şekil 4. 8) sağlıklı ve T1DM grupları arasında hem direkt ($p=0,485$) hem indirekt ($p=0,937$) kültür koşullarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmazken, sağlıklı grubunda IL-4 gen ekspresyon düzeyi direkt kültür koşulları ortalaması (mean=8,33) indirekt kültür koşullarından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0,028$).



Şekil 4. 8: IL-4 geni çoğalma eğrileri

IL-10 gen ekspresyon düzeyleri (Şekil 4. 9) ise indirekt kokültür koşullarında T1DM grubunun ortalaması (mean=1,86) sağlıklı grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek iken ($p=0,041$), direkt kültür koşullarında anlamlı fark bulunmadı ($p=0,180$).



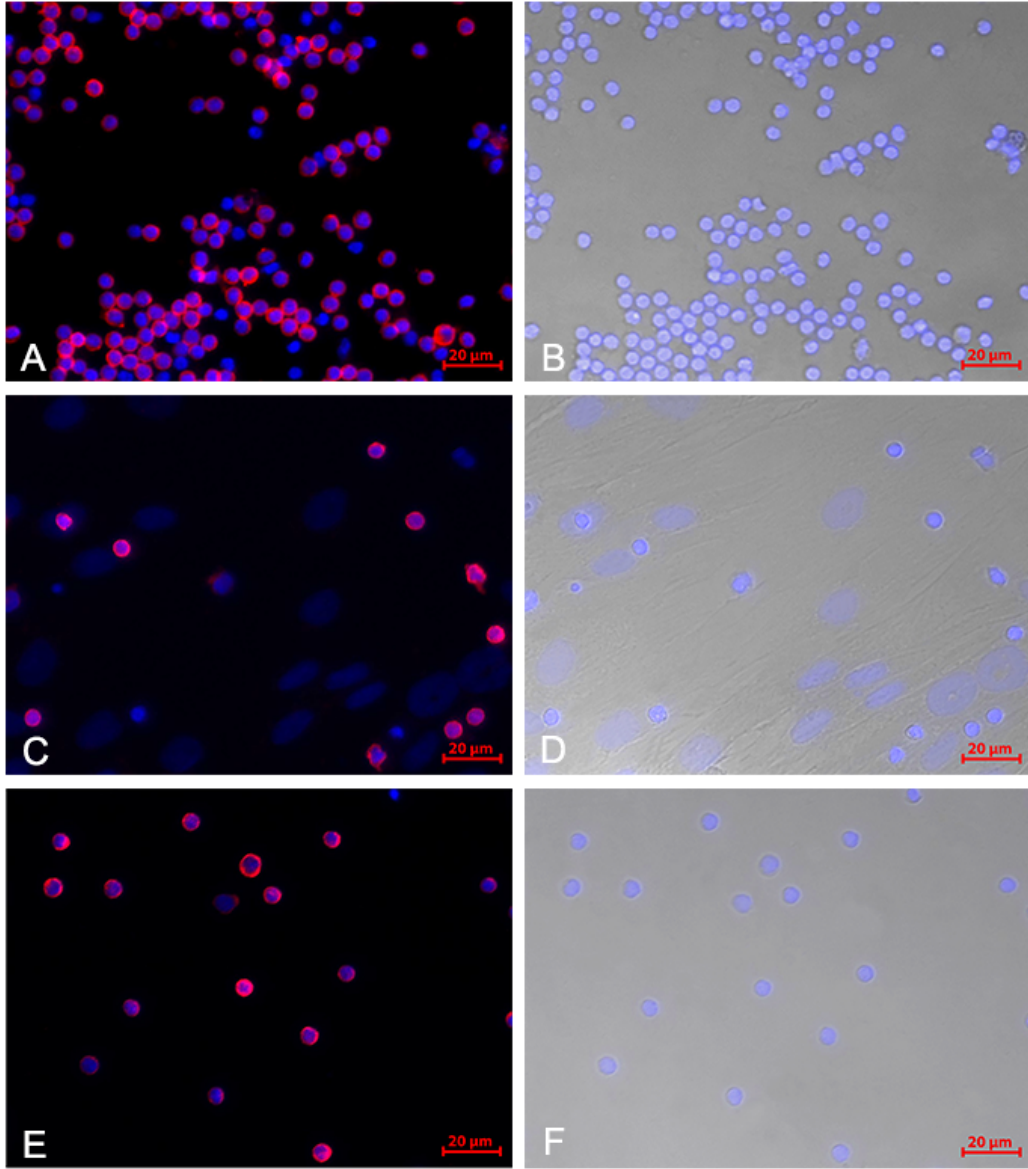
Şekil 4. 9: IL-10 geni çoğalma eğrileri

Tablo 4. 3: FOXP3, TGF- β , IL-4, IL-10 gen ekspresyon düzeylerinin sağlıklı ve T1DM gruplarında farklı direkt ve indirekt kültür koşullarında istatistiksel değerlendirmesi

Gen Adı	Grup	Direkt Kuyusu		İndirekt Kuyusu	
		Ortalama $\pm$ SS Medyan (min-max)	p	Ortalama $\pm$ SS Medyan (min-max)	p
FOXP3	Sağlıklı	6,53 $\pm$ 9,49 1,74 (0,17-24,25)	0,818	1,04 $\pm$ 1,11 0,78 (0,15-3,16)	0,240
	T1DM	5,52 $\pm$ 7,70 2,14 (0,98-20,82)		1,44 $\pm$ 0,73 1,39 (0,69-2,71)	
TGF- β	Sağlıklı	9,78 $\pm$ 19,07 2,03 (0,23-48,50)	1,000	1,01 $\pm$ 1,80 0,26 (0,04-4,65)	0,485
	T1DM	35,35 $\pm$ 80,46 1,64 (0,15-199,46)		3,83 $\pm$ 5,83 0,46 (0,06-14,02)	
IL-4	Sağlıklı	8,33 $\pm$ 7,82 6,26 (1,60-23,10)	0,485	4,49 $\pm$ 6,51 1,97 (0,23-17,50)	0,937
	T1DM	18,34 $\pm$ 37,34 2,39 (1,02-94,35)		10,96 $\pm$ 17,89 1,93(0,26-45,88)	
IL-10	Sağlıklı	1,14 $\pm$ 1,51 0,39 (0,10-3,94)	0,180	0,57 $\pm$ 0,44 0,48 (0,14-1,39)	0,041
	T1DM	4,92 $\pm$ 6,47 2,09 (0,30-17,26)		1,86 $\pm$ 2,03 0,90 (0,59-5,89)	

4.6. İMMÜNFLORESAN BOYAMA

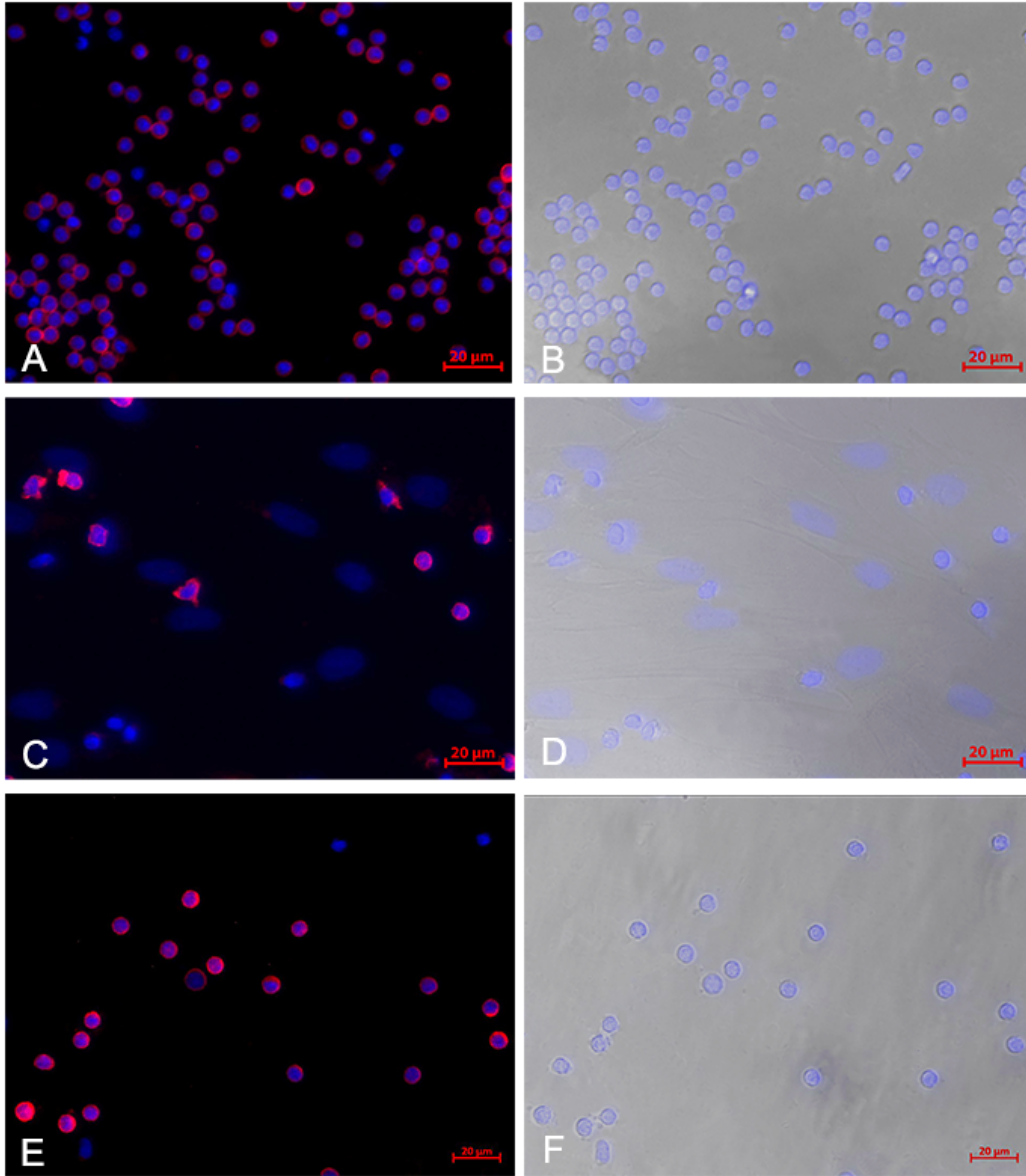
Düzenleyici T hücrelerin MKH ile etkileşimlerinin sentezledikleri sitokinlere etkisini gözlemlemek için direkt, indirekt kokültür ve kontrol gruplarında IL-2, IL-10 ve TNF- α sitokinleri için ayrıca T lenfosit belirteci olan CD4 ile antiapoptotik bir belirteç olan BCL-2'nin immünfloresan boyaması gerçekleştirildi. Her bir kuyudan rastgele 5 fotoğraf çekilerek Zeiss Zen.2.3 pro programı ile floresan boyaların ışımaya yoğunluğu ölçümü gerçekleştirildi ve veriler istatistiksel olarak incelendi (Tablo 4. 4).



Resim 4. 2: Sağlıklı grubundan 2 nolu hastanın CD4 belirtecine ait fotomikrograflar. **A.** Kontrol kuyusu. **B.** Kontrol kuyusu aydınlık alan. **C.** Direkt kokültür kuyusu **D.** Direkt kokültür kuyusu aydınlık alan **E.** İndirekt kokültür kuyusu **F.** İndirekt kokültür kuyusu aydınlık alan. X40.

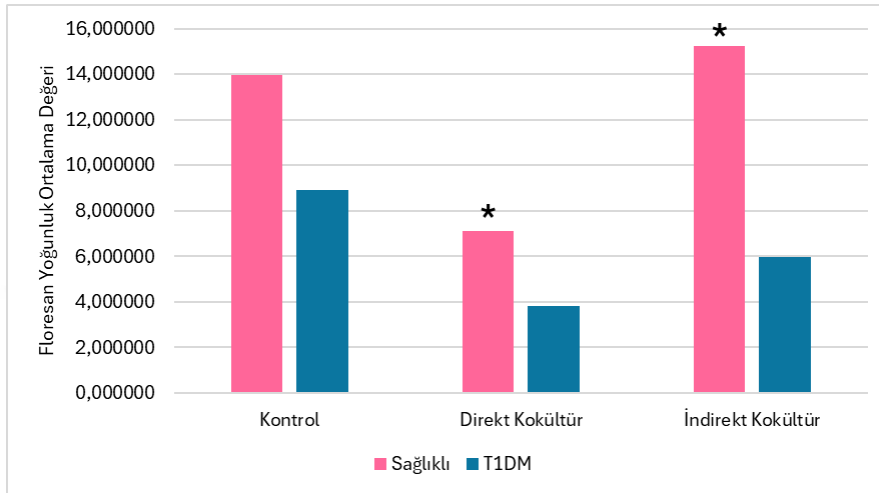
Düzenleyici T hücre belirteçlerinden biri olan CD4, sağlıklı ve T1DM gruplarından izole edilen hücre popülasyonlarının pozitifliğini göstermek amacıyla immünfloresan boyama gerçekleştirilmiştir. Sağlıklı grubun CD4 belirtecine ait fotomikrografında (Resim 4. 2) kontrol ve indirekt kültür kuyusunda Treg hücrelerinin yüzeylerinde kırmızı renkte floresan ışımaya yaparken, sferikal şekilli nükleusları DAPI

boyaması ile mavi renkte görülmektedir. Direkt kültür kuyusunda MKH ile bir arada bulunan Tregler yüzeylerinde CD4 varlığına bağlı olarak kırmızı renkte görülürken, büyük ve oval şekilli nükleusa sahip MKH'lar CD4 negatif hücreler olması sebebiyle herhangi bir ışığa göstermemiştir.



Resim 4. 3: T1DM grubundan 7 nolu hastanın CD4 belirtecine ait fotomikrograflar. **A.** Kontrol kuyusu. **B.** Kontrol kuyusu aydınlık alan. **C.** Direkt kokültür kuyusu **D.** Direkt kokültür kuyusu aydınlık alan **E.** İndirekt kokültür kuyusu **F.** İndirekt kokültür kuyusu aydınlık alan. X40.

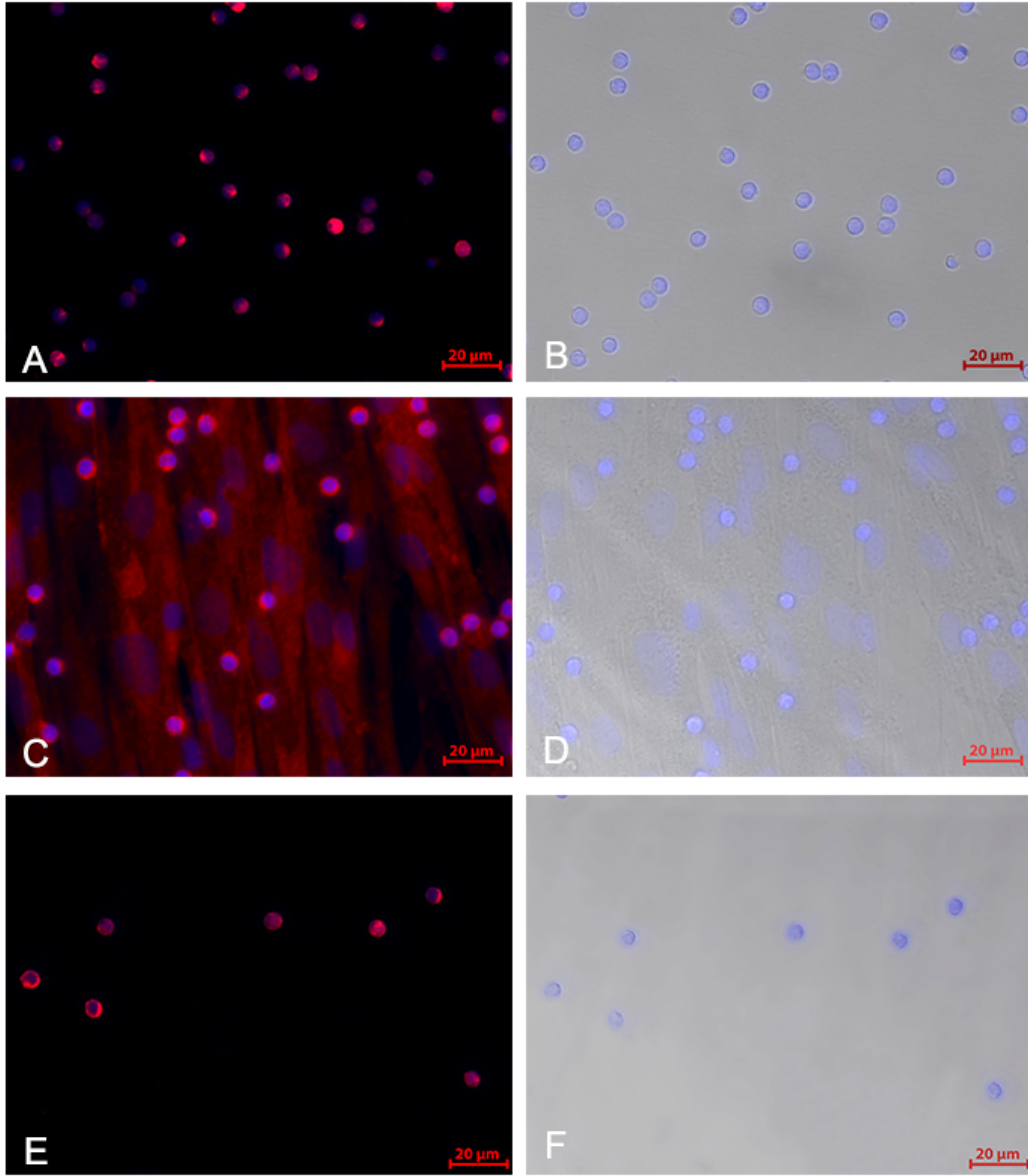
Tip 1 diyabetli gruba ait hücrelerin CD4 pozitifliğini gösteren fotomikrografında (Resim 4. 3) kontrol, direkt ve indirekt kültür kuyularında Treg hücrelerinin yüzeylerinde CD4 protein ifadesine bağlı olarak görülen floresan ışımının daha soluk olduğu görülmektedir. Treg ve MKH'ların nükleusları parlak mavi olarak görülmektedir.



Şekil 4. 10: CD4 belirtecine ait floresan ışımaya yoğunluğu ortalama değerleri

Sağlıklı grupta indirekt, direkt kültür koşulları ve kontrol kuyusu arasında CD4 sentezi bakımından anlamlı farklılık görülmedi ($p=0,780$); ancak T1DM grubunda indirekt, direkt kültür koşulları ve kontrol kuyusu arasında CD4 sentezi bakımından anlamlı farklılık mevcuttu ($p=0,009$). Bu farklılık kontrol kuyusu ortalamasının ($\text{mean}=8,931$) direkt kültür koşullarından ve indirekt kültür koşullarından anlamlı olarak yüksek olduğu bulundu ($p=0,019$, $p=0,028$). Sağlıklı grupta direkt ve indirekt kültür koşullarında CD4 sentezi ortalaması ($\text{mean}=7,129$, $\text{mean}=15,214$) T1DM grubuna kıyasla anlamlı şekilde yüksekti ($p=0,022$, $p=0,049$). Sağlıklı grupta kontrol kuyusunda CD4 sentezi yönünden T1DM grubuna kıyasla anlamlı fark bulunamadı ($p=0,117$) (Şekil 4. 10).

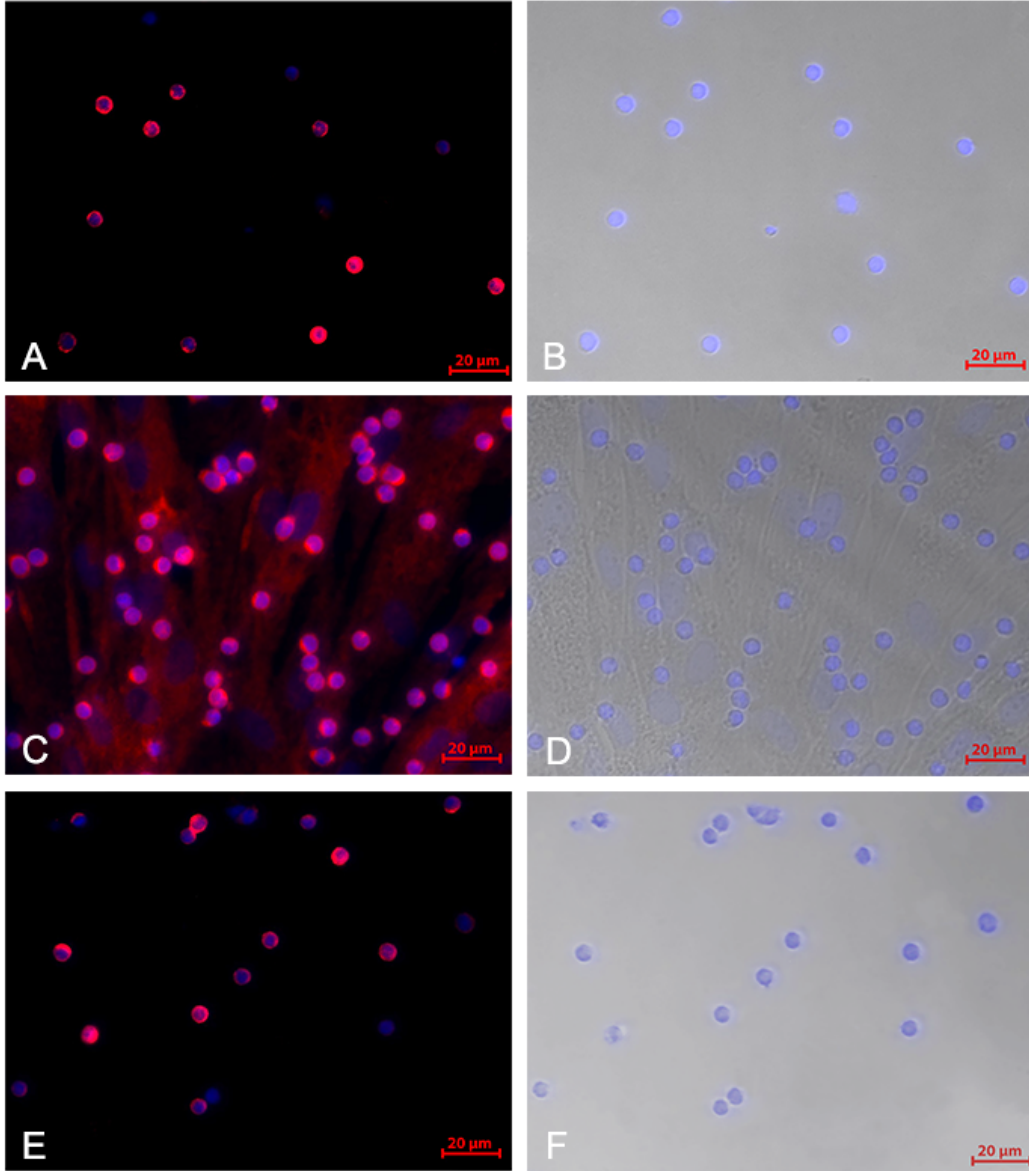
Mezenkimal kök hücreler tarafından sentezlenen ve Treg'lerin CD25 yüzey reseptörüne bağlanan IL-2'nin sağlıklı grubun kontrol, direkt ve indirekt kültür kuyularında Treg'lerde yüksek ifadesi görülmüştür. Direkt kültür kuyusunda MKH sitoplazması içerisinde yüksek düzeyde IL-2 sentezine bağlı olarak hücrelerde yoğun kırmızı ışımaya gözlenmektedir (Resim 4. 4).



Resim 4. 4: Sağlıklı grubundan 1 nolu hastanın IL-2 belirtecine ait fotomikrograflar. **A.** Kontrol kuyusu. **B.** Kontrol kuyusu aydınlık alan. **C.** Direkt kokültür kuyusu **D.** Direkt kokültür kuyusu aydınlık alan **E.** İndirekt kokültür kuyusu **F.** İndirekt kokültür kuyusu aydınlık alan. X40.

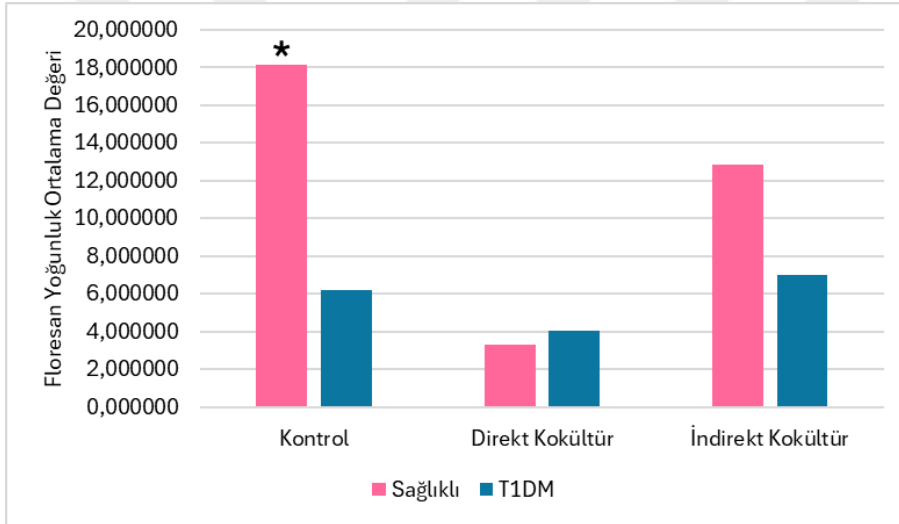
Tip 1 diyabet grubunun kontrol, direkt ve indirekt kültür kuyularında bulunan ya IL-2'nin yoğun varlığından dolayı çok parlak, ya da IL-2'nin düşük miktarlarda bağlanmasından dolayı oldukça soluk görünen heterojen Treg hücrelerden oluştuğu görülmektedir. Treg hücre nükleusları tüm gruplarda sferikal şekilli ve parlak mavi olarak karşımıza çıkmaktadır. Direkt kokültür kuyusunda bulunan MKH'ların ise,

sitoplazmalarında IL-2 sentezine bağı olarak kırmızı floresan ışıma verdiği ancak bu ışımanın sitoplazmanın bazı bölgelerinde gözlenmediği ve sağlıklı gruptan farklı olarak sitoplazmada karanlık alanlar bulunduğu gözlenmektedir (Resim 4. 5).



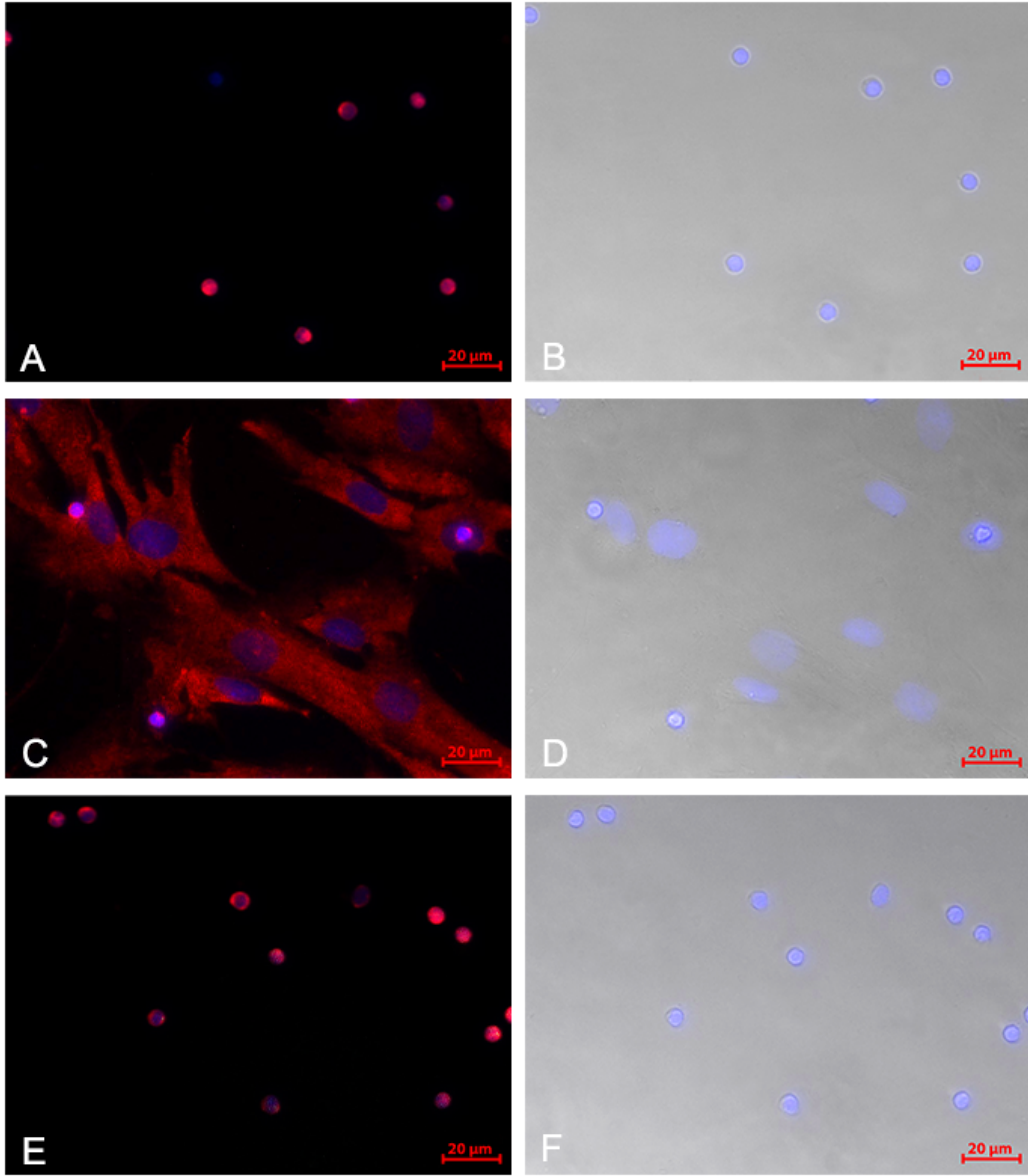
Resim 4. 5: T1DM grubundan 10 nolu hastanın IL-2 belirtecine ait fotomikrograflar. **A.** Kontrol kuyusu. **B.** Kontrol kuyusu aydınlık alan. **C.** Direkt kokültür kuyusu **D.** Direkt kokültür kuyusu aydınlık alan **E.** İndirekt kokültür kuyusu **F.** İndirekt kokültür kuyusu aydınlık alan. X40.

T1DM grubunda indirekt, direkt kültür koşulları ve kontrol kuyusu arasında IL-2 sentezi bakımından anlamlı farklılık görülmedi ($p=0,724$); ancak sağlıklı grubunda indirekt, direkt kültür koşulları ve kontrol kuyusu arasında IL-2 sentezi bakımından anlamlı farklılık mevcuttu ($p=0,027$). Bu farklılık kontrol kuyusu ortalamasının ($\text{mean}=18,174$) direkt kültür koşullarından, indirekt kültür koşulları ortalamasının ($\text{mean}=12,866$) direkt kültür koşullarından anlamlı olarak yüksek olduğu yönündeydi ($p<0,001$, $p=0,049$). Sağlıklı grupta kontrol kuyusunda IL-2 sentezi ortalaması ($\text{mean}=18,174$) T1DM grubuna kıyasla anlamlı şekilde yüksekti ($p<0,001$). Direkt ve indirekt kültür koşullarında IL-2 sentezi yönünden sağlıklı ve T1DM gruplara arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p=0,497$, $p=0,089$) (Şekil 4. 11).

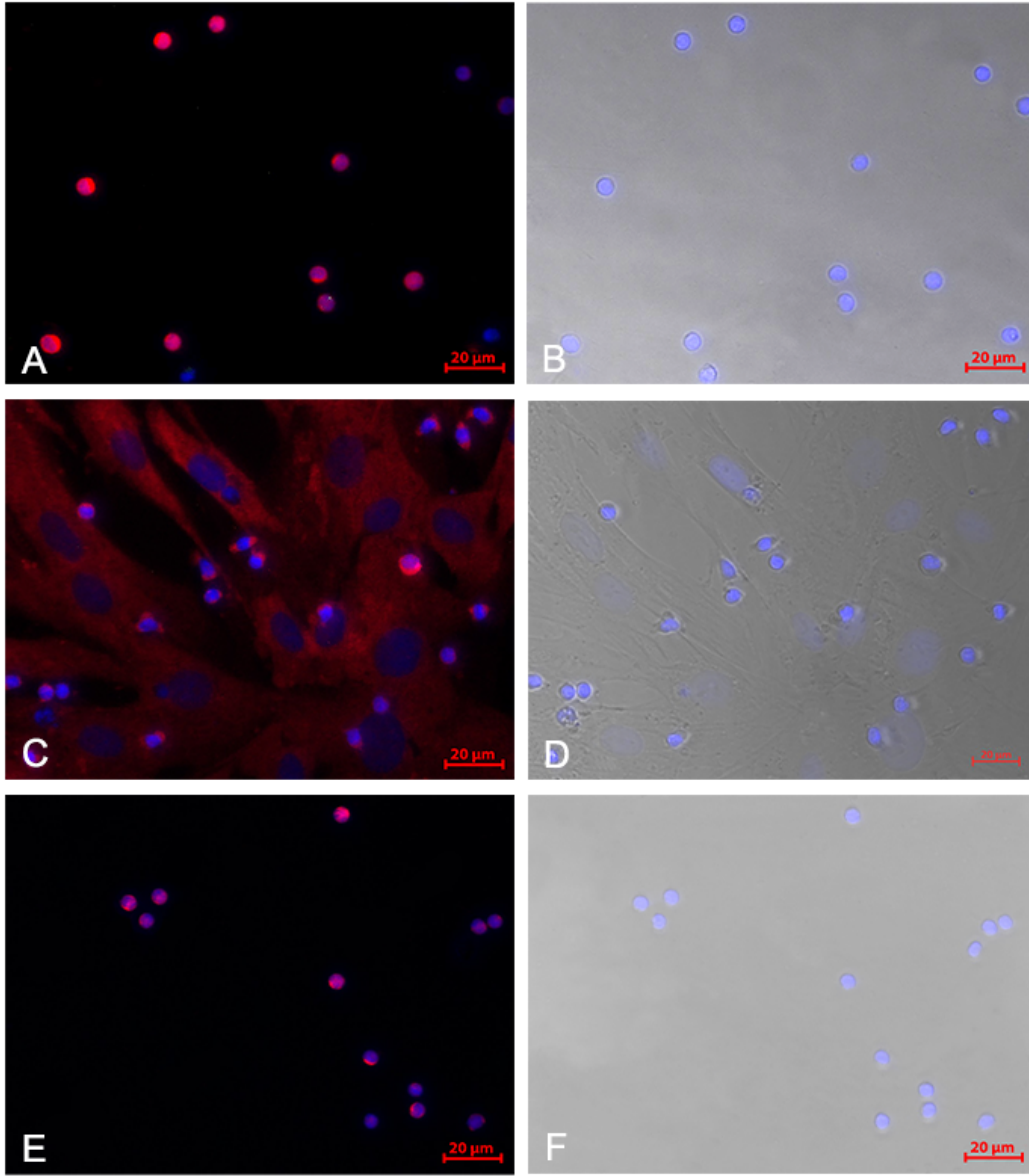


Şekil 4. 11: IL-2 belirtecine ait floresan ışımaya yoğunluğu ortalama değerleri

Proenflamatuvar sitokin olan TNF- α sentezinin sağlıklı (Resim 4.6) ve T1DM (Resim 4.7) grupları için mikroçevrelerindeki farkı ve MKH ile etkileşimin TNF- α sentezine etkisini gözlemlemek amacıyla immünfloresan boyama yapıldı. Sağlıklı grubun farklı kültür koşullarındaki Treg hücrelerinin TNF- α sentezine bağlı olarak yoğun ışımaya verdiği ve direkt kültür kuyusundaki MKH'lerin de sitoplazmalarında senteze bağlı yoğun ışımaya gözlenmiştir.



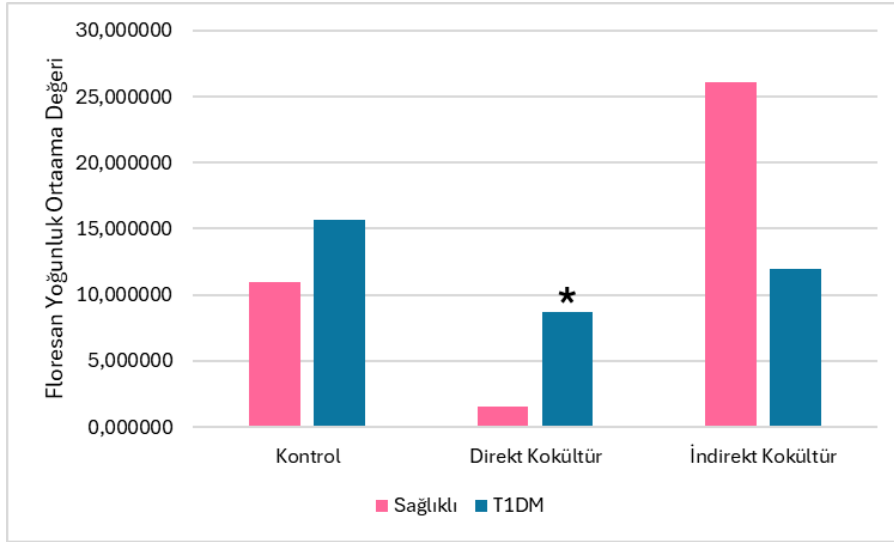
Resim 4. 6: Sağlıklı grubundan 5 nolu hastanın TNF- α belirtecine ait fotomikrograflar **A.** Kontrol kuyusu. **B.** Kontrol kuyusu aydınlık alan. **C.** Direkt kokültür kuyusu **D.** Direkt kokültür kuyusu aydınlık alan **E.** İndirekt kokültür kuyusu **F.** İndirekt kokültür kuyusu aydınlık alan. X40.



Resim 4. 7: T1DM grubundan 12 nolu hastanın TNF- α belirtecine ait fotomikrograflar. **A.** Kontrol kuyusu. **B.** Kontrol kuyusu aydınlık alan. **C.** Direkt kokültür kuyusu **D.** Direkt kokültür kuyusu aydınlık alan **E.** İndirekt kokültür kuyusu **F.** İndirekt kokültür kuyusu aydınlık alan. X40.

Sağlıklı ve T1DM gruplarının indirekt, direkt kültür koşulları ve kontrol kuyusu arasında TNF- α sentezi bakımından anlamlı farklılık görülmedi ($p=0,185$, $p=0,295$). Kontrol kuyusu ve indirekt kültür koşullarında TNF- α sentezi bakımından T1DM ve sağlıklı grupları arasında anlamlı fark görülmezken ($p=0,276$, $p=0,223$), direkt kültür

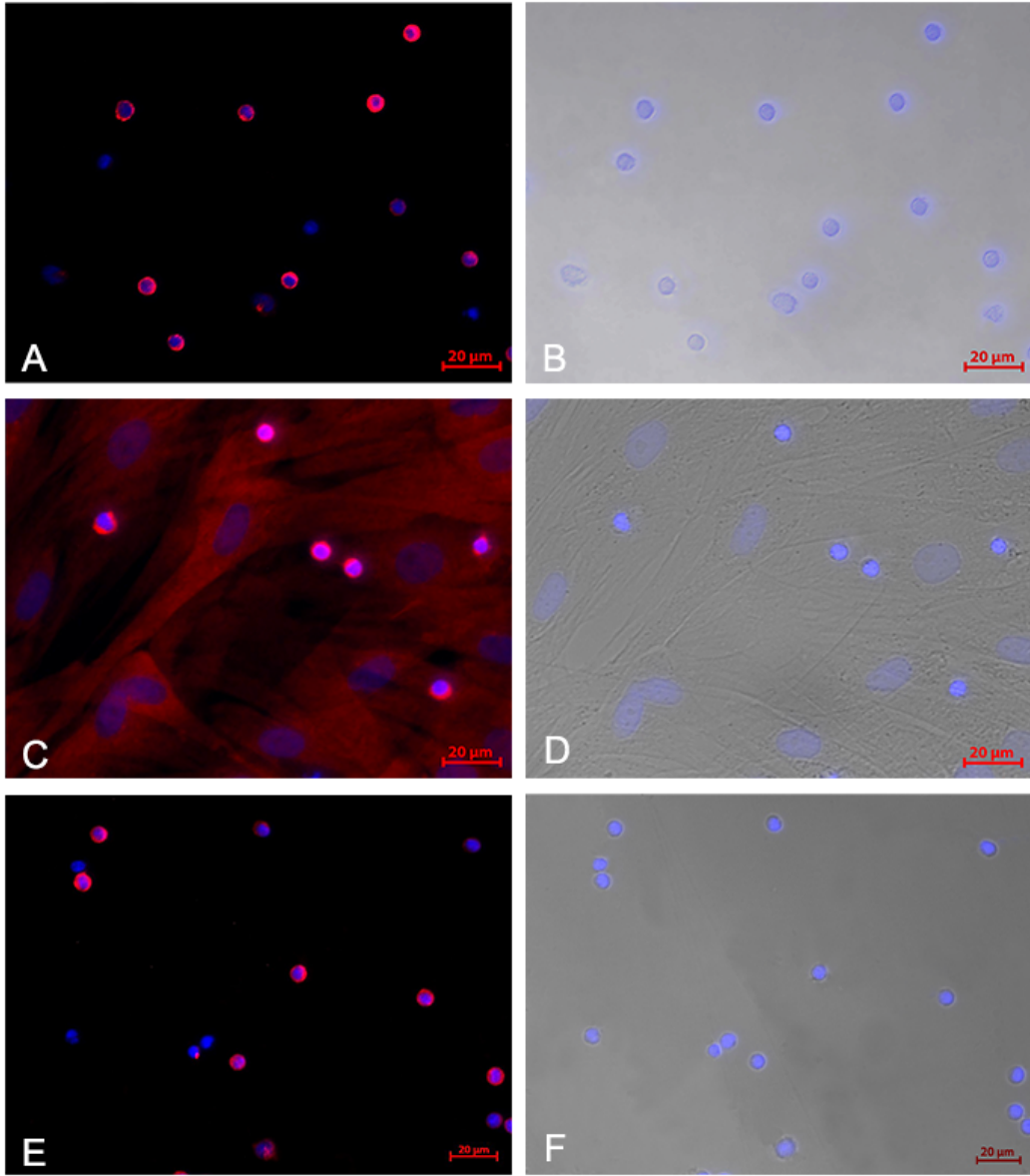
koşullarında T1DM grubu ortalaması (mean=8,70) sağlıklı gruba göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0,001$) (Şekil 4. 12).



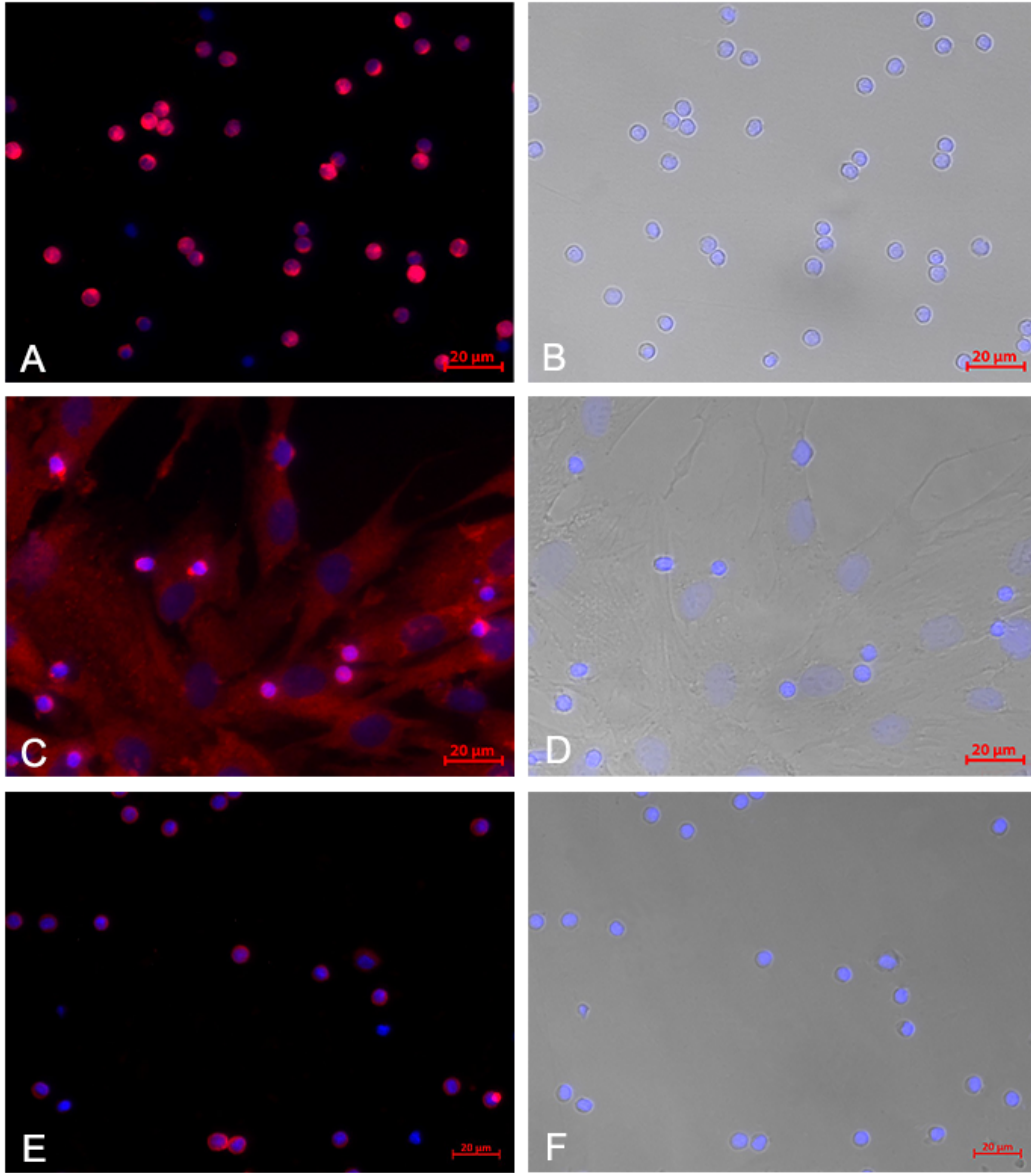
Şekil 4. 12: TNF- α belirtecine ait floresan ışıma yoğunluğu ortalama değerleri

Antienflamatuvar sitokin olan IL-10 sentezinin sağlıklı (Resim 4. 8) ve T1DM (Resim 4. 9) grupları arasındaki farkı ve MKH'ların Treg hücreleri üzerinde sitokin sentezine etkisini incelemek amacıyla IL-10 belirteci immünfloresan yöntemiyle boyandı. Hem sağlıklı hem T1DM gruplarına ait immünfloresan fotomikrograflarında farklı kültür koşullarında Treg hücrelerinde yüksek IL-10 varlığına bağlı olarak yoğun floresan ışıma gözlenirken, MKH'ların da sitoplazmalarında IL-10 sentezine bağlı olarak yoğun floresan ışıma görüldü.

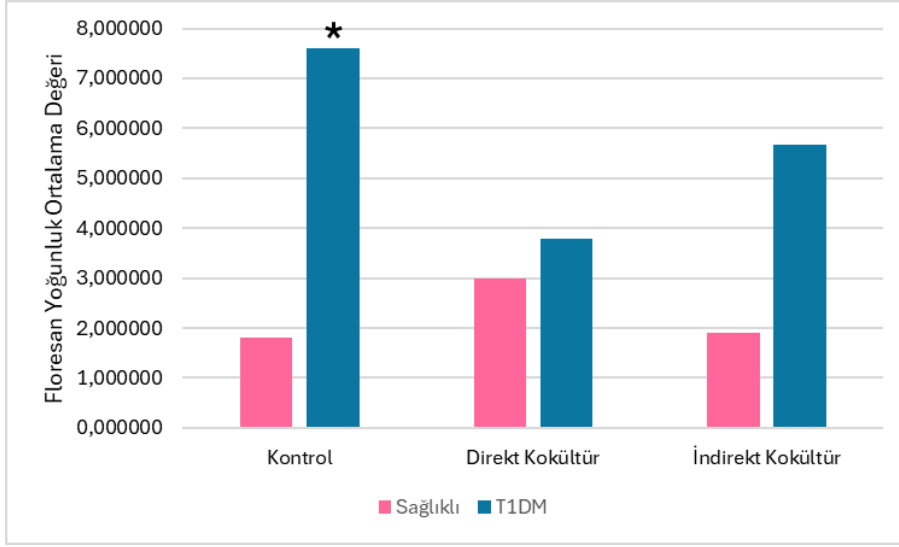
Sağlıklı ve T1DM gruplarının indirekt, direkt kültür koşulları ve kontrol kuyusu arasında IL-10 sentezi bakımından anlamlı farklılık görülmedi ($p=0,722$, $p=0,488$). Direkt ve indirekt kültür koşullarında IL-10 sentezi yönünden T1DM ve sağlıklı grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmezken ($p=0,295$, $p=0,082$), T1DM grubunda kontrol kuyusunda anlamlı bir artış gözlemlendi ($p=0,003$) (Şekil 4. 13).



Resim 4. 8: Sağlıklı grubundan 4 nolu hastanın IL-10 belirtecine ait fotomikrograflar. **A.** Kontrol kuyusu. **B.** Kontrol kuyusu aydınlık alan. **C.** Direkt kokültür kuyusu **D.** Direkt kokültür kuyusu aydınlık alan **E.** İndirekt kokültür kuyusu **F.** İndirekt kokültür kuyusu aydınlık alan. X40.

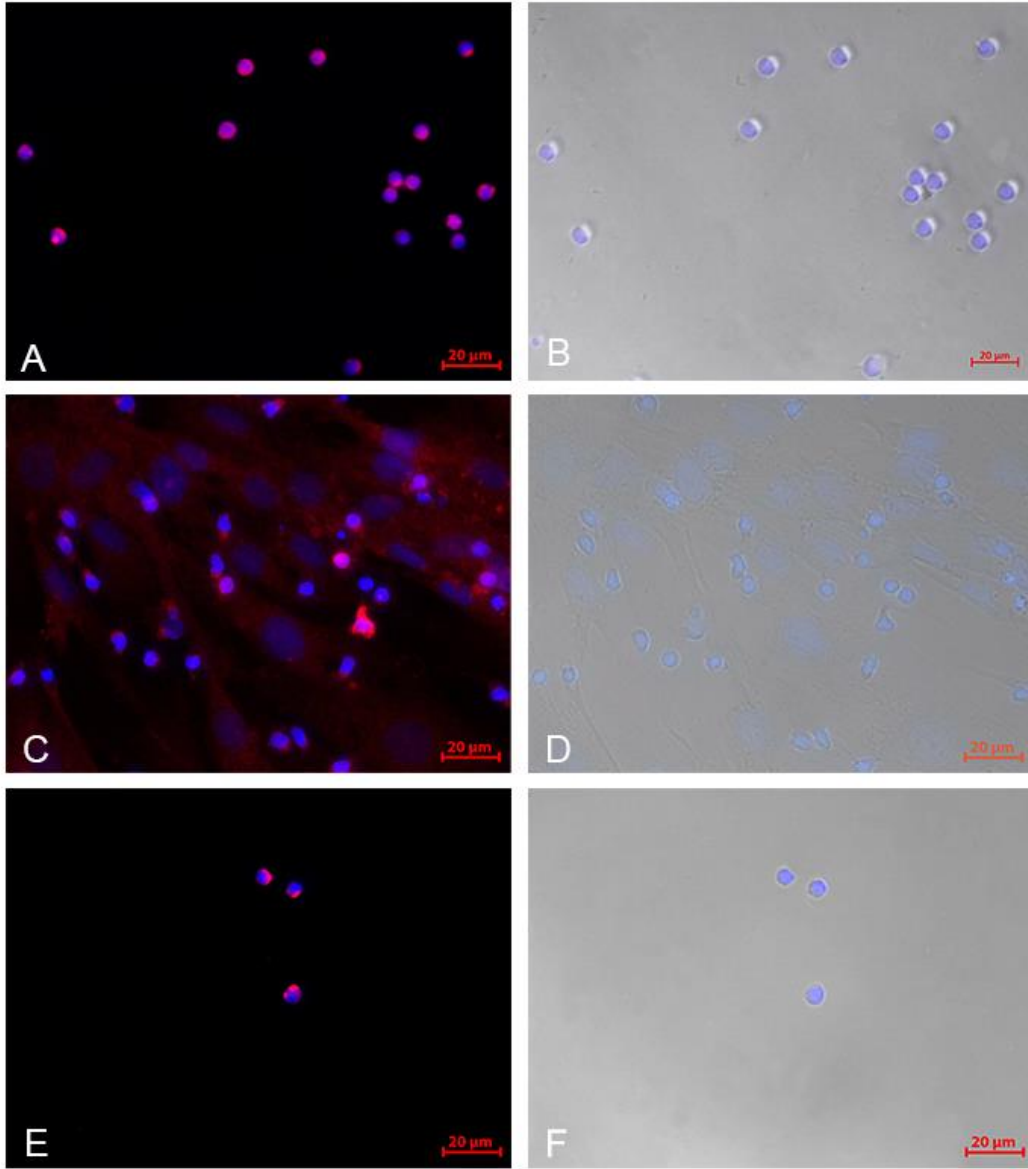


Resim 4. 9: T1DM grubundan 11 nolu hastanın IL-10 belirtecine ait fotomikrograflar. **A.** Kontrol kuyusu. **B.** Kontrol kuyusu aydınlık alan. **C.** Direkt kokültür kuyusu **D.** Direkt kokültür kuyusu aydınlık alan **E.** İndirekt kokültür kuyusu **F.** İndirekt kokültür kuyusu aydınlık alan. X40.

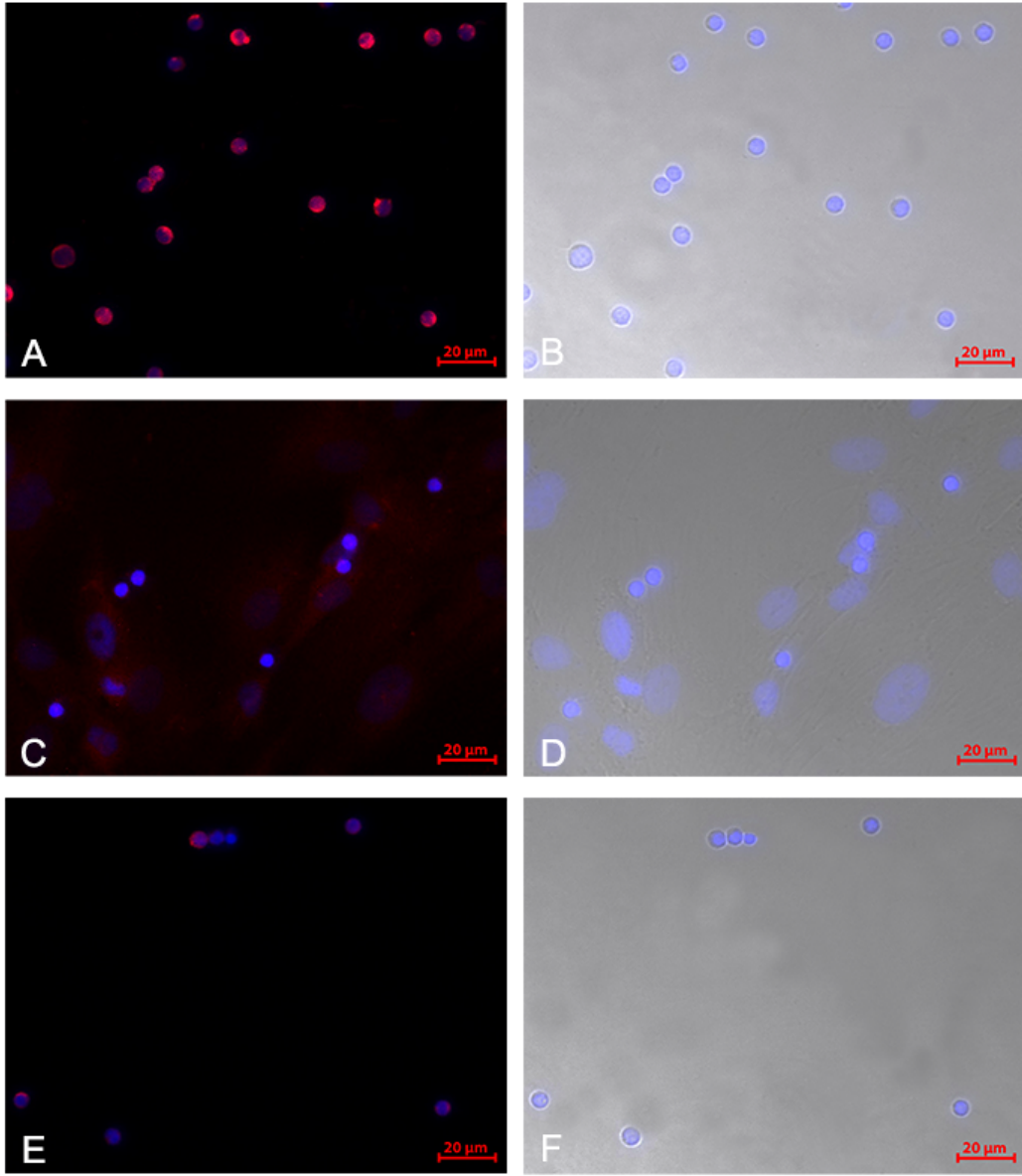


Şekil 4. 13: IL-10 belirtecine ait floresan ışıma yoğunluğu ortalama değerleri

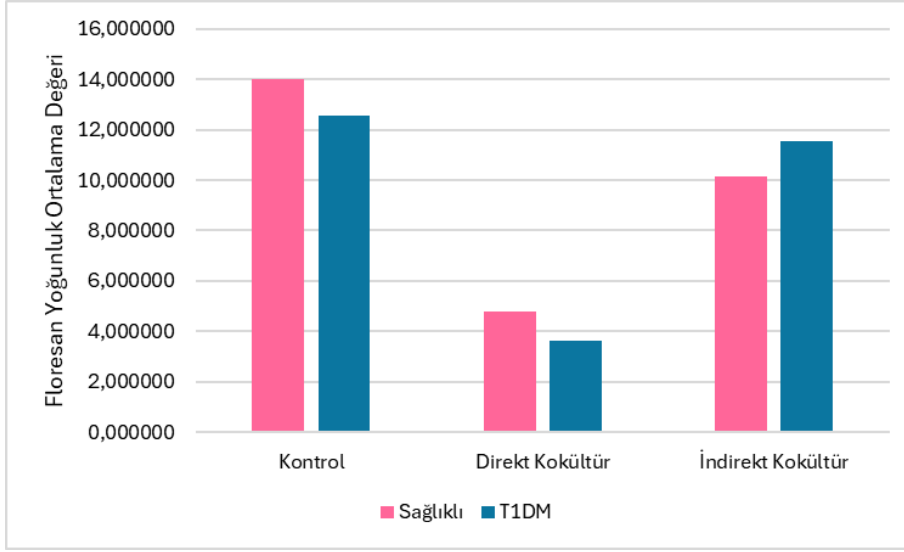
Mezenkimal kök hücrelerin Treg hücre sağkalımına etkisini incelemek için proapoptotik bir protein olan BCL-2 belirtecinin immünfloresan boyaması gerçekleştirildi. Hem sağlıklı (Resim 4.10) hem T1DM (Resim 4.11) gruplarına ait immünfloresan fotomikrograflarında kontrol kuyularında soluk ışıma veren BCL-2, direkt ve indirekt kuyularında bulunan Treg popülasyonlarında az sayıdaki hücrelerde ifade edildiği görüldü. Direkt kültür kuyusunda bulunan MKH'ların BCL-2 az miktarda varlığına bağlı olarak soluk floresan ışıma görüldü. Hem sağlıklı ve hem T1DM grubunda indirekt, direkt kültür koşulları ve kontrol kuyusu arasında BCL-2 sentezi bakımından anlamlı farklılık görülmedi ($p=0,112$, $p=0,710$). T1DM ve sağlıklı grupları arasında direkt ve indirekt kültür koşullarında ve kontrol kuyusunda BCL-2 sentezi yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ($p=0,409$, $p=0,613$, $p=0,619$) (Şekil 4. 14).



Resim 4. 10: Sağlıklı grubundan 6 nolu hastanın BCL-2 belirtecine ait fotomikrograflar. **A.** Kontrol kuyusu. **B.** Kontrol kuyusu aydınlık alan. **C.** Direkt kokültür kuyusu **D.** Direkt kokültür kuyusu aydınlık alan **E.** İndirekt kokültür kuyusu **F.** İndirekt kokültür kuyusu aydınlık alan. X40.



Resim 4. 11: T1DM grubundan 8 nolu hastanın BCL-2 belirtecine ait fotomikrograflar. **A.** Kontrol kuyusu. **B.** Kontrol kuyusu aydınlık alan. **C.** Direkt kokültür kuyusu **D.** Direkt kokültür kuyusu aydınlık alan **E.** İndirekt kokültür kuyusu **F.** İndirekt kokültür kuyusu aydınlık alan. X40.



Şekil 4. 14: BCL-2 belirtecine ait floresan ışıma yoğunluğu ortalama değerleri

Tablo 4. 4: İmmünfloresan fotomikrograf ölçümlerinin istatistiksel verileri

		Kontrol Kuyusu		Direkt Kuyusu		İndirekt Kuyusu	
		Ortalama ± SS	<i>p</i> *	Ortalama ± SS	<i>p</i> *	Ortalama ± SS	<i>p</i> *
CD4	Sağlıklı	13,97±6,36	0,117	7,12±2,79	0,022	15,21±8,92	0,049
	T1DM	8,931±3,34		3,84±0,96		5,96±4,78	
IL-2	Sağlıklı	18,17± 3,30	<0,001	3,27±2,08	0,497	12,86± 5,98	0,089
	T1DM	6,21± 1,40		4,06±1,78		6,98±4,74	
IL-10	Sağlıklı	1,81±0,36	0,003	2,98±1,44	0,295	1,89±0,40	0,082
	T1DM	7,59±3,61		3,78±,035		5,67±4,76	
BCL-2	Sağlıklı	14,02±5,17	0,619	4,76±3,21	0,409	10,13±3,63	0,613
	T1DM	12,54±4,77		3,60±0,70		11,54±5,48	
TNF-α	Sağlıklı	10,97±8,05	0,276	1,58±0,26	<0,001	26,04±25,67	0,223
	T1DM	15,64±5,78		8,70± 2,69		11,97±6,68	

5. TARTIŞMA

Otoimmün hastalıklar, otoantikörlerin varlığı, immün tolerans kaybı ve düzensiz immün sistem nedeniyle hedef organ hasarı yanı sıra işlev bozukluğuna yol açan kronik inflamatuvar reaksiyonlar ile karakterize edilir. (87). Otoimmün bir hastalık olan T1DM, ağırlıklı olarak T yardımcı 1 (Th1) hücrelerinin aktivasyonu ve pankreas adacıklarına infiltrasyonuna bağlı olarak pankretik β hücrelerinin yok edilmesiyle sonuçlanan ve hiperglisemiye neden olan bağışıklık sisteminin bozulmasından kaynaklanır (74,75). T1DM gelişiminde hem bağışıklık sistemi düzeyinde hem de hedef β hücreleri düzeyinde birtakım sitokinlerin genetik ve immünopatojenik çalışmalarla önemi ve, T1DM'nin patogenezi ile doğrudan ilişkilendirmiştir (6–8).

Yardımcı T hücreleri, adaptif immün yanıtın düzenleyicileridir ve inflamatuvar sitokinler tarafından aktive edilir (128). TH hücrelerin alt popülasyonlarından biri olan Treg hücreleri CD4⁺ T hücrelerinin %10'undan daha azını temsil eder, ancak immün homeostazın korunmasında vazgeçilmez bir işlev görür. CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ fenotipinde tanımlanan bu hücrelerin ana transkripsiyon faktörü olan FOXP3'ün yokluğunda Treg'ler gelişmediği ve FOXP3 geninde ortaya çıkan mutasyonların sistemik ölümcül otoimmün hastalıklara sebep olduğu insan ve hayvan çalışmalarında gösterilmiştir (36,129). Ayrıca otoimmün hastalıklarda gerçekleştirilen insan çalışmalarında periferik kandan izole edilen Treg hücrelerinin sayısında veya işlevinde kusurluluğun söz konusu olduğu ortaya konmuştur ve bu veriler in vivo hastalık modelleri ile desteklenmiştir (13,14).

MKH'lerin, yağ dokularından, kemik iliğinden, göbek kordonundan (Wharton Jelly, WJ), diş özünden, periodontal ligamentten, hatta pankreas adacıkları gibi farklı dokulardan izole edilebilmesi, belirli hücre tiplerine farklılaşma kapasiteleri, bol miktarda çözünür büyüme faktörleri ve sitokin üretim kapasiteleri ve hematopoez destekleyici özellikleri nedeniyle son zamanlarda rejeneratif tıp alanında büyük ilgi görmektedir (94,95). Ayrıca, MKH'lerin inflamasyon bölgelerine göç edebilmesi ve lenfositlerle arasındaki hücresel etkileşimler veya çözünür faktörlerin üretimi yoluyla güçlü immünomodülatör ve anti-inflamatuvar etkilere sahip olması MKH'lara otoimmün hastalıkların tedavisi için umut veren bir seçenek olarak ilginin artmasına sebep olmuştur (101).

Mezenkimal kök hücreler, lenfosit aktivasyonunu, proliferasyonunu ve farklılaşmasını değiştirebilir ve düzenleyici özelliklere sahip T hücreleri üretebilir. MKH immünomodülasyonunda Treg'lerin rolü tartışmalıdır. Birkaç çalışma, MKH'lerin Treg indüksiyonu yoluyla immün yanıtı dolaylı olarak modüle ettiğini öne sürerken, diğerleri MKH'lerin hiçbir rolü olmadığını öne sürmüştür. Genel olarak, MKH'ler tercihli olarak farklı düzenleyici fenotipleri barındıran T hücresi alt kümelerinin üretilmesine ve/veya genişlemesine neden olduğu öne sürülmüştür. Diğer bulgular, MKH'lerin CD4⁺ veya CD8⁺ lenfositlerden Treg oluşumunu indüklediğini ve bu Treg'lerin lenfositleri güçlü bir şekilde inhibe eden immün düzenleyici etkileri olduğunu göstermiştir (21).

Literatürde otoimmün hastalığı olan bireylerin Treg hücrelerinin MKH varlığında sayısının ve antiinflamatuvar sitokin sentezinin arttığının gösterildiği çalışmalar genellikle romatoid artrit ile ilgili olup, T1DM çalışmaları oldukça azdır. Klinik çalışmaların veritabanı olan 'ClinicalTrials.gov' adresinde ise T1DM tedavisi için regülatör T hücrelerinin kullanıldığı sınırlı sayıda erken faz çalışmaları bulunmasına rağmen, bu çalışmalarda kullanılan Treg'ler IL-2 ile kombine edilerek kullanılmıştır. MKH ve Treg etkileşimlerinin incelendiği mevcut çalışmalarda çoğunlukla kemik iliği kökenli MKH'lar tercih edilmiş olup, göbek kordonu kökenli MKH'ların T1DM hasta grubunda kullanıldığı çalışmalar oldukça sınırlıdır.

Bu çalışma T1DM hastalarından izole edilen Treg hücrelerinin WJ-MKH ile ko-kültüre edilerek, MKH'ın Treg proliferasyonu ve sitokin sentezi yönünden etkilerinin hem gruplar arasında hem de farklı kültür koşullarında değerlendirildiği ilk çalışmadır. Bu amaçla, T1DM hastaları ve sağlıklı bireylerden Treg hücreleri izole edilmiş ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen Treg hücreleri proliferasyon analizi için CFSE ile işaretlenerek WJ-MKH'lar ile 7 günlük direkt ve indirekt ko-kültürü gerçekleştirilmiştir. Sitokin profillerinin değerlendirilmesi için, WJ-MKH'lar ile indirekt ve direkt ko-kültürü gerçekleştirilen Tregler, kültür süresinin sonunda FOXP3, TGF- β , IL-4, ve IL-10 gen ekspresyon düzeyleri RT-PCR yöntemi ile ölçülmüş ve Ct değerleri analiz edilmiştir. Ayrıca kültür süresinin sonunda kültür plakalarında CD4, IL-2, IL-10 ve BCL2 belirteçleri için immünfloresan boyama gerçekleştirilmiş ve bu belirteçlerin floresan ışıma yoğunlukları ölçülmüştür. Elde edilen tüm veriler hem direkt ve indirekt kültür koşulları, hem de sağlıklı ve T1DM grupları arasında karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

T1DM, erken çocukluk döneminde insüline (IAA) veya GAD65'e (GADA) veya her ikisine karşı ilk β -hücre otoantikorunun ortaya çıkmasıyla karakterizedir ve nadiren, ilk adacık otoantikoru IA-2'ye (IA-2A) veya ZnT8'e (ZnT8A) yöneliktir (130,131). Bu otoantikorlardan bir veya daha fazlası, yeni teşhis konmuş T1DM'li kişilerin %95'inden fazlasında, T1DM klinik başlangıcından aylar veya yıllar önce tespit edilebilir. Dahası, ICA'ya (adacık hücre antikor) ek olarak dört β -hücre otoantikorunun tümünün tespiti %91'lik bir tanı duyarlılığı göstermektedir (132). Adacık otoantikorlarının oluşumu ve sayısının insülit ile ilişkilendirilmesine rağmen, yapılan bir çalışmada 25-60 yaş aralığındaki 1507 pankreas donörünün 62'sinde (%4) adacık otoantikorları tespit edilmiştir. Çalışmaya dahil olan 62 kişide HLA duyarlılığı da olmasına rağmen, bunlardan sadece ikisi insülit göstermiş ve adacık otoantikorlarının varlığının insülitin kesin bir belirteci olmadığı öne sürülmüştür (5). Ayrıca ulusal diyabet konsensus grubu tarafından yayınlanan T1DM tanı ve tedavi rehberine göre T1DM tanısı için hiçbir klinik özelliğin tek başına yeterli olmayacağı ve T1DM'li kişilerin %5-10'unda antikor bulunmadığından, antikor testlerinde negatif bir sonucun T1DM tanısını değiştirmeyeceği belirtilmiştir (76). Bu çalışmada yer alan T1DM grubundaki 6 hasta bireyin 5'inin tanı esnasında Anti-GAD, Anti-ICA, Anti-İnsülin belirteçlerinden en az bir tanesi pozitif sonuç vermişken, 12 nolu hastanın otoantikorlarının üçüde negatifti.

Tanı anında, GAD otoantikoru varlığı ve bununla korole azalmış c-peptid seviyeleri T1DM'li kişilerde sağlıklı kontrollere kıyasla β -hücre fonksiyonu azalmış olmasından kaynaklanır (133). Hassas c-peptid ölçümleri yapıldığında, tanısı uzun süreli olan T1DM'li kişilerin %30-80'inde insülin mikrosekresyonunun devam ettiği, bu nedenle endojen β -hücre miktarı ve fonksiyonu hastalık süresi uzadıkça azalsa da, bu düşüşün tüm β hücrelerinin tamamen kaybına kadar ilerlemediği öne sürülmüştür (134–137). Diyabet Kontrol ve Komplikasyonlar Çalışması'nın (DCCT) tarama aşaması, yetişkinlerin %48'inin tanıdan sonraki 5 yıl içinde önemli c-peptid seviyelerine sahip olduğunu ve %8'inin tanıdan 5-15 yıl sonra önemli c-peptid seviyelerine sahip olduğunu göstermiştir ve bunu retinopati, nefropati ve hipoglisemi gelişiminin azalmasıyla ilişkilendirilmiştir (138–140). Eksojen insüline çok az ihtiyaç duyularak veya hiç gerek duyulmayan tanı konulduktan sonraki bu dönem, balayı dönemi olarak adlandırılır (141). Çalışmada T1DM grubunda yer alan 1-27 yıllık tanı 6 bireyden 5'inin c-peptid seviyeleri 0,5 ng/mL'den küçük olup olup yalnızca 1 yıllık tanı 10 nolu hastanın c-

peptid seviyesi T1DM kriterlerinin üzerinde tespit edilmiş ve balayı döneminde olduğu yönünde nitelendirilmiştir.

Otoimmün hastalıkların Treg hücreleriyle bağlantısı FOXP3 geninde fonksiyon kaybına sebep olan mutasyonlarının sonucu ortaya çıkan immünodisregülasyon poliendokrinopati enteropati X'e bağlı sendrom (IPEX) ile ortaya konmuş ve benzer şekilde, işlevsel bir FOXP3 geninden yoksun scurfy fenotipinde farelerde şiddetli otoimmünitenin spontan gelişimine neden olduğu deneysel olarak gösterilmiştir (66,142,143). T1DM'li hastalarda yapılan Treg analizleri, pek çok araştırmacı tarafından işlevsel ve sayısal olarak kusurlu rapor edilirken (13,14,69) bazı araştırmacılar tarafından kabul görmemiştir (71,144,145). Bu tutarsız sonuçların insanlarda saf bir Treg popülasyonunun tanımlanması ve izole edilmesindeki zorluklardan kaynaklanıyor olabileceği ileri sürülmüştür. Bu nedenle, T1DM'de Treg alt tiplerinin dengesinde bir kayma veya sıklığında bir değişiklik olması öne sürülmüştür. Okubo ve diğerleri yakın zamanda aktive edilmiş FOXP3⁺ Treg sıklığının, T1DM'li bireylerde diyabetsiz kontrol bireyleriyle karşılaştırıldığında azaldığını göstermiştir (146).

Çalışmamızda izole edilen hücrelerin karakterizasyonu için flow sitometride ölçümleriyle elde edilen bulgular, T1DM'li bireylerin CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ hücre popülasyonlarının sağlıklı bireylere kıyasla anlamlı olarak düşük olduğunu göstermektedir. Bu sonuç, Okubo ve diğerlerinin FOXP3⁺ Treg hücrelerinin aktive edilmiş alt tiplerinin frekansındaki azalmayı bildiren çalışmalarıyla uyumlu olup, Treg fonksiyonlarındaki bozulmaların T1DM gelişim sürecinde etkin rol oynadığını düşündürmektedir. FOXP3'ün eksikliği, Treg hücrelerinin otoimmün yanıtı baskılama yetisini zayıflatarak T1DM patogenezinde rol alan temel unsurlarından biri olabilir. CD4⁺CD25⁺ hücrelerin istatistiksel olarak sağlıklı ve T1DM grupları arasında anlamlı farklılık göstermemesi, Treg popülasyonunun işlevselliğinde FOXP3'ün kilit rol oynadığını ve bu faktörün baskılayıcı işlevlerindeki eksikliklerin T1DM'nin gelişiminde önemli bir yer tuttuğunu göstermektedir.

Treglerin sayıca yetersiz olması da T1DM patogenezi ile ilişkilendirilmiş ve klinik kullanıma uygun hale getirilmesi için proliferatif kapasitelerinin geliştirilmesi üzerine çalışılmıştır. Literatürde Treg hücrelerinin in vitro koşullarda proliferasyonunu gösteren pek çok çalışma olmasına rağmen, bu çalışmalar genellikle Treglerin baskılayıcı aktivitesini ortaya koyan efektör T hücreler ve diğer lenfosit popülasyonlarıyla

etkileşimleri veya Fitohemaglütinin (PHA), siklosporin A, anti-CD3/anti-CD28 boncuklar gibi uyarılara tepkisi üzerine gerçekleştirilmiştir (125,127,147–150). Sağlıklı bireylerden izole edilen lenfositlerin farklı uyarılar karşısında proliferatif etkisinin incelendiği bir çalışmada, CD4⁺ ve CD8⁺ popülasyonlarının uyarımlı grupları arasında anlamlı düzeyde farklılıklar gözlenmiş; ancak uyarımsız kontrol gruplarında her iki popülasyonda da proliferasyon gözlenmemiştir (127). MKH'ların Treg hücre proliferasyonuna etkisini göstermek için yapılan bir hayvan çalışmasında BM-MKH'ların direkt kültür koşullarında Treg proliferasyonunu indoleamin 2,3-dioksijenaz (IDO) aracılığıyla artırdığı, özellikle hipoksi koşullarına maruz bırakılan MKH'ların indükleyici kapasitesinin daha da arttığı MTT metodu kullanılarak gösterilmiştir (151). AD-MKH'lar kullanılarak yapılan insan çalışmasında ise anti-CD3/CD28 boncuklarla uyarılmış lenfosit popülasyonlarına MKH eksosomlarının etkisi incelenmiş ve parakrin faktörler yoluyla Treg proliferasyonunu artırdığı öne sürülmüştür (152).

Azevedo ve ark, gelecekteki klinik deneyleri desteklemek için MKH'ların Treg hücrelerini *in vitro* olarak çoğaltma potansiyeli hakkında klinik öncesi bir araştırma yapmış, sağlıklı donörlerden alınan PBMC'leri BM-MKH'lar ile kültürlemiştir. 14 günlük ko-kültür sonrasında CD4⁺ CD25^{yüksek} FOXP3⁺ CD127^{düşük} Treg hücrelerinin sayılarında ve sıklığında bir artış olduğunu öne sürmüşlerdir. Ancak, bu artışın nTreglerin MKH'larla etkileşimi sonucu değil, saflaştırılmış CD4⁺ T hücrelerin Treg benzeri bir fenotipe dönüşmesi sonucu elde edildiğini vurgulamışlardır (150). Başka bir araştırmacı grubu, MKH'ların PBMC popülasyonunda CD4⁺ hücrelerin çoğalmasını baskılayabildiğini ancak, saflaştırılmış CD4 hücre popülasyonunda bu etkiyi gösterememiş olmasını PBMC içerisinde var olan IFN- γ üretebilen hücrelerle ilişkilendirmişlerdir (153). Daha da önemlisi, toplam CD4 T hücrelerinin veya CD25⁻ CD4 T hücrelerinin allojenik stimülasyonuyla indüklenen popülasyonda MSC'lerin baskılayıcı aktivitesinde önemli bir fark gözlenmediğini ortaya koymuşlardır (153).

Çalışmamızda, MKH ile gerçekleştirilen 7 günlük ko-kültürün, Treg proliferasyonu açısından sağlıklı ve T1DM grupları arasında anlamlı bir fark yaratmadığı gözlenmiştir. Ayrıca kontrol, direkt ve indirekt kültür koşulları arasında da anlamlı bir fark bulunmamıştır. Literatürde MKH'ların Treg proliferasyonu arttığını öne süren çalışmalarda kullanılan MTT metodu, hücrelerin genel metabolik aktivitesini ölçmekle birlikte, proliferasyonu doğrudan takip etmez ve hücre canlılığını dolaylı olarak

değerlendirmektedir. Bu çalışmada proliferasyon analizinde CFSE kullanılarak yapılan ölçümler, hücrelerin kaç defa bölündüğünü doğrudan izlemeye olanak tanımıştır ve elde edilen sonuçlara göre, proliferasyonda anlamlı bir artış gözlenmemesi, MKH'ların uyaran olmadan Treg proliferasyonunu indükleme yeteneğinin sınırlı olabileceğini düşündürmektedir.

Mezenkimal kök hücre tedavilerine ilişkin çok sayıda prelinik çalışmanın yanı sıra sınırlı sayıda insan klinik denemeleri, yalnızca umut verici güvenlik ve etkinlik profilleri göstermekle kalmamış, aynı zamanda Treg sıklığı ve işlevinde değişiklikler de ortaya koymuştur (22). MKH'ların insan ve deney hayvanı türlerinde gerçekleştirilen *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar çok çeşitli olup, MKH'ların Treg üzerindeki etkileriyle ilgili oldukça çelişkili sonuçlar literatürde yer almaktadır. Bunun sebebinin, çalışmalarda kullanılan MKH'ların farklı kökenlere sahip olması, immün sistemin karmaşıklığı ve metodolojideki çeşitlilik olduğu düşünülmektedir.

Farklı kaynaklardan elde edilen MKH'lerin aynı temel özellikleri paylaşmasına rağmen detaylarda farklılık gösterdiği bilinmektedir. Örneğin, WJ-MKH'lar, AD-MKH'lardan önemli ölçüde daha fazla TGF- β , hem AD-MKH hem de BM-MKH'lardan önemli ölçüde daha az VEGF salgıladığı gösterilmiştir. Çalışmalar, TGF- β 'nın, Treg gelişimi ve farklılaşması için kritik öneme sahip olduğunu ortaya koymuştur ve bazı deneyler, TGF- β 'nın mikroçevrede aşırı derecede eksprese edilmesi durumunda FOXP3 ekspresyonunu ve iTreg hücre farklılaşmasını uyarabileceğini göstermiştir (154). Başka bir çalışma ise, TGF- β 'nın Treg hücrelerini çevreleri hakkında eğitmede ve bu ortamdaki tepkileri düzenlemek için uygun şekilde donatılmalarını sağlamada hayati bir rolü olduğunu öne sürmüştür (155). Ayrıca, çalışmalar WJ-MKH'ların tip 1 makrofajdan (M1) üretilen kemotaktik sinyallere BM-MKH'lardan çok daha duyarlı olduğunu göstermektedir. BM-MKH, AD-MKH ve WJ-MKH'ın lenfositler üzerine etkisinin karşılaştırmalı incelendiği bir çalışmada PBMC popülasyonunda Treg hücrelerinin sağkalımının WJ-MKH'larda kültürlenmiş grupta BM-MKH'lardan veya AT-MKH'lardan çok daha yüksek ortaya kondu (156). Bu sonuçlar hem BM-MKH'lerin hem de WJ-MKH'ların, immünomodülatör tedavinin temeli olabilecek makrofajlarla karşılıklı etkileşime girme yeteneğine sahip olmasına rağmen, WJ-MKH'ların immünomodülasyon açısından gelecekteki klinik çalışmalar için daha iyi bir aday olabileceğini göstermektedir (157).

WJ-MKH'ların önemli bir avantajı ise diğer doku kaynaklarından izole edilen MKH'lara kıyasla daha ilkel dolayısıyla potensinin yüksek olmasıdır. Ayrıca, WJ-MKH'nin eldesi esnasında, donör için olası bir riske sebep olabilecek herhangi bir invaziv prosedür kullanılmamaktadır. WJ-MKH'lar daha yüksek proliferatif kapasiteleri, daha düşük immünojenisiteleri ve çözünür tolerojenik faktörlerin daha güçlü üretimi nedeniyle immünomodülasyon için üstün potansiyele sahip hücreler olarak kabul edilmektedir (158).

Vasilev ve ark., AD-MKH tarafından üretilen salgı faktörlerinin Th17 ve Treg alt gruplarında immün düzenleyici etkilerini değerlendirdikleri çalışmada, otoimmün bir hastalık olan romatoid artrit (RA) sahip bireylerin PBMC'lerini AD-MKH ile şartlandırılmış ortamda (AD-MKHcm) ve kontrol ortamında kültürlemiştir. AD-MKHcm içeriğinde IL-6, IL-17A, IL-21 CCL2, CCL5, IL-8, VEGF-A ve PGE2 varlığı ELISA yöntemi ile gösterilmiştir. AD-MKHcm ile muamele edilen RA PBMC'lerinin kontrol ortamına kıyasla TGF- β 1 salgısında artış söz konusuysa, TNF- α , IL-17A ve IL-21 sentez seviyeleri kontrol PBMC'ye kıyasla azaldığını göstermişlerdir. Ayrıca kontrol PBMC içinde flow sitometri ile yüzdesi belirlenen CD4⁺FOXP3⁺, CD4⁺CD25⁻FOXP3⁺ ve CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ hücre popülasyonlarının AD-MKHcm muamele edilen kontrol gruplarında artış gösterdiği ortaya konmuştur (123).

Çalışmamızda bu bulgularla uyumlu olarak WJ-MKH ile direkt ko-kültüre edilmiş T1DM ve sağlıklı gruplarında TGF- β gen ekspresyon düzeyinde anlamlı bir artış gözlemledik. Bununla korole olarak T1DM grubunun direkt ko-kültür kuyusunda FOXP3 mRNA seviyesinde anlamlı artış mevcuttu. TGF- β , immün regülasyonda özellikle Treg hücrelerinin farklılaşmasında önemli bir rol oynayan kritik bir sitokindir ancak FOXP3⁺ iTreglerde spesifik demetile edilmiş bölgenin eksik demetilasyonundan dolayı TGF- β sentezinin stabil olmadığı ve hassas mekanizmalarla kontrol edildiği öne sürülmüştür (35,62,159,160). Çalışmamızda elde edilen verilerde, TGF- β ekspresyonunun direkt kültür koşullarında daha yüksek olması, literatürde TGF- β 'nin FOXP3 ekspresyonunu indükleyerek Treg gelişimini desteklediğini gösteren bulgularla örtüşmektedir. Bu sentez artışının hem T1DM hem sağlıklı grupta yalnızca direkt kültür kuyularında gözlenmesi dikkat çekiciydi ve MKH'ların direkt temasta TGF- β sentezinin hassas süreçlerini daha kontrollü indükleyebileceğini düşündürdü. Hücre-hücre temas bağımlı mekanizmaların *in vitro* ve *in vivo* koşullar altında MKH'lar ve Treg arasındaki etkileşimlerinde kritik

olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. English ve ark., insan MKH'ları ve saflaştırılmış CD4⁺ T hücreleri arasındaki yarı geçirgen bir zarla gerçekleştirilen dolaylı temasın, direkt temasa dayalı deneylere kıyasla FOXP3 mRNA ekspresyonunu kontrol seviyelerine düşürmesini göstererek direkt kültür koşullarının Treg'in indüksiyonu için önemli olduğuna dair ilk *in vitro* kanıtı sağlamıştır (119).

TGF- β 'nin artmış mRNA düzeylerinin tespit edildiği T1DM grubunda FOXP3 ile korolesyon gösterirken, sağlıklı grupta TGF- β artışı gözlenmesine rağmen FOXP3 mRNA düzeyinde tespit edilememiş ve dikkat çekici olarak IL-4 gen ekspresyon seviyelerinde artış gözlenmiştir.

Pedrosa ve ark. ise, romatoid arthrid (RA) hastalarından elde edilen periferik kan mononükleer hücrelerini forbol miristat asetat (PMA) ve iyonomisin ile stimüle ederek, insan BM-MKH ile kültürlemiştir. BM-MKH'ların T hücreleri tarafından üretilen immünoşüpresif moleküllere etkisinin mRNA düzeyinde etkisini incelemek için, uyarılmış PBMC'den izole edilen CD4⁺ Treg hücreleri, Treg uzaklaştırılmış CD4⁺ T hücreleri ve CD8⁺ T hücrelerini BM-MKH'ların varlığında/yokluğunda kültürlemişler ve mRNA düzeyinde CD4⁺ ve CD8⁺ T hücreleri tarafından IL-10 ve TGF- β ekspresyonunun RA ve sağlıklı gruplarında, CD4⁺ T hücreleri tarafından IL-4 ekspresyonunun sağlıklı grubunda arttırdığını ortaya koymuşlardır. Ancak Treg hücre popülasyonunda mRNA düzeyinde değerlendirilen moleküllerin hiçbirinde değişiklik gözlemlememişlerdir (124).

Dardalhon ve ark. ise, TH2-farklılaştırıcı bir sitokin olan IL-4'ün, TGF- β ile indüklenen FOXP3 ekspresyonunu inhibe ettiğini ve böylece yeni nesil FOXP3⁺ Treg hücrelerini baskıladığını göstermişlerdir (161). Farklı bir araştırmacı grubu ise kültür ortamına eklenen ekzojen IFN- γ veya IL-4'ün TGF- β 'nin FOXP3 ekspresyonunu indüklemeye yeteneğini azalttığı ve bu sitokinlerin nötralizasyonu sağlandığında TGF- β 'nin, FOXP3'ü indüklemeye ve baskılayıcı aktiviteyi geliştirme yeteneğini önemli ölçüde artırdığını ortaya koymuştur (162).

Literatüdeki bulgularla uyumlu olarak elde ettiğimiz sonuçlar, sağlıklı grubun direkt kuyusunda TGF- β artışı olmasına rağmen, IL-4'ün varlığında dolayı Treglerin gelişimini baskılayıp, Th2 hücre yanıtını teşvik etmiş olabileceğini gösteriyor olabilir. Sağlıklı grupta TGF- β ve IL-4'ün birlikte varlığı, FOXP3 indüksiyonunu sınırlandırıyor olabileceğini düşündürmektedir. Bu durum, sağlıklı grupta TGF- β artışına rağmen FOXP3 artışının gözlenmemesini açıklayabilir.

Çalışmamızda, sağlıklı grubun direkt kültür kuyusunda gözlenen artmış IL4 gen ekspresyonu T1DM grubunda anlamlı bulunamamıştır. Bu durumun T1DM ve sağlıklı bireylerin bağışıklık mikroçevrelerinin farklı olmasıyla ilişkili olduğunu düşünmekteyiz. T1DM'de artan enflamasyon ve immün düzensizlikler nedeniyle TGF- β daha güçlü bir FOXP3 indüksiyonuna yol açabilirken, sağlıklı bireylerde daha stabil bir immün mikroçevre olduğu için TGF- β 'nin FOXP3 üzerindeki etkisinin sınırlı olabileceği ve IL-4'ün varlığının bu dengeyi daha da değiştirebileceğini düşünmekteyiz.

Yapılan çalışmada FOXP3⁺ Treg'lerin ortak bir fenotipe sahip hücre popülasyonu olmadığı, aksine farklı olgunlaşma, farklılaşma ve aktivasyon durumlarını yansıtan veya farklı baskılama yöntemleri veya hedefleri kullanan hücresel fenotipik alt tiplerin heterojen bir karışımı olduğu öne sürülmüştür (163,164). Literatürde FOXP3'ün hem nTreg hücreleri hem de aktive edilmiş T hücrelerinde geçici olarak ifade edilebildiği ortaya konmuştur. Aktivasyon sırasında CD4⁺CD25⁻ T hücrelerinin FOXP3 ekspresyonu kazanabileceği, ancak FOXP3'ün geçici ifadesinin hücrelere baskılayıcı işlevsellik kazandırmayacağı ortaya konmuştur (33). Bu durum, özellikle diyabet gibi otoimmün hastalıklarda Treg hücrelerinin plastisitesine, dolayısıyla proinflamatuvar fenotip kazanma yeteneklerine işaret eder. Yapılan çalışmalarda, Treg popülasyonlarında FOXP3 ekspresyonunu koruyan ancak baskılayıcı fonksiyonlarını kaybeden hücreler gözlemlendiği belirtilmiştir. Bu hücreler TNF- α gibi sitokinler salgılayarak bağışıklık tepkisini daha da artırmaya yatkınlık gösterebilir (165). FOXP3 pozitifliğinin yüksek olmasının, her zaman baskılayıcı fonksiyonu koruyacağını garanti etmediği, Treg-soy izleme sistemi kullanarak yapılan bir çalışmada, daha önce FOXP3 ifade eden hücrelerin, yani exFOXP3 hücrelerini, efektör benzeri özellikler kazandığını ve otoimmüniteyi ortaya çıkarabildiği gösterilmiştir (33,166). Ayrıca, FOXP3'ün stabilitesinin proinflamatuvar ortamda zayıflayabildiği, bunun sonucunda Treg hücrelerinin baskılayıcı kapasitelerini kaybederek proinflamatuvar sitokinler üretmelerine yol açabileceği öne sürülmüştür (165,167). Treg popülasyonunda soy dengesizliği olarak tanımlanan bu durum özellikle diyabet gibi kronik inflamatuvar hastalıklarda Treg hücrelerinin fonksiyonlarının bozulması ve proinflamatuvar bir fenotip kazanarak TNF- α gibi proinflamatuvar sitokin sentezi ile bağışıklık tepkisini daha da arttırmasıyla sonuçlanabileceği rapor edilmiştir (165,168). Son zamanlarda, MKH'ların immünosüpresif fonksiyonlarının, bol miktarda inflamatuvar faktörün bağışıklık hücrelerinden salındığı mikroçevre tarafından tetiklendiğine dair kanıtlar artmaktadır

(169,170). Bunun yanı sıra MKH'ların düşük proinflatuvar mikroçevrelerde MKH'ların bağışıklık tepkilerini önemli ölçüde destekleyebileceğini rapor eden çalışmalar mevcuttur (102).

Çalışmamızda elde edilen immünfloresan bulgularına göre TNF- α düzeylerinin T1DM grubunun direkt kültür kuyusunda sağlıklı grubuna kıyasla anlamlı olarak artmış olduğu gözlemlenmiştir. FOXP3⁺ Treg indüksiyonunun TGF- β ile gerçekleştiği düşünülen bu kuyuda Treglerin literatürde bahsedilen otoimmüniteye bağlı yüksek plastisitesi sebebiyle proinflatuvar özellik kazanarak sağlıklı gruba kıyasla yüksek TNF- α sentezi gerçekleştiğini düşünmekteyiz. Bu durum, TNF- α gibi proinflatuvar sitokinlerin FOXP3 ve TGF- β yüksekliğine rağmen artış göstermesiyle çelişkili görünebilir. Ancak, literatürde TGF- β 'nin insan T hücrelerinde dual rolünün olduğu, T hücresi farklılaşma durumuna ve uyarım koşullarına bağlı olarak uyarıcı veya engelleyici etkilere sebep olabileceği pek çok araştırmacı tarafından öne sürülmüştür (171). Yanı sıra, literatürde Treg hücrelerinin proinflatuvar sitokinlerle birlikte çalışarak inflamasyonu sınırlandırdığı ve etkili bağışıklık düzenlenmesini sağladığına dair bulgular da vardır (28).

Öte yandan, TNF- α 'nın yüksek olduğu durumlarda FOXP3 ve TGF- β 'nin da yüksek olması, proinflatuvar bir yanıtın bağışıklık sisteminin baskılanmasıyla dengelendiğini düşündürebilir. Yani TNF- α ve TGF- β 'nin birlikte artış göstermesi hem inflamasyonu tetikleyen hem de bu inflamasyonu baskılamaya çalışan bir denge süreci olabilir. Bu tarz etkileşimler, MKH'ların bağışıklık sisteminde hem proinflatuvar hem de antiinflatuvar yolları etkileyebildiğini gösteren literatür bilgisiyle uyumludur (172).

Güncel çalışmalarda artan kanıtlara göre, MKH'ların sentez ürünlerinin direkt etkisi yerine, T hücresi, B hücresi, antijen sunan hücreler ve NK hücre aracılı bağışıklık yanıtları ile dolaylı olarak immünmodülasyonu gerçekleştirebileceği yönündeki ortak görüş artmaktadır (21). Bu doğrultuda, TGF- β 'nin T hücresi tepkilerini, Teff veya Treg hücrelerini indüklemek baskılayabileceği öne sürülmüştür (173,174).

Antiinflatuvar bir sitokin olarak bilinen IL-10'un, pankreastaki lokal sekresyonunun T1DM başlangıç sürecinden patogenezi destekleyerek süreci hızlandırabildiği ortaya konmuştur. Bu paradoksal etkiler, IL-10'un hem immünosüpresif hem de uyarıcı roller oynadığını ortaya koymaktadır (175).

İnsan dental pulpa kökenli MKH'ların (hDP-MKH) parakrin faktörler yoluyla CD4⁺ T yardımcı hücre alt kümelerindeki etkilerini araştıran çalışmada ko-kültür

gruplarında IL-10 ve TGF- β 1 artışı rapor edilmiştir (176). MKH'ların ve T hücrelerinin ko-kültürü sırasında, TGF- β , IL-2, ve IL 1 β 'nin salgı seviyelerinde gerçekleşen artışı Treg fonksiyonu ile ilişkilendiren çalışmaların yanı sıra (21), IL-10, TGF- β ve PGE2 gibi çözünür faktörlerin Treg oluşumunda veya bunların immün düzenleyici işlevinde rol oynamadığını öne süren çalışmalar da mevcuttur (177).

Çalışmamızda, T1DM grubunun direkt kültür kuyusunda gözlemlenen proinflamatuvar mikroçevrenin aksine indirekt kültür kuyusunda antiinflamatuvar mikroçevrenin varlığını ortaya koyan sağlıklı grubun indirekt kültür koşullarına kıyasla anlamlı yüksek IL-10 mRNA seviyeleri tespit edilmiştir. İmmünfloresan verilerimizde bu mRNA ekspresyonun protein ifadesi olarak IL-10'un T1DM grubunda sağlıklı gruba oranla anlamlı olarak yüksek tespit edilmiştir. mRNA düzeyindeki anlamlılık indirekt grupları arasında gözlenirken protein seviyesindeki anlamlılık kontrol kuyuları arasında gözlenmiştir. Bu farklılığı değerlendirken PCR sonuçlarının istatistiksel analizinde CT değerleri kat artışının kontrol kuyuları referans alınarak hesaplandığı ve istatistiksel değerlendirmeye sadece direkt ve indirekt kuyuları dahil edilirken, immünfloresan analizinde ise tüm kültür koşullarının verileri istatistiksel değerlendirmeye dahil edildiğini göz önünde bulundurmak gerekmektedir.

Antiinflamatuvar bir sitokin olan IL-10 Treglerin ana sentez ürünlerinden biri olup, proinflamatuvar sitokin aktivasyonu kademesini sınırladığı, T hücre aracılı immün yanıtları aşağı düzenlediği, Th1, Th2 hücrelerinin proliferasyonunu sınırladığı ve mononükleer hücreler ile dendritik hücreler sayısını düzenlediği gösterilmiştir (178).

Bulgularımızda T1DM grubunda, IL-10'un kontrol ve indirekt kuyularda artmış sentezinin görülmesi, MKH'ların parakrin etkiler aracılığıyla diyabetli bireylerden elde edilen hücrelere antiinflamatuvar özellik kazandırdığını ve bu sitokinin üretimini arttığını ortaya koymaktadır. Sağlıklı grubuna kıyasla görülen bu farklılığın T1DM'nin inflamatuvar ortamında kazanılmış antiinflamatuvar kapasitesiyle ilişkili olduğunu düşünmekteyiz.

Literatürde, IL-10'un baskılayıcı fonksiyonu ön plana çıkmış olmasına rağmen, FOXP3 ve TGF- β sentezi ile her zaman IL-10 ekspresyonunun tetiklemediği, FOXP3 ve TGF- β 'nin yüksek olduğu koşullarda hücrelerin metabolik veya direkt temas yoluyla baskılama mekanizmaları üzerinden etki edebildiği, böylece IL-10 üretiminden bağımsız baskılama yollarının söz konusu olabileceği gösterilmiştir (117). Bu bilgilerin,

çalışmamızda IL-10 sentezinin, FOXP3 ve TGF- β sentezi gözlenen kültür koşullarından farklı kuyuda tespit edilmesini aydınlayabileceği düşünülmektedir.

İnterlökin-2, Tconv tarafından sentezlenen ve TCR ile etkileşime giren IL-2 reseptör α -zinciri (IL-2R α ; CD25), IL-2 reseptör β -zinciri (IL-2R β ; CD122) ve ortak gama-zinciridir (IL-2R γ ; CD132) olmak üzere 3 altbirimden oluşan glikoprotein yapıda bir sitokindir (179,180). Treg'ler IL-2 sentezi gerçekleştirmez ancak, yüzeyinde sahip olduğu IL-2R α (CD25) sebebiyle mikroçevredeki IL-2'yi yüksek oranda tüketerek dolaylı şekilde Teff'lerin çoğalmasını ve aktivasyonunu kısıtlamaya yardımcı olur (63,64).

Treg kusurluluğuna yol açan pek çok mekanizma bildirilmiş olmasına rağmen, otoimmün hastalıklarda rapor edilen Treg fonksiyon bozukluğu IL-2 ve sinyal bileşenlerine dayandırılmıştır (179). T1DM ile yapılan bir çalışmada diğer çalışmalarda rapor edilen IL-2R sinyalleşme kusurlarla tutarlı olarak, deneklerdeki Treg'lerin IL-2 yoksunluğu geçiren Treg'lerinkine benzer bir gen ekspresyonu ile ilişkili olan apoptoz eğilimi gösterdiği öne sürülmüştür (181).

Çalışmamızda immünfloresan boyama yöntemiyle gösterilen CD4 belirteci yönünden sağlıklı ve T1DM gruplarının kontrol kuyuları arasında farklılık gözlenmezken, bu kuyularda IL-2 protein ifade düzeylerinin sağlıklı grubun kontrol kuyusunda T1DM kontrol kuyusuna oranla anlamlı seviyede yüksek tespit edildi. CD4⁺ T hücreleri hem sağlıklı bireylerde hem de T1DM'li bireylerde benzer oranlarda bulunmasına rağmen, IL-2 yönünden farklılık göstermesinin işlevsel farklılıklarını ifade ediyor olabileceğini düşünmekteyiz. Literatürde açıkça belirtilen T1DM patogenezinin ilişkin verilerle uyumlu olarak elde ettiğimiz bulgular T1DM'deki Treg hücrelerinin frekansındaki azalma ve IL-2 sinyal yolunda bozulmalar yaşadığını destekler yöndedir.

Mevcut çalışmalarda, IL-2 ve TGF- β sitokinlerinin birlikte hem *in vitro* hem de *in vivo* üretilen FOXP3⁺ iTreg hücrelerinin sağkalımları ve baskılayıcı işlevlerini desteklediği gösterilmiştir (160,182). Yapılan bir çalışmada, CD4⁺ CD25⁺ hücrelerinin mikroçevrede bulunan yeterli ekzojen IL-2 ve TGF- β 'nin kostimülatör etkileri ile CD4⁺ CD25⁻ popülasyonunu baskılayıcı CD25⁺ hücrelere dönüştürdüğü gösterilmiştir. CFSE ile etiketlenmiş bu popülasyonlarda 4-6 gün süren TGF- β uyarımıyla birlikte CD25⁺ hücrelerinin sayısını önemli ölçüde artarken, TGF ilave edilmemiş kontrol grubunda azalmış aktivasyon ve daha fazla hücre ölümü rapor edilmiştir (174).

PBMC'lerin BM-MKH kültürlendiği çalışmada, BM-MSC'lerin IL-2 ve IFN- γ sitokinlerinin üretimini hem sağlıklı hem RA gruplarında inhibe etmesi CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinin yüzdesindeki azalmayla ilişkilendirilmiş, RA grubunda IL-2 ve IFN- γ inhibisyonunun daha belirgin olduğu vurgulanmıştır. MKH içermeyen kontrol kuyularında ise RA hastalarının sağlıklı gruba kıyasla IL-2 üreten CD4⁺ T hücrelerinin yüzdesi artmış ve CD4⁺ ve CD8⁺ T hücreleri için daha yüksek IL-2 ortalaması görülmüştür (124).

Krampera ve ark. ise, insan CD4⁺ T hücrelerini uyardıktan sonra BM-MKH'ların direkt ve indirekt koşullarda kültürleyerek MKH immünmodulasyon özelliğini gözlemledikleri çalışmada, uyarılmış popülasyonun hem kontrol hem ko-kültür gruplarında düşük FOXP3 mRNA düzeyleri raporlamışlardır. MKH ile ko-kültürlenmiş grupta yüksek CD25 ekspresyonu gösteren T hücreler gözlenmesine rağmen, bu farkın kontrol grubuyla arasında anlamlı olmadığı, hatta ekzojen IL-2'nin bu durumu değiştirmedeği bildirildi (153).

Çalışmamızda IL-2 ifadesinin kültür koşulları arasında T1DM grubunda farklılık göstermezken, sağlıklı bireylerin IL2 sentezi yönünden kontrol kuyusunda sentez oranı direkt ko-kültür kuyusundan, indirekt kültür kuyusunda sentez oranı da direkt kuyusundan yüksek olarak gözlemlendi. Sağlıklı gruptaki bu farklı kültür koşulları arasında CD4 protein ifadesi yönünden bir farklılık söz konusu değildi. Literatürde rapor edilen bilgiler ışığında MKH'ların baskılayıcı özelliğinin ön plana çıkarak IL-2 sentezini çeşitli mekanizmalar yoluyla CD4⁺ popülasyonu içerisinde azaltmış olabileceğini düşünmekteyiz.

Sağlıklı grubun indirekt kültür kuyusunda gözlemlenen yüksek IL-2 ifadesi Th1 hücre yanıtları destekleyecek yönde olup, bu hücrelerin IL-4 üretimini baskımlı olabileceğini ve TGF- β üretiminin sınırlandırılmış olabileceğini düşünmekteyiz. Direkt kültür kuyusunda ise düşük IL-2 ifadesi göz önünde bulundurulduğunda indirekt kuyusuna kıyasla mikroçevresinin Th2 hücre yanıtlarına eğilim gösteren, dolayısıyla IL-4'ün artmasına, ayrıca Treg hücrelerinin aktivitesini tetikleyerek dolaylı mekanizmalarla TGF- β üretiminin artmasına sebep olabileceği düşünülmektedir.

Bulgularımıza göre, T1DM grubunun kontrol kuyusundaki CD4 yüzey belirteci ifade eden hücreler direkt ve indirekt kültür koşullarına oranla yüksek bulunmuştur. Ancak bu kuyularda IL-2 ifadesi anlamında herhangi bir fark tespit edilememiştir.

Azalmış CD4 ifadesi gözlenen direkt kuyusunda TNF- α 'nın artmış seviyelerde olması, inflamatuvar mikroçevrenin sonucu olarak CD4⁺ hücrelerin fonksiyonlarının baskılanmış veya apoptozun tetiklenmesi sonucu CD4⁺ hücrelerinin kaybına neden olabileceği düşünülmüştür. Benzer şekilde indirekt kuyusunda tespit edilen azalmış CD4 ifadesine eşlik eden artmış IL-10 seviyeleri, özellikle pro-inflamatuvar CD4⁺ T hücrelerinin proliferasyonunu engelleyerek Th1, Th17 hücrelerin fonksiyonlarını baskılamış olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda anti-apoptotik bir protein olan BCL-2'nin immünfloresan verilerinin analizine göre hem sağlıklı ve T1DM grupları arasında hemde farklı kültür koşulları arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda elde edilen veriler doğrultusunda, WJ-MKH'lerin, bağışıklık sisteminin düzenlenmesi ve Treg hücrelerinin fonksiyonları üzerinde potansiyel etkileri olduğunu ortaya koymaktadır. Ancak, bu etkilerin bağışıklık mikroçevresine ve kullanılan kültür koşullarına bağlı olarak değişiklik gösterdiği anlaşılmaktadır. MKH'ların Treg proliferasyonuna hem T1DM hem de sağlıklı gruplarda anlamlı bir etkisi gözlenmemiştir. Bu durum, MKH'ların Treg hücrelerinin çoğalmasını indüklemek için tek başına yeterli olmadığını ve ek uyaranlara ihtiyaç duyulabileceğini düşündürmektedir. MKH'ların direkt temas sonucu Treg fenotipinin indüklenmesi için parakrin faktörler yoluyla etkileşimlerden daha etkili olduğu FOXP3 sentezi ile ortaya konmuştur. Sitokin profilleri yönünden MKH'ın sağlıklı bireyler ve T1DM bireylerin Tregleri üzerine etkileri birbirinden farklı sonuçlar vermiştir. Bu durumun immün sistemin karmaşıklığı ve otoimmünitenin hücresel seviyede sebep olduğu fonksiyon bozuklukları kaynaklı olduğunu düşünmekteyiz. Hücreler arası iletişimin kompleks mekanizmalarla yönetiliyor olmasının yanı sıra çalışmamızda yer alan her iki hücre tipinde mikroçevreye bağımlı olarak hızlı yanıt değiştiren yüksek plastisiteye sahip hücreler olması bu mekanizmaların anlaşılmasını zorlaştırmaktadır. Çalışmamızda elde ettiğimiz bu verilerin MKH ve Treg etkileşimlerini ve hücrelerinin immünmodülatör potansiyelini daha iyi anlamak için temel oluşturabileceği kanaatindeyiz. Ayrıca T1DM'nin tedavisinde geliştirilebilecek muhtemel protokoller için yapılacak araştırmalara ışık tutabileceğini düşünmekteyiz.

Mezenkimal kök hücrelerin T1DM ve diğer otoimmün hastalıkların tedavisinde potansiyeli büyük olsa da hücre-hücre etkileşimleri ve sitokin yanıtlarının daha iyi anlaşılması, tedavi yaklaşımlarını optimize etmek için kritik öneme sahiptir. Bu amaç doğrultusunda farklı MKH kaynaklarının karşılaştırmalı olarak proinflamatuvar ve anti-inflamatuvar mekanizmaların daha ayrıntılı araştırılması, otoimmün hastalıkların tedavisinde yeni stratejiler geliştirilmesine katkı sağlayacaktır. Treg hücrelerinin fonksiyonlarını ve stabilitelerini artırmak için IL-2 gibi destekleyici sitokinlerin etkin dozlarının tespit edilmesi ve klinik denemelerde etkin uygulamaların oturtulması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Ogle, G.D., Wang, F., Gregory, G.A. and Maniam J. Idf Atlas Reports. Idf. 2022;1–15.
2. Mobasser M, Shirmohammadi M, Amiri T, Vahed N, Fard HH, Ghojzadeh M. Prevalence and incidence of type 1 diabetes in the world: A systematic review and meta-analysis. *Heal Promot Perspect*. 2020;10(2):98–115.
3. Diabetes DOF. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2010;33(SUPPL. 1).
4. Magliano DJ, Boyko EJ, Balkau B, Barengo N, Barr E, Basit A, et al. IDF Diabetes Atlas [Internet]. IDF official website. 2021. Available from: <https://diabetesatlas.org/atlas/tenth-edition/%0Ahttps://diabetesatlas.org/data/en/world/>
5. Alshiekh S, Larsson HE, Ivarsson S-A, Lernmark A. Autoimmune Type 1 Diabetes. 5th ed. R.Holt, C.Cockram AF and BG, editor. Textbook of Diabetes. John Wiley & Sons, Ltd; 2017. 143–153 p.
6. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL. Role of cytokines in the pathogenesis of autoimmune diabetes mellitus. *Rev Endocr Metab Disord*. 2003;4(3):291–9.
7. Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T. A choice of death - The signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia*. 2001;44(12):2115–33.
8. Polychronakos C, Li Q. Understanding type 1 diabetes through genetics: Advances and prospects. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2011;12(11):781–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3069>
9. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Masanao A, Misako I, Masaaki T. Immunologic Self-Tolerance Maintained by Activated T Cells Expressing 11-2 Receptor α -Chains (CD25). *J Immunol*. 1995;155(3):1151–64.
10. Piao WH, Jee YH, Liu RL, Coons SW, Kala M, Collins M, et al. IL-21 modulates CD4⁺ CD25⁺ regulatory T-cell homeostasis in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Scand J Immunol*. 2008 Jan;67(1):37–46.
11. Wang R, Song L, Han G, Wang J, Chen G, Xu R, et al. Mechanisms of regulatory T-cell induction by antigen-IgG-transduced splenocytes. *Scand J Immunol*. 2007;66(5):515–22.
12. Wang Y, Meng J, Wang X, Liu S, Shu Q, Gao L, et al. Expression of human TIM-1 and TIM-3 on lymphocytes from systemic lupus erythematosus patients. *Scand J Immunol*. 2008;67(1):63–70.
13. Brusko TM, Wasserfall CH, Clare-Salzler MJ, Schatz DA, Atkinson MA. Functional defects and the influence of age on the frequency of CD4⁺CD25⁺ T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2005;54(5):1407–14.
14. Lindley S, Dayan CM, Bishop A, Roep BO, Peatman M, Tree TIM. Defective suppressor function in CD4⁺CD25⁺ T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2005;54(1):92–9.
15. Dominguez-Villar M, Baecher-Allan CM, Hafler DA. Identification of T helper type 1-"like, Foxp3⁺ regulatory T cells in human autoimmune disease. *Nat Med*. 2011;17(6):673–5.
16. Miyara M, Gorochov G, Ehrenstein M, Musset L, Sakaguchi S, Amoura Z. Human FoxP3⁺ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* [Internet]. 2011;10(12):744–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2011.05.004>
17. Michael H. Ross, PhD; Wojciech Pawlina M. HISTOLOGY A Text and Atlas. 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business.; 2011.
18. Giganti G, Atif M, Mohseni Y, Mastronicola D, Grageda N, Povoleri GAM, et al. Treg cell therapy: How cell heterogeneity can make the difference. *Eur J Immunol*. 2021;51(1):39–55.
19. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* [Internet]. 2006;8(4):315–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/14653240600855905>
20. Zhou Y, Yamamoto Y, Xiao Z, Ochiya T. The immunomodulatory functions of mesenchymal stromal/stem cells mediated via paracrine activity. *J Clin Med*. 2019;8(7).
21. Najar M, Raicevic G, Fayyad-Kazan H, Bron D, Toungouz M, Lagneaux L. Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: A gathering of regulatory immune cells. *Cytotherapy* [Internet]. 2016;18(2):160–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.10.011>
22. Negi N, Griffin MD. Effects of mesenchymal stromal cells on regulatory T cells: Current understanding and clinical relevance. *Stem Cells*. 2020;38(5):596–605.
23. Abul K. Abbas, MBBS; Andrew H. Lichtman, MD, PhD; Shiv Pillai, MBBS P. Cellular and Molecular Immunology. 10th ed. ELSEVIER. 2015.
24. Kierszenbaum AL, Tres LL. HISTOLOGY AND CELL BIOLOGY An Introduction to Pathology.

- 4th ed. Vol. 3, *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952. Elsevier; 2018. 1–749 p.
25. Grover P, Goel PN, Greene MI. Regulatory T Cells: Regulation of Identity and Function. *Front Immunol*. 2021;12(October):1–10.
 26. Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*. 1970;18(5):723–37.
 27. Kapp JA. Special regulatory T-cell review: Suppressors regulated but unsuppressed. *Immunology*. 2008;123(1):28–32.
 28. Corthay A. How do regulatory t cells work? *Scand J Immunol*. 2009;70(4):326–36.
 29. Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: Mechanisms of differentiation and function. Vol. 30, *Annual Review of Immunology*. 2012. p. 531–64.
 30. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4 + CD25 high Regulatory Cells in Human Peripheral Blood. *J Immunol*. 2001;167(3):1245–53.
 31. Dominguez-Villar M, Hafler DA. Regulatory T cells in autoimmune disease. *Nat Immunol*. 2018 Jul 1;19(7):665–73.
 32. Shevach EM, Thornton AM. tTregs, iTregs, pTregs: Similarities and Differences. 2015;259(1):88–102.
 33. Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EIH, Huizinga TWJ, Toes REM. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur J Immunol*. 2007;37(1):129–38.
 34. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor Foxp3. *Immunity*. 2005;22(3):329–41.
 35. Hull CM, Peakman M, Tree TIM. Regulatory T cell dysfunction in type 1 diabetes: what's broken and how can we fix it? *Diabetologia*. 2017;60(10):1839–50.
 36. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *J Immunol*. 2017;198(3):981–5.
 37. Asseman C, Fowler S, Powrie F. Control of experimental inflammatory bowel disease by regulatory T cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162(4 II):1–5.
 38. Chen X, Oppenheim JJ. Resolving the identity myth: Key markers of functional CD4 +FoxP3 + regulatory T cells. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2011;11(10):1489–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2011.05.018>
 39. Oldenhove G, De Heusch M, Urbain-Vansanten G, Urbain J, Maliszewski C, Leo O, et al. CD4+ CD25+ regulatory T cells control T helper cell type 1 responses to foreign antigens induced by mature dendritic cells in vivo. *J Exp Med*. 2003;198(2):259–66.
 40. Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity*. 2004;21(4):503–13.
 41. Geng X, Li M, Cui B, Lu C, Liu X, Zhang P, et al. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells suppress NKG2D-mediated NK cell cytotoxicity in peripheral blood. *Med (United States)*. 2019;98(22).
 42. Littwitz-Salomon E, Malyshkina A, Schimmer S, Dittmer U. The Cytotoxic Activity of Natural Killer Cells Is Suppressed by IL-10+ Regulatory T Cells During Acute Retroviral Infection. *Front Immunol*. 2018;9(August):1–10.
 43. Morris AC, Rennie J, Rossi AG, Walsh TS. Role of regulatory T cells in neutrophil function. *Lancet* [Internet]. 2016;387:S30. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00417-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00417-7)
 44. Rigas D, Lewis G, Aron JL, Wang B, Banie H, Sankaranarayanan I, et al. ILC2 Suppression by Regulatory T Cells Attenuates Airway Hyperreactivity and Requires ICOS:ICOS-Ligand Interaction. *J Clin Investig Allergy Clin Immunol*. 2017;139(5):1468–77.
 45. Curotto De Lafaille MA, Muriglan S, Sunshine MJ, Lei Y, Kutchukhidze N, Furtado GC, et al. Hyper immunoglobulin E response in mice with monoclonal populations of B and T lymphocytes. *J Exp Med*. 2001;194(9):1349–59.
 46. Akbari O, Freeman GJ, Meyer EH, Greenfield EA, Chang TT, Sharpe AH, et al. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med*. 2002;8(9):1024–32.
 47. Zuany-Amorim C, Sawicka E, Manlius C, Le Moine A, Brunet LR, Kemeny DM, et al. Suppression of airway eosinophilia by killed Mycobacterium vaccae-induced allergen-specific regulatory T-cells. *Nat Med*. 2002;8(6):625–9.
 48. Weiner HL. Oral tolerance: Immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. *Immunol Today*. 1997;18(7):335–43.
 49. Zhang X, Izikson L, Liu L, Weiner HL. Activation of CD25 + CD4 + Regulatory T Cells by Oral Antigen Administration. *J Immunol*. 2001;167(8):4245–53.
 50. Karlsson MR, Rugtveit J, Brandtzaeg P. Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in

- children who have outgrown cow's milk allergy. *J Exp Med*. 2004;199(12):1679–88.
51. Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol*. 2004;5(3):266–71.
52. Hori S, Carvalho TL, Demengeot J. CD25+CD4+ regulatory T cells suppress CD4+ T cell-mediated pulmonary hyperinflammation driven by *Pneumocystis carinii* in immunodeficient mice. *Eur J Immunol*. 2002;32(5):1282–91.
53. Kullberg MC, Jankovic D, Gorelick PL, Caspar P, Letterio JJ, Cheever AW, et al. Bacteria-triggered CD4+ T regulatory cells suppress *Helicobacter hepaticus*-induced colitis. *J Exp Med*. 2002;196(4):505–15.
54. Alpan O, Bachelder E, Isil E, Arnheiter H, Matzinger P. “Educated” dendritic cells act as messengers from memory to naive T helper cells. *Nat Immunol*. 2004;5(6):615–22.
55. Matzinger P. Friendly and dangerous signals: Is the tissue in control? *Nat Immunol*. 2007;8(1):11–3.
56. Baecher-Allan C, Viglietta V, Hafler DA. Inhibition of Human CD4 + CD25 +high Regulatory T Cell Function . *J Immunol*. 2002;169(11):6210–7.
57. Cohn M. What roles do regulatory T cells play in the control of the adaptive immune response? *Int Immunol*. 2008;20(9):1107–18.
58. Grunnet LG, Mandrup-Poulsen T. Cytokines and type 1 diabetes: A numbers game. *Diabetes*. 2011;60(3):697–9.
59. Kyttaris VC. Targeting cytokines to treat autoimmunity. *Clin Immunol* [Internet]. 2019;206(August):108251. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clim.2019.108251>
60. Patra MC, Shah M, Choi S. Toll-like receptor-induced cytokines as immunotherapeutic targets in cancers and autoimmune diseases. *Semin Cancer Biol*. 2020;64(April):61–82.
61. Saraiva M, Vieira P, O'Garra A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J Exp Med*. 2020;217(1):1–19.
62. Travis MA, Sheppard D. TGF- β activation and function in immunity. *Annu Rev Immunol*. 2014;32(November 2013):51–82.
63. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol*. 2007;8(12):1353–62.
64. Bayer AL, Lee JY, De La Barrera A, Surh CD, Malek TR, Bayer L. A function for IL-7R for CD4 + CD25 + Foxp3 + T regulatory cells. *J Immunol J Immunol* [Internet]. 2008;181(1):225–34. Available from: www.jimmunol.org.
65. Zhang Q, Cui F, Fang L, Hong J, Zheng B, Zhang JZ. TNF- α impairs differentiation and function of TGF- β -induced Treg cells in autoimmune diseases through Akt and Smad3 signaling pathway. *J Mol Cell Biol*. 2013;5(2):85–98.
66. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*. 2001;27(1):20–1.
67. Chatila TA, Helms C, Bowcock AM, Chatila TA, Blaeser F, Ho N, et al. JM2 , encoding a fork head – related protein , is mutated in X- linked autoimmunity – allergic dysregulation syndrome Find the latest version : JM2 , encoding a fork head – related protein , is mutated in X-linked autoimmunity – allergic dysregulation syn. 2000;106(12).
68. Scheinecker C, Göschl L, Bonelli M. Treg cells in health and autoimmune diseases: New insights from single cell analysis. *J Autoimmun* [Internet]. 2020;110(November):102376. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.102376>
69. Kukreja A, Cost G, Marker J, Zhang C, Sun Z, Lin-Su K, et al. Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest*. 2002;109(1):131–40.
70. Burrack AL, Martinov T, Fife BT. T cell-mediated beta cell destruction: Autoimmunity and alloimmunity in the context of type 1 diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8(DEC):1–15.
71. Brusko T, Wasserfall C, McGrail K, Schatz R, Viener HL, Schatz D, et al. No alterations in the frequency of FOXP3+ regulatory T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2007;56(3):604–12.
72. McMurchy AN, Levings MK. Suppression assays with human T regulatory cells: A technical guide. *Eur J Immunol*. 2012;42(1):27–34.
73. Latha S, Vijayakumar R. The Facts about Diabetes Mellitus- A Review. *Galore Int J Heal Sci Res* [Internet]. 2019;4(2; April-June):64–75. Available from: www.gijhsr.com
74. DiMeglio LA, Evans-Molina C, Oram RA. Type 1 diabetes. *Lancet* [Internet]. 2018;391(10138):2449–62. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31320-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31320-5)
75. Mathis D, Vence L, Benoist C. B-Cell Death During Progression To Diabetes. *Nature*.

- 2001;414(6865):792–8.
76. Çorakçı A, Kaya A, Tuzcu A, Sözlü A, Kubat Üzümlü A, Atmaca A, et al. Diyabet Tanı ve Tedavi Rehberi 2023. Vol. 4. 2023. 88–100 p.
 77. Ramachandran A, Snehalatha C, Nanditha A. Classification and Diagnosis of Diabetes In: Holt R, Cockram C, Flyvbjerg A, Goldstein B, editors. Textbook of diabetes. Chichester (UK): John Wiley & Sons, Ltd. p. 23–28. Textb diabetes. 2017;23–8.
 78. IDF. T1D Index Factsheet: Turkey Current. IDF. 2022.
 79. World Health Organization, International Diabetes Federation. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia. World Health Organization. 2006.
 80. Care D, Suppl SS, Brown FM, Bruemmer D, Collins BS, Hilliard ME, et al. 2 . Classification and Diagnosis of Diabetes : Standards of Care in Diabetes — 2023. 2023;46(January):19–40.
 81. Lim HW, Kim CH. Loss of IL-7 Receptor α on CD4 + T Cells Defines Terminally Differentiated B Cell-Helping Effector T Cells in a B Cell-Rich Lymphoid Tissue . J Immunol. 2007;179(11):7448–56.
 82. Ziegler AG, Rewers M, Simell O, Simell T, Lempainen J, Steck A, et al. Seroconversion to Multiple Islet Autoantibodies and Risk of Progression to Diabetes in Children HHS Public Access. JAMA. 2013;309(23):2473–9.
 83. Ilonen J, Hammas A, Laine AP, Lempainen J, Vaarala O, Veijola R, et al. Patterns of β -cell autoantibody appearance and genetic associations during the first years of life. Diabetes. 2013;62(10):3636–40.
 84. Ilonen J, Lempainen J, Veijola R. The heterogeneous pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. Nat Rev Endocrinol. 2019;15(11):635–50.
 85. Pugliese A. Autoreactive T cells in type 1 diabetes. J Clin Invest. 2017;127(8):2881–91.
 86. DiMeglio LA, Evans-Molina C, Oram RA. Type 1 diabetes. Lancet. 2018;391(10138):2449–62.
 87. Hejrati A, Rafiei A, Soltanshahi M, Hosseinzadeh S, Dabiri M, Taghadosi M, et al. Innate immune response in systemic autoimmune diseases: a potential target of therapy. Vol. 28, Inflammopharmacology. 2020. p. 1421–38.
 88. Hartemann A, Bensimon G, Payan CA, Jacqueminet S, Bourron O, Nicolas N, et al. Low-dose interleukin 2 in patients with type 1 diabetes: A phase 1/2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet Diabetes Endocrinol. 2013;1(4):295–305.
 89. Rosenzweig M, Churlaud G, Mallone R, Six A, Dérian N, Chaara W, et al. Low-dose interleukin-2 fosters a dose-dependent regulatory T cell tuned milieu in T1D patients. J Autoimmun. 2015;58:48–58.
 90. Robert S, Gysemans C, Takiishi T, Korf H, Spagnuolo I, Sebastiani G, et al. Oral delivery of glutamic acid decarboxylase (GAD)-65 and IL10 by lactococcus lactis reverses diabetes in recent-onset NOD mice. Diabetes. 2014;63(8):2876–87.
 91. Zacccone P, Phillips J, Conget I, Gomis R, Haskins K, Minty A, et al. Interleukin-13 prevents autoimmune diabetes in NOD mice. Diabetes. 1999;48(8):1522–8.
 92. Tang Q, Adams JY, Penaranda C, Melli K, Piaggio E, Sgouroudis E, et al. Central role of a defective interleukin-2 production in triggering Islet Autoimmune Destruction. Diabetes. 2008;28(5):687–97.
 93. Karaöz E, Demircan PC, Saflam Ö, Aksoy A, Kaymaz F, Duruksu G. Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Histochem Cell Biol. 2011;136(4):455–73.
 94. Karaoz E, Tepekoy F, Yilmaz I, Subasi C, Kabatas S. Reduction of Inflammation and Enhancement of Motility after Pancreatic Islet Derived Stem Cell Transplantation Following Spinal Cord Injury. J Korean Neurosurg Soc. 2019;62(2):153–65.
 95. Kabataş S, Civelek E, İnci Ç, Yalçinkaya EY, Günel G, Kır G, et al. Wharton’s Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation in a Patient with Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: A Pilot Study. Cell Transplant. 2018;27(10):1425–33.
 96. Okur SÇ, Erdoğan S, Demir CS, Günel G, Karaöz E. The effect of Umbilical Cord-derived Mesenchymal stem cell transplantation in a patient with cerebral palsy: A case report. Int J Stem Cells. 2018;11(1):141–7.
 97. El Omar R, Beroud J, Stoltz JF, Menu P, Velot E, Decot V. Umbilical cord mesenchymal stem cells: The new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies? Tissue Eng - Part B Rev. 2014;20(5):523–44.
 98. 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 [Internet]. 2016;99:69–80. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.09.015>
99. Richardson SJ, Rodriguez-Calvo T, Gerling IC, Mathews CE, Kaddis JS, Russell MA, et al. Islet cell hyperexpression of HLA class I antigens: a defining feature in type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2016;59(11):2448–58.
 100. Lukomska B, Stanaszek L, Zuba-Surma E, Legosz P, Sarzynska S, Drela K. Challenges and Controversies in Human Mesenchymal Stem Cell Therapy. *Stem Cells Int*. 2019;2019.
 101. Zhao Q, Ren H, Han Z. Mesenchymal stem cells: Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases. *J Cell Immunother* [Internet]. 2016;2(1):3–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jocit.2014.12.001>
 102. Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ*. 2014;21(2):216–25.
 103. Naji A, Eitoku M, Favier B, Deschaseaux F, Rouas-Freiss N, Suganuma N. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2019;76(17):3323–48. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03125-1>
 104. Maumus M, Jorgensen C, Noël D. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine applied to rheumatic diseases: Role of secretome and exosomes. *Biochimie* [Internet]. 2013;95(12):2229–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2013.04.017>
 105. Abumaree M, Al Jumah M, Pace RA, Kalionis B. Immunosuppressive Properties of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cell Rev Reports*. 2012;8(2):375–92.
 106. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2005;105(10):4120–6.
 107. Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PST, Mayer B, Parmelee A, Doi K, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E 2-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med*. 2009;15(1):42–9.
 108. Wang Q, Sun B, Wang D, Ji Y, Kong Q, Wang G, et al. Murine bone marrow mesenchymal stem cells cause mature dendritic cells to promote T-cell tolerance. *Scand J Immunol*. 2008;68(6):607–15.
 109. Bai L, Lennon DP, Eaton V, Maier K, Caplan AI, Miller SD, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis. *Glia*. 2009;57(11):1192–203.
 110. Fiorina P, Jurewicz M, Augello A, Vergani A, Dada S, La Rosa S, et al. Immunomodulatory Function of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Experimental Autoimmune Type 1 Diabetes. *J Immunol*. 2009;183(2):993–1004.
 111. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxeavanis CN, Papamichail M. Interactions Between Human Mesenchymal Stem Cells and Natural Killer Cells. *Stem Cells*. 2006;24(1):74–85.
 112. Mougiakakos D, Jitschin R, Johansson CC, Okita R, Kiessling R, Le Blanc K. The impact of inflammatory licensing on heme oxygenase-1-mediated induction of regulatory T cells by human mesenchymal stem cells. *Blood*. 2011;117(18):4826–35.
 113. Svobodova E, Krulova M, Zajicova A, Pokorna K, Prochazkova J, Trosan P, et al. The role of mouse mesenchymal stem cells in differentiation of naive T-cells into anti-inflammatory regulatory T-cell or proinflammatory helper T-cell 17 population. *Stem Cells Dev*. 2012;21(6):901–10.
 114. Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, 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):3722–9.
 115. Gonçalves FDC, Luk F, Korevaar SS, Bouzid R, Paz AH, López-Iglesias C, et al. Membrane particles generated from mesenchymal stromal cells modulate immune responses by selective targeting of pro-inflammatory monocytes. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–13.
 116. Gieseke F, Böhringer J, Bussolari R, Dominici M, Handgretinger R, Müller I. Human multipotent mesenchymal stromal cells use galectin-1 to inhibit immune effector cells. *Blood*. 2010;116(19):3770–9.
 117. Duff MM, Ritter T, Ceredig R, Griffi MD. Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. 2011;1–9.
 118. Ghannam S, Pène J, Torcy-Moquet G, Jorgensen C, Yssel H. Mesenchymal Stem Cells Inhibit Human Th17 Cell Differentiation and Function and Induce a T Regulatory Cell Phenotype. *J Immunol*. 2010;185(1):302–12.
 119. English K, Ryan JM, Tobin L, Murphy MJ, Barry FP, Mahon BP. Cell contact, prostaglandin E2 and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25Highforkhead box P3+ regulatory T cells. *Clin Exp Immunol*. 2009;156(1):149–60.

120. Burchill MA, Yang J, Vogtenhuber C, Blazar BR, Farrar MA. IL-2 Receptor β -Dependent STAT5 Activation Is Required for the Development of Foxp3⁺ Regulatory T Cells. *J Immunol*. 2007;178(1):280–90.
121. Saldanha-Araujo F, Ferreira FIS, Palma P V., Araujo AG, Queiroz RHC, Covas DT, et al. Mesenchymal stromal cells up-regulate CD39 and increase adenosine production to suppress activated T-lymphocytes. *Stem Cell Res* [Internet]. 2011;7(1):66–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scr.2011.04.001>
122. Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, György H. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med*. 19(6):355–367.
123. Vasilev G, Ivanova M, Ivanova-Todorova E, Tumangelova-Yuzeir K, Krasimirova E, Stoilov R, et al. Secretory factors produced by adipose mesenchymal stem cells downregulate Th17 and increase Treg cells in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol Int* [Internet]. 2019;39(5):819–26. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00296-019-04296-7>
124. Pedrosa M, Gomes J, Laranjeira P, Duarte C, Pedreiro S, Antunes B, et al. Immunomodulatory effect of human bone marrow-derived mesenchymal stromal/stem cells on peripheral blood T cells from rheumatoid arthritis patients. *J Tissue Eng Regen Med*. 2020;14(1):16–28.
125. Hong JW, Lim JH, Chung CJ, Kang TJ, Kim TY, Kim YS, et al. Immune tolerance of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells mediated by CD4⁺CD25⁺ FoxP3⁺ regulatory T-cells and induced by TGF- β 1 and IL-10. *Yonsei Med J*. 2017;58(5):1031–9.
126. Tsang M, Gantchev J, Ghazawi FM, Litvinov I V. Protocol for adhesion and immunostaining of lymphocytes and other non-adherent cells in culture. *Biotechniques*. 2017;63(5):230–3.
127. Kashef S, Moghtaderi M, Hatami HR, Kalani M, Alyasin S, Nabavizadeh H, et al. Evaluation of T Cell Proliferation Using CFSE Dilution Assay: A Comparison between Stimulation with PHA and Anti-CD3/Anti-CD28 Coated Beads. *Iran J Allergy, Asthma Immunol*. 2022;21(4):458–66.
128. Ye Q, Wang B, Mao J. The pathogenesis and treatment of the ‘Cytokine Storm’ in COVID-19.’ *J Infect* [Internet]. 2020;80(6):607–13. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.03.037>
129. Van Der Vliet HJJ, Nieuwenhuis EE. IPEX as a result of mutations in FOXP3. *Clin Dev Immunol*. 2007;2007:3–8.
130. Smith PH, Bessette AJ, Weinberger AH, Sheffer CE, Mckee SA. Seroconversion to Multiple Islet Autoantibodies and Risk of Progression to Diabetes in Children. *Physiol Behav*. 2016;92(3):135–40.
131. Krischer JP, Lynch KF, Schatz DA, Ilonen J, Lernmark Å, Hagopian WA, et al. The 6 year incidence of diabetes-associated autoantibodies in genetically at-risk children: the TEDDY study. *Diabetologia*. 2015;58(5):980–7.
132. Alshiekh S, Larsson HE, Ivarsson S-A, Lernmark Å. Autoimmune Type 1 Diabetes. In: R.Holt,C.Cockram AF andB. G, editor. *Textbook ofDiabetes*. 5th ed. John Wiley & Sons, Ltd.; 2017. p. 143–53.
133. Greenbaum CJ, Anderson AM, Dolan LM, Mayer-Davis EJ, Dabelea D, Imperatore G, et al. Preservation of β -cell function in autoantibody-positive youth with diabetes. *Diabetes Care*. 2009;32(10):1839–44.
134. Davis AK, DuBose SN, Haller MJ, Miller KM, DiMeglio LA, Bethin KE, et al. Prevalence of detectable c-peptide according to age at diagnosis and duration of type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2015;38(3):476–81.
135. Oram RA, Jones AG, Besser REJ, Knight BA, Shields BM, Brown RJ, et al. The majority of patients with long-duration type 1 diabetes are insulin microsecreters and have functioning beta cells. *Diabetologia*. 2014;57(1):187–91.
136. Oram RA, Mcdonald TJ, Shields BM, Hudson MM, Shepherd MH. Most people with long duration type 1 diabetes in a large population based study are insulin microsecreters. 2017;38(2):323–8.
137. Rother KI, Spain LM, Wesley RA, Digon BJ, Baron A, Chen K, et al. Effects of exenatide alone and in combination with daclizumab on β -cell function in long-standing type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2009;32(12):2251–7.
138. Palmer JP, Fleming GA, Greenbaum CJ, Herold KC, Jansa LD, Kolb H, et al. C-Peptide Is the Appropriate Outcome Measure for Type 1 Diabetes Clinical Trials to Preserve β -Cell Function. Vol. 53. 2004.
139. Lachin JM, McGee P, Palmer JP. Impact of c-peptide preservation on metabolic and clinical outcomes in the diabetes control and complications trial. *Diabetes*. 2014;63(2):739–48.
140. Steffes MW, Sibley S, Jackson M, Thomas W. B-Cell Function and the Development of Diabetes-Related Complications in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes Care*. 2003;26(3):832–6.

141. Keenan HA, Sun JK, Levine J, Doria A, Aiello LP, Eisenbarth G, et al. Residual insulin production and pancreatic β -cell turnover after 50 years of diabetes: Joslin medalist study. *Diabetes*. 2010;59(11):2846–53.
142. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*. 2001;27(1):68–73.
143. Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, et al. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet*. 2001;27(1):18–20.
144. Putnam AL, Vendrame F, Dotta F, Gottlieb PA. CD4+CD25high regulatory T cells in human autoimmune diabetes. *J Autoimmun*. 2005;24(1):55–62.
145. Battaglia M, Stabilini A, Migliavacca B, Horejs-Hoeck J, Kaupper T, Roncarolo M-G. Rapamycin Promotes Expansion of Functional CD4 + CD25 + FOXP3 + Regulatory T Cells of Both Healthy Subjects and Type 1 Diabetic Patients. *J Immunol*. 2006;177(12):8338–47.
146. Okubo Y, Torrey H, Butterworth J, Zheng H, Faustman DL. Treg activation defect in type 1 diabetes: correction with TNFR2 agonism. *Clin Transl Immunol* [Internet]. 2016;5(1):e56-9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cti.2015.43>
147. Venken K, Thewissen M, Hellings N, Somers V, Hensen K, Rummens JL, et al. A CFSE based assay for measuring CD4+CD25+ regulatory T cell mediated suppression of auto-antigen specific and polyclonal T cell responses. *J Immunol Methods*. 2007;322(1–2):1–11.
148. Hou H, Zhou Y, Yu J, Mao L, Bosco MJ, Wang J, et al. Establishment of the reference intervals of lymphocyte function in healthy adults based on IFN- γ secretion assay upon phorbol-12-myristate-13-acetate/ionomycin stimulation. *Front Immunol*. 2018;9(FEB).
149. Gad M, Kristensen NN, Kury E, Claesson MH. Characterization of T-regulatory cells, induced by immature dendritic cells, which inhibit enteroantigen-reactive colitis-inducing T-cell responses in vitro and in vivo. *Immunology*. 2004;113(4):499–508.
150. Azevedo RI, Minskaia E, Fernandes-Platzgummer A, Vieira AIS, da Silva CL, Cabral JMS, et al. Mesenchymal stromal cells induce regulatory T cells via epigenetic conversion of human conventional CD4 T cells in vitro. *Stem Cells*. 2020;38(8):1007–19.
151. Kadle RL, Abdou SA, Villarreal-Ponce AP, Soares MA, Sultan DL, David JA, et al. Microenvironmental cues enhance mesenchymal stem cell-mediated immunomodulation and regulatory T-cell expansion. *PLoS One* [Internet]. 2018;13(3):1–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0193178>
152. Fattore A Del, Luciano R, Pascucci L, Goffredo BM, Giorda E, Scapaticci M, et al. Immunoregulatory effects of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles on T lymphocytes. *Cell Transplant*. 2015;24(12):2615–27.
153. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, et al. Role for Interferon- γ in the Immunomodulatory Activity of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*. 2006;24(2):386–98.
154. Tran DQ. TGF- β : The sword, the wand, and the shield of FOXP3 + regulatory T cells. *J Mol Cell Biol*. 2012;4(1):29–37.
155. Konkel JE, Zhang D, Zanvit P, Chia C, Zangarale-Murray T, Jin W, et al. Transforming Growth Factor- β Signaling in Regulatory T Cells Controls T Helper-17 Cells and Tissue-Specific Immune Responses. *Immunity* [Internet]. 2017;46(4):660–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2017.03.015>
156. Karaöz E, Demircan PÇ, Erman G, Güngörürler E, Sarıboyacı AE. Comparative Analyses of Immunosuppressive Characteristics of Bone-Marrow, Wharton's Jelly, and Adipose Tissue-Derived Human Mesenchymal Stem Cells. *Turkish J Hematol*. 2017;34(3):213–25.
157. Dymowska M, Aksamit A, Zielniok K, Kniotek M, Kaleta B, Roszczyk A, et al. Interaction between macrophages and human mesenchymal stromal cells derived from bone marrow and wharton's jelly—A comparative study. *Pharmaceutics*. 2021;13(11).
158. 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 Vaccines Immunother*. 2016;12(1):85–96.
159. Chinen T, Kannan AK, Levine AG, Fan X, Klein U, Zheng Y, et al. An essential role for the IL-2 receptor in T reg cell function. *Nat Immunol*. 2016 Oct 19;17(11):1322–33.
160. Tran DQ, Ramsey H, Shevach EM. Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 - T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor- β -dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood*. 2007;110(8):2983–90.

161. Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel RA, et al. IL-4 inhibits TGF- β -induced Foxp3⁺ T cells and, together with TGF- β , generates IL-9⁺ IL-10⁺ Foxp3⁻ effector T cells. *Nat Immunol.* 2008;9(12):1347–55.
162. Tao X, Ma J, Zhang Y, Yu J, Cai L, Wang J, et al. Neutralization of IL-4 and IFN- γ facilitates inducing TGF- β -induced CD4⁺Foxp3⁺ regulatory cells. *Int J Biomed Sci.* 2008;4(1):52–7.
163. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, et al. Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4⁺ T Cells Expressing the FoxP3 Transcription Factor. *Immunity.* 2009;30(6):899–911.
164. Shevryev D, Tereshchenko V. Treg Heterogeneity, Function, and Homeostasis. *Front Immunol.* 2020;10(January):1–13.
165. Kleynwiefeld M, Hafler DA. Regulatory T cells in autoimmune neuroinflammation. *Immunol Rev.* 2014;259(1):231–44.
166. Zhou X, Bailey-Bucktrout SL, Jeker LT, Penaranda C, Martínez-Llordella M, Ashby M, et al. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat Immunol.* 2009;10(9):1000–7.
167. Pillai V, Ortega SB, Wang CK, Karandikar NJ. Transient regulatory T-cells: A state attained by all activated human T-cells. *Clin Immunol.* 2007;123(1):18–29.
168. Battaglia M, Roncarolo MG. The Fate of Human Treg Cells. *Immunity [Internet].* 2009;30(6):763–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2009.06.006>
169. 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):141–50.
170. Ren G, Su J, Zhang L, Zhao X, Ling W, L’Huillie A, et al. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells.* 2009;27(8):1954–62.
171. De Jong R, Van Lier RAW, Ruscetti FW, Schmltt C, Debré P, Mossalayi MD. Differential effect of transforming growth factor- β 1 on the activation of human naive and memory CD4⁺ T lymphocytes. *Int Immunol.* 1994;6(4):631–8.
172. Burr SP, Dazzi F, Garden OA. Mesenchymal stromal cells and regulatory T cells: The Yin and Yang of peripheral tolerance. *Immunol Cell Biol.* 2013;91(1):12–8.
173. Content R. Generation Ex Vivo of TGF- β -Producing Regulatory T Cells from CD4⁺CD25⁻ Precursors. *J Immunol Immunolgy.* 2002;169(8):4183–9.
174. Zheng SG, Wang JH, Gray JD, Soucier H, Horwitz DA. Natural and Induced CD4⁺CD25⁺ Cells Educate CD4⁺CD25⁻ Cells to Develop Suppressive Activity: The Role of IL-2, TGF- β , and IL-10. *J Immunol.* 2004;172(9):5213–21.
175. Lu J, Liu J, Li L, Lan Y, Liang Y. Cytokines in type 1 diabetes: mechanisms of action and immunotherapeutic targets. *Clin Transl Immunol.* 2020;9(3):1–17.
176. Özdemir AT, Özgül Özdemir RB, Kırmaz C, Sarıboyacı AE, Ünal Halbutoğlları ZS, Özel C, et al. The paracrine immunomodulatory interactions between the human dental pulp derived mesenchymal stem cells and CD4 T cell subsets. *Cell Immunol.* 2016;310:108–15.
177. Prevosto C, Zancolli M, Canevali P, Zocchi MR, Poggi A. Generation of CD4⁺ or CD8⁺ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. *Haematologica.* 2007;92(7):881–8.
178. Qiao Y, Chao J, Shen J, Hong X, Zhi, Liang L, Bo C, Sheng, Sui Y, et al. Changes of regulatory T cells, transforming growth factor-beta and interleukin-10 in patients with type 1 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Clin Immunol [Internet].* 2016;170:61–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2016.08.004>
179. Harris F, Berdugo YA, Tree T. IL-2-based approaches to Treg enhancement. Vol. 211, *Clinical and Experimental Immunology.* Oxford University Press; 2023. p. 149–63.
180. Zohouri M, Mehdipour F, Razmkhah M, Faghih Z, Ghaderi A. CD4⁺CD25⁻FoxP3⁺ T cells: a distinct subset or a heterogeneous population? *Int Rev Immunol [Internet].* 2021;40(4):307–16. Available from: <https://doi.org/10.1080/08830185.2020.1797005>
181. Spence A, Tang Q. Restoring Regulatory T Cells in Type 1 Diabetes. *Curr Diab Rep [Internet].* 2016;16(11). Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11892-016-0807-6>
182. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and Adaptive Foxp3⁺ Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor? *Immunity [Internet].* 2009;30(5):626–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2009.05.002>

EKLER

EK-1.Etik Kurul Onayı

Klinik Araştırmalar Etik Kurul Onayı/Tarih ve Sayı: 20.06.2022-E.66947

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU (2011-KAEK-42) KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	İnsan Göbek Kordonundan Türetilen Mezenkimal Stromal/Kök Hücrelerin Tip I Diyabet Hastalarından Alınan Periferik Kan T Lenfosit Hücreleri Üzerindeki İmmünomodülatör Etkisi

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Adnan Menderes Bulvarı Vatan Caddesi 34093 Fatih/İstanbul
	TELEFON	
	FAKS	
	E-POSTA	

İLİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Dr.Öğr.Üyesi Halime Tuba CANBAZ
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	-
	DESTEKLEYİCİ	
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)	Öğr. Gör. Selin URSAVAŞ

EK-2.Bilgilendirilmiş Onam Formu

Değerli katılımcı,

Bu araştırma, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı öğrencisi Selin URSAVAŞ'ın doktora tezi kapsamında ve Dr. Öğr. Üyesi Halime Tuba CANBAZ ile Prof. Dr. Erdal KARAÖZ danışmanlığında yürütülecek olan bilimsel bir çalışmadır.

Araştırmanın içeriği kandan elde edilen bağışıklık hücrelerine ilişkin ölçümleri kapsamaktadır. Toplanan veriler sadece bilimsel amaçlarla kullanılacak, kimliğinizi ortaya çıkarabilecek kayıtlar gizli kalacak, elde edilen kişisel bilgiler ve uygulanacak testlere verdiğiniz cevaplar araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi saklı tutulacaktır.

Araştırmanın yaklaşık 12 kişinin katılımıyla yürütülmesi ve yaklaşık 10 dakika sürmesi beklenmektedir. Araştırma süreci boyunca sizden beklenen, yönergelere dikkatli bir şekilde uymak ve ölçekler üzerinde yer alan soruları dürüst şekilde cevaplamaktır. Hiçbir sorumluluk altından kalmadan soruların bir kısmına cevap vermeme, araştırmaya katılmayı reddetme veya araştırmadan çekilme hakkına sahip olacaksınız.

'Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen araştırmacı tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi biliyorum.'

Gönüllü Katılımcı

Araştırmacı

İmza

İmza



