

T.C
GENELKURMAY BASKANLIğI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
SAğLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜğÜ
ANKARA

MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN
B-LENFOSİTLERİN İMMÜNMODÜLATÖR
FONKSİYONLARI ÜZERİNE ETKİSİ

Meral SARPER
Svl. Me. Biyolog

İmmünoloji ve Alerji Hastalıkları Bilim Dalı
İmmünoloji Programı
Yüksek Lisans Tezi

ANKARA
2012

T.C
GENELKURMAY BASKANLIğI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
SAğLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN
B-LENFOSİTLERİN İMMÜNMODÜLATÖR
FONKSİYONLARI ÜZERİNE ETKİSİ**

Meral SARPER
Svl. Me. Biyolog

Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinin
İmmünoloji Programı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

TEZ DANIŞMANI
Doç.Tbp.Kd.Alb.Uğur MUŞABAK

Ankara

2012

GATA Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne:

“Mezenkimal Kök Hücrelerin B-Lenfositlerin İmmünmodülatör Fonksiyonları Üzerine Etkisi” konulu bu çalışma jürimiz tarafından İmmünoloji Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : Doç. Tbp. Kd. Alb. Uğur MUŞABAK
GATF İmmünoloji ve Alerji Hastalıkları BD.

Üye : Prof. Tbp. Kd. Alb. Ali Uğur URAL
GATF Hematoloji BD.

Üye : Prof. Tbp. Kd. Alb. Mehmet BAYSALLAR
GATF Temel İmmünoloji BD.

Üye : Doç. Tbp. Kd. Alb. Uğur MUŞABAK
GATF İmmünoloji ve Alerji Hastalıkları BD.

ONAY:

Svl. Me. Bio. Meral SARPER'in 07.02.2012 tarihinde savunduğu bu tez Akademi Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Ufuk DEMİRKILIÇ
Profesör Tabip Tuğgeneral
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması GATA Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulunun 23 Eylül 2010 gün ve 200 sayılı oturumunda “Mezenkimal Kök Hücrelerin B Lenfositlerin İmmünmodülatör Fonksiyonları Üzerine Etkisi” konusu ile kabul edilmiş, İmmünoloji ve Alerji Hastalıkları Bilim Dalı ile Araştırma-Geliştirme Merkez. Başkanlığı Tıbbi-Kanser-Laboratuvar Araştırma. Kısımları’nda yapılmıştır.

İmmünoloji Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans Programının açılmasına öncülük ederek bu konuda eğitim almama imkan sağlayan ve hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç.Dr. Uğur MUŞABAK’a, şükran ve teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim süresince ve öncesinde mesleki gelişimime katkı sağlayan, tez hazırlama sürecinde bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım değerli hocalarım Sayın Prof.Dr. Ali Uğur URAL ve Doç.Dr. Ferit AVCU’ya teşekkürü bir borç bilerek saygılarımı sunarım.

Tezimin hazırlanması, uygulanması ve yazımı sırasında görüşlerini bildirerek gelişimime katkıda bulunan, kendisinden her zaman yakınlık ve destek gördüğüm değerli dostum Pınar Elçi’ye teşekkür eder, şükranlarımı iletirim.

Ayrıca tez çalışmalarımın bir kısmını yürüttüğüm İmmünoloji Laboratuvarı’nda tecrübe ve bilgileriyle desteklerini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Uzm.Bio. Aysel PEKEL ve Dr.Bio. Rahşan ILIKÇI SAĞKAN’a teşekkür ederim.

Son olarak beni yetiştiren, yaşamım boyunca bana güvenen, sadece çalışma süresince değil hayatımın her anında bana verdikleri destek ve güvenden dolayı sevgili aileme sonsuz teşekkür ediyorum.

Biyolog Meral SARPER

ÖZET

Tez Yazarı : Svl. Me. Biyolog. Meral SARPER

Tez Başlığı : Mezenkimal Kök Hücrelerin B-Lenfositlerin İmmünmodülatör Fonksiyonları Üzerine Etkisi

Tez Programı : İmmünoloji Yüksek Lisansı, Ankara, 2012

Destek hücresi özelliği taşıyan Mezenkimal Kök Hücre (MKH)'lerin, B lenfositlerin migrasyon, çoğalma ve immünoglobulin (Ig) sentezini etkileyerek bu hücreler üzerinde düzenleyici rol oynadıkları gösterilmiştir. Bu çalışmanın amacı MKH'lerin B lenfositlerin immünomodülatör fonksiyonları üzerine olan etkilerini araştırmaktır. Bu amaçla sağlıklı donör adaylarından alınan kemik iliği örneklerinden gradient dansite yöntemiyle elde edilen MKH'lerle, aynı olguların periferik kanlarından negatif seçim yöntemiyle elde edilen B lenfositler 24, 48 ve 72 saat süre ile ayrı ayrı ve birlikte kültüre edilmiş, CD5+ ve CD19+ B lenfositlerde akım sitometri ile CD25 ifadesi ve hücre içi IL-10 sentezi ölçülmüştür. Tek başına ve ko-kültürlerde kullanılan B lenfositler kontrol amacıyla pokeweed mitojen (PWM) ile uyarılmış ve uyarılmamış koşullarda kültüre edilmiştir. Ayrıca tek başına yapılan kültürlerde ve ko-kültürlerde XTT (2,3-bis[2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide iner salt) testi kullanılarak proliferasyon yanıtı ölçülmüş, sonuçlar istatistiksel olarak birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Ko-kültürlerde interferon gamma (IFN- γ) ile uyarılmış MKH'ler kullanılmış ve indolamin 2-3 dioksijenazın (IDO) sentezi akım sitometri ile ölçülmüştür. Kontrol amacıyla tek başına kültüre edilen IFN- γ ile uyarılan MKH kültürlerinde IDO sentezi de değerlendirilmiştir. MKH kültürlerinde ayrıca CD105, CD90 ve HLA-DR ifadesi de akım sitometri ile ölçülmüş ve bu belirteçlerin yüksek oranlarda ifade edildiği tespit edilmiştir. Ko-kültürlerde hücre fenotipinde meydana gelen değişiklikler MKH ve B lenfositlerin 1M:1B, 1M:2B, 2M:1B, 2M:2B oranlarında ayrı ayrı değerlendirilmiştir. MKH'lerle kültüre edilen uyarılmış ve uyarılmamış CD5+ ve CD19+B lenfositlerdeki CD25 ifadesi ile IL-10 sentezinin tek başına kültüre edilenlere göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. CD25 ifadesinin ve CD5+B lenfositlerden sentezlenen IL-10 düzeyinin 1M:1B'de, CD19+ B lenfositlerden sentezlenen IL-10 düzeyinin ise 2M:1B'de en yüksek olduğu görülmüştür. XTT testi değerlendirmesine göre MKH

ve B lenfositlerin beraber kültüre edildiği oranlardaki proliferasyon yanıtının, bu hücrelerin tek başına yapılan kültürlerindeki proliferasyon yanıtına göre daha yüksek olduğu, ko-kültürde MKH oranı arttıķa proliferasyon oranının arttığı, B lenfosit oranı arttıķa da proliferasyonun baskılandığı görülmüştür.

Sonuç olarak Mezenkimal Kök Hücrelerin B lenfositlerin immünmodülatör fonksiyonları üzerine etkilerinin olduğu görülmüştür. Bu Sonuēlar bir n bulgu olmasına rağmen immnmodulasyonda, MKH ve B lenfositler arasındaki etkileşimin, hedef sahalardan biri olabileceğini desteklemektedir. MKH'in bu immnmodulatuvar mekanizmalarının, B lenfositler üzerine olan baskılayıcı ve düzenleyici rollerinin aydınlatılması ve sebeplerinin ortaya çıkarılması için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahatar Kelimeler : Mezenkimal kök hücre, B lenfosit, hücre kültürü, immnmodulasyon, IL-10.

Danışman : Doç.Tbp.Kd.Alb.Uğur MUŞABAK

ABSTRACT

Author of the thesis : **Civil Servant Biologist Meral SARPER**

Title of the thesis : **Effect of Mesenchymal Stem Cells on the Immunomodulatory Functions of B - Lymphocytes**

Thesis program : **Master of Immunology, Ankara, 2012**

It was revealed that mesenchymal stem cells (MSC) show supporting cell features have a regulatory effect on B-lymphocytes by influencing migration, proliferation and synthesis of immunoglobulins (Ig) of B-lymphocytes. The aim of this study was to investigate the effects of MSC on some immunomodulatory functions of B-lymphocytes. For this purpose, both MSC derived from human bone marrow samples by density-gradient centrifugation method and B lymphocytes obtained from healthy donors' peripheral bloods by negative selection method were cultured both separately and together through 24, 48, 72 hours, and intracellular IL-10 synthesis and surface expression level of CD25 molecule on CD5+ and CD19+B-lymphocytes were measured using flow cytometry. B-lymphocytes used in individual or co-cultures were cultured under conditions induced by pokeweed mitogen (PWM) and non-induced conditions for control. In addition, proliferation response was measured in the individual cultures and co-cultures using the XTT (2,3-bis[2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt) test, and results were compared statistically with one another. MSC stimulated by interferon gamma (IFN- γ) were used in co-cultures and the synthesis of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) was measured by flow cytometry. The synthesis of IDO in individually MSC cultures stimulated with IFN- γ was also evaluated for control. Additionally, the expressions of CD105, CD90 and HLA-DR were also measured in the MSC cultures by flow cytometry and it was detected high expression levels of these markers. The changes occurred in the cell phenotype at the co-cultures were separately evaluated at the 1M:1B, 1M:2B, 2M:1B, 2M:2B ratios of MSC and B-lymphocytes. It was detected that the surface expression of CD25 and the synthesis of IL10 in stimulated and unstimulated CD5+CD19+ B lymphocytes cultured with MSC were higher than those of alone. The highest levels of surface expression of CD25 and synthesis of IL10 in

CD5+ B lymphocytes were observed at 1M:1B, and the highest levels of synthesis of IL-10 in CD19+B were observed at 2M:1B. According to XTT test results, it was demonstrated that the proliferation response in the case of together cultivation of MSC and B-lymphocytes is overwhelming the proliferation response of either of MSC and B-lymphocytes alone, and the proliferation rate was increased with increasing rate of MSC and the proliferation rate was suppressed with increasing rate of B-lymphocytes at co-culture.

In conclusion, it was shown that MSC have the effects on some immunomodulatory functions of B-lymphocytes. This results, although preliminary, lend support to the idea that the interaction of MSC and B-lymphocytes might represent a possible promising target in the field of immunomodulation. Future studies are needed to prove causality and provide insight about these immunomodulatory mechanisms of MSC and its potential roles regarding the immunoregulation and suppression on B-lymphocytes.

Key words :Mesenchymal stem cell, B lymphocyte, cell culture, immunomodulation, IL10.

Supervisor :Assoc. Prof. Uğur MUŞABAK

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
İNGİLİZCE ÖZET	vii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xviii
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kök Hücrenin Tanımı ve Özellikleri	3
2.1.1. Kök Hücre Tipleri	3
2.1.1.1. Embriyonik Kök Hücreler	4
2.1.1.2. Fetus Kök Hücreleri	4
2.1.1.3. Kordon Kanı Kök Hücreleri	4
2.1.1.4. Erişkin Kök Hücreler	5
2.2. Mezenkimal Kök Hücreler	6
2.2.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Elde Edilmesi ve Üretilmesi	8
2.2.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Kalite Kontrolü	9
2.2.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Dondurulması (Kriyoprezervasyonu)	10
2.2.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin Morfolojik Özellikleri	10
2.2.5. Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünojenotipik Özellikleri	10
2.2.6. Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünojenolojisi	13
2.2.7. Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünojenomodülatör Özellikleri	14
2.2.7.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Edinsel İmmünite Üzerine Etkileri	14
2.2.7.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Doğal İmmünite Üzerine Etkileri	15
2.2.8. Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinikte Kullanım Alanları	16
2.2.8.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinik Kullanım Açısından Avantajları	16
2.2.8.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinik Kullanım Açısından Zorlukları	17
2.3. İmmün Sistem	18

2.3.1.	B Lenfositler	19
2.3.2.	B Lenfositlerin Gelişimi	20
2.3.2.1.	B Lenfositlerin Gelişiminde Moleküler Etkileşimler	20
2.3.2.2.	B Lenfositlerin Gelişiminde Genetik Kontrol	21
2.3.2.3.	Sekonder Lenfoid Organlarda B Lenfositlerin Gelişimi	21
2.3.3.	Hümorale İmmün Yanıtlar	22
2.3.4.	Regülatör B Hücreleri	23
2.4.	Mezenkimal Kök Hücrelerin B Lenfositler Üzerindeki Düzenleyici Etkileri	27
GEREÇ ve YÖNTEM		29
3.1.	Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	29
3.2.	Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu ve Kültürü	31
3.2.1.	Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu	31
3.2.2.	Mezenkimal Kök Hücre Kültürü	32
3.2.3.	İmmüfenotip Analiz İçin MKH Örneklerinin Hazırlanması	33
3.3.	B Lenfosit İzolasyonu ve Kültürü	34
3.3.1.	B Lenfosit İzolasyonu	34
3.3.2.	B Lenfosit Kültürü	35
3.3.3.	İmmüfenotip Analiz İçin B Lenfosit Örneklerinin Hazırlanması	35
3.4.	Mezenkimal Kök Hücre ve B Lenfosit Ko-kültürü	36
3.4.1.	İmmüfenotip Analiz İçin MKH'lerle Kültüre Edilen B Lenfosit Örneklerinin Hazırlanması	37
3.4.	Mezenkimal Kök Hücre-B Lenfosit Ko-kültüründe Proliferasyon Testi	38
3.5.	İstatistiksel Analiz	40
BULGULAR		41
4.1.	Tek Başına Kültüre Edilen MKH'lerin İmmüfenotip Analizi	41
4.2.	Tek Başına Kültüre Edilen B Lenfositlerin İmmüfenotip Analizi	43
4.3.	MKH'lerle Birlikte Kültüre Edilen B Lenfositlerin İmmüfenotip Analizi	46
4.4.	Tek Başına ve MKH'lerle Birlikte Kültüre Edilen B Lenfositlerin Karşılaştırılması	52
4.5.	Mezenkimal Kök Hücrelerin B Lenfositlerin Proliferasyonlarına Etkileri	56
4.5.1.	24. Saat MKH - B Lenfosit Ko-kültürünün Etkileşim Sonuçları	57
4.5.2.	48. Saat MKH - B Lenfosit Ko-kültürünün Etkileşim Sonuçları	60

4.5.3.	72. Saat MKH - B Lenfosit Ko-kültürünün Etkileşim Sonuçları	63
	TARTIŞMA	67
	SONUÇ ve ÖNERİLER	73
	KAYNAKLAR	74

SİMGELER ve KISALTMALAR

ACD	:	Asit-Sitrat-Dekstroz
ALCAM	:	Aktive Lökosit Hücre Adezyon Molekülü
B _{reg}	:	Regülatör B hücreleri
CD	:	Cluster of Differentiation
CFU-F	:	Colony Forming Unit
DNA	:	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	:	Etilen Diamin Tetra Asetikasit
FCS	:	Fetal Calf Serum
G ₀	:	Hücrede dinlenme fazı
G ₁	:	Hücre bölünmesine hazırlık fazı
GM-CSF	:	Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
G-SCF	:	Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör
GVHH	:	Graft Versus Host Hastalığı
HGF	:	Hepatosit Büyüme Faktörü
HKH	:	Hematopoetik Kök Hücre
HLA	:	Human Leucocyte Antigen
ICAM	:	Hücreler Arası Adezyon Molekülü
IDO	:	İndolamin 2,3-Dioksijenaz
IFN- γ	:	İnterferon gamma
Ig	:	İmmüoglobülin
IL	:	İnterlökin
ISCT	:	International Society of Cell Therapy
LFA	:	Lenfosit Fonksiyon İlişkili Antijen
MKH	:	Mezenkimal Kök Hücre
MNH	:	Mononükleer Hücre
M-CSF	:	Megakaryosit Koloni Uyarıcı Faktör
NCAM	:	Nöral Hücre Adezyon Molekülü
NK	:	Doğal Öldürücü Lenfositler
NO	:	Nitrik Oksit

PECAM	:	Trombosit Endotelyal Hücre Adezyon Molekülü
PGE2	:	Prostaglandin E2
PWM	:	Pokeweed Mitogen
RA	:	Romatoid Artrit
SCF	:	Kök Hücre Faktörü
SLE	:	Sistemik Lupus Eritematosus
Tc	:	Sitotoksik T hücresi
TGF- β	:	Transforming Growth Factor- β
Th	:	T helper (yardımcı T) hücresi
T _{reg}	:	Regülatör T hücreleri
TNF	:	Tümör Nekroz Faktör
VCAM	:	Vasküler Hücre Adezyon Molekülü
VLA	:	Very Late Antigen

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	Kök hücre hiyerarşisi.	3
2.2.	Kök hücre tipleri.	5
2.3.	Kültüre edilmiş MKH ve HKH'lerin inverted mikroskoptaki görüntüsü.	7
2.4.	Kültüre edilmiş MKH'lerin sırasıyla 3., 7. ve 14. günlerde inverted mikroskoptaki CFU-F görüntüsü.	9
2.5.	Mezenkimal kök hücreler ile immün sistem hücrelerinin etkileşimi.	14
2.6.	Kemik iliği (a) ve sekonder lenfoid organlarda (b) B hücre gelişimi.	22
3.1.	MKH'lerin üretim basamakları.	32
3.2.	MKH'ler ve B lenfositlerin PWM ile uyarılmadan (a) ve PWM ile uyarılarak (b) 6 kuyucuklu platelerdeki ekim şeması.	36
3.3.	MKH - PWM ile uyarılmış B lenfosit ko-kültürünün [1M:1B (a), 1M:2B(b), 2M:1B (c), 2M:2B (d)] inverted mikroskoptaki görüntüsü.	37
3.4.	MKH - PWM ile uyarılmamış B lenfosit ko-kültürünün [1M:1B (a), 1M:2B (b), 2M:1B (c), 2M:2B (d)] inverted mikroskoptaki görüntüsü.	37
3.5.	MKH'ler ve B lenfositlerin PWM ile uyarılmadan (a) ve PWM ile uyarılarak (b) 96 kuyucuklu platelerdeki ekim şeması.	39
4.1.	IFN- γ ile uyarılmış MKH kültürlerinde ifade edilen-edilmeyen yüzey belirteçlerinin akım sitometri görüntüleri [CD45-HLADR (a), CD34-HLADR (b), CD90-IDO (c), CD105-IDO (d)].	41
4.2.	IFN- γ ile uyarılmamış MKH kültürlerinde ifade edilen-edilmeyen yüzey belirteçlerinin akım sitometri görüntüleri [CD45-HLADR (a), CD34-HLADR (b), CD90-IDO (c), CD105-IDO (d)].	41
4.3.	IFN- γ ile uyarılmış (M+) ve uyarılmamış (M-) MKH kültürlerinde CD105+IDO+ (a), CD90+IDO+ (b) ve HLA-DR+ (c) hücre yüzdeleri.	42

4.4.	PWM ile uyarılmış B lenfosit kültürlerinde ifade edilen CD19, CD25 ve CD5 yüzey belirteçleri ile CD5+ ve CD19+B lenfositler tarafından sentezlenen IL-10 düzeylerinin akım sitometri görüntüleri [CD25-CD19 (a), CD5-IL 10 (b), CD19-IL 10 (c)].	43
4.5.	PWM ile uyarılmamış B lenfosit kültürlerinde ifade edilen CD19, CD25 ve CD5 yüzey belirteçleri ile CD5+ ve CD19+B lenfositler tarafından sentezlenen IL-10 düzeylerinin akım sitometri görüntüleri [CD25-CD19 (a), CD5-IL 10 (b), CD19-IL 10 (c)].	43
4.6.	PWM ile uyarılmış (B+) ve uyarılmamış (B-) B lenfosit kültürlerindeki CD5+ (a), CD19+ (b), CD1d+ (c) ve CD19+CD25+ (d) B lenfosit yüzdeleri.	44
4.7.	PWM ile uyarılmış (B+) ve uyarılmamış (B-) B lenfosit kültürlerindeki CD5+ (a) ve CD19+ (b) B lenfositlerden sentezlenen IL-10 düzeyleri.	45
4.8.	MKH + PWM ile uyarılmış B lenfosit ko-kültürlerinde ifade edilen CD19, CD25 ve CD5 yüzey belirteçleri ile CD5+ ve CD19+ B lenfositler tarafından sentezlenen IL-10 düzeylerinin akım sitometri görüntüleri [CD25-CD19 (a), CD5-IL 10 (b), CD19-IL 10 (c)].	47
4.9.	MKH + PWM ile uyarılmamış B lenfosit ko-kültürlerinde ifade edilen CD19, CD25 ve CD5 yüzey belirteçleri ile CD5+ ve CD19+ B lenfositler tarafından sentezlenen IL-10 düzeylerinin akım sitometri görüntüleri [CD25-CD19 (a), CD5-IL 10 (b), CD19-IL 10 (c)].	47
4.10.	24.saat MKH + B lenfosit [PWM ile uyarılmış (B+) ve uyarılmamış (B-)] ko-kültürlerindeki CD5+ (a), CD19+ (b) ve CD19+CD25+ (c) B lenfosit yüzdeleri.	48
4.11.	24.saat MKH + B lenfosit [PWM ile uyarılmış (B+) ve uyarılmamış (B-)]ko-kültürlerinde CD5+ (a) ve CD19+ (b) B lenfositlerden sentezlenen IL-10 düzeyleri.	49

4.12.	48.saat MKH + B lenfosit [PWM ile uyarılmış (B+) ve uyarılmamış (B-)]ko-kültürlerindeki CD5+ (a), CD19+ (b) ve CD19+CD25+ (c) B lenfosit yüzdeleri.	50
4.13.	48.saat MKH + B lenfosit [PWM ile uyarılmış (B+) ve uyarılmamış (B-)] ko-kültürlerindeki CD5+ (a) ve CD19+ (b) B lenfositlerden sentezlenen IL-10 düzeyleri.	50
4.14.	72.saat MKH + B lenfosit [PWM ile uyarılmış (B+) ve uyarılmamış (B-)] ko-kültürlerinde CD5+ (a), CD19+ (b) ve CD19+CD25+ (c) B lenfosit yüzdeleri.	51
4.15.	72.saat MKH + B lenfosit [PWM ile uyarılmış (B+) ve uyarılmamış (B-)] ko-kültürlerindeki CD5+ (a) ve CD19+ (b) B lenfositlerden sentezlenen IL-10 düzeyleri.	52
4.16.	Tek başına (B+) ve MKH'lerle birlikte kültüre edilen PWM ile uyarılmış B lenfositlerdeki CD5+ (a), CD19+ (b) ve CD19+CD25+ (c) B lenfosit yüzdelerinin karşılaştırılması.	53
4.17.	Tek başına (B+) ve MKH'lerle birlikte kültüre edilen PWM ile uyarılmış B lenfositlerdeki CD5+ (a) ve CD19+ (b) B lenfositlerden sentezlenen IL-10 düzeylerinin karşılaştırılması.	54
4.18.	Tek başına (B+) ve MKH'lerle birlikte kültüre edilen PWM ile uyarılmamış B lenfositlerdeki CD5+ (a), CD19+ (b) ve CD19+CD25+ (c) B lenfosit yüzdelerinin karşılaştırılması.	55
4.19.	Tek başına (B+) ve MKH'lerle birlikte kültüre edilen PWM ile uyarılmamış B lenfositlerdeki CD5+ (a) ve CD19+ (b) B lenfositlerden sentezlenen IL-10 düzeylerinin karşılaştırılması.	56
4.20.	MKH – uyarılmamış B lenfosit ko-kültürünün 24. saat XTT sonucundaki 1MKH-1B (a), 1MKH-2B (b), 2MKH-1B (c), 2MKH-2B (d) oranlarının absorbans değerlerinin karşılaştırılması.	57

4.21.	MKH - PWM ile uyarılmış B lenfosit ko-kültürünün 24. saat XTT sonucundaki 1MKH-1B (a), 1MKH-2B (b), 2MKH-1B (c), 2MKH-2B (d) oranlarının absorbans değerlerinin karşılaştırılması.	58
4.22.	MKH'lerin-PWM ile uyarılmış (B+) ve uyarılmamış (B-) B lenfosit ko-kültürünün 24. saat XTT sonucundaki proliferasyon yüzdelerinin (a) ve absorbans değerlerine göre proliferasyon oranlarının (b) karşılaştırılması.	59
4.23.	MKH - uyarılmamış B lenfosit ko-kültürünün 48. saat XTT sonucundaki 1MKH-1B (a), 1MKH-2B (b), 2MKH-1B (c), 2MKH-2B (d) oranlarının absorbans değerlerinin karşılaştırılması.	60
4.24.	MKH - PWM ile uyarılmış B lenfosit ko-kültürünün 48. saat XTT sonucundaki 1MKH-1B (a), 1MKH-2B (b), 2MKH-1B (c), 2MKH-2B (d) oranlarının absorbans değerlerinin karşılaştırılması.	61
4.25.	MKH'lerin-PWM ile uyarılmış (B+) ve uyarılmamış (B-) B lenfosit ko-kültürünün 48. saat XTT sonucundaki proliferasyon yüzdelerinin (a) ve absorbans değerlerine göre proliferasyon oranlarının (b) karşılaştırılması.	62
4.26.	MKH - uyarılmamış B lenfosit ko-kültürünün 72. saat XTT sonucundaki 1MKH-1B (a), 1MKH-2B (b), 2MKH-1B (c), 2MKH-2B (d) oranlarının absorbans değerlerinin karşılaştırılması.	63
4.27.	MKH - PWM ile uyarılmış B lenfosit ko-kültürünün 72. saat XTT sonucundaki 1MKH-1B (a), 1MKH-2B (b), 2MKH-1B (c), 2MKH-2B (d) oranlarının absorbans değerlerinin karşılaştırılması.	64
4.28.	MKH'lerin-PWM ile uyarılmış (B+) ve uyarılmamış (B-) B lenfosit ko-kültürünün 72. saat XTT sonucundaki proliferasyon yüzdelerinin (a) ve absorbans değerlerine göre proliferasyon oranlarının (b) karşılaştırılması.	65

TABLÖLAR

Tablo		Sayfa
2.1.	Mezenkimal kök hücrelerin antijenik özellikleri.	11
2.2.	Mezenkimal kök hücrelerin taşıdıkları adezyon molekülleri.	12
4.1.	Tek başına kültüre edilen MKH'lerin immüfenotip analizi.	41
4.2.	Tek başına kültüre edilen B lenfositlerin immüfenotip analizi.	43
4.3.	MKH-PWM ile uyarılmış B lenfosit ko-kültürlerindeki B lenfositlerin immüfenotip analizi.	46
4.4.	MKH-uyarılmamış B lenfosit ko-kültürlerindeki B lenfositlerin immüfenotip analizi.	46
4.5.	MKH-B lenfosit (PMW ile uyarılmış ve uyarılmamış) ko-kültürlerinin 24, 48 ve 72. saat sonunda XTT testi ile elde edilen proliferasyon yanıtları.	56

GİRİŞ

Yoğun differansiyasyon ve rejenerasyon yeteneklerinden dolayı kök hücrelere olan ilgi giderek artmakta ve her yıl birçok yeni çalışmalar yapılmaktadır. Vücudumuzdaki kas, karaciğer, cilt hücreleri gibi hücrelerin hedefleri bellidir ve bu hücreler bölündükleri zaman yine kendileri gibi bir hücre oluştururlar. Oysa yoğun differansiyasyon ve rejenerasyon kapasitesine sahip olan kök hücrelerin bu hücrelerden farklı olarak belirlenmiş bir fonksiyonları yoktur ve aldıkları sinyallere göre farklı hücre tiplerine dönüşebilirler. Bu nedenle önümüzdeki on yıl, hücre tedavilerinin çok konuşulacağı, doku mühendisliği ve hücre tedavilerinde bu hücrelerin uzun süre ilk tercih edilecek hücreler olacağına işaret etmektedir. Kök hücreler; bölünme ve farklılaşma kapasitelerine göre değerlendirildiklerinde totipotent, pluripotent ve multipotent kök hücrelerden, elde edildikleri kaynaklara göre değerlendirildiklerinde ise; embriyonik, fetus, kordon kanı ve erişkin dokularından elde edilen kök hücrelerden bahsedilir (1).

Mezenkimal kök hücreler (MKH), otolog organ kök hücre üretiminin sıkıntılı olması, embriyonel, fetus ve kadavradan elde edilen kök hücrelerinin allojenik oluşları, özellikle embriyonel hücrelerde teratom oluşum riskleri ve bu hücrelerin kullanımlarının etik olmaması gibi nedenlerden dolayı klinik uygulamalarda ilgi duyulan hücrelerden biri olmuştur. MKH'ler; kemik iliği mikro çevresinde, kemik homeostazisi ve hematopoezini destekleyen elementlerden biri olup in vitro şartlarda uygun koşullar sağlandığında kemik, kıkırdak ve yağ hücrelerine farklılaşabilme yeteneğine sahip olan mezodermal orijinli, multipotent, erişkin kök hücrelerdir. Destek hücresi özelliği taşıyan MKH'ler, immünojenitelerinin düşük ve immüniteyi baskılayıcı özelliklerinin olması nedeniyle tıbbın birçok alanında kullanılma potansiyeline sahiptirler. İn vitro çalışmalar, allojenik lenfositlerin MKH'lere karşı çoğalma yanıtının düşük olduğunu, MKH'lerin, allo-antijen ve mitojenlere karşı oluşan T lenfosit uyarısını, sitotoksik T lenfosit ile dendritik hücre oluşumunu ve B hücre proliferasyonunu engelleyerek immün baskılayıcı etki gösterdiklerini kanıtlamaktadır. İn vivo olarak da immün düzenleyici etkileri kanıtlanmış olup özellikle Graft versus host hastalığı (GVHH), organ allograft reddinin önlenmesi ve otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılabilecekleri belirtilmiştir(2,3).

Edinsel immün sistemin önemli bir üyesi olan B lenfositler periferik kan lenfositlerinin %15-20'sini oluşturmaktadırlar. Başlıca görevleri: antikor sentezleyen plazma hücrelerine farklılaşarak yabancı antijenlere karşı özgül immün yanıt oluşturmak, T hücrelerine antijen sunmak ve salgıladıkları sitokinlerle immün düzenleme yapmaktır. B lenfositlerin düzenleyici fonksiyonları; sentezledikleri antikorlarla, direk hücreler arası etkileşimle veya sitokin üretimiyle olmaktadır. B lenfositlerin enfeksiyonlarda, otoimmünitede ve kanser gelişimindeki düzenleyici veya baskılayıcı tarzda etkilerinin, sentezledikleri sitokinler arasından daha çok IL-10 ve TGF- β gibi sitokinleri salgılamaları neticesinde gerçekleştiği gösterilmiştir. IL-10 sitokinini sentezleyen B lenfositleri, B lenfosit alt grupları şeklinde sınıflandırılmış ve bu düzenleyici/baskılayıcı özellikteki hücreler regülatör B hücreleri (Breg veya B 10 hücreleri) olarak adlandırılmışlardır (4,5).

MKH'lerin, B lenfositler üzerinde düzenleyici rol oynadığı yapılan çalışmalar la gösterilmiştir. Ancak B lenfositlerinin immünmodülatör fonksiyonları üzerine etkilerinin araştırılması ile ilgili çalışmalar çok kısıtlı olmakla birlikte dünya literatüründe bu konu ile ilgili yayınlanmış çok az çalışma mevcuttur.

Bu çalışmanın amacı; MKH'lerin B lenfositlerin immünmodülatör fonksiyonlarına olan etkilerini ortaya çıkararak bu etkilerin olumlu ve olumsuz yönlerini tartışmaya açmak, B lenfositlerin MKH'lerin proliferasyon kabiliyetleri üzerinde etkili olup olmadığını araştırmak ve özellikle B lenfositlerin rol aldığı bağışıklık sistemiyle ilgili hastalıkların tedavisinde MKH'lerin kullanılıp kullanılmayacağını belirlemeye çalışmaktır. Ayrıca bu çalışmanın in vivo araştırmalar için öncül bir çalışma olarak bilime katkı sağlayacağına da inanmaktayım.

GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücrenin Tanımı ve Özellikleri

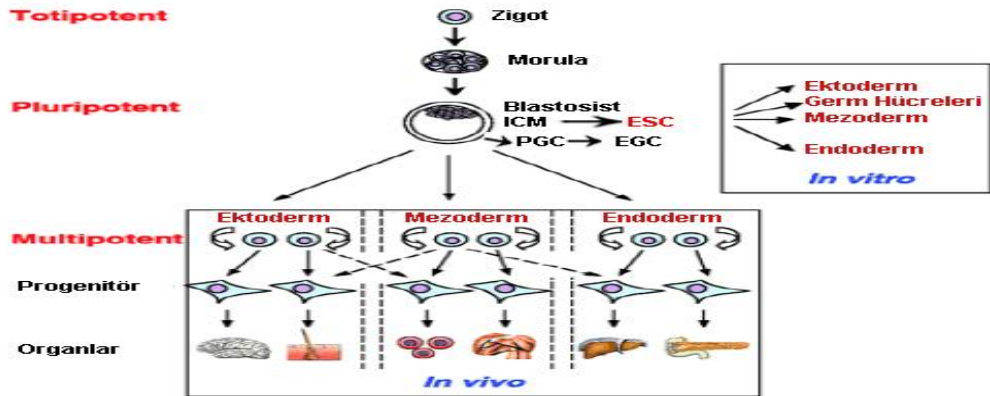
Farklı hücre tiplerine dönüşebilme (in vivo ve in vitro ortamda) ve kendisini yenileyebilme özelliğine sahip olan hücelere kök hücreler adı verilir. Telomeraz ifadelerinin yüksek olmasından dolayı kendilerini yenileyebilme özelliklerini yaşam boyu sürdürebildikleri için in vitro koşullarda bol miktarda üretilebilirler.

Kök hücrelerin başlıca özellikleri;

- Hasar gören dokuyu işlevsel olarak yeniden yapılandırabilirler.
- Çok sayıda farklılaşmış yeni hücreler oluşturabilir ve bu yeteneklerini in vitro ortamlarda da gösterebilirler.
- Uygun bir çevreye yerleşme yeteneğindedirler.
- Özelleşmemiş hücrelerdir. Dolayısıyla dokuya has özellik taşımazlar. Ancak genlerin kontrolü altında aldıkları sinyale göre özelleşmiş hücelere dönüşürler (farklılaşma) (1,6).

2.1.1. Kök Hücre Tipleri

Kök hücreleri bölünme ve farklılaşma kapasitelerine göre totipotent, pluripotent ve multipotent olmak üzere 3 grup altında tanımlamak mümkündür (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Kök hücre hiyerarşisi (7).

Vücuttaki tüm hücelere dönüşebilme yeteneğine sahip olan ilk hücreye (örn: zigot) **totipotent hücre** denir ve bu hücre yetişkin bir organizmanın meydana gelmesi için gereksinim duyulan bütün genleri taşır. Bundan sonra embriyo 16 blastomerli evrede blastokist adı verilen içi boşluklu hücre topluluklarına (blastula evresi) dönüşür. Blastokisti oluşturan hücre kitlesi içindeki bir grup hücre (embriyoblast) son derece önemli bir role sahip olup, 3 temel embriyonik tabaka olan; endoderm, ektoderm ve mezodermi oluştururlar. Bu hücelere **pluripotent hücreler** (embriyonik kök hücreler) denir. Bunlar bir canlıyı meydana getirmezler yani totipotent değildirler (6). Kök hücreler, gelişimin ilerleyen dönemlerinde (fetusta, kordon kanında, kemik iliğinde ve yetişkin vücudunda) daha özel görevlere sahip olmaya başlarlar ve giderek daha sınırlı bir bölünme ve farklılaşma yeteneği taşıyan erişkin tip kök hücelere dönüşürler. Biraz daha özelleşmiş bu hücelere **multipotent hücreler** denir (örneğin; mezenkimal kök hücreler bu tür hücrelerdendir) (8).

Kök hücreler elde edildikleri kaynağa göre değerlendirildiğinde ise; embriyonik, fetus, kordon kanı ve erişkin dokularından elde edilen kök hücreler olmak üzere sınıflandırılmaktadır (şekil 2.2) (9,10).

2.1.1.1. Embriyonik Kök Hücreler

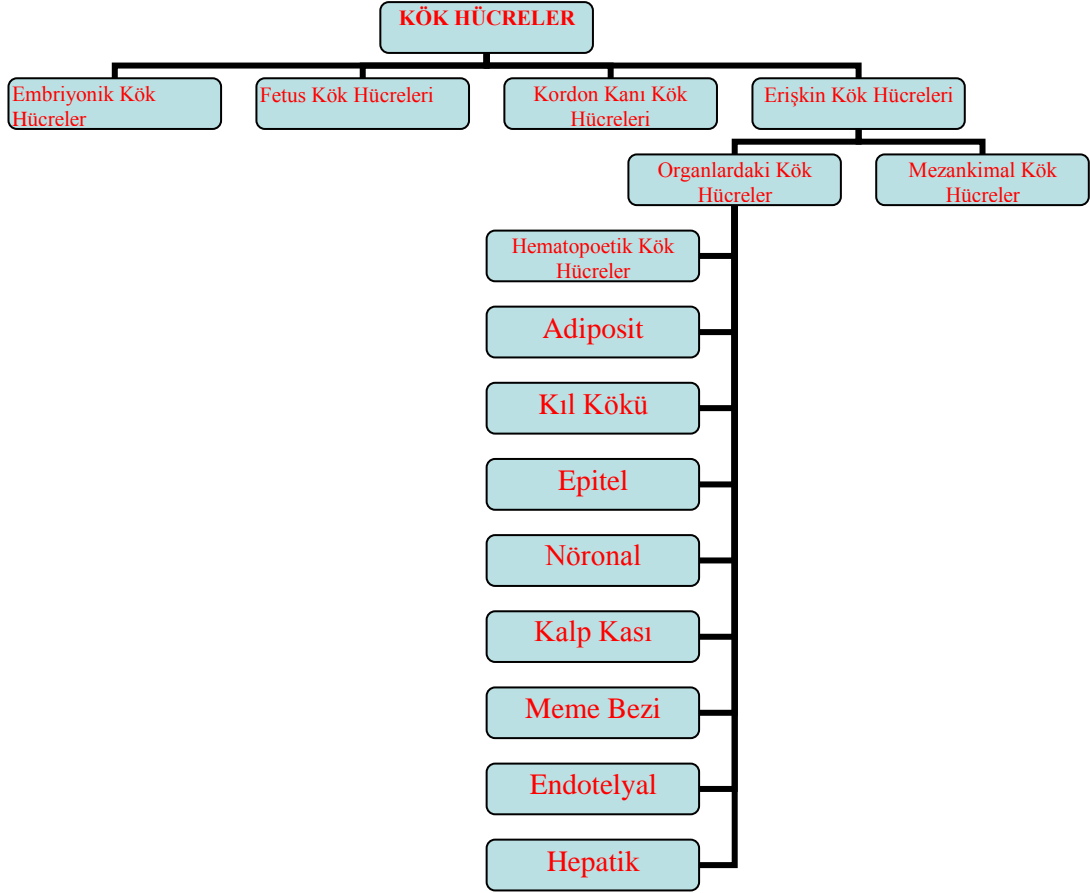
Blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilen, çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilen ve yüksek telomeraz ifadeleri (ekspresyon) nedeniyle sonsuz DNA sentez yeteneği olan hücrelerdir (11,12).

2.1.1.2. Fetus Kök Hücreleri

Klinik kullanıma henüz girmese de araştırmalarda önemli bir kök hücre kaynağı olarak gösterilmiştir. Pluripotent olan bu hücreler; kendilerini yenileme ve sınırsız sayıda bölünme özelliğine sahiptirler (13).

2.1.1.3. Kordon Kanı Kök Hücreleri

Kordon kanı; kanda bulunan tüm hücresel elemanları ve kemik iliği kök hücrelerini % 0.2-2 oranında içeren, plasentadan fetüse besin maddelerini taşıyan rezidüel bir kandır. Kordon kanı kök hücreleri doğum henüz tamamlanmadan ya da doğum bitince plasentanın ayrılmasından hemen sonra göbek kordonu toplardamarından elde edilirler (14).



Şekil 2.2. Kök hücre tipleri (15).

2.1.1.4. Erişkin Kök Hücreler

Gelişimin ileri evrelerinde görülen bu hücreler, organizmanın yaşamı boyunca daha sınırlı olmakla birlikte kendilerini yenileyebilme özelliğini korurlar. Yüksek telomeraz aktivitesine sahip oldukları halde embriyonik kök hücrelere göre daha kısıtlı bir farklılaşma potansiyelleri vardır (16).

En iyi tanımlanmış erişkin kök hücreler;

Mezenkimal Kök Hücreler

Organlardaki Kök Hücreler: Kemik iliği: Hematopoetik kök hücreler (HKH) (Kanın şekilli elemanlarının ve immün sistem hücrelerininin üretilmesinden sorumlu olan hücrelerdir. Yüzey belirteçleri olarak başlıca CD34, CD14, CD45, CD133 ve c-kit taşırlar. Morfolojik olarak yuvarlaktırlar ve yüzeylere yapışma özellikleri yoktur) (17,18), yağ doku: Adiposit kök hücresi (kemik iliğinden elde edilen kök hücreler kadar farklılaşma

yeteneğine sahiptirler) (19), deri: Epidermal kök hücre (20), gastrointestinal sistem: Epitel kök hücresi (21), santral sinir sistemi: Nöronal kök hücre (22), kalp: Kalp kası kök hücresi (23), meme: Meme bezi kök hücresi, damar: Endotelial kök hücre, karaciğer: Hepatik kök hücre gibi organlardaki kök hücreler daha çok buldukları bölgelerdeki hücre yenilenmesinden sorumludurlar (15). Bu hücreler fenotipik olarak hücre yüzey belirteçleri ile ayırt edilebilmektedirler.

2.2. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH)

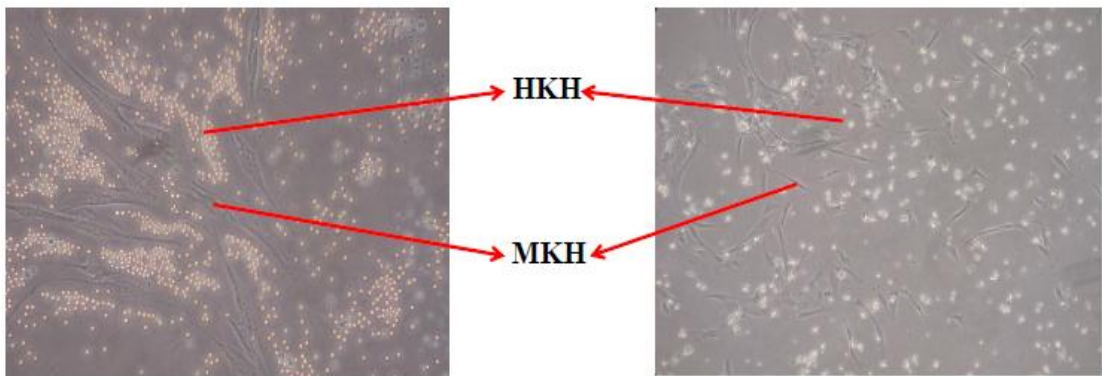
Kemik iliğinde hematopoetik olmayan kök hücrelerin varlığı Alman patolog Cohnheim tarafından bulunmuş olmakla birlikte MKH'ler ilk olarak 1970'lerde Friedenstein ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Friedenstein, kemik iliği aspiratının fetal buzağı serumu içeren ortama yayılması sonucunda adezyon yeteneği olan, kemik, kıkırdak ve yağ hücrelerine farklılaşabilen, morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen kolonilerin varlığını bildirmiş ve bu hücreleri fibroblast kolonisi yapan ünit (CFU-F) olarak tanımlamıştır (2). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda bu hücrelerin, her üç germ yaprağından köken alan hücre ve dokulara farklılaşabilen, non-hematopoetik multipotent kök hücreler olduğu anlaşılmış ve günümüzde de mezodermal kökenli hücrelere farklılaşma yeteneklerinden dolayı MKH'ler olarak adlandırılmışlardır (24).

MKH'ler; kemik iliği mikro çevresinde, kemik homeostazisi ve hematopoezini destekleyen elementlerden biri olup in vitro şartlarda uygun koşullar sağlandığında kemik, kas, kıkırdak, tendon ve yağ hücrelerine (mezodermal hücreler); non-mezenşimal olarak nöron ve astrositler (ektodermal hücreler) ile hepatositlere (endodermal hücreler) farklılaşabilme yeteneğine sahip olan mezodermal orijinli multipotent hücrelerdir. Kemik iliği stromasından köken alan MKH'ler “destek hücresi” özelliği taşımaları nedeni ile HKH'lerle yakın etkileşimde olup onların büyümesine ve farklılaşmasına katkıda bulunan birçok büyüme faktörü (Megakaryosit koloni uyarıcı faktör: M-CSF, Kök hücre faktörü: SCF gibi), sitokin (İnterlökin(IL)-1 α ve β , IL-6,7,8,11,14,15) ve trombopoetin salgırlar. Bu nedenle Uluslar arası Hücre Tedavileri Topluluğu (International Society of Cell Therapy: ISCT) tarafından MKH'ler “mezenkimal stromal hücre” veya “multipotent mezenkimal stromal hücre” olarak da adlandırılmaktadırlar.

Kemik iliğindeki her $10^4 - 10^5$ çekirdekli hücreden birinin MKH olduğu bilinmektedir. Bu oran kordon kanında 10^8 hücrede 1'e düşmektedir (25). MKH sayısı yaşla ters orantılı olarak değişmekte olup yeni doğanda yaklaşık $1/10^4$ olan oranın erişkinde $1/25.10^4$ 'e düştüğü ileri sürülmektedir. Bir diğer önemli bulgu da yaşla birlikte meydana gelen farklılığın sadece sayısal azalmadan ibaret olmadığı doku gelişimi, hücre bölünmesi ve immünolojik özelliklerinde de değişiklikler meydana gelmesidir.

MKH'ler bugün kemik iliği, kemik trabeküler dokusu, kordon kanı, amniyon mayi, plasenta, yağ dokusu, tendonlar, sinovyal membran, karaciğer ve diş gibi birçok farklı dokudan elde edilebilmektedirler. Bu dokulardan elde edilen MKH'ler biyolojik ve morfolojik olarak birbirine benzemekle beraber farklı ortamlarda gelişmelerinden dolayı bu hücrelerin immünomodulatuvar özelliği, farklılaşma yeteneği ve in vivo etkinliği farklıdır.

MKH'ler; içerisinde multipotent erişkin progenitör hücreler (multipotent adult progenitor cells: MAPCs), multilineage uyarılabilir kök hücreler (marrow-isolated adult multilineage inducible: MIMAI) ve çok küçük embriyonik hücre benzeri kök hücreleri (very small embryonic-like: VSEL) bulduran heterojen bir topluluktur. Bu hücrelerin MKH ve HKH'lerin öncülü olduğu düşünülmektedir. Onarıcı ve iyileştirici özellikleri nedeniyle bugün için üzerinde en çok durulan ve araştırılan kök hücreler, erişkin HKH'ler ve stromal kaynaklı MKH'lerdir. Kemik iliğinin in vitro kültürlerinde plastik zeminine tutunan hücreler MKH'ler, süpernatantda yüzen hücreler ise farklılaşmamış veya farklılaşmış hematopoetik hücrelerdir (Şekil 2.3) (26).



Şekil 2.3. Kültüre edilmiş MKH ve HKH'lerin inverted mikroskoftaki görüntüsü.

ISCT tarafından MKH'ler için 3 tanımlayıcı özellik bildirilmiştir:

1. Standart kültür ortamında plastik yüzeye yapışabilmeleri
2. CD105(SH2), CD73(SH3/SH4), CD90 gibi hücre yüzey belirteçlerini ifade etmeleri ancak CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79, CD19, HLA-DR gibi hematopoetik belirteçleri bulundurmamaları
3. İn vitro koşullarda kemik, yağ ve kıkırdak hücrelerine farklılaşabilmeleri (27).

Farklılaşabilme yetenekleri ise;

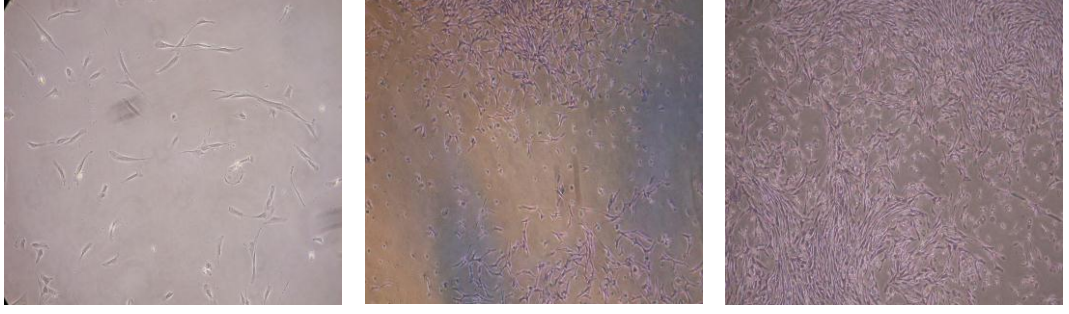
- Osteojenik; Von Kossa, Alizarin Red, Alkalen Fosfataz (+)
- Adipojenik; Oil red (+)
- Kondrojenik; Alcian blue (+) boyaları ile gösterilebilir (28).

2.2.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Elde Edilmesi ve Üretilmesi

Birçok farklı dokudan elde edilen MKH'ler, klinik kullanımda daha çok kemik iliği, periferik kan, kordon kanı ve hatta yağ dokusundan elde edilmektedirler. Periferik kan için granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) ile indüksiyon sonrası aferez yöntemi tercih edilirken, kemik iliği ve kordon kanı için kaynağından direk alım yöntemi uygulanmaktadır. Bu hücrelerin alınması sırasında asit-sitrat-dekstroz (ACD) içeren solüsyonlar ile prezervatifsiz heparin içeren antikoagülan maddeler kullanılmakta olup hücreler kaynağından alındıktan sonra

- 1- Dansite gradient yöntemi ile
- 2- Basit santrifüj yöntemi ile
- 3- Pozitif seçim ± Negatif seçim ile izole edilirler (29).

İzolasyon sonrasında elde edilen mononükleer hücreler (MNH) % 10-20 arasında değişen oranlarda fetal calf serum (FCS) içeren besi yeri ortamında (MesenCult: Mesenchymal Stem Cell Researchers Standardize Their Culture, α -MEM: Minimum Essential Eagle's Media, DMEM: Dubelco's Modified Eagle Media, RPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute 1640, IMDM: Iscove's Modified Dubelco's Media) flasklara ekilerek inkübatörde (37°C'de %5 CO₂ basıncı altında) kültüre alınır (30). İlk ekimden 72 saat sonra yapışmayan hematopoetik hücreleri ortamdan uzaklaştırmak amacıyla besiyeri değişiminin yapılmasının ardından her 3 günde bir tekrar besiyeri değişimi yapılır. Genellikle 7-10. günlerde CFU-F oluşur (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Kültüre edilmiş MKH'lerin sırasıyla 3., 7. ve 14. günlerde inverted mikroskoptaki CFU-F görüntüsü.

Kemik iliği kaynaklı MNH kültüründe MKH görünümlü iğsi hücreler 14. günde kültür flaskının %80'ini kaplamaktadır. Bu aşamadan sonra hücrelerin tripsinizasyon yöntemi (Trypsin-EDTA kullanılarak) ile yerinden kaldırılması ve takiben birinci pasaj için yeniden ekilmesi gereklidir. İlk pasajdan sonraki pasajlarda hücre çoğalması belirgin olarak artar ve hücre çoğalması % 70 oranına ulaşıncaya yeni pasaj gerekir. İnsan çalışmaları için en uygun hücreler genellikle üçüncü pasaj sonrasında elde edilmektedir. Çok fazla pasajlanmış hücreler farklılaşabilme olasılığı nedeniyle kullanılmamalıdır. Daha çok 3-10. pasaj arasındaki hücreler kullanılmalıdır (29).

2.2.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Kalite Kontrolü

- a. Hücre sayımı; hücre sayım kameraları ile yapılır (Thoma lamı, *Neugot chamber*).
- b. Canlılık; en sık *Trypan – Blue* ile bakılır. Çalışmalar için %95'in üzerinde canlılık varlığı önerilmektedir.
- c. Morfolojik analiz; özellikle iğsi hücrelerin varlığı tercih edilirken poligonal hücreler farklılaşmaya başlamış hücreler olarak değerlendirilir.
- d. İmmünofenotipleme; MKH için en sık kullanılan tanımlama panelleri şunlardır: CD73(+), CD105(+), CD44(+), CD29(+), CD90(+), CD166(+), Stro-1(+), CD45(-), CD34(-), CD13(+), CD14(-), CD31(-), HLA-DR(-).
- e. Farklılaşma yeteneğinin ölçümü.
- f. Mikrobiyolojik analiz yapılır.
- h. Diğer; Hücrelerin bölünme yeteneklerinin takibi açısından özellikle telomer uzunluğu ve telomeraz enzim aktivitesinin tayini yapılır (29).

2.2.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Dondurulması (Kriyoprezervasyonu)

MKH'lerin saklanması için en uygun ısı; $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ile $-175\text{ }^{\circ}\text{C}$ arasındadır. $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 6 ay, $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de ise sonsuza dek saklanabileceği düşünülmektedir. Dondurulacak olan hücreler, tripsinizasyon yöntemi ile yerinden kaldırıldıktan sonra santrifüj tüpü içerisinde pellet haline getirilerek buz içerisine alınır. Pellet haline getirilen bu hücreler her bir kriyovialde bir milyon hücre olacak şekilde FCS ile seyreltilir. Son hacmin %10'u kadar dimetilsülfoksit (DMSO), hücre solüsyonu içerisine damlatma usulüyle eklendikten sonra tüm solüsyon eşit bir şekilde kriyoviallere bölünür ve bu kriyovialler $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 1 saat, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 1 gece bekletilerek ertesi gün sıvı azot tankına ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) kaldırılırlar.

2.2.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin Morfolojik Özellikleri

MKH'ler kültür ortamında ışık veya faz kontrast mikroskobu ile incelendiğinde fusiform şekilli, fibroblast benzeri bir görünümde dirler. Fibroblastlardan morfolojik olarak en önemli farkları çekirdek yerleşiminin fibroblastlarda asimetrik olmasına karşın bu hücrelerde simetrik olmalarıdır (28).

2.2.5. Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünojenotipik Özellikleri

Kültür ortamında çoğaltılmış MKH'lerin antijenik özelliklerine bakıldığında kendilerine has bir belirteç taşımadıkları ancak endotel, epitel ve kas hücrelerine benzer immünojenotipik özelliklere sahip oldukları görülmektedir (31). MKH'ler CD45, CD34, CD14, CD11 gibi hematopoetik belirteçleri ve CD80, CD86, CD40 gibi ko-stimülatör molekülleri ifade etmezlerken, CD105 (SH2) ve CD73 (SH3/4), CD90 (thy-1), STRO-1 (fibroblast yüzey belirteci), CD71 (transferin resöptör), CD106, CD146, CD13, CD44 ve HLA sınıf-I molekülünü (düşük seviyede) taşırlar (32,33) (Tablo 1). Farklı dokulardan elde edilen MKH'lerin immünojenotipik özellikleri genel olarak birbirine benzemekle birlikte aralarında bazı farklılıklar da vardır. Örneğin, kemik iliğinden elde edilen MKH'ler yüzeylerinde CD106 taşırlarken CD49d taşımamakta; buna karşılık yağ dokusundan elde edilenler CD49d taşırlarken, CD106 taşımamaktadırlar (34).

Erişkin MKH'lerinin yüzeylelerinde düşük seviyede HLA sınıf-I antijenleri ifade edilirken, HLA sınıf-II antijenleri sadece sitoplazmada bulunmaktadır. Fetus karaciğerinden kaynaklanan MKH'lerde ise hücre yüzeyinde ve sitoplazmasında HLA sınıf-II antijenleri bulunmaktadır (35,36). Bu bulgular MKH antijen ifadesinin fetal yaşamdan erişkin yaşama geçişte değiştiğini düşündürmektedir.

Tablo 2.1. Mezenkimal kök hücrelerin antijenik özellikleri (37)

Antijen	CD Numarası	Ekspresyon
Hematopoietik kök hücre belirteci	CD 34	Negatif
Lökosit ortak antijeni	CD 45	Negatif
LPS reseptör	CD 14	Negatif
T lenfosit belirteci	CD 3	Negatif
B lenfosit belirteci	CD 19	Negatif
HLA-DR		Negatif
Lewis X	CD 15	Negatif
T 6	CD 1a	Negatif
Endoglin	CD 105	Pozitif
5'terminal nükleotidaz	CD 73	Pozitif
SH4	CD 73	Pozitif
Thy-1	CD 90	Pozitif
Büyüme Faktörü ve Sitokin Reseptörleri		
IL -1 reseptör	CD 121	Pozitif
IL -2 reseptör	CD 25	Negatif
IL -3 reseptör	CD 123	Pozitif
IL -4 reseptör	CD 124	Pozitif
IL -6 reseptör	CD 126	Pozitif
IL - 7 reseptör	CD 127	Pozitif
IL - γ reseptör	CDw119	Pozitif
Tümör nekroz faktör alfa reseptör	CD120	Pozitif
Fibroblast büyüme faktör reseptör		Pozitif
Platelet kaynaklı büyüme faktör reseptör	CD140a	Pozitif
Transferin reseptörü	CD71	Pozitif

MKH'ler ve HKH'ler fibronektin, laminin, kollajene bağlanmadan sorumlu olan integrin ailesi ve L-Selektin gibi birçok adezyon molekülünü ortak olarak bulundurlar (Tablo 2).

Tablo 2.2. Mezenkimal kök hücrelerin taşıdıkları adezyon molekülleri (37).

Adezyon molekülü	CD Numarası	Ekspresyon
ALCAM	CD166	Pozitif
ICAM-1	CD54	Pozitif
ICAM-2	CD102	Pozitif
E-Selektin	CD62E	Negatif
P-Selektin	CD62P	Negatif
L-Selektin	CD62L	Pozitif
VCAM	CD106	Pozitif
Hyaluronate Reseptör	CD44	Pozitif
NCAM	CD56	Pozitif
LFA-3	CD58	Pozitif
LFA-1 α	CD11a	Negatif
LFA-1 β	CD18	Negatif
Cadherin 5	CD144	Negatif
PECAM-1	CD31	Negatif
VLA- α 1	CD49a	Pozitif
VLA- α 2	CD49b	Pozitif
VLA- α 3	CD49c	Pozitif
VLA- α 4	CD49d	Negatif
VLA- β	CD29	Pozitif
Beta 4 integrin	CD104	Pozitif

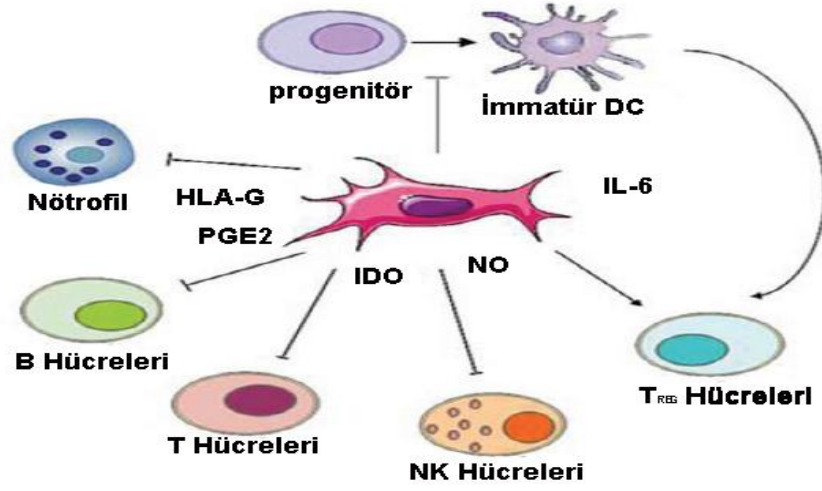
MKH'ler; sitokin, kemokin ve ekstraselüler matriks proteinlerini sentezleyebilirler. Salgıladıkları başlıca sitokinler; Tümör nekroz faktör- α (TNF- α), M-CSF, Flt-3 ligand, IL-1 β , 2, 4, 6, 7, 8,11, 12, 14, 15 ve SCF'dür. Ayrıca MKH'lerin bulunduğu kültür ortamına IL-1 α ilave edildiğinde G-CSF, GM-CSF (Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör) sentezleme yeteneği kazanırlar. MKH'lerin G-CSF, GM-CSF, SCF ve IL-6 salgılamaları, allojenik ve otolog hematopoetik kök hücre nakillerinde hematopoietik kök hücrelerin yerleşim, çoğalma ve farklılaşmalarını sağlayarak nötrofil ve trombosit engraftmanını hızlandırıcı etki gösterdiği düşünülmektedir

(33). Diğer taraftan MKH'ler, inflamasyon alanından salgılanan sitokin ve kemokinlerin meydana getirdikleri gradient yönünde göç ederek ürettikleri kemokin reseptörleri vasıtasıyla hasarlı dokulara yerleşirler. CXCL12 [stromal hücre kökenli faktör (SDF)-1 α], CX3CL1 (fraktalkin) ve CXCL10 [IFN- γ uyarıcı protein-10]'un MKH'lerin migrasyonunda rol oynayan başlıca kemokinler oldukları gösterilmiştir (38). Buna karşın MKH'ler yüzeylerinde ifade ettikleri CCR2, CCR8, CXCR1, CXCR2, CXCR3 ve CXCR4 ile kemotaktik uyarıların geldiği dokulara yerleşirler (39).

2.2.6. Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünoyoloji

Doku hasarında tamir yeteneğine sahip olan MKH'ler tedavi amacıyla kullanılabilirler. Klinik kullanım için belki de en avantajlı özelliklerinden birisi immünojenitelerinin düşük ve artmış immüniteyi baskılayıcı olmalarıdır. Bu hücrelerin immünoyoloji diğer dokulara göre daha değişkenlik göstermektedir. İn vitro çalışmalar, allojenik lenfositlerin MKH'lere karşı çoğalma yanıtının düşük olduğunu, MKH'lerin, allo-antijen ve mitojenlere karşı oluşan T lenfosit uyarısını, sitotoksik T lenfosit ile dendritik hücre oluşumunu ve B hücre proliferasyonunu engelleyerek immün baskılayıcı etki gösterdiklerini kanıtlamaktadır. Bu etkilerini de sentezledikleri indolamin 2,3-dioksijenaz (IDO), prostaglandin E2 (PGE2), insan lökosit antijen-G (HLA-G), IL-6, nitrik oksit (NO), transforming growth factor- β (TGF- β) ve hepatosit büyüme faktörü (HGF) aracılığı ile gerçekleştirmektedirler (Şekil 2.5).

İn vivo olarak da immün düzenleyici etkileri kanıtlanmış olup özellikle GVHH, organ allograft reddinin önlenmesi ve otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılabilirliği belirtilmiştir. Ayrıca immün sistemden kaçabilme yeteneğine sahip olması özelliklerinden dolayı da allojenik nakle uygun olabilecekleri bildirilmiştir (40).



Şekil 2.5. Mezenkimal kök hücreler ile immün sistem hücrelerinin etkileşimi (41).

2.2.7. Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünmodülatör Özellikleri

Yapılan çalışmalar MKH'lerin doğal ve edinsel immünite üzerinde düzenleyici etkilerinin (baskılayıcı veya uyarıcı tarzda) olduğunu göstermiştir (35). Bu etkilerin ortaya çıkmasında hücreler arasında kurulan fiziksel temas yanında MKH'lerden salgılanan çözünür faktörler de önemli rol oynamaktadır. MKH'lerin immünmodülatör etkilerinin olması immün tedavide önem arz etmektedir.

2.2.7.1. MKH'lerin Edinsel İmmünite Üzerine Etkileri

MKH'lerin edinsel immüniteyi oluşturan hücreler üzerinde düzenleyici veya baskılayıcı tarzda etkileri şu şekilde olmaktadır:

MKH'ler, aktive T lenfositlerde anti-proliferatif etki gösterirken, istirahat dönemindeki T lenfositlerin ise sağ kalımını desteklemekte ve aktivasyon moleküllerinin artmasını baskılamaktadır (42-44). MKH'lerden salgılanan ve T lenfositler üzerinde baskılayıcı etki yapan araçların IDO, PGE2, TGF- β 1 ve HGF olduğu gösterilmiştir (45,46). T lenfositlerin baskılanmasında rol oynadığı ileri sürülen faktörler STAT3 fosforilasyonu ve NO'dir. Diğer taraftan virüslerin, MKH'lerden IFN γ sentezini uyararak sitotoksik T (Tc) lenfositlerin çoğalmalarına ve sitotoksik etkilerinin artmasına neden oldukları rapor edilmiştir (47,48). Ayrıca

MKH'lerin; yardımcı T lenfositlerden (Th1) inflamatuvar özellikteki IFN γ salgılanmasını baskımlarken, Th2 lenfositlerden anti-inflamatuvar özellikteki IL-4 salgılanmasını uyardıkları (49), hafıza T lenfositlerin spesifik antijenlere karşı verdikleri yanıtları baskıladıkları (50) ve regülatör T (Treg) lenfositlerin oluşumunda rol oynadıkları belirtilmiştir (51).

Yapılan çalışmalar MKH'lerin B lenfositler üzerinde de düzenleyici etkilerinin olduğunu ve bunun fiziksel temas yanında, salgılanan bazı faktörlerle gerçekleştiği gösterilmiştir (46). Dış kaynaklı IFN- γ ile uyarılan (41,52) MKH'ler tarafından sentezlenenIDO'nun B lenfositlerin proliferasyonlarını baskıladığı, IL-6'nın ise B lenfositlerin farklılaşmasında ve immünoglobulin (Ig) sentezinde önemli rolünün olduğu belirtilmiştir (53).

MKH'lerin, dendritik hücrelerde anti-proliferatif etki meydana getirdikleri (54), CD1a, CD40, CD83, HLA-DR ve kostimülatör moleküllerin (CD80, CD86) ifadelerini azaltarak monositlerin dendritik hücrelere farklılaşmasını engellediği ve IL-12 üretimini baskıladığı (42,55), miyeloid dendritik hücrelerden TNF- α üretimini azalttığı, plazmasitoid dendritik hücrelerden ise IL-10 üretimini arttırdığı bildirilmiştir. MKH'lerin dendritik hücre farklılaşması ve fonksiyonları üzerine olan baskılayıcı etkilerini IL-6, M-CSF ve PGE2 gibi araçlarla gerçekleştirdiği belirtilmiştir (35,49).

2.2.7.2. MKH'lerin Doğal İmmünite Üzerine Etkileri

MKH'ler salgıladıklarıIDO, HLA-G, TGF β ve PGE2 ile NK hücrelerinin proliferasyonunu ve fonksiyonlarını baskılamaktadırlar (35). Diğer taraftan MKH'lerden salgılanan IL-6'nın nötrofilleri apoptoza karşı koruduğu fakat fonksiyonlarını (fagositoz ve migrasyon) etkilemediği gösterilmiştir (56). Makrofajlarla MKH'lerin birlikte kültüre edilmesinden sonra makrofajların fagositoz yeteneklerinin artmasının yanında IL-10 ve IL-6 sentezlerinin de arttığı, IL-12 ve TNF- α sentezlerinin ise azaldığı tespit edilmiştir (57). MKH'lerin immün hücreler üzerine baskılayıcı etkisini sağlayan etmenlerden biri olan HLA-G5 molekülü (annenin fetusa karşı immün toleransında etkilidir), dendritik hücre maturasyonunu

engellemekte, NK lenfositlerin litik aktivitesini ve IFN- γ sentezini baskılamaktadır (40,46).

2.2.8. Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinikte Kullanım Alanları

MKH'lerin transplantasyon alanında kullanıldığı ve önemli sonuçların elde edildiği gösterilmiştir. İmmüno-regülasyon özellikleri ve stromal destek sağlamaları nedeniyle HKH ve organ nakillerinde kullanıma potansiyelleri bulunmaktadır (3,58). Allojenik nakillerde ve İmmüno-supresif tedavilere dirençli hastalarda GVHH'nın önlenmesi veya tedavisinde önemli katkıları olduğu gösterilmiştir (59). Ayrıca MKH'lerin, allojenik nakillere bağlı olarak meydana gelen red reaksiyonlarında doku onarımını sağladığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (60).

MKH'ler rejeneratif amaçlı olarak da birçok disiplin tarafından kullanılmaktadır: Kas ve iskelet sistemi hastalıklarında (61), gastroenterolojik hastalıklarda (62,63), kalp-damar hastalıklarında, nörolojik ve kalıtsal hastalıklarda (64) kullanılmakta, deneysel olarak immün-modülasyon etkileri nedeniyle otoimmün hastalıkların tedavisinde de umut vaat etmektedirler (65). Bu konuda birçok deneysel araştırma vardır ancak klinik uygulama deneyimi günümüzde son derece kısıtlıdır. Multipl skleroz, amiotrofik lateral skleroz, sistemik lupus eritematosus (SLE), romatoid artrit (RA) gibi hastalıklarda deneysel modellerde kullanılmaya başlanmış, hastalık belirtilerinde yavaşlama sağlanabileceği bildirilmiştir. Crohn hastalığında MKH tedavileri ile Faz III çalışmalarına başlanmıştır (66).

MKH'lerin kalıtsal hastalıkların tedavisinde kullanılması amacıyla da çalışmalar yapılmaktadır. Ayrıca çok sayıda lizozomal enzim ifade edebilen sağlıklı insan MKH'leri, enzim eksikliği ile seyreden depo hastalıklarında enzim kaynağı olarak da kullanılabilirler (67,68).

2.2.8.1. MKH'lerin Klinik Kullanım Açısından Avantajları

MKH'ler, farklılaşma yetenekleri sayesinde kemik, kıkırdak, kas, yağ ve tendon gibi mezodermal kökenli dokulara dönüşebildikleri için klinik kullanım potansiyelleri bulunmaktadır. Ayrıca in vitro koşullarda nöron gibi ektodermal, hepatosit gibi endodermal dokulara da dönüştürülebilmektedirler. Moleküler biyoloji

mühendisliği alanında bu hücrelerde, çeşitli değişikliklerin yapılmasıyla doku onarımında ve yenilenmesinde kullanılabileceklerini gösteren çalışmalar mevcuttur (69,70).

MKH'ler homing özelliklerinden dolayı yerleştikleri dokunun fonksiyonlarını gösterirler (71). Bu nedenle MKH'ler allojenik kemik iliği nakli sonrası engraftmanı hızlandırmak ve GVHH'nı önlemek için kullanılmıştır (64).

İntravenöz infüzyon sonrası kemik iliğine yerleşme eğilimi gösteren MKH'ler ayrıca inflamasyonun olduğu hasarlı dokuya doğru migrasyon özelliklerinden dolayı ulaşabilmektedirler (34,72). Ayrıca füzyon yeteneklerinin olması sayesinde hasarlı hücre yenilenmesine de katkıda bulunurlar (73).

MKH'lerin klinik kullanım (özellikle hücresel tedavi açısından) için en avantajlı özelliklerinden biri de immünojenitelerinin düşük olması ve immüno-regülatör özelliklerinin bulunmasıdır. HLA sınıf-II antijenleri ve ko-stimülatör molekül ifadeleri olmadığından immün yanıt gelişimini önlerler (34). MKH'ler bu özelliklerinden dolayı HLA uyumsuz gönüllü vericilerden alınarak tedavi amaçlı kullanılabilmektedirler.

MKH'lere gen transferinin kolay olması ve bazı enzimleri salgılamaları da bu hücreleri klinik kullanım açısından avantajlı kılmaktadır (67,68).

2.2.8.2. MKH'lerin Klinik Kullanım Açısından Zorlukları

MKH'ler sayılarının çok az olması nedeniyle in vitro kültür ortamında uzun bir sürede üretilmektedirler. Klinik kullanıma uygun MKH üretimi için in vitro işlemlerin uluslar arası kabul edilmiş standartlarda GMP (good manufacturing practice: iyi üretim uygulamaları) koşullarına uygun olarak yapılması gerekmektedir. Bu da ciddi bir teknoloji, alt yapı, deneyim gerektirdiğinden ve maliyetinin de fazla olması nedeniyle klinik kullanıma uygun MKH üretimi yapan merkezlerin sayısı oldukça azdır.

MKH'lerin in vitro üretiminde kullanılan FCS, hayvan kökenli olmasından dolayı klinik kullanım için uygun değildir. FCS alerjik ve immünolojik reaksiyonlara yol açarak engraftmanı engelleyebilir. Bu nedenle klinik kullanıma uygun MKH üretiminde sıklıkla otolog serum kullanılmaktadır.

İn vitro kültür sürecinin uzun olmasından dolayı mikroorganizma kontaminasyonu veya hücre yaşlanması, telomer kısalması, kanser gelişimi gibi ciddi riskler olabileceğinden klinik çalışmalarda erken pasajların kullanılması önerilmektedir. Ancak bu safhada da MKH saflığının daha düşük olması, makrofaj ve endotel hücreleri gibi hücrelerin karışması mümkün olabilmektedir.

Bu hücrelerin immünsupresif özelliklerinin olması enfeksiyon riskini (sitomegalavirüs gibi) arttırabilmektedir.

MKH'erin klinik kullanımlarındaki bir diğer sorun da bu hücrelerin, verildiği organizmadaki uzun süreli canlılık ve fonksiyonlarını sağlayamamaları nedeniyle tekrarlayan infüzyonlar gerektirmeleridir.

Ayrıca MKH kullanımının malignite (sarkom, akut myeloid lösemi) oluşturduğuna dair bazı çalışmalar da vardır (74).

2.3. İmmün Sistem

Organizmaya çeşitli yollardan girmiş olan yabancı antijenleri tanıyarak bunlara yanıt oluşturan sistemdir. Hastalığa özellikle enfeksiyon hastalıklarına karşı gösterilen dirence immünite, enfeksiyona yol açan patojenlere karşı verilen tepkiye de immün yanıt adı verilir.

İmmün sistem, fonksiyonel olarak doğal (doğuştan var olan) ve edinsel (sonradan kazanılmış=adaptif) immünite diye ikiye ayrılır;

Doğal immün sistemi oluşturan başlıca bileşenler; fagositler (nötrofiller, monosit/makrofajlar), NK hücreleri, doğal bağışıklık sitokinleri (TNF, IL-1, IL-12, IFN γ), kompleman sistemi ve diğer plazma proteinleri (akut faz proteinleri)'dir. Ayrıca monosit ve makrofajlar doğal ve edinsel immün sistemler arasında köprü oluştururlar.

Mikroplara karşı savaş bir yandan doğal savunma mekanizmaları ile yürütülürken diğer taraftan yabancı antijenlerle sekonder lenfoid organlarda edinsel immün sisteme tanıtılırlar. Başlıca bileşenleri B ve T lenfositler olan edinsel immün yanıtın en önemli özelliği antijene özgü olması ve hafıza (bellek) hücrelerinin bulunmasıdır.

Humoral (sıvısal) ve hücreyel olmak üzere iki tip edinsel immün yanıt vardır. Humoral immüniteden sorumlu B lenfositler antikör salgılayarak hücre dışı

mikropların yok edilmesine aracılık ederlerken, hücre sel immüniteden sorumlu T lenfositler sitokin salgılayarak fagositoza uğramış mikropların yok edilmesinde makrofajlara yardım ederler veya bizzat mikroplar üzerinde sitotoksik etki gösterirler (75).

2.3.1. B Lenfositler

Edinsel immün sistemin önemli bir üyesi olan B lenfositler, HKH'den sonraki ortak lenfoid progenitör hücreden gelişirler (76). Bu gelişim süreci kuşlarda barsak sistemi sonundaki Bursa of Fabricius denilen organda, memelilerde ise fetal yaşamın ilk dönemlerinde karaciğerde daha sonraki dönemlerde ve erişkinlerde kemik iliğinde gerçekleşir (77). Bu dokular, lenfositlerin öncül hücrelerden geliştiği dokular oldukları için primer lenfoid organlar olarak adlandırılırlar. Bu organlarda işlevselliğini kazanamayan hücreler apoptozis (programlanmış hücre ölümü) ile ölürken işlevselliğini kazananlar ise olgunlaşarak kan yoluyla lenf düğümleri, dalak, mide-bağırsak sisteminin mukoza altı lenfoid dokuları (peyer plakları, appendiks), solunum yolları ve derideki epitelle ilişkili lenfoid dokuları içeren sekonder lenfoid organlar adı verilen organlara göç ederler. Bu organların ana görevi lenfosit ve yabancı antijenlerin karşılaşmalarını sağlamaktır.

Periferik kan lenfositlerinin %15-20'si B lenfositlerdir. Dolaşıma salınan B lenfositler istirahat halinde olup uyarılmadıkları sürece fonksiyon göstermezler ve bölünmezler. Başlıca görevleri: antikor sentezleyen plazma hücrelerine farklılaşarak yabancı antijenlere karşı özgül immün yanıt oluşturmak, T hücrelerine antijen sunmak ve salgıladıkları sitokinlerle immün düzenleme yapmaktır (78). Ancak savunma görevi sadece özgül immün yanıt oluşturmaktan ibaret değildir. Salgıladıkları antikorlarla; mikropların ve tümör hücrelerinin opsonizasyonunda, kompleman sisteminin aktivasyonunda ve toksin nötralizasyonunda görev yaparlar. Böylelikle doğal immün yanıtın güçlendirilmesine ve sitotoksik hücrelerin etkilerini göstermesine aracılık ederler (4).

B hücre membranına bağlı antikorlar aynı zamanda antijenleri tanıyan reseptörler olarak da görev yaparlar. Bir antikor molekülü birbirine eş iki ağır (heavy-H) ve iki hafif (light-L) zinciri olan; her bir hafif zincirde bir değişken (variable-V) ve bir sabit (constant-C) bölge, her bir ağır zincirde de bir V üç ya da

dört C bölge içeren dört polipeptid zincirinden oluşur. Farklılıkları C bölgesinde olan işlevleri farklı olmayan κ ve λ diye adlandırılan iki çeşit hafif zincir, yine farklılıkları C bölgesinden kaynaklanan μ , δ , α , γ , ϵ diye adlandırılan beş çeşit ağır zincir vardır. Her iki tip hafif zincirden biri, beş tip ağır zincirden biriyle kompleks oluşturarak bir antikor molekülünü oluşturur ve bu antikor molekülünün adlandırılması hafif zincirlerden bağımsız olarak ağır zincir tiplerine göre sırasıyla IgM, IgG, IgD, IgE, IgA şeklinde yapılır (75).

2.3.2. B Lenfositlerin Gelişimi

B lenfositlerinin ortak lenfoid progenitör hücreden efektör fonksiyonlarını kazanmış olan plazma hücreleri ve hafıza hücrelerine farklılaşmaları, kemik iliğinde başlayan (antijenden bağımsız olgunlaşma süreci) ve sekonder lenfoid organlarda (antijene bağlı olarak) devam eden bir süreçtir (76,79,80). Kemik iliğinden immatür olarak ayrılan B lenfositler sekonder lenfoid organlara gider ve olgunlaşmalarını burada tamamladıktan sonra dolaşıma geçerek tüm lenfoid sisteme yayılırlar. Antijenlerle ilk karşılaşmada kısa ömürlü plazma hücreleri meydana gelirken, ikinci ve daha sonraki karşılaşmalarda ise izotip değişimi olmuş ve antijene özgü yüksek afiniteli antikor sentezleyen uzun ömürlü plazma hücreleri ile hafıza hücreleri meydana gelir (81). Bu antikorlar antijenin vücuda tekrar girmesi halinde erken koruma sağlamaktadır.

2.3.2.1. B Lenfosit Gelişiminde Moleküler Etkileşimler

B lenfosit soyu oluşturacak olan lenfoid progenitör hücreleri ile kemik iliği stromal hücrelerinin adezyon moleküllerinin (lenfoid progenitör hücrede VLA-4, stromal hücrede VCAM-1) (82) birbirine bağlanması, lenfoid progenitör hücre yüzeyinde c-kit (CD117) ifadesini, stromal hücre yüzeyinde ise SCF ifadesini artırır (83). Lenfoid progenitör hücrelerin B lenfosit olmaya karar verdiği bu aşamada hücreler erken pro-B (early progenitor B) hücresi adını alırlar. c-kit-SCF etkileşimi, stromal hücrelerden IL-7 sentezini uyarırken diğer taraftan pro-B hücresinde IL-7 reseptörü üretilmesini sağlar (84). Bu aşamadaki hücreler geç pro-B (late pro-B) hücresi adını alırlar. IL-7'nin, reseptörüne bağlanması pro-B hücresinde

rekombinasyonu aktive eden genlerin (RAG-1, RAG-2) aktivasyonuna ve yüzeylerinde fonksiyonel olmayan antijen reseptörlerinin üretilmesine yol açar. Prekürsör-B (pre-B) hücresi adını alan bu hücreler stromal hücrelerden ayrıldıktan sonra yüzeylerinde IgM yapısında fonksiyonel antijen reseptörlerini üretirler. Bu hücreler de immatür B hücresi olarak adlandırılırlar. Bu şekilde sistemik dolaşıma geçen hücrelerin yüzeylerinde düşük seviyede IgD yapısında antijen reseptörleri de belirir (IgM^{high}IgD^{low}) (Şekil 2.6) (4).

2.3.2.2. B Lenfositlerin Gelişiminde Genetik Kontrol

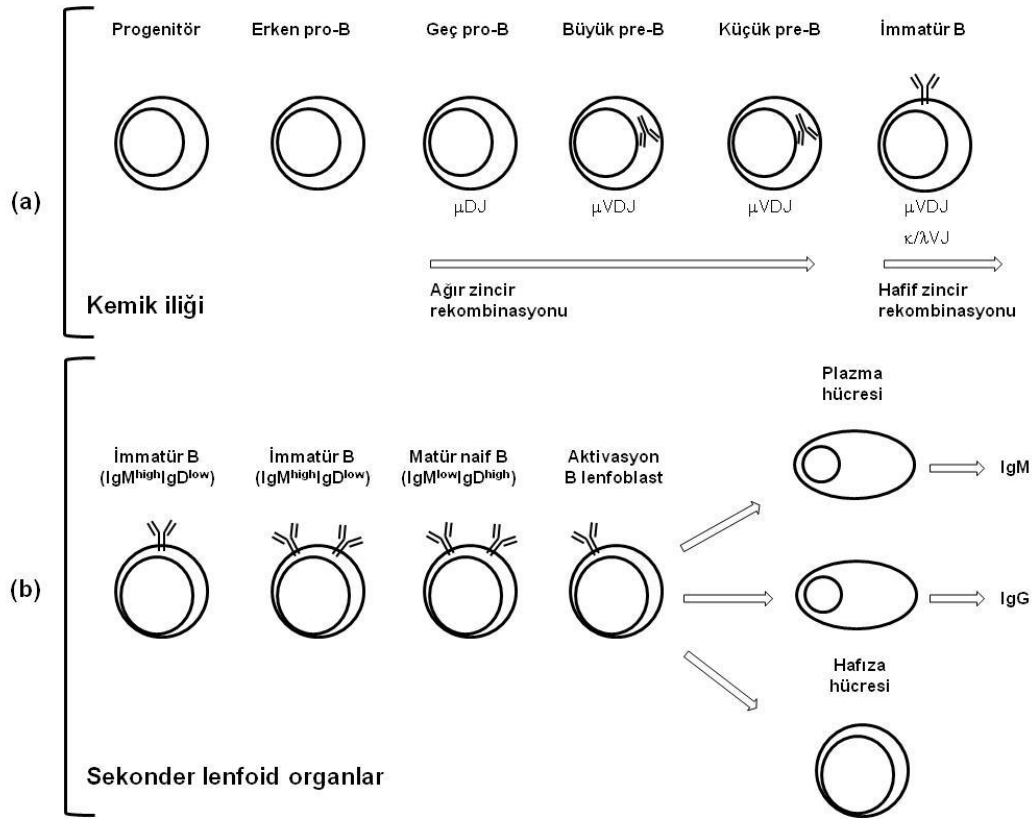
HKH ve erken lenfoid progenitörler, Ig ve hücre reseptör genlerini kalıtsal olarak taşırlar. Kemik iliğinde gerçekleşen bu olayların her aşaması genetik kontrol altında gerçekleşmektedir. Antijene özgü IgM yapısındaki B lenfosit reseptörünün antijen bağlayan değişken kısmı, ağır zincirin V (variable), D (diversity) ve J (joining) gen segmentlerinin, hafif zincirin ise V ve J gen segmentlerinin rekombinasyonu neticesinde sentezlenir (4). V ve J'nin ya da V, D ve J'nin somatik rekombinasyonları V(D)J rekombinaz adı verilen bir enzim aracılığı ile gerçekleşir. Bu enzimin rekombinasyonunu, Rag-1 ve Rag-2 diye adlandırılan proteinlerden oluşan yakın ilişkili iki gen aktive eder (75).

B lenfosit öncülleri olgunlaşırken bu gen segmentlerinde tamamen tesadüfi olmayan rekombinasyonlar meydana gelmektedir (85). Böylelikle doğadaki çok çeşitli antijenleri tanıma ve bağlama özgüllüğü taşıyan B lenfosit klonları gelişir (edinsel immün sistemin özgüllük ve çeşitlilik özelliği).

2.3.2.3. Sekonder Lenfoid Organlarda B Lenfositlerin Gelişimi

Kemik iliğinden dolaşıma geçerek sekonder lenfoid organlara gelen immatür B lenfositler (IgM^{high}IgD^{low}) (85) stromal hücreler ve dendritik hücrelerden salgılanan kemokinlerin (CCL21 ve CCL19) oluşturduğu gradient yönünde hareket ederek lenf noduna girerler (87). Foliküler dendritik hücre (FDH)'lerden salgılanan CXCL13 kemokini, immatür B lenfositleri primer foliküle çeker (88). Bundan sonra B lenfositlerden salgılanan lenfotoksin FDH'lerdeki lenfotoksin reseptörüne bağlanır (89). FDH'lerden salgılanan diğer bir faktör olan B hücre aktivasyon faktörü [B-cell

activating factor (BAFF)] (90) B lenfositler için hayati bir öneme sahip olup BAFF reseptörü (BAFFR)'ne bağlanarak immatür B lenfositlerinin olgunlaşmasını sağlar. Bu hücreler ($IgM^{low}IgD^{high}$) meydana geldikten sonra lenf nodundan ayrılarak dolaşıma geçer ve diğer sekonder lenfoid organlara giderek kendilerinin yoğun olarak bulunduğu alanlara yerleşirler(91). Antijenleriyle henüz karşılaşmamış olan bu hücreler, matür naif B lenfositlerdir; antijenleri ile karşılaşmadıkları zaman birkaç hafta içinde apoptoza giderek ortadan kalkarlar. Kendilerine özgü antijenlerle karşılaştıklarında ise aktive olarak çoğalırlar ve antikor üreten plazma hücreleri ile hafıza B hücrelerine farklılaşırlar (Şekil 2.6) (4).



Şekil 2.6. Kemik iliği (a) ve sekonder lenfoid organlarda (b) B hücre gelişimi.

2.3.3. Hümorale İmmün Yanıtlar

Hümorale immün yanıtlar dalak, lenfoid foliküller, lenf düğümleri ve mukozal lenfoid dokulardaki antijene özgül B lenfositlerin antijeni tanıyıp çoğalması (klonal çoğalma) ile başlar, antikor salgılayan efektör hücrelere dönüşmesi ve hafıza

(bellek) hücrelerini oluşturması ile sonuçlanır. Uzun ömürlü plazma hücreleri ve hafıza hücreleri kemik iliğine göç ederek orada yaşarlar ve aynı antijenle sonraki karşılaşmalarda enfeksiyona karşı daha erken ve etkin savunmayı sağlarlar.

Protein yapısındaki antijenlere karşı antikor yanıtı oluşması için T hücre yardımı gerekirken (T bağımlı antijen), lipopolisakkarid veya tekrarlayan antijenik determinantları olan polisakkarid yapısındaki antijenlere karşı antikor yanıtı oluşması için T hücre yardımına gerek yoktur (T bağımsız antijen). Bu antijenler kapsül ya da zarf antijenleri gibi mikrobik yüzeylerde ya da salgılanmış toksinler gibi sıvı şekilde bulunabilirler. B lenfositlerinin, protein yapıları antijenler dışında çok çeşitli molekülleri tanıyıp onlara özgül antikorlar üretmesi hümmoral immüitenin, polisakkarid yapıları ve kapsüllü mikroorganizmalara karşı savunmada, hücresele immüiteden daha önemli rol oynadığını ve değişik mikroorganizmalarla en elverişli şekilde mücadele ettiğini göstermektedir_(75,92).

T bağımsız antijenlere karşı gelişen antikor yanıtı, T bağımlı antijenlere karşı gelişen antikor yanıtından daha zayıftır. Her iki antijene ilk maruz kalmada çoğunlukla IgM yapısında antikor sentezlenir (primer immün yanıt). Ancak aynı antijenlere ikinci kez maruz kalmada verilen yanıt (sekonder immün yanıt) birbirinden farklıdır. T bağımsız antijenlere karşı hafıza hücresi oluşmadığından sekonder immün yanıt primer immün yanıtta benzer şekilde olur ve başlıca IgM yapısında antikor üretilir. Halbuki T bağımlı antijenlere karşı primer immün yanıt esnasında hafıza hücreleri oluştuğundan, aynı antijenlere ikinci kez maruz kalmada gelişen sekonder immün yanıt, primer immün yanıtta daha güçlüdür ve çoğunlukla yüksek afiniteli IgG yapısında antikor üretilir. Protein yapısındaki antijenlerle uzamış ve tekrarlayan karşılaşmalar sonucunda antikor afinitesi artar (4).

2.3.4. Regülatör B Hücreleri

Edinsel immün sistemin bir bileşeni olan B lenfositler immünregülasyonu sağlamada önemli bir role sahiptirler. T lenfositler gibi B lenfosit alt gruplarının da hem patojenik (otoimmün hastalıkların gelişiminde başlıca otoantikor üreterek hastalık patogeneğinde rol oynamaktadır) hem de düzenleyici fonksiyonları vardır. T_{reg} lenfositlerin, düzenleyici etkilerinden dolayı immün yanıt sırasında önemli bir

role sahip oldukları daha önceden belirtilmiştir (93). Ancak son 10 yıl içerisinde yapılan çalışmalarda deneysel olarak oluşturulmuş otoimmün ensefalomyelit, multipl skleroz ve crohn hastalığı gibi otoimmün hastalıklarda B lenfositlerinin düzenleyici etkilerinin olduğu gösterilmiştir. B lenfositlerinin düzenleyici özelliklerini belirtmek için önceleri sadece “düzenleyici B lenfositleri” terimi kullanılmış ancak daha sonradan çeşitli otoimmün hastalıklı fare modelleri kullanılarak yapılan çalışmalarda B lenfositlerinin düzenleyici özelliklerinin yanında baskılayıcı özelliklerinin de olduğu tespit edilmiştir (5). Bu nedenle bu B lenfosit alt grupları regülatör B hücreleri (B_{reg}) olarak adlandırılmışlardır.

B lenfositlerinin düzenleyici fonksiyonları sentezledikleri antikorlarla olabileceği gibi direkt hücreler arası etkileşimle (B hücrelerinin $CD4^+$ T hücreleri ile fiziksel etkileşimi (temas); $B7/CD28$, $CD40/CD40L$ (CD40L) ve $OX40/OX40$ gibi kostimülatör moleküller aracılığı ile olur) veya sitokin üretimiyle de olabilmektedir. $IL-4$, $IL-6$, $IL-10$, $IFN-\gamma$ ve $TGF-\beta$ B lenfositlerinin immünregülasyonu sağlayan sitokinleri olup immün yanıt sürecinde dendritik hücrelerle birlikte $CD4^+$ T hücrelerinin aktivasyonunu sağlarlar.

B lenfositlerin $CD4^+$ T hücreleri ile fiziksel etkileşimi, dendritik hücre ve makrofaj aktivasyonunu etkilemesi efektör B lenfositlerin humoral immünitede olduğu kadar hücrel immünite için de gerekli olduğunu göstermektedir (Şekil 2.5). $CD8^+$ T lenfositlerinin aktivasyonu için B lenfositlerin gerekli olmadığı ileri sürüldüğü gibi bunun aksini gösteren çalışmalar da mevcuttur (93,94).

B lenfositlerin enfeksiyonlarda, otoimmünitede ve kanser gelişimindeki düzenleyici rollerini daha çok $IL-10$ ve $TGF-\beta$ gibi baskılayıcı özellikteki sitokinleri salgılayarak gerçekleştirdikleri gösterilmiştir (94). Dolayısıyla B lenfosit alt gruplarının sınıflandırılması $IL-10$ sitokinini sentezleme yeteneklerine göre yapılmıştır.

Buna göre farelerde oluşturulan deneysel modellerde; $IL-10$ üreten B_{reg} hücreleri;

1. $CD5^+ B1-a$
2. $CD1d^{hi} CD23^+$ transtional (geçiş) marjinal zone (T2-MZ) ($CD19^+$, $CD21^+$, $CD24^+$)
3. $CD1d^{hi} CD21^{hi}$ marjinal zone (MZ) ($CD19^+$, $CD5^+$)

şeklinde sınıflandırılmıştır (5,93,95).

Farelerde oluşturulan deneysel modellerde bilinen B lenfositler ile B2 lenfositleri arasında, Cytosine-phosphate-guanine (CpG) ya da lipopolisakkarit ile uyarılma sonucunda yüksek düzeyde IL-10 üreten marjinal zon B hücrelerinin olduğu ve bu hücrelerin fenotipik olarak CD1d^{hi}CD5⁺ yüzey belirteçlerine sahip olduğu tanımlanmıştır (93,96).

B lenfosit alt gruplarından özellikle peritoneal boşluktaki B1 lenfositlerinin zengin bir IL-10 kaynağı olduğu tanımlanmış olup son zamanlarda yapılan çalışmalarda çocuklardaki bulaşıcı hastalıklarda önemli baskılayıcı rolleri olduğu gösterilmiştir.

İnsanlarda B_{reg} hücre popülasyonu ayrımı yapıldığında ise;

1. CD19⁺ CD38^{hi} CD24^{hi} (olgunlaşmamış) (IgM^{hi}, IgD^{hi}, CD5⁺, CD10⁺, CD20⁺, CD27⁺, CD1d^{hi})
2. CD19⁺ CD38^{int} CD24^{int} (olgun) (IgM^{int}, IgD⁺, CD5⁻, CD10⁻, CD20⁺, CD27⁻, CD1d⁺)
3. CD19⁺ CD38⁻ CD24^{hi} (bellek) (IgM⁺, IgD⁺/IgM⁻, IgD⁻, CD5⁻, CD10⁻, CD27⁺, CD1d⁺)

şeklinde sınıflandırılmıştır (97).

Bunlardan CD19⁺CD38^{hi}CD24^{hi} (CD5⁺CD1d^{hi}) fenotipli regülatör özellikli B lenfositlerinin (B_{reg} veya B10 hücreleri) düzenleyici kapasiteye diğerlerinden daha çok sahip olduğu tanımlanmış ve bu B_{reg} lenfositlerin, inflamasyon oluşturulmuş deneysel modellerde %71 oranında bulunduğu gösterilmiştir. Bu lenfositlerin, IL-10 üreterek CD4⁺ T hücrelerinin sitokin üretimini baskıladığı ve Th1 farklılaşmasını engellediği, baskılayıcı özelliklerinin de IL-10, CD80 ve CD86 aracılığı ile olduğu TGF- β 'ya bağlı olmadığı belirtilmiştir. Ayrıca bu B_{reg}'lerin baskılayıcı fonksiyonlarında, IL-10 yanında diğer çözünür faktörlerin ve bazı eş-uyaran moleküllerin (özellikle CD38^{hi} CD24^{hi} olabilir) de sorumlu olduğu gösterilmiştir (94,97).

İnsanda tonsil B lenfositlerinin, Epstein–Barr virus (EBV) ile infeksiyondan sonra bu hücrelerin yüksek düzeyde IL-10 sentezlediklerini gösteren çalışmalar mevcuttur (94).

Barsak hastalığı (93), kollajen bağı uyarılmış artrit, kolit ve kontakt hipersensitivite gibi otoimmün enfeksiyonlarda (5,97) ve parazit enfeksiyonu sonrasında (96) B_{reg} 'lerin IL-10 üreterek baskılayıcı etkilerinin olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur.

IL-10'un tümör bağışıklığındaki rolü ise tartışmalı olup immün yanıtı baskılayarak tümörün gelişmesini sağlayabildiğini ya da anjiogenesisi baskılayarak ve NO üretimini arttırarak tümörün gerilemesine yol açtığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Ayrıca sitotoksik hücreleri (CD8+ T lenfositler ile NK hücreleri) uyararak da tümör gelişimini engellediği gösterilmiştir.

IL-10 üreten B lenfositlerin transplantasyonda da etkili olduğu gösterilmiş olup yapılan bir çalışmada kemik iliği naklinden sonra konakçının B lenfositlerinin, CD4+ T lenfosit çoğalmasımı ve Th1 farklılaşmasını engellediği böylelikle GVHH'a verilen cevabı baskıladığı tespit edilmiştir.

B_{reg} hücrelerinin ağırlıklı olarak inflamasyon yanıtlarını düzenledikleri ve inflamasyon merkezine çok az sayıda göç ettikleri gösterilmiştir. Otoimmün hastalıkların ilerlemesini azaltmak için yapılan çalışmalarda, B_{reg} hücrelerinin transferinin zor olduğu bunun da regülatör özellikli antijen spesifik B lenfositlerin sayılarının çok az olmasından kaynaklandığı belirtilmiştir (5,96).

B lenfositler IL-10 üretiminin yanı sıra TGF- β 1 salgılayarak da otoimmüniteyi baskılayabilirler (5,97). *In vitro* şartlarda lipopolisakkarit ile uyarılma sonucu B_{reg} hücrelerinin TGF- β 1 üretme yeteneğine sahip olduğu saptanmıştır.

Özetle immün yanıt üzerinde düzenleyici rol oynayan B hücreleri:

1. IL-10 üreterek Th1/Th2 dengesini etkiler, İnflamasyon şelalesinin direkt olarak baskılanmasına yol açarlar.
2. Effektör T lenfositlerin apoptozuna neden olan TGF- β üretirler.
3. Direkt olarak veya antijen sunan hücre görevi yaparak aktive CD4+ T hücrelerini baskırlarlar.
4. β_2 mikroglobuline bağı olarak T_{reg} alt gruplarının aktivasyonunu sağlarlar.
5. Zararlı çözümler faktörleri nötralize eden IgG ve IgA üretirler.
6. IgG/Fc γ RIIB etkileşimi ile dendritik hücre ve makrofaj aktivasyonunu baskırlarlar.

7. Self-reaktif T lenfositlerin aktivasyonunda potansiyel olarak self antijenlerin kaynağını teşkil eden apoptotik hücrelerin temizlenmesini artırır (93).

2.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin B Lenfositler Üzerindeki Düzenleyici Etkileri

B lenfositlerin gelişim sürecinin ilk aşaması kemik iliğinde gerçekleştiği için buradaki stromal hücrelerle B lenfosit progenitörleri yakın etkileşimdedirler. Dolayısıyla B lenfositlerin hayatta kalma ve çoğalmasının, buradaki stromal hücrelerden salınan sitokinlerle desteklendiği saptanmış ve bu destekleyici özelliğin de MKH'ler tarafından sağlandığı bulunmuştur (98).

MKH'lerin, B lenfositlerin migrasyon, çoğalma ve Ig sentezini etkileyerek bu hücreler üzerinde düzenleyici rol oynadığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu etkilerini B lenfositler ile oluşturdukları fiziksel temas aracılığıyla sağlayabildikleri gibi salgıladıkları bazı faktörlerle de gerçekleştirebildikleri gösterilmiştir (35,41,46). MKH'ler, aktif B lenfositlerin apoptozunu uyarmaktan çok hücre döngüsünü G0/G1 fazında durdurarak bu hücreler üzerinde anti-proliferatif etki gösterdiği (34,35,41,98), istirahat dönemindeki B lenfositlerin ise sağ kalımını desteklediği tespit edilmiştir (99). Anti-proliferatif etki IFN- γ ile uyarılmış (41,52) MKH'lerden salgılananIDO ile meydana gelmektedir. MKH'lerin ürettiğiIDO'nun, B lenfositleri apoptozdan koruyarak hücre çoğalmasında gerekli olan triptofan sentezini azalttığı ve böylelikle B lenfositler üzerinde anti-proliferatif etkiye neden olduğu gösterilmiştir (34,35,52). Buna ilaveten MKH'lerin uyardığı programlı hücre ölümü (PD-1 yolu), B lenfosit proliferasyonunu baskılayan başka bir mekanizma olarak gösterilmiştir (39).

MKH'ler tarafından sentezlenen IL-6'nın da B lenfositlerin farklılaşmasında ve Ig sentezinde önemli rolünün olduğu belirtilmiştir (53). IL-6 ve ICAM-1 reseptörleri MKH'lerin B lenfositler üzerinde uyarıcı etki yapan araçlarıdır. Edinsel immün sistemin diğer hücreleri üzerinde düzenleyici etkileri olan ve MKH'ler tarafından salgılanan çözünür faktörlerin (PGE2, TGF- β 1, HGF) B lenfositler üzerinde de etkili olabileceği belirtilmiştir (35).

MKH'ler, B lenfositlerin ko-stimülatör molekül ifadesini ve sitokin üretimini etkilememektedirler (98). Dolayısıyla TNF- α , IFN- γ , IL-4 ve IL-10 üretimini inhibe etmezler (34). Ayrıca MKH'ler, B lenfositlerin, antikör salgılayan hücrelere

dönüşmesi de dahil olmak üzere sekonder lenfoid organlara yerleşmesinde önemli rol oynayan CXCR4, CXCR5, CCR7 reseptörlerinin ifadesini de azaltırlar (34,46,98).

Aktif B lenfositlerde ifadesi artan CD 25'in (lenfosit ortak yüzey belirteci) MKH varlığında ifadesinin azaldığı beirtilmiştir (34, 75). B lenfositlerin IgG, IgA ve IgM vasfındaki antikor sentezlerinin de MKH'ler tarafından baskılandığı gösterilmiştir (35,36,98).

GEREÇ VE YÖNTEM

“Mezenkimal Kök Hücrelerin B-Lenfositlerin İmmünomodülatör Fonksiyonları Üzerine Etkisi” başlıklı tez konusu; GATA Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulu’nun 23 Eylül 2010 gün ve 200 sayılı oturumunda tez konusu olarak, GATA Bilimsel Kurulun AR-2010/35 nolu projesi olarak kabul edilip, Eylül 2011-Aralık 2011 tarihleri arasında GATA İmmünoloji ve Alerji Hastalıkları BD. ve Araştırma-Geliştirme Merkezi, Tıbbi-Kanser ve Laboratuvar Araştırma Kısımları’nın olanakları ile yapıldı.

Bu çalışmada, in vitro yöntemler kullanılarak kemik iliğinde bulunan MKH’lerin, kanda bulunan ve antikor üreten B-lenfositler üzerine olan etkileri incelenmiştir. Bunun için B lenfositler ve MKH’ler tek başlarına ve birlikte kültüre (kokültür) edilmiştir. Çalışmada kullanılmış olan MKH’ler, Hematoloji kliniğinde nakil yapılacak olan hastalara, kemik iliği vericisi sağlıklı bireylerden alınan kemik iliklerinin kullanılmayan kısmından, B lenfositler ise aynı olguların periferik kanlarından elde edilmiş olup GATA Etik Kurulu’nun 05 Mayıs 2010 günü yapılan 151. oturumunda onaylanmış ve hastaların yazılı izni alınmıştır.

3.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

Akım sitometri cihazı	Becton Dickinson, Immunocytometry Systems, ABD
Fotoğraf makinesi	Nikon, Japonya
İnkübatör	Sanyo, MCO-18AIC, Japonya
İnverted mikroskop	Nikon TS 100, Japonya
Laminar air flow	Biolab, İtalya
Plate okuyucu	EL × 808-IU Bio-Tek, ABD
Santrifüj	HERMLE, Z383K, Almanya
Thoma lamı	Merck, Almanya
Vorteks	Nüve, Almanya
ACD’li tüpler	Becton Dickinson, Fransa

6 ve 96 kuyucuklu plate	Corning, ABD
Akım sitometri tüpleri	Becton Dickinson, Fransa
B hücre ayırma kiti	Human B cell enrichment coctail, RosetteSep, StemCell Technologies, Kanada
CD1d-PE	eBioscience, ABD
CD5-FITC	eBioscience, ABD
CD19- PerCP-Cy5.5	eBioscience, ABD
CD25-APC	eBioscience, ABD
CD34-PE	eBioscience, ABD
CD45- FITC	eBioscience, ABD
CD90-APC	eBioscience, ABD
CD105-PE	eBioscience, ABD
Ependorf Tüpler	Costar, ABD
Ficoll-histopaque	PAA, Germany
HLA-DR-PerCP	eBioscience, ABD
IDO	Enzo life Science, Fransa
IL-10-PE	eBioscience, ABD
İnterferon- γ	Sigma, ABD
Kültür kabı (25-75 cm ²)	Costar, ABD
L-glutamin	Biological Industries, İsrail
Mesencult media	StemCell Technologies, Kanada
MKH stimülasyon suplementi	StemCell Technologies, Kanada
Pokeweed Mitogen	Sigma, ABD
Penisilin-streptomisin	Biological Industries, İsrail

Permeabilize solüsyonu	Becton Dickinson, ABD
PBS	Biological Industries, İsrail
Steril santrifüj tüpleri	Corning, ABD
Steril pipetler (2ml, 5ml, 10ml)	Corning, ABD
Steril pipet uçları	Corning, ABD
Tripsin-EDTA	Biological Industries, İsrail
XTT	Biological Industries, İsrail

3.2. Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu ve Kültürü

3.2.1. Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu

MKH'leri izole etmek amacıyla sağlıklı insandan alınan kemik iliği ACD'li tüp içerisinde laboratuvar ortamına getirilerek 50 ml'lik santrifüj tüpü içerisinde 1/2 oranında fosfatla tamponlanmış tuz solüsyonu (Phosphate Buffered Saline: PBS) ile seyreltildi. Başka bir 50 ml'lik santrifüj tüpü içerisine seyreltilmiş kemik iliğinin 1/3'ü oranında ficoll-histopaque solüsyonu konuldu. Seyreltilen kemik iliği solüsyonu ficoll solüsyonu üzerine damla damla ilave edilerek tabakalandırıldı (gradient dansite yöntemi). Hazırlanan örnek oda ısısında 1800 rpm de 30 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonunda MNH'leri içeren kısım dikkatlice alınıp diğer bir tüpe aktarıldıktan sonra PBS ile seyreltildi ve oda ısısında 1800 rpm de 5 dk. santrifüj edilerek bir kez yıkama işlemi yapıldı. Böylelikle ficoll ve istenmeyen hücreler uzaklaştırıldı. Yıkama işlemi birkez daha tekrarlandı (yıkama işlemi besiyeri + %10 FCS ile de yapılabilir) (Şekil 3.1).

hücre pelleti medya ile seyreltilip thoma lamında hücre sayımı yapıldı. Daha fazla miktarda üretim yapmak için 75 cm²'lik kültür kaplarına 1x10⁶ hücre ekildi (Şekil 3.1). Hücrelerin takibi inverted mikroskobunda yapıldı.

3. pasajdan sonra kullanıma hazır hale gelen MKH'ler tripsinizasyon yöntemi ile kültür kabı yüzeyinden kalkdırılıp santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra hücre pelleti medya ile seyreltilerek thoma lamında hücre sayımı yapıldı. MKH'ler, her bir kültür kabında 50x10⁴ hücre olacak şekilde 6 adet 25 cm² lik kültür kaplarına 7 cc mesencult medya ile ekildikten sonra bu kültür kaplarının 3 tanesine MKH'leri uyarmak amacıyla IFN- γ (7cc için 21 μ l) konuldu. Diğer 3 tanesi ise IFN- γ ile uyarılmadan 24, 48 ve 72 saat süreyle % 5 CO₂ basıncı altında 37°C'lik inkübatörde kültüre edildi. 24, 48 ve 72. saatin sonunda her iki gruptaki hücrelerin değerlendirilmesi akım sitometri ile yapıldı.

3.2.3. İmmünfenotip Analiz İçin MKH Örneklerinin Hazırlanması

3. pasajdan sonra kullanılan ve 24, 48, 72 saat süreyle kültüre edilen hücrelerin MKH'ler olduğunu göstermek için Anti CD45, Anti CD34, Anti HLA-DR, Anti CD90, Anti CD 105 monoklonal antikorları kullanıldı. Akım sitometride CD45(-) CD34(-) CD90(+) CD105(+) hücreler MKH olarak değerlendirildi. MKH'lerden sentezlenenIDO da akım sitometrik analiz ile gösterildi.

Bunun için 24, 48 ve 72 saat kültüre edilen uyarılmış ve uyarılmamış MKH'ler belirtilen sürelerin sonunda tripsinizasyon yöntemi ile kültür kaplarından kaldırıldı. Sonra 15 ml'lik santrifüj tüplerine alınarak oda ısısında PBS ile 800 rpm'de 5 dk. santrifüj edilerek yıkama işlemi yapıldı (tripsinin etkisini uzaklaştırmak için). Süpernatant atıldıktan sonra hücre pelletine 500 μ l PBS eklenip nazik bir şekilde pipetleme yapılarak hücre solüsyonu hazır hale getirildi.

Akım sitometride çalışılacak parametrelere göre hazırlanan akım sitometri tüplerine hücre solüsyonlarından 200 μ l konuldu. Örneklerin üzerine sırasıyla

1. tüpe: CD45-FITC, CD34-PE, HLA-DR-PerCP
2. tüpe: CD105-PE, CD90-APC

monoklonal antikorlarından 10 μ l ilave edilerek düşük hızda vorteks yapıldı. Yüzey boyama için örnekler oda ısısında karanlıkta 30 dk. inkübe edildikten sonra IDO'nun tespiti için ayrıca hücre içi boyama yapıldı. Yüzey boyama yapılmış hücrelerin

üzerine hücre zarı geçirgenliğini arttırmak için 300 µl permeabilizing solüsyonu ilave edildi. Düşük hızda vorteks edildikten sonra oda ısısında karanlıkta 15-20 dk. inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda hücrelerin üzerine PBS eklenerek 2000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Üstteki süpernatant atıldıktan sonra birinci tüpe 10 µl IDO poliklonal antikoru ve ikinci tüpe 10 µl izotipik kontrolü konularak oda ısısında karanlıkta 15-20 dk. inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda hücreler bir kez daha yıkama işlemine tabi tutuldu. Elde edilen hücre pelletinin üzerine 300 µl PBS konularak analiz zamanına kadar + 4 °C'de muhafaza edildi. Analizler FACSCanto model akım sitometri cihazı ve FACSDiva yazılımı kullanılarak yapıldı.

3.3. B Lenfosit İzolasyonu ve Kültürü

3.3.1. B Lenfosit İzolasyonu

B lenfositler, kemik iliği vericisi sağlıklı bireylerin periferik kanından negatif seçim yöntemiyle B hücre ayırma kiti kullanılarak izole edildi. Bu amaçla 2ml kan örneği 100 µl izolasyon reaktifi ile 30 dk süreyle inkübe edildi, sonrasında % 2 FCS içeren PBS ile karıştırılarak ficoll solüsyonu üzerine damla damla ilave edilerek kademeli olarak yayıldı ve 1800 rpm de 30 dk. oda ısısında santrifüj edildi. B lenfositten zengin olan tabaka ayrı bir tüpe alınıp % 2 FCS içeren PBS ile karıştırılarak 1800 rpm de 5 dk. oda ısısında santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra CD19+ B lenfositden zengin hücre pelleti elde edildi.

Pokeweed Mitogen (PWM: Phytolacca Americana Lektini) hazırlanması: Flakon içerisindeki 5 mg PWM'nin üzerine 5 ml PBS eklenerek vorteks yapıldıktan sonra steril ependorf tüplere bölünüp -20 °C'lik derin dondurucuya kaldırıldı. Hücre kültüründe kullanılması hedeflenen miktar 20 µg/ml olarak belirlendi.

3.3.2. B Lenfosit Kültürü

Akım sitometride yapılan değerlendirme sonucunda % 95 saflıkla elde edilen B lenfositlerinin thoma lamında sayımı yapıldı. B lenfositler, her bir kültür kabında 50×10^4 hücre olacak şekilde 6 adet 25 cm² lik kültür kaplarına 7 ml mesencult medya ile ekildikten sonra bu kültür kaplarının 3 tanesine B lenfositleri uyarmak amacıyla PWM (7cc için 140 µl) konuldu. Diğer 3 tanesi ise PWM ile uyarılmadan 24, 48 ve 72 saat süreyle % 5 CO₂ basıncı altında 37°C'lik inkübatörde kültüre edildiler. 24, 48

ve 72. saatin sonunda her iki gruptaki hücrelerin değerlendirilmesi akım sitometri ile yapıldı.

3.3.3. İmmünofenotip Analiz İçin B Lenfosit Örneklerinin Hazırlanması

PWM ile uyarılmış ve uyarılmamış B lenfositlerde CD19, CD25, CD1d, CD5 yüzey belirteçlerinin ifadesi ve B lenfositlerden salgılanan IL-10 sentezi akım sitometri ile değerlendirildi.

Bunun için 24, 48 ve 72 saat kültüre edilen uyarılmış ve uyarılmamış B lenfositler belirtilen sürelerin sonunda kültür ortamından alınıp santrifüj tüplerine konularak oda ısısında 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra hücre pelletine 500 µl PBS eklenip nazik bir şekilde pipetleme yapılarak hücre solüsyonları hazır hale getirildi.

Akım sitometride çalışılacak parametrelere göre hazırlanan akım sitometri tüplerine hücre solüsyonundan 200 µl konuldu. Örneklerin üzerine sırasıyla

1. tüpe: CD5-FITC, CD19- PerCP-Cy5.5, CD1d-PE, CD25-APC

2. tüpe: CD5-FITC, CD19- PerCP-Cy5.5, CD25-APC

monoklonal antikorlarından 10 µl ilave edilerek düşük hızda vorteks yapıldı. Yüzey boyama için örnekler oda ısısında karanlıkta 30 dk. inkübe edildikten sonra IL-10'un tespiti için ayrıca hücre içi boyama yapıldı. Yüzey boyama yapılmış hücrelerin üzerine hücre zarı geçirgenliğini arttırmak için 300 µl permeabilizing solüsyonu ilave edildi. Düşük hızda vorteks edildikten sonra oda ısısında karanlıkta 15-20 dk. inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda hücrelerin üzerine PBS eklenerek 2000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Üstteki süpernatant atıldıktan sonra birinci tüpe 10 µl IL-10-PE, ikinci tüpe 10 µl izotipik kontrolü konularak oda ısısında karanlıkta 15-20 dk. inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda hücreler bir kez daha yıkama işlemine tabi tutuldu. Elde edilen hücre pelletinin üzerine 300 µl PBS konularak analiz zamanına kadar + 4 °C'de muhafaza edildi. Analizler FACSCanto model akım sitometri cihazı ve FACSDiva yazılımı kullanılarak yapıldı.

3.4. Mezenkimal Kök Hücre ve B Lenfosit Ko-kültürü

Mezenkimal kök hücrelerin, B-lenfositler üzerindeki etkisini incelemek amacıyla bu hücreler 1M:1B, 1M:2B, 2M:1B, 2M:2B oranlarında 24, 48 ve 72 saat süreyle bir arada kültüre edildiler (Şekil 3.2).

$$1M:1B = 5 \times 10^5 \text{ MKH} + 5 \times 10^5 \text{ B Lenfosit}$$

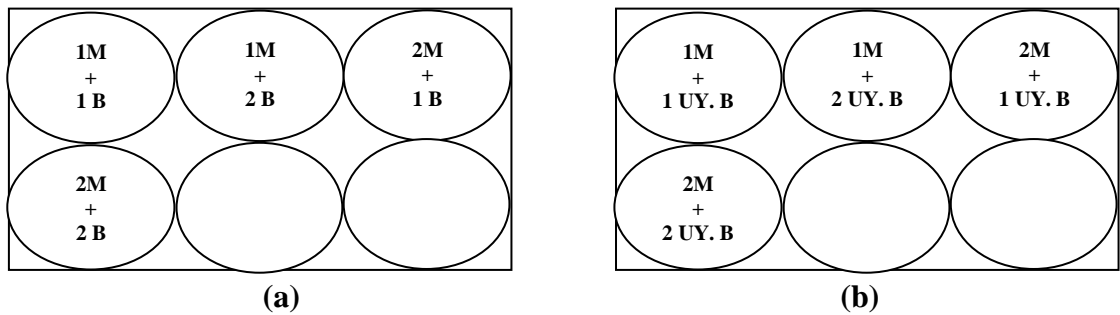
$$1M:2B = 5 \times 10^5 \text{ MKH} + 1 \times 10^6 \text{ B Lenfosit}$$

$$2M:1B = 1 \times 10^6 \text{ MKH} + 5 \times 10^5 \text{ B Lenfosit}$$

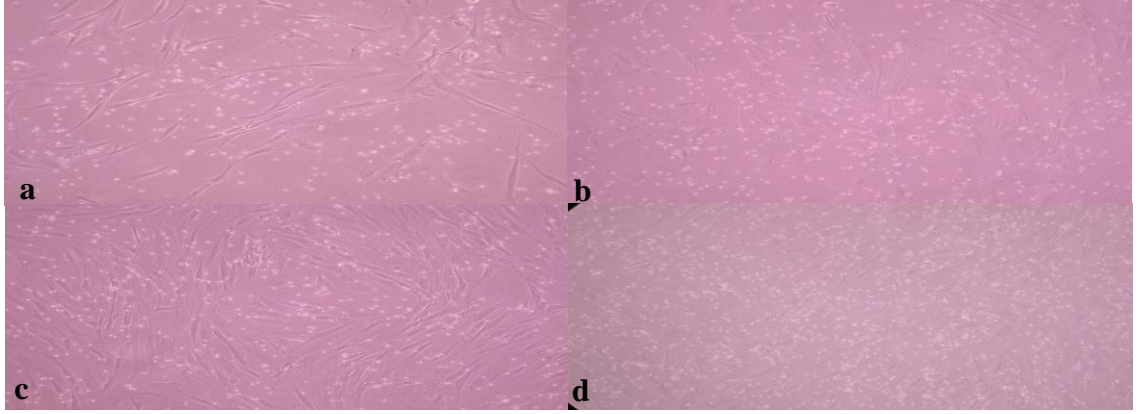
$$2M:2B = 1 \times 10^6 \text{ MKH} + 1 \times 10^6 \text{ B Lenfosit}$$

MKH'lerin thoma lamında sayımı yapıldıktan sonra 6 adet 6 kuyucuklu platelere yukarıda belirtilen oranlarda (B lenfositler olmaksızın) IFN- γ varlığında ekimleri yapıldı. Bir gece % 5 CO₂ basıncı altında 37°C'lik inkübatörde bekletildi. Ertesi gün medya değişimi yapılarak ortamdaki IFN- γ uzaklaştırıldı. MKH'lerin üzerine thoma lamında sayımı yapılan B lenfositler, belirtilen oranlarda 3 ml mesencult medya ile ekildi. Platelere 3 tanesinin her bir kuyucuğuna ekilen B lenfositleri uyarılmak amacıyla 60 μ l PWM konularak, diğer 3 tanesi ise PWM ile uyarılmadan 24, 48 ve 72 saat süreyle % 5 CO₂ basıncı altında 37°C'lik inkübatörde kültüre edildi (Şekil 3.2, 3.3, 3.4). 24, 48 ve 72. saatin sonunda kültürlerdeki B lenfositler kültür ortamından alınarak akım sitometri ile değerlendirmeleri yapıldı.

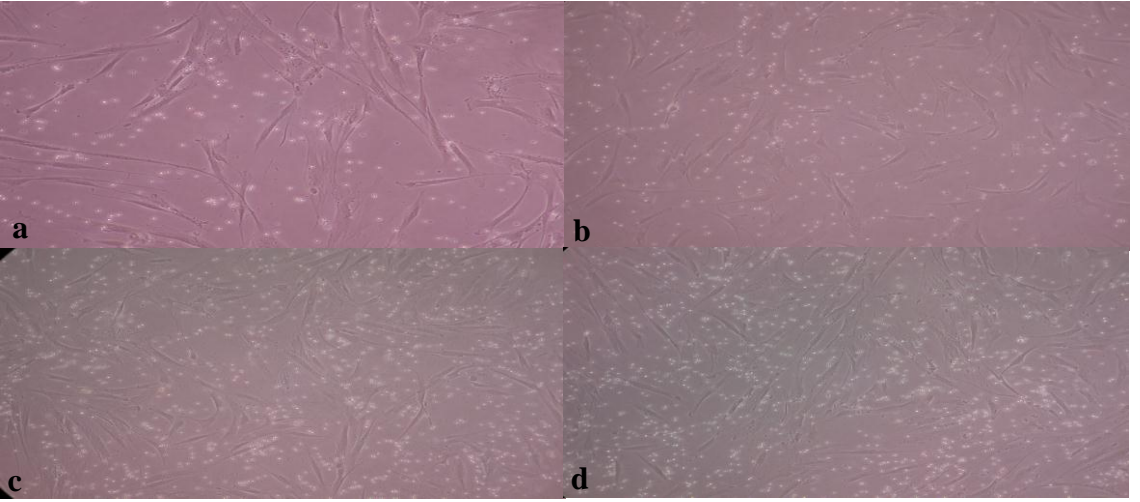
Kontrol olarak MKH'ler olmaksızın 24, 48 ve 72 saat süreyle tek başına kültüre edilen PWM ile uyarılmış ve uyarılmamış B lenfositler kullanıldı.



Şekil 3.2. MKH'ler ve B lenfositlerin PWM ile uyarılmadan (a) ve PWM ile uyarılarak (b) 6 kuyucuklu platelerdeki ekim şeması.



Şekil 3.3. MKH - PWM ile uyarılmış B lenfosit ko-kültürünün [1M:1B (a), 1M:2B (b), 2M:1B (c), 2M:2B (d)] inverted mikroskoptaki görüntüsü.



Şekil 3.4. MKH - PWM ile uyarılmamış B lenfosit ko-kültürünün [1M:1B (a), 1M:2B (b), 2M:1B (c), 2M:2B (d)] inverted mikroskoptaki görüntüsü.

3.4.1. İmmünofenotip Analiz İçin MKH'lerle Kültüre Edilen B Lenfosit Örneklerinin Hazırlanması

MKH'lerle birlikte kültüre edilen uyarılmış ve uyarılmamış B lenfositlerde CD19, CD25, CD5 yüzey belirteçlerinin ifadesi ile CD19+ ve CD5+B lenfositlerden salgılanan IL-10 sentezi akım sitometri ile değerlendirildi.

Bunun için MKH'lerle birlikte 24, 48 ve 72 saat kültüre edilen uyarılmış ve uyarılmamış B lenfositler belirtilen sürelerin sonunda kültür ortamından alınıp santrifüj tüplerine konularak oda ısısında 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.

Süpernatant atıldıktan sonra hücre pelletine 500 µl PBS eklenip nazik bir şekilde pipetleme yapılarak hücre solüsyonları hazır hale getirildi.

Akım sitometride çalışılacak parametrelere göre hazırlanan akım sitometri tüplerine hücre solüsyonundan 200 µl konuldu. Örneklerin üzerine sırasıyla

1. tüpe: CD5-FITC, CD19- PerCP-Cy5.5, CD25-APC

2. tüpe: CD5-FITC, CD19- PerCP-Cy5.5, CD25-APC

monoklonal antikorlarından 10 µl ilave edilerek düşük hızda vorteks yapıldı. Yüzey boyama için örnekler oda ısısında karanlıkta 30 dk. inkübe edildikten sonra IL-10'un tespiti için ayrıca hücre içi boyama yapıldı. Yüzey boyama yapılmış hücrelerin üzerine hücre zarı geçirgenliğini arttırmak için 300 µl permeabilizing solüsyonu ilave edildi. Düşük hızda vorteks edildikten sonra oda ısısında karanlıkta 15-20 dk. inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda hücrelerin üzerine PBS eklenerek 2000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Üstteki süpernatant atıldıktan sonra birinci tüpe 10 µl IL-10-PE ikinci tüpe 10 µl izotipik kontrolü konularak oda ısısında karanlıkta 15-20 dk. inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda hücreler bir kez daha yıkama işlemine tabi tutuldu. Elde edilen hücre pelletinin üzerine 300 µl PBS konularak analiz zamanına kadar + 4 °C'de muhafaza edildi. Analizler FACSCanto model akım sitometri cihazı ve FACSDiva yazılımı kullanılarak yapıldı.

3.4. Mezenkimal Kök Hücre-B Lenfosit Ko-kültüründe Proliferasyon Testi

MKH'lerin B-Lenfositler üzerindeki proliferatif ya da anti-proliferatif etkisini göstermek veya B lenfositlerin MKH'ler üzerinde etkisi olup olmadığını belirleyebilmek için MKH-B lenfosit ko-kültürlerinde 24., 48. ve 72. saat sonunda XTT (2,3-bis[2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt) testi yapıldı.

XTT suda çözünen bir tetrazolium tuzu olup sarı renkli bir solüsyondur. Tetrazolium halkasının dehidrogenaz enzimlerince parçalanması sonucu XTT turuncu renkli çözünebilir formazana dönüşür. Dehidrogenaz enzimleri canlı hücrelerin mitokondrilerinde mevcut olup ölü hücreler bu değişimi gerçekleştiremezler. Formazan konsantrasyonu canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır. Meydana gelen renk reaksiyonu 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak okunur ve absorbans değerleri belirlenir.

3. pasajdan sonra kullanıma hazır hale gelen MKH'ler, tripsinizasyon yöntemi ile kültür kabı yüzeyinden kaldırılıp santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra hücre pelleti medya ile seyreltilerek thoma lamında hücre sayımı yapıldı. 6 adet 96 kuyucuklu platelere MKH'lerin tek başına (1M, 2M) ve daha sonradan B lenfositlerin de ekileceği kuyucuklara belirtilen oranlarda (**1M+1B**, **1M+2B**, **2M+1B**, **2M+2B**) IFN- γ varlığında 100'er μ l ekimleri yapıldı (Şekil 3.3). % 5 CO₂ basıncı altında 37°C'lik inkübatörde bir gece bekletildi. Ertesi gün tüm kuyucuklardaki medyalar atılarak ortamdaki IFN- γ uzaklaştırıldı.

Platelerin 3 tanesinin her bir kuyucuğuna MKH'lerin üzerlerine thoma lamında sayımları yapılmış B lenfositlerin, PWM varlığında uyarılmış olarak belirtilen oranlarda (**1M+1B**, **1M+2B**, **2M+1B**, **2M+2B**) 100'er μ l ekimleri yapıldı (Şekil 3.3). Ayrıca B lenfositlerin MKH'ler olmaksızın tek başlarına da belirtilen oranlarda (1B, 2B) PWM varlığında uyarılmış olarak 100'er μ l ekimleri yapıldı. Diğer 3 tanesine de yine aynı oranlarda fakat B lenfositler PWM ile uyarılmadan 100'er μ l ekimleri yapıldı.

6 adet plate 24, 48 ve 72 saat süreyle % 5 CO₂ basıncı altında 37°C'lik inkübatörde kültüre edildi. 24., 48. ve 72. saat sonunda toplam 100 μ l olan hücre konsantrasyonunun üzerine 50 μ l XTT solüsyonu eklendi. En az 4 saat inkübatörde bekletildikten sonra platelerdeki hücrelerde oluşan renk değişimi plate okuyucuda 450 nm dalga boyu ile belirlendi.

Boş	1B	1M	1M	2B	1M	2M	2M	2M			
Media			+ 1B		+ 2B		+ 1B	+ 2B			

(a)

Boş	1	1M	1M	2	1M	2M	2M	2M			
Media	UYB		+ 1UYB	UYB	+ 2UY.B		+ 1UY.B	+ 2UY.B			

(b)

Şekil 3.5. MKH'ler ve B lenfositlerin PWM ile uyarılmadan (a) ve PWM ile uyarılarak (b) 96 kuyucuklu platelerdeki ekim şeması.

3.5. İstatistiksel Analiz

XTT testi sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi SPSS (Software Inc. Version 16) istatistik programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gruplar arası değerlendirme için tek yönlü (ANOVA) varyans analizi uygulanmış, homojen gruplarda TUKEY HSD, homojen olmayan gruplarda Tamhane değişkenleri uygulanmıştır. İstatistiksel nemlilik için $p < 0,05$ kabul edildi.

İmmnfenotip analiz sonuçları için ise her bir zaman aralığında 3'er deney yapılıp aritmetik ortalaması alındı

BULGULAR

4.1. Tek Başına Kültüre Edilen MKH'lerin İmmünofenotip Analizi

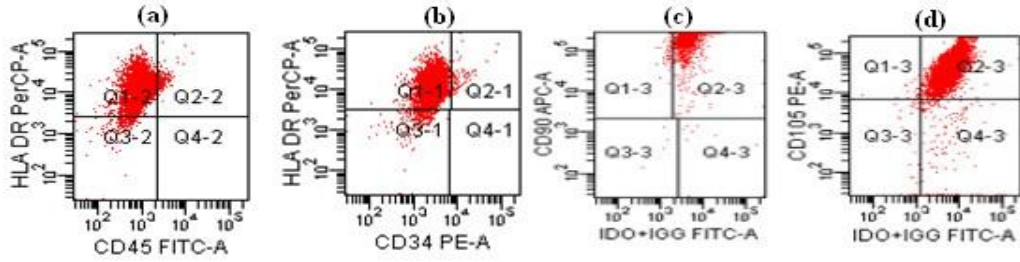
24, 48 ve 72 saat süreyle IFN- γ ile uyarılarak ve uyarılmadan kültüre edilen MKH'lerin ifade ettikleri CD105, CD90, HLA-DR, CD45 ve CD34 yüzey belirteçleri ile sentezlediğiIDO düzeyleri Tablo 4.1'de, akım sitometri görüntüleri ise Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Tek başına kültüre edilen MKH'lerin immünofenotip analizi.

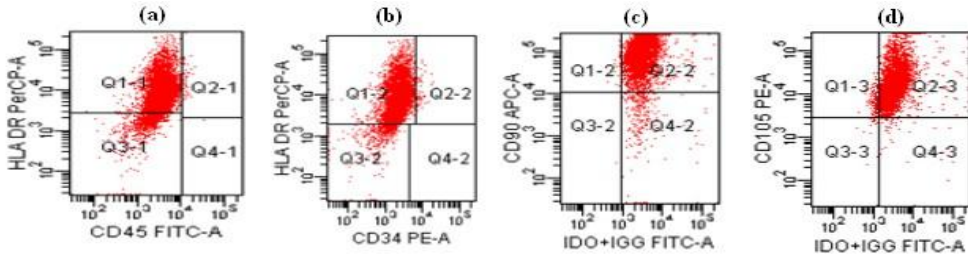
ÖRNEK ADI	CD45 (%)	CD34 (%)	HLADR (%)	CD45-HLADR+ (%)	CD34-HLADR+ (%)	CD105+ IDO+ (%)	CD90+IDO+ (%)
24.h M (-)	0,2	0,1	80,2	0,9	0,9	95,7	96,6
24.h M (+)	0,6	0,7	91,4	2,8	1,9	92,2	86,3
48.h M (-)	0	0,5	96,8	0,2	0,8	97,6	83,5
48.h M (+)	0	0,4	96,4	1,1	1,8	96,1	94
72.h M (-)	0,2	0,1	98,1	0,9	1,2	98,1	97,2
72.h M (+)	0,1	0	93,6	3	4,5	96,5	95,3

M(-): IFN- γ ile uyarılmamış MKH, M(+): IFN- γ ile uyarılmış MKH

Her bir zaman aralığı için 3'er deney yapıp aritmetik ortalaması alındı.

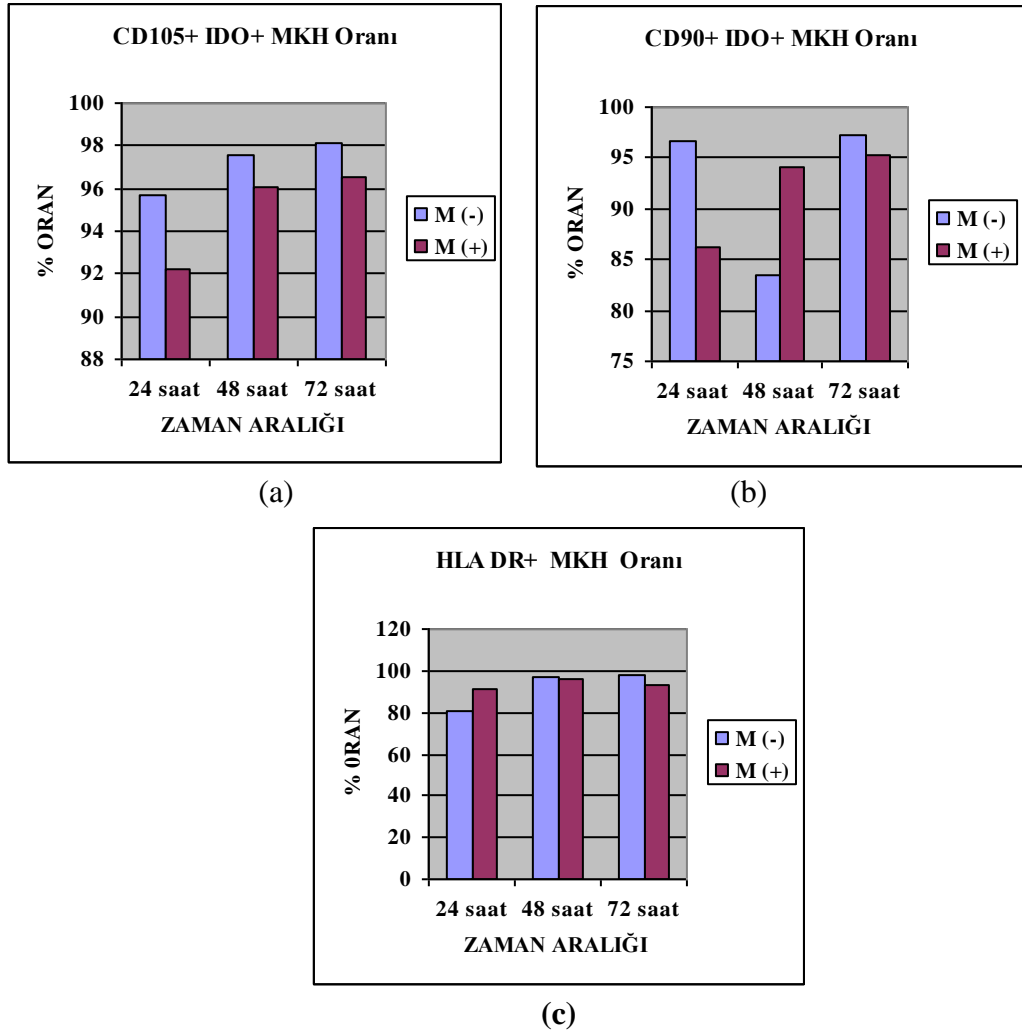


Şekil 4.1. IFN- γ ile uyarılmış MKH kültürlerinde ifade edilen-edilmeyen yüzey belirteçlerinin akım sitometri görüntüleri [CD45-HLADR (a), CD34-HLADR (b), CD90-IDO (c), CD105-IDO (d)].



Şekil 4.2. IFN- γ ile uyarılmamış MKH kültürlerinde ifade edilen-edilmeyen yüzey belirteçlerinin akım sitometri görüntüleri [CD45-HLADR (a), CD34-HLADR (b), CD90-IDO (c), CD105-IDO (d)].

MKH'lerde CD105, CD90 ve HLA-DR yüzey belirteçlerinin yüksek oranlarda ifade edildiği ve IDO'nun MKH'ler tarafından sentezlendiği görüldü. CD105+ MKH'lerden sentezlenen IDO oranının hem uyarılmış hem de uyarılmamış hücrelerde 24. saatten 72. saate doğru arttığı, her iki grup kendi aralarında karşılaştırıldığında ise uyarılmamış hücrelerde uyarılmışlara göre bu oranın daha yüksek olduğu görüldü. CD90+ MKH'lerden sentezlenen IDO oranının 24. ve 72. saatte uyarılmamış hücrelerde uyarılmışlara göre daha yüksek olduğu, 48.saate ise uyarılmış hücrelerde uyarılmamışlara göre bu oranın daha yüksek olduğu görülmüştür. Uyarılmış ve uyarılmamış MKH'lerde HLA-DR'nin yüksek oranlarda ifade edildiği tespit edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. IFN- γ ile uyarılmış (M+) ve uyarılmamış (M-) MKH kültürlerinde CD105+IDO+ (a), CD90+IDO+ (b) ve HLA-DR+ (c) hücre yüzdeleri.

4.2. Tek Başına Kültüre Edilen B Lenfositlerin İmmünofenotip Analizi

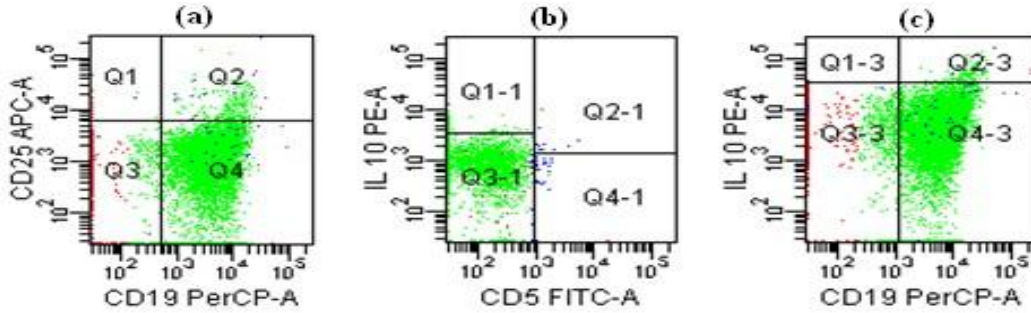
24, 48 ve 72 saat süreyle PWM ile uyarılarak ve uyarılmadan, tek başına kültüre edilen B lenfositlerde ifade edilen CD19, CD25, CD1d ve CD5 yüzey belirteçleri ile B lenfositler tarafından sentezlenen IL-10'nun düzeylerinin analiz sonuçları Tablo 4.2'de, akım sitometri görüntüleri ise Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'de verilmiştir.

Tablo 4.2. Tek başına kültüre edilen B lenfositlerin immünofenotip analizi.

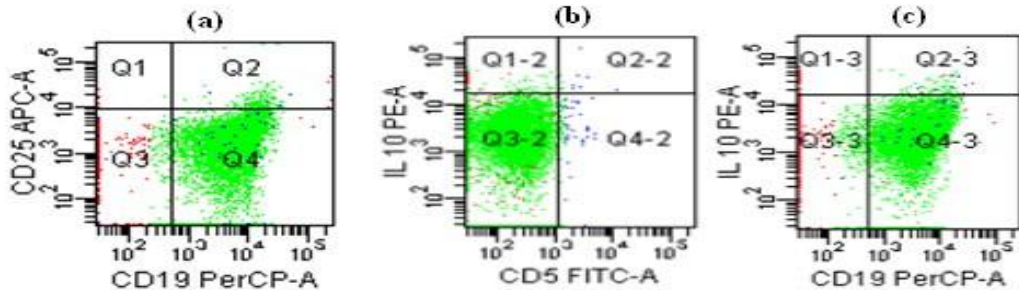
ÖRNEK ADI	CD19 (%)	CD5 (%)	CD1d (%)	CD19 + CD25 (%)	CD5 + CD19 (%)	CD 5+ IL 10 (%)	CD19+ IL 10 (%)
24.h B (-)	93,6	0,4	3,4	2,6	0,9	0,2	1,0
24.h B (+)	93,4	0,5	3,8	1,9	0,4	0,4	1,8
48.h B (-)	96,7	0,8	6,6	1,3	0,3	0,5	1,7
48.h B (+)	97,1	1,3	4,5	1,1	0,2	0,4	1,2
72.h B (-)	96,8	0,5	9,4	1,3	0,3	0,1	1,7
72.h B (+)	93,9	1,5	4,2	1,5	4,2	0,4	4,5

B(-): PWM ile uyarılmamış B Lenfosit, **B(+):** PWM ile uyarılmış B Lenfosit.

Her bir zaman aralığı için 3'er deney yapıp aritmetik ortalaması alındı.

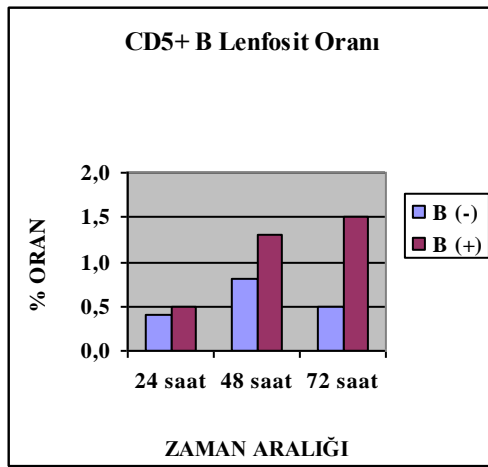


Şekil 4.4. PWM ile uyarılmış B lenfosit kültürlerinde ifade edilen CD19, CD25 ve CD5 yüzey belirteçleri ile CD5+ ve CD19+B lenfositler tarafından sentezlenen IL-10 düzeylerinin akım sitometri görüntüleri [CD25-CD19 (a), CD5-IL 10 (b), CD19-IL 10 (c)].

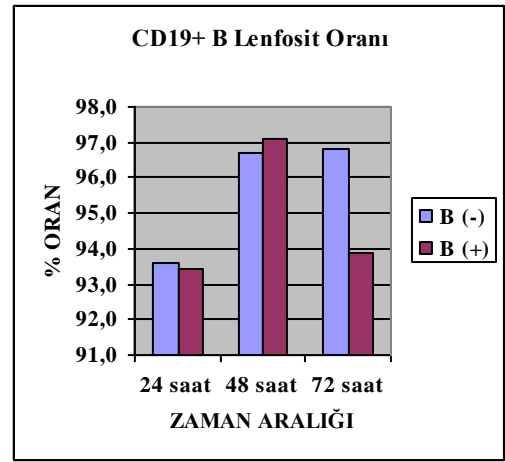


Şekil 4.5. PWM ile uyarılmamış B lenfosit kültürlerinde ifade edilen CD19, CD25 ve CD5 yüzey belirteçleri ile CD5+ ve CD19+B lenfositler tarafından sentezlenen IL-10 düzeylerinin akım sitometri görüntüleri [CD25-CD19 (a), CD5-IL 10 (b), CD19-IL 10 (c)].

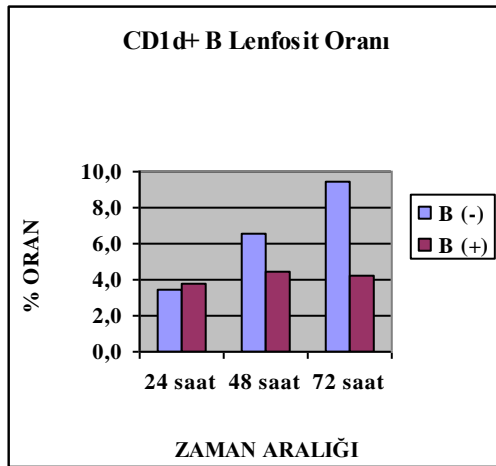
CD5+ B lenfosit oranının uyarılmış B lenfositlerde 24. saatten 72. saate doğru arttığı, uyarılmamış B lenfositlerde ise bu oranın en yüksek 48. saatte olduğu; CD19+ B lenfosit oranının uyarılmış ve uyarılmamış B lenfosit kültürlerinde farklı olmadığı her iki kültürde de en yüksek oranın 48. saatte olduğu; CD1d+ B lenfosit oranının uyarılmış kültürlerde zamanlar arasında farklılık olmadığı, uyarılmamış kültürlerde ise 24. saatten 72. saate doğru arttığı tespit edilmiştir. CD19+CD25+ B lenfosit oranının da uyarılmış ve uyarılmamış B lenfosit kültürleri arasında farklı olmadığı en yüksek oranın 24. saatte olduğu görülmüştür (Şekil 4.6).



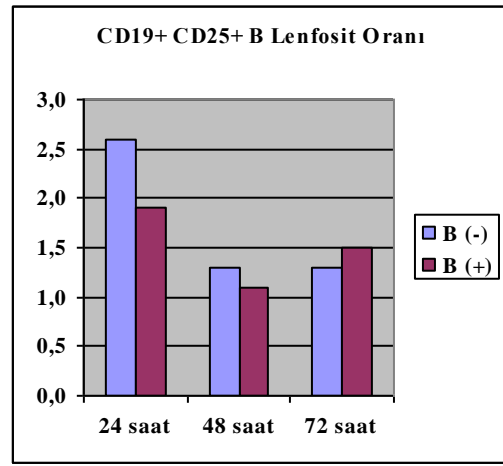
(a)



(b)



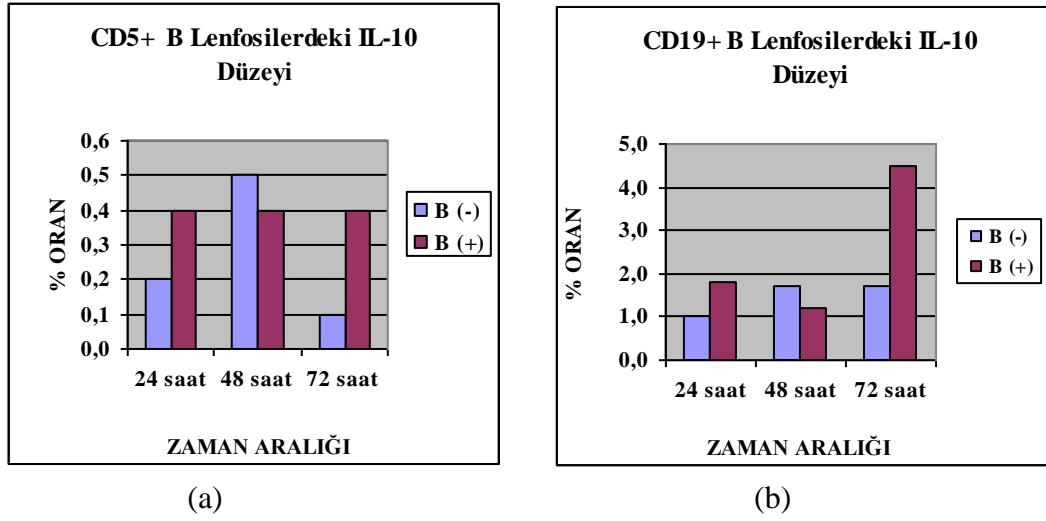
(c)



(d)

Şekil 4.6. PWM ile uyarılmış (B+) ve uyarılmamış (B-) B lenfosit kültürlerindeki CD5+ (a), CD19+ (b), CD1d+ (c) ve CD19+CD25+ (d) B lenfosit yüzdeleri.

Tek başına kültüre edilen B lenfositlerde IL-10 sentezlendiği saptanmış olup her bir zaman aralığında; CD5+B lenfositlerden sentezlenen IL-10 düzeyinin uyarılmış kültürlerde farklı olmadığı, uyarılmamış kültürlerde ise en yüksek 48. saatte olduğu görülmüştür; CD19+B lenfositlerden sentezlenen IL-10 düzeyinin ise uyarılmamış kültürlerde farklı olmadığı, uyarılmış kültürlerde ise en fazla 72. saatte olduğu görülmüştür (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. PWM ile uyarılmış (B+) ve uyarılmamış (B-) B lenfosit kültürlerindeki CD5+ (a) ve CD19+ (b) B lenfositlerden sentezlenen IL-10 düzeyleri.

4.3. MKH'lerle Birlikte Kültüre Edilen B Lenfositlerin İmmünofenotip Analizi

PWM ile uyarılmış ve uyarılmamış B lenfositler, IFN- γ ile uyarılmış MKH'lerle birlikte 1M:1B, 1M:2B, 2M:1B ve 2M:2B oranlarında 24, 48 ve 72 saat süreyle kültüre edildikten sonra B lenfositlerde ifade edilen yüzey belirteçlerinin ve IL-10 sentezinin analiz sonuçları Tablo 4.3 ile Tablo 4.4'de, akım sitometri görüntüleri ise Şekil 4.8 ile Şekil 4.9'de verilmiştir.

Tablo 4.3. MKH-PWM ile uyarılmış B lenfosit ko-kültürlerindeki B lenfositlerin immünofenotip analizi.

ÖRNEK ADI	CD19 (%)	CD5 (%)	CD19+CD25 (%)	CD5+CD19 (%)	CD5+IL10 (%)	CD19+IL10(%)
24.h B (+) 1:1	96,5	1,8	6,3	0,8	0,7	1,7
24.h B (+) 1:2	96,4	1,4	3,1	0,9	0,5	2,1
24.h B (+) 2:1	95,4	1,5	4,4	0,9	0,6	1,4
24.h B (+) 2:2	95,2	1,5	6	0,7	0,4	1,6
48.h B (+) 1:1	75,6	1,3	2,2	0,6	0,4	1,6
48.h B (+) 1:2	95	1,1	1,8	0,4	0,4	1,6
48.h B (+) 2:1	95,1	1,5	2,5	0,8	0,3	5,6
48.h B (+) 2:2	94	1,3	1,2	0,7	0,3	3
72.h B (+) 1:1	94,2	2	1,6	0,2	1,1	2,5
72.h B (+) 1:2	93,6	1,7	2,2	0,4	0,5	3
72.h B (+) 2:1	92,3	1,9	3	0,4	0,7	4
72.h B (+) 2:2	93,7	1,7	3,5	0,5	0,6	3,5

B(+): PWM ile uyarılmış B Lenfosit

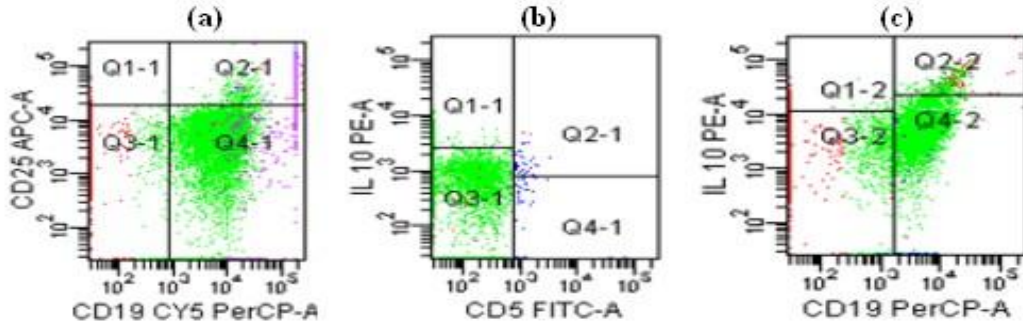
Her bir zaman aralığı için 3'er deney yapıp aritmetik ortalaması alındı.

Tablo 4.4. MKH-uyarılmamış B lenfosit ko-kültürlerindeki B lenfositlerin immünofenotip analizi.

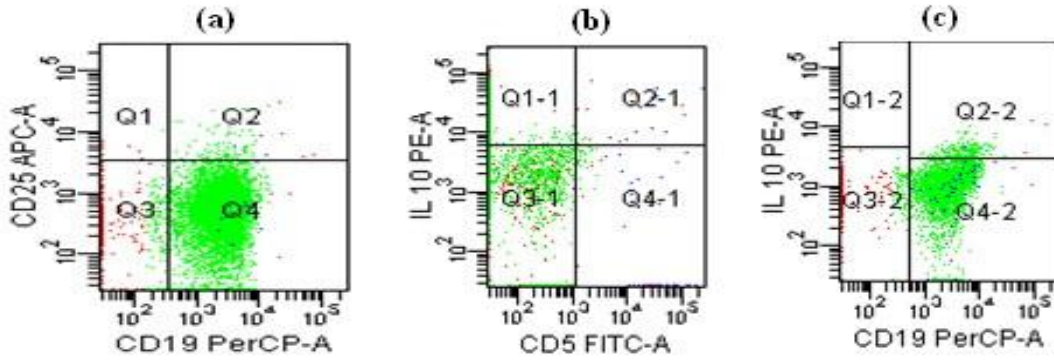
ÖRNEK ADI	CD19 (%)	CD5 (%)	CD19+CD25(%)	CD5+CD19(%)	CD5+IL10(%)	CD19+IL10(%)
24.h B (-) 1:1	94,4	0,6	1,85	1,3	0,35	5,4
24.h B (-) 1:2	93,8	0,4	1,55	0,8	0,3	3,9
24.h B (-) 2:1	92,3	0,9	2,4	0,6	0,4	14,5
24.h B (-) 2:2	98,9	0,9	0,6	0,6	0,1	1,4
48.h B (-) 1:1	89,2	1,3	1,8	1,7	0,6	4,4
48.h B (-) 1:2	93,8	0,9	1,9	1,3	0,3	3,5
48.h B (-) 2:1	92	2,2	2,4	3,9	0,6	4,8
48.h B (-) 2:2	95,3	1,5	1,4	1,8	0,5	3,5
72.h B (-) 1:1	90,5	1,7	3,3	1,5	0,8	4,3
72.h B (-) 1:2	90,7	1,2	1,5	0,4	0,6	3,8
72.h B (-) 2:1	91,6	1,5	3,1	0,6	0,8	4,7
72.h B (-) 2:2	89,5	1,4	2,1	0,7	0,4	3,3

B(-): PWM ile uyarılmamış B lenfosit

Her bir zaman aralığı için 3'er deney yapıp aritmetik ortalaması alındı.

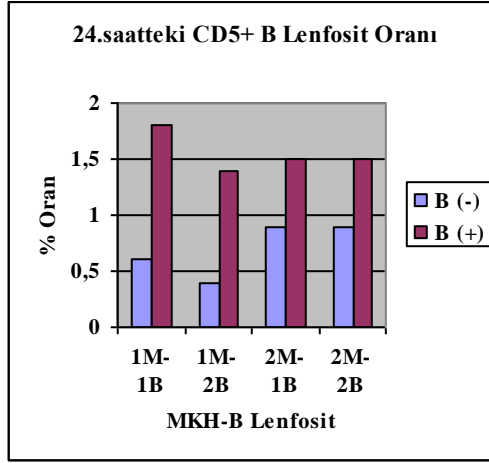


Şekil 4.8. MKH + PWM ile uyarılmış B lenfosit ko-kültürlerinde ifade edilen CD19, CD25 ve CD5 yüzey belirteçleri ile CD5+ ve CD19+ B lenfositler tarafından sentezlenen IL-10 düzeylerinin akım sitometri görüntüleri [CD25-CD19 (a), CD5-IL 10 (b), CD19-IL 10 (c)].

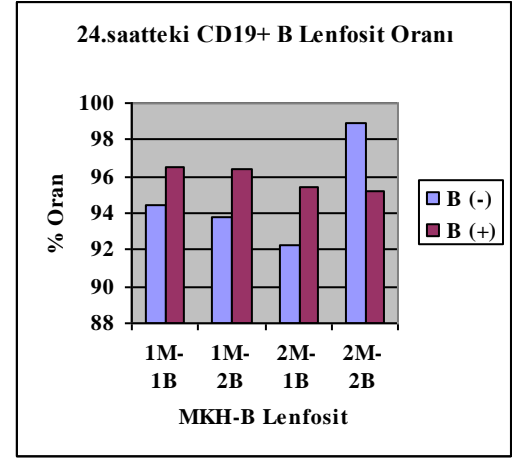


Şekil 4.9. MKH + PWM ile uyarılmamış B lenfosit ko-kültürlerinde ifade edilen CD19, CD25 ve CD5 yüzey belirteçleri ile CD5+ ve CD19+ B lenfositler tarafından sentezlenen IL-10 düzeylerinin akım sitometri görüntüleri [CD25-CD19 (a), CD5-IL 10 (b), CD19-IL 10 (c)].

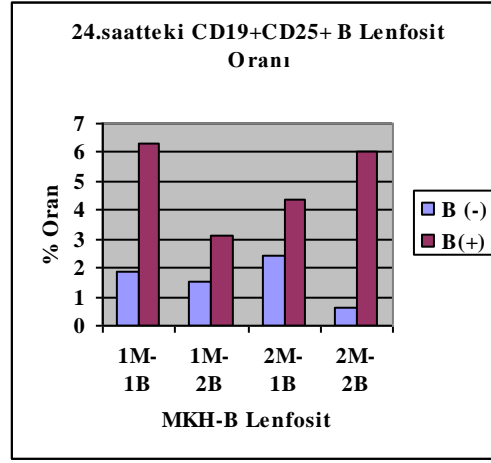
24. saatte ko-kültürlerdeki CD5+, CD19+ ve CD19+CD25+ B lenfosit oranlarının uyarılmış B lenfositlerle yapılan kültürlerde daha yüksek olduğu görülmüştür. CD5+ ve CD19+CD25+ B lenfosit oranı, B lenfositlerin uyarıldığı ko-kültürlerde 1M:1B'de, uyarılmadığı ko-kültürlerde 2M:1B'de en yüksek olduğu; CD19+ B lenfosit oranının ise B lenfositlerin uyarıldığı ko-kültürlerde 1M:1B'de, uyarılmadığı ko-kültürlerde ise 2M:2B'de en yüksek olduğu görüldü (Şekil 4.10).



(a)



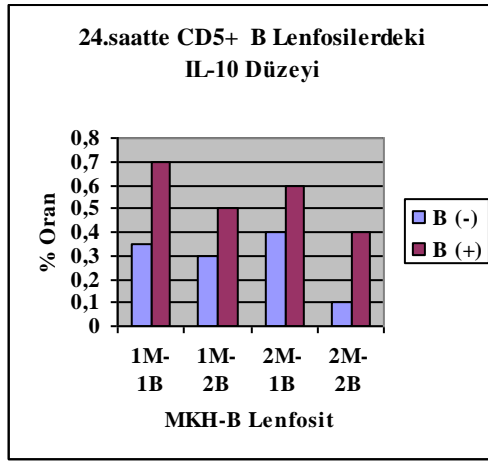
(b)



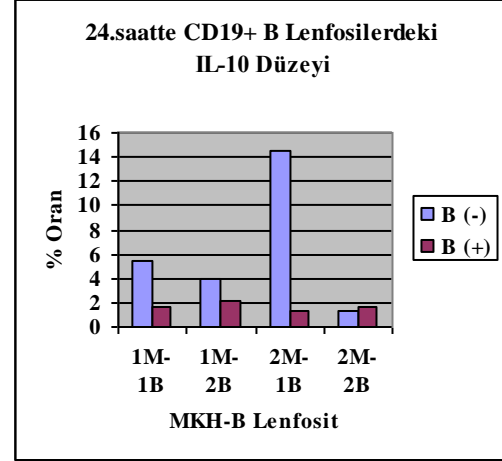
(c)

Şekil 4.10. 24. saat MKH + B lenfosit [PWM ile uyarılmış (B+) ve uyarılmamış (B-)] ko-kültürlerindeki CD5+ (a), CD19+ (b) ve CD19+CD25+ (c) B lenfosit yüzdeleri.

24. saatte ko-kültürlerdeki CD5+B lenfositlerden sentezlenen IL-10 düzeyinin uyarılmış B lenfositlerle yapılan kültürlerde daha yüksek olduğu ve bunun da 1M:1B'de en yüksek olduğu tespit edilmiş, uyarılmamış B lenfositlerle yapılan kültürlerde ise 2M:1B'de en yüksek oranda olduğu bulunmuştur. CD19+B lenfositlerden sentezlenen IL-10 düzeyinin uyarılmamış B lenfositlerle yapılan kültürlerde daha yüksek ve bunun da 2M:1B'de en yüksek olduğu görülmüş, uyarılmış B lenfositlerle yapılan kültürlerde ise oranlar arasında farklılık tespit edilmemiştir (Şekil 4.11).



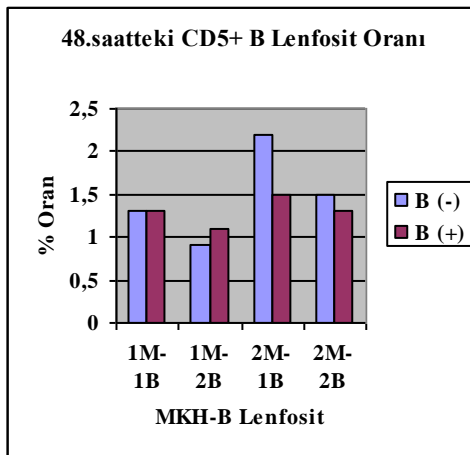
(a)



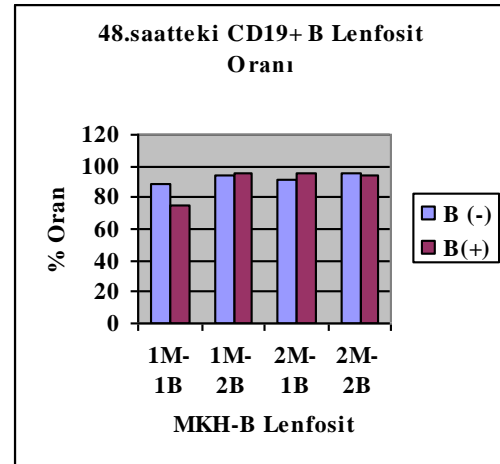
(b)

Şekil 4.11. 24.saat MKH + B lenfosit [PWM ile uyarılmış (B+) ve uyarılmamış (B-)] ko-kültürlerinde CD5+ (a) ve CD19+ (b) B lenfositlerden sentezlenen IL-10 düzeyleri.

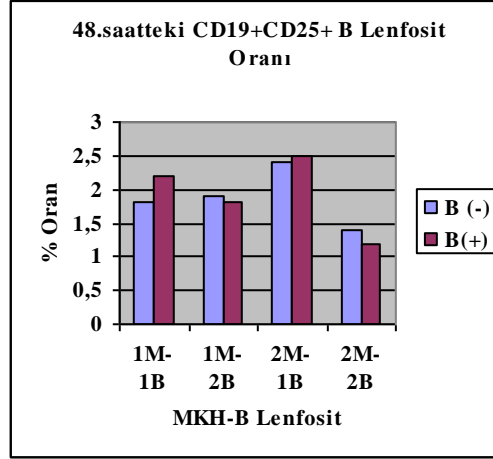
48. saatte uyarılmış ve uyarılmamış B lenfositlerle yapılan kültürler arasında CD5+, CD19+ ve CD19+CD25+ B lenfosit oranları açısından bir farklılık olmadığı tespit edilmiş, CD5+, CD19+ ve CD19+CD25+ B lenfosit oranlarının hem uyarılmış hem de uyarılmamış B lenfositlerle yapılan kültürlerde en yüksek 2M:1B’de olduğu bulunmuştur (Şekil 4.12).



(a)



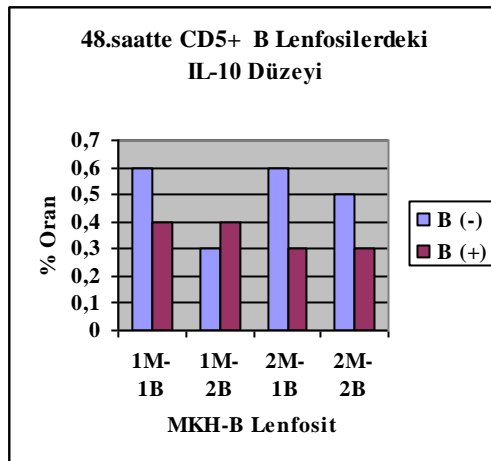
(b)



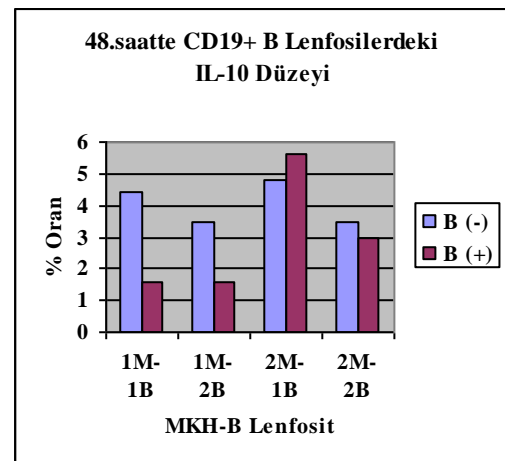
(c)

Şekil 4.12. 48.saat MKH + B lenfosit [PWM ile uyarılmış (B+) ve uyarılmamış (B-)] ko-kültürlerindeki CD5+ (a), CD19+ (b) ve CD19+CD25+ (c) B lenfosit yüzdeleri.

48. saatte ko-kültürlerdeki CD5+B lenfositlerden sentezlenen IL-10 düzeyinin uyarılmamış B lenfositlerle yapılan kültürlerde daha yüksek olduğu ve bunun da 1M:1B ve 2M:1B oranlarında en yüksek olduğu tespit edilmiş, uyarılmış B lenfositlerle yapılan kültürlerde ise oranlar arasında bir farklılık görülmemiştir. CD19+B lenfositlerden sentezlenen IL-10 düzeyinin de uyarılmamış B lenfositlerle yapılan kültürlerde daha yüksek olduğu tespit edilmiş, her iki hücre grubunda da 2M:1B’de en yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4.13).



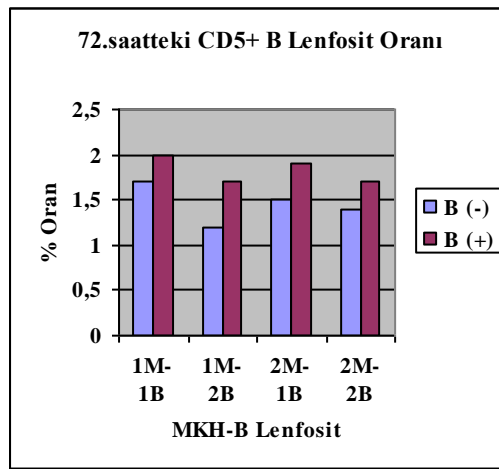
(a)



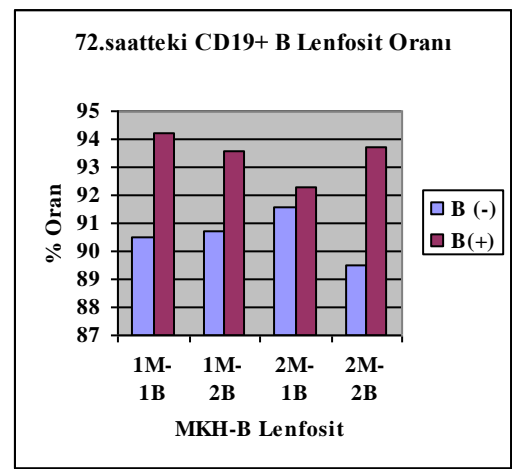
(b)

Şekil 4.13. 48.saat MKH + B lenfosit [PWM ile uyarılmış (B+) ve uyarılmamış (B-)] ko-kültürlerindeki CD5+ (a) ve CD19+ (b) B lenfositlerden sentezlenen IL-10 düzeyleri.

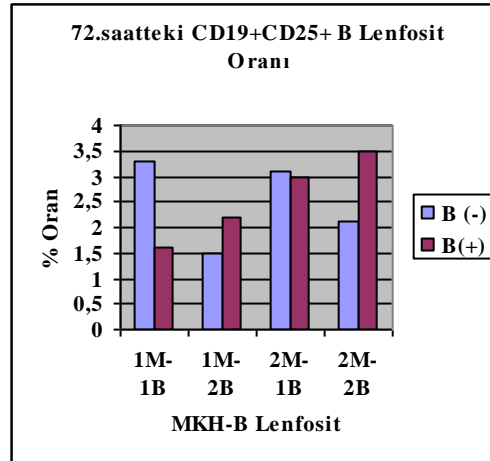
72. saatte ko-kültürlerdeki CD5+, CD19+ ve CD19+CD25+ B lenfosit oranlarının uyarılmış B lenfositlerle yapılan kültürlerde uyarılmamışlara göre daha yüksek olduğu görülmüştür. CD5+B lenfosit oranının uyarılmış ve uyarılmamış B lenfosit ko-kültürlerinde en yüksek 1M:1B'de, CD19+B lenfosit oranının B lenfositlerin uyarıldığı ko-kültürlerde 1M:1B'de, uyarılmadığı ko-kültürlerde 2M:1B'de olduğu bulunmuş, CD19+CD25+ B lenfosit oranının ise B lenfositlerin uyarıldığı ko-kültürlerde 2M:2B'de, uyarılmadığı ko-kültürlerde 1M:1B'de en yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4.14).



(a)



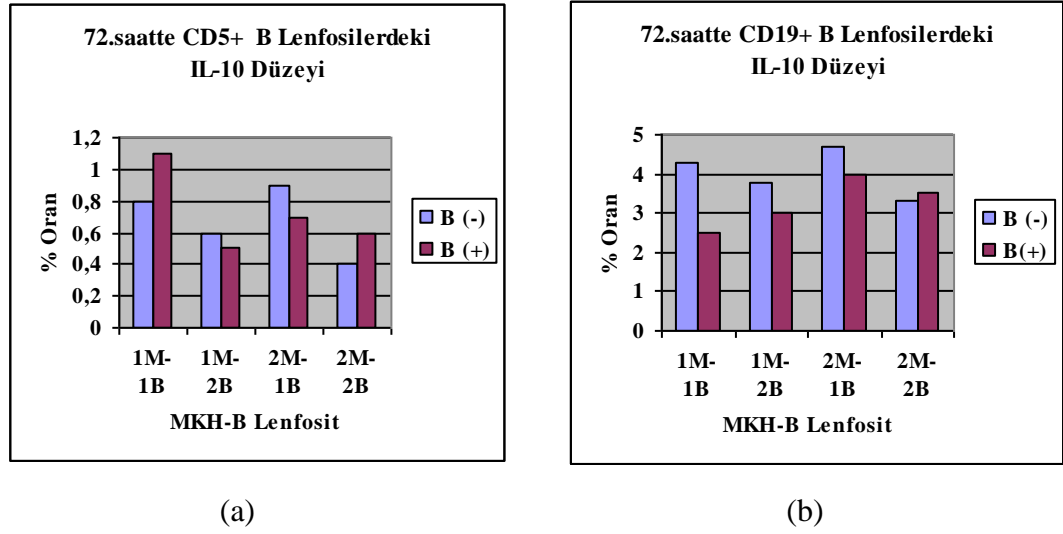
(b)



(c)

Şekil 4.14. 72. saat MKH + B lenfosit [PWM ile uyarılmış (B+) ve uyarılmamış (B-)] ko-kültürlerinde CD5+ (a), CD19+ (b) ve CD19+CD25+ (c) B lenfosit yüzdeleri.

72. saatte ko-kültürlerdeki CD5+B lenfositlerden sentezlenen IL-10 düzeyinin uyarılmış B lenfositlerle yapılan kültürlerde 1M:1B oranında, uyarılmamış B lenfositlerle yapılan kültürlerde ise 2M:1B oranında olduğu tespit edilmiş, CD19+ B lenfositlerden sentezlenen IL-10 düzeyinin ise uyarılmış ve uyarılmamış B lenfositlerle yapılan kültürlerde 2M:1B oranında en yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4.15).



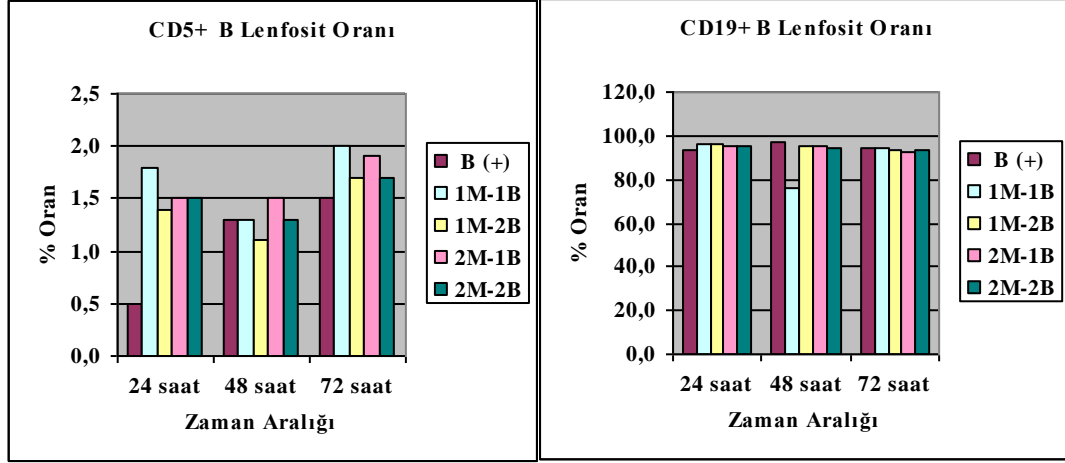
Şekil 4.15. 72.saat MKH + B lenfosit [PWM ile uyarılmış (B+) ve uyarılmamış (B-)] ko-kültürlerindeki CD5+ (a) ve CD19+ (b) B lenfositlerden sentezlenen IL-10 düzeyleri.

4.4. Tek Başına ve MKH'lerle Birlikte Kültüre Edilen B Lenfositlerin Karşılaştırılması

Tek başına ve MKH'lerle birlikte kültüre edilen uyarılmış B lenfositlerdeki CD5+, CD19+ ve CD19+CD25+ B lenfosit yüzdeleri ile CD5+ ve CD19+B lenfositlerden sentezlenen IL-10 düzeylerinin karşılaştırması Şekil 4.16 ve Şekil 4.17'da verilmiştir.

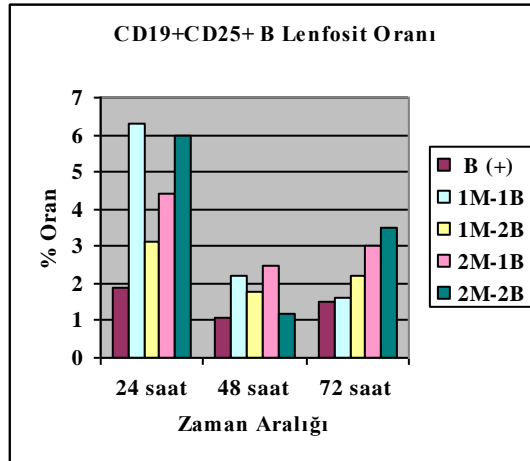
MKH'lerle birlikte kültüre edilen uyarılmış B lenfositlerde CD5+B lenfosit oranının tek başına kültüre edilenlere göre daha yüksek olduğu ve en yüksek oranın 24. saatte olduğu tespit edilmiş, tek başına ve MKH'lerle birlikte kültüre edilen uyarılmış B lenfositler arasında CD19+B lenfosit oranı açısından ise bir farklılığın olmadığı görülmüştür. CD19+CD25+ B lenfosit oranının MKH'lerle birlikte kültüre

edilen uyarılmış B lenfositlerde daha yüksek olduğu ve en yüksek oranın 24. saatte olduğu olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.16).



(a)

(b)

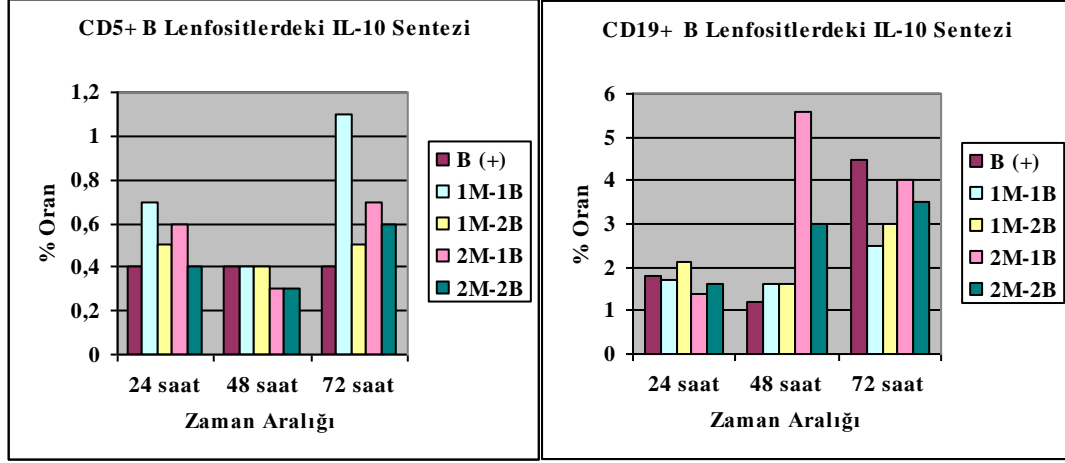


(c)

Şekil 4.16. Tek başına (B+) ve MKH'lerle birlikte kültüre edilen PWM ile uyarılmış B lenfositlerdeki CD5+ (a), CD19+ (b) ve CD19+CD25+ (c) B lenfosit yüzdelерinin karşılaştırılması.

Uyarılmış B lenfositler içerisindeki CD5+B lenfositlerden sentezlenen IL-10 düzeyinin, MKH'lerle birlikte kültüre edilenlerde 24 ve 72. saatte tek başına kültüre edilenlere göre daha yüksek olduğu, 48. saatte ise tek başına ve MKH'lerle birlikte kültüre edilen uyarılmış B lenfositler arasında farklılık olmadığı görülmüştür. CD19+B lenfositlerden sentezlenen IL-10 düzeyinin 24. saatte, tek başına ve MKH'lerle birlikte kültüre edilen uyarılmış B lenfositler arasında farklı olmadığı, 48.saatte MKH'lerle birlikte kültüre edilenlerde tek başına kültüre edilenlere göre

daha yüksek olduğu, 72. saatte ise tek başına kültüre edilenlerde MKH'lerle birlikte kültüre edilenlere göre daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 4.17).



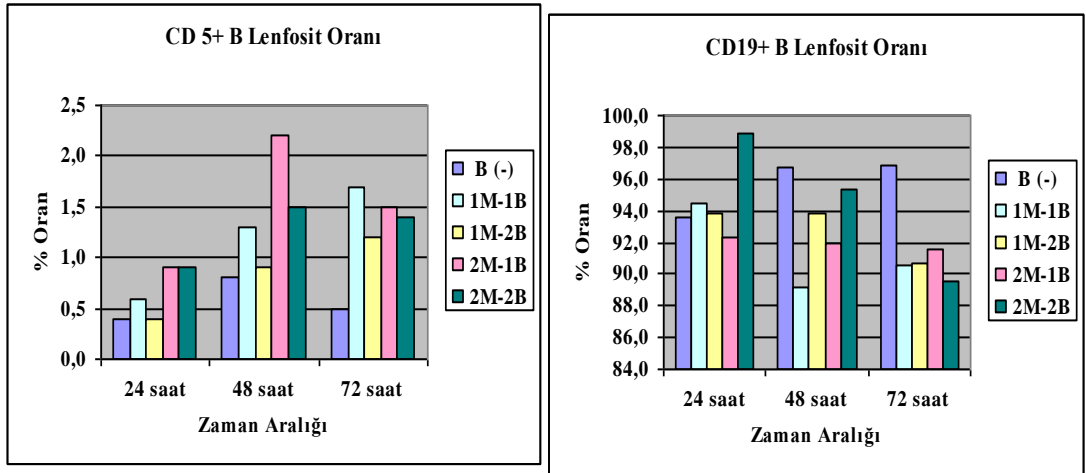
(a)

(b)

Şekil 4.17. Tek başına (B+) ve MKH'lerle birlikte kültüre edilen PWM ile uyarılmış B lenfositlerdeki CD5+ (a) ve CD19+ (b) B lenfositlerden sentezlenen IL-10 düzeylerinin karşılaştırılması.

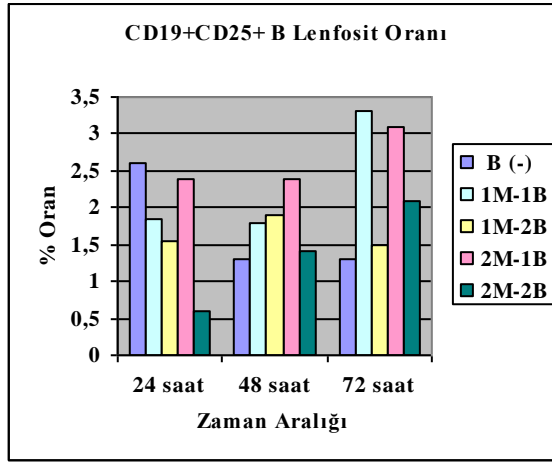
Tek başına ve MKH'lerle birlikte kültüre edilen uyarılmamış B lenfositlerdeki CD5+, CD19+ ve CD19+CD25+ B lenfosit yüzdeleri ile CD5+ ve CD19+B lenfositlerden sentezlenen IL-10 düzeylerinin karşılaştırması Şekil 4.18 ve Şekil 4.19'da verilmiştir.

MKH'lerle birlikte kültüre edilen uyarılmamış B lenfositlerde CD5+B lenfosit oranının tek başına kültüre edilenlere göre daha yüksek olduğu ve en yüksek oranın 72. saatte olduğu; CD19+B lenfosit oranının 24. saatte MKH'lerle birlikte kültüre edilen uyarılmamış B lenfositlerde tek başına kültüre edilenlere göre, 48. ve 72. saattlerde ise tek başına kültüre edilen uyarılmamış B lenfositlerde MKH'lerle birlikte kültüre edilenlere göre daha yüksek olduğu görülmüştür. CD19+CD25+ B lenfosit oranının ise 24. saatte tek başına kültüre edilen uyarılmamış B lenfositlerde MKH'lerle birlikte kültüre edilenlere göre, 48. ve 72. saatlerde MKH'lerle birlikte kültüre edilenlerde tek başına kültüre edilenlere göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.18).



(a)

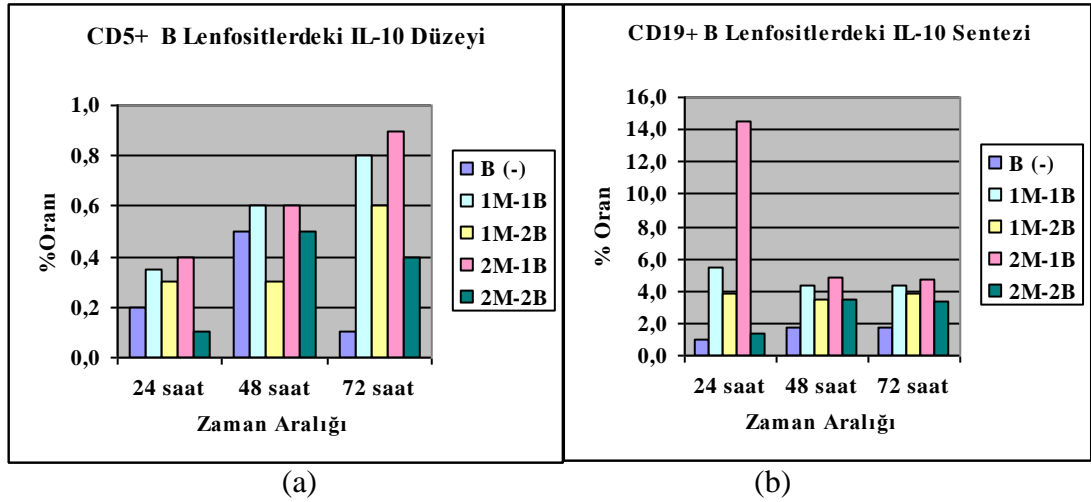
(b)



(c)

Şekil 4.18. Tek başına (B+) ve MKH'lerle birlikte kültüre edilen PWM ile uyarılmamış B lenfositlerdeki CD5+ (a), CD19+ (b) ve CD19+CD25+ (c) B lenfosit yüzdelerinin karşılaştırılması.

Uyarılmamış B lenfositler içerisindeki CD5+B lenfositlerden sentezlenen IL-10 düzeyinin, MKH'lerle birlikte kültüre edilenlerde tek başına kültüre edilenlere göre daha yüksek olduğu ve bu farklılığın en yüksek 72. saatte olduğu görülmüştür. CD19+B lenfositlerden sentezlenen IL-10 düzeyinin de MKH'lerle birlikte kültüre edilenlerde tek başına kültüre edilenlere göre daha yüksek olduğu ve bu farklılığın en yüksek 72. saatte olduğu görülmüştür (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. Tek başına (B+) ve MKH'lerle birlikte kültüre edilen PWM ile uyarılmamış B lenfositlerdeki CD5+ (a) ve CD19+ (b) B lenfositlerden sentezlenen IL-10 düzeylerinin karşılaştırılması.

4.5. Mezenkimal Kök Hücrelerin B Lenfositlerin Proliferasyonlarına Etkileri

MKH-B lenfosit (PMW ile uyarılmış ve uyarılmamış) ko-kültürleri 24, 48 ve 72. saat sonunda XTT testi ile değerlendirilmiştir (Tablo 4.5).

Değerlendirmeler mm^3 'deki hücre sayısına göre yapılmıştır.

1 B= 1 mm^3 de 200 B lenfosit içermektedir.

1 M= 1 mm^3 de 200 MKH içermektedir.

2 B= 1 mm^3 de 400 B lenfosit içermektedir.

2 M= 1 mm^3 de 400 MKH içermektedir.

Elde edilen sonuçlar 1 mm^3 deki hücrenin XTT absorbans değerine göre karşılaştırılmıştır.

1 B – 1 MKH (mm^3 de 200 B lenfosit - mm^3 de 200 MKH)

2 B – 2 MKH (mm^3 de 400 B lenfosit - mm^3 de 400 MKH)

1 B – 2 MKH (mm^3 de 200 B lenfosit - mm^3 de 400 MKH)

2 B – 1 MKH (mm^3 de 400 B lenfosit - mm^3 de 200 MKH)

Tablo 4.5. MKH-B lenfosit (PMW ile uyarılmış ve uyarılmamış) ko-kültürlerinin 24, 48 ve 72. saat sonunda XTT testi ile elde edilen proliferasyon yanıtları.

ÖRNEK ADI	1 B	1M	1M + 1B	2 B	1 M + 2 B	2 M	2 M + 1 B	2 M + 2B
24.h B(-)	0,152	0,168	0,817	0,128	0,338	0,4	1,289	1,113
24.h B(+)	0,145	0,227	0,69	0,168	0,51	0,469	1,176	0,919
48.h B(-)	0,148	0,317	1,068	0,117	0,725	0,395	1,715	0,986
48.h B(+)	0,121	0,203	1,031	0,11	0,959	0,465	1,45	1,427
72.h B(-)	0,132	0,503	1,462	0,091	1,371	0,92	2,363	2,498
72.h B(+)	0,114	0,496	1,158	0,094	0,681	0,845	1,949	1,769

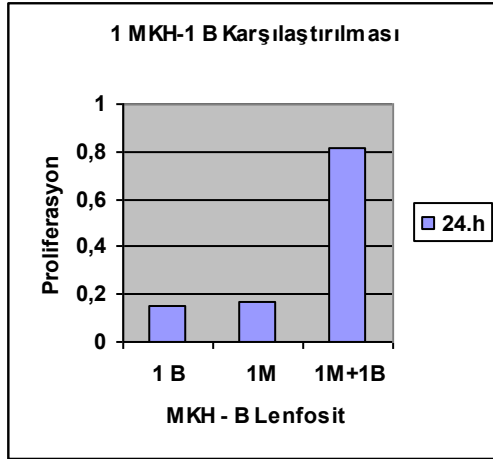
B(-): PWM ile uyarılmamış B Lenfosit, **B(+):** PWM ile uyarılmış B Lenfosit.

Her bir zaman aralığı için 3'er deney yapıp aritmetik ortalaması alındı.

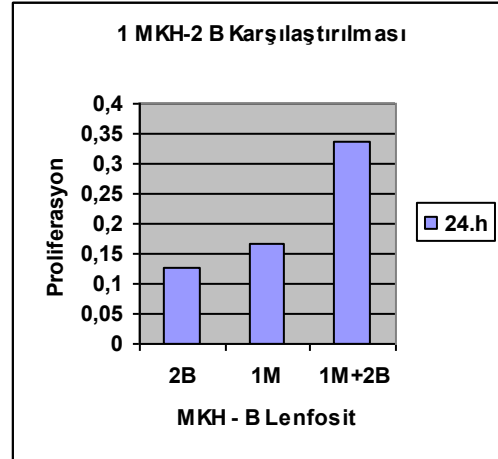
4.5.1. 24. Saat MKH - B Lenfosit Ko-kültürünün Etkileşim Sonuçları

MKH - Uyarılmamış B Lenfosit Ko-kültürü

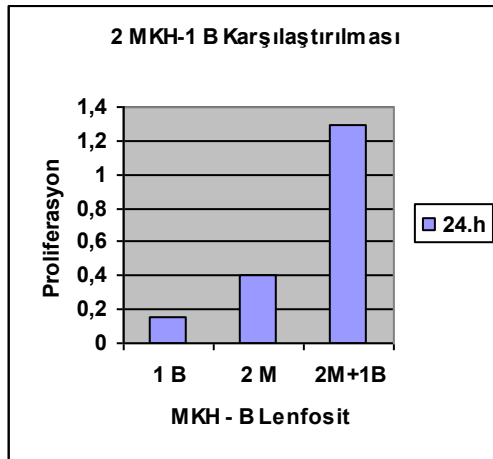
Saat	1 B	1 M	1M + 1B	2 B	1M + 2B	2 M	2M + 1B	2M + 2B
24.h	0,152	0,168	0,817	0,128	0,338	0,4	1,289	1,113



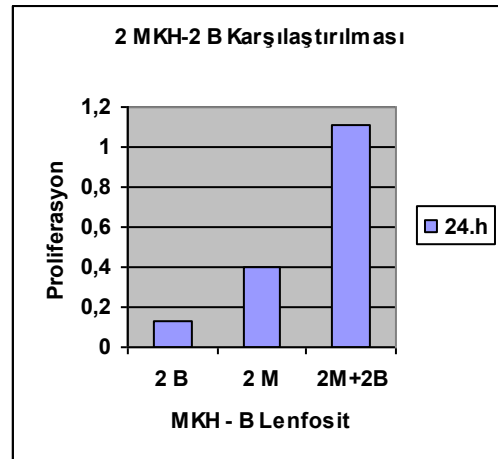
a. $1M + 1B = 0,168 + 0,152 = 0,320$
1M-1B için elde edilen sonuç: 0,817
 $0,817 : 0,320 = 2,55$
% 255'lik proliferasyon sağlanmıştır.



b. $1M + 2B = 0,168 + 0,128 = 0,296$
1M-2B için elde edilen sonuç: 0,338
 $0,338 : 0,296 = 1,14$
% 114'lik proliferasyon sağlanmıştır.



c. $2M + 1B = 0,4 + 0,152 = 0,552$
2M-1B için elde edilen sonuç: 1,289
 $1,289 : 0,552 = 2,34$
% 234'lik proliferasyon sağlanmıştır.

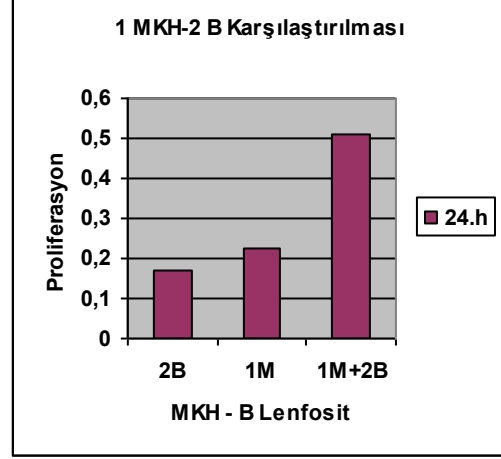
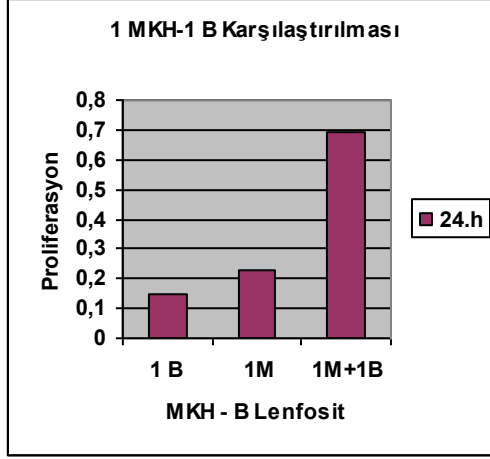


d. $2M + 2B = 0,4 + 0,128 = 0,528$
2M-2B için elde edilen sonuç: 1,113
 $1,113 : 0,528 = 2,11$
% 211'lik proliferasyon sağlanmıştır.

Şekil 4.20. MKH – uyarılmamış B lenfosit ko-kültürünün 24. saat XTT sonucundaki 1MKH-1B (a), 1MKH-2B (b), 2MKH-1B (c), 2MKH-2B (d) oranlarının absorbans değerlerinin karşılaştırılması.

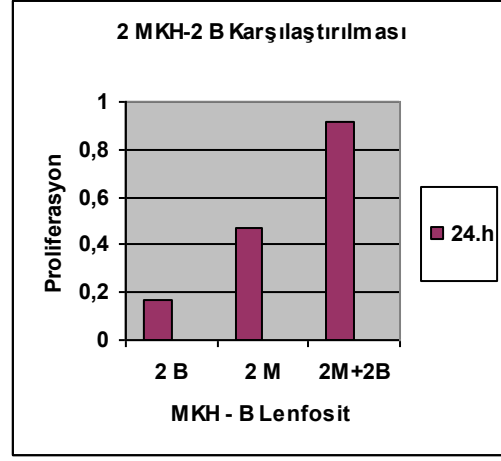
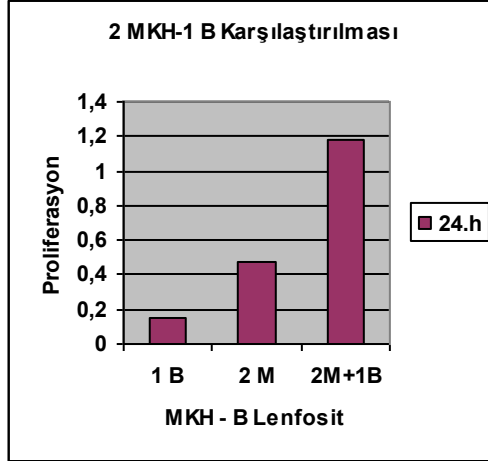
MKH - PWM ile Uyarılmış B Lenfosit Ko-kültürü

Saat	1 B	1 M	1M + 1B	2 B	1M + 2B	2 M	2M + 1B	2M + 2B
24.h	0,145	0,227	0,69	0,168	0,51	0,469	1,176	0,919



a. $1M + 1B = 0,227 + 0,145 = 0,372$
 $1M-1B$ için elde edilen sonuç: 0,69
 $0,69 : 0,372 = 1,85$
 % 185'lik proliferasyon sağlanmıştır.

b. $1M + 2B = 0,227 + 0,168 = 0,395$
 $1M-2B$ için elde edilen sonuç: 0,51
 $0,51 : 0,395 = 1,29$
 % 129'lik proliferasyon sağlanmıştır.

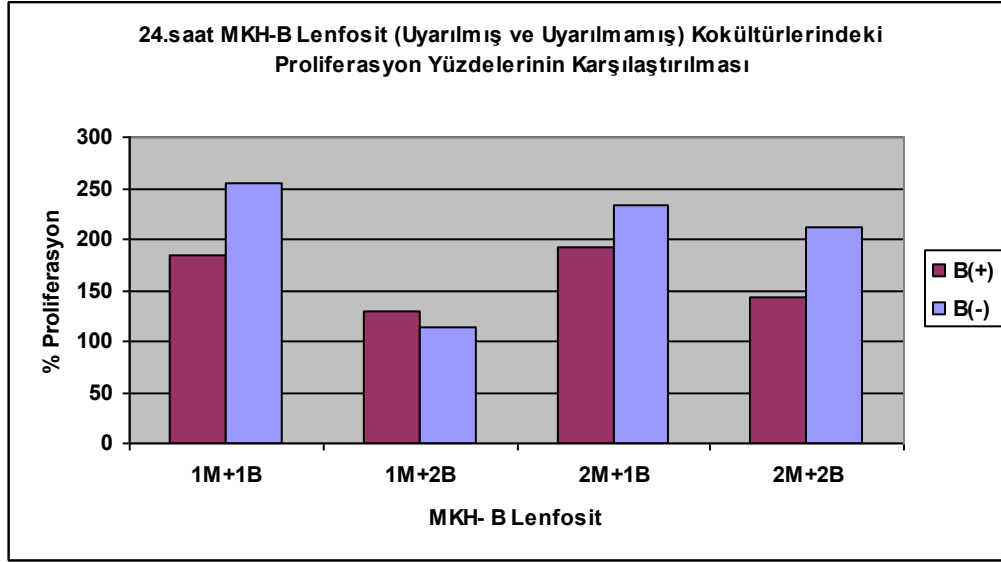


c. $2M + 1B = 0,469 + 0,145 = 0,614$
 $2M-1B$ için elde edilen sonuç: 1,176
 $1,176 : 0,614 = 1,92$
 % 192'lik proliferasyon sağlanmıştır.

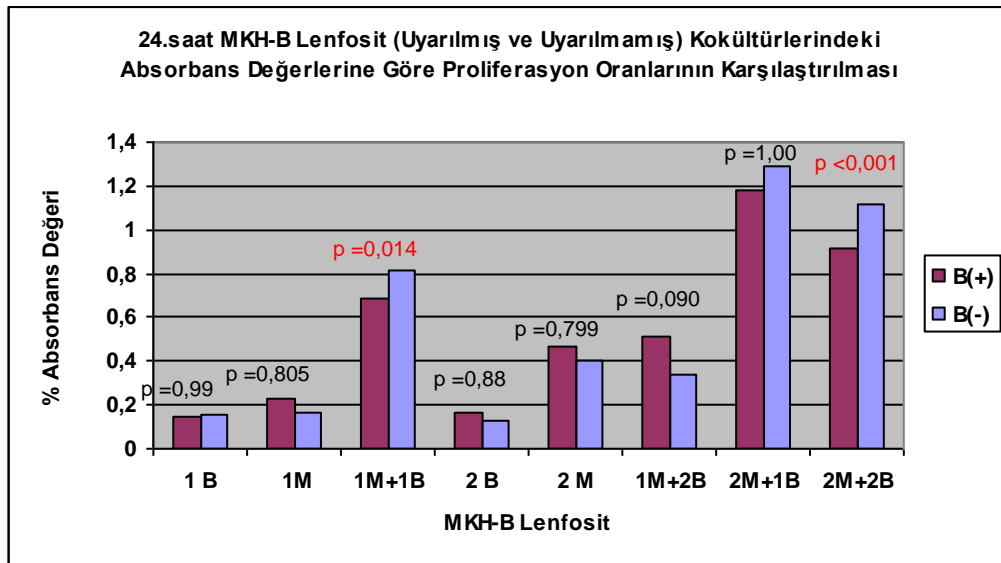
d. $2M + 2B = 0,469 + 0,168 = 0,637$
 $2M-2B$ için elde edilen sonuç: 0,919
 $0,919 : 0,637 = 1,44$
 % 144'lik proliferasyon sağlanmıştır.

Şekil 4.21. MKH - PWM ile uyarılmış B lenfosit ko-kültürünün 24. saat XTT sonucundaki 1MKH-1B (a), 1MKH-2B (b), 2MKH-1B (c), 2MKH-2B (d) oranlarının absorbans değerlerinin karşılaştırılması.

24. saatte en fazla proliferasyonun uyarılmış B lenfositlerde 2M-1B, uyarılmamış B lenfositlerde ise 1M-1B oranında olduğu görülmüştür. Uyarılmış ve uyarılmamış hücreler arasında ise 1M-1B ($p=0,014$) ve 2M-2B ($p<0,001$) oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır (Şekil 4.22).



(a)



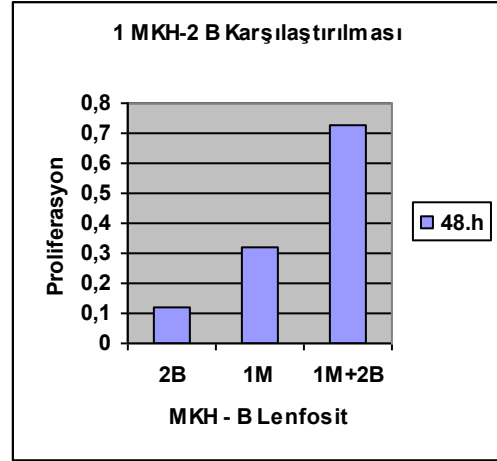
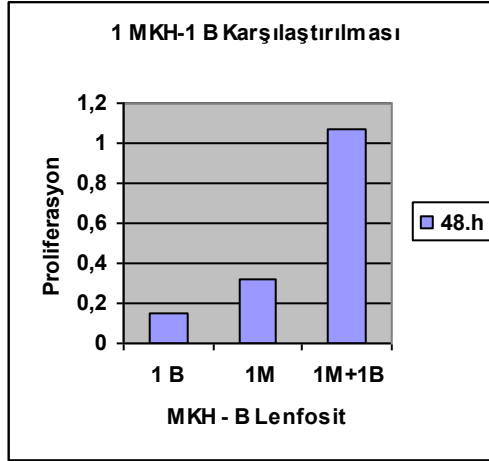
(b)

Şekil 4.22. MKH'lerin-PWM ile uyarılmış (B+) ve uyarılmamış (B-) B lenfosit ko-kültürünün 24. saat XTT sonucundaki proliferasyon yüzdelerinin (a) ve absorbans değerlerine göre proliferasyon oranlarının (b) karşılaştırılması.

4.5.2. 48. Saat MKH - B Lenfosit Ko-kültürünün Etkileşim Sonuçları

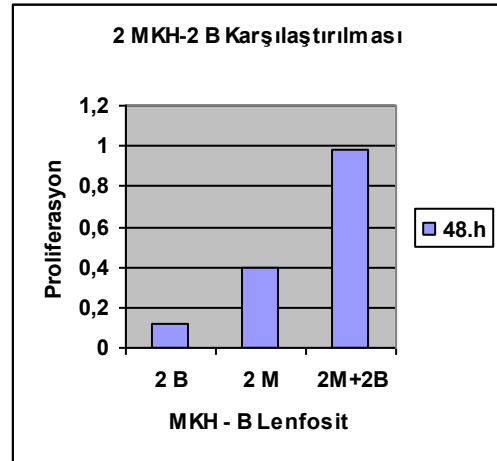
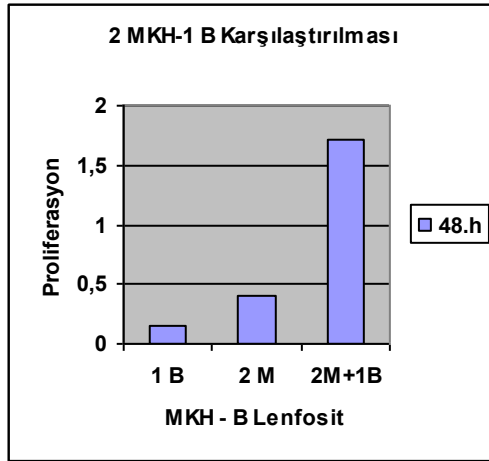
MKH - Uyarılmamış B Lenfosit Ko-kültürü

Saat	1 B	1 M	1M + 1B	2 B	1M + 2B	2 M	2M + 1B	2M + 2B
48.h	0,148	0,317	1,068	0,117	0,725	0,395	1,715	0,986



a. $1M + 1B = 0,317 + 0,148 = 0,465$
 $1M - 1B$ için elde edilen sonuç: 1,068
 $1,068 : 0,465 = 2,29$
 % 229'lik proliferasyon sağlanmıştır.

b. $1M + 2B = 0,317 + 0,117 = 0,434$
 $1M - 2B$ için elde edilen sonuç: 0,725
 $0,725 : 0,434 = 1,67$
 % 167'lik proliferasyon sağlanmıştır.



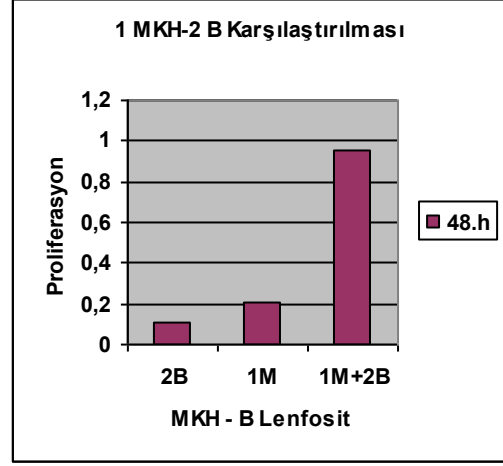
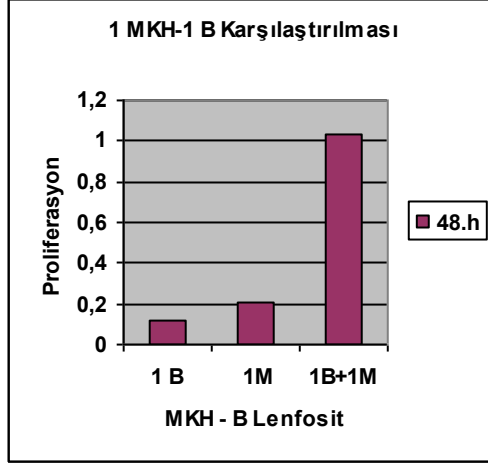
c. $2M + 1B = 0,395 + 0,148 = 0,543$
 $2M - 1B$ için elde edilen sonuç: 1,715
 $1,715 : 0,543 = 3,16$
 % 316'lik proliferasyon sağlanmıştır.

d. $2M + 2B = 0,395 + 0,117 = 0,512$
 $2M - 2B$ için elde edilen sonuç: 0,986
 $0,986 : 0,512 = 1,93$
 % 193'lik proliferasyon sağlanmıştır.

Şekil 4.23. MKH - uyarılmamış B lenfosit ko-kültürünün 48. saat XTT sonucundaki 1MKH-1B (a), 1MKH-2B (b), 2MKH-1B (c), 2MKH-2B (d) oranlarının absorbans değerlerinin karşılaştırılması.

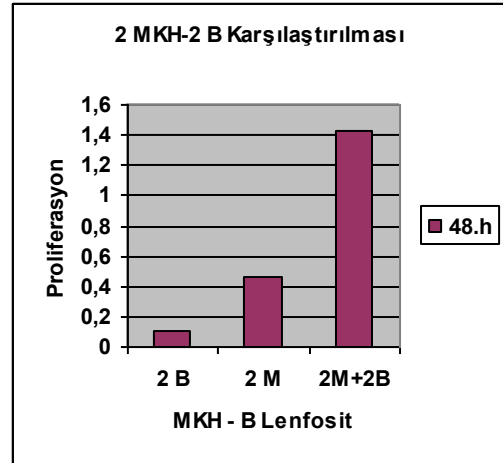
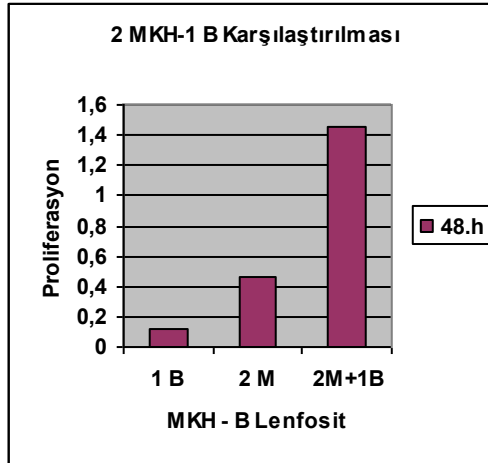
MKH - Uyarılmış B Lenfosit Ko-kültürü

Saat	1 B	1 M	1M + 1B	2 B	1M + 2B	2 M	2M + 1B	2M + 2B
48.h	0,121	0,203	1,031	0,11	0,959	0,465	1,45	1,427



a. $1M + 1B = 0,203 + 0,121 = 0,324$
 $1M-1B$ için elde edilen sonuç: 1,031
 $1,031 : 0,324 = 3,18$
 % 318'lik proliferasyon sağlanmıştır.

b. $1M + 2B = 0,203 + 0,11 = 0,313$
 $1M-2B$ için elde edilen sonuç: 0,959
 $0,959 : 0,313 = 3,06$
 % 306'lik proliferasyon sağlanmıştır.

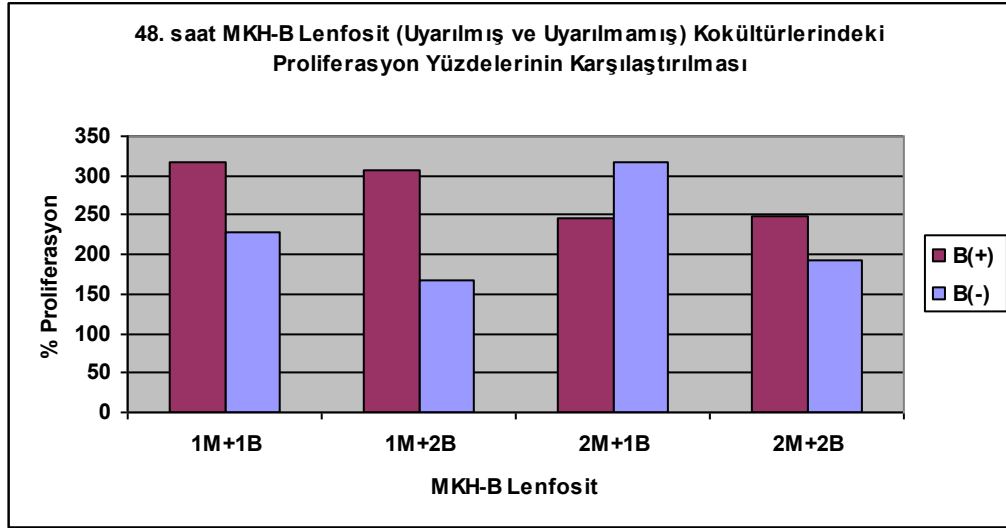


c. $2M + 1B = 0,465 + 0,121 = 0,586$
 $2M-1B$ için elde edilen sonuç: 1,45
 $1,45 : 0,586 = 2,47$
 % 247'lik proliferasyon sağlanmıştır.

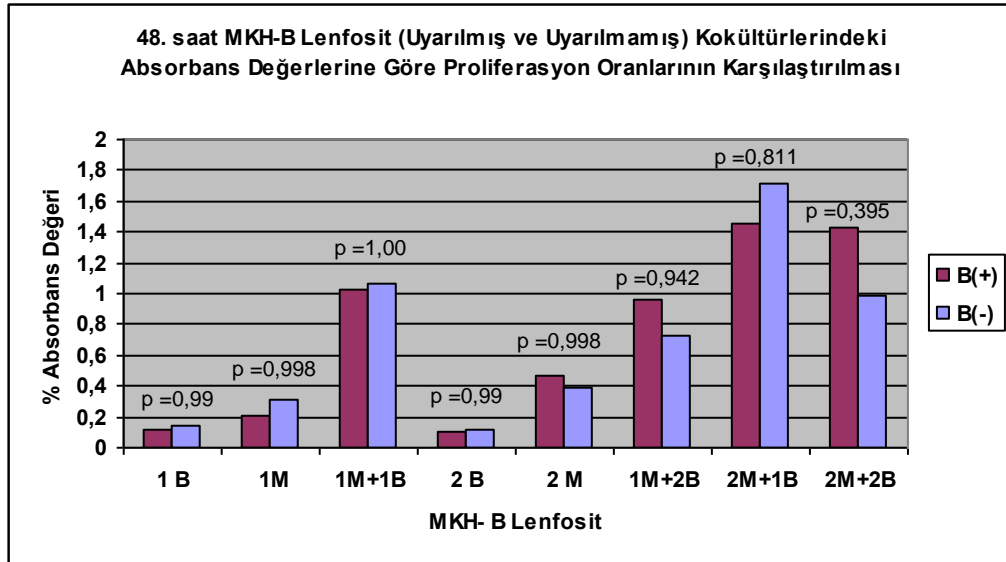
d. $2M + 2B = 0,465 + 0,11 = 0,575$
 $2M-2B$ için elde edilen sonuç: 1,427
 $1,427 : 0,575 = 2,48$
 % 248'lik proliferasyon sağlanmıştır.

Şekil 4.24. MKH - PWM ile uyarılmış B lenfosit ko-kültürünün 48. saat XTT sonucundaki 1MKH-1B (a), 1MKH-2B (b), 2MKH-1B (c), 2MKH-2B (d) oranlarının absorbans değerlerinin karşılaştırılması.

48. saatte en fazla proliferasyonun uyarılmış B lenfositlerde 1M-1B, uyarılmamış B lenfositlerde ise 2M-1B oranında olduğu görülmüştür. Uyarılmış ve uyarılmamış hücreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (Şekil 4.25).



(a)



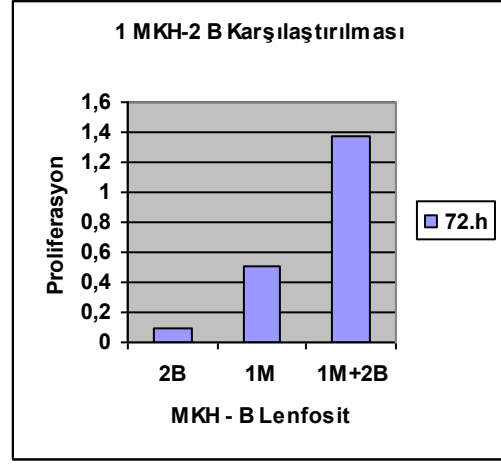
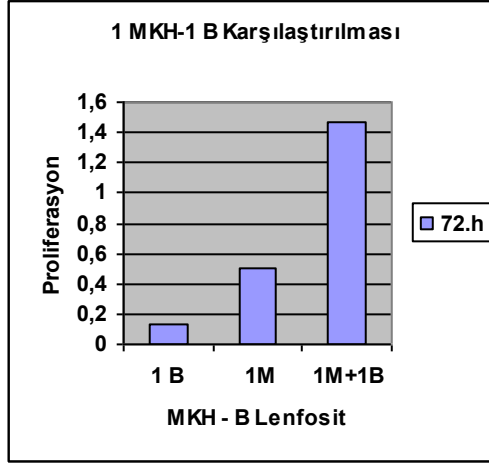
(b)

Şekil 4.25. MKH'lerin-PWM ile uyarılmış (B+) ve uyarılmamış (B-) B lenfosit ko-kültürünün 48. saat XTT sonucundaki proliferasyon yüzdelerinin (a) ve absorbans değerlerine göre proliferasyon oranlarının (b) karşılaştırılması.

4.5.3. 72. Saat MKH - B Lenfosit Ko-kültürünün Etkileşim Sonuçları

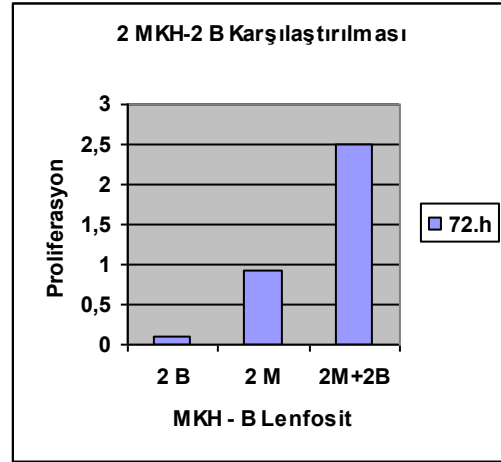
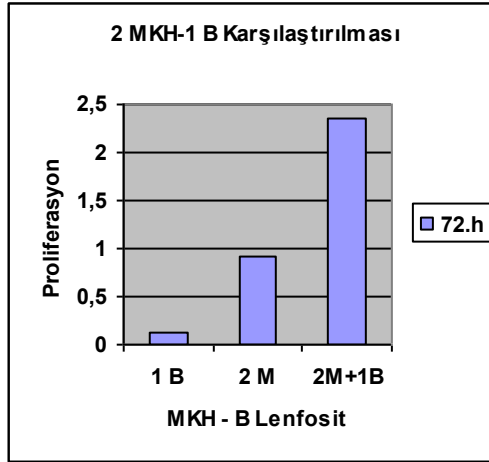
MKH - Uyarılmamış B Lenfosit Ko-kültürü

Saat	1 B	1 M	1M+1B	2 B	1M + 2B	2 M	2M + 1B	2M + 2B
72.h	0,132	0,503	1,462	0,091	1,371	0,92	2,363	2,498



a. $1M + 1B = 0,503 + 0,132 = 0,635$
1M-1B için elde edilen sonuç: 1,462
 $1,462 : 0,635 = 2,30$
% 230'lik proliferasyon sağlanmıştır.

b. $1M + 2B = 0,503 + 0,091 = 0,594$
1M-2B için elde edilen sonuç: 1,371
 $1,371 : 0,594 = 2,31$
% 231'lik proliferasyon sağlanmıştır.



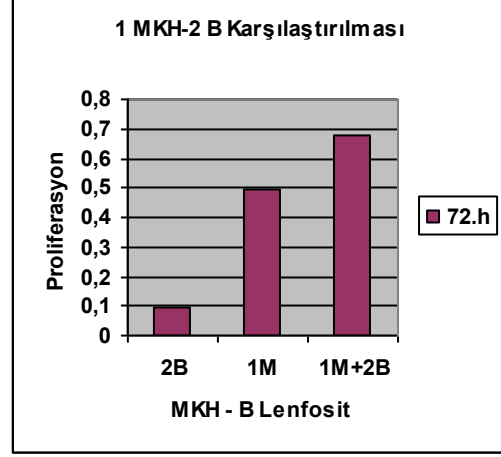
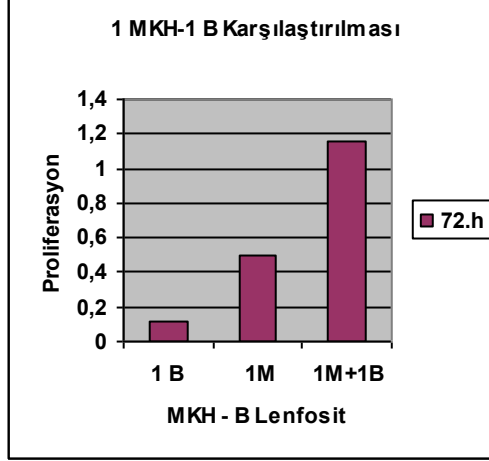
c. $2M + 1B = 0,92 + 0,132 = 1,052$
2M-1B için elde edilen sonuç: 2,363
 $2,363 : 1,052 = 2,25$
% 225'lik proliferasyon sağlanmıştır.

d. $2M + 2B = 0,92 + 0,091 = 1,011$
2M-2B için elde edilen sonuç: 2,498
 $2,498 : 1,011 = 2,47$
% 247'lik proliferasyon sağlanmıştır.

Şekil 4.26. MKH - uyarılmamış B lenfosit ko-kültürünün 72. saat XTT sonucundaki 1MKH-1B (a), 1MKH-2B (b), 2MKH-1B (c), 2MKH-2B (d) oranlarının absorbans değerlerinin karşılaştırılması.

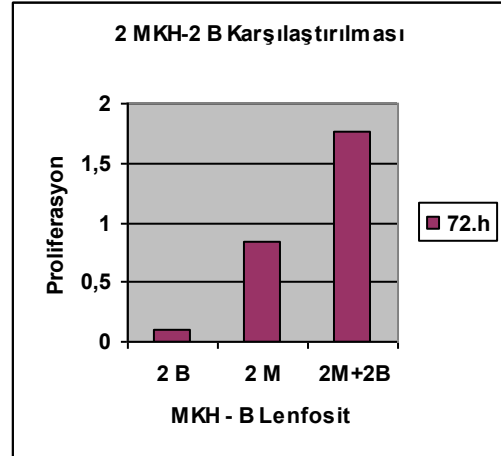
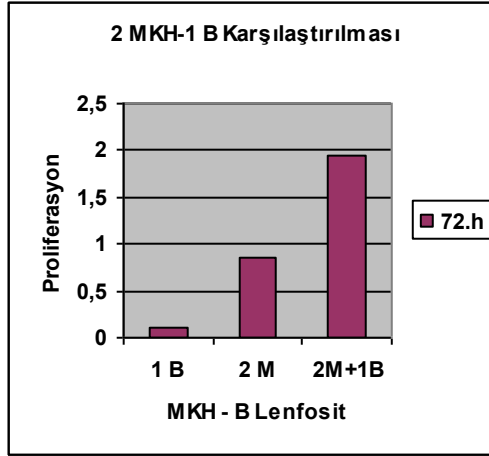
MKH - Uyarılmış B Lenfosit Ko-kültürü

Saat	1 B	1 M	1M + 1B	2 B	1M + 2B	2 M	2M + 1B	2M + 2B
72.h	0,114	0,496	1,158	0,094	0,681	0,845	1,949	1,769



a. $1M + 1B = 0,496 + 0,114 = 0,61$
 $1M-1B$ için elde edilen sonuç: 1,158
 $1,158 : 0,61 = 1,90$
 % 190'lik proliferasyon sağlanmıştır.

b. $1M + 2B = 0,496 + 0,094 = 0,59$
 $1M-2B$ için elde edilen sonuç: 0,681
 $0,681 : 0,59 = 1,15$
 % 115'lik proliferasyon sağlanmıştır.

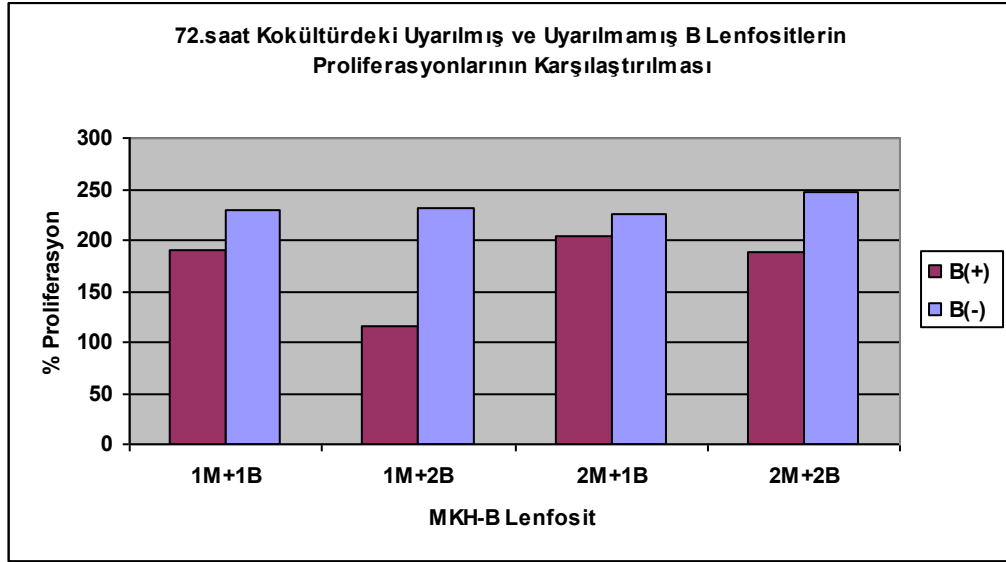


c. $2M + 1B = 0,845 + 0,114 = 0,959$
 $2M-1B$ için elde edilen sonuç: 1,949
 $1,949 : 0,959 = 2,03$
 % 203'lik proliferasyon sağlanmıştır.

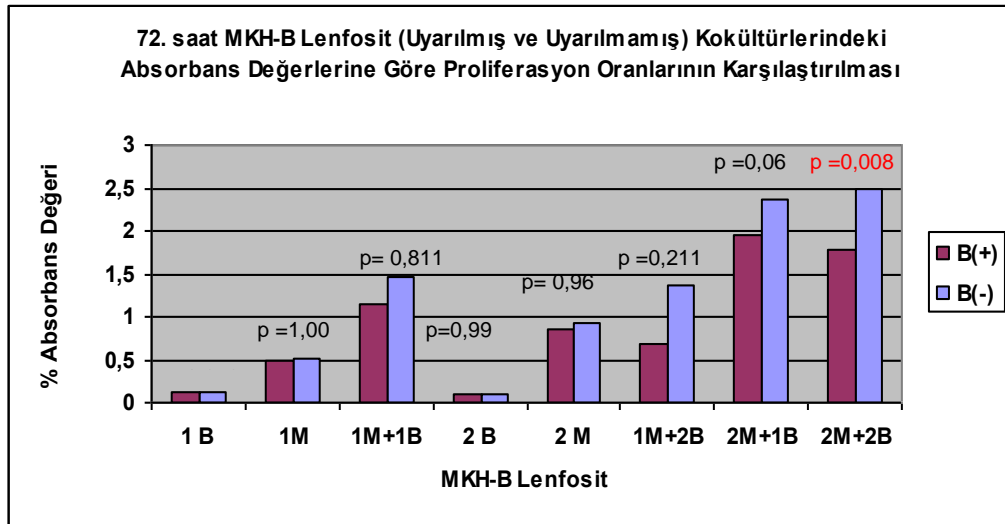
d. $2M + 2B = 0,845 + 0,094 = 0,939$
 $2M-2B$ için elde edilen sonuç: 1,769
 $1,769 : 0,939 = 1,88$
 % 188'lik proliferasyon sağlanmıştır.

Şekil 4.27. MKH - PWM ile uyarılmış B lenfosit ko-kültürünün 72. saat XTT sonucundaki 1MKH-1B (a), 1MKH-2B (b), 2MKH-1B (c), 2MKH-2B (d) oranlarının absorbans değerlerinin karşılaştırılması.

72. saatte en fazla proliferasyonun uyarılmış B lenfositlerde 2M-1B, uyarılmamış B lenfositlerde ise 2M-2B oranında olduğu görülmüştür. Uyarılmış ve uyarılmamış hücreler arasında ise 2M-2B ($p=0,008$) oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır (Şekil 4.28).



(a)



(b)

Şekil 4.28. MKH'lerin-PWM ile uyarılmış (B+) ve uyarılmamış (B-) B lenfosit ko-kültürünün 72. saat XTT sonucundaki proliferasyon yüzdelerinin (a) ve absorbans değerlerine göre proliferasyon oranlarının (b) karşılaştırılması.

MKH-B lenfosit ko-kültürlerindeki proliferasyon oranının, tek başına kültüre edilen MKH ve B lenfositlerin proliferasyonlarına göre daha fazla olduğu, ko-kültürde MKH oranı arttıkça proliferasyon yanıtının arttığı, B lenfosit oranı arttıkça da proliferasyonun baskılandığı görülmüştür.

ÖZETLE;

Uyarılmış ve uyarılmamış MKH'lerde CD105, CD90 ve HLA-DR 'nin yüksek oranlarda ifade edildiği veIDO'nun sentezlendiği tespit edilmiştir.

Tek başına kültüre edilen PWM ile uyarılmış ve uyarılmamış CD19+B lenfositlerde, CD1d (% 3,4-9,4), CD5 (% 0,4-1,5) ve CD25 (%1,1-2,6) pozitifliği saptanmış olup CD5+ ve CD19 + B lenfositlerden farklı zaman aralıklarında sırasıyla % 0,2-0,5 ve % 1-4,5 oranlarında IL-10 sentezlendiği görülmüştür.

MKH'lerle kültüre edilen PWM ile uyarılmış ve uyarılmamış CD5+ ve CD19+ B lenfositlerdeki CD25 ifadesi ile IL-10 sentezinin tek başına kültüre edilenlere göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ko-kültürdeki uyarılmış B lenfositlerde CD25 ifadesinin 24. saatte (% 6,3) uyarılmamışlarda ise 72. saatte (% 3,3) ve 1M:1B'de, CD5+B lenfositlerden sentezlenen IL-10 düzeyinin uyarılmış kültürlerde 72. saatte (% 1,1) uyarılmamış kültürlerde de 72. saatte (% 0,8) ve 1M:1B'de, CD19+B lenfositlerden sentezlenen IL-10 düzeyinin ise uyarılmış kültürlerde 48. saatte (% 5,6) uyarılmamış kültürlerde ise 24.saate (% 14,5) ve 2M:1B'de en yüksek olduğu görülmüştür.

PWM ile uyarılan ve uyarılmayan B lenfositlerin MKH'lerle kültürü sonucunda XTT testi değerlendirmesine göre MKH ve B lenfositlerin beraber kültüre edildiği oranlardaki proliferasyon yanıtının, bu hücrelerin tek başına yapılan kültürlerindeki proliferasyon yanıtlarına göre daha yüksek olduğu, ko-kültürde MKH oranı arttıkça proliferasyon yanıtının arttığı, B lenfosit oranı arttıkça da proliferasyonun baskılandığı görülmüştür.

TARTIŞMA

Çalışma sonucunda uyarılmış ve uyarılmamış MKH'lerde CD105, CD90 ile HLA-DR ifadesinin yüksek olduğu ve MKH'lerdenIDO'un sentezlendiği görülmüştür. Birçok literatürde MKH'ler için immüfenotip analiz yapılırken genel olarak CD105+, CD90+, CD34-, CD45-, HLA-DR- tanımlama panelleri kullanılmıştır (27, 29, 33, 34, 37, 46,100, 101, ,102,103). Çalışmada literatürlerle uyumlu olarak CD105+, CD90+, CD34-, CD45- bulunmuştur. Ancak hem uyarılmış hem de uyarılmamış MKH'lerde, literatürlerden farklı olarak HLA-DR+ bulunmuştur. Dominici ve arkadaşları, MKH'lerin IFN- γ varlığında düşük düzeyde HLA-DR ifade ettiklerini belirtmişlerdir (104). Le Blanc ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada kemik, kıkırdak ve adipositlere farklılaşmış ve farklılaşmamış MKH'lerin, immüfenotip analiz sonucunda HLA sınıf I ifade ettiklerini, HLA sınıf II ifade etmediklerini, IFN- γ varlığında ise 48. saatte % 90'ın üzerinde HLA sınıf II ifade ettiklerini göstermişlerdir (105). Ancak in vitro olarak yaptıkları çalışmalarda HLA uyumsuz kişilerde MKH'lerin transplantasyonları desteklediğini belirtmişlerdir. Chan ve arkadaşları, MKH'lerin HLA sınıf II ifadesi ile makrofaj ve Tc'lerini desteklediklerini, makrofajlar kadar olmasa da antijen sunan hücre özelliklerinin olduğunu ve bu özelliklerinin IFN- γ varlığında oluştuğunu belirtmişlerdir. Yaptıkları çalışmada iki farklı antijen varlığında MKH'lerin antijen sunan hücre özelliği kazandıklarını ve bunun da IFN- γ varlığında gerçekleştiğini göstermişlerdir. Ayrıca bu çalışma ile MKH'lerin düşük düzeyde IFN- γ ile (10 U/ml) uyarıldığında HLA-DR ifadesinin oluştuğunu, yüksek düzeyde IFN- γ ile (100 U/ml) uyarıldığında ise HLA-DR ifadesinin azaldığını tespit etmişlerdir (106). Yaptığım çalışma sonucunda ise IFN- γ ile uyarılmış ve uyarılmamış MKH'lerde HLA-DR ifadesinin % 90'ın üzerinde olduğu görülmüştür. Bunun belki de kültür ortamındaki FCS'den kaynaklandığını düşünmekteyim (107)

MKH'lerin doğal ve edinsel immüniteyi oluşturan hücreler üzerinde düzenleyici veya baskılayıcı tarzda etkilerinin olduğu, bu etkilerini direkt hücreler arasında kurulan fiziksel temas yanında sentezledikleri çözünür faktörler aracılığıyla da gerçekleştirdikleri tespit edilmiştir. Literatürlerde MKH'lerin immün baskılayıcı etkisini sağlayan çözünebilir faktörlerden birinin de bu hücrelerden sentezlenenIDO olduğu belirtilmiştir (25, 34, 35, 45, 46, 52, 102). Bu literatürlerde, MKH'lerin

sentezlediği IDO'nun, hücreleri apoptozdan koruyarak hücre çoğalmasında gerekli olan triptofan sentezini azalttığı ve hücreler üzerinde anti-proliferatif etkiye neden olduğu belirtilmiştir. Krampera ve arkadaşları, IFN- γ varlığında uyarılan MKH'lerin IDO sentezleyerek B hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığını göstermişlerdir (49). Çalışma sonucunda literatürden farklı olarak IDO'nun sadece IFN- γ ile uyarılmış MKH'lerden değil uyarılmamış MKH'lerden de sentezlendiği ve bu oranın % 90'ın üzerinde olduğu görülmüştür. Traggiai ve arkadaşları, MKH'lerin IDO sentezleyerek B hücrelerinin proliferasyonunu ve Ig sentezleyen hücrelere dönüşmesini uyardıklarını göstermişlerdir (108). Çalışma sonucunda MKH'lerle kültüre edilen B lenfosit ko-kültüründe, MKH oranı arttıkça proliferasyonun arttığı, MKH oranı azalıp B lenfosit oranı arttıkça proliferasyonun baskılandığı görülmüştür.

Corcione ve arkadaşları, yapmış oldukları çalışmada MKH ve B lenfositleri kültüre ederken aynı kuyucuk içerisinde ve kuyucuğu 0,5 μ m'lık delikleri bulunan bir membranla bölerek membranın iki yanında kültüre etmişlerdir. Ancak aynı kuyucuk içerisine ekilen MKH-B lenfosit ko-kültüründeki, B lenfositlerin proliferasyonunun daha çok baskılandığını ve en fazla baskılanmanın 1M:1B oranında olduğunu bulmuşlardır. Dolayısıyla MKH'lerin B lenfositler üzerindeki etkisinde MKH'lerden salgılanan çözünür faktörlerin yanında hücrelerin birbiriyle direkt fiziksel temasta bulunmasının da gerekli olduğunu belirtmişlerdir (98). Le Blanc ve arkadaşları, B lenfositlerinin rol oynadığı otoimmün hastalıklarda kullanılma potansiyeli olan MKH'lerin dozunun iyi ayarlanması gerektiğini, yüksek doz kullanımının tehlikeli olabileceğini, çok düşük dozun da B lenfositleri aktive ettiğini ve bu konuyla ilgili in vivo verilerin de çok az olduğunu belirtmişlerdir (34).

Bu bilgilerden yararlanarak yapmış olduğum çalışmada MKH'lerin ve B lenfositlerin birbirleri üzerindeki proliferasyon etkilerini incelemek için her iki hücre grubunu belli oranlarda hücre-hücre etkileşimini sağlamak amacıyla membran olmadan aynı kuyucuklarda kültüre ettim. MKH'lerle birlikte kültüre edilen uyarılmış ve uyarılmamış B lenfosit kültürlerinde; MKH ve B lenfositlerin beraber kültüre edildiği oranlardaki proliferasyon yanıtının, bu hücrelerin tek başına yapılan kültürlerindeki proliferasyon yanıtlarına göre daha yüksek olduğu, ko-kültürde MKH oranı arttıkça proliferasyon yanıtının arttığı, B lenfosit oranı arttıkça da proliferasyon yanıtının baskılandığı görülmüştür. Örneğin MKH-B lenfosit ko-kültüründe

uyarılmamış B lenfositlerde 24. saatte 1M-1B oranındaki proliferasyon değeri %255 iken B lenfositlerin sayıca fazla olduğu 1M-2B oranındaki proliferasyon değeri %114'e düşmekte, MKH'lerin sayıca fazla olduğu 2M-1B oranında % proliferasyon değeri 234'e çıkmakta ve tekrar B lenfositlerin sayıca arttığı 2M-2B oranında ise % proliferasyon değeri 211'e düşmektedir. Aynı durum uyarılmış B lenfositlerde de görülmüştür. Ancak XTT testi sonucunda proliferasyon yanıtının hangi hücreye ait olduğunu belirlemek için başka bir yöntem kullanılması ve deneysel olarak meydana getirilmiş olan Th1 kutuplaşması görülen hayvan çalışmalarında da bu sonucun değerlendirilmesi gerekmektedir

Bu çalışmada tek başına kültüre edilen uyarılmış ve uyarılmamış CD19+ B lenfositlerde % 3,4 - 9,4 oranında CD1d, % 0,4 - 1,5 oranında CD5 ve %1,1 - 2,6 oranında CD25 pozitifliği saptanmış olup CD5+ ve CD19+ B lenfositlerden farklı zaman aralıklarında sırasıyla % 0,2 - 0,5 ve % 1 - 4,5 oranlarında IL-10 sentezlendiği görülmüştür.

Mikael Brisslert, CD25+B lenfositlerin regülatör B lenfosit olmadığını, hafıza B lenfosit alt grubu olduğunu, IgG, IgM, IgA sentezlediklerini, CD27, CD80, düşük düzeyde HLA sınıf II ve CD122 ile CD132 (IL-2 reseptörleri) ifade ettiklerini belirtmiştir (109). HLA sınıf II'nin düşük düzeyde olmasına rağmen yüksek düzeyde ko-stimülatör molekül ifade etmelerinden dolayı T lenfositlere antijen sunum kapasitelerinin CD25- B lenfositlerden daha yüksek olduğunu bunun da romatoid artrit (RA), sistemik lupus eritematozus (SLE) gibi B lenfositlerinin rol oynadığı hastalıklarda önemli olabileceğini belirtmiştir. Sylvie Amu, CD25+ B lenfositleri sağlıklı bireylerde, RA'lı hastalarda, SLE hastalarında ve farelerde incelemiş; genel olarak bu hücrelerin olgun B lenfosit fenotipine sahip olduklarını ancak antijen sunma yeteneklerinin olgun B lenfositlerden daha iyi, immünoglobulin (Ig) sentezlerinin ise daha az olduğunu belirtmiştir (110). Sağlıklı bireylerde ve RA'lı hastalarda, CD25+ B lenfositlerde CD25- B lenfositlere göre IgG, IgA sentezi ile CD80 ifadesinin yüksek, IgD ve IgM sentezinin düşük olduğu; SLE'li hastalarda Ig açısından fark olmadığı CD80 ifadesinin CD25+B lenfositlerde daha yüksek olduğunu belirtmiştir. Farelerde ise CD25+ ve CD25- B lenfositlerin fenotiplerinin çok farklı olduklarını belirtmiştir. Bu veriler CD25+B lenfositlerinin sadece bağışıklık sisteminin fizyolojisinde değil aynı zamanda otoimmünite patogeneğinde

de rol oynadığını düşündürmektedir. Amu ve arkadaşlarının, yaptıkları bir çalışmada CD25+B lenfositlerin, RA ve SLE hastalarında sağlıklı bireylere göre daha aktif ve olgun bir fenotipe sahip olduğu, CD122 ve CD132'nin anlamlı olarak daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Dolayısıyla CD25+ B lenfosit popülasyonundaki IL-2'ye artan duyarlılığın hastalığın ilerlemesini etkileyebileceğini belirtmişlerdir (111). Yaptığım çalışmada MKH'lerle birlikte kültüre edilen uyarılmış ve uyarılmamış CD19+B lenfositlerdeki CD25 oranında bir değişiklik olup olmayacağını değerlendirmek için öncelikle tek başına kültüre edilen uyarılmış ve uyarılmamış CD19+B lenfositlerdeki CD25 oranına bakıldıktan sonra bu hücrelerde sırasıyla %1,1 - 2,6 oranında CD25 pozitifliği bulunmuştur.

Gary-Gouy ve arkadaşları, CD5+B lenfositlerin peritoneal boşlukta bulunan B1 lenfositlerden köken aldığını ve tüm B lenfositlerin % 10'unu oluşturduğunu, daha çok doğal immüniteden sorumlu olup IgM sentezlediklerini belirtmişlerdir. CD5+B lenfositler ile IL-10 üretimi arasında doğrudan bir ilişki olduğunu, insan periferik kanında CD5+B lenfositlerin CD5-B lenfositlerden daha fazla IL-10 ürettiklerini dolayısıyla CD5+ B lenfositlerin IL-10 üretimini uyararak B lenfositlerin hayatta kalmalarını desteklediklerini belirtmişlerdir. (112) Lee ve arkadaşları, CD5+ B lenfositleri; CD19 (yüksek) ve CD19 (düşük) olanlar şeklinde sınıflandırmışlar ve her iki grubun da IL-10 sentezlediğini tespit etmişlerdir. Ancak CD5+ CD19 (yüksek) B lenfositlerin IL-10 üretiminin daha fazla olduğunu, CD5+B lenfositlerin IL-10 üretimi için CD19 B lenfositlerin gerekli olduğunu bunun da immünolojik olarak önemli olabileceğini belirtmişler ve bu konuyla ilgili daha fazla çalışmalar yapılması gerektiğini önermişlerdir (113). Çalışmamda literatürlerle uyumlu olarak tek başına kültüre edilen uyarılmış ve uyarılmamış CD19+B lenfositlerde % 0,4 - 1,5 oranında CD5 pozitifliği saptanmış olup CD5+B lenfositlerden farklı zaman aralıklarında sırasıyla % 0,2 - 0,5 oranlarında IL-10 sentezlendiği, CD19+B lenfositlerden ise % 1 - 4,5 oranlarında IL-10 sentezlendiği görülmüştür. Daha sonradan MKH'lerle kültüre edilen uyarılmış ve uyarılmamış B lenfositlerdeki CD5+ ve CD19+B lenfositlerden sentezlenen IL-10 oranında değişiklik olup olmadığı değerlendirilmiştir.

Bouaziz ve arkadaşları, kollajen ile uyarılmış artrit, kolit, kontakt hipersensitivite ve tümör bağışıklığında (5), Blair ve arkadaşları; SLE'de (97), Mauri

ve arkadaşları (96), parazit enfeksiyonu sonrasında ve kemik iliği transplantasyonundan sonra IL-10 üreten B hücrelerin immün düzenlenmede önemli rollerinin olduğunu göstermişlerdir.

Sun ve arkadaşları, 14 nefrit ve 15 SLE'li hastada MKH kullanımının olumlu sonuç verdiğini bildirmişlerdir (114). Tyndall ve arkadaşı, MKH'lerin in vitro kolay elde edilmesi ve çoğaltılmasından dolayı klinik kullanımda yararlı olabileceklerini ancak in vitro olarak iyi üretim koşullarının sağlanması, MKH'lerin kaynağının (kemik iliği, yağ doku vb.) ve allojenik veya otoplastik kullanımının optimize edilmesi gerektiğini belirtmişlerdir. Ayrıca MKH'lerin kültür ortamına katılan büyüme faktörlerinin bu hücrelerde HLA sınıf II ifade etmelerine neden olabileceklerini ve dolayısıyla otoimmün hastalıklarda kullanımının çok güvenli olmayacağını da belirtmişlerdir (115). Scherer ve arkadaşları GVHH'da, crohn hastalığında ve nakil hastalarında MKH kullanımının umut verici sonuçlarına rağmen bu hücrelerin farklı dokulardan elde edilmesi, kültür ortamındaki ve in vivo uygulamalarındaki farklılıklardan dolayı otoimmün hastalık modellerinde kullanımlarının daha az tutarlı olduğunu belirtmişlerdir (116). Schurgers ve arkadaşları, MKH'lerin in vitro olarak T hücre çoğalmasını baskıladığını ancak artritli hastalarda in vivo olarak T hücre aktivitesine etkilerinin olmadığını, hastalık seyrinin kötüleştiğini ve bunun da allojenik MKH'lerin kullanımından kaynaklanabileceğini söylemişlerdir. İn vitro ve in vivo arasındaki bu tür uyumsuzluklardan dolayı insanlarda otoimmün hastalıklarında MKH kullanımına dair daha fazla araştırma yapılması gerektiğini belirtmişlerdir (117). MKH'lerin immün sistem hücrelerinden T hücreler üzerine olan etkileriyle ilgili çok sayıda çalışmalar yapılmış olmasına rağmen B hücreleriyle ilgili çalışma sayısı oldukça azdır. Yapılan çalışmalarda genellikle MKH'lerin, B hücrelerinin migrasyon, çoğalma ve Ig sentezini etkileyerek bu hücreler üzerinde düzenleyici rol oynadıkları gösterilmiştir. (34, 35, 39, 41, 46, 52, 53, 98, 99). Bu bilgilerden hareket ederek RA ve SLE patogeneğinde rol oynayan B lenfositlerin immün düzenleyici rollerinin MKH'ler tarafından nasıl etkilenebileceği sorusu akla gelmiş ve bu çalışmada her iki hücre grubu birlikte kültüre edilerek immünofenotiplerinde meydana gelen değişiklikler ölçülmüştür. MKH'lerle birlikte kültüre edilen uyarılmış ve uyarılmamış B lenfosit kültürlerinde CD5+ ve CD19+B lenfositlerde CD25 ifadesi ile IL-10 düzeyinin, tek başına kültüre edilen uyarılmış ve

uyarılmamış B lenfositlere göre daha yüksek olduğu görülmüştür. CD19+B lenfositlerde CD25 ifadesinin % 6,3 oranında ve bunun da 1M:1B'de, CD5+ B lenfositlerden sentezlenen IL-10 düzeyinin % 1,1 oranında ve bunun da 1M:1B'de, CD19+ B lenfositlerden sentezlenen IL-10 düzeyinin ise % 14,5 oranında ve bunun da 2M:1B'de en yüksek olduğu görülmüştür.

Le Blanc ve arkadaşları, MKH ve B lenfositleri kültüre ettikten sonra CD25 ifadesinde artış bulamamışlar ve bunun da alloreaktif T hücrelerinin inaktif durumda kalmalarına yol açtığını belirtmişlerdir. Çalışmamda bu bulguya zıt olarak MKH'lerle kültüre edilen B lenfositlerde CD25 ifadesinin arttığı bulunmuştur (118). Le Blanc ve arkadaşları (34) ile Corcione ve arkadaşları (98), MKH'lerin B lenfositlerdeki IL-10'u baskılamadığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada literatürlerle uygun olarak MKH'lerin B lenfositlerdeki IL-10 salgısını baskılamadığı aksine arttırdığı görülmüştür.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada yapılan diğer çalışmalardan farklı olarak MKH'lerin, B lenfositlerdeki CD25 ifadesine ve IL-10 sentezine olan etkileri araştırılmıştır. Bu konu özellikle MKH'lerin otoimmün hastalıklarda kullanımının güvenli olup olmadığı konusunun hala belirsiz olması nedeniyle önem taşımaktadır. Yapılan bu çalışma, in vitro koşullarda MKH'lerin ve B lenfositlerin etkileşimleri sonucunda ortaya çıkan immünofenotiplerin, bu hücrelerin oranlarına ve etkileşim sürelerine bağlı olduğunu göstermiştir. Dolayısıyla MKH'lerin in vivo kullanımında bu parametrelerin göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Diğer taraftan hayvan deneyleri yaparak in vitro sonuçlar in vivo sonuçlarla karşılaştırılmalıdır. Bu konularla ilgili literatür bilgileri az olduğundan çalışmanın sonuçlarını değerlendirmek için yaptığım deney sayısının artırılması gerektiğini düşünmekteyim. Böylelikle B lenfositlerin rol oynadığı otoimmün hastalıklarda MKH'lerin kullanımı konusunu araştırarak diğer çalışmalara ışık tutacak değerli bulgular elde edilecektir.

KAYNAKLAR

1. Herzog E.L, Cahi L., Krause D.S., Plasticity Of Marrow-Derived Stem Cells, Blood, 102, s.3483-3493, 2003.
2. Friedenstein A.j, Gorskaja J.F, Kulagina N.N., Fibroblast Precursors in Normal and Irradiated Mouse Hematopoietic Organs, Exp Hematol, 4, s.267-74, 1976.
3. Ringden O., Uzunel M., Rasmusson I. ve ark., Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Therapy-resistant Graft Versus Host Disease, Abstract, Transplantation, 81, s.1390-7, 2006.
4. Muşabak U., B Hücre Gelişimi ve Tolerans Mekanizmaları, Türkiye Klinikleri J Immunol Rheumatol-Special Topics, 4(2), s.16-24, 2011.
5. Bouaziz J-D., Yanaba K., Tedder T.F., Regulatory B cells as Inhibitors of Immune Responses and Inflammation, Immunological Reviews, 224, s.201–214, 2008.
6. Verfaillie C.M, Pera M.F, Lansdorp P.M., Stem Cells Hype and Reality, Hematology Am Soc., Hematol Educ. Program, s.369-391, 2002.
7. Wobus A.M, Boheler K.R., Embryonic Stem Cells: Prospects for Developmental Biology and Cell Therapy, Physiol Rev, 85(2), s.635-78, 2005.
8. Stemcells Scientific Progress and Future Research Directions Report Prepared by the National Institutes of Health, June 2001, <http://stemcells.nih.gov/info/2001report/2001report.htm> (03.10.2011).
9. Mimeault M, Batra S.K., Recent Advances on the Significance of Stem Cells in Tissue Regeneration and Cancer Therapies, Stem Cell, 24, s.2319-2345, 2006.

10. Kk hücre, http://www.kokhucredernegi.org.tr/tur/kok_hucre/hema.htm (03.10.2011).
11. İnan S, zbilgin K., Kk Hücre Biyolojisi, Sağlıkta Birikim Dergisi, 1(5), s.11-24, 2008.
12. Trounson A., The Production and Directed Differentiation of Human Embryonic Stem Cells, *Endocr Rev*, 27, s.208-219, 2006.
13. Counter C.M, Hirte H.W, Bacchetti S, Harley C.B., Telomerase Activity in Human Ovarian Carcinoma, *Proc Natl Acad Sc.*, 91, s.2900-4, 1994
14. Ogur G, Sezer O., İnan Kk Hücreleri İçin Yeni Bir Kaynak: Fetal Kk Hücreler, *Türkiye Klinikleri J Hem Onc*, 1(2), s.29-35, 2008.
15. Kansoy S., Kk Hücre Kaynağı Olarak Kordon Kanı, *Türkiye Klinikleri J Hem Onc*, 1(2), s.23-28, 2008.
16. Fuchs E., Tumber T., Guasch G, Socializing With the Neighbors: Stem Cells and Their Niche, *Cell*, 116, s.769-778, 2004.
17. Jason R., Lingheng L., Recent Advances in Understanding Extrinsic Control of Hematopoietic Stem Cell Fate, *Current Opinion in Hematology*, 13(4), s.237-242, 2006.
18. Ross J., Li L., Recent Advances in Understanding Extrinsic Control of Hematopoietic Stem Cell Fate, *Curr Opin Hematol.*; 13(4), s.237-242, 2006.
19. Zuk P.A, Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J.W., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz H.P., Hedrick M.H., Multilineage Cells From Human Adipose Tissue: İmplications for Cell-Based Therapies, *Tissue Eng*, 7(2), s.211-228, 2001.
20. Levy V., Lindon C., Harfe B.D, Morgan B.A., Distinct Stem Cell Populations Regenerate the Follicle and İnterfollicular Epidermis, *Dev Cell*, 9(6), s.855-861, 2005.
21. Ishizuya-Oka A., Epithelial-Connective Tissue Cross-Talk is Essential for Regeneration of İntestinal Epithelium, *J Nippon Med Sch*, 72(1), s.13-18, 2005.

22. Parker M.A., Anderson J.K., Corliss D.A., Abraria V.E., Sidman R.L., Park K.I., Teng Y.D., Cotanche D.A., Snyder E.Y., Expression Profile of an Operationally-Defined Neural Stem Cell Clone, *Exp Neurol*, 194(2), s.320-332, 2005.
23. Beltrami A.P., Barlucchi L., Torella D. ve ark., Adult Cardiac Stem Cells are Multipotent and Support Myocardial Regeneration, *Cell*, 114, s.763-776, 2003.
24. Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L., Schwartz R.E., Keene C.D., Ortiz-Gonzalez X.R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W.C., Largaespada D.A. ve Verfaillie C.M., Pluripotency of Mesenchymal Stem Cells Derived From Adult Marrow, *Nature*, 418, s.41-49, 2002.
25. Bernardo M.E., Locatelli F., Fibbe W.E., Mesenchymal Stromal Cells: A Novel Treatment Modality for Tissue Repair, *Hematopoietic Stem Cells VII*, 1176, s.101–117, 2009.
26. Friedenstein A.J., Chailakhyan R.K., Latsinik N.V., Panasyuk A.F., Keiliss-Borok I.V., Stromal Cells Responsible for Transferring the Microenvironment of the Hemopoietic Tissues. Cloning in vitro and Retransplantation in vivo, *Transplantation*, 17, s.331-40, 1974.
27. Keating A., Mesenchymal Stromal Cells. *Current Opinion in Hematology*, 13, s.419-25, 2006.
28. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D.j, Horwitz E., Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells, *The International Society for Cellular Therapy Position Statement*, *Cytotherapy*, 8, s.315-7, 2006.
29. Ovalı E., Mezenkimal Kök Hücre Kaynakları ve Üretimi, *THD, MKHK Kitapçığı*, s.7-10, 2008.
30. Sotiropoulou P.A., Perez S.A., Salagianni M., Baxevanis C.N., Papamichail M., Characterization of the Optimal Culture Conditions for Clinical Scale

- Production of Human Mesenchymal Stem Cells, *Stem Cells*, 24, s.462-471, 2006.
31. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D. ve ark., Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells, *Science*, 284, s.143-147, 1999.
32. Karaöz E., Ovalı E., Kök Hücreler, 1.Baskı, ATİ Teknoloji, s.92-93, 2004.
33. Nasef A., Fouillard L., El-Taguri A., Lopez M., Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells, *Lipbyan J Med*, s.190-201, 2007.
34. Le Blanc K., Ringdén O., Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells and Clinical Experience, *J Internal Medicine*, 13, s.69-80, 2007.
35. Newman R.E, Yoo D., LeRoux M.A., Danilkovitch-Miagkova A., Treatment of Inflammatory Diseases With Mesenchymal Stem Cells, *Inflammation & Allergy - Drug Targets*, 8, s.110-123, 2009.
36. Le Blanc K., Tammik C., Rosendahl K. ve ark., HLA Expression and Immunologic Properties of Differentiated and Undifferentiated Mesenchymal Stem Cells, *Exp Hematol*, 31, s.890-96, 2003.
37. Yılmaz M., Mezenkimal Kök Hücrelerin Tanımlanması ve Fenotipik Özellikleri, THD, MKHK. Kitapçığı, s.11-13, 2008.
38. Croitoru-Lamoury J., Lamoury F.M., Zaunders J.J., Veas L.A., Brew B.J., Human Mesenchymal Stem Cells Constitutively Express Chemokines and Chemokine Receptors That can be Upregulated by Cytokines, IFN-Beta and Copaxone, *J Interferon Cytokine Res*, 27, s.53-64, 2007.
39. Ringe J., Strassburg S., Neumann K., Endres M., Notter M., Burmester G.R. ve ark., Towards in Situ Tissue Repair: Human Mesenchymal Stem Cells Express Chemokine Receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and Migrate Upon Stimulation With CXCL8 but not CCL2, *J Cell Biochem*, 101, s.135-46, 2007.
40. Avcu F., Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünregulatuvar Fonksiyonları, THD, MKHK. Kitapçığı, s.14-16, 2008.

41. Ghannam S., Bouffi C., Djouad F., Jorgensen C., Noel D., Immunosuppression by Mesenchymal Stem Cells: Mechanisms and Clinical Applications, *Stem Cell Research & Therapy*, s.1-2, 2010.
42. Patel S.A., Sherman L., Munoz J., Rameshwar P., Immunological Properties of Mesenchymal Stem Cells and Clinical Implications, *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 56, s.1-8, 2008.
43. Glennie S., Soeiro I., Dyson P.J, Lam E.W., Dazzi F., Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Induce Division Arrest and Energy of Activated T Cells, *Blood*, 105, s.2821-7, 2005.
44. Benvenuto F., Ferrari S., Gerdoni E., Gualandi F., Frassoni F., Pistoia V. ve ark., Human Mesenchymal Stem Cells Promote Survival of T Cells in a Quiescent State, *Stem Cells*, 25, s.1753-60, 2007.
45. Chamberlain G., Fox J., Ashton B., Middleton J., Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing, *Stem Cells*, 25, s.2739-49, 2007.
46. Uccelli A., Moretta L., Pistoia V., Immunoregulatory Function of Mesenchymal Stem Cells, *Eur J Immunol*, 36, s.2566-73, 2006.
47. Kang H.S, Habib M., Chan J., Abavana C., Potian J.A., Ponzio N.M. ve ark., Paradoxical Role for IFN-Gamma in the Immune Properties of Mesenchymal Stem Cells During Viral Challenge, *Exp Hematol*, 33, s.796-803, 2005.
48. Rasmusson I., Uhlin M., Le Blanc K., Levitsky V., Mesenchymal Stem Cells Fail to Trigger Effector Functions of Cytotoxic T Lymphocytes, *J Leukoc Biol*, 82, s.887-93, 2007.
49. Aggarwal S., Pittenger M.F., Human Mesenchymal Stem Cells Modulate Allogeneic Immune Cell Responses, *Blood*, 105, s.1815-22, 2005.
50. Krampera M., Glennie S., Dyson J., Scott D., Laylor R., Simpson E., Dazzi F., Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Inhibit the response of Naive and Memory Antigen-Specific T Cells to Their Cognate Peptide, *Blood*, 101, s.3722-29, 2003.

51. Prevosto C., Zancolli M., Canevali P., Zocchi M.R, Poggi A., Generation of CD4+ or CD8+ Regulatory T Cells Upon Mesenchymal Stem Cell-Lymphocyte Interaction, *Haematologica*, 92, s.881-8, 2007.
52. Krampera M., Cosmi L., Angeli R. ve ark., Role for Interferon in the Immunomodulatory Activity of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, *Stem Cells*, 24, s.386-398, 2006.
53. Rasmusson I., Le Blanc K., Sundberg B., Ringden O., Mesenchymal Stem Cells Stimulate Antibody Secretion in Human B Cells, *Scandinavian Journal of Immunology*, 65, s.336–343, 2007.
54. Ramasamy R., Fazekasova H., Lam E.W., Soeiro I., Lombardi G., Dazzi F., Mesenchymal Stem Cells Inhibit Dendritic Cell Differentiation and Function by Preventing Entry Into The Cell Cycle, *Transplantation*, 83, s.71-6, 2007.
55. Zhang W., Ge W., Li C., You S., Liao L., Han Q. ve ark., Effects of Mesenchymal Stem Cells on Differentiation, Maturation and Function of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells, *Stem Cells*, 13, s.263-71, 2004.
56. Raffaghello L., Bianchi G., Bertolotto M., Montecucco F., Busca A., Dallegrì F. ve ark., Human Mesenchymal Stem Cells Inhibit Neutrophil Apoptosis: a Model for Neutrophil Preservation in the Bone Marrow Niche, *Stem Cells*, 26, s.151-62, 2008.
57. Kim J., Hematti P., Mesenchymal Stem Cell-Educated Macrophages: A Novel Type of Alternatively Activated Macrophages, *Exp Hematol*, 2009.
58. Pelagiadis I., Dimitriou H., Kalmanti M., Biologic Characteristics of Mesenchymal Stromal Cells and Their Clinical Applications in Pediatric Patients, *J Pediatr Hematol Oncol*, 30, s.301-309, 2008.
59. Jacobsohn D.A., Acute Graft Versus Host Disease in Children, *Bone Marrow Transplantation*, 41, s.215–221, 2008.
60. Ringden O. ve ark., Tissue Repair Using Allogeneic Mesenchymal Stem Cells for Hemorrhagic Cystitis, Pneumomediastinum and Perforated Colon, *Leukemia*, 21, s.2271-2276, 2007.

61. Krampera M., Pizzolo G., Aprilli G., Franchini M., Mesenchymal Stem Cells for Bone, Cartilage, Tendon and Skeletal Muscle Repair, *Bone*, 39, s.678-83, 2006.
62. Alison M.R., Poulsom R., Hepatocytes from Non-Hepatic Adult Stem Cells, *Nature*, 2000.
63. Theise N.D. ve ark., Liver From Bone Marrow in Humans, *Hepatology*, 32, s.11-16, 2000.
64. Ural AU, Mezenkimal Kök Hücre Uygulamaları (Yetişkin), *Türkiye Klinikleri J Hem Onc*, 1, s.62-65, 2008.
65. Marinova-Mutafchieva L., Williams R.O., Funa K., Maini R.N., Zvaifler N.J., Inflammation is Preceded by Tumor Necrosis Factor–Dependent İnfiltration of Mesenchymal Cells in Experimental Arthritis, *Arthritis Rheum*, 46, s.507-513, 2002.
66. Ghannam S., Bouffi C., Djouad F., Jorgensen C ve Noël D., Immunosuppression by Mesenchymal Stem Cells: Mechanisms and Clinical Applications, *Stem Cell Research & Therapy*, 1(2), s.1-7, 2010.
67. Muller I., Kustermann-Kuhn B., Hotwarth C. ve ark., In Vitro Analysis of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells as Potential Cellular Therapeutics in Neurometabolic Diseases in Pediatric Patients, *Exp Hematol*, 34, s.1413-9, 2006.
68. Chan J., O'Donoghue K., de la Fuente J. Ve ark., Human Fetal Mesenchymal Stem Cells as Vehicles for Gene Delivery, *Stem Cells*, 23, s.93-102, 2005.
69. Krause D., Theise N., Collector M., ve ark., Multi-Organ, Multi-Lineage Engraftment by a Single Bone Marrow Derived Stem Cell, *Cell*, 105, s.369, 2001.
70. Verfaillie C.M., Pera M.F., Lansdorp P.M., Stem Cells: Hype and Reality. *Hematology, Soc Hematol Educ Program*, s.369-91, 2002.
71. Lazarus H.M., Haynesworth S.E., Gerson S.L., Rosenthal N.S., Caplan A.I., Ex vivo Expansion and Subsequent İnfusion of Human Bone Marrow-Derived Stromal Progenitor Cells (Mesenchymal Progenitor Cells):

- Implications for Therapeutic Use, Bone Marrow Transplant. 16, s.557-64, 1995.
72. Broke G. ve ark., Therapeutic Applications of Mesenchymal Stromal Cells, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 18, s.846–858, 2007.
73. Alvarez-Dolado M., Pardal R., Garcia-Verdugo J.M. ve ark., Fusion of Bone Marrow-Derived Cells With Purkinje Neurons, Cardiomyocytes and Hepatocytes. 425, s.968-73, 2003.
74. Ünal Ş. ve ark., Mezenkimal Kök Hücrelerin Pediatride Klinik Uygulama Alanları, *Türkiye Klinikleri J Hem Onc*, 1(2), s.57-61, 2008.
75. Abbas A.K., Lichtman A.H., İmmün Sistemin Fonksiyonları ve Bozuklukları, *Temel İmmnoloji*, s.1-143, 2007.
76. Karsunky H., Inlay M.A., Serwold T., Bhattacharya D., Weissman I.L., Flk2+ Common Lymphoid Progenitors Possess Equivalent Differentiation Potential for the B and T Lineages, *Blood*, 111(12), s.5562-70, 2008.
77. Özbal Y., İmmün Sistemde Görevli Hücreler, *Temel İmmünoloji*, 2(2); s.17-57, 2000.
78. Jefferis R., Male D., Brostoff J., Roth D.B., Roitt I., *Antibodies in Immunology*, Mosby Elsevier, Canada, s.59-86, 2006.
79. Basten A., Silveira P.A., B-Cell Tolerance: Mechanisms and İmplications, *Curr Opin Immunol*, 22(5), s.566-74, 2010.
80. Tussiwand R., Bosco N., Ceredig R., Rolink A.G., Tolerance Checkpoints in B-Cell Development: Johnny B Good, *Eur J Immunol*. 39(9), s.2317-24, 2009.
81. Zubler R.H., Naive and Memory B Cells in T-Cell-Dependent and T-İndependent Responses, *Springer Semin Immunopathol*, 23(4), s.405-19, 2001.
82. Jarvis L.J., Maguire J.E., LeBien T.W., Contact Between Human Bone Marrow Stromal Cells and B Lymphocytes Enhances Very Late Aantigen-4/Vascular Cell Adhesion Molecule-1-İndependent Tyrosine Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase, Paxillin, and ERK2 in Stromal Cells, *Blood*, 90(4), s.626-35, 1997.

83. Henderson A.J., Narayanan R., Collins L., Dorshkind K., Status of Kappa L Chain Gene Rearrangements and c-kit and IL-7 Receptor Expression in Stromal Cell-Dependent pre-B Cells, *J Immunol*, 149(6), s.1973-9, 1992.
84. Ryan D.H., Nuccie B.L., Ritterman I., Liesveld J.L., Abboud C.N., Insel R.A., Expression of Interleukin-7 Receptor by Lineage-Negative Human Bone Marrow Progenitors With Enhanced Lymphoid Proliferative Potential and B-Lineage Differentiation Capacity, *Blood*, 89(3), s.929-40, 1997.
85. Borghesi L., Milcarek C., From B Cell to Plasma Cell: Regulation of V(D)J Recombination and Antibody Secretion, *Immunol Res*, 36(1-3), s.27-32, 2006.
86. Torres R.M., Hafen K., A Negative Regulatory Role for Ig-Alpha During B Cell Development, *Immunity*, 11(5), s.527-36, 1999.
87. Brandes M., Legler D.F., Spoerri B., Schaerli P., Moser B., Activation-Dependent Modulation of B Lymphocyte Migration to Chemokines, *Int Immunol*, 12(9), s.1285-92, 2000.
88. Cyster J.G., Ansel K.M., Reif K., Ekland E.H., Hyman P.L., Tang H.L. ve ark., Follicular Stromal Cells and Lymphocyte Homing to Follicles, *Immunol Rev*, 176, s.181-193, 2000.
89. Luther S.A., Bidgol A., Hargreaves D.C., Schmidt A., Xu Y., Paniyadi J. ve ark., Differing Activities of Homeostatic Chemokines CCL19, CCL21, and CXCL12 in Lymphocyte and Dendritic Cell Recruitment and Lymphoid Neogenesis, *J Immunol*, 169(1), s.424-33, 2002.
90. Mackay F., Schneider P., Rennert P., Browning J., BAFF and APRIL: A Tutorial on B Cell Survival, *Annu Rev Immunol*, 21, s.231, 2003.
91. Xu S., Tan J.E., Wong E.P., Manickam A., Ponniah S., Lam K.P., B Cell Development and Activation Defects Resulting in Xid-Like Immunodeficiency in BLNK/SLP-65-Deficient Mice, *Int Immunol*, 12(3), s.397-404, 2000.

92. Chalouni C., Banchereau J., Vogt A.B., Pascual V., Davoust J., Human Germinal Center B Cells Differ From Naive and Memory B Cells by Their Aggregated MHC Class II-Rich Compartments Lacking HLA-DO, *Int Immunol*, 15(4), s.457-66, 2003.
93. Mizoguchi A. ve Bhan A.K., A Case for Regulatory B Cells, *J Immunol*, 176, s.705-710, 2006.
94. DiLillo D.J., Matsushita T. ve Tedder T.F., B10 Cells and Regulatory B Cells Balance Immune Responses During Inflammation, Autoimmunity and Cancer, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1183, s.38–57, 2010.
95. Gray D., Gray M., What are Regulatory B cells?, *Eur. J. Immunol*, 40, s.2677–2679, 2010.
96. Mauri C., Ehrenstein M.R., The ‘Short’ History of Regulatory B cells, *TRENDS in Immunology*, s.29-1, 2007.
97. Blair P.A, Norena L.Y., Flores-Borja F., Rawlings D.J., Isenberg D.A., Ehrenstein M.R., Mauri C., CD19+CD24^{hi}CD38^{hi} B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients, *Immunity Article*, 32, s.129–140, 2010.
98. Corcione A., Benvenuto F., Ferretti E., Giunti D., Cappiello V., Cazzanti F., Risso M., Gualandi F., Mancardi G.L., Pistoia V., Uccelli A., Human Mesenchymal Stem Cells Modulate B-cell Functions, *Blood*, 107, s.367-372, 2006.
99. Tabera S., Pérez-Simón J.A., Díez-Campelo M., Sánchez-Abarca L.I., Blanco B., López A., Benito A., Ocio E., Sánchez-Guijo F.M., Cañizo C, San Miguel J.F., The Effect of Mesenchymal Stem Cells on the Viability, Proliferation and Differentiation of B-Lymphocytes, *Haematologica Original Articles*, 93(9), s.1301-9, 2008.
100. Neagu, M., Suci E., Ordodi V., Virgil P., Human Mesenchymal Stem Cells as Basic Tools for Tissue Engineering: Isolation and Culture, *Romanian J. Biophys*, 15 (1–4), s.29-34, 2005.

101. Rojewski M.T., Weber B.M., Schrezenmeier H., Phenotypic Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Various Tissues, *Transfus Med Hemother*, 35, s.168–184, 2008.
102. Uccelli A., Lorenzo M., Pistoia V., Mesenchymal Stem Cells in Health and Disease, *Nature Reviews Immunology*, 8, s.726-736, 2008.
103. Comoli P., Ginevri F., Maccario R., Avanzini M.A., Marconi M., Groff A., Cometa A., Cioni M., Porretti L., Barberi W., Frassoni F., Locatelli F., Human Mesenchymal Stem Cells Inhibit Antibody Production Induced In Vitro by Allostimulation, *Nephrology Dialysis Transplantation*, 23(4), s.1196-1202, 2008.
104. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F.C., Krause D.S., Deans R.J., Keating A., Prockop D.J., Horwitz E.M., Position Paper Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells, *The International Society for Cellular Therapy Position Statement*, *Cytotherapy*, 8 (4), s.315- 317, 2006.
105. Le Blanc K., Tamik C., Rosendahl K., Zetterberg E., Ringde'n O., HLA Expression and Immunologic Properties of Differentiated and Undifferentiated Mesenchymal Stem Cells, *Experimental Hematology*, 31, s.890–896, 2003.
106. Chan J.L., Tang K.C., Patel A.P., Bonilla L.M., Pierobon N., Ponzio N.M., Rameshwar P., Antigen-Presenting Property of Mesenchymal Stem Cells Occurs During a narrow Window at Low Levels of Interferon- γ , *Blood*, 107, s.4817-4824, 2006.
107. Bernardo M. E., Human Mesenchymal Stromal Cells: Biological Characterization and Clinical Application, Published With Minor Modification in *Ann N Y Acad Sci*, 1176, s.101-117, 2009.
108. Traggai E., Volphi S., Schena F. ve ark., Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Induce Both Polyclonal Expansion and Differentiation of B Cells Isolated From Healthy Donors and Systemic Lupus Erythematosus patients, *Stem Cells*, 26, s.562-569, 2008.

109. Brisslert M., CD25 Positive B Cells, *Mod. Asp. Immunobiol*, 19, s.23, 2006.
110. Amu S., The Expression and Function of CD25 B Cells in Man and in Mice, 2008.
111. Amu S., Strömberg K., Bokarewa M., Tarkowski A., Brisslert M., CD25-Expressing B-Lymphocytes in Rheumatic Diseases, *Journal of Immunology*, 65, s.182–191, 2007.
112. Gary-Gouy H., Harriague J., Bismuth G., Platzer C., Schmitt C., Dalloul A.H., Human CD5 Promotes B-Cell Survival Through Stimulation of Autocrine IL-10 Production, *Blood*, 100 (13), s.537-43, 2002.
113. Ho Lee J., Noh J., Noh G., Soo Choi W., Sun Lee S., IL-10 is Predominantly Produced by CD19(low)CD5(+) Regulatory B Cell Subpopulation: Characterisation of CD19 (high) and CD19(low) Subpopulations of CD5(+) B cells, *Yonsei Med J*, 52(5), s.851-855, 2011.
114. Sun L, Liang J., Zhang H., ve ark., Allogenic Mesenchymal Stem Cells Transplantation in Refractory Systemic Lupus Erythematosus: A Pilot Clinical Study, *Ann Rheum Dis*, 69, s.1423–29, 2010.
115. Tyndall A., Houssiau F.A., Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Autoimmune Diseases, *Ann Rheum Dis*, 69 (8), s.1413-15, 2010.
116. Scherer H.U., Pel M., EM Toes R., Mesenchymal Stem Cells in Autoimmune Diseases: Hype Or Hope?, *Arthritis Research & Therapy*, 12, s.126, 2010.
117. Schurgers E., Kelchtermans H., Mitera T., Geboes L., Matthys P., Discrepancy Between the in vitro and in vivo Effects of Murine Mesenchymal Stem Cells on T-Cell Proliferation and Collagen-Induced Arthritis, *Arthritis Res Ther*, 12, s.31, 2010.
118. Le Blanc K., Rasmusson I., Götherström C., Seidelz C., Sundberg B., Sundin M., Rosendahl K., Tammik C., Ringde'n O., Mesenchymal Stem Cells Inhibit The Expression of CD25 (Interleukin-2 Receptor) and CD38 on Phytohaemagglutinin-Activated Lymphocytes, *Scandinavian Journal of Immunology*, 60, s.307–315, 2004.