



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**“ALLOJENİK TRANSPLANTASYONLARDA
KULLANILAN İMMÜNSUPRESİF İLAÇ DOZLARININ
AZALTILMASINDA UMBLİKAL KORD MEZENKİMİ
KAYNAKLI KÖK HÜCRELERİN ROLÜ”**

Şeyda Güray EVİN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Sütçü

Konya-2019

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**“ALLOJENİK TRANSPLANTASYONLARDA KULLANILAN
İMMÜNSUPRESİF İLAÇ DOZLARININ AZALTILMASINDA
UMBLİKAL KORD MEZENKİMİ KAYNAKLI KÖK HÜCRELERİN
ROLÜ”**

Şeyda Güray EVİN
TIPTA UZMANLIK TEZİ

PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Sütçü

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından
19102007 proje numarası ile desteklenmiştir.

Konya-2019

TEZ KABUL ve ONAY SAYFASI

UZMANLIK TEZİ JÜRİ TUTANAĞI

Uzmanlık Öğrencisinin Adı Soyadı : Şeyda GÜRAY EVİN

Uzmanlık Dalı : Plastik, Rek. ve Estetik Cerrahisi Anabilim Dalı

Tez Danışmanı : Dr. Öğr. Üyesi Mustafa SÜTÇÜ

Tezin Adı : "Allojenik Transplantasyonlarda Kullanılan İmmünespresif İlaç Dozlarının Azaltılmasında Umbilikal Kord Mezenkimi Kaynaklı Kök Hücrelerin Rolü"

Dr. Şeyda GÜRAY EVİN'in hazırlamış olduğu tezini 29/08/2019 tarihinde aşağıda isimleri yazılı olan jüri huzurunda savunmuştur.

SONUÇ:

TEZ BAŞARILI 

TEZ BAŞARISIZ ()

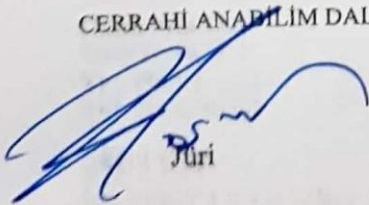
PROF. DR.

ZEKERİYA TOSUN

S.Ü. TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK, REK. VE ESTETİK

CERRAHİ ANABİLİM DALI



Jüri

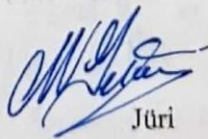
DR.ÖĞR. ÜYESİ

MUSTAFA SÜTÇÜ

S.Ü. TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK, REK. VE ESTETİK

CERRAHİ ANABİLİM DALI



Jüri

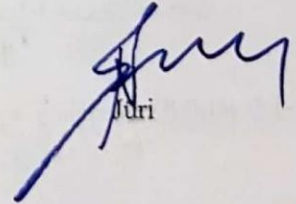
PROF. DR.

NEDİM SAVACI

N.E ÜNV. TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK, REK. VE ESTETİK

CERRAHİ ANABİLİM DALI



Jüri

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	v
1. GİRİŞ.....	1
1. 1. Giriş ve Amaç.....	1
1.2. Genel Bilgiler	3
1.2.1. Allotransplantasyonun tanımı	3
1.2.2 Allotransplantasyon tarihçesi	3
1.2.3 Allotransplantasyonu yapılabilen dokular.....	6
1.2.4 Allotransplantasyon immünolojisinin tarihçesi.....	13
1.2.5 Allotransplantasyon farmakolojisinin tarihçesi.....	15
1.2.6 İmmüsupresif ilaçların yan etkileri	19
1.2.7. İmmüsupresif dozlarını azaltmada kullanılan yöntemlerin tarihçesi	20
1.2.8 Kök hücreler	27
2. GEREÇ VE YÖNTEM	38
2. 1. Deney Hayvanları.....	38
2. 1. 1. Deney hayvanlarının temini ve bakımı	38
2. 1. 2 Transplante edilecek dokunun, transplantasyon yönteminin ve kullanılacak deney hayvanlarının seçimi	40
2. 2 Deney Gruplarının Belirlenmesi	42

2. 3. Umblikal Kord Mezenkimal Kök Hücrelerin Elde Edilmesi	43
.....	45
2.4. Siklosporin-A Hazırlama Protokolü.....	46
2.5. Cerrahi İşlemlerin Yapılması	46
2.5.1. Anestezi	46
2.5.2. Cilt allogreftlerinin transplantasyonu	46
2.5.3. Greftlerin açılması.....	52
2.5.4. Biyopsi tekniği ve biyopsilerin alınması	52
2.5.5. Cerrahi sonrası takip.....	54
2.5.6. Ötenazi Uygulanması	54
2.6. Değerlendirme Yöntemleri.....	54
2.6.1. Makroskopik incelemeler	54
2.6.2. Mikroskopik incelemeler.....	55
2.6.3. Sayısal termal görüntüleme	70
2.7. İstatistiksel Analiz	75
3. BULGULAR	78
3.1. Makroskopik Değerlendirme Sonuçları	78
3.2. Sayısal Termal Görüntüleme Değerlendirme Sonuçları	81
3.3. Mikroskopik Değerlendirme Sonuçları	85
3.5. İstatistiksel Analiz Sonuçları.....	106
6.KAYNAKLAR.....	141

7. ÖZET.....	157
8. SUMMARY.....	159
9. EKLER.....	161
10. ÖZGEÇMİŞ.....	162



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Santigrad derece
μl	Mikrolitre
ng	Nanogram

Kısaltmalar

ark.	Arkadaşları
ASCs	Adipose-derived Stem Cells: Yağ Doku
Kaynaklı Kök Hücre	
ASH	Antijen sunan hücre
AZA	Azotioprin
CTLA	T lenfosit ilişkili protein 4
DH	Dendritik Hücre
FDA	Food Drug Administration
GVHH	Graft versus host hastalığı
HKH	Hematopoetik kök hücre

ICOS	T hücre kostimülatör sistemi
IL	İnterlökin
İH	İmmünhistokimyasal
IM	İntramusküler
ISSCR	Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği
KDA	Kompozit doku allotransplantasyonu
Kİ-MKH	Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler
MKH	Mezenkimal Kök Hücreler
MMF	Mikofenolatmofetil
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
NK	Doğal öldürücü hücre
PD-1	Programlanmış hücre ölümü proteini 1
RET	Retiküloendotelyal sistem
SK	Siklosporin
SOT	Solid organ transplantasyonu
TGF	Transforme Edici Büyüme Faktörü
TNF	Tümör Nekrozis Faktörü
UA-MKH	Umblikal arter mezenkimal kök hücre
UV-MKH	Umblikal ven mezenkimal kök hücre

UK	Umblikal kord
UK-MKH	Umblikal kord mezenkimal kök hücre
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör
WJ-MKH	Wharton Jeli mezenkimal kök hücre



1. GİRİŞ

1. 1. Giriş ve Amaç

Allotransplantasyon bir organ ya da dokunun farklı genotipe sahip aynı tür bireyler arasında taşınmasıdır. Son dönem organ yetmezlikleri, yaşam kalitesini azaltan uzuv kayıplarının ve konvansiyonel yöntemlerle giderilemeyecek kozmetik problemlerin tedavisi çoğu kez allotransplantasyondur.

Literatürde rutin olarak yapılan 6 tip solid organ transplantasyonu bildirilmiştir. Bunlar; böbrek, pankreas, karaciğer, kalp, akciğer, ve barsak transplantasyonlarıdır. 2015 yılında Amerika’da yaklaşık 25.000 kişiye solid organ transplantasyonu (SOT) yapılmıştır. Türkiye’de ise sağlık bakanlığı verilerine göre 2008 yılından beri 24.390 hastaya SOT (böbrek, akciğer, ince barsak, karaciğer, pankreas, kalp) yapılmıştır.

Solid organlar dışında el, kol, bacak gibi uzuvlar ve yüz de nakledilebilecek dokular arasındadır. Bunlara genel olarak kompozit doku allotransplantasyonları (KDA) denilmektedir. KDA, SOT’nun aksine cilt, kas-iskelet sistemi, sinirler ve vasküler dokular gibi farklı doku içeriklerini barındıran tek bir anatomik bölümün nakledilmesidir. Yine SOT’dan farklı olarak içerdiği dokuların çeşitliliğine göre alıcıda daha güçlü bir immünolojik yanıt geliştirir. Örneğin; ekstremitte transplantasyonlarında en antijenik parça cilttir. Ardından sırasıyla kas, kemik, kıkırdak ve tendon gelmektedir ve her biri kendine özgü bir immün reaksiyon geliştirmektedir (Zdichavsky et al. 1999).

Cildin antijenitesi transplantasyon tarihçesinde araştırmacıları en çok zorlayan faktörlerden biridir. Cilt, antijenitesi nedeniyle reddin ilk hedefidir (Lee et

al. 1991; Kanitakis et al. 2003). SOT’larda kullanılan immunsupresif ilaç dozları cilt içeren dokuların rejeksiyonunun önlenmesinde yetersiz kalmaktadır. Bu durum KDA’da immunsupresif dozlarının artırılmasına neden olmuştur (Stark et al. 1987; Hovius et al. 1992).

SOT’dan farklı olarak KDA’da amaç, hastanın hayatını tehdit eden bir patolojinin ortadan kaldırılması değil yaşam kalitesinin artırılması ve beden algısının düzeltilmesidir. Yan etkileri doz bağımlı gelişen immünsupresif ilaçların KDA sonrası ömür boyu kullanılması hastalarda ek problemlerin ortaya çıkmasına neden olmakta ve yaşam kalitelerini azaltmaktadır. Özellikle KDA yapılacak hastalarda immunsupresif ilaçlar nedeniyle fayda-yan etki oranı iyi hesaplanmalıdır. Bu nedenle son yıllarda immunsupresif ilaç dozlarının azaltılmasına ve bu ilaçların biyolojik ajanlarla yer değiştirilmesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır.

Plastik cerrahinin rejeneratif uygulamalarında sıkça kullanılan kök hücreler bu alandaki çalışmalarda da başrolü üstlenmiştir. Çeşitli bağ dokulardan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin immunmodülatör etkileri kanıtlandığından beri transplantasyon hastalarında reddin önlenmesinde kullanımı gündeme gelmiştir. Bu alanda birçok in vivo ve in vitro çalışma-yapılmıştır (Ringden et al. 2006; English and Wood 2013; Sioud et al. 2010; Perico et al. 2011).

Bu çalışmada umblikal kord mezenkimal kök hücrelerinin immünsupresif ilaç dozlarını azaltmadaki rolü ve etki mekanizmasının deneysel bir model üzerinde nicel parametrelerle gösterilmesi amaçlanmıştır.

1.2. Genel Bilgiler

1.2.1. Allotransplantasyonun tanımı

Allotransplantasyon, bir organ veya dokunun, aynı türün farklı genotipe sahip bireyleri arasında naklidir. Transplant allogreft olarak adlandırılır. Allotransplante edilebilen dokular ise; cilt, solid organlar ve birkaç dokuyu beraber içeren kompozit dokulardır.

1.2.2 Allotransplantasyon tarihçesi

1.2.2.1 Cilt allotransplantasyonunun tarihçesi

Cilt, allotransplantasyon tarihçesinde yer alan en önemli dokulardan biridir. İlk transplante edilen doku olması ile diğer allotransplantasyon çalışmalarının önünü açmıştır. Bunun yanı sıra güçlü antijenitesi nedeniyle transplantasyon immünolojisinin anlaşılması ve rejeksiyonun önlenmesinde en çok kullanılan deneysel model olmuştur.

1804 yılında sonucun başarılı olduğu iddia edilen ilk cilt allotransplantasyonu koyunlar arasında yapılmıştır (Bunger 1823). Fakat gerçek anlamda transplantasyona dair araştırmalar 1870 yılında başlamış ve ilk önce allojenik cilt greftlerinin yaşayabilirliği ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Transplantasyon immünolojisine dair bilgilerin eksik olması nedeniyle deneysel cilt allotransplantasyonlarında üst üste başarısızlıklar yaşanması araştırmacıları başka nakil sahalarına yönlendirmiştir.

Transplant rejeksiyonunun immünolojisi üzerine yapılan çalışmalar ile birincil ve ikincil rejeksiyon reaksiyonları tanımlanmış ve immüsupresif ajanlar keşfedilmiştir. Devamında allojenik cilt transplantasyon çalışmaları yeniden hız kazanmıştır (Lopez-Flores et al. 2011; Black et al. 1988; Bartholomew et al. 2002; P. Sbrano 2008).

1.2.2.2 Solid organ allotransplantasyonu tarihçesi

1902 yılında Carrel tarafından vasküler anastomoz tekniklerinin geliştirilmesi ile birlikte solid organ transplantasyon cerrahileri gündeme gelmiştir. 1936 yılında Voronoy tarafından ilk kez kadavradan böbrek nakli denenmiştir (Squifflet 2003; R.M Langer 2002). 1951 yılında Dr. Kuss tarafından kadavradan böbrek nakli; 1953 yılında Dr. Michon tarafından akrabalar arası böbrek nakli; 1954 yılında Dr. Hume, Dr. Murray ve Dr. Merrill tarafından ikizler arası ilk başarılı böbrek nakli; 1962 yılında Dr. Hamburger tarafından akrabalar arası ilk başarılı böbrek nakli ve devamında Dr. Kuss tarafından akraba olmayanlar arasında böbrek nakli yapılarak SOT çalışmaları devam etmiştir (Starzl 1993). Böbrek dışında 1963 yılında Dr. Starzl tarafından ilk karaciğer nakli 3 yaşında bilier atrezili bir hastaya yapılmıştır (Starzl et al. 1963). 1966 yılında Dr. Kelly Lillehei tarafından ilk pankreas nakli yapılmıştır (Kelly et al. 1967). 1967 yılında ilk başarılı karaciğer nakli ve ilk kalp nakli gerçekleştirilmiştir (Starzl et al. 1968; Barnard 1969).

1.2.2.3 Kompozit doku allotransplantasyonu tarihçesi

KDA'nun tarihi 16. yüzyıla dayanmaktadır. İkiz kardeşler Cosmas ve Damien'in ilk kez kadavradan bacak nakli yaptığı çalışma o döneme ait tablolarda resmedilmiştir (Squifflet 2003). Aynı yüzyıl içinde Gaspere Tagliocozzi'nin burnu olmayan bir hastanın burnunu rekonstrükte etmek için allojenik doku naklini kullandığı, bu dokunun 3 yıl yaşayabildiği ve aniden kaybedildiği bildirilmiştir (Gander et al. 2006).

KDA'ları 1957 yılında bir plastik cerrah olan Erle E. Peacock tarafından bir bütün olarak dijital fleksor tendon mekanizmasının transfer edilmesi ile birlikte gerçek anlamda tarihçede yerini almıştır (Peacock 1960). Bundan sonra Robert Gilbert bilateral el amputasyonu olan bir hastaya ilk el transplantasyonunu yapmıştır (Foroohar et al. 2011). 3 hafta sonra bu girişimin rejeksiyonla sonuçlanması cilt içeren dokuların transplante edilmesinin yüksek antijenik özellikleri nedeniyle oldukça zor olduğu fikrinin benimsenmesine neden olmuştur. Bu alandaki klinik çalışmalar uzun bir süre sekteye uğramış ve bundan sonraki dönemde yapılan ilk başarılı KDA'na kadar 30 yıl geçmiştir. Bu süre içinde cilt içeren kompozit dokuların epidermisten kaynaklanan yüksek antijenik özelliklerinin immunsupresif ilaçlarla bile baskılanamayacağına dair yanlış inanışlar transplantasyon cerrahları arasında yaygınlaşmıştır. İmmunsupresif ilaçların SOT'nun başarısını artırmasından sonra immunsupresiflerle desteklenmiş KDA'ları yeniden hayvan deneylerinde yer bulmaya başlamıştır. 1998 ve 2000 yıllarında Lyon'da el ve yüz nakli ekibi tarafından ilk başarılı el transplantasyonu gerçekleştirilmiştir (Dubernard JM 1999). Red reaksiyonunun önlenmesinde çeşitli immunsupresif tedavilerden yararlanılmıştır.

1.2.3 Allotransplantasyonu yapılabilen dokular

Şimdiye kadar abdominal duvar, diz, fleksor tendon mekanizması, sinir, larinks, kas, dil, trakea, skalp ve penis transplantasyonları gerçekleştirilmiştir. Bunun dışında son dönemde plastik cerrahi pratiğini en çok ilgilendiren el, kol, bacak, parsiyel ve total yüz nakilleri de gerçekleştirilmiştir.

1.2.3.1. Parsiyel yüz allotransplantasyonu

Yüz, sadece üzerinde koklama, duyma, görme organlarımızın bulunduğu bir anatomik bölge olmayıp aynı zamanda dış dünya ile sosyal ve emosyonel ilişki kurmamızı sağlayan en önemli aracımızdır. Bu nedenle yüzdeki deformiteler oldukça ağır psikolojik ve sosyal travmaları beraberinde getirebilir. Geleneksel yöntemler kullanılarak yapılan otolog yüz rekonstrüksiyonlarında ise dokuların benzer olmaması ve kalıcı izler oluşması nedeniyle ideal sonuçlar elde etmek zordur.

Yüzün KDA şeklinde taşınması ileri derece deformitelerde başvuru olan bir rekonstrüksiyon seçeneğidir. Doku eksikliğinin yaygınlığına göre yüz bölgesi parsiyel ya da total olarak transplante edilebilir. Yüz transplantasyonu, el transplantasyonu ile birlikte en fazla gerçekleştirilen KDA'dur (Emmanuel Morelon 2015).

2005 yılında Dr. Dubernard tarafından yönetilen ekip dünyadaki ilk parsiyel yüz transplantasyonunu yapmıştır. Bu allogreft burun, dudaklar ve çeneyi içermektedir. Hastaya immunsupresif tedavi uygulanmış ve 18 aylık sonuçları memnun edici olarak bildirilmiştir (Devauchelle et al. 2006). 2006 yılında ikinci parsiyel yüz transplantasyonu Çin'de yapılmıştır. Bunun yapılan ilk parsiyel yüz

naklinden farkı kemik ve tükürük bezlerini de içermesidir (Guo et al. 2008). Literatürde bu vakanın geç dönem sonuçları ile ilgili veri bulunmamaktadır. 2007 yılında Fransız bir ekip tarafından üçüncü parsiyel yüz nakli yapılmıştır (Lantieri et al. 2016).

2008 yılında Siemionow tarafından ilk totale yakın yüz transplantasyonu yapılmış ve takiplerde immunsupresif tedavi verilmiştir (Siemionow et al. 2009). Bundan sonra 2018 yılına kadar 24 hastaya daha parsiyel yüz nakli yapılmıştır.

1.2.3.2. Total yüz allotransplantasyonu

İlk kez 2010 yılında Barret tarafından yapıldıktan sonra 2018 yılına kadar 18 hastaya daha total yüz allotransplantasyonu yapılmıştır (Barret et al. 2011).

1.2.3.3. El allotransplantasyonu

Araştırmacılar arasında allotransplante edilebilme ihtimali ve bundan doğacak kazanımları en erken tartışılmaya başlanan ve bu nedenle allotransplantasyonu en çok yapılan organ eldir. Vücudumuzun en fonksiyonel organı olan elin allotransplantasyonu oldukça önemlidir. Günümüzde unilateral ya da bilateral olacak şekilde 70 civarında el transplantasyonu yapılmıştır. Şimdiye kadar yapılan el transplantasyonlarının genel olarak hastaların yaşam kalitelerine olumlu etkileri olduğu gözlenmiştir. En sık yapılan KDA olduğundan allogreftin davranışı, immünsupresyonun etkileri, rejeksiyon bulguları ve özellikleri oldukça iyi tanımlanmıştır. Literatürde bu vakalarla ilgili vurgulanan noktalardan biri; bu tür transplantasyonlarda akut red ataklarının oldukça fazla sayıda olmasıdır.

(Kanitakis J 2005) (Kanitakis et al. 2003). Bu da bu transplantasyonların erken dönem başarısını artırmaktadır.

KDA sonrası kronik red reaksiyonları SOT'da olduğu kadar sık değildir. Bunun nedenlerinden birisi SOT kadar sık yapılmaması, diğeri ise KDA'da kronik rejeksiyonun tanımının açıkça yapılmamış olmasıdır. Aynı zamanda kronik rejeksiyonun oluşmadan önlenmesi adına uyarıcı olabilecek gözlemsel bir ipucu bulunmamaktadır. Kronik reddin belirtisi SOT'a benzer şekilde özellikle endotelde gerçekleşen vasküler hasar, myointimal proliferasyon, arteriel lümen daralmasıdır. Bu da greft parankiminde iskemik değişikliklere, fibrozise, disfonksiyona ve en sonunda greft kaybına neden olur.

Transplante edilebilen diğerk dokular arasında bulunan fleksor tendon mekanizması allotransplantasyonu ilk kez 1957 yılında Erle E. Peacock tarafından gerçekleştirildikten sonra 1989 ve 1999 yıllarında Guimberteau 2 hastaya fleksor tendon mekanizmasının transplantasyonunu yapmıştır. İmmüsupresif tedavi alan hastaların sonuçlarının başarılı olduğu bildirilmiştir (Guimberteau et al. 1992). Fleksor tendon mekanizmasının total transferi ile ilgili güncel çalışma bulunmamaktadır.

1.2.3.4. Sinir allotransplantasyonu

İlk kez Mackinnon tarafından yapılmıştır ve 2001 yılında sonuçları yayınlanmıştır. Tüm hastalara immüsupresif tedavi başlanmış, yalnızca 1 hastada red reaksiyonuyla karşılaşmıştır. Diğerk 6 hastada ise duyu ve motor dönüşler iyi olmuştur (Mackinnon et al. 2001). Sinir allotransplantasyonunun diğerk

allotransplantasyonlardan farkı sinir rejenerasyonu tamamlandığında immunsupresif tedavinin kesilebilmesidir.

1.2.3.5. Larinks allotransplantasyonu

1960'lı yıllarda hayvan çalışmaları ile başlamıştır. 1969 yılında Klauskens insanda ilk larinks transplantasyonunu gerçekleştirmiştir, ancak hasta 8 ay sonra tümör nüksü nedeniyle kaybedilmiştir (Kluyskens and Ringoir 1970). 1998 yılında Strome insanda, faringolaringeal sistem, 6 trakeal halka, troid ve paratroid glandları içeren ilk başarılı larinks transplantasyonunu yapmıştır (Lorenz and Strome 2014). İmmunsupresif tedavi verdikleri hastada başarılı sonuçlar elde etmişlerdir. İkinci başarılı larinks transplantasyon 2010 yılında Gregory Farwell tarafından yapılmıştır (Farwell et al. 2013). 2002 yılından beri Tintinago ve ekibi tarafından klinik larinks transplantasyonları yapılmaktadır ve yine bu ekip tarafından ideal larinks ve trakea donörlerinin özellikleri belirlenmiştir (Duque et al. 2007).

1.2.3.6. Kas allotransplantasyonu

Vaskülarize kas allotransplantasyonu ilk kez 1998 yılında renal transplantasyon yapılmış bir hastanın skalp defektini kapatmak için uygulanmıştır. İmmunsupresif tedavi almaya devam eden hastada herhangi bir rejeksiyon bildirilmemiştir (Jones, Humphrey, and Brennan 1998). Bu vakadan sonra literatüre giren başka bir vaka olmamıştır. Günümüzde artık allojenik kas doku transplantasyonu yerine kasın doku mühendisliği ile yeniden üretilmesi üzerine çalışmalar yapılmaktadır (Yan et al. 2019; Bach et al. 2006).

1.2.3.7. Allojenik dil transplantasyonu

İlk kez 2003 yılında dil kanserli bir hastaya yapılmıştır. Bu transplantasyondan sonra tat duyusunun geri gelmesi mümkün olmamış fakat dil kası hareketlerinde kısmi dönüş elde edilebilmiştir (BBCNews 2003) Günümüzde rekonstrüktif mikrocerrahinin sağladığı imkanlarla dil rekonstruksiyonu yapılabilmektedir. Dil transplantasyonunun fonksiyonel anlamda bu tekniklere üstünlüğü kanıtlanamadığından güncel nakiller yapılmamıştır.

1.2.3.8. Trakea allotransplantasyonu

İlk kez Rose ve ekibi tarafından 1979 yılında yapılmıştır. Trakea sternokloidomastoid kasa sarılarak transfer edilmiştir. Herhangi bir immunsupresif tedavi almamasına rağmen hastanın 9 haftalık takip süreci başarı ile sonlanmış, red ya da nekroz gözlenmemiştir. (Rose, Sesterhenn, and Wustrow 1979). 1993 yılında Levashov ve arkadaşları tarafından trakea omentuma sararak transfer edilmiş ve ikinci transplantasyonu bildirilmiştir. (Levashov Yu et al. 1993). Son olarak 2004 yılında Klepetko başka bir omentuma sarılı heterotopik trakea transplantasyonu yapmış ve hastaya immunsupresif tedavi vermiştir (Klepetko et al. 2004). Operasyondan 8 ay sonra tamamıyla normal bir trakea elde etmeyi başarmıştır.

1.2.3.9. Skalp allotransplantasyonu

Şimdiye kadar yapılmış ilk başarılı skalp transplantasyonuna dair bilgileri 1982 yılında Buncke ve ekibinin yayınladığı makaleden edinebilmekteyiz (Buncke et al. 1982). Bu transplantasyon tek yumurta ikizleri arasında gerçekleştirilmiş ve herhangi bir immunsupresyon yapılmadan başarıya ulaşmıştır. Skalp

transplantasyonuna dair ikinci vaka 2005 yılında yapılmış. 72 yaşında bir kadın hastanın verteksinden eksize edilen malign melanom defekti, skalp ve 2 kulağı barındıran bir KDA ile onarılmıştır (Jiang et al. 2005). Postoperatif 120. güne kadar yapılan biyopsilerde rejeksiyon gözlenmemiştir fakat vakanın geç dönem sonuçları bilinmemektedir.

1.2.3.10. Abdominal duvar allotransplantasyonu

Kompozit abdominal duvar allotransplantasyonu bir ya da her iki rektus kası, fasya, subkutan doku ve cildi içermektedir. Son dönem barsak hastalıklarında, total parenteral nütrisyona muhtaç hastalarda, çoklu organ yetmezliği olan hastalarda yapılan barsak ya da multiviseral transplantasyonlardan sonra karın duvarını kapatabilmek oldukça zor olmaktadır. Karın duvarı allotransplantasyonunun gündeme gelme nedeni bu zorluğun giderilmesidir. Levi ve arkadaşları tarafından 8 hastaya yapılan 9 abdominal duvar allotransplantasyonunu raporlamış ve karın duvarının kapatılması için uygun seçeneklerden biri olduğu gösterilmiştir. 2 hastada transplant cildine karşı gelişen immünolojik atak kortikosteroid tedavisiyle giderilmiştir. (Levi et al. 2003)

1.2.3.11. Penis allotransplantasyonu

2006 yılında Hu ve ekibi penil transplantasyon yaparak immünsupresyon tedavisi verdikleri bir hastanın erken dönem sonuçlarını yayınlamışlardır (Hu et al. 2006). Hastayla ilgili sosyal ve psikolojik bazı faktörler transplantın erken dönemde geri alınmasına neden olmuştur. Bu yüzden geç dönem sonuçları olmamakla beraber transplant alındığında yapılan patolojik değerlendirme rejeksiyonun olmadığı yönündedir. 2014 yılında Stellenbosch Üniversitesi'nde ikinci penis

allotransplantasyonu gerçekleştirilmiştir (Bateman 2015). Sirkümsizyon nedeniyle penisini kaybetmiş bir hastaya yapılan penis nakli sonrası tam üriner ve cinsel fonksiyon bildirilmiştir (van der Merwe et al. 2017). 2016 yılında Amerika’da üçüncü penis transplantasyonu penis kanseri nedeniyle penektomi olmuş bir hastaya yapılmıştır (Grady 2016). Olgunun geç dönem sonucu ile ilgili veri bulunmamaktadır. KDA’lar arasında yapılmadan önce etik, sosyal ve psikolojik yönlerinin en iyi şekilde değerlendirilmesi gereken grup penis transplantasyonudur. Bu nedenle literatürde klinik olarak yapılmış kısıtlı sayıda vaka bulunmaktadır.

1.2.3.12. Bacak allotransplantasyonu

İlk kez 2 bacak nakli 2011 yılında İspanya’da Dr. Pedro Cavadas ve ekibi tarafından yapılmıştır. Hasta immünsupresif ilaçları kullanmaya devam edemediğinden nakilden yaklaşık 2 yıl sonra bacaklar yeniden ampute edilmiştir (Silverstein 2013).

Halihazırda transplante edilebilecek dokuların sonuncusu ise femoral diafizdir. İlk kez 1990 yılında Fransız bir grup araştırmacı, insan femoral diafizini vaskülarize biçimde aktarmış ve immunsupresif tedavi almayan hastada greftin vaskülarizasyonunun devam etmediği görülmüştür (Chiron et al. 1990). 1995 yılında Hofmann ve arkadaşları (ark.) yeniden femoral diafiz naklini gerçekleştirmişler ve immunsupresif tedavinin olmazsa olmaz olduğunu bildirmişlerdir (G. O. Hofmann 1995). 1994 yılında Doi bir anneden bebeğine allojenik fibula nakli gerçekleştirmiş fakat immünsupresif tedavi uygulamadığından Chiron gibi o da transplant vaskülarize etmeyi başaramamıştır.

Bundan sonra total diz nakilleri hem deneysel hem de klinik olarak denenmiş fakat tatmin edici sonuçlar alınamamıştır. Hoffman 1998 yılında başarılı bir şekilde gerçekleştirdiği 3 femur diafizi ve 3 total diz transplantasyonu bildirmiştir (Hofmann et al. 1998). Hastaların her birinde immunsupresif ilaç kullanılmıştır. Diz ve dizin farklı komponentlerinin transplantasyonu hala güncelliğini koruyan konulardan biridir.

1.2.4 Allotransplantasyon immünolojisinin tarihçesi

Doku ve organ nakillerinin özgürce yapılabilmesinin önündeki engel alıcı ve verici arasındaki genetik uyumsuzluktur. Bu genetik uyumsuzluğun transplante edilen dokular üzerinde nasıl etkili olduğunun açıklanmasında immünolojik gelişmeler kilit rol oynamaktadır.

1918 yılında ilk kez Masson tarafından donör ve alıcı arasındaki benzerliğin transplantasyonlardaki önemine değinilmiştir. Fakat bu öngörü 1930'lu yıllara kadar tartışmalı kalmıştır. 1943 yılında Peter Medawar ve plastik cerrah arkadaşı Thomas Gibson bir hastaya kardeşinden deri nakli yaparak hem primer hem de sekonder rejeksiyon reaksiyonunu değerlendirme şansı elde etmişlerdir. Bu klinik deneyimin sonunda rejeksiyonun spesifik karakteristiklerini ifade edecek biçimde; rejeksiyonda latensi dönemi, hafıza ve spesifite gibi kavramlar ortaya atılmıştır. Reddin lokal bir reaksiyondan öte, planlı ve profesyonel çalışan bir immun sistemin ürünü olduğu keşfedilmiştir (Gibson and Medawar 1943). Lenfositlerin red reaksiyonu üzerinde antikorlardan daha etkili olduğuna değinilmiştir. 1944 yılında Medawar tarafından tavşanlar üzerinde yapılan çalışma ile cilt greftlerinin reddinde etkili olan hücreler

daha açık şekilde ortaya koyulmuş ve red reaksiyonunun şiddetinin greft miktarına bağlı olarak değişebileceği belirtilmiştir.

1953 yılında Owen, Medawar ve Billingham tarafından immünolojik olarak olgunlaşmamış farelere, intrauterin veya perinatal dönemde donör splenositlerin intravenöz infüzyonla aşılabilceği ve bu yolla farelerin olgunlaştıklarında, donörden yapılan cilt veya diğer doku nakillerinde herhangi bir immünolojik reaksiyon göstermediklerini kanıtlanmışlardır (Billingham, Brent, and Medawar 2003). Medawar buna edinilmiş immünolojik tolerans adını vermiş ve bu çalışma ile Nobel ödölüne layık görülmüştür (Silverstein 2016). Bu yıllarda lenfositlerin fonksiyonları daha net anlaşılmıştır. T ve B lenfositlerin farklı görevleri olduğu bulunmuş, T hücre reseptörü ve immunglobulinler keşfedilmiş, T lenfositlere antijen sunmada HLA proteinlerinin etkin rol oynadığı anlaşılmıştır. 1990'lı yılların başında T hücrelerin aktive olması için antijen sunan hücreler dışında eş uyarılar (kostimülatörler) olarak adlandırılan bir grup reseptör ve ligandın da etkili olduğu bulunmuştur.

Bu reseptör ve ligandların antijen sunan hücrelere ek olarak T hücreleri başka bir mekanizma ile uyardığı ve T hücre cevabının daha güçlü olmasına yol açtıkları keşfedilmiştir. 1990 yılında bu yolaklardan ilki yani "CD28/CTLA-4: CD80/CD86" kostimülasyon yolağı tanımlanmıştır (June et al. 1990). Daha sonra birçok in vitro çalışmada bu yolağın etkinliği kanıtlanmıştır (Damle et al. 1988; Tan et al. 1993). Bundan sonra tanımlanan kostimülatör yolaklarının sayısı artmış bunlar kendi içlerinde 4 ana gruba ayrılmış ve sırasıyla "CD28, indüklenebilir T hücre kostimülatör sistemi (ICOS), T lenfosit ilişkili protein 4 (CTLA-4) ve programlanmış

hücre ölümü proteini 1 (PD-1) olarak adlandırılmıştır. Bunların immünolojik toleranstaki etkinlikleri önce rat ve farelerde yapılan çalışmalarla gösterilmeye çalışılmış ve umut vaad eden sonuçların elde edilmesiyle birlikte insan olmayan primatlar üzerinde çalışmalara devam edilmiştir. Böylece immün sistem komponentleri daha açık ve anlaşılır şekilde ortaya konulmuş, bu gelişmelere uyan dönemlerde immün sistem komponentlerinin fonksiyonlarını yönetecek farmakolojik ajanların keşfi gündeme gelmiştir.

1.2.5 Allotransplantasyon farmakolojisinin tarihçesi

1.2.5.1 Ksenobiyotik ajanların tarihçesi

Ksenobiyotik ajanlar temel olarak immün yanıtta rol oynayan çeşitli hücre tiplerinin hücre içi moleküler mekanizmalarına müdahale ederler. Bunlar günümüzde de kullanılan kortikosteroidler ve kalsinörin inhibitörleri gibi farmakolojik ajanlardır. Bu ajanların allotransplantasyonların yaşayabilirliğini artırdığı 5. yüzyıldan itibaren bilinmektedir (Whitaker et al. 2008). Transplantasyon tarihçesinde yeni farmakolojik ajanların keşfi ise uzun dönemde transplantasyon başarısını artıran en önemli gelişme olmuştur.

1963 yılında bunlardan ilki Elion ve Hitchings tarafından geliştirilen 6-merkaptopürin (6-MP) ve Azotiopirin (AZA) olmuştur. Aynı yıllar içinde steroidler, AZA ve 6-MP allotransplantasyonlarda reddi önlemek için kullanılmaya başlanmıştır (Lance et al. 1971), (Doi 1979). Bu ajanların keşfi ve kullanımı ile birlikte SOT’da başarı oranı artırılmış fakat cilt içeren allotransplantasyonlarda aynı başarı elde edilememiştir.

1969 yılında ‘‘Tolypocladium inflatum’’ türü mantardan siklosporinin (SK) elde edilmesi transplantasyon farmakolojisine yapılmış en önemli katkılardandır.

SK'in keşfinin ardından böbrek transplantasyonu yapılan ve rejeksiyonu önlemek için SK uygulanan hastalarda özellikle akut rejeksiyonun önlenmesinde umut vaat eden sonuçlar elde edilmiştir (Canadian Multicentre Transplant Study 1983). Sonraki yıllarda mandibula ve arka bacak allotransplantasyonu yapılan deneysel modellerde SK kullanılmış ve akut rejeksiyonu geciktirdiği görülmüştür. 1970'li yılların başında primatlarda üst ekstremité allotransplantasyonunda SK kullanılması ile akut rejeksiyonun geciktirildiği fakat engellenemediği yönünde sonuçlar elde edilmiştir (Stark et al. 1987). Bunun üzerine uzun bir süre cilt içeren dokuların allotransplantasyonu üzerine yapılan çalışmalar sektöre uğramıştır.

1984 yılında Takrolimus keşfedilmiş ve FK506 olarak isimlendirilmiştir. 1995 yılında konvansiyonel immünsupresyon rejimlerine dirençli karaciğer ve böbrek nakli hastalarında kullanımı onaylanmıştır. Zamanla Takrolimusun diğer organ nakilleri ve greft versus host hastalığında (GVHD) kullanımının olumlu sonuçları olduğu keşfedilmiştir (Fung 2004). Günümüzde de allotransplantasyonların immünsupresif tedavi rejimleri içinde yerini almıştır.

Klinik olarak 1995 yılında MMF ve mikofenolik asit esterleri transplantasyon rejeksiyonunu önlemek için kullanılmaya başlanmıştır. MMF lenfositler üzerine olan sitostatik etkisi ile rejeksiyonun önlenmesinde ve tedavisinde yıllardır yoğun bir şekilde kullanılmaktadır.

Sirolimus (Rapamisin) 1975 yılında *Streptomyces hygroscopicus*'dan elde edildikten sonra 1996 yılında immünsupresif olarak ilk klinik uygulamaları başlamıştır (Kelly PA 1997).

Sonraki yıllarda yapılan SOT'da immünsupresif ilaçların yan etkilerinden kaçınmak amacıyla bu ilaçların kombinasyonlarını içeren rejimler kullanılmaya başlanmıştır. Takrolimus, MMF, Rapamisin bu kombine rejimlerin bir parçası haline

gelmiştir. Böbrek transplantasyonu hastalarında doku yaşayabilirliğini arttırmakta oldukça başarılı olan Tacrolimus+MMF+Kortikosteroidler KDA uygulamalarında rejeksiyonun önlenmesi amacıyla kombine tedavi rejimi olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bununla birlikte KDA’da da bu kombinasyonun kullanılması ile başarı sağlanmıştır (Francois et al. 2000).

1.2.5.2 Biyolojik ajanların tarihçesi

Biyolojik ajanlar ksenojenik moleküllerin aksine hücre içi moleküler mekanizmalara müdahale etmez direk hücre yüzeyindeki hedef moleküller üzerinden etkili olurlar.

Günümüzde allotransplantasyonlarda kullanılan immünsupresif ajanların başarısı yalnızca transplant rejeksiyonunun önüne geçmesi ile değil, toksisitesinin de az olması ile ölçülmektedir. Bu nedenle son yıllarda hem immünsupresyon sağlamada hem de rejeksiyonun engellenmesinde biyolojik ajanlar kullanılmaktadır. Bunlar; monoklonal antikorlar, poliklonal antikorlar ve füzyon proteinleri olarak sınıflandırılabilir.

1970’li yıllardan beri kullanılan poliklonal antikorlar (Anti-lenfosit ve anti-timosit immünglobulinler) bu özellikleri ile kullanılan en eski biyolojik immünsupresiflerdir. İlk kez 1980’lerde Byron Walkman deneysel bir cilt allotransplantasyonunda antilenfosit globulin kullanmıştır. Alıcıya karşı immünize olmuş deneysel modelden elde edilen IgG’ler ekstrakte ve pürifiye edildikten sonra “antilenfosit globulin” olarak alıcıya intraperitoneal yolla enjekte edilmiştir. Daha sonra vericiden alıcıya aktarılan cilt allogreftinin daha uzun süre yaşayabildiği gözlenmiştir. Bununla ilgili ilk klinik çalışma ise 1966 yılında Dr.Starzl tarafından yapılmıştır. Dr.Starzl transplantasyondan önce “antilenfosit globulin” enjeksiyonu

ile rejeksiyonu önlemeyi denemiştir. Bu çalışmanın başarıyla sonuçlanması rejeksiyon tedavisinde yeni bir çağın başlamasını sağlamıştır. Rejeksiyonun önlenmesinde; daha önce kullanılandan düşük dozda AZA ve steroidin ‘antilenfosit globulin’ ile kombine edilebileceği vurgulanmıştır (Starzl TE 1967).

1975 yılında Kohler ve Milstein tarafından fare hibridoma teknolojisinin geliştirilmesi ile birlikte ‘tedavi edici antikorların üretilmesi’ gündeme gelmiştir (Kohler and Milstein 1975). Fare hibridomaları bu antikorları üretmek için ilk kaynaklar olarak kullanılmıştır. Buradan elde edilen antikorların terapötik etkileri in vivo çalışmalarda gösterilmiştir (Cosimi et al. 1981; Meeker et al. 1985). Fakat fare proteinlerini içeren bu bileşenler insanda ksenosensitizasyona yol açmış ve kendileri de bir immün reaksiyona neden olmuştur. Bu da antikorların immünsupresif etkilerini azaltmıştır (Shawler et al. 1985). Daha sonra hümanize antikorları daha yoğun içeren kimerik yapılı monoklonal antikor olan Alemtuzumab (Campath) geliştirilmiştir. Alemtuzumab’ın transplantasyonda kullanım endikasyonu olmasa da güçlü immünsupresif etkileri ile bu alandaki kullanımını zaman içinde artmıştır. Alemtuzumab ilk kez 1998’de böbrek transplantasyonu yapılmış 13 hastada SK ile beraber sürdürme tedavisinde kullanılmış ve 2001 yılında Food Drug Administration (FDA) onayı olarak klinik kullanıma girmiştir. (Calne R 1998)

Halen CD3 antikorlu olan Muromonab (OKT3), humanize CD25 antikorlu olan Basiliximab, Daclizumab ve CD52 antikorlu olan Alemtuzumab klinik kullanımdadır.

1.2.5.3 Soluble füzyon proteinlerinin tarihçesi

Rejeksiyonun önlenmesinde kullanılabilen soluble füzyon proteinlerinden ilk tanımlananı Abatacept’tir. Abatacept CTLA-4 ile IgG1’in Fc fragmentinin

etkileşimini inhibe ederek, T lenfositleri aktive edecek kostimülatör sinyallerin oluşmasını önler. Bu molekül ilk tanımlandığında yapılan deneysel çalışmalar fare transplantasyon modellerinde rejeksiyonu önlemede etkin olduğunu göstermiştir. Fakat insan dışı primatlarda yapılan transplantasyonlarda iyi sonuçlar alınamamış ve Abatacept'in moleküler yapısında değişiklik yapılmıştır. Belatacept bu değişiklik sonucu elde edilen ikinci jenerasyon bir ilaçtır. Yapılan çalışmalar insan dışı primatlarda transplantın korunmasında etkin rol oynadığını göstermiştir (Larsen et al. 2005). Halen Abatacept ve Belatacept ile ilgili faz II ve III klinik çalışmalar devam etmektedir.

1.2.6 İmmüsupresif ilaçların yan etkileri

İmmüsupresif ilaçların zaman içinde birikmesinin; deri üzerine (atopik dermatit, alopesi, pannikülit, granülomatoz dermatit, hirsutizm, cilt kanserleri), gastrointestinal sistem üzerine (ağızda kuruma ve ülserler, ağızda mantar enfeksiyonları, şiddetli ishal, nefrotoksisite, yüksek kan lipit oranları, diyabet, gingival hipertrofi, besin alerjileri) nörolojik durum üzerine (baş ağrıları, tremor, konvülsiyon), psikiyatrik durum üzerine (duygudurum değişiklikleri, uyku problemleri), kardiyovasküler sistem üzerine (yüksek kan basıncı, yüksek kolesterol, anemi), ortopedik patolojiler üzerine (artrit, kemiklerde zayıflama) artan oranda negatif etkileri olmaktadır (Davies et al. 2007; Bennett et al. 1996; Pirsch et al. 1997)

Bu etkileri azaltmak amacıyla çoğu zaman immüsupresif ilaçların yanısıra; antibiyotik, antifungal, antiviral, anti-ülser ilaçlar ve diüretiklere ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun yanında bağışıklık baskılayıcı ilaçlar diyabet ve hipertansiyon gibi yaygın halk sağlığı problemlerini gidermek için alınması gereken bazı ilaçlarla da etkileşime girerek bunların tedavisini zorlaştırabilmektedir. Bazı besinlerle de

etkileşime girebilecekleri ve bu nedenle biyoyararlanım oranlarında değişiklikler olabileceği bilinmektedir. (Egashira 2003; Egashira et al. 2012)

Bu ilaçların gebelik ve emzirme durumlarında kullanılmaları risk teşkil etmektedir (Goldman 1997). Transplantasyon cerrahilerinden sonra hastaların %40'ı immünsupresiflerin neden olduğu enfeksiyon, %4-20'si ise maligniteler nedeniyle hayatlarını kaybedebilmektedir (Madani et al. 2008).

1.2.7. İmmünsupresif dozlarını azaltmada kullanılan yöntemlerin tarihçesi

İmmünsupresif ilaçların yan etkilerinden kaçınmak için immünsupresif etkinin azaltılmadan dozların azaltılması uzun yıllardır üzerinde çalışılan bir konudur.

1.2.7.1 Uygulama yolları değiştirilerek yapılan immünsupresif tedavi

Etkilerini nonspesifik immün sistem üzerinden göstererek sistemik yan etkilere neden olan immünsupresifleri daha lokal yollarla uygulayabilmek için topikal yolun kullanılması fikri 1951'lere dayanmaktadır. Buna dair ilk çalışma Billingham ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada "kortizon asetat" sistemik dozundan daha düşük dozda olacak şekilde cilt allotransplantı üzerine topikal olarak uygulanmıştır. Sonuçta bu uygulamanın cilt allogreftlerini yaşatmakta başarılı olduğu vurgulanmıştır (Billingham, Krohn, and Medawar 1951).

1960'lı yıllarda cilt üzerinden uygulama yapılamayacak olan SOT hastaları için yine lokal etkili bir yol geliştirilmiş ve transplanta yerleştirilen bir kalıcı arteriel katater yolu ile kortikosteroid ve antimetabolitler uygulanmıştır.(Kountz and Cohn 1969; Retik et al. 1966). 1970-80'li yıllarda lokal allogreft radyasyonunun etkinliği üzerine çalışmalar yapılmış ve greft yaşayabilirliğini desteklediği vurgulanmıştır (Gergely NF 1970), (Halperin EC 1984).

Cilt içeren dokuların allotransplantasyonunda topikal immünsupresyon uygulamaları daha akılcı bir yaklaşımdır. Bunun nedeni bu dokuların solid organlar gibi herhangi bir kavite içinde bulunmaması, sürekli gözlenebilir ve topikal ilaç uygulanmasına elverişli olmalarıdır. Başka bir neden ise bu dokuların solid organların aksine yüksek kan akımına sahip olmamaları ve uygulanan ilaçların temizlenme süresinin uzayarak biyoyararlanımlarının artmasıdır (Collins 1984).

Aynı mantık ile 1990'lı yılların sonunda Louisville'de ekstremité transplantasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda immünsupresiflerin etkilerini maksimuma çıkarmak ve yan etkilerini minimuma indirmek amacıyla hem topikal yoldan hem de implante edilebilir pompalar yardımıyla immünsupresif tedavi uygulanmıştır (Shirbacheh et al. 1998).

Bunun dışında ilaçlar metal partiküllere eklenerek sistemik olarak uygulanmış ve transplante edilmiş dokuların üzerine yerleştirilen magnetler yardımıyla bu dokularda birikmesi sağlanmıştır (Lubbe et al. 1996).

Topikal immünsupresyon uygulaması SOT'lar için uygulanabilir bir yöntem değildir. Bunun yerine bu hastalarda transplante edilen organın ana ya da yan arterlerine yerleştirilen kataterler yardımıyla aynı etki sağlanmaya çalışılmıştır. Fakat kataterin neden olduğu enfeksiyon ya da tromboz gibi komplikasyonlar zamanla bu yöntemin kullanımını azaltmıştır (Gruber 1992). Bundan sonra araştırmacılar sistemik olarak uygulanan immünsupresif ilaçların yalnızca hedef organlar üzerine lokal etki yapması için kullanılabilecek ajanlar geliştirmeye çalışmışlardır. Bu amaçla lipozomal teknolojiye yararlanılmıştır.

Lipozomlar, birçok farklı farmakolojik ajan ile yüklenebilen, belirli fiziksel ve biyolojik özelliklere sahip olan fosfolipid vezikülleridir. Lipozomlara farmakolojik

immünsupresif ajanlar eklenebilir. Bu bileşikler sistemik dolaşımdan retiküloendotelyal sistem (RET) tarafından temizlenir. RET'in en önemli komponenti olan karaciğer bu bileşikleri selektif olarak tutar. 1991 yılında lipozomal siklosporinle yapılmış bir çalışma bu bileşenin en çok karaciğer tarafından tutulduğunu kanıtlamıştır (Freise et al. 1991). Lipozomal siklosporin aerosolleri aynı etki mekanizması ile akciğer transplantasyonlarında da kullanılmaktadır.

Lokal immünsupresyon uygulamalarının dışında son yıllarda nispeten düşük toksisite ve güçlü immünsupresyon sağlamak için her biri farklı mekanizmalar üzerinden etki eden farklı immünosüpresif ilaçların düşük dozlarda uygulanması SOT'da yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bununla birlikte son yıllarda bazı el transplantasyon vakalarında bu kombine rejimler kullanılarak başarı sağlandığına dair çalışmalar yayınlanmıştır (Francois et al. 2000; Jones et al. 2000; Pei, Gu, and Yu 2000) Bu vakalarda Takrolimus, MMF ve kortikosteroidler kullanılarak başarılı sonuçlar elde edilmektedir. Kortikosteroidler özellikle el transplantasyonu yapılan hastalarda, kemik ve yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olduğundan; bunlarla kombine edilmeyen rejimler araştırma konusu olmuştur. Perez Abadia ve arkadaşları 2003 yılında ratlarda arka bacak transplantasyonu sonrası kombine tedavi olarak MMF ve Takrolimusu kullandıkları çalışmanın sonucunu sunmuşlardır. Bu çalışmada kortikosteroidler hiç kullanılmamış ve MMF+Takrolimus tedavisi uygulanan transplantasyon grubunda yaşayabilirliğin iyi oranlarda olduğu gösterilmiştir (Perez-Abadia et al. 2003).

1960'ların sonunda Baker ve arkadaşları lenfatik drenajın olmaması halinde allojenik cilt greftinin reddedilmediğini belirtmiştir (Barker and Billingham 1968). Böylece lenf nodlarının rejeksiyonda yeri olduğuna dikkat çekilmiştir. Zaman

içerisinde yapılan farklı çalışmlarda sekonder lenfoid organları olmayan farelerin vaskülarize organları ve cilt allogreftlerini reddetmediği gösterilmiştir (Lakkis et al. 2000). Böylece lenf nodlarına müdahale ile immün toleransın sağlanabileceği hipotezi ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. 2006 yılında Perez Abadia tarafından yapılan başka bir çalışmada, kimerik 2 fare türü arasında hem vaskülarize hem de non-vaskülarize lenf nodu transferi yapılmış ve vaskülarize lenf nodu transferi yapılan grupta GVHH geliştiği gözlenmiştir. Bu çalışma ile lenf nodlarının immün cevapları yönetmede etkin olduğu yeniden kanıtlanmıştır (Francois et al. 2006).

1.2.7.2 İmmüntolerans

Son yıllarda transplantasyonlardan sonra immünsupresyon ile immün sistemi baskılamak yerine immün sistemin eğitilmesi gündeme gelmiştir. Çeşitli yöntemlerle alıcının immün sistemine müdahale edilerek donör antijenlerine karşı bir cevapsızlık durumu geliştirilmeye çalışılmaktadır.

İmmüntoleransın en ideal şekli tamamen bir immunbaskılama olmaksızın alıcının immun sisteminin donöre özel tolerans geliştirmesi için yeniden programlanmasıdır. 1950’lerde Medawar tarafından bu durum “aktif olarak kazanılmış tolerans” olarak vurgulanmıştır. Birisi alıcı diğeri de vericiden olmak üzere, 2 farklı tür tavuk yumurta hücresi bir parabioz üzerinde birleştirilerek 2 türün de genetik komponentlerini içeren bir suş elde edilmiştir. Bu suştan taşınan cilt greftlerinin alıcı tavuklarda reddedilmediğinin görülmesi immüntoleransın ilk deneysel kanıtlarındandır (Hasek 1953)

Allotransplantasyonlarda immüntoleransın sağlanmasının 3 önemli avantajı vardır. Bunlardan ilki immünsupresyon ihtiyacını tamamen ortadan kaldırmak ya da düşük dozlarda immünsupresyon ile greft viabilitesini devam ettirebilmektir. Böylece transplantasyon cerrahilerinde en çok tartışılan konulardan biri olan immünsupresif tedavilerin akut ve kronik dönemde oluşturabileceği sistemik toksisitelerin önüne geçilmiş olur. İkincisi, her ne kadar akut dönemde rejeksiyonun olmaması transplantasyon başarısında önemli olsa da, kronik rejeksiyonun görülmesi başarısızlığın en önemli nedenlerindendir. İmmüntoleransın sağlanması ile kronik rejeksiyonun önüne geçilmiş olacaktır. Üçüncüsü ise immüntolerans özellikle SOT'da allojenik organ sayısının kısıtlılığı problemini ortadan kaldıracaktır. Allojenik organlardan çok daha agresif bir immün yanıtı neden olan ksenojenik organlar transplantasyonlarda kullanılabilecek böylece verici problemi ortadan kalkmış olacaktır (Sykes 2007).

Allotransplantasyonlarda immüntoleransı sağlanmanın 3 yolu vardır; bunlar T ve B lenfosit toleransını sağlamak, kostimülatör blokajı ve karışık kimerizmdir.

T ve B lenfosit toleransı: T lenfositlerde klonal delesyon, anergi ve supresyon yolu ile immüntolerans geliştirilebilmektedir. Klonal delesyon T lenfositlerin timüs içerisindeki gelişimleri sırasında donör kemik iliği hücreleri ile karşılaşarak bunların sunduğu antijenlere karşı tepki vermeyecek şekilde eğitilmesidir. Bu antijenlere yüksek afinite gösteren ve yüksek avidite ile bağlanan T lenfositler klonal delesyona uğrar ve periferik dolaşıma çıkamazlar. Böylece transplante edilen dokuda immünolojik bir reaksiyon başlatamazlar. Bu genel olarak sistemik tolerans olarak kabul edilir. Bu toleransın sağlanması için alıcı timusun belli aralıklarla verici hematopoetik hücrelerine maruz kalması istenir.

Bunun dışında periferik T lenfositlerin donör antijenlerine cevabını önleyen periferik tolerans şekli de mevcuttur. Bu da periferik dokuda matür T lenfositlerin donör antijenlerine maruz bırakılması ile gerçekleşir.

Kostimülatör blokajı: T lenfositlerin yabancı antijenle uyarıldıktan sonra çoğalmasını sağlayan sinyal yollarının blokajını içerir. Bu reseptör ve ligandlar tanımlandıktan sonra yapılan çeşitli in vitro ve in vivo çalışmalarda etkinlikleri gösterilmiştir. 2011 yılında böbrek transplantasyonlarında akut reddin önlenmesinde bir CTLA4-Ig füzyon proteini olan Belatacept (Nujolix®)'in klinik kullanımı için FDA tarafından onay verilmiştir. Fakat yüksek dozlarda kullanımı halinde lenfoproliferatif bozukluğa yol açmasından dolayı FDA onayı yalnızca yetişkin böbrek transplantasyonunda kullanılacak şekilde sınırlandırılmıştır.

Bugüne kadar kostimülatörler üzerinde yapılan çalışmalar bu moleküllerin immünsüpresiflere benzer şekilde yan etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Birçok avantajının bulunmasının yanı sıra akut rejeksiyon ve greft kaybını önlemede, ölüm oranını azaltmada klasik immünsüpresiflerle kıyaslandığında anlamlı bir farklılık görülmemiştir (Hugo Wéclawiak 2010). İmmünsüpresiflerin dozunu azaltmak, tedaviden tamamen çıkarabilmek adına kostimülatörlerle yapılan çalışmalar sadece belli endikasyonlarda başarılı olmuştur.

Karışık kimerizm: Bir diğer tolerans yöntemidir. Karışık kimerizm donör ve alıcı immün sistem hücrelerinin birbirine benzetilmesi anlamına gelir. 1952 yılında Anderson tarafından popularize edilmiş bir terimdir. Bunu sağlamanın yollarından biri alıcıya donörden kemik iliği nakli yapmaktır. Nakledilen kemik iliği sayesinde alıcıda donöre ait immün sistem hücreleri üretilir. Bu prosedüre makrokimerizm denir ve ilk kez 1953 yılında Medawar, Brent ve Billingham tarafından

tanımlanmıştır. Bununla ilgili ilk klinik çalışma ise Monaco ve ark tarafından 1976 yılında yapılmıştır (Monaco et al. 1976) Bu benzerlik oranının % 1 kadar bile olması güçlü bir toleransa neden olmaktadır (Ildstad and Sachs 1984). Bu yöntemin hayvan modellerinde toleransı indüklediği gösterilmiş olsa da yüz transplantasyonu yapılan bir hastada kullanımının toleransı indüklemediği bildirilmiştir (Prigozhina and Slavin 2004), (Monaco et al. 1976) (Kanitakis et al. 2006). Bu konuda hala tartışmaların olması bu yöntemin en azından KDA'ları açısından rutin hale gelmesinin önüne geçmiştir. Kimerizm sağlamak için kullanılan yöntemlerden bir diğeri ise mikrokimerizmdir. Burada donörden alıcıya bir pluripotent hematopoetik aktarım yapılmaz, hematopoetik sistem kaynaklı hücreler donör dokuda üretilir ve alıcının sistemik dolaşımına geçer. Dolayısıyla donöre ait tüm kemik iliği kök hücresi kaynaklı hücreler üretilmez, alıcının sistemik dolaşımında donöre ait daha az sayıda hücre bulunur. Bu olay, donör passenger lökositleri üzerinden gerçekleşir. 1968 yılında passenger lökositlerin (donör dendritik hücrelerinin) allograft reddindeki önemi vurgulanmıştır. Bu yöntemde aracı olan passenger lökositlerin allograft reddindeki önemi gösterilmiştir (Elkins and Guttman 1968). Mikrokimerizmde transplantasyon sonrası alıcı lökositleri ile vericinin passenger lökositleri etkileşir. Vericinin passenger lökositleri ilk etapta yoğun bir antijen yükü sağladığından alıcı lökositlerinde klonal bir yorulma meydana gelir ve donör spesifik bir tolerans meydana gelir. Özellikle böbrek ve karaciğer nakillerinde mikrokimerizm nakledilen dokuya immüntoleransı sağlanması için oldukça avantajlıdır. Bu yöntemde allograft reddine neden olan passenger lökositlerin transplantasyondan önce alıcı immün sistemine aktararak transplanta karşı verilecek immün sistem cevabının azaltılması amaçlanır.

Karışık kimerizm gelecekte daha da yaygınlaşırsa ve kendine ait komplikasyonları çözüme ulaştırılırsa immunsüpresif dozlarının azaltılması ve hatta bu ilaçların tamamen tedaviden çıkarılmasında etkin rol oynayabilir.

1.2.7.3 Transplantasyonda kök hücrelerin kullanımı

Son yıllarda immünolojik toleransı sağlamada tanımlanmış standart tedavi yöntemlerinin dışında yeni bir öneri olarak kök hücre çalışmaları yapılmaya başlanmıştır. Buradaki amaç kemik iliği kök hücrelerinin mikst kimerizmi sağlamak amacıyla kullanılmasının ötesinde kök hücrelerin immünmodülatör etkisinden faydalanmaktır.

1.2.8 Kök hücreler

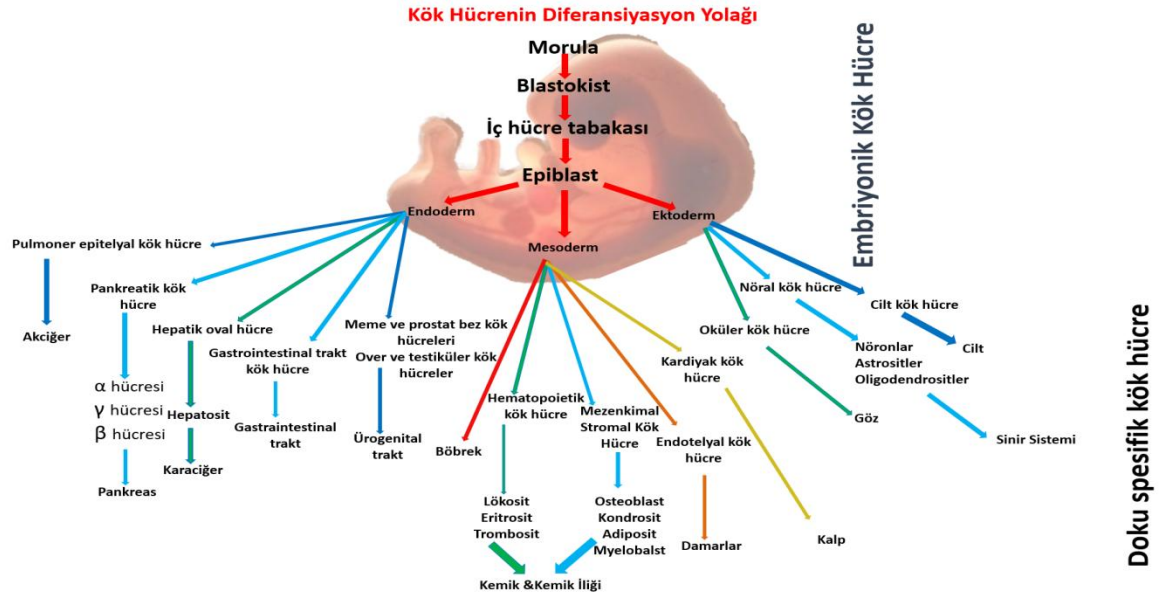
Kök hücreler uygun ortam sağlandığında çoğalabilen, kendisini ve hasarlı dokuları tamir edebilen, menşei olan dokuyu tamamen yeniden oluşturabilen ve en az bir hücreye farklılaşabilen hücre tipleridir (Can 2008). İlk kez mürin blastokistlerinin içinden bir küçük hücre grubu olarak elde edilmişlerdir (Evans and Kaufman 1981).

Kök hücreler farklılaşma kapasitelerine göre totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent olarak beş gruba, kaynağına göre ise embriyonik ve embriyonik olmayan kök hücreler olarak iki gruba ayrılırlar (Hedrick MH 2003). Embriyonik olmayan kök hücreler; erişkin kök hücreleri, fetüs kök hücreleri, kadavradan elde edilen kök hücreler, göbek kordonu ve plasenta kaynaklı kök hücrelerdir (Alp 2014).

1.2.8.1 Kök hücre türleri

Embriyolojik gelişim esnasında farklı evrelerde çeşitli kök hücreler rol oynamaktadır. Totipotent kök hücreler, erken embriyonik dönemde (1-3 gün) oluşan ve her hücreye farklılaşma yeteneği olan hücrelerdir. Pluripotent kök hücreler, embriyonun blastokist aşamasında (5-14 gün) oluşup ektoderm, endoderm ve mezoderm gibi her üç germ tabakasına ve 200'den fazla hücreye de farklılaşma yeteneği bulunan kök hücrelerdir. Multipotent kök hücreler ise fetal dokulardan, kordon kanı ya da erişkin insan dokularından elde edilebilen hücre tipleridir. Oligopotent kök hücreler, hematopoetik kök hücreler gibi kendini yenileme kapasitesine sahiptir ve gerektiğinde iki veya daha fazla hücre tipine farklılaşabilen hücrelerdir. Unipotent kök hücreler ise yalnızca 1 hücre tipine yani kendilerine diferansiye olabilen hücrelerdir (Kolios and Moodley 2013) (**Şekil 1.1**).

Erişkin kök hücreler dokularda dormant (uyur) halde bulunan ve uygun ortam sağlanarak aktive edildiğinde bulunduğu dokuya ait hücreleri oluşturma yeteneğine sahip olan hücrelerdir. Hematopoetik ve mezenkimal kök hücreler klinik pratikte oldukça sık kullanılan erişkin kök hücrelerdir. Bunun dışında kas-iskelet, kalp-damar, sinir, sindirim sistemi, epitel doku, testis ve ovaryum kök hücreleri diğerk unipotent erişkin kök hücre tipleridir.



Şekil 1.1: Embriyonik ve erişkin kök hücreler ve bunlardan farklılaşabilen organ ve dokular görülmekte

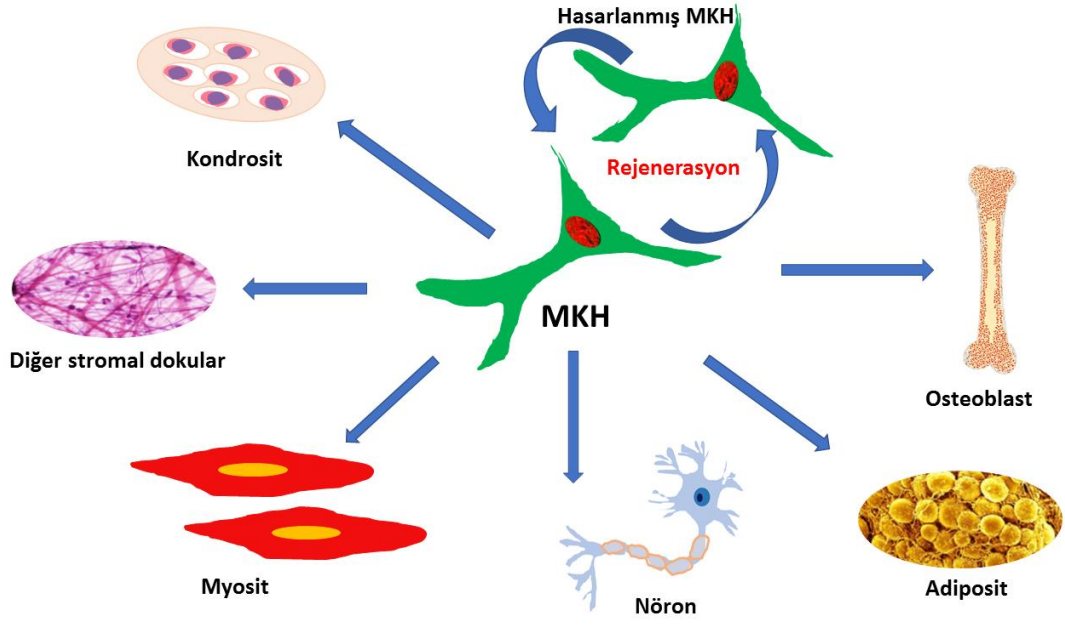
1.2.8.1.1 Hematopoietik kök hücreler

Kemik iliğinde ve dolaşımda bulunan CD34 yüzey belirtecine sahip hücrelerdir. Kök hücrelerin tanımına uygun olarak, hematopoietik kök hücre (HKH) in vivo olarak kendi kendini yeniler, tüm olgun kan elemanlarına farklılaşır ve fonksiyonel olarak tamamen miyeloablasyon yapılan bir alıcının tüm hematopoietik sistemini çoğaltabilir (Can 2008). Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler (Kİ-MKH) şu ana kadar birçok çalışmada kullanılmıştır (Bianco et al. 2001; Arnous, Mozid, and Mathur 2011; Bhansali et al. 2014; Reinders et al. 2013). Fakat kullanımı her zaman önerilmez; çünkü kemik iliği aspirasyonu invaziv bir işlemdir, ağrılıdır, enfeksiyon ve donör alan morbiditesine neden olabilir. Ayrıca donör yaşına bağlı olarak bu hücrelerin proliferasyon ve farklılaşabilme özellikleri değişebilir (Stenderup et al. 2003; Hass et al. 2011).

1.2.8.1.2 Mezenkimal kök hücreler

Mezenkimal kök hücreler (MKH) stromal dokuların ana hücreleri olup, bu dokularda dormant (uyur) halde yaşarlar. İlk kez Friedenstein ve ark. tarafından 1970 yılında fare kemik iliği stromasının başka bir dokuya nakledilmesi ve burada bu hücrelerin kendi türünden farklı mezenkimal hücrelere dönüşebildiğinin gösterilmesi ile keşfedilmişlerdir (Friedenstein, Chailakhjan, and Lalykina 1970). Daha sonra Pittenger ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada bağ doku kaynaklı bu hücreleri invitro ortamda adiposit, kondrosit ve osteoblasta farklılaştırmışlar ve bu hücrelere MKH demişlerdir (Pittenger et al. 1999) (Şekil 1.2). Oldukça fazla kök hücre türü olduğundan dolayı MKH'lerin diğerlerinden ayırt edilebilmesi için 2008 yılında Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (ISCT) bazı kriterler yayınlamıştır. Bunlar;

- a) Plastik yüzeye tutunabilmeleri,
- b) b) Yüzeylerinde CD105 (SH2), CD73 (SH3/4) ve CD90 gibi belirteçleri eksprese ederken; CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79, CD19 ve HLA-DR gibi hematopoetik belirteçleri eksprese etmemeleri,
- c) c) Osteojenik, kondrojenik ve adipojenik seriye farklılaşabilmeleri (Dominici et al. 2006)



Şekil 1.2: Mezenkimal kök hücrelerin multipotent özellikleri

Mezenkimal kök hücrelerin kullanım alanları

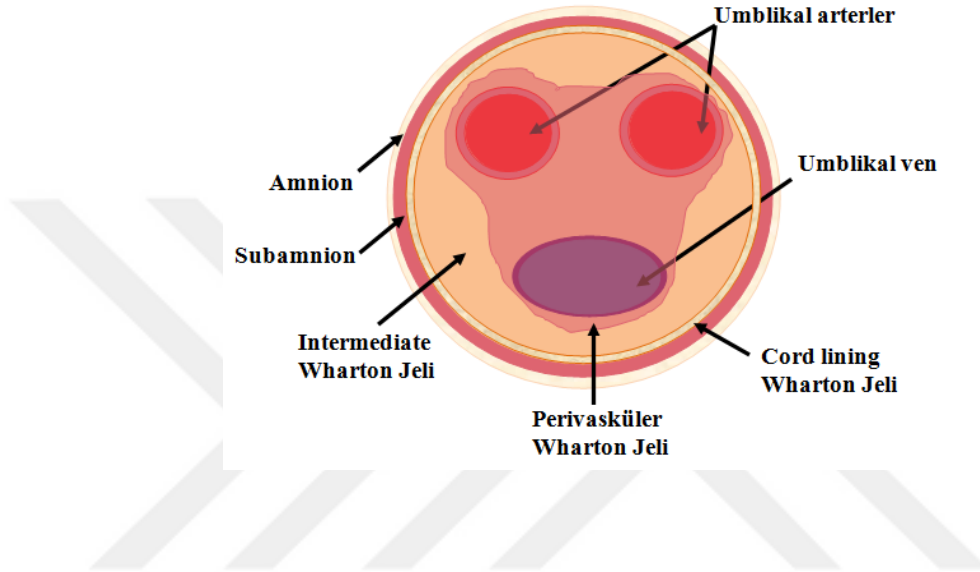
Mezenkimal kök hücreler farklı hücrelere dönüşüm kapasitesinin yanında birçok büyüme faktörü ve sitokinler üretirler. Bu özellikleri ile 1990 yılından beri çeşitli klinik çalışmalara konu olmuş ve hangi hastalıklarda kullanılabilecekleri üzerine yoğun araştırmalara başlanmıştır. Halihazırda MKH'lerin kullanım alanları **Tablo 1,1**'de özetlenmiştir.

Tablo 1.1: MKH’lerin kullanım alanları ve etki mekanizmaları

Kullanıldığı Patolojiler	Etki Mekanizmaları
Graft Versus Host Hastalığı	İmmünmodülatör etki ile Graft Versus Host Hastalığına neden olan asıl hücreler olan T lenfositlerin proliferasyonunu baskırlar.
Kronik ve inflamatuvar gastrointestinal hastalıklar (Crohn ve Ülseratif Kolit)	Epitelizasyonu güçlendirmesi ve antiinflamatuvar etkileri ile, lokal enjekte edilebilir olması kullanım kolaylığı sağlamaktadır
Eklem yüzeyi ya da kıkırdak içeren dokularda meydana gelen travmatik ya da inflamatuvar kıkırdak hasarları	İmmünmodülatör ve Rejeneratif özellikleri ile
Bağ dokunun genetik kodlamasında bozukluk nedeniyle gelişen konjenital hastalıkların tedavisinde (Osteogenezis imperfecta, vs)	Rejenerasyon ve farklılaşma kapasiteleri ile
Yara iyileşmesi	Salgıladığı büyüme faktörleri ve sitokinler ile oluşan rejenerasyon kapasitesi
Yağ grefti yaşayabilirliğinin desteklenmesi	Salgıladığı büyüme faktörleri ve sitokinler ile oluşan rejenerasyon kapasitesi
Yüzde oluşan kemik defektlerin giderilmesi	Rejenerasyon ve farklılaşma kapasitesi ile
Kardiyak olaylar	MKH’in farklılaşma kapasitesi ile myositlere dönüşümü ve anti-inflamatuvar özellikleri ile
Nörolojik Hastalıklar (Travmatik omurilik yaralanması, Parkinson, Amiyotrofik Lateral Skleroz, Multipl Skleroz)	Rejenerasyon ve farklılaşma kapasiteleri ile
Karaciğer sirozu, hepatit, son dönem karaciğer hastalığı	Antiinflamatuvar, rejenerasyon ve farklılaşma kapasiteleri ile
Tip 1 diyabet	Farklılaşma kapasiteleri ile
Organ nakillerinde, rejeksiyonun engellenmesi için indüksiyon ve sürdürme tedavilerinde kullanılmaktadır.	İmmünmodülasyon ve immünsupresiflerin yaptığı end organ toksisitesinin azaltılmasında da rejeneratif özellikleri ile

Umblikal kord mezenkimal kök hücre (Wharton jeli mezenkimal kök hücre /stromal hücre)

Umblikal kord (UK) bir muköz bağ doku (Wharton jeli) içine gömülü 2 adet arter ve 1 adet ven içermektedir. (Şekil 1.3) Umblikal kordun çevresinde tüm bu yapıları çevreleyen tek katlı amniotik epitel hücreleri bulunur (Fernanda Vieira Paladino 2019).



Şekil 1.3: Umblikal kord'un yapısı

İlk kez 1991 yılında, McElreavey ve arkadaşları tarafından bir insan umblikal kordunun Wharton jelinden “fibroblast benzeri hücreler” olarak izole edilmişlerdir. UK doğumu takiben tıbbi atık olarak kabul edilir ve uygun şartlarda imha edilir. UK hücre kaynağı olarak kullanılmak istendiğinde gerekli izinler alınarak, invaziv bir işleme gerek kalmaksızın kolayca temin edilir. Oldukça zengin bir MKH kaynağı olduğundan UK'un UK-MKH elde etmek için değerlendirilmesi oldukça mantıklı bir yaklaşımdır. UK-MKH'leri 4 farklı UK kompartmanından elde edilebilir;

1) Tüm UK-MKH: Kök hücre elde etmek için umblikal kordun bir bütün halinde işleminden geçirilmesi ile elde edilir.

2) Umblikal Kord Wharton Jeli MKH (WJ-MKH), Umblikal Arter MKH (UA-MKH), Umblikal Ven MKH (UV-MKH): WJ-MKH umblikal arter ve venler UK'dan ayrıldıktan sonra elde edilen MKH'dir. UA-MKH ve UV-MKH umblikal arter ve venin kültüre edilmesi ile elde edilir.

3) UK yüzeyi ve subamnion kaynaklı MKH: UK'nin subamnion bölgesinin lining membranından ayrıldıktan sonra MKH üretimi için kültüre edilmesiyle elde edilir.

4) İnsan umblikal kord perivasküler MKH: UK'dan izole edilen umblikal arter ve venlerin her iki ucu loop şeklinde birleştirilerek enzimatik solüsyona aktarılır ve burada perivasküler hücrelerin arter ve ven çevresinden ayrılması beklenir. Bu hücrelerin toplanarak kültüre edilmesi ile insan umblikal kord perivasküler kök hücreleri oluşur. Tüm UK ya da sadece bazı kompartmanlarından elde edilen UK-MKH'in proliferasyon, farklılaşma ve immüsupresyon kapasitelerinin birbirinden farklı olup olmadığı hala tartışmalıdır (Tokiko Nagamura-Inoue 2014).

ISCT'nin UK-MKH'leri tanımlamakta kullandıkları özellikler diğer MKH'ler ile aynıdır fakat elde edildiği UK kompartmanına göre UK-MKH belirteçleri arasında fark olabilir.

UK-MKH'lerin bazı özellikleri onu diğer MKH'den üstün kılar. Örneğin Kİ-MKH'ye göre kendisini daha hızlı yeniler, gen profili embriyonik kök hücrelere daha çok benzer ve daha yüksek çoğalma kapasitesine sahiptir (Hsieh et al. 2010; Marino et al. 2019). Bunun yanında osteojenik ve adipojenik dokuya dönüşme kapasiteleri Kİ-MKH kadar iyi değildir (Hsieh et al. 2010). Kondrojenik dokuya farklılaşma konusunda ise UK-MKH'lerin daha iyi olduğu düşünülmektedir.

UK-MKH'ler allojenik transplantasyonlardan kaynaklı bir immünolojik reaksiyona neden olmazlar. Bu durum, UK-MKH'nin diğer MKH'lerde de mevcut olan HLA Sınıf I molekülleri daha az içermeleri ve HLA-DR'yi hiç içermemeleri ile ilgilidir. Ek olarak regülatuar T lenfositlerin (Treg) sayısını artırarak alloantijenlere karşı immün cevabı azaltırlar. Kİ-MKH'den farklı olarak bol miktarda tolerojenik interlökinler salgılar (IL-10, Transforming growth faktör- β). Aynı zamanda IL-6 ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) eksprese ederler. UK-MKH'ler hem soluble faktörler salgılayarak hem de hücre-hücre kontağı ile immünsupresif etkiler gösterebilirler (Marino et al. 2019). PGE2, galectin-1, HLA-G5 gibi moleküller bu immünsupresif etkiye aracılık eden faktörlerdir. Bunlar arasında 2-3 dioksijenazın (IDO) çok önemli bir yeri vardır. Bu enzim ortamdaki IFN-gama tarafından aktive edilir ve ortamdaki triptofanın kinürenine dönüşümünü artırır. Ortamda miktarı azalan triptofan T lenfosit çoğalmasını baskılar ve UK-MKH'lerin T lenfositler üzerine olan etkileri bu yolak üzerinden ortaya çıkar (Prasanna et al. 2010). Bunlara ek olarak eşsiz bir özelliği de HLA- G6'nın izoformlarını eksprese etmesidir. Şu ana kadar yapılan çalışmalar ile UK-MKH'lerin B lenfositler üzerinde etkisi olup olmadığı netlik kazanmamıştır (Che et al. 2012; Ribeiro et al. 2013). Kİ-MKH'ne benzer şekilde UK-MKH'de otojen ve allojenik kullanıma uygundur. **Tablo 1.2'**de UK-MKH'nin en sık kullanılan diğer iki kök hücre (Kİ-MKH, Yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler: ASCs) ile benzer ve farklı yönleri özetlenmiştir.

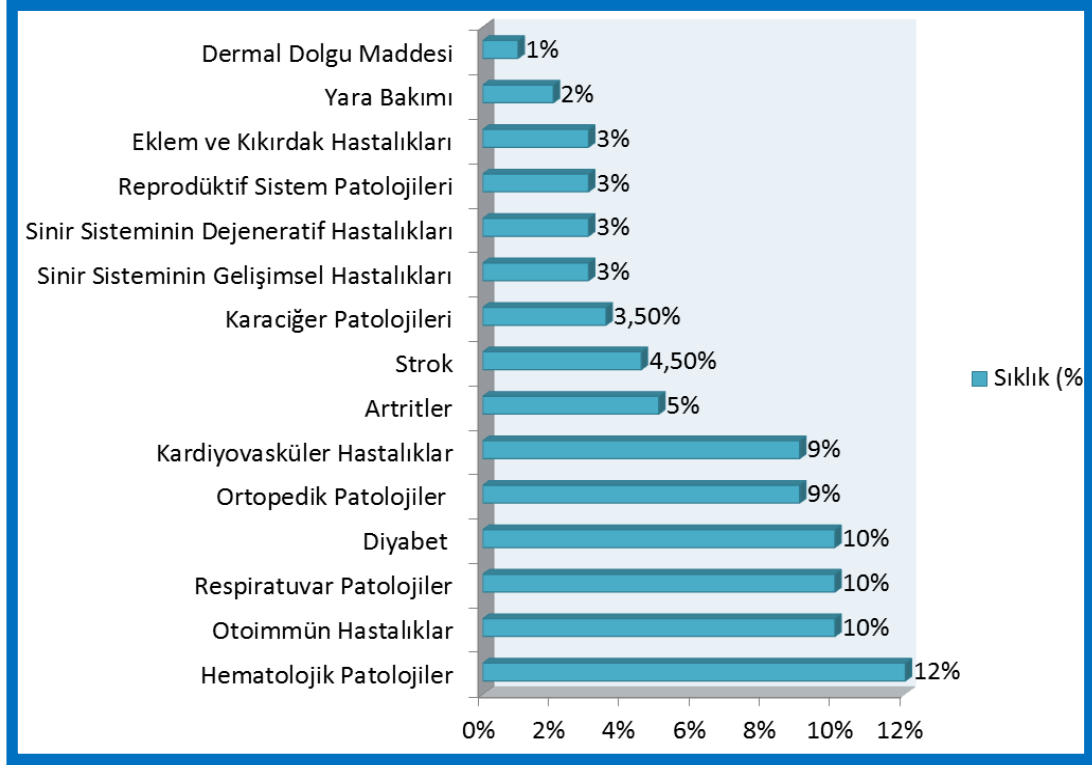
Otolog UK-MKH genetik hastalıkların gen terapisinde, serebral palsi tedavisinde, hipoksik beyin hasarı gibi patolojilerin tedavisinde rejeneratif ve anti-inflamatuar etkileri ile kullanılmıştır (**Grafik 1.1**).

Tablo 1.2: UK-MKH'nin sık kullanılan diğer mezenkimal kök hücre kaynakları ile karşılaştırılması.

Özellikleri	UK-MKH	Kİ-MKH	ASCs
Elde edilmesi	Non -invaziv	İnvaziv	İnvaziv
Elde edilmesi sırasında ağrı	Yok	Ağrılı	Az ya da orta derecede ağrılı
Donörde oluşan morbidite	Risk yok	Orta düzeyde riskli	Az ya da orta düzeyde riskli
Kaynak	Fetus kaynaklı	Erişkin kaynaklı	Erişkin kaynaklı
In vitro çoğalma	Yüksek derecede	Orta derecede	Orta derecede
In vitro büyüme	Daha hızlı	Daha yavaş	Daha hızlı

Transplantasyonlardaki kullanımına dair çalışmalar son yıllarda yapılmaya başlanmış ve ilk olarak akut ve kronik GVHH tedavisinde kullanılmıştır (Can, Celikkan, and Cinar 2017). GVHH hematolojik malignansilerde ya da hastalıklarda kemik iliğinin myeloablatif ya da nonmyeloablatif yöntemlerle baskılanması sonrası yeni bir kemik iliği hücre kolonisi oluşturmak üzere başka bir donörden Kİ-MKH'lerin alıcıya aktarılmasıdır. Bu kök hücre transplantasyonu ile beraber donörün T lenfositleri de alıcıya geçer ve burada güçlü bir antijenik cevap oluşturur. Akut ya da kronik olarak farklı semptomlar ile prezente olabilir. Önemi ise yüksek derecelerde mortalite ihtimalini de yükseltmesidir. Akut ve kronik GVHH'nın tedavisinde kortikosteroidler kullanılmaktadır; fakat hastaların bazıları bu tedaviye direnç göstermektedir. Bu yüzden özellikle steroide dirençli hasta grubunda kullanılmak üzere son yıllarda başvuru alan tedavi yöntemlerinde birisi UK-MKH uygulamalarıdır.

Grafik 1.1: UK-MKH'lerin kullanıldığı patolojiler ve kullanım sıklıklarını gösteren grafik



UK-MKH bu amaçla 2011 yılında 2 pediatrik hastada steroid tedavisine dirençli

GVHH'nın tedavisinde kullanılmıştır (Wu et al. 2011). Daha sonra birçok çalışmada akut ya da kronik GVHH'nın tedavisinde kullanılmıştır. Bu çalışmalarda uygulanan ortalama en düşük ve en yüksek dozlar $5,18-5,27 \times 10^6$ /kg ($0,5 \times 10^6$ /kg - 8×10^6 /kg) idi (Wu et al. 2011; Boruckowski et al. 2016; Wu et al. 2015; Wu et al. 2013; Chen et al. 2012; Qiao et al. 2013; Zheng et al. 2015; Gao et al. 2016). Bu çalışmaların birçoğunda özellikle steroid tedavisine dirençli GVHH'da UK-MKH tedavisinin anlamlı olduğu bildirilmiştir. Organ ya da KDA'da kullanımı ile ilgili ulaşılabilen literatür çalışması bulunmamaktadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda deney hayvanlarının tüm cerrahi işlemleri, bakımları ve izlemleri Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Etik Kurulunun onayı (2018-46, Bkz. Ek A) alınarak Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi, Konya, Türkiye’de gerçekleştirildi. Tüm çalışma boyunca laboratuvar hayvanlarının bakım ve kullanımı ‘‘Deney Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı İçin Sağlık Rehberi Ulusal Enstitüsü (National Institute of Health Guide for the care and use of laboratory animals)’’ kurallarına uygun olarak yapıldı.

2. 1. Deney Hayvanları

2. 1. 1. Deney hayvanlarının temini ve bakımı

Çalışmada donör olarak 10 adet, 4-6 haftalık, 30-40 gram ağırlığında, erkek ‘‘ inbred C57BL/6’’ ve alıcı olarak 40 adet benzer özelliklerde ‘‘inbred Balb/c’’ fareler kullanıldı (Şekil 2. 1 ve Şekil 2. 2). Tüm fareler Kobay Deney Hayvanları A.Ş., Ankara, Türkiye’den temin edildi.



Şekil 2. 1: Cilt allogreftlerinin alıcısı olarak kullanılan Balb/c fare



Şekil 2. 2: Cilt allogreftlerinin donörü olarak kullanılan CD57BL/6 fare

Fareler konvansiyonel polikarbon kafeslerde (Tecniplast, Varese, Italy) zemin materyali olarak kaba çam talaşı kullanılarak muhafaza edildiler. 1 fare 1 kafeste olacak şekilde, sabit sıcaklık (24 °C) ve sabit nemde (%45), 12 saat gündüz ve 12 saat gece siklusunda, gürültüden ve titreşim yaratacak cihazlardan uzak odalarda barınma sağlandı. Pelet yem ve su ile ad libitum (yiyebildiği kadar) beslendiler.

Çalışma başlamadan önce Selçuk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama merkezi veteriner hekimi tarafından yapılan değerlendirmede farelerde malnütrisyon, enfeksiyon ve açık yara gibi bulguların yanı sıra başka bir sağlık problemini işaret edecek herhangi bir bulguya rastlanmadı. Cerrahi işlem öncesi profilaktik antibiyoterapi uygulanmadı. Tüm farelerde cerrahi işlemler genel anestezi altında yapıldı. Tüm işlemler veteriner hekim gözetiminde yapıldı. İşlem sonrası fareler bakım ortamlarına alınarak rutin bakımları yapıldı. Sıvı kaybı olduğu

düşünülen farelere vücut ağırlıklarına uygun dozlarda %0,9'luk serum fizyolojik (Polifleks, Polifarma, İstanbul, Türkiye) subkutan olarak uygulandı.

2. 1. 2 Transplante edilecek dokunun, transplantasyon yönteminin ve kullanılacak deney hayvanlarının seçimi

Allogreft rejeksiyon mekanizmalarını incelemek ve önlemek, kronik dönemde tolerans geliştirmek, immüsupresif rejimlerin rejeksiyon üzerindeki etkisini değerlendirebilmek için çok sayıda hayvan modeli geliştirilmiş olmasına rağmen fare kullanılarak hazırlanan deney modelleri bu çalışmaların temelini oluşturmaktadır. Bunun nedeni rejeksiyonda, toleransta, immüsupresyonda yer alan antikorların farelerde iyi tanımlanmış olması ve birçok inbred ve transgenik fare soyunun bulunmasıdır (Brandacher et al. 2012).

Inbred (akrabalı yetiştirme, kendileme) fare soyu elde edebilmek için aynı aileden kardeşler çiftleştirilir. Erkek ve dişi tam kardeşlerin çiftleştirilmesinden birbirleri ile yakınlık derecesi %25 olan fareler elde edilir. Bu çiftleştirme işlemi kardeşler arasında ardışık olarak 20'ye ulaştırılırsa buradan meydana gelen fareler genetik açıdan bir örnek kabul edilir (Casellas 2011). Aralarında doku transplantasyonu yapılacak 2 tür fare kendi içlerinde eş genetik koda sahip olur ve böylece genetik farklılık problemi ortadan kaldırılmış olur. Bu çalışmada kullanılan Balb/c ve CD57BL/6 türü fareler inbred suşlar olup her iki grup kendi içinde eş genoma sahiptir.

Transplantasyon çalışmalarında cilt allotransplantasyon uygulanması kolay ve dışarıdan izlenebilir olması açısından oldukça kullanışlıdır. Cilt içerdiği lenfatik kanalların yoğunluğu ve immünitesi nedeniyle rejeksiyona oldukça açık bir dokudur. Daha önce kemirgenler üzerinde yapılmış deneysel çalışmalar organ

transplantasyonları ile cildin immünolojik reaksiyon gücünü karşılaştırmış ve bu dokuların tolere edilebilme potansiyellerinin **karaciğer > kalp > böbrek > pankreas ada hücreleri > cilt** şeklinde olduğunu bildirmişlerdir (Lechler et al. 2005). Dolayısıyla yeni immünsupresif rejimlerin denenmesi açısından cilt uygun bir tercih olmaktadır. Bu yüzden çalışmamızda cilt allogrefti modeli tercih edilmiştir.

Fare çalışmalarında allotransplante edilecek cildin antijenitesini etkileyen birçok faktör vardır. Bunlardan en önemlileri cilt allogreftinin elde edildiği anatomik bölge ve allogreftin büyüklüğüdür.

Fare cilt grefti modellerinde greftin elde edilebileceği üç ana donör bölge vardır. Bunlar; kulaklar, gövde-kuyruk ve sırt cildidir. Donör bölgelerine göre cilt greftlerinin ortaya çıkardığı immün yanıt değişmektedir (Matsuo 2007). Kulak ve sırt cildi daha güçlü bir immünolojik yanıt ortaya çıkarmaktadır (Larsen et al. 1990) Bu nedenle bu çalışmada sırt cildinin kullanılması tercih edilmiştir.

Peter Medawar tarafından 1944 yılında yapılmış çalışmada cilt grefti miktarının da immünolojik yanıtı etkilediği vurgulanmıştır (Medawar 1944). Bu yüzden bu çalışmada allogreftlerin çap farklarından kaynaklanabilecek immünolojik yanıt farklılıklarını ortadan kaldırmak için Thuy L ve ark tarafından yapılan çalışmada olduğu gibi greft alımında 10 mm'lik delici (punch) kullanılmıştır (Thuy L. Phung 2017).

Çalışmamızda minör histokompatibilite farklılıklarından kaçınmak için farelerin tümü aynı cinsiyetten seçildi. Erkek farelerin kullanılmasının dezavantajı saldırganlığa bağlı cerrahi alanın yaralanması olmasına rağmen bunu önlemek için çalışmamızda cilt greftleri interskapuler bölgeye koyuldu ve farelerin her biri ayrı kafeslerde muhafaza edildi. Böylece farelerin hem birbirlerine zarar vermesi

engellendi hem de cilt greftleri ulaşamayacakları bir anatomik bölgeye koruyucu bariyer eşliğinde yerleştirildi.

Allogreftin stabilizasyonu için aralıklı atılan büyük çaplı sütürlerin ve yapıştırıcıların başarısız olduğu düşünülmektedir. Ayrıca emilebilen sütürlerin etrafında oluşan inflamatuvar reaksiyon greftin histopatolojik değerlendirmesinde yanlıgılara neden olabileceğinden tercih edilmemesi gerektiği vurgulanmıştır (Pakyari et al. 2016). Bu nedenle çalışmamızda cilt allogreftleri alıcı alana 7.0 polipropilen sütür (Prolene®, Ethicon Ltd, Edinburgh, UK) ile devamlı olarak suture edildi.

2. 2 Deney Gruplarının Belirlenmesi

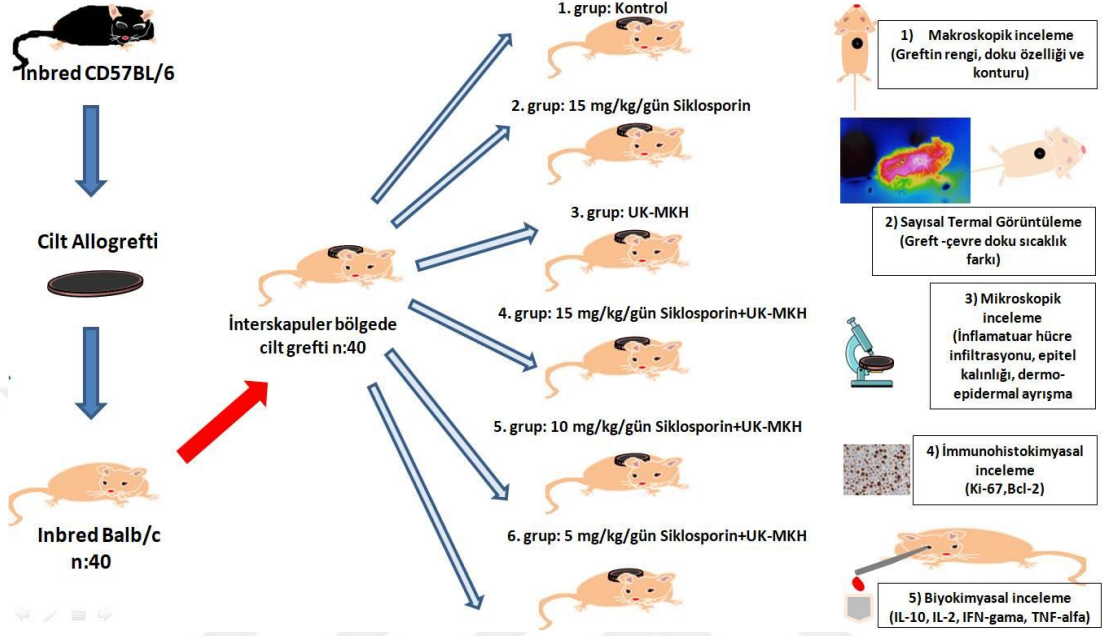
Çalışmada 50 adet fare kullanıldı. Bunların 10 tanesi cilt allogrefti donörü olan CD57BL/6 farelerdi. 40 tanesi ise alıcı Balb/c farelerdi. CD57BL/6 farelerin sırt cildinden alınan cilt allogreftleri Balb/c farelerin sırtında oluşturulan aynı büyüklükteki tam kat defekt alanına taşındı. Balb/c fareler greftlendikten sonra random olarak 6 gruba ayrıldı.

Grup 1 (n:5): Cilt allogrefti transplante edildi. Kök hücre ya da immüsupresif tedavi uygulanmadı.

Grup 2 (n:7): Cilt allogrefti transplante edildi. **15mg/kg/gün** Siklosporin-A subkutan uygulandı.

Grup 3 (n:7): Cilt allogrefti transplante edildi. 0. gün 5.7×10^6 hücre/kg ve 3. günde 10.3×10^6 hücre/kg UK-MKH paraspinal kaslara intramusküler (IM) uygulandı.

Grup 4 (n:7): Cilt allogrefti transplante edildi. **15 mg/kg/gün** Siklosporin-A subkütan; 0. gün 5.7×10^6 hücre/kg ve 3. günde 10.3×10^6 hücre/kg UK-MKH IM uygulandı.



Şekil 2.3: Deney protokolü ve değerlendirme kriterlerinin özeti

Postoperatif 4. günde tüm greftler açıldı. Deney sonuna kadar tüm greftler makroskopik olarak gözlemlendi. 1 gün ara ile yapılan termal görüntülemelerle greft yaşayabilirliği değerlendirildi. Rejeksiyon reaksiyonunun maksimum olduğu 10. günde biyokimyasal değerlendirme için farelerden kan, histopatolojik değerlendirme için greftlerden biyopsi alındı. Deney sonuna kadar makroskopik gözlem ve termal kamera görüntülemesine devam edildi. Deney sonunda sistemik yan etkileri değerlendirmek için tüm farelerden karaciğer ve böbrek biyopsileri alındı (Şekil 2.3)

2. 3. Umbilikal Kord Mezenkimal Kök Hücrelerin Elde Edilmesi

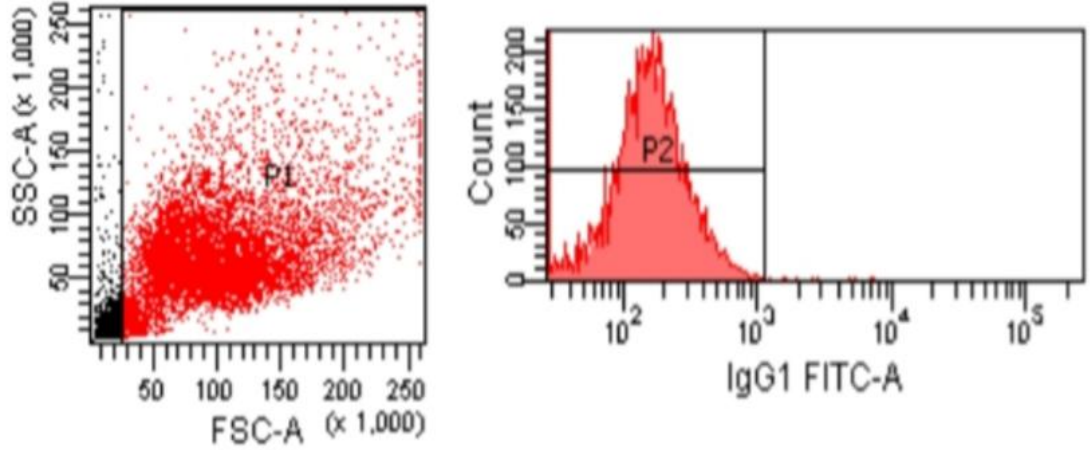
UK-MKH'nin KI-MKH'den bir farkı da UK'dan elde edildiklerinde kullanılabilecek kadar sağlıklı olup olmadığının anlaşılamamasıdır. Yenidoğan

UK’undan elde edilen WJ-MKH’nin kullanılabilmesi için bebeğin tamamen sağlıklı ve full term’de doğmuş olması gereklidir. Doğum ile amniotik membranın yırtılması arasında 18 saatten daha uzun süre olmamalı, anne gebeliği boyunca en az 2 kez rutin doktor kontrolünden geçmiş olmalı ve bu kontrolleri normal olmalıdır. Doğum sırasında ateş ya da enfeksiyon ile karşılaşılmamış olmalı ve maternal serumdan yapılan hemoglobin elektroforezi, viral ya da paraziter hastalıkları analiz eden serolojik testlerin doğumdan önce yapılmış ve sonuçlarının normal olması gereklidir (Fernanda Vieira Paladino 2019).

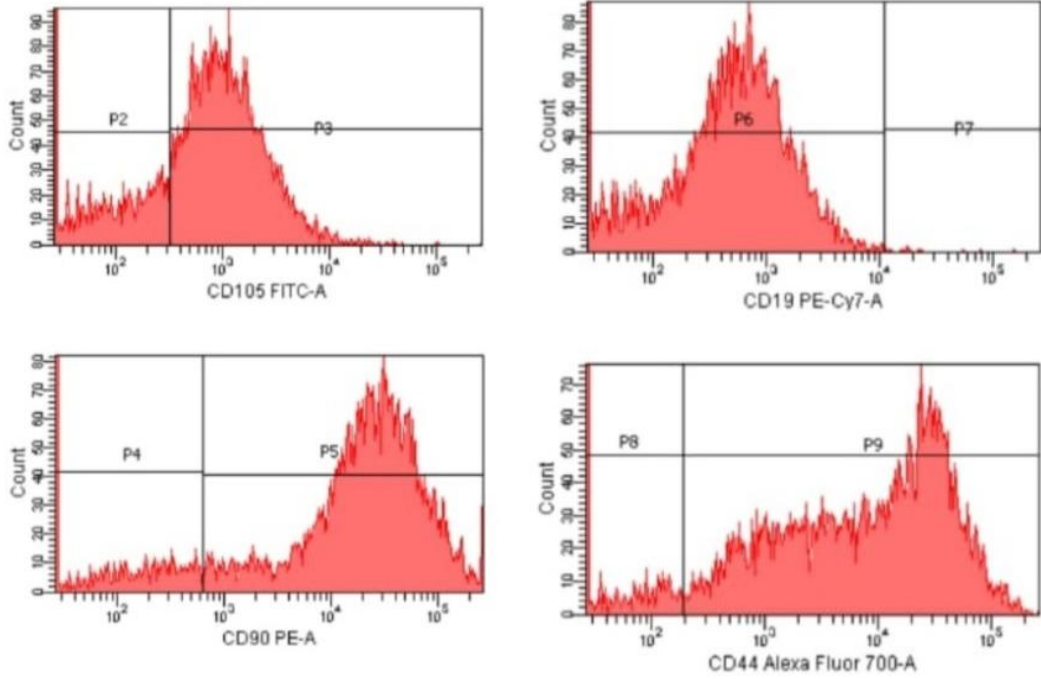
Bu nedenle çalışmada bu şartları sağladığı bilinen bir gebelikten elde edilen ‘‘İnsan Umblikal Kord Whorton Jeli Mezenkimal Kök Hücreleri ticari kiti’’ kullanılmıştır.

Kullanılan hücre hattı ATCC® (PCS-500-010, American Type Culture Collection, Manassas, USA) firmasından temin edildi. Kullanılan hat insan kaynaklı PCS-500-010 kodu ile satılan göbek kordonu bağ dokusu kökenli mezenkimal kök hücrelerdir. Laboratuvarımıza P2 olarak gelen hücreler α MEM (Minimum Essential Medium α) mediumunda L-Glutamin ve Gentamisin ilavesi ile kültüre edildi. Pasaj 4 (P4) hücreler Tryple mediumu ile elde edildi. Bundan sonra hücreler 5 eşit miktara ayrılarak tüplere bölündü. 1 grup kontrol grubu olarak ayrıldı (**Şekil 2.4**). Diğer 4 tüpün her birine 1 primer 1 sekonder antikor koyularak flow sitometri çalışıldı. Bu çalışmanın sonucunda CD 105 %73,2, CD 44 %88,4, CD 90 %83,3 ve negatif marker olarak CD 19’un %99,7 oranında olduğu görüldü (**Şekil 2.5**). 5 adet 1 cc lik enjektöre her enjektörde $1,33 \times 10^6$ adet kök hücre serum fizyolojik ile sulandırılarak koyuldu ve her fareye 1.5 dizyem enjeksiyon yapıldı. Böylece 0. Günde her fareye 199.500 adet kök hücre enjeksiyonu yapıldı.

Aynı protokol kullanılarak 3. günde her fare için 360.500 adet hücre içerecek şekilde solüsyon hazırlandı ve enjeksiyon yapıldı.



Şekil 2.4: Kontrol grubundan elde edilen akış sitometri değerleri



Şekil 2.5: Çalışma gruplarından elde edilen akış sitometri değerleri

2.4. Siklosporin-A Hazırlama Protokolü

Bu çalışmada kullanılan 15mg/kg siklosporin A dozu Flores ve ark. tarafından kullanılan ve minimal etkin doz olarak belirlenen çalışmadan örnek alındı. Sandimmun 50 mg/ml'lik (Novartis Pharma AG Stein- İsviçre) ampul kullanıldı. Enjeksiyon sırtın kuyruğa yakın bölümüne subkutan olarak yapıldı.

2.5. Cerrahi İşlemlerin Yapılması

2.5.1. Anestezi

Tüm cerrahi işlemler ve enjeksiyonlar aynı cerrahi ekip tarafından gerçekleştirildi. Tüm farelere anestezi indüksiyonu aseptik şartlarda intraperitoneal yolla verilen ketamin hidroklorür (150 mg/kg-Ketalar®, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) ve xylazine hidroklorit (5 mg/kg-Rompun®, Bayer, Türkiye) karışımı ile sağlandı. Cilt allotransplantasyonu, biyopsi ve kan alma işlemlerinin tümü genel anestezi altında gerçekleştirildi.

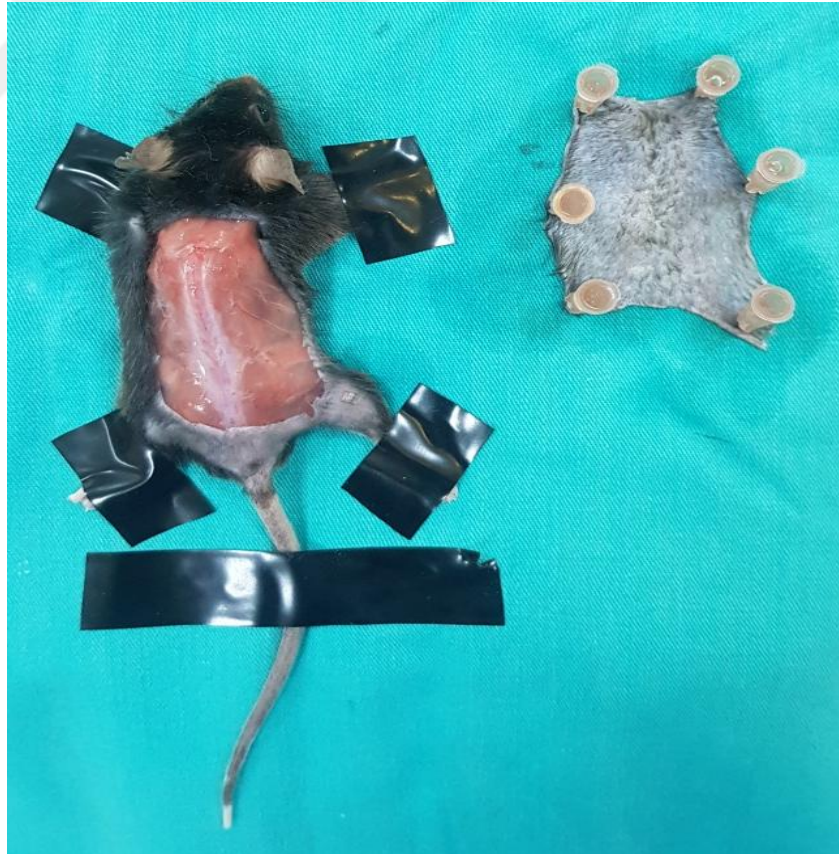
2.5.2. Cilt allogreftlerinin transplantasyonu

Genel anestezi altında CD57BL/6 farelerin sırt tüyleri traş edildi. Ardından povidon iyot çözeltisi ile dezenfekte edildi. Köpük pano üzerine steril yeşil örtüldü ve fare bunun üzerine taşındı. Povidon iyot çözeltisi steril serum fizyolojik ile uzaklaştırıldı. Sırtının lateralinden yapılan insizyonu takiben tüm sırt cildi tam kat diseke edildi ve soyuldu (**Şekil 2.6**).



Şekil 2.6: CD57BL/6 farenin sırt cildi diseksiyonu

Elde edilen cilt grefti dış yüzeyi dışa bakacak şekilde fare ile aynı steril yeşil üzerine düzgünce serildi. Kenarlarından iğne ataçlarla zemine sabitlendi (Şekil 2.7)

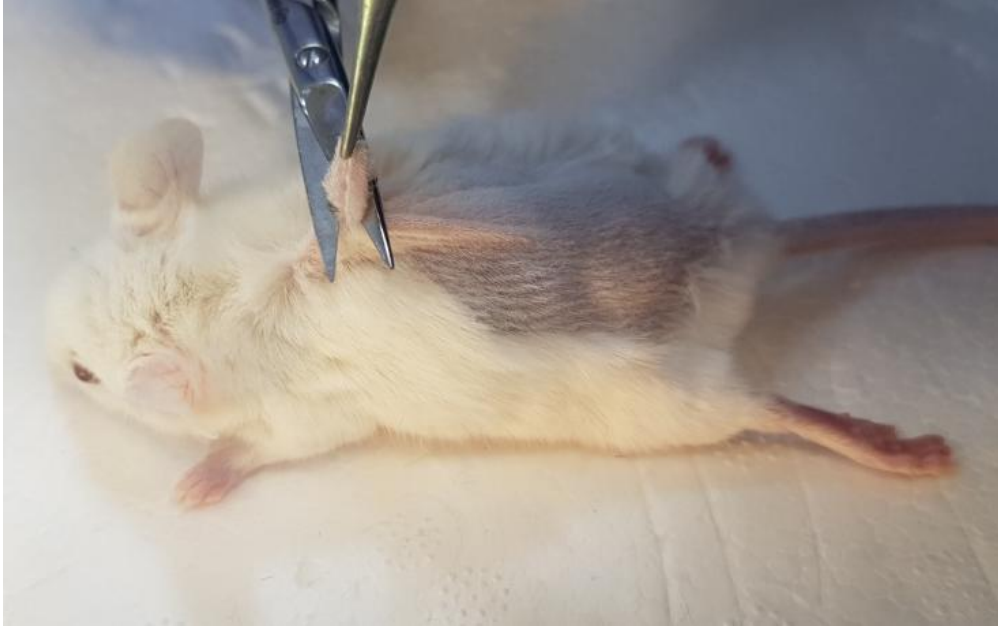


Şekil 2.7: Köpük panoya sabitlenmiş cilt grefti

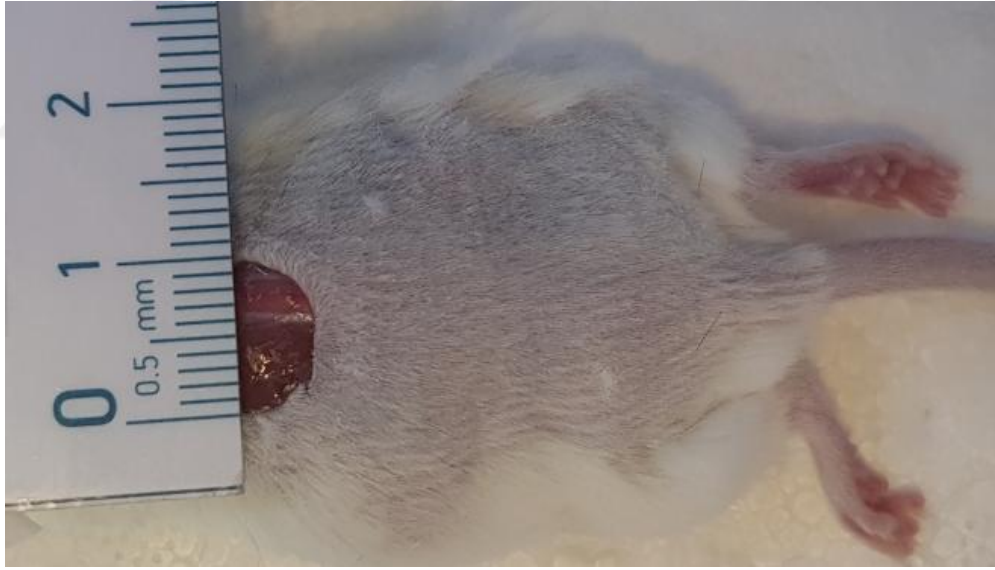
Zemine sabitlenerek yeterince gerginlik oluştutulan cilt greftinden 10 mm çaplı delici (puncher) yardımıyla 4 adet deri grefti elde edildi (**şekil 2.8**). Graftler serum fizyolojik ile nemlendirilmiş spanlara sarılarak muhafaza edildi. Balb/c farelerin sırt cildi ölçülerek işaretlenen 10 mm çaplı daire şeklinde alan düz bir diseksiyon makası ile tek seferde çıkarıldı ve tam kat bir defekt oluşturuldu (**şekil 2.9, şekil 2.10**)



şekil 2.8: 10 mm delici ile elde edilen cilt greftleri



Şekil 2.9: Alıcı Balb/c farelerin sırtında defekt oluşturulması



Şekil 2.10: Alıcı Balb/c farenin sırtında oluşturulan 10 mm'lik tam kat defekt

CD57BL/6'dan alınan cilt greftleri Balb/c farelerin sırt cildinde oluşturulan aynı büyüklükteki defekte 7.0 polipropilen sütür ile adapte edildi ( ekil 2.11)

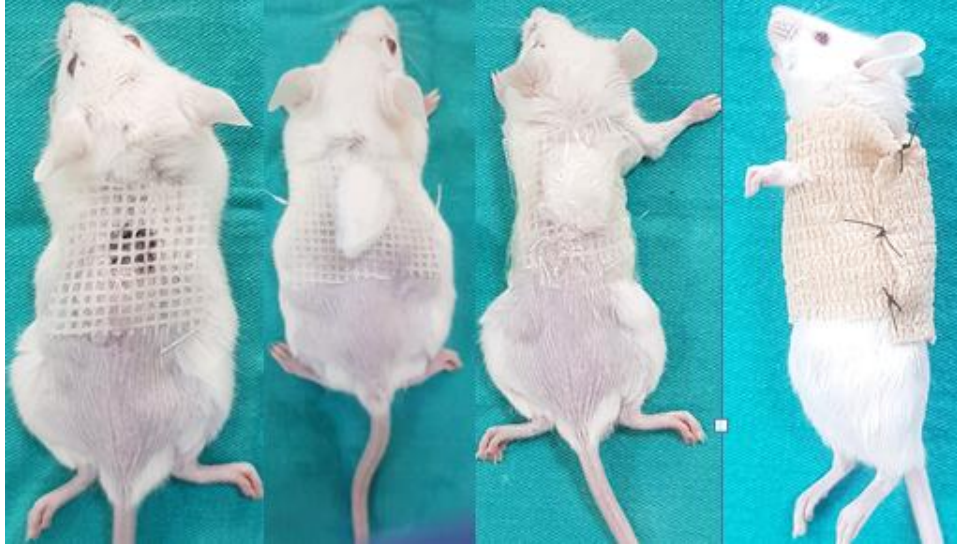
Ardından tüm alıcı Balb/c fareler rastgele 6 gruba ayrıldı. Siklosporin uygulanacak olan grup 2, 4, 5 ve 6 farelere daha önce belirlenen dozlarda siklosporin subkutan yolla enjekte edildi. UK-MKH uygulanacak grup 3, 4, 5 ve 6'ya ise daha önce belirlenen dozlarda kök hücreler paraspinal kas içine IM yolla enjekte edildi ( ekil 2.12).



Şekil 2.11: Balb/c farenin sırtına adapte edilmiş cilt grefti



Şekil 2.12: 30 gauge i ne ile UK-MKH'nin paraspinal kas içine enjeksiyonu.



Şekil 2.13: Greft pansumanının aşamaları

Tüm greftler pansumanla kapatıldı. %5 oranında chlorhexidine acetate BP içeren yumuşak parafinle doyurulmuş delikli gazlı Leno bezi (Bactigras) greftin üzerine serildi. Bohça pansuman amacıyla serum fizyolojik ile nemlendirilmiş steril pamuk bunun üzerine koyuldu ve tüm pansuman şeffaf film örtü (Tegaderm, 3M Company, USA) ile kapatıldı. Kendi üzerine yapışabilen elastik bandaj yelek şekline getirildi. Ardından fareye giydirildi, kendi üzerine yapıştırıldı ve ipek sütürler ile sabitlendi (**Şekil 2.13**).

Greftlerin açılacağı 4. güne kadar fareler tek başlarına kafeslerde muhafaza edildiler.

3. günde grup 3,4, 5, ve 6 farelerine yeniden UK-MKH enjeksiyonu yapıldı. Greftin üzerindeki kendi üzerine yapışan bandaj aralandı paraspinal kas alanı belirlendi ve şeffaf bant üzerinden IM olarak uygulandı.

2.5.3. Greftlerin açılması

Greftlerin açılması işlemi anestezisiz gerçekleştirildi. Fareler uygun pozisyonda tutulduktan sonra önce kendi üzerine yapışan elastik bandajın ipek sütürleri alındı, elastik bandaj ve şeffaf örtü bistüri yardımı ile kesilerek uzaklaştırıldı. Greftler bu günden sonra açık bırakıldı.

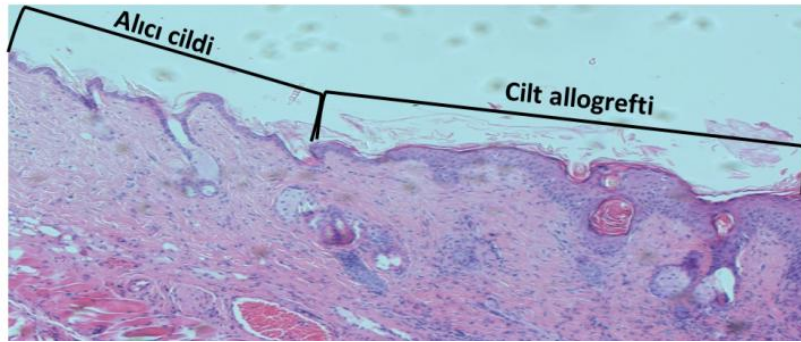
2.5.4. Biyopsi tekniği ve biyopsilerin alınması

Tüm gruplarda greftleme işleminde sonra 10. günde cilt allogreftinden insizyonel biyopsi alındı. Biyopsi işlemi genel anestezi altında gerçekleştirildi. Biyopsiler %50'si cilt allogrefti %50'si ise alıcı farenin sağlam cildini içerecek biçimde alındı. (Şekil 2.14, Şekil 2.15) Örnekler %10 formaldehid solüsyonunda 1 gece bekletildikten sonra patoloji laboratuvarına götürüldü, kasetlenerek parafine gömüldü ve kesitlere ayrıldı.

Cilt allogreftinin en geç reddedildiği Grup 2, 4 ve 5'te rejeksiyon belirtilerinin 30. günde başlaması nedeniyle çalışma sonlandırıldı. Tüm gruptaki farelere genel anestezi uygulandı. Anterior yaklaşımla ksifoid altında yapılan 1 cm cilt insizyonunu takiben cilt cilt altı doku geçilerek batına ulaşıldı. Karaciğer ve iki böbrek alındı.



Şekil 2.14: Cilt allogreftinden örnekleme yapılmış Balb/c fare, sağ altta yarısı alıcı farenin cildi yarısı cilt allogreftinden oluşan örnekleme görülmektedir



Şekil 2.15: Örneklemenin histopatolojik görüntüsü

2.5.5. Cerrahi sonrası takip

Her işlemden sonra farelerin anesteziden uyanması beklendi ve ardından kafeslerine geri alındı. Cerrahi sonrası ağrı kontrolü amacıyla içme sularına 2 mg/ml parasetamol ilave edildi. Fareler deney sonrası günlük olarak, genel durum, vücut ağırlığı, malnütrisyon, enfeksiyon bulguları yönünden yakın gözlendi. Biyopsi alanlarına günlük pansuman ve antibiyotikli pomadlarla yara bakımı yapıldı. Deney boyunca hiçbir fare kaybı olmadı.

2.5.6. Ötenazi Uygulanması

Çalışmanın 30. gününde tüm farelerden karaciğer ve böbrek biyopsileri elde edildi. Batını açılmış olan fareler fiziksel bir uygulamaya uygun olmadığından ve genel anestezinin etkisi devam ederken intrakardiyak kan alma ile ötenazi uygulandı.

2.6. Değerlendirme Yöntemleri

2.6.1. Makroskopik incelemeler

Açıldığı 4. günden itibaren hergün greftlerin rengi, doku özelliği ve konturu değerlendirildi. Pembe-kırmızı renk greftin vasküler olduğuna işaret ederken, mor-siyah renk vaskülaritenin olmadığı ya da kaybolmaya başladığını göstermekteydi. Graftin pliabilitesini devam ettirmesi, palpasyon ile yumuşak olması sağlıklı görünüm olarak değerlendirilirken; epidermis üzerinde kabuklanma, greftin yer yer ya da tamamen eskarlı bir hal alması rejeksiyon konusunda uyarıcı oldu. Makroskopik reddin değerlendirilmesinde greftin tamamen zeminden ayrılıp ayrılmadığı araştırıldı. Tüm makroskopik değerlendirme kriterleri **Tablo 2.1'** de özetlenmektedir.

Tablo 2.1: Cilt allogreftlerinin makroskopik değerlendirme kriterleri

Greft rengi	Pembe-kırmızı Mor-siyah	Vaskülarize görünüm, sağlıklı greft Bozulmuş vaskülarizasyon, rejeksiyon
Greft Palpasyonu	Esnek ve bükülebilir Sert	Sağlıklı greft Bozulmuş vaskülarizasyon, rejeksiyon
Greft Yapısı	Epidermal kurut ya da eskar yok Epidermal kurut ya da eskar var	Sağlıklı greft Bozulmuş vaskülarizasyon, rejeksiyon
Makroskopik red	Greft zemine bitişik Greft zeminden tamamen ayrılmış	Sağlıklı greft Rejeksiyon

2.6.2. Mikroskopik incelemeler

Cilt allogreftleri ve sağlıklı cildi içeren biyopsi örnekleri %10'luk formaldehit solüsyonu ile fikse edilip parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan mikrotomlar (Leica Microsystems EG 1130, Wetzlar, Germany) yardımıyla alınan kesitler hematoxilen eozin (HE) ve immünohistokimyasal (İH) boyalarla (Ki-67, Bcl-2, CD4, CD8, Doğal öldürücü hücre antikorları ve Dendritik hücre antikorları) boyandı. Boyanan preparatlar ışık mikroskobu (Carl Zeiss Axio Imager D1, Carl Zeiss Microscopy, LLC, USA) ile incelendi ve dijital görüntüleri kaydedildi.

HE ve İH boyaları ile boyanmış tüm preparatlarda allogreftler rejeksiyon açısından değerlendirildi. Bunun için 2008 yılında Cendales ve ark tarafından cilt içeren kompozit doku nakillerinde rejeksiyonun gösterilmesinde kullanılan "Banff sınıflaması" esas alınarak rejeksiyon derecelendirmesi yapıldı (Cendales et al. 2008) Buna göre;

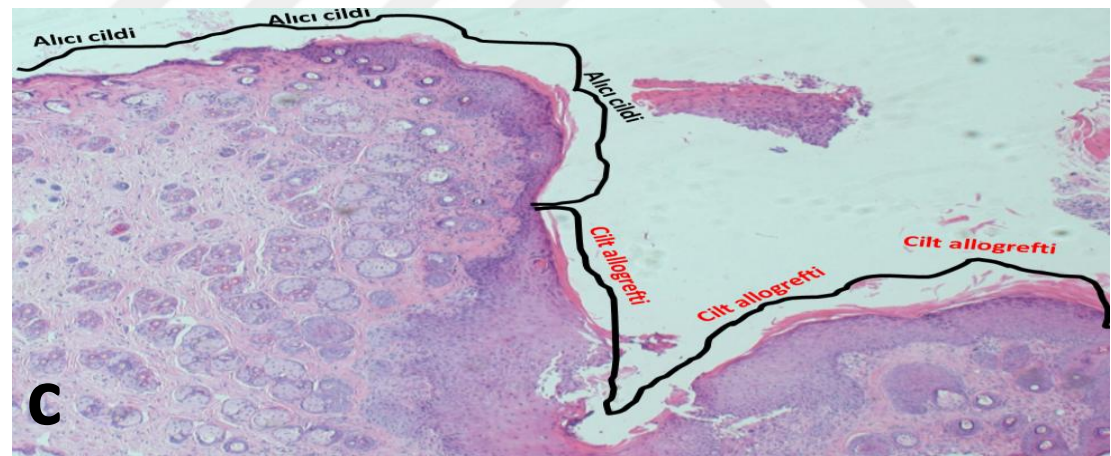
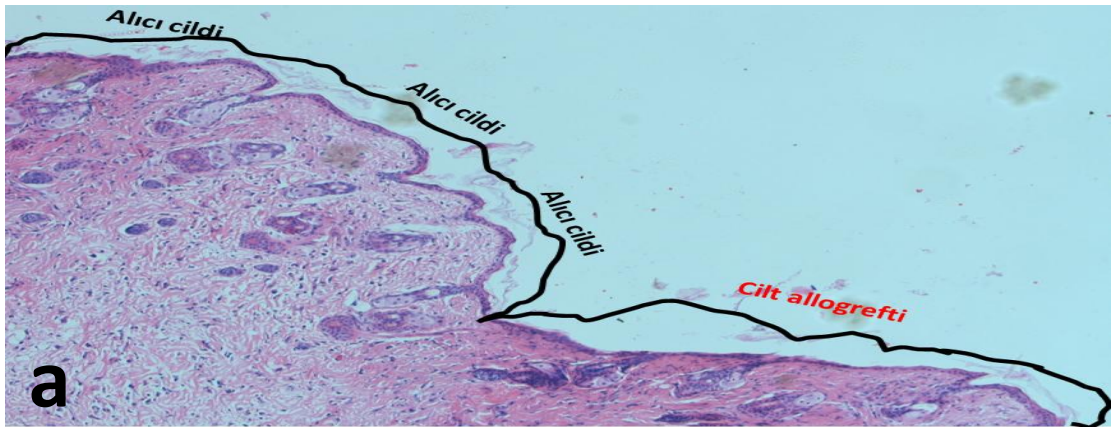
Grade 0 (Normal, rejeksiyon yok): İnflamasyon yok ya da çok az,

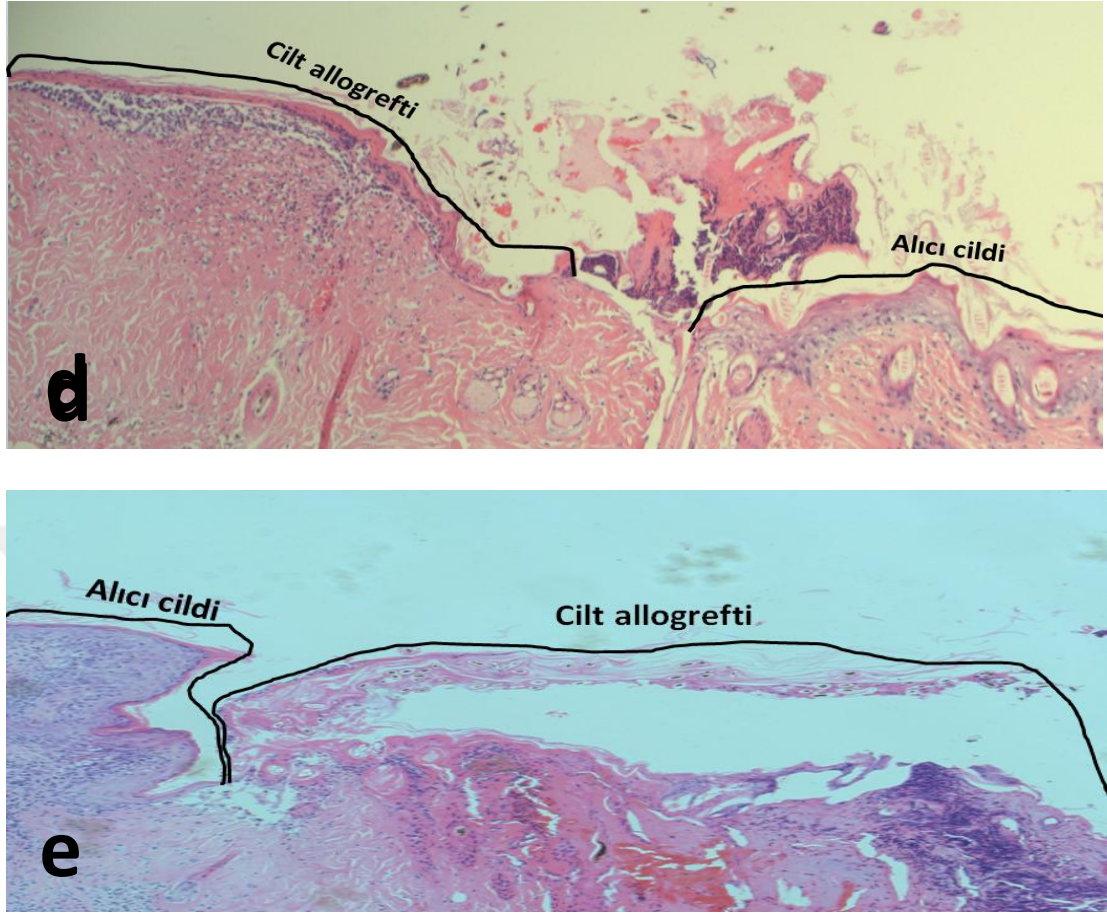
Grade 1 (Hafif derece rejeksiyon): Hafif derecede perivasküler infiltrasyon var, ancak epidermal tutulum yok,

Grade 2 (Orta derece rejeksiyon): Epidermal diskeratoz ve egzozitoz yok, hafif derecede epidermal ve/veya cilt eklerinde tutulum (spongiosis ve ekzositoz ile sınırlı) var, orta- ağır derecede perivasküler inflamasyon var,

Grade 3 (Şiddetli derece rejeksiyon): Epitelyal apoptozis, diskeratoz ve/veya keratinoliz ile giden yoğun inflamasyon var,

Grade 4 (İleri derece rejeksiyon): Epidermis ve diğer deri eklerinde belirgin inflamasyon var, nekrotizan akut rejeksiyon vardır (**Şekil 2.16**).



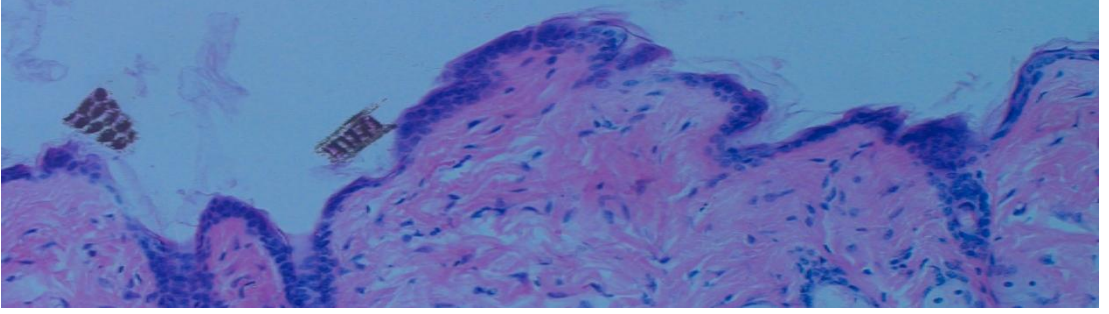


Şekil 2.16: Banff derecelendirmesine göre; a: Grade 0, b: Grade 1, c: Grade 2, d: Grade 3, e: Grade 4'ü göstermektedir.

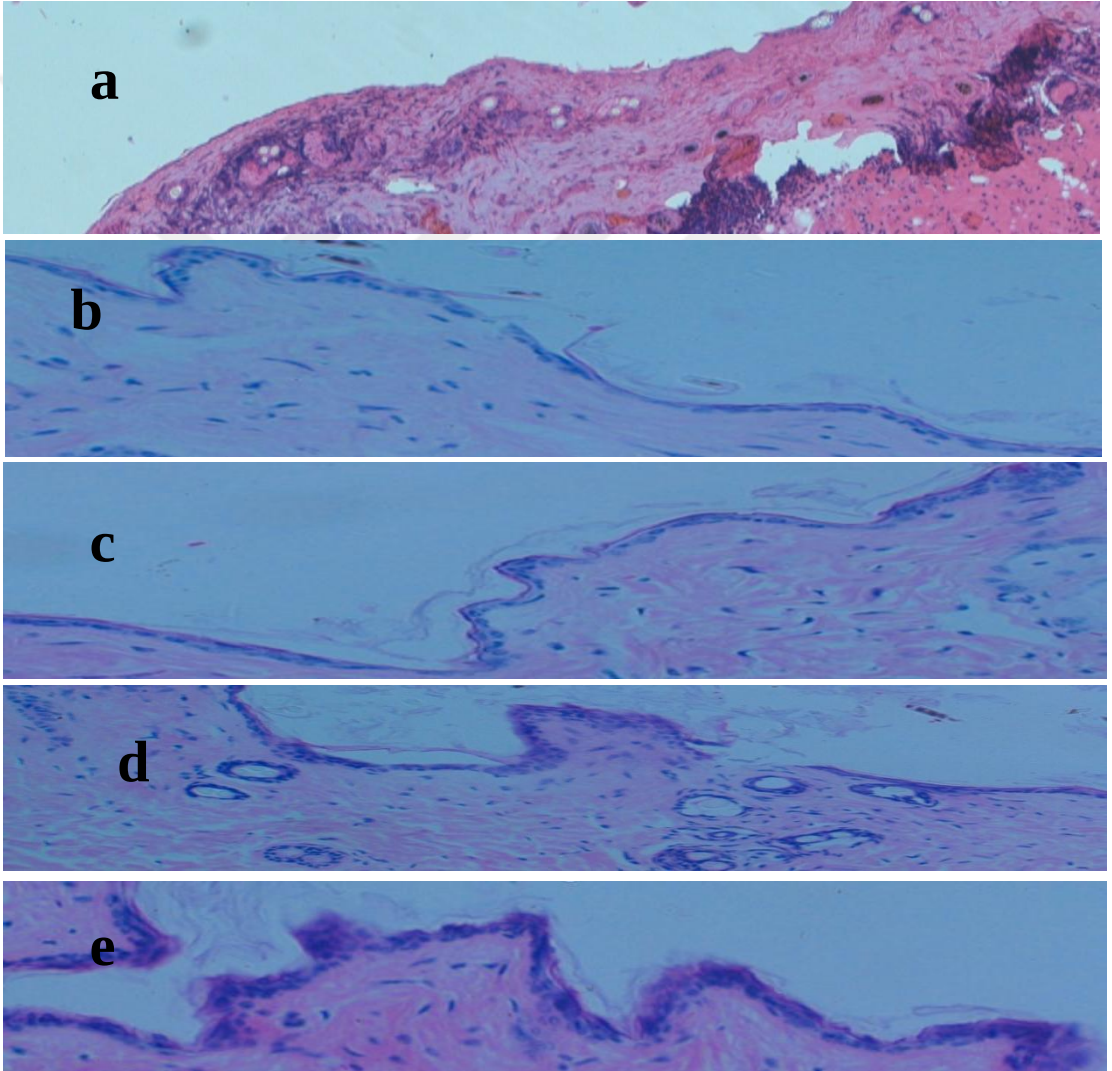
İnflamasyon miktarını değerlendirerek rejeksiyonu ön gören Banff derecelendirme sistemi dışında, cilt allogreft reddinin diğer göstergeleri olan dermo-epidermal ayrışma ve epitel kalınlığındaki değişim de değerlendirildi. Epitel kalınlığındaki değişimin değerlendirilmesinde CD57BL/6 (verici) grubun normal cilt histopatolojik örneklemedeki epitel kalınlığı referans alındı. Yetişkin CD57BL/6 farelerin cilt örneklerinde epitel kalınlıklarının 3-4 tabakalı olduğu görüldü (Şekil 2.17). Epitel kalınlığı grade sistemi;

- Grade 0: Total epitelyal nekroz
- Grade 1: Tek katlı epitel
- Grade 2: 2 sıra epitel
- Grade 3: 3 sıra epitel
- Grade 4: 4 sıra epitel olacak şeklinde tasarlandı (Şekil 2.17).

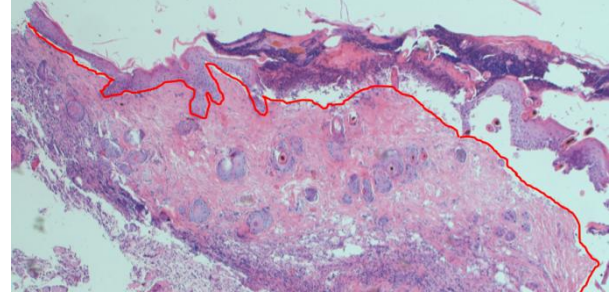
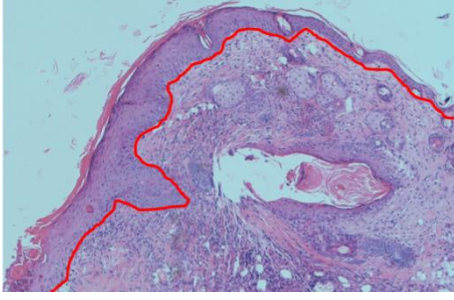
Dermoepidermal ayrışma var ya da yok şeklinde değerlendirildi (Şekil 2.18, Şekil 2.19).



Şekil 2.17: CD57BL/6 farelerin doğal epitel görünümü 3-4 sıralı epitel tabakaları mevcut



Şekil 2.17: Epitel kalınlığı derecelendirmesine göre; a: Grade 0'ı (Total epitelial nekroz), b: Grade 1 (Tek katlı epitel), c: Grade 2 (2 sıra epitel), d: Grade 3 (3 sıra epitel) ve e: Grade 4'ü (4 sıra epitel) göstermektedir



Böbrek ve Karaciğer biyopsileri;

Şekil 2.18: Dermoepidermal

ayrışmanın olmadığı epitel

Çalışma bitiminde tüm farelerden elde e

ri %10'luk formaldehit solüsyonu ile fikse

bloklardan mikrotomlar (Leica Microsystems EG

1130, Wetzlar, Germany) yardımıyla alınan transvers ve vertikal kesitler HE ile boyandı.

Boyanan preparatlar ışık mikroskobu (Carl Zeiss Axio Imager D1, Carl Zeiss Microscopy, LLC, USA) ile incelendi ve dijital görüntüleri kaydedildi.

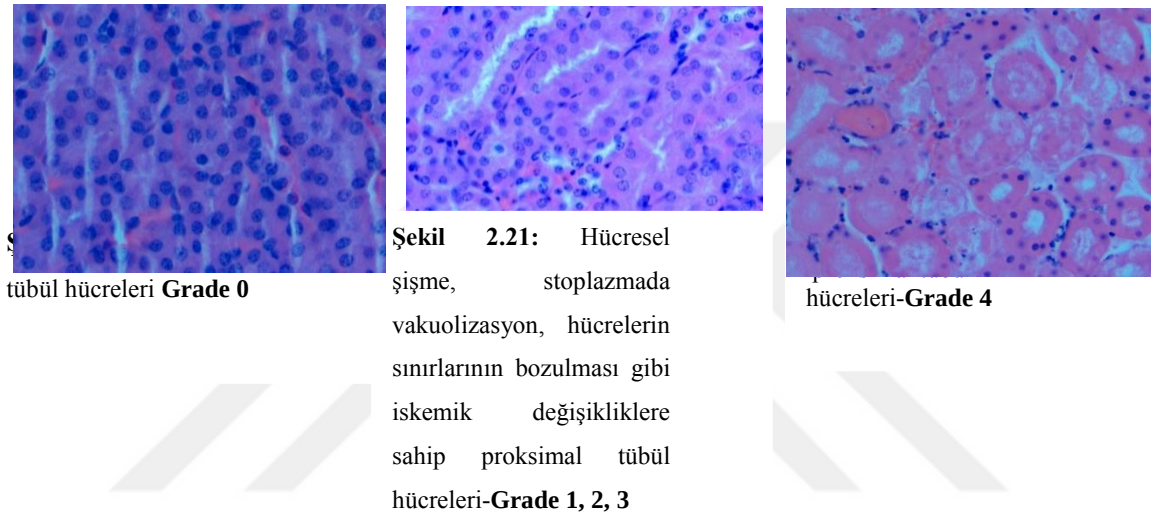
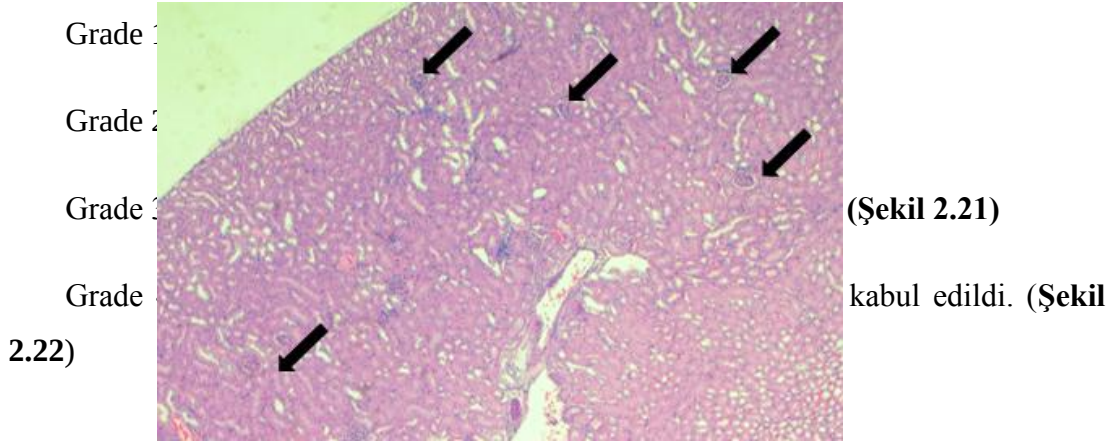
Şekil 2.19: Dermoepidermal

ayrışmanın mevcut ol

Böbrek ve karaciğer biyopsilerinde Siklosporinin akut yan etkileri araştırıldı. Böbrekte meydana gelen akut yan etkilerin nedeni siklosporinin vazokonstrüksiyon ve vazodilatasyon yapıcı ajanların arasındaki dengeyi bozmasıdır. Özellikle akut dönemde meydana gelen değişiklikler Renin-Anjiotensin-Aldosteron sisteminin Siklosporin tarafından aktive edilmesine bağlanmaktadır (Gardiner DS 1991). Çalışmamızda akut dönemde SK'den en fazla etkilenen böbrek proksimal tübül ve jukstaglomerüler aparat (JGA) hücreleri incelendi. Bu hücrelerde meydana gelen değişikliklerin derecelendirilmesinde Grup 1'in sonuçları en iyi kabul edilerek referans alındı. Proksimal tübül hücrelerde meydana gelen değişiklikler Racusen ve ark'nın renal allograft patolojilerini derecelendirmede kullandıkları Banff derecelendirme sisteminin bir modifikasyonu kullanılarak değerlendirildi (Racusen et al. 1999). Buna göre proksimal tübül hücrelerde meydana gelen değişiklikler;

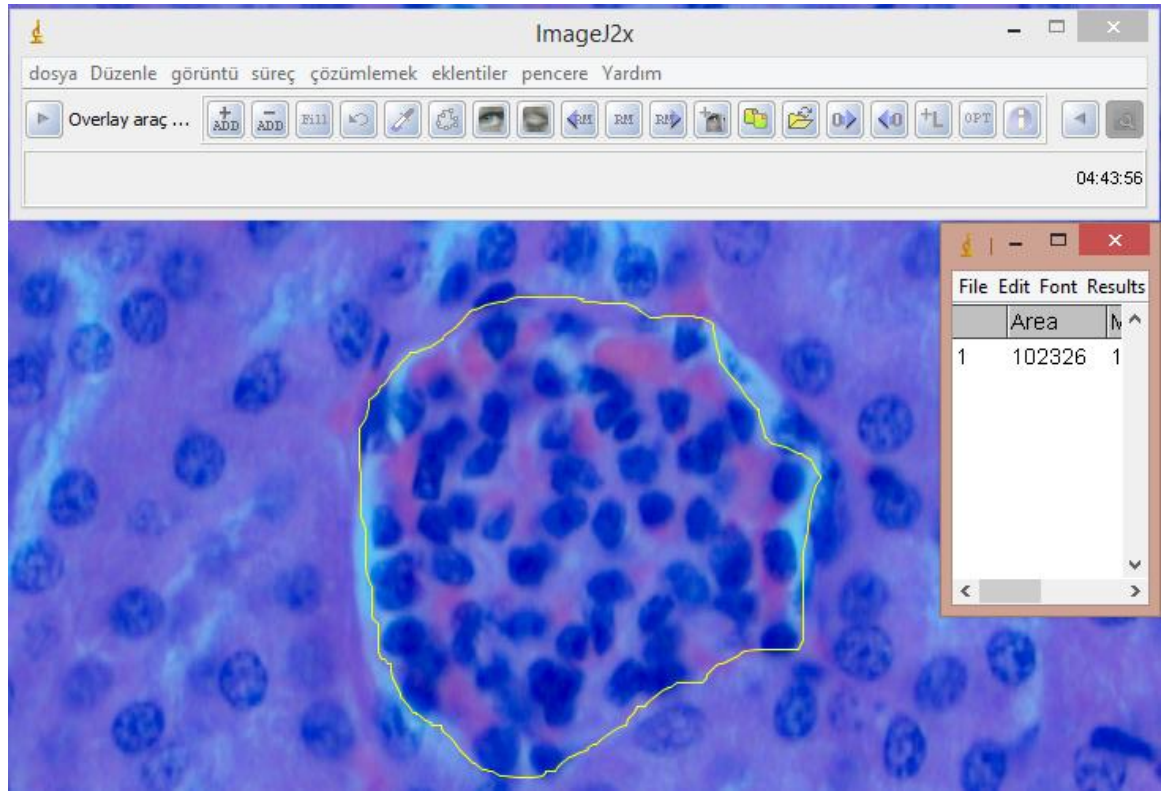
Grade 0; İskemik değişiklik ya da nekroz yok (**Şekil 2.20**)

Grade 1, 2, 3; Hücresel şişme, stoplazmada vakuolizasyon, hücrelerin sınırlarının bozulması gibi iskemik değişiklikler;

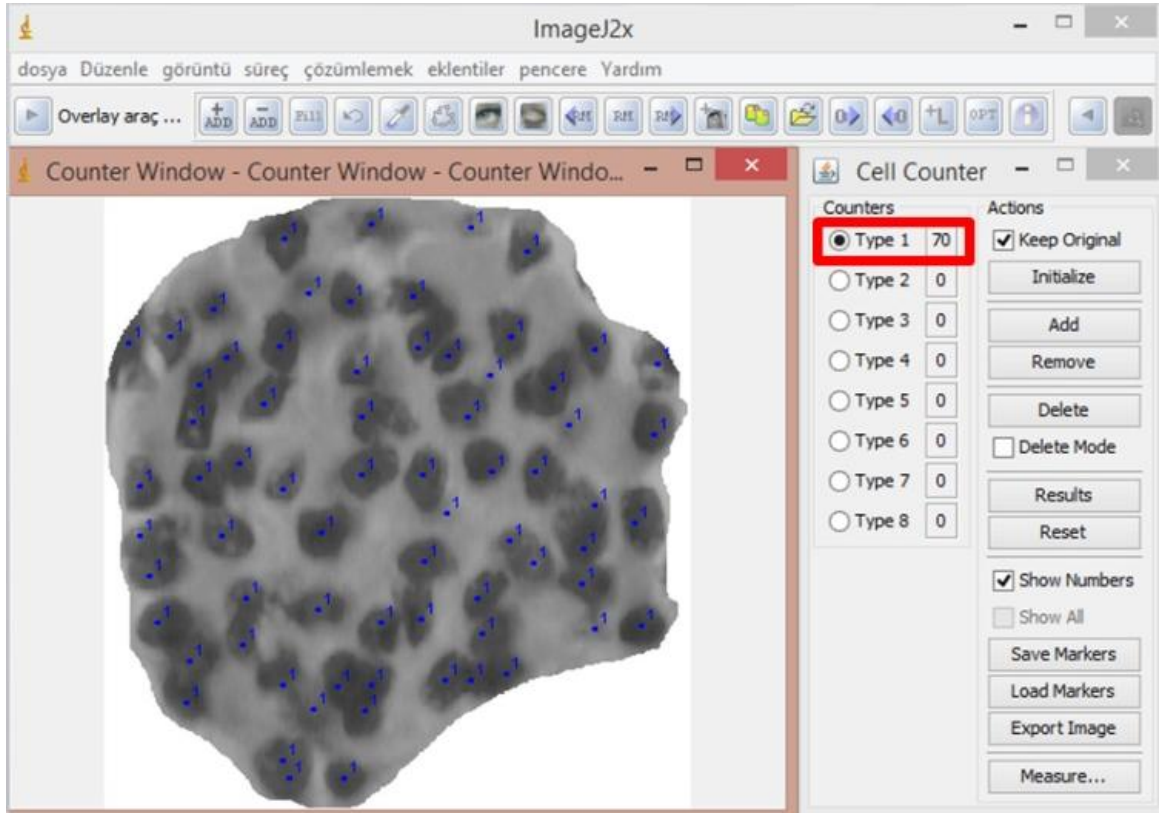


JGA hücrelerinde meydana gelen hipertrofiyi değerlendirmek için Grup 1'in böbrek biyopsilerinden seçilmiş kesitlerde 2,5x büyütme altında rastgele 5 adet JGA seçildi (Şekil 2.23). 40x büyütme altında her JGA'dan görüntü elde edildi. Bu görüntüler ImageJ2x programına (ImageJ2X 2.1.4.7, National Institutes of Health, Bethesda, MD) aktararak 8 bit gri skalada değerlendirildi ve her JGA'nın pixel cinsinden alanı hesaplandı ve JGA hücreleri sayıldı (Şekil 2.24, Şekil 2.25). Hücre sayısı JGA'nın alanına bölünerek bir hücre yoğunluk değeri elde edildi.

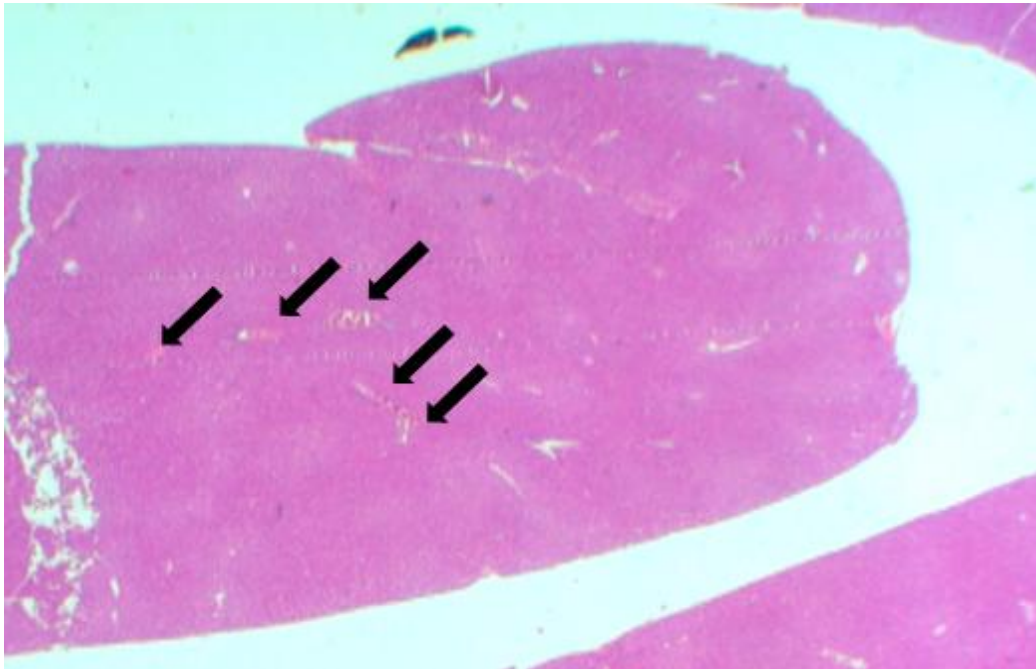
Şekil 2.23: 2,5x büyütme altında rastgele 5 adet JGA'nın seçilmesi



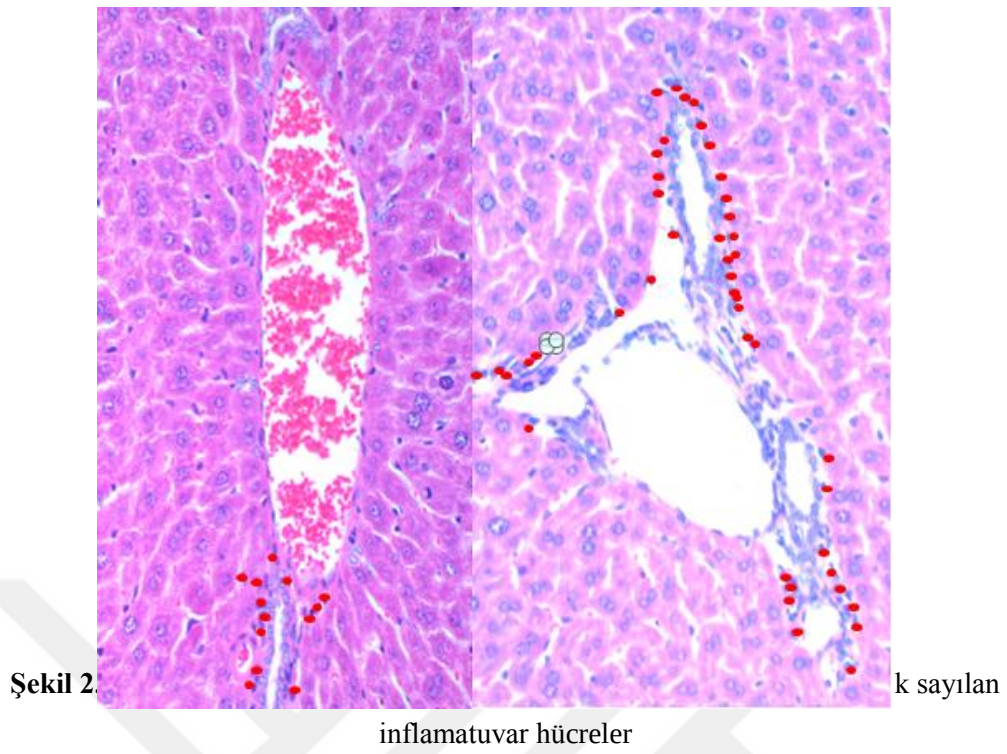
Şekil 2.24: Image J2x üzerinde piksel cinsinden alan ölçümü yapılmış tek bir JGA'nın görüntüsü



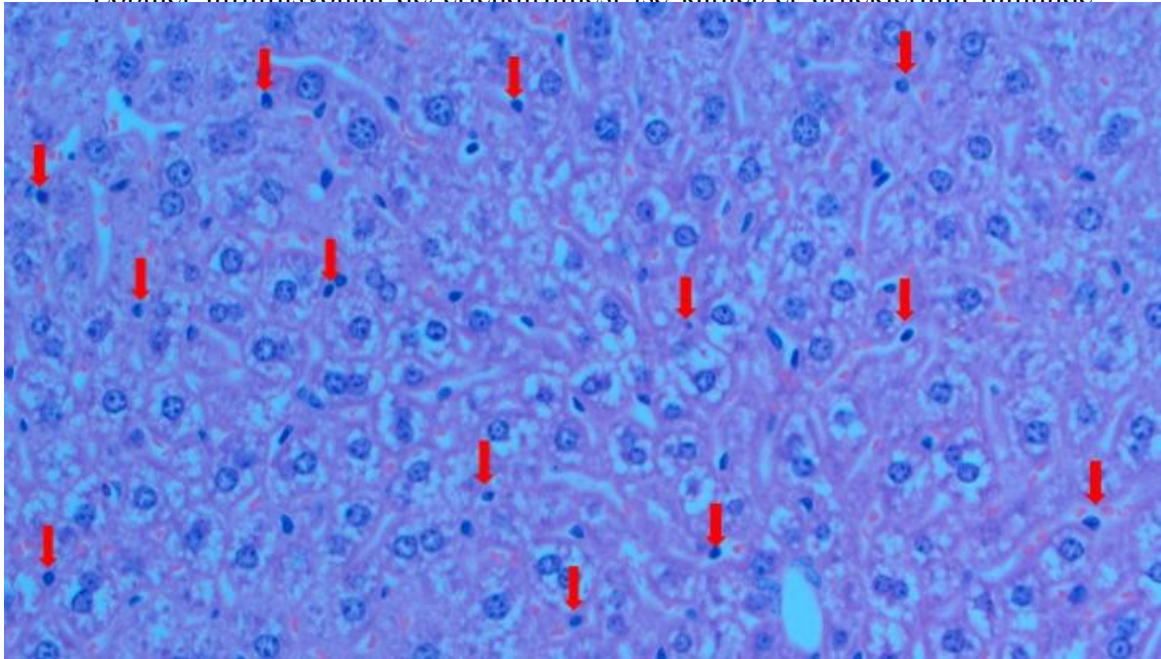
Şekil 2.24: Image J2x üzerinde piksel cinsinden alan ölçümü yapılmış tek bir JGA'nın görüntüsü



Şekil 2.26: 2,5x büyütme altında rastgele 5 adet portal alanın seçilmesi



Lobüler infiltrasyonun değerlendirilmesi ise karaciğer örneklerinin tümünde



Şekil 2.28: 40x büyütme ile elde edilmiş periportal lobüler alanda sayılan lenfositler

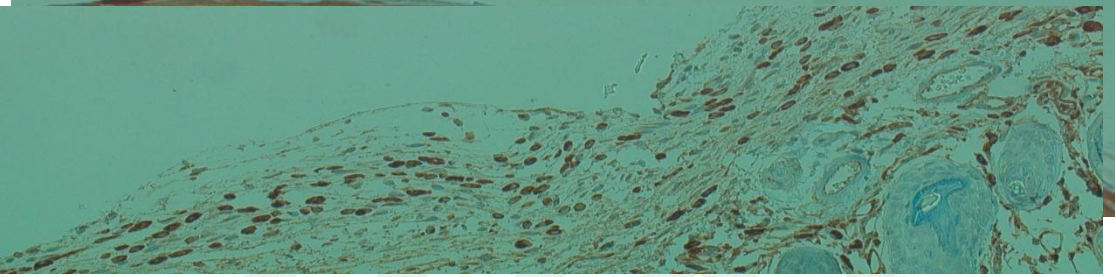
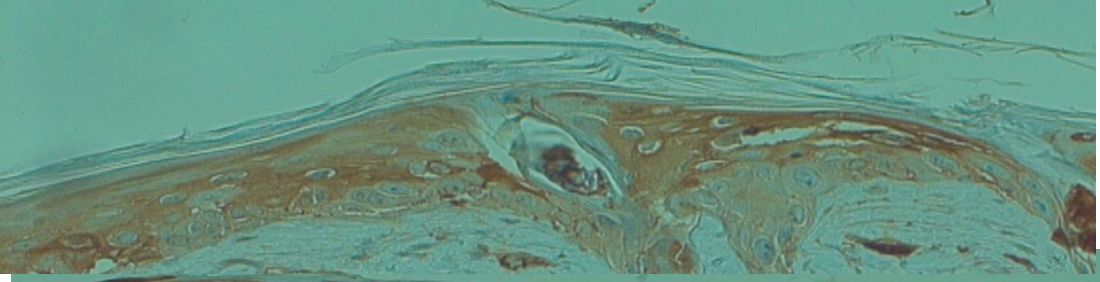
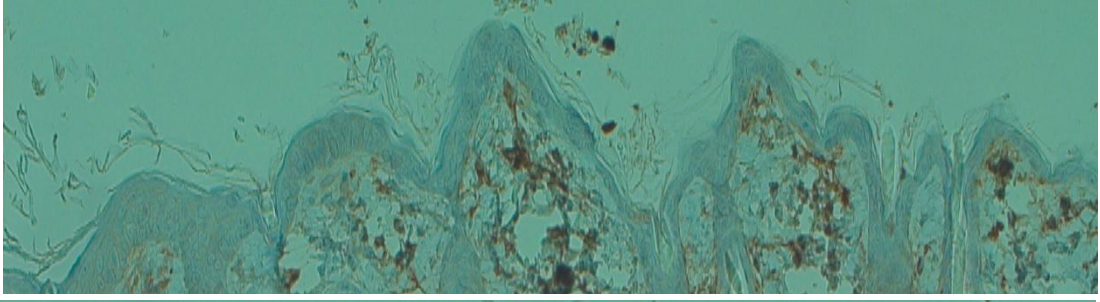
Siklosporinin akut dönemde karaciğer histopatolojisinde meydana getirdiği en sık değişiklik portal alan çevresinde ve lobüler bölgede inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve steatozistir. İlaçla ilişkili hepatitlerde her ilacın karaciğer üzerine farklı bir histopatolojik etkisi olduğundan halihazırda kullanılan ortak bir skorlama sistemi bulunmamaktadır (Yu et al. 2017). Bu yüzden bu çalışmada modifiye semikantitatif bir yöntem kullanıldı ve portal alan çevresinin değerlendirilmesinde 2,5x büyütmede elde edilen görüntülerden seçilen rastgele 5 portal alanın çevresindeki inflamatuvar hücreler sayıldı (**Şekil 2.26, Şekil 2.27**). Steatoz ise hiçbir patolojik örneklemde tespit edilemediğinden çalışma sonuçlarına etki etmedi.

İmmünohistokimyasal inceleme: Biyopsilerin parafin bloklarından alınan diğer kesitleri İH boyama ile incelendi. Fare cilt allogrefti örneklerinde belirli anatomik bölgelerin Ki-67, Bcl-2 ve CD 4, CD 8, Doğal öldürücü hücre (NK), Dendritik Hücre (DH) boyamaları bu amaçla kullanıldı. (**Tablo 2.2**) 15 mg/kg/gün dozunda SK-A alan Balb/c farelerden alınan cilt örnekleri referans kabul edildi ve puanlama bu referans değerlere göre yapıldı. İH boyanma derecelendirmesinde HE boyanmada kullanılabilecek bir yarı kantitatif puanlama sistemi kullanıldı. Boyanma derecesi referans boyanmaya göre %76-100 arasında ise hafif derecede azalma 4 puan, %51-75 arasındaysa orta derece azalma 3 puan, %26-50 arasındaysa ileri derece azalma 2 puan, %25 ve altında ise ağır derece azalma 1 puan ve epitelin tamamen nekroza gittiği durumda 0 puan verildi.

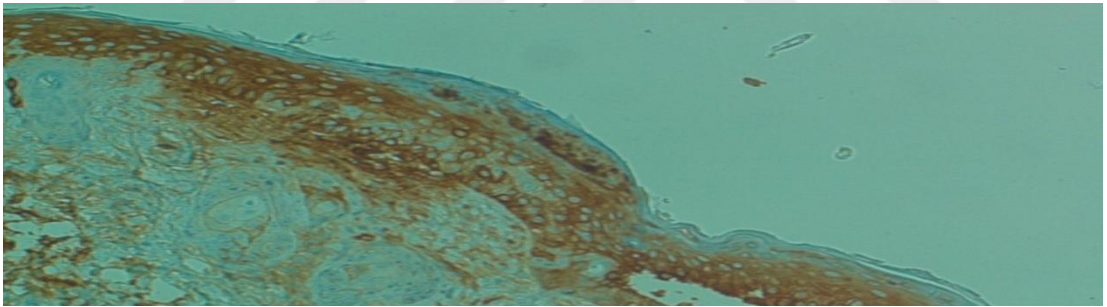
Tablo 2.2: İmmünohistokimyasal incelemede kullanılan antikorlar ve değerlendirilen cilt bölgeleri

Antikor	Cilt allogreftinde değerlendirilen bölgeler
Ki-67	Epidermis bazal tabaka hücreleri
Bcl-2	Epidermis bazal tabaka hücreleri
CD 4	Epitelyal ve subepitelyal lenfositler
CD 8	Epitelyal ve subepitelyal lenfositler
Doğal öldürücü Hücre	Epitelyal ve subepitelyal bölge
Dendritik Hücre	Epitelyal ve subepitelyal bölge

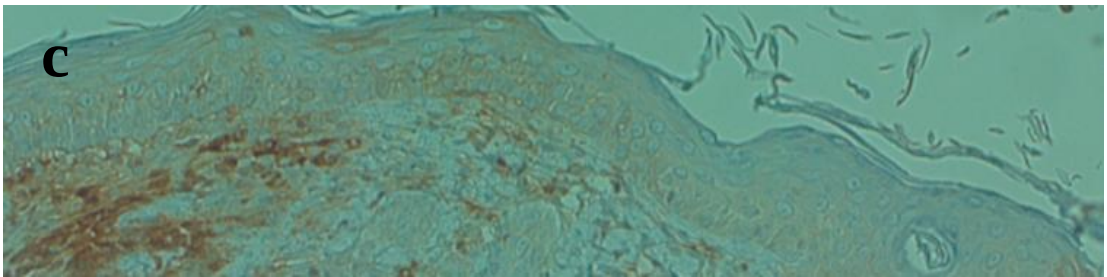
Ki-67: 1980 yılında keşfedilmiş proliferasyonla ilişkili bir nükleer antijendir. Yalnızca bölünen hücrelerde bulunmaktadır (Lian Tao Li 2014). Çalışmamızda cilt allogrefti epitelini Ki-67 antikorlarıyla (anti-Ki-67 Mouse Monoclonal Primary Antibody, Santa Cruz Biotechnology, code: sc-23900) boyayarak epitelyal proliferasyonun devam edip etmediğini araştırdık. Minimal etkin dozda siklosporin-A (15 mg/kg/gün) alan gruptan elde edilen cilt allograft biyopsileri Ki-67 ile boyandı; 200x büyütmede rastgele 5 alan sayılarak referans görüntü ve değerler oluşturuldu (**Şekil 2.29**). Bu görüntülerdeki proliferasyon miktarı %100 kabul edilirken, proliferasyonun olmaması %0 kabul edildi, 0 puan verildi. Boyanma derecesi referans boyanmaya göre %76-100 arasında ise hafif derecede azalma 4 puan, %51-75 arasındaysa orta derece azalma 3 puan, %26-50 arasındaysa ileri derece azalma 2 puan, %25 ve altında ise ağır derece azalma 1 puan ve epitelin tamamen nekroza gittiği durumda 0 puan verildi. (**Şekil 2.30**)



%100 kabul edilen referans görüntü



a



c

d

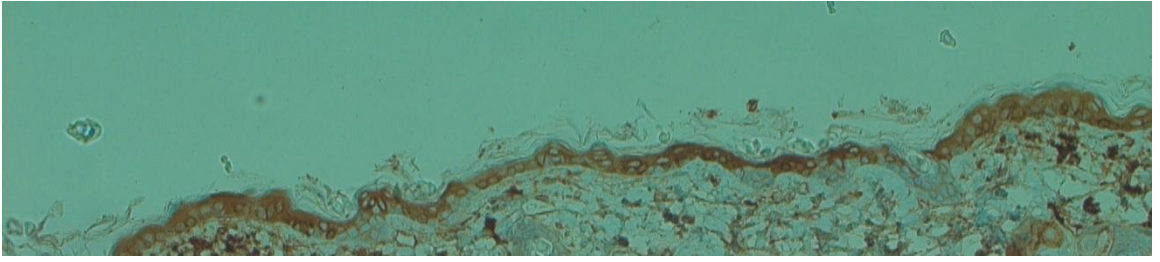
b

c

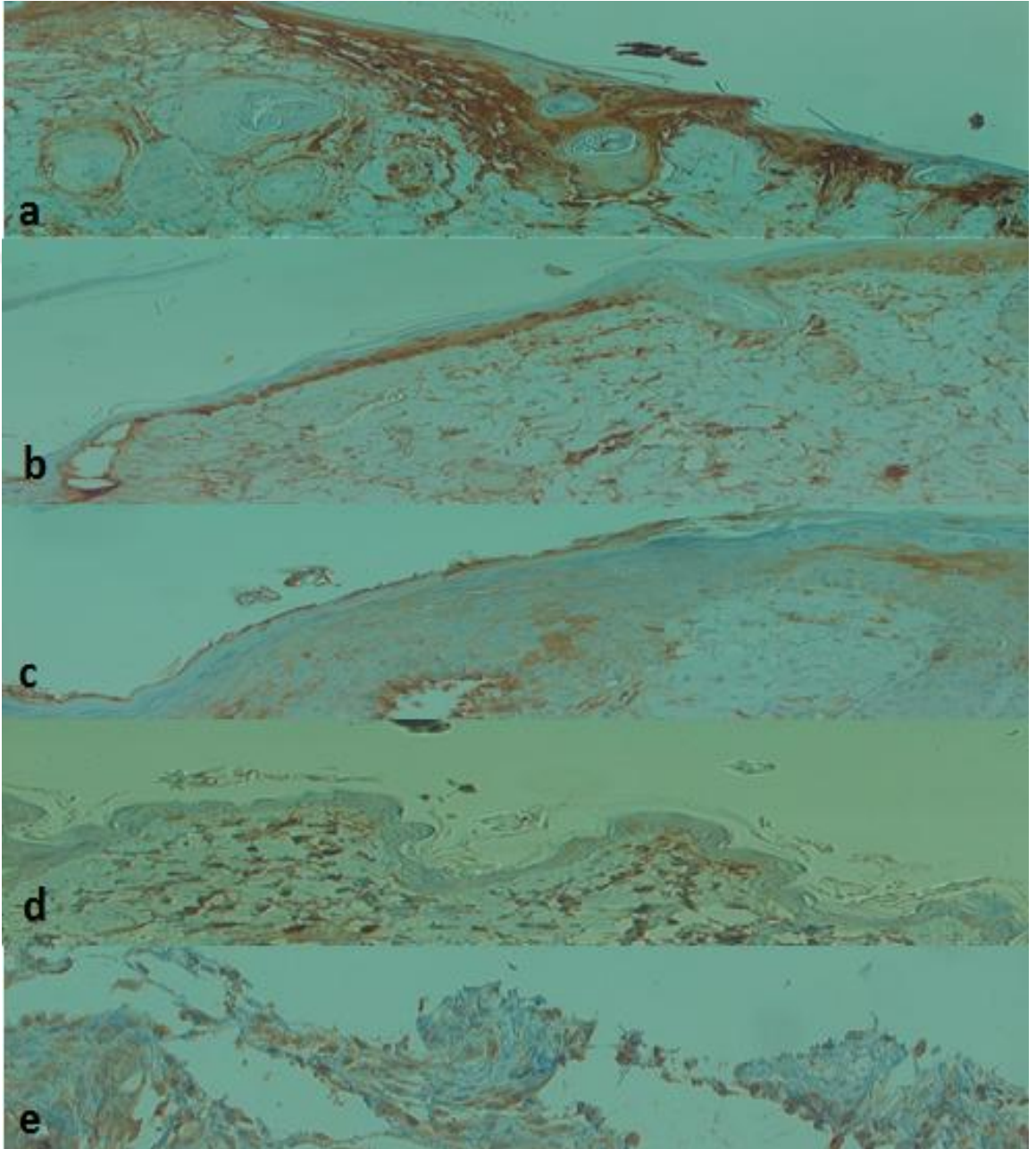
d
e

Şekil 2.30: Ki-67 derecelendirmesine göre, a: 4 puan, b: 3 puan, c: 2 puan, d: 1 puan ve e: 0 puanı göstermektedir

Bcl-2: Mitokondriyal apoptoz sinyali, programlanmış hücre ölümünün en yaygın şeklidir (Hotchkiss ve ark. 2009) ve B hücreli lenfoma-2 (Bcl-2) protein ailesi üzerinden gerçekleşir (Hotchkiss et al. 2009). Bcl-2'nin mitokondri üzerindeki ekspresyonunun hücreyi programlanmış hücre ölümünden koruduğu gösterilmiştir (Vaux, Cory, and Adams 1988). Çalışmamızda cilt allogrefti epitelini Bcl-2 antikorları (Mouse Bcl-2 antibody, Santa Cruz Biotechnology, Bcl-2 Antibody (7): sc-7382) ile boyayarak epitel hücrelerinin programlanmış hücre ölümünden ne kadar etkilendiğini araştırdık. Minimal etkin dozda siklosporin-A (15 mg/kg/gün) alan gruptan elde edilen cilt allogreft biyopsileri Bcl-2 ile boyandı; 200x büyütmede rastgele 5 alan sayılarak referans görüntü ve değerler oluşturuldu (**Şekil 2.31**). Bu görüntülerdeki Bcl-2'nin ekspresyonu yani apoptozisten korunma %100 kabul edilirken, Bcl-2 boyanmada azalma ve apoptoza gidiş %0 şeklinde yorumladı ve 0 puan verildi. Boyanma derecesi referans boyanmaya göre %76-100 arasında ise hafif derecede azalma 4 puan, %51-75 arasındaysa orta derece azalma 3 puan, %26-50 arasındaysa ileri derece azalma 2 puan, %25 ve altında ise ağır derece azalma 1 puan ve epitelin tamamen nekroza gittiği durumda 0 puan verildi. (**Şekil 2.32**)



Şekil 2.31: Bcl-2 boyanma derecelendirmesinde kullanılan ve boyanma %100 kabul edilen referans görüntü



Şekil 2.32: Bcl-2 derecelendirmesine göre, a: 4 puan, b: 3 puan, c: 2 puan, d: 1 puan ve e: 0 puanı göstermektedir.

CD4, CD8, NK ve Dendritik Hücre Antikorları

Biyopsilerin parafin bloklarından elde edilen kesitler CD4, CD8, NK ve DH antikorları (Santa Cruz Biotechnology Anti Mouse CD4 sc-19641, Anti-mouse CD8 sc-1181, NK Cell Marker Antibody (ANK61): sc-59340 ve Novus Biologicals Dendritik cell marker antibody AP-MAB0801) ile işaretlenerek bu hücrelerin örneklerdeki miktarları araştırıldı.

2.6.3. Sayısal termal görüntüleme

Allotransplantın canlılığının tespitinde kullanılan birçok yöntem vardır. SOT'da genellikle fonksiyonel yöntemler kullanılır. Bu yöntemlerden birisi organdan biopsi alarak dokunun histolojik yapısında meydana gelen değişiklikleri analiz etmektir. Diğer yöntem ise daha az girişimseldir ve nakledilen organı ilgilendiren biyokimyasal parametrelerin takibini içerir. Transplante edilen organdaki herhangi bir fonksiyonel bozukluk biyokimyasal parametrelerin değişmesine neden olacaktır. SOT'da rejeksiyonla ilgili bilgi verebilecek biyokimyasal parametre bildirilmiştir (Hickman, Potter, and Pesce 1997; Josephson 2011)

Cilt içeren KDA'da ise rejeksiyonun göstergesi olarak biyopsinin kullanımı oldukça yaygındır. Hatta cilt biyopsilerinden yapılan değerlendirmede rejeksiyonun bazı göstergeleri tanımlanmış ve klinikte de yaygın olarak kullanılan bir derecelendirme sistemi oluşturulmuştur (Cendales et al. 2008). Biyopsi ile rejeksiyonun tanınması yaklaşımı güncelliğini korumaktadır. Fakat bu invaziv bir işlemdir ve cilt bariyerinin bazı bölgelerde bozulmasına yol açar. Bu da transplantasyon hastalarının enfeksiyonlara açık hale gelmesini kolaylaştırır. Bu nedenle daha noninvaziv bir yöntemin bu takipte kullanılması oldukça önem taşımaktadır.

Canlı dokuda fonksiyon, kanlanma yani oksijenlenme ve ısı vardır. Bunların ölçülmesi yaşayabilirlikle ilgili bize fikir verecektir. Transplante edilen dokunun canlılığını değerlendirmek için bakılacak başka bir faktör de dokuya kapiller düzeyde gelen kan ya da oksijen miktarıdır. Şimdiye kadar literatürde organ ya da doku nakilleri sonrası takipte, oksijenlenmeyi ölçen sistemler tanımlanmıştır. Fakat bu sistemler bir bireyin kendi dokusunun yine kendi vücudunda bir defekte taşınması işleminin yani serbest fleplerin kanlanmasının takibinde kullanılmaktadır.

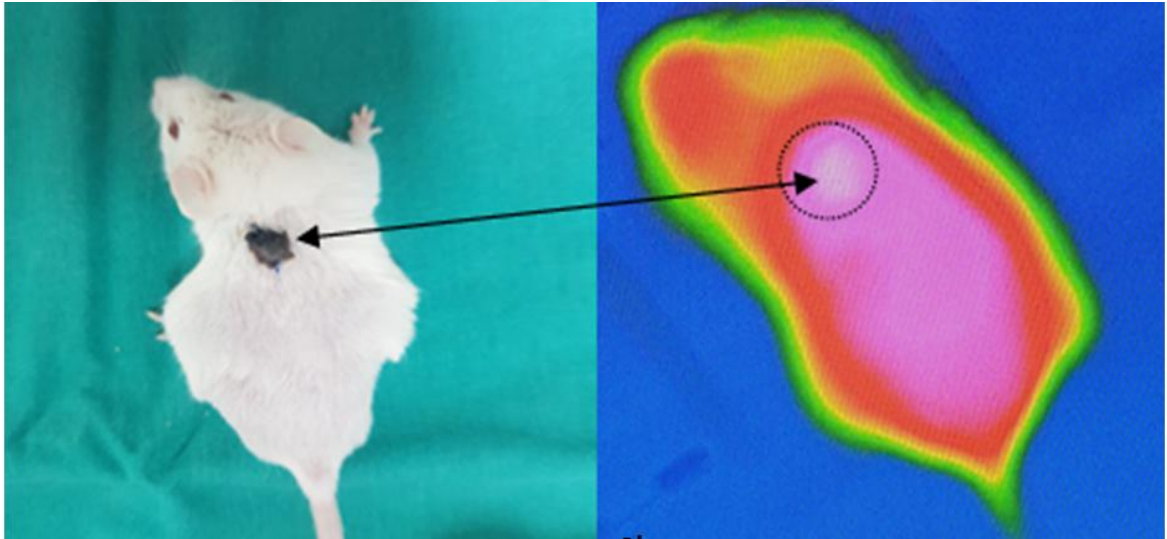
Sayısal termal görüntüleme (STG), kızılötesi tarama cihazı ile insan vücudunun oluşturduğu sıcaklığı algılayıp, termogram olarak isimlendirilen görüntülerin alınarak ileri teknolojiye sahip bilgisayarlar tarafından ön analizinin yapılmasına dayanan bir yöntemdir. İnsan vücudu etkili bir termal sistemdir ve kendi sıcaklığını regüle etme kapasitesine sahiptir. Bu regülasyon ve ısı üretimi aynı zamanda dokuya belli miktarda kan geldiğini ve dokunun canlı olduğunu gösterir. Özellikle rejeksiyon reaksiyonu sırasında dokuların kanlanması bozulmakta ve bu termoregülasyon yeterli şekilde yapılamamaktadır. Bu çalışmada bu prensipten yola çıkarak STG'yi cilt allogreftlerinin canlılığının takibinde kullandık.

Farelerde ek bir stres oluşturmamak adına tüm termal görüntüleme işlemi farelerin Selçuk Üniversitesi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'ndeki barınma odalarında gerçekleştirildi (**Şekil 2.33**). Termal kamera ile kayıt işlemi sırasında anestezi verilmedi. Greftlerin açıldığı 4.günden itibaren gün aşırı olacak şekilde kızılötesi görüntüleme sağlayan bir termal kamera (VarioCAM® HD head, InfraTec, Dresden/Germany) ile çekim yapıldı. Çekimlerde her fare, üzeri yeşil cerrahi örtü örtülmüş bir platforma alındı. Her çekimde kamera ile fare arasındaki

uzaklığı 50 cm olacak şekilde sabit tutan aynı yükseklikte platform kullanıldı. Farelerin platform üzerinde doğru pozisyonda olduğu IRBIS 3.1 plus programı (InfraTec GmbH, Dresden, Germany) üzerindeki görüntülerinden teyit edildi. Önce fareler sabit tutularak cilt allogreftinin yeri tespit edildi (**Şekil 2.34**). Daha sonra fareler serbest bırakılarak hareketli halde çekime devam edildi. Sabit ve hareketli çekimler toplamda 60 saniyelik süreyi kapsadı. Görüntülerden greft üzerinden yansıyan sıcaklığın ortalaması (GYSO) elde edildi. Farenin greft dışında kalan yüzey alanı 2 parçaya bölünerek (Genel 1, Genel 2) bu alanların toplamının ortalamasından da çevreden yansıyan sıcaklık ortalaması elde edildi (ÇYSO) (**Şekil 2.35**). Her ölçümde elde edilen GYOS ile ÇYSO'ları tek grafik üzerinde gösterilerek birbiri ile ilişkisi değerlendirildi ve makroskopik bulgular ile korelasyonu araştırıldı.



Şekil 2.33: VarioCAM® HD kamera ve IRBIS 3.1 plus programının kurulu olduğu ve anlık görüntülerin alınabildiği bilgisayar ile sayısal termal görüntülemenin yapıldığı alan



Şekil 2.35: IRBIS® üzerinde cilt allogreftinin (kırmızı ile taranmış daire şeklinde alan) ve çevreden yansıyan sıcaklık ortalamalarının (Genel 1 ve Genel 2) elde edilmesi

Biyokimyasal analiz için kan alma yöntemi

Literatürde allotransplante edilen cilt greftlerde rejeksiyon reaksiyonunun oluşma zamanı 10-13 gün arasında raporlanmıştır. Bu nedenle bu çalışmada biopsi ve biyokimyasal inceleme 10. günde yapıldı. Bunun nedeni hiçbir tedavi almayan 1. grupta rejeksiyon reaksiyonunun etkilerinin 10. günde gözle görülebilir seviyeye ulaşmasıydı. Biyokimyasal parametrelerde değerlendirilecek olan interleukin düzeylerinin biopsi alımı sırasındaki minör travmaya bağlı olarak değişebileceği öngörülerek 10. Günde biopsiden önce kan alma işlemi gerçekleştirildi. Kan alma işlemi genel anestezi altında farelerin orbital ven pleksuslarından yapıldı. Hematokrit tüpü kullanılarak ven pleksusları zedelendi ve kanın tüpe dolması sağlandı (**Şekil 2.36**). Her fareden ortalama 0.5 ml kan elde edildi.



Şekil 2.36: Orbital ven pleksusu kanülize edilerek kan eldesi yapılan Balb/c fare

2.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel Değerlendirme

Değerlendirme kriterleri kullanılarak elde edilen sonuçlar gruplar arasında anlamlı fark olup olmamasına göre SPSS (Statistical Package for SociSciences, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) 25.0 programı kullanılarak değerlendirildi. İstatistiksel olarak benzer gruplar arasında birbiri ile en benzerleri bulundu. Tüm gruplardan elde edilen verilerin değerlendirilmesinde 16 ayrı değerlendirme yapıldı.

1) Makroskopik bulgular olan **nekroz başlangıcı ve rejeksiyon zamanları (gün)** arasındaki fark **Anova testi** ile incelendi. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan ($\text{sig.}0.000 < p\text{-değeri} = 0.05$) analiz sonucuna göre gruplar **Tukey testi** ile kümelendi ve kendi içinde karşılaştırıldı.

2) Mikroskopik olarak **epitelizasyon ve Banff skorlaması** değerlendirilirken; gruplarda yer alan puanların ortalamaları arasındaki farka bakıldı. Buna göre H_0 hipotezi “ %95 güvenle, gruplar arası fark yok” şeklinde kuruldu, $p < 0,05$ ise H_0 reddedildi ve fark var şeklinde yorumlandı. **Box's test** sonucunda elde edilen p -değeri (0,906) 0,05 anlamlılık değerinden büyük çıktığından gruplar arasında kovaryans eşitliğinin sağlandığı görüldü ve **Manova test** istatistiği için **Wilk's Lambda**'nın kullanılabileceği görüldü. Çok değişkenli gruplar arasındaki etkiye yönelik test Wilk's Lambda sonucunda 6 farklı grup arasındaki ortalamalar p değeri (0,000) 0,05 anlamlılık düzeyinden küçük olduğundan istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Bu durumda, gruplar arasındaki farklılığa bakıldığında, bu farklılığın hangi ikili grup arasında oluştuğunu tespit etmek amacıyla **Bonferroni düzeltmesi** yapıldı. SK-A'nın böbrek ve karaciğer üzerindeki toksik etkileri için

(JGA hücre sayısı/JGA alanı, tübül hücre hasar skorlaması, portal infiltrasyon ve lobüler infiltrasyon miktarı) gruplar arasında farklılığın olup olmadığına bakıldı. **JGA hücre sayısı/JGA alanı** gruplar arası farklılığın olup olmadığı **Anova testi** ile belirlendi; p değeri (0,000) 0,05 anlamlılık düzeyinden küçük olduğundan anlamlı farklılığın olduğu görüldü ve **Bonferroni ikili karşılaştırmalar test** düzeltilmesi yapıldı. Gruplar arası yakınlık incelendi. **Tübül hücre hasar skorlaması, portal infiltrasyon ve lobüler infiltrasyon miktarı** değerlendirilirken **Manova çoklu karşılaştırma** testi yapıldı. Buna göre H0 hipotezi ‘’ %95 güvenle, gruplar arası fark yok’’ şeklinde kuruldu, **Box’s test** sonucunda elde edilen p-değeri (0,000) 0,05 anlamlılık değerinden küçük çıktığından gruplar arasında kovaryans eşitliğinin sağlanmadığı görüldü ve Manova test istatistiği için **Pillai’s Trace**’in kullanılabileceği görüldü. Bu durumda çok değişkenli gruplar arasındaki etkiye yönelik test Pillai’s Trace sonucunda 6 farklı grup arasındaki ortalamalar p değeri (0,000) 0,05 anlamlılık düzeyinden küçük olduğundan istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Bu durumda, gruplar arasındaki farklılığa bakıldığında, bu farklılığın hangi ikili grup arasında oluştuğunu tespit etmek amacıyla **Bonferroni düzeltmesi** yapıldı.

3) İmmünohistokimyasal olarak **Ki-67** ve **Bcl-2** değerlendirilirken; gruplarda yer alan puanların ortalamaları arasındaki farka bakıldı. Buna göre H0 hipotezi ‘’ %95 güvenle, gruplar arası fark yok’’ şeklinde kuruldu, $p < 0,05$ ise H0 reddedildi ve fark var şeklinde yorumlandı. **Box’s test** sonucunda elde edilen p-değeri (0,906) 0,05 anlamlılık değerinden büyük çıktığından gruplar arasında kovaryans eşitliğinin sağlandığı görüldü ve **Manova test** istatistiği için **Wilk’s Lambda**’nın kullanılabileceği görüldü. Çok değişkenli gruplar arasındaki etkiye yönelik test Wilk’s Lambda sonucunda 6 farklı grup arasındaki ortalamalar p değeri (0,000) 0,05

anlamlılık düzeyinden küçük olduğundan istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Bu durumda, gruplar arasındaki farklılığa bakıldığında, bu farklılığın hangi ikili grup arasında oluştuğunu tespit etmek amacıyla **Bonferroni düzeltmesi** yapıldı.

4) **STG bulgular** En az çekim sayısı 5 olduğundan 6 grup ilk 5 çekim sonuçları için değerlendirildi. Sıcaklıklar arasındaki istatistiksel farklılığın anlamına yönelik **Anova testi** yapıldı.

5) **Biyokimyasal incelemelerden elde edilen sonuçlar** 4 ayrı analiz ile değerlendirildi. Her grup için interlökin değerlerinin ortalaması elde edildi ve ortalamalar arasındaki farklılığa bakıldı. **Box's test** sonucunda elde edilen p değeri (0,000) 0,05 anlamlılık değerinden büyük çıktığından gruplar arasında kovaryans eşitliğinin sağlanmadığı görülmüş ve Manova test istatistiği için **Pillai's Trace** kullanılmıştır. Çok değişkenli gruplar arası etkiye yönelik bir test olan **Pillai's Trace**'in sonucunda 6 farklı grup arasında ortalama p değeri (0,000) 0,05 anlamlılık düzeyinden küçük olduğundan istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Farklılığın hangi 2 grup arasında oluştuğunu tespit etmek amacıyla **Bonferroni düzeltmesi** yapılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Makroskopik Değerlendirme Sonuçları

Grup 1’de makroskopik olarak tüm allogreftler 4. günde vaskülarize görünümdeydi. Renk değişikliği ve nekroz başlangıcı ortalama 10.günde (10, 9, 10, 11, 10. günler) gözlenirken, total rejeksiyon ortalama 12. Günde (12, 12, 12, 12, 12. günler) gözlendi (**Şekil 3.1**).

Grup 2’de; makroskopik olarak tüm allogreftler 4. günde vaskülarize görünümdeydi. Kurut oluşumu 4 farede ortalama 28. Günde gözlenirken çalışma sonuna kadar greftin %50 sini kapsayacak kadar artmadı (28, 29, 27, 29. günler) gözlenirken; bu grupta çalışma sonuna kadar allogreft kaybı gözlenmedi (**Şekil 3.2**).

Grup 3’de; makroskopik olarak tüm allogreftler 4. günde vaskülarize görünümdeydi. Renk değişikliği ve nekroz başlangıcı ortalama 11. günde (11, 10, 10, 11, 11, 12, 12. günler) gözlenirken, total rejeksiyon ortalama 13. günde (12, 13,14, 12, 13, 13, 14. günler) gözlendi (**Şekil 3.3**).

Grup 4’te; makroskopik olarak tüm allogreftler 4. günde vaskülarize görünümdeydi. Kurut oluşumu 4 farede ortalama 28. günde (28, 29, 29, 29. günler) gözlenirken çalışma sonuna kadar greftin %50 sini kapsayacak kadar artmadı. Cilt allogreftleri 30 gün boyunca yaşadı. Bu grupta çalışma sonuna kadar allogreft kaybı gözlenmedi (**Şekil 3.4**)

Grup 5’de; makroskopik olarak tüm allogreftler 4. günde vaskülarize görünümdeydi. Kurut oluşumu 5 farede ortalama 28. günde (29, 29, 29, 29, 28. günler) gözlenirken çalışma sonuna kadar greftin %50 sini kapsayacak kadar artmadı Bu grupta çalışma boyunca allogreft kaybı gözlenmedi (Şekil 3.5)

Grup 6’da; makroskopik olarak tüm allogreftler 4. günde vaskülarize görünümdeydi. Renk değişikliği ve nekroz başlangıcı ortalama 11. Günde (11, 11, 10, 11, 12, 11, 11. günler) gözlenirken, total rejeksiyon ortalama 13. Günde (12, 12, 15,13, 14, 13, 12. günler) gözlendi (Şekil 3.6)



Şekil 3.1: Grup 1’de cilt allogreftlerinin günlere göre değişimi



Şekil 3.2: Grup 2’de cilt allogreftlerinin günlere göre değişimi



Şekil 3.3: Grup 3’de cilt allogreftlerinin günlere göre değişimi



Şekil 3.4: Grup 4’de cilt allogreftlerinin günlere göre değişimi



Şekil 3.5: Grup 5’de cilt allogreftlerinin günlere göre değişimi

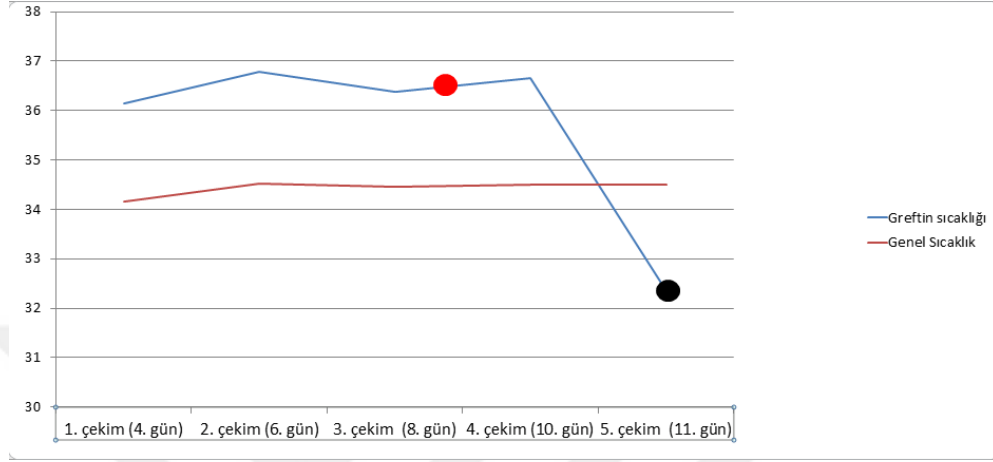


Şekil 3.6: Grup 6'da cilt allogreftlerinin günlere göre değişimi

3.2. Sayısal Termal Görüntüleme Değerlendirme Sonuçları

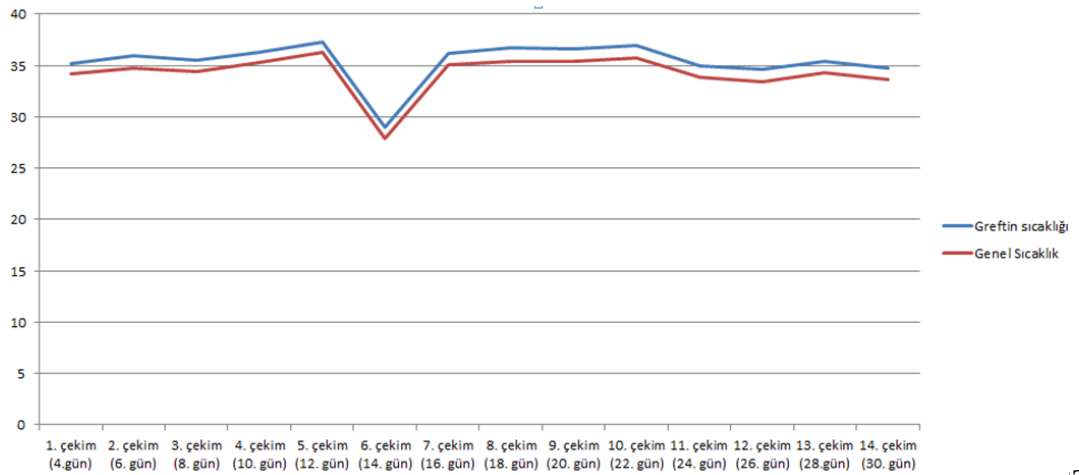
Grup 1'de; tüm allogreftlerin vaskülarize olduğu 4. gün ile 8. gün arasında GYOS ile ÇYOS birbirine paralel olarak seyretti. 8. Gün itibari ile nekrozun klinik olarak belirgin hale geldiği 10. güne kadar greft altında meydana gelen inflamatuvar olayı yansıtır biçimde GYOS ile ÇYOS arasındaki fark artmaya başladı. 10. gün itibari ile belirginleşen nekroz ile greft zeminden ayrılmaya başladı ve GYOS ÇYOS'ın altına düştü. Total red gerçekleşene kadar GYOS düşmeye devam etti.

Grafik 3.1: Kontrol grubunda GYSO ile ÇYSO ‘nın değişimini ve birbiri ile ilişkisini gösteren grafik (Kırmızı daire nekroz başlangıcını, siyah daire total reddi göstermektedir)



Grup 2’de; Makroskopik olarak; tüm allogreftler 4. günde vaskülarize görünümdeydi. Bu grupta allogreft kaybı gözlenmedi. 4. günden deneyin sonlandırıldığı 29. güne kadar GYOS ile ÇYOS birbirine paralel seyretti.

Grafik 3.2: Grup 2’de GYSO ile ÇYSO ‘nın değişimini ve birbiri ile ilişkisini gösteren grafik

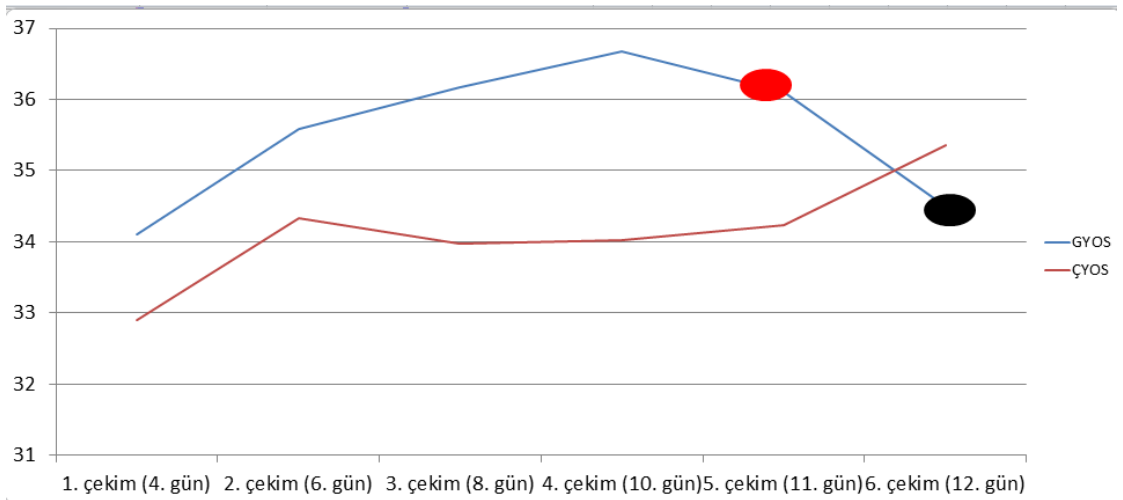


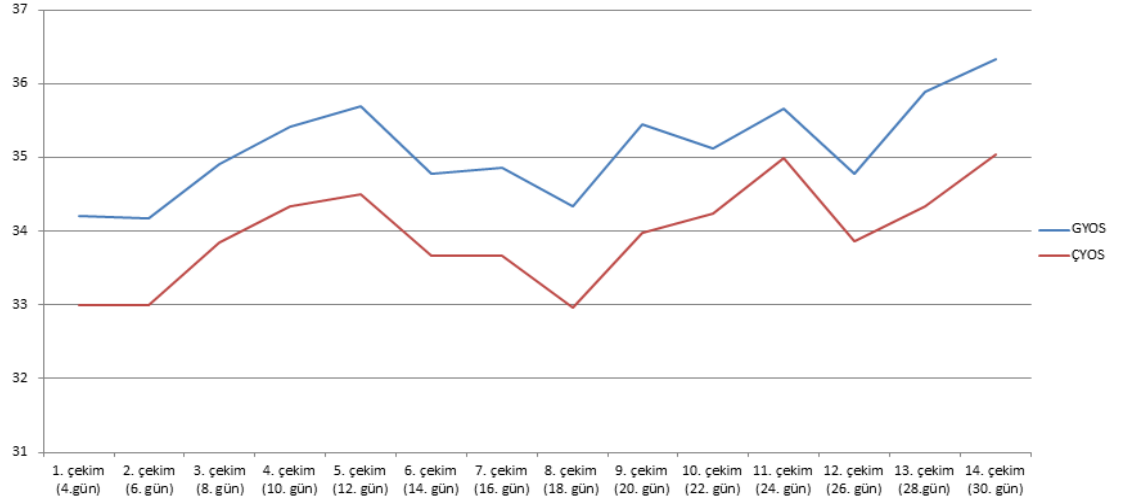
Grup 3'te tüm allogreftler 4 ve 8. Gün arasında vaskülarizeydi. Total rejeksiyonda GYOS ile ÇYOS arasındaki fark negatif değerlere ulaştı.

Grafik 3.3: Grup 3'de GYOS ile ÇYOS 'nın değişimi ve birbiri ile ilişkisini gösteren grafik (Kırmızı daire nekroz başlangıcını, siyah daire total reddi göstermektedir)

Grup 4'te; Grup 2'ye benzer şekilde makroskopik olarak; tüm allogreftler 4. günde vaskülarize görünümdeydi. Bu grupta allogreft kaybı gözlenmedi. 4. günden çalışmanın sonlandırıldığı 29. güne kadar GYOS ile ÇYOS birbirine paralel seyretti.

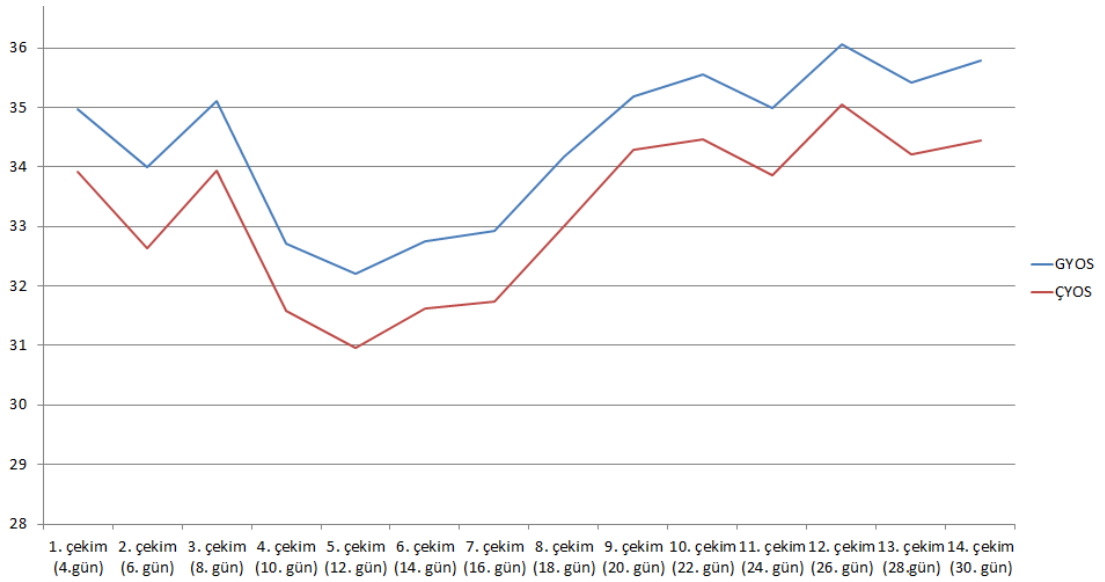
Grafik 3.4: Grup 4'te GYOS ile ÇYOS 'nın değişimini ve birbiri ile ilişkisini, gösteren grafik. (Kırmızı daire nekroz başlangıcını, siyah daire total reddi göstermektedir)





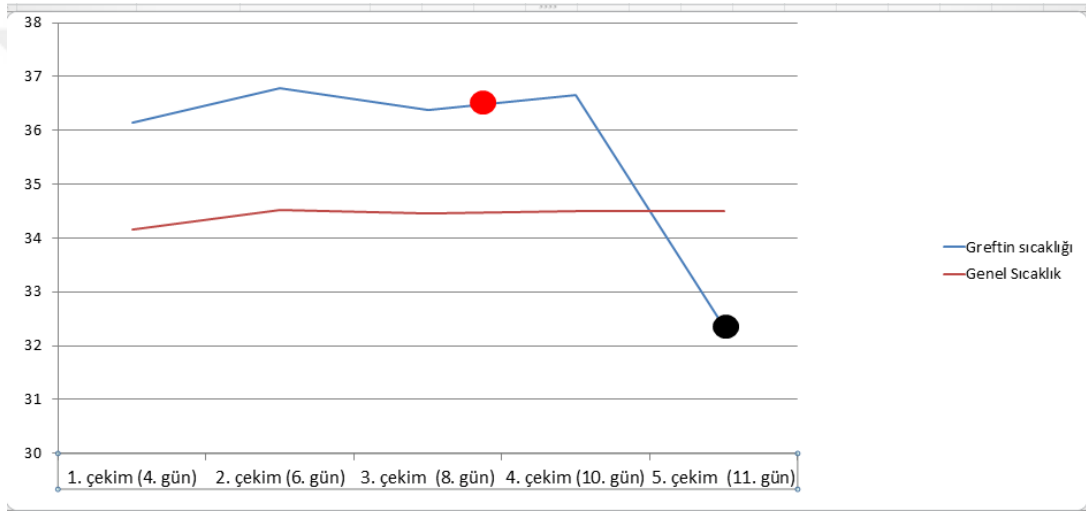
Grup 5'te; Grup 2'ye benzer şekilde makroskopik olarak; tüm allogreftler 4. günde vaskülarize görünümdeydi. Bu grupta allogreft kaybı gözlenmedi. 4. günden deneyin sonlandırıldığı 29. güne kadar GYOS ile ÇYOS birbirine paralel seyretti. Sıcaklık farkları 0,8-1,37°C arasındaydı.

Grafik 3.5: Grup 5'de GYOS ile ÇYOS 'nın değişimini ve birbiri ile ilişkisini gösteren grafik



6. grupta tüm allogreftlerde, vaskülarize oldukları 4. gün ile 9. gün arasında GYOS ile ÇYOS birbirine paralel olarak seyretti. Bu red reaksiyonunun başladığını gösterir biçimde inflamatuvar reaksiyonda artışı ve bazı farelerde daha erken rejeksiyonu temsil etti. 10. gün itibari ile nekrozun klinik olarak belirgin hale geldiği 11. güne GYOS ile ÇYOS arasındaki farkı arttı 11. gün itibari ile belirginleşen nekroz ile greft zeminden ayrılmaya başladı ve GYOS ÇYOS'ın altına düştü. Total red gerçekleşene kadar GYOS düşmeye devam etti.

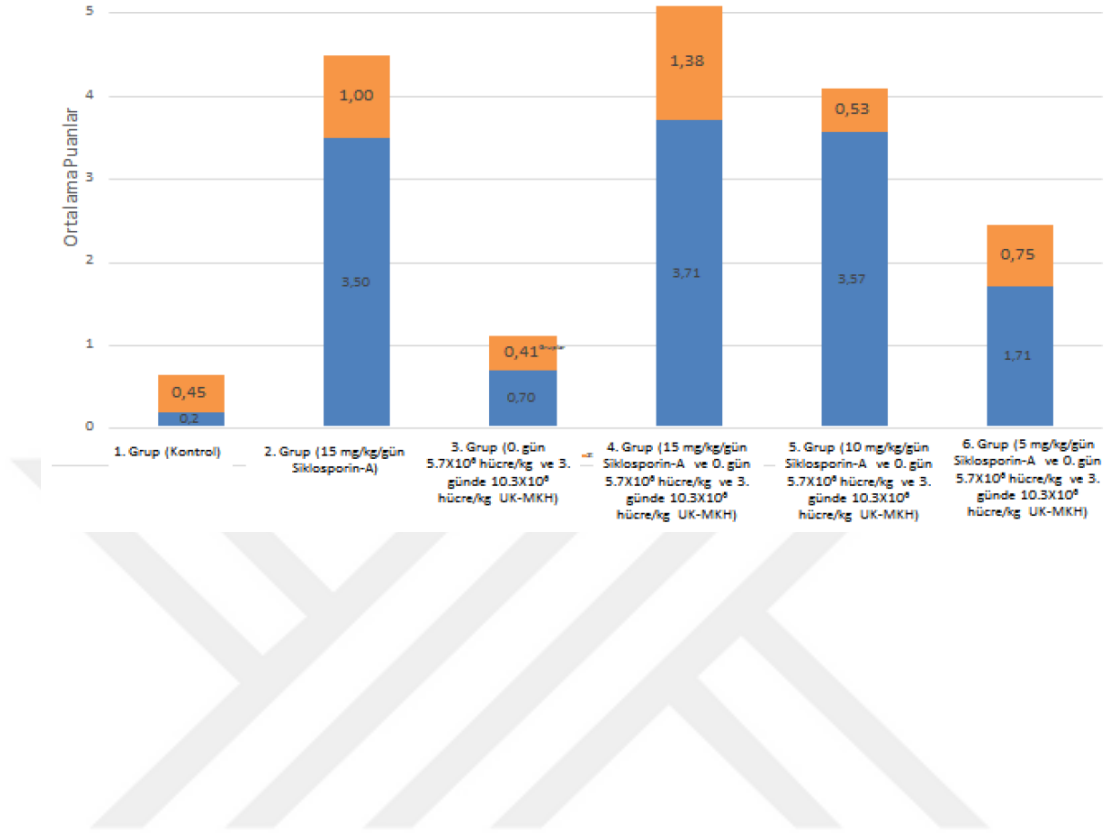
Grafik 3.6: Grup 6'da GYOS ile ÇYOS 'nın değişimini ve birbiri ile ilişkisini gösteren grafik



3.3. Mikroskopik Değerlendirme Sonuçları

Epitelizasyon sonuçları; Epitelizasyon kriterine göre; Grup 1; $(0,20 \pm 0,45)$, Grup 2; $3,50 \pm 1$, Grup 3; $0,70 \pm 0,41$, Grup 4; $3,71 \pm 1,38$, Grup 5; $3,57 \pm 0,53$ ve Grup 6; $1,71 \pm 0,75$ ortalama puana sahipti (**Grafik 3.7**). Epitelizasyon skoru Grup 1'de en düşüktü. Bu grubun ortalamasına en yakın gruplar 3 ve 6 idi. Grup 2, 4 ve 5' de epitelizasyon skorları yüksekti. Bunlar arasında en yüksek skora Grup 4 sahipti (**Tablo 3.1**).

Grafik 3.7: Tüm gruplardaki epitelizasyon değerlerinin ortalamaları ve standart sapmalarını gösteren grafi



Tablo 3.1: Tüm grupların epitelizasyon skorları

	1.grup	2.grup	3.grup	4.grup	5.grup	6.grup
1.Fare	1	4	1	4	4	2
2. Fare	0	4	0	4	4	2
3. Fare	0	4	0	3	4	2
4. Fare	0	3	1	4	3	1
5. Fare	0	3	0	4	3	2
6. Fare		3	0	4	3	1
7. Fare		4	3	3	4	2

Banff Derecelendirme sonuçları; Grup 1; $3,80 \pm 0,45$, Grup 2; $1,14 \pm 0,38$, Grup 3; $3,14 \pm 0,90$, Grup 4; $0,86 \pm 0,69$, Grup 5; $1,00 \pm 0,58$ ve Grup 6; $2,57 \pm 0,53$ ortalama puana sahipti (Grafik 3.8). Banff skorlarının en yüksek olduğu grup 1 idi. Bunu yalnızca kök hücre tedavisi alan Grup 3 ve 5 mg SK-A le beraber kök hücre alan Grup 6 izledi. Banff skorları Grup 2, 4 ve 5'te düştü. Bu gruplar arasında ise en düşük Grup 5 idi (**Tablo 3.2**).

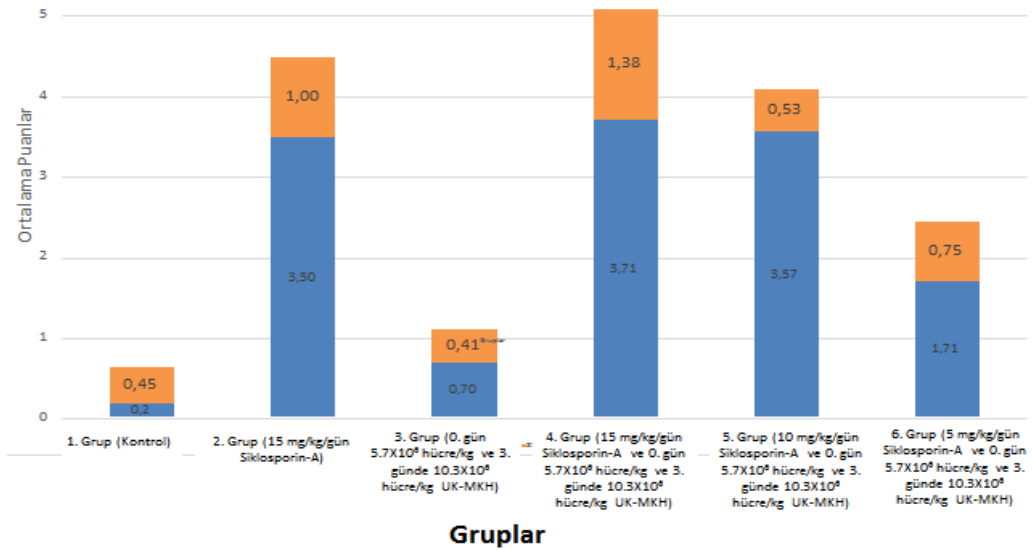
Grafik 3.8: Tüm grupların Banff skoru ortalamaları ve standart sapmalarını gösteren grafik

Tablo 3.2: Tüm grupların Banff skorları

	1.grup	2.grup	3.grup	4.grup	5.grup	6.grup
1.Fare	4	1	2	0	1	2
2.Fare	3	1	2	1	1	3
3.Fare	4	2	3	1	1	2
4.Fare	4	1	3	1	1	3
5.Fare	4	1	4	2	0	2
6.Fare		1	4	1	2	3
7.Fare		1	4	0	1	3

Dermoepidermal Ayrışma Sonuçları

Çalışmada cilt allogrefti epitelinde dermoepidermal ayrışmanın olup olmadığı değerlendirildi. Grup 1, 3 ve 6'nın tamamında dermoepidermal ayrışma gözlenirken;

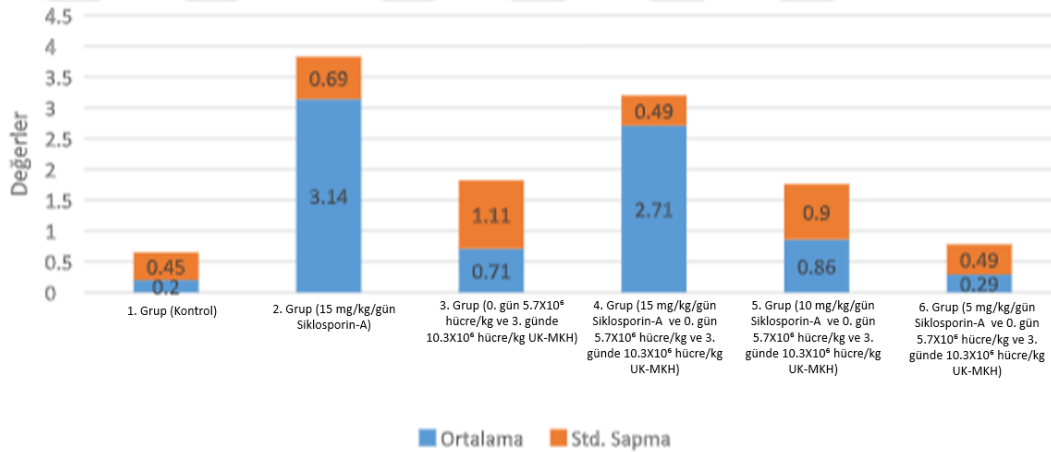


Grup 4 ve 5'te hiçbir farede gözlenmedi, Grup 2'de ise yalnızca 1 farede gözlemlendi.

Böbrek biyopsi sonuçları

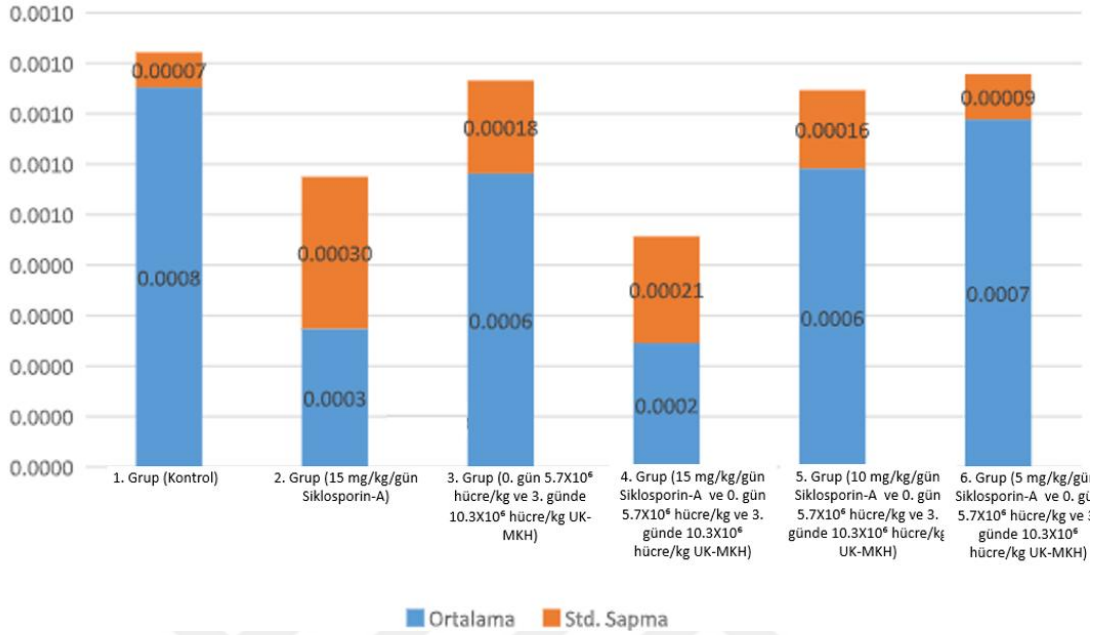
Böbrek proksimal tübül hücrelerinde iskemik değişiklikler ve nekroz varlığı araştırıldı. Tübül hücrelerin hasar skoruna göre; Grup 1; $0,2 \pm 0,45$, Grup 2; $3,14 \pm 0,69$, Grup 3; $0,71 \pm 1,11$, Grup 4; $2,71 \pm 0,49$, Grup 5; $0,86 \pm 0,9$ ve Grup 6; $0,29 \pm 0,49$ ortalama puana sahipti (**Grafik 3.9**). Elde edilen bulgulara göre; Grup 1’de tübül hücrelerde değişiklik görülmezken; Grup 2’de genellikle kortikal tübüllerin %50’sinden fazlasını kapsayan iskemik değişiklikler görülmüştür. Grup 3, 5 ve 6’da skor ortalamaları bakımından Grup 1 ile benzerdi. Grup 2 ise Grup 4 ile benzerdi (**Tablo 3.3**).

Grafik 3.9: Tüm grupların tübül hücre hasar skoru ortalamaları ve standart sapmalarını gösteren grafik



JGA hücrelerinde hiperplazi değerlendirilirken böbreğin subkortikal alanından rastgele seçilen 5 adet JGA için **Hücre sayısı/JGA alanı** (pixel cinsinden) hesaplandı. 15 mg/kg/gün dozunda SK-A alan gruplarda JGA hücre sayısının azaldığı saptandı (**Tablo 3.3**). Ortalama Hücre sayısı/JGA alanı; Grup 1’de; $0,0008 \pm 0,00007$, Grup 2’de; $0,0003 \pm 0,0003$, Grup 3; $0,0006 \pm 0,00018$, Grup 4’de; $0,0002 \pm 0,00021$, Grup 5; $0,0006 \pm 0,00016$ ve Grup 6; $0,0007 \pm 0,00009$ idi (**Grafik 3.10**).

Grafik 3.10: Tüm grupların tübül hücre hasar skoru ortalamaları ve standart sapmaları gösteren grafik



Tablo 3.3: Tüm grupların tübül hücre hasar skorları ve Ortalama Hücre sayısı/JGA alan ölçümlerini gösteren tablo

Gruplar		Böbrek JGA hücre sayısı sayısı/yüzey alanı					Tübül hücre hasar gradelemesi
1. Grup	1. Fare	.00072	0,000831	0,001031	0,000648	0,000724	1
	2. Fare	.000743	0,000662	0,000758	0,000571	0,00056	0
	3. Fare	.000782	0,000851	0,000745	0,000689	0,000709	0
	4. Fare	.00083	0,00098	0,000097	0,00078	0,00089	0
	5. Fare	.00087	0,00078	0,000887	0,000678	0,000986	0

2. Grup	1. Fare	.0005427	0,0007816	0,0004087	0,0004487	0,00001	3
	2. Fare	.0013168	0,0004431	0,0010373	0,000572	0,000561	3
	3. Fare	.000478	0,0005581	0,0004263	0,0004903	0,0005444	3
	4. Fare	.000023	0,0000132	0,0000273	0,00015	0,000061	2
	5. Fare	.000019	0,000034	0,0000023	0,000089	0,0000215	3
	6. Fare	.0000821	0,0000145	0,0000721	0,000028	0,0000145	4
	7. Fare	.0000623	0,0000512	0,0000413	0,00012	0,0000484	4
3. Grup	1. Fare	.000423	0,000526	0,000464	0,000563	0,000381	1
	2. Fare	.000143	0,000274	0,000555	0,000386	0,000264	0
	3. Fare	.000524	0,000734	0,000185	0,000278	0,000154	0
	4. Fare	.000982	0,000125	0,000784	0,000952	0,000653	1
	5. Fare	.000999	0,000845	0,000125	0,000789	0,000878	0

	6. Fare	.000875	0,000644	0,000875	0,000634	0,000734	0
	7. Fare	.000336	0,000875	0,000655	0,000765	0,000967	3
4. Grup	1. Fare	.000483695	0,000350506	0,000905775	0,000233882	0,000483473	3
	2. Fare	.000376335	0,000513316	0,00044381	0,000626107	0,000468179	2
	3. Fare	.000385484	0,001100684	0,00033356	0,000337037	0,0000154	3
	4. Fare	.000253	0,000012	0,0000284	0,0000734	0,0000414	3
	5. Fare	.0000178	0,0000453	0,000144	0,0000734	0,0000533	3
	6. Fare	.0002785	0,00004552	0,00002784	0,00006211	0,0000452	2
	7. Fare	.00005242	0,000014	0,0000341	0,0000231	0,000213	3
5. Grup	1. Fare	.00029414	0,00057608	0,00057369	0,00050028	0,00035774	2
	2. Fare	.00048541	0,00044571	0,00049124	0,00061643	0,00040064	2
	3. Fare	.00044725	0,0004552	0,00052574	0,00045766	0,00038959	1

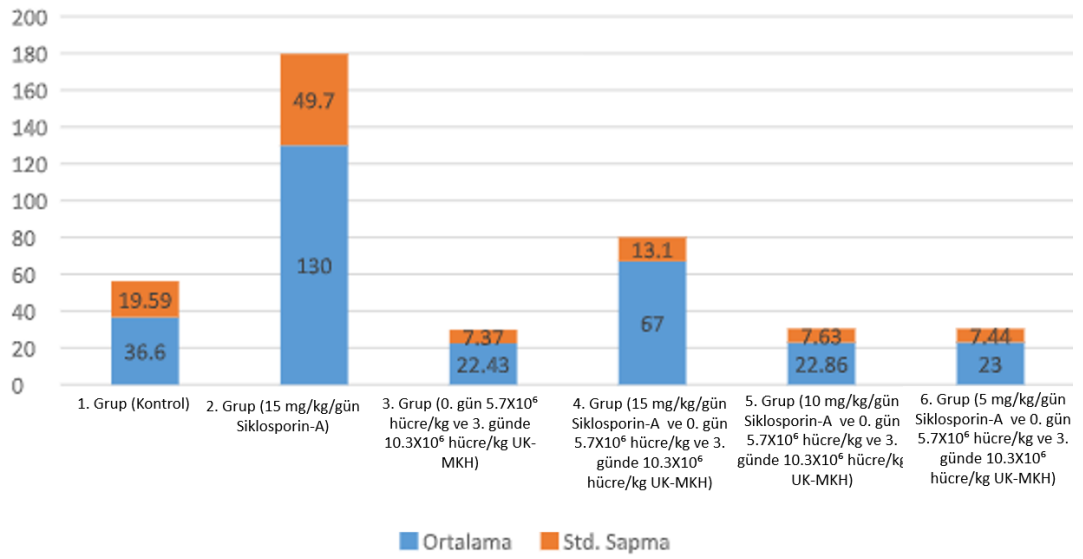
	4. Fare	.0009822	0,0005266	0,000845	0,000745	0,000675	1
	5. Fare	.000933	0,000585	0,0009945	0,0007386	0,0009265	0
	6. Fare	.0004577	0,0004997	0,000766	0,0003776	0,0003997	0
	7. Fare	.0008775	0,0006734	0,00006345	0,0007854	0,0008354	0
6. Grup	1. Fare	.00044058	0,00060342	0,00122357	0,00043344	0,00054964	0
	2. Fare	.0007554	0,000698	0,0005697	0,000845	0,0008345	0
	3. Fare	.0005987	0,00069875	0,000856	0,0008965	0,0005998	0
	4. Fare	.0008769	0,0008996	0,0004587	0,0008745	0,0005387	0
	5. Fare	.0006798	0,000879	0,0008796	0,00007564	0,000624	0
	6. Fare	.0006345	0,0007589	0,0006795	0,0008598	0,0005694	1

Portal alan ve lobüler infiltrasyon skorlaması

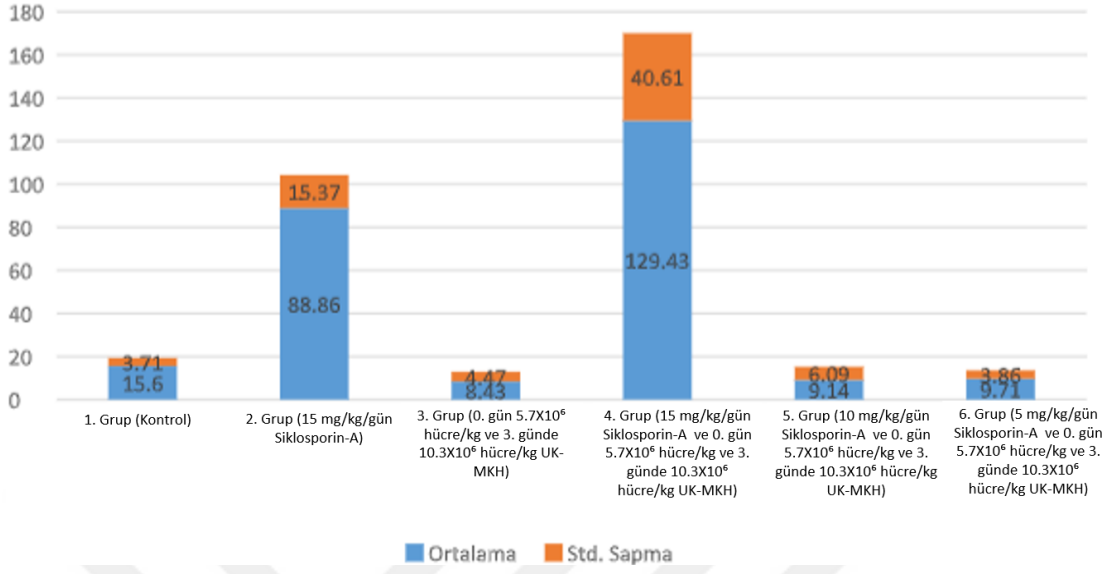
Rastgele seçilen 5 portal alanın inflamatuvar infiltrasyon miktarı ve 40x büyütmede periportal alandan seçilmiş tek bir parankim kesiti lenfosit infiltrasyonu bakımından değerlendirdi (**Tablo 3.4**). Portal infiltrasyon değerlendirmesine göre;

Grup 1; $15,6 \pm 3,71$, Grup 2; $88,86 \pm 15,37$, Grup 3; $8,43 \pm 4,47$ Grup 4; $129,43 \pm 40,61$, Grup 5; $9,14 \pm 6,09$ ve Grup 6; $9,71 \pm 3,86$ ortalama puana sahipti (**Grafik 3.11**). Parankim lenfosit infiltrasyonu değerlendirmesine göre; Grup 1; $15,6 \pm 3,71$, Grup 2; $88,86 \pm 15,37$, Grup 3; $8,43 \pm 4,47$ Grup 4; $129,43 \pm 40,61$, Grup 5; $9,14 \pm 6,09$ ve Grup 6; $9,71 \pm 3,86$ ortalama puana sahipti (**Grafik 3.12**).

Grafik 3.11: Tüm grupların portal alan inflamatuvar hücre sayısı ve standart sapmalarını gösteren grafik



Grafik 3.12: Tüm grupların lobüler infiltrasyon sayısı ve standart sapmalarını gösteren grafik



Tablo 3.4: Tüm grupların portal alan ve lobüler infiltratif hücre sayılarını gösteren tablo

Gruplar	Fare	1.portal alan	2.portal alan	3.portal alan	4.portal alan	5.portal Alan	Kc alan lenfosit miktarı
1. Grup	1. Fare	4	4	4	1	0	54
	2. Fare	3	5	5	0	2	11
	3. Fare	3	2	0	5	5	58
	4. Fare	0	0	3	2	8	34
	5. Fare	2	7	4	1	8	26
2. Grup	1. Fare	14	15	16	12	4	92

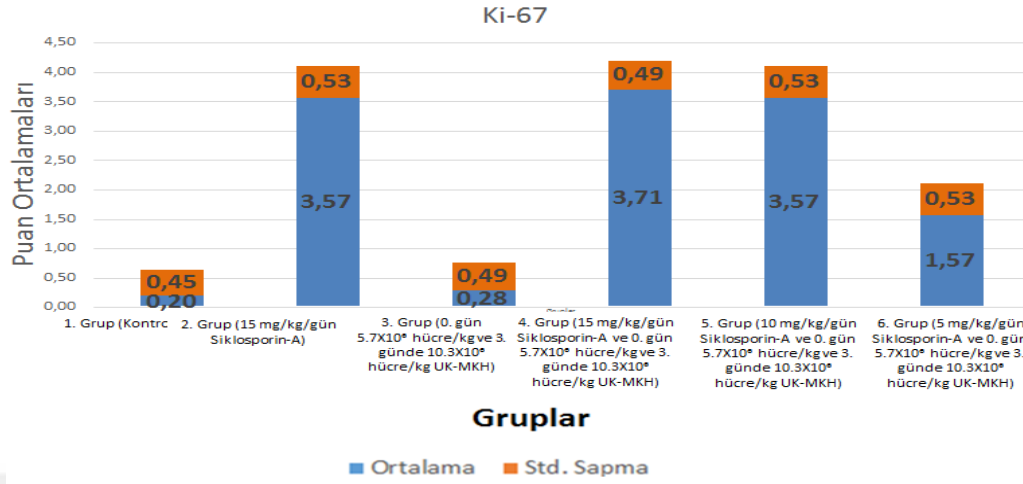
	2. Fare	18	15	20	8	21	34
	3. Fare	6	32	23	9	16	174
	4. Fare	23	21	16	19	31	153
	5. Fare	21	30	18	15	8	142
	6. Fare	19	27	24	21	9	162
	7. Fare	13	14	30	19	15	153
3. Grup	1. Fare	5	1	1	1	2	26
	2. Fare	2	0	0	1	0	32
	3. Fare	1	0	2	3	3	15
	4. Fare	4	5	2	2	3	23
	5. Fare	3	0	0	0	2	30
	6. Fare	1	1	2	0	1	13
4. Grup	7. Fare	2	4	2	1	2	18
	1. Fare	12	7	4	19	10	80
	2.	27	20	17	32	19	66

	Fare						
	3. Fare	24	30	14	25	57	74
	4. Fare	23	25	36	42	48	82
	5. Fare	42	36	33	16	26	48
	6. Fare	19	40	36	28	27	52
	7. Fare	34	20	24	12	22	67
5. Grup	1. Fare	12	3	2	1	1	30
	2. Fare	1	0	0	0	2	22
	3. Fare	2	3	2	1	2	12
	4. Fare	1	1	0	1	1	34
	5. Fare	2	5	3	2	1	21
	6. Fare	3	1	3	4	1	25
	7. Fare	1	1	1	0	0	16
6. Grup	1. Fare	2	3	6	0	0	24
	2. Fare	1	1	1	1	0	32

	3. Fare	1	4	1	2	2	31
	4. Fare	2	0	3	2	1	25
	5. Fare	1	5	2	5	3	22
	6. Fare	1	2	2	1	1	13
	7. Fare	2	3	3	3	1	14

Ki-67 kriterine göre; Grup 1; $0,20 \pm 0,45$, Grup 2; $3,57 \pm 0,53$, Grup 3; $0,28 \pm 0,49$, Grup 4; $3,71 \pm 0,49$, Grup 5; $3,57 \pm 0,53$ ve Grup 6; $1,57 \pm 0,53$ ortalama puana sahipti (**Grafik 3.13**) Ki-67 skoru en düşük Grup 1’de idi. Bunu Grup 3 ve 6 takip etti. HE ile boyanma sonuçlarına göre Grup 1 ve 3’ün ortalamaları Ki-67 derecelendirmesinde daha yakındı. HE sonuçlarında en iyi skorlara Grup 4 sahipken, Ki-67 skor ortalamasında Grup 2 ve 5’den daha düşüktü (**Tablo 3.7**).

Grafik 3.13: Tüm grupların Ki-67 skoru ortalamaları ve standart sapmalarını gösteren grafik

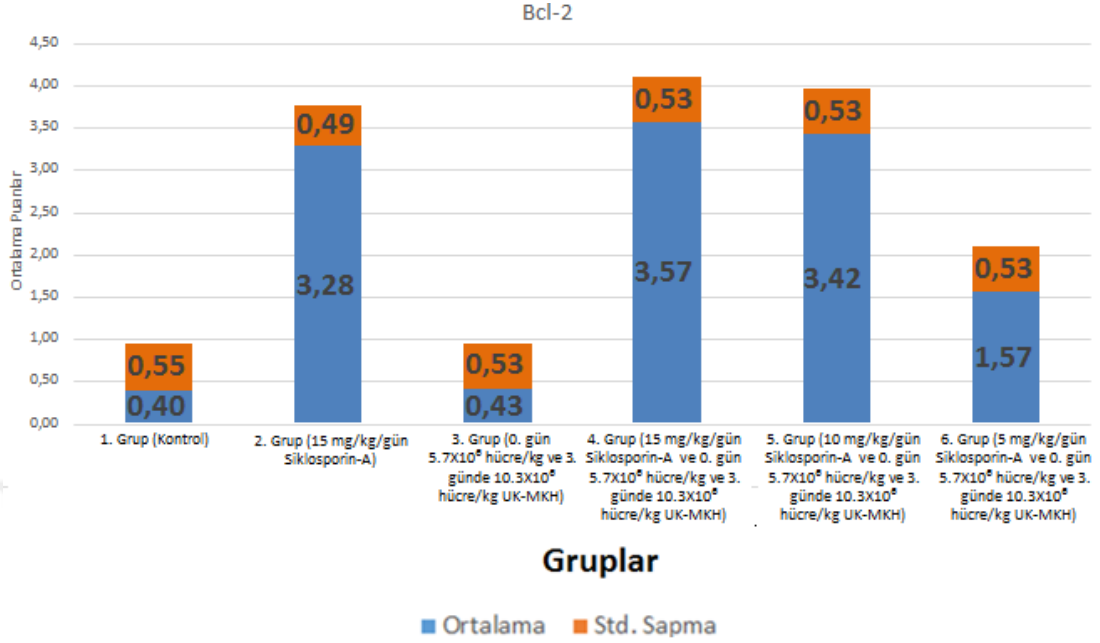


Tablo 3.7: Tüm grupların Ki-67 skorları

	1.grup	2.grup	3.grup	4.grup	5.grup	6.grup
1.Fare	1	3	0	3	4	2
2.Fare	0	4	0	4	4	1
3.Fare	0	4	1	4	4	2
4.Fare	0	4	0	4	3	2
5.Fare	0	4	1	4	3	1
6.Fare		3	0	4	3	2
7.Fare		3	0	3	4	1

Bcl-2 kriterlerine göre Grup 1; $0,40 \pm 0,55$, Grup 2; $3,28 \pm 0,49$, Grup 3; $0,43 \pm 0,53$, Grup 4; $3,57 \pm 0,53$, Grup 5; $3,42 \pm 0,53$ ve Grup 6; $1,57 \pm 0,53$ ortalama puana sahipti. (**Grafik 3.14**). Grup 2’ de Bcl-2 skorları en yüksekti bunu Grup 4 ve 5 izledi. En düşük skor Grup 1’de elde edildi. Grup 3 ortalaması Grup 1’e yakındı. (**Tablo 3.8**)

Grafik 3.14: Tüm grupların Bcl-2 skoru ortalamaları ve standart sapmalarını gösteren grafik



Tablo 3.8: Tüm grupların Bcl-2 skorlarını gösteren tablo

	1.grup	2.grup	3.grup	4.grup	5.grup	6.grup
1.Fare	0	4	0	3	3	1
2.Fare	0	3	1	3	4	1
3.Fare	1	3	0	4	3	2
4.Fare	0	4	0	4	3	2
5.Fare	1	3	1	4	4	2
6.Fare		3	1	4	3	1
7.Fare		3	0	3	4	2

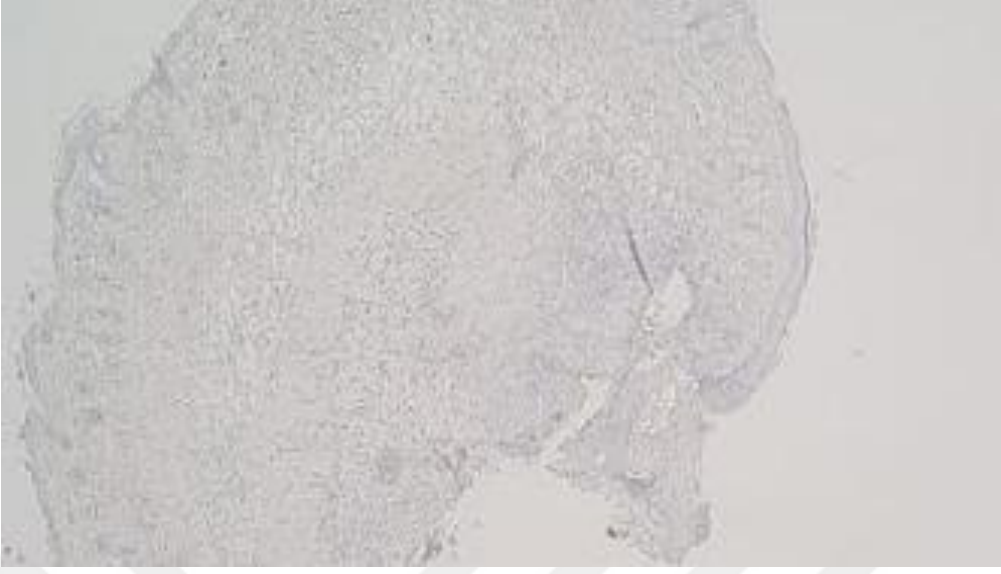
CD4, CD8, NK ve DH Antikoları; bu hücrelerin gösterilmesine yönelik olarak kullanılan antikorlar, cilt allogrefti örneklerinde hiçbir yapıyı boyayamadığından hücre sayımı ve istatistiksel anlamlılığı değerlendirilemedi. (Şekil 3.7, Şekil 3.8, Şekil 3.9, Şekil 3.10).



Şekil 3.7: CD 4 antikor kullanılarak elde edilen boyanma miktarı



Şekil 3.8: CD 8 antikor kullanılarak elde edilen boyanma miktarı



Şekil 3.9: NK antikoru kullanılarak elde edilen boyanma miktarı

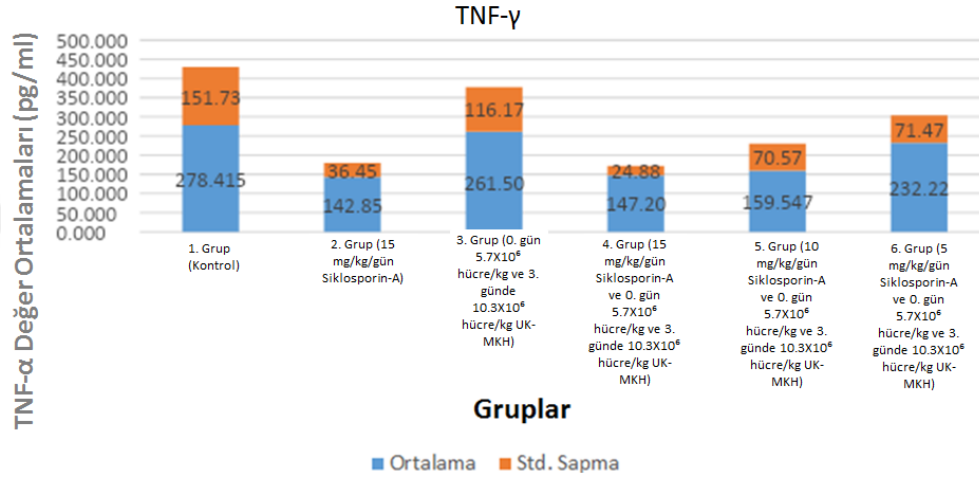


Şekil 3.10: DH antikoru kullanılarak elde edilen boyanma miktarı

3.4. Biyokimyasal Değerlendirme Sonuçları

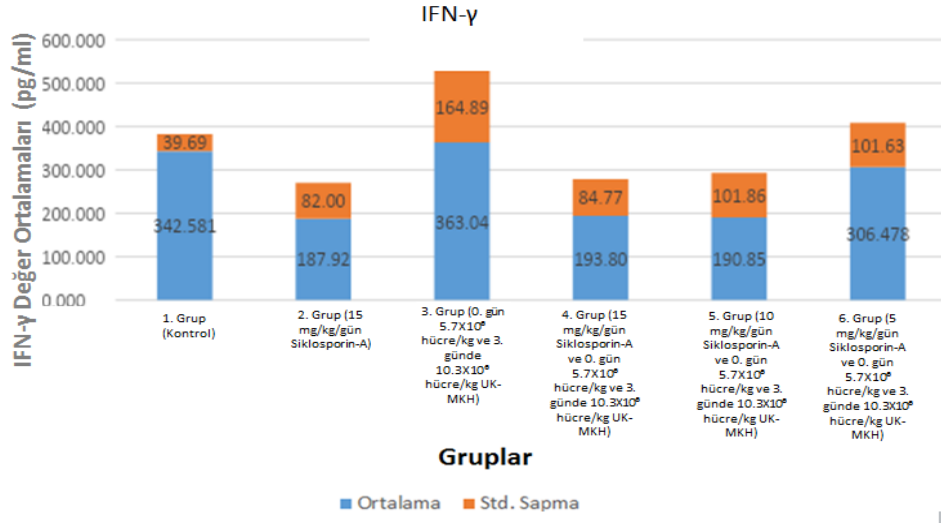
TNF- α ; Ortalama TNF- α değerleri, Grup 1’de; 278,415±151,73 pg/ml, Grup 2’de; 142,85±36,45 pg/ml, Grup 3’de; 261,50±116,17 pg/ml, Grup 4’de; 147,20±24,88 pg/ml, Grup 5’de; 159,55±70,57 pg/ml ve Grup 6’da; 232,22±71,47 pg/ml idi (**Grafik 3.15**) (**Tablo 3.9**).

Grafik 3.15: Tüm grupların TNF- α düzey ortalamaları ve standart sapmaları gösteren grafik



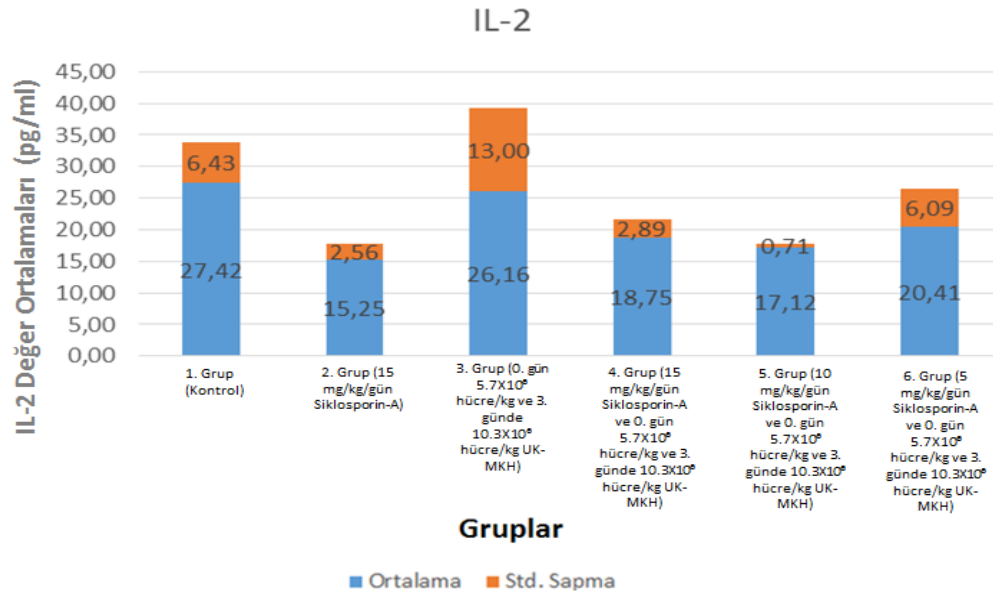
IFN- γ ; Ortalama IFN- γ düzeyleri; Grup 1’de; 342,581±39,69 pg/ml, Grup 2’de; 187,92±82,00 pg/ml, Grup 3’de; 363,04±164,89 pg/ml, Grup 4’de; 193,80±84,77 pg/ml, Grup 5’de; 190,85±101,86 pg/ml ve Grup 6’da 306,478±101,63 pg/ml idi (**Grafik 3.16**) (**Tablo 3.9**).

Grafik 3.16: Tüm grupların IFN- γ düzey ortalamaları ve standart sapmalarını gösteren grafik



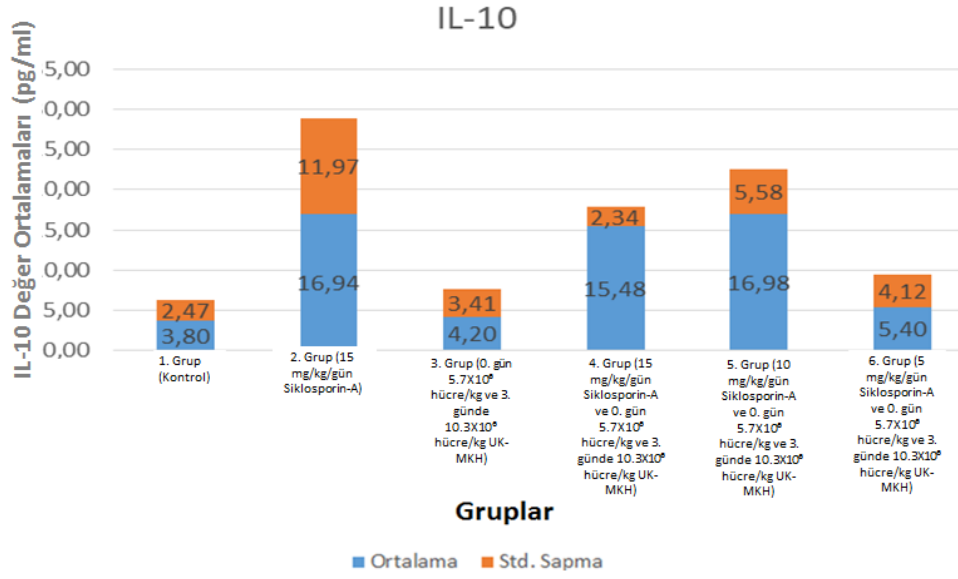
15,25±2,56
Grup 5’de
0 3.9).

Grafik 3.17: Tüm grupların IL-2 düzey ortalamaları ve standart sapmaları gösteren grafik



IL-10; Ortalama IL-10 düzeyleri Grup 1’de; 3,80±2,47 pg/ml, Grup 2’de; 16,94±11,97 pg/ml, Grup 3’de; 4,20±3,41 pg/ml, Grup 4’de; 15,48±2,34 pg/ml, Grup 5’de; 16,98±5,58 pg/ml ve Grup 6’da; 5,40±4,12 pg/ml idi. (Grafik 3.18) (**Tablo 3.9**).

Grafik 3.18: Tüm grupların IL-10 düzey ortalamaları ve standart sapmaları gösteren grafik



Tablo 3.9: Tüm gruplarda grupların TNF- α , IFN- γ , IL-2 ve IL-10 seviyesini gösteren tablo

	<u>IFNγ (pg/ml)</u>	<u>TNFα(pg/ml)</u>	<u>IL2(pg/ml)</u>	<u>IL 10(pg/ml)</u>
1. GRUP				
1. Fare	400,875	550,441	27,465	0,752
2. Fare	313,162	412,474	23,105	3,04
3. Fare	300,027	275,717	38,182	7,394
4.Fare	341,26	153,443	26,428	4,774
5.Fare	357,581	278,415	21,940	3,04
2. GRUP				
1. Fare	251,443	207,359	13,25	8,384
2. Fare	160,012	142,85	15,256	16,9418
3. Fare	164,5	158,707	17,82	33,764
4.Fare	335,977	140,313	11,409	8,527
5.Fare	97,284	101,058	14,838	33,764
6.Fare	118,332	100,785	18,963	6,27
7.Fare	187,892	148,878	15,214	10,9292
3. GRUP				
1. Fare	366,901	188,867	12,504	1,456
2. Fare	359,796	261,5	14,037	3,072
3. Fare	673,274	489,112	51,402	2,569
4.Fare	232,996	244,929	26,725	2,816
5.Fare	201,296	122,571	26,16	11,087
6.Fare	244,858	215,348	30,746	2,075

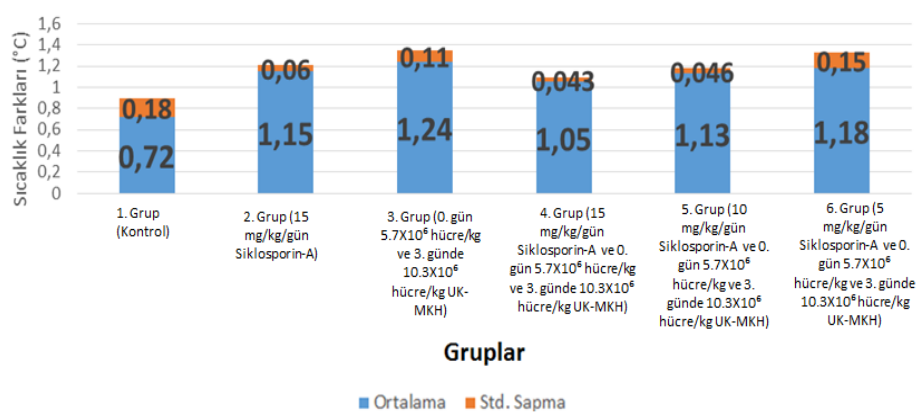
7.Fare	462,186	308,173	21,546	6,325
4. GRUP				
1. Fare	50,698	127,068	18,756	15,771
2. Fare	283,413	162,718	17,585	17,378
3. Fare	212,552	168,564	14,58	17,405
4.Fare	225,692	173,828	24,231	15,771
5.Fare	196,645	103,823	18,628	11,099
6.Fare	112,456	143,941	19,512	17,246
7.Fare	275,1524	150,458	17,958	13,69
5. GRUP				
1. Fare	238,088	180,325	16,581	13,329
2. Fare	289,747	84,716	17,117	11,521
3. Fare	190,85	99,925	17,599	21,112
4.Fare	44,717	273,152	17,173	21,965
5.Fare	256,23	114,356	18,223	10,245
6.Fare	264,173	228,661	17,139	16,245
7.Fare	52,145	135,694	15,987	24,443
6. GRUP				
1. Fare	320,408	283,254	17,326	8,11
2. Fare	219,847	232,22	24,504	3,841
3. Fare	516,919	232,22	11,938	3,163
4.Fare	302,326	240,761	29,886	13,699
5.Fare	210,308	158,176	20,41	2,768
6.Fare	291,319	133,664	15,348	3,763
7.Fare	284,217	345,245	23,458	2,456

3.5. İstatistiksel Analiz Sonuçları

Makroskopik değerlendirilmede; nekroz başlangıç ve total rejeksiyon zamanı değerlendirildi. **Anova testi** ile nekroz başlangıç günleri ve total rejeksiyon zamanları arasındaki istatistiksel anlam araştırıldı ve en benzer grupları bulabilmek için **Tukey karşılaştırma testi** yapıldı. Anova testinde hem nekroz başlangıç günleri hem de total rejeksiyon zamanları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılığın olduğu gözlemlendi (sig.= 0.000<p-value= 0.05). Tukey karşılaştırma testinde her iki kriter için kontrol grubu olan Grup 1 ile Grup 3. ve 6 kendi arasında; Grup 2, 4. ve 5'in de kendi arasında benzer olduğu görüldü.

Sayısal Termal Görüntülemeye; tüm farelerde ilk 5 çekim yapıldı bundan sonra çekim sayıları gruplar ve fareler arasında farklılık gösterildi. Normalde gün aşırı yapılan çekimlere, rejeksiyon süreci başlayan farelerde günlük olacak şekilde devam edildi. Bu yüzden istatistiksel değerlendirmede ilk 5 çekim 6 grup için de değerlendirildi. Anova testi ve Bonferroni düzenlemesi ile elde edilen 5 çekim değerlendirmesine göre; Grup 1 ile diğer gruplar karşılaştırıldığında ortalama sıcaklık farkı değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamasına rağmen ($p<0,05$) Grup 1 sıcaklık farkı değeri tüm gruplardan daha düşüktü (Grafik 3.19). Grup 1’de bulunan farelerde ilk 5 çekim içerisinde total rejeksiyon gerçekleştiğinden dolayı sıcaklık farkları eksi değerlere düştü ve en düşük bu gruptaydı. Grup 2 ile Grup 3, 4, 5 ve 6’nın ortalama sıcaklık farkı değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$).

Grafik 3.19: Her grupta GYSO ile ÇYSO arasındaki fark ve standart sapmalarını gösteren grafik



Bu gruplar arasında Grup 3 ve 6’da son çekimlerde gelişen ani sıcaklık düşmeleri istatistiksel değerlendirmeyi etkileyememiştir. Bunun nedeni ise bu gruplara verilen UK-MKH ve 5mg/kg/gün SK-A ile beraber UK-MKH’nin ilk günlerde rejeksiyonun geciktirilmesinde etkin olmasına ve ilk çekimlerde oluşan

sıcaklık farklarının rejeksiyon olmayan gruplardaki sıcaklık farkları ile benzer olmasına bağlanmıştır.

Mikroskopik bulguların istatistiksel değerlendirme sonuçları

Epitelizasyon sonuçları;

Grup 1 ile Grup 2, 4, 5 ve 6'nın ortalamaları arasında anlamlı fark bulunurken Grup 1 ile Grup 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.

Grup 2'de yer alan farelerin epitelizasyon değerlerine bakıldığında, Grup 2 ile Grup 1, 3 ve 6'nın ortalama değerleri arasındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü. Grup 2 ile Grup 1 ve Grup 2 ile Grup 3 epitelizasyon skorlarına göre ortalama puan olarak birbirine benzer değildi ve Grup 2 ortalamaları Grup 6, 3 ve Grup 1 değerlerinden yüksekti. Grup 2 ile Grup 4, Grup 2 ile Grup 5 ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu. Kontrol grubu ile Grup 3 ve 6'nın epitelizasyon skorlarının birbirine benzer olması tek başına UK-MKH enjeksiyonu ve 5 mg SK ile UK-MKH enjeksiyonunun rejeksiyonu önlemede yetersiz kaldığını göstermiştir. Grup 5'in yüksek skora sahip olması minimal etkin dozun altındaki SK dozu (10 mg) ile UK-MKH'nin sinerjistik etkisini göstermektedir.

Banff Derecelendirme sonuçlarının değerlendirilmesi için Box's Kovaryans Matrislerinin Eşitlik Testi ve Bonferroni düzeltmesi yapılarak gruplar arası fark tespit edildi ve bunun istatistiksel anlamlılığına bakıldı. Grup 1 ile 2, 4, 5 ve 6 arasında anlamlı fark bulunurken; Grup 1 ile Grup 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.

Grup 2 ile Grup 1, 3 ve 6'nın ortalama değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı. Grup 2 ortalamaları Grup 6, Grup 3 ve Grup 1 ortalamalarından dūşüktü. Grup 2 ile Grup 4, Grup 2 ile Grup 5 ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu. Rejeksiyonun direk göstergesi olan Banff skorlamasında Grup 2, 4 ve 5'in düşük skora sahip olması bu gruplarda belirgin derecede rejeksiyon reaksiyonunun gerçekleşmediğini göstermektedir

Böbrek JGA hücre sayısı/çapı değerlendirme sonuçlarında Grup 1 ile Grup 3, Grup 1 ile Grup 5 ve Grup 1 ile Grup 6 ortalamaları arasında anlamlı bir farklılığın bulunmadığı görüldü ($p>0,05$). Grup 1 ile Grup 2 ve Grup 1 ile Grup 4 ortalamaları arasında anlamlı fark bulundu ($p<0,05$). Grup 1'in ortalama puanı Grup 2 ve Grup 4'den daha yüksekti.

Grup 2 ile Grup 1 ve Grup 6 ile Grup 5'in ortalamaları arasında anlamlı fark bulundu ($p<0,05$). Grup 2 ortalama JGA hücre sayısı/çapı Grup 1, Grup 6 ve Grup 5'in değerlerinden dūşüktü. Grup 4 ile Grup 2 ortalamaları arasında anlamlı bir fark bulunmazken ($p>0,05$); Grup 4 ile Grup 1, Grup 3, Grup 5 ve Grup 6'nın ortalamaları arasında fark bulundu ($p<0,05$). Grup 4 JGA hücre sayısı/çapı ortalama değerinin Grup 1, Grup 3, Grup 5 ve Grup 6 değerlerinden düşük olduğu görüldü. Grup 2 ve 4'ün ortalamaları arasında anlamlı bir fark bulunamaması 15 mg/kg/gün SK-A alan farelerde akut böbrek toksisitesinin oluştuğunu göstermekte ve Grup 4'ün Grup 2'ye ek olarak aldığı UK-MKH'de bu toksisiteyi anlamlı derecede azaltmamaktadır. Grup 5'in ortalamasının Grup 1'e benzer olması 10mg/kg/gün SK-A'nın akut böbrek toksisitesine neden olmayacak kadar düşük doz olduğunu gösterdi.

Böbrek tübül hücre hasarı değerlendirmesinde Grup 1 ile Grup 3, 5 ve 6 arasında anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$). Grup 1 ile Grup 2, Grup 1 ile Grup 4, ortalamaları arasında anlamlı fark bulundu ($p<0,05$). **Böbrek tübül hücre** hasarının Grup 2' de Grup 1 ve Grup 4'e göre daha fazla olduğu görüldü.

Grup 2 ile Grup 4 ortalamaları arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$). Grup 2 ile Grup 1, Grup 2 ile Grup 3, Grup 2 ile Grup 5 ve Grup 2 ile Grup 6, ortalamaları arasında anlamlı fark bulundu ($p<0,05$). Grup 2 değeri Grup 1, Grup 3, Grup 5 ve Grup 6 değerlerine göre daha yüksekti.

Grup 4 ile Grup 2 ortalamaları arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$). Grup 4 ile Grup 1, Grup 4 ile Grup 3, Grup 4 ile Grup 5 ve Grup 4 ile Grup 6 ortalamaları arasında anlamlı fark bulundu ($p<0,05$). Grup 4 ortalama değerinin Grup 1, Grup 3, Grup 5 ve Grup 6 ortalama değerlerine göre daha yüksek olduğu görüldü. Bu bulgular JGA hücre sayısı/çapı değerlendirmesi ile elde edilen sonuçlarla benzer olup; 10 mg/kg/gün SK-A'nın akut dönemde böbrek toksisitesine neden olmadığını göstermiştir.

5 portal alanın değerlendirmesinde Grup 1 ile Grup 3, Grup 1 ile Grup 5 ve Grup 1 ile Grup 6 ortalama hücre sayıları arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$). Grup 1 ile Grup 2, Grup 1 ile Grup 4, arasında anlamlı bir fark bulundu ($p<0,05$). Grup 1'in 5 portal alandaki ortalama inflamatuvar hücre infiltrasyon sayısı Grup 2 ve Grup 4'den düşüktü. Grup 4'te portal infiltrasyon Grup 1 ve Grup 2'ye göre daha fazlaydı. (p Grup 4: 0,004> p Grup 2 ve p Grup 1: 0,000)

Grup 2 ile Grup 1, Grup 2 ile Grup 3, Grup 2 ile Grup 4, Grup 2 ile Grup 5 ve Grup 2 ile Grup 6 ortalama hücre sayıları arasında anlamlı bir farklılığın olduğu görüldü ($p<0,05$). Bu durumda karaciğer portal alandaki ortalama hücre sayılarının incelenmesi sonucunda Grup 2 değeri Grup 4'den daha düşükken Grup 1, Grup 3, Grup 5 ve Grup 6'dan daha yüksekti. Grup 1 ile Grup 5 arasında anlamlı fark olmaması 10mg/kg/gün SK-A'nın akut dönemde karaciğer toksisitesini yapmadığını göstermektedir. Grup 2 ve Grup 4'ün birbirine benzer olması 15mg/kg/gün SK-A'nın akut dönemde karaciğer toksisitesine neden olduğunu göstermiştir. Grup 4'ün Grup 2'ye ek olarak aldığı UK-MKH'de bu toksisiteyi anlamlı derecede azaltmamıştır.

Periportal lobüler alanın lenfosit infiltrasyon değerlendirmesinde Grup 1 ile Grup 3, Grup 1 ile Grup 4, Grup 1 ile Grup 5 ve Grup 1 ile Grup 6 ortalama hücre sayıları arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$). Grup 1 ile Grup 3, Grup 4, Grup 5 ve Grup 6 ortalaması birbirine benzerdi. Grup 1 ile Grup 2 ortalaması arasında anlamlı fark bulundu ($p<0,05$). Grup 1 ortalama değerinin Grup 2 değerinden düşük olduğu görüldü.

Grup 2 ile Grup 1, Grup 2 ile Grup 3, Grup 2 ile Grup 4, Grup 2 ile Grup 5 ve Grup 2 ile Grup 6 ortalama lenfosit hücre sayıları arasında anlamlı bir fark bulundu ($p<0,05$). Grup 2 ortalama değeri Grup 1, Grup 3, Grup 4, Grup 5 ve Grup 6 'ya göre daha yüksekti. Bu bulgular 5 portal alanın değerlendirmesinden elde edilen bulgularla örtüşmekteydi. Farklı olarak ise Grup 4'ün Grup 2'ye benzer olmadığı görüldü. Karaciğerde histopatolojik ilaçlara bağlı histopatolojik değişiklikler portal alandan başlayarak lobüllere doğru ilerler. Grup 4'te portal alan etrafındaki

inflamasyon Grup 2'den farklı çıkmamasına rağmen lobüler infiltrasyon daha azdır. Bu da UK-MKH'nin karaciğer üzerinde koruyucu etkisi olduğunu gösterdi.

Histopatolojik İnceleme Sonuçları;

Bcl-2 skorları değerlendirildiğinde Grup 1 ile Grup 2, 4, 5, 6'nın ortalamaları arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p<0,05$). Grup 1 ile Grup 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$).

Grup 2 ile Grup 1, 3, 6 ortalama değerleri arasındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü. Grup 2 ile Grup 4 ve 5'in ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığı görüldü. Grup 2 değerine en yakın değerlerin Grup 5'te olduğu saptandı. (p Grup 5:1,000> p Grup 2=0,618). Bu bulgular bize 15mg/kg/gün dozunda SK-A'nın ciltte normal hücre siklusunu etkilemediğini gösterdi. Grup 2 değerine en yakın değerlerin Grup 5'te elde edilmesi SK-A dozunu düşürdüğümüz bu grupta normal hücre siklusunu etkileyecek başka bir faktör olan rejeksiyon reaksiyonunun gelişmediğini göstermiştir. Bu da SK-A dozunun düşürülmesine karşın UK-MKH'nin bunu destekleyecek şekilde immünsupresif etki yaptığını kanıtlamıştır.

Ki-67 skorları değerlendirildiğinde Grup 1 ile Grup 2, 4, 5 ve 6'nın ortalamaları arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p<0,05$). Grup 1 ile Grup 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$).

Grup 2 ile Grup 1, 3 ve 6'nın ortalama değerleri arasındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü. Grup 2 ile 1, 3 ve 6. Grupların Ki-67 skorlarına göre ortalama puanları birbirine benzer değildi. Grup 2 ortalamaları Grup 3, Grup 1 ve Grup 6 değerlerinden yüksekti. Grup 2 ile Grup 5 ve Grup 4

ortalamları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü. Bu gruplar arasında birbirine en fazla benzeyen gruplar ise Grup 4 ve 5 idi. (p Grup 5: 1,000, p Grup 4:1,000). Grup 2 değerine en yakın değerin Grup 4 ve Grup 5'te elde edilmesi SK-A dozunu düşürdüğümüz Grup 5'te normal hücre siklusunu etkileyecek rejeksiyon reaksiyonunun gelişmediğini göstermiştir. Bu da SK-A dozunun düşürülmesine karşın UK-MKH'nin bunu destekleyecek şekilde immünsupresif etki yaptığını kanıtlamıştır.

Biyokimyasal analiz sonuçlarında; TNF- α ortalama düzeyleri incelendiğinde Grup 1 ile Grup 2, 4 ve 5'in arasında anlamlı fark olduğu görüldü (p<0,05). Grup 1 ortalama TNF- α düzeyinin Grup 2, 4 ve 5'den daha yüksek olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak da anlamlı olduğu görüldü. Grup 2'nin ortalama TNF- α düzeylerinin Grup 1'den daha düşük olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü Grup 2'nin ortalama TNF- α düzeyi diğer tüm gruplardan daha düşük olmasına rağmen bu grup ile Grup 3, 4, 5 ve 6 arasında istatistiksel bir fark bulunamadı (p>0,05). Grup 2 düzeyine en yakın TNF- α düzeyleri Grup 4 ve Grup 5'te tespit edildi (p 4.Grup=p 5.Grup:1,000). Grup 1 ortalama TNF- α düzeyinin Grup 2, 4 ve 5'den daha yüksek olması Grup 2,4 ve 5'in Grup 1 ile kıyaslandığında rejeksiyondan korunduğunu kanıtlamıştır. Grup 2, 3, 4, 5 ve 6 arasında TNF- α düzeyi bakımından fark bulunamaması 15 mg/kg/gün SK-A alan Grup 2 ve Grup 4'ün 10 mg/kg/gün SK-A alan Grup 5 ile benzer sitokin profiline sahip olduğunu gösterdi. Bu da bu gruplarda rejeksiyonun benzer derecede olduğunu kanıtlamıştır. Grup 3 ve 6'nın bunlardan farklı olmaması bu grupların rejeksiyondan korunduğunun tek bir sitokin profili ile açıklanamayacağını göstermiştir.

IFN- γ değerlendirmesinde; Grup 1 ortalama değerine en yakın değerler Grup 6 ve Grup 3’de elde edildi ve fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (p Grup 6 =p Grup 3:1,000). Grup 2 ile Grup 4 ve Grup 5’in IFN- γ ortalama düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunamadı (p>0,05). Grup 2 ortalama değerine en yakın değerler Grup 4 ve Grup 5’de elde edildi ve bu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (p Grup 4 =p Grup 5:1,000). Grup 3 IFN- γ düzeyine en yakın değerler Grup 1 ve Grup 6’da elde edildi ve (p Grup 1 =p Grup 6:1,000). Grup 3 ile Grup 1 ve bu grupların arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (p>0,05). Rejeksiyondan korunan Grup 2, 4 ve 5’in benzer olması ve bu grupların Grup1, 3 ve 6’dan farklı olması IFN- γ düzeylerinin SK-A ve UK-MKH ile birlikte baskılandığını göstermektedir. Grup 4’n Grup 2’ye yakın olması SK-A yı minimal etkin dozda alan bu gruplarda IFN- γ ’nın UK-MKH’yi aktive etmeyi başaracak kadar yüksek rejeksiyonu başlatamayacak kadar düşük olduğunu kanıtlamıştır. In vivo şartlarda Grup 4 ve 5’te elde edilen IFN- γ düzeyinin UK-MKH’nin immünsupresyon gücünü azaltıcı bir etki yapmayacak kadar optimal dozda olduğunu göstermiştir.

IL-2 değerlendirmesinde; Grup 1 ortalama değeri Grup 2, 4 ve 5’den yüksekti ve fark istatistiksel olarak anlamlıydı. (p<0,05). Grup 2 ile Grup 4 ve Grup 5 arasında anlamlı bir fark bulunamadı (p<0,05). Grup 2 ortalama değerine en yakın değer Grup 5’de elde edildi (p 5.grup=1,000>p Grup 4:1,000>p Grup 6:1,000). Bu bulgular Grup 5 ile Grup 4’n rejeksiyonda ana rolü üstlenen IL-2’ yi aynı oranda baskıladığını göstermektedir.

IL-10 değerlendirmesinde; Grup 1 ile Grup 2 ve Grup 1 ile Grup 5 IL-10 ortalama düzeyleri arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü (p<0,05). Grup 1 ortalama değeri Grup 2 ve Grup 5’den düşüktü (pGrup 2:0,023>p Grup

5:0,022<0,05). Grup 2'nin ortalama IL-10 düzeyi Grup 1, Grup 3 ve Grup 6 düzeylerinden yüksekti ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı (p Grup 1:0,023>p Grup 6:0,019>p Grup 3:0,007<0,05). Grup 2 ile Grup 4 ve Grup 2 ile Grup 5 IL-10 ortalama düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunamadı (p>0,05). Grup 2 ortalama değerine en yakın IL-10 düzeyinin Grup 5'de olduğu görüldü (p Grup 5:1,000>p Grup 4:1,000). Grup 3'ün ortalama IL-10 düzeyi Grup 2, Grup 4 ve Grup 5 düzeylerinden düşüktü ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı (p<0,05). Grup 3 ile Grup 1 ve Grup 3 ile Grup 6'nın ortalama IL-10 düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunamadı (p>0,05). Grup 3 ortalama değerine en yakın değerse Grup 1'de tespit edildi. (p Grup 1:1,000>p Grup 6:1,000).

5.TARTIŞMA

Günümüz teknolojileri ile üretimi mümkün olmayan doku ve organ kayıplarının yerine konulmasında allojenik transplantasyonlar altın standart olarak yerini korumaktadır. Fakat ilk KDA'dan bu yana SOT'ları dışında kozmetik ve fonksiyonel eksiklikleri gidermek için yapılacak transplantasyonların gerekliliği tartışmalıdır (Brenner 2002). Bunun en önemli nedeni KDA'nın ölümcül bir patolojiyi ortadan kaldırmak için yapılmamasına karşın hayat boyu süren immüsupresyon kullanımını gerektirmesi hatta bunun neden olduğu komorbiditeler nedeniyle de hasta ömrünü azaltmasıdır. Gelecekte immüsupresyonun gerekli olmadığı, donöre spesifik toleransın geliştirilebileceği transplantasyonlar, sağladığı estetik ve fonksiyonel avantajlar nedeniyle rekonstrüktif mikrocerrahinin vazgeçilmez prosedürleri olacaktır (Wu S 2009).

Transplantasyon immünolojisinde gelişmelerin önünü açacak temel bilgiler literatürde sıkça vurgulanmıştır. Transplantasyon başarısını etkileyen genetik faktörler majör, minör histokompatibilite antijen uyumu, ABO kan grubu ve cilt spesifik antijenlerin uyumudur. Kan grubu antijenleri transplantasyon yapılacak 2 birey arasında aynı olursa bu uzun dönem greft sağkalımını artıran bir etken olacaktır fakat birebir uyum yoksa en azından alıcıya karşı doğal antijen barındırmayan kan grubuna sahip bir donörün doku ya da organı kullanılabilir. Alıcı ve verici arasında izogenetik bir benzerlik ya da kardeşlik yoksa histokompatibilite antijenleri alıcı ile donör arasındaki uyumun az olmasına neden olur. Bu problem immün reaksiyonlarda rol alan hücre ve moleküllerin kontrolüne yönelik daha profesyonel immüsupresiflerin geliştirilmesi ile aşılmıştır. Fakat çok eski zamanlardan beri bilinen şekilde cilt, transplantasyon toleransının sağlanmasının en zor olduğu dokudur

ve cilt spesifik antijenler transplantasyonun başarısını etkileyen diğ er bir antijen grubudur (Steinmuller and Wachtel 1980). Bu y uzden cilt içeren dokuların transplantasyonunda allogrefti korumak için daha y uksek dozlarda imm unsupresif kullanmak gerekir (Zhou et al. 2013; Francois et al. 2006; Madani et al. 2008).

 mm unsupresifler transplantasyon cerrahilerinden sonra hastaların tedavi protokollerinde bulunmak zorunda olan farmakolojik ajanlardır. Yan etki profili oldukça geniştir ve d    k terapötik indeksleri nedeniyle dikkatli kullanılmaları gerekir (Ponticelli and Glassock 2019). Yan etkileri doz bağımlı gelişen bu ilaçlar kronik kullanımlarında v ucutta k um lasyon oluşturarak başka patolojilerin ortaya çıkmasına neden olur. KDA endikasyonları SOT'dan farklı olarak ölümcül olabilecek bir patolojiyi ortadan kaldırmak için konulmaz. Bu nedenledir ki hastalar hayat kalitelerini azaltacak herhangi bir uygulamaya karşı daha az tolerans gösterir. Yapılan ilk el transplantasyonunda hasta bazında başarı sağılanamamasının en önemli nedeni hastanın imm unsupresiflerin yan etkilerini sebep göstererek transplantın alınmasını istemesidir (Hettiaratchy, Butler, and Lee 2001). Yeni nesil birçok imm unsupresyon yeterince y uksek doz ve çeşitlilikte kullanıldığında çok antijenik dokuların bile rejeksiyonunun engellenmesine karşın KDA'larında imm unsupresyon sınırının nereye kadar olması gerektiğı tartışmalı hale gelmiştir. El transplantasyon komitesinde bununla ilgili ortaya çıkan 2 farklı g r   ten birisi el nakillerini etik olmayan, olgunla mamı  ve yanlış algılanan prosedürler olarak nitelemiştir (Hettiaratchy, Butler, and Lee 2001).  mm unsupresiflerin zararlarından korunmak adına doku eksikliklerinin giderilmesinde kullanılacak y ontemlerden bir diğ eri ise rekonstrüktif mikrocerrahidir. Günümüzde rekonstrüktif mikrocerrahi ile doku eksikliklerinin olu turduğı form ve/veya fonksiyon bozuklukları düzeltilebilmekte ise de bu her zaman mümkün olamayabilmektedir. Ampute olmuş parçaların

anatomik yerine replante edilmesi en iyi estetik ve fonksiyonel sonucu sağlayan yöntemdir. Bu sayede uzuv orijinal dokusu kullanılarak onarılmış olur. Fakat yanık, doğumsal defektler, malignite eksizyonları gibi konjenital ya da kazanılmış nedenlerle oluşan eksikliklerin giderilmesinde her zaman orijinal dokuyu kullanabilmek mümkün olmamaktadır. Uzak dokular kullanılarak yapılan rekonstrüksiyonlar; dokuların renk, kalınlık, esneklik farkları nedeniyle optimal olmamaktadır. Eğer onarılacak anatomik bölgede fonksiyona da ihtiyaç varsa her yapının fonksiyonunu ayrı ayrı üstlenecek kompozit bir otolog doku yaratmak oldukça zordur. Rekonstrksiyonun kabul edilebilir hale getirilebilmesi için birçok revizyon ameliyatı yapmak gerekebilir (Gander et al. 2006). Transplantasyon, donör alan morbiditesinden kaçınmayı sağlarken aynı zamanda da Sir Harold Gillies'in benzeri benzerle onarma prensibine tamamen uyan bir yaklaşımdır (Schuind, Abramowicz, and Schneeberger 2007) Dokuların hem kozmetik hem de fonksiyonel onarımında yeterlidir.

Plastik cerrahi ile transplantasyon kavramı her zaman yakın ilişki içinde olmuştur. Bunun nedenlerinden birisi; plastik cerrahların ‘‘doku taşıması ile yeniden yapılandırma’’ kavramına aşına olmalarıdır. (Lee 2006). Plastik cerrahide doku taşımanın en sık yolu olan cilt greftinin otolog aktarımları ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmış, cilt greftlerinin yaşayabilirliğini artırmak için öneriler sunulmuş, cilt greftlerinin kalınlıklarını ifade eden özel isimlendirmeler yapılmıştır (Reverdin 1869; Ameer, Singh, and Kumar 2013). Cilt greftleri literatürde taşınabilen ilk dokular olarak yerini aldığından aynı türün farklı bireyleri arasında taşınması da erken dönemde gündeme gelen ve denenen transplantasyon prosedürü olmuştur. Bu yüzden otojen doku yetersizliği olan hastalara taşınan allojenik ya da ksenojenik cilt greftlerinin akıbeti cilt grefti tarihçesinin erken dönemlerinde keşfedilmiştir. 1800'l

yılların sonunda kadavradan aktarılan cilt allogreftlerinin yaşayabilirliği ile ilgili yapılmış çalışmalar cilt allogreftlerinde yaşayabilirliğin oldukça iyi olduğunu bildirmişlerdir. Fakat bu dönemde transplantasyonun immünolojik komponenti bilinmediğinden bu sonuçların çok güvenilir olduğu düşünülmemektedir (Bartens 1888; Knauer 1889; Hübscher 1889; Ivanova 1890). Bundan sonra literatürde bildirilmiş cilt allotransplantasyonları başarısızlıkla sonuçlanmış ve transplantasyonun immünolojik temellerinin anlaşılmasına kadar allojenik cilt transplantasyonunun mümkün olmadığı düşünülmüştür (Mellish 1904; Sick 1892; Gross 1895; Bivings).

2. Dünya savaşı yıllarında Peter Medawar ve arkadaşları tarafından yapılan ve transplantasyonun immünolojik temellerini oluşturan çalışmalarda da allojenik cilt greftleri kullanılmıştır. Bu çalışmada cilt allogreftleri üzerinde hem birincil hem de ikincil set reaksiyonu değerlendirilmiş ve birincil reddin 7-10 ya da 10-13 gün arasında olduğu raporlanmıştır (Brandacher 2015; Richters et al. 2005; Janeway CA Jr 2001.). Çalışmamızda cilt allogrefti yapılarak herhangi bir immunsupresif tedavi verilmeyen kontrol grubunda rejeksiyon başlangıcının ortalama 11. gün olması literatür ile uyumlu bulunmuştur.

Plastik cerrahlarla transplantasyonu ilişkilendiren nedenlerden ikinciside transplantasyonların mikrocerrahi yöntemler kullanılarak yapılabiliyor olmasıdır. Tarihte yapılmış ilk başarılı böbrek naklinin bir plastik cerrah olan Joseph Edward Murray tarafından yapılmış olması bunu kanıtlar niteliktedir (Murray, Merrill, and Harrison 1958). Günümüzde plastik cerrahlar KDA ile de transplantasyon cerrahisinde aktif olarak yer almaya başlamışlardır.

Kompozit doku nakillerinde kullanılan en güncel immüsupresif tedavi kombinasyonu; kortikosteroidler + kalsinörin inhibitörleri + MMF'dir (Schneeberger et al. 2009). Keşfedilen en eski immüsupresiflerden biri olan Siklosporin-A bir kalsinörin inhibitörü olarak çalışmamızda tercih ettiğimiz immüsupresifti. Bunun başlıca nedeni Siklosporin A'nın antijen spesifik olmaksızın tüm immün efektör hücrelerin fonksiyonlarını sistematik olarak baskılaması ve bu seçici olmayan immüsupresyonun meydana getirdiği ciddi yan etkilerdi. SK-A başlıca nefrotoksisite ve hipertansiyona neden olur. Nefrotoksisite oldukça ciddi bir yan etki olup SK-A gibi kalsinörin inhibitörleri ile tedavi edilen hastaların %15-20'sinin diyaliz ya da renal transplantasyon gerektirecek kronik böbrek yetmezliği geliştirmesine neden olur (Ojo et al. 2003). Bunun yanında diyabet, gingival hiperplazi, hirsutizm ve kozmetik yan etkileri de vardır. Çalışmamızda Grup 2 ve 4'teki fareler 15mg/kg/gün dozunda subkutan SK-A ile tedavi edildi. Çalışma sonunda elde edilen böbrek biyopsilerinde bu gruplarda proksimal tübüler hücrelerde iskemik değişikliklerin oluşmaya başladığı, tübüllerde dezorganizasyon olduğu görüldü. O'Connell ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da çalışmamızı destekler nitelikte sonuçlar olup, 4 hafta boyunca 15mg/kg/gün dozunda SK-A alan farelerde dezorganize düzensiz şekilli ve komşu tübüllerden ayrılmış proksimal tübüller ve tübül hücreleri dikkati çekmiştir (O'Connell et al. 2011). Ulaşılabilen literatürde farelerde 10mg/kg/gün dozda SK-A'nın nefrotoksik olduğuna dair veri bulunmamaktadır. Çalışmamızda 10 mg/kg dozda SK-A kullanılan Grup 5'te nefrotoksik bulgular saptanmadı. Bu bulgu UK-MKH kullanarak SK-A'nın dozunda sağlanan azalmanın akut dönemde böbrek toksisitesine neden olmadığını göstermektedir.

SK-A'nın toksik etki gösterdiği organlardan diğeri de karaciğerdir. Nefrotoksisite kadar sık olmasa da akut dönemde en çok steatoz ya da portal alanda inflamasyona neden olmaktadır (Thomson, Whiting, and Simpson 1984; Whiting et al. 1983; Boland et al. 1984) Deney gruplarımızda steatoz gözlenmedi. Portal inflamasyonun SK-A'yı yüksek doz alan gruplarda daha fazla olduğu görüldü.

Transplant hastalarını immüsupresiflerin uzun dönem etkilerinden korumak amacıyla farklı yaklaşımlar geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden bir kısmı immüsupresiflerin ya da başka farmakolojik ajanların kullanılmaya devam edildiği fakat yan etki profilini azaltmaya yönelik önlemlerin alındığı yöntemlerdir. Burada hastaların ilaç alma zorunluluğu ortadan kalkmazken; kullanılan farmakolojik ajanların oluşturduğu yeni yan etkilerle karşılaşmak mümkündür.

Diğer yöntemler ise immüsupresif tedaviye gereksinimi tamamen ortadan kaldırmaya yöneliktir. Başarıldığı takdirde transplantasyon cerrahisinde çığır açacak, allojenik dokuların yanısıra ksenojenik dokuların da kullanımına izin verecek donöre spesifik tolerans bunlardan biridir.

Birinci yöntemde tek ve yüksek doz bir immüsupresif yerine birkaç farklı ajan kombinasyonu ile daha düşük dozda immüsupresif kullanarak yan etkilerden korunma yoluna gidilmiştir (Srinivas and Meier-Kriesche 2008; Kirk et al. 2005). Örneğin Louisville'de yapılan el transplantasyonlarından sonra ATG ya da Alemtuzumab ile yapılan yüksek doz indüksiyon ve arkasından kortikosteroidler+kalsinörin inhibitörleri ve MMF sürdürme tedavisi yerine indüksiyonda yalnızca Alemtuzumab; sürdürme tedavisinde de Takrolimus ve MMF kullanılmıştır (Janeway CA Jr 2001.). Son dönemde geliştirilen yeni tedavi protokolleri immüsupresiflerin etkilerini azaltmadan dozlarını minimize etmede

umut vaat etmiştir (Srinivas and Meier-Kriesche 2008; Schneeberger et al. 2011). Kullanılan diğer grup ajanlar ise kostimülatör blokajı gerçekleştiren moleküllerdir. Bunlar aynı zamanda T hücre anerjisine neden olurlar (Gribben et al. 1996). CD28 kostimülatör yolağı kendisine spesifik bir antikor ya da B7-1, B7-2'ye karşı soluble bir reseptör ile inhibe edilebilir. Yine başka bir kostimülasyon yolağı olan CTLA-4'e karşı da CTLA-4-Ig füzyon proteini kullanılabilmektedir. Ek olarak antijen sunan hücrelerin T lenfositlerin aktivasyonuna en fazla neden olduğu kostimülatör etkileşim yolağı olan CD40-CD154'ü inhibe etmeye yönelik çalışmalar devam etmektedir. Bu yolağın tek başına ya da CTLA-4 ile birlikte baskılanması tamamen MHC uyumsuzluğu olan fareler arasında aktarılan cilt greftinin rejeksiyonunu geciktirmesine rağmen kalıcı olarak önleyememiştir (Larsen et al. 1996; Lu et al. 2006). Birçok kostimülatör yolak vardır ve bu yolakları inhibe eden kombinasyonlar rodentlerde umut vaad eden sonuçlar vermiştir. Fakat bunlar tek başlarına insanlarda toleransı sağlayacak kadar güçlü değildir (Sykes 2007). Ek olarak bu ajanların rejeksiyonu önlemedeki başarısını ölçen çalışmalarda bazı komplikasyonlara neden oldukları saptanmıştır. Örneğin CTLA-4Ig füzyon proteini Belatacept yüksek dozda kullanıldığında lenfoproliferatif bozukluğa yol açmış ve bu nedenle endikasyonları kısıtlanmıştır (Vincenti, Charpentier, et al. 2010; Vincenti, Blanche, et al. 2010; Grinyo et al. 2010). Yine CD28 süperagonisti olarak geliştirilen TGN1412 uygulandığı 6 hastada sitokin fırtınasına yol açarak multi organ yetmezliği ile sonuçlanmıştır (Suntharalingam et al. 2006). Anti CD154 üzerine yapılan çalışmalar platelet ekspresyonunu artırarak tromboembolik komplikasyonlara neden olmuştur (Couzin 2005). Sonuç olarak kostimülatör blokajı yapan ilaçların da yan etkileri vardır, tam bir tolerans sağladıkları kanıtlanamamıştır, insan üzerindeki etkileri yapılan hayvan çalışmalarından elde edilen etkilerle aynı değildir ve hastaları kronik

ilaç kullanımından kurtaramamaktadırlar. Gelecek vaat eden bir çözüm olmasına karşın klinik uygulamalar için daha çok çalışma yapmak gereklidir.

İmmüsupresiflerin kullanılmadığı yöntemlerde ise donöre spesifik bir tolerans geliştirerek immüsupresiflerin tamamen tedavi dışı bırakılması hedeflenir. Tolerans donör dokuya spesifik bir immün cevapsızlıktır. Sistemik ya da intermediate geliştirilmesi mümkündür. Tolerans T ve B lenfositler üzerinden geliştirilebilir. T lenfositler üzerinden bunu yapmanın yolu klonal delesyon, anerji ya da supresyon oluşturmaktır. Aynı biçimde B hücre anerjisi oluşturan yöntemler ve rejeksiyon reaksiyonunun ana hücrelerinden biri olan DH fonksiyonlarının yönetilebildiği yöntemler de mevcuttur (Benichou et al. 2011). Hücre bazlı bu tolerans yöntemlerinin yanısıra kimerizm de tolerans sağlanmada kullanılabilir. Transplante edilen doku ya da organın donöründen alıcıya kemik iliği transplantasyonu yapmak kimerizm yöntemlerinden birisidir. Bu, son yıllarda Pittsburgh protokolünde uygulanmaya başlamıştır. Bu protokolde Alemtuzumab ile indüksiyon yapılır, transplantasyondan sonra 2 hafta içinde donörden kemik iliği hücre transplantasyonu gerçekleştirilir ve yalnızca Takrolimus ile sürdürme tedavisine devam edilir (Janeway CA Jr 2001.). Başarılı olduğu bildirilmiş bu yöntem ile immüsupresyonun yan etkilerinden korunmak mümkündür (Gorantla et al. 2011).

Son yıllarda immüsupresiflerin etkilerini azaltmadan, dozlarını düşürerek yan etkilerin azaltılmasına katkı sağlayan, periferik organları immüsupresyonun yan etkilerinden koruyacak yeni bir tedavi yöntemi olarak mezenkimal kök hücreler hem deneysel hem de klinik çalışmalarda yoğun bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Bu hücreler sahip oldukları plastisite dışında parakrin etki gösteren büyüme

faktörleri, sitokinler, anjiojenik faktörler de salgılayarak diğer hücreler üzerinde etki gösterirler (Karaöz E 2019).

2000 yılında Liechty ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada bu etkilerden birinin immünmodülasyon olduğu bulunmuştur (Liechty et al. 2000). Başlangıçta otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılarak bu etki klinik olarak kanıtlanmıştır. (Le Blanc and Ringden 2007; De Miguel et al. 2012; Garcia-Olmo et al. 2009; Yamout et al. 2010; Sun et al. 2009) Daha sonra yapılan çalışmalar ise bunun immüsupresyon yönünde kullanılabileceğini bildirmiştir (Ghannam et al. 2010). Bu çalışmaların umut vaat eden sonuçları MKH'in organ naklinde rejeksiyonun engellenmesinde ya da immüsupresif sürdürme tedavisinde kullanımını gündeme getirmiştir. Çünkü MKH'lerin hem hücre-hücre teması ile hem de parakrin etki ile immün reaksiyonda rol alan tüm hücreler üzerinde baskılayıcı ya da modülasyon sağlayıcı bir etkisi bulunmaktadır (Tablo 5.1) (Wang, Qu, and Zhao 2012).

Tablo 5.1: MKH'lerin rejeksiyonu başlatan ve sürdüren hücreler üzerine etkilerini gösteren tablo

İmmün reaksiyona katkıda bulunan hücre tipi	Mezenkimal Kök Hücrenin Etkileri
T lenfositler	- Selüler ya da nonspesifik mitojenik etki ile T lenfosit proliferasyonunu baskılar - Naif ve efektör T lenfositlerin sitokin sekresyon profilini değiştirir - Regülatör T lenfositlerin çoğalmalarını sağlar ve fonksiyonlarını artırır.
B lenfositler	- B lenfositlerin proliferasyonunu inhibe eder - Kemotaktik özelliklerini etkiler - Terminal diferansiasyonunu inhibe eder
NK hücreleri	- HLA Sınıf-I antijen sunan hücrelere karşı NK hücrelerinde meydana gelen sitotoksik aktiviteyi azaltır, sitokin sekresyonunu baskılar - NK hücrelerin fenotiplerini değiştirerek proliferasyonunu baskılar
Dendritik Hücreler	- Dendritik hücrelerin diferansiasyonunu, matürasyonunu ve fonksiyonlarını etkiler, dendritik hücre migrasyonunu, matürasyonunu ve antijen sunumunu baskılar - Matür Dendritik hücrelerin Jagged-2 bağımlı regülatör DH'lere dönüşümünü sağlar

Aynı zamanda immünojeniteden de yoksun olmaları MKH'lerin allojenik kullanımını mümkün kılmıştır. Sistemik olarak uygulandıklarında MKH'nin doku yaralanması ve inflamasyon olan bölgelere göç etme özelliği mevcuttur. İlk kez 2008 yılında sıçan kalp transplantasyon modelinde Popp ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır. Bu modelde 2 farklı tür arasında yapılan kalp naklinden 4 gün önce alıcıya aktarılan donör kaynaklı Kİ-MKH'nin MMF ile birlikte en uzun sağkalımı elde ettiği görülmüştür. Tek başına MMF kullanılan grupta ortalama greft sağkalımı 15 gün iken Kİ-MKH'nin eklenmesi ile bu süre 100 güne ulaşmıştır (Popp et al. 2008). Aynı zamanda MMF almayıp, transplantasyondan 4 gün önce donör kaynaklı Kİ-MKH alan grupta hiçbir şey almayan grupla kıyaslandığında allogreft reddinin 2 gün daha erken gerçekleştiği görülmüştür. Bu, allojenik Kİ-MKH'nin in vivo ortamda donör karşıtı bir bağışıklık tepkisi ortaya koyduğunu göstermiştir. Çalışmamızda bu çalışmaya benzer şekilde SK-A ile birlikte UK-MKH verilen grupta yalnızca SK-A alan gruba göre daha uzun yaşayabilirlik elde edildi. Yalnızca UK-MKH alan Grup 3'te ise hiçbir tedavi verilmeyen Grup 1'e göre daha erken bir rejeksiyon saptanmadı. Bu durum UK-MKH'nin diğer MKH kaynakları ile karşılaştırıldığında daha güçlü bir immünsupresyon etkisi sağlamanın yanında daha az antijenik olmasına bağlanmıştır (Yoo et al. 2009)

MKH'nin immünsupresyondaki rolünü araştıran çalışmalar bu hücrelerin öncelikle IFN- γ , TNF- α veya IL-1 gibi bir aktivatöre maruz bırakılmaları gerektiğini göstermiştir (Kim et al. 2018). Bu moleküllerle aktive edilmeyen MKH'de immün baskılama özelliği görülmemiştir (Ren et al. 2009). Birçok immünsupresif ajan MKH'in aktivasyonuna katkı sağlayan bir proinflamatuvar sitokin olan IFN- γ 'yı baskılar. Bu, MKH'in immünsupresiflerle beraber kullanımının sorgulanmasına ve beraber kullanıldıklarında oluşacak etki ile ilgili çalışmalar yapılmasına yol açmıştır.

SK-A'nın MKH ile kullanıldığı çalışmalar farklı sonuçlar bildirmiştir (Eggenhofer et al. 2011). Eggenhofer ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada fare kalp nakli modeli kullanılmış ve MMF, SK ve Sirolimus ile Kİ-MKH'nin birlikte ortaya çıkardıkları etki üzerine çalışılmıştır. Bu çalışmada çalışmamızla benzer şekilde tek başına kök hücrenin kalp allogreftinin yaşayabilirliğini etkilemediği bulunmuştur. Aynı zamanda SK ile Kİ-MKH kullanılan gruplarda daha az allograft yaşayabilirliği tespit edilmiştir. Fare heterotopik kalp nakillerinde minimal etkin SK-A dozu 15mg/kg/gün olarak belirlenmiştir. Hiç SK-A tedavisi almayan farelerde allograft 13 gün, 16 gün SK-A tedavisi alanlarda, 17 gün yaşayabilmiş 30 gün tedavi alanlarda 30 gün boyunca greft viabilitesini sürdürmüştür (Giardina et al. 1990). Eggenhofer ve arkadaşlarının çalışmasında MKH'ler operasyondan 4 gün önce uygulanmıştır. Çalışmada MKH'nin veriliş yolu açıkça belirtilmemiştir. Fakat intravenöz yol kullanılmışsa MKH'lerin çoğunlukla akciğerde akümüle olduğu ve yarı ömrünün de 24 saat olduğu bilinmektedir (Parekkadan and Milwid 2010) Bu durumda operasyondan tam 96 saat önce uygulanmış olan kök hücrenin etkinliğinin kaybolmuş olması da SK-A ile birlikte uygulandığında etki gösterememesine neden olmuş olabilir. MMF ile SK grubu arasında ortaya çıkan greft yaşayabilirlik farklılığı bu immünsupresiflerin kalp allotransplantı üzerinde tek başına yaptığı etkiler sonucu oluşmuş olabilir. Maccario ve arkadaşlarının yaptıkları başka bir çalışmada SK-A ile allojenik hematopoietik kök hücrenin beraber immünsupresyon üzerine etkileri incelenmiş ve bunların birbiri ile sinerjistik etki oluşturduğu görülmüştür (Maccario et al. 2005; Le Blanc et al. 2004) Inoue ve arkadaşları yaptıkları çalışmada bu sonuçların in vivo koşullarda aynı olmadığını bildirmişler ve SK-A ile MKH'nin beraberken sinerjistik etki yapamayacağını öne sürmüşlerdir (Inoue et al. 2006) Bu çalışmada 10 grubun 4'ünde donör kaynaklı Kİ-MKH kullanılmıştır. Bu gruplardan

inferior vena kava ve portal sistem üzerinden 5×10^6 adet kök hücre enjeksiyonu yapılan ve SK-A tedavisi almayan ratların kalp allogreftlerinde yaşayabilirlik ve rejeksiyon açısından kontrol grubu ile bir fark elde edilememiştir. Bu bulgu çalışmamızla örtüşmektedir ve tek başına kök hücrenin rejeksiyonu önlemede yetersiz olduğunu göstermiştir. Yüksek doz olarak nitelendirilen bu kök hücre dozunun değişik uygulama yolları kullanılarak yapılan intravenöz enjeksiyonlarının literatürde daha önce de belirtilen şekilde yüksek emboli ile sonuçlandığını bildirmişlerdir (Furlani et al. 2009; Jung et al. 2013). Başka bir grupta yine kuyruk veni ve portal ven kullanılarak 2×10^6 adet kök hücre enjeksiyonu yapılmış ve bu grup da SK-A tedavisi almamıştır. 2×10^6 adet kök hücre yapılan gruplarda kök hücrenin sağlıklı bir biçimde sistemik dolaşıma geçip etkili olduğu kabul edilirse bu çalışmanın bulguları çalışmamızda elde ettiğimiz kök hücrenin tek başına rejeksiyonu baskılamakta etkin olmadığı bulgusunu desteklemektedir. Emboliye rastlanmamasına rağmen greft yaşayabilirliği artmamıştır. Çalışmamızda kök hücrenin intravenöz enjeksiyonunun yaygın bir komplikasyonu olan emboliden korunmak için UK-MKH'leri paraspinal kaslara intramusküler enjekte edildi (Sheyn et al. 2010). Bunun başka bir nedeni de intravenöz enjekte edilen kök hücrelerin farklı yerlere dağıldığı ve fonksiyon göstermeleri için gerekli mekanizmalardan biri olan hücre-hücre kontağını sağlayamadığının öngörülmesidir (Bartholomew et al. 2002). Yine Inonue ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 2×10^6 adet kök hücre ile 0,5 mg/kg SK-A alan gruplarda sadece SK-A alan gruplara göre daha hızlı rejeksiyon olduğu bildirilmiştir fakat bu iki grup arasındaki farkın istatistiksel anlamlılığı belirtilmemiştir. Daha hızlı rejeksiyon olan gruplarda hem kök hücre hem de SK-A dozu oldukça düşük tutulmuştur. Ratlarda heterotopik kalp nakillerinde kullanılan minimal etkin doz 5mg/kg iken bu çalışmada 0,5 mg/kg/gün olarak sınırlandırılmıştır

(Suzuki, Kanashiro, and Amemiya 1987). Bu bulgu çalışmamızla örtüşmemektedir. Hem minimal etkin dozda hem de daha düşük dozda SK-A'yı UK-MKH ile kullandığımız Grup 4 ve 5'te daha hızlı rejeksiyon gözlemlenemedi. Bunun nedeni kg başına verilecek kök hücre sayısının bu çalışmada olduğundan daha yüksek değerde tutulmasıdır. Allotransplantasyonda kök hücre ile SK-A'yı beraber kullanan başka bir çalışma Hsieh ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (Hsieh et al. 2012). Tamamen MHC uyumsuzluğu olan 2 grup rat arasında yapılan adipoz doku allotransplantasyonunda bazı grupların adipoz doku fleplerine vaskülarize femur dokusu dahil edilerek donörden Kİ-MKH aktarımı yapılmıştır. Adipoz doku transplantasyonu yapıp yalnızca 5mg/kg/gün/7gün SK-A alan grupta flep yaşayabilirliği 5,5 hafta; adipoz doku ve femur aktarılacak hiç tedavi almayan grupta 5,5 hafta ve adipoz doku ve femur aktarılacak 7 gün boyunca 5mg/kg SK alan son grupta 8,2 hafta olduğu raporlanmıştır. Son grupta elde edilen flep yaşayabilirliği süresi MKH'in bir sınıfı olan Kİ-MKH'nin SK-A'nın düşük dozları ile sinerjistik etki yarattığını göstermektedir. Bu, çalışmamızın sonuçları ile uyumludur. Bu çalışmada ratlarda adipoz doku aktarımında olması gereken standart SK-A dozunu yarısına düşürerek bu toleransı sağlamışlardır. Çalışmamızda SK-A'nın minimal etkin dozunu 1/3 oranında düşürebildik bunun nedeni ise cildin bilinen en antijenik doku olmasına karşın adipoz dokunun zayıf antijenik olmasıdır.

Buna benzer sonuçlar Kuo ve arkadaşları tarafından da elde edilmiştir. Domuzlarda heterotopik arka bacak allotransplantasyonu yapıldıktan sonra Kİ-MKH 'nin hem tek başına hem de düşük doz SK-A ile birlikte kontrol grubuna göre daha uzun yaşayabilirlik sağladığını ve SK-A ile beraber Kİ-MKH alan gruplarda CD25 pozitif regülatör T hücrelerin sayısından artış olduğunu bildirmişlerdir (Kuo YR 2011).

Sbano ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada Kİ-MKH yine SK-A ile birlikte kullanılarak cilt grefti yaşayabilirliği üzerindeki etkileri araştırılmıştır (P. Sbano 2008). Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar SK-A ile Kİ-MKH'in sinerjistik etki göstererek beraber kullanıldıklarında tedavi almayan, yalnızca SK-A alan ve yalnızca Kİ-MKH alan gruplara göre yaşayabilirliğin istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığını göstermiştir. Bu çalışmanın sonucu çalışmamızla örtüşmektedir. Çalışmamızdan farklı olarak bu çalışmada da tek başına kök hücre kullanılan grupta hiç tedavi almayan gruba göre daha erken allogreft rejeksiyonunun gerçekleşmiş olması kök hücrenin immün özellik gösterdiğini düşündürmektedir.

Petit ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada cilt allogrefti 2 rat türü arasında aktarılmış ve yine Kİ-MKH'in tek başına ve donör epidermal hücrelerin enjeksiyonu ile birlikte olan etkinliği değerlendirilmiştir. Bu çalışmada çalışmamızdan farklı olarak immüsupresif bir ajan kullanılmamıştır. Kİ-MKH ile epidermal hücrenin beraber enjekte edildiği grup ile diğer gruplar arasında greft yaşayabilirliği bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark elde edilmiştir. Bu çalışma tek başına Kİ-MKH kullanılan grupta yeterli viabilite sağlanamadığını bildirmiş ve bu sonuç çalışmamızda Grup 3'te elde ettiğimiz sonuçlar ile de örtüşmüştür (Petit et al. 2004). Bartholomew ve arkadaşlarının yaptığı benzer bir çalışmada ise Kİ-MKH'in in vitro olarak allojenik periferik lenfositlerin proliferasyonunu baskıladığı ortaya koyulmuştur. Bu bulgu babunlar üzerinde yapılan cilt allotransplantasyonu ile de in vivo olarak kanıtlanmıştır. Bu çalışmada yine immüsupresif bir ajan kullanılmamış ve tek doz MKH'in greft yaşayabilirliğini artırdığı bulunmuştur (Bartholomew et al. 2002).

Dokuların antijenitesi ile onlara karşı ortaya çıkan immün reaksiyonun gücü değişmektedir. Bir allogreftte karşı oluşan rejeksiyon reaksiyonu basit olarak bir

inflamatuvar reaksiyon ile aynı özellikleri taşımaktadır. Bu yüzden rejeksiyonun derecelendirme sistemlerinde inflamatuvar hücrelerin miktarları ve invazyon alanının genişliği göz önünde bulundurulur (Cendales et al. 2008) Doku rejeksiyonunda ortaya çıkan inflamatuvar reaksiyonun gücü allogreftin işlev görmesini engeller ve sonunda viabilitesini de tamamen yitirmesine neden olur (Abul A 2000). Cilt, DH'ler gibi çok güçlü antijen sunan hücrelere ve antijen sunumunu kolaylaştıran zengin bir lenf sistemine sahiptir. Bos ve Kapsenberg bunu "cilt immün sistemi" olarak özelleştirilmiş bir terimle ifade etmişlerdir (J. D. Bos 1986).

Allojenik cilt transplantasyonunda öncelikle allogreft üzerinde bulunan antijen sunucu DH'ler alıcının lenf nodlarına ulaşarak burada T lenfositlerin donör antijenlere karşı reaktif hale gelmesini sağlarlar. Bu aynı zamanda direk tanınma olarak da bilinir. Cilt allogrefti antijenlerinin sunumu bununla da kalmaz ve donör antijenleri alıcının antijen sunan hücrelerine de bağlanarak alıcı T lenfositleri tarafından indirek yoldan da tanınması sağlanır. Daha sonra da bu lenfositler allogrefti istila ederek burada bir rejeksiyon reaksiyonu başlatırlar. T lenfositlerin başlattığı bu reaksiyon B lenfositler, NK hücrelerinin de aktive olması ile daha da karmaşık hale gelir. Akut rejeksiyonun yanısıra kronik rejeksiyonunun da yolu açılmış olur (Benichou et al. 2011). Rejeksiyon reaksiyonu sırasında buna katkıda bulunan hücrelerden salgılanan sitokinler birçok çalışmada gösterilmiştir (Bartholomew et al. 2002; Lopez-Flores et al. 2011) Rejeksiyonda en büyük rolü üstlenen T lenfositlerin donör antijenlerine karşı reaktif hale gelebilmesi ve rejeksiyonu sağlayacak kadar çoğalabilmesi için IL-2'yi salgılamaları gereklidir. Bu salgıyı başlatan şey DH'lerin T lenfositlere antijen sunması, hem IL-2 salgılayarak hem de kostimülasyon yolu ile T lenfositleri çoğalmaya sevk etmesidir. Donör antijenleri ile uyarılan T lenfositler kostimülasyon yolu ile IL-2 salgırlar. T

lenfositlerden yapılan bu IL-2 salgısı T lenfositlerin uyarılmasını, çoğalmasını ve T lenfositler üzerindeki IL-2 reseptör sayısının da artmasını sağlarlar. Bunun yanında B lenfositler, NK hücreleri, monosit ve makrofajları da uyararak diğer proinflamatuvar sitokinler olan TNF- α ve IFN- γ 'nın da salınımını sağlarlar (Smith 1988). Fakat literatürde bazı çalışmalar düşük dozda SK-A kullanımının bu sitokin profili üzerine aynı etkiyi yapmadığı görüşündedir (Lopez-Flores et al. 2011; Bretscher and Havele 1992) Flores ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada kuyruk cildini transplante ettikleri farelerin 1 grubunda minimal etkin dozdan oldukça düşük dozda SK-A kullanmışlar (5mg/ml) ve diğer tüm gruplara göre daha yüksek oranda IL-2, IFN- γ ve TNF- α ekspresyonu görmüşlerdi. IL-10 üretiminde ise tedavi almamış, düşük doz SK-A almış ve terapötik doz SK-A almış gruplar arasında fark görmediklerini bildirmişlerdir. Bu, SK-A'nın terapötik dozda regülatör T hücrelerinin aktivitelerini baskılamazken, düşük dozda bu hücreleri inhibe ederek allograft rejeksiyonuna katkıda bulunmasına bağlanmıştır (Miroux et al. 2009). Bu çalışmada tek başına düşük doz SKA verdiğimiz bir deney grubumuz bulunmamaktadır fakat UK-MKH ile beraber düşük doz SK-A verdiklerimizde doz bağımlı bir şekilde sitokin profilinde inflamasyonu destekleyecek bulguların ortaya çıktığı görüldü. Verdiğimiz SK-A dozu azaldıkça antiinflamatuvar sitokin dozu artmış ve IL-10 dozu azalmıştı.

Bunun yanında MKH'lerin birçok otoimmün hastalığın tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalar insan MKH'in ve salgıladıkları faktörlerin T lenfositlerin ve antijen sunucu hücrelerin aktivasyonu, proliferasyonu ve matürasyonunu inhibe ettiklerini göstermiştir (Groh et al. 2005; Rasmusson et al. 2003; Beyth et al. 2005). Bunun yanında DH ve T lenfositler tarafından üretilen sitokinleri de kontrol ederler (Aggarwal and Pittenger 2005). IFN- γ düzeyini azaltırlar. Bunu; IL-10 salgılayarak immatür DH'in matür DH'e dönüşümünü

engelleyerek bu hücrelerden salgılanan IFN- γ düzeyini azaltarak,IDO sentezi yaparak NK hücrelerinden salgılanan IFN- γ düzeyini düşürerek ve Th1 hücre aktivasyonunu azaltarak yine bunlardan salgılanan miktarı düşürerek yaparlar. TNF- α düzeyini düşürürler bunu yine immatür DH'in sayısını azaltarak bunlardan salgılanmasını önleyerek yaparlar (Aggarwal and Pittenger 2005). IL-2 düzeyini düşürmeleri hem DH hem de T lenfosit aktivasyonunu azaltmaları ile ilişkilidir. IL-10 düzeyini ise artırırılar. Bunu hem kendi salgıladıkları IL-10 ile hem de IDO ve nitrik oksit (NO) salınımı ile regülatör T lenfositlerin sayılarını artırmak suretiyle bunlardan salgılanan IL-10'u artırarak yaparlar (Augello et al. 2007). In vitro koşullarda bu etkileri elde edebilmek için MKH'nin IL-1 β , TNF- α ya da IFN- γ 'dan biri ya da birkaçı ile aktive edilmesi gereklidir. Fakat in vivo koşullarda halihazırda bu sitokinler kök hücrenin etki edeceği inflamatuvar bölgede bulunduğundan kök hücrenin aktive olduğu kabul edilir (Singer and Caplan 2011). IFN- γ ile ilgili yapılmış çalışmalar bu özelliğinin yanısıra doz bağımlı olarak MKH'leri modüle edebileceğini göstermiştir. Bazı dozlarda IFN- γ normalde MKH'de bulunmayan MHC sınıf II antijenlerinin eksprese edilerek, MKH'i ASH'e dönüşümünü sağlamaktadır. Buradaki temel problem kök hücrelerin, in vivo ortamda bu sitokinlerin miktarını azaltan immünsupresif ajanlarla kullanıldığında aktive olup olamayacağı ve immünbaskılayıcı özelliklerinin tam tersi olarak immün aktive edici hale gelip gelmeyeceğidir (Chan et al. 2008). Bazı çalışmalar IFN- γ oluşumunu inhibe eden SK ile MKH'nin beraber kullanımının MKH'nin immün baskılayıcı özelliğini ortadan kaldırdığını öne sürmüştür (Eggenhofer et al. 2011; Inoue et al. 2006) Literatürde bulunan tüm bu veriler değerlendirildiğinde çalışmamızda SK ile UK-MKH arasında bir sinerjizm ortaya çıktığı söylenebilir. Genel olarak literatürde de belirtildiği gibi tek başına kök hücre alan grupta greft yaşayabilirliğinin artmaması

tek başına kök hücrenin yeterli immün baskılayıcı etkiyi ortaya çıkarmadığını gösterir. SK-A ile UK-MKH uygulanan grupta antiinflamatuvar sitokin oranının tek başına SK-A alan gruptan daha düşük olması bu sinerjistik etkiyi ortaya koymuştur. 10 mg SK-A ile UK-MKH kullanılan grupta ise sitokinler bazında tek başına SK-A'nın yaptığı antiinflamatuvar etki gözlemlenmiştir.

Bir immünsupresif ilacın MKH ile olan etkileşiminin gelecekte yapılacak çalışmalar ile daha net ortaya koyulması gerekmektedir. MKH'nin dozu immünsupresif ilacın dozu, MKH'nin uygulanma yolu, MKH'nin uygulanma zamanı ve dozu gibi birçok faktör immünsupresiflerle MKH'lerin etkileşim patarenini değiştirebilir. Bu durumda bir immünsupresif ilacın MKH ile asla kombine edilemeyeceği düşüncesi, kombine uygulamalarda doğru doz, uygulama yolu ve uygulama zamanının belirlenmesi için yapılacak yeni çalışmalarla değişebilir.

Çalışmamızda SK-A ve UK-MKH'nin beraber ortaya çıkardığı antiinflamatuvar sitokin profilini aynı zamanda sayısal termal görüntüleme ile de analiz ettik. Bunu kullanmaktaki amacımız allogreftin klinik izlemine daha kantitatif bir değerlendirme aracı ile katkıda bulunmaktır. SOT'da kullanılan invaziv allogreft takip yöntemlerinden biyopsi dışında olanlar kompozit doku nakillerinin takibinde kullanılamamaktadır. KDA'da biyopsi epidermis, dermis ve subdermisin bir kısmının dahil edildiği punch biyopsi şeklinde yapılır. Bu invaziv işlem enfeksiyon riski taşımakla birlikte yüz transplantasyonu hastaları gibi kozmetik ve görünür yerlerde allogrefti bulunan hastalarda skar gibi istenmeyen sonuçlara da neden olur (Brandacher 2015) Ulaşılabilen literatürde KDA'da rejeksiyonun takibinde kullanılan non invaziv bir yöntemle rastlanmamıştır.

Termal görüntülemenin tıpta birçok alanda kullanımı mevcuttur. Bu kullanım alanlarını kanlanmanın takip edildiği durumlar ve inflamatuvar patolojiler olarak ayırabiliriz. İnflamatuvar patolojilerin dolaşım takibi yapılan gruptan farkı takip edilen dokuda ortaya çıkan sıcaklık artışının analiz edilmesidir. Osteoartrit, inflamatuvar artrit, yumuşak doku romatizması, tensiçi dirseği, fibromyalji, kompleks rejyonel ağrı sendromu gibi patolojiler inflamasyona sekonder ortaya çıkan; takip ve tedavisinde termal kamera görüntülemenin kullanıldığı alanlardır. Her patoloji için bir sıcaklık dağılım indeksi oluşturarak tanının netleştirilmesi ve ayırıcı tanıların elde edilmesi sağlanabilir. Spalding ve arkadaşları inflamatuvar artrit tanısı için böyle bir sıcaklık dağılım indeksi tanımlamışlardır (Spalding et al. 2008). Selfe ve arkadaşları patellofemoral ağrı sendromu için kontralateral diz ile 0,5 °C'lik sıcaklık farklarının uyarıcı olması gerektiğini vurgulamıştır (James Selfe 2008). Romano ve arkadaşları total diz protezi sonrası ağrılı ve ağrısız dizler üzerinde yaptıkları değerlendirmede 0,8-0,9 °C sıcaklık farklarının anlamlı olduğunu bildirmiştir (Romano et al. 2011). Bu çalışmada termal kamera ile görüntülemeye cilt sıcaklığının direk olarak dokunun metabolik aktivitesi ve dolaşımı ile değiştiği prensibinden yola çıkıldı. Çalışmamızda ölçümlerimiz 3 ana komponenti içerdi; birincisi cilt allogrefti ile çevreden yansıyan sıcaklık arasındaki farkın ortalama 0,9 °C ile 1,3 °C arasında kaldığı sağlıklı cilt allogrefti, ikincisi; başlangıçta sağlıklı sıcaklık farkı gösteren fakat gelişen rejeksiyonla birlikte sıcaklık farkının 2,3 °C'lere kadar arttığı red olan cilt allogrefti, üçüncüsü ise; tamamen rejekte olan ve zeminle bağlantısını kaybeden greftlerde oluşan soğuma idi. Bu, rejeksiyon olan gruplarda ani bir ısı artışı ve ilerleyen günlerde çevreden yansıyan sıcaklığın altına düşüş şeklinde ortaya çıktı. Rejeksiyon olmayan greftlerde çevreden yansıyan sıcaklık ile paralel değişimler elde edildi. Çalışmamızdan elde ettiğimiz bu bulgular Alametsa ve

arkadaşlarının bacak ülserlerinde inflamasyonun göstergesi olarak tanımladıkları sıcaklık aralıkları ile örtüşmekteydi (Jarmo Alametsä 2018).

Çalışmamızda epitelyal hücrelerin Ki-67 ve Bcl-2 ekspresyonlarını inceledik. Bunu yapmaktaki amacımız MKH'nin epitel rejenerasyonu ya da onarımına sağladığı katkıyı göstermek değildi. Zaten sağlam bir epitel tabakası ile transplante ettiğimiz cilt allogreftlerinin epitelyal bütünlüğünün rejeksiyondan ne oranda korunabildiği ve epiteldeki normal proliferasyonun devam edip etmediğini göstermekti. Birçok çalışma MKH'lerin antiapoptotik bir protein olan Bcl-2'nin ekspresyonunu artırdığını bildirmiştir. Wang ve arkadaşları myokardiyal enfarktüste Kİ-MKH kullanımının Bcl-2 proteininde artışa yol açtığını bildirmişlerdir (Wang et al. 2009). Aynı şekilde sistemik lupus eritematozuslu hastalarda MKH'nin eksikliğini öngören bir çalışmada bu hastalarda antiapoptotik Bcl-2 proteininin seviyesinde azalma bildirilmiştir (Li et al. 2012). Liu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada MKH'lerin bir üyesi olan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrenin rat serebral iskemi reperfüzyon hasarında Bcl-2 ekspresyonunu artırarak hücre apoptozunu önlediğini göstermişlerdir (Liu, Zhang, and Tang 2014).

MKH'leri Bcl-2'nin ekspresyonuna benzer şekilde Ki-67'nin ekspresyonunu da artırmaktadırlar. Mazhari ve arkadaşları bunu domuz myokardiyal enfarktüs modelinde göstermişlerdir. Myokardiyal enfarktüs sonrası hücre bazlı tedavi sağlamak amacı ile enjekte edilen MKH'nin 8 hafta sonra hem myositlerde hem de perienfarkt bölgesindeki hücrelerde Ki-67'yi pozitifleştirdiği görülmüştür (Mazhari and Hare 2007). Buna benzer bir sonuç myokardiyal enfarktüsün oluşturulduğu domuz modelinde de elde edilmiş ve Kİ-MKH ile tedavi edilen grupta Ki67+ myositlere rastlanmıştır (Amado et al. 2005) Cova ve arkadaşları ratlarda

oluşturdukları Parkinson modelinde MKH'leri nöroprotektif etkisinden faydalanmak amacıyla düşük ve yüksek dozlarda kullanmışlar ve kök hücreye karşı bir immün reaksiyonun gelişmesini önlemek amacıyla da 10mg/kg dozda SK-A kullanmışlardır. Bu çalışma da çalışmamızla benzer biçimde kök hücre dozundaki artışın Ki-67 ekspresyonunda artışa neden olduğunu bildirmiştir (Cova et al. 2010). ADKH'nin yara iyileşmesi üzerine etkilerini çalışan başka bir çalışmada ise TNF- α eklenmiş kültür medyumunda bulunan ADKH'in Ki-67 ekspresyonunu daha fazla artırdığı görülmüş bu yolla hem TNF- α 'nın MKH'leri aktive ettikleri hem de MKH'lerin Ki-67 ekspresyonunu artırdıkları bildirilmiştir (Heo et al. 2011). Çalışmamızda kullanılan UK-MKH literatürde MKH'lerin Ki-67 ve Bcl-2 eksprese etmedeki etkinliklerini göstermiştir. Çalışmada ek olarak kullanılan SK-A'nın bu proteinlerin değişimi üzerine etkilerini değerlendirmek gereklidir. Literatürde SK otoimmün cilt hastalıklarının tedavisinde hücrelerde apoptozu indükleyerek etkili olurken; gingival hipertrofi gibi yan etkileri tam tersine proliferasyonu aktive etmesine ve Ki-67, Bcl-2'nin ekspresyonunu artırmasına bağlıdır (Buduneli et al. 2007; MT Abou Elkhier 2014). SK-A'nın hücre bölünmesini engellmesi ve apoptozisi indüklemesi genellikle T hücrelerin aktivasyonundan kaynaklanan otoimmün hastalıklarda meydana gelir bu da SK-A'nın T hücre proliferasyonu ve aktivasyonunu inhibe etmesine bağlıdır. Çalışmamızda cilt allogrefti epitelinde hücrelerin çoğalıyor olması normalde de olması gereken bir bulgudur ve yara iyileşme sürecinin ya da T lenfosit aktivasyonunun bir sonucu değildir. Yalnızca normal proliferasyon siklusudur. Dolayısıyla SK'in bu sürece etkisini belirlemek amacıyla; SK'in tedavisinde kullanıldığı aşırı proliferasyon problemi olan cilt patolojilerinde ne yaptığına ya da yan etkisi sonucu ortaya çıkardığı patolojilerdeki rolünü baz almamak gereklidir. Çünkü yan etki profiline bakacak olursak gingivada proliferasyonu artırıp apoptozu

baskıların; böbrek epitel hücrelerinde tam tersi etki yaptığını görürüz (Lally, Healy, and Ryan 1999) SK-A'nın normal hücre siklusu üzerine olan etkileri literatürde daha önce çalışılmıştır. Janikowska ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada SK'in 100 ng/mL'ye kadar olan dozlarının insan fibroblastlarının normal proliferasyon siklusunu bozmadığı ve toksik etki de yapmadığı bildirilmiştir (Janikowska et al. 2016). Bosca ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise insandan cilt ksenogrefti aktarımı yapıldığından SK-A tedavisi altında olan farelerin kulak epiteli, dil ve özofagus epitelindeki hücrelerin normal hücre siklusunda olup olmadığı değerlendirilmiştir. Dil, kulak epiteli ve cilt ksenogreftinde deney ve kontrol grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur (Ana Ramirez-Bosca 1990). Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar bu çalışmayı desteklememektedir. Çalışmamızda epitelizasyonun bozulmamış olması verdiğimiz SK dozunun Bosca ve arkadaşlarının çalışmasında kullanılan dozdan (50mg/kg) çok daha düşük olmasına bağlanmıştır. Bu çalışmada Bcl-2 ve Ki-67 oranı yalnızca reddin önlendiği gruplarda yüksekti. Bu da normal epitelyal hücre siklusunun rejeksiyon reaksiyonunda salgılanan faktörlerden etkilenmemiş olmasına bağlanmaktadır.

H&E boyaması ile elde ettiğimiz tüm bulgular makroskopik, STG bulguları ve immünohistokimyasal bulgularımızı desteklemektedir. MKH'lerin bir çeşidi olan Wharton Jeli- Mezenkimal Kök Hücre (WJ-MKH) SK-A ile sinerjistik etki göstermiştir. Bu, histopatolojik değerlendirmede UK-MKH ile SK-A'nın 10mg/kg ya da 15mg/kg dozlarının birlikte kullanılması ile elde ettiğimiz Banff skorlarında düşüklük, epitelizasyon skorlarında yükseklik ve dermoepidermal ayrışmanın az olması ile kanıtlanmıştır.

WJ-MKH'ler diğer mezenkimal kök hücre kaynakları ile kıyaslandığında daha yüksek immünsupresif etki gösterirler. Çalışmamızda bu kök hücre kaynağının

tercih edilme nedeni budur. WJ-MKH alıcı immünitesinden korunmak için diğer MKH kaynaklarının sahip olduğu özelliklere sahipken; embriyoyu anne immünitesinden koruyan HLA-G6 proteinini de yüksek düzeyde eksprese eder (Jahnavi 2011). Diğer MKH kaynakları ile kıyaslandığında daha immünsupresif oluşu moleküler özelliklerine değil de kendisine karşı hiç immün cevap oluşturulmaması ile ilgili olabilir. AD-MKH, Kİ-MKH ile kıyaslandığında T lenfositlerde BCL2L10, BAK1, BIK gibi proapoptotik genlerin regülasyonunu; FADD ve FASL gibi apoptozis ile ölüm genlerinin ekspresyonunu artırdığı görülmüştür (Fernanda Vieira Paladino 2019). Diğer MKH kaynaklarından başka bir farkı da yüksek oranda IL-17A eksprese etmeleridir (Karaöz E 2017). GVHH'nın tedavisinde kullanılması IL-17A'yı yüksek düzeyde eksprese etmeleri nedeniyle başarılı sonuçlar vermiştir. WJ-MKH'nin GVHH'da kullanımı otoimmün hastalıklarda kullanımı dışında immünsupresyon etkisinin en çok kullanıldığı alanlardan biridir. Diğer kök hücre kaynakları ile kıyaslanacak olursa elde edilmesi oldukça kolaydır ve etik problem oluşturmaz. Ulaşılabilen literatürde WJ-MKH'nin SOT ya da KDA'da kullanımı ile ilgili bir veri bulunmamaktadır. Bu çalışma hem bu anlamda ilk olup hem de WJ-MKH'lerin transplantasyonda kullanımının MKH'ler ile benzer sonuçlara neden olduğunu ortaya koymuştur.

Sonuç olarak bu çalışmada WJ-MKH'ler ilk kez bir transplantasyon araştırmasında kullanılmıştır. Sahip olduğu benzersiz immünsupresyon etkisi ile cilt gibi çok antijenik bir dokunun rejeksiyonunda immünsupresiflerle sinerjistik etki yapacak şekilde çalışmıştır. Gelecekte yapılacak çalışmalar ile bu elde edilmesi kolay kök hücre kaynağının transplantasyonlarda kullanımının uzun dönem sonuçlarını görmek ve donöre karşı tolerans sağlamadaki rolünü netleştirmek mümkün olacaktır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Son dönem organ yetmezlikleri ve konvansiyonel yöntemlerle giderilemeyecek kozmetik deformitelerin allotransplantasyonlarla onarılmasının önündeki en büyük engel hayat boyu immüsupresif kullanımını gerektirmesidir.

İmmüsupresif ilaçlar allogreftin rejeksiyonunu önlerken birçok sistemik komplikasyonu da beraberinde getirmektedir. Malignite, enfeksiyonlar, organ yetmezlikleri bunlardan birkaçı olup ölümle sonuçlanabilecek kadar ağır düzeylere ulaşabilmektedir. Literatürde immüsupresiflerin etkinliğini azaltmadan doz bağımlı olarak gelişen bu yan etkileri önlemeye yönelik birçok çalışma yapılmıştır. Bunlar lokal uygulamalar, immüsupresiflerin kombine kullanımları, yeni nesil daha spesifik immüsupresif ajanların geliştirilmesi, kök hücre nakilleri ile tolerans sağlama ve hücresel tedavilerdir. Hücresel tedavilerde mezenkimal kök hücreler önemli yer tutmaktadır. Özellikle kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin immüsupresif etki düzeyi birçok çalışmaya konu olmuştur fakat bugüne kadar literatürde en potent immüsupresif mezenkimal kök hücre olan Wharton jeli mezenkimal kök hücrenin allotransplantasyonlarda allogreft rejeksiyonunun engellenmesi için kullanımına dair yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızda en antijenik doku olan cildin allotransplantasyonunda rejeksiyonu önlemede kullanılan immüsupresif ajanın dozunu azaltarak immüsupresif etkinin aynı oranda devamında Wharton Jeli mezenkimal kök hücreyi kullandık. Tek başına kök hücre kullandığımız grupta kontrol grubundan daha erken rejeksiyon gelişmemesi Wharton Jeli mezenkimal kök hücrenin alloantijen gibi davranmadığını göstermiş ve Siklosporin dozunda 5 mg/kg'lık düşüşün rejeksiyon olmadan tolere edilmesini sağlamıştır. Bu yolla akut rejeksiyonda etkinliği kanıtlanmış ve periferik organ hasarının da önüne geçilmiştir.

6.KAYNAKLAR

- Abul A, Lichtman HA, Pober J. 2000. Cellular and molecular immunology, fourth edition (W.B. Saunders Company: New York).
- Aggarwal, S., and M. F. Pittenger. 2005. 'Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses', *Blood*, 105: 1815-22.
- Alp, Can. 2014. Kök Hücre Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları (Akademisyen Kitabevi: Ankara).
- Amado, L. C., A. P. Saliaris, K. H. Schuleri, M. St John, J. S. Xie, S. Cattaneo, D. J. Durand, T. Fitton, J. Q. Kuang, G. Stewart, S. Lehrke, W. W. Baumgartner, B. J. Martin, A. W. Heldman, and J. M. Hare. 2005. 'Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 11474-9.
- Ameer, F., A. K. Singh, and S. Kumar. 2013. 'Evolution of instruments for harvest of the skin grafts', *Indian J Plast Surg*, 46: 28-35.
- Ana Ramirez-Bosca, Jean Kanitakis, Jean Thivolet 1990. 'Cyclosporin A Exerts a Cytostatic Effect In Vivo on Human and Murine Epithelial Cells ', *Cancer*, 66: 936-40.
- Arnous, S., A. Mozid, and A. Mathur. 2011. 'The Bone Marrow Derived Adult Stem Cells for Dilated Cardiomyopathy (REGENERATE-DCM) trial: study design', *Regen Med*, 6: 525-33.
- Augello, A., R. Tasso, S. M. Negrini, R. Cancedda, and G. Pennesi. 2007. 'Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis', *Arthritis Rheum*, 56: 1175-86.
- Bach, A. D., A. Arkudas, J. Tjiawi, E. Polykandriotis, U. Kneser, R. E. Horch, and J. P. Beier. 2006. 'A new approach to tissue engineering of vascularized skeletal muscle', *J Cell Mol Med*, 10: 716-26.
- Barker, C. F., and R. E. Billingham. 1968. 'The role of afferent lymphatics in the rejection of skin homografts', *J Exp Med*, 128: 197-221.
- Barnard, C. N. 1969. 'Human heart transplantation', *Can Med Assoc J*, 100: 91-104.
- Barret, J. P., J. Gavalda, J. Bueno, X. Nuvials, T. Pont, N. Masnou, M. J. Colomina, J. Serracanta, A. Arno, P. Huguet, J. M. Collado, P. Salamero, C. Moreno, R. Deulofeu, and V. Martinez-Ibanez. 2011. 'Full face transplant: the first case report', *Ann Surg*, 254: 252-6.
- Bartens. 1888. 'Transplantation der Haut von einer Leiche', *Berl Klin Wochenschr*, 25: 649.
- Bartholomew, A., C. Sturgeon, M. Siatskas, K. Ferrer, K. McIntosh, S. Patil, W. Hardy, S. Devine, D. Ucker, R. Deans, A. Moseley, and R. Hoffman. 2002. 'Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo', *Exp Hematol*, 30: 42-8.
- Bateman, Chris. 2015. 'World's first successful penis transplant at Tygerberg Hospital', *S Afr Med J*, 105: 251-52.
- BBCNews. 2003. 'BBC News, Health, Tongue transplant first', Accessed 6 May. <http://news.bbc.co.uk/2/hi/health/3084651.stm>.
- Benichou, G., Y. Yamada, S. H. Yun, C. Lin, M. Fray, and G. Tocco. 2011. 'Immune recognition and rejection of allogeneic skin grafts', *Immunotherapy*, 3: 757-70.
- Bennett, W. M., A. DeMattos, M. M. Meyer, T. Andoh, and J. M. Barry. 1996. 'Chronic cyclosporine nephropathy in renal transplantation', *Transplant Proc*, 28: 2100-3.

- Beyth, S., Z. Borovsky, D. Mevorach, M. Liebergall, Z. Gazit, H. Aslan, E. Galun, and J. Rachmilewitz. 2005. 'Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness', *Blood*, 105: 2214-9.
- Bhansali, A., P. Asokumar, R. Walia, S. Bhansali, V. Gupta, A. Jain, N. Sachdeva, R. R. Sharma, N. Marwaha, and N. Khandelwal. 2014. 'Efficacy and safety of autologous bone marrow-derived stem cell transplantation in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized placebo-controlled study', *Cell Transplant*, 23: 1075-85.
- Bianco, P., M. Riminucci, S. Gronthos, and P. G. Robey. 2001. 'Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications', *Stem Cells*, 19: 180-92.
- Billingham, R. E., L. Brent, and P. B. Medawar. 2003. 'Actively acquired tolerance' of foreign cells. 1953', *Transplantation*, 76: 1409-12.
- Billingham, R. E., P. L. Krohn, and P. B. Medawar. 1951. 'Effect of locally applied cortisone acetate on survival of skin homografts in rabbits', *Br Med J*, 2: 1049-53.
- Bivings, WT. 'Avulsion of the scalp, with report of a case', *Philad Med J* 9: 1020-23.
- Black, K. S., C. W. Hewitt, C. L. Chau, and L. Pizzo. 1988. 'Transdermal application of cyclosporine prolongs skin allograft survival', *Transplant Proc*, 20: 660-2.
- Boland, J., K. Atkinson, K. Britton, P. Darveniza, S. Johnson, and J. Biggs. 1984. 'Tissue distribution and toxicity of cyclosporin A in the mouse', *Pathology*, 16: 117-23.
- Boruckowski, D., D. Gladysz, S. Ruminski, I. Czaplicka-Szmaus, M. Murzyn, A. Olkowicz, K. Kalwak, M. Mielcarek, K. Drabko, J. Styczynski, M. Markiewicz, K. Pawelec, M. Boruckowski, and T. Oldak. 2016. 'Third-party Wharton's jelly mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant acute and chronic graft-versus-host disease: a report of 10 cases', *Turkish Journal of Biology*, 40: 493-500.
- Brandacher, G., J. Grahammer, R. Sucher, and W. P. Lee. 2012. 'Animal models for basic and translational research in reconstructive transplantation', *Birth Defects Res C Embryo Today*, 96: 39-50.
- Brandacher, Gerald. 2015. 'Unique Immunological Features of Vascularized Composite Allografts.' in Kadiyala V. Ravindra (ed.), *The science of Reconstructive Transplantation* (Springer: Newyork).
- Brenner, Michael J.; Tung, Thomas H.; Jensen, John N.; and Mackinnon, Susan E. 2002. 'The spectrum of complications of immunosuppression: Is the time right for hand transplantation?', *The Journal of Bone and Joint Surgery*: 1861-70.
- Bretscher, P. A., and C. Havele. 1992. 'Cyclosporin A can switch the immune response induced by antigen from a humoral to a cell-mediated mode', *Eur J Immunol*, 22: 349-55.
- Buduneli, N., E. Buduneli, S. Cinar, D. Lappin, and D. F. Kinane. 2007. 'Immunohistochemical evaluation of Ki-67 expression and apoptosis in cyclosporin A-induced gingival overgrowth', *J Periodontol*, 78: 282-9.
- Buncke, H. J., W. Y. Hoffman, B. S. Alpert, L. Gordon, and A. E. Stefani. 1982. 'Microvascular transplant of two free scalp flaps between identical twins', *Plast Reconstr Surg*, 70: 605-9.
- Bunger. 1823. 'Gelungener versuch einer nasenbildung aus einem vollig getrennten hautstuck aus dem beine', *J Chir Augenheilk*: 569.
- Calne R, Friend P, Moffatt S. 1998. 'Prope tolerance, perioperative Campath 1H, and low-dose cyclosporin monotherapy in renal allograft recipients', *Lancet*, 352.

- Can, A. 2008. 'A Concise Review on the Classification and Nomenclature of Stem Cells', *Turk J Haematol*, 25: 57-9.
- Can, A., F. T. Celikkan, and O. Cinar. 2017. 'Umbilical cord mesenchymal stromal cell transplantations: A systemic analysis of clinical trials', *Cytotherapy*, 19: 1351-82.
- Canadian Multicentre Transplant Study, Group. 1983. 'A randomized clinical trial of cyclosporine in cadaveric renal transplantation', *N Engl J Med*, 309: 809-15.
- Casellas, J. 2011. 'Inbred mouse strains and genetic stability: a review', *Animal*, 5: 1-7.
- Cendales, L. C., J. Kanitakis, S. Schneeberger, C. Burns, P. Ruiz, L. Landin, M. Rimmelin, C. W. Hewitt, T. Landgren, B. Lyons, C. B. Drachenberg, K. Solez, A. D. Kirk, D. E. Kleiner, and L. Racusen. 2008. 'The Banff 2007 working classification of skin-containing composite tissue allograft pathology', *Am J Transplant*, 8: 1396-400.
- Chan, W. K., A. S. Lau, J. C. Li, H. K. Law, Y. L. Lau, and G. C. Chan. 2008. 'MHC expression kinetics and immunogenicity of mesenchymal stromal cells after short-term IFN-gamma challenge', *Exp Hematol*, 36: 1545-55.
- Che, N., X. Li, S. Zhou, R. Liu, D. Shi, L. Lu, and L. Sun. 2012. 'Umbilical cord mesenchymal stem cells suppress B-cell proliferation and differentiation', *Cell Immunol*, 274: 46-53.
- Chen, G. H., T. Yang, H. Tian, M. Qiao, H. W. Liu, C. C. Fu, M. Miao, Z. M. Jin, X. W. Tang, Y. Han, G. S. He, X. H. Zhang, X. Ma, F. Chen, X. H. Hu, S. L. Xue, Y. Wang, H. Y. Qiu, A. N. Sun, Z. Z. Chen, and D. P. Wu. 2012. '[Clinical study of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells for treatment of nineteen patients with steroid-resistant severe acute graft-versus-host disease]', *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*, 33: 303-6.
- Chiron, P., J. A. Colombier, J. L. Tricoire, J. Puget, G. Utheza, Y. Glock, and P. Puel. 1990. '[A large vascularized allograft of the femoral diaphysis in man]', *Int Orthop*, 14: 269-72.
- Collins, J. M. 1984. 'Pharmacologic rationale for regional drug delivery', *J Clin Oncol*, 2: 498-504.
- Cosimi, A. B., R. C. Burton, R. B. Colvin, G. Goldstein, F. L. Delmonico, M. P. LaQuaglia, N. Tolkoff-Rubin, R. H. Rubin, J. T. Herrin, and P. S. Russell. 1981. 'Treatment of acute renal allograft rejection with OKT3 monoclonal antibody', *Transplantation*, 32: 535-9.
- Couzin, J. 2005. 'Drug discovery. Magnificent obsession', *Science*, 307: 1712-5.
- Cova, L., M. T. Armentero, E. Zennaro, C. Calzarossa, P. Bossolasco, G. Busca, G. Lambertenghi Delilieri, E. Polli, G. Nappi, V. Silani, and F. Blandini. 2010. 'Multiple neurogenic and neurorescue effects of human mesenchymal stem cell after transplantation in an experimental model of Parkinson's disease', *Brain Res*, 1311: 12-27.
- Damle, N. K., L. V. Doyle, L. S. Grosmaire, and J. A. Ledbetter. 1988. 'Differential regulatory signals delivered by antibody binding to the CD28 (Tp44) molecule during the activation of human T lymphocytes', *J Immunol*, 140: 1753-61.
- Davies, N. M., J. Grinyo, R. Heading, B. Maes, H. U. Meier-Kriesche, and M. Oellerich. 2007. 'Gastrointestinal side effects of mycophenolic acid in renal transplant patients: a reappraisal', *Nephrol Dial Transplant*, 22: 2440-8.
- De Miguel, M. P., S. Fuentes-Julian, A. Blazquez-Martinez, C. Y. Pascual, M. A. Aller, J. Arias, and F. Arnalich-Montiel. 2012. 'Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications', *Curr Mol Med*, 12: 574-91.

- Devauchelle, B., L. Badet, B. Lengele, E. Morelon, S. Testelin, M. Michallet, C. D'Hauthuille, and J. M. Dubernard. 2006. 'First human face allograft: early report', *Lancet*, 368: 203-9.
- Doi, K. 1979. 'Homotransplantation of limbs in rats. A preliminary report on an experimental study with nonspecific immunosuppressive drugs', *Plast Reconstr Surg*, 64: 613-21.
- Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, Dj Prockop, and E. Horwitz. 2006. 'Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement', *Cytotherapy*, 8: 315-7.
- Dubernard JM, Owen E, Herzberg G, et al. 1999. ' Human hand allograft: report on first 6 months', *Lancet*, 353: 1315-20.
- Duque, E., J. Duque, M. Nieves, G. Mejia, B. Lopez, and L. Tintinago. 2007. 'Management of larynx and trachea donors', *Transplant Proc*, 39: 2076-8.
- Egashira, K., Fukuda, E., Onga, T., Yogi, Y., Matsuya, F., Koyabu, N., Ohtani, H. , Sawada Y. 2003. 'Pomelo-induced increase in the blood level of tacrolimus in a renal transplant patient', *Transplantation*, 75: 1057.
- Egashira, Kanoko, Hitoshi Sasaki, Shun Higuchi, and Ichiro Ieiri. 2012. 'Food-drug Interaction of Tacrolimus with Pomelo, Ginger, and Turmeric Juice in Rats', *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 27: 242-47.
- Eggenhofer, E., P. Renner, Y. Soeder, F. C. Popp, M. J. Hoogduijn, E. K. Geissler, H. J. Schlitt, and M. H. Dahlke. 2011. 'Features of synergism between mesenchymal stem cells and immunosuppressive drugs in a murine heart transplantation model', *Transpl Immunol*, 25: 141-7.
- Elkins, W. L., and R. D. Guttman. 1968. 'Pathogenesis of a local graft versus host reaction: immunogenicity of circulating host leukocytes', *Science*, 159: 1250-1.
- Emmanuel Morelon, Jean Kanitakis, Palmina Petruzzo, Lionel Badet, Olivier Thaunat. 2015. 'Immunological Challenges in Vascularised Composite Allotransplantation', *Curr Transpl Rep*, 2: 276-83.
- English, K., and K. J. Wood. 2013. 'Mesenchymal stromal cells in transplantation rejection and tolerance', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3: a015560.
- Evans, M. J., and M. H. Kaufman. 1981. 'Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos', *Nature*, 292: 154-6.
- Farwell, D. G., M. A. Birchall, P. Macchiarini, Q. C. Luu, A. M. de Mattos, B. J. Gallay, R. V. Perez, M. P. Grow, R. Ramsamooj, M. D. Salgado, H. A. Brodie, and P. C. Belafsky. 2013. 'Laryngotracheal transplantation: technical modifications and functional outcomes', *Laryngoscope*, 123: 2502-8.
- Fernanda Vieira Paladino, Juliana de Moraes Rodrigues, Aline da Silva, and Anna Carla Goldberg. 2019. 'The Immunomodulatory Potential of Wharton's Jelly Mesenchymal Stem/Stromal Cells', *Stem Cells International Volume*.
- Foroohar, A., R. M. Elliott, T. W. Kim, W. Breidenbach, A. Shaked, and L. S. Levin. 2011. 'The history and evolution of hand transplantation', *Hand Clin*, 27: 405-9, vii.
- Francois, C. G., W. C. Breidenbach, C. Maldonado, T. P. Kakoulidis, A. Hodges, J. M. Dubernard, E. Owen, G. Pei, X. Ren, and J. H. Barker. 2000. 'Hand transplantation: comparisons and observations of the first four clinical cases', *Microsurgery*, 20: 360-71.
- Francois, C. G., P. C. Brouha, L. A. Laurentin-Perez, G. Perez-Abadia, F. V. Grossi, J. H. Barker, C. W. Hewitt, M. Kon, R. Ramsamooj, and C. Maldonado. 2006.

- 'Vascularized lymph node transplantation induces graft-versus-host disease in chimeric hosts', *Transplantation*, 81: 1435-41.
- Freise, C. E., K. Hong, L. E. Clemens, D. Papahadjopoulos, E. Burke, O. Martinez, J. Lake, N. L. Ascher, and J. P. Roberts. 1991. 'Characterization of a cyclosporine-containing liposome', *Transplant Proc*, 23: 473-4.
- Friedenstein, A. J., R. K. Chailakhjan, and K. S. Lalykina. 1970. 'The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells', *Cell Tissue Kinet*, 3: 393-403.
- Fung, J. J. 2004. 'Tacrolimus and transplantation: a decade in review', *Transplantation*, 77: S41-3.
- Furlani, D., M. Ugurlucan, L. Ong, K. Bieback, E. Pittermann, I. Westien, W. Wang, C. Yerebakan, W. Li, R. Gaebel, R. K. Li, B. Vollmar, G. Steinhoff, and N. Ma. 2009. 'Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? Mesenchymal stem cells and intravital microscopy', *Microvasc Res*, 77: 370-6.
- G. O. Hofmann, M. H. Kirschner, V. Bühren, et al. 1995. 'Allogeneic vascularized transplantation of a human femoral diaphysis under cyclosporine A immunosuppression', *Transpl Int*, 8: 418-19
- Gander, B., C. S. Brown, D. Vasilic, A. Furr, J. C. Banis, Jr., M. Cunningham, O. Wiggins, C. Maldonado, I. Whitaker, G. Perez-Abadia, J. M. Frank, and J. H. Barker. 2006. 'Composite tissue allotransplantation of the hand and face: a new frontier in transplant and reconstructive surgery', *Transpl Int*, 19: 868-80.
- Gao, L., Y. Zhang, B. Hu, J. Liu, P. Kong, S. Lou, Y. Su, T. Yang, H. Li, Y. Liu, C. Zhang, L. Gao, L. Zhu, Q. Wen, P. Wang, X. Chen, J. Zhong, and X. Zhang. 2016. 'Phase II Multicenter, Randomized, Double-Blind Controlled Study of Efficacy and Safety of Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells in the Prophylaxis of Chronic Graft-Versus-Host Disease After HLA-Haploidentical Stem-Cell Transplantation', *J Clin Oncol*, 34: 2843-50.
- Garcia-Olmo, D., D. Herreros, I. Pascual, J. A. Pascual, E. Del-Valle, J. Zorrilla, P. De-La-Quintana, M. Garcia-Arranz, and M. Pascual. 2009. 'Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial', *Dis Colon Rectum*, 52: 79-86.
- Gardiner DS, Watson MA, Junor BJ, Briggs JD, More IA, Lindop GB. 1991. 'The effect of conversion from cyclosporine to azathioprine on renin-containing cells in renal allograft biopsies', *Nephrol Dial Transplant*, 6: 363-67.
- Gergely NF, Coles JC. 1970. 'Prolongation of heterotopic cardiac allografts in dogs by topical radiation', *Transplantation*, 9: 193-202.
- Ghannam, S., C. Bouffi, F. Djouad, C. Jorgensen, and D. Noel. 2010. 'Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications', *Stem Cell Res Ther*, 1: 2.
- Giardina, J. J., K. Malinowska, R. Pifarre, M. H. Hwang, J. A. Robinson, H. S. Loeb, and C. E. Lawless. 1990. 'Use of cyclosporine in the mouse heterotopic heart transplant model', *J Heart Transplant*, 9: 106-13.
- Gibson, T., and P. B. Medawar. 1943. 'The fate of skin homografts in man', *J Anat*, 77: 299-310 4.
- Goldman , R., Schilling,E. 1997. 'Immunsuppressive Drug Use During Pregnancy', *Rheum Dis Clin North Am*, 23: 149-67.
- Gorantla, V. S., G. Brandacher, S. Schneeberger, X. X. Zheng, A. D. Donnenberg, J. E. Losee, and W. P. Lee. 2011. 'Favoring the risk-benefit balance for upper extremity transplantation--the Pittsburgh Protocol', *Hand Clin*, 27: 511-20, ix-x.

- Grady. 2016. 'Recipient of first penis transplant in U.S. is released from hospital', *The New York Times*. Available from: <https://www.nytimes.com/2016/06/02/health/penis-transplant-thomas-manning-goes-home.html> [Erişim tarihi: January 20, 2017].
- Gribben, J. G., E. C. Guinan, V. A. Boussiotis, X. Y. Ke, L. Linsley, C. Sieff, G. S. Gray, G. J. Freeman, and L. M. Nadler. 1996. 'Complete blockade of B7 family-mediated costimulation is necessary to induce human alloantigen-specific anergy: a method to ameliorate graft-versus-host disease and extend the donor pool', *Blood*, 87: 4887-93.
- Grinyo, J., B. Charpentier, J. M. Pestana, Y. Vanrenterghem, F. Vincenti, R. Reyes-Acevedo, A. M. Apanovitch, S. Gujrathi, M. Agarwal, D. Thomas, and C. P. Larsen. 2010. 'An integrated safety profile analysis of belatacept in kidney transplant recipients', *Transplantation*, 90: 1521-7.
- Groh, M. E., B. Maitra, E. Szekely, and O. N. Koc. 2005. 'Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells', *Exp Hematol*, 33: 928-34.
- Gross, F. 1895. 'Le scalp et son traitement par les greffes dermo-epidermiques d'OllierThiersch', *Sem Med*, 15: 221.
- Gruber, S. A. 1992. 'The case for local immunosuppression', *Transplantation*, 54: 1-11.
- Guimberteau, J. C., J. Baudet, B. Panconi, R. Boileau, and L. Potaux. 1992. 'Human allotransplant of a digital flexion system vascularized on the ulnar pedicle: a preliminary report and 1-year follow-up of two cases', *Plast Reconstr Surg*, 89: 1135-47.
- Guo, S., Y. Han, X. Zhang, B. Lu, C. Yi, H. Zhang, X. Ma, D. Wang, L. Yang, X. Fan, Y. Liu, K. Lu, and H. Li. 2008. 'Human facial allotransplantation: a 2-year follow-up study', *Lancet*, 372: 631-8.
- Halperin EC, Delmonico FL, Nelson PW, Shipley WU, Cosimi AB. 1984. 'The use of local allograft irradiation following renal transplantation', *Radiat Oncol Biol Phys*, 10: 987-90.
- Hasek, M. 1953. '[Vegetative hybridization of animals by means of junction of the blood circulation during embryonic development]', *Chekhoslovatskaia Biol*, 2: 267-82.
- Hass, R., C. Kasper, S. Bohm, and R. Jacobs. 2011. 'Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC', *Cell Commun Signal*, 9: 12.
- Hedrick MH, Daniels EJ. 2003. 'The use of adult stem cells in regenerative medicine', *Clin Plast Surg*, 30: 499-505.
- Heo, S. C., E. S. Jeon, I. H. Lee, H. S. Kim, M. B. Kim, and J. H. Kim. 2011. 'Tumor necrosis factor-alpha-activated human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells accelerate cutaneous wound healing through paracrine mechanisms', *J Invest Dermatol*, 131: 1559-67.
- Hettiaratchy, S., P. E. Butler, and W. P. Lee. 2001. 'Lessons from hand transplantations', *Lancet*, 357: 494-5.
- Hickman, P. E., J. M. Potter, and A. J. Pesce. 1997. 'Clinical chemistry and post-liver-transplant monitoring', *Clin Chem*, 43: 1546-54.
- Hofmann, G. O., M. H. Kirschner, F. D. Wagner, L. Brauns, O. Gonschorek, and V. Buhren. 1998. 'Allogeneic vascularized transplantation of human femoral diaphyses and total knee joints--first clinical experiences', *Transplant Proc*, 30: 2754-61.
- Hotchkiss, R. S., A. Strasser, J. E. McDunn, and P. E. Swanson. 2009. 'Cell death', *N Engl J Med*, 361: 1570-83.

- Hovius, S. E., H. P. Stevens, P. W. Van Nierop, M. Godschalk, A. Kusuma, G. Deelen, M. Van de Bergh, and J. C. Van der Meulen. 1992. 'Replantation of the radial side of the hand in the rhesus monkey: anatomical and functional aspects. A preliminary study to composite tissue allografting', *J Hand Surg Br*, 17: 651-6.
- Hsieh, J. Y., Y. S. Fu, S. J. Chang, Y. H. Tsuang, and H. W. Wang. 2010. 'Functional module analysis reveals differential osteogenic and stemness potentials in human mesenchymal stem cells from bone marrow and Wharton's jelly of umbilical cord', *Stem Cells Dev*, 19: 1895-910.
- Hsieh, Y. H., W. F. Chen, J. J. Huang, C. W. Wu, H. Engel, and M. H. Cheng. 2012. 'Vascularized bone marrow allotransplantation and low-dose cyclosporine prolong the survival of adipose tissue allografts', *Plast Reconstr Surg*, 130: 64-72.
- Hu, W., J. Lu, L. Zhang, W. Wu, H. Nie, Y. Zhu, Z. Deng, Y. Zhao, W. Sheng, Q. Chao, X. Qiu, J. Yang, and Y. Bai. 2006. 'A preliminary report of penile transplantation', *Eur Urol*, 50: 851-3.
- Hugo Wéclawiak, Nassim Kamar, Abdoulattif Ould-Mohamed, Isabelle Cardeau-Desangles & Lionel Rostaing. 2010. 'Biological agents in kidney transplantation: belatacept is entering the field', *Expert Opinion on Biological Therapy*, 10: 1501-08.
- Hübscher, C. 1889. 'Beitrage zur Hautverpflanzung nach Thiersch. Bruns' ', *Beitr Klin Chir*, 4: 395-421.
- Ildstad, S. T., and D. H. Sachs. 1984. 'Reconstitution with syngeneic plus allogeneic or xenogeneic bone marrow leads to specific acceptance of allografts or xenografts', *Nature*, 307: 168-70.
- Inoue, S., F. C. Popp, G. E. Koehl, P. Piso, H. J. Schlitt, E. K. Geissler, and M. H. Dahlke. 2006. 'Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in a rat organ transplant model', *Transplantation*, 81: 1589-95.
- Ivanova, SS. 1890. 'The transplantation of skin from dead body to granulating surface ', *Ann Surg*, 12: 354-55.
- J. D. Bos, M. L. Kapsenberg. 1986. 'The skin immune system Its cellular constituents and their interactions', *Immunol Today*, 7: 235-40.
- Jahnavi, S. Jyothi Prasanna and V. S. 2011. 'Wharton's jelly mesenchymal stem cells as off-the-shelf cellular therapeutics: a closer look into their regenerative and immunomodulatory properties', *Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal*, 4: 28-38.
- James Selfe, Jonathan Whitaker, Natalie Hardaker. 2008. 'A narrative literature review identifying the minimum clinically important difference for skin temperature asymmetry at the knee', *Thermology international*, 18: 51-54.
- Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. . 2001. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* (Garland Science: Newyork).
- Janikowska, G., T. Janikowski, A. Pyka, A. Wilczok, and U. Mazurek. 2016. 'Cyclosporin a Affects the Proliferation Process in Normal Human Dermal Fibroblasts', *Acta Pol Pharm*, 73: 55-63.
- Jarmo Alametsä, Markku Oikarainen, Jarmo Perttunen, Jari Viik, Annikki Vaalasti 2018. 'Thermal imaging in skin trauma evaluation: observations by CAT S60 mobile phone', *FinJeHeW*, 10: 192-96.
- Jiang, H. Q., Y. Wang, X. B. Hu, Y. S. Li, and J. S. Li. 2005. 'Composite tissue allograft transplantation of cephalocervical skin flap and two ears', *Plast Reconstr Surg*, 115: 31e-35e; discussion 36e-37e.

- Jones, J. W., S. A. Gruber, J. H. Barker, and W. C. Breidenbach. 2000. 'Successful hand transplantation. One-year follow-up. Louisville Hand Transplant Team', *N Engl J Med*, 343: 468-73.
- Jones, T. R., P. A. Humphrey, and D. C. Brennan. 1998. 'Transplantation of vascularized allogeneic skeletal muscle for scalp reconstruction in renal transplant patient', *Transplant Proc*, 30: 2746-53.
- Josephson, M. A. 2011. 'Monitoring and managing graft health in the kidney transplant recipient', *Clin J Am Soc Nephrol*, 6: 1774-80.
- June, C. H., J. A. Ledbetter, P. S. Linsley, and C. B. Thompson. 1990. 'Role of the CD28 receptor in T-cell activation', *Immunol Today*, 11: 211-6.
- Jung, J. W., M. Kwon, J. C. Choi, J. W. Shin, I. W. Park, B. W. Choi, and J. Y. Kim. 2013. 'Familial occurrence of pulmonary embolism after intravenous, adipose tissue-derived stem cell therapy', *Yonsei Med J*, 54: 1293-6.
- Kanitakis J, Petruzzo P, Jullien D, et al. 2005. 'Pathological score for the evaluation of allograft rejection in human hand (composite tissue) allotransplantation', *Eur J Dermatol*, 15: 235.
- Kanitakis, J., L. Badet, P. Petruzzo, J. L. Beziat, E. Morelon, N. Lefrancois, C. Frances, A. Claudy, X. Martin, B. Lengele, S. Testelin, B. Devauchelle, and J. M. Dubernard. 2006. 'Clinicopathologic monitoring of the skin and oral mucosa of the first human face allograft: Report on the first eight months', *Transplantation*, 82: 1610-5.
- Kanitakis, J., D. Jullien, P. Petruzzo, N. Hakim, A. Claudy, J. P. Revillard, E. Owen, and J. M. Dubernard. 2003. 'Clinicopathologic features of graft rejection of the first human hand allograft', *Transplantation*, 76: 688-93.
- Karaöz E , Çetinalp Demircan P, Erman G, Güngörürler E, Eker Sarıboyacı A. 2017. 'Comparative Analyses of Immunosuppressive Characteristics of Bone-Marrow, Wharton's Jelly, and Adipose Tissue-Derived Human Mesenchymal Stem Cells', *Türk J Haematol*, 34: 213-25.
- Karaöz E, Tepeköy F. 2019. 'Organ Transplantasyonunda Mezenkimal Kök Hücrelerin Bağışıklık Baskılayıcı Rollerini', *Kök Hücre ve Transplantasyon İmmünolojisi*. 1. Baskı, Türkiye Klinikler: 9-19.
- Kelly PA, Gruber SA, Behbod F, Kahan BD. 1997. 'Sirolimus, a new, potent immunosuppressive agent', *Pharmacotherapy*, 17: 1148-56.
- Kelly, W. D., R. C. Lillehei, F. K. Merkel, Y. Idezuki, and F. C. Goetz. 1967. 'Allotransplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy', *Surgery*, 61: 827-37.
- Kim, D. S., I. K. Jang, M. W. Lee, Y. J. Ko, D. H. Lee, J. W. Lee, K. W. Sung, H. H. Koo, and K. H. Yoo. 2018. 'Enhanced Immunosuppressive Properties of Human Mesenchymal Stem Cells Primed by Interferon-gamma', *EBioMedicine*, 28: 261-73.
- Kirk, A. D., R. B. Mannon, S. J. Swanson, and D. A. Hale. 2005. 'Strategies for minimizing immunosuppression in kidney transplantation', *Transpl Int*, 18: 2-14.
- Klepetko, W., G. M. Marta, W. Wisser, E. Melis, A. Kocher, G. Seebacher, C. Aigner, and S. Mazhar. 2004. 'Heterotopic tracheal transplantation with omentum wrapping in the abdominal position preserves functional and structural integrity of a human tracheal allograft', *J Thorac Cardiovasc Surg*, 127: 862-7.
- Kluyskens, P., and S. Ringoir. 1970. 'Follow-up of a human larynx transplantation', *Laryngoscope*, 80: 1244-50.

- Knauer, G. 1889. 'Ueber die Deckung grosser Hautdefekte mittels der Thiersch'schen Transplantationsmethode. Inaugural thesis', Kgl Julius-Maximilians Universitat Wtirzburg, Bonitas-Bauer, Wtirzburg.
- Kohler, G., and C. Milstein. 1975. 'Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity', *Nature*, 256: 495-7.
- Kolios, G., and Y. Moodley. 2013. 'Introduction to stem cells and regenerative medicine', *Respiration*, 85: 3-10.
- Kountz, S. L., and R. Cohn. 1969. 'Initial treatment of renal allografts with large intrarenal doses of immunosuppressive drugs', *Lancet*, 1: 338-40.
- Kuo YR, Chen CC, Shih HS, Goto S, Huang CW, Wang CT, Chen CL, Wei FC. 2011. 'Prolongation of composite tissue allotransplant survival by treatment with bone marrow mesenchymal stem cells is correlated with T-cell regulation in a swine hind-limb model', *Plast Reconstr Surg*, 127: 569-79.
- Lakkis, F. G., A. Arakelov, B. T. Konieczny, and Y. Inoue. 2000. 'Immunologic 'ignorance' of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue', *Nat Med*, 6: 686-8.
- Lally, C., E. Healy, and M. P. Ryan. 1999. 'Cyclosporine A-induced cell cycle arrest and cell death in renal epithelial cells', *Kidney Int*, 56: 1254-7.
- Lance, E. M., A. E. Inglis, F. Figarola, and F. J. Veith. 1971. 'Transplantation of the canine hind limb. Surgical technique and methods of immunosuppression for allotransplantation. A preliminary report', *J Bone Joint Surg Am*, 53: 1137-49.
- Lantieri, L., P. Grimbert, N. Ortonne, C. Suberbielle, D. Bories, S. Gil-Vernet, C. Lemogne, F. Bellivier, J. P. Lefaucheur, N. Schaffer, F. Martin, J. P. Meningaud, P. Wolkenstein, and M. Hivelin. 2016. 'Face transplant: long-term follow-up and results of a prospective open study', *Lancet*, 388: 1398-407.
- Larsen, C. P., E. T. Elwood, D. Z. Alexander, S. C. Ritchie, R. Hendrix, C. Tucker-Burden, H. R. Cho, A. Aruffo, D. Hollenbaugh, P. S. Linsley, K. J. Winn, and T. C. Pearson. 1996. 'Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways', *Nature*, 381: 434-8.
- Larsen, C. P., T. C. Pearson, A. B. Adams, P. Tso, N. Shirasugi, E. Strobert, D. Anderson, S. Cowan, K. Price, J. Naemura, J. Emswiler, J. Greene, L. A. Turk, J. Bajorath, R. Townsend, D. Hagerty, P. S. Linsley, and R. J. Peach. 2005. 'Rational development of LEA29Y (belatacept), a high-affinity variant of CTLA4-Ig with potent immunosuppressive properties', *Am J Transplant*, 5: 443-53.
- Larsen, C. P., R. M. Steinman, M. Witmer-Pack, D. F. Hankins, P. J. Morris, and J. M. Austyn. 1990. 'Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants', *J Exp Med*, 172: 1483-93.
- Le Blanc, K., I. Rasmusson, C. Gotherstrom, C. Seidel, B. Sundberg, M. Sundin, K. Rosendahl, C. Tammik, and O. Ringden. 2004. 'Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohaemagglutinin-activated lymphocytes', *Scand J Immunol*, 60: 307-15.
- Le Blanc, K., and O. Ringden. 2007. 'Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience', *J Intern Med*, 262: 509-25.
- Lechler, R. I., M. Sykes, A. W. Thomson, and L. A. Turka. 2005. 'Organ transplantation--how much of the promise has been realized?', *Nat Med*, 11: 605-13.
- Lee, W. P., M. J. Yaremchuk, Y. C. Pan, M. A. Randolph, C. M. Tan, and A. J. Weiland. 1991. 'Relative antigenicity of components of a vascularized limb allograft', *Plast Reconstr Surg*, 87: 401-11.

- Lee, W.P.A, Butler P.E.M, Mathes DW. 2006. Mathes S.J (ed.), Mathes Plastic Surgery (Saunders Elsevier: Philadelphia).
- Levashov Yu, N., P. K. Yablonsky, S. M. Cherny, S. V. Orlov, B. B. Shafirovsky, and I. M. Kuznetsov. 1993. 'One-stage allotransplantation of thoracic segment of the trachea in a patient with idiopathic fibrosing mediastinitis and marked tracheal stenosis', *Eur J Cardiothorac Surg*, 7: 383-6.
- Levi, D. M., A. G. Tzakis, T. Kato, J. Madariaga, N. K. Mittal, J. Nery, S. Nishida, and P. Ruiz. 2003. 'Transplantation of the abdominal wall', *Lancet*, 361: 2173-6.
- Li, X., L. Liu, D. Meng, D. Wang, J. Zhang, D. Shi, H. Liu, H. Xu, L. Lu, and L. Sun. 2012. 'Enhanced apoptosis and senescence of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells in patients with systemic lupus erythematosus', *Stem Cells Dev*, 21: 2387-94.
- Lian Tao Li, Guan Jiang, Qian Chen Jun, Nian Zheng. 2014. 'Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer', *Molecular Medicine Reports*, 11: 1566-72.
- Liechty, K. W., T. C. MacKenzie, A. F. Shaaban, A. Radu, A. M. Moseley, R. Deans, D. R. Marshak, and A. W. Flake. 2000. 'Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep', *Nat Med*, 6: 1282-6.
- Liu, X. L., W. Zhang, and S. J. Tang. 2014. 'Intracranial transplantation of human adipose-derived stem cells promotes the expression of neurotrophic factors and nerve repair in rats of cerebral ischemia-reperfusion injury', *Int J Clin Exp Pathol*, 7: 174-83.
- Lopez-Flores, R., R. Bojalil, J. C. Benitez, Y. Ledesma-Soto, C. A. Terrazas, M. Rodriguez-Sosa, and L. I. Terrazas. 2011. 'Consecutive low doses of cyclosporine A induce pro-inflammatory cytokines and accelerate allograft skin rejection', *Molecules*, 16: 3969-84.
- Lorenz, R. R., and M. Strome. 2014. 'Total laryngeal transplant explanted: 14 years of lessons learned', *Otolaryngol Head Neck Surg*, 150: 509-11.
- Lu, L. F., E. F. Lind, D. C. Gondek, K. A. Bennett, M. W. Gleeson, K. Pino-Lagos, Z. A. Scott, A. J. Coyle, J. L. Reed, J. Van Snick, T. B. Strom, X. X. Zheng, and R. J. Noelle. 2006. 'Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance', *Nature*, 442: 997-1002.
- Lubbe, A. S., C. Bergemann, H. Riess, F. Schriever, P. Reichardt, K. Possinger, M. Matthias, B. Dorken, F. Herrmann, R. Gurtler, P. Hohenberger, N. Haas, R. Sohr, B. Sander, A. J. Lemke, D. Ohlendorf, W. Huhnt, and D. Huhn. 1996. 'Clinical experiences with magnetic drug targeting: a phase I study with 4'-epidoxorubicin in 14 patients with advanced solid tumors', *Cancer Res*, 56: 4686-93.
- Maccario, R., A. Moretta, A. Cometa, D. Montagna, P. Comoli, F. Locatelli, M. Podesta, and F. Frassoni. 2005. 'Human mesenchymal stem cells and cyclosporin a exert a synergistic suppressive effect on in vitro activation of alloantigen-specific cytotoxic lymphocytes', *Biol Blood Marrow Transplant*, 11: 1031-2.
- Mackinnon, S. E., V. B. Doolabh, C. B. Novak, and E. P. Trulock. 2001. 'Clinical outcome following nerve allograft transplantation', *Plast Reconstr Surg*, 107: 1419-29.
- Madani, H., S. Hettiaratchy, A. Clarke, and P. E. Butler. 2008. 'Immunosuppression in an emerging field of plastic reconstructive surgery: composite tissue allotransplantation', *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 61: 245-9.
- Marino, L., M. A. Castaldi, R. Rosamilio, E. Ragni, R. Vitolo, C. Fulgione, S. G. Castaldi, B. Serio, R. Bianco, M. Guida, and C. Selleri. 2019. 'Mesenchymal Stem Cells from the Whartons Jelly of the Human Umbilical Cord: Biological Properties and Therapeutic Potential', *Int J Stem Cells*.

- Matsuo, S, Kurisaki, A, Sugino, H, Hashimoto, I, Nakanishi. 2007. 'Analysis of skin graft survival using green fluorescent protein transgenic mice', *J Med Invest*: 267-75.
- Mazhari, R., and J. M. Hare. 2007. 'Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cardiac repair: potential influences on the cardiac stem cell niche', *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 4 Suppl 1: S21-6.
- Medawar, P. B. 1944. 'The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits: A report to the War Wounds Committee of the Medical Research Council', *J Anat*, 78: 176-99.
- Meeker, T. C., J. Lowder, D. G. Maloney, R. A. Miller, K. Thielemans, R. Warnke, and R. Levy. 1985. 'A clinical trial of anti-idiotypic therapy for B cell malignancy', *Blood*, 65: 1349-63.
- Mellish, EJ. 1904. 'Total avulsion of the scalp', *Ann Surg*, 40: 644-49.
- Miroux, C., O. Morales, A. Carpentier, S. Dharancy, F. Conti, E. Boleslawski, P. Podevin, C. Auriault, V. Pancre, and N. Delhem. 2009. 'Inhibitory effects of cyclosporine on human regulatory T cells in vitro', *Transplant Proc*, 41: 3371-4.
- Monaco, A. P., A. W. Clark, M. L. Wood, A. I. Sahyoun, S. D. Codish, and R. W. Brown. 1976. 'Possible active enhancement of a human cadaver renal allograft with antilymphocyte serum (ALS) and donor bone marrow: case report of an initial attempt', *Surgery*, 79: 384-92.
- MT Abou Elkhier, RR EL- Zehary , MI Mourad, NT Abou El-Khier. 2014. 'Immunohistochemical assessment of Bcl-2 and Ki-67 in gingival tissues of normal and immunosuppressed patients as predictors of neoplasia', *Annals of Oral & Maxillofacial Surgery*, 10: 1-8.
- Murray, J. E., J. P. Merrill, and J. H. Harrison. 1958. 'Kidney transplantation between seven pairs of identical twins', *Ann Surg*, 148: 343-59.
- O'Connell, S., C. Slattery, M. P. Ryan, and T. McMorow. 2011. 'Identification of novel indicators of cyclosporine A nephrotoxicity in a CD-1 mouse model', *Toxicol Appl Pharmacol*, 252: 201-10.
- Ojo, Akinlolu O., Philip J. Held, Friedrich K. Port, Robert A. Wolfe, Alan B. Leichtman, Eric W. Young, Julie Arndorfer, Laura Christensen, and Robert M. Merion. 2003. 'Chronic Renal Failure after Transplantation of a Nonrenal Organ', *New England Journal of Medicine*, 349: 931-40.
- P. Sbano, A. Cuccia, B. Mazzanti, S. Urbani, B. Giusti, I. Lapini, L. Rossi, R. Abbate, G. Marseglia, G. Nannetti, et al. 2008. 'Use of donor bone marrow mesenchymal stem cells for treatment of skin allograft rejection in a preclinical rat model', *Arch. Dermatol. Res*, 300: 115-24.
- Pakyari, M., A. Farokhi, M. Khosravi-Maharlooei, R. T. Kilani, A. Ghahary, and E. Brown. 2016. 'A new method for skin grafting in murine model', *Wound Repair Regen*, 24: 695-704.
- Parekkadan, B., and J. M. Milwid. 2010. 'Mesenchymal stem cells as therapeutics', *Annu Rev Biomed Eng*, 12: 87-117.
- Peacock, E. E., Jr. 1960. 'Homologous composite tissue grafts of the digital flexor mechanism in human beings', *Transplant Bull*, 7: 418-21.
- Pei, G., L. Gu, and L. Yu. 2000. '[A preliminary report of two cases of human hand allograft]', *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 80: 417-21.
- Perez-Abadia, G., L. Laurentin-Perez, V. S. Gorantla, C. G. Francois, M. Vossen, P. C. Brouha, H. I. Orhun, G. L. Anderson, C. Maldonado, D. J. Pidwell, W. C.

- Breidenbach, and J. H. Barker. 2003. 'Low-dose immunosuppression in a rat hind-limb transplantation model', *Transpl Int*, 16: 835-42.
- Perico, N., F. Casiraghi, M. Inrona, E. Gotti, M. Todeschini, R. A. Cavinato, C. Capelli, A. Rambaldi, P. Cassis, P. Rizzo, M. Cortinovis, M. Marasa, J. Golay, M. Noris, and G. Remuzzi. 2011. 'Autologous mesenchymal stromal cells and kidney transplantation: a pilot study of safety and clinical feasibility', *Clin J Am Soc Nephrol*, 6: 412-22.
- Petit, F., A. B. Minns, J. A. Nazzal, S. P. Hettiaratchy, L. A. Lantieri, M. A. Randolph, and W. P. Lee. 2004. 'Prolongation of skin allograft survival after neonatal injection of donor bone marrow and epidermal cells', *Plast Reconstr Surg*, 113: 270-6.
- Pirsch, J. D., J. Miller, M. H. Deierhoi, F. Vincenti, and R. S. Filo. 1997. 'A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation. FK506 Kidney Transplant Study Group', *Transplantation*, 63: 977-83.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, and D. R. Marshak. 1999. 'Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells', *Science*, 284: 143-7.
- Ponticelli, C., and R. J. Glasscock. 2019. 'Prevention of complications from use of conventional immunosuppressants: a critical review', *J Nephrol*.
- Popp, F. C., E. Eggenhofer, P. Renner, P. Slowik, S. A. Lang, H. Kaspar, E. K. Geissler, P. Piso, H. J. Schlitt, and M. H. Dahlke. 2008. 'Mesenchymal stem cells can induce long-term acceptance of solid organ allografts in synergy with low-dose mycophenolate', *Transpl Immunol*, 20: 55-60.
- Prasanna, S. J., D. Gopalakrishnan, S. R. Shankar, and A. B. Vasandan. 2010. 'Pro-inflammatory cytokines, IFNgamma and TNFalpha, influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially', *PLoS One*, 5: e9016.
- Prigozhina, T., and S. Slavin. 2004. 'Transplantation of hematopoietic stem cells for induction of unresponsiveness to organ allografts', *Springer Semin Immunopathol*, 26: 169-85.
- Qiao, S. M., G. H. Chen, Y. Wang, S. Y. Hu, X. D. Sun, and D. P. Wu. 2013. '[Curative effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells for treatment of acute graft-versus-host disease of children after allo-HSCT]', *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 21: 716-20.
- R.M Langer , B.D Kahan 2002. 'Alexis Carrel's legacy: visionary of vascular surgery and organ transplantation', 34: 1061-66.
- Racusen, L. C., K. Solez, R. B. Colvin, S. M. Bonsib, M. C. Castro, T. Cavallo, B. P. Croker, A. J. Demetris, C. B. Drachenberg, A. B. Fogo, P. Furness, L. W. Gaber, I. W. Gibson, D. Glotz, J. C. Goldberg, J. Grande, P. F. Halloran, H. E. Hansen, B. Hartley, P. J. Hayry, C. M. Hill, E. O. Hoffman, L. G. Hunsicker, A. S. Lindblad, Y. Yamaguchi, and et al. 1999. 'The Banff 97 working classification of renal allograft pathology', *Kidney Int*, 55: 713-23.
- Rasmusson, I., O. Ringden, B. Sundberg, and K. Le Blanc. 2003. 'Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells', *Transplantation*, 76: 1208-13.
- Reinders, M. E., J. W. de Fijter, H. Roelofs, I. M. Bajema, D. K. de Vries, A. F. Schaapherder, F. H. Claas, P. P. van Miert, D. L. Roelen, C. van Kooten, W. E. Fibbe, and T. J. Rabelink. 2013. 'Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of allograft rejection after renal transplantation: results of a phase I study', *Stem Cells Transl Med*, 2: 107-11.

- Ren, G., J. Su, L. Zhang, X. Zhao, W. Ling, A. L'Huillie, J. Zhang, Y. Lu, A. I. Roberts, W. Ji, H. Zhang, A. B. Rabson, and Y. Shi. 2009. 'Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression', *Stem Cells*, 27: 1954-62.
- Retik, A. B., J. M. Dubernard, W. J. Hester, and J. E. Murray. 1966. 'A study of the effects of intra-arterial immunosuppressive drug therapy on canine renal allografts', *Surgery*, 60: 1242-50.
- Reverdin, J.L. 1869. 'Grefe epidermiques. Experience faite dans le service de M le Docteur Guyon a l'Hopital Necker', *Bull Soc Imp Chir Paris*.
- Ribeiro, A., P. Laranjeira, S. Mendes, I. Velada, C. Leite, P. Andrade, F. Santos, A. Henriques, M. Graos, C. M. Cardoso, A. Martinho, M. Pais, C. L. da Silva, J. Cabral, H. Trindade, and A. Paiva. 2013. 'Mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix, adipose tissue and bone marrow exhibit different capability to suppress peripheral blood B, natural killer and T cells', *Stem Cell Res Ther*, 4: 125.
- Richters, C. D., M. J. Hoekstra, J. S. du Pont, R. W. Kreis, and E. W. Kamperdijk. 2005. 'Immunology of skin transplantation', *Clin Dermatol*, 23: 338-42.
- Ringden, O., M. Uzunel, I. Rasmusson, M. Remberger, B. Sundberg, H. Lonnies, H. U. Marschall, A. Dlugosz, A. Szakos, Z. Hassan, B. Omazic, J. Aschan, L. Barkholt, and K. Le Blanc. 2006. 'Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease', *Transplantation*, 81: 1390-7.
- Romano, C. L., D. Romano, F. Dell'Oro, N. Logoluso, and L. Drago. 2011. 'Healing of surgical site after total hip and knee replacements show similar telethermographic patterns', *J Orthop Traumatol*, 12: 81-6.
- Rose, K. G., K. Sesterhenn, and F. Wustrow. 1979. 'Tracheal allotransplantation in man', *Lancet*, 1: 433.
- Schneeberger, S., L. Landin, J. Jableki, P. Butler, C. Hoehnke, G. Brandacher, E. Morelon, and Esot Cta Working Group. 2011. 'Achievements and challenges in composite tissue allotransplantation', *Transpl Int*, 24: 760-9.
- Schneeberger, S., L. Landin, C. Kaufmann, V. S. Gorantla, G. Brandacher, P. Cavadas, W. P. Lee, W. C. Breidenbach, and R. Margreiter. 2009. 'Alemtuzumab: key for minimization of maintenance immunosuppression in reconstructive transplantation?', *Transplant Proc*, 41: 499-502.
- Schuind, F., D. Abramowicz, and S. Schneeberger. 2007. 'Hand transplantation: the state-of-the-art', *J Hand Surg Eur Vol*, 32: 2-17.
- Shawler, D. L., R. M. Bartholomew, L. M. Smith, and R. O. Dillman. 1985. 'Human immune response to multiple injections of murine monoclonal IgG', *J Immunol*, 135: 1530-5.
- Sheyn, D., M. Ruthemann, O. Mizrahi, I. Kallai, Y. Zilberman, W. Tawackoli, L. E. Kanim, L. Zhao, H. Bae, G. Pelled, J. G. Snedeker, and D. Gazit. 2010. 'Genetically modified mesenchymal stem cells induce mechanically stable posterior spine fusion', *Tissue Eng Part A*, 16: 3679-86.
- Shirbacheh, M. V., J. W. Jones, W. C. Breidenbach, S. McCabe, J. H. Barker, and S. A. Gruber. 1998. 'The case for local immunosuppression in composite tissue allotransplantation', *Transplant Proc*, 30: 2739-42.
- Sick, C. 1892. 'Muench Med Wochenschr', 39: 115.
- Siemionow, M., F. Papay, D. Alam, S. Bernard, R. Djohan, C. Gordon, M. Hendrickson, R. Lohman, B. Eghtesad, K. Coffman, E. Kodish, C. Paradis, R. Avery, and J. Fung. 2009. 'Near-total human face transplantation for a severely disfigured patient in the USA', *Lancet*, 374: 203-9.

- Silverstein, A. 2013. 'World's first double-transplant patient loses legs', Accessed 26 August. <https://www.pri.org/stories/2013-06-11/worlds-first-double-transplant-patient-loses-legs>.
- Silverstein, A. M. 2016. 'The curious case of the 1960 Nobel Prize to Burnet and Medawar', *Immunology*, 147: 269-74.
- Singer, N. G., and A. I. Caplan. 2011. 'Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation', *Annu Rev Pathol*, 6: 457-78.
- Sioud, M., A. Mobergslén, A. Boudabous, and Y. Floisand. 2010. 'Evidence for the involvement of galectin-3 in mesenchymal stem cell suppression of allogeneic T-cell proliferation', *Scand J Immunol*, 71: 267-74.
- Smith, K. A. 1988. 'Interleukin-2: inception, impact, and implications', *Science*, 240: 1169-76.
- Spalding, S. J., C. K. Kwok, R. Boudreau, J. Enama, J. Lunich, D. Huber, L. Denes, and R. Hirsch. 2008. 'Three-dimensional and thermal surface imaging produces reliable measures of joint shape and temperature: a potential tool for quantifying arthritis', *Arthritis Res Ther*, 10: R10.
- Squifflet, J. P. 2003. 'From Leg Transplantation by St Cosmas and St Damian to the Modern Era', *Acta Chir Belg*, 103 Suppl 1: 6-9.
- Srinivas, T. R., and H. U. Meier-Kriesche. 2008. 'Minimizing immunosuppression, an alternative approach to reducing side effects: objectives and interim result', *Clin J Am Soc Nephrol*, 3 Suppl 2: S101-16.
- Stark, G. B., W. M. Swartz, K. Narayanan, and A. R. Moller. 1987. 'Hand transplantation in baboons', *Transplant Proc*, 19: 3968-71.
- Starzl, T. E. 1993. 'The French Heritage in Clinical Kidney Transplantation', *Transplant Rev (Orlando)*, 7: 65-71.
- Starzl, T. E., C. G. Groth, L. Brettschneider, I. Penn, V. A. Fulginiti, J. B. Moon, H. Blanchard, A. J. Martin, Jr., and K. A. Porter. 1968. 'Orthotopic homotransplantation of the human liver', *Ann Surg*, 168: 392-415.
- Starzl, T. E., T. L. Marchioro, K. N. Vonkaulla, G. Hermann, R. S. Brittain, and W. R. Waddell. 1963. 'Homotransplantation of the Liver in Humans', *Surg Gynecol Obstet*, 117: 659-76.
- Starzl TE, Marchioro TL, Hutchinson DE, Porter KA, Cerilli GJ, Brettschneider L. 1967. 'The clinical use of antilymphocyte globulin in renal homotransplantation', *Transplantation*, 5: 1100-5.
- Steinmuller, D., and S. S. Wachtel. 1980. 'Transplantation biology and immunogenetics of murine skin-specific (Sk) alloantigens', *Transplant Proc*, 12: 100-6.
- Stenderup, K., J. Justesen, C. Clausen, and M. Kassem. 2003. 'Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells', *Bone*, 33: 919-26.
- Sun, L., K. Akiyama, H. Zhang, T. Yamaza, Y. Hou, S. Zhao, T. Xu, A. Le, and S. Shi. 2009. 'Mesenchymal stem cell transplantation reverses multiorgan dysfunction in systemic lupus erythematosus mice and humans', *Stem Cells*, 27: 1421-32.
- Suntharalingam, G., M. R. Perry, S. Ward, S. J. Brett, A. Castello-Cortes, M. D. Brunner, and N. Panoskaltsis. 2006. 'Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412', *N Engl J Med*, 355: 1018-28.

- Suzuki, S., M. Kanashiro, and H. Amemiya. 1987. 'Effect of a new immunosuppressant, 15-deoxyspergualin, on heterotopic rat heart transplantation, in comparison with cyclosporine', *Transplantation*, 44: 483-7.
- Sykes, M. 2007. 'Immune tolerance: mechanisms and application in clinical transplantation', *J Intern Med*, 262: 288-310.
- Tan, P., C. Anasetti, J. A. Hansen, J. Melrose, M. Brunvand, J. Bradshaw, J. A. Ledbetter, and P. S. Linsley. 1993. 'Induction of alloantigen-specific hyporesponsiveness in human T lymphocytes by blocking interaction of CD28 with its natural ligand B7/BB1', *J Exp Med*, 177: 165-73.
- Thomson, A. W., P. H. Whiting, and J. G. Simpson. 1984. 'Cyclosporine: immunology, toxicity and pharmacology in experimental animals', *Agents Actions*, 15: 306-27.
- Thuy L. Phung, Sriram Ayyaswamy. 2017. 'A Novel Mouse Skin Graft Model of Vascular Tumors Driven by Akt1 ', *BioProtoc*, 7.
- Tokiko Nagamura-Inoue, Haiping He. 2014. 'Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility', *World J Stem Cells*, 6: 195-202.
- van der Merwe, A., F. Graewe, A. Zuhlke, N. W. Barsdorf, A. D. Zarrabi, J. T. Viljoen, H. Ackermann, P. V. Spies, D. Opondo, T. Al-Qaoud, K. Bezuidenhout, J. D. Nel, B. Bailey, and M. R. Moosa. 2017. 'Penile allotransplantation for penis amputation following ritual circumcision: a case report with 24 months of follow-up', *Lancet*, 390: 1038-47.
- Vaux, D. L., S. Cory, and J. M. Adams. 1988. 'Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells', *Nature*, 335: 440-2.
- Vincenti, F., G. Blanco, A. Durrbach, P. Friend, J. Grinyo, P. F. Halloran, J. Klempnauer, P. Lang, C. P. Larsen, F. Muhlbacher, B. Nashan, J. P. Soulillou, Y. Vanrenterghem, T. Wekerle, M. Agarwal, S. Gujrathi, J. Shen, R. Shi, R. Townsend, and B. Charpentier. 2010. 'Five-year safety and efficacy of belatacept in renal transplantation', *J Am Soc Nephrol*, 21: 1587-96.
- Vincenti, F., B. Charpentier, Y. Vanrenterghem, L. Rostaing, B. Bresnahan, P. Darji, P. Massari, G. A. Mondragon-Ramirez, M. Agarwal, G. Di Russo, C. S. Lin, P. Garg, and C. P. Larsen. 2010. 'A phase III study of belatacept-based immunosuppression regimens versus cyclosporine in renal transplant recipients (BENEFIT study)', *Am J Transplant*, 10: 535-46.
- Wang, S., X. Qu, and R. C. Zhao. 2012. 'Clinical applications of mesenchymal stem cells', *J Hematol Oncol*, 5: 19.
- Wang, X., T. Zhao, W. Huang, T. Wang, J. Qian, M. Xu, E. G. Kranias, Y. Wang, and G. C. Fan. 2009. 'Hsp20-engineered mesenchymal stem cells are resistant to oxidative stress via enhanced activation of Akt and increased secretion of growth factors', *Stem Cells*, 27: 3021-31.
- Whitaker, I. S., E. M. Duggan, R. R. Alloway, C. Brown, S. McGuire, E. S. Woodle, E. C. Hsiao, C. Maldonado, J. C. Banis, Jr., and J. H. Barker. 2008. 'Composite tissue allotransplantation: a review of relevant immunological issues for plastic surgeons', *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 61: 481-92.
- Whiting, P. H., J. G. Simpson, R. J. Davidson, and A. W. Thomson. 1983. 'Pathological changes in rats receiving cyclosporin A at immunotherapeutic dosage for 7 weeks', *Br J Exp Pathol*, 64: 437-44.
- Wu, K. H., C. K. Chan, C. Tsai, Y. H. Chang, M. Sieber, T. H. Chiu, M. Ho, C. T. Peng, H. P. Wu, and J. L. Huang. 2011. 'Effective treatment of severe steroid-resistant acute

- graft-versus-host disease with umbilical cord-derived mesenchymal stem cells', *Transplantation*, 91: 1412-6.
- Wu, Q. L., X. Y. Liu, D. M. Nie, X. X. Zhu, J. Fang, Y. You, Z. D. Zhong, L. H. Xia, and M. Hong. 2015. 'Umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells ameliorate graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation through multiple immunoregulations', *Journal of Huazhong University of Science and Technology-Medical Sciences*, 35: 477-84.
- Wu S, Xu H, Ravindra K, Ildstad ST. 2009. 'Composite tissue allotransplantation: past, present and future-the history and expanding applications of CTA as a new frontier in transplantation', *Transplant Proc*, 41: 463-65.
- Wu, Yamei, Zhihong Wang, Yongbin Cao, Lixin Xu, Xiaohong Li, Pei Liu, Pei Yan, Zhouyang Liu, Dandan Zhao, Jing Wang, Xiaoxiong Wu, Chunji Gao, Wanming Da, and Zhongchao Han. 2013. 'Cotransplantation of haploidentical hematopoietic and umbilical cord mesenchymal stem cells with a myeloablative regimen for refractory/relapsed hematologic malignancy', *Annals of Hematology*, 92: 1675-84.
- Yamout, B., R. Hourani, H. Salti, W. Barada, T. El-Hajj, A. Al-Kutoubi, A. Herlopian, E. K. Baz, R. Mahfouz, R. Khalil-Hamdan, N. M. Kreidieh, M. El-Sabban, and A. Bazarbachi. 2010. 'Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis: a pilot study', *J Neuroimmunol*, 227: 185-9.
- Yan, G., R. Yan, C. Chen, C. Chen, Y. Zhao, W. Qin, M. B. Veldman, S. Li, and S. Lin. 2019. 'Engineering vascularized skeletal muscle tissue with transcriptional factor ETV2-induced autologous endothelial cells', *Protein Cell*, 10: 217-22.
- Yoo, K. H., I. K. Jang, M. W. Lee, H. E. Kim, M. S. Yang, Y. Eom, J. E. Lee, Y. J. Kim, S. K. Yang, H. L. Jung, K. W. Sung, C. W. Kim, and H. H. Koo. 2009. 'Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues', *Cell Immunol*, 259: 150-6.
- Yu, Yue-cheng, Yi-min Mao, Cheng-wei Chen, Jin-jun Chen, Jun Chen, Wen-ming Cong, Yang Ding, Zhong-ping Duan, Qing-chun Fu, Xiao-yan Guo, Peng Hu, Xi-qi Hu, Ji-dong Jia, Rong-tao Lai, Dong-liang Li, Ying-xia Liu, Lun-gen Lu, Shi-wu Ma, Xiong Ma, Yue-min Nan, Hong Ren, Tao Shen, Hao Wang, Ji-yao Wang, Tai-ling Wang, Xiao-jin Wang, Lai Wei, Qing Xie, Wen Xie, Chang-qing Yang, Dong-liang Yang, Yan-yan Yu, Min-de Zeng, Li Zhang, Xin-yan Zhao, Hui Zhuang, Drug-induced Liver Injury Study Group, Chinese Society of Hepatology, and Chinese Medical Association. 2017. 'CSH guidelines for the diagnosis and treatment of drug-induced liver injury', *Hepatology International*, 11: 221-41.
- Zdichavsky, M., J. W. Jones, E. T. Ustuner, X. Ren, J. Edelstein, C. Maldonado, W. Breidenbach, S. A. Gruber, M. Ray, and J. H. Barker. 1999. 'Scoring of skin rejection in a swine composite tissue allograft model', *J Surg Res*, 85: 1-8.
- Zheng, Y., Y. Wang, Z. Zhai, Q. Zhai, and S. Y. Hu. 2015. '[Therapeutic effects of human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation on acute graft versus host disease]', *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, 17: 869-72.
- Zhou, J., W. He, G. Luo, and J. Wu. 2013. 'Fundamental immunology of skin transplantation and key strategies for tolerance induction', *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 61: 397-405.

7. ÖZET

TIPTA UZMANLIK TEZİ /Konya-2019

Giriş: Mezenkimal kök hücrelerin immünmodülatör özellikleri olduğu ve bu özelliğin immünsupresyon yönünde kullanılabileceği birçok deneysel ve klinik çalışmada kanıtlanmıştır. Literatürde bu etkinin immünsupresif tedavi dozlarını azaltacak kadar güçlü olup olmadığını araştıran yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada umbilikal kord mezenkimal kök hücrelerinin (UK-MKH) immünsupresif dozlarını azaltmadaki rolü ve etki mekanizmasının deneysel bir model üzerinde nicel parametrelerle gösterilmesi amaçlanmıştır.

Gereç-Yöntem: Çalışmada donör olarak 10 adet, 4-6 haftalık, 30-40 gram ağırlığında "erkek inbred C57BL/6" ve alıcı olarak 40 adet benzer özelliklerde "inbred Balb/c" fareler etik kurul onayı alınarak kullanıldı.

- 1.Grup** (n:5); Cilt allogrefti transplante edildi, kök hücre ya da immünsupresif tedavi uygulanmadı.
- 2.Grup** (n:7); Allogreft sonrası hergün 15mg/kg/gün Siklosporin-A subkütan uygulandı.
- 3.Grup** (n:7); Allogreft sonrası 0.gün 5.7×10^6 hücre/kg ve 3.günde 10.3×10^6 hücre/kg UK-MKH intramusküler (İM) uygulandı.
- 4.Grup** (n:7); Allogreft sonrası hergün 15mg/kg/gün Siklosporin-A subkütan; 0.gün 5.7×10^6 hücre/kg ve 3.günde 10.3×10^6 hücre/kg UK-MKH İM uygulandı.
- 5.Grup** (n:7); Allogreft sonrası hergün 10mg/kg/gün Siklosporin-A subkütan; 0.gün 5.7×10^6 hücre/kg ve 3.günde 10.3×10^6 hücre/kg UK-MKH İM uygulandı.
- 6.Grup** (n:7); Allogreft sonrası hergün 5mg/kg/gün Siklosporin-A subkütan; 0.gün 5.7×10^6 hücre/kg ve 3.günde 10.3×10^6 hücre/kg UK-MKH İM uygulandı.
- Tüm allogreft pansumanları 4.günde açıldı. Takip süreleri 30 gündü. Graft yaşayabilirliği aşağıdaki parametrelerle değerlendirildi.

Makroskopik olarak; greftin rengi, doku özelliği ve konturu üzerinden rejeksiyon değerlendirildi.

Sayısal termal görüntüleme (STG); kızılötesi görüntüleme cihazıyla (VarioCAM® HD head, InfraTec, Dresden, Germany) cilt allogreftinin çevre dokulara göre sıcaklık değişimleri (Δt) kantitatif olarak belirlendi.

Mikroskopik olarak; rejeksiyonun en yoğun olduğu 10.gün biyopsilerinde inflamatuvar hücre infiltrasyonu, epitel kalınlığı, dermo-epidermal ayrışma değerlendirildi. Çalışmanın sonunda farelerden elde edilen karaciğer ve böbrek biyopsilerinde immünsupresyonun etkileri incelendi.

İmmünohistokimyasal incelemelerle; hücre proliferasyonu (Ki-67) ve anti-apoptozis (Bcl-2) dereceleri belirlendi.

Biyokimyasal incelemede; serum anti-inflamatuvar (IL-10) ve pro-inflamatuvar (IL-2, IFN-gama, TNF-alfa) sitokin düzeyleri belirlendi.

Veriler istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Bulgular: Makroskopik olarak; tüm allogreftler 4.günde vaskularize görünümdeydi. Renk değişikliği ve nekroz başlangıcı; 1. grupta 10. gün, 3. ve 6. gruplarda 11. günde gözlenirken; total rejeksiyon; 1. grupta 12. gün, 3 ve 6. gruplarda 13. günde gözlemlendi. 2, 4 ve 5. gruplarda allogreft kaybı gözlenmedi.

STG'de; allotransplantasyonlarda inflamasyonun maksimum olduğu 10. günde allogreftlerin çevre dokuya göre ısı artışı; 1. grupta en fazlayken; 4. grupta en azdı ve fark istatistiksel olarak anlamlıydı (1.grup Δt : 2,08 °C, 2.grup Δt : 1,11 °C, 3.grup Δt : 1,75°C, 4.grup Δt : 0,88°C, 5.grup Δt : 1,05 °C, 6.grup Δt : 1,17 °C).

Mikroskopik bulgular; allogreftlerin epitel kalınlığı değerlendirildiğinde 2, 4 ve 5. gruplarda

çok sıralı epidermal kalınlık korundu ve aralarında istatistiksel fark yoktu. İnflamatuar hücre infiltrasyonu en fazla 1. ve 3. gruptaydı ve aralarında istatistiksel fark yoktu. Dermo-epidermal ayrışma ise 1, 3 ve 6. gruplarda gözlenirken, diğer gruplarda gözlenmedi. Böbrek ve karaciğer biyopsilerinde 2. ve 4. gruplarda SK toksisitesine bağlı bulgular gözlenirken; 1, 3, 5 ve 6. gruplarda gözlenmedi ve aralarında istatistiksel fark bulunamadı.

İmmünohistokimyasal bulgular; hücresel proliferasyon (Ki-67) ve anti-apoptozis (bcl-2) skorları 2, 4 ve 5. gruplarda en yüksekti ve aralarında istatistiksel fark yoktu.

Biyokimyasal incelemede; 1, 3 ve 6. gruplarda pro-inflamatuar sitokinler en yüksek, anti-inflamatuar sitokinlerse en düşüktü. Grup 2, 4, 5’de ise pro-inflamatuar sitokinler düşük, anti-inflamatuar sitokinler yüksekti. Gruplar arasında istatistiksel fark yoktu.

Tartışma: İmmünsupresif tedavinin yan etkilerinden kaçınmanın en etkin yolu; terapötik etkiyi azaltmadan immünsupresif dozlarının düşürülmesi olmalıdır. Bu çalışmada allojenik transplantasyonlarda kullanılan immünsupresif ilaçlardan SK’nin dozunun azaltılmasında UK-MKH’nin rolü araştırılmış

ve allotransplantasyonlarda "UK-MKH+immünsupresif" kombine uygulamasının nefrotoksisite ve hepatotoksisiteye neden olmadan immünsupresif ilaç dozlarının azaltılmasını sağladığı kanıtlanmıştır. Bu kombinasyonun klinik pratiğe uyarlanabilecek etkin ve güvenilir bir tedavi seçeneği olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Allotransplantasyon, immünsupresiflerin toksik etkileri, umbilikal kord mezenkimal kök hücre

8. SUMMARY

Introduction

It has been proved by many clinical and experimental studies that mesenchymal stem cells have immunomodulatory properties and can be used for immunosuppression. There are not enough studies in the literature to determine whether this effect is strong enough to reduce immunosuppressive treatment doses.

The aim of this study was to prove the role and mechanism of action of umbilical cord mesenchymal stem cells (UC-MSC) with quantitative parameters in reducing immunosuppressive doses on an experimental model.

Material and Method

10 black male inbred C57BL / 6, weighing 30-40 grams, 4-6 weeks old and 40 inbred Balb / c mice with similar properties were used with the approval of the ethics committee in this study.

Group 1 (n:5): Skin allograft was transplanted, no stem cell or immunosuppressive treatment was applied.

Group 2 (n: 7); Cyclosporine-A subcutaneous 15mg / kg / day was administered after allograft.

Group 3 (n: 7); On day 0, 5.7×10^6 cells / kg on day 3, 10.3×10^6 cells / kg were administered intramuscular (IM) UC-MSC.

Group 4 (n: 7); 15 mg / kg / day Cyclosporin-A subcutaneous daily after allograft; On day 0, 5.7×10^6 cells / kg and on day 3 10.3×10^6 cells / kg UC-MSC were administered.

Group 5 (n: 7); Cyclosporin-A subcutaneous 10mg / kg / day after allograft; On day 0, 5.7×10^6 cells / kg and on day 3, 10.3×10^6 cells / kg UC-MSC were administered.

Group 6 (n: 7); Cyclosporin-A subcutaneous 5mg / kg / day after allograft; On day 0, 5.7×10^6 cells / kg and on day 3, 10.3×10^6 cells / kg UC-MSC were administered.

All allograft tie overs were removed on the 4th day. Follow-up period was 30 days.

Macroscopically; rejection was assessed by changes in color, texture and contour of the graft. In **digital thermal imaging** (DTI); The temperature changes (Δt) of the skin allograft relative to surrounding tissues were quantitatively determined by infrared imaging device (VarioCAM® HD head, InfraTec, Dresden, Germany).

Microscopically; In the 10th day biopsies where rejection was most intense, inflammatory cell infiltration, epithelial thickness and dermo-epidermal separation were evaluated. At the end of the study, the effects of immunosuppression on liver and kidney were examined with biopsies obtained from mice.

Immunohistochemical examinations; cell proliferation (Ki-67) and anti-apoptosis (Bcl-2) levels were determined.

In biochemical examination; Serum anti-inflammatory (IL-10) and pro-inflammatory (IL-2, IFN-gamma, TNF-alpha) cytokine levels were determined.

The data were compared statistically.

Results

Macroscopically; all allografts were vascularized on the 4th day. Color change and onset of necrosis; on the 10th day in the 1st group, on the 11th day in the 3rd and 6th groups; total rejection was observed on day 12 in group 1, and day 13 in groups 3 and 6. Allograft loss was not observed in groups 2, 4 and 5. **Digital Thermal Imaging;** the highest temperature increase of allografts relative to surrounding tissue on the 10th day when inflammation was maximal in allotransplantations was in group 1, and Group 4 was the least. The difference was statistically significant (group 1 Δt : 2.08°C , group 2 Δt : 1.11°C , group 3 Δt : 1.75°C , group 4 Δt : 0.88°C , 5.group Δt : 1.05°C , 6.group Δt : 1.17°C).

Microscopic results; when the epithelial thickness of allografts was evaluated, multilevel epidermal thickness was maintained in groups 2, 4 and 5 and there was no statistical difference between them. Inflammatory cell infiltration was mostly in the first and third groups and there was no statistical difference between them. Dermo-epidermal separation was observed in groups 1, 3 and 6, but not in other groups. Kidney and liver biopsies showed signs of SC toxicity in groups 2 and 4; There was no statistical difference between groups 1, 3, 5 and 6.

Immunohistochemical results; Ki-67 and bcl-2 scores were highest in groups 2, 4 and 5 and there was no statistical difference between them.

In biochemical examination; Pro-inflammatory cytokines were the highest and anti-inflammatory cytokines were the lowest in groups 1, 3 and 6. In group 2, 4, 5 pro-inflammatory cytokines were low and anti-inflammatory cytokines were high. There was no statistical difference between the groups.

Discussion: The most effective way to avoid side effects of immunosuppressive therapy is decreasing of immunosuppressive doses without reducing the therapeutic effect. The aim of this study was to investigate the role of UC-MSC in reducing the dose of SC one of the immunosuppressive drugs used in allogeneic transplantations.

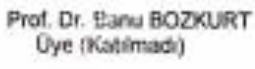
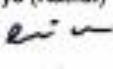
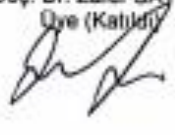
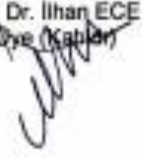
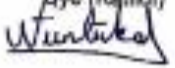
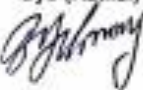
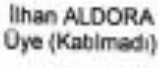
It was proven that combination of the "UC-MSC + immunosuppressive" is of benefit to reducing of immunosuppressive drug doses without causing nephrotoxicity and hepatotoxicity. It has been shown that this combination is an effective and safe treatment option that can be adapted to clinical practice.

Keywords: Allotransplantation, toxic effects of immunosuppressives, umbilical cord mesenchymal stem cell

9. EKLER

Ek A. Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden alınmış etik kurul belgesi

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ DENEYSEL TIP UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL KARARI

Karar Sayısı: 2018-46	Toplantı Tarihi: 25.01.2019	
Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik,Rekonstruktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı'ndan Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Sütçü ve Dr. Şeyda Güray Evin, Necmettin Erbakan Üniversitesi Prof. Dr. Tahsin Murat Aktan, Prof. Dr. Selçuk Duman, Selçuk Üniversitesi Prof Dr Özlem Ata, Doç Dr Sedat Abuşoğlu, Doç Dr Murat Ceylan, Öğr. İsmail HARMANKAYA tarafından sunulan "Allojenik Transplantasyonlarda Kullanılan Immunsupresif İlaç Dozlarının Azaltılmasında Umbilikal Kord Mezenkimi Kaynaklı Kök Hücrelerin Rolü" başlıklı uzmanlık tezi projesi kurul tarafından değerlendirildi. Projede belirtilen anesteziik maddenin (Xylazine 5 mg/kg, Ketamin 150 mg/kg) kullanılması uygun görülmüştür. Projede belirtilen ve istatistiksel olarak en güvenilir sonuç elde edilebilecek asgari sayıda kullanılacak olan (50 adet fare) hayvan sayısı uygun görülmüştür. Projenin hayvan deneylerine ilişkin yönlerinin Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesinde belirtilen "Etik Kurallar" dikkate alınarak hazırlandığı belirlenmiştir. Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesinde yer alan kurallar ve belirtilen "Hayvan Deneyleri ile ilgili Etik İlkeler" saklı kalmak koşulu ile projenin hazırlanmasında "Etik Kurul Yönergesi İlkelerine Uyulduğuna", çalışmanın deneysel kısmını yapacak çalışmacının "Deney Hayvanları Kullanım Sertifikasına" sahip olduğu dikkate alınarak projenin hayvan kullanım etiği açısından "uygun" olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.		
 Doç. Dr. İlhan ÇİFTÇİ Başkan (Katıldı)		
 Doç. Dr. Bahadır SÖTÜRK Başkan v. (Katıldı)	 Prof. Dr. Banu BOZKURT Üye (Katılmadı)	 Prof. Dr. Sibel YILDIRIM Üye (Katıldı)
 Prof. Dr. Kamil ÖNEY Üye (Katıldı)	 Doç. Dr. Güler YAVAŞ Üye (Katıldı)	 Doç. Dr. Zafer SAYIN Üye (Katıldı)
 Doç. Dr. İlhan ECE Üye (Katıldı)	 Dr. Öğr. Üyesi Fatih KARA Üye (Katılmadı)	 Dr. Öğr. Üyesi Nejat ÜNLÜKAL Üye (Katıldı)
 Vet. Uzmanı S. Metin GÖKYAPRAK Üye (Katıldı)	 Burhan YILMAZ Üye (Katıldı)	 İlhan ALDORA Üye (Katılmadı)

10. ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Konya’da doğdu. İlk ve ortaöğretimi Ahmet Haşhaş İlköğretim Okulu’nda tamamladı. 2006 yılında Bayburt Lisesi’nden birincilik derecesi ile mezun oldu. Aynı yıl İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesine girdi. 2013 yılında tıp fakültesinden birincilik derecesi ile mezun oldu. Malatya Devlet Hastanesi’nde 3 ay pratisyen hekim olarak görev yaptıktan sonra , 2013 yılında Samsun Eğitim ve Araştırma Hastanesi’nde Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi ihtisasına başladı. İhtisas eğitiminin ilk 8 ayını burada tamamladıktan sonra 2014 yılında Selçuk Üniversitesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı’nda uzmanlık eğitimine devam etti. İhtisası boyunca özellikle kraniyomaksillofasyal alanda birçok yurtiçi ve yurtdışı kongrede tebliğler sundu. Maksillofasyal travmalar, rinoplasti ve minimal invaziv cerrahilerle ilgili kurslara katıldı. Mikrocerrahi ve kraniyomaksillofasyal alanda yapılan çalışmalara ve yayınlara katkıda bulundu. 2018 yılı Ağustos-Eylül aylarında Seul’de bulunan Asan Medical Center’da gözlemci olarak bulundu. Kitap okumak ve tıbbi illüstrasyon özel ilgi alanları olup evli ve 1 çocuk annesidir.