

T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
ANKARA ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
HEMATOLOJİ ONKOLOJİ EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
ÇOCUK HEMATOLOJİ ONKOLOJİ BÖLÜMÜ
EĞİTİM SORUMLUSU: Prof. Dr. Bahattin Tunç



SAĞLIKLI KEMİK İLİĞİ DONÖRLERİNDE
GRANÜLOSİT KOLONİ STİMÜLE EDİCİ FAKTÖRÜN
MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KAYNAKLI İMMÜN
MODÜLATÖR SİTOKİNLERE ETKİSİ

ÇOCUK HEMATOLOJİ ONKOLOJİSİ
YAN DAL UZMANLIK TEZİ
Uzm. Dr. İkbal OK BOZKAYA

ANKARA
EYLÜL 2012

T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
ANKARA ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
HEMATOLOJİ ONKOLOJİ EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
ÇOCUK HEMATOLOJİ ONKOLOJİ BÖLÜMÜ
EĞİTİM SORUMLUSU: Prof. Dr. Bahattin Tunç

SAĞLIKLI KEMİK İLİĞİ DONÖRLERİNDE
GRANÜLOSİT KOLONİ STİMÜLE EDİCİ FAKTÖRÜN
MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KAYNAKLI İMMÜN
MODÜLATÖR SİTOKİNLERE ETKİSİ

ÇOCUK HEMATOLOJİ ONKOLOJİSİ
YAN DAL UZMANLIK TEZİ
Uzm. Dr. İkbal OK BOZKAYA

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Duygu Uçkan Çetinkaya
Doç. Dr. Fatih Mehmet Azık

ANKARA
EYLÜL 2012

T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Onkoloji
Eğitim ve Araştırma Hastanesi Baştabipliği

TEZ DEĞERLENDİRME FORMU

ADI SOYADI : İkbal OK BOZKAYA
UZMANLIK DALI : Çocuk Hematolojisi ve Onkolojisi
TEZİN ADI : Sağlıklı Kemik İliği Donörlerinde G-CSF'nin Mezenkimal Kök Hücre Kaynaklı İmmün Modülatör Sitokinlere Etkisi

1- Sayfa Sayısı : 87
2- Tablo Sayısı : 3
3- Şekil Sayısı : 29
4- İstatistik Sayısı : 6
5- Literatür Sayısı ve Faydalanma Durumu : 149 - Başarılı
6- Yazı Tertibi : Başarılı
7- Konuyu Anlatma ve Konuya Hakimiyet : Başarılı
8- İncelemenin Bilimsel Bakımdan Tutumu : Başarılı
9- Orijinal Olup Olmadığı : Orijinal

SONUÇ : Başarılı

TEZ DEĞERLENDİRME JÜRİSİ

Prof. Dr. Bahattin TUNÇ
Eğitim Görevlisi

Prof. Dr. Fahriye Duygu ÇETINKAYA
Eğitim Görevlisi

Doç. Dr. Emine Betül TAVİL
Eğitim Görevlisi

ONAY

Doç. Dr. Emrah ŞENEİ
Baştabip V.



TEŞEKKÜR

Bilgi ve tecrübeleriyle tez çalışmamın yönlendirilmesi ve yürütülmesi konusunda beni sonsuz destekleyen çok değerli hocalarım Prof. Dr. Duygu UÇKAN ÇETİNKAYA ve Doç.Dr. Fatih Mehmet Azık'a;

Desteğini her zaman yanımda hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Bahattin Tunç'a;

Tez çalışmam boyunca bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren ve laboratuvarını açan değerli hocam Prof. Dr. Meltem Özgüner'e ve tezimin yapılmasında özveriyle çalışan laboratuvar teknisyenleri Yasin Köksal ve Elif Canal'a;

Deneysel çalışmalarımın ELİSA testleri aşamasında yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Mehmet Namuslu ve Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Tuğrul Çelik'e;

Yan dal uzmanlık eğitimim süresince deneyimlerini ve desteklerini esirgemeyen hocalarım Doç.Dr. Neşe Yaralı, Uzm. Dr. Abdurrahman Kara, Doç. Dr. Betül Tavail, Uzm. Dr. Vildan Çulha ve onkoloji konusunda deneyimlerini aktaran Doç. Dr. Suna Emir ve Uzm. Dr. Ahmet Demir'e;

Sevgilerini ve desteklerini esirgemeyen çok sevgili çalışma arkadaşlarıma;

Hayatımın her anında sevgi, sabır ve güvenleriyle beni destekleyen değerli annem, babam, ablam, eşim Davut ve kızım Ceylin'e sonsuz teşekkürler.

ÖZET

Granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) hematopoezi ve immün sistemi düzenleyici temel hematopoetik büyüme faktörüdür. Radyoterapi ve kemoterapi sonrası gelişen myelosupresyon sonrasında normal hematopoetik hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasını artırması ve nötrofillerin fonksiyonlarını aktive etmesi nedeni ile klinikte yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca kemik iliği kök hücrelerinin periferik kana geçmesini sağlaması nedeniyle periferik kök hücre naklinde donörlere uygulanmaktadır. Seyrek olarak da periferik kandan kök hücre toplamaya uygun olmayan ve verici kemik iliğinden hasta için gereken sayıda kök hücre toplanamayacağı öngörülen donörlere de kemik iliği toplanmadan önce G-CSF verilmektedir. Granülosit koloni uyarıcı faktörün T hücre reaktivitesi ve antijen sunan hücrelerin fonksiyonunu modifiye ederek immün sistemi etkilediği bildirilmiştir. Devam eden çalışmalarda ise G-CSF'nin inflamatuvar cevabı uyarıcı ancak adaptif immün sistemi baskılayıcı özellikleri gösterilmiştir. Kök hücre nakli amacıyla donörlere verilen G-CSF'nin hastanın immün sistemini nasıl etkilediği konusunda literatürde yeterli bilgi bulunmamaktadır. Donöre uygulanan G-CSF'nin hastada transplant sonrası T lenfositlerin inflamatuvar fenotipten immünsupresif özelliğe geçmelerinde (Th1- Th2 shift) rol oynayarak alloimmün cevabı etkilediği ileri sürülmektedir.

Mezenkimal kök hücreler (MKH) 30 yıl kadar önce in-vitro kemik iliği kültür ortamında plağa yapışan ve hematopoetik kök hücrelerden farklı işi bir hücre topluluğunun fark edilmesi ile tanımlanmıştır. Mezoderm kaynaklı çoğu dokudan izole edilmiş ve mezoderm kaynaklı dokulara farklılaşabildikleri gösterilmiştir. Günümüze kadar bu hücrelerin özellikleri, fonksiyonları konusunda araştırmalar yapılmıştır. Bu hücrelerin; hücresele etkileşimlerle hücrelere destek olduğu, salgıladığı faktörlerle kök ve öncül hücrelerin büyümesi ve farklılaşmasında, anjiogenezde ve immün modülasyonda rol aldığı düşünülmektedir. Literatürde immün modulatuar etkilerin ortaya çıkmasında hücre-hücre ilişkilerinin ve MKH'lerden salınan transforme edici büyüme faktörü $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), hepatosit büyüme faktörü (HGF), prostaglandin E2 (PGE2), indoleamin dioksijenaz (IDO) ve insan lökosit antijeni G-5 (HLA-G5) gibi faktörlerin önemli katkısı olduğu bildirilmiştir. Son yıllarda bu hücreler rejeneratif tedavide giderek artan ilgi

uyandırmış, bilhassa immünmodulatuvar özellikleri nedeniyle steroide cevapsız akut graft-versus-host hastalığı (aGVHH) başta olmak üzere çeşitli patolojik durumlarda deneme tedavisi veya deneysel araştırma kapsamında klinik uygulama alanına girmiştir.

G-CSF'nin immün sistem üzerindeki etkilerinde MKH'lerin katkısı ve MKH'lerden salınan immün modulatuvar sitokinlerin etkisi olup olmadığı incelenmemiştir. Granülosit koloni uyarıcı faktör ile uyarılmış kemik iliğinden izole edilen MKH'lerin salgıladıkları immün modulatuvar sitokinlerde değişiklikler olacağı düşünülerek bu çalışma planlanmıştır.

Bu amaçla, G-CSF ile uyarılmış ve uyarılmamış sağlıklı kemik iliği nakli vericilerinden toplanan kemik iliği örneklerinden izole edilerek in-vitro hücre kültür ortamında çoğaltılan MKH'lerin incelenmesi planlanmıştır. Granülosit koloni uyarıcı faktör ile uyarılmış 8 sağlıklı kemik iliği donörlerinden elde edilen MKH'ler in-vitro kültür ortamında çoğaltıldıktan sonra morfolojik, fenotipik, farklılaşma özellikleri incelenmiş ve 2. pasaja getirilen hücrelerin (P2) kültür süpernatantlarında immün modulatuvar sitokinler olan TGF- β 1, HGF ve PGE2 düzeyleri ölçülerek G-CSF ile uyarılmamış sağlıklı kemik iliği vericilerinden aynı şekilde elde edilen kemik iliği MKH'leri ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada ayrıca kemik iliği mikroçevresini yansıtacağı düşünülen kemik iliği plazmasında da aynı solubl faktör düzeyleri ölçülmüş ve karşılaştırmalar yapılmıştır.

Çalışmada G-CSF ile uyarılmış veya uyarılmamış sağlıklı donörlerin tamamından MKH kültürleri geliştirilebilmiştir. İncelemeler sonunda morfolojik, antijenik ve farklılaşma özellikleri açısından G-CSF ile uyarılmış MKH'lerin sağlıklı kontrollerden elde edilenler ile benzerlik gösterdiği görülmüştür. Granülosit koloni uyarıcı faktör ile uyarılmış 8 sağlıklı donörün MKH süpernatantında TGF- β 1, HGF ve PGE2 düzeylerinin incelenmesi sonucu ise PGE2 düzeyinde kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı bir düşüklük saptanmıştır. Donörlerin kemik iliği plazmasında aynı sitokinler ölçülmüş ve G-CSF alanlarda HGF düzeyleri istatistiksel anlamlı bir yükseklik bulunmuştur. Granülosit koloni uyarıcı faktörün kemik iliği üzerine etkisi hayvan deneylerinde incelenmiş, bilindiği kadarıyla bu konuda insanlarda yapılan bir çalışma bildirilmemiştir. Bu bulgular, G-CSF'nin kemik iliği kaynaklı immün

modulatuvar sitokinlerde değişikliğe neden olarak kemik iliği mikroçevresini değiştirdiği ve MKH'nin salgıladığı sitokinleri etkilediğini göstermektedir. Özetle, G-CSF faktör ile uyarılmış kemik iliği MKH'lerinin morfolojik, fiziksel, antijenik özellikleri ve farklılaşma kapasitesi yönünden G-CSF ile uyarılmamış sağlıklı kontrollerden geliştirilen hücrelerle benzer olduğu, ancak MKH'lerin en önemli özellikleri olan sekretuvar kapasite yönünden farklılık gösterdiği, MKH'lerden TGF- β 1, HGF ve PGE2 salınımının olduğu ve bunun hastadan hastaya farklı olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular, GCSF'nin inflamasyon ve immün modülasyon üzerine olan etkilerinde kemik iliği MKH'lerinin ve kemik iliği mikroçevresindeki değişikliklerin katkısı olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Mezenkimal kök hücre, mezenkimal stromal hücre, granülosit koloni uyarıcı faktör, prostaglandin E2 (PGE2), Hepatosit büyüme faktörü (HGF), transforme büyüme faktörü- β 1 (TGF- β 1), kemik iliği, mikroçevre

ABSTRACT

Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) is the basic hematopoietic growth factor that modulates hematopoiesis and immune system. It is widely used in clinical practice for radiotherapy and chemotherapy induced myelosuppression to increase the proliferation and differentiation of hematopoietic cells and activate the neutrophils functions. In addition, G-CSF is administered to donors to mobilize stem cells from the bone marrow into peripheral blood prior to collection from of peripheral blood stem cells. G-CSF is rarely administered to donors prior to bone marrow harvest. However if the established number of stem cells needed for the recipient will necessitate large volume marrow collection from the donor and if the donor is not eligible for peripheral blood collection G-CSF may be used to increase the stem/progenitor cell content of the product. G-CSF has been shown to affect the immune system by modifying T-cell reactivity and antigen presenting cell function. Following studies have shown that G-CSF stimulates the inflammatory response while suppressing the adaptive immune system. However, there is paucity of information in the literature regarding the effects of G-CSF primed stem cells on recipient immune system. Data suggest G-CSF induced TH-1 to TH-2 shift may play a role in modification of the alloimmune reactions in the recipient.

Mesenchymal stem cells (MSC) were first characterized more than 30 years ago, and were described as fibroblast-like cells with the property of adhering to plastic when bone marrow cultured in-vitro. It has been shown that MSCs may be isolated from most of the mesoderm derived tissues and have the differentiation capacity of mainly connective tissue and different mesoderm tissues. Up to date, several studies have been performed on biological properties and function of these cells. MSCs are believed to play a role in supporting other types of cells/stem cells by establishment of cellular interactions, by providing secretory factors for growth, differentiation, and other biological functions and by contributing to in angiogenesis and immune modulation. MSCs have been shown to effect the functions of immune cells mainly by secretion of immune modulatory factors such as transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1), hepatocyte growth factor (HGF) and prostaglandin E2 (PGE2), indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO), human leucocyte antigen G-5 (HLA G-5) and

through cell-cell interactions. In the recent years, these cells have aroused increasing attention in the field of regenerative medicine, and for treatment of autoimmune and inflammatory conditions including steroid resistant graft-versus-host disease (GVHD) in which clinical trials are ongoing.

To our knowledge, the effect of G-CSF on the immunomodulatory functions of MSCs and on secretion of immune modulatory cytokines has not been studied. In the present study it is hypothesized that G-CSF-primed bone marrow derived MSCs may modulate secretion of immune modulatory cytokines in the bone marrow microenvironment.

For this purpose, examination of G-CSF-primed and unprimed bone marrow derived MSCs is planned. In the present study G-CSF-primed bone marrow derived MSC's from 8 healthy donors were expanded in in-vitro cultures, and their proliferative characteristics, morphology, phenotype and differentiation capacity were examined. In addition, supernatants of the second passage of MSCs were evaluated for TGF- β 1, HGF and PGE2 levels and compared with the controls. Furthermore, in order to reflect their status in the microenvironment of the bone marrow, the levels of those soluble factors were also determined in the bone marrow plasma of the G-CSF primed and unprimed donors.

Mesenchymal stem cell expansion was successful in all samples obtained from controls and G-CSF stimulated donors. Morphological, surface antigenic properties and differentiation capacity of MSC's were similar in patient and control samples. The analyses of TGF- β 1, HGF and PGE2 levels in the G-CSF-primed and unprimed bone marrow derived MSCs supernatants revealed that PGE2 levels were significantly lower in the G-CSF-primed samples. These cytokines were also measured in the bone marrow plasmas and a statistically significant increase was detected in the level of HGF in G-CSF-primed bone marrow plasmas. These findings suggest that G-CSF induces changes in the bone marrow microenvironment through modification of secretion of immune modulatory cytokines and affects the secretion of cytokines from MSCs. The current study is novel to show the effects of G-CSF on bone marrow microenvironment of healthy human donors. The preliminary data suggest that G-CSF-primed and unprimed bone marrow derived MSCs have similar

morphologic/phenotypic properties and differentiation capacity but differ in their secretory capacity, the most important feature of MSCs. In addition significant changes in cytokine levels of bone marrow plasma of G-CSF primed donors were also demonstrated. These findings suggest that bone marrow MSCs and changes in the marrow microenvironment may contribute to the effects of G-CSF on inflammation and immune modulation.

Keywords: Mesenchymal stem cell, Mesenchymal stromal cell, granulocyte colony-stimulating factor, prostaglandin E2 (PGE2), hepatocyte growth factor (HGF), transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), bone marrow, microenvironment

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

İÇ KAPAK	ii
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLolar DİZİNİ	xvi
KISALTMALAR	xvii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1.KÖK HÜCRE.....	4
2.1.1. Totipotent kök hücre.....	4
2.1.2. Pluripotent kök hücre.....	4
2.1.3. Multipotent kök hücre.....	4
2.2. HEMATOPOEZİS.....	6
2.3. HEMATOPOETİK KÖK HÜCRE NİŞLERİ.....	8
2.4. HEMATOPOETİK KÖK HÜCRE NAKLİ.....	11
2.4.1. Hematopoetik Kök Hücre Transplantasyon Tipleri.....	12
2.4.2.Hematopoetik Kök Hücre Transplantasyon Kaynakları ve toplanması	13
2.4.2.1. Kemik iliğinden kök hücre toplanması.....	13
2.4.2.2. Kök hücrelerin periferik kandan toplanması.....	15
2.5. GRANÜLOSİT KOLONİ UYARICI FAKTÖR.....	15
2.5.1. Rekombinant insan GCSF'nin hematolojik etkileri.....	17
2.5.1.1. Nötrofil kinetiği ve fonksiyonu.....	17
2.5.1.2. Monositler.....	17
2.5.1.3. Eozinofiller.....	17
2.5.1.4. Trombositler ve koagülasyon.....	17
2.5.2. Rekombinant insan G-CSF'nin immünolojik etkileri.....	18
2.5.3. Rekombinant insan G-CSF'nin sağlıklı donörlerdeki yan etkileri...	19

2.6. MEZENKİMAL KÖK HÜCRE.....	20
2.6.1. Mezenkimal kök hücrelerin immünomodulator etkileri.....	24
2.6.1.1. T hücre proliferasyonu ve fonksiyonu üzerine etkisi.....	26
2.6.1.2. B hücre proliferasyonu ve fonksiyonu üzerine etkisi.....	27
2.6.1.3. Doğal öldürücü hücreler üzerine etkisi.....	27
2.6.1.4. Mezenkimal kök hücreler ile dentritik hücreler arasındaki etkileşim.....	28
2.7. İNDOLEAMİNE 2,3-DİOKSİJENAZ.....	29
2.8. HEPATOSİT BÜYÜME FAKTÖRÜ.....	30
2.8.1. Hepatosit büyüme faktörünün Fonksiyonları.....	31
2.8.1.1. Organ Rejenerasyonu.....	31
2.8.1.2. Organ Gelişimi.....	32
2.8.1.3. Antiapoptotik Etkileri.....	32
2.8.1.4. Antifibrotik Etkileri.....	33
2.8.1.5. Antiinflamatuvar Etkileri.....	33
2.8.1.6. Anjiogenik Etkileri.....	33
2.9. TRANSFORME EDİCİ BÜYÜME FAKTÖRÜ BETA (TGF-B).....	34
2.9.1. Transforme edici büyüme faktörünün immün hücreler üzerine etkisi	36
2.10. PROSTAGLANDİN E2.....	37
2.10.1. PGE2 ve doğal immün hücrelerin aktivitesi.....	39
2.10.2. PGE2 ve antijene özgül immün cevapların indüksiyonu.....	40
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	42
3.1. Çalışma grubunun seçilmesi.....	42
3.1.1. Numunelerin toplanması	42
3.1.2. Mononükleer hücrelerin ayrılması.....	43
3.1.3. Mezenkimal kök hücre izolasyonu ve hücre kültüründe çoğaltılması	45
3.1.4. İzole edilen MKH'lerin karakterizasyonu.....	46
3.2. İmmün modulator sitokinlerin ELİSA ölçümü.....	49
3.2.1. Hepatosit büyüme faktörünün ELİSA ölçümü.....	49
3.2.2. Transforme edici büyüme faktörünün ELİSA ölçümü.....	49
3.2.3. Prostaglandin E2'nin ELİSA ölçümü.....	50
3.3. İstatistiksel Analiz.....	51

4. BULGULAR.....	53
4.1. Çalışma gruplarının özellikleri.....	53
4.2. İnsan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu, Üretilmesi ve Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular.....	53
4.2.1 İnsan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Çoğaltılması.....	53
4.2.2 İnsan Kemik İliğinden İzole Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu.....	54
4.3. Hepatosit büyüme faktörü konsantrasyonları.....	57
4.4. Transforme edici büyüme faktörü beta 1 konsantrasyonları.....	59
4.5. Prostaglandin E2 konsantrasyonları.....	61
5. TARTIŞMA.....	64
6. SONUÇLAR.....	72
7. KAYNAKLAR.....	73
EKLER.....	90
Ek 1: Mezenkimal kök hücre farklılaşma sonuçları.....	1
Ek 2: Granülosit koloni uyarıcı faktör verilen ve verilmeyen donörlerin kemik iliği plazma ve MKH süpernatantlarındaki (100.000 hücre başına) PGE2, HGF, TGF-β1 konsantrasyonları	3

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Kök hücre tipleri	5
Şekil 2.2	Hematopoetik hiyerarşi modeli	7
Şekil 2.3	Endostel nişte osteoblastlar ile HKH'ler arasında homeostazı sağlayan iletişimler	9
Şekil 2.4	Kemikte yer alan Endostel Niş ile Vasküler Niş arası etkileşimler	10
Şekil 2.5	G-CSF kullanılarak hematopoetik kök hücre mobilizasyonu	11
Şekil 2.6	İnsan G-CSF molekülünün kristal yapısı	15
Şekil 2.7	Granülosit koloni uyarıcı faktörün temel biyolojik aktivitesi	19
Şekil 2.8	Mezenkimal kök hücrelerinin farklılaşması	20
Şekil 2.9	Mezenkimal kök hücrelerin temel özellikleri	21
Şekil 2.10	Mezenkimal kök hücrelerin flasktaki iğsi görünüşleri	22
Şekil 2.11	Kültüre edilmiş MKH'lerin parakrin etkileri	23
Şekil 2.12	Mezenkimal kök hücre (MKH) lenfopoezisi ve immün cevabı düzenler	25
Şekil 2.13	Hepatosit büyüme faktörünün yapısı ve biyolojik fonksiyonları	31
Şekil 2.14	Hepatosit büyüme faktörü ve karaciğer tamiri	32
Şekil 2.15	TGF- β sinyal yolağı	35
Şekil 2.16	TGF- β multifonksiyonel düzenleyicidir	36
Şekil 2.17	Prostaglandin E ₂ 'nin sentezi, yıkımının düzenlenmesi ve PGE ₂ 'ye cevap	38
Şekil 2.18	PGE ₂ tarafından immün cevabın düzenlenmesi. PGE ₂ yerel akut inflamasyonu destekler	40
Şekil 3.1	Ameliyathanede kemik iliği toplanması	42
Şekil 3.2	Ürünün taşınması ve laminar akım kabininde örneklerin alınması	43
Şekil 3.3	Mononükleer hücrelerin ayrışması ve dondurulması	44
Şekil 3.4	Mononükleer hücrelerin T75 doku kültür kabına ekilmesi ve 37°C %5 CO ₂ 'li inkübatörde kültüre edilmesi	45
Şekil 3.5	Mezenkimal kök hücrelerin inverted mikroskopta iğsi-	

	poligonal yapılarının incelenmesi	46
Şekil 3.6	ELİSA testlerinin okunduğu BioTek ELx808 cihazı ve testlerinin yapılması	51
Şekil 4.1	Adipojenik farklılaşma deneyine ait mikroskop görüntüleri	55
Şekil 4.2	Osteojenik farklılaşma deneyine ait mikroskop görüntüleri	56
Şekil 4.3	Akım sitometri ile hücre yüzey moleküllerinin işaretlenmesi	57
Şekil 4.4	Granülosit koloni uyarıcı faktörü ile uyarılmış ve uyarılmamış kemik iliğinden izole edilen MKH süpernatantlarında HGF konsantrasyonları	58
Şekil 4.5	Granülosit koloni uyarıcı faktörü ile uyarılmış ve uyarılmamış kemik iliği plazmasındaki HGF konsantrasyonları	59
Şekil 4.6	Granülosit koloni uyarıcı faktörü ile uyarılmış ve uyarılmamış kemik iliğinden izole edilen MKH süpernatantlarında TGF- β 1 konsantrasyonları	60
Şekil 4.7	Granülosit koloni uyarıcı faktörü ile uyarılmış ve uyarılmamış kemik iliği plazmasındaki TGF- β 1 konsantrasyonları	61
Şekil 4.8	Granülosit koloni uyarıcı faktörü ile uyarılmış ve uyarılmamış kemik iliğinden izole edilen MKH süpernatantlarında PGE2 konsantrasyonları	62
Şekil 4.9	Granülosit koloni uyarıcı faktörü ile uyarılmış ve uyarılmamış kemik iliği plazmasındaki PGE2 konsantrasyonları	63

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1	Hematopoetik kök hücre transplantasyon tipleri	12
Tablo 3.1	İnsan kemik iliğinden izole edilen mezenkimal hücrelerin yüzey molekül özelliklerinin belirlenmesi için kullanılan antikorlar	48
Tablo 4.1	Donörlerin tanımlayıcı özellikleri	53

KISALTMALAR

ACD	: Asit sitrat dektroz
BHP	: B hücre öncülleri
BrdU	: Bromodeoksiüridin
CD	: Farklılaşma küme belirteçleri (<i>Cluster of Differentiation</i>)
CLP	: Ortak lenfoid progenitör (Common Lymphoid Progenitors)
CMP	: Ortak miyeloid progenitörler (Common Myeloid Progenitors)
COX	: Siklooksijenaz
DMEM-LG	: Dulbeco's modified eagle medium low glukoz
DMSO	: Dimetil sülfoksit
EP	: Eritrosit öncülleri
FACS	: Floresan aktive edilmiş hücre ayırıştırma (Fluorescence-activated cell sorting)
FGF-4	: Fibroblast büyüme faktörü (fibroblast growth factor-4)
FITC	: Fluorescein isothiocyanate
G-CSF	: Granülosit koloni uyarıcı faktör
G-CSFR	: Granülosit koloni uyarıcı faktör reseptörü
GMP	: Granülosit monosit öncülleri (Granulocytic/Monocytic Precursor)
GP	: Granülosit öncülleri
GVHH	: Graft versus host hastalığı
HGF	: Hepatosit büyüme faktörü
HKHT	: Hematopoetik kök hücre transplantasyon
HLA-G5	: İnsan lökosit antijen G5
HLA-I	: Birinci basamak insan lökosit antijenlerini
HLA-II	: İkinci basamak lökosit antijenlerini
ICAM-1	: İntrasellüler hücre adezyon molekülü-1 (intracellular cell adhesion molecule-1)
IDO	: İndoleamin 2,3-dioksijenaz
IFN- γ	: İnterferon gama
IL-10	: İnterlökin-10
iNOS	: Uyarılabilir nitrik oksit sentaz
Kİ	: Kemik iliği

LFA-1	: Lenfosit fonksiyon ilişkili antijen 1 (Lymphocyte function-associated antigen 1)
LİF	: Lösemi inhibitör faktör
LPS	: Lipopolisakkarit
LT-HKH	: Uzun süreli (long term) hematopoetik kök hücre
MEP	: Megakaryosit eritrosit öncülleri (Megakaryocytic/Erythroid Precursor)
MKH	: Mezenkimal kök hücreler
MMP-9	: Matriks metalloproteinaz-9
MP	: Monosit öncülleri
MPP	: Multipotent progenitör
NKP	: Doğal öldürücü hücre öncülleri
PBS	: Phosphate buffered saline
PE	: Phycoerythrin (fikoeritrin)
PECAM-1	: Trombosit endotel hücre adezyon molekülü-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule)
15-PGDH	: 15-hidroksiprostaglandin dehidrogenaz
PGE2	: Prostaglandin E2
PIGF	: Fosfatidilinositol-glikan biyosentezis sınıf F protein
SCF	: Kök hücre faktörü (Stem cell factor)
SDF-1	: Stromal hücre kaynaklı faktör
STAT-5	: Transkripsiyon 5'in sinyal çoğaltıcı ve aktivatörü (signal transducer and activator of transcription-5)
ST-HKH	: Kısa süreli (short term) hematopoetik kök hücre
TGF-β1	: Transforme büyüme faktörü-β1
THP	: T hücre öncülleri
Th ₁	: Tip 1 T yardımcı hücre
Th ₂	: Tip 2 T yardımcı hücre
TNF	: Tümör nekroz faktör
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VLA-4	: Çok geç antijen-4 (very late antigen-4)

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kök hücreler kendilerini yenileme ve olgun hücrelere farklılaşabilme yetenekleri olan hücrelerdir. Embriyonun gelişimi sürecinde ve doku onarımında, organogenezin ve histogenezin yerine getirilmesinde görev alan blastosistin iç hücre kütleleri içindeki embriyoblastlara embriyon kök hücresi denilir. Dokuların gelişmesiyle birlikte doku içinde veya dokudan uzak başka kaynaklarda (örneğin kemik iliğinde) yerleşmiş olan ve kendini yenileme ve olgun hücreye farklılaşabilme özelliğini saklı tutan hücrelere ise dokuya özgü kök hücresi veya erişkin kök hücresi adı verilir. Kök hücreler türlerine göre; totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent kök hücre olarak ayrılmaktadır (2).

Mezenkimal kök hücreler (MKH) kemik, kıkırdak, tendon, ligament, kemik iliği stroması, adiposit, kas, dermis ve bağ dokusuna farklılaşabilen multipotent progenitör hücrelerdir (3). Yetişkin ve fetal dokularda; kemik iliği (Kİ), yağ dokusu, umbilikal kord kanı, amniyotik sıvı ve fetal akciğerde bulunmaktadır. İlk kez Friedenstein ve arkadaşları 30 yıl önce plastik yüzeye yapışma özelliği olan fibroblast benzeri bazı hücreleri tanımladılar. Plastik yüzeye yapışma özelliği farklılaşmadan defalarca çoğaltılabilmeyi sağlamaktadır. Mezenkimal kök hücrelerin adiposit, osteosit, kontrosit, tenosit, iskelet kası, nöron ve visseral mezoderm hücrelerine farklılaşabilme özelliği vardır (4-7).

İnsan MKH'leri için spesifik belirleyiciler tanımlanmamıştır. Uluslararası hücresel tedavi birliği insan mezenkimal kök hücrelerinin tanımı için minimum kriterler belirlemiş ve stroma kökenli olan bu hücrelere mezenkimal stromal hücre denilmesini önermiştir (8). Bu hücreleri tanımlayıcı kriterler:

- a) Standart hücre kültür ortamında plastiğe yapışma,
- b) Farklılaşma küme (*Cluster of Differentiation, CD*) belirteçleri; CD105, CD73, CD90 ekspresyonunun pozitif olması ve hematopoetik kök hücre yüzey belirteçleri olan CD34, CD45, CD11a, CD19 veya CD79, CD14 veya CD11b ve HLA DR ekspresyonlarının negatif olması,
- c) Spesifik uyarıcı altında in-vitro olarak osteosit, adiposit, kontrosite farklılaşmasıdır.

Rejeneratif potansiyellerinden dolayı MKH kardiyak enfarktüs, kemik hastalıkları ve metabolik hastalıklar gibi durumlarda doku rejenerasyonu ve tamiri

amacıyla kullanımı araştırılmaktadır. Mezenkimal kök hücreler, birinci basamak insan lökosit antijenlerini (HLA-I) çok düşük oranda ifade etmektedir ve ikinci basamak lökosit antijenlerini (HLA-II) ise hücre yüzeyinde ifade etmezler. Bu sayede immün-tanımadan kaçabilmektedirler (9, 10).

İnflamatuvar bir sitokin olan interferon gama (IFN- γ), MKH'lerde doz bağımlı olarak triptofan katabolize edici enzim olan indoleamin 2,3-dioksijenaz (IDO) ekspresyonunu artırır. Bunun sonucunda; T ve B lenfositler, doğal öldürücü hücreler gibi çeşitli immün hücrelerin çoğalmaları ve efektör fonksiyonları inhibe olmaktadır (11). Mezenkimal kök hücreler, prostaglandin E2 (PGE2), transforme büyüme faktörü- β 1 (TGF- β 1), interlökin-10 (IL-10), hepatosit büyüme faktörü (HGF) sekresyonu aracılığı ile allojenik olarak uyarılmış T lenfositleri baskılayıcı ve immün supresif özelliğe sahip olan CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ T lenfositlerin çoğalmasını uyarıcı yeteneğe sahiptir (10).

Granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) ilk bulunduğu nötrofiller için bir büyüme faktörü olarak tanımlanmıştır (12). İnflamatuvar uyarılar kemik iliği stroma hücrelerinden, endotelial hücrelerden, makrofajlardan ve fibroblastlardan G-CSF üretimini indüklemektedir. Granülosit koloni uyarıcı faktör reseptörleri erken miyeloid progenitörler, matür granülosit, monosit/makrofaj (12), endotelial hücreler ve diğer non-hematopoetik dokular (13) ve insan T ve B hücrelerinin üzerinde bulunmaktadır (14-16). Granülosit koloni uyarıcı faktör, granülosit progenitörlerin proliferasyonunu ve matür nötrofillerin efektör fonksiyonlarının aktivitesini artırır (12). Aynı zamanda hematopoetik kök hücrenin proliferasyonunu, farklılaşmasını ve mobilizasyonunu indükler. Klinikte temel kullanım alanları; miyelosüpresyon sonrası nötrofilleri yükseltmek ve hematopoetik kök hücre transplantasyon (HKHT) hazırlığı için kemik iliğinden hematopoetik kök hücrelerin mobilizasyonunu sağlamaktır (17).

Normal kişilerde G-CSF verildikten sonra periferik kan sitokin profilinin önemli oranda değiştiği çalışmalarda gösterilmiştir. Granülosit koloni uyarıcı faktör tedavisi sonrasında lökositlerin antiinflamatuvar duruma yöneldiği iki mekanizma ile gösterilmiştir: Anti-inflamatuvar etkili interlökin-1 reseptör antagonisti, çözünen tümör nekroz faktör (TNF) reseptör salınımlarında artış ve pro-inflamatuvar mediatör salınımda (TNF, IFN- γ ve GM-CSF) azalmadır (18).

Granülosit koloni stimüle edici faktör ile uyarılarak periferik kök hücre nakli yapılan hastalar ile G-CSF verilmeden kemik iliğinden toplanarak yapılan HKHT sonuçları kıyaslandığında periferik HKHT’de daha fazla T hücre verilmesi nedeni ile aGVHH’de artış beklenmesine rağmen, GVHH’nin artmadığı bilinmektedir. Bununla birlikte bu hastalarda kronik GVHH daha sık görülmektedir. Bunun mekanizması tam olarak bilinmese de; G-CSF uyarısı ile tip1 T yardımcı hücre (Th₁) → tip 2 T yardımcı hücre (Th₂)’ye olan geçiş nedeni ile T lenfositlerden kaynaklanan inflamatuvar cevabın azalarak aGVHH riskinde artışı engelleyeceği ileri sürülmektedir. Akut GVHH’de Th₁ hücreleri sorumlu iken kronik GVHH’de ise Th₂ hücreleri sorumludur (17). Bu nedenle donöre G-CSF uygulanarak yapılan periferik kan kök hücre naklinin (PKKHN) aGVHH riskini artırmadığı, buna karşın kGVHH’de artışa yol açtığı kabul edilmektedir. Yine de G-CSF’nin bu immunmodülatör/immunsupresif etkileri yeterince incelenmiş değildir ve kemik iliği üzerine önemli etkileri (mobilizasyon, farklılaşma) olan bu faktörün kemik iliği mikroçevresinin ana elemanlarından olan MKH’ler üzerine etkisi bilinmemektedir.

Bu çalışma ile G-CSF uyarısı ile insan kökenli kemik iliği kaynaklı MKH’lerin salgıladıkları immun modülatör sitokinlerdeki değişiklikleri saptayarak; G-CSF’nin immün sistem üzerine, iyi tanımlanmamış etkilerinin ortaya çıkarılmasını ve HKHN’de oldukça sık kullanılan bu ajanın klinik kullanımı için uygun koşulların tanımlanmasına katkıda bulunulması amaçlanmıştır. Bunun için, G-CSF verilen ve verilmeyen sağlıklı kemik iliği donörlerinden üretilen mezenkimal kök hücrelerin morfolojisi, çoğalma, immün fenotipik özellikleri, farklılaşma potansiyellerinde ve sekretuar özelliklerinde farklılık olup olmadığı, sekretuar sitokinlerden immun düzenleyici olduğu düşünülen prostaglandin E2, hepatosit büyüme faktörü, transforme büyüme faktörü beta 1 düzeyleri arasında fark olup olmadığını araştırdık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KÖK HÜCRE

Uzun süre bölünebilen, kendini yenileyen ve aynı zamanda ihtiyaca göre farklılaşarak diğer doku hücrelerine dönüşebilen hücrelere “kök hücreler” denir. Farklılaşmamış kök hücrelerin, başlangıçtaki hücrenin karakteristik özelliklerini taşıyan en az bir benzer hücre oluşturabilme yeteneği (selfrenewal); tek bir hücreden birden fazla hücre serisine farklılaşabilme yeteneği (multi-lineage differentiation) ve bir dokunun işlevsel olarak yeniden yapılandırılması özellikleri vardır (19).

Bir dokudan elde edilen kök hücrelerin, uygun ortam şartlarında, uygun uyarılarla farklı doku hücrelerine dönüşebilme yetenekleri *plastisite* (*transdiferansiyasyon*) olarak tanımlanmıştır (20). Kök hücreler, totipotent, pluripotent ve multipotent olmak üzere üç grup altında tanımlanmaktadır (2).

2.1.1. Totipotent kök hücre

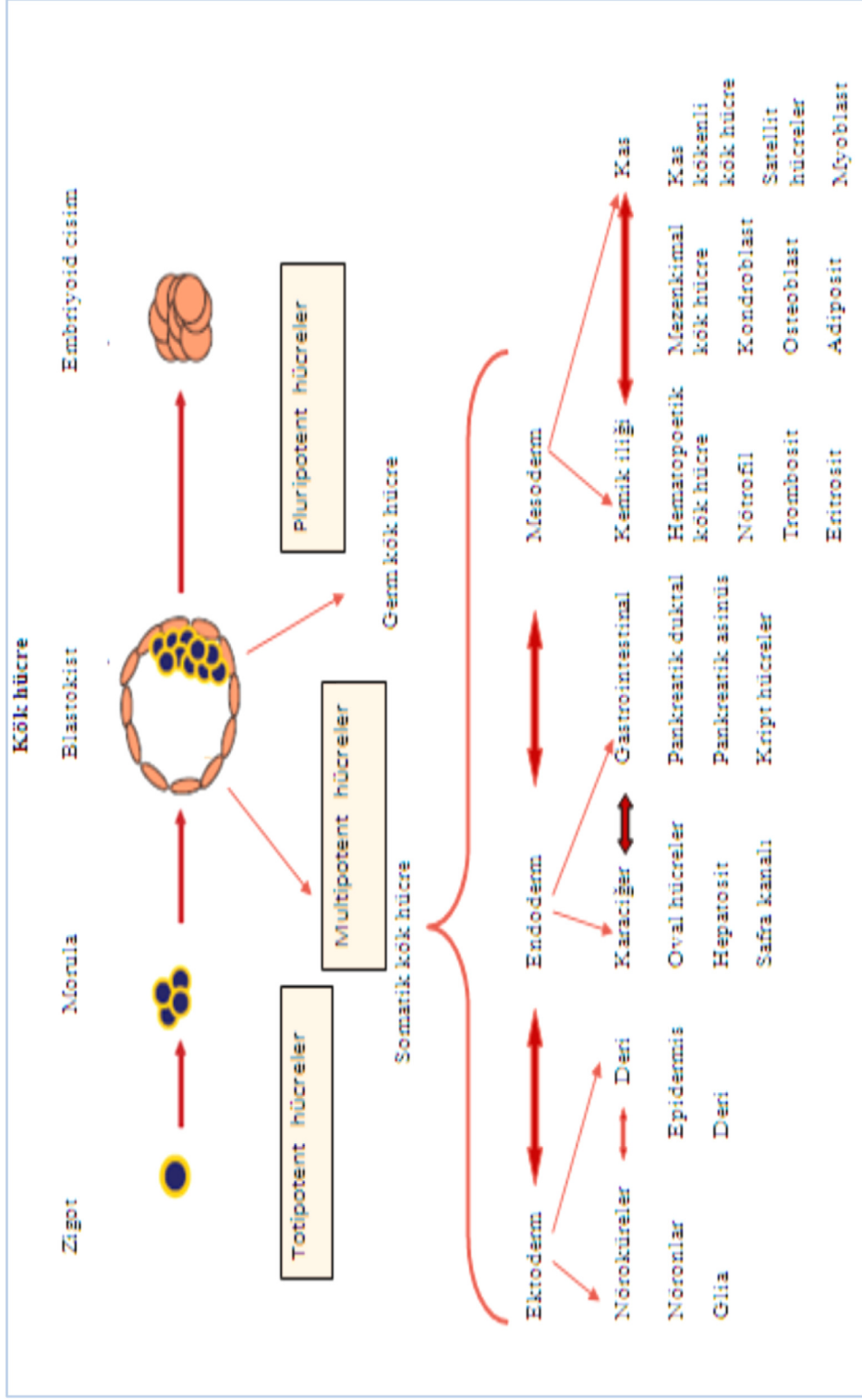
Totus: Tam, bölünmemiş, *Potentia*: Güç. Fertilizasyon ile spermium ve ovumun birleşmesi ile oluşan zigot, vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilecek potansiyele sahip ilk embriyonik hücredir. Zigot ve embriyonun 5. gününe kadar olan tüm blastomerlere her şeyi yapabilen anlamında “totipotent hücreler” denir. Tam ve işlev gören bir canlıyı oluşturabilecek tüm hücre tiplerine farklılaşabilir.

2.1.2. Pluripotent kök hücre

Fertilizasyondan sonra, pre-implantasyon döneminde 5. günde oluşan blastosist evresindeki embriyoda bulunan hücrelerdir. Blastosist; trofoblastik hücreler, blastosöl ve iç hücre kitlesi olmak üzere üç yapıdan oluşmuştur. Embriyonik kök hücrelere kaynaklık eden iç hücre kitlesinden elde edilen hücreler pluripotent kök hücreler olup, gerekli ortam sağlandığında yaklaşık 200 hücre türüne dönüşebilecek potansiyele sahiptir; ancak işlev gören bir organizmayı oluşturamazlar (21).

2.1.3. Multipotent kök hücre

Özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilirler ve erişkin kök hücrelerine dönüşürler. Erişkin kök hücreleri, buldukları dokunun hücre tipini üretirler. Kök hücre tipleri Şekil 2.1’de gösterilmiştir (1).



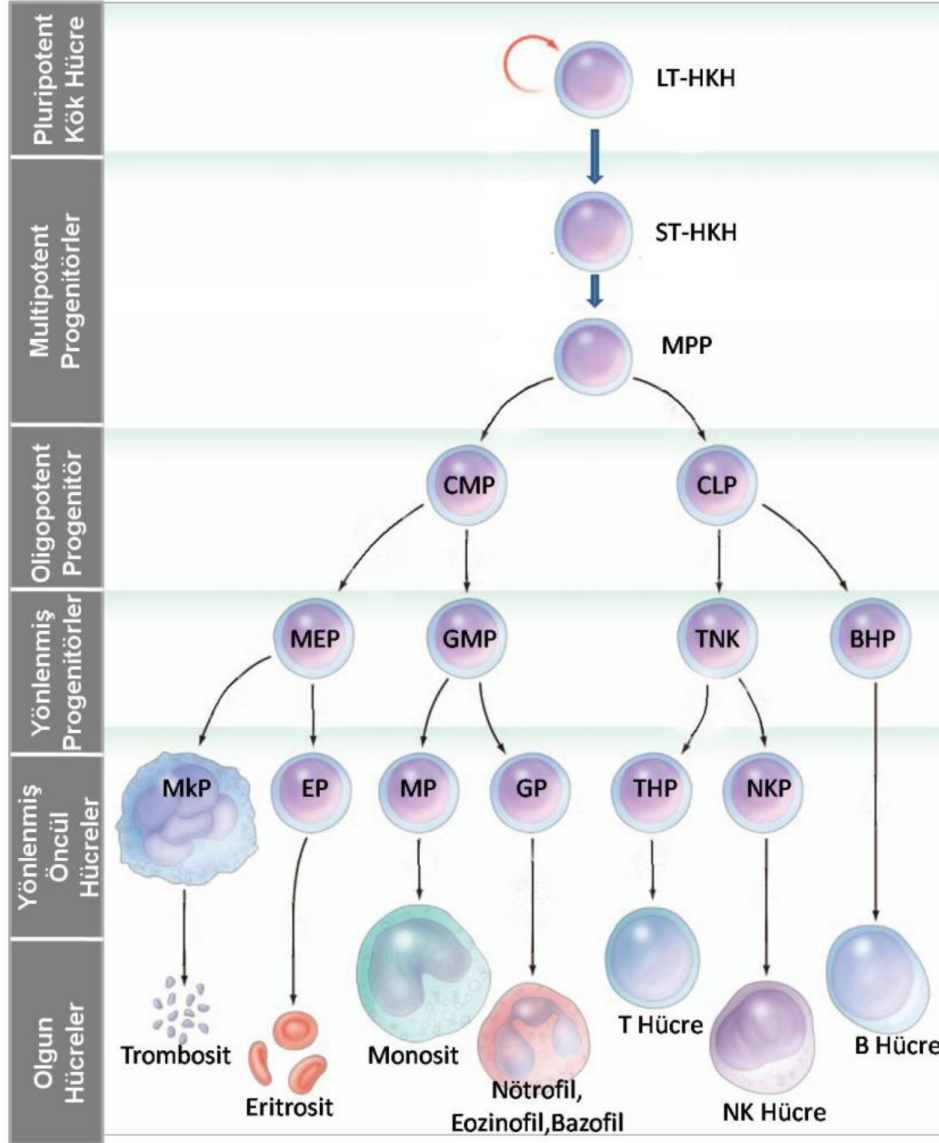
Şekil 2.1: Kök hücre tipleri. Totipotent kök hücreler embriyoda pluripotent iç hücre kitlesine ilerler. Doğum sonrası multipotent kök hücreler tam bir doku kompartmanını yeniden oluşturabilir, ancak biyolojik olarak anlamlı transdiferasyon nadirdir (kaynak (1)'den yararlanılmıştır).

2.2. HEMATOPOEZİS

Olgun hematopoetik sistem aşamalı olarak farklılaşma yeteneğine sahip multipotent ve unipotent kök hücreleri içerir (22). Bu farklılaşma süreci, normal fizyolojik koşullar altında geri dönüşümsüzdür. Yüksek düzeyde proliferasyon yapabilme yeteneğine sahip bu hücreler, farklı fonksiyonel özelliklerde olgun kan hücrelerinin yapımını sağlarlar (22, 23). Böylece hematopoetik sistemin sessiz fazda sürdürülmesi için gereken miktarda farklılaşmış hücre yapımı sağlanır. Hematopoetik kök hücreler (HKH) bir veya birden çok seriye farklılaşmaya sınırlanmış progenitör hücrelerden oluşan hiyerarşik düzenin ana kaynağını oluştururlar. Hiyerarşinin en tepesinde olan HKH'ler üzerindeki proliferasyon baskısı en düşük düzeydedir (23). Homeostaz sırasında kemik iliğinde az sayıda yer alan HKH'ler farklılaşmış kan hücrelerinin belirli miktarda idamesi ve hematopoetik kök hücre havuzunun yenilenmesi için nadir olarak bölünürler (22, 24).

Hiyerarşik düzende HKH'den sonra yer alan multipotent progenitör (MPP) hücreler bütün serilere farklılaşma potansiyelini sürdürürler ancak kendilerini yenileme kapasiteleri sınırlıdır. Hematopoetik kök hücrelerden daha fazla miktarda bulunan MPP hücreler gelişim potansiyeli kısıtlı oligopotent progenitörlere kaynak oluştururlar. Bu hücreler ortak lenfoid progenitör (Common Lymphoid Progenitors, CLP) ve ortak miyeloid progenitörler (Common Myeloid Progenitors, CMP) ile hematopoetik hiyerarşi içerisindeki dallanma noktasını temsil ederler. Sonuçta oligopotent hücreler, bütün olgun kan hücrelerini oluşturacak seri-sınırlı öncül hücrelerin oluşumunu sağlarlar. Ortak lenfoid progenitörler B, T, dendritik ve doğal öldürücü hücreleri içeren olgun lenfoid efektör hücreleri oluştururlarken miyeloeritroid hücre oluşturma potansiyelinden yoksundurlar. Ortak myeloid progenitörler ise miyeloid ve eritroid seri ile dendritik hücreleri yapma yeteneğine sahiptirler (22, 24). Gelişimin daha ileri evrelerinde CMP hücreler CD34 ve Fcγ reseptör ekspresyonlarına göre megakaryosit eritrosit öncülleri (Megakaryocytic/Erythroid Precursor, MEP) ve granülosit monosit öncülleri (Granulocytic/Monocytic Precursor, GMP) olmak üzere iki farklı hücre grubuna bölünürler. Farklılaşma yeteneği sınırlı GMP'ler esas olarak olgun nötrofil, monosit ve makrofaj oluşumunu sağlarken daha az oranda eozinofil, bazofil ve mast hücrelerini meydana getirirler (24). Megakaryosit eritrosit öncülleri ise eritrositlerin

ve daha sonra trombositleri meydana getirecek megakaryositlerin oluşumundan sorumludur (24). Böylece hematopoetik sistemin hiyerarşik düzeni içerisinde bütün serilerde kan hücrelerinin oluşumu ve idamesi gerçekleşmiş olur (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Hematopoetik hiyerarşi modeli. LT-HKH: Uzun süreli (long term) hematopoetik kök hücre, ST-HKH: Kısa süreli (short term) hematopoetik kök hücre, MPP: Multipotent progenitör, CMP: Ortak (common) miyeloid progenitörler, CLP: Ortak (common) lenfoid progenitör, MEP: Megakaryosit eritrosit öncülleri, GMP: Granülosit monosit öncülleri, TNK: T ve doğal öldürücü (NK) hücre öncülleri, BHP: B hücre öncülleri, MkP: Megakaryosit, EP: Eritrosit öncülleri, MP: Monosit öncülleri, GP: Granülosit öncülleri, THP: T hücre öncülleri, NKP: Doğal öldürücü hücre öncülleri. (Kaynak (24)'dan yararlanılmıştır).

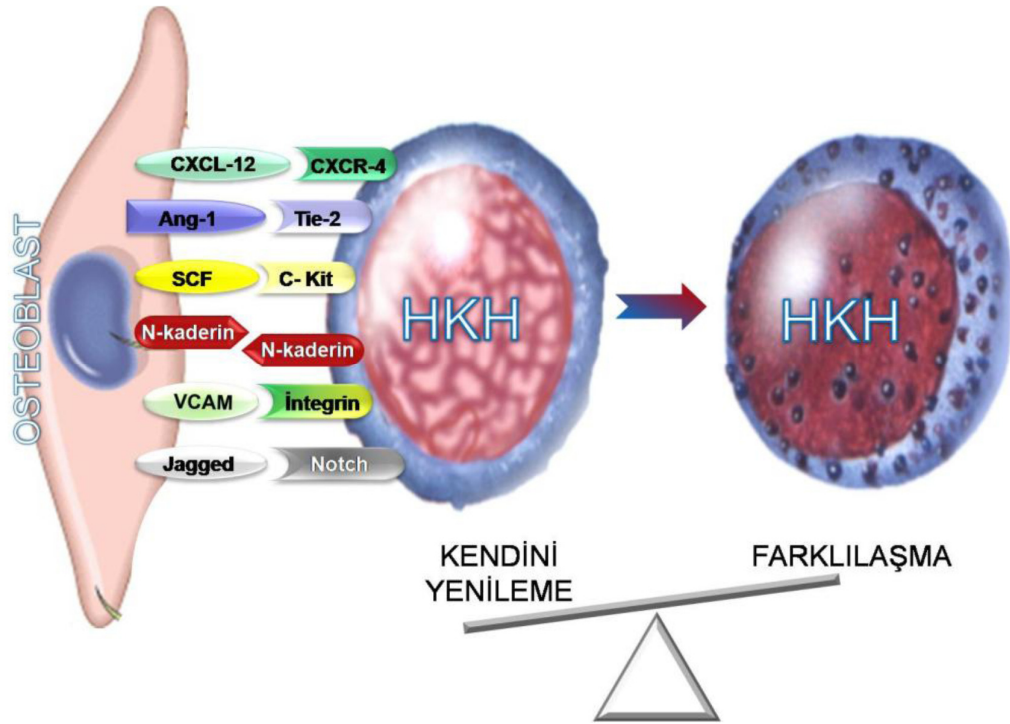
2.3. HEMATOPOETİK KÖK HÜCRE NİŞLERİ

Kök hücrelerin kendini yenileme ve farklılaşma özelliklerinin temini ve sürdürülmesi özelleşmiş bir mikroçevre gerektirmektedir. Destekleyici hücreler, bu hücrelerden sağlanan sinyaller, salınan solubl faktörler, ekstrasellüler matriks molekülleri, ayrıca parakrin nöroendokrin etkilerin de katkısıyla oluşan özel mikroçevre ‘kök hücre nişi’ olarak tanımlanmaktadır (25, 26). ‘Niş’ kök hücrenin kendi kimliğini sürdürmesine olanak veren ve mikroçevresini oluşturan özelleşmiş bir bölge ve etrafındaki hücre grubunun tamamı olarak tanımlanmaktadır. Hematopoetik kök hücreler kemik iliğindeki özelleşmiş mikroçevrelerde özgül mezenkimal kökenli stromal hücreler (osteoblast, fibroblast, endotelyal hücre, adiposit, vb.) ile HKH ve progenitörleri ile yakın etkileşim içerisinde bulunurlar. Hematopoetik kök hücrelerin kendilerini yenilemesi, hücre siklusunun G₀ evresinde sessiz olarak kalmaları, adezyonları, proliferasyonları, olgunlaşmaları, farklılaşmaya yönelmeleri, Kİ’den ayrılıp dolaşıma girmeleri (*mobilizasyon*) dolaşımdan Kİ’e geri dönmeleri (*homing*) ve yerleşimleri (*engraftment*) gibi birçok karmaşık sürecin düzeni de hematopoetik kök hücre nişlerinde sağlanmaktadır (26, 27).

Kemik iliğinde HKH’lerin farklı fonksiyonlarını düzenleyen iki ayrı türde niş; endosteal niş (osteoblastik niş) ve vasküler niş (endotelyal niş) bulunur. Bu iki niş birbirinden fiziksel olarak tamamen ayrı olmayıp birbirleriyle bağlantılıdır. HKH’ler farklı koşullar altında iki nişten birini kullanırlar (26).

Endosteal nişteki özgül mikroçevre, hücreler ve salgıladıkları faktörler HKH’lerin sessiz (G₀) fazda, endosteal nişe tutunmuş halde farklılaşmadan yaşamlarını sürdürmelerini ve yerleşimlerini sağlarlar. Mezenkimal kök hücrelerden gelişen ve kemik formasyonunda rol alan osteoblastlar endosteal nişin temel bileşenini oluşturur (26). Osteoblastlar hücre bağımlı, matriks bağımlı ve çözülmüş (solubl) sitokinler sentezleyerek HKH fonksiyonlarını module ederler. Bunların en önemlileri G-CSF, GM-CSF, M-CSF, IL-1, IL-6, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), CXCL12, IL-3, FLT ligand ve kök hücre faktörü (Stem cell factor, SCF)’dür. Aynı zamanda bu hücreler adezyon molekülleri de eksprese ederler (Şekil 2.3). CD34, CD44, ICAM-1 (intracellular cell adhesion molecule-1), VLA-4 (very late antigen), VLA-5, PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule), LFA-

1 (Lymphocyte function-associated antigen 1) ve LFA-3 bu grubun önemli örnekleridir (28).

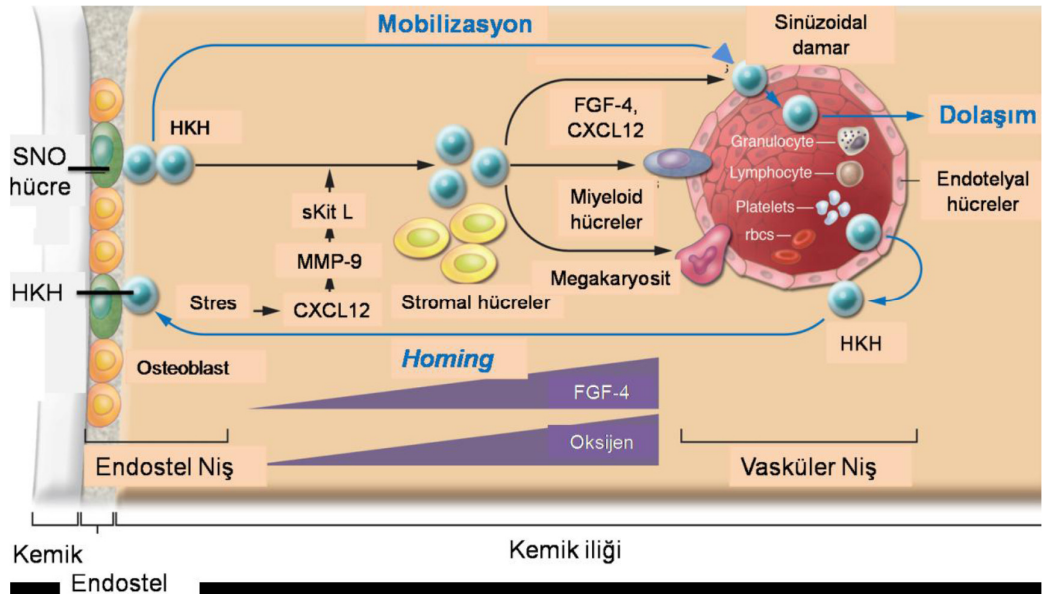


Şekil 2.3: Endosteal nişte osteoblastlar ile HKH'ler arasında homeostazı sağlayan iletişimler (kaynak (27)'den yararlanılmıştır).

Kemik iliğinde fonksiyonel özellikleri ile önemli bir diğer hücre grubu da osteoklastlardır. Osteoklastlar hasar, stres, inflamasyon durumlarında çevrelerinde proteolitik aktiviteyi artırırlar. Matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9) ve katepsin salgılayarak endosteal nişteki CXCL12'yi yıkıma uğrattırlar ve olgunlaşmamış hematopoetik progenitor hücrelerin (HPH) dolaşıma girmelerine neden olurlar. Normal koşullarda endosteal nişteki CXCL12, HKH üzerindeki reseptörü CXCR4 ile etkileşerek HKH havuzunun devamlılığında, HKH trafiğinde ve kök hücrelerin mobilizasyonunda rol oynar (27).

Kemik iliğinde bulunan sinüs duvarı trilaminar yapıda olup endotel hücreleri, bazal membran ve adventisyal retiküler hücrelerden oluşmaktadır. Kemik iliğindeki bu damar sistemi HKH ve progenitor hücrelerin yaşamlarını, çoğalmalarını, değişik serilere farklılaşmalarını, olgunlaşmalarını sağlayan özgül bir "Niş"tir (28). Vasküler niş hematopoetik kök ve progenitor hücrelere hormon, besin, oksijen ve

büyüme faktörlerince zengin bir ortam sağlayarak HKH fonksiyonlarını düzenler. Buradaki HKH'lerin kandaki faktörlere sürekli maruz kalması, onların dolaşımdan gelen sinyalleri (stres, inflamasyon, sitotoksik ajanlar, vb.) anında algılamalarını ve yanıt vermelerini sağlar (27). Ayrıca, vasküler niş HKH'lerin mobilizasyonunu ve dolaşımdan kemik iliğine dönerek yerleşmelerini (homing) ve bu süreçte transendotelial geçişlerine yardımcı olur (26). Hematopoetik progenitör hücrelerin vasküler nişe toplanması temel düzeyde fibroblast büyüme faktörü (fibroblast growth factor-4, FGF-4)'ne ve CXCL12'ye bağlıdır. Aynı zamanda vasküler nişte yüksek, osteoblastik nişte düşük olan FGF gradienti HKH veya progenitörlerin vasküler alana toplanmasında etkilidir (27). CXCL12 ise hematopoetik hücrelerin transendotelial göçünde etkin bir kemotaktik faktördür (26). Kemik iliği endotel hücreleri de CXCL12, VCAM-1 ve selektinler eksprese ederek HKH'lerin mobilizasyonunda, dolaşımdan kemik iliğine dönmelerinde ve yerleşimlerinde rol alırlar (Şekil 2.4) (28).



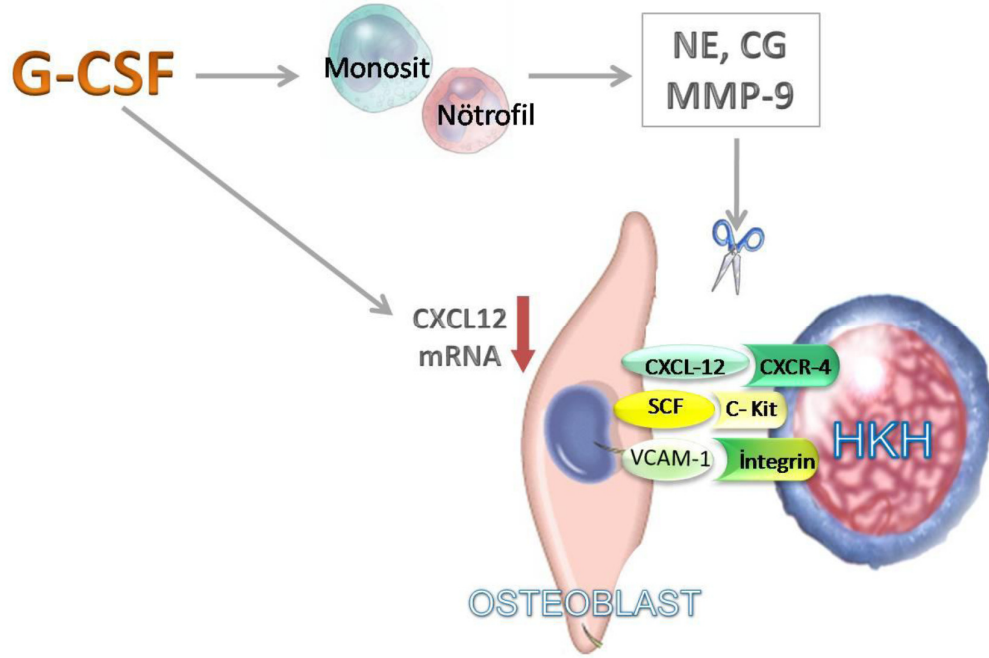
Şekil 2.4: Kemikte yer alan Endotel Niş ile Vasküler Niş arası etkileşimler (kaynak (26)'dan yararlanılmıştır).

G-CSF Kullanılarak Hematopoetik Kök Hücre Mobilizasyonu

Kök hücrelerin mobilizasyonu sırasında kemik iliğinde kemokinler, sitokinler, proteazlar ve adezyon molekülleri arasında iletişimlerin gerçekleştiği biyolojik olarak oldukça karmaşık bir mikroçevre ortamı oluşur.

Granülosit koloni uyarıcı faktör aracılı mobilizasyon modeli ilk basamak olarak G-CSF etkisiyle olgun hematopoetik hücrelerin baskın olarak nötrofiller

sonrasında monositlerin aktivasyonunu; ikinci basamakta ise aktive olmuş hücrelerden HKH/HPH'lerin mobilizasyonunu sağlayacak ikincil sinyallerin oluşumunu kapsamaktadır. Kemik iliğinde oluşturulan ikincil sinyallerden mobilizasyonda en etkin olanları; proteazların salınımı ve kemik iliğindeki CXCL12'nin düzenlemesidir. Granülosit koloni uyarıcı faktör ile çoğalan ve aktive olan nötrofillerden kemik iliği stromasına yüksek miktarda aktif formda salınan proteazlar arasında; nötrofil elastaz (NE), kathepsin G (CG) ve MMP-9 sayılabilir. Salınan protezlar HKH/HPH'leri kemik iliği nişlerinde tutmakta görevli adezyon ve kemoatraktan moleküllerinden; VCAM-1, CXCL12, CXCR4 ve c-kit ligandı keserler (Şekil 2.5) (29).



Şekil 2.5: G-CSF kullanılarak hematopoetik kök hücre mobilizasyonu (Kaynak (29)'dan yararlanılmıştır).

2.4. HEMATOPOETİK KÖK HÜCRE NAKLİ

Kan bileşenlerinin hücre yapısında olanlarının hepsini üretme ve farklılaşma özelliğine sahip hücreler “hematopoetik kök hücre” (HKH) olarak tanımlanır. Bunların sayısı sabittir, ancak gerektiğinde, hem kendi sayılarını çoğaltabilirler, hem de yeni ve olgun kan hücreleri üretirler (30). Hematopoetik kök hücreler esas olarak

kemik iliğinde ve az miktarda kanda bulunurlar. Göbek kordon kanı da kök hücre içermektedir. Bu kaynaklardan herhangi biri kök hücre naklinde kullanılabilir (31).

Hematopoetik kök hücre transplantasyonu hastalıklı veya hasarlı olan kemik iliğini yeniden kurmak amacıyla hematopoetik kök hücrelerin genellikle damar yoluyla verilmesi işlemidir. Hematopoetik kök hücre naklinde amaç bir kanseri veya hastalığı hazırlama rejimi kullanarak yok etmek ve sonrasında boşalan kemik iliği kavitesine hastanın damar yolundan verilen kök hücrelerin yerleşmesinin sağlanmasıdır. Bu hücreler daha sonra büyüyüp bölünerek, eritrosit, lökosit ve trombositleri oluşturmak üzere olgunlaşırlar (32). Bazen de hematopoetik bozukluk olmayan kalıtsal hastalıklarda enzim salınımı sağlayarak klinik iyileşme sağlarlar.

Hematopoetik kök hücre transplantasyonu hematolojik maligniteler, kemik iliği yetmezlikleri, immün yetmezlikler, konjenital hematolojik hastalıklar ve bazı solid tümörlerde kabul edilen etkin bir tedavi olduğu gibi bazı nörolojik ve kalıtsal metabolik hastalıklarda da hastalığı düzeltebilmekte ya da iyileşme sağlayabilmektedir (31).

2.4.1. Hematopoetik Kök Hücre Transplantasyon Tipleri

Kemik iliği donör tiplerine göre HKHT genel olarak üç tiptir: Singenetik, allojenik ve otolog (Tablo 2.1).

Tablo 2.1: Hematopoetik Kök Hücre Transplantasyon Tipleri

Verici Tipi	Donör
Allojenik	Akraba donör (genellikle kardeş) Akraba dışı gönüllü donör Umbilikal kordon kanı
Singenetik	Tek yumurta ikizi
Otolog	Kendisi

Singenetik: Tek yumurta ikiz kardeşinden yapılan nakildir.

Otolog: Yüksek doz myeloablative hazırlama rejimi genellikle kemosenitif hematopoetik malign hücreleri veya solid tümör hücrelerini yok etmek için kullanılır, ardından aplaziye giren hastaya hastanın daha önce dondurulup saklanmış kök hücreleri kurtarıcı tedavi olarak kendisine verilir. İmmün supresyona gerek yoktur.

Allojenik: Kök hücreler başka bir insana aittir. Bu tür transplantasyonlar çoğu malign hastalıklarda, defektif kemik iliği hastalıklarında, kalıtsal metabolik hastalık veya immun sistem bozukluklarında uygulanır. İdeal allojenik donör insan lökosit antijenleri (HLA) uyumlu bireylerdir. İnsan lökosit antijenlerinin uyum derecesi graft rejeksiyon ve GVHH riskinde önemlidir.

2.4.2. Hematopoetik Kök Hücre Transplantasyon Kaynakları ve toplanması

HKH kaynağı olarak kemik iliği, GCSF ile mobilize periferik kan veya kordon kanı kullanılabilir

2.4.2.1.Kordon kanı

Kordon kanı transplantasyonunda kaynak olarak umbilikal kordon kanından toplanan kök hücreler kullanılır. Kordon kanı transplantasyonu, toplanmasının kolay olması, donör için riskinin olmaması, bankalardan temininin mümkün olması, GVHH ve HLA uyumsuzluğunda toleransın diğer kök hücre kaynaklarına göre fazla olması nedeni ile giderek kullanımının yaygınlaştığı görülmektedir.

Kordon kanı toplandıktan sonra işlemlerden geçirilir ve sıvı nitrojenle yıllarca saklanabilir. Hasta için HLA uygun verici adayı bulunmaması durumunda dünyada bulunan çok sayıda Kordon Kanı bankaları taranarak hasta için uygun verici bulunmaya çalışılır. Bulunduğu takdirde, kordon kanları depolanıp saklanmış olduğu için temini kolaydır ve transplant süreci hızlı işler. Nadir durumlarda, hastanın annesi hamile ise, kordon kanı toplanarak tolere edilebilir doku uyumu saptanırsa aile içerisinde de temin edilebilir.

2.4.2.2.Kemik iliğinden kök hücre toplanması

Hematopoetik kök hücre nakli amacıyla donörlerden kemik iliği toplanmadan önce donöre herhangi bir ilaç uygulanmamaktadır. Kemik iliği kök hücre yönünden zengin bir doku olduğu için çoğu zaman toplanan miktar hacmi içerisinde engraftman için yeterli sayıda kök hücre bulunmaktadır. Hastada donör kökenli hematopoez başlaması için gerekli kök hücre miktarı hastanın vücut ağırlığına göre hesaplanır. Donörden toplanacak kemik iliği miktarı ise sınırlıdır; genellikle maksimum 16-10 ml/kg hacim aşılmamaya çalışılır. Buna karşın hastanın ağırlığının yüksek, donörün ağırlığının düşük olması durumunda veya hasta ve transplant koşullarına bağlı olarak fazla hücre gerekmesi durumunda başarılı engraftman elde

etmek için G-CSF gibi bir mobilizan ajan vermeden kemik iliğinden engraftman için gerekli hücre sayısını karşılamak mümkün olmamaktadır. Genellikle transplant için gereken kemik iliği çekirdekli hücre sayısı hastanın kilogramı başına $>3-5 \times 10^8$ olarak hesaplanmaktadır. Kan grubu uygunsuzluğu veya ürüne başka işlem yapılması gerekiyorsa bu işlemler esnasında hücre kaybı olacağından engraftman elde edebilmek için vericiden daha fazla sayıda hücre toplanması gerekmektedir. Donörlerden toplanan volümün 16- 20 ml/kg'ı aşması durumunda transfüzyon ihtiyacı doğacağı ve/veya donör için risk oluşturacağı bilinmektedir. Bu durumda, donörlere G-CSF uygulandıktan sonra kemik iliği toplama işlemine gidilebilir. Granülosit koloni uyarıcı faktör uygulanması sonrası aferez yöntemi ile periferik kan kök hücre (PKKH) toplanması bilhassa erişkinlerde en yaygın kullanılan kök hücre toplama yöntemidir. Çocuk donörlerde ve bazı erişkinlerde periferik venöz erişim zorluğu nedeniyle aferez yöntemi ile kök hücre toplanmasında teknik zorluk yaşanabilir. Bu durumlarda, geçici santral venöz kateter uygulaması ile uygun damar yolu erişimi sağlanabilirse de santral venöz kateter takılması işlemi invaziv bir işlem olduğundan aferez yöntemi ile toplama yerine G-CSF sonrası kemik iliği toplanması bir seçenek oluşturur. Ayrıca, aferez işlemi esnasında kan volümü yeterli olmayan küçük çocuklarda işlem için yabancı kan komponentlerine maruz kalma riski doğmaktadır. Bu nedenlerle birçok merkezde çocuk donörlerde kemik iliği toplanması tercih edilmektedir. Kemik iliği transplantasyon ünitemizde de yukarıda bahsi geçen şartlarda ve hastaya verilmesi hesaplanan çekirdekli hücre sayısının 2×10^8 /kg (hasta ağırlığı)'ın altında kalacağı öngörülen durumlarda vericilere G-CSF uygulandıktan sonra kemik iliği toplanmaktadır. Granülosit koloni uyarıcı faktör kemik iliği nişlerinden kök hücre, progenitör ve farklılaşmakta olan hücrelerin mobilizasyonunu sağlamaktadır.

Ağrı hissedilmemesi için kemik iliği toplama işlemi yeterli anestezi altında ve ameliyathane koşullarında yapılır. Oldukça düşük riskli bir girişimdir. Buna rağmen vericiler işlem öncesinde ayrıntılı muayene ve tetkiklerden geçirilir. Her iki posterior iliak krestten çoklu aspirasyon ile kemik iliği toplanır. Çoğu aspirasyonlar aynı iğne deliğinden, farklı kemik iliği alanlarından yapılır (31). Aspirasyonlarda volüm 5 cc olacak şekilde yapılır. Daha yüksek volümlerde periferik kan ile çekirdekli kemik iliği hücreleri dilue olmaktadır. Amaç, yeterli engraftman için alıcının kilogramı

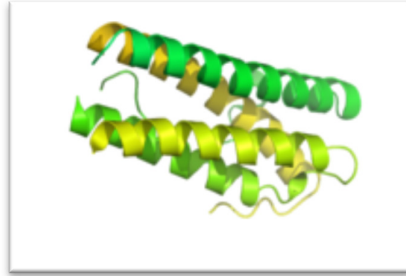
başına $>3 \times 10^8$ çekirdekli kemik iliği hücresi elde etmektir. Alınan total volüm 15-20 ml/kg'ı (vericinin ağırlığı) geçmemelidir. Vericinin vücudu bu eksilen miktarı birkaç hafta içinde tamamlar. Toplanan kemik ilikleri antikoagülan konulmuş steril torbaya konur. Daha sonra kemik spikülleri, pıhtılaşmış materyaller ve yağı uzaklaştıran ancak hücrelerin takılmadan geçtiği 850, 500, 200 μm 'lik filtrelerden geçirilir. Kemik iliği kan transfüzyon torbasına konarak hastaya verilmeye hazır hale gelir.

2.4.2.3. Kök hücrelerin periferik kandan toplanması

Hematopoetik kök hücreler kemik iliğinden periferik kan dolaşımına çok az miktarda geçmektedir. Aferez işlemi ile HKH'den zenginleştirilmiş periferik mononükleer hücreler toplanabilmektedir. Kanda dolaşan kök hücrelerin sayısını arttırmak amacıyla vericilere işlemden önce 4-5 gün, genellikle $10\mu\text{g}/\text{kg}/\text{gün}$ dozunda subkutan G-CSF uygulanmaktadır. Bu işlem allojenik nakilde vericiye, otolog nakillerde ise hastanın kendisine uygulanır. Antekübital venlerden birinden veya geçici bir kateter ile santral venden alınan kan kesintisiz olarak cihaza ulaşmakta ve cihaz tarafından kök hücreden zengin mononükleer hücreler ayrıldıktan sonra kanın geriye kalanı vericiye geri verilmektedir. Herhangi bir anestezi gerektirmeyen bu işlem birkaç saatte tamamlanır. Aferez işlemi, hedeflenen mononükleer hücre veya CD34(+) hücre sayısına ulaşana kadar tekrarlanır. Bu işlemde amaç $>3 \times 10^6/\text{hasta kg}$ CD34(+) hücre sayısına ulaşmaktır. Elde edilen kök hücreler alıcıya hemen verilir veya otolog nakillerde sonradan nakledilmek üzere dondurularak saklanır (33, 34).

2.5. GRANÜLOSİT KOLONİ UYARICI FAKTÖR

Granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) hematopoezi ve doğal immün sistemi düzenleyici temel hematopoetik büyüme faktörüdür. Sitokin sınıf I süperailisi üyesi olan G-CSF, kromozom 17q 11-22 üzerinde lokalize tek gen şeklinde kodlanır ve dört antiparalel α -heliks yapısı ile karakterizedir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6: İnsan G-CSF molekülünün kristal yapısı.

Granülosit koloni uyarıcı faktör proteini Thr-133 pozisyonundan O-bağımlı glikolizasyona uğramış haldedir. Bu hidrofilik O-bağımlı şeker zinciri nötral pH'da proteinin stabilitesini sağlayarak degradasyona uğramasını engeller, ancak biyolojik aktivitesi için gerekli değildir (29, 35, 36). Esas olarak monosit/makrofaj hücrelerince üretilir (12). Hematopoetik sistem üzerindeki G-CSF'nin temel etkileri; normal hematopoetik kök hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasını indüklemesi, radyoterapi ya da kemoterapiye bağlı myelosupresyon sonrasında nötrofillerin yeniden yapılanmasını artırması, matür nötrofillerin efektör fonksiyonlarının aktivasyonu ve kemik iliği kök hücrelerinin periferik kana geçmelerini sağlamasıdır (35, 36).

Sağlıklı kişilerde, fizyolojik koşullar altında G-CSF serum düzeyi ölçülemeyecek kadar azdır (12, 37). Enfeksiyon durumunda ise G-CSF serum düzeyi yüksek düzeylere ulaşır ve iyileşmeye paralel olarak azalır. İnflamatuvar uyarılar [IL-1, IL-6, lipopolisakkarit (LPS), tümör nekroz faktör- α (TNF- α) ve özellikle IL-17], kemik iliği stroma hücrelerinden, endotelial hücrelerden, makrofajlardan ve fibroblastlardan G-CSF üretimini artırır (37, 38).

Granülosit koloni uyarıcı faktör reseptörü (G-CSFR, CD114) sitokin reseptör süperfamilyasına ait tek zincir polipeptid yapısında tip I membran proteinidir. Kromozom 1p35-p34.3 üzerinde tek gen olarak kodlanır ve erken myeloid öncülleri, matür granülositler, monosit/makrofaj, trombositler, endotelial hücreler ve diğer hematopoetik olmayan dokular (insan plasenta, trofoblastik hücreler, nöronlar, hepatositler), insan T ve B hücreleri üzerinde de eksprese edilmektedir (12, 14-16, 39-41).

1986 yılında insan G-CSF cDNA'sının klonlanması, rekombinant G-CSF proteininin üretimini sağlamıştır ve G-CSF'nin biyolojik özellikleri tanımlanmıştır (79).

Granülosit koloni uyarıcı faktör rekombinant teknoloji ile üretilmektedir ve iki formu bulunmaktadır. Lenograstim Çin hamster over hücrelerinden elde edilmektedir ve doğal moleküldeki aynı bölgeden glikozillenmiştir. Filgrastim ise *Escherichia coli*'de üretilmektedir ve glikolize değildir. İn vitro çalışmalar, glikolizasyonun in vitro ısı, pH ve serumdaki proteazlarca yıkılmasında stabilitesini

koruduğundan dolayı lenograstimin filgrastime göre biyolojik potansiyelinin daha yüksek olduğunu belirtmektedirler (36).

2.5.1. Rekombinant insan G-CSF'nin hematolojik etkileri

2.5.1.1. Nötrofil kinetiği ve fonksiyonu

Rekombinant insan G-CSF, myeloid prekürsörlerin çoğalmasını uyarır ve kemik iliğinden nötrofil salınımını artırır. Sekretuar vezikülleri mobilize eder ve spesifik ve azurofilik granüllerin içeriğinin salınımını artırır. Nötrofillerin respiratuar yıkım metabolizmasının, yüzeyinde CD11b/CD18 antijen sunumunun ve hücrel elastaz aktivitesinin dahil olduğu fagositer fonksiyonlarını artırır (12, 42).

2.5.1.2. Monositler

Periferik kan kök hücre vericilerinde 5 günlük rekombinant insan G-CSF verildikten sonra periferik kan monosit sayıları yaklaşık üç kat artmaktadır. Bu da monosit aktivasyonu ve monositteki efektör moleküllerin düzenlenmesiyle ilişkilidir. Sağlıklı bireylerde rekombinant insan G-CSF ile mobilize olmuş monositler, mobilize edilmemişlere göre lipopolisakkarit gibi proinflamatuvar faktörlere yanıtta daha fazla IL-10 üretmişlerdir (43).

2.5.1.3. Eozinofiller

Rekombinant insan G-CSF sağlıklı bireylere verildikten sonra dolaşımdaki eozinofillerde artış, eozinofil granül proteinlerinin mobilizasyonunda ve eozinofil adezyonunda artış olmaktadır (44).

2.5.1.4. Trombositler ve koagülasyon

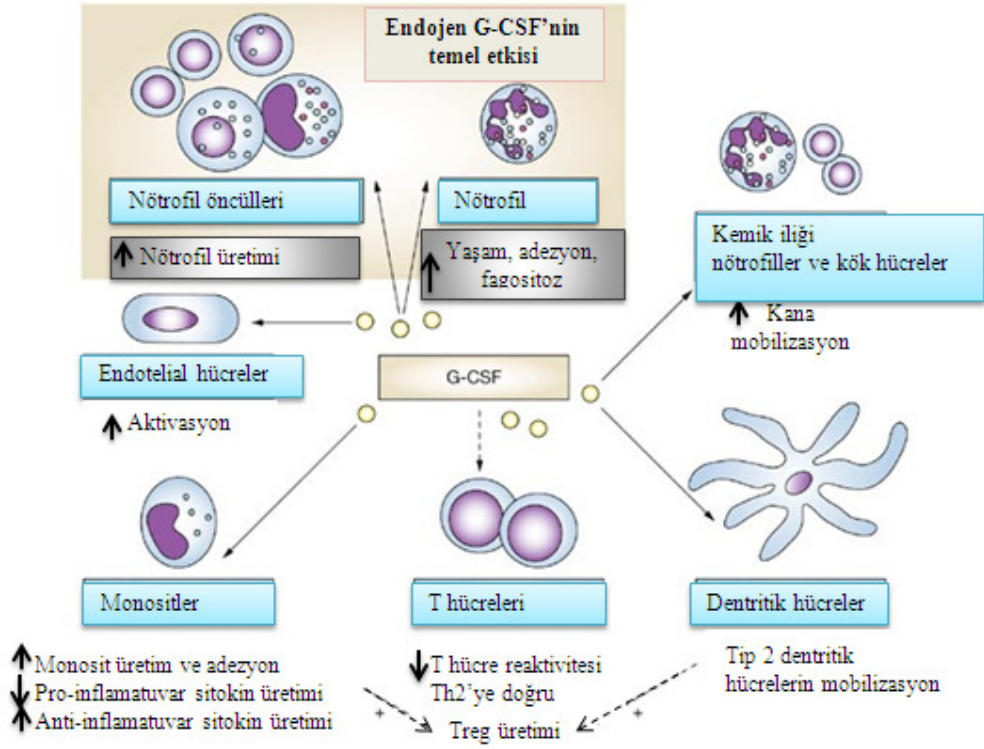
Rekombinant insan G-CSF'nin sağlıklı bireylerde trombosit fonksiyonları üzerine olan etkisi ile ilgili veriler sınırlıdır. Shimoda ve arkadaşları trombosit üzerinde G-CSF reseptörlerini tanımlamışlardır (45).

Koagülasyon sistemi üzerine olan etkileri daha detaylı araştırılmış ve plazmadaki endotel aktivasyon belirteçlerinde (trombomodulin ve von Willebrand faktör antijenleri), kan koagülasyon aktivasyonunda (fibrinojen-trombin, trombin-antitrombin III (TAT) kompleksi, D-dimer) artış olduğu gösterilmiştir. Bu değişiklikler tedavi kesildikten 1 hafta sonra normale gelmektedir (46). Başka bir çalışmada faktör VIII ve fibrinojen düzeyi artarken protein C ve protein S aktivitelerinin azaldığı saptanmıştır (47). Bu bulgular, rekombinant insan G-CSF'nin

bazı donörlerde geçici protrombotik ya da hiperkoagülopatik durumda artış olabileceğini göstermektedir.

2.5.2. Rekombinant insan G-CSF'nin immünolojik etkileri

Granülosit koloni uyarıcı faktör, T hücre reaktivitesi ve antijen sunan hücrelerin fonksiyonunu modifiye ederek immün sistemi etkilemektedir. T hücre üzerinde G-CSFR ekspresyonu tartışmalıdır. İnsan CD4+ ve CD8+ T hücrelerinde mRNA düzeyleri ile G-CSFR ekspresyonu gösterilmiştir. İlginç olarak, farmakolojik dozlarda G-CSF, T hücre immün modülatör genlerini (GATA-3 ve Stat5) aktive ve direk olarak T hücrelerince üretilen proinflamatuvar sitokinleri inhibe edebilmektedir (14, 15). Naif T hücreleri antijen sunan hücreler tarafından T hücre reseptörlerinin antijenik uyarılmalarına bağlı olarak yardımcı T hücresi 1 ve yardımcı T hücresi 2 olmak üzere iki farklı tipe farklılaşmaktadır. Bu hücreler adaptif immünyetede önemli rol oynar. Yardımcı T hücresi 1 IFN γ üretir ve intrasellüler patojenlere karşı olan immünyetenin bir parçasıdır. Yardımcı T hücresi 2 IL-4, IL-5 ve IL-13 üretir ve ekstrasellüler patojenlere karşı humoral immünyetenin elemanıdır. GATA-3 aktivasyonu IL-4 arttırarak, Stat5 aktivasyonu IL-4'den bağımsız olarak Th2 farklılaşmasını arttırmaktadır. Ayrıca bazal GATA-3 ekspresyonu Th1 farklılaşmasını inhibe etmektedir (48). Granülosit koloni uyarıcı faktör, yardımcı T hücrelerin tip 2 yönüne (Th2) polarizasyonuna neden olmakta ve T hücre toleransını indüklemektedir (17, 49). Hücreyel immün yanıtta etkin rol alan dendritik hücreler (dendritic cell, DC), naif T hücreleri Tip 1 veya Tip 2 yönüne farklılaştırmalarına göre DC1 veya DC2 olarak tanımlanırlar. Yapılan deneylerde G-CSF'ye maruz kalma sonucunda periferik kandaki DC2 miktarı artarken, DC1 miktarının değişmediği gösterilmiştir (2, 35, 50, 51). Franze ve arkadaşları Th2'de önemli transkripsiyon faktörü olan GATA-3 ekspresyonunun G-CSF verildikten sonra arttığını göstermişlerdir (15). Klinik çalışmalar G-CSF ile uyarılmış donörlerde CD4+ T hücrelerince anti-inflamatuvar sitokin olan IL-10 salınımının daha fazla, inflamatuvar sitokilerden IL-4, IL-2 ve IFN- γ salınımının daha az olduğunu göstermiştir (49). Granülosit koloni uyarıcı faktörün hematolojik etkileri şekil 2.7'de özetlenmiştir.



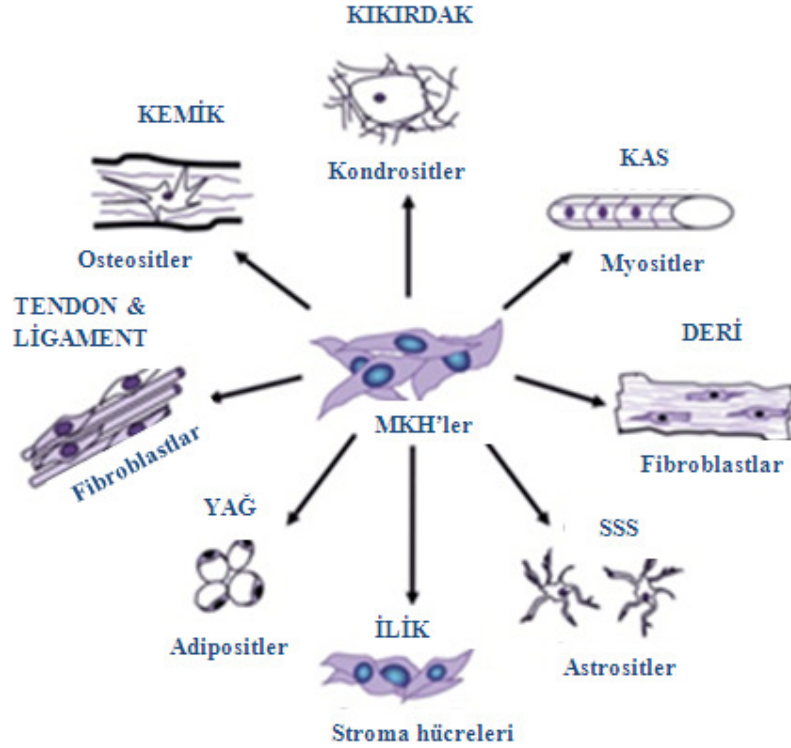
Şekil 2.7: Granülosit koloni uyarıcı faktörün temel biyolojik aktivitesi. Endojen G-CSF primer olarak nötrofil ve nötrofil öncülleri üzerinde etki eder. Bununla birlikte nötrofil üretimi, kemik iliğinden nötrofillerin ve kök hücrelerin kana geçmelerini indükler. Dışarıdan G-CSF verilmesi monositleri, dentritik hücreleri ve endotelial hücreleri de etkiler. Ayrıca verilen G-CSF direkt ya da G-CSF'nin monosit ve dentritik hücreler üzerindeki etkileriyle dolaylı olarak T hücrelerini de etki eder (kaynak (37)'den yararlanılmıştır). Kısaltmalar: G-CSF, granülosit koloni uyarıcı faktör; TH2, tip 2 yardımcı T hücre; TREG, düzenleyici T hücre (37).

2.5.3. Rekombinant insan G-CSF'nin sağlıklı donörlerdeki yan etkileri

Granülosit koloni uyarıcı faktörün genellikle hafif ile orta düzeyde kemik ve eklem ağrısı, baş ağrısı, ateş, rinit, döküntü, halsizlik, trombositopeni ve enjeksiyon bölgesinde reaksiyonlar gibi yan etkileri bulunmaktadır. Granülosit koloni uyarıcı faktörün kısa ya da uzun süreli kullanım sonucu nadir olmasına rağmen inme, myokardiyal enfarktüs ve splenik rüptür gibi yaşamı tehdit edici komplikasyonları görülebilir. Literatürde sağlıklı donörlere allojenik periferik kök hücre nakli amacıyla verilen G-CSF sonrasında 6-10.günlerde spontan splenik rüptür olan vakalar bildirilmiştir (52).

2.6.MEZENKİMAL KÖK HÜCRE

Mezenkimal kök hücreler (MKH) kemik, kıkırdak, tendon, ligament, kemik iliği stroması, adiposit, kas, dermis ve bağ dokusuna farklılaşabilen multipotent progenitör hücrelerdir (3). Mezenkimal kök hücreler yetişkin ve fetal dokularda kemik iliği (Kİ), yağ dokusu, umbilikal kord kanı, amniyotik sıvı ve fetal akciğerde bulunmaktadır (4-7). Mezenkimal kök hücrelerin adiposit, osteosit, kontrosit, tenosit, iskelet kası, nöron ve visseral mezoderm hücrelerine farklılaşabilme özelliği vardır (Şekil 2.8) (4-7).



Şekil 2.8: Mezenkimal kök hücrelerinin farklılaşması.

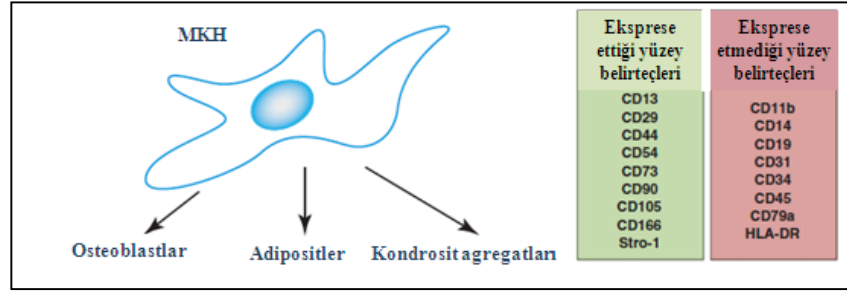
İlk kez 30 yıl önce, Friedenstein ve arkadaşları tarafından fütal buzağı serumu içeren kemik iliğinin hücre kültüründe, kemik hücrelerine ve adipositlere farklılaşan ve fibroblastlara benzeyen yapışkan hücre kolonilerinin gelişmesi sonucu tanımlanmıştır. Bu özellik farklılaşma kapasitesini kaybetmeden defalarca çoğaltılabilmeyi sağlamaktadır. Mezenkimal kök hücrelerin adiposit, osteosit, kontrosit, tenosit, iskelet kası, nöron ve visseral mezoderm hücrelerine farklılaşabilme özelliği vardır (3-6).

Mezenkimal kök hücreler başta konnektif doku hücreleri olmak üzere çeşitli dokulara farklılaşma potansiyeli taşımaları (53), solubl faktörler salgılayarak, aynı zamanda ekstraselüler matriks ile ve hücreler arası adeziv bağlantılar sağlayarak diğer hücrelere destek sağlamaları (54), immünomodulator, çoğunlukla immünsupresif etki göstermeleri (9, 11, 55, 56), in vitro ortamda kolay çoğaltılabilir olmaları, gen transferi kolaylığı olması (57) ve defekt bölgelerine mobilizasyon göstermeleri (58) nedeniyle klinik kullanım için ilgi çekmektedir.

İnsan MKH'leri için spesifik belirleyiciler tanımlanmamıştır. Uluslararası hücresel tedavi birliği insan mezenkimal kök hücrelerinin tanımı için minimum kriterler belirlemiştir (8). Bu kriterler:

- Standart kültür ortamında plastiğe yapışma,
- CD105, CD73, CD90 ekspresyonu pozitif olması ve hematopoetik kök hücre yüzey belirteçleri olan CD34, CD45, CD11a, CD19 veya CD79, CD14 veya CD11b ve HLA DR ekspresyonlarının negatif olması,
- Spesifik uyarıcı altında in-vitro olarak osteosit, adiposit, kondrosit farklılaşmasıdır.

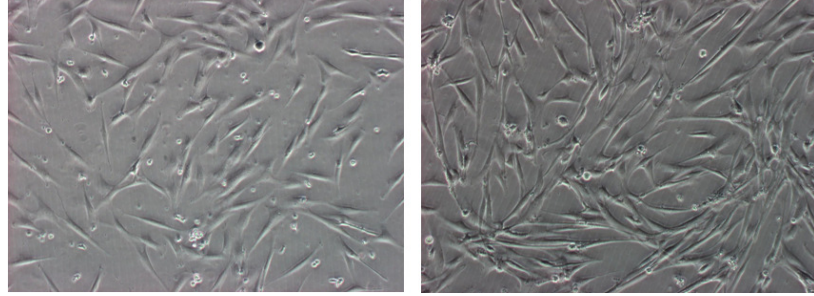
Mezenkimal kök hücrelerin temel özellikleri şekil 2.9'da özetlenmiştir.



Şekil 2.9: Mezenkimal kök hücrelerin temel özellikleri (kaynak (59)'den yararlanılmıştır).

Temel olarak bağ dokusu içeren tüm dokularda MKH bulunmakla birlikte, MKH kaynağı olarak en iyi tanımlanmış doku kemik iliğidir. Kemik iliğinde bir milyon hücre başına 6-10 MKH olduğu hesaplanmaktadır ve yaşla birlikte sayısı azalmaktadır (60). Sayıca az olması nedeniyle laboratuvar ortamında araştırma yapmak için veya tedavi amaçlı kullanım için in vitro olarak çoğaltılmaları gerekmektedir.

Günümüzde MKH'nin en önemli morfolojik özelliği şekil 2.10'da görüldüğü gibi fibroblastlara benzer şekilde iğsi, uzantılı yapısı ve hücre kültürü ortamında flasklara yapışma özelliğidir.



Şekil 2.10: Mezenkimal kök hücrelerin flasttaki iğsi görünümüleri (Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Onkoloji E.A.H, Kök Hücre Laboratuvarından alınmıştır).

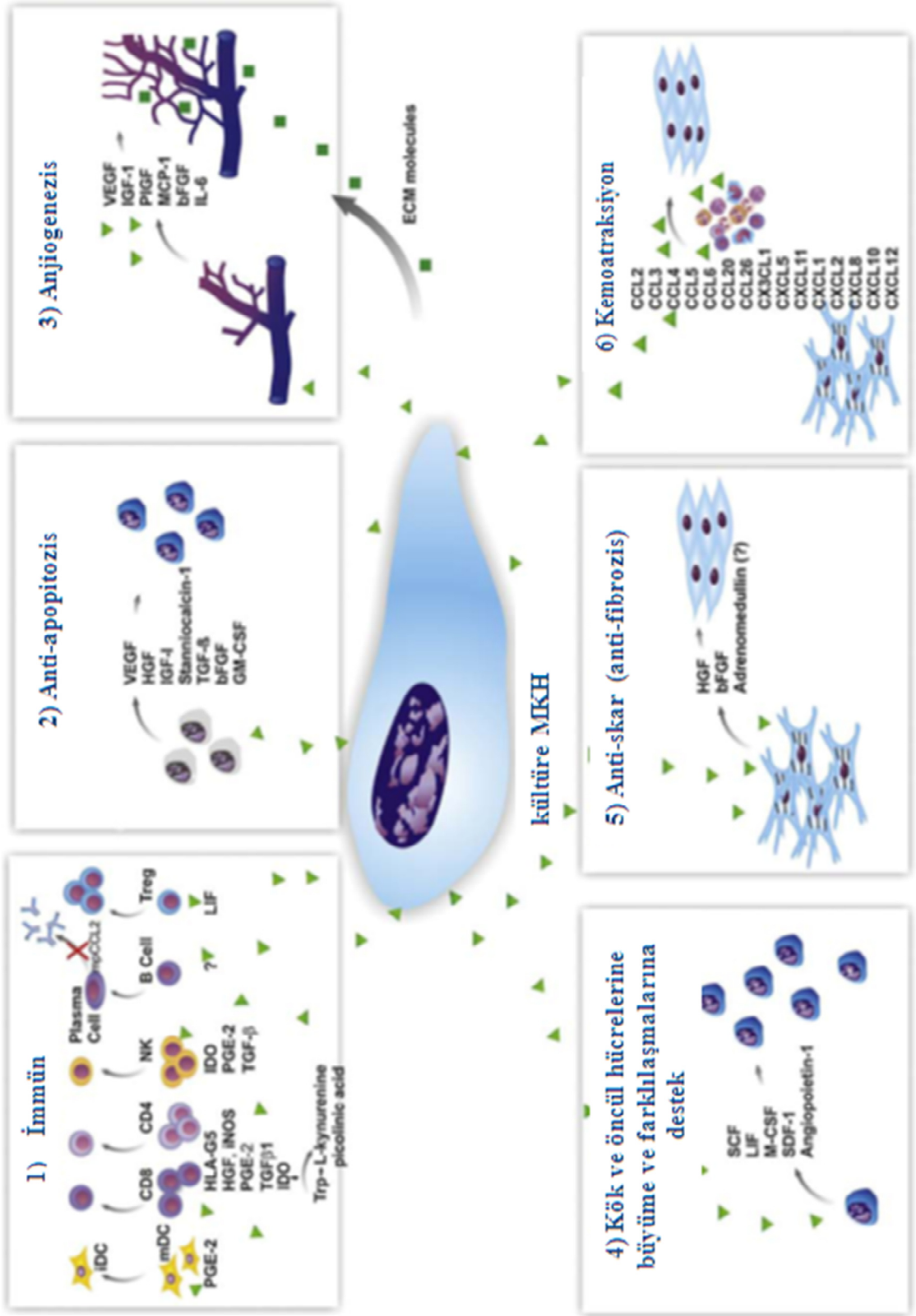
İmmün fenotiplendirme ile diğer hücrelerden özellikle hematopoetik kök hücreden ayırt edilebilmektedir. Mezenkimal kök hücreyi tanımlamak için kullanılan pozitif belirteçler CD105 (endoglin, Mab SH2), CD73 (ekto 5' nükleotidaz, Mab SH3 ve SH4) ve CD90 (Thy-1)'dir. Hematopoetik belirteçler olan CD45 (pan-lökosit belirteci), CD34 (hematopoetik kök hücre belirteci), CD14 ve CD11b (monosit ve makrofaj belirteci), CD79a ve CD19 (B hücre belirteci) açısından negatif olması gerekmektedir. HLA-DR molekülü de MKH uyarılmadıkça MKH yüzeyinde eksprese edilmemektedir (8).

Kemik iliği MKH'leri hematopoetik hücreler için gerekli birçok büyüme faktörünü salgılar (makrofaj koloni stimule eden faktör, stem cell faktör gibi), ayrıca diğer kök hücreler ile ortak olan bazı gen ekspresyonları yanında konnektif dokuya özgün moleküller ve adezyon moleküllerini eksprese ederler.

Mezenkimal kök hücrelerin terapotik etkileri altı kategoriye ayrılabilir:

- 1) İmmünomodülasyon,
- 2) Anti-apoptozis,
- 3) Anjiogenezis,
- 4) Lokal kök ve progenitör hücrelerin büyüme ve farklılaşmasına destek,
- 5) Skar oluşumunu engelleme,
- 6) Kemoatraksiyon.

Kültüre edilmiş MKH'lerin parakrin etkileri şekil 2.11'de özetlenmiştir.



Şekil 2.11: Kültüre edilmiş MKH'lerin parakrin etkileri. Mezenkimal kök hücrelerin terapötik etkilerinde temel mekanizmanın, geniş yelpazede bioaktif moleküllerin salınımı olduğuna inanılmaktadır. Terapötik etkileri altı kategoriye ayrılabilir: İmmünomodülasyon, anti-apoptozis, anjiogenezis, lokal kök ve progenitor hücrelerin büyüme ve farklılaşmasına destek, skar oluşumunu engelleme ve kemoatraksiyon.

1) İmmünomodülatör etkileri: CD8⁺ ve CD4⁺ T lenfositleri ve doğal öldürücü hücrelerin çoğalmasının inhibisyonu, plazma hücrelerince immünglobulin üretiminin baskılanması, dentritik hücrelerin maturasyonunun inhibisyonu ve regülatör T hücrelerinin çoğalmasının uyarılmasıdır. Prostaglandin E2 (PGE2), insan lökosit antijen G5 (HLA-G5), hepatosit büyüme faktörü (HGF), uyarılabilir nitrik oksit sentaz (iNOS), indoleamin-2,3-dioksijenaz (IDO), transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β), lösemi inhibitör faktör (LİF) ve interlökin 10 (IL-10) salınımı immünomodülasyonu aracılık eder.

2) Anti-apoptozis: Mezenkimal kök hücreler apoptozisi sınırlar ve bioaktif moleküller olan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), HGF, insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), stanniokalsin-1, TGF- β ve granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) ile gerçekleştirir.

3) Anjiogenezis: Mezenkimal kök hücreler ekstrasellüler matriks molekülleri, VEGF, IGF-1, fosfatidilinositol-glikan biyosentezis sınıf F protein (PIGF), monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1), fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve interlökin 6 (IL-6) salgılayarak lokal anjiogenezisi uyarılmaktadır. Doku içindeki progenitor ve kök hücre mitozunu kök hücre faktörü (SCF), makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF), stromal hücre kaynaklı faktör (SDF-1), LİF ve anjiopoetin-1 salınımı ile uyarır. Bundan başka, iskemide HGF, FGF (ve olasılıkla adrenomedullin) üretimi skar oluşumunu inhibe etmektedir (53). (Kaynak 53'den yararlanılmıştır).

2.6.1. Mezenkimal kök hücrelerin immünomodulatuvar etkileri

Mezenkimal kök hücreler major histocompatibilite kompleksi (MHC) sınıf I moleküllerini düşük oranda eksprese ederler, MHC sınıf II antijenlerini ise eksprese etmezler. Yapılan çalışmalarda sınıf II antijenlerinin intrasellüler olarak bulunduğu, ancak IFN- γ ile uyarıldığı zaman hücre yüzeyinde eksprese edildiği gösterilmiştir. Ko-stimulator molekül (B7-1, B7-2, CD40 ve CD40L) ekspresyonları yoktur, T lenfosit aktivasyonu ve alloreaktif reaksiyonları önlerler. Sınıf II negatif MKH'ler allojenik lenfositlerde proliferatif bir cevap oluşumuna yol açmazlar. Bu da MKH'lerin immün sistemden kaçmalarını sağlamaktadır (61). Mezenkimal kök hücreler, dentritik ve T hücre alt grupları DC1/Th1 ve DC2/Th2 tarafından üretilen sitokinleri düzenler, antijen sunan hücrenin olgunlaşmasını ve aktivasyonunu engeller ve CD4⁺CD25⁺ düzenleyici T hücre sayısını artırır (62). Mezenkimal kök hücrelerin immün sistem üzerindeki etkileri şekil 2.12'de özetlenmiştir.

2.6.1.1. T hücre proliferasyonu ve fonksiyonu üzerine etkisi

İnsanlarda, babunlarda ve farelerde yapılan çok sayıda çalışmada, MKH'lerin alloantijen, mitojen, anti-CD3 ve anti-CD28 ile uyarılan T hücre proliferasyonunu baskıladığı in-vitro olarak gösterilmiştir (64-66). Bu supresif etki için MHC kısıtlaması yoktur ve allojenik MKH'ler de aynı etkilere neden olmaktadır. Bu etki, hücrelerin hücre siklusunun G0/G1fazında birikmesiyle açıklanan hücre bölünmesinin inhibe edilmesine bağlanabilir (67). Moleküler düzeyde değerlendirildiğinde, siklin D2 ekspresyonu azalırken p27 ekspresyonu artar. Bu da MKH'lerle T hücre proliferasyonunun, T hücre aktivasyonu ve IFN- γ üretimine kıyasla neden daha çok etkilendiğini açıklamaktadır (67). T hücre proliferasyonunun MKH'lerce inhibisyonu hem hücre-hücre teması hem de IFN- γ , interlökin 1 β gibi çözünen faktörlerin salınımı aracılığıyla olduğu görülmektedir (68, 69). Bazı çalışmalar immün supresif etkide çözünen faktörlerin daha önemli olduğunu öne sürmektedir (64, 70). Mezenkimal kök hücre kaynaklı olan TGF- β 1, HGF,IDO ve PGE2'nin T hücre cevabı üzerinde immünmodülatör etkisi olduğuna inanılmaktadır (11, 64, 71, 72). Transforme edici büyüme faktörü ve HGF karşı nötralizan antikorlar, MKH'nin indüklediği T hücre proliferasyonunun baskısını ortadan kaldırmaktadır (64). Mezenkimal kök hücrelerin IFN- γ ile uyarılmasıyla IDO protein ekspresyonu artmakta ve kinürenin sentezi ile sonuçlanan esansiyel triptofanın yıkımını katalizleyen IDO aktivitesini artırır. Ortamdaki esansiyel aminoasit triptofanın azalmasıyla lenfosit proliferasyonu baskılanır (11). T hücrelerinin MKH'lerle ko-kültürü PGE2 düzeylerinde artışla sonuçlanmakta ve PGE2 üretim inhibitörleri ile tedavi edildiğinde MKH aracılı immün modülasyon azalmaktadır (72), bununla birlikte PGE2'nin immün supresif etkisinin altındaki mekanizma net anlaşılammıştır. Mezenkimal kök hücrelerce nitrik oksit (NO) üretimi T hücre proliferasyonunun inhibisyonunda başka bir mekanizmadır (73). Nitrik oksit, T hücre aktivasyonu ve proliferasyonu için kritik bir transkripsiyon faktörü olan transkripsiyon 5'in sinyal çoğaltıcı ve aktivatörünün [signal transducer and activator of transcription-5 (STAT-5)] fosforilasyonunu baskılayarak T hücre proliferasyonunu inhibe eder (74). Mezenkimal kök hücrelerce, T ve NK hücre fonksiyonlarının baskılanması, allojenik T hücre cevabının Th2 sitokin profiline kayması ve CD4⁺CD25⁺ forkhead box P3 (FoxP3⁺) düzenleyici T hücre indüksiyonu

için insan lökosit antijen-G5 (HLA-G5) salınımının gerekli olduğu bildirilmektedir (75). Mezenkimal kök hücreler tarafından T hücre inhibisyonu apoptozisin indüklemesine bağlı değildir ancak hücre bölünmesi ve çözünen faktörlerin üretimini baskılanmasıyla olmaktadır (64). Bununla birlikte son yıllarda yapılan bir çalışmada, MKH'lerin aktive T hücrelerde [CD3 (+) ve bromodeoksiüridin (BrdU) (+)] apoptozisi indükleyebildiği fakat aktif olmayan T hücrelerde [CD3+ ve BrdU(-)] indüklediği bildirilmiştir. Bu da indüklenmiş NO üretimiyle in vivo gecikmiş tip hipersensitivite cevabında belirgin azalmaya neden olmaktadır (76).

Mezenkimal kök hücrelerin immün supresif etkisinin altındaki mekanizmanın türlere göre farklılık gösterdiğine inanılmaktadır. Ren ve arkadaşları immün olayları baskılamada insan MKH'ler ve fare MKH'lerin farklı moleküller salgıladıklarını göstermişlerdir (77). İnsan ve maymun kaynaklı MKH'lerin immün supresyonuIDO aracılığıyla olurken fare kaynaklı MKH'ler aynı kültür şartlarında immün etkilerini NO yoluyla gerçekleştirmişlerdir. Farelerde olduğu gibi, insan MKH'lerin immün supresyonu intrensek değil, fakat kemokin bağımlıdır ve inflamatuvar sitokinler ile uyarılabilir (77).

Supresif etkinin derecesi MKH'lerin konsantrasyonuna bağlıdır. Yüksek MKH/lenfosit oranı MKH'lerin inhibitör etkileriyle ilişkilirken düşük MKH/lenfosit oranı sıklıkla proliferasyonun arttırılmasıyla ilişkilidir (78).

2.6.1.2. B hücre proliferasyonu ve fonksiyonu üzerine etkisi

Mezenkimal kök hücrelerin, anti-immün globulin (Ig) antikorları, anti-CD40L antikorları ve sitokinler (IL-2 ve IL-4) ile aktive edilmiş B hücre çoğalmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (56). Antikor üretimi ve CXCL12 ve CXCL13 karşı kemotaktik cevap olarak CXCR4, CXCR5, CXCR7 kemokin reseptörlerinin salımı olan B hücre fonksiyonları MKH'ler tarafından bozulmaktadır; bununla birlikte B hücre ko-stimülator molekül ekspresyonu ve sitokin üretiminde MKH etkilememektedir (56). Mezenkimal kök hücreler sadece IFN- γ varlığında B hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir, olasılıkla IFN- γ , MKH'de IDO üretimini arttırarak efektör hücrelerin triptofan kullanımını baskılamaktadır (69).

2.6.1.3. Doğal öldürücü hücreler üzerine etkisi

Çok sayıda çalışma MKH'lerin doğal öldürücü (NK) hücre proliferasyonunu ve IL-2 ve IL-15 uyarılan IFN- γ üretimini baskıladığını, fakat aktive NK hücrelerin

proliferasyonunu ile kısmi olarak inhibe ettiğini göstermişlerdir (68, 72, 79). Krampera ve arkadaşları MKH varlığında IL-2 ile 4-5 gün kültüre edilmiş NK hücrelerinin K562 hedef hücrelere karşı sitolitik potansiyellerinde azalma olduğunu ve bunun da NK hücrelerinin IFN- γ üretiminde supresif etkisine bağlanabileceğini belirtmişlerdir (69). Ayrıca, bir çalışma MKH'nin, HLA-sınıf I-negatif hücrelere göre HLA sınıf I-pozitif hücrelere karşı NK hücre sitotoksitesini daha etkin baskıladığını göstermiştir (68). Düşük HLA sınıf I ifade allojenik yanı sıra singeneik MKH'lerinin aktive NK hücreleri tarafından parçalanmasına daha duyarlı yapar. Mezenkimal kök hücrelerin IFN- γ ile inkübasyonu sonucunda HLA sınıf I ekspresyonu arttığı için NK hücre aracılı parçalanma duyarlılığı azalmaktadır (80). Mezenkimal kök hücrelerin immün supresif etkilerinin altındaki mekanizmalar hala açık değildir ve çok çeşitli teoriler sunulmuştur. Transforme edici büyüme faktörü- β 1 ve PGE2 gibi çözünen faktörlerin MKH aracılı NK hücre proliferasyonunun baskılanmasında önemli rol oynadıklarına inanılmaktadır (68).

Prigione ve arkadaşları periferik kanda sabit NK T (iNK T, $V\alpha 24^+V\beta 11^+$) ve $\gamma\delta T$ ($V\delta 2^+$) hücrelerinin proliferasyonu üzerine MKH'lerin inhibitör etkisi IDO ve TGF- β 1'den ziyade salınan PGE2 aracılı olduğunu ve bununla birlikte sitokin üretimi ve sitotoksik aktivitesinin kısmi etkilendiğini göstermişlerdir (81). $V\delta 2^+$ hücreler naif CD4+ T hücre cevabı için profesyonel antijen sunan hücre olarak da görev yapar ve MKH aktive $V\delta 2^+$ hücrenin CD4+T hücreye antijen hazırlama ve sunmasına inhibe etmemektedir (81).

2.6.1.4. Mezenkimal kök hücreler ile dentritik hücreler arasındaki etkileşim

Mezenkimal kök hücreler, maturasyon sinyallerine cevabı inhibe ederek, ko-stimülatör moleküllerin ekspresyonunu azaltarak ve uyarılmış naif T hücre proliferasyonunu ve IL-12 salınım yeteneğini engelleyerek monosit ya da CD34⁺ hematopoetik kök hücrelerin dentritik hücrelere farklılaşmasını bozmaktadır (66, 82, 83). Bu inhibitör etki çözünen faktörlere ve doza bağlı olabilir. Spaggiari ve arkadaşları MKH'lerin monosit kaynaklı dentritik hücrelerin özellikle PGE2 aracılığı ile maturasyon ve fonksiyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir (84). Ramasamy ve arkadaşları dentritik hücrelerde hücre siklusu MKH'lerle etkileşime girdiklerinde G0/G1 fazında durakladığını bildirmişlerdir (85). Bir çalışmada, insan yağ

dokusundan izole edilen MKH'lerin insan dentritik hücrelerinin farklılaşmasında kemik iliği kaynaklı MKH'lerden daha potent immün modülatör olduğunu bildirmişlerdir (86).

2.7. İndoleamin 2,3-dioksijenaz

İndoleamin 2,3-dioksijenaz, triptofan metabolizmasının oksidasyon yolağında hız kısıtlayıcı bir enzim ve intrasellüler olarak konstitütif indüklenebilir formda plasenta, akciğer, ince ve kalın barsak, kolon, dalak, mide ve beyinde eksprese edilmektedir. İndoleamin 2,3-dioksijenaz, dendritik hücrelerde, monosit ve makrofajlarda, eozinofillerde, fibroblastlarda, epitelyal hücrelerde, vasküler düz kaslarda, endotelyal hücrelerde, mezenkimal kök hücrelerde ve bazı tümör hücrelerinde IFN- γ ile indüklenmektedir (11, 90-92).

Triptofan açlığı T hücre inaktivasyonu için asıl sebeptir. Aynı zamanda kinürenin ve oksijen radikalleri gibi IDO ürünleri de T hücresinin çoğalması ve yaşamını düzenler (91, 96).

Mezenkimal kök hücreler doza bağlı olarak IFN- γ uyarısı ile IDO salınımını arttırmaktadır (11). İnsan mezenkimal kök hücrelerinin T hücre üzerine olan immün baskılayıcı özelliğinde en önemli çözünen faktör IDO aktivitesi olduğu gösterilmiştir (77). Triptofan eksikliği ve kinürenin fazlalığı, T hücre proliferasyonunu baskılayarak ve apoptozise duyarlılaştırarak immün modülatör etkiye sahiptir (96). Curti ve arkadaşları AML dentritik hücrelerinin enzimatik olarak ve fonksiyonel olan IDO1 gen eksprese ettiğini ve IDO aracılığı ile Treg popülasyonunun arttırabildiğini göstermişlerdir. Bu Treg'lerin hem lösemi spesifik T hücre immün cevabı inhibe ettiği ve normal dentritik hücrelerin antijen sunma kapasitesini azalttığını göstermişlerdir (92).

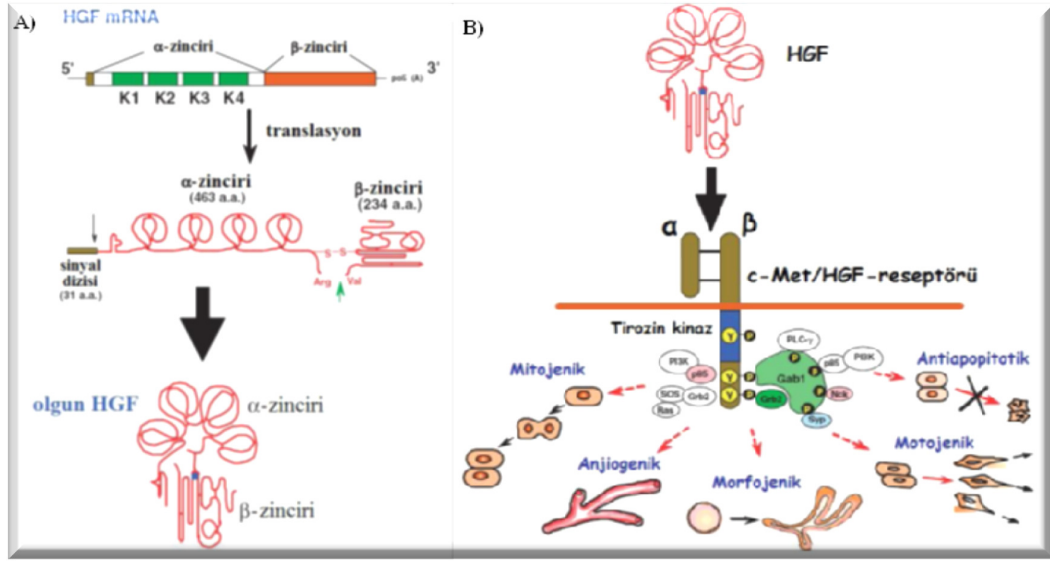
Zhao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada allojenik hematopoetik kök hücre nakli sonrası gelişen akut graft versus host hastalığının derecesi ile plazma IDO düzeylerinde değişiklik saptamışlardır. Evre III-IV olan hastalarda plazma IDO düzeyi evre I-II olanlara göre daha düşük bulunmuş ve immün supresif tedaviye cevap verenlerde plazma IDO düzeyinde azalma olduğunu göstermişlerdir (97).

2.8. HEPATOSİT BÜYÜME FAKTÖRÜ

İlk kez 1984 yılında, ratlarda hepatosit proliferasyonunu ve DNA sentezini uyaran bir faktör belirlenmiş ve bu faktöre “hepatosit büyüme faktörü” (HGF) ve “hepatotropin” isimleri verilmiştir (98). Bu ilk çalışmanın ardından, kısa süre içinde, HGF'nin amino asit sekansı ve cDNA'sı da tanımlanmıştır (99).

Hepatosit büyüme faktörü, disülfür bağıyla bağlı iki alt üiteden (α , 69 kDa ve β , 34 kDa) oluşan dimerik bir moleküldür. Hepatosit büyüme faktörü, fibroblast ve makrofaj gibi stroma hücreleri tarafından, 728 amino asitten oluşan ve pro-HGF adı verilen öncül bir molekül şeklinde sentez edilir; daha sonra Arg494-Val495 bölgesinin ekstrasellüler proteolitik yıkımı sonucu olgun HGF oluşur. Pro-HGF'nin HGF'ye dönüşerek aktif hale gelmesinden, başlıca hepatosit büyüme faktörü aktivatörü (HGFA) sorumludur. Faktör XIIa, ürokinaz ve doku plazminojen aktivatörü de HGF'ye aktive edebilir. Olgun HGF'nin α zincirindeki Cys487 amino asit rezidüsü ile β zincirindeki Cys604 rezidüsü arasında bir disülfür köprüsü bulunur (100-102).

Hepatosit büyüme faktörünün reseptörü c-met proto-onkogeni 1991 yılında tanımlandı. Met reseptörü ekstrasellüler Sema, PSI ve IPT domainleri, transmembran domain ve intrasellüler juktamembran ve tirozin kinaz domainlerini içeren yapısal domainlerden oluşmuştur. Hepatosit büyüme faktörün c-Met'e bağlanması, tirozin kinazın C-terminal olarak toplanmış tirozin rezidülerinin fosforilasyonunu uyarır. Bu durum, mitojenik, motojenik ve morfojenik aktiviteleri içeren bir dizi hücresel aktiviteyi ortaya çıkaracak olan hücre içi olayları başlatır (şekil 2.13) (100).



Şekil 2.13: Hepatosit büyüme faktörünün yapısı ve biyolojik fonksiyonları.

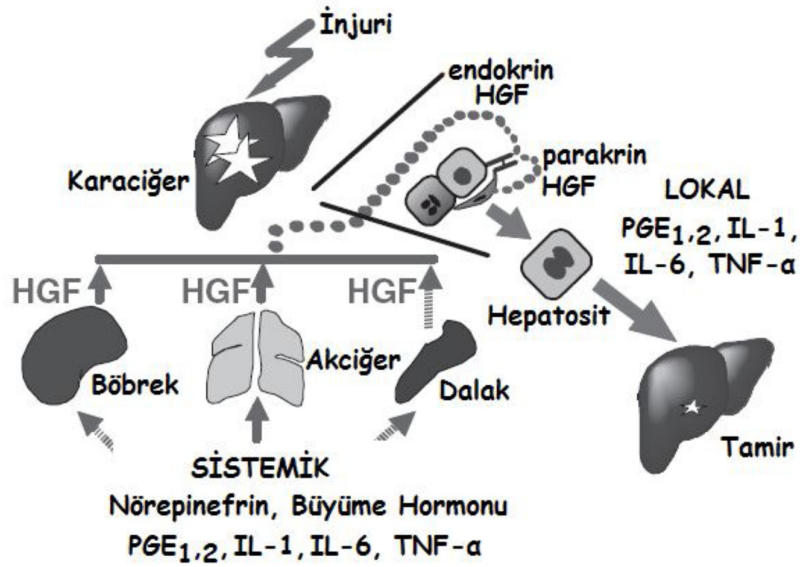
A) Hepatosit büyüme faktörünün üretimi ve aktivasyonu.

B) Hepatosit büyüme faktörünün c-Met/HGF-reseptörü yoluyla gerçekleştirdiği biyolojik etkileri (kaynak (100)'den yararlanılmıştır).

2.8.1. Hepatosit büyüme faktörünün Fonksiyonları

2.8.1.1. Organ Rejenerasyonu

Hepatosit büyüme faktörü, rat karaciğer hücreleri üzerinde mitojen bir ajan olarak tanımlanmıştır. Hepatik injuri esnasında, hem kan hem de karaciğer HGF seviyeleri önemli ölçüde artar (100, 103). Hepatosit büyüme faktörü, mitojenik etkilerinin yanı sıra, hepatositlerde anti-apoptotik ve anti-inflamatuvar etkilere de sahiptir (104). Yapılan çalışmalarda, hepatektominin ardından kalan karaciğer dokusundan ziyade, akciğer, böbrek ve dalak gibi bütünlüğü bozulmamış uzak organlarda HGF mRNA seviyelerinin arttığı bulunmuştur (103). Bu durum, hepatektominin ardından portal ven yoluyla karaciğer loblarına HGF desteğinin sağlandığını göstermektedir (şekil 2.14).



Şekil 2.14: Hepatosit büyüme faktörü ve karaciğer tamiri

Her ne kadar HGF, karaciğer hücreleri üzerinde mitojen bir ajan olarak tanımlanmış ve buna göre isimlendirilmişse de, diğer birçok organ ve dokuda da intrinsik bir tamir faktörü olarak rol oynamaktadır (105). Yapılan çalışmalar, HGF'nin, gastrointestinal sistemde özellikle ülser iyileşmesi, deride kıl gelişimi ve yara iyileşmesi, kıkırdak ve kas dokusunda hasar sonrası iyileşme sürecinde ve hematopoezde görev aldığını göstermektedir (106-110).

2.8.1.2. Organ Gelişimi

1991 yılında, Montesano ve arkadaşları HGF'nin embriyolojik süreçte organların gelişimi için önemli olabileceğini öne sürmüştür (111). Gerçekten de ilerleyen yıllarda yapılan çalışmalar, organogenezde HGF'nin yaşamsal bir role sahip olduğunu göstermiştir (112). Hepatosit büyüme faktörünün başta plasenta olmak üzere, sinir dokusu, böbrek, karaciğer, akciğer, GİS, kas dokusu, dişler, kemik ve kıkırdak dokusu, meme bezleri, hematopoetik doku ve tükürük bezlerinin gelişiminde fonksiyon gördüğü anlaşılmıştır (100).

2.8.1.3. Antiapoptotik Etkileri

Yapılan çalışmalarla, HGF'nin Bcl-xL ekspresyonunu indüklediği ve Fas aracılı apoptotik hücre ölümünü baskıladığı gösterilmiştir (113). Yamamoto ve arkadaşları endotelial hücrelerde hipoksinin indüklediği apoptotik hücre ölümünün,

HGF tarafından önemli ölçüde engellendiğini ve HGF'nin apoptozun bir inhibitörü olan Bcl-2'yi doza bağımlı bir şekilde artırdığını tespit etmişlerdir (114).

Paradoksal olarak, HGF/Met sistemi proapoptotik özellikler de gösterir. Hepatosit büyüme faktörü reseptörünün kaspazlar tarafından yıkıma uğraması sonucu ayrılan parçası (p40 Met), apoptozu uyarma yeteneğine sahiptir. Ayrıca, HGF reseptörünün direkt olarak Fas reseptörüne bağlanarak Fas ligand bağlanmasını önlemesi nedeniyle, HGF'nin reseptörüne bağlanması Met/Fas ilişkisini bozar ve hücreyi Fas bağımlı apoptoza duyarlı hale getirir (115, 116).

2.8.1.4. Antifibrotik Etkileri

Yapılan çalışmalarla HGF'nin hepatik fibrozlu ratlarda kollajenaz aktivitesini artırdığı ve fibrozun ilerlemesini engellediği, akciğer yaralanmasında fibrotik değişiklikleri baskılandığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde, HGF'nin antifibrotik etkisi, kronik böbrek yetmezliğinde, sistemik sklerozda ve kardiyomiyopatide de belirlenmiştir (100).

2.8.1.5. Antiinflamatuvar Etkileri

Kuroiwa ve arkadaşları akut GVHH'de HGF'nin IFN- γ , TNF- α ve IL-12'yi baskıladığını tespit etmişlerdir (117). Benzer şekilde, kardiyak transplantasyonda HGF'nin IFN- γ ekspresyonunu azalttığı bulunmuştur (118). Okunishi ve arkadaşları ise, HGF'nin hem in vivo hem de in vitro olarak, antijen-sunma gibi dentritik hücre fonksiyonlarını baskıladığını bulmuşlardır (119). Son yıllarda yapılan çalışmalar, HGF'nin hem oksijenaz-1 indüksiyonunu, IL-10 üretimini arttırarak ve IL-6 üretimini azaltarak antiinflamatuvar etki gösterdiğini ortaya koymuştur (120, 121).

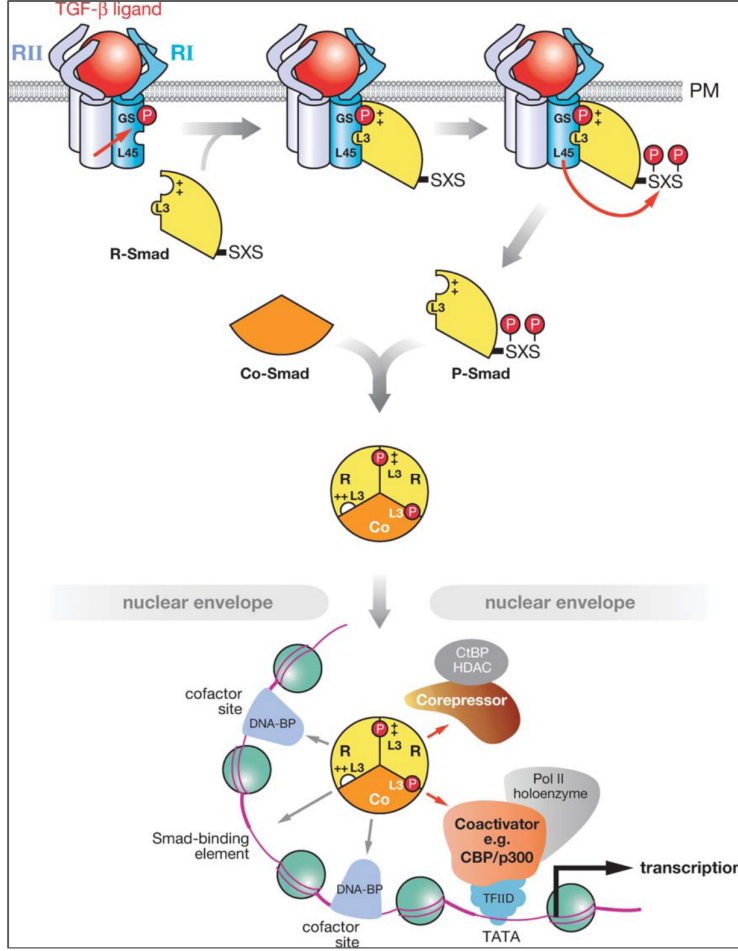
2.8.1.6. Anjiogenik Etkileri

Hepatosit büyüme faktörünün doza bağımlı bir şekilde endotelial hücrelerde DNA ve protein sentezini uyardığı bulunmuştur (122). İskemik durumlarda HGF'nin anjiogenezi indüklediği tespit edilmiştir. Hepatosit büyüme faktörü, kemik iliğinden endotelial progenitor hücrelerin mobilizasyonunu indüklediği ve endotelial hücrelerin proliferasyonunu artırdığı gösterilmiştir (123). Son zamanlarda, özellikle kanser tedavisinde, anjiogenezi inhibe etmek için, HGF/c-Met sinyal yolu bir hedef olarak ön plana çıkmıştır (124).

2.9. TRANSFORME EDİCİ BÜYÜME FAKTÖRÜ BETA (TGF-B)

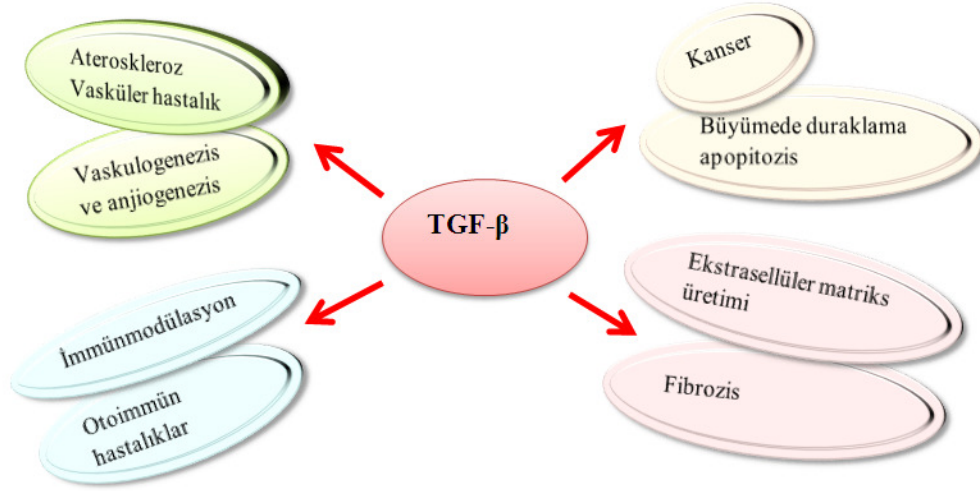
Transforme edici büyüme faktörü beta ailesinin üyeleri büyüme ve farklılaşma esnasındaki aktif hücrelerden polipeptid olarak salınırlar. Çok hücreli organizmada 60'dan fazla TGF- β aile üyeleri tanımlanmıştır. Bu 60 aile üyesinden üçü TGF- β 'lar, beşi aktivinler ve sekizi kemik morfojenik protein olarak farklı genler tarafından kodlanmaktadır (125).

Üç yüz doksan amino asitten oluşan büyük bir prekürsör protein molekülüdür (43). Yapısında bir disülfid köprüsü bulunan 25 kDa'luk bir homodimerdir. Transforme edici büyüme faktörü- β hücrede inaktif pro-peptid şeklinde sentezlenir ve latent TGF- β -bağlayan proteinler (LTBb) ile kompleks oluşturularak latent (inaktif) TGF- β formunda salgılanır. Pro-peptidin N-terminalinde "latency associated protein" (LAP) olarak adlandırılan bir dizi bulunur. Latent TGF- β 'nın yapısından LTBP ve LAP proteinlerinin serin proteazlar aracılığı ile uzaklaştırılması (veya LAP'ın konformasyonel değişimi) sonucu aktif TGF- β oluşur (126). Bir kaskad şeklinde ilerleyen TGF- β sinyalizasyon yolunun aktivasyonu ligandın reseptörlerine bağlanması ile başlatılır. Hücre membranında TGF- β tip I (TbRI) ve TGF- β tip II (TbRII) olmak üzere iki tip reseptör bulunur. Endoglin ve betaglican olarak da adlandırılan TGF- β tip III reseptörleri (TbRIII) TGF- β 'nın ilk iki tip reseptörlerine bağlanmasını kolaylaştırır. TGF- β tip II reseptörün membran dışı bölgesine, sonra da tip I reseptörüne bağlanır. Oluşan ligand/reseptör kompleksi ikişer TbRI ve TbRII içeren bir heterotetramerdir. TbRI ve TbRII reseptörleri serin/treonin kinaz özelliğine sahiptir. Transforme edici büyüme faktörü- β 'nın tip II reseptörüne bağlanması, bu reseptörün kinaz aktivitesinin ortaya çıkmasını ve tip I reseptörün yapısında bulunan GS (glisin, serin) bölgesinin fosforilasyonunu sağlamaktadır. Bu şekilde aktiflenmiş TbRI sitozolde bulunan Smad proteinlerini fosforiller (125). Smad proteinlerinin yapısında bir bağlaç bölgesi tarafından birleştirilen iki globüler bölge bulunmaktadır. Bağlaç bölgesinde ubiquitin ligazın bağlandığı ve fosforilasyon yerleri bulunmaktadır. Bu bölge, diğer sinyalizasyon yolların TGF- β yolu ile kesiştiği noktadır. Böylece TGFb-Smad yolu hücredeki diğer sinyalizasyon yolları ile karşılıklı etkileşime girer. Bu şekilde hücreyi hangi yönde etkileyeceği belirlenir (şekil 2.15) (125, 127).



Şekil 2.15: TGF- β sinyal yolağı. TGF- β süperaile ligandları ilk olarak tip II (RII) veya tip I (RI) homodimerlerine ya da RII-RI heterotetramere bağlanır. Ligand bağlama, RII'nin kinaz aktivitesinin ortaya çıkmasını ve RI'in yapısında bulunan GS (glisin, serin) bölgesinin fosforilasyonunu sağlayarak reseptör kompleksini stabilize eder. Reseptör aktivasyonundan sonra, RI üzerindeki L45 ile Smads üzerindeki L3 arasında etkileşimden sonra SXS motifi fosforillenir. Fosforile Smad'lar (P-Smads) daha sonra memelilerde ortak Smad4 ile üçlü bir kompleks oluşturur. Smad kompleksi sonra DNA ve transkripsiyon faktörleri ile etkileştiği nükleus içine geçer (125).

Transforme edici büyüme faktörü, hücre çoğalması, farklılaşması, apoptozis, adezyon, çeşitli hücre tiplerinin migrasyonu ve ekstrasellüler matriks proteinlerinin üretimini düzenler (şekil 2.16). İmmatür hematopoetik hücreler, aktive T ve B hücreleri, makrofajlar, nötrofiller ve dentritik hücreler gibi çoğu hücre tipleri TGF- β üretir ve/veya etkilerine duyarlıdır (128, 129).



Şekil 2.16: TGF- β multifonksiyonel düzenleyicidir.

2.9.1. Transforme edici büyüme faktörünün immün hücreler üzerine etkisi

Transforme edici büyüme faktörü lenfositlerin tüm alt grupları, makrofaj ve dentritik hücrelerin çoğalması, farklılaşması ve fonksiyonlarını düzenler. Transforme edici büyüme faktörü- β 'nın etkisi hücre tipine ve farklılaşma durumuyla birlikte ortamda bulunan sitokinlerin kombinasyonuna bağlıdır (129). Transforme edici büyüme faktörü- β 1 knockout farelerden elde edilen bilgilerle TGF- β 'nın immün hücre homeostazisinin idame ettirilmesinde çok önemli bir rol oynadığı anlaşılmıştır. Transforme edici büyüme faktörü- β 1 olmayan fareler doğumdan sonra beslendiklerinde çoğu organda multifokal, lenfosit infiltrasyonlu inflamatuvar hastalıklar ve otoimmün bulgular sonucunda kısa sürede ölmektedir (130-132). Bu fareler ayrıntılı incelendiğinde, inflamasyon başladığında vasküler endotele lökosit adezyonunun arttığı ve major histokompatibilite kompleks moleküllerinin arttığı görülmüştür (133). Bu fare fenotipinde, TGF- β 1'in lenfosit üzerindeki antiproliferatif etkisinin kaybolduğuna atfedilmiştir. Bu çalışmalarla endojen TGF- β 1'in otoimmüniteyi baskıladığı açıkça görülmektedir. Transforme edici büyüme faktörü- β 2 ya da TGF- β 3 eksik fareler ciddi gelişim defektleri ve immün hücreler oluşmadan ölmüşlerdir ve bu izoformların immün hücrelerin düzenlenmesinde önemli olup olmadığı hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır (129).

İn vitro çalışmalar TGF- β 'nın B ve T hücrelerinin tüm evrelerinde etkilediğini göstermektedir. Tipik olarak, TGF- β , B ve T hücre proliferasyonunu

inhibe ederek ve apoptozisi uyararak immün supresif bir molekül gibi rol oynamaktadır (128). Son zamanlarda, TGF- β 1'in aktive T hücrelerin ölümünü destekleyerek inflamasyonu baskıladığı ve apoptotik T hücrelerden ortaya çıkan TGF- β ile immün supresif bir çevre oluşturduğu saptanmıştır (134, 135).

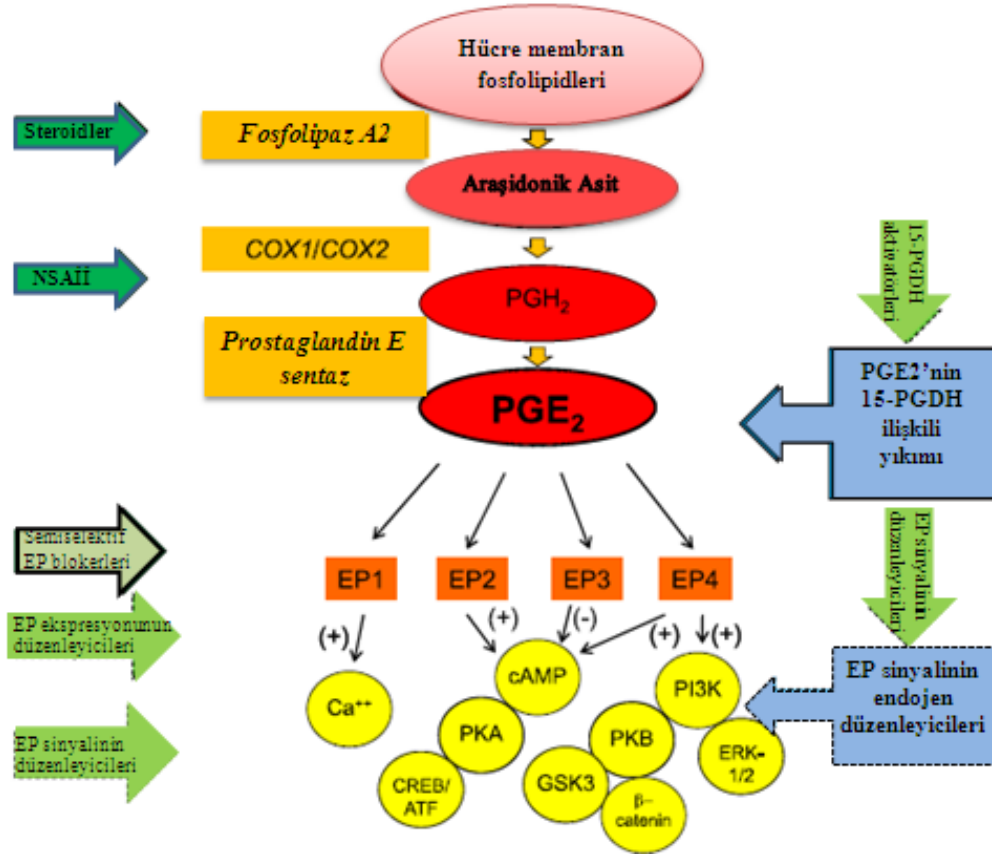
Transforme edici büyüme faktörü yardımcı T hücre alt grup farklılaşmasında önemli rol oynar. Transforme edici büyüme faktörü- β 'nın CD4+hücreleri Th1 hücrelere farklılaşmaya teşvik edici eğilimi vardır. Transforme edici büyüme faktörü- β , Th2 sitokinlerle karşılaştırıldığında profili Th1'e doğru kaydırır ve IL-2 ve IFN- γ üretimini artırır. Bununla birlikte, TGF- β , naif T hücrelerinde Th1/Th2 cevabını inhibe eder fakat hafıza T hücrelerinde ise sadece Th1 cevabını inhibe etmektedir (129).

Transforme edici büyüme faktörünün antikor sınıf değişiminde rol oynadığı gösterilmiştir. Antijen tanıyan bölgesini kodlayan immünglobulin (Ig) ağır zincir gen bölgesiyle farklı Ig sınıfının sabit kısmıyla yeniden birleştirir. Transforme edici büyüme faktörü- β 'nın germline Ig α genlerinde transkripsiyonu indükleyebilme yeteneğinden dolayı sınıf değişimini Ig izotip IgA'ya yönlendirir (128). Ayrıca, TGF- β , B hücrelerinin normal olgunlaşmasını ve farklılaşmış fonksiyonlarını da kontrol eder. Bunlar pre-B hücreleri ve olgun B hücreler üzerinde IgM, IgD, CD23 ve transferrin reseptörünün inhibisyonu ve MHC sınıf II ekspresyonunun indüksiyonu gibi yüzey moleküllerinin ekspresyonunu düzenler (128).

2.10. PROSTAGLANDİN E2

Prostaglandinler, siklooksijenaz (COX; esas aktif siklooksijenaz COX1 ve uyarılabilir COX2) tarafından araşidonik asitten (AA) ve az bir kısmı izoprostan yolağında prostaglandin sentaz tarafından üretilen küçük moleküllerdir (136, 137). Myeloid ve stroma hücrelerinde siklooksijenazın temel ürünü olan PGE2'nin lokal düzeyleri, COX2 kaynaklı sentez ile PGE2'nin 15-hidroksiprostaglandin dehidrogenaz (15-PGDH) ilişkili yıkımı arasındaki lokal balans tarafından düzenlenir (136). Prostaglandin E2 için reseptörler (EP1-EP4), nosisepsiyon ve diğer nörolojik sinyallerin görüldüğü, hematopoezis, kan akımının düzenlenmesi, renal filtrasyon ve kan basıncı, mukozal bütünlüğün düzenlenmesi, vasküler geçirgenlik ve düz kas fonksiyonlarını kapsayan PGE2'nin fonksiyonlarının görüldüğü çoğu hücre tipinde

bulunur (138). Prostaglandin E₂'nin sentezi ve yıkımının düzenlenmesi şekil 2.17'de özetlenmiştir.



Şekil 2.17: Prostaglandin E₂'nin sentezi, yıkımının düzenlenmesi ve PGE₂'ye cevap. Prostaglandin E₂ sentezi, glukokortikoid steroidlere duyarlı fosfolipaz A₂ ile hücre membranından araşidonik asidin salımı ile başlatılır. Araşidonik asit, AA'den PGH₂'ye dönüştüren, nonsteroid antiinflamatuar ilaçlarla baskılanabilen siklooksijenaz 1 (COX1) ve COX2 için substrat haline gelir. PGE₂'nin temel baskılayıcı ve düzenleyici fonksiyonları cAMP/PKA/CREB sinyal yolları ile dört bilinen reseptör aracılığıyla olur.

Prostaglandin E₂ vücuttaki tüm hücre tiplerinde üretilebilir. İnflamasyona cevaptaki PGE₂'yi epitel, fibroblast ve infiltre eden inflamatuvar hücreler üretmektedir. Prostaglandin E₂ sentez süreci, hücre membranından AA mobilize eden fosfolipaz A₂, AA'yi PGH₂'ye dönüştüren siklooksijenaz (COX1 ve COX2) ve PGE₂'nin son hali için gerekli olan PGE sentazı içerir (139). Prostaglandin E₂, albümin ile yıkımı artmasına rağmen in vitro göreceli olarak stabildir. Buna karşıt olarak PGE₂, in vivo çok hızlı bir dönüşüme sahiptir ve dokudan ve dolaşımdan çok hızlı uzaklaştırılır. Dokuya özgün PGE₂ yıkım oranı 15-PGDH tarafından kontrol

edilir. Kanserin çoğu formlarında ve ultraviyole ile ışınlanmış deride olduğu gibi 15-PGDH aktivitesinin baskılanması, PGE2'den zengin ve immün supresif bir ortam oluşturur (138). Bu bulgular PGE2 sentezine ek olarak PGE2 yıkım oranı immün patolojilerde ve immün modülasyonda potansiyel bir hedef oluşturmaktadır.

Prostaglandin E2'nin heterojen etkileri EP1, EP2, EP3 ve EP4 olarak tanımlanmış dört farklı reseptörün varlığını göstermektedir. EP3 ve EP4 yüksek afiniteli reseptörleri ifade eder, bununla birlikte EP1 ve EP2 etkili sinyalizasyon için PGE2'nin yüksek konsantrasyonlarını gerektirir (140). PGE2'nin antiinflamatuvar ve supresif aktivitesinin baskın yönlerini aracılık ettiği EP2 ve EP4 yoluyla sinyalizasyon adenilat siklaz ile tetiklenen cAMP/PKA/CREB yolağı aracılık eder (Şekil 2.17) (138). Onların sözde benzer fonksiyonlarına rağmen, EP2 ve EP4 tarafından sinyalizasyon, PGE2'nin farklı konsantrasyonlarında ve farklı sürelerde tetiklenir. EP4 sinyalizasyonu PGE2 ile etkileştikten sonra kısa sürede duyarsızlaşır, oysa EP2 ligand uyarılmış duyarsızlaşmaya karşı dirençlidir ve inflamasyon anından sonra da uzun zaman periyodunca PGE2 fonksiyonlarını devam ettirir (141). EP2 cAMP bağımlı sinyalizasyon yolunu kullanırken, EP4 PI3K bağımlı ERK1/2 yolağını da aktiflemektedir. Düşük afiniteli EP1 ve yüksek afiniteli EP3 Gs-bağılı değildir ve cAMP aktive edici fonksiyonu yoktur. EP3'ün çoğu varyantları Gi-bağılı PGE2 reseptörü olup adenilat siklazı inhibe eder. EP1 ile sinyalizasyon kalsiyum salımını içerir (140).

2.10.1. PGE2 ve doğal immün hücrelerin aktivitesi

Prostaglandin E2, nötrofillerin, makrofajların ve mast hücrelerinin dokuya geçmesini uyarabilmesine rağmen farklı doğal efektör hücrelerin fonksiyonlarını farklı etkiler (138).

Doğal öldürücü hücreler (NK): Prostaglandin E2, IL-12, IL-15 ve genellikle IL-2'ye cevabını baskılayarak NK hücrelerinin sitolitik efektör fonksiyonlarını baskılar. Ayrıca NK hücrelerinin IFN- γ üretimini de baskılar ve dentritik hücre aracılı Th1 ve sitotoksik T lenfosit cevabının başlatılmasındaki NK hücrelerinin yardımcı fonksiyonunu ortadan kaldırır (142).

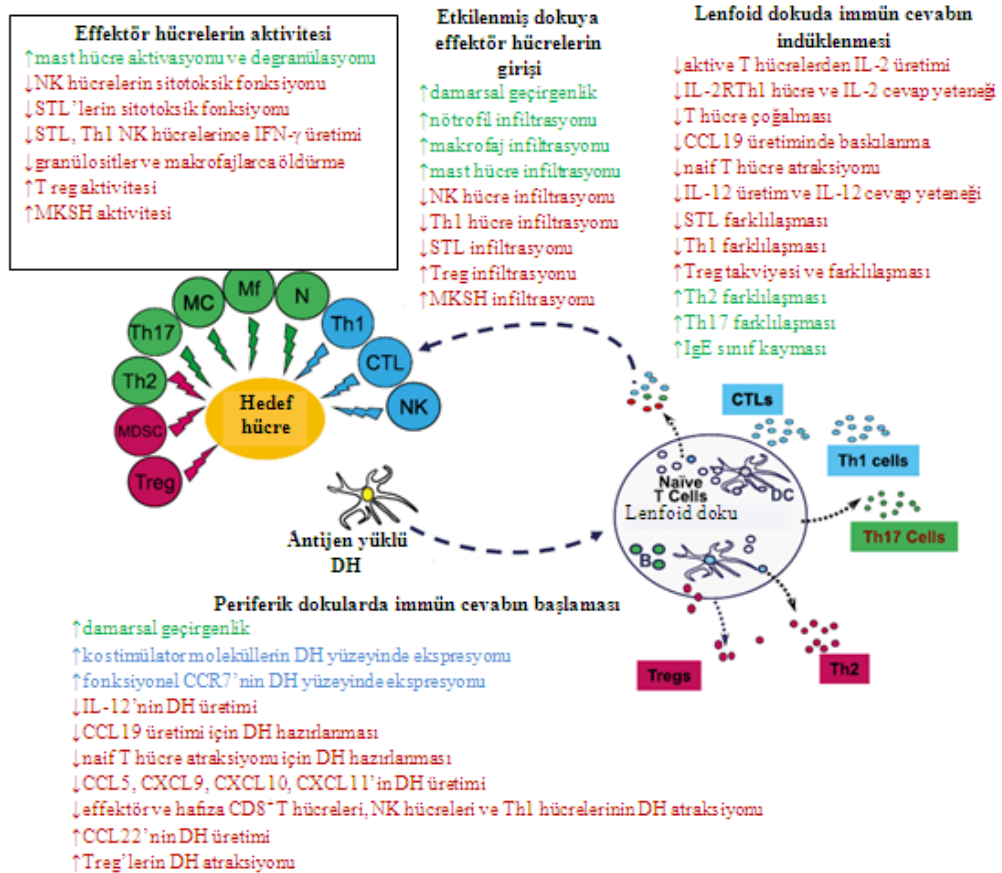
Granülositler: Prostaglandin E2'nin granülosit fonksiyonlarını inhibe etmektedir (138).

Makrofajlar: Prostaglandin E2, EP2-bağımlı ve PTEN-bağımlı etkisiyle alveolar makrofajların fagositoz ve onların öldürme fonksiyonlarını sınırlandırır (143).

Mast hücreleri: Prostaglandin E2, hem mast hücrelerinin indüksiyonuna hem de onların yerel atraksiyon ve granüllerinin bırakmasına EP1 ve EP3'ü içeren mekanizmayla destekler (144).

2.10.2. PGE2 ve antijene özgül immün cevapların indüksiyonu

Prostaglandin E2, immün yanıtların indüksiyonu ile ilgili birkaç önemli olayı etkiler. Naif T hücrelerinin işlenmesi sırasında dentritik hücre fonksiyonlarının çok boyutlu düzenlemesine ek olarak, T hücre IL-2 üretimini ve IL-2'ye cevap verme yeteneğini direkt olarak inhibe eder (Şekil 2.18) (138).



Şekil 2.18: PGE2 tarafından immün cevabın düzenlenmesi. PGE2 yerel akut inflamasyonu destekler (kaynak (138)'den yararlanılmıştır).

Dentritik hücreler: Prostaglandin E2 dentritik hücre farklılaşmasını erken dönemde engellemektedir. Buna karşın olgun dentritik hücrelerin aktivasyonunda daha karmaşık etkileri vardır. Prostaglandin E2, tam olgun dentritik hücrenin lenf noduna göç etme kapasitesini artırmakta ve naif T hücresinin işlenmesini desteklediği gösterilmiştir (145). Prostaglandin E2, dentritik hücreden IL-10, trombospondin-1 veIDO gibi çeşitli baskılayıcı faktörlerin üretimini arttırmaktadır (138).

T hücreler: Naif T hücrelerinin aktivasyonu ve çoğalması üzerine PGE2'nin baskılayıcı etkisi, IL-2 üretimi ve T hücrelerinin IL-2'ye cevabında aracılık eden IL-2 reseptörü ve JAK3'ün ekspresyonu üzerine olan direkt inhibitör etkisini içermektedir (146). Prostaglandin E2, yüksek dozlarda nonspesifik olarak T hücre aktivasyon ve proliferasyonunu baskılamaktadır. Prostaglandin E2'nin daha düşük konsantrasyonlarında CD4+ hücre paternini immünitenin inflamatuvar/sitotoksik formunu destekleyen saldırgan Th1 hücrelerini immünitenin orta düzeyde doku yıkıcı formunu aracılık eden Th2 ve Th17 hücrelerine doğru kaymasında düzenleyici etkisinin olduğu gösterilmiştir (138).

Prostaglandin E2 kaynaklı EP2 ve EP4 bağlı sinyaller, çoğu enfeksiyon ve otoimmünite modellerinde IL-17 üreten T hücrelerinin gelişimini desteklediği gösterilmiştir. Prostaglandin E2'nin Th17'yi artırıcı aktivitesi, Th17 inhibitörü olan IL-12p70 üretimini baskımlarken TH17'yi destekleyen IL-23 artırma yeteneği ile ilişkilidir (147).

Fare modellerinde, viral antijenler ve alloantijenlere karşı sitotoksik T lenfosit (STL) aktivitesinin PGE2 ve cAMP yükselmesine çok hassas olduğu gösterilmiştir. İlginç olarak, STL'ler, kendi baskılayıcı fonksiyonlarının kazanımı ile sonuçlanan PGE2 üretebilmektedirler (148).

B hücreler: PGE2'nin erken dönem B hücre aktivasyonunu etkilediği ve aktive B lenfositlerinde Ig sınıf değişikliğini düzenlediği bilinmektedir. Muhtemelen bu ilgi çekici etkisini de Ig E üretimini destekler niteliktedir (144).

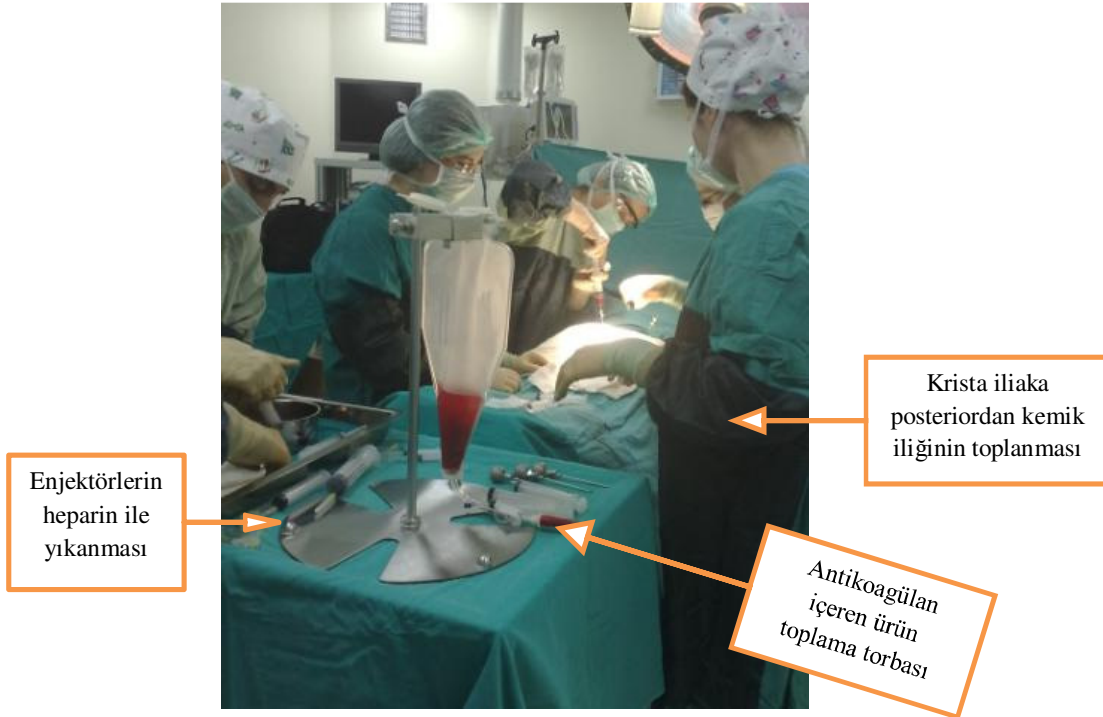
3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma grubunun seçilmesi

Bu çalışmaya, Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulu'nun 15.02.2012 tarih ve 001 numaralı kararı ile etik kurul onayı alındıktan sonra başlandı. Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kök Hücre Transplantasyon Ünitesindeki hastaların sağlıklı, gönüllü 8 adet G-CSF uygulanmış ve kontrol grubu olarak 8 adet G-CSF uygulanmamış kemik iliği donörleri bu çalışma kapsamına alındı.

3.1.1. Numunelerin toplanması

Donörden en fazla toplanabilecek kemik iliği volümü ile hesaplanan çekirdekli hücre sayısı alıcının ağırlığı başına 2×10^8 'in altında kalacağı öngörülen ve periferik kök hücre toplamaya uygun olmayan vericilere G-CSF (lenograstim, *Granocyte*®) $10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{doz}$ 3 gün, günde bir kez subkutan uygulandı. Üç gün G-CSF verilip, dördüncü gün ameliyathane koşullarında, genel anestezi altında, her iki posterior iliak krestten çoklu aspirasyon ile donörün ağırlığına göre (en fazla 16 cc/kg) yaklaşık 500-1000 ml kemik iliği toplandı (şekil 3.1).



Şekil 3.1: Ameliyathanede kemik iliği toplanması

Tahmini çekirdekli hücre: Toplama öncesi hesaplanan tahmini çekirdekli hücre sayısının yeterli olması beklenen donörlere herhangi bir ilaç verilmeksizin nakil günü aynı koşullarda kemik iliği toplandı. Alınan kemik ilikleri pıhtılaşmaması için 1/7 oranında asit sitrat dektröz (ACD) ile hazırlanmış kemik iliği toplama torbasına aktarıldı. Kemik iliği toplama işlemi sonlandırılmasına yakın kemik iliği örneğinden hücre sayımı yapılarak toplanması gereken kemik iliği hacmi hesaplandı. Belirlenen volümde kemik iliği toplandıktan sonra kemik iliği 850, 500 ve 200 µm'lik filtrelerden geçirilerek kemik iliği transfer torbasına aktarıldı. Kök hücre ürünü taşıma kabı içerisinde kemik iliği işleme laboratuvarına getirildi. Laminar akım kabini içinde üründen çekirdekli hücre, CD34⁺ hücre sayımı ve standart kültürler için örnekler alındı. Bu esnada toplanan kemik iliğinden 2-3 ml kadarı çalışma için ayrıldı (şekil 3.2).

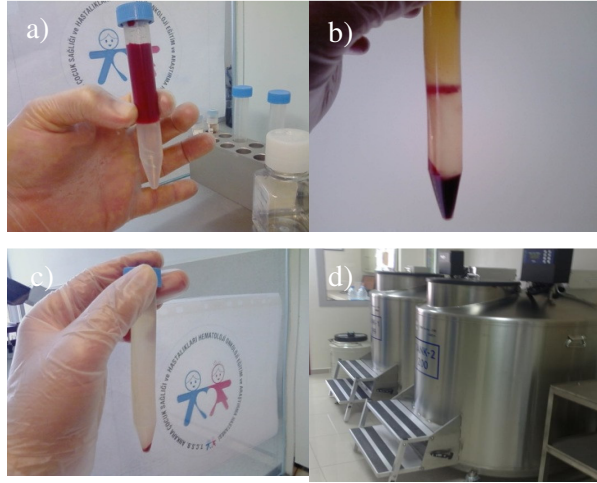


Şekil 3.2: Ürünün taşınması ve laminar akım kabini içinde örneklerin alınması.

3.1.2. Mononükleer hücrelerin ayrılması

İki ml kemik iliği 1:1 oranında PBS (Biochrom, Almanya) ile karıştırılarak 4 ml fikol (Biocoll, Biochrom, Almanya) üzerine yayılmıştır. Kemik iliği içerisindeki mononükleer hücreler (MNH) frensiz olarak 2200 rpm'de 20 dakika santrifüj (Eppendorf, Almanya) edilerek ayrılmıştır (resim 3.2). Santrifüj sonunda oluşan MNH tabakası toplanarak yeni bir tüpe aktarılmıştır. İçerisinde az sayıda olan MKH'leri de içeren tüm pellet homojenize edilerek 10 ml PBS ile sulandırılıp 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek yıkanmıştır. Altta kalan pelletin üzerine 5 ml PBS eklenerek sayım işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücre sayısı otomatik hücre sayım cihazında sayılıp, elde edilen ml'deki hücre sayısı total sayıyı hesaplamak için 5 (5ml

olduğu için) ile çarpılır. Elde edilen hücreler bir kez daha santrifüj edilip pellet haline gelen hücreler üzerine Dulbecco's Modified Eagle Medium low Glucose (DMEM-LG), %20 fetal bovine serum ve %10 Dimetil sülfoksit (DMSO) (OriGen, İşveç) içeren dondurma (freezing) solüsyonu eklenerek kriyoviallerde +4°de 1 saat, -20°de 4 saat, - 80°de 24 saat ve daha sonra -196° sıvı azot tanklarına alınmıştır (şekil 3.3).



Şekil 3.3: Mononükleer hücrelerin ayrışması ve dondurulması. a) Mononükleer hücre ayrışması için fikol eklenmesi, b) fikol eklenmiş örneğin santrifüj sonrası plazma, mononükleer hücre ve eritrositler olarak ayrışması, c) ayrılmış mononükleer hücreler, d) hücrelerin dondurulduğu - 196 °C sıvı azot tankları.

Örneklerin çözülmesi: Kriyovialler azot tankından alındıktan sonra +37 ° C su banyosunda çözülmüştür. Çözünen ürün yeni bir tüpe alınarak freezing solüsyonunu ortamdaki uzaklaştırmak için 5ml PBS eklenip 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Hücre pelleti üzerine kültür solüsyonu eklenerek doku kültür kabına (75 cm²'lik flask- T75) en az 20x10⁶ hücre olacak şekilde 10 ml büyüme besiyeri [DMEM-LG (Biochr flaszom, Almanya), %10 fetal bovine serum (Biochrom, Almanya), %1 antibiyotik (Penisilin-Streptomisin, Biochrom, Almanya)] ile birlikte aktarılmış ve 37°C, %5 CO₂'li inkübatörde (Galaxy 170R, Eppendorf Company, Almanya) kültüre edilmiştir (şekil 3.4).



Şekil 3.4: Mononükleer hücrelerin T75 doku kültür kabına ekilmesi ve 37°C %5 CO₂'li inkübatörde kültüre edilmesi.

3.1.3. Mezenkimal kök hücre izolasyonu ve hücre kültüründe çoğaltılması

Mononükleer hücrelerden MKH kültürüne geçiş: 75 cm²'lik flasklara (T75) ekilen mononükleer hücreler 24 saat sonunda gözlenmiştir. Kültür flaskı tabanına yapışan adeziv hücreler gözlendikten sonra her 3 günde bir kültür besi yeri değiştirilmiştir. Buradaki amaç adeziv olmayan hematopoetik hücrelerin ortamdaki uzaklaştırılmasıdır. Yaklaşık iki hafta içerisinde adeziv karakterdeki hücrelerin çoğalarak kültür kabını %70 oranında doldurması sağlanmıştır. Bu aşamada hücre kültür besiyeri (süpernatant/conditioned medium) ortamdaki alınarak 0,22 µm'lik filtreden geçirilip her örnekten iki ml'lik iki kriyovial dondurulmuş ve 80°C derin dondurucuda saklanmıştır. Hücre kültür ortamından besiyerinin uzaklaştırılmasından sonra ortama PBS eklenerek hücreler yıkanır. Ortamdaki PBS uzaklaştırılarak 4 ml %0,05 tripsin/EDTA (Biochrom, Almanya) konularak inkübatöre konularak 10 dk beklenir. Bu aşamada hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadıkları “inverted” mikroskopta kontrol edildikten sonra kalkmış olan tüm hücreler kültür flasklarından alınır, tripsini ortamdaki uzaklaştırmak amacıyla PBS ile yıkanır. Yıkanan hücreler sayım için örnek alınarak otomatik sayım cihazında (Beckman Coulter HmX-AL) sayılır.

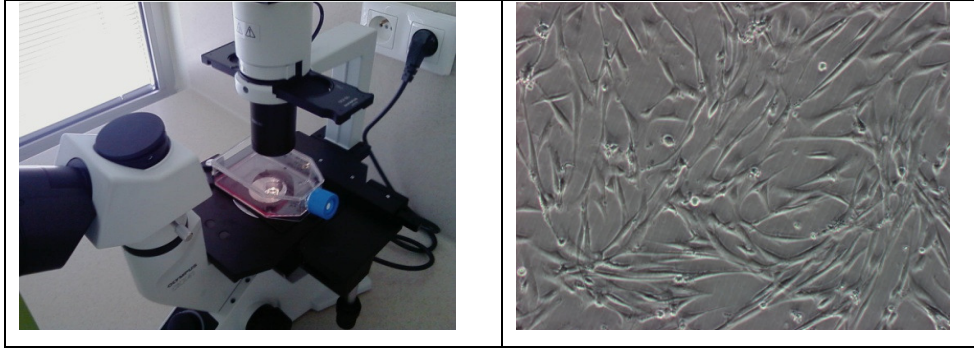
MKH kültüründe pasajlamalar: Hücre sayımının sonucuna göre bir T75 kültür flaskına 3x10⁵ hücre olacak şekilde (4000 hücre/ cm²) 10 ml hücre kültür besiyeri eklenerek ekilir ve 37°C, %5 CO₂'li inkübatöre yerleştirilir. Kalan hücreler üzerine DMEM-LG, %20 fetal bovine serum ve %10 DMSO (OriGen, İsveç) içeren dondurma (freezing) solüsyonu eklenerek kriyoviallerde +4°de 1 saat, -20°de 4 saat, -80°de 24 saat ve daha sonra -196° sıvı azot tanklarına alınmıştır. Aynı işlem pasaj 2 geçilirken tekrarlanmıştır. Pasaj 1 sonunda elde edilen hücrelerin bir kısmı MKH karakterizasyon çalışmasına, bir kısmı da DNA izolasyonu ve ELİSA testleri için 6 kuyucuklu kültür flasklarına ekildi.

3.1.4. İzole edilen MKH'lerin karakterizasyonu

Tüm karakterizasyon çalışmaları pasaj 2 MKH'ler ile yapılmıştır.

Morfolojik analiz

MKH'lerin karakterizasyonunda ilk adım hücrelerin plastik yüzeye yapışabilmeleri ve içsi-poligonal morfoloji göstermeleridir. Bu özelliklerinin saptanması inverted mikroskop kullanılarak yapılmıştır (şekil 3.5).



Şekil 3.5: Mezenkimal kök hücrelerin inverted mikroskopta içsi-poligonal yapılarının incelenmesi.

Farklılaşma testleri

Hücrelerin MKH olduğunun kanıtlanması için, en azından, adipojenik ve osteojenik farklılaşma kapasitesi olduğunun in-vitro ortamda gösterilmesi gerekmektedir. Bu nedenle MKH'ler adipojenik veya osteojenik yönde farklılaşmayı uyaran besiyeri ortamında tutularak 3 hafta sonra farklılaşma gösterip göstermedikleri yönünden değerlendirilmiştir.

Adipojenik Farklılaşma

İkinci pasajda olan hücreler 6 kuyucuklu kültür kaplarına 3×10^5 /kuyu olacak şekilde ekilerek çoğaltılmaya başlanmıştır. Haftada 2 kez besiyeri değiştirilerek hücrelerin %100 yoğunluğa ulaşması sağlanmıştır. Ardından tüm kuyucuklar 1 ml PBS ile yıkanmış ve adipojenik farklılaşması istenen hücreleri içeren kuyucuklara 2 ml adipojenik farklılaşma besiyeri (MesenCult® Adipogenic stimulatory supplements (Human), Stemcell, Kanada) eklenmiştir. Kontrol kuyucuklarına ise standart büyüme besiyeri eklenmiştir. Üç günde bir kültür ortamı tazelenmiştir.

Üç hafta sonunda tüm kuyucuklardan besiyerleri toplanmış ve PBS ile yıkama yapılmıştır. Yıkamanın ardından yağ hücresine farklılaşması beklenen hücreler 2 ml %10 formol (Sigma, ABD) ile 1 saat fikse edilmiştir. Fiksasyonun ardından formol uzaklaştırılıp, steril distile su ile yıkanmıştır. Ardından her bir kuyucuğa 2ml %60 izopronalol konularak 5 dakika bekletilmiştir. İzopronalolun uzaklaştırılmasından sonra her bir kuyucuğa 2ml Oil Red O boyası (Sigma, ABD) eklenerek 5 dakika oda ısısında beklenmiş ve ardından distile su ile 2 kere yıkama yapılmıştır. Her bir kuyucuğa 2 ml hematoksilen boyası eklenerek 1 dakika oda ısısında tutulmuş, çekirdek boyanması sağlanmıştır. Hematoksilen ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra her bir kuyucuğa ortamın kurumaması amacı ile 2 ml distile su eklenmiştir. Dijital görüntüleme sistemi (Olympus, Japonya) ile fotoğrafları çekilmiştir. Oil red boyası ile kırmızı renkte boyanma ve hücre içerisinde yağ damlacıkları görülmesi adiposit farklılaşmasının kanıtı olarak kabul edilmiştir.

Osteojenik Farklılaşma

Tripsinize edilmiş olan pasaj 2 MKH'ler 6 kuyucuklu kültür kaplarına toplam 3×10^5 hücre olacak şekilde ekilerek çoğaltılmış ve haftada 2 kez besiyeri değiştirilerek hücrelerin %80 yoğunluğa ulaşması sağlanmıştır. Ardından tüm kuyucuklar 1'er ml PBS ile yıkanmış ve kemik hücresine farklılaşması istenen hücreleri içeren kuyucuklara 2 ml osteojenik farklılaşma besiyeri (MesenCult® Osteogenic Stimulatory Kit, Stemcell, Kanada) eklenmiştir. Kontrol kuyucuklarına ise standart büyüme besiyeri eklenmiştir. 3 hafta sonunda tüm kuyucuklardan besiyerleri toplanmış ve 2 ml PBS ile yıkama yapılmıştır.

Farklılaşma analizi için 1 ml %4 paraformaldehit ile 30 dakika oda ısısında fikse edilen hücreler distile su ile yıkanarak paraformaldehit ortamdan uzaklaştırılmıştır. Her bir kuyucuğa 1 ml Alizarin Red boyası (Sigma, ABD) eklenerek 20 dakika oda ısısında bekletilmişlerdir. Ardından boya uzaklaştırılıp kuyucuklar 1 ml distile su ile yıkanmış ve dijital görüntüleme sistemi ile kuyucukların fotoğrafları çekilmiştir. Alizarin red boyası ile koyu renkte kalsiyum depozitleri görülmesi osteojenik farklılaşmanın kanıtı olarak kabul edilmiştir.

Akım Sitometri ile Hücre Yüzey Molekül Analizi

Hücrelerin Hazırlanması

Hücrelerin yüzey moleküllerinin analizi için pasaj 2 MKH'ler kullanılmıştır. T75 doku kültür kabında üretilen hücreler PBS ile yıkanmış ve ardından 2 ml tripsin-EDTA eklenerek 37°C'de 10 dakika bekletilmiş ve böylece hücrelerin yüzeyden ve birbirlerinden ayrılmaları sağlanmıştır. İnkübasyon bitiminde tripsinin etkisini durdurmak amacıyla kültür kabına serum içeren büyüme besiyeri eklenmiş ve hücreler tüpte toplanmıştır. Otomatik analizatör ile hücre sayımı yapılan hücreler FACS tüplerine, tüp başına 2×10^5 hücre olacak şekilde 2 ml PBS kullanılarak bölüştürülmüştür. 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılan tüplerdeki pellet homojenize edilmiştir.

Hücrelerin İşaretlenmesi

Homojenize edilen hücre pelleti üzerine 100 µl 'PBS-BSA-Na Azide' ile birlikte her birinden 5 µl olacak şekilde tablo 3.1'de yer alan ve farklı floresanlarla işaretlenmiş antikorlardan eklenmiştir.

Tüpler +4°C'de ve karanlıkta 30 dakika inkübe edilmiş; inkübasyon bitiminde 2 kez 'PBS-BSA-Na Azide' ile yıkama yapılan tüplere 200µl 'PBS-BSA-Na Azide' eklenerek FACS Aria (Beckon Dickinson Biosciences, ABD) cihazı ile okutulmaya geçilmiştir.

İşaretlenmiş Hücrelerin Yüzey Molekül Analizi

Analiz toplam 10000 olgu (event) okutularak Floresan aktive edilmiş hücre ayırıştırma (Fluorescence-activated cell sorting) (FACS) Aria cihazı ile yapılmıştır. Analiz için BD FACSDiva Software v6.1.2 yazılımı (Beckon Dickinson Biosciences, ABD) kullanılmıştır. Hücrelerin işaretlenmesinde kullanılan florokromlardan Fluorescein isothiocyanate (FITC) ve Fikoeritrin (Phycoerythrin, PE) 488 nm (mavi) dalga boyunda ölçülmüş; sırasıyla yeşil ve turuncu renk vermişlerdir.

Antikor	Özellik	Floresan	Marka, Ülke	Beklenen
HLA ABC (MHC sınıf I)	Tüm çekirdekli hücreler için belirteç	PE	BD, ABD	Pozitif
CD90 (Thy-1)	Mezenkimal kök hücre, nöron, fibroblast belirteci	PE	BD, ABD	Pozitif
CD73 (Ekto5'nükleotidaz)	Mezenkimal kök hücre, nöron, fibroblast, T ve B lenfosit belirteci	PE	BD, ABD	Pozitif

CD44	Mezenkimal kök hücre, endotel, fibroblast, tümör hücre belirteci	PE	e-bioscience, ABD	Pozitif
CD49e (İntegrin alfa-5)	Mezenkimal kök hücre, T ve B lenfosit belirteci	PE	BD, ABD	Pozitif
CD34	Hematopoetik kök hücre belirteci	FITC	BD, ABD	Negatif
CD4	T lenfosit belirteci	FITC	BD, ABD	Negatif
CD3	T lenfosit belirteci	FITC	BD, ABD	Negatif

Tablo 3.1: İnsan kemik iliğinden izole edilen mezenkimal hücrelerin yüzey molekül özelliklerinin belirlenmesi için kullanılan antikorlar

3.2. İmmün modulatör sitokinlerin ELİSA ölçümü

Mezenkimal kök hücreler pasaj 2 ye getirildikten sonra süpernatantları filtreden geçirilerek eppendorf tüplerine alındı. Süpernatantlar -80°C 'de dondurulmuş şekilde, çalışma gününe kadar saklandı. ELİSA testleri Fatih Üniversitesi Tıp Fakültesi Multidisipliner Laboratuvarında BioTek (USA) cihazı kullanılarak yapıldı. Mezenkimal kök hücre süpernatantında ölçülen ELİSA test sonuçlarının standart olması için 10×10^4 MKH başına düşen değerler olarak alınmıştır.

3.2.1. Hepatosit Büyüme Faktörünün ELİSA Ölçümü

Hepatosit Büyüme Faktörü düzeyleri, MKH kültür süpernatantları ve kemik iliği plazmaları çözüldükten sonra 8 saat içinde ölçüldü. Mezenkimal kök hücre süpernatantı ve kemik iliği plazmaları HGF düzeyleri, Human HGF R&D Systems ELISA kiti (Minneapolis, USA) ve BioTek (USA) cihazı kullanılarak üreticinin talimatlarına göre ölçüldü. Kullanım öncesi tüm kitler, MKH süpernatantı ve kemik iliği plazmaları örnekleri oda ısısına getirildi. Assay Diluent RD1W 150 μl ve 50 μl standart, süpernatant ve kemik iliği plazmaları kuyucuklara eklendikten sonra 2 saat oda ısısında inkube edildi. Solüsyon aspire edildikten sonra 400 μl Wash Buffer ile 4 kez yıkama yapıp 200 μl "HGF Conjugate" ile oda ısısında 1,75 saat oda ısısında inkubasyon yapıldı. Solüsyon aspire edildikten sonra 400 μl Wash Buffer 4 kez yıkama yapıp 200 μl "substrate solution" ile oda ısısında ve karanlıkta 30 dakika inkubasyon yapıldı. 50 μl "stop solution" eklendikten sonra 30 dakika içinde ölçümler 450 nm optik dansite kullanılarak yapıldı. HGF düzeyleri standart solüsyon kullanılarak çizilen bir kalibrasyon eğrisinden hesaplandı. Sonuçlar pg/ml olarak değerlendirildi. HGF konsantrasyonları her süpernatant ve kemik iliği plazma örneği

için en az iki kere ölçüldü ve daha sonra yapılan analizlerde, ölçülen değerlerin aritmetik ortalaması kullanıldı.

3.2.2. Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta 1 Ölçümü

Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta 1 düzeyleri süpernatantlar ve kemik iliği plazmaları çözüldükten sonra 8 saat içinde ölçüldü. Mezenkimal kök hücre süpernatantı ve kemik iliği plazmaları TGF- β 1 düzeyleri, Human TGF- β 1 R&D Systems ELISA kiti (Minneapolis, USA) ve BioTek (USA) cihazı kullanılarak üreticinin talimatlarına göre ölçüldü. Kullanım öncesi tüm kitler ve MKH süpernatantı ve kemik iliği plazmaları örnekleri oda ısısına getirildi. Latent TGF- β 1 aktive etmek için kitle yazan talimatlara göre 100 μ l MKH süpernatanta 20 μ l 1 N HCl eklenip oda ısısında 10 dakika inkübe edildi. Aktive edilmiş örnek 20 μ l 1,2 N NaOH/0,5 M HEPES ile nötralize edildi ve hızlıca ölçüme geçildi. Hücre kültür mediumunda bulunan bovine serumdaki latent TGF- β 1 düzeyini hesaplamak için aynı işlemler yapılarak düzey hesaplandı ve çıkan sonuçlardan bu düzey çıkartıldı. Standart eğri hesaplandıktan sonra 1,4 dilüsyon faktörü ile konsantrasyonlar hesaplandı. 40 μ l kemik iliği plazmasına 20 μ l 1 N HCl eklenip oda ısısında 10 dakika inkübe edildi. Aktive edilmiş örnek 20 μ l 1,2 N NaOH/0,5 M HEPES ile nötralize edildi. Aktive edilmiş örnekten 10 μ l alınıp 190 μ l Kalibratör Diluent ile dilüe edildi ve hızlıca ölçüme geçildi. Standart eğri hesaplandıktan sonra 40 dilüsyon faktörü ile konsantrasyonlar hesaplandı. 50 μ l Assay Diluent RD1-21 ve 50 μ l aktive edilmiş süpernatantlar, 50 μ l Assay Diluent RD 1-73 ve 50 μ l aktive edilmiş kemik iliği plazmaları kuyucuklara eklendikten sonra 2 saat oda ısısında inkübe edildi. Solüsyon aspire edildikten sonra 400 μ l Wash Buffer ile 4 kez yıkama yapıp 100 μ l "TGF- β 1 Conjugate" ile oda ısısında 2 saat oda ısısında inkubasyon yapıldı. Solüsyon aspire edildikten sonra 400 μ l Wash Buffer 4 kez yıkama yapıp 100 μ l "substrate solution" ile oda ısısında ve karanlıkta 30 dakika inkubasyon yapıldı. 100 μ l "stop solution" eklendikten sonra 30 dakika içinde ölçümler 450 nm optik dansite kullanılarak yapıldı. TGF- β 1 düzeyleri standart solüsyon kullanılarak çizilen bir kalibrasyon eğrisinden hesaplandı. Sonuçlar pg/ml olarak değerlendirildi. TGF- β 1 konsantrasyonları her süpernatant ve kemik iliği plazma örneği için en az iki kere ölçüldü ve daha sonra yapılan analizlerde, ölçülen değerlerin aritmetik ortalaması kullanıldı.

3.2.3. Prostaglandin E2 ölçümü

Prostaglandin E2 düzeyleri MKH süpernatantları ve kemik iliği plazmaları çözüldükten sonra 8 saat içinde ölçüldü. Mezenkimal kök hücre süpernatantı ve kemik iliği plazmaları PGE2 düzeyleri, Human PGE2 R&D Systems ELISA kiti (Minneapolis, USA) ve BioTek (USA) cihazı kullanılarak üreticinin talimatlarına göre ölçüldü. Kullanım öncesi tüm kitler, MKH süpernatantı ve kemik iliği plazmaları örnekleri oda ısısına getirildi. Örneklerden 150 µl alınarak 300 µl Calibrator Diluent RD5-56 ile 3 kat dilüe edildi. Standart eğri hesaplandıktan sonra 3 dilüsyon faktörü ile konsantrasyonlar hesaplandı. Calibrator Diluent RD5-56' dan 200 µl non-spesifik bağlayıcı kuyucuğa, 150 µl de sıfır standarda ve kalan kuyucuklara 150 µl standart, MKH süpernatantı ve kemik iliği plazmaları eklendi. Non-spesifik bağlayıcı kuyucuk dışındaki wellere 50 µl Primer Antikor solüsyonu eklendikten sonra 500 rpm 'horizontal orbital microplate shaker' üzerinde 1 saat oda ısısında inkube edildi. Tüm kuyucuklara 50 µl "PGE2 Congutate" ile oda ısısında 2 saat oda ısısında sallayıcı üzerinde inkubasyon yapıldı. Solüsyon aspire edildikten sonra 400 µl Wash Buffer 4 kez yıkama yapıp 200 µl "substrate solution" ile oda ısısında ve karanlıkta 30 dakika inkubasyon yapıldı. 100 µl "stop solution" eklendikten sonra 30 dakika içinde ölçümler 450 nm optik dansite kullanılarak yapıldı. PGE2 düzeyleri standart solüsyon kullanılarak çizilen bir kalibrasyon eğrisinden hesaplandı. Sonuçlar pg/ml olarak değerlendirildi. HGF konsantrasyonları her süpernatant ve kemik iliği plazma örneği için en az iki kere ölçüldü ve daha sonra yapılan analizlerde, ölçülen değerlerin aritmetik ortalaması kullanıldı.



Şekil 3.6: ELİSA testlerinin okunduğu BioTek ELx808 cihazı ve testlerinin yapılması

3.3. İstatiksel Analiz

İstatistiksel analizler, SPSS 16,0 istatistik programı (SPSS Inc, Chicago, USA) ile yapıldı. Sürekli numerik değişkenlerin dağılımının normal olup olmadığı Kolmogorov-Smirnov testi ile belirlendi. Normal dağılıma uymayan analitin iki grupta karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi kullanıldı. İstatistiksel analizler için $p < 0.05$ değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Çalışma gruplarının özellikleri

Bu çalışmaya kemik iliği nakli amacıyla G-CSF verilerek kemik iliği toplanan 8 donör, kontrol grubu olarak kemik iliği nakli amacıyla G-CSF verilmeden kemik iliği toplanan 8 donör dahil edildi. Donörlerin tanımlayıcı özellikleri tablo 4.1’de özetlenmiştir.

	Yaş		Cinsiyet	
	Ortanca	Min-mak	Erkek	Kız
G-CSF(+)	9,0	3,5-17	5	3
G-CSF(-)	9,5	4,5-17	4	4

Tablo 4.1: Donörlerin tanımlayıcı özellikleri.

4.2. İnsan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu, Üretilmesi ve Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular

4.2.1. İnsan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu Ve Çoğaltılması

Mezenkimal kök hücreler birçok dokunun yanısıra kemik iliğinde hematopoetik kök hücrelerle birlikte bulunmaktadır. Kemik iliğinde yer alan 100.000 çekirdekli hücreye karşın yaklaşık 1 MKH olduğu bildirilmektedir (149). Bu nedenle bölüm 3.1.3’de detaylı anlatıldığı gibi in-vitro hücre kültür ortamında çoğaltılarak kültür ortamına salgıladıkları sitokinler çalışılabilir. Çalışmamızda da kültür ortamına bırakılan hücreler tek tek kültür kabına yapışmışlardır. Yapışan ve koloni formunda çoğalan fibroblast morfolojisindeki hücrelerin stromal kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden zengin olduğu; buna karşın yapışma göstermeyen hücrelerin ağırlıklı olarak hematopoetik hücreler olduğu bilindiğinden dolayı yapışmayan, besiyerinde yüzen hematopoetik hücreler üç günde bir besiyeri tazelenerek elimine edilmiştir.

Doku kültür kabına yapışan hücrelerin 14 gün sonunda %80 oranında kültür kabının yüzeyini kapladığı gözlenmiştir. Tripsin enzimi uygulayarak yüzeyden ve birbirlerinden ayrılmaları sağlanan hücreler toplanmış ve bir kısmı daha sonraki

çalışmalar için dondurularak -196 derecede sıvı azot içerisinde saklanmıştır. Kalan hücreler ise tekrar kültür edilmiştir. Hücrelerin pasajlanma işlemi 2 kez uygulanarak MKH'lerin sayıca çoğalması ve daha homojen hücre popülasyonu elde edilmesi sağlanmıştır.

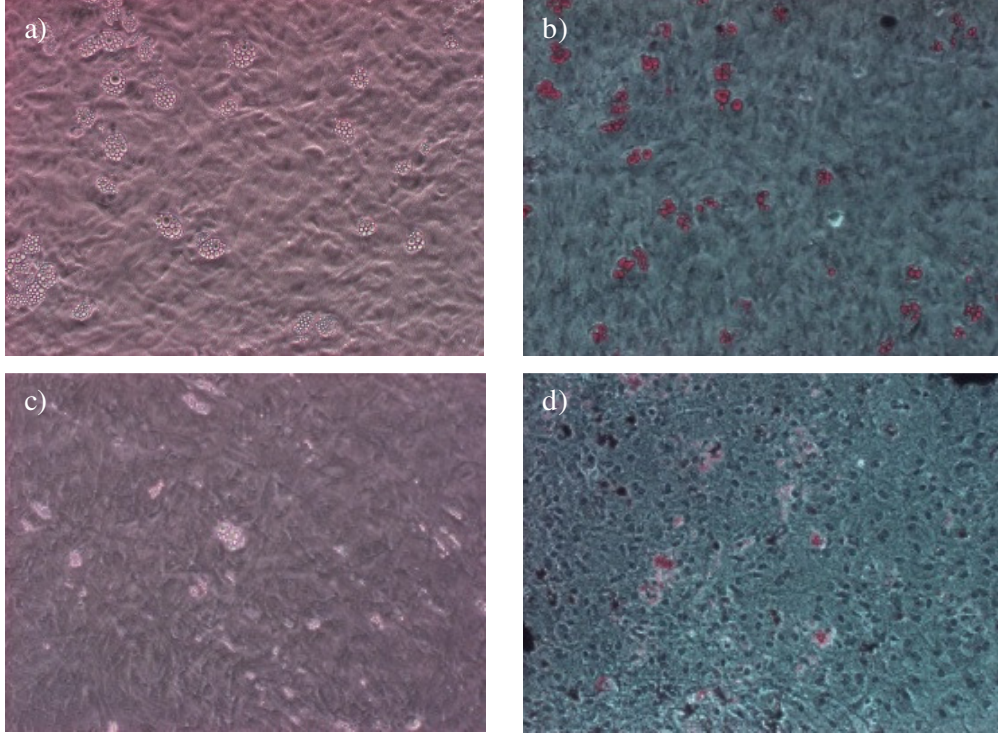
4.2.2. İnsan Kemik İliğinden İzole Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

İzole edilen ve çoğaltılan hücrelerin MKH olduğunu kanıtlamak amacıyla karakterize edilmeleri gerekmektedir. Bu amaçla Uluslararası Hücresel Tedavi Derneğinin (ISCT/The International Society for Cellular Therapy) MKH'lerin karakterizasyonu için belirlediği kriterler kullanılmıştır (8). Bu tanımlamaya göre hücrelerin adeziv (yapışan) yapıda olması, stromaya özgü yüzey belirteçlerine sahip olması, hematopoetik hücrelere özgü belirteçleri taşıması ve adipojenik ve osteojenik olmak üzere en az iki hücre serisine multipotent farklılaşma özelliği göstermeleri ile MKH olarak adlandırılabilirler.

Kemik iliğinden izole edilen mononükleer hücrelerinin kültürü sonucunda doku kültür kabının tabanına hücreler yapışmış ve çoğaltılarak pasajlama yapılmıştır. Böylece bu hücrelerin MKH olması için ilk koşul olan plastik yüzeylere yapışabilme özellikleri sağlanmıştır.

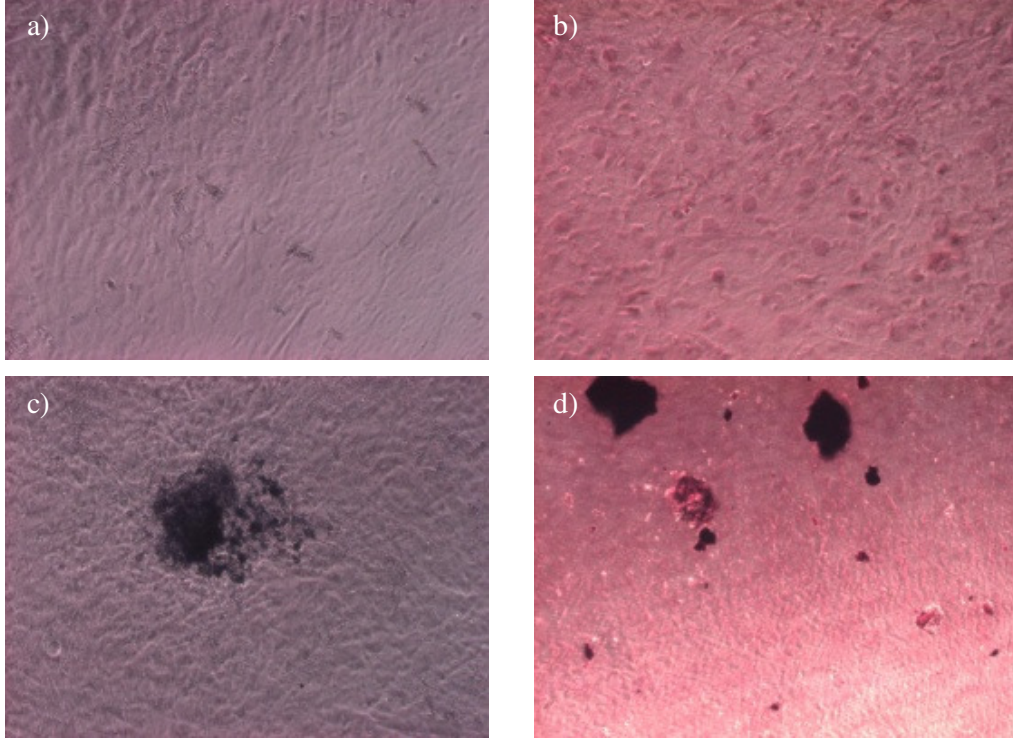
Mezenkimal kök hücreler mezodermal germ tabakasına ait hücrelere farklılaşma özelliğine sahip hücrelerdir. Çalışmamızda, hücrelerin MKH karakterizasyonunda sıklıkla kullanılan adipojenik ve osteojenik farklılaşma kapasiteleri analiz edilmiştir. Bu amaçla 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekilen ve çoğaltılan 2. pasajdaki hücrelerin adipojenik ve osteojenik farklılaşmaları morfolojik olarak analiz edilmiştir.

Adipojenik farklılaşma besiyerinde G-CSF ile uyarılan ve uyarılmayan kemik iliği kaynaklı MKH'leri morfolojik olarak benzer şekilde yağ hücrelerine farklılaştığı görülmüştür. Farklılaşma besiyeri yerine büyüme besiyeri ile devam edilen ve aynı yöntem ile boyanan kontrol hücrelerinin mikroskopik incelemesinde ise yağ hücresi saptanmamıştır (Şekil 4.1).



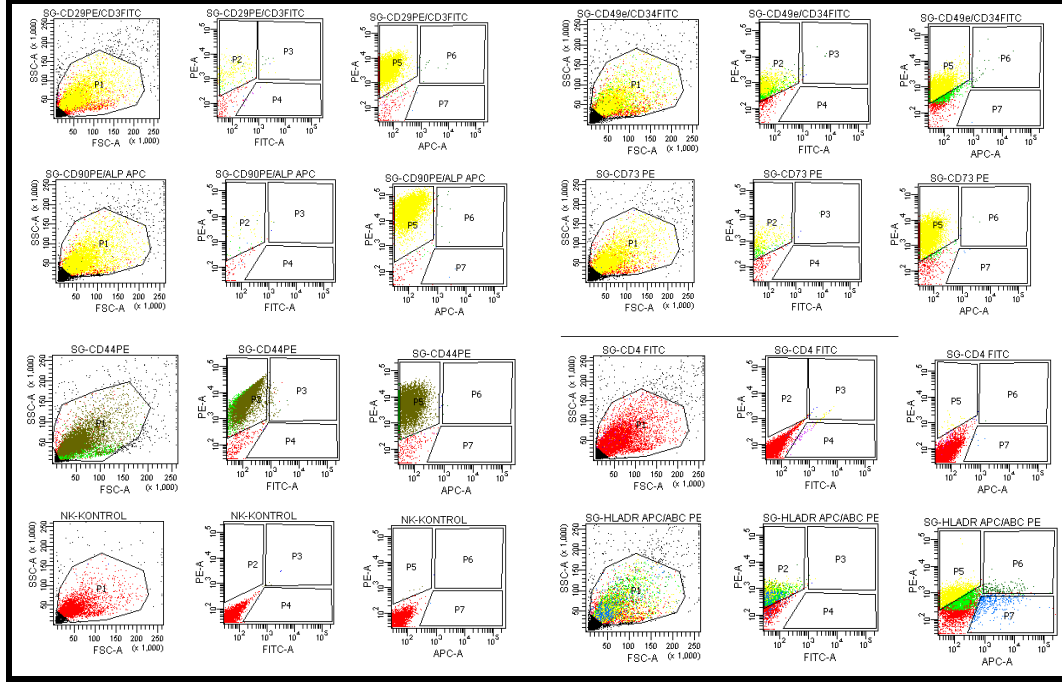
Şekil 4.1: Adipojenik farklılaşma deneyine ait mikroskop görüntüleri. Granülosit koloni uyarıcı faktör ile uyarılmış kemik iliğinden üretilen MKH'lerin yağ hücre morfolojisine sahip hücreler (4x) (a, c) ve Oil Red O boyası ile boyanmış yağ vezikülleri (4x) (b, d) .

Kemik hücrelerine farklılaşması istenen hücreler 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekildikten ve kültür kabının yüzeyini tamamen kaplamaları sağladıktan sonra osteojenik farklılaşma besiyeri eklenmiştir. Yirmibir gün sonunda morfolojik analiz elde etmek amacıyla kemik hücrelerine farklılaşması beklenen hücreleri içeren kuyucuklar ve büyüme besiyeri ile devam ettirilen kontrol hücreleri içeren kuyucuklar Alizarin Red boyası ile boyanmıştır. Boyamadan önce ve sonra inverted mikroskop görüntüleme sistemi ile fotoğrafları çekilerek farklılaşması beklenen hücreler ile kontrol hücreleri arasındaki fark gözlenmiştir. Mikroskop ile yapılan morfolojik gözlem sonucunda kemik hücrelerine farklılaşan hücreler (Şekil 4.2. a, c) ve kalsiyum birikintilerinin Alizarin Red boyası ile boyandığı gözlenmiştir (Şekil 4.2. b, d).



Şekil 4.2: Osteojenik farklılaşma deneyine ait mikroskop görüntüleri. Kemik hücre farklılaşması kalsiyum birikimi ile gösterilmiştir (4x) (a, c), Alizarin Red boyası ile boyanmış kalsiyum birikintileri (4x) (b,d).

Uluslararası hücresel tedavi derneğinin (ISCT) belirlediği kriterlere göre MKH'ler yüzey molekülü olarak CD105, CD90, CD73 gibi stromaya özgü molekülleri eksprese ederken; hematopoetik kök hücre yüzey molekülleri olan CD45, CD34, CD14 eksprese etmemelidir. Bu amaçla yaptığımız çalışmada bu yüzey moleküllerini içeren bir panel hazırlanmıştır (tablo 3.1). Akım sitometri çalışmasının sonucunda kemik iliğinden izole edilip hücre kültürün çoğaltılan hücrelerin CD44, CD90, CD73, CD49e, HLA ABC yüzey moleküllerini %90'nın üzerinde eksprese ettiği; CD34, CD3 ve CD4 gibi hematopoetik yüzey moleküllerini % 5'in altında eksprese etmediği saptanmıştır (şekil 4.3). Böylece analiz edilen hücrelerin yüzey molekül özelliklerinin MKH özelliğinde olduğu belirlenmiştir.

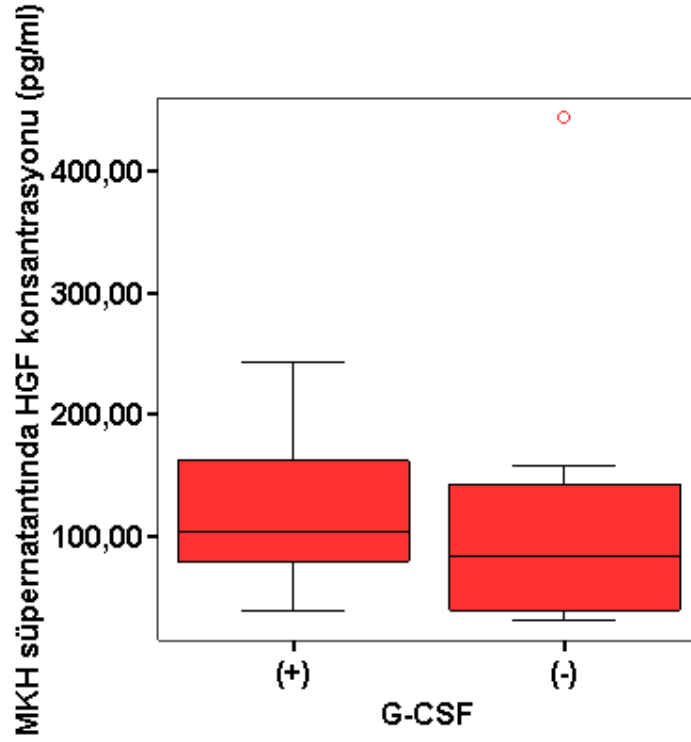


Şekil 4.3: Akım sitometri ile hücre yüzey moleküllerinin işaretlenmesi.

Sonuç olarak MKH karakterizasyonu çalışması kapsamında yapılan morfolojik analiz, farklılaşma ve yüzey molekül özellik analizlerinden elde edilen veriler ile Uluslararası Hücresel Tedavi Derneğinin (ISCT) belirlediği MKH karakterizasyon kriterlerinin sağlandığı; insan kemik iliğinden elde edilen hücrelerin MKH olduğu belirlenmiştir.

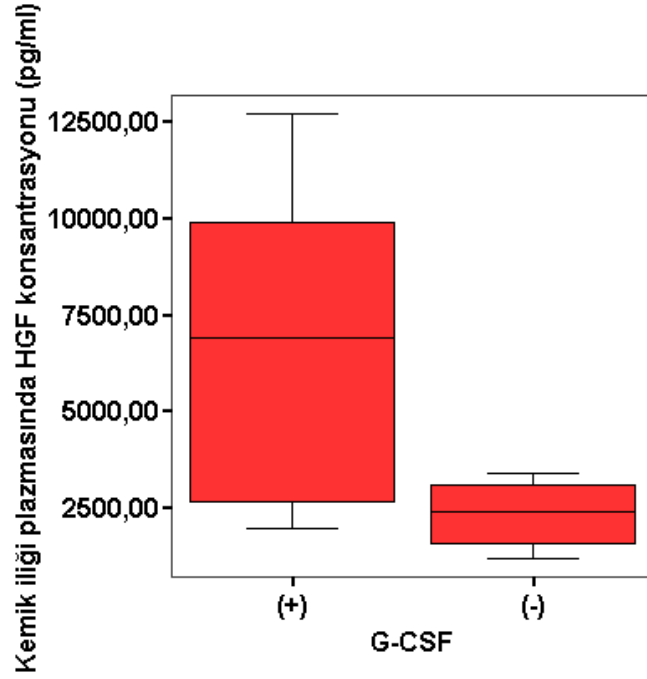
4.3. Hepatosit büyüme faktörü konsantrasyonları

Granülosit koloni uyarıcı faktör ile uyarılmış kemik iliğinden izole edilen 8 olgunun MKH süpernatanlarında 100.000 hücreden salınan HGF konsantrasyonu $121,60 \pm 68$ pg/mL (ortalama, standart sapma) olarak ölçüldü. Kontrol grubu olan G-CSF ile uyarılmamış kemik iliğinden izole edilen 8 olgunun MKH süpernatanlarında 100.000 hücreden salınan HGF konsantrasyonu $125,91 \pm 135$ pg/mL (ortalama, standart sapma) olarak ölçüldü. İki grup arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$).



Şekil 4.4: Granülosit koloni uyarıcı faktör ile uyarılmış ve uyarılmamış kemik iliğinden izole edilen MKH süpernatantlarında HGF konsantrasyonları.

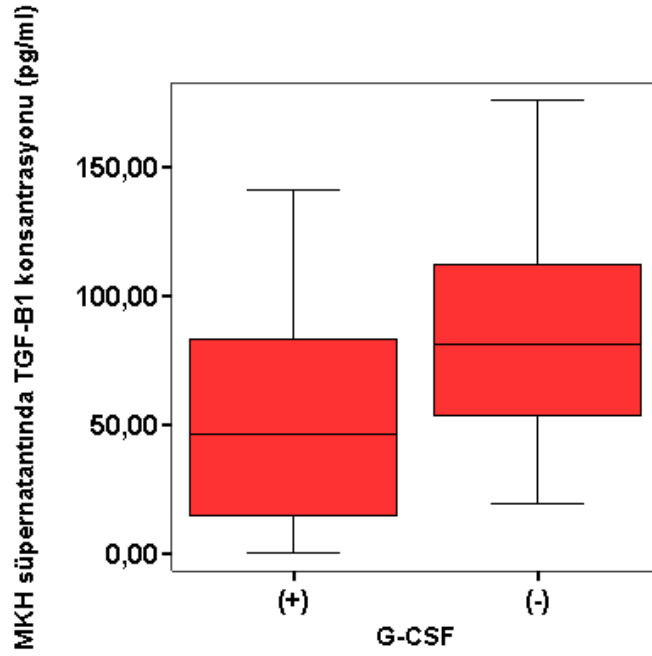
Granülosit koloni uyarıcı faktör ile uyarılmış kemik iliğinden izole edilen 8 olgunun kemik iliği plazmalarından ölçülen HGF konsantrasyonu $6699,92 \pm 4125,69$ pg/mL (ortalama, standart sapma) olarak ölçüldü. Kontrol grubu olan G-CSF ile uyarılmamış kemik iliğinden izole edilen 8 olgunun kemik iliği plazmalarından ölçülen HGF konsantrasyonu $2340,56 \pm 843,97$ pg/mL (ortalama, standart sapma) olarak ölçüldü. İki grup arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,05$).



Şekil 4.5: Granülosit koloni uyarıcı faktör ile uyarılmış ve uyarılmamış kemik iliği plazmasındaki HGF konsantrasyonları.

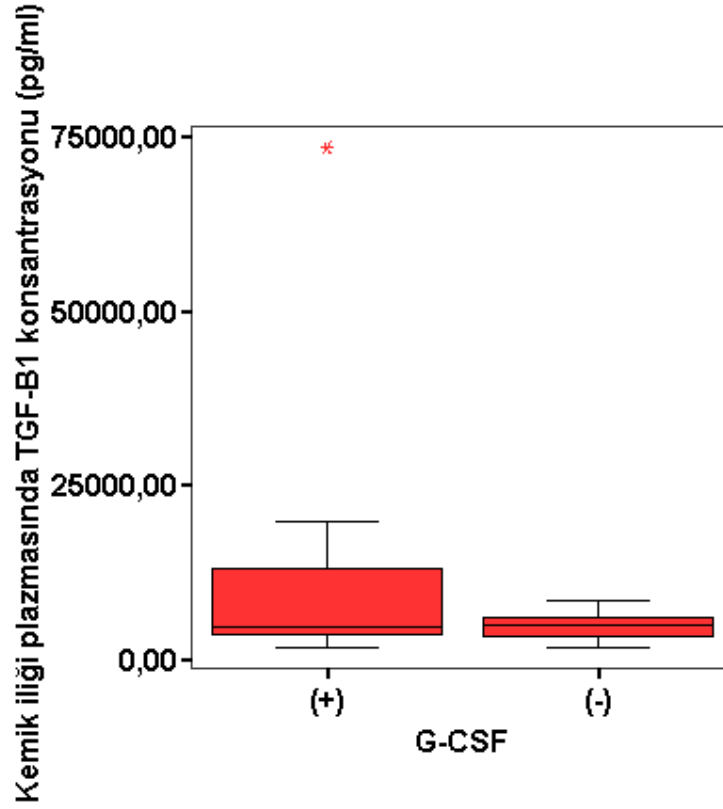
4.4. Transforme edici büyüme faktörü beta konsantrasyonları

Granülosit koloni uyarıcı faktör ile uyarılmış kemik iliğinden izole edilen 8 olgunun MKH süpernatantlarında 100.000 hücreden salınan TGF- β 1 konsantrasyonu $53,98 \pm 47,48$ pg/mL (ortalama, standart sapma) olarak ölçüldü. Kontrol grubu olan G-CSF ile uyarılmamış kemik iliğinden izole edilen 8 olgunun MKH süpernatantlarında 100.000 hücreden salınan TGF- β 1 konsantrasyonu $86,30 \pm 49,39$ pg/mL (ortalama, standart sapma) olarak ölçüldü. İki grup arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0,05$).



Şekil 4.6: Granülosit koloni uyarıcı faktör ile uyarılmış ve uyarılmamış kemik iliğinden izole edilen MKH süpernatantlarında TGF-β1 konsantrasyonları.

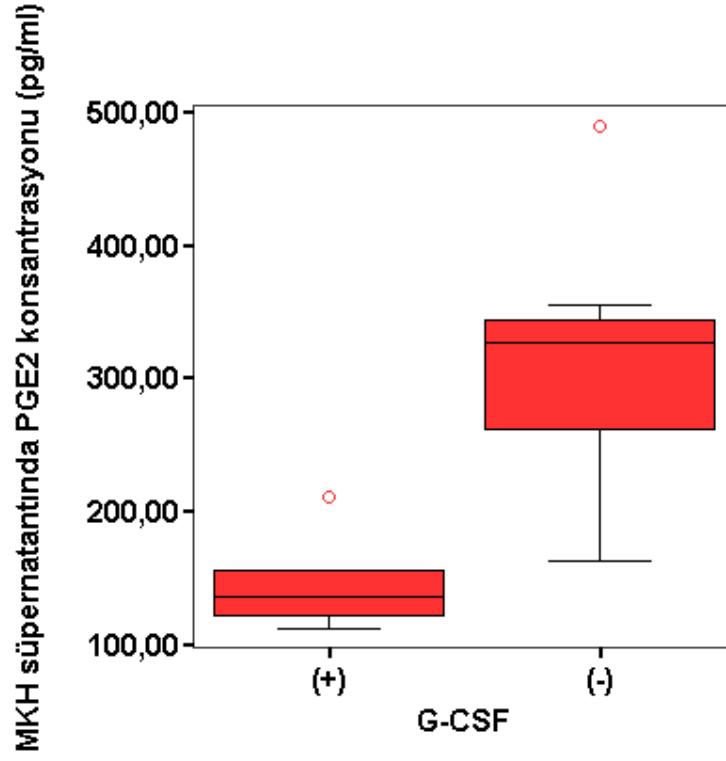
Granülosit koloni uyarıcı faktör ile uyarılmış kemik iliğinden izole edilen 8 olgunun kemik iliği plazmalarından ölçülen TGF-β1 konsantrasyonu $14757 \pm 24415,12$ pg/mL (ortalama, standart sapma) olarak ölçüldü. Kontrol grubu olan G-CSF ile uyarılmamış kemik iliğinden izole edilen 8 olgunun kemik iliği plazmalarından ölçülen TGF-β1 konsantrasyonu $4956,93 \pm 2158,45$ pg/mL (ortalama, standart sapma) olarak ölçüldü. İki grup arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0,05$).



Şekil 4.7: Granülosit koloni uyarıcı faktör ile uyarılmış ve uyarılmamış kemik iliği plazmasındaki TGF-β1 konsantrasyonları.

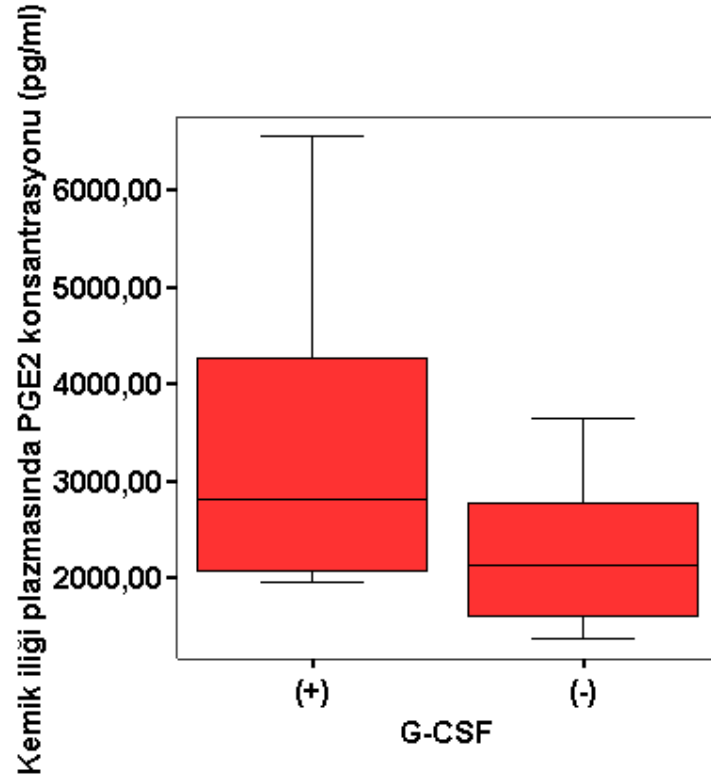
4.5. Prostaglandin E2 konsantrasyonları

Granülosit koloni uyarıcı faktör ile uyarılmış kemik iliğinden izole edilen 8 olgunun MKH süpernatantlarında 100.000 hücreden salınan PGE2 konsantrasyonu $143,19 \pm 31,69$ pg/mL (ortalama, standart sapma) olarak ölçüldü. Kontrol grubu olan G-CSF ile uyarılmamış kemik iliğinden izole edilen 8 olgunun MKH süpernatantlarında 100.000 hücreden salınan PGE2 konsantrasyonu $314,66 \pm 97,18$ pg/mL (ortalama, standart sapma) olarak ölçüldü. İki grup arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,05$).



Şekil 4.8: Granülosit koloni uyarıcı faktör ile uyarılmış ve uyarılmamış kemik iliğinden izole edilen MKH süpernatantlarında PGE2 konsantrasyonları.

Granülosit koloni uyarıcı faktör ile uyarılmış kemik iliğinden izole edilen 8 olgunun kemik iliği plazmalarından ölçülen PGE2 konsantrasyonu $3350,06 \pm 1654,91$ pg/mL (ortalama, standart sapma) olarak ölçüldü. Kontrol grubu olan G-CSF ile uyarılmamış kemik iliğinden izole edilen 8 olgunun kemik iliği plazmalarından ölçülen PGE2 konsantrasyonu $2254,68 \pm 794,15$ pg/mL (ortalama, standart sapma) olarak ölçüldü. İki grup arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0,05$).



Şekil 4.9: Granülosit koloni uyarıcı faktör ile uyarılmış ve uyarılmamış kemik iliği plazmasındaki PGE2 konsantrasyonları.

5. TARTIŞMA

Granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) hematopoezi ve doğal immün sistemi düzenleyici temel hematopoetik büyüme faktörüdür. Hematopoetik sistem üzerindeki G-CSF'nin temel etkileri; normal hematopoetik kök hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasını indüklemesi, radyoterapi ya da kemoterapiye bağlı myelosupresyon sonrasında nötrofillerin yeniden yapılanmasını artırması, matür nötrofillerin efektör fonksiyonlarının aktivasyonu ve kemik iliği kök hücrelerinin periferik kana geçmelerini sağlamasıdır (35, 36). Bu etkileri nedeni ile klinikte ışın tedavisi ve kemoterapi sonrası hastalara ve periferik kök hücre naklinden önce donörlere uygulanmaktadır. Periferik kök hücre toplamaya uygun olmayan ve kemik iliğinden hasta için yeterli kadar CD34+ hücre toplanamayacağı öngörülen vericilere de toplanan kemik iliği ürünü içerisindeki kök/projenitör hücre miktarını artırmak için kemik iliği toplanmadan önce G-CSF verilmektedir. Bu uygulama ile kök hücrelerin vericinin kemik iliği nişlerinden çıkması, bir kısmının vasküler niş bölgesinde projenitör hücrelere dönüşmesi sağlanmaktadır. Böylelikle toplanan kemik iliği ürünüde kök hücre ve projenitör hücre konsantrasyonları artmaktadır. Bununla birlikte G-CSF'nin immün sistem üzerinde de çeşitli etkileri olduğu düşünüldüğünde G-CSF verildikten sonra toplanan kemik iliği ile nakil yapılmış hastalarda standart uygulamaya göre (G-CSF verilmeden toplanan kemik iliği) immün cevapta değişiklikler olması beklenebilir (2, 17, 35, 49). Periferik kan kök hücre nakli amacıyla donörlere verilen G-CSF'nin Th-1-Th-2 shift yapma etkisiyle hastada akut ve kronik GVHH oluşum insidansını etkilediği düşünülmektedir (aGVHH riskini artırmayıp kGVHH riskinde artışa yol açarak). Granülosit koloni uyarıcı faktör uygulanarak yapılan KİT'de ise G-CSF etkisiyle verici kemik iliğinde olan değişikliklerin hastanın immün sistemi üzerine olası etkileri araştırılmamıştır.

Çalışmamızda hasta sayısının kısıtlı olması, hasta tanılarının ve kullanılan hazırlık rejimlerinin heterojen olması nedeniyle 2 grup arasında transplant sonrası immünolojik etkiler (GVHH insidansı, immün rekonstitüsyon vb) yönünden bir kıyaslama yapılamamıştır. Buna karşın literatürde ilk kez, G-CSF uygulanan sağlıklı kişilerin kemik iliği mikroçevresinde oluşan immünmodulator değişikliklere ait ön veriler elde edilmiştir.

Bu amaçla, kemik iliği mikroçevresinin bir yansıması olarak kemik iliği plazmalarında; ayrıca mikroçevrenin önemli elemanlarından ve stromal hücreler olan MKH supernatanlarında immünmodulasyonda rolü olduğu bilinen sitokin/solubl faktör düzeylerine bakılmış; ayrıca G-CSF uygulamasının MKH'lerin biyolojik özelliklerine etkisi incelenmiştir. Mezenkimal kök hücre süpernatnlarında yapılan analizler hücre kültür ortamında pasajlanarak çoğaltılmış hücrelerin sekretuar fonksiyonunu göstermekte olup hücre-hücre, hücre-matriks, hücre-solubl faktör ilişkilerini içermediğinden tam olarak in-vivo durumu yansıtmamaktadır. Buna karşın kemik iliği plazma örneklerindeki ölçümler, laboratuvar ortamında modifiye edilmeden direkt olarak yapıldığı için G-CSF uygulanan vericinin kemik iliği mikroçevresinde oluşan tüm hücre-matriks-faktör interaksyonlarının sonucunu yansıtmaktadır. Bu etkileşimler sonucu kemik iliği mikroçevresinde bulunan her bir hücre tipinden solubl faktörler salınabilmektedir. Bu konuda MKH'ler en başta gelen hücreler arasında sayılabilir. Bu çalışmada hücre kültür ortamında MKH supernatanlarında saptanan bazı faktörlerin de in-vivo ortamda oluşan dinamik etkileşimler sonucu salınımlarında değişiklikler olabileceği akılda tutulmalıdır.

Mezenkimal kök hücreler (MKH) kemik, kıkırdak, tendon, ligament, kemik iliği stroması, adiposit, kas, dermis ve bağ dokusuna farklılaşabilen multipotent progenitör hücrelerdir (3). Temel olarak bağ dokusu içeren tüm dokularda MKH bulunmakla birlikte, MKH kaynağı olarak en iyi tanımlanmış doku kemik iliğidir. Kemik iliği kaynaklı MKH'leri hematopoetik hücreler için gerekli birçok büyüme faktörü ve immün sistemde etkili olan sitokinleri salgılar, ayrıca diğer kök hücreler ile ortak olan bazı gen ekspresyonları yanında konnektif dokuya özgün moleküller ve adezyon moleküllerini eksprese ederler (62). Literatürde immün modulator etkilerini hücreler arası etkileşim ve esas olarak salgıladıkları TGF- β 1, HGF, PGE2,IDO ve HLA-G5 gibi faktörler ile gösterdiği bildirilmiştir (11, 64, 71, 72). Bu immünmodulator/immünsupresif özellikleri nedeniyle MKH'ler klinik kullanım açısından başta steroidlere cevapsız aGVHD olmak üzere inflamatuvar ve otoimmün hastalıklarda ilgi uyandırmaktadır.

İmmün sistemi etkileyen G-CSF'nin MKH üzerine etkisi ve salgıladıkları immün modulator sitokinlerdeki değişimi bilinmemektedir. Granülosit koloni uyarıcı faktör etkileri esas olarak kemik iliği ve hematopoetik sistem üzerinedir. Bu

nedenle G-CSF ile uyarılmış kemik iliğinden izole edilen MKH'lerde özellikle de salgıladıkları immün modulator sitokinlerde değişiklikler olacağı düşünülerek bu çalışma planlanmıştır.

Bu amaçla, HKHT amacıyla sağlıklı vericilere G-CSF verilerek elde edilen kemik iliklerinden üretilen MKH'leri incelenmiş, G-CSF verilmeden toplanan kemik iliğinden üretilen kontrol MKH'ler ile karşılaştırılmıştır. Hücre kültürleri aynı zamanda, aynı deneyimli kişi ve aynı koşullarda yapıldığı için benzer standartlarda üretilmiş, tüm çalışmalarda lot numaraları aynı olan besiyeri, fetal buzağı serumu kullanılmıştır. Tüm kemik iliği örneklerinden MKH üretilebilmiş; kültürde çoğalma özellikleri, hücrelerin morfolojik, immünofenotipik analizleri ve adiposit ve osteoblastlara farklılaşma kapasitesinde G-CSF'ye maruz kalmış MKH'ler ile kontrol örnekler arasında bir farklılık saptanmamıştır.

Kemik iliği mikroçevresini yansıtacağı düşünülerek kemik iliği plazmasında immün modulator TGF- β 1, HGF ve PGE2 sitokinleri incelenmiş, ayrıca MKH'lerin katkısını ortaya koymak açısından MKH kültür süpernatantları da kullanılmıştır.

Son 30 yıl içinde keşfedilip, aminoasit sekansı ve DNA'sı belirlenen HGF'nin başta plasenta olmak üzere, sinir dokusu, böbrek, karaciğer, akciğer, GİS, kas dokusu, dişler, kemik ve kıkırdak dokusu, meme bezleri, hematopoetik doku ve tükürük bezlerinde fonksiyon gördüğü bildirilmiştir. Bu faktörün organ gelişimi, antiapoptotik, antifibrotik, antiinflamatuvar ve antiangiogenetik etkileri olduğu gösterilmiştir (100-124). Literatürde yapılmış çalışmalarda yaş ve cinsiyete göre serum HGF konsantrasyonlarında değişiklik olduğu gösterilmiştir. On-ondokuz yaş arasındaki HGF konsantrasyonu kızlarda 360 ± 160 pg/ml, erkeklerde 350 ± 250 pg/ml olarak bildirilmiştir (105). Kemik iliği mikroçevresini gösterdiği düşüncesi ile incelediğimiz Kİ plazmasında ise G-CSF verilen grupta ortalama 6700 ± 4125 pg/ml, ortanca 6910 (1950 - 12722) pg/ml; G-CSF verilmeyen grupta ise ortalama 2340 ± 843 pg/ml, ortanca 2409 (1164 - 3412) pg/ml olarak saptanmıştır. Bu değerler literatürde bildirilen serum değerlerine göre çok yüksektir ve HGF'nin kemik iliği mikroçevresinden salgılandığına ve önemli fonksiyonlarına işaret etmektedir. Çalışmamızda, G-CSF verilen ve verilmeyenlerde kemik iliği plazma HGF değerleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,027$). Bu sonuç, kemik iliğinde

G-CSF ile HGF konsantrasyonunda bir artış olduğunu göstermektedir. Kemik iliği mikroçevresinde HGF kaynağı, MKH'ler de dahil olmak üzere diğer hücreler de olabilir. Bu nedenle çalışmamızda, MKH süpernatantlarında da HGF düzeyleri incelenmiştir. Granülosit koloni uyarıcı faktör ile uyarılmış kemik iliğinden elde edilenlerde ortalama 121 ± 68 pg/ml, ortanca 103 (38 - 243) pg/ml bulunurken; G-CSF ile uyarılmamış olanlarda 125 ± 135 pg/ml, ortanca 84 (31 - 443) pg/ml olarak saptanmıştır. İki grup arasında istatistiksel anlamlı bir fark saptanmasa da ($p=0,24$) bu değerler MKH'lerden HGF salınımının olduğunu göstermektedir. Granülosit koloni uyarıcı faktör uygulanmış kemik iliğinden kültür ortamında geliştirilen MKH'lerin HGF salınımında kontrol değerlere göre bir farklılık saptanmamıştır. Kemik iliği plazmalarında G-CSF uyarısı ile HGF değerlerinde belirgin artış olurken MKH süpernatantlarında bir fark saptanmaması, in- vivo ortamda hücre-hücre, hücre-matriks, hücre-diğer solubl faktör etkileşimlerinin sonucu MKH'lerin in-vitro ortamda olandan farklı bir ekspresyon profili gösterebileceğini; ayrıca kemik iliğinde yer alan diğer hücre tiplerinden de salınacağını düşündürmektedir. Ayrıca, MKH'lerin kültürde çoğaltılma aşamasında geçen süre içerisinde fonksiyonel özelliklerinde değişiklikler olması da beklenir. Çalışmamızda, bu nedenle nispeten erken pasaj 2 süpernatantları kullanılmıştır. Ancak yine de geçen süre içerisinde G-CSF'nin etkisinin ortadan kaybolmuş olabileceği düşünülmüştür. Mezenkimal kök hücrelerin ortamdaki aldığı uyarılar (IFN- γ , IL-1 β gibi) ile immün supresif faktör salınımı artmaktadır. Hücre kültür ortamında MKH'lerin in-vivo ortamda olduğu gibi diğer hücrelerle temasta olmaması nedeniyle bu uyarılardan yoksun olması sonucu sekretuar fonksiyonlarında değişiklik olduğu düşünülmüştür. İlerleyen çalışmalarda, sitokinler ile uyarıda bulunularak ve hematopoetik hücreler ile ko-kültür yapılarak deneyler tekrarlanabilir. Literatürde, HGF'nin hem in-vivo hem de in-vitro olarak dentritik hücrelerin antijen sunma fonksiyonlarını baskıladığı, hem oksijenaz-1 indüksiyonu ile IL-10 üretimini artırıp IL-6 üretimini azaltarak antiinflamatuvar etki gösterdiği bildirilmiştir (112-114). Çalışmalara antiinflamatuvar ve inflamatuvar diğer sitokinlerinde eklenmesi, hatta sitokin array analizleri gibi daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Transforme edici büyüme faktörü, hücre çoğalması, farklılaşması, apoptozis, adezyon, çeşitli hücre tiplerinin migrasyonu ve ekstrasellüler matriks proteinlerinin

üretimini düzenler. İmmatür hematopoetik hücreler, aktive T ve B hücreleri, makrofajlar, nötrofiller ve dentritik hücreler gibi çoğu hücre tipleri TGF- β üretir ve/veya etkilerine duyarlıdır (128, 129). Kulkarni ve arkadaşlarının, TGF- β 1 knockout farelerle yaptıkları deneyde elde edilen bilgilerle TGF- β 'nın immün hücre homeostazisinin idame ettirilmesinde çok önemli bir rol oynadığını göstermişlerdir (130). İn vitro çalışmalar TGF- β 'nın B ve T hücrelerinin tüm evrelerinde etkilediğini göstermektedir. Tipik olarak, TGF- β , B ve T hücre proliferasyonunu inhibe ederek ve apoptozisi uyararak immün supresif bir molekül gibi rol oynamaktadır (128). Son zamanlarda, TGF- β 1'in aktive T hücrelerin ölümünü destekleyerek inflamasyonu baskıladığı ve apoptotik T hücrelerden ortaya çıkan TGF- β ile immün supresif bir çevre oluşturduğu saptanmıştır (134, 135). Di Nicola ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, MKH'lerin indüklediği T hücre proliferasyonunun etkisi TGF- β 1 ve HGF antikoru eklendiğinde ortadan kalktığı görülmüştür (64). Literatürde çeşitli çalışmalarda MKH'lerin immün supresif etkilerinde salgıladığı TGF- β 1'in de etkili olduğu gösterilmiştir (64, 68, 71, 72). Bizim çalışmamızda da kemik iliği MKH'lerinden TGF- β 1 salınımı olduğu görüldü. Granülosit koloni uyarıcı faktör ile uyarılmış Kİ'den üretilen MKH süpernatantlarında TGF- β 1 konsantrasyonu ortalama 54 ± 47 pg/ml, ortanca 46,5 (0,5 - 141) pg/ml iken; G-CSF ile uyarılmamış Kİ'den elde edilen de ise 86 ± 49 pg/ml, ortanca 81 (19 - 175) pg/ml olarak saptandı. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,41$). Bu çalışmada G-CSF ile uyarılmış kemik iliğinden kültür ortamında geliştirilen MKH'lerin kontrol örneklerine göre TGF- β 1 salınımında değişikliğe yol açmadığı görülmüştür. Burada yine, hücre kültür ortamı ve dinamik hücre - hücre etkileşimlerinin olmamasının hücrelerin sekreter özelliklerini değiştirdiği akla gelmektedir. Kemik iliğindeki dinamik etkileşimleri daha iyi yansıtacağı düşüncesi ile incelediğimiz Kİ plazmasında G-CSF verilen grupta TGF- β 1 konsantrasyonu ortalama 14757 ± 24415 pg/ml, ortanca 4638 (1703 - 73540) pg/ml; G-CSF verilmeyen grupta ise ortalama 4956 ± 2158 pg/ml, ortanca 5026 (1845 - 8634) pg/ml olarak saptanmıştır. Bu iki grup arasında istatistiksel farklılık saptanmamıştır ($p=1,00$). Ancak olgu bazında G-CSF alan donörün kemik iliği plazmasında aşırı derecede yüksek (73540 pg/ml) TGF- β 1 saptanırken MKH süpernatantında diğerlerine göre düşük miktarda (6 pg/ml) TGF- β 1 saptanmıştır. Mezenkimal kök hücreler kemik iliği mikroçevresinde

diğer hücrelerle etkileşim halindedir. Makrofaj, NK, hasarlı dokulardan gelen uyarılarla MKH'lerden TGF- β 1 üretimi artmaktadır (61). İmmatür hematopoetik hücreler, aktive T ve B hücreleri, makrofaj ve dentritik hücreler gibi çoğu hücre tipleri TGF- β 1 ürettiği gösterilmiştir (127, 128). Kemik iliği plazmalarında belirgin yüksek konsantrasyonda TGF- β 1 saptanmasına rağmen süpernatantlarda düşük oranlarda saptanmıştır. Kültür ortamında mikroçevre koşulları olmaması ve uyarı yapılmaması nedeni ile düşük saptanmış olabileceği düşünülmüştür. Aynı zamanda G-CSF alan kişilerde bireysel farklılıklar nedeni ile uç değerler saptanmıştır. Daha fazla olgu sayısı ile birlikte, uyarılar ile daha kapsamlı çalışmalar ihtiyaç vardır.

Prostaglandinler, siklooksijenaz tarafından arasıdonik asitten ve az bir kısmı izoprostan yolağında prostaglandin sentaz tarafından üretilen küçük moleküllerdir (136). Prostaglandin E2 vücuttaki tüm hücre tiplerinde üretilebilir. İnflamasyona cevaptaki PGE2'yi epitel, fibroblast ve infiltre eden inflamatuvar hücreler üretmektedir. Prostaglandin E2, albümin ile yıkımı artmasına rağmen in vitro göreceli olarak stabildir. Buna karşıt olarak PGE2, in vivo çok hızlı bir dönüşüme sahiptir ve dokudan ve dolaşımdan çok hızlı uzaklaştırılır (138). Prostaglandin E2'nin heterojen etkileri EP1, EP2, EP3 ve EP4 olarak tanımlanmış dört farklı reseptörün varlığını göstermektedir. PGE2'nin antiinflamatuvar ve supresif aktivitesinin baskın yönlerini aracılık ettiği EP2 ve EP4 yoluyla ve PGE2'nin farklı konsantrasyonlarında ve farklı sürelerde tetiklenir (141). T hücrelerinin MKH'lerle ko-kültürü PGE2 düzeylerinde artışla sonuçlanmakta ve PGE2 üretim inhibitörleri ile tedavi edildiğinde MKH aracılı immün modülasyon azalmaktadır (72). Spaggiari ve arkadaşları MKH'lerin monosit kaynaklı dentritik hücrelerin özellikle PGE2 aracılığı ile matürasyon ve fonksiyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir (84). Bizim çalışmamızda, G-CSF ile uyarılmış Kİ'den üretilen MKH süpernatantlarında PGE2 konsantrasyonu ortalama 143 ± 31 pg/ml, ortanca 135 (112 - 211) pg/ml; G-CSF ile uyarılmamış Kİ'den elde edilen de ise 314 ± 94 pg/ml, ortanca 326 (162 - 489) pg/ml olarak saptandı. Bu da mezenkimal kök hücrelerden PGE2 salınımının olduğunu göstermektedir. Granülosit koloni uyarıcı faktör uygulanmış donörlerin kemik iliğinden elde edilen MKH'lerinin PGE2 salınımında kontrole göre belirgin düşüklük saptanmıştır ve iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$). Kemik iliği mikroçevresini gösterdiği düşüncesi ile incelediğimiz Kİ

plazmasında G-CSF verilen grupta PGE2 konsantrasyonu ortalama 3350 ± 1654 pg/ml, ortanca 2803 (1950 - 6558) pg/ml; G-CSF verilmeyen grupta ise ortalama 2254 ± 794 pg/ml, ortanca 2128 (1377 - 3657) pg/ml olarak saptanmıştır. Bu iki grup arasında istatistiksel farklılık saptanmamıştır ($p=0,11$). Granülosit koloni uyarıcı faktörün kemik iliğinde PGE2 düzeylerinde değişikliğe yol açmazken MKH süpernatantlarında belirgin azalmaya yol açmıştır. Ancak bunun hücreler üzerinde hangi reseptörlere etkilediği ve sonucunun nasıl olduğu konusunda daha ayrıntılı çalışmalara gereksinim vardır.

Bu çalışmada dikkati çeken bir konu da, G-CSF verilen donörlerin kemik iliği plazmalarında sağlıklı donörler arasında görülen bireysel farklılıkların çok geniş bir dağılım göstermesidir. Granülosit koloni uyarıcı faktör sonrası 8 farklı vericinin kemik iliği plazması incelendiğinde HGF, TGF- β 1 ve PGE2 konsantrasyonlarında bireysel büyük farklılıklar gözlenmiş ve bu farklılığın G-CSF'ye yanıtta bireysel faktörlere bağlı olduğu düşünülmüştür. Bu durum, klinikte G-CSF uygulanan donörlerde lökosit sayılarındaki değişken artışlar ve sürelerin çok farklı olması ile birleştirildiğinde, G-CSF uygulamasının sağlıklı kişilerde kemik iliği üzerine etkilerinde multifaktörlerin rolü olduğunu, genetik polimorfizmlere bağlı bireysel farklılıkların mobilizasyon ve diğer biyolojik fonksiyonlar üzerinde önemli farklar gösterebileceğini düşündürmüştür. Mezenkimal kök hücre süpernatantlarında ise dağılımda bu kadar farklılık saptanmamış olması; kültür ortamında, MKH'lerin temin edildiği bireye ait özelliklerin giderek azaldığına, hücrelerin diğer etkileşimlerden uzak olarak tek başlarına kültürde giderek benzer özellikler kazandığına işaret etmektedir.

Özetle, G-CSF uygulanmış sağlıklı vericilerin kemik iliği plazmaları ve kemik iliklerinden elde edilerek hücre kültüründe çoğaltılmış MKH'lerinin incelenmesi sonucunda G-CSF'nin kemik iliği mikroçevresinden immünmodulator sitokin / büyüme faktörlerinin salınımını etkilediği gözlenmiş; bunlardan HGF ve PGE2 düzeylerinde istatistiksel anlamlı değişiklikler olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, kemik iliği kökenli MKH'lerin HGF, TGF- β 1 ve PGE2 gibi faktörleri salgıladığı görülmüş ve bu durumun bu hücrelerin immünmodulator rollerine işaret ettiği düşünülmüştür. Bununla birlikte kültür ortamında, donöre verilen G-CSF'nin etkisinin büyük ölçüde kaybolması ve hücre-hücre, hücre-matriks ilişkilerinin

olmaması nedeniyle in-vivo ortamı daha iyi yansıtmak için ko-kültür deneyleri, sitokin array analizleri ve solubl faktörlerle uyarılmış kapsamlı ileri çalışmaların yapılmasının yararlı olacağı kanısına varılmıştır. İnsanlardan elde edilen kemik iliği örneklerinde literatürde ilk kez incelenen G-CSF etkisinin çalışıldığı ve bir ön çalışma şeklinde planlanan bu çalışmamızda elde edilen sonuçların kapsamlı çalışmaların planlanmasına ışık tutacağı düşünülmüştür.

6. SONUÇLAR

Çalışmada elde ettiğimiz sonuçlara göre G-CSF verilen ve verilmeyen kemik iliği kaynaklı MKH'ler plastik yüzeye yapışabilen iğsi fenotipte olması, osteosit ve adipojenik hücre morfolojilerine farklılaşabilmeleri, immün fenotiplendirmede belirlenen MKH yüzey belirteçlerini sahip olmaları ve hematopoetik yüzey belirteci içermemeleri nedeniyle MKH olarak tanımlanabilmek için gerekli kriterlerin hepsine sahip idi. Bu sonuçlar doğrultusunda G-CSF verilen kemik iliklerinden de MKH üretilmektedir.

Mezenkimal kök hücre süpernatantlarında immün süpresif/immün modulator özellikleri olan HGF, PGE2 ve TGF- β 1 saptanmıştır. Bu da MKH'lerin kültür ortamına bu sitokinleri salgıladıklarını göstermektedir.

Granülosit koloni uyarıcı faktör verilmiş kemik iliğinden elde edilen MKH süpernatantlarından PGE2 düzeyinde kontrol gruba göre istatistiksel anlamlı bir düşüklük saptanmış ve G-CSF'nin kemik iliği kaynaklı MKH'ler üzerinde immünmodulator etkisine işaret etmiştir. Hepatosit büyüme faktörü ve TGF- β 1 düzeylerinde kontrol grubu ile arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Kemik iliği mikroçevresinin yansıması olarak kemik iliği plazmalarına, G-CSF alan veya almayan bireylerin hepsinde HGF, PGE2 ve TGF- β 1 salınımı olduğu gözlenmiş; bilhassa G-CSF verilen bireyler arasında HGF, PGE2 ve TGF- β 1 düzeylerinde bireysel farklılıkların çok yüksek olduğu gözlenmiştir. Kemik iliği plazmalarında HGF düzeyi G-CSF alan donörlerde istatistiksel anlamlı derecede yüksek bulunmuş ve G-CSF'nin kemik iliği mikroçevresinden potent immünsüpresif etkili HGF salınımını artırdığı saptanmıştır. Prostaglandin E2 ve TGF- β 1'in kemik iliği plazma düzeyleri G-CSF alanlarla almayanlar arasında istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Tyndall A, Uccelli A. Multipotent mesenchymal stromal cells for autoimmune diseases: teaching new dogs old tricks. *Bone marrow transplantation*. 2009;43(11):821-8.
2. Rossetti M, Gregori S, Roncarolo MG. Granulocyte-colony stimulating factor drives the in vitro differentiation of human dendritic cells that induce anergy in naive T cells. *European journal of immunology*. 2010;40(11):3097-106.
3. Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*. 1992;13(1):81-8.
4. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968;6(2):230-47.
5. Tondreau T, Meuleman N, Delforge A, Dejeneffe M, Leroy R, Massy M, et al. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem Cells*. 2005;23(8):1105-12.
6. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*. 2001;7(2):211-28.
7. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*. 2001;98(8):2396-402.
8. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
9. Jones BJ, McTaggart SJ. Immunosuppression by mesenchymal stromal cells: from culture to clinic. *Experimental hematology*. 2008;36(6):733-41.

10. Zhao S, Wehner R, Bornhauser M, Wassmuth R, Bachmann M, Schmitz M. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells and their therapeutic consequences for immune-mediated disorders. *Stem cells and development*. 2010;19(5):607-14.
11. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Daubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*. 2004;103(12):4619-21.
12. Demetri GD, Griffin JD. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood*. 1991;78(11):2791-808.
13. Liongue C, Wright C, Russell AP, Ward AC. Granulocyte colony-stimulating factor receptor: stimulating granulopoiesis and much more. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2009;41(12):2372-5.
14. Sloand EM, Kim S, Maciejewski JP, Van Rhee F, Chaudhuri A, Barrett J, et al. Pharmacologic doses of granulocyte colony-stimulating factor affect cytokine production by lymphocytes in vitro and in vivo. *Blood*. 2000;95(7):2269-74.
15. Franzke A, Piao W, Lauber J, Gatzlaff P, Konecke C, Hansen W, et al. G-CSF as immune regulator in T cells expressing the G-CSF receptor: implications for transplantation and autoimmune diseases. *Blood*. 2003;102(2):734-9.
16. Morikawa K, Morikawa S, Nakamura M, Miyawaki T. Characterization of granulocyte colony-stimulating factor receptor expressed on human lymphocytes. *British journal of haematology*. 2002;118(1):296-304.
17. Rutella S. Granulocyte colony-stimulating factor for the induction of T-cell tolerance. *Transplantation*. 2007;84(1 Suppl):S26-30.
18. Hartung T, Docke WD, Gantner F, Krieger G, Sauer A, Stevens P, et al. Effect of granulocyte colony-stimulating factor treatment on ex vivo blood cytokine response in human volunteers. *Blood*. 1995;85(9):2482-9.
19. Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science*. 2000;287(5457):1442-6.

20. Vescovi A, Gritti A, Cossu G, Galli R. Neural stem cells: plasticity and their transdifferentiation potential. *Cells, tissues, organs*. 2002;171(1):64-76.
21. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282(5391):1145-7.
22. Durand C, Dzierzak E. Embryonic beginnings of adult hematopoietic stem cells. *Haematologica*. 2005;90(1):100-8.
23. Sigvardsson M. New light on the biology and developmental potential of haematopoietic stem cells and progenitor cells. *Journal of internal medicine*. 2009;266(4):311-24.
24. Kaushansky K. Lineage-specific hematopoietic growth factors. *The New England journal of medicine*. 2006;354(19):2034-45.
25. Martinez-Agosto JA, Mikkola HK, Hartenstein V, Banerjee U. The hematopoietic stem cell and its niche: a comparative view. *Genes & development*. 2007;21(23):3044-60.
26. Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(5):1195-201.
27. Li Z, Li L. Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments. *Trends in biochemical sciences*. 2006;31(10):589-95.
28. Shiozawa Y, Havens AM, Pienta KJ, Taichman RS. The bone marrow niche: habitat to hematopoietic and mesenchymal stem cells, and unwitting host to molecular parasites. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK*. 2008;22(5):941-50.
29. Nervi B, Link DC, DiPersio JF. Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization. *Journal of cellular biochemistry*. 2006;99(3):690-705.
30. Shizuru JA, Negrin RS, Weissman IL. Hematopoietic stem and progenitor cells: clinical and preclinical regeneration of the hematolymphoid system. *Annual review of medicine*. 2005;56:509-38.

31. Haining W. N DC, Lehmann L.E. Principles of bone marrow and stem cell transplantation. In: Orkin S.H NDG, Ginsburg D, Look A.T, Fisher D.E, Lux S.E., editor. Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood. 7 th ed. Canada: Saunders Elsevier; 2009. p. 398-452.
32. Quesenberry PJ, Colvin G, Abedi M. Perspective: fundamental and clinical concepts on stem cell homing and engraftment: a journey to niches and beyond. *Experimental hematology*. 2005;33(1):9-19.
33. Miniero R, Busca A, Bonetti F, Giorgiani G, Zecca M, Berger M, et al. Allogeneic transplantation of peripheral blood progenitor cells in children: experience of two pediatric centers. *Bone marrow transplantation*. 1998;22 Suppl 5:S33-6.
34. İlhan O AÖ, Arat M. . Periferik kan kök hücre nakli tekniği ve uygulama esasları *Hematoloji-Onkoloji Güncel Derleme Dergisi*. 1999;1:71-8.
35. Anderlini P. Effects and safety of granulocyte colony-stimulating factor in healthy volunteers. *Current opinion in hematology*. 2009;16(1):35-40.
36. Gutierrez-Delgado F, Bensinger W. Safety of granulocyte colony-stimulating factor in normal donors. *Current opinion in hematology*. 2001;8(3):155-60.
37. Eyles JL, Roberts AW, Metcalf D, Wicks IP. Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophils--forgotten mediators of inflammatory disease. *Nature clinical practice Rheumatology*. 2006;2(9):500-10.
38. Cebon J, Layton J. Measurement and clinical significance of circulating hematopoietic growth factor levels. *Current opinion in hematology*. 1994;1(3):228-34.
39. Berliner N. Lessons from congenital neutropenia: 50 years of progress in understanding myelopoiesis. *Blood*. 2008;111(12):5427-32.
40. Kirsch F, Kruger C, Schneider A. The receptor for granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) is expressed in radial glia during development of the nervous system. *BMC developmental biology*. 2008;8:32.

41. Piscaglia AC, Shupe TD, Oh SH, Gasbarrini A, Petersen BE. Granulocyte-colony stimulating factor promotes liver repair and induces oval cell migration and proliferation in rats. *Gastroenterology*. 2007;133(2):619-31.
42. Price TH, Chatta GS, Dale DC. Effect of recombinant granulocyte colony-stimulating factor on neutrophil kinetics in normal young and elderly humans. *Blood*. 1996;88(1):335-40.
43. Mielcarek M, Graf L, Johnson G, Torok-Storb B. Production of interleukin-10 by granulocyte colony-stimulating factor-mobilized blood products: a mechanism for monocyte-mediated suppression of T-cell proliferation. *Blood*. 1998;92(1):215-22.
44. Karawajczyk M, Hoglund M, Ericsson J, Venge P. Administration of G-CSF to healthy subjects: the effects on eosinophil counts and mobilization of eosinophil granule proteins. *British journal of haematology*. 1997;96(2):259-65.
45. Shimoda K, Okamura S, Harada N, Kondo S, Okamura T, Niho Y. Identification of a functional receptor for granulocyte colony-stimulating factor on platelets. *The Journal of clinical investigation*. 1993;91(4):1310-3.
46. Falanga A, Marchetti M, Evangelista V, Manarini S, Oldani E, Giovanelli S, et al. Neutrophil activation and hemostatic changes in healthy donors receiving granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*. 1999;93(8):2506-14.
47. Sohngen D, Wienen S, Siebler M, Boogen C, Scheid C, Schulz A, et al. Analysis of rhG-CSF-effects on platelets by in vitro bleeding test and transcranial Doppler ultrasound examination. *Bone marrow transplantation*. 1998;22(11):1087-90.
48. Zhu J, Yamane H, Cote-Sierra J, Guo L, Paul WE. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell research*. 2006;16(1):3-10.

49. Rutella S, Pierelli L, Bonanno G, Sica S, Ameglio F, Capoluongo E, et al. Role for granulocyte colony-stimulating factor in the generation of human T regulatory type 1 cells. *Blood*. 2002;100(7):2562-71.
50. Rutella S, Zavala F, Danese S, Kared H, Leone G. Granulocyte colony-stimulating factor: a novel mediator of T cell tolerance. *J Immunol*. 2005;175(11):7085-91.
51. Arpinati M, Green CL, Heimfeld S, Heuser JE, Anasetti C. Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells. *Blood*. 2000;95(8):2484-90.
52. Nuamah NM, Goker H, Kilic YA, Dagmoura H, Cakmak A. Spontaneous splenic rupture in a healthy allogeneic donor of peripheral-blood stem cell following the administration of granulocyte colony-stimulating factor (g-csf). A case report and review of the literature. *Haematologica*. 2006;91(5 Suppl):ECR08.
53. Grove JE, Bruscia E, Krause DS. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells*. 2004;22(4):487-500.
54. Avecilla ST, Hattori K, Heissig B, Tejada R, Liao F, Shido K, et al. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nature medicine*. 2004;10(1):64-71.
55. Semedo P, Palasio CG, Oliveira CD, Feitoza CQ, Goncalves GM, Cenedeze MA, et al. Early modulation of inflammation by mesenchymal stem cell after acute kidney injury. *International immunopharmacology*. 2009;9(6):677-82.
56. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 2006;107(1):367-72.
57. Chan J, O'Donoghue K, de la Fuente J, Roberts IA, Kumar S, Morgan JE, et al. Human fetal mesenchymal stem cells as vehicles for gene delivery. *Stem Cells*. 2005;23(1):93-102.

58. Wynn RF, Hart CA, Corradi-Perini C, O'Neill L, Evans CA, Wraith JE, et al. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood*. 2004;104(9):2643-5.
59. Gebler A, Zabel O, Seliger B. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. *Trends in molecular medicine*. 2012;18(2):128-34.
60. Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *The Journal of pathology*. 2009;217(2):318-24.
61. Singer NG, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annual review of pathology*. 2011;6:457-78.
62. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood*. 2005;105(5):2214-9.
63. Chen X, Armstrong MA, Li G. Mesenchymal stem cells in immunoregulation. *Immunology and cell biology*. 2006;84(5):413-21.
64. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002;99(10):3838-43.
65. Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringden O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scandinavian journal of immunology*. 2003;57(1):11-20.
66. Shi M, Liu ZW, Wang FS. Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. *Clinical and experimental immunology*. 2011;164(1):1-8.
67. Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*. 2005;105(7):2821-7.

68. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells*. 2006;24(1):74-85.
69. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006;24(2):386-98.
70. Rasmusson I, Uhlin M, Le Blanc K, Levitsky V. Mesenchymal stem cells fail to trigger effector functions of cytotoxic T lymphocytes. *Journal of leukocyte biology*. 2007;82(4):887-93.
71. Najjar M, Raicevic G, Boufker HI, Fayyad Kazan H, De Bruyn C, Meuleman N, et al. Mesenchymal stromal cells use PGE2 to modulate activation and proliferation of lymphocyte subsets: Combined comparison of adipose tissue, Wharton's Jelly and bone marrow sources. *Cellular immunology*. 2010;264(2):171-9.
72. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005;105(4):1815-22.
73. Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, et al. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood*. 2007;109(1):228-34.
74. Bingisser RM, Tilbrook PA, Holt PG, Kees UR. Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway. *J Immunol*. 1998;160(12):5729-34.
75. Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *Stem Cells*. 2008;26(1):212-22.
76. Lim JH, Kim JS, Yoon IH, Shin JS, Nam HY, Yang SH, et al. Immunomodulation of delayed-type hypersensitivity responses by mesenchymal stem cells is associated with bystander T cell apoptosis in the draining lymph node. *J Immunol*. 2010;185(7):4022-9.

77. Ren G, Su J, Zhang L, Zhao X, Ling W, L'Huillie A, et al. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells*. 2009;27(8):1954-62.
78. Le Blanc K, Ringden O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *Journal of internal medicine*. 2007;262(5):509-25.
79. Ryan JM, Barry F, Murphy JM, Mahon BP. Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clinical and experimental immunology*. 2007;149(2):353-63.
80. Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood*. 2006;107(4):1484-90.
81. Prigione I, Benvenuto F, Bocca P, Battistini L, Uccelli A, Pistoia V. Reciprocal interactions between human mesenchymal stem cells and gammadelta T cells or invariant natural killer T cells. *Stem Cells*. 2009;27(3):693-702.
82. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2005;105(10):4120-6.
83. Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R, Fibbe WE. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*. 2006;177(4):2080-7.
84. Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood*. 2009;113(26):6576-83.
85. Ramasamy R, Fazekasova H, Lam EW, Soeiro I, Lombardi G, Dazzi F. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation*. 2007;83(1):71-6.
86. Ivanova-Todorova E, Bochev I, Mourdjeva M, Dimitrov R, Bukarev D, Kyurkchiev S, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more

potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Immunology letters*. 2009;126(1-2):37-42.

87. Richard DM, Dawes MA, Mathias CW, Acheson A, Hill-Kapturczak N, Dougherty DM. L-Tryptophan: Basic Metabolic Functions, Behavioral Research and Therapeutic Indications. *International journal of tryptophan research : IJTR*. 2009;2:45-60.
88. Michael AF, Drummond KN, Doeden D, Anderson JA, Good RA. Tryptophan Metabolism in Man. *The Journal of clinical investigation*. 1964;43:1730-46.
89. Grohmann U, Fallarino F, Puccetti P. Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends in immunology*. 2003;24(5):242-8.
90. Taylor MW, Feng GS. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1991;5(11):2516-22.
91. Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nature reviews Immunology*. 2004;4(10):762-74.
92. Curti A, Trabanelli S, Onofri C, Aluigi M, Salvestrini V, Ocadlikova D, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing leukemic dendritic cells impair a leukemia-specific immune response by inducing potent T regulatory cells. *Haematologica*. 2010;95(12):2022-30.
93. Widner B, Werner ER, Schennach H, Wachter H, Fuchs D. Simultaneous measurement of serum tryptophan and kynurenine by HPLC. *Clinical chemistry*. 1997;43(12):2424-6.
94. Vottero E, Mitchell DA, Page MJ, MacGillivray RT, Sadowski IJ, Roberge M, et al. Cytochrome b(5) is a major reductant in vivo of human indoleamine 2,3-dioxygenase expressed in yeast. *FEBS letters*. 2006;580(9):2265-8.
95. Maghzal GJ, Thomas SR, Hunt NH, Stocker R. Cytochrome b5, not superoxide anion radical, is a major reductant of indoleamine 2,3-dioxygenase in human cells. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(18):12014-25.

96. Steckel NK, Kuhn U, Beelen DW, Elmaagacli AH. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation and in pregnant women: association with the induction of allogeneic immune tolerance? *Scandinavian journal of immunology*. 2003;57(2):185-91.
97. Zhao XS, Liu KY, Liu DH, Xu LP, Chen H, Huang XJ. Potential immunosuppressive function of plasma indoleamine 2,3-dioxygenase in patients with aGVHD after allo-HSCT. *Clinical transplantation*. 2011;25(3):E304-11.
98. Nakamura T, Nawa K, Ichihara A. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochemical and biophysical research communications*. 1984;122(3):1450-9.
99. Nakamura T, Nawa K, Ichihara A, Kaise N, Nishino T. Purification and subunit structure of hepatocyte growth factor from rat platelets. *FEBS letters*. 1987;224(2):311-6.
100. Nakamura T, Mizuno S. The discovery of hepatocyte growth factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. *Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and biological sciences*. 2010;86(6):588-610.
101. Naldini L, Tamagnone L, Vigna E, Sachs M, Hartmann G, Birchmeier W, et al. Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *The EMBO journal*. 1992;11(13):4825-33.
102. Miyazawa K. Hepatocyte growth factor activator (HGFA): a serine protease that links tissue injury to activation of hepatocyte growth factor. *The FEBS journal*. 2010;277(10):2208-14.
103. Kinoshita T, Hirao S, Matsumoto K, Nakamura T. Possible endocrine control by hepatocyte growth factor of liver regeneration after partial hepatectomy. *Biochemical and biophysical research communications*. 1991;177(1):330-5.

104. Mizuno S, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: a regenerative drug for acute hepatitis and liver cirrhosis. *Regenerative medicine*. 2007;2(2):161-70.
105. Funakoshi H, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: from diagnosis to clinical applications. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2003;327(1-2):1-23.
106. Schmassmann A, Stettler C, Poulsom R, Tarasova N, Hirschi C, Flogerzi B, et al. Roles of hepatocyte growth factor and its receptor Met during gastric ulcer healing in rats. *Gastroenterology*. 1997;113(6):1858-72.
107. Lindner G, Menrad A, Gherardi E, Merlino G, Welker P, Handjiski B, et al. Involvement of hepatocyte growth factor/scatter factor and met receptor signaling in hair follicle morphogenesis and cycling. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2000;14(2):319-32.
108. Sisson TH, Nguyen MH, Yu B, Novak ML, Simon RH, Koh TJ. Urokinase-type plasminogen activator increases hepatocyte growth factor activity required for skeletal muscle regeneration. *Blood*. 2009;114(24):5052-61.
109. Kmiecik TE, Keller JR, Rosen E, Vande Woude GF. Hepatocyte growth factor is a synergistic factor for the growth of hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 1992;80(10):2454-7.
110. Weimar IS, Miranda N, Muller EJ, Hekman A, Kerst JM, de Gast GC, et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) is produced by human bone marrow stromal cells and promotes proliferation, adhesion and survival of human hematopoietic progenitor cells (CD34+). *Experimental hematology*. 1998;26(9):885-94.
111. Montesano R, Matsumoto K, Nakamura T, Orci L. Identification of a fibroblast-derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor. *Cell*. 1991;67(5):901-8.
112. Kolatsi-Joannou M, Moore R, Winyard PJ, Woolf AS. Expression of hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor, MET, suggests roles in human embryonic organogenesis. *Pediatric research*. 1997;41(5):657-65.

113. Kosai K, Matsumoto K, Nagata S, Tsujimoto Y, Nakamura T. Abrogation of Fas-induced fulminant hepatic failure in mice by hepatocyte growth factor. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998;244(3):683-90.
114. Yamamoto K, Morishita R, Hayashi S, Matsushita H, Nakagami H, Moriguchi A, et al. Contribution of Bcl-2, but not Bcl-xL and Bax, to antiapoptotic actions of hepatocyte growth factor in hypoxia-conditioned human endothelial cells. *Hypertension*. 2001;37(5):1341-8.
115. Wang X, DeFrances MC, Dai Y, Pediaditakis P, Johnson C, Bell A, et al. A mechanism of cell survival: sequestration of Fas by the HGF receptor Met. *Molecular cell*. 2002;9(2):411-21.
116. Tulasne D, Foveau B. The shadow of death on the MET tyrosine kinase receptor. *Cell death and differentiation*. 2008;15(3):427-34.
117. Kuroiwa T, Kakishita E, Hamano T, Kataoka Y, Seto Y, Iwata N, et al. Hepatocyte growth factor ameliorates acute graft-versus-host disease and promotes hematopoietic function. *The Journal of clinical investigation*. 2001;107(11):1365-73.
118. Yamaura K, Ito K, Tsukioka K, Wada Y, Makiuchi A, Sakaguchi M, et al. Suppression of acute and chronic rejection by hepatocyte growth factor in a murine model of cardiac transplantation: induction of tolerance and prevention of cardiac allograft vasculopathy. *Circulation*. 2004;110(12):1650-7.
119. Okunishi K, Dohi M, Nakagome K, Tanaka R, Mizuno S, Matsumoto K, et al. A novel role of hepatocyte growth factor as an immune regulator through suppressing dendritic cell function. *J Immunol*. 2005;175(7):4745-53.
120. Kamimoto M, Mizuno S, Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor prevents multiple organ injuries in endotoxemic mice through a heme oxygenase-1-dependent mechanism. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;380(2):333-7.
121. Kamimoto M, Mizuno S, Nakamura T. Reciprocal regulation of IL-6 and IL-10 balance by HGF via recruitment of heme oxygenase-1 in macrophages for

- attenuation of liver injury in a mouse model of endotoxemia. *International journal of molecular medicine*. 2009;24(2):161-70.
122. Nakamura Y, Morishita R, Higaki J, Kida I, Aoki M, Moriguchi A, et al. Hepatocyte growth factor is a novel member of the endothelium-specific growth factors: additive stimulatory effect of hepatocyte growth factor with basic fibroblast growth factor but not with vascular endothelial growth factor. *Journal of hypertension*. 1996;14(9):1067-72.
 123. Morishita R, Nakamura S, Hayashi S, Taniyama Y, Moriguchi A, Nagano T, et al. Therapeutic angiogenesis induced by human recombinant hepatocyte growth factor in rabbit hind limb ischemia model as cytokine supplement therapy. *Hypertension*. 1999;33(6):1379-84.
 124. You WK, McDonald DM. The hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway as a therapeutic target to inhibit angiogenesis. *BMB reports*. 2008;41(12):833-9.
 125. Feng XH, Derynck R. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annual review of cell and developmental biology*. 2005;21:659-93.
 126. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGFbeta activation. *Journal of cell science*. 2003;116(Pt 2):217-24.
 127. Soond SM, Chantry A. How ubiquitination regulates the TGF-beta signalling pathway: new insights and new players: new isoforms of ubiquitin-activating enzymes in the E1-E3 families join the game. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2011;33(10):749-58.
 128. Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annual review of immunology*. 1998;16:137-61.
 129. Dennler S, Goumans MJ, ten Dijke P. Transforming growth factor beta signal transduction. *Journal of leukocyte biology*. 2002;71(5):731-40.
 130. Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, et al. Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(2):770-4.

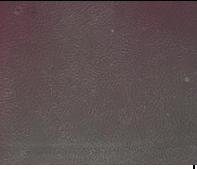
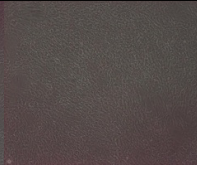

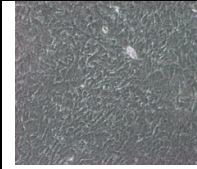
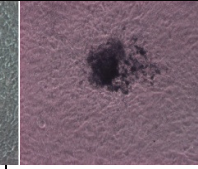
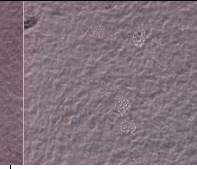
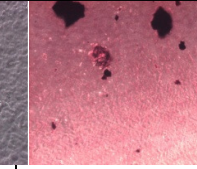
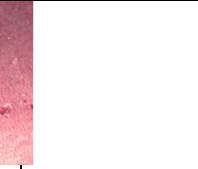
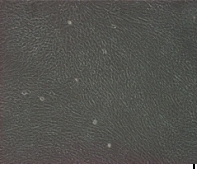
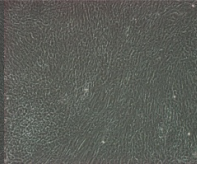


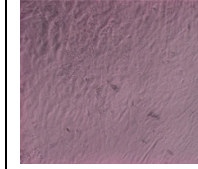
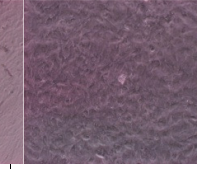
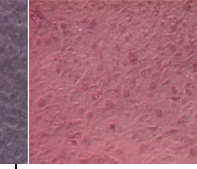

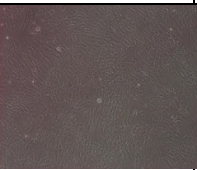
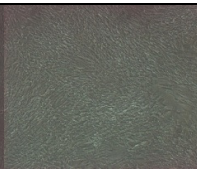

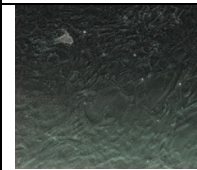

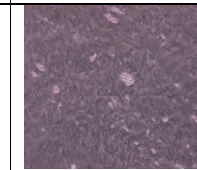

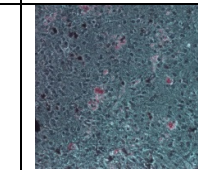
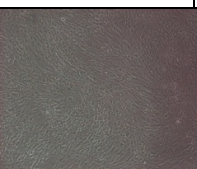
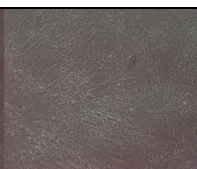
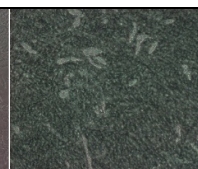
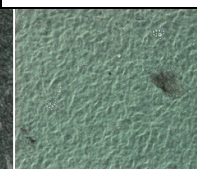
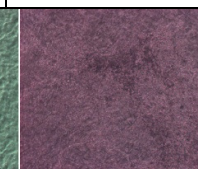
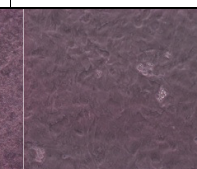
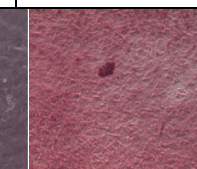
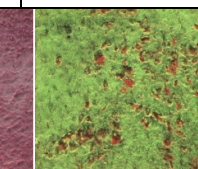
131. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*. 1992;359(6397):693-9.
132. Yaswen L, Kulkarni AB, Fredrickson T, Mittleman B, Schiffman R, Payne S, et al. Autoimmune manifestations in the transforming growth factor-beta 1 knockout mouse. *Blood*. 1996;87(4):1439-45.
133. Geiser AG, Letterio JJ, Kulkarni AB, Karlsson S, Roberts AB, Sporn MB. Transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) controls expression of major histocompatibility genes in the postnatal mouse: aberrant histocompatibility antigen expression in the pathogenesis of the TGF-beta 1 null mouse phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(21):9944-8.
134. Sillett HK, Cruickshank SM, Southgate J, Trejdosiewicz LK. Transforming growth factor-beta promotes 'death by neglect' in post-activated human T cells. *Immunology*. 2001;102(3):310-6.
135. Chen W, Frank ME, Jin W, Wahl SM. TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. *Immunity*. 2001;14(6):715-25.
136. Phipps RP, Stein SH, Roper RL. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. *Immunology today*. 1991;12(10):349-52.
137. Gao L, Zackert WE, Hasford JJ, Danekis ME, Milne GL, Remmert C, et al. Formation of prostaglandins E2 and D2 via the isoprostane pathway: a mechanism for the generation of bioactive prostaglandins independent of cyclooxygenase. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(31):28479-89.
138. Kalinski P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J Immunol*. 2012;188(1):21-8.
139. Park JY, Pillinger MH, Abramson SB. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clin Immunol*. 2006;119(3):229-40.
140. Hata AN, Breyer RM. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacology & therapeutics*. 2004;103(2):147-66.

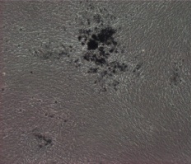
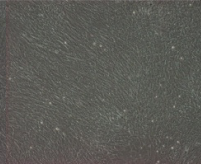
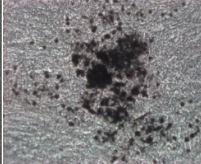


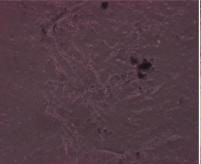
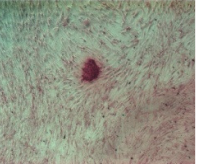
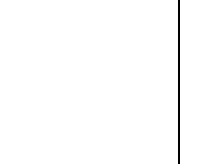
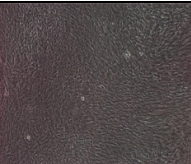
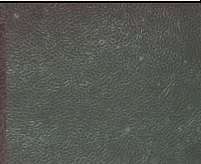

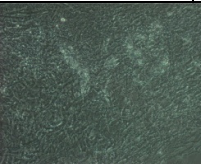
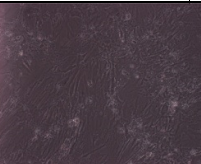
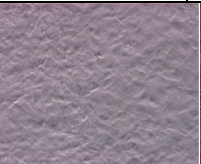
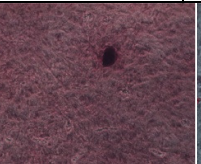
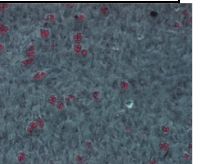
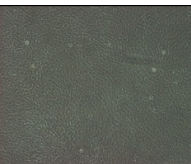

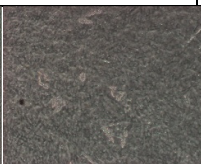

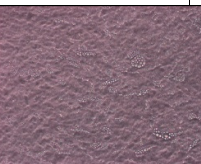
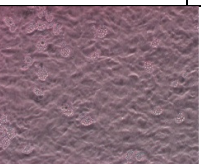
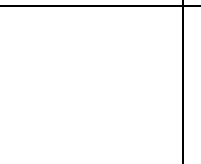
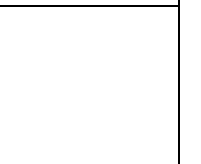
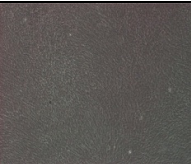




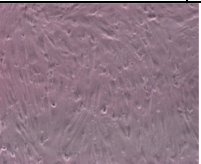
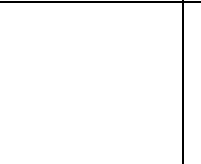
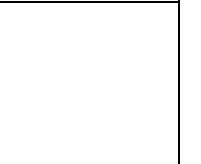
141. Nishigaki N, Negishi M, Ichikawa A. Two Gs-coupled prostaglandin E receptor subtypes, EP2 and EP4, differ in desensitization and sensitivity to the metabolic inactivation of the agonist. *Molecular pharmacology*. 1996;50(4):1031-7.
142. Walker W, Rotondo D. Prostaglandin E2 is a potent regulator of interleukin-12- and interleukin-18-induced natural killer cell interferon-gamma synthesis. *Immunology*. 2004;111(3):298-305.
143. Serezani CH, Chung J, Ballinger MN, Moore BB, Aronoff DM, Peters-Golden M. Prostaglandin E2 suppresses bacterial killing in alveolar macrophages by inhibiting NADPH oxidase. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2007;37(5):562-70.
144. Gomi K, Zhu FG, Marshall JS. Prostaglandin E2 selectively enhances the IgE-mediated production of IL-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by mast cells through an EP1/EP3-dependent mechanism. *J Immunol*. 2000;165(11):6545-52.
145. Jonuleit H, Kuhn U, Muller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, et al. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *European journal of immunology*. 1997;27(12):3135-42.
146. Kolenko V, Rayman P, Roy B, Cathcart MK, O'Shea J, Tubbs R, et al. Downregulation of JAK3 protein levels in T lymphocytes by prostaglandin E2 and other cyclic adenosine monophosphate-elevating agents: impact on interleukin-2 receptor signaling pathway. *Blood*. 1999;93(7):2308-18.
147. Khayrullina T, Yen JH, Jing H, Ganea D. In vitro differentiation of dendritic cells in the presence of prostaglandin E2 alters the IL-12/IL-23 balance and promotes differentiation of Th17 cells. *J Immunol*. 2008;181(1):721-35.
148. Watchmaker PB, Berk E, Muthuswamy R, Mailliard RB, Urban JA, Kirkwood JM, et al. Independent regulation of chemokine responsiveness and cytolytic function versus CD8+ T cell expansion by dendritic cells. *J Immunol*. 2010;184(2):591-7.

149. Lennon DP, Caplan AI. Isolation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. *Experimental hematology*. 2006;34(11):1604-5.

EKLER

Ek 1: Mezenkimal kök hücre farklılaşma sonuçları

H n o	4.gün		21.gün		33.gün		Boyama	
	Osteojenik	Adipojenik	Osteojenik	Adipojenik	Osteojenik	Adipojenik	Osteojenik	Adipojenik
1								
2								
3								
4								

H n o	4.gün		21.gün		33.gün		Boyama	
	Osteojenik	Adipojenik	Osteojenik	Adipojenik	Osteojenik	Adipojenik	Osteojenik	Adipojenik
5								
6								
7								
8								

Ek 2: Granülosit koloni uyarıcı faktör verilen ve verilmeyen donörlerin kemik iliği plazma ve MKH süpernatanlarındaki (100.000 hücre başına) PGE2, HGF, TGF- β 1 konsantrasyonları.

	cinsiyet	yaş	G-CSF	PGE2 (pg/ml) süpernatan	PGE2 (pg/ml) kemik iliği	HGF (pg/ml) süpernatan	HGF (pg/ml) kemik iliği	TGF- β 1(pg/ml) süpernatan	TGF- β 1 (pg/ml) kemik iliği
1	erkek	4,5	yok	330,42	1919,2	31,09	2252,51	127,61	3507,00
2	kız	9	yok	310,09	1806,6	87,68	1489,61	97,40	3253,82
3	kız	17	yok	489,50	2337,4	158,55	3411,05	70,11	8634,16
4	erkek	14	yok	323,03	3657,1	126,92	2973,67	66,53	5769,92
5	erkek	7	yok	332,68	2521,1	80,64	2566,35	19,60	1845,44
6	erkek	10	yok	213,54	1408,3	443,21	1164,08	40,65	4298,22
7	kız	11	yok	355,10	3010,4	40,35	3225,75	175,88	6592,80
8	kız	9	yok	162,92	1377,6	38,91	1641,52	92,69	5754,08

	cinsiyet	yaş	G-CSF	PGE2 (pg/ml) süpernatant	PGE2 (pg/ml) kemik iliği	HGF (pg/ml) süpernatant	HGF (pg/ml) kemik iliği	TGF-β1(pg/ml) süpernatant	TGF-β1 (pg/ml) kemik iliği
9	kız	9	var	135,11	3579,7	121,88	5083,76	,54	4883,74
10	erkek	9	var	155,53	1950,9	95,11	1950,36	50,70	4393,18
11	kız	15	var	124,70	2032,7	112,48	3032,10	72,22	1703,00
12	erkek	17	var	117,06	4960,1	38,32	9598,19	94,70	6213,00
13	erkek	10	var	154,97	3252,9	92,22	12722,6	5,98	73540,00
14	kız	7,5	var	211,12	6558,9	243,44	10189,6	24,08	3918,44
15	erkek	3,5	var	112,03	2110,5	202,33	2282,56	42,46	3554,46
16	erkek	6	var	135,01	2354,9	67,05	8740,10	141,14	19853,74