



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

**FARKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRE
HATLARININ İNFLAMATUVAR HASARLANMA
SONRASI REJENERASYONU KAPASİTELERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HAZIRLAYAN
REYHAN HUSEYNOVA**

**DANIŞMAN
PROF. DR. AFİG BERDELİ**

İZMİR

2017

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

**FARKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRE
HATLARININ İNFLAMATUVAR HASARLANMA
SONRASI REJENERASYONU**

Kök Hücre Anabilim Dalı Programı

**Yüksek Lisans Tezi
REYHAN HUSEYNOVA**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Afig BERDELİ**

**İZMİR
2017**

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez projesi çalışmamda ve öğrenimim dâhilinde bana yaptığı yardımlarda beni bilgi birikim ve tecrübeleriyle aydınlatan tez danışmanım Prof. Dr. Afig BERDELİ 'ye teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca her koşul altında beni maddi ve manevi olarak destekleyen AİLEME,

Çalışmalarımda takıldığım yerlerde yardım eden Muhammet OCAK'a,

Tüm Çocuk Hastanesi Moleküler Tıp Laboratuvarı ekibine teşekkürü borç bilirim.

Reyhan HUSEYNOVA

ÖZET

Amaç:

Ekstrasellüler matriks immün inflamasyon aracılı oluşan patogenezi tam olarak anlaşılmış ancak rejenerasyon etkisi birçok dokuda örneklenmemiş durumdur. İnflamasyon sebebiyle ekstrasellüler matriks proteazlarına maruz kalan dokularda immün hasarlanma oluşur ve hücresele aracılı sıvılarda artış gözlenir. Bu durumda bu hasarlanma sonucu dokularda şişlik kızarıklık ve ısı artışı oluşur ki bu da ağrı ve hareket kısıtlılığına sebep olur. Bundan dolayı bu tip patogenezlere kök hücrelerin moleküler değişimi ve bu hasarlanmanın hücresele rejenerasyonu literatürde aktüel olarak tartışılmaktadır. Kök hücrelerin hasarlı dokudan göç sebebiyle hasarın yaşandığı ekstrasellüler matrikse göç etmesi ve bunun sonucu bazı doku onarım mekanizmalarının aksamaya uğraması dokudaki yıkımı hızlandırmaktadır. Kök hücrelerin rejenerasyon yapabilmek için mikro çevre nişlerine ihtiyacı vardır.

Rejenerasyon mekanizmaları üzerine yapılmış birçok araştırmada kök hücrelerde işleyen yolaklar iyi anlaşılmıştır. Tezimde bu yolaklar üzerinde görev alan JUNB, MEPE, MMP13, MMP2 proteinlerine yoğunlaştım. Bu genlerin kodladığı proteinler kök hücrelerin yeniden modellenmesi, asimetrik bölünmesi, doku onarımı gibi önemli işlevlerde görev alırlar.

Tezimde dokuda gerçekleşen inflamasyonun doku rejenerasyon mekanizmalarına olan etkisi kök hücre migrasyonunda işlev kaybettiği savunuldu. Dokuyu rejenere etme kabiliyetlerinin kaybetmelerinin sebebi olarak mikro çevre nişlerinin bozulması ve tutunma yetilerinin azalması olduğu düşünüldü.

Gereç ve Yöntem:

Tezimde ekstrasellüler matrix hasar taklidi çeşitli doku kök hücreleri üzerine yapıldı ve daha önceden ayarlanan hasar modelleri ve farmakolojik modülasyon modellerinde bahsi geçen rejenerasyon yolaklarının önemli proteinlerinin ekspresyon seviyeleri ölçüldü. Bu amaçla 6 kuyucuklu toplam 9 plate'de Sinoviyal kökenli,

Umbilical cord kökenli ve Adipose doku kökenli kök hücreler ayrı ayrı 3'er platede kültürlendi. Her plate içinde 24 saat ve 48 saat kültür süresi olarak, placebo kültürleriyle beraber IL-1 ve IL-1+Canakinumab antagonisti olacak şekilde dizayn edildi. Ardından kültürlerden alınan örneklerden mRNA izolasyonu yapıldı ve izole mRNA'lardan Reverse T. PCR ile cDNA elde edilip elde edilen cDNAların RealTime PCR ile daha önce sipariş verilen JUNB, MEPE, MMP13, MMP2 Taqman hazır problemleri kullanılarak ekspresyon seviyeleri Ct değeri olarak ABI7000 RT-PCR cihazında ölçüldü. Çıkan sonuçlar $\Delta\Delta C_t$ hesabı ile değerlendirildi. Ve katlanma formülüyle fold change hesaplandı.

Bulgular:

Değerlendirmelere göre ekstrasellüler matriks hasar taklitleri ve farmakolojik modülasyonlarda hücresel rejenerasyon yollarında görev alan proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonlarında değişim gözlemlendi. IL-1 hasar taklitlerinde rejenerasyon yolağında görev alan proteinlerinin ortamda azalmasına sebep olacak bir gen ekspresyonu azalması saptandı.

Tartışma ve Sonuç:

Deney bulgularımıza göre ekstrasellüler matrix inflamasyon hasarının in-vitro taklidi yapılan kültürlerde, hücresel ve dolayısıyla dokusal rejenerasyona hücrelerin tutunduğu nişten ayrılıp, yangısal reaksiyonların olduğu, işlev göremeyecekleri süspansiyon ortamına dahil olduktan sonra rejenerasyon yeteneklerini kaybetmektedirler.

Bunun dışında yangısal hasar ile kök hücrelere ve çevre doku hücrelerine verilen hasarda kök hücrelerde eksprese edilen ve ekspresyon seviyesinde artış gösteren MEPE proteini bütün dokuda artarak ilerleyen bir sinyal olarak işlev görürken JUNB proteini tekil hücre hasarında rejenerasyon başlatır.

ABSTRACT

Goal:

The pathogenesis caused by the extracellular matrix immunoinflammation is fully understood, but the regeneration effect is not sampled in many tissues. Immunological damage occurs in tissues exposed to extracellular matrix proteases due to inflammation and increases in cellular mediators. In this case, the swelling redness and temperature increase occur in these damaged tissues, which causes pain and movement restriction. Hence, molecular alteration of stem cells in such pathogenesis and cellular regeneration of these damages are currently discussed in the literature. Migration of the stem cells to the extracellular matrix where the damage is experienced due to migration from the damaged tissue, which results in the acceleration of the destruction of the tissue due to the occlusion of some tissue repair mechanisms. Stem cells require microenvironmental niches to regenerate.

In many studies on regeneration mechanisms, the pathways that work in stem cells are well understood. I concentrated on the JUNB, MEPE, MMP13, MMP2 proteins involved in these pathways. The proteins encoded by these genes function in important functions such as stem cell remodeling, asymmetric cleavage, tissue repair. It has been argued that the effect of tissue inflammation on tissues in tissue has lost its role in stem cell migration. The loss of their ability to regenerate the tissue was thought to be due to the degradation of microenvironmental niches and the decrease in their ability to hold.

Materials and Methods:

In the assay, imitation of extracellular matrix damage was performed on various tissue stem cells, and expression levels of important proteins of regenerating pathways regulated in pre-defined damage models and pharmacological modulation models were measured. For this purpose, Sinobiyal, Umbilical cord and Adispose tissue stem cells were cultured on 3 plates in 9 plates with 6 wells. Each plate was

designed to be IL-1 and IL-1 + canacinumab antagonists with placebo cultures for 24 hours and 48 hours as culture supernatants. Then mRNA was isolated from cultured samples and cDNAs were obtained from isolated mRNAs by Reverse T. PCR and the cDNAs obtained were measured by RealTime PCR on ABI7000 RT-PCR as expression levels Ct value using JUNB, MEPE, MMP13, MMP2 Taqman Ready Probe. The results were evaluated with the $\Delta \Delta C_t$ account. And the fold change formula is calculated fold change.

Results:

According to the evaluations, changes in the expression of genes encoding proteins involved in extracellular matrix damage mimicities and pharmacological modulation in cellular regeneration pathways were observed. In IL-1 damage mimicry, a decrease in gene expression was detected, which would result in the reduction of the proteins involved in the regeneration pathway.

Discussion and Conclusion:

According to our experimental findings, extracellular matrix inflammation damage is lost in regenerating ability after in-vitro pretreatment cultures in which cells and tissues regenerate are separated from the niches that the cells are holding, including inflammatory reactions and suspension that they will not function.

In addition, the JEPA protein initiates regeneration of single cell damage while the MEPE protein, which is exogenously expressed in stem cells in damage to root cells and surrounding tissue cells by inflammatory damage, increases in expression level and functions as an increasing signal in the whole tissue.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
ÖZET	II
ABSTRACT.....	IV
TABLOLAR DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
KISALTMALAR	IX
BÖLÜM I.....	1
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. KÖK HÜCRELER ve ÖZELLİKLERİ.....	2
2.2. EKSTRASELÜLER MATRİKS İNFLAMASYONU	13
2.3. KÖK HÜCRELERDE REJENERASYONLA İLGİLİ GENLER.....	24
BÖLÜM II	29
3. GEREÇLER VE YÖNTEM.....	29
3.1. KÖK HÜCRE KÜLTÜRLENMESİ	29
3.2. KÜLTÜRLERİN MANİPÜLASYONU.....	33
3.3. RNA İZOLASYONU VE CDNA ELDESİ	35
3.4. EKSPRESYON ANALİZİ	38
BÖLÜM III.....	43
4. BULGULAR.....	43
BÖLÜM VI.....	48
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	48
BÖLÜM V.....	53
7. KAYNAKÇA	53
ÖZGEÇMİŞ.....	70

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1: Sayfa 5 - Mezenşimal kök hücrelerin karakterizasyon yüzey antijenler.

Tablo 2: Sayfa 42 – Ct değerleri tablosu

Tablo 3: Sayfa 43 – Fold Change değerleri tablosu

Tablo 4: Sayfa 45 – Karşılaştırmalı Fold change analizi



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: 3. Sayfa - Mezenkimal Kök Hücreler.

Şekil 2: 4.Sayfa - Kök Hücrelerin karakteristik özellikleri.

Şekil 3: 6.Sayfa - Rejenerasyon Aşamaları

Şekil 4: 10. Sayfa - Kök Hücre temini ve uygulanma döngüsü

Şekil 5: 15. Sayfa - MSC'lerin immün modülasyon etkileri.

Şekil 6: 16. Sayfa - PAR1 proteini MMP13 tarafından non-kanonik yoldan kırılır. Bu durum PAR1 transmembran proteininin işlev kaybı ile sonuçlanır.

Şekil 7: 17. Sayfa - MMP-13'ün Stem cell dökülmesine etkisi.

Şekil 8: 18. Sayfa - JunB overekspresyonu ve hücre siklusu ilişkisi

Şekil 9: 21.Sayfa - Kayıp yaşanmadığını kanıtlamak için Tripan-Blue boyama

Şekil 10: 26. Sayfa - 6 Kuyucuklu plate üzerinde deney düzeneği

KISALTMALAR

ECM	Ekstraselüler matris
K	Kitosan
PGA	Poli(glikolik asit)
PLA	Poli(L-laktik asit)
PLGA	Poli(Laktik-ko-glikolik asit)
HA	Hidroksiapatit
SBF	Yapay vücut sıvısı (Simulated Body Fluid)
IGF	İnsülin-benzeri büyüme faktörü
TGF β	Dönüştürücü (Transforming) büyüme faktörü
BMP	Kemik morfojenik protein
EKH	Embriyonik kök hücre
MKH	Mezenkimal kök hücre
hOB	İnsan osteoblastı
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
MEM	Modified Eagle's Medium
K/HA	Kitosan/Hidroksiapatit

BÖLÜM I

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mezenkimal kök hücrelerin rejenerasyonu eklem ve kemik, kas ve diğer dokuların cerrahisinin en temel çalışma alanlarından biridir. Travma, kronik enfeksiyon, kist ve tümör rezeksiyonları gibi durumlarda defektler oluşmakta ve çoğu vakada kemik greftlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Uygun taşıyıcı üretimi ve klinik kullanıma hazır hale getirilmesi de doku mühendisliği için önemli bir çalışma alanıdır. Bu amaçla pek çok sentetik materyal özellikleri geliştirilerek kullanılmaya devam edilmektedir. Uygulanacak biyomateryalin biyoeriyebilir, biyouyumlu, osteokondüktif ve osteoindüktif özelliklerinin yeterli düzeyde olması hedeflenmektedir.

Güvenilir bir taşıyıcı teminiyle beraber sağlıklı ve kaliteli bir doku oluşumu için uyarıcı hücreler de kullanılmaktadır. Mezenşimal kök hücreler bahsedilen bu tedavi yaklaşımlarında önemli rol üstlenmektedir.

Kök hücrelerin keşfi ve potansiyellerinin anlaşılması üzerine bu alana yönelik ayrılan fonlar ve çalışma sayıları da artmıştır. Ülkemizde de bu alanda artan bir ilgi bulunmaktadır. Kök hücreler, kendini yenileme kapasiteleri ve başka hücre tiplerine farklılaşabilme özellikleri ile ön plana çıkmaktadırlar.

Vücutta, kordon kanı, plasenta, kemik iliği, yağ dokusu gibi pek çok dokudan elde edilebildiği gibi çeşitli kaynaklardan da temin edilebilmektedirler. Kolay elde edilebilmeleri ve yüksek farklılaşma potansiyelleri çeşitli mezenkimal kök hücre kaynaklarını ön plana çıkarmaktadır.

Adipoz kökenli mezenkimal kökenli kök hücreler hem yöntem olarak kolay elde edilebilirliği hem de osteojenik farklılaşma kapasitesinin yeterli olduğu pek çok kez gösterilmiş olmasından dolayı önemli bir kaynak olarak görülmektedir.

Bu çalışmada, Artiritik Hasara Spesifik Uyandırılmış Sinovial Kökenli, adipoz kökenli ve kordon kanı kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerde oluşturulan standart defektlerin hücreli ve hücresiz yaklaşımlar kullanılarak rejenerasyon incelenmesi

yapıldı. Doku mühendisliğinin mezenkimal kök hücre rejenerasyonunda etkinliğinin gösterilmesi ve klinik kullanım için potansiyelinin gösterilmesi için deney düzeneğinde rejenerasyona yoğunlaşıldı.

Ekstrasellüler inflamasyon kronik yada sistemik görülen hastalıklarda rastgelinen bir durumdur. IL-1 ve TNF-a'nın ekstrasellüler matrix içinde birikmesiyle matrixde yıkıcı proteazların oluşumuyla kollogen IV'lerin zarara uğraması ve layerin incilmesiyle oluşur.

Çalışmamızda EMİ taklidi edilmiş sinoviyal, adipoz doku ve kordon kanı kök hücrelerinin rejenerasyon yeteneğinin akıbeti üzerine yoğunlaşıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KÖK HÜCRELER ve ÖZELLİKLERİ

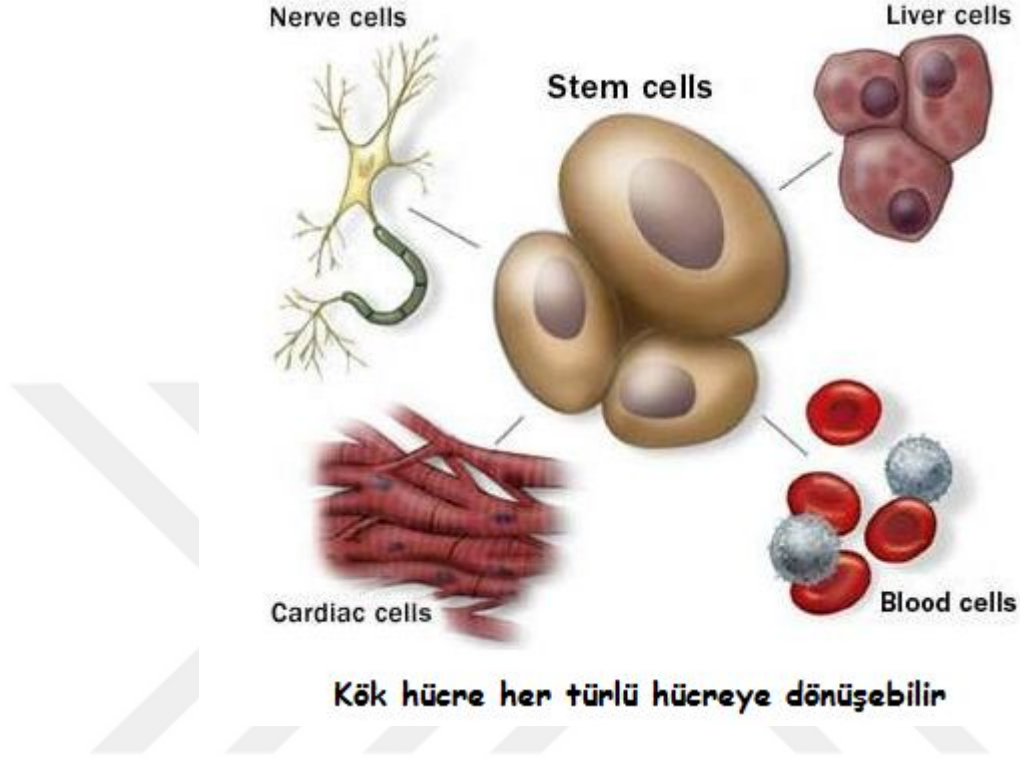
Hücre patolojisinin kurucusu ve modern hücre teorisinin öncülerinden olan, Rudolf Ludwig Karl Virchow (1821–1902), her bir hücre var olan başka bir hücreden oluştuğunu ileri sürdüğü tezinde, ilk defa 'köklülük' (stemness) kavramından bahsetmiştir. Kök hücre kavramı ilk olarak bilim literatörüne girmesi, 1868 yılında Alman biyologu Ernst Haeckel tarafından sağlanmıştır. Darwin'in evrim teorisinin büyük destekçisi olan Haeckel, organizmanın evrimini açıklamak için çizdiği filo genetik ağaçlara "kök ağacı" (Almanca Stammbaume) adını vermiştir. Bu ağacın tepesinde bulunan ve çok hücreli canlıların tamamının atası kabul edilen tek hücreli canlıya "kök hücre" anlamına gelen "Stammzelle" adını vermiştir. Ayrıca daha sonralar bu tanımlı geliştiren Haeckel, organizmayı oluşturacak olan döllenmiş yumurta'ya da kök hücre adını vermiştir. Bu hücrelerin biyolojisini anlamak için bilinmesi gereken bazı terimler;

Totipotent kök hücreler: Her yönde farklılaşabilen ve canlıyı oluşturabilme yetisine sahip kaynak hücrelerdir.

Pluripotent kök hücreler: Çok yönlü farklılaşabilen ve birçok dokuya kaynaklık eden hücrelerdir.

Multipotent kök hücreler: Birkaç farklı hücreye dönüşebilen kök hücreler.

Kendini yenileme (self-renewal): Kök hücrelerin belli bir hücre tipine farklılaşmadan aynı genetik yapıda kendini yenilemesidir.

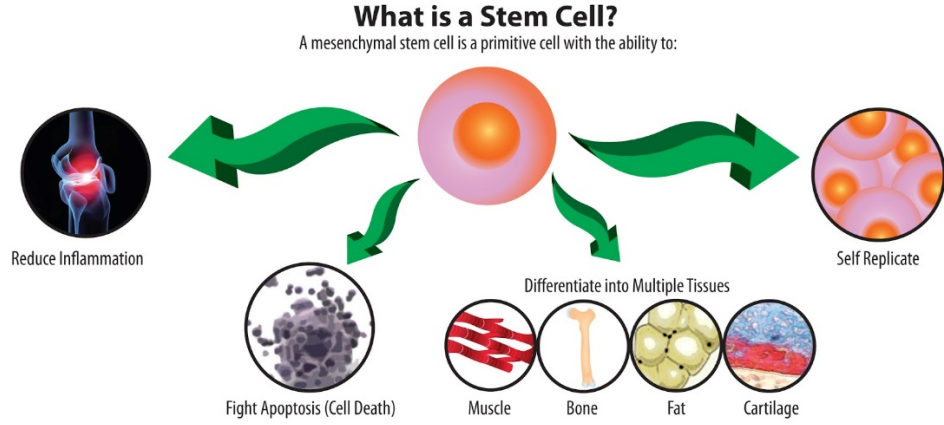


Şekil 1: Mezenkimal Kök Hücreler.

Farklılaşma (diferansiyasyon): Hücrelerin farklı görev ve işlevler için başka bir hücre tipine dönüşmesine denir. Her hücrenin farklılaşma kapasitesi farklı olabilir.

Embriyonik kök hücreler: embriyonun erken evrelerinde bulunan totipotent özellikte olan hücrelerdir. İn-vitro gebeliklerde ihtiyaç fazlasının alınması ile temin edilmektedir.

Somatik (yetişkin) kök hücreler: Doku ve organları gelişmiş bireylerden elde edilen kök hücrelerdir.



Şekil 2: Kök Hücrelerin karakteristik özellikleri.

Sinoviyal Doku Kaynaklı MKH

Sinoviyum; kemiklerin kıkırdakla kaplı alanlar dışındaki, eklem kapsülünün iç yüzeyini çevreleyen ve kök hücreden zengin olan bir vasküler bağ dokusudur. Günümüzde, özellikle eklem hasarlarının tedavisinde kullanılan sinoviyum (doku kaynaklı kök hücreler), hastadan artroskopik cerrahi ile alınan biyopsilerden elde edilmektedir.

Sinoviyal kök hücre kendini yenileme potansiyeline sahiptir. Çoğalarak, aynı genetik yapıya sahip hücreler oluştururlar. sinoviyumdan elde edilen bu hücreler totipotent yapıdadır. Şartlar sağlandığında kıkırdak gibi hücre türlerine değişebilirler. Ancak tek başlarına yeni bir organizma oluşturamazlar.

Mezenşimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonunda Hücre Yüzey Antijenleri (CD sistemi)

Başlangıçta sadece lökosit antijenlerini sınıflandırmak için kullanılan bu sistem günümüzde endotel hücreleri, sitokin reseptörleri, bazı intrasellüler moleküller ve kök hücreler için de kullanılmaktadır. Karakterizasyonları tamamlanmış CD1'den CD350'ye kadar numaralandırılmış bu antikolar, araştırma, tanı, hastalık takibi, tedavi ve hücre karakterizasyonunda yaygın

olarak kullanılmaktadır. Bu yüzey antijenlerinden CD44, CD73, CD90 ve CD105 çalışmada tercih edilen yüzey antijenleridir.

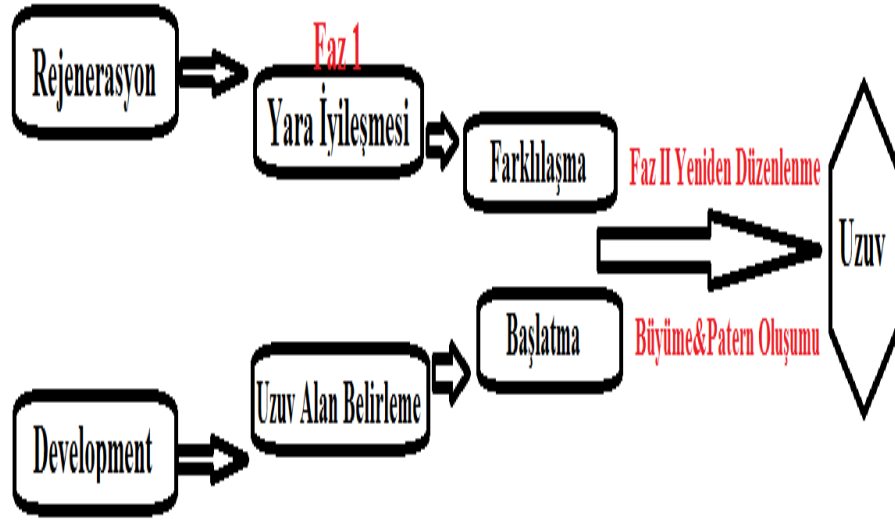
Mezenkimal kök hücrelerin pozitif yüzey antijenleri			
CD13	CD73	CD126	CD58
CD29	CD90	CD127	CD71
CD44	CD102	CD166	CD123
CD51	CD105	CD140a	CD124
CD54	CD106	CD120a	CD120b

Tablo 1: Mezenşimal kök hücrelerin karakterizasyon yüzey antijenler.

REJENERASYON:

Doku kaybından sonra ortadan kalkan hücrelerin yerini aynı cinste ve aynı değerde çoğalan hücrelerin doldurması'dır. Buna en iyi örnek, kuyruğu kopan bir kertenkelede yeni kuyruk oluşumudur. İnsanlarda her doku rejenere olamaz ama deri, mukoza, damarlar ve kemik iliği gibi dokular iyi rejenere olmaktadır. Ancak kas, akciğer ve beyin hücrelerinde rejenerasyon yeteneği yoktur. Ayrıca bu hücrelerin ölümü o bölgenin sikatris doku ile dolmasına ve ilgili organın çalışma yeteğinin düşürülmesiyle sonuçlanmaktadır.

Rejenerasyon Aşamaları;



Şekil 3. Rejenerasyon Aşamaları

Salamanderler diğer omurgalıların aksine hayatları boyunca bacaklarını yeniden canlandırabilirler ve böylece bu olayın nasıl yapılacağını gözlemlemek için benzersiz bir pencere oluştururlar. Bir semenderde başarılı kol bacak yenilenmesi, yara iyileşmesi ile başlayan ve bir rejenerasyon blastomu ile biten erken faz'dan oluşan iki aşamalı bir süreçtir (Şekil 3). Bu embriyo bacak gelişimi sırasında meydana gelen olaylar, ikinci yeniden geliştirme fazı takibinin bir tekrarıdır.

Uzuv rejenerasyonunun sonraki aşaması, uzuv gelişimine eşdeğer olan, blasteminin ortaya çıkmasına yol açan, erken rejenerasyon aşamasına özgüdür.

Rejenerasyonun benzersiz olayları, epidermal hücrelerin yarayı hızla kapatması, farklılaştırmayı uyaran yara epidermisi ve altta yatan kütük hücrelerin arasındaki etkileşimleri ve blastoma neden olan hücre göçünü ve çoğalmasını içermektedir.

İnsan mezenşimal kök hücreleri, erişkin kemik iliğinde bulunan, farklılaşmamış hücreler olarak çoğalabilen ve kemik, kıkırdak, yağ, tendon, kas ve kemik iliği dâhil olmak üzere mezenkimal dokuların soylarına ayırma potansiyeline sahip olan multipotent hücreler olduğu düşünülmektedir.

İnsan mezenşimal kök hücrelerinin özelliklerine sahip olan hücreler, gönüllü donörlerin kemik iliği kaynaklı hücrelerinden izole edilmektedir. Bu hücreler istikrarlı fenotipi göstermektedirler. Bu yetişkin kök hücreleri, sadece adipositik, kondrositik veya osteositik soylarına indüklenebilmektedirler. Kolonilere genişletildiğinde, potansiyellerini koruyan bireysel kök hücreler tespit edilmiştir.

Son zamanlarda, pluripotent kök hücreler insan fetüs dokusundan kültürlenmiştir ve embriyonik germ katmanlarında bulunan çeşitli hücre tiplerine yol açma yeteneğini göstermiştir.

Burada açıklanan mezenkimal hücreler, yüzeylerinde bir dizi markör proteinin varlığı ile kültürde, iyi yayılmış morfoloji ile çoğalma kabiliyetleri ile karakterize edilmiştir.

Sinoviyal kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kemik iyileşmesi üzerine etkileri, ekartasyon ve potansiyel osteojenik etkileri nedeniyle son yıllarda araştırılmaya başlanmıştır. Planlanan *in vitro* araştırmanın amacı, polikaprolakton doku iskeleleri üzerinde kültüre edilecek insan dental pulpa (DPSC) ve folikül (DFSC) dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kemik doku rejenerasyon kapasitesini karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

Şimdiye kadar hastalıkların tedavisine yönelik çeşitli yaklaşımlar uygulanmasına rağmen iyileşme hızına bağlı olaylar, hastalığın tedavisinin önünde önemli engeller oluşturmaktadır. Bu nedenle hasar görmüş sinire bağlı patolojilerin giderilmesinde yeni yaklaşımların geliştirilmesi oldukça önemlidir. Kök hücre alanındaki gelişmeler ve kök hücreye dayalı tedavi yaklaşımlarındaki ilerlemeler sinir doku hasarlarının tedavisinde de yeni ümitlere yol açmaktadır.

Periferik sinir hasarlarında yağ, kemik iliği ve hipokampal nöral kök hücre kullanan deneysel çalışmalarda bazı olumlu sonuçlar elde edilse de problemin çözümü henüz mümkün olmamıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda kök hücre tedavilerinde başarının sağlanması için hasar görmüş bölgenin sahip olduğu mikroçevre ile uygulanan kök hücre kaynağının uygun olması gerektiği vurgulanmaktadır.

Literatürde bu konu ile ilgili çalışmalar az sayıda olsa da giderek önem kazanmaktadır. Ayrıca şimdiye kadar sinir hasarlarının rejenerasyonunda bu alanda herhangi bir çalışmaya da rastlanılmamıştır. Buna göre de bu tez çalışmasının amacı;

insan biyopsi öneklerinden kök hücrelerin izolasyonu, devamlı kültürünün yapılması, karakterizasyonu ve kriyoprezervasyonunu gerçekleştirilmekle, kök hücrelerden yeterli miktarda hücre kitlesi elde edilip ilk kez olarak hasar görmüş sinir rejenerasyonunda temellerine dayalı yeni bir yaklaşım geliştirilmesi ayrıca ileride hücresel tedaviler ve doku mühendisliği çalışmalarında kullanılmak üzere kök hücre kriyobankının oluşturulması olmuştur.

Doku mühendisliği, yeni doku ve organları oluşturmak/onarmak için pek çok disiplinin beraber çalıştığı ve özellikle son yıllarda daha fazla olmak üzere hayli ilgi uyandıran bir alandır. Genel olarak taşıyıcı ve uyarıcı ajanların uygun biçimde kullanılarak dokunun teminini sağlamaktadır.

Sinovial kökenli mezenkimal kök hücrelerin rejenerasyonun, ağız, diş ve çene cerrahisinin en temel çalışma alanlarından biridir. Travma, kronik enfeksiyon, kist ve tümör rezeksiyonları gibi durumlarda defektler oluşmakta ve çoğu vakada kemik greftlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Uygun taşıyıcı üretimi ve klinik kullanıma hazır hale getirilmesi de doku mühendisliği için önemli bir çalışma alanıdır. Bu amaçla pek çok sentetik materyal özellikleri geliştirilerek kullanılmaya devam edilmektedir. Uygulanacak biyomateryalin biyoeriyebilir, biyouyumlu, osteokondüktif ve osteoindüktif özelliklerinin yeterli düzeyde olması hedeflenmektedir.

Güvenilir bir taşıyıcı teminiyle beraber sağlıklı ve kaliteli bir doku oluşumu için uyarıcı hücreler de kullanılmaktadır. Mezenşimal kök hücreler bahsedilen bu tedavi yaklaşımlarında önemli rol üstlenmektedir.

Kök hücrelerin keşfi ve potansiyellerinin anlaşılması üzerine bu alana yönelik ayrılan fonlar ve çalışma sayıları da artmıştır. Ülkemizde de bu alanda artan bir ilgi bulunmaktadır.

Kök hücreler, kendini yenileme kapasiteleri ve başka hücre tiplerine farklılaşabilme özellikleri ile ön plana çıkmaktadırlar.

Vücutta, kordon kanı, plasenta, kemik iliği, yağ dokusu gibi pek çok dokudan elde edilebildiği gibi dental kaynaklardan da temin edilebilmektedirler. Kolay elde edilebilmeleri ve yüksek farklılaşma

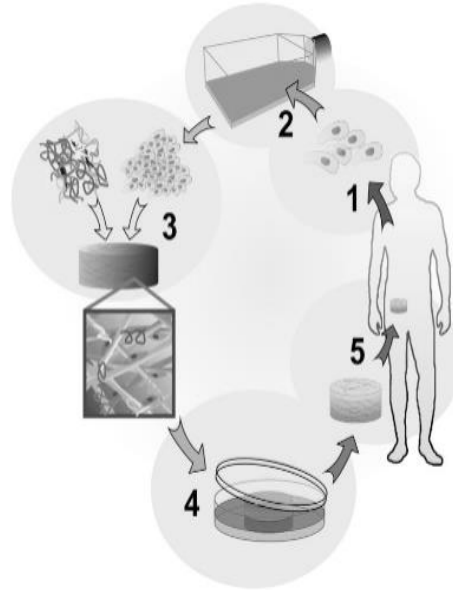
potansiyelleri sinovial kökenli mezenkimal kök hücre kaynaklarını ön plana çıkarmaktadır.

sinovial kökenli mezenkimal kökenli kök hücreler hem yöntem olarak kolay elde edilebilirliği hem de osteojenik farklılaşma kapasitesinin yeterli olduğu pek çok kez gösterilmiş olmasından dolayı önemli bir kaynak olarak görülmektedir.

Bu çalışmada, Artiritik Hasara Spesifik Uyandırılmış Sinovial Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerde oluşturulan standart defektlerin hücreli ve hücresiz yaklaşımlar kullanılarak rejenerasyon incellenmesi yapıldı. Doku mühendisliğinin mezenkimal kök hücre rejenerasyonunda etkinliğinin gösterilmesi ve klinik kullanım için potansiyelinin gösterilmesi hedeflenmektedir.

Dokular, onarım ya da rejenerasyon yoluyla iyileşebilirler. Onarım, doku hasarı meydana geldikten sonra mevcut duruma uyum sağlama durumudur. Kaybedilen doku ile işlev ve yapı olarak farklılık gösterebilmektedir. Rejenerasyon ise kaybedilen dokunun aynı yerde yeniden oluşturulmasıdır. Bu yeni doku, kaybedilen dokunun bire bir aynısıdır.

Hasarlı ve işlevselliğini yitirmiş organların yenisi ile değiştirilmesi fikri doku mühendisliği çalışmalarında önemli bir yer tutmaktadır. Ancak büyük organların oluşturulması şu aşamada pek çok zorluğu da beraberinde getirmektedir. Çünkü büyük yapıların, oluşturulan iskeleler içinde beslenmesi ciddi bir sorundur.



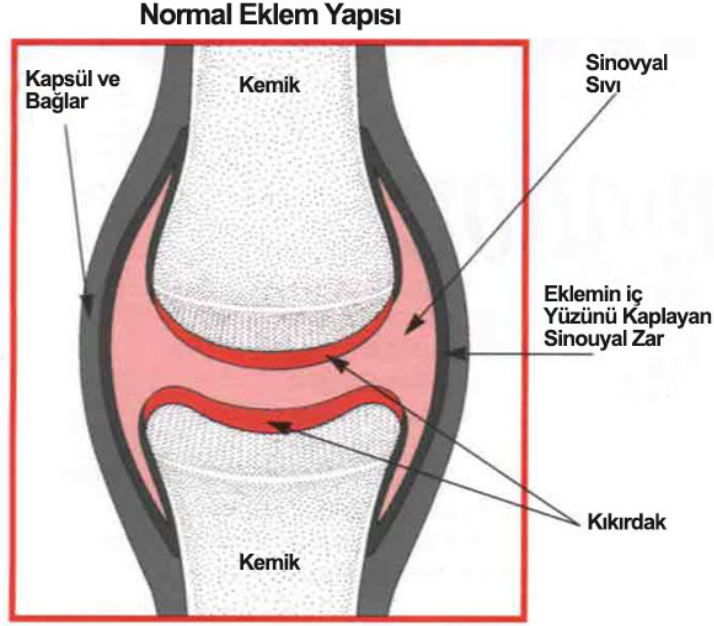
Şekil 4: Kök Hücre temini ve uygulanma döngüsü

Doku kültüründe kullanılan malzemelerin özellikleri;

- 1) Hücrelerin tutunmasını sağlamalı.
- 2) Hücrelerin büyümesini sağlamalı.
- 3) Biyoyumlu olmalı.
- 4) Biyoçözünür olmasına rağmen uygun zamanda çözünmeli ve çözünürken toksik etki oluşturmamalı olması.
- 5) Hücre göçümüne izin vermesi.
- 6) Gözenekler birbiriyle bağlantılı olmalı.
- 7) Mikro gözeneklerle yüzey alanı geniş olmalı.
- 8) Doku tamirine kadar mekanik özelliklerini korumuş olmalı.
- 9) Talep edilen şekilde üretilebilmeli.

2.2. SİNOVİYAL DOKU

Eklemlerin çevresini kaplayan “sinovyum” adlı kalın bir zar vardır. Hareketli bir eklemde çevresindeki kapsülü saran zara denir. Sinovyum, el ve ayaklardaki bazı tendonlara kılıf da sağlar. Eklemi ya da tendonu kayganlaştıran, eklem kıkırdağını besleyen az miktarda, koyu kıvamlı bir sıvı sinovyal sıvıyı salgılar. Sinovyum iltihaplanabilir; eklemde bu durum sinoviyit olarak adlandırılır-ken, tendon kılıfında tenosinoviyit olarak adlandırılır.



2.3. UMBİLİCAL CORD KÖK HÜCRELERİ

Kordon kanı kök hücreleri olarak bilinen bu hücreler +34 CD olup blastomer evresi öncesi en yakın hücreler olarak değerlendirilirler. Bu hücrelerde hiçbir tayin, proliferasyon gerçekleşmemiş olup birçok tedavide kullanılırlar.



2.4. ADİPOSE DOKU KÖK HÜCRELERİ

Kompleks bir canlı olan insan, olağanüstü bir koruma mekanizması geliştirerek zararlı olabilecek etkenlerden mümkün olduğunca kendini uzak tutar ve bunu başarabilmek için de bazı farklılaşmamış hücreleri kullanır. Yani her türlü doku kayıplarında yeniden fonksiyon gösterebilmesinin sırrı sahip olduğu kök hücrelerde saklıdır. Vücudumuzda farklılaşmamış bir hücre olarak bulunan kök hücreler herhangi bir organa yerleştirildiklerinde farklılaşıp o dokunun özelliklerini kazanarak şimdiye kadar bilinen oldukça fazla dokunun yerine geçebilmekte ve bu sayede hastalıkları iyileştirip, dokuları yenileyebilmektedir. Kök hücre kaynağı olarak kullanılan, kordon kanı, kemik iliği ve yirmi yaş dışından sonra bilim adamları insan yağ dokusunda da kök hücre araştırdılar ve yağ dokusunda diğer kaynaklardan çok daha fazla kök hücre bulunduğunu keşfettiler. Bu hücreler üzerinde yapılan in vitro çalışmalar şunu gösteriyor ki bu hücrelerden birçok değişkene bağlı istenen soya yönelik doğrudan kök hücre optimizasyonu yapılabilmektedir.

2.3. EKSTRASELÜLER MATRİKS İNFLAMASYONU (EMİ)

Ekstraselüler matrikste gerçekleşen bu inflamasyon türü her cins alerjik reaksiyonla, otoimmün hastalıklarla ilişkilendirilebilir. Kısaca T hücrelerinin tolerans kaybetmesi sonucu ortamda yayılan IL-1 gibi sitokinlerin ortamda yıkım proteazları salgılatmasıyla gerçekleşir.

Genelde alerjik reaksiyonların başlama sebebi bu tip patogenezdir. Patogenezini iyi anlaşılmasına rağmen genetik ve çevresel faktörler tarafından etkilendiği düşünülmektedir.

EMİ ilişkili hastalıklarda ilk olarak kas iskelet sistemi dokularında akut inflamasyon belirtileri ile başlar ve daha sonra diğer doku ve organ sistemlerini etkilemektedir. Bu tip olgunun genel prevalansı yaklaşık 113/100.000 olarak belirtilmektedir. Ayrıca 15 yaş ve altında insidansı 13,9/100.000 olarak belirtilmiştir.

EMİ’de sık karşılaşılan belirtiler

Sinoviyal kök hücrelere kadar etki eden tiplerinde çocuklarda sabahları eklemlerde tutukluk, yürümede zorlanma, eklemlerde şişlik ve aktivite kısıtlılığı olarak bildirilmektedir. Adipose dokuda gerçekleşenler genel anlamda iltihapla sonuçlanmakta ve umbilical cord dokusunda ise bu durum ekstrem olarak gözlemlenmekte ve anne bebek kan uyumsuzluğunda gözlemlenmektedir. EMİ tanısında kesinleşmiş bir test olmadığı için bu yaş grubunda gözlemlenen eklem yakınması (diğer nedenlerin dışlanması takdirde) büyük önem taşımaktadır.

EMİ tedavisinde amaç, hastalarda kronik enflamasyon yanıtlarını baskılamak ve eklem deformitesini önleyerek normal büyüme gelişimini sağlamaktır.

EMİ Epidemiyolojisi

EMİ'nin insidansı ile ilgili net rakamlar alınmamakla birlikte Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir çalışmada, sadece bir yılda 46 milyon yetişkine ve 15 yaşın altında yaklaşık 300 bin çocuğa EMİ tanısı konmuştur. EMİ'nin tahmin insidansı 4-14/100.000 ve prevalansı ise 1.6-86.1/100.000 arasında değişmektedir.

Genel olarak EMİ kızlarda erkeklerden iki kat daha fazla görülmektedir. Farklı alt tiplerine, yaş ve cinsiyete göre dağılımına bakıldığında Oligoartiküler EMİ kızlarda daha sık görülmekte olup ve Kız/Erkek oranı 3/1'dir. Ayrıca Bu tipin insidansı 2-4 yaş aralığında artış göstermektedir. Sistemik EMİ'da ise cinsiyet farkı bulunmamakta ve bu tipte kız ve erkek oranı eşittir.

Türkiye'de yapılan bir çalışmada EMİ prevalansı 64/100.000 olarak rapor edilmiş ve Ülkemizde yapılan bir çalışmada Oligoartiküler tipi ve poliartiküler başlangıçlı EMİ en sık görülen EMİ tipi olarak saptanmıştır.

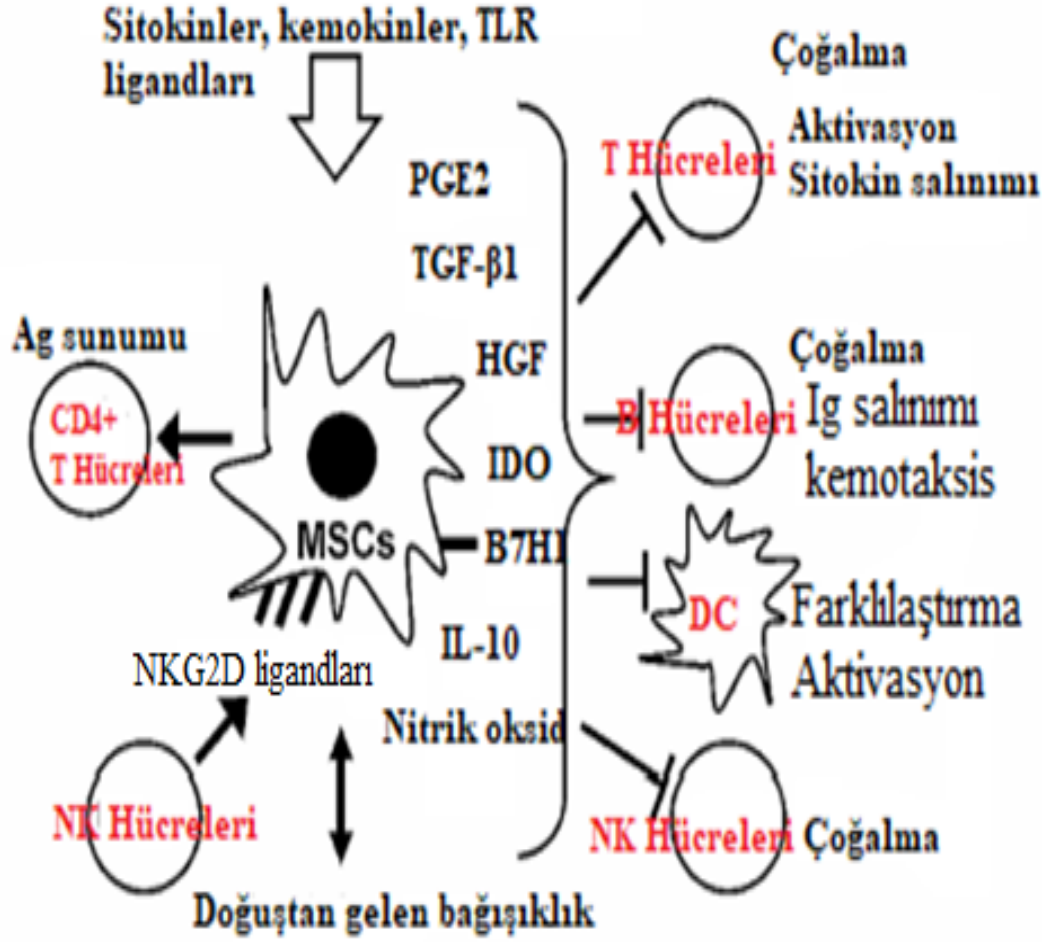
EMİ patofizyolojisinde anormal İmmün düzenleme, sitokin üretimi, İmmünogenetik yatkınlık, viral enfeksiyonlar yer almaktadır (54). Çeşitli nedenler ile uyarılmış olan T lenfositleri T hepler 1(Th1) ve Th2 olmak üzere iki ana alt gruba farklılaşırlar. EMİ'da baskın olan Th2 hücrelerdir. T hücre aktivasyonu eklemlerde ve etkilenen diğer dokularda doku hasarına yol açan B hücre aktivasyonu, kompleman tüketimi ve özellikle IL-6, IL-13, TNF-alfa ve diğer proenflamatuar sitokinlerin belki de özgül genetik allellerin kontrolü altında salınımı gibi çeşitli olaylar zincirine yol açar (24). Bu salınım sonucu hedef eklem üzerinde çeşitli yangısal olaylar başlamaktadır. Yangısal etkileşim sonucu villöz hipertrofi ve hiperplazi ile birlikte subsinoviyal dokuların hiperemisi ve ödemi ile karakterize (24) olan sinovit ve eklem İçi sıvı miktarında artma olmaktadır. Sinoviyumda vasküler endotelial hiperplazi belirgindir (26); T ve B hücreleri, mononükleer hücreler, makrofajlar, dendritik hücreler ve plazma hücrelerinin İnfiltrasyonu ile karakterizedir (24,26). Sinovyal dokuda fazla miktarda proanyojenik, vasküler endotelial büyüme faktörü salınmaktadır (26). Süreğenleşmiş enflamasyon sonucu oluşan sinovyal

hipertrofi ve sinovit ise pannus olarak adlandırılmaktadır. Pannus oluşumu İleri veya kontrol altına alınamayan hastalarda görülür ve eklem kıkırdağı ve çevresindeki kemiğin ilerleyici erozyonu ile karakterizedir (24,26).

T hücre reseptörü ekspresyonu konusunda yapılan çalışmalar eklem sinoviyasında bulunan ve henüz karakterize edilmemiş olan antijenler için özgül T hücrelerinin toplandığını doğrulamaktadır (24). Özgül T hücre popülasyonları zamanla değişebilir, bazen hücrelerin koruyucu olabilen klonal genişlemesi söz konusudur (örneğin belli ısı şok proteinlerine karşı reaktif olanlar gibi) ve tıbbi tedaviye yanıtın artması ile birliktelik gösterir (24,55).

Tedaviye direnç kısmen yüzeylelerinde kronik aktivasyona uygun şekilde moleküller bulunan T hücrelerinin sinoviyuma göçünden kaynaklanabilir. Bu T hücrelerinin toplanması etkilenen çocuklarda daha fazla oranda bulunan belli HLA tipleri sayesinde olur (24). Belli allellerin kalıtılması bu sitokinlerden daha fazla oranda üretilmesine ve bunun sonucunda daha şiddetli hastalığa katkıda bulunur (24).

Sitokinler EMİ'nin alt gruplarına göre değişik roller göstermektedir (56). EMİ'nin tüm alt tiplerinde özellikle TNF-alfa ve İnterferon gama(INF-y) patogeneizde önemli rol oynamaktadır. Bazı çalışmalarda hem serum hem de sinovial sıvıda TNF seviyelerinde artış olduğu gösterilmiştir (57). TNF'nin kronik inflamasyon medyatörü olarak hastalığın patogenezinde rol oynadığını göstermektedir. Seropozitif poliartiküler EMİ'da IL-1 seviyelerinin hastalığın patogenezinde ve eklemdaki İnflamasyondan sorumlu olduğu düşünülür (56). Sistemik EMİ'da IL- 6 miktarının dolaşımında artması sistemik EMİ'da eklem tutulumunun genişlemesi(58), mikrositik anemi ve büyüme geriliği gibi eklem dışı bulguları ile ilişkilidir (A3). Ateşin en yüksek olduğu dönemlerde IL-1 reseptör antagonistinin (IL1-ra) serum seviyelerinde artış olduğu (54), plazma IL-7 seviyelerinde artışın sistemik semptomlar ile ilişkili olduğu bulunmuştur (59). Sistemik EMİ'da serum ve sinoviyal sıvıda TNF alfa düzeylerinde artış olduğu saptanmıştır. Sistemik EMİ'da 'calgranulins' olarak bilinen fagosit spesifik kalsiyum binding proteinlerinin serum konsantrasyonlarının 20 kat artmış olduğu bildirilmiştir (60). Yine bu hasta grubunda serum ve sinoviyal sıvıda Makrofaj İnhibitör Faktör (MİF) düzeyinde artış gösterilmiştir (61). Sistemik EMİ ile HLA ilişkisi gösterilmemiştir (54).



Şekil 5: MSC'lerin immün modülasyon etkileri.

Oligoartiküler EMİ'li hastalarda TNF polimorfizminin anti-TNF tedaviye yanıtı değiştirebileceği belirtilmektedir (62). RF pozitif poliaritiküler EMİ, erişkinde görülen RF pozitif romatoid EMİ ile aynı patolojik değişiklikleri gösterir. Bazı çalışmalarda da entezit ilişkili EMİin, spondiloartropati hastalık grubu ile aynı patogenetiğe sahip olduğu gösterilmiştir (26).

sitokinler doğrudan veya dolaylı olarak ilişkili olabilir. TNF- α , IL-1 β , IL-6 gibi pro-inflamatuar sitokinler katekolaminerjik iletimi modüle edebilir (102), anormal serotonin metabolizmasına ve toksik triptofan metabolitlerinin fazla oluşmasına yol açacak şekilde triptofan metabolizmasını değiştirebilir (103), gen ekspresyonunu değiştirebilir (104) ve hipotalamik-pituiteradrenal aksı aktive ederek anormal strese yanıtına neden olabilir (105). TNF- α ve IL-12 hücrel immünitede rol almaktadır. Özellikle IL-12 artışı, Thelper-1 hücre farklılaşması ve aktivasyonuna, natural killer hücre aktivasyonuna ve Treg hücre aktivitesinin baskılanmasına neden olur. Böylece periferal immün sistem aktivitesinde artışa ve otoreaktif hücrelerin kontrolünde yetersizliğe yol açar. Bu nedenle TS patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir (106; 107). Leckman ve arkadaşları, 46 TS hastası ile 31 sağlıklı kontrol arasındaki geniş bir dizi sitokin plazma seviyelerini karşılaştırdıkları çalışmalarında, TS hastalarında TNF- α ve IL-12 bazal plazma seviyelerinde artış olduğunu bildirmişlerdir (108). Ayrıca tik semptomlarının alevlendiği dönemlerde bu iki sitokinde %50-60 oranında artış olduğunu ve ilave olarak araştırılan tüm ana sitokinlerde genel bir artış olduğunu, bu alevlenmelerle ilişkili artışın PANDAS olmayan hastalarda daha yaygın olduğunu belirtmek gerekir (108). Gabbay ve ark. TS'lu 32 çocuk ve ergende sitokinlerin TS üzerindeki potansiyel rolünü incelemiş; eşlik eden OKB olan hastalarda kontrol grubuna göre önemli ölçüde yüksek IL-12 plazma düzeyleri bulmuştur (109). 12 PANDAS'lı çocuk ile yapılan başka bir çalışmada ise klinik alevlenmeler ile (GABHS enfeksiyonu ile ilişkili olsun veya olmasın) tip1 sitokinler, tip2 sitokinler ve kemokinler arasında ilişki bulunmamıştır (110). Çalışmalar arasındaki bu farklı sonuçlar yöntemsel farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir. IL-2'nin hem T lenfositlerin aktivasyonunda hem de Treg hücrelerin gelişiminde rol oynadığı bilinmektedir (109; 111; 112). Gabbay ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada TS hastaları OKB komorbiditesi olanlar ve OKB komorbiditesi olmayanlar olarak iki gruba ayrılarak IL-2 düzeyleri değerlendirilmiş, sonuçların OKB komorbiditesi olmayan grupta önemli ölçüde daha yüksek olduğu bulunmuştur (109). Daha yakın zamanda yapılan bir başka çalışmada IL-2 seviyesi ile tik şiddeti arasında pozitif korelasyon olduğu gösterilmiştir (111). Monosit kemotaktik faktör-1 (MCP-1)'in TS'li hastaların bazal ganglionlarında arttığı bildirilmiştir (112). MCP-1 monositlerin inflamasyon bölgesine toplayan bir

sitokindir. Böylelikle kan-beyin bariyerinin geçirgenliğini artırır ve muhtemelen bu sayede serumdaki otoantikörlerin bazal ganglion gibi beyin alanları içine girişine izin verir (113). Dört erişkin TS hastasının postmortem incelendiği bir çalışmada; kontroller ile karşılaştırıldığında hastaların bazal ganglionlarında MCP-1, IL-2, IFN, protein tirozin fosfataz reseptör-N (PTPR-N) seviyelerinin önemli ölçüde daha yüksek olduğu bulunmuştur (112). Bu çalışma iki inflamatuvar belirteç olan MCP-1 ve IL-2'nin doğrudan bazal ganglionlarda artışı gösteren ilk kanıttır. PTPR-N'nin tip 1 diyabet gibi otoimmün hastalıklarda bir otoantijen olduğu bulunmuştur. Bu nedenle TS patogenezinde bazal ganglionlar ile ilişkili bir otoimmün sürecin parçası olabileceği öne sürülmüş olsa da bu bulgunun tekrarlanması gerekmektedir (114).

2.11.2 Antikörler Antikörler ile ilgili çalışmalar genel olarak GABHS enfeksiyonu sonrası oluşan otoantikörler nedeniyle olduğu düşünülen PANDAS grubunda yoğunlaşmıştır. Bazal ganglionlara bağlanan antinöronal antikörlerin PANDAS hastalarında arttığı gösterilmiştir (115). Yine PANDAS vakalarının serumunda dopamin D1 ve D2 reseptörlerine karşı antikörler tespit edilmiştir (116). Otoantikörlerin nöronal hücre yüzey antijenlerine bağlanması sinyal iletimini değiştirerek eksitator nörotransmitterlerin salınımına neden olabilir ve bu durum PANDAS'da görülen semptomları açıklayabilir (114). Bazal ganglionlara karşı otoantikörler birçok TS ve PANDAS olgusunun serumunda saptanmıştır (115; 117; 118; 119; 120; 121; 122). Piruvat kinaz M1 yakın zamanda tanımlanmış bir otoantijendir. TS'da streptokok tarafından indüklenen semptom alevlenmeleri esnasında piruvat kinaz antikörlerinin arttığı gösterilmiştir (120). Ancak bu bulgular daha sonra Singer ve ark. tarafından yapılan çalışma ile doğrulanamamıştır (110). Bu durum laboratuvar prosedürlerindeki farklılıklardan veya hasta seçiminden kaynaklanmış olabilir. Otoantikörlerin patojenik olduğunu söyleyebilmek için hedef organda bulunduğu, hayvanlara pasif olarak transferi ile semptomların ortaya çıktığının ve serumdan uzaklaştırıldıklarında hastaların semptomlarında azalma olduğunun gösterilmesi gerekir. Bununla ilgili olarak hayvanlara TS hastalarının serumu verildikten sonra stereotipik davranışların ortaya çıktığını gösteren çalışmalar olmakla birlikte (123; 124), başka bir çalışmada herhangi

bir etkisi olmadığı gösterilmiştir (125). Perlmutter ve arkadaşları PANDAS'lı çocuk ve ergen hastalarda plazma değişimi ve IVIg uygulamasının plaseboda üstün olduğunu göstermiştir (126). Bununla birlikte Hoekstra ve ark. erişkin TS hastalarında IVIg uygulamasını etkisiz bulmuştur (127). Dizinde TS hastalarında beyin spesifik alanlarındaki nöronal antijenlere bağlanan antikörlerin arttığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (128; 129). Wendlant ve arkadaşlarının 20 TS'li ve 21 sağlıklı çocuğun serumlarında Western blot tekniği ile striatum, globus pallidus, kas ve HTB-10 hücrelerine karşı otoantikörleri karşılaştırdıkları çalışmalarında globus pallidus, kas ve HTB-10 hücrelerine karşı benzer sonuçlar elde edilirken özellikle striatal antijenlere karşı antikörlerin arttığı gösterilmiştir (130). TS patofizyolojisinde striatumun rolü düşünüldüğünde, TS patogenezinin otoimmün yatkınlıkla ilişkisi açısından bu bulgunun önemi büyüktür. Özetle antikörler ile ilgili çalışmalar genel olarak bazı antijenlere karşı antikörlerin konsantrasyonlarının arttığını veya nöronal antijenlerle antikörlerin bağlanmasının arttığını ortaya koymuştur. Bazı antijenlere saldıran antikörlerin konsantrasyonları değişebilir ve antijenik ağırlıklar farklılık gösterebilir; bununla birlikte nöronal antijenlere karşı otreaktivitenin arttığı çalışmalarla kanıtlanmıştır. Bu bilgiler TS'nun otoimmün patogenezi için bir açıklama sağlayabilir (113).

2.11.3. İmmunglobulinler Yapılan çalışmalarda TS hastalarının serumlarında bazı immunglobulin (Ig) seviyelerinde değişiklikler bildirilmiştir. Kawikova ve arkadaşlarının 24 TS ve/veya OKB hastası (20 TS, 16 OKB) ile yaş ve cinsiyet açısından eşleştirilmiş 22 sağlıklı kontrolün serumlarında total ve spesifik IgA, IgG, IgM düzeylerini ELİSA ile değerlendirdikleri çalışmalarında; total IgA seviyelerinde ve tubulin hariç bütün antijenlere karşı spesifik IgA seviyelerinde TS ve/veya OKB grubunda sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı azalma olduğu gösterilmiştir (131). Bu çalışmada spesifik IgA, IgM, ve IgG daha önce multipl skleroz (miyelin bazik protein ve miyelin bağlantılı glikoprotein) ve Sydenham koresi (Gangliozid-GM1, lizogangliozid ve tubulin) için tanımlanan antijenlere karşı gelişen antikörlerdir(131). Bu bulgu iki şekilde yorumlanabilir. İlk olarak, IgA düzeyindeki azalma mukozal yüzeylerde immün defansı bozabilir, bu nedenle TS hastaları GABHS ve diğer üst solunum yolu enfeksiyonlarına karşı daha yatkın hale gelebilirler (114). İkinci olarak IgA; IgG-aracılı fagositozu da içeren hücre aracılı immün yanıtın baskılanmasından

sorumludur ve IgA konsantrasyonunda azalma otoreaktif IgG aracılı fagositozda artışla sonuçlanabilir (113). Böylelikle hem TS hastalarında otoimmün hastalıkların gelişmesi riski artabilir (132) hem de oluşan otoantikorlar nedeniyle TS gelişimine bir yatkınlık söz konusu olabilir (131). TS hastalarında IgG ve IgM seviyelerinde azalma bildirilmiştir (133). Bilindiği üzere IgG ve IgM patojenlere karşı immün yanıtın ve fagositozdan sorumludur. Bu Ig'lerin seviyelerindeki azalma immün savunmayı riske atmaktadır ve bundan dolayı enfeksiyonlara artmış yatkınlıkla sonuçlanabilir (133). Pek çok çalışmada TS hastalarında IgE seviyelerinde artış bildirilmiştir (134; 135; 136). Ayrıca TS ile birlikte atopik hastalığı olanlarda daha yüksek IgE düzeyleri bildirilmiş ve alerjik hastalık varlığı ile IgE yüksekliği arasında ilişki olduğu öne sürülmüştür (135; 137). Ig izotiplerindeki bu farklılıkların otoantikorlar ile ilişkisi ve TS populasyonunda daha kırılğan bir fenotip ile ilişkili olup olmadığı, dolayısıyla TS etiyolojisindeki rolü belirsizdir. 2.11.4. Lenfositler TS hastalarında B lenfositler ve T lenfositler ile ilgili sayı ve işlev anormallikleri bildirilmiştir. B lenfositler üzerinde D8/17 ekspresyonunun arttığı çalışmalarla gösterilmiş, bu durumun otoimmün yatkınlığa neden olarak TS patogenezine aracılık ettiği öne sürülmüştür(138; 139; 140). Moller ve arkadaşları 20 erişkin TS hastasında sağlıklı kontrollere kıyasla CD69+ B lenfositlerin ve CD95+ T lenfositlerin arttığını bulmuştur(141). Bu sonuçlar B lenfosit aktivasyonunun arttığını ve aktivasyonun indüklediği T lenfosit apoptozunu göstermektedir(114). TS ve akut romatizmal ateşi olan hastalarda CD19+ B lenfosit oranlarının arttığını bildirilmiştir(142). İnsan ve hayvan çalışmalarında CD19 ekspresyonunun yüksek seviyede otoantikor üretimi ve otoimmün hastalıklar ile ilişkili olduğu gösterilmiştir(143; 144; 145). TS hastalarında CD19+ B lenfosit oranlarının artması otoantikorların oluşmasına yatkınlık oluşturuyor olabilir. Otoimmün hastalıklar otoreaktif T ve B lenfositleri baskılayarak organizmanın kendi antijenlerine karşı immün yanıtı sınırlayan immün tolerans sürecinde kırılmalar nedeniyle ortaya çıkar. Periferik toleransı sağlayan mekanizmalardan biri T lenfositlerin bir alt grubu olan; B lenfositlerin, CD4+ ve CD8+ T lenfositlerin inhibisyonundan sorumlu Treg hücrelerdir(19; 20). Treg hücre sayısının multipl skleroz (146), sistemik lupus

eritematozus (147), tip 1 diyabet(148), romatoid EMİ(149) gibi otoimmün hastalıklarda azaldığı; HBV, HCV, CMV enfeksiyonlarında ve birçok kanser tipinde tipinde arttığı saptanmıştır(20). Kawikova ve arkadaşları TS (n:17), OKB(n:10) ve ve TS+OKB (n:10) olan 37 çocuk ile 9 sağlıklı çocuğun periferal kanda CD4+CD25+CD69- Treg hücre seviyelerini flow-sitometri kullanarak değerlendirmiş ve hasta grubunu 20 ay boyunca takip ederek YGTADÖ skorlarında ≥ 9 puan artışı ve/veya ÇY-BOKÖ skorlarında ≥ 7 puan artış olanlarda (n: 6) yeniden CD4+CD25+CD69- Treg hücre seviyeleri hesaplamıştır. Söz konusu çalışmada; TS ve/veya OKB hastalarında periferal kanda CD4+CD25+CD69- Treg hücre seviyelerinin daha düşük olduğu, bu düşüklüğün orta ve ağır TS ve/veya OKB hastalarında (YGTADÖ ≥ 20 , ÇYBOKÖ ≥ 16) istatistiksel olarak anlamlı olduğu ve semptom şiddeti ile korelasyon gösterdiği bulunmuştur (21). Ayrıca takipler esnasında 6 hastada alevlenme olduğu tespit edilmiş, 6 hastadan 5'inin CD4+CD25+CD69- Treg hücre seviyelerinin alevlenme öncesindeki ölçümlerine göre daha düşük olduğu ancak bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur. Bu bulgular en azından bir grup TS hastasının otoimmün lenfositleri baskılamada Treg eksikliğinden ötürü azalmış kapasiteye sahip olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (21). Dopaminin özellikle, tip 1 dopamin reseptörleri üzerinden (DRD1 ve DRD5) Treg hücrelerin baskılayıcı etkilerini, ayrıca adhesyon ve migrasyon yeteneklerini azalttığı farelerde in vitro olarak gösterilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada Treg hücrelerin efektör T hücrelerine göre DRD1 reseptörünü 4 kat, DRD5 reseptörünü 14 kat daha fazla ürettikleri PCR ölçümlerinde gösterilmiştir (150). Ferrari ve arkadaşları, 15 TS hastası ve 15 sağlıklı kontrolün periferik kan lenfositlerinde dopamin reseptörlerinin mRNA ekspresyonlarını real time PCR kullanarak belirledikleri çalışmalarında TS hastalarında DRD5 mRNA düzeylerinin sağlıklı kontrollere göre daha yüksek olduğunu ayrıca bu artışın OKB eş tanısı olan hastalarda kompulsiyon şiddeti ile korelasyon gösterdiğini bulmuştur (151). TS hastalarında gösterilen dopaminerjik D5 mRNA ekspresyonu artışı Treg hücrelerin fonksiyonunda azalmaya neden olarak otoimmün süreci tetikleyebilir. Özet olarak, TS hastalarında otoimmün yatkınlığa neden olabilecek, hücresel bağışıklıkta bazı değişiklikler olduğunu düşündüren ön veriler vardır. Bu bulgular üzerine yaş veya ilaçların ne derece etkili oldukları da keşfedilmeyi beklemektedir. Ayrıca

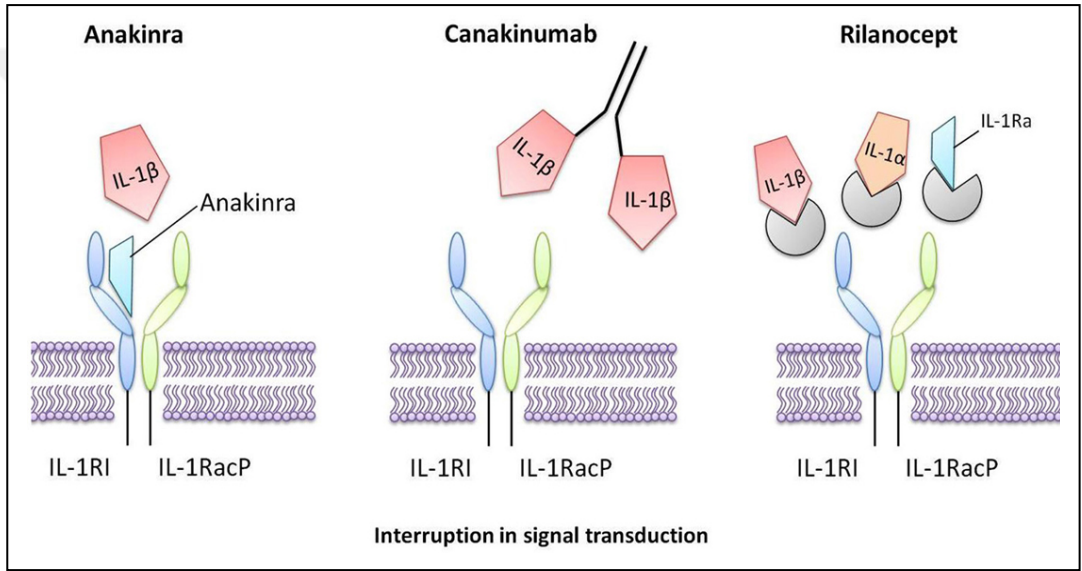
immünolojik sistemleri ile ilgili farklılıklarının olduğu gösterilen TS hastaları ile PANDAS olguları arasındaki mevcut örtüşmenin boyutu da belirsizdir. Elde edilen bulguların yapılacak çalışmalarla tekrarlanmasına ihtiyaç vardır. 2.12. Bağışıklık Sistemi ile İlgili Genel Bilgiler ve Regulator T Hücreler Bağışıklık sisteminin doğal ve edinsel olmak üzere iki bileşeni vardır. Bu iki bileşen konağı enfeksiyonlara karşı birlikte korurlar. Doğal bağışıklık sistemi antijenin yapısından bağımsız olarak birçok antijene karşı ortak olarak kullanılabilen birimlerden oluşur ve inflamatuvar yanıtın ilk basamağını oluşturur. Burada özel bir antijene karşı özgüllük söz konusu değildir, midemizin asit pH'sının mikropları öldürmesi, nötrofiller, makrofajlar ve doğal öldürücü hücreler (NK), kompleman sistem proteinleri gibi birçok mekanizma da doğal bağışıklık sisteminin bir parçasıdır. Edinsel bağışıklık sistemi belli antijenlere özgül olarak gelişir. Humoral ve hücreli bağışıklık olarak ikiye ayrılır. Humoral bağışıklık sistemi antikorları salgılayan B lenfositlerden oluşur. Hücreli bağışıklık ise hücrelerin bizzat kendilerinin öldürme işlemine katıldığı CD8+ T lenfositlerden ve bütün bu bahsedilen mekanizmaları yöneten CD4+ T lenfositlerden oluşur (152). CD4+ T yardımcı lenfositler öncelikle timüste ilk olarak naif T lenfosit olarak oluşmakta ve dolaşıma verilmektedir. Bunun ardından bu hücreler antijenler ile karşılaştıktan sonra uygun sitokin ortamı etkisiyle belli T hücre guruplarına farklılaşmaktadırlar. IFN γ , IL-12, TGF- β yardımcı T lenfositleri (Th) Th1 yönünde farklılaşmaya teşvik eder. Th1 hücreleri makrofajları uyarır ve bütün antiviral inflamatuvar yanıtlarda rol oynar. IL-4 ise, humoral ve alerjik yanıtta rol oynayan Th2 yönünde farklılaşmayı teşvik eder. CD4+ T hücreler arasında immün sistemi düzenleyen ve bu yüzden de regulator T (Treg) hücreler olarak atfedilen bir grup tanımlanmıştır (153). Regulator T hücrelerinin temel fonksiyonu bağışıklık yanıtının gerekmediği zamanda baskılanmasını sağlamaktadırlar. Yani Treg hücreler, T hücre uyarımının başlamasını engellemezler, buna karşın T hücre yanıtının kalıcılığını engellerler. Bu mekanizma özellikle alerjik ve otoimmün yanıtların baskılanmasında ve enfeksiyon sonrasında patojen mikroorganizma temizlediğinde yararlıdır. Regulator T hücreleri (Treg) timüsten doğrudan regulator T hücresi olarak farklılaşmış hücreler (natural Treg) veya efektör T

hücrelerine benzer şekilde timüsten naif T hücresi olarak ayrılmış hücreler (adaptif Treg) olarak ikiye ayrılır. Adaptif Treg hücreler de temel olarak iki gruba ayrılabilirler. Tr1 hücreler IL-10 aracılığıyla etki ederken Th3 hücreler TGF- β aracılığı ile çalışır (154; 155). Natural Treg (nTreg) hücreler timusta self-antijenlere karşı etkisizleştirilirler ve matür nTreg hücreleri timustan periferik lenfoid sisteme salınır. Enfeksiyöz veya otoimmün herhangi bir nedene bağlı olarak ortaya çıkan immün yanıt nTreg hücrelerini enflamasyon alanına çeker. Baskılayıcı etki nTreg hücrelerin hücre-hücre etkileşim yoluyla efektör hücreleri etkisiz hale getirmesi ile ortaya çıkar. CTLA-4 (Sitotoksik T lenfosit antijen-4, CD152) reseptörü ile birleşme hemen her zaman nTreg hücrelerin efektörlere karşı baskılayıcı aktivitesini tetikler (156; 157). Bir diğer etki mekanizması da IL-2 ve diğer gama zincirli sitokinler için yarışarak ve IL-2 üretimini baskılayarak efektör hücrelerin apoptozunu tetiklemeleridir (158; 159). Ayrıca perforin ve granzimler salgılayarak efektörlere karşı sitotoksik oldukları da bulunmuştur (160; 161). Adaptif Treg hücreleri hem kökeni hem de aktivite şekli açısından nTreg hücrelerden farklıdır. Antijenik uyarımın ardından immün yanıt esnasında naif CD4+ hücrelerden, ortamda TGF- β sitokini baskınlığında, ortaya çıkarlar (162; 163). Yani immün yanıtı tetikleyen antijene spesifik olarak ortaya çıkarlar. Adaptif Treg hücreler immün yanıtı sitokinler aracılığı ile baskırlarlar (163). (Bkz. şekil 1) Farelerde bütün CD4+CD25+ Treg hücrelerin düzenleyici aktivitesi olduğu gösterilmiş olmasına rağmen insanlarda sadece yüksek oranda CD25 reseptörü eksprese eden Treg hücreler düzenleyici aktiviteye sahiptir (164) Son zamanlarda IL-7'nin T hücrelerin sağ kalımı ve homeostatik proliferasyonu için gerekli olduğu ve T hücrelerinin büyük kısmında IL7 reseptörünün (IL-7R, CD127) ifade olduğu bulunmuştur (165). İlginç olarak Treg hücreleri homeostatik genişlemeye uğramazlar ve bu reseptörleri üzerlerinde barındırmazlar (165; 166; 167). Bu nedenlerle saf Treg hücre popülasyonu elde etmenin yolu CD4+CD25^{high}CD127^{-/low} hücreleri belirlemektir (167; 168) Bu veriler ışığında çalışmamızda Treg hücre popülasyonunu belirlemek amacı ile CD4+CD25+CD127^{-/low} hücreler belirlenecektir.

Tedavi yaklaşımları: Biyolojik ajanlar

Canakinumab

Monoklonal antikor olarak üretilen bu ilaç IL-1 β antagonisti olarak görev yapan ilaçlardan birisidir. Anafikir olarak çalışma prensibi şekilde görüldüğü gibi IL-1 β lara bağlanarak sinyal transdüksiyonunu bölmektir.



Şekil 6: IL-1 antagonistlerinin çalışma prensibi

2.4. KÖK HÜCRELERDE REJENERASYONLA İLGİLİ GENLER

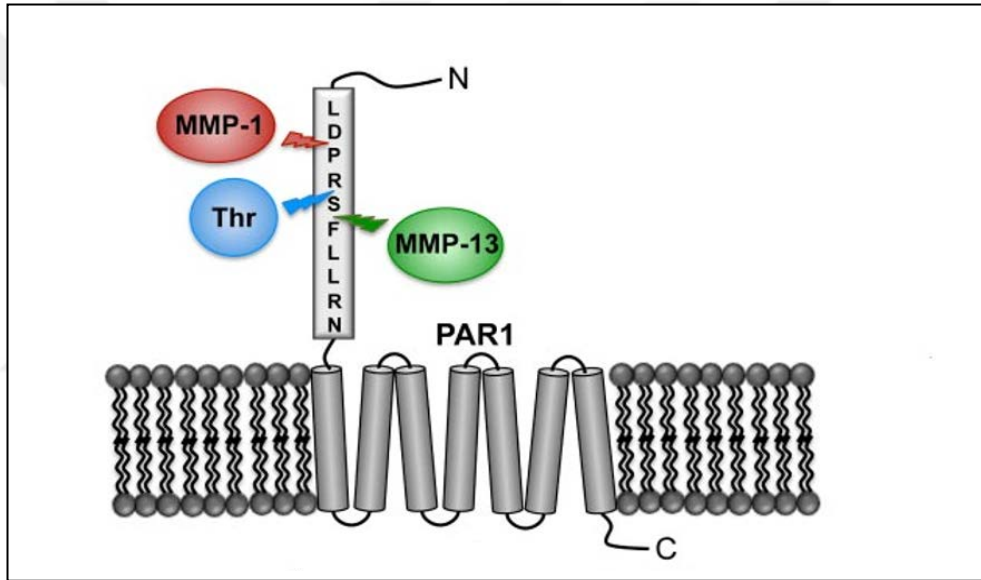
MMP2

Matrix Metalloproteinaz 2 olarak bilinen MMP2 inflamasyonel dемеç sırasında Tip IV ve Tip V kollojenlerin degradasyonuna yol açar. Bu, hücre

migrasyonunu kolaylaştırmaktadır. Sinovial sıvı içinde erozyon başlama sebeplerinin başında MMP proteinlerinin gelme sebebi kollojenlere yangısal zarar zarar görmede bu tip tepki göstermesidir.

MMP13

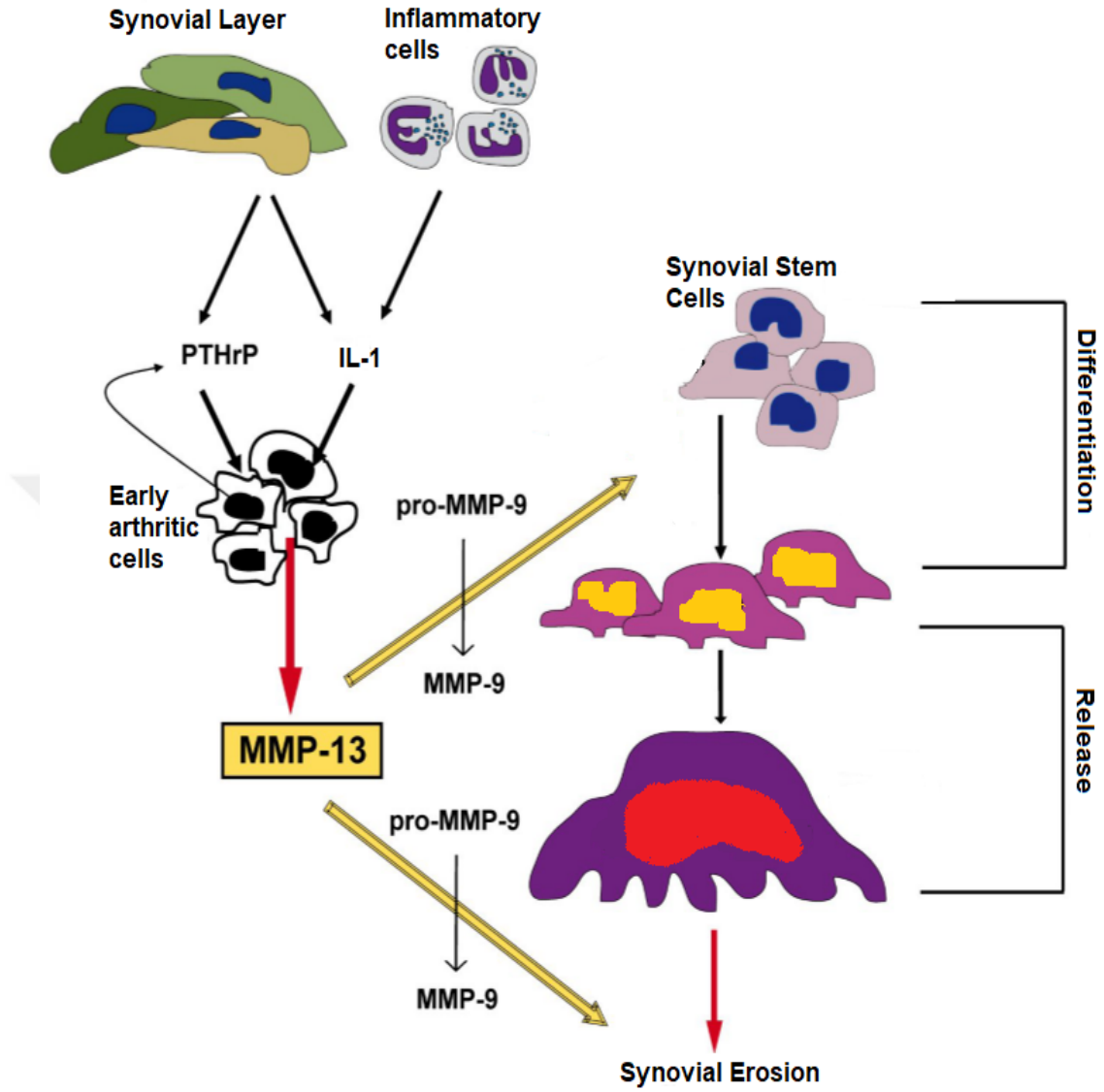
Non-kanonik PAR1 yolağının inhibitörlerinden olan MMP13, G proteini sinyalizasyonunun karışmasına sebebiyet vererek hücre içinde kötü sonuçlar doğurabilir.



Şekil 8: PAR1 proteini MMP13 tarafından non-kanonik yoldan kırılır. Bu durum PAR1 transmembran proteinin işlev kaybı ile sonuçlanır.

PAR1 proteini kemik ve kıkırdak rejenerasyonunda platelet benzeri yapılar oluşturarak rol alır. MMP13, PAR1 proteinin işlevini kaybetmesine EMİ kapsamı içinde sebebiyet verir.

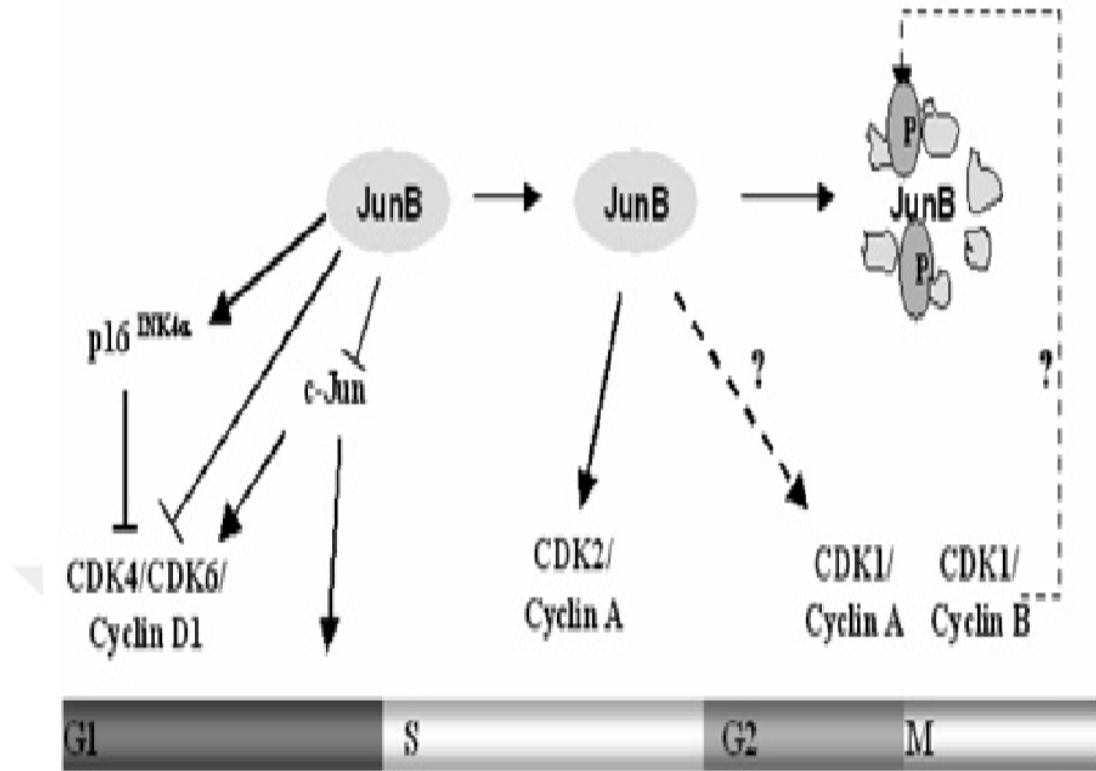
MMP-13 arthrit markeri olarak bilinir bunun sebebi EMİ vakalarında MMP-13 doku hücrelerinde görülme sıklığının artmasıdır.



Şekil 9: MMP-13'ün Stem cell dökülmesine etkisi.

JUNB

JunB, dimerik transkripsiyon faktörlerinin AP1(aktivatör protein) ailesinin bir üyesidir. JunB hücre proliferasyon inhibitörü, tümör supresörü ve senesens indükleyici olarak bilinir.



Şekil 10: JunB overekspresyonu G1 fazında duraksamayı tetiklerken buna karşılık S fazında siklin A/CDK2 ekspresyonunu artırır. Mitoz bölünme tamamlanmasından önce JunB degrade olmak zorundadır. Bu düzgün bir mitoz olmasının yolunu feedback mekanizmasıyla açar.

MEPE

Matriks Ekstrasellular Fosfolipoprotein olarak bilinen MEPE, kemik ve kıkırdak metabolizması regülatörü olarak iş yapar. Stabilize olmamış fraktal yaralanmalarda ve ya yangısal zararlarda komşu bağ dokularda eksprese edilmeye başlanıp direkt olarak bir kaskad gibi kıkırdak ve kemik hücreleri arasında da sentezlenmeye başlanır.

Yaralanma ve yangısal dемеç başlangıcında endokonral osifikasyon yolağı üzerinden iyileşme başlarken komşu hücreler tarafından MEPE ekspresyonu artar,

daha sonra kıkırdak hücreleri arasında da başlayan bu ekspresyon artışı yaralı bölgelerin rejerasyonu için gerekli kök hücrelerin migrasyonunu başlatır. Eğer yaralanma kemikte ise yine de kıkırdak hücresi oluşumu gözlenir ancak hücrelerinin yerini MEPE ekspresyonu azalması sonucunda kemik hücreleri almaya başlar.



BÖLÜM II

3. GEREÇLER VE YÖNTEM

Tez deneyimizin yapılması için basitçe Hücrelerimiz açılacak, kültürlenecek, ilaç manipülasyonuna ve farmakolojik modülasyona maruz kaldıktan sonra hücre ekstraktlarından RNA elde edilip Reverse Transkriptaz aktivitesiyle cDNA eldesi ve Real-Time PCR ile elde edilen ΔC_t değerlerinin ekspresyon analizinde yorumlanması.

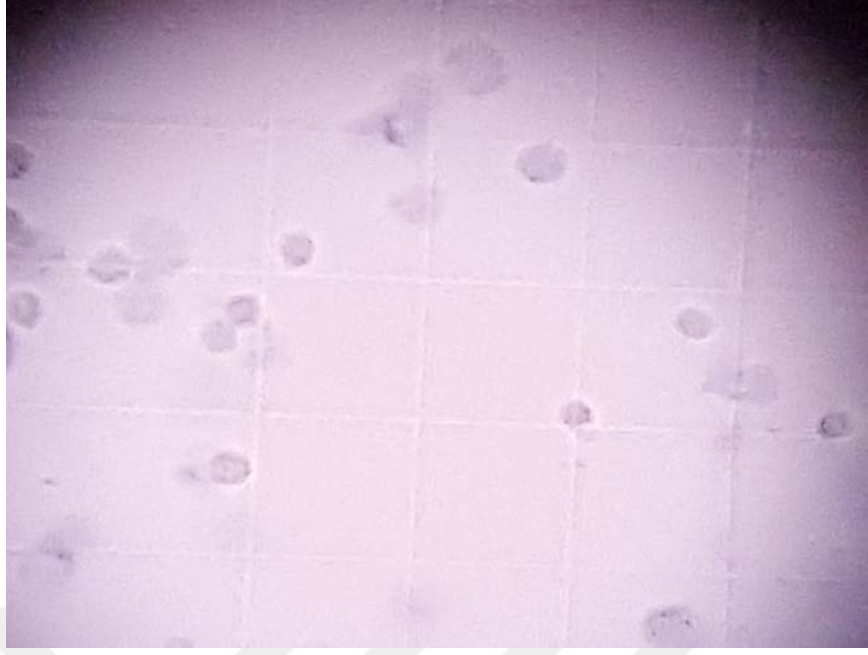
3.1. KÖK HÜCRE KÜLTÜRLENMESİ

HÜCRE HATTININ AÇILMASI

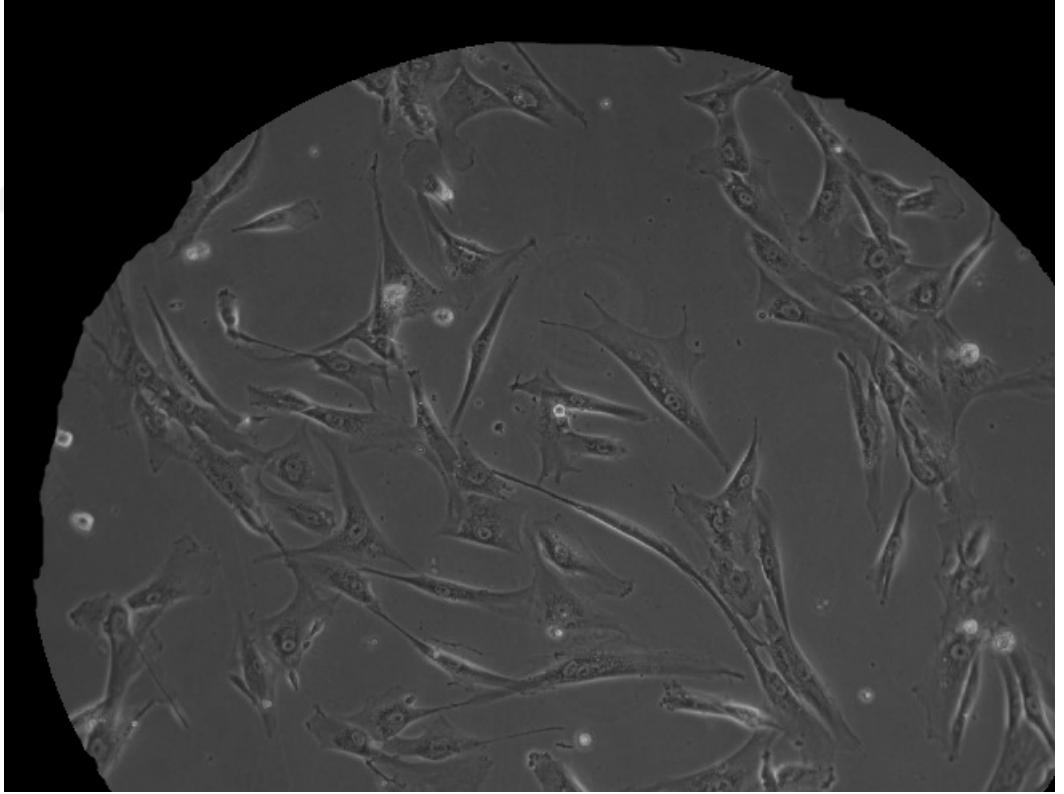
1-) Celprogen firmasından sipariş edilen Sinoviyal kökenli kök hücreleri(katalog numarası 36042-13) ve GENKÖK'ten Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL'un katkılarıyla alınan Umbilical Cord ve Adipose Tissue kök hücre kültürlerini ürün protokolüne göre kültürleyip plate ortamına adapte edildi.

Flask hazırlanırken, hücre kültürlenecek her 25 cm² alan için 5ml RPMI kullanıldı ve 37C⁰, 5% CO₂ ayarlanmış inkübatöre hücreleri eklemeye yarım saat kala yerleştirildi ki medyum sıcaklığa alışsın.

Bu sırada sinoviyal kültür için donmuş hücre vialini 37C⁰'lik suda kibarca çalkalayarak erittik. Erime işlemi yaklaşık 1 dakika gibi kısa sürede bitirildi ki DMSO zehirlenmesi kaynaklı hücre kaybı yaşanmasın. Kültürlenecek flask için 1ml complete medium miktarda konikal tüpe aktardık.

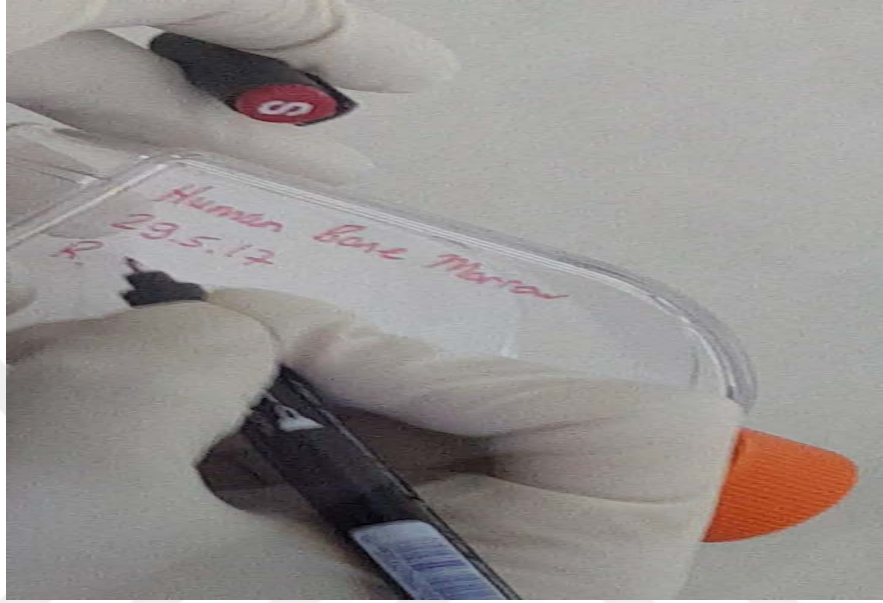


Şekil 11: Kayıp yaşanmadığını kanıtlamak için Tripan-Blue boyama



Şekil 12: Umbilical Cord kök hücrelerinin mikroskop görüntüsü

Cryovial tüpten konikal tüpe steril bir pipetle aktarım yapıldı. Kibarca pipetaj yapılarak süspansiyon homojenize edildi ama hücre canlılığını tehlikeye atacağından santrifüj yapılmadı. Sonra 1'er ml hücre süspansiyonu ilk basamaklarda hazırlanan ve önceden ısıtılmış flaska kondu. Birkaç kere pipetaj yapılarak hücrelerin eşit bir şekilde dağılması sağlandı. Yeterli konfluensiye gelmesi yaklaşık olarak 37⁰C, %5 CO2 koşullarında 24 saat sürdü.



2-) Ekimden tam 1 gün sonra, flasklar inkübatörden çıkarıldı ve Toma lamı yardımıyla sayım yapıldı. Tüketilmiş medyum monolayere pH değişikliğinden ve artık madde kirliliğinden dolayı zarar vermeden alındı. Yerine her 25 cm2lik kültürlenen yüzey için 5ml'lik mediumumuzu eklendi ve inkübatöre geri kondu. Bu işlemden 1 ila 2 gün sonra tekrar konfluensi için mikroskop altında sayım yapıldı. Yeterli konfluensiye ulaşması yaklaşık 2 gün sürdü.

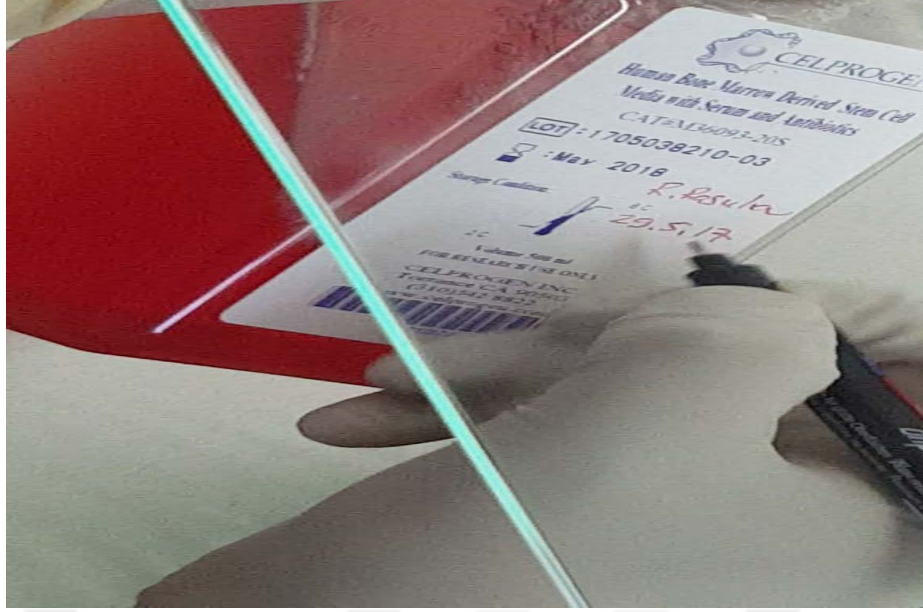
KÜLTÜRÜN SUBKÜLTÜRLERE AYRILMASI

3-) Flaskın doluluk oranı %80e vardıktan sonra subkültürleme işlemi yapıldı. Primer hücre kültürümüz %95 oranında adheziv ve kalan hücre kısmı da süspanse halde kültüre olduğu yazdığı için hücrelerimizi flasktan ayırırken her iki tip kültür ayırma yoluna gidildi.



Flaskta süspans halde bulunan besiyeri pipetle çekilip bir falcon tüpüne alındı. Daha sonra flask tabanı PBS ile yıkanıp ölü hücrelerden arındırıldı. Ardından 75 cm² flaskımıza her 25 cm²'sine 1 mL olacak şekilde tripsin eklenmesi gerekirdi ancak kök hücrelerimizin ayrılmaya çok istekli olduğunu kültürlerken anladığımız için sadece 1.5 mL tripsin ekleyip 37 C⁰deki inkübatöre 1 dakikalığına koyduk. 1 dakika dolar dolmaz inkübatörden çıkardığımız flasklarımızın içine mediumumuzu eşit miktar ekleyerek tripsini inhibe ettik. Hücrelerimiz artık sıvının içinde tabandan ayrılmış biçimde süspans halde bulunuyorlardı.

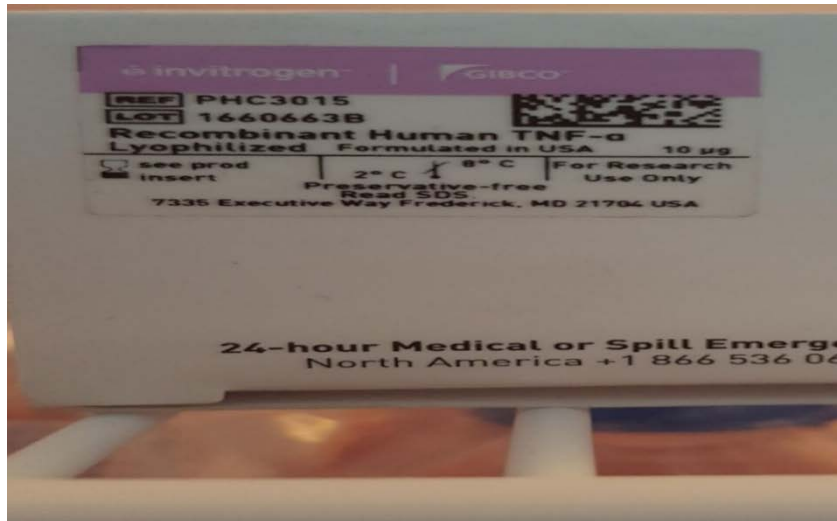
Hepsini 15 mL'lik falcon tüplere aldıktan sonra 1000 RPMde +4 C⁰ derece 2 dakika santrifüj ettik. Falcon tüplerin üstünde kalan süpernatantı attıktan sonra pelletimizin üstüne 3mL besiyeri koyarak hafifçe salladık. Hücrelerimiz tekrar ekilmeye hazır hale geldi.



4-) 2 falcondan alınan örneklerle Toma lamında sayım yaptıktan sonra cm^2 'ye 5k görülebilir hücre gelecek şekilde yeni $75cm^2$ 'lik flaskımıza ektik. Flaskımızı tekrar inkübatör koşullarına bıraktık.

3.2. KÜLTÜRLERİN MANİPÜLASYONU

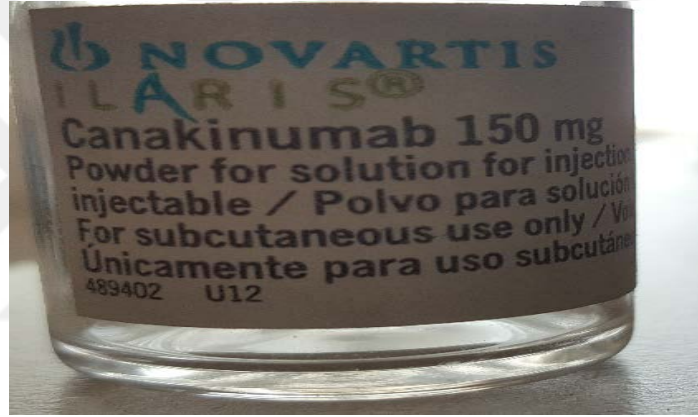
5-) Kültür toplam 36 well manipülasyon 3 well placebo kültürü olacak şekilde ayrıldı.



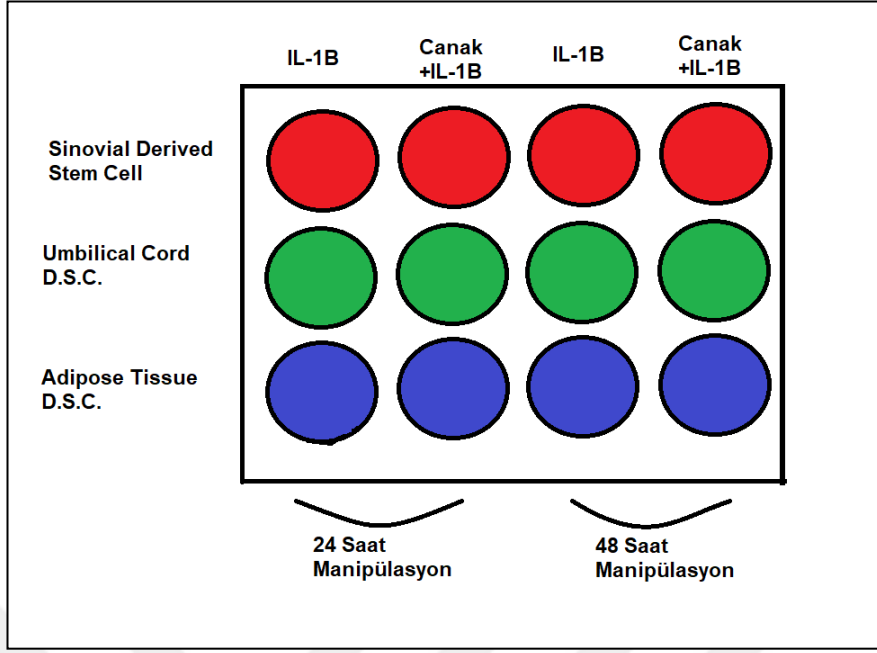
Wellerin hepsinde IL-1(25 cm²ye 5 ng/ml) olacak miktarda kullanıldı. Bununla birlikte toplam 18 wellde IL-1B antagonisti olan Ilaris Canakinumab aynı miktarlarda eklendi. Bu miktarlar bir kültürün inflamasyon göstermesi için maximumdur. Deney gereği 24 saat inkübe edilecekler 24 saat dolunca D-PBS ile yıkayıp ayrılma işlemine tabi tutulur ve 48 saatlik inkübe kültürler için plate tekrar inkübasyon cihazına yerleştirilir.

KULLANILAN İLAÇLAR ve DÜZENEK

Düzenekte kullanılan sitokin IL-1, 3 patogenez yolağının da kilit noktası ve nihai varış istasyonudur.



Farmakolojik modülasyon manipülasyonu için kullanılan bu sitokinin antagonisti olan Canakinumab monoklonal antikoru **şekil-12**'de görüldüğü gibi ortama eklenmiştir. Bu düzenek uyumlu sonuç vermesi ve sağlaması için toplam **3 farklı 12 kuyucuklu plate üzerine** kurulmuştur. Bunun yanı sıra 3'er adet placebo kültür kültürlenmiştir her doku için.



Ş
ekil
12: 6
Kuy
ucuk
lu
plate
üzeri
nde
dene
y
düze
neği

3.3. RNA İZOLASYONU VE CDNA ELDESİ

RNA İZOLASYONU VE ÖLÇÜMLERİ

Kültürlerin hepsinden birer örnek alındı. Alınan örneklerden RNA izolasyonu için Invitrogen invitrogen RNA Mini Kit kullanıldı. RNA elde edildikten sonra cDNA sentezi için Applied Biosystems Taqman Reverse Transcription Reagents kiti kullanıldı. Real-Time PCR da Applied Biosystems Taqman Universal PCR Master Mix kullanıldı. RT-PCR reaksiyonları ABI 9700 thermal cycler'da gerçekleştirildi. Kullanılan kitle önerilen işlem adımları aşağıdaki sıraya göre uygulandı.

Tüplerin içerisindeki hücre örneklerinin içine 0.3 ml 2-merkaptoethanol ile hazırlanmış Lysis Buffer eklendi. RNase-free pipet ucu yardımıyla tüpün içindeki karışımı yavaşça birkaç defa pipetleme yapılarak örnekler Lysis Buffer içinde parçalandı. 2 dakika 12000g'de santrifüj yapıldı, süpernatant yeni RNase-free tüpe aktarıldı. Pellet uzaklaştırıldı. Süpernatantın her volümüne bir volüm %70 etil alkol eklenir. Hazırlanan mix dikkatlice vorteks ile karıştırıldı. Örneğin 700µl'si Spin Cartridge kolonuna aktarıldı. 12000g'de 15 saniye oda

sıcaklığında santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kolonun altındaki Collection tüpleri değiştirildi. Örneklerin hepsi bitene kadar 4. ve 5. adımlar tekrarlanır. Her bir Spin Cartridge kolonuna 700µl Wash Buffer 1 eklenir. 12000g'de 15 saniye oda sıcaklığında santrifüj edildi. Santrifüj sonrası Collection tüpleri değiştirildi yenisi takıldı.

RNA İZOLASYONU

1. 500µl etanol ile hazırlanmış Wash Buffer II eklenir.
2. 12000g'de 15 saniye oda sıcaklığında santrifüj edildi. Collection tüp atıldı yenisi takıldı.
3. 8. ve 9. Adımlar birkez daha tekrarlandı.
4. RNA tamamen membrana tutunsun diye 12000g'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Sonrasında collection tüp atıldı ve kolon RNA'yı saklayacağımız yeni tüpe takıldı.
5. 30-3 ×100 µl RNase- free su kolonun membranına tam merkeze eklendi.
6. Oda sıcaklığında 1 dk inkübe edildi.
7. 12000g'de 2 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilerek sonuçta RNA elde edilmiş oldu.

İzole edilen RNA'nın konsantrasyonuna NanoDrop dijital spektrofotometre cihazı kullanılarak belirlendi ve izolasyonun hemen ardından cDNA sentezi gerçekleştirildi. RNA'nın geriye kalan kısmı -80'de saklandı.

REVERSE T.-PCR İLE CDNA ELDESİ

RNA elde edildikten sonra Applied Biosystems Taqman Reverse Transcription Reagents kiti kullanılarak cDNA elde edildi.

Bileşenlerimiz;

10×R.T Buffer 5mg/cl

MgCl₂ 11 mg/cl

25×dNTP's 2.5 mg/cl

10×Random Hexamer 2.5 mg/cl
RNase Inhibitor 3 mg/cl
Multiscribe Reverse Trans. 1.25 mg/cl
dH₂O 14.75 mg/cl
Kalıp RNA 10 mg/cl

Yukardaki tabloya göre hazırlanan karışım aşağıdaki tabloda bulunan sıcaklık ve süre bilgilerine göre thermal cycler ayarlandı ve tüpler yerleştirildi.

260C 10 dk 1 Döngü

420C 60 dk 1 Döngü

950C 5 dk 1 Döngü

+40C ∞ olacak şekilde ayarlandı.

Thermal cycler'daki program bittikten sonra cDNA'lar hemen buz üzerine alındı. Daha sonra bu sentezin gerçekleşip gerçekleşmediğini ve ortamda herhangi bir genomik DNA'nın kalıp kalmadığını kontrol etmek için aşağıdaki tabloya göre PCR reaksiyon karışımı hazırlandı. Bileşenler ve miktarları ;

cDNA 5µl

10×PCR Buffer 2.5 µl

Gold MgCl₂ (25mM) 2.5 µl

dNTP 0.5 µl

Primer- forward 2 µl

Primer – reverse 2 µl

Amplitaq gold (5U/ µl) 0.3 µl

DNAaz-RNAaz free su 10.2 µl

Toplam 25 µl

PCR ÜRÜNLERİNİN AGARUZ JEL İLE ELEKTROFEZİNDE KALİTE KONTROLÜ

cDNA manipülasyona uğramış genlerinizin primeri kullanılarak PCR ile çoğaltıldı ve PCR ürünleri %2'lik (w/v) agaroz jelde (Sigma Co., S.Louis, MA, USA) elektroforeze tabi tutuldu. Elektroforez işlemi için agarozdan 2 gr tartılarak 100 µl 1 × TBE tamponundan (10 × TBE Sigma Co., Blue View Nucleic Acid Stain) manyetik karıştırıcıda boncuk kullanılarak karıştırıldı. Bu karışım mikrodalga fırın kullanılarak eritildi. Manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak 60°C'ye kadar soğutuldu ve üzerine 10 µg/ml konsantrasyonunda etidyum bromür çözeltisinden (Sigma Co., S.Louis, MA, USA) solüsyonundan 7 µl ilave edildi. Bu agaroz solüsyonu önceden hazırlanmış elektroforez tankının (Owl Inc, Heidelberg, Germany) taraklar yerleştirilen kamerasına döküldü ve sertleşinceye kadar beklendi. Üzerine 1×TBE tamponu eklendikten sonra taraklar çıkarıldı. 2 µl cDNA, 1 µl 1×6 yükleme solüsyonu ve 3 µl su ile karıştırılarak jele yüklendi. Elektroforez EC 105 cihazında (EC Apparatus Co, USA), güç kaynağı 100Mv-80Ma koşullarına ayarlanarak 30-40 dakika süreyle uygulandı. Jeldeki cDNA, ultraviole transiluminatöründe (Vilber Inc, Lourmat France) baz sayısı bilinen standart DNA markırı (Hae III, Fermentas) ile karşılıklı olarak yüklenip, Syngene In Geneus Jel kamera sistemi kullanılarak görüntülendi.

3.4. EKSPRESYON ANALİZİ

RT-PCR İLE cDNAların çoğaltımı sırasında Ct değeri ölçümü

Gen ekspresyon çalışmasına Hücre kültür örneklerden RNA elde ettikten sonra RNA eldesi invitrogen RNA Isolation Kit'i ile gerçekleştirildi. RNA elde ettikten sonra miktarı NanoDrop ile ölçülür. Elde edilen RNAdan cDNA elde edilir(c.DNA sentez kiti) . MEPE, JUNB, MMP13, MMP2 genleri için TaqMan real time PCR

hazır primer- prob ısmarlandı. TaqMan 2X RT-PCR kiti kullanarak her gen için hazırlanan karışımlar ABI7000 otomatik RT-PCR makinesine yüklendi. House keeping gen olarak ACTB kullanıldı. Ct değerleri elde edilerek ekspresyon değerleri karşılaştırıldı.

Real-Time PCR, EMİ hasar taklidi yapılmış grupla kontrol grupları arasındaki hedef genlerin mRNA miktarındaki değişimi gözlemek için gerçekleştirildi. Real-Time PCR reaksiyonu için Applied Biosystems Taqman Universal PCR Master Mix kullanıldı. Reaksiyonlar ABI PRISM 7000 cihazında gerçekleştirildi. PCR reaksiyonu sırasında amplifikasyon işlemi gerçekleştikçe TaqMan probdan salınarak serbest kalan FAM boyasının verdiği floresans Real-Time PCR cihazı tarafından kaydedilerek her örneğin başlangıç konsantrasyonuna göre vermiş olduğu Ct değerleri yine cihaz tarafından otomatik olarak hesaplandı. Amplifikasyon ABI PRISM 7000 cihazının bilgisayarından eş zamanlı olarak izlendi.

Karışım	Miktar	Son Konsantrasyon
ABI TaqMan 2x PCR master mix	25µl	1x
Forward primer (10µM)	4 µl	800nM
Reverse Primer (10µM)	4 µl	800nM
Prob (10µM)	1 µl	200nM
RNase-free su	11 µl	
cDNA	5 µl	
Toplam	50 µl	

Reaksiyon karışımlarının hazırlanmasında tablodaki bilgiler kullanılarak her bir gen (MEPE, JUNB,MMP2,MMP13) için ayrı olan primer ve problemler kullanılarak

ayrı karışımlar hazırlandı. Örneklerde cDNA olmadan toplam olarak örnek sayısı kadar mix hazırlandı. Hazırlanan mix RT-PCR optik tüplere tek tek sırayla 45µl dağıtıldı. Daha sonra dağıtılan karışımların üzerine sırasıyla 5µl cDNA örnekleri eklendi. Tüplerin optik kapakları kapandı ve ABI PRISM 7000'e yerleştirildi.

Döngü sayısı	Sıcaklık	Zaman	Aşama
1	50 ⁰ C	2 dakika	UNG enzim inkübasyon
1	95 ⁰ C	10 dakika	AmpliTaq gold enzim aktifliği
40	95 ⁰ C	15 saniye	Denatürasyon
	60 ⁰ C	1 dakika	Bağlanma

ABI TaqMan 2x PCR master mix kullandığımız için içerisinde olan UNG enzimin aktifleşmesi için 50⁰C'de 2 dakika olan protokolü kullandık.

KULLANILAN PRİMERLER

MMP 2 GEN PRİMER VE PROB DİZİSİ

MMP2-F-5' -AGAGAACCTCAGGGAGAGTAAG-3'

MMP2-R-5' -CCTCGAACAGATGCCACAATA-3'

MMP2-FAM-TCTGTCCTGTAGAAAGAGCCCTGAAGA- TAMRA

MMP13 GEN PRİMER VE PROB DİZİSİ

MMP13-F-5' -GTAACCTCTGCCTCCTGTATTG -3'

MMP13-R-5' -Reverse TAGTGGCACATGCCTGTAATC-3'

MMP13-FAM-TCTCATGTCTTGTGTCTCAGTCTCCCA-TAMRA

MEPE GEN PRIMER VE PROB DIZISI

MEPE-F-5' - TGGCCTGAGGATGTCAATTTAT-3'

MEPE-R-5' -TGAGAGCTGCGCCATATTC-3'

MEPE-FAM- AGGGTTTGAGGATGGAGATGATGCT-TAMRA

JUNB GEN PRIMER VE PROB DIZISI

JUNB-F-5' -TCTACCACGACGACTCATACA-3'

JUNB-R-5' -GGCTCGGTTTCAGGAGTTT -3'

JUNB-FAM-TGGTGGCCTCTCTCTACACGACTA-TAMRA

ACTB GEN PRIMER VE PROB DIZISI

ACTB-F-5' -GGATCAGCAAGCAGGAGTATG-3'

ACTB-R-5' -AGAAAGGGTGTAACGCAACTAA-3'

ACTB-FAM-TCGTCCACCGCAAATGCTTCTAGG-TAMRA



SONUÇLARIN YORUMLANMASI

Real-Time PCR için kullanılan cihaz, termal döngüler sırasında örneklerin floresans miktarını ölçer ve böylece Real-Time deneyleri hem kantitatif hem de kalitatif ölçümler için kullanılabilir. Karşılaştırmalı CT metodu ile kontrol ve model grupları arasındaki gen ekspresyon farklılıklar hesaplanarak sonuçlar $\Delta\Delta C_t$ olarak yorumlanmıştır.



BÖLÜM III

4. BULGULAR

Deneyler sonucunda 9 plate içinde toplam 36 kuyucuk ve 3 blank hücre kültürümüzden RT-PCR sonucunda bazı değerler elde ettik. Deneylerimizin anlamlı olması için en az 3'er örnek kullandığımız için T-testine gerek duyulmadı.

$\Delta\Delta Ct$ hesabı ve üzerinden gen ekspresyonu tayini şu hesaplarla yapılır;

$$\Delta\Delta Ct(\text{hedef gen}) =$$

$$[\Delta Ct_{\text{Hedef kültür}} - \Delta Ct_{\text{Kontrol kültür}}]$$

$$\Delta\Delta Ct(\text{h.g}) =$$

$$[(Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{ref gen}}) - (Ct_{\text{Hedef gen}} - Ct_{\text{ref gen}})]$$

Ekspresyondaki katlanma değişimi(Fold Change);

$$2^{-\Delta\Delta Ct(\text{hedef gen})}$$

UMBILICAL CORD $\Delta\Delta Ct$				
	JUNB	MEPE	MMP13	MMP2
PLACEBO	6,7837	7,1417	8,5659	8,7341
24 SAAT IL-1B	4,5745	7,1437	8,5741	8,7454
24 SAAT - ILARIS	5,7572	7,1274	8,5676	8,9641
48 SAAT IL-1B	3,4752	7,2361	8,5727	8,7894
48 SAAT - ILARIS	7,5767	7,2211	8,5994	8,9887

ADIPOSE TISSUE $\Delta\Delta Ct$				
	JUNB	MEPE	MMP13	MMP2
PLACEBO	8,7947	7,3695	8,5452	8,7633
24 SAAT IL-1B	7,7652	6,6548	6,5477	5,8965
24 SAAT - ILARIS	7,5477	6,5747	7,3564	6,3645
48 SAAT IL-1B	6,5457	5,5854	6,3746	5,7948
48 SAAT - ILARIS	7,5758	7,3264	7,4675	6,3794

SINOVIAL TISSUE $\Delta\Delta Ct$				
	JUNB	MEPE	MMP13	MMP2
PLACEBO	7,1232	7,1232	8,3123	8,1278
24 SAAT IL-1B	6,4147	6,5458	5,5878	5,5894
24 SAAT - ILARIS	6,9515	7,3221	6,5965	6,5878
48 SAAT IL-1B	5,3541	6,4213	5,5458	5,5965
48 SAAT - ILARIS	6,3465	7,3545	7,1879	6,5217

Tablo 2: Ct Değerlerinin dokulara göre sınıflandırılmış hali

FOLD CHANGE HESAPLARI

	JUNB UC	JUNB ATSc	JUNB STSc
PLACEBO	0,0091	0,0023	0,0072
24 SAAT IL-1B	0,0420	0,0046	0,0117
24 SAAT - ILARIS	0,0185	0,0053	0,0081
48 SAAT IL-1B	0,0899	0,0107	0,0244
48 SAAT - ILARIS	0,0052	0,0052	0,0123

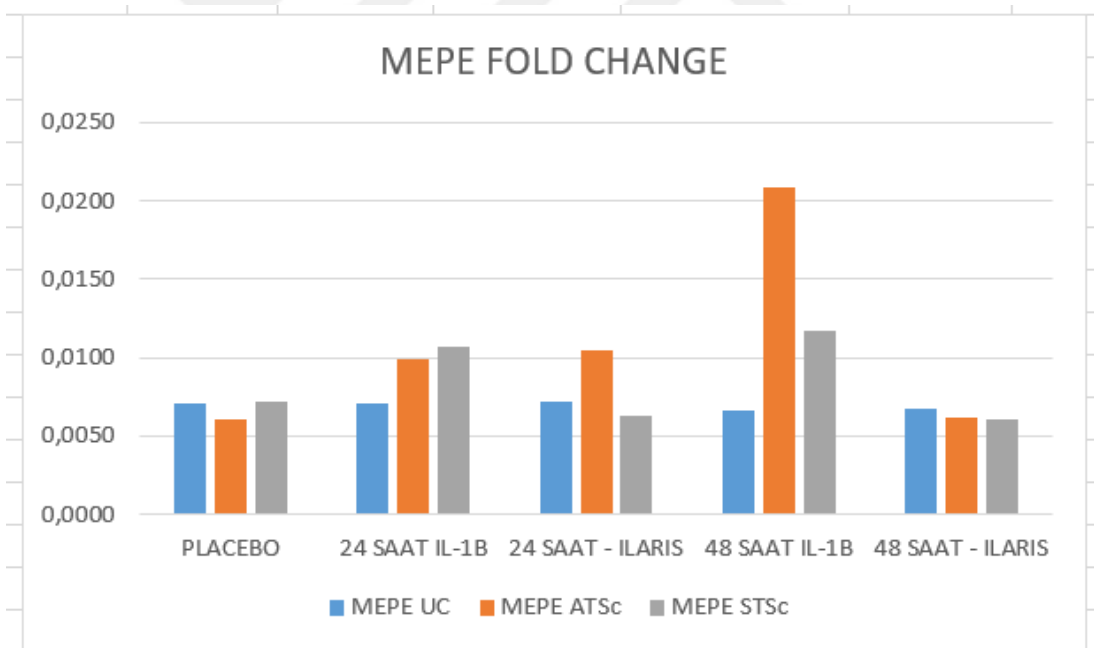
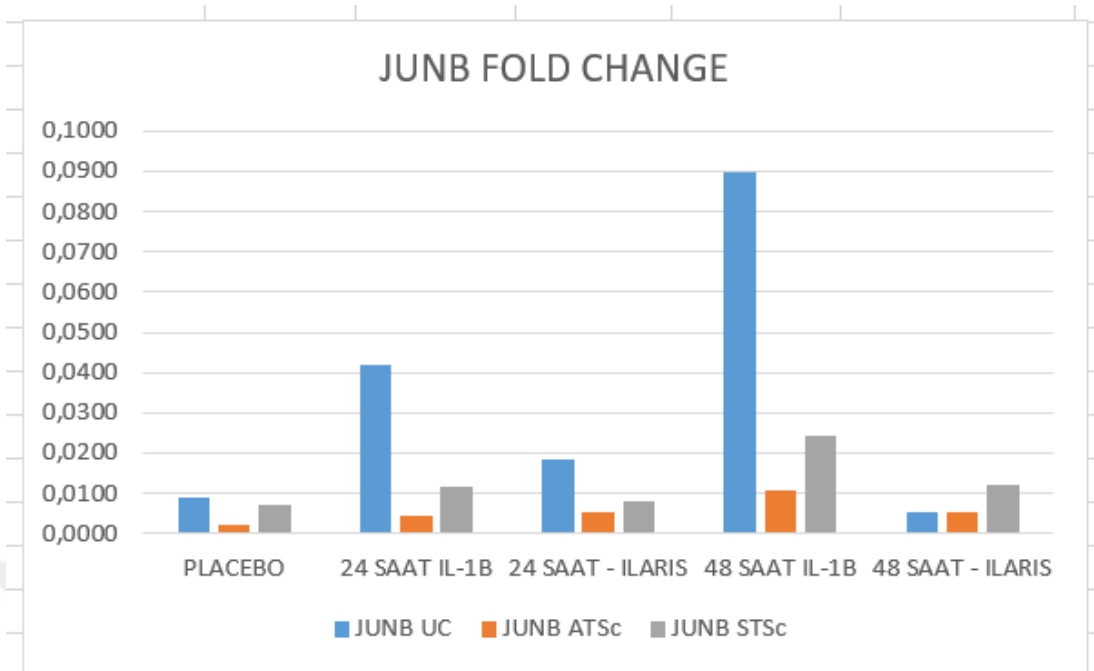
	MEPE UC	MEPE ATSc	MEPE STSc
PLACEBO	0,0071	0,0060	0,0072
24 SAAT IL-1B	0,0071	0,0099	0,0107
24 SAAT - ILARIS	0,0072	0,0105	0,0062
48 SAAT IL-1B	0,0066	0,0208	0,0117
48 SAAT - ILARIS	0,0067	0,0062	0,0061

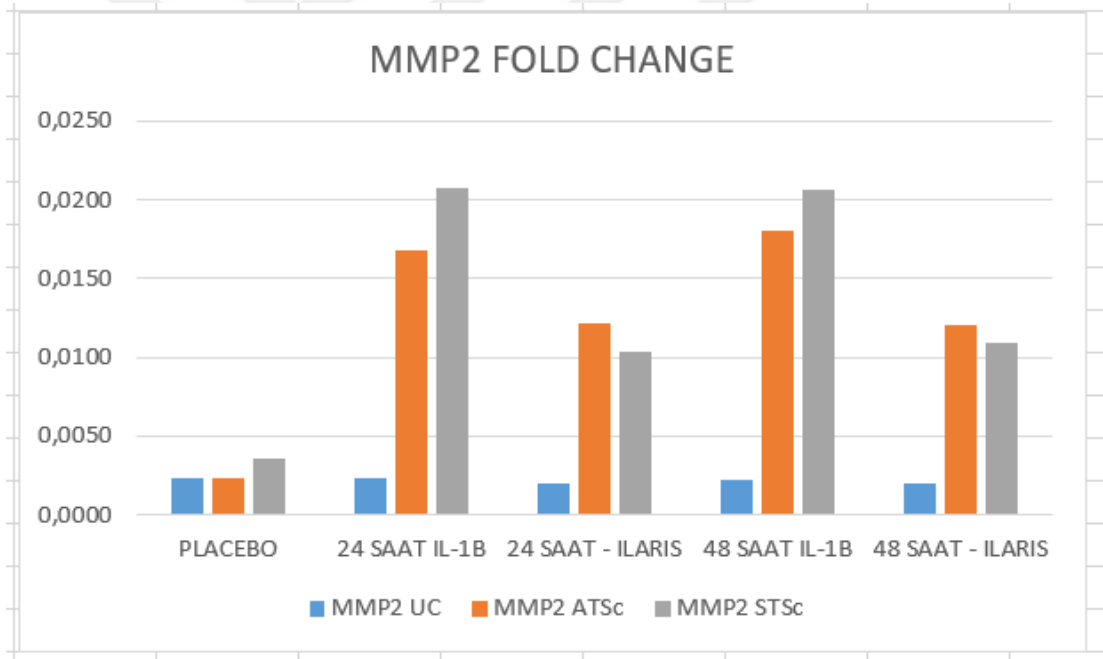
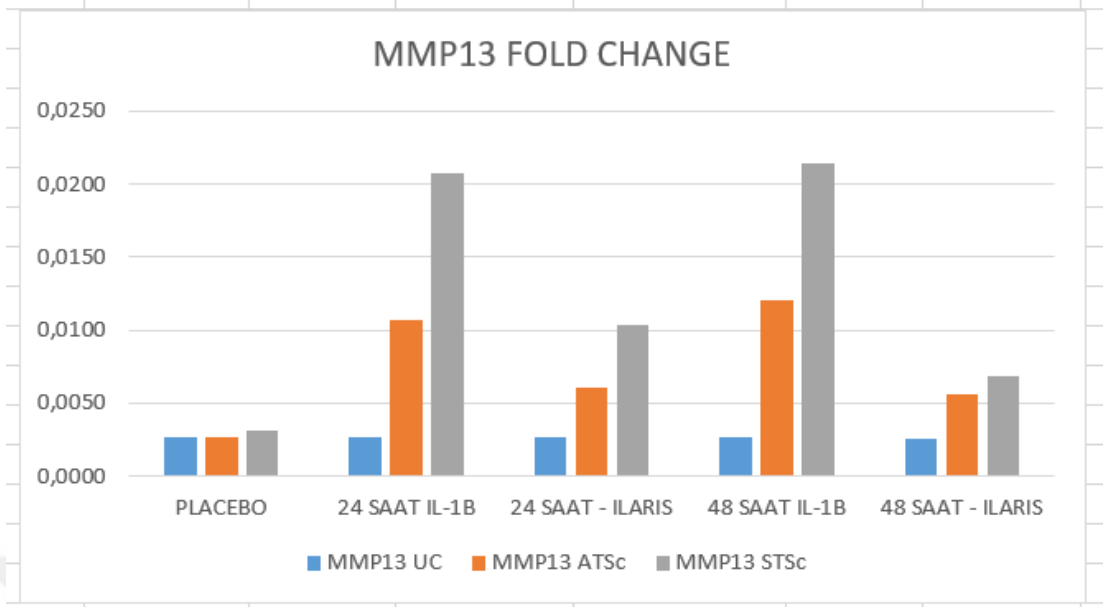
	MMP13 UC	MMP13 ATSc	MMP13 STSc
PLACEBO	0,0026	0,0027	0,0031
24 SAAT IL-1B	0,0026	0,0107	0,0208
24 SAAT - ILARIS	0,0026	0,0061	0,0103
48 SAAT IL-1B	0,0026	0,0121	0,0214
48 SAAT - ILARIS	0,0026	0,0057	0,0069

	MMP2 UC	MMP2 ATSc	MMP2 STSc
PLACEBO	0,0023	0,0023	0,0036
24 SAAT IL-1B	0,0023	0,0168	0,0208
24 SAAT - ILARIS	0,0020	0,0121	0,0104
48 SAAT IL-1B	0,0023	0,0180	0,0207
48 SAAT - ILARIS	0,0020	0,0120	0,0109

Tablo 3: Genlerin Ekspresyon seviyelerinin fold change türünden değişimi

Bu hesaplamalar yukarıda belirtilen genel katlanma formülüne uygun hesaplanmış olup, aşağıda karşılaştırmalı grafikleri vardır.





Tablo 4: Karşılaştırmalı grafikler

BÖLÜM VI

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Otolog doku transplantasyonu ile biyolojik tedavilerde başarılı sonuçlar elde edilmesine rağmen doku alınan alanda hasar oluşumu ve sınırlı hücre kaynağı nedeniyle bazı transplantasyon uygulamaları için uygun olmamaktadır.

Mezenkimal kök hücreler, 2001 yılında itibaren iskelet kas rejenerasyonu, özellikle kırıkta, kemik, tendon ve kas hasarlarının tedavisinde, prenatal tanı uygulamasında konan teşhislerin tedavisinde, çeşitli hasarlanmalar için kaynak oluşturmada oldukça umut verici olmuştur.

Günümüzde mezenkimal kök hücreler kullanılarak yapılan tedavilerinde oldukça başarılı sonuçlar elde edilmektedir. Bilimsel çalışmalar, birçok farklı kök hücre kaynağı olmasına rağmen, doku hasarlarının onarımında en iyi adayın, yüksek kondrojenik potansiyele ve düşük hipertrofik farklılaşmaya sahip sinoviyum dokusu kaynaklı kök hücreler, her dokuya proliferere olabilen Adipoz Doku Kök Hücreleri ve en erken evre kök hücrelerinden Kordon kanı kök hücreleri olduğunu göstermektedir.(27)

Esasen, kök hücre ile ilgili çalışmalar insan kanı üzerinde yapılan çalışmalarla hız kazanmıştır. Franz Ernst Christian Neumann (1834-1918) kemik iliği üzerine yaptığı çalışmalar sonucu, akyuvarlara benzer hücrelerin varlığını tespit ettikten sonra kemik iliği, kan hücrelerini oluşturan organ olduğu tezini ileri sürmüştür. Daha sonra, Julius Friedrich Cohnheim (1839–1884) ise yaraları iyileştiren hücrelerin kandan, dolayısıyla kemik iliğinden geldiğini ileri sürmüştür.(12)

Arthur Pappenheim (1870—1916) ise alyuvarlarla ilgili yaptığı çalışmalar sonucu, kemik iliğinde işlevsel olarak kök hücelere benzeyen progenitör hücrelerin varlığını tespit etmiştir. Pappenheim kök hücre ile alyuvar ve akyuvar üretebilme özelliğine sahip öncü hücre anlamında kullanmaktadır.(8)

Kan fizyolojisi üzerine yoğunlaşan Alexander Alexandrowitsch Maximow (1874—1928) ise 1909 yılında hematopoetik kök hücre adını verdiği ve yaralanma esnasında kandan yaralı dokuya taşınan kan hücrelerinin varlığını ortaya çıkarmıştır. Ayrıca bu hücreler hasar görmüş bölgeye ulaştıklarında, ihtiyaç hissedilen hücreye farklılaşabilme hipotezinden ilk defa olarak bahsetmiştir.(5)

Çalışmamız dâhilinde elde ettiğimiz bulgulara göre JUNB proteini doku hasarı taklidimizde EMİ'ye verilen cevabın ilk basamaklarında yer alır. JUNB proteini cevap olarak hücrenin bölünme kapasitesini azaltır. Bu alınan ilk önlemdir. Bütün hasarlara karşı başlatılan sinyal yollarında bu genin kodladığı protein hücre siklusunu G1 fazında yakalar ve duraklatır. Bu davranış dokunun tümör oluşumu başlangıcı ihtimaline karşı bir cevap olarak düşünülmüştür. (37)

İnflamasyonun erken aşamasında zarar gören kollojen IV ve V proteinleri JUNB proteinini aktive eden sinyal yolağını başlatır. Bu olay hücrenin herhangi bir bölünme, göç etme ya da farklılaşma eğiliminde olmamasının garantisidir. (13)

Deneylerimizden elde ettiğimiz bulgularda IL-1, TNF-a ve ikisi birden kullanılarak üretilmiş hasar modellerinde JUNB ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir. Bunun haricinde farmakolojik modülasyon kullanılan modellerde ise bu artış cüzi eğilim göstermiştir.

Ekstrasellüler Matrix inflamasyonu sırasında alınan önlemler sadece intrinsik değil, aynı zamanda hücrelerin etrafında birbirleriyle bağlantılı olduğu hücrelerde de vardır. Buna örnek olarak çalışmamıza dâhil ettiğimiz MEPE proteinini kodlayan MEPE geni, fraktal ve yangısal zedelenmelerde arkadaş hücreleri tarafında eksprese edilmeye başlanıp, tıpkı bir kaskad gibi artarak devam etmektedir. (25)

MEPE geninin fonksiyonu zedelenme sonucu oluşan yaralanmanın yeni göçler oluşturarak giderilmesi üzerine kuruludur. Deneylemiz sonucu elde ettiğimiz bulgularda saptandığına göre MEPE geni ekspresyonu EMİ hasar taklidi oluşturulan IL-1, TNF-a ve birlikte oluşturdukları modelde ekspresyon artışı gözlenmiştir. Bu durum beklendiği üzere dokunun hasara uğramasına verilen cevaptır.

Çalışmamızda hedef gen olarak belirlediğimiz bir diğer gen olan MMP13 geninin kodladığı MMP13 proteini non kanonik PAR1 yolağının inhibitörlerinden biridir. Taklit hasar modeli sonucunda bu genin ekspresyonu oluşturduğumuz düzenekte az bir miktar artış göstermiştir. Bu durum hem deney koşullarımızın in-vitro oluşu hem de hücreler arası bağlantının zayıf oluşundan kaynaklı olabilir. Non kanonik sinyal yolları bilindiği üzere hücre-hücre etkileşimi ile doğrudan etkilidir.

Oluşturulan farmakolojik modülasyon modellerinde değerler hasar taklit değerlerine göre normal halden çok da farklı bir çizgi izlememiştir.

İnflamasyon sebebiyle hücre içinde aktivasyon gösteren MMP2 geninin kodladığı protein olan MMP2 proteini tip IV ve V kollojen yıkımını başlatan mekanizmanın başlangıç kapısıdır. Sinoviyal membrandan sinoviyal sıvıya hücre göçünü, adipoz dokuda iltihaplanma başlangıcını ve bebek-anne arasında bir yaş sonucu gerçekleşen hataların giderilme başlangıcını kontrol eden bu protein oluşturduğumuz hasar taklit modellerinde elde ettiğimiz bulgularda görüldü ki MMP2 geni ekspresyonu azalmıştır. Bunun sebebi olarak 48 saatlik hasar taklit modelinde erozyona uğrayacak hücre kalmaması ve yahut in-vitro bir model oluşturduğumuz için hiç erozyon oluşmaması olabilir. Farmakolojik modülasyon çerçevesinde elde edilen rakamlarda normal kültüre göre önemli bir değişim saptanmaması iki senaryoyu da destekler niteliktedir.

Ülkemizde kırık defektlerinin ilaç tedavisi ve sonuçları hakkında yeterli veri bulunmamaktadır. Amerika Birleşik Devletler’inde yılda yaklaşık 20.000 kırık defektlerinin cerrahisi gerçekleştirildiği bilinmektedir.

Yapılan klinik ve deneysel çalışmalar kıkırdak defektlerinin ilaç tedavilerinin sonuçları yaralanmalarının cerrahi tedavilerinin sonuçlarından daha üstün olduğunu göstermektedir. Bunun başlıca nedeni kıkırdak defektlerinin rejenerasyon yeteneğinin kısıtlı olmasıdır.

Özellikle son yıllarda moleküler ve hüresel biyoloji, biyomühendislik ve kök hücre alanındaki önemli gelişmelere paralel olarak mezenkimal kök hücre rejenerasyonu hakkındaki bilgilerimiz artmaktadır. Kıkırdak cerrahisinde amaç rejenerasyon sürecindeki bir takım eksikliklerin giderilmesi ve fonksiyonel sonuçların tekrar kazanılmasıdır.

Kök hücrelerin bakteriyel polyesterler ile biyoyumluluk gösterdiği ve kök hücrelerin bakteriyel polyesterler üzerinde agregatlar ve sferoidal kümeler oluşturdukları saptanmıştır. Yine MSC kaynaklı kök hücrelerin bu bakteriyel polyesterlerin nanofibriler yüzeyine tutunarak büyüme ve farklılaşma gösterebildikleri literatürdeki çalışmalarda mevcuttur. Bu amaçla embriyonik, fetal ve erişkin mezenşimal kaynaklı kök hücrelerden yararlanılmaktadır.

MSC'lerin potansiyel avantajları otolog donörden temin edilebilmesi ve allojenik MSC'nin nonimmunojenik olmasıdır. MSC'lerin ayrıca in vitro ortamda nöronal morfoloji kazanmaları ve nöronal ve nöroglial marker eksprese etmeleri sinir sistemi hasarında kullanımına olan ilgiyi arttırmaktadır.

Mezenşimal kök hücrelerin transplantasyonu ile bu hücrelerin kendini yenileme ve multipotansiyel özelliklerinden yararlanabileceği düşünülmektedir.

Kök hücrelerin aynı zamanda hasarlı hücreler ile yer değişimi, nöroproteksiyon veya endojen hücreler ile birlikte rejenerasyon oluşturabilmek için uygun bir mikroçevre oluşumu sağladığı bilinmektedir.

Günümüzde insanlar üzerinde mezenşimal kök hücrelerin Parkinson hastalığında, beyin hasarında, serebral infarktta ve spinal kord hasarında transplantasyonu ile ilgili çalışmalar literatürde mevcuttur.

Farklılaşmanın yanısıra kök hücrelerin hasarlı nöronlara rejenerasyon sürecinde trofik destek sağlaması da başka bir olası mekanizmadır.

Kök hücre tedavisinin bazı durumlarda kayıp nöronların yerini almaktan çok nöronal koruma ve anti-inflamatuvar özellikleri ile tedaviye katkıda bulunduğunu gösterir bilgiler elde edilmişti.

Bu çalışmada IL-1 ve TNF-a ile oluşturulan deneysel sinoviyal membran, adipoz doku ve kordon kanı kök hücrelerinde oluşturulan hasar sonrasında Canakinumab ile hazırlanan tedavi modeli insan mezenkimal kaynaklı kök hücreler ile birlikte kullanılmasının ekstrasellüler matrixden başlayan rejenerasyonuna olan etkisi araştırıldı.

Sonuç olarak daha önceki çalışmalarda da gösterildiği üzere rejenerasyon yeteneği kök hücrenin tutunma meselesiyle alakalıdır. EMİ patogenezi sırasında gerçekleşen göç sebebiyle kök hücreler süspanse bir ortama geçiş yaparlar. Bu noktada kanser oluşumu yolunun başlaması gerekmektedir ancak JUNB gibi savunma sistemleri hücre siklusunu durdurabilme yeteneği vardır.

Süspanse ortamdaki inflamasyonel reaksiyonlar dolayısıyla kök hücrelerin kollojenleri yıkıma uğrar. Bu durumdan sorumlu genler MMP13 ve 2 dir. Buna karşılık rejenerasyon mekanizmaları yangı halini yeni kıkırdak dokusu üreterek durdurmaya çalışır. Burada MEPE geni işlevini yerine getirir ve artarak yayılan bir sinyal gibi doku çaplı rejenerasyona öncülük eden mekanizmanın başlangıç proteinlerinden biridir.

BÖLÜM V

7. KAYNAKÇA

1. **Ethan S Sen, Colin G Steward, Athimalaipet V Ramanan**, Diagnosing haemophagocytic syndrome, *Archives of Disease in Childhood*, 2017, **102**, 3, 279.
2. **Joost F. Swart, Eveline M. Delemarre, Femke van Wijk, Jaap-Jan Boelens, Jürgen Kuball, Jacob M. van Laar, Nico M. Wulffraat**, Haematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases, *Nature Reviews Rheumatology*, 2017, **13**, 4, 244.
3. **Margit Zeher, Gábor Papp, Britt Nakken, Peter Szodoray**, Hematopoietic stem cell transplantation in autoimmune disorders: From immune-regulatory processes to clinical implications, *Autoimmunity Reviews*, 2017.
4. **Lei Ye, Li Li, Bing Wan, Minglan Yang, Jie Hong, Weiqiong Gu, Weiqing Wang, Guang Ning**, Immune response after autologous hematopoietic stem cell transplantation in type 1 diabetes mellitus, *Stem Cell Research & Therapy*, 2017, **8**, 1.
5. **C. M. Hedrich, C. Günther, M. Aringer**, Morbus Still im Kindes- und Erwachsenenalter, *Der Hautarzt*, 2017.

6. **Patrick S. C. Leung, Zongwen Shuai, Bin Liu, Shang An Shu, Lingyun Sun**, Next-Generation Therapies and Technologies for Immune-Mediated Inflammatory Diseases, 2017, 167.
7. **E. M. Delemarre, T. van den Broek, G. Mijnheer, J. Meerding, E. J. Wehrens, S. Olek, M. Boes, M. J. C. van Herwijnen, F. Broere, A. van Royen, N. M. Wulffraat, B. J. Prakken, E. Spierings, F. van Wijk**, Autologous stem cell transplantation aids autoimmune patients by functional renewal and TCR diversification of regulatory T cells, *Blood*, 2016, **127**, 1, 91.
8. **Susan Shenoi, Carol A. Wallace**, Diagnosis and Treatment of Systemic EMİe Idiopathic Arthritis, *The Journal of Pediatrics*, 2016, **177**, 19.
9. **P.J. Kelsey, M.-C. Oliveira, M. Badoglio, B. Sharrack, D. Farge, J.A. Snowden**, Haematopoietic stem cell transplantation in autoimmune diseases: From basic science to clinical practice, *Current Research in Translational Medicine*, 2016, **64**, 2, 71.
10. **P.H. Muller, R. ten Cate**, Pediatrics in Systemic Autoimmune Diseases, 2016, **11**, 1.
11. **Sathish Kumar**, Systemic EMİe Idiopathic Arthritis: Diagnosis and Management, *The Indian Journal of Pediatrics*, 2016, **83**, 4, 322.
12. **Fabrizio De Benedetti, Rayfel Schneider**, Textbook of Pediatric Rheumatology, 2016, 205.
13. **Norman T. Ilowite, Ronald M. Laxer**, Textbook of Pediatric Rheumatology, 2016, 161.
14. **Richard A. Nash, Thomas'** Hematopoietic Cell Transplantation, 2016, 792.
15. **Normi Bruck, Anja Schnabel, Christian M. Hedrich**, Current understanding of the pathophysiology of systemic EMİe idiopathic arthritis (sJIA) and target-directed therapeutic approaches, *Clinical Immunology*, 2015, **159**, 1, 72.
16. **Katherine A Steigerwald, Norman T Ilowite**, Novel treatment options for EMİe idiopathic arthritis, *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 2015, **8**, 5, 559.

17. **Colleen K. Correll, Bryce A. Binstadt**, Advances in the pathogenesis and treatment of systemic EMİe idiopathic arthritis, *Pediatric Research*, 2014, **75**, 1-2, 176.
18. **Eveline M. Delemarre, Sarah T. A. Roord, Theo van den Broek, Evelien Zonneveld-Huijssoon, Wilco de Jager, Henk Rozemuller, Anton C. Martens, Femke Broere, Nico M. Wulffraat, Tibor T. Glant, Berent J. Prakken, Femke van Wijk**, Brief Report: Autologous Stem Cell Transplantation Restores Immune Tolerance in Experimental Arthritis by Renewal and Modulation of the Teff Cell Compartment, *Arthritis & Rheumatology*, 2014, **66**, 2, 350.
19. **Magdalena Witkowska, Elzbieta Smolewska, Piotr Smolewski**, Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Children with Autoimmune Connective Tissue Diseases, *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 2014, **62**, 4, 319.
20. **Qiong Wu, Anne M. Pesenacker, Alka Stansfield, Douglas King, Dawn Barge, Helen E. Foster, Mario Abinun, Lucy R. Wedderburn**, Immunological characteristics and T-cell receptor clonal diversity in children with systemic EMİe idiopathic arthritis undergoing T-cell-depleted autologous stem cell transplantation, *Immunology*, 2014, **142**, 2, 227.
21. **Jaeha Shin, Kyung-Mee Lee, Jae Hyup Lee, Junghoon Lee, Misun Cha**, Magnetic manipulation of bacterial magnetic nanoparticle-loaded neurospheres, *Integrative Biology*, 2014, **6**, 5, 532.
22. **Roberto Giacomelli, Piero Ruscitti, Paola Di Benedetto, Vasiliki Liakouli, Francesco Carubbi, Paola Cipriani**, Potential of stem cells in the treatment of rheumatic disease, *International Journal of Clinical Rheumatology*, 2014, **9**, 2, 183.
23. **Júlia Kurkó, András Vida, Tímea Ocskó, Beata Trynieszewska, Tibor A. Rauch, Tibor T. Glant, Zoltán Szekanecz, Katalin Mikecz, Oliver Frey**, Suppression of Proteoglycan-Induced Autoimmune Arthritis by Myeloid-Derived Suppressor Cells Generated In Vitro from Murine Bone Marrow, *PLoS ONE*, 2014, **9**, 11, e111815.

24. **Sebastiaan Vastert, Berent Prakken**, Update on research and clinical translation on specific clinical areas: From bench to bedside: How insight in immune pathogenesis can lead to precision medicine of severe EM \ddot{e} idiopathic arthritis, *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 2014, **28**, 2, 229.
25. **Margarita Pematzoglou, Helen Dimitriou, Eftichia Stiakaki**, Could mesenchymal stromal cells have a role in childhood autoimmune diseases?, *Immunological Investigations*, 2013, **42**, 7, 639.
26. **Laure Calvet, Aurélie Cabrespine, Nathalie Boiret-Dupré, Etienne Merlin, Catherine Paillard, Marc Berger, Jacques-Olivier Bay, Olivier Tournilhac, Pascale Halle**, Hematologic, immunologic reconstitution, and outcome of 342 autologous peripheral blood stem cell transplantations after cryopreservation in a -80°C mechanical freezer and preserved less than 6 months, *Transfusion*, 2013, **53**, 3, 570.
27. **Joyce J. Hsu, Tzielan Chang Lee, Christy I. Sandborg**, Kelley's Textbook of Rheumatology, 2013, 1752.
28. **Friso G.J. Calkoen, Danielle M.C. Brinkman, Carly Vervat, Monique M. van Ostaijen-ten Dam, Rebecca ten Cate, Maarten J.D. van Tol, Lynne M. Ball**, Mesenchymal stromal cells isolated from children with systemic EM \ddot{e} idiopathic arthritis suppress innate and adaptive immune responses, *Cytotherapy*, 2013, **15**, 3, 280.
29. **H.-I. Huppertz**, Remission in der Kinderreumatologie, *Zeitschrift für Rheumatologie*, 2013, **72**, 4, 354.
30. **Sheryl Mascarenhas, Belinda Avalos, Stacy P. Ardoin**, An Update on Stem Cell Transplantation in Autoimmune Rheumatologic Disorders, *Current Allergy and Asthma Reports*, 2012, **12**, 6, 530.
31. **Alan Tyndall**, Application of autologous stem cell transplantation in various adult and pediatric rheumatic diseases, *Pediatric Research*, 2012, **71**, 4-2, 433.
32. **J D Bowen, G H Kraft, A Wundes, Q Guan, K R Maravilla, T A Gooley, P A McSweeney, S Z Pavletic, H Openshaw, R Storb, M Wener, B A McLaughlin, G R Henstorf, R A Nash**, Autologous

hematopoietic cell transplantation following high-dose immunosuppressive therapy for advanced multiple sclerosis: long-term results, *Bone Marrow Transplantation*, 2012, **47**, 7, 946.

33. **Thomas Daikeler, André Tichelli, Jakob Passweg**, Complications of autologous hematopoietic stem cell transplantation for patients with autoimmune diseases, *Pediatric Research*, 2012, **71**, 4-2, 439.
34. **Gregor Dueckers, Nihal Guellac, Martin Arbogast, Guenther Dannecker, Ivan Foeldvari, Michael Frosch, Gerd Ganser, Arnd Heiligenhaus, Gerd Horneff, Arnold Illhardt, Ina Kopp, Ruediger Krauspe, Barbara Markus, Hartmut Michels, Matthias Schneider, Wolfram Singendonk, Helmut Sitter, Marianne Spamer, Norbert Wagner, Tim Niehues**, Evidence and consensus based GKJR guidelines for the treatment of EMİe idiopathic arthritis, *Clinical Immunology*, 2012, **142**, 2, 176.
35. **J A Snowden, R Saccardi, M Allez, S Ardizzone, R Arnold, R Cervera, C Denton, C Hawkey, M Labopin, G Mancardi, R Martin, J J Moore, J Passweg, C Peters, M Rabusin, M Rovira, J M van Laar, D Farge**, Haematopoietic SCT in severe autoimmune diseases: updated guidelines of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, *Bone Marrow Transplantation*, 2012, **47**, 6, 770.
36. **Andrea Pession, Daniele Zama, Riccardo Masetti, Pietro Gasperini, Arcangelo Prete**, Hematopoietic stem cell transplantation for curing children with severe autoimmune diseases: Is this a valid option, *Pediatric Transplantation*, 2012, **16**, 5, 413.
37. **Christina Mayerl, Martina Prelog**, Immunosenescence and EMİe idiopathic arthritis, *Autoimmunity Reviews*, 2012, **11**, 5, 297.
38. **Klinische Immunologie**, 2012, e1.
39. **A Ravelli, A A Grom, E M Behrens, R Q Cron**, Macrophage activation syndrome as part of systemic EMİe idiopathic arthritis: diagnosis, genetics, pathophysiology and treatment, *Genes and Immunity*, 2012, **13**, 4, 289.
40. **H. Tsukamoto, K. Nagafuji, T. Horiuchi, H. Mitoma, H. Niiro, Y. Arinobu, Y. Inoue, K. To, T. Miyamoto, H. Iwasaki, T. Teshima, M.**

- Harada, K. Akashi**, Analysis of immune reconstitution after autologous CD34+ stem/progenitor cell transplantation for systemic sclerosis: predominant reconstitution of Th1 CD4+ T cells, *Rheumatology*, 2011, **50**, 5, 944.
41. **Margit Zeher, Gabor Papp, Peter Szodoray**, Autologous haemopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases, *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2011, **11**, 9, 1193.
42. **Michael W. Beresford**, EMĭe Idiopathic Arthritis, *Pediatric Drugs*, 2011, **13**, 3, 161.
43. **J Riegler, B Allain, R J Cook, M F Lythgoe, Q A Pankhurst**, Magnetically assisted delivery of cells using a magnetic resonance imaging system, *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2011, **44**, 5, 055001.
44. **Philip J. Hashkes, Ronald M. Laxer**, *Rheumatology*, 2011, 1017.
45. **Jacob M. van Laar**, Stem Cell Therapy: Resetting Autoimmunity or Postponing the Inevitable?, *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, 2011, **3**, 3, 127.
46. **A. Tyndall**, Successes and Failures of Stem Cell Transplantation in Autoimmune Diseases, *Hematology*, 2011, **2011**, 1, 280.
47. **Norman T. Ilowite, Ronald M. Laxer**, Textbook of Pediatric Rheumatology, 2011, 71.
48. **Fabrizio De Benedetti, Rayfel Schneider**, Textbook of Pediatric Rheumatology, 2011, 236.
49. **Francesca Milanetti, Mario Abinun, Julio C. Voltarelli, Richard K. Burt**, Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Childhood Autoimmune Disease, *Pediatric Clinics of North America*, 2010, **57**, 1, 239.
50. **Alexandra Filipovich, Kenneth McClain, Alexei Grom**, Histiocytic Disorders: Recent Insights into Pathophysiology and Practical Guidelines, *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2010, **16**, 1, S82.
51. **Alan Tyndall, Jacob M. van Laar**, Stem cells in the treatment of inflammatory arthritis, *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 2010, **24**, 4, 565.

52. **Johannes Riegler, Jack A. Wells, Panagiotis G. Kyrtatos, Anthony N. Price, Quentin A. Pankhurst, Mark F. Lythgoe**, Targeted magnetic delivery and tracking of cells using a magnetic resonance imaging system, *Biomaterials*, 2010, **31**, 20, 5366.
53. **Faye A.H. Cooles, John D. Isaacs**, Treating to re-establish tolerance in inflammatory arthritis – lessons from other diseases, *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 2010, **24**, 4, 497.
54. **Vijay R Karia, Raquel Cuchacovich, Luis R Espinoza**, Undifferentiated spondyloarthritis following allogeneic stem cell transplantation, *BMC Musculoskeletal Disorders*, 2010, **11**, 1.
55. **Claudio Annaloro, Francesco Onida, Giorgio Lambertenghi Deliliers**, Autologous hematopoietic stem cell transplantation in autoimmune diseases, *Expert Review of Hematology*, 2009, **2**, 6, 699.
56. **J. A. Snowden, E. Martin-Rendon, S. M. Watt**, Clinical stem cell therapies for severe autoimmune diseases, *Transfusion Medicine*, 2009, **19**, 5, 223.
57. **A C Krauss, N R Kamani**, Hematopoietic stem cell transplantation for pediatric autoimmune disease: where we stand and where we need to go, *Bone Marrow Transplantation*, 2009, **44**, 3, 137.
58. **Jonathan H. Esensten, David Wofsy, Jeffrey A. Bluestone**, Regulatory T cells as therapeutic targets in rheumatoid arthritis, *Nature Reviews Rheumatology*, 2009, **5**, 10, 560.
59. **M. Prelog, J. Brunner**, Reply, *Arthritis & Rheumatism*, 2009, **60**, 1, 311.
60. **A. R. Lorenzi, H. E. Foster, J. D. Isaacs**, Thymic function and immune senescence in EMİe idiopathic arthritis: Comment on the article by Prelog et al, *Arthritis & Rheumatism*, 2009, **60**, 1, 310
61. **I. Kötter, M. Schmalzing, J. Henes, W. Vogel, L. Kanz**, Aktueller Stellenwert der Stammzelltransplantation bei Autoimmunerkrankungen, *Zeitschrift für Rheumatologie*, 2008, **67**, 8, 716.
62. **N. M. Wulffraat, E. M. van Rooijen, R. Tewarie, D. Brinkman, B. Prakken, W. Kuis**, Current perspectives of autologous stem cell transplantation for severe EMİe idiopathic arthritis, *Autoimmunity*, 2008, **41**, 8, 632.

63. **T Takken, C van den Beuken, N M Wulffraat, P J M Helders, J van der Net**, Exercise tolerance in children with EMİe idiopathic arthritis after autologous SCT, *Bone Marrow Transplantation*, 2008, **42**, 5, 351.
64. **Riccardo Saccardi, Massimo Di Gioia, Alberto Bosi**, Haematopoietic stem cell transplantation for autoimmune disorders, *Current Opinion in Hematology*, 2008, **15**, 6, 594.
65. **Sean Deane, Frederick J. Meyers, M. Eric Gershwin**, On reversing the persistence of memory: Hematopoietic stem cell transplant for autoimmune disease in the first ten years, *Journal of Autoimmunity*, 2008, **30**, 3, 180.
66. **Nikolay P Nikolov, Steven Z Pavletic**, Technology Insight: hematopoietic stem cell transplantation for systemic rheumatic disease, *Nature Clinical Practice Rheumatology*, 2008, **4**, 4, 184.
67. **D. M. C. Brinkman, C. M. Jol-van der Zijde, M. M. ten Dam, P. A. W. te Boekhorst, R. ten Cate, N. M. Wulffraat, R. Q. Hintzen, J. M. Vossen, M. J. D. van Tol**, Resetting the Adaptive Immune System After Autologous Stem Cell Transplantation: Lessons from Responses to Vaccines, *Journal of Clinical Immunology*, 2007, **27**, 6, 647
68. **Luna J, Masamunt MC, Lawrance IC, Sans M**. Mesenchymal cell proliferation and programmed cell death: key players in fibrogenesis and new targets for therapeutic intervention. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300: G703-708, 2011.
69. **Melton D, Cowen C**. "Stemness": Definitions, Criteria, and Standards. *Essentials of Stem Cell Biology*. Lanza R (Ed.), San Diego, USA, Academic Press, pp: xxiii-xxviii, 2009.
70. **Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ**. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 88: 287-298, 1997.
71. **Watt FM, Lo Celso C, Silva-Vargas V**. Epidermal stem cells: an update. *Curr Opin Genet Dev* 16: 518-524, 2006.
72. **Shinin V, Gayraud-Morel B, Gomes D, Tajbakhsh S**. Asymmetric division and cosegregation of template DNA strands in adult muscle satellite cells. *Nat Cell Biol* 8: 677- 687, 2006.

73. **Campbell KH.** Nuclear transfer in farm animal species. *Semin Cell Dev Biol* 10: 245-252, 1999.
74. **Potten CS, Wilson JW.** The Development of Epithelial Stem Cell Concepts. *Essentials of Stem Cell Biology.* Lanza R (Ed.), San Diego, USA, Academic Press, pp: 17-27, 2009.
75. **Harvanová D, Tóthová T, Sarišský M, Amrichová J, Rosocha J. ,** Isolation and characterization of synovial mesenchymal stem cells. *Folia Biol (Praha).* 2011;57(3):119-24.
- 76. Celprogen 36042-13 document sheet**
77. **Toledano, H. and Jones, D.L.,** Mechanisms regulating stem cell polarity and the specification of asymmetric divisions (March 31, 2009), *StemBook*, ed. The Stem Cell Research Community, *StemBook*, doi/10.3824/stembook.1.41.1, <http://www.stembook.org>.
78. **Dr. Hanife GÜLER TANIR, Dr. Şayeste DEMİREZEN,** *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2009;29(5)
79. **Huelsken J, Behrens J.** The Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 2002;115(Pt 21):3977-8.
80. **Humbert PO, Dow LE, Russell SM.** The Scribble and Par complexes in polarity and migration: Friends or foes? *Trends Cell Biol* 2006;16: 622–630.
81. **Mellman I, Nelson WJ.** Coordinated protein sorting, targeting and distribution in polarized cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:833–845.
82. **Chen X, Yang J, Evans PM, Li u C.** Wnt signaling: the good and the bad. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2008;40(7):577-94.
83. **Schwarz-Romond T, Metcalfe C, Bienz M.** Dynamic recruitment of axin by Dishevelled protein assemblies. *J Cell Sci* 2007;120(Pt 14):2402-12.
84. **Fraser E, Young N, Dajani R, Franca-Koh J, Ryves J, Williams RS, et al.** Identification of the Axin and Frat binding region of glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem* 2002;277(3):2176-85.
85. **Petty RE, Cassidy TJ.** Chronic arthritis. In: Cassidy TJ, Petty RE (eds) *Textbook of Pediatric Rheumatology.* Elsevier Saunders Company, Fifth edition 2005:206-341

86. **Miller ML, Cassidy JT.** Juvenile Rheumatoid Arthritis. In: Behrman R.E, Kliegman R.M, Jenson H.B (eds) Nelson Textbook of Pediatrics. Philadelphia: Saunders; 18th ed. 2008 p.1001-1011
87. **Weiss JE, Ilowite NT.** Juvenile idiopathic arthritis. Rheum Dis Clin North Am. 2007 ;33:441-70.
88. **Ravelli A, Martini A.** Juvenile idiopathic arthritis. Lancet. 2007;369:767-78.
89. **Kasapçopur Ö, Özdoğan H.** Jüvenil idyopatik Artrit. Klinik Gelişim Dergisi 2006;19:1:7-22
90. **International League of Associations for Rheumatology Classification of Juvenile Idiopathic Arthritis: Second Revision, Edmonton, 2001**
91. **Rudolf MC, Genel M, Tamborlane VW Jr, Dwyer JM.** Juvenile rheumatoid arthritis İn children with diabetes mellitus. J Pediatr 1981;99:519-524.
92. **Jenkins EA, Hull RG, Gray RE, Hall MA, Ansell BM.** Diabetes mellitus and myasthenia gravis İn a patient with systemic onset juvenile chronic arthritis. J R Soc Med 1989;82:368-369.
93. **Dhib M, Prieur AM, Courville S, et al.** Crescentic Glomerulonephritis İn Juvenile Chronic Arthritis. J Rheumatol 1996;23:1636-1640.
94. **Juvenile idiopathic arthritis-related uveitis.** Kesen MR, Setlur V, Goldstein DA. Int Ophthalmol Clin. 2008;48:21-38. Review.
95. **Kotaniemi K, Savolainen A, Karma A, Aho K.** Recent Advances İn Uveitis of Juvenile Idiopathic Arthritis . Surv Ophthalmol. 2003 ;48:489-502.
96. **Oen K,** Comparative epidemiology of the rheumatic diseases İn children. Current Opinion İn Rheumatology 2000,12:410—414.
97. **Saurenmann RK, Rose JB, Tyrrell P, Feldman BM, et. al.** Epidemiology of juvenile idiopathic arthritis İn a multiethnic cohort: ethnicity as a risk factor. Arthritis Rheum. 2007;56:1974-84.
98. **Özen 8, Karaaslan Y, Özdemir O et al.** Prevalance of JCA and Familial Mediterranean Fever İn Turkey: A field study. J Rheumatol 1998;25:2445-9.
99. **Fujikawa S, Okuni M.** A nationwide surveillance study of rheumatic diseases among Japanese children. Acta Paediatern 1997; 39: 242—4.

100. **Gadoth N, Hershkovitch Y.** Rheumatoid arthritis during the first year of life. A case report and review of the literature. *Eur J Pediatr* 1979;132:115-118.
101. **Kimme L.** Hyrich Infectious agents In chronic rheumatic diseases *Curr Opin Rheumatol* 2001;13:300-304.
102. **Nocton JJ, Miller LC, Tucker LB, Schaller JG.** Human parvovirus B19-associated arthritis In children. *J Pediatr* 1993;122:186-190.
103. **Taylor HG, Borg AA, Dawes PT.** Human parvovirus B19 and rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 1992;11:548-50.
104. **Takahashi Y, Murai C, Shibata S, et al.:** Human parvovirus B19 as a causative agent for rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:8227—8232.
105. **Chantler JK, Tingle AJ, Petty RE.** Persistent rubella virus infection associated with chronic arthritis In children. *N Engl J Med* 1985;313: 1117-1123.
106. **Hyrich KL, Inman RD.** Infectious agents In chronic rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol.* 2001; 13:300-4.
107. **Massa M, Mazzoli F, Pignatti P. et al.** Proinflammatory responses to self HLA epitopes are triggered by molecular mimicry to Epstein-Barr virus proteins In oligoarticularjuvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46: 2721-2729.
108. **Berman A, Cahn P, Perez H, et al:** Human Immunodeficiency virus infection associated arthritis: clinical characteristics. *J Rheumatol* 1999;26:1158-1162.
109. **Pope JE, Stevens A, Howson W, et al.** The development of rheumatoid arthritis after recombinant hepatitis B vaccination. *J Rheumatol* 1998;25:1687-93
110. **Howson CP, Katz M, et al.** Chronic arthritis after rubella vaccination. *Clin Infect Dis* 1992;15:307-12.
111. **Murray KJ, Moroldo MB, Donnelly P et al.** Age-specific effects of juvenile rheumatoid arthritis-associated HLA alleles. *Arthritis Rheum* 1999;42:1843-53.

112. **Prahalad S.** Genetics of juvenile idiopathic arthritis: an update. *Current Opinion In Rheumatology* 2004;16:588—594.
- 113.
114. **Wordsworth P.** Genes In the spondyloarthropathies. *Rheum Dis Clin North Am* 1998;24:845-63.
115. **Reveille JD, Ball EJ, Khan MA.** HLA-B27 and genetic predisposing factors In spondyloarthropathies. *Curr Opin Rheumatol* 2001;13:265-272.
116. **Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P:** The effect of novel polymorphisms In the Interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998;102:1369-1376.
117. **Sherry Fife MS, Gutierrez A, Ogilvie EM, et al.** Novel IL10 gene family associations with systemic juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Research Therapy.* 2006;8:R148.
118. **Donn R, Alourfi Z, De Benedetti F, Meazza C, et al.:** Mutation screening of the macrophage migration Inhibitory factor gene: positive association of a functional polymorphism of macrophage migration Inhibitory factor with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46:2402-2409.
119. **De Benedetti F, Meazza C, Vivarelli M, et al.** Functional and prognostic relevance of the -173 polymorphism of the macrophage migration Inhibitory factor gene In systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2003, 48: 1398—1407.
120. **Ozen S, Bakkaloglu A, Yilmaz E, et al.:** Mutations In the gene for familial Mediterranean fever: do they predispose to inflammation? *J Rheumatol* 2003, 30: 2014—2018.
121. **Mason T, Rabinovich CE, Fredrickson DD, et al:** Breast feeding and the development of juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1995;22:1166-1170.
- 122.
123. **Mangge H, Schauenstein K.** Cytokines In juvenile rheumatoid arthritis (JRA). *Cytokine.* 1998;10:471-80.

124. **Kamphuis S, Kuis W, de Jager W, et al** Tolerogenic immune responses to novel T-cell epitopes from heat-shock protein 60 In juvenile idiopathic arthritis. *Lancet* 2005; 366: 50—56.
125. **Muzaffer MA, Dayer JM, Feldman BM, et.al.** Differences In the profiles of circulating levels of soluble tumor necrosis factor receptors and Interleukin 1 receptor antagonist reflect the heterogeneity of the subgroups of juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2002 ;29:1071-8.
126. **Lepore L, Pennesi M, Saletta S, Perticarari S, Presani G, Prodan M.** Study of IL- 2, IL-6, TNF alpha, IFN gamma and beta In the serum and synovial fluid of patients with juvenile chronic arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1994;12: 561—5.
127. **De Benedetti F, Massa M, Robbioni P, Ravelli A, Burgio GR, Martini A.** Correlation of serum Interleukin-6 levels with joint involvement and thrombocytosis In systemic juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1991; 34: 1158—63.
128. **De Benedetti F, Massa M, Pignatti P, et.al.** Elevated circulating Interleukin-7 levels In patients with systemic juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1995;22:1581-5.
129. **Foell D, Roth J.** Proinflammatory S100 proteins In arthritis and autoimmune disease. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 3762—71.
130. **Meazza C, Travaglio P, Pignatti P, et al.** Macrophage migration Inhibitory factor In patients with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 232-37.
131. **Zeggini E, Thomson W, Kwiatkowski D et al.** Linkage and association studies of single-nucleotide polymorphism-tagged tumor necrosis factor haplotypes In juvenile oligoarthritis. *Arthritis and Rheumatism* 2002; 46: 3304—331 1.
132. **Kuis W, Heijnen CJ, Hogeweg JA, et al:** How painful Is juvenile chronic arthritis? *Arch Dis Child* 1997;77:451-453.
133. **Cabral DA, Tucker LB:** Malignancies In children who initially present with rheumatic complaints. *J Pediatr* 1999;134:53-57.

134. **Ronchez MV, Hilario MO, Goldenberg J, et al.** Temporomandibular joint and mandibular growth alterations In patients with juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1995;22:1956-1961.
135. **Ross AC, Edgar MA, Swann M, et al.** Scoliosis In *JCA*. *J Bone Joint Surg* 1987; 69B: 175-8
136. **Frosch M, Roth J.** New Insights In systemic juvenile idiopathic arthritis—from pathophysiology to treatment. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47:121-5.
137. **Pascual V, Allantaz F, Arce E, et al.** Role of Interleukin-1 (IL1) In the pathogenesis of systemic onset juvenile idiopathic arthritis and clinical response to IL-1 blockade. *The Journal of Experimental Medicine* 2005;9:1479—86.
138. **Yokota S, Miyamae T, Imagawa T et al.** Therapeutic efficacy of humanized recombinant anti-Interleukin-6 receptor antibody In children with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 2005;52: 818—825.
139. **Ravelli A.** Toward an understanding of the long-term outcome of juvenile idiopathic arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2004; 22: 271—75.
140. **DD, Mellins ED, Wedgewood RJ.** Decreasing severity of chronic uveitis In children with pauciarticular arthritis. *Am J Dis Child* 1991;145:1026—8.
141. **Ferucci ED, Majka DS, Parrish LA, et.al.** Antibodies against cyclic citrullinated peptide are associated with HLA-DR4 In simplex and multiplex polyarticular—onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2005 ;52:239-46.
142. **Athreya BH, Ostrov BE, Eichenfield AH, Goldsmith DP.** Lymphedema associated with juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1989;16:1338-1340.
143. **Bardare M, Falcini F, Hertzberger-ten Cate R, et al:** Idiopathic limb edema In children with chronic arthritis: a multicenter report of 12 cases. *J Rheumatol.* 1997;24:384-388.

144. **Vostrejs M, Hollister JR.** Muscle atrophy and leg length discrepancies İn pauciarticularjuvenile rheumatoid arthritis. *Am J Dis Child* 1988;142:343-345.
145. **Goldenberg J, Ferraz MB, Pessoa AP, et al.** Symptomatic cardiac involvement İn juvenile rheumatoid arthritis. *Int J Cardiol* 1992;34:57-62.
146. **Alukal MK, Costello PB, Green FA.** Cardiac tamponade İn systemic juvenile rheumatoid arthritis requiring emergency pericardiectomy. *J Rheumatol* 1984;11:222- 225.
147. **Yancey CL, Doughty RA, Cohlman BA, Athreya BH.** Pericarditis and cardiac tamponade İn juvenile rheumatoid arthritis. *Pediatrics* 1981 ;68: 369-373.
148. **Jan J.E, Hill R.H, Low M.D, et al.** Cerebral complications İn juvenile rheumatoid arthritis *C.M.A. Journal* 1972;7: 107.
149. **Barcena A, Muench MO, Kapidzic M, Gormley M, Goldfien GA, Fisher SJ.** Human placenta and chorion: potential additional sources of hematopoietic stem cells for trans-plantation. *Transfusion* 51 Suppl 4: 94S-105S, 2011.
150. **Can A.** A concise review on the classification and nomenclature of stem cells. *Turkish Journal of Hematology* 25: 57-59, 2008.
151. **Can A.** Kök Hücre Tanımları. Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar. TÜBA Kök Hücre Çalışma Grubu (Ed.), Ankara, Türkiye Bilimler Akademisi. 20, pp: 15-22, 2009.
152. **De Coppi P, Bartsch G, Jr., Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, Mostoslavsky G, Serre AC, Snyder EY, Yoo JJ, Furth ME, Soker S, Atala A.** Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol* 25: 100-106, 2007.
153. **Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO, Tukun A, Uckan D, Can A.** Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in site and in vitro surveys. *Stern Cells* 25: 319-331, 2007.
154. **Smith AG.** Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 435-462, 2001.

155. **Weissman IL, Anderson DJ, Gage F.** Stern and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 387-403, 2001.
156. **Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AI, Campbell KIL.** Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810-813, 1997.
157. **Thompson AM, Bizarro MJ.** Necrotising enterocolitis in newborns: pathogenesis prevention and management. *Drugs* 2008;68:1227-1238.
158. **Papile LA, Burstein J, Burstein R, Koffler H.** Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: a study of infants with birth weights less than 1500 g. *J Pediatr* 1978;92:529-534.
159. **International Committee for Classification of ROP:** The International Classification of Retinopathy of Prematurity revisited. *Arch Ophthalmol* 2005;123 991-999.
160. **Jobe AH, Bancalari E.** Bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1723-1729.
161. **Richardson DK, Concoran JD, Escobar GJ, et al.** SNAP-II and SNAPPE-II: simplified newborn illness severity and mortality risk scores. *J Pediatr* 2001;138:92-100.
162. **Nelle M, Ficher S, Conze S, Beedgen B, Grischke EM, Lindcamp O.** Effects of late cord clamping on circulation in pretermes (VLBWI). *Pediatr Res* 1998;44:454 (Abstract).
163. **Ibrahim HM, Krouskop RW, Lewis DF, Dhanireddy R.** Placental transfusion: umbilical cord clamping and preterm infants. *J Perinatol.* 200;20:351-4
164. **Jones JG, Holland BM, Hudson I, Wardrop CA.** Total circulating red cell volume versus hematocrit as the primary descriptor of oxygen transport by the blood. *Br J Haematol* 1990;76:288-94.
165. **Rabe H, Reynolds G, Diaz-Rossello J.** A systematic review and meta-analysis of a brief delay in clamping the umbilical cord of preterm infants. *Neonatology.* 2008;93:138-144.

166. **Beck AC.** How can the obstetrician aid in reducing the mortality of prematurely born infants? *Am J Obstet Gynecol.* 1941;42:355-64.
167. **Madsen LP, Rasmussen MK, Bjerregaard LL, Nehr SB, Ebbesen F.** Impact of blood sampling in very preterm infants. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation.* 2000; 60(2):125-132.



ÖZGEÇMİŞ

REYHAN HUSEYNOVA



1976 Yılında Azerbaycanda doğdum.Ukrayna kiev O.O. Bogomoltsa Tıp Üniversitesi Eczacılık bölümünde mezun oldum Sonrasında 2015 Eylül ayında Ege Üniversitesi Kök Hücre Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimime başladım.

E-posta: r.huseynova55@gmail.com

Tel No: +90 553 737 87 11