

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ISI ŞOK PROTEİN 10 (HSP10)'UN MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERİN İMMÜNMODÜLASYONUNDAKİ
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Aysun SARIKAYA

Enstitü Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Elvan ŞAHİN
Ortak Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Fatima Susanna Faustina AERTS KAYA

NİSAN - 2018

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ




ISI ŞOK PROTEİN 10 (HSP10)'UN MEZENKİMAL
KÖK HÜCRELERİN
İMMÜNMODÜLASYONUNDAKİ ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Aysun SARIKAYA

Enstitü Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji

Bu tez 13/04/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.”

JÜRİ ÜYESİ	KANAATI	İMZA
Prof. Dr. Elvan ŞAHİN	Başarılı	
Prof. Dr. Nureddin CENGİZ	Başarılı	
Prof. Dr. Süleyman KALELİ	Başarılı	
Dr. Öğr. Üyesi Fatima Susanna Faustina AERTS KAYA	Başarılı	
Doç. Dr. Nermin AKDEMİR	Başarılı	

BEYAN

Bu çalışma için T.C. Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik Kurulundan 07/01/2015 tarihinde onay olarak hazırlanmıştır (GO14/574). Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilemeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

19.04.2018

Aysun SARIKAYA

İmza



TEŞEKKÜR

Hem yüksek lisans eğitimim sırasındaki büyük katkıları için hem de tez konumu belirlemem ve devamını sağlamamda bilgi ve tecrübeleriyle fikir verip her zaman destek olduğu için danışman hocam Prof. Dr. Elvan ŞAHİN'e ve tezimi hazırlarken destekleriyle her zaman yanımda olan ortak danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Fatima Susanna Faustina AERTS KAYA'ya içten teşekkür ederim. Tez çalışmam için Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi (PediSTEM)'ndeki laboratuvarımı kullanmama izin veren ve çalışma boyunca fikirleriyle destek olan hocam Prof. Dr. Fahriye Duygu UÇKAN ÇETİNKAYA'ya, Doç. Dr. Özgür ÖZYUNCU'ya ve PediSTEM'de çalışan arkadaşlarıma ve personeline teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca yüksek lisans eğitimim sırasında, sahip olduğu bilgi ve deneyimi ile desteklerini esirgemeyen hocam Prof. Dr. Nureddin CENGİZ'e içten teşekkürlerimi sunarım.

Her koşulda yanımda olan, bu günlere ulaşabilmem için her zaman bana destek veren ve maalesef tez çalışmam sürecinde kaybettiğim sevgili annem Şerife SARIKAYA'ya, babam Lütfi SARIKAYA'ya ve kardeşim Şükrü SARIKAYA'ya, manevi ablam Dr. Ilgın ÇAĞNAN'a, manevi kardeşim Elif SÖZEN'e gönülden minnetlerimi sunmayı borç bilirim. Yanısıra, yüksek lisans eğitimine birlikte başladığım arkadaşım Oğuzhan BULDUK'a eğitim ve tez çalışmam süresince fikir paylaşımları için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	i
TEŞEKKÜRLER	ii
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	vi
ŞEKİLLER.....	vii
RESİMLER.....	ix
TABLolar	x
ÖZET.....	xii
SUMMARY	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER (MKH).....	2
2.1.1. MKH İmmünofenotipik özellikleri	3
2.1.2. MKH Fonksiyonları	4
2.1.2.1. Hematopoetik Kök Hücreler Desteği	4
2.2.2.2. Rejeneratif Tıp.....	4
2.2.2.3.İmmünomodülasyon	5
2.2. PLASENTA	6
2.2.1. İmmüno-regülasyonda Plasentanın Rolü.....	9
2.2.2. Plaseenta Mezenkimal Kök Hücreleri.....	10
2.3. ERKEN GEBELİK FAKTÖRÜ (EPF).....	11
2.4. ISI ŞOK PROTEİNLER (Hsp) VE HSP10.....	12
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	16
3.1. GEREÇLER	16
3.2. KİMYASALLAR VE TAMPON SOLÜSYONLAR.....	17
3.3. BOYAMALAR	18
3.4. ANTİKORLAR.....	18
3.5. YÖNTEMLER	19

3.5.1. Etik Kurul İzni.....	19
3.5.2. MKH İzolasyonu	19
3.5.2.1. Kemik iliği MKH'leri.....	19
3.5.2.2. Plasenta MKH'leri.....	20
3.5.3. MKH Karakterizasyonu	20
3.5.3.1. İmmünofenotiplendirme	20
3.5.3.2. MKH'lerin Farklılaşması.....	21
3.5.3.2.1. Adipojenik Farklılaşma	21
3.5.3.2.2. Osteojenik Farklılaşma	22
3.5.4. Fonksiyonel Testler	22
3.5.4.1. İmmünohistokimya.....	22
3.5.4.2. Western Blot.....	23
3.5.4.3. ELISA.....	25
3.5.4.4. T hücre Proliferasyonu ve Aktivasyonu Baskılama Testleri.....	25
3.5.5. İstatistik	26
4. BULGULAR.....	27
4.1. KEMİK İLİĞİ VE PLASENTA MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN İMMÜNOFENOTİPLERDİRMESİ.....	27
4.2. KEMİK İLİĞİ VE PLASENTA MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN FARKLILAŞMASI	29
4.3. KEMİK İLİĞİ VE PLASENTA MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN İN VİTRO T HÜCRE BASKILAMASI.....	30
4.4. KEMİK İLİĞİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNDEN HSP10 SALINIMI.....	34
4.5. KEMİK İLİĞİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNDE VE PLASENTA MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNDE İNTRASELLÜLER HSP10 İFADELERİ	34
4.6. KEMİK İLİĞİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNDE HSP10 PROTEİN İFADELERİ	35

5. TARTIŞMA VE SONUÇ	37
KAYNAKLAR	45
EK	55
ÖZGEÇMİŞ	56



KISALTMA VE SİMGELER

APC	: Antigen Presenting Cells (Antijen sunan hücreler)
ARS	: Alizarin Red Stain
CFU-F	: Colony Forming Unit Fibroblast
Cpn 10	: Mitochondrial Chaperone 10 (Mitokondriyal Şaperon 10)
DC	: Dendritic cell (Dendritik Hücre)
EPF	: Early Pregnancy Factor (Erken Gebelik Faktörü)
Fas-L	: Fas Ligand
FBS	: Fetal Bovine Serum (Fetal Buzağı Serumu)
FL	: Flt-3 Ligand
GvHH	: Graft versus Host Disease (Graft Versus Host Hastalığı)
HKH	: Hematopoietic stem cell (Hematopoetik Kök Hücre)
HLA-G	: Human Leukocyte Antigen-G (İnsan Lökosit Antijeni-G)
HO-1	: Hemoxigenase-1 (Hem Oksijenaz-1)
Hsp	: Heat shock protein (Isı şok protein)
Hsp10	: Heat shock protein 10 (Isı şok protein 10)
IBMX	: Isobutylmethylxanthine (İzobutilmetilksantin)
ICAM	: Intracellular adhesion molecule (İntraselüler adezyon molekülü)
IDO	: Indoleamin 2,3-dioxygenase (İndoleamin 2, 3-Dioksijenaz)
IFN γ	: Interferon Gamma
IGF-1	: Insulin like growth factor 1 (İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü I)
IL	: Interleukin (İnterlökin)
LFA-1	: Lymphocyte function-associated antigen 1 (Lenfosit fonksiyonuna bağlı antijen-1)
LIF	: Leukemia inhibiting factor (Lösemi İnhibe Edici Faktör)
LPS	: Lipopolysaccharide (Lipopolisakkarit)
L-PHA	: Phytohaemagglutinin-L (Fitohemaglutinin-L)
Mac-1	: Macrophage antigen 1 (Makrofaj antijen-1)
M-CSF	: Macrophage Colony Stimulating Factor (Makrofaj Koloni Stimüle Faktör)
Eden	
MKH	: Mesenchymal stem cell (Mezenkimal kök hücre)

MNH	: Mononuclear cell (Mononükleer hücre)
Nf-KB	: Nuclear Factor-kappa B (Nükleer faktör-Kappa B)
NK	: Natural killer cell (Doğal öldürücü hücreleri)
NO	: Nitric Oxide (Nitrik Oksit)
ORO	: Oil Red O dye
PD-L1/2	: Programmed Death Cell Ligand 1/ 2 (Programlanmış Hücre Ölümü Ligand 1/2)
PGE2	: Prostaglandin E2
PKL	: Peripheral blood lymphocytes (Periferik Kan Lenfositleri)
SCF	: Stem cell factor (Kök hücre faktörü)
SDF α 1	: Stromal derived factor alpha-1 (Stroma kökenli faktör alfa -1)
TCR	: T cell receptor (T-hücre reseptörü)
TGF β	: Transforming growth factor beta (Transforme eden büyüme faktörü beta)
Th1	: Type 1 T helper cells (Tip-1 Yardımcı T-Lenfositler)
Th2	: Type 2 T helper cells (Tip-2 Yardımcı T-Lenfositler)
TLR	: Toll-like receptor (Toll benzeri reseptör)
TNF α	: Tumor necrosis factor alpha (Tümör Nekrotizan Faktör-Alfa)
Treg	: Regulatory T-cell (Regülatuar T hücre)
TSG6	: TNF α Stimulated Gene/Protein 6 (TNF α ile Stimule Edilen Gen/Protein 6)
VCAM-1	: Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1)
VLA-4	: Very Late Antigen-4 (Çok geç antijeni-4)

ŞEKİLLER

Şekil 1. MKH farklılaşma potansiyeli	2
Şekil 2. MKH immünomodülasyonu	6
Şekil 3. Plasentanın şematik gösterimi	9
Şekil 4. Hsp10/Hsp60 kompleksi	13
Şekil 5. Hsp10'un hücre içi ve hücre dışı fonksiyonları	14
Şekil 6. 24-Kuyucuklu tabakada T-hücre baskılama testinin deneysel yapısı	26
Şekil 7. KI-MKH ve PL-MKH'lerin FACSARIA (Becton Dickinson) marka akım sitometri cihazı ile analiz edilmiş olan immünofenotipik karakterizasyonu	28
Şekil 8. PL-MKH'lerinde Hsp10 pozitifliğini gösteren akım sitometrik analiz sonuçları	29
Şekil 9. Hsp10'un ELISA standart sonuçları	34

RESİMLER

Resim 1. Akım sitometri cihazı (FACSARIA/ FACSARIA-II).....	21
Resim 2. Chamber slide.....	23
Resim 3. Kİ-MKH'lerin (A,B, C) ve PL-MKH'lerin (D,E, F) 21. günde adipojenik ve osteojenik farklılaşmasını gösteren invert mikroskobu görüntüleri.....	30
Resim 4. A. Kontrol (Stimüle edilmemiş) besiyeri; B. L-PHA ile stimüle edilmiş CD3+ T-hücreleri (okla işaretli) içeren besiyerinin invert mikroskobik görüntüsü ..	31
Resim 5. Kİ-MKH'leri (% 1, % 3, % 10, % 30) ile 4 gün ko-kültüre edilen CD3+ periferik kan lenfositlerinin (PKL) ekspansiyon düzeyi	32
Resim 6. PL-MKH'leri (% 1, % 3, % 10, % 30) ile 4 gün ko-kültüre edilen CD3+ periferik kan lenfositlerinin (PKL) ekspansiyon düzeyi	33
Resim 7. Kİ-MKH'lerindeki ve PL-MKH'lardaki Hsp10'un sitoplazmik lokalizasyonunu gösteren immünfloresan mikroskobik görüntü	35
Resim 8. Stresörlerle uyarılmış Kİ-MKH'lerinde Hsp10 protein ifadeleri.....	36

TABLÖLAR

Tablo 1. Trisin jel içeriği	24
Tablo 2. Kİ-MKH ve PL-MKH'lerin belirteç düzeyleri	27
Tablo 3. Kİ-MKH ve PL-MKH'lerdeki immünolatuar antigen ifadeleri.....	28
Tablo 4. Semi-kantitatif farklılaşma sonuçları	30
Tablo 5. Uyarılmış Kİ-MKH'lerinden hücre dışına salınan Hsp10 (ng/mL) düzeylerinin ELISA sonuçları.....	34



EK

Ek.1. Etik Kurul Kararı.....	56
------------------------------	----



ÖZET

Bu tez çalışması kapsamında, Isı şok protein 10 (Hsp10)'un Mezenkimal kök hücrelerin (MKH) immünomodülasyonundaki rolü araştırıldı. Hücrelerin karakterizasyonu için stromal belirteçlerin ifadelerine ve farklılaşmalarına bakıldı. Kİ-MKH'nın ve PL-MKH'nın aktive edilmiş T hücre proliferasyonu üzerindeki immünomodülatör etkilerini araştırmak için CD3 + T hücreleri izole edildi. L-PHA ile uyarılmış ve CFSE etiketli T hücreleri BM-MSK'ler veya PL-MSK'ler ile birlikte kültürlendi. IFN γ , LPS ve ısı şokuna maruz bırakılan BM-MSK'lerin süpernatantlarında Hsp10 seviyeleri, ELISA ile değerlendirildi; EGF / Hsp10'un hücre içi ifadesi Western-Blot ve immünohistokimyasal boyamalar kullanılarak değerlendirildi. CD105, CD73, CD90, CD44, CD29, MSK'lerin immünofenotiplenmesi için stromal belirteçler olarak kullanılmış ve akış sitometrisi (FACS) kullanılarak ölçülmüştür. Yüzey belirteçlerinin ve immünomodülatör moleküllerin ekspresyonunda Kİ-MKH ve PL-MKH arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Genel olarak, Kİ-MKH'lar PL-MKH'lardan daha yüksek bir farklılaşma kapasitesine sahip olduğu gösterildi. PL-MKH'lar, T-hücresi genişlemesini Kİ-MKH'lara göre daha az baskılayabildiği gözlemlendi. Çeşitli uyarıların uygulanmasından sonra hücre kültürü süpernatantına PL-MKH ve Kİ-MKH'lardan Hsp10 salgılanması, algılama seviyelerinin altında kaldı.

Bu veriler, PL-MKH'lerin hem diferansiyasyon hem de immün baskılayıcı kapasitelerinin görece safsızlık nedeniyle engellendiği fikrini desteklemektedir.

Sonuç olarak, FACS, Western Blot, ELISA ve immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak, hem Kİ-MKH hem de PL-MKH'lerde, Hsp10'un protein katlama ve transportunda hücre içi olarak önemli rol ile tutarlı olarak yüksek Hsp10 seviyelerinin saptanmış olduğu gösterildi, ancak bu protein, uygulanan uyarıların herhangi birine yanıt olarak salgılanmadığından, Hsp10'un Kİ-MKH'larda ve PL-MKH'larda önemli bir immünorölasyon işlevine sahip olma ihtimalinin olmadığını göstermektedir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: HSP, İmmünomodülasyon, Kİ, MKH, Plasenta, HSP10

SUMMARY

In this thesis, the role of heat shock protein 10 (Hsp10) in the immunomodulation of mesenchymal stem cells (MSC) was investigated. Cells were characterized and assessed for expression of stromal markers and differentiation. CD3⁺ T-cells were isolated in order to investigate the immunomodulatory effects of BM-MSC and PL-MSC on activated T-cell proliferation. L-PHA-stimulated and CFSE-labeled T-cells were co-cultured with BM-MSCs or PL-MSCs. Hsp10 levels in supernatants of BM-MSCs exposed to IFN γ , LPS and heat shock were assessed by ELISA; intracellular expression of EGF/Hsp10 was assessed using Western-Blot and immunohistochemical stainings. CD105, CD73, CD90, CD44, CD29 were used as stromal markers for immunophenotyping of MSCs and measured using flow cytometry (FACS). No significant differences between BM-MSC and PL-MSC were observed in the expression of surface markers and immunomodulatory molecules. Overall, BM-MSCs showed a higher differentiation capacity than PL-MSCs. PL-MSCs were less able to suppress T-cell expansion than BM-MSCs. Secretion of Hsp10 from PL-MSC and BM-MSCs into the cell culture supernatant after application of various stimuli remained below detection levels.

These data support the idea that both differentiation and immune suppressive capacities of PL-MSCs were hampered because of the relative impurity.

In conclusion, using FACS, Western Blot, ELISA and immunohistochemical methods, we showed that although high levels of Hsp10 were detected intracellularly in both BM-MSC and PL-MSCs, which is consistent with the important role for Hsp10 intracellularly in protein folding and transport, but since this protein was not secreted in response to any of the stimuli applied, indicating that it is unlikely that Hsp10 has an important immunoregulatory function in BM and PL-MSCs.

KEY WORDS: HSP, Immunomodulation, BM, MSC, Placenta, HSP10

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mezenkimal Kök Hücre (MKH)'ler kemik, kıkırdak ve yağ hücresi gibi farklılaşabilme yeteneğine sahip olan ve immün sistemin düzenlenmesinde önemli rol oynayan hücrelerdir. Bu kök hücreler farklı dokulardan izole edilebilmektedir. Ancak farklı dokulardan elde edilen MKH'lerin hem farklılaşma kapasitesi hem de immünojenik etkileri birbirinden farklı olabilmektedir.

Erken Gebelik Faktörü (Early Pregnancy Factor, EPF), fertilizasyondan sonra yaklaşık 6-24 saat içerisinde, maternal serumda tespit edilebilmekte ve gebeliğin ilk iki trimesteri boyunca üretilmektedir. EPF, bağışıklık sisteminin baskılayıcı bir proteindir. EPF'nin, yeni oluşan embriyoya karşı maternal immün sistemin tepki göstermesini engellediği bildirilmiştir. EPF gebeliğin birinci trimesterinde yetersiz seviyelerde eksprese edildiğinde, düşüklerin patofizyolojisinde önemli bir rol oynadığı rapor edilmiştir.

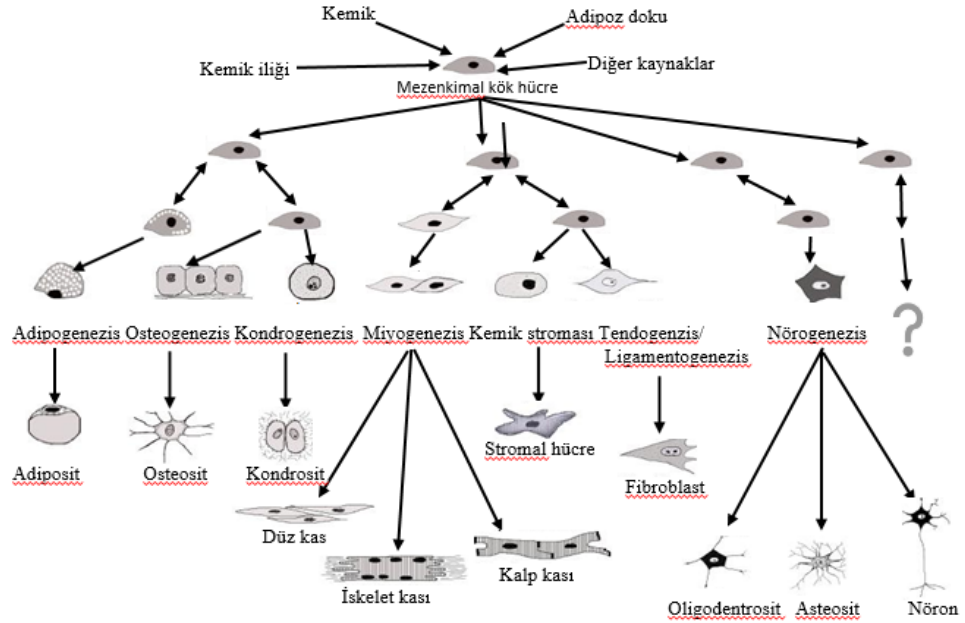
Isı şok protein 10 (Heat shock protein 10, Hsp10) kompleksi, hücrede proteinlerin katlanmasında, kontrolünde, translokasyonunda, üretiminde ve degradasyonunda rol oynamaktadır. Hsp10'un anti-tümör immün yanıtı baskıladığı ve regülatuar T-hücrelerini arttırarak immünomodülasyonu sağladığı gösterilmiştir. Bu nedenle, immünomodülatuar özelliği olan Hsp10, otoimmün hastalıkların veya allojenik hematopoetik kök hücre naklinden sonra oluşabilen ölümcül greft-versus-host hastalığı (GvHH)'nin tedavisinde önemli rol oynayabilir.

Son çalışmalara ait veriler, EPF ve Hsp10'un aynı molekül olduğunu desteklemektedir. Ancak Hsp10 etkisini hücre içinde gösterirken, EPF'nin etkisi hücre dışında gerçekleşmektedir. İmmün baskılayıcı olan Hsp10 proteini, kontrol edilemeyen çeşitli immün yanıtların tedavilerinde önemli bir rol oynayabilir. Bu hipotezlerden yola çıkarak yaptığımız tez çalışması kapsamında, Hsp10'un PL-MKH ve Kİ-MKH'lerin immünomodülasyonun-daki rolü ve immün düzenleyici potansiyeli araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER

Mezenkimal kök hücre (MKH)'ler erişkin multipotent kök hücre tiplerinden biridir. Bağ dokusunun öncül hücreleridir ve destek hücreleri olan stromal hücrelerin de kökenini teşkil etmektedirler. Friedenstein ve ark., fetal buzağı serumu (FBS) kullanarak yaptıkları kemik iliği (Kİ) kültürlerinde adezyon yeteneği gösteren, morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen hücre kolonilerinin bulunduğunu tespit etmişlerdir (Friedenstein, Gorskaka ve Kulagina, 1976). Bu hücrelerin de osteoblast, adiposit ve kondrosit hücrelerine farklılaşabildiğini gösterilmiştir (Pittenger et al., 1999). Birden fazla hücre serisine farklılaşabilmeleri, kendilerini yenileyebilme özelliklerinden dolayı bu hücrelere MKH denmektedir (Caplan, 1991; Prockop, 1997). Ayrıca, bu hücrelerin kendi germ yaprağına farklılaşma potansiyelinin dışında daha geniş bir farklılaşma potansiyeli olduğu da gösterilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. MKH farklılaşma potansiyeli (Aerts and Wagemaker, 2005)

Önceleri, colony forming unit fibroblast (CFU-F) ve “kemik iliği stromal fibroblast”ları denilen bu hücreler daha sonra MKH olarak tanımlanmışlardır. MKH’ler, kemik iliği de dahil olmak üzere çeşitli bağ dokularında bulunmaktadır. Örneğin; bu hücreler kemik iliği, plasenta, diş pulpası, karaciğer, kordon kanı, amniyon sıvısı, sinovial sıvıyı da içeren birçok farklı kaynaktan üretilebilmektedir (Malgieri, Kantzari and Patrizi, 2010).

2.1.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünofenotipik Özellikleri

Farklı dokulardan morfolojik ve biyolojik olarak benzer özelliklere sahip MKH’ler izole edilebilmektedir. Çoğu çalışmada MKH fenotipik özellikleri kültürde çoğaltıldıktan sonra değerlendirilmektedir. Kültürde çoğaltılmış MKH’ler antijenik özelliklerine bakıldığında kendilerine has bir belirteç taşımadıkları belirtilmiştir. Ayrıca, *in situ* koşullar altındaki MKH’lerin ifade ettiği antijen profili, kültür ortamında çoğaltılan MKH’lerinkinin tamamen aynısı değildir. Kemik iliğinden izole edilmiş ve kültürde çoğaltılmış MKH’lerin tanımı için minimal gerekli olan immünofenotipik özellikleri Dominici ve ark. tarafından 2006 yılında *Cytotherapy* dergisinde yayınlanmıştır: MKH’lerde CD29, CD44, CD105 (SH2) ve CD73 (SH3-SH4) stromal antijenleri pozitifdir. Ayrıca, hücre popülasyonunda CD45, CD34 ve HLA-DR gibi hematopoetik yüzey belirteçlerin pozitiflik oranının %2’yi geçmemesi gerekmektedir (Dominici et al., 2006). Bunun yanı sıra fibroblast yüzey antijeni STRO-1, CD71 (Transferrin Reseptörü) ve CD90 (Thy-1), MKH’ler tarafından yüksek oranlarda ifade edilmektedir. Kemik iliğinde bulunan MKH’ler fibronektin, laminin, kollajen gibi ekstrasellüler matriks elemanlarına ve intrasellüler adezyon molekülü ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102), ICAM-3 (CD50), vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1, CD106) ve L-Selektin (CD62L) gibi adezyon moleküllerine sahiptir (Majumdar, Thiede, Mosca, Moorman, Gerson, 1998).

2.1.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Fonksiyonları

2.1.2.1. Hematopoetik Kök Hücelere Desteği

MKH'ler kemik iliğinde bulunan, hayat boyunca yeterli sayıda tüm kan hücrelerinin devamını sağlayan hematopoetik kök hücre (HKH)'lerin olgunlaşması, sağ kalımı, çoğalması ve sessizliği için gerekli olan niş ortamının yaratılmasında önemli rol oynamaktadır (Blanco et al., 2010). MKH'ler, çok sayıda biyoaktif molekül, sitokin, kemokin, enzim ve ekstrasellüler matriks proteinlerini sentezlemektedir. HKH'ler yüksek düzeyde CXCL12 ifade eden fibroblastik retikulum hücreleri ile komşudurlar. Nestin eksprese eden MKH'ler, HKH'lerin gelişimi için gerekli faktörlerin genlerini barındırmaktadır (Mendez-Ferrer et al., 2010). Kİ-MKH'leri HKH için gerekli makrofaj koloniyi stimüle eden faktör (M-CSF), Flt-3 ligand, kök hücre faktörü (Stem Cell Factor, SCF) gibi büyüme faktörlerini salgılamaktadır. Bunun dışında, MKH'lerden interlökin-6 (IL-6), IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15 gibi sitokinler ve stroma kökenli faktör alfa-1 (SDF α 1) gibi kemoatraktan protein olmak üzere kemokinler de sentezlenmektedir (Aerts-Kaya and Wagemaker, 2005).

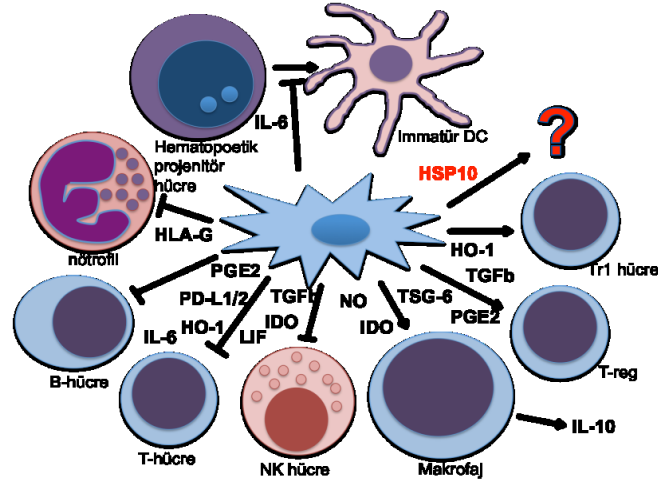
2.1.2.2. Rejeneratif Tıp

MKH'lerin bir başka önemli kullanım alanı rejeneratif tıptır. Hücrelerin adipojenik, osteojenik, kondrojenik, nörojenik ve miyojenik farklılaşma potansiyelinden dolayı diş hekimliğinde implant yapımı, miyokard enfarktüsünün tedavisi, spinal kord yaralanmalarının tedavisi ve plastik cerrahide yanık tedavisi gibi, çok geniş bir kullanım alanına sahiptir. Örneğin; miyokard enfarktüsünde kardiyomyositlere destek sağlamak amacıyla uygulanan MKH tedavisi ile bu hücrelerin hasarlı kalp dokusuna göç ederek iyileşmeyi sağladığı gösterilmiştir (Aerts-Kaya ve Uçkan-Çetinkaya, 2016). Ayrıca kırık ve kemik onarımı gereken hasarlarda, travma ve yaşlılık sonucu ortaya çıkan osteoartritte MKH'lerin kullanılması uygun görülmektedir. Günümüzde sinir sistemi hastalıklarının önemli bir kısmında tam iyileşme sağlayan tedavi yöntemleri henüz geliştirilememiştir. Bu hastalıklar arasında multipl skleroz, nörodejeneratif hastalıklar ve travmatik sinir kesileri gelmektedir. Omur iliği

yaralanmalarında etkin rejeneratif tedavilerin yakın bir gelecekte mümkün olabileceği yapılan çalışmalar sonucunda gösterilmiştir. Kalıtsal hastalıklarda en başarılı sonuçlar osteogenezis imperfekta hastalarda elde edilmiş olup, hastaların boylarında uzama, kırıklarda azalma ve motor fonksiyonlarda düzelmeler bildirilmiştir (Doğanay, Gürcan, Olşen, Darka, Alpan, 2012).

2.1.2.3. İmmünomodülasyon

MKH'ler MHC sınıf II ve CD40, CD40L, CD80, CD83 ve CD86 gibi ko-stimülatör molekülleri eksprese etmediğinden dolayı, donör MKH'ler alıcıların immün sisteminde uyarılmamaktadır (Haddar and Saldanha-Araujo, 2014; Domici et al., 2006). MKH'ler T hücre yanıtlarını, dendritik hücreleri (DC) modüle ederek, natural killer (NK) ve T hücrelerinin fonksiyonlarını bozarak baskılamaktadırlar. MKH'ler prostoglandin-E2 (PGE2), IL-10 ve indoleamin 2,3-dioksijenaz (IDO) salgılayarak etraflarında bölgesel bir süpressif mikroçevre oluşturmaktadırlar. MKH'ler *in vitro* ortamda bu molekülleri ve sitokinleri kullanarak, T hücre proliferasyonu ve aktivasyonunu baskılamaktadır ve regülatuar T hücrelerinin (Treg) sayısını arttırmaktadırlar (Şekil 2) (Ma et al., 2014). *In vitro* ortamda MKH'lerin lenfositlere allojenik yanıt göstermediği ve *in vivo* sitotoksik T hücreleri ve NK hücreleri tarafından ortadan kaldırılmadığı görülmüştür. MKH'lerin bu bağışıklık sistem düzenleyici özellikleri, HLA tip-II reseptörlerinin olmaması ve sitokin salgılamamalarıyla açıklanmıştır (Angoulvant et al., 2004).



Şekil 2. MKH immünomodülasyonu (Tez ortak danışmanı Fatima AERTS-KAYA tarafından çizilmiştir.)

MKH'ler çeşitli solübl faktörler salgılayarak T hücre ve B hücre proliferasyonunu azaltmaktadır, DC'leri immatür evrede tutmaktadırlar, nötrofillerin ve NK hücrelerin fonksiyonlarını baskılamaktadırlar.

Allojenik HKH transplante edilen ve doku grubu (HLA) tam uyumlu donörü bulunmayan hastalarda, Graft versus Host Hastalığı (GvHH) gelişebilmektedir. Hastalarda ağır ve potansiyel olarak ölümcül inflamatuvar ve otoimmünite benzeri bir sendrom oluşmaktadır. MKH'lerin immün baskılayıcı özelliklerinden dolayı bu hücreler GvHH tedavisinde olarak sağlamıştır (Le Blanc ve Ringden, 2007). MKH'lerin GvHH'nın evrelerini azaltabildiği ve HKH naklinden sonra gerekli olduğunda immün modülatuar tedavi olarak klinikte de MKH'lerin kullanılabildiği gösterilmiştir (Bernardo ve ark., 2011).

2.2. PLASENTA

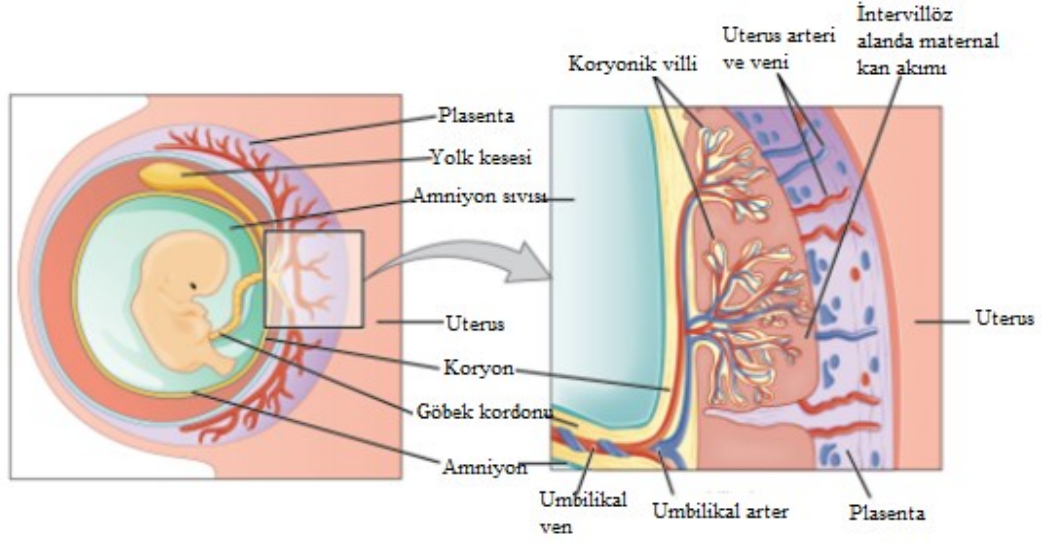
Plasenta, fetusun beslenmesini ve gelişimini sağlayan bir dokudur, maternal ve fetal kaynaklı yapıları içermektedir. Fetal bölümü koryon frondozum, maternal bölümü desidua bazalis olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır (Özer, 2016). Fetal bileşen koryon plağı ve koryon villüslerinden oluşmaktadır ve bütün bu yapıların hepsine villöz koryon denmektedir. Koryonik villuslar, koryondan uzanıp dallanırlar.

Villusların uçları desidüaya bağlıdır ve 6. haftadan itibaren dallardan serbest uçlar gelişir (Ovalle and Nahirney, 2009). Villusların ortasında yer alan gevşek bağ dokusunda iki tip hücre bulunur. Bunlar mezenkimal hücreler ve Hofbauer hücreleridir (Özer, 2016). Hofbauer, hücreleri makrofajlar olarak da bilinir ve gebelik ilerledikçe sayıları artar. Her villus, embriyonun trofoblast tabakasından türeyen iki epitelyal hücre tabakasından oluşmaktadır (Ovalle and Nahirney, 2009). Langerhans hücreleride denilen tek sıra sitotrofoblast hücre tabakası, geniş soluk hücrelerdir. Sitoplazmalarında glikojen ve vakuol yer alır. Sinsityotrofoblastlar ise daha koyu nükleuslu hücrelerdir. Aktif transportu, pasif alımı, immünglobülinlerin reseptör-aracılı endositozu, kolaylaştırılmış difüzyonu ve salgı ekzositosu gibi görevleri vardır (Ovalle and Nahirney, 2009). 10. haftadan sonra sitotrofoblast tabakası yavaş yavaş ortadan yok olmaya başlar (Ovalle and Nahirney, 2009). Trofoblast hücre tabakaları villöz kordonlarını oluştururlar. Villöz kordonlarıda endometriyuma invaze olarak endometrial stromadaki spiral arteriyollerle venüllerin duvarlarını yok ederler. Damarların parçalanmasıyla birlikte dışarıya maternal kan çıkar ve desidual dokuyu aşındırılmasıyla intervillöz aralıkları oluşturur. Maternal kan ile temas eden plazma membranında apikal villuslar vardır. Sitoplazmalarında mitokondriyon, lizozomlar, salgı vezikülleri, granüllü ve granülsüz endoplazmik retikulum gibi organeller bulunmaktadır. Steroid salgılayan hücreler ile uyumlu olarak, progesteron ve östrojenlerin sentez ve salınımı için gerekli olan granülsüz endoplazmik retikulum, lipit damlacıkları ve golgi komplekslerine sahiptirler. Granüllü endoplazmik retikulum ve ribozomlar; koryonik gonadotropin ve plasental laktojen hormonların sentezi için gereklidir. Gebeliğin ikinci yarısında sitotrofoblastlar kaybolur ve sinsityotrofoblastlar kalır. Üçüncü trimesterde; sinsityal düğümler denilen sinsityotrofoblast hücre çekirdeklerinin lokal çıkıntıları görülmektedir. Hücrelerin sitotrofoblastlara komşu plazma membranları kenetlenir. Komşu hücrelerin yan yüzeylerinde ve sinsityotrofoblastlarla temas eden yüzeylerinde dezmozomlara sahiptirler (Ovalle and Nahirney, 2009).

Desidua bazalis, embriyonun implante olduğu endometriyumun stratum bazalesi'dir. Bazal plak denilen sıkı tabakayı meydana getirir. 4-5. aylarda desidüadan oluşan desidual septumlar intervillöz mesafeye kadar ulaşır ancak koryonik plağa kadar

ulaşamazlar. Septumlar maternal doku içerirler, yüzeyleri sinsityal hücrelerle döşelidir (zer, 2016). Septumlarla plasenta bir çok kotilodona ayrılmıştır. Kotilodonlar ana kök villus ve dallarını içerir. Kapiller duvardaki nadir yırtılmalar dışında fetal ve maternal kan birbiri ile karışmaz (Ovalle and Nahirney, 2009). Fetal ve maternal kanın karışmasını engelleyen plasenta bariyeridir. Dördüncü ayın başından itibaren incelemek ürünlerin geçişini kolaylaştırır. Plasenta bariyeri sinsityotrofoblastlar, sitotrofoblastlar, trofoblastların bazal laminası, villus bağ dokusu, endotelin bazal laminası ve tersiye villüs içindeki fetal plasental kapillerrin endotelinden oluşmaktadır (Ovalle and Nahirney, 2009).

Plasenta, gazların, elektrolitlerin ve metobolitlerin maternal ve fetal kan arasındaki değişimi gibi anne ile gelişen embriyoya ya da fetus arasındaki fizyolojik alışverişler ile bağlantılı fonksiyonlardan sorumludur. Fetal kandan umbilikal kordon arterleri plasentaya girer. Plasentada ilerleyerek koryonik plağa girip dallanırlar. Damarların dalları villuslara girip kapiler damar ağı oluştururlar. Gaz ve metabolit değişimi ince fetal tabaka boyunca gerçekleşir. Fetal dolaşıma giren antijenler fetusta immünite oluşmasını sağlarlar. Maternal kan bazal plağa giren spiral umbilikal arterler aracılığıyla plasentaya ulaşır. Kan villusların üzerini aşınca gaz ve metabolit değişimi olur. Fetusa ait atık ürünler, plasenta yoluyla maternal kana geçer. Maternal antikorlar plasenta yoluyla fetusa geçer, ayrıca östrojenler, progesteronlar ve insan koryonik gonadotropini gibi bazı hormonlar plasenta tarafından yapılır ve salınır. Plasentadan koryonik somatomammotropin, endotelial büyüme faktörü, relaksin, fibroblast büyüme faktörü, koloni stimüle edici faktör, interlökin, leptin gibi bir çok molekül salgılanır(zer, 2016).



Şekil 3. Plasentanın şematik gösterimi

(https://opentextbc.ca/anatomyandphysiology/chapter/28-2-embryonic-development/#fig-ch29_02_08. Erişim Tarihi: 20.03.2018).

2.2.1. İmmünregülasyonda Plasentanın Rolü

Gelişme sürecindeki maternal plasental doku, anneden embriyoya karşı oluşması muhtemel immün yanıtların immün regülasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Bir MHC-I molekülü olan HLA-G, sitotrofoblastlarda ve plasenta dokusunda yüksek düzeylerde eksprese edilmektedir (Mosaferi et al., 2013). HLA-G molekülü NK hücrelerini, B-hücrelerini, T-hücrelerini ve antijen sunan hücreleri (APC) inhibe eder. Gebelik boyunca çeşitli hücrelerden salınan sitokinler arası etkileşim de anneye ait immün sistemi kontrol altında tutarak embriyonun yaşamını devam ettirmesinde önemli rol oynar. Tip-1 yardımcı T-lenfositler (Th1)'lerden salınan IL-2, interferon gamma (IFN γ) ve Tümör Nekrotizan Faktör-alfa (TNF- α) embriyo için zararlı olan sitokinler arasında yer aldığı halde, Th2'lerden salınan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve Lösemi İnhibe Edici Faktör (LIF) gebelik lehine iş gören sitokinler arasında bulunmaktadır (Kanellopoulos-Langevin, Caucheteux, Verbeke, Ojcius., 2003; Bulla, 2004). Tekrarlayan spontan düşüklere anne kanında, Th1'lerden salgılandığı bilinen IL-2 molekülü yüksek düzeyde bulunduğu halde; sağlıklı gebelik geçiren annelerin kanında ise IL-4 ve IL-10 düzeyleri oldukça yüksek bulunmuştur (De Lemos, 2003). Trofoblastlar, immün sistem üzerine baskılayıcı rolü olan TGF β ve IL-10 üretimini de

üstlenmişlerdir (Guzeloglu, Erdem, Saribay, 2007). Th2'ler tarafından üretilen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve IL-13 molekülleri, Th1'ler tarafından üretilen IL-2, TNF- α ve IFN γ moleküllerin üzerinde etkili olarak hücrenel aracılı immün sistemin aktivasyonunu engellerler (Padua, 2004). Treg'ler diğer hücrelerin proliferatif tepkilerini ve sitokin üretimlerini baskılayan CD4⁺/CD25⁺ hücreler olup, maternal-fetal ara yüzde özellikle IL-10 ve TGF β gibi immünoşüpresif sitokinleri üreterek etki ederler (Padua, 2004; Lewkowicz, Lewkowicz and Tchorzewski, 2005). Sinsityotrofoblastlar, fetal-maternal ara yüzde sentezledikleriIDO enzimi ortama vererek, lokal triptofan konsantrasyonunu düşürürler ve böylece bölgedeki T lenfositlerin çoğalmasını yavaşlatırlar (De Lemos, 2003; Trowsdal and Betz, 2006). Plasentanın bu anlatılan immün regülatuar görevlerinin yanında, NO molekülünün de maternal toleransta önemli rol oynadığı bildirilmektedir. NO'nunIDO ve Fas/FasL mekanizmalarında düzenleyici bir rolünün olduğu, Th1 ve Th2'ler arasındaki denge üzerine de etki ettiği rapor edilmiştir (Hernandez et al., 2004).

2.2.2. Placenta Mezenkimal Kök Hücreleri

Farklı dokulardan elde edilen MKH'ler genelde benzer fenotipik özelliklere sahip olmakla birlikte bazı farklılıkları da vardır (Weissman, 2000; Krause, 2002). Placenta koryonundan elde edilen MKH'ler, Kİ-MKH'lerdeki gibi CD90, CD105 ve CD73 belirteçleri açısından pozitif ve CD45, CD34, CD14 belirteçleri arasından negatiftir. PL-MKH'ler de Kİ-MKH'leri gibi hematopoetik, endotelial ve trofoblastik hücre belirteçlerini bulundurmazken, embriyonik kök hücre belirteci olan SSEA3/4 ve Oct-4'ü bulundurmaktadır (Alviano et al., 2007; Wolbank et al., 2007). Placenta kaynaklı MKH'ler *in vitro* koşullarda, T hücre aktivasyonunu ve proliferasyonunu baskılamaktadır (Gu et al., 2013). Bu T hücre şüpresyonunun, hem çeşitli solübl faktörlere hem de hücre-hücre etkileşimlerine bağlı olduğu gösterilmiştir (Gu et al., 2013). PL-MKH'lerin yüzeylerinde, Programlanmış Ölüm-Ligand 1 (PD-L1) ve FasL molekülleri ifade edilmektedir. FasL, lenfositlerin yüzeyinde bulunan Fas (CD95) molekülüne bağlanarak onların apoptoz sürecine girmelerine neden olur (Gu et al., 2013; Luan et al., 2013; Arvola, Gustafsson, Mattsson, 2001). PL-MKH yüksek oranlardaIDO ekspresyon etmektedirler (Kudo et al., 2013).

2.3. ERKEN GEBELİK FAKTÖRÜ (EPF)

Erken gebelik faktörü (Early Pregnancy factor, EPF) fertilizasyondan sonra 6-24 saat içerisinde maternal serumda tespit edilebilmekte ve gebeliğin ilk iki trimesteri boyunca üretilmektedir (Qin and Zheng, 1987; Özbek, Cengiz ve Yanar, 2013). Rozet inhibisyon testi ile tespit edilen EPF, bağışıklık sisteminin baskılayıcı bir proteindir (Özbek ve ark., 2013). Embriyo annenin immün sisteminden “kaçmayı” başarabilirse gebelik gerçekleşebilecektir. Bundan dolayı daha erken dönemde maternal sistemi immünolojik olarak implantasyona hazırlamaktadır. İmmünoşüpresif faktör etkisi gösteren EPF'nin, yeni oluşan embriyoya karşı maternal immün sistemin tepki göstermesini engellemesi çok önemlidir (Özbek ve ark., 2013). EPF, hücrenin büyümesinde ve hayatta kalmasında rol oynamaktadır. Embriyonik gelişim için ve doku yenilenmesi için gereklidir (Athanasas-Platsis et al., 1991; Athanasas-Platsis et al., 1994). Ayrıca tümör hücreleri için otokrin sağkalım faktörü olarak da görev yapar (Quinn et al., 1990). Embriyonik hücrelerin canlılıklarının devamı için otokrin büyüme faktörü rolü oynayan EPF tümör hücreleri için de aynı rolü oynamaktadır. Bir çalışmaya göre EPF üretimi hücre bölünmesi sırasında gerçekleşmekte ve büyüme durduktan sonra veya hücre farklılaşması durumunda ise üretim olmamaktadır. Tümör hücresine anti-EPF antikorları artan dozlarda uygulandığı hücre büyümelerinde ve canlılıklarında önemli miktarda, doza bağlı bir düşüş olduğu gözlemlenmiştir. EPF sadece tümör hücreleri tarafından değil aynı zaman da normal hücreler tarafından üretilir (Quinn KA et al, 1990). Hücre kültüründe büyütülen ve bölünmekte olan aktif primer hücrelerin de EPF ürettiği, yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. İnsanda EPF aktivitesi maternal serum, idrar, fetal serum, amniyotik sıvı ve plasental ekstraktlarda tespit edilmiştir (Zheng, Qin, Ma, Qiao, Wang., 1990). Ayrıca insulin, insulin benzeri büyüme faktörü I (IGF-I), IGF-II, prolaktin, insan plasental laktojen, büyüme hormonu ve tioredoksin de olası adaylar olarak araştırılmıştır (Lash and Legge, 1997).

Embriyonun canlılığı ile yakından ilişkili olan EPF, embriyo transferinden sonraki 12 saat içerisinde ortaya çıkar ve embriyonun ölümü ya da alınmasını takiben 24-48 saat içerisinde kaybolmaktadır (Morton, Rolfe and Cavanagh, 1987). Ayrıca, EPF'nin tümör hücreleri, yetişkinlerde normal çoğalan hücreler ve aktif plateletler tarafından hücre büyümesi ve bölünmesi sırasında üretildiği, tümör hücrelerinin proliferasyonu

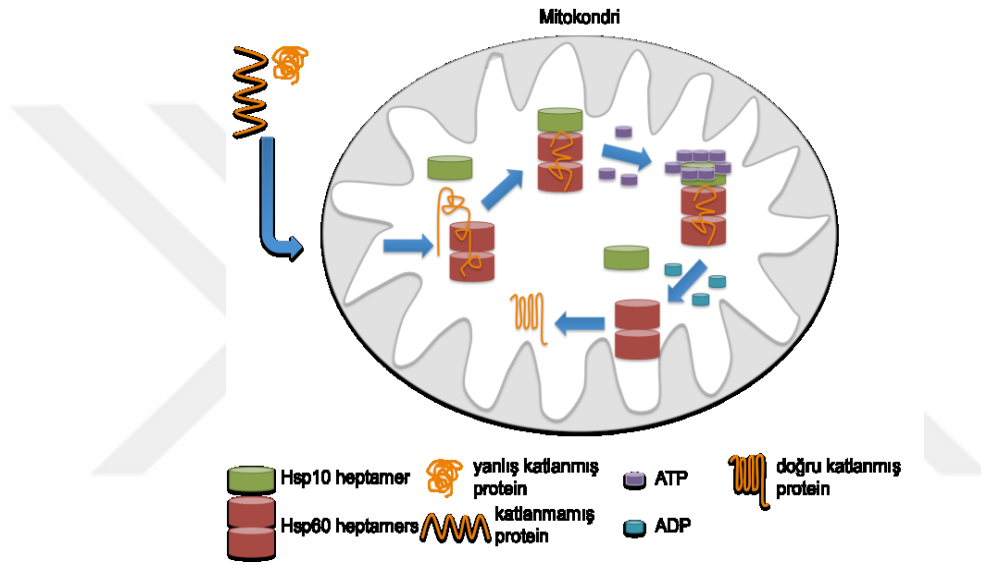
ve normal doku yenilenmesi için de gerekli olduğu gösterilmiştir (Cavanagh and Morton, 1994). Anti-EPF antikoru verilen gebe sıçanlarda embriyo sayısının kontrole kıyasla önemli derecede azaldığı ve embriyo gelişimlerinin daha geç gerçekleştiği gözlemlenmiştir ve anti-EPF antikoru uygulamalarından sonra embriyonik canlılığın sona erdiği rapor edilmiştir (Athanasas-Platsis ve ark, 1989). Düşük EPF aktivitesinin klomifen sitrat tedavisi gören kadınlarda subklinik embriyo kayıplarına neden olduğu tespit edilmiştir (Shahani, Moniz, Gokral, Meherji, 1995; Grossoa, Bellingeri, Schadeb, Adriana, 2012). EPF, hücre yüzeyinde bulunan TRL2/4, CD14, CD36, CD40 ve CD91 reseptörlerine bağlanarak bağışıklık sisteminde düzenleyici rol üstlenmektedir (Plüddemann, Neyen and Gordon 2007). EPF'ye bağlanan CD4⁺/CD25⁺ Treg hücreleri bağışıklık yanıtının bastırılmasında rol almıştır (Kohm, Carpentier, Anger, Miller, 2002).

2.4. ISI ŞOK PROTEİNLERİ VE HSP10

1962 yılında tanımlanan ısı şok proteinler (heat shock proteins, Hsp), hücrelerin yüksek ısıya (42-46°C) maruz kalmasıyla üretimi artan bir protein grubudur (Aufrecht, 2005). Evrim sırasında en çok korunmuş proteinlerden olup, fizyolojik durumlarda hücrelerde Hsp düşük seviyede mevcutken, stres maruziyetinde hücredeki ifadeleri hızla artmaktadır (Wang and Subject, 2013). Hsp düzeyinin yükselmesine ısı artışı dışında enfeksiyon ve inflamasyon gibi durumlar, etanol, arsenik ve eser metaller gibi bir çok kimyasallar, ultraviyole ışık, açlık, hipoksi ve dehidratasyon da neden olmaktadır. Bu nedenle Hsp'lere "stres proteinleri" de denilmekte ve stres cevabının bir komponenti olarak da görülmektedirler (Morimoto, 1998; Petrof, Ciancio and Chang, 2004).

Hsp'ler intrasellüler şaperonlardır. Katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin düzenlenmesinde katkıda bulunmakta, hücrelerin sağ kalımı ve homeostazını sağlamaktadırlar. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 ve küçük Hsp'ler olarak altı büyük Hsp ailesi tanımlanmıştır (Wang ve Subject, 2013). Hsp10, nükleer transkripsiyon ve sitoplazmik translasyondan sonra mitokondrilere transport edilmektedir (Hansen, Bross, Westergaard, Gregersen, 2003). 10 kDa boyutlu ve yüksek korunurlukta bir protein olup, diğer mitokondriyal ısı şok proteini Hsp60 ile beraber protein katlanması, protein kompleks toparlanması ve

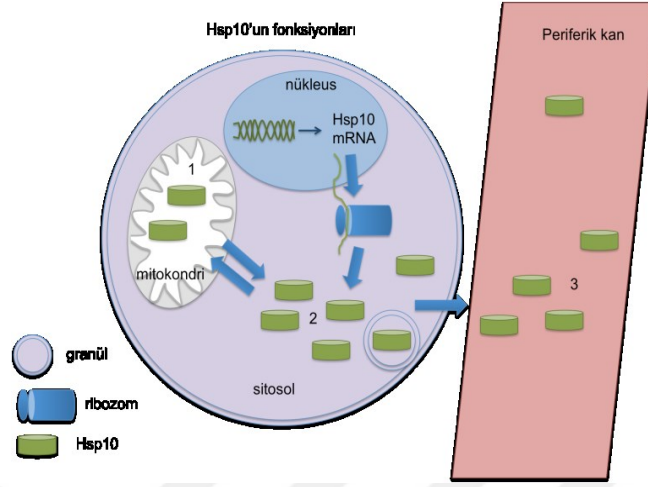
ayrılmasında ko-şaperon olarak rol almaktadır (Şekil 4) (Cavanagh and Morton 1994; Corrao et al., 2010). Sağlıklı hücrelerde Hsp10 çoğunlukla mitokondriyal matrikste bulunmakta, ancak çeşitli intrasitoplazmik granüllerde, eritrositlerde, plateletlerde ve kan serumunda da düşük seviyelerde bulunmaktadır (Sadacharan, Cavanagh and Gupta, 2001). Hsp10'un mitokondriyalde nasıl tutulduğu ve sitozolden hücre dışına nasıl salındığı henüz bilinmemektedir. Sekresyon için gerekli N-terminal sinyal peptid, Hsp10'da bulunmadığından dolayı, Hsp10'un ekstrasellüler transportunun klasik olmayan bir yoldan regüle edildiği düşünülmektedir.



Şekil 4. Hsp10/Hsp60 kompleksi. Mitokondriyal Hsp10/Hsp60 kom-pleksi proteinlerin doğru katlanmasında önemli bir rol oynamaktadır. (Tez ortak danışmanı Fatima AERTS-KAYA tarafından çizilmiştir.)

İnsan Hsp10'u HSPE1 geni tarafından ve Hsp60 ise HSPD1 geni tarafından kodlanmaktadır (Hansen et al., 2003) ve aynı gen üzerinde karşılıklı gelecek şekilde düzenlenmişlerdir (Jia et al., 2011). Hsp10/Hsp60 kompleksi mitokondriyalde protein kontrolünde, translokasyonda ve degradasyonda önemli bir rol oynamaktadır (Jia et al., 2011). Uyarıcı sinyal ile Hsp10, amino asit kalıntılarının modifikasyonunu tetiklemekte ve Hsp10/Hsp60 bağlantısının ayrılmasına neden olmaktadır. Sitozoldaki Hsp10'nun hücre döngüsünü ve apoptozu regüle ettiği düşünülmektedir (Czarnecka, Campanella, Zummo, Cappello., 2006). Gebelik gibi özel durumlarda, Hsp10 hızlı bir şekilde ekstrasellüler sıvılara ve periferik kana salınabilmektedir. Hsp10 ekstrasellüler

çevrede özellikle immünomodülatuar bir etki göstermektedir (Summers et al., 1996). Hsp10'nun bu üç farklı fonksiyonları Şekil 5'te özetlenmektedir.



Şekil 5. Hsp10'un hücre içi ve hücre dışı fonksiyonları Hsp10; 1) mitokondrilerde protein katlanmasında, 2) sitozolda apoptoz ve hücre döngüsü regülasyonunda bir rolü oynamakta, 3) ekstraselüler çevrede immün modülatuar bir etkisi göstermektedir. (Tez ortak danışmanı Fatima AERTS-KAYA tarafından çizilmiştir.)

Periferik kan dolaşımında bulunan Hsp10, bağışıklık sistemini baskılayıcı bir proteindir (Özbek ve ark., 2013). Hsp10, prokaryotik ve ökaryotik hücreleri enfeksiyona ve inflamasyona bağlı olan stres durumlarından korumaktadır; merkezi sinir sistemindeki lenfosit fonksiyonuna bağlı antijen-1 (LFA-1), vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VLA-4), makrofaj-1 antijen (Mac-1) ve adezyon molekülleri olan ICAM-1 ve VCAM-1 ekspresyonunu baskılamakta ve ayrıca spinal kord parankimasında efektör T hücrelerin infiltrasyonunu azaltmaktadır (Zhang et al., 2003). Hsp10, Toll-like reseptör (TLR) sinyallerinin yayılmasını hedef alırken (Johnson et al., 2005) aynı zamanda lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılmış nükleer faktör-kappa B (Nf-KB) aktivasyonunu azaltmaktadır (Jia et al., 2011). Tümör hücreleri bağışıklık sistemini yıkmak için çeşitli mekanizmalar geliştirmiştir. Hücre içinde Hsp10 düzeyi arttığında anti-tümör immün yanıtın baskılandığı ve immün sistem süpresyonunun arttığı bildirilmektedir. Bu baskılanma, T hücre reseptörünün (TCR) CD3-zeta zinciri ile bağlantılı sinyal iletiminin engellenmesi ile gerçekleşmektedir. Zeta zinciri bağlantılı sinyal iletimin engellenmesiyle sitokin üretiminin azaldığı ve Treg hücrelerinin arttığı görülmüştür. Hsp10 tarafından tümörü

infiltrate eden lenfosit aktivasyonunun inhibisyonu, kanserin ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadır (Jia et al., 2011).

Fertilizasyondan sonra 6-24 saat içerisinde, EPF maternal serumda tespit edilebilmekte ve gebeliğin ilk iki trimesteri boyunca üretilmektedir (Qin and Zheng, 1987). İmmünoşüpresif faktör etkisi gösteren Hsp10'un, yeni oluşan embriyoya karşı maternal immün sistemin tepki göstermesini engellemesi çok önemlidir. İnsanda Hsp10 aktivitesi maternal serum, idrar, fetal serum, amniyotik sıvı ve plasental ekstraktlarda tespit edilmiştir (Zheng et al., 1990). Yeni çalışmalardan elde edilen bu veriler, EPF ile Hsp10'un aynı molekül olduğunu düşündürmektedir. Ancak Hsp10'un etkisini hücre içinde, EPF'nin ise etkisi hücre dışında gerçekleştirdiği bildirilmektedir. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada da insan plateletlerinden izole edilen EPF'nin, mitokondriyal şaperon 10 (cpn10) ve Hsp10 ile aynı olduğu gösterilmiştir (Cavanagh and Morton, 1994; Corrao et al., 2010).

Hsp10, bağışıklık sistemini baskılayan proteinlerdir ve gebeliğin ilk günlerinde maternal seruma salınmakta ve ikinci trimestere kadar plasenta dokusunda ifade edilmektedir. PL-MKH ve Kİ-MKH'ler farklı sitokinleri salgılayarak ve farklı yollarla uyararak immün baskılayıcı etkilerini gerçekleştirmektedirler. Halen MKH'lerin immün modülasyondaki etkileri henüz tam açıklanmamıştır. PL-MKH ve Kİ-MKH'lerin *in vitro* deneylerde immünomodülatuar etkileri karşılaştırılmamış ve Hsp10'un MKH'lerin immünomodülatuar fonksiyonundaki rolü araştırılmamıştır.

Bu nedenle yapılan tez çalışması kapsamında: 1) PL-MKH ve Kİ-MKH'lerin, HLA-G, Fas, Fas-L, CD200 gibi immünomodülasyonda rol oynayan yüzey belirteçleri, akım sitometrisi ile araştırılmıştır; 2) immün baskılayıcı etkilerini analiz etmek için PL-MKH'ler ve Kİ-MKH'ler stres indükleyen faktörler (ısı şoku, LPS, IFN γ , serumsuz ortam) ile uyarılmış ve intrasellüler Hsp10 seviyeleri Western Blot ile değerlendirilmiştir; 3) bu stresörlerle uyarılmış PL-MKH'ler ve Kİ-MKH'lerinin T-hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki baskılayıcı etkileri ko-kültürlerde araştırılmıştır; 4) ve bu ko-kültürlerden toplanmış süpernatantlardaki Hsp10'un seviyeleri ELISA yöntemi ile analiz edilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. GEREÇLER

- Faz kontrast mikroskop (Olympus DP73, Japan)
- İmmüno Floresan Mikroskop (Leica DMIL, Germany)
- Mikropipet (Gilson, USA)
- Mikropipet uçları (10 uL, 20 uL, 100 uL, 200 uL, 1000 uL) (Gilson, USA)
- Pastör Pipetleri (Corning, USA)
- Vorteks (DragonLab MX-S, Chinese)
- Masa üstü santrifüj (Eppendorf 5810 R, Germany)
- pH Metre (Mettler Toledo Model S220, USA)
- Falkon Tüpleri (15mL, 50mL) (Eppendorf, Germany)
- FACS tüpleri (Becton Dickinson, USA)
- Eppendorf tüpleri (1,5 mL) (Eppendorf, Germany)
- Chamber slide (Sigma, Germany, kat no: Nunc 154739)
- Lamel (Marienfeld, Germany)
- Hemositometre (Bürker, Germany)
- Enjektörler (5 mL, 10 mL, 20 mL) (Serba, Türkiye)
- Isıtıcı tabla (Daihan MSH20A, South Korea)
- Hücre kazıyıcısı (ThermoFisher Scientific, USA)
- Hassas terazi (Dikomsan, Türkiye)
- Biyogüvenlik evre II laminer akım (Hereus, Germany)
- FACSARIA ve FACSARIA II (Becton Dickinson, USA)
- CO₂'li inkübatör (NÜVE E4160, Türkiye)
- Serolojik pipet (2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL) (Corning, USA)
- Pipetör (Thermo Scientific, USA)
- ELISA okuyucu (TECAN Sunrise, Switzerland)
- T-25 flask (Corning, USA)
- T-75 flask (Corning, USA)
- 145 mm petripler (Greiner, USA)
- 6 kuyucuklu tabaka (6-well plate) (Corning, USA)

- 24 kuyucuklu tabaka (6-well plate) (Corning, USA)
- Jel elektroforezi (Bio-Rad, USA)
- Trans-Blot Turbo Blotting sistemi (Bio-Rad, USA)
- + 4°C buzdolabı (Vestfrost, Denmark)
- -20°C derin dondurucu (Uğur, Türkiye)
- -80°C derin dondurucu (RSBiotech, UK)
- -196°C sıvı azot tankı
- Distile su cihazı (mes Mp MINIpure, Türkiye)
- LS kolonları (Miltenyi, Germany, Lot no: 5151123095)

3.2. KİMYASALLAR ve TAMPON SOLÜSYONLAR

- Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG, Germany, kat. no: A2212)
- L-Glutamine (Biochrom AG, Germany kat. no: K0282)
- DMSO (BioFrox, Germany, Lot no: 86919)
- Dispaz I (Sigma, USA, kat. no: 07D4818)
- Kollajenaz (Sigma, USA, kat. no: C 9722)
- Deksametazon (Sigma, USA, kat. no: D4902)
- IBMX (Applichem, Germany, kat. no A0695)
- İnsülin (Sigma, USA, kat. no: I9278)
- Igepal (Sigma, USA, kat no: i3021)
- Propanol (Applichem, kat. no: A3928)
- β -Gliserofosfat (Applichem, Germany, kat no A2253)
- 0,2 mM L-Askorbik asit (Sigma, USA, kat no A4403)
- %4'lük Paraformaldehit (Sigma, USA, kat. no)
- Triton X-100 (BioRad, USA, kat. no:#1610407)
- Tween-20 (Millipore, Lot no: S6740684-336)
- %5 tavşan serumu (Invitrogen, UK, kat. no: 16120099)
- BSA (Miltenyi kat. no:130-091-376)
- LPS (Biochemca, Lot no: 62326)
- IFN γ (Immuno Tools, kat. no: 11343534)
- 2-merkaptöetanol (Sigma, USA, Lot no: 062K0115)

- 4X örnek tampon solüsyonu (ThermoFisher Scientific, USA, kat no: NP0008)
- Distile su (EMD Millipore, Germany)
- Spectra™ Multicolor Low Range Proteins standard (ThermoFisher Scientific, kat no: 26628)
- Süt tozu (Bio-Rad, USA, kat no: 170-6404)
- Sıvı azot
- L-PHA (Sigma, USA, kat no: M5030)
- DMEM-LG (Invitrogen, Gibco, UK, kat no 31600-083)
- MCDB-201 (Sigma, USA, kat no #M6770-1L)
- FBS (FBS, Gibco, UK kat no10270-106, lot#41F1133K)
- % 0,25 Tripsin/1mM EDTA (Invitrogen, Gibco, UK, kat no 27250-018)
- PBN (1L PBS 1X, 25 mL %20 Bovine Serum Albumin, 5 mL %10 NaN₃)
- PBS (Sigma, USA, cat no: #SLBN0455V)
- Trisin running tampon solüsyonu
- % 0,1 Tween-20 içeren 1X TBS (TBS-T)
- M-PER Lizis Tamponu (10 mM Tris-Baz-pH 7.4, 300 mM NaCl, 2 mM EDTA, % 0,5 Triton X-100) (Thermo Scientific, USA, kat no: 78501)

3.3. BOYALAR

- Oil Red O Stain (Sigma Aldrich, USA, kat no:1320-06-5)
- Alizarin Red S Stain (Appllichem, Lot no: 8F004374)
- Ponceau Red Stain (Biochem, Türkiye, kat no: F1273)
- CFSE (Molecular Probes, Invitrogen, kat no: C34554)
- Bradford Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc. NH, USA)

3.4. ANTİKORLAR

- anti-Hsp10 primer antikor (Ptglab, kat no: 16512-1-AP)
- anti-Hsp 10 primer antikor (Abcam, USA, kat no: 109624)
- Goat-anti rabbit IgG (H+L) sekonder antikor (Thermofisher, kat no: A11008)
- anti-β-Aktin primer antikorları (Cell Signaling Technology, USA, kat no: mAb #8457)
- CD105-PE (eBioscience, USA, Lot no: E01422-1632)

- CD73-FITC (Biolegend, USA, kat no: 344016)
- CD140b-PE (Becton Dickinson, USA, kat no: 558821)
- CD166-PE (Biolegend, USA, kat no: 343903)
- CD90-PE (Becton Dickinson, USA, kat no: 555596)
- CD44-FITC (Biolegend, USA, kat no: 338804)
- CD29-PE (Becton Dickinson, USA, kat no: 555443)
- CD200-PE (Becton Dickinson, USA, kat no:552475)
- HLA-G- (Becton Dickinson, USA, kat no: 557577)
- HLA-DR-PE (Biolegend, USA, kat no: 307606)
- Fas (Becton Dickinson, USA, kat no: 558814)
- Fas-L (CD178-APC) (Becton Dickinson, USA, kat no: 556374)
- CD3 izolasyon kiti (Miltenyi, kat no: 130-050-101)
- EPF/Hsp10 ELISA kiti (Cloud-Clone Corp, kat no: L160314401)
- Quantichrom™ Kalsiyum Analiz kiti (Bioassay Systems, DICA-500)
- Clarity Western ECL Substrate kiti (Bio-Rad, kat no: BR1705061)

3.5. YÖNTEMLER

3.5.1. Etik Kurul İzni

Bu çalışma için etik onay (GO 14/574), Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik Kurulu'ndan alındı.

3.5.2. Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu

3.5.2.1. Kemik İliği MKH'leri

Kemik iliğinden mononükleer hücreler (MNH) dansite santrifügasyon (Fikol) yöntemiyle ayrıldı. $10-20 \times 10^6$ MNH'ler T-75 kültür kaplarında, 10 mL büyüme besiyeri içerisinde (DMF10: % 60 DMEM-LG/ % 40 MCDB-201, % 10 ısı ile inaktive edilmiş fetal buzağı serum (FBS), % 1 Penisilin/Streptomisin, 2 mM L-Glutamin), 37 °C' de, % 5 CO₂ 'li ortamda kültüre edildi. Besi yerleri 3-4 günde bir değiştirildi. Yeterli sayısal yoğunluğa ulaşan hücreler % 0, 25 Tripsin/1mM EDTA kullanılarak kültür kabından kaldırıldı. Kaldırılan MNH'lerin bir kısmı gerektiğinde yeniden MKH geliştirmek amacıyla DMEM-LG, % 20 FBS ve % 10 DMSO içeren dondurma

besiyerinde dondurularak -196 °C'lik sıvı azot tankında saklandı. Dondurulmayan MNH'lerden üretilen MKH'ler üçüncü pasaja kadar çoğaltıldıktan sonra tez çalışmaları için kullanıldı.

3.5.2.2. Plasenta MKH'leri

Plasentalar, son trimesterde sezaryen ile sağlıklı doğum yapan annelerden alınarak küçük doku parçaları halinde kesildi. Bu küçük plasenta parçaları önce 20 mL'lik % 0, 25 Tripsin/1mM EDTA içerisine kondu ve 37 °C' de 10-30 dakika (dk) inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı alınıp atıldı. Altta kalan parçaların üzerine 500 µL Dispaz I ve Kollajenaz enzimleri eklenerek tekrar 37 °C' de 30 dk inkübe edildi. Bu şekilde izole edilen hücreler falkon tüpünden alınarak 145 mm petri kaplarına ekildi ve üzerine eklenen DMF10 içinde çoğalmaya bırakıldı. Hücreler pasaj 3'e kadar çoğaltılıp % 0, 25 Tripsin/1mM EDTA ile kaldırıldıktan sonra tüm fonksiyonel ve karakterizasyonu için gerekli olan testler yapıldı.

3.5.3. Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyonu

3.5.3.1. İmmünofenotiplendirme

Yüzey belirteç değerlendirmesi

Aderan (adherent) hücreler yeterli sayısal yoğunluğa ulaşınca (konfluent olunca) % 0, 25 Tripsin/1 mM EDTA ile kaldırıldı ve FACS tüpleri içinde hücre süspansiyonları hazırlandı. Bu hücre süspansiyonlarının üzerine, belirlenen stromal belirteçlere spesifik (CD105, CD73, CD140b, CD166, CD90, CD44, CD29 ve CD200) antikorların her birinden ayrı ayrı tüplere 5 µL ve bunların üzerine immünomodülatuar antijenlerin birinden (HLA-G, HLA-DR, Fas ve Fas-L) 5 µL olmak üzere, 100 µL PBN çözeltisi ile birlikte eklendi. Örnekler oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde 2 kez PBN çözeltisi ile yıkama yapılan örneklerin üzerine 200 µL PBN çözeltisi eklenerek akım sitometri cihazında (FACSARIA/FACSARIA-II) okutuldu ve FACS Diva yazılımı ile analiz edildi.

İntrasellüler boyamalar

Aderan hücreler yeterli sayısal yoğunluğa ulaşınca (konfluent olunca) % 0, 25 Tripsin/1 mM EDTA ile kaldırıldı ve FACS tüpleri içinde hücre süspansiyonları hazırlandı. 1 mL soğuk metanol ile 10 dk, -20°C'de inkübasyon yapıldı. Takiben, hücreler 2 kez PBS/ % 0, 2 Tween-20 ile yıkandı ve 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra 100 µL PBS/ % 0, 2 Tween-20 ile 1 µL Hsp10 antikorunu eklenerek 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Tekrar 2 kez PBS/ % 0, 2 Tween-20 ile yıkayıp 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra 100 µL PBS/ % 0, 2 Tween-20 ve bunu üzerine 1 µL anti-rabbit-488 antikorunu eklenerek 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İki kez PBS/ % 0, 2 Tween-20 ile yıkayıp 2000 rpm'den 5 dk santrifüj edildi. Sonra örneklerin üzerine 100 µL PBS/ % 0, 2 Tween-20 eklenerek akım sitometri cihazında (FACSARIA/FACSARIA-II, Resim 1) okutuldu ve FACS Diva yazılımı ile analiz edildi.



Resim 1. Akım Sitometri Cihazı (FACSARIA/ FACSARIA-II), BD

3.5.3.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşması

3.5.3.2.1. Adipojenik farklılaşma

Pasaj 3 olan MKH'ler, 6-kuyucuklu tabakalara ekildi. Konfluent olunca büyüme ortamı, adipojenik ortam ile değiştirildi. Adipojenik ortam içeriği: 50 mL'lik falkon tüpünün içinde, DMEM-LG ile 50 mL'ye tamamlanacak şekilde, % 10 FBS-HI, 1 µM Deksametazon, 60 µM İndometazin, 500 µM İzobutilmetilksantin ve 5 µg/mL insülin konularak hazırlandı. Yirmibirinci günde kuyucuklardan besiyerleri mikropipetle

toplandı ve kuyucuklardaki aderen hücreler 1 mL PBS ile yıkandı. Hücreler 10 dakika %10'luk formaldehit ile fikse edildikten sonra, hücrelerdeki yağ içeriğini gösterebilmek için 2 mg/mL Oil Red O boyası ile 15 dk oda ısısında inkübe edildi. Boyamayı takiben aderen hücreler 3 defa distile su ile yıkandıktan sonra faz kontrast mikroskopunda incelenerek görüntüldü. Hücrelerde Oil Red O boyası ile boyanmış olan nötral yağ içeriğinin miktarını ölçmek için, hücreler 15 dk oda ısısında % 2 Igepal/Propanol ile inkübe edilerek yağ içeriği çözüldü ve spektrofotometre ile ($\lambda = 492$ nm) semi-kantitatif analizi yapıldı.

3.5.3.2.2. Osteojenik farklılaşma

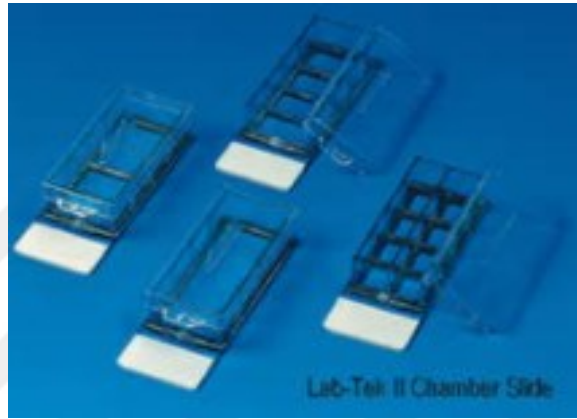
Pasaj 3 MKH'ler 6-kuyucuklu tabakalarda çoğaltıldı. Tam konfluent olmadan (subkonfluent) büyüme ortamı, osteojenik ortam ile değiştirildi. Osteojenik ortam içeriği: 50 mL'lik falkon tüpünün içinde, DMEM-LG ile 50 mL'ye tamamlanacak şekilde, % 10 FBS-HI, 100 nM Deksetazon, 10 mM β -Gliserofosfat ve 0,2 mM L-Askorbik asit konularak hazırlandı. Yirmibirinci günde hücreler %10'luk formaldehit ile 10 dk fikse edildikten sonra pH 4,2 olan Alizarin Red S boyası ile boyandı. Boyanan hücreler distile su ile 3 defa yıkamayı takiben, faz kontrast mikroskopunda incelendi ve ekstrasellüler matriks kalsifikasyonunu gösteren kalsiyum fosfat depozitleri görüntüldü. Kalsiyum fosfat miktarını göstermek için, Alizarin Red S boyamayı takiben kuyucuklara 1 mL 0,6 M hidroklorik asit ekleyerek 4 saat oda ısısında inkübe edildi ve kalsiyum fosfat düzeyleri Quantichrom™ Kalsiyum Analiz kiti kullanarak spektrofotometre ile ($\lambda = 620$ nm) semi-kantitatif analiz edildi.

3.5.4. Fonksiyonel Testler

3.5.4.1 İmmünohistokimya

Lam (chamber slide, Resim 2) üzerinde çoğaltılan olan MKH'ler %4'lük paraformaldehit ile fikse edildi ve intrasellüler Hsp10 göstermek için boyamaları yapıldı. Hücreler oda sıcaklığında 10 dk boyunca 20 μ L Triton X-100 (% 0, 2 PBS) ve 10 mL PBS ile inkübe edilip, PBS ile yıkandı. 800 μ L Tween-20 (% 0, 1 PBS) + 100 μ l % 5 tavşan serum + 100 μ L BSA içeren bloklama buffer ile 1 saat inkübe edildi. Daha sonra 80 μ L Tween-20 (% 0, 1 PBS) + 10 μ L tavşan serum ve bunun üzerine %

10 oranında (10 µL) anti-Hsp10 antikoru (Abcam) eklendikten sonra gece boyunca +4°C’de inkübe edildi. Takiben PBS ile 3 kez 5’er dk yıkandı. 1 saat boyunca oda sıcaklığında 70 µL Tween-20 + 10 µL tavşan serumu ve % 20 oranında (20 µL) goat anti-rabbit IgG (H+L) sekonder antikor ile 1 saat boyunca inkübe edildi. Bundan sonra da PBS ile 3 kez 5’er dk yıkandı. Yıkamayı takiben 1:1000 oranında distile su ile dilüe edilen DAPI boyası ile 5 dk karanlık ortamda inkübe edildi. PBS ile 3 kez 5’er dk yıkandı ve floresan mikroskopunda incelenerek resimleri çekildi.



Resim 2. 8 kuyucuklu Chamber Slide

3.5.4.2. Western Blot

Besi yerinde üretilmiş MKH'lere farklı stresörler uygulanarak, hücre içinde lokalize Hsp10'un hücre dışına salınması uyarıldı. Bu stresörler; ısı şoku (45°C’de 30 dk), serumsuz ortamda bırakma ve immün sistem uyarıcıları olan LPS (10 mg/mL) ve IFN γ (10 mg/mL) olarak belirlendi. Bu stresörler uygulandıktan 2 saat, 4 saat, 8 saat ve 24 saat sonra T-25 flaskta bulunan aderan hücreler toplanarak içerdikleri Hsp10 miktarı analiz edildi. Bu amaçla, MKH'leri toplayıp bunlardan total protein lizatı oluşturmak için, aderan hücreler soğuk PBS ile iki kez yıkandı, 1X proteaz inhibitör kokteyli içeren tampon solüsyonu M-PER Lizis Tamponu (10 mM Tris-Baz-pH 7,4, 300 mM NaCl, 2 mM EDTA, % 0,5 Triton X-100) hücrelerin üzerine eklendi ve 5 dk buz üzerinde inkübe edildi. Hücre kazıyıcısı kullanılarak hücreler toplandı ve hücre debrislerinden kurtarmak için 14000 g’de, +4°C’de 15 dk santrifüj edildi. Proteinleri içeren süpernatant, daha sonra kullanmak için, yeni bir tüpe aktararak -80°C’de saklandı. Bradford Protein Assay Kit ile örneklerin protein konsantrasyonları

spektrofotometrik olarak belirlendi. Total protein lizatları SDS-poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) yürütüldü. SDS-PAGE’de moleküler ağırlığı 20 kDa’dan daha düşük olan proteinleri ayrıştırabilmek için üç farklı jel tabakası (stacking, intermediate ve separating) şeklinde düzenlenen trisin jel sistemi kullanıldı (Tablo 1).

Tablo 1. Trisin jel içeriği

	Separating tabakası	Intermediate tabakası	Stacking tabakası
Jel yüzdesi	% 15	% 10	% 4
% 38 Gliserol	1,6 mL	-	-
ddH₂O	-	1,2 ml	1,4 mL
% 30 Akrlamid	2,7 mL	0,8 mL	0,3 mL
Separating tampon solüsyonu (3 M Tris HCl pH 8,5, % 0,1 SDS)	2,14 mL	1 mL	-
Stacking tampon solüsyonu (1 M Tris HCl pH 6,8, % 0,1 SDS)	-	-	0,3 mL
% 10 Amonyum persülfat (APS)	0,06 mL	0,03 mL	0,02 mL
TEMED	0,003 mL	0,003 mL	0,002 mL

11 µg protein lizatı 2-merkaptoetanol ve 4X tampon solüsyonu ile karıştırıldı ve distile su kullanılarak final hacim 40 µL’ye tamamlandı. Denatürasyon için, örnekler 5 dk boyunca kaynatılmıştır. Örnekler SDS-PAGE jeline yüklenerek Trisin running tampon solüsyonu (100 mM Tris-baz, 100 mM Trisin, % 0,1 SDS) içerisinde 70-80 voltta, oda ısısında yürütüldü. Örneklerle beraber *Spectra™ Multicolor Low Range Proteins* standartları da (ThermoFisher Scientific, kat no: 26628) yürütüldü. Jelde yürütülen proteinler, *Trans-Blot Turbo Blotting* sisteminde (transfer koşulları: 5 dk, 2,5 amper ve en fazla 25 voltta) PVDF membrana transfer edildi. Membranlar Ponceau Red boyası ile boyanıp proteinlerin transfer olup olmadığı saptandı ve boyayı uzaklaştırmak için membranlar distile su ile yıkandı. Daha sonra % 0,1 Tween-20 içeren 1X TBS (TBS-T) içerisinde % 5 yağsız süt tozu ile oda ısısında 1 saat boyunca bloklandı. Membran bloklama sonrası % 5 süt tozu içerisinde dilüe edilen anti-Hsp10 veya anti-β-Aktin primer antikoları ile gece boyunca +4°C’de inkübe edildi.

Sonrasında, membranlar 3 kez TBS-T içerisinde yıkandı, % 5 süt tozu içerisinde dilüe edilen keçi-anti tavşan IgG (H+L) sekonder antikor ile bir saat oda ısısında inkübe edildi ve tekrar 3 kez TBS-T içerisinde yıkandı. Peroksidaz aktivitesi, Clarity Western ECL Substrat kiti ile üretici firmanın önerdiği protokol kullanılarak belirlendi.

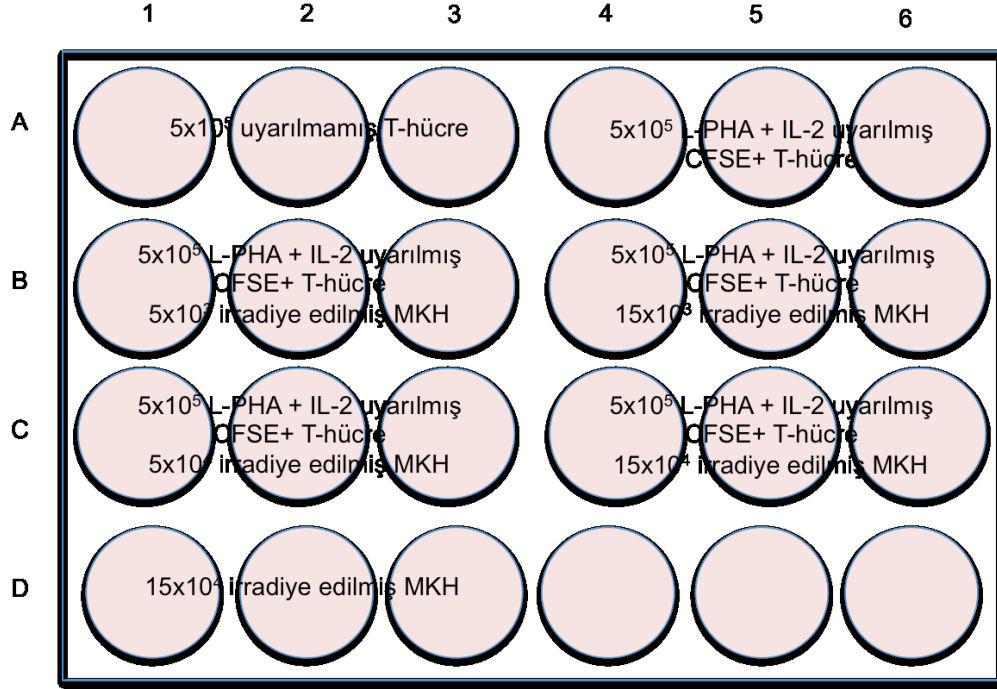
3.5.4.3. ELISA

Besi yerinde üretilmiş MKH'ler farklı stresörlere [ısı şoku (45°C'de 30 dk) ve immün sistem uyarıcıları olan LPS (10 mg/mL) ve IFN γ (10 mg/mL) uygulaması] maruz bırakılarak, hücre içinde lokalize Hsp10'un hücre dışına salgılanması uyarıldı ve stresör uygulamasını takip eden 2'inci saatte, 8'inci saatte ve 24'üncü saatte süpernatantlar toplanarak -20°C'de saklandı ve daha sonra Hsp10 düzeyleri ELISA kiti kullanılarak değerlendirildi. Kit içerisinde bulunan kullanım kılavuzuna göre, 100 ng/mL, 50 ng/mL, 25 ng/mL, 12, 5 ng/mL, 6, 25 ng/mL, 3, 12 ng/mL, 1, 5 ng/mL ve 0 ng/mL oranlarında standartlar hazırlandı. Örnekler ve standartlar düz tabanlı 96 kuyucuklu plakaya ekildi. Her kuyucuğun üzerine Assay Dilüent A (1X) eklenerek 1 saat 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında yıkama solüsyonu ile yıkanarak, üzerine Assay Dilüent B (1X) eklendi ve 30 dk 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tekrar yıkama solüsyonu ile yıkandı ve üzerine TMB Substrat solüsyonu eklenerek 15 dk 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 50 μ L Stop Solüsyonu eklenip, 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik yöntem ile Tecan ELISA okuyucuda okutuldu. Sonuçları Excell spreadsheet program ile analiz edildi.

3.5.4.4. T-Hücre Proliferasyonunu ve Aktivasyonunu Baskılama Testleri

Periferik kandaki CD3⁺ lenfositler manyetik boncuklar kullanılarak işaretlendi. 10⁸ sayıda PK-MNH'ler manyetik alanda bulunan LS kolonundan geçirilerek CD3 antikoruyla işaretlenen hücrelerin kolonda tutunması sağlandı, bu antikoru içermeyen işaretlenmemiş hücreler kolondan geçti. Kolonda yıkama işlemi yapılarak, CD3⁺ lenfositler kolondan toplandı. CD3⁺ lenfositler, hücre proliferasyonu için kullanılan ve hücre içerisine geçebilen bir boya olan CFSE (karboksi-florescein diasetat suksinimidil ester) ile boyandı. Boyanan CD3⁺ lenfositler, daha önceden kuyucuklara % 1, % 3, % 10, % 30 oranlarında ekilen 20 Gray (Gy) irradiye edilmiş Kİ-MKH'ler ve PL-MKH'lerin üzerine eklenerek, MKH'lerin içerdiği Hsp10'un immün baskılayıcı etkilerini değerlendirmek için kullanıldı (Şekil 6). T-hücre aktivasyonunu sağlamak

için L-PHA ve proliferasyonunu sağlamak için IL-2 aynı kuyucuklara birlikte konuldu. T-hücre proliferasyon oranı, CFSE floresan yoğunluğuna göre FACS ARIA cihazında ölçüldü. Prolifere olmuş T hücrelerin görüntüsü Leica invert mikroskopunda incelendi.



Şekil 6. 24-kuyucuklu tabaka T-hücre baskılama testinin deneysel yapısı.

3.5.5. İstatistik

Tüm hesaplamalar Microsoft® Excell® for Mac 2011. Versiyon 14.7.3. Spread Sheet içerisinde yapıldı. P değeri <0, 05 ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Gruplar arasında kıyaslama yapmak için *Student t*-testi kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. KEMİK İLİĞİ VE PLASENTA MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN İMMÜNOFENOTİPLERDİRMESİ

Pasaj 3'deki MKH'lerin immünofenotiplendirilmesi akım sitometrisi kullanılarak yapıldı. Kemik iliği MKH'lerinde CD105, CD73, CD90, CD44, CD29 stromal yüzey antijenleri pozitif olarak saptandı. Hematopoetik (CD45) ve endotelial (CD31) belirteçleri ifade etmedikleri görüldü. Kİ-MKH'lerin ve PL-MKH'lerin stromal belirteç düzeylerini gösteren akım sitometri sonuçları Tablo 2'de sunuldu. PL-MKH'lerindeki CD90 düzeyi, Kİ-MKH'lerindeki kıyasla anlamlı düzeyde daha düşük bulundu ($p < 0,05$) (Tablo 2).

Tablo 2. Kİ-MKH ve PL-MKH'lerin belirteç düzeylerini gösteren akım sitometri sonuçları

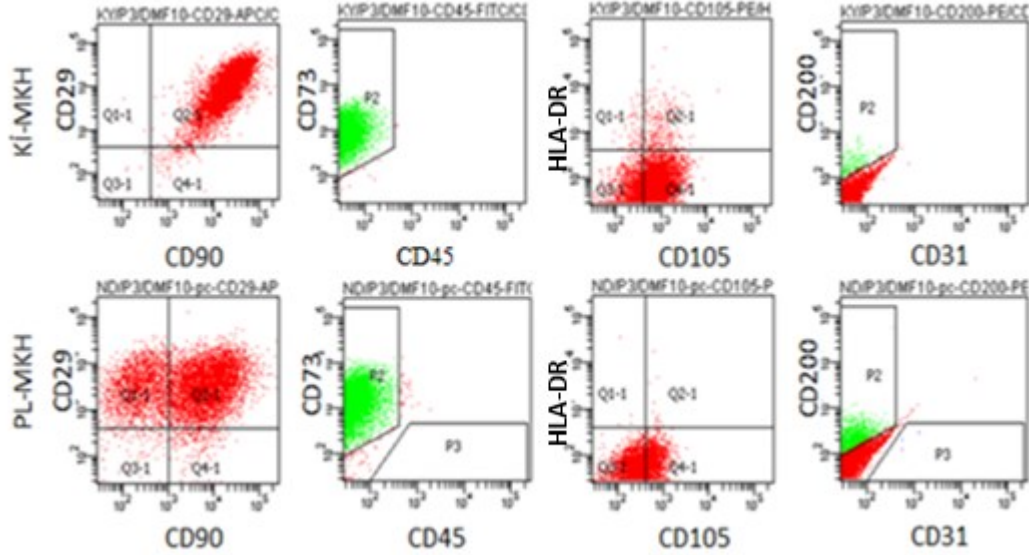
	CD29 %	CD44 %	CD90 %	CD105 %	CD73 %	CD45 %	CD31 %
Kİ- MKH (n=6)	98,2±2,7	90,1±15,9	99,2±0,6	93,1±10,5	97,0±2,7	0,2±0,2	0,2±0,2
PL- MKH (n=6)	91,4±18,6	67,0±30,9	85,0±9,3*	89,3±20,2	90,0±12,9	1,1±1,8	0,8±1,4

* $p < 0,05$

Akım sitometri sonuçları detaylı değerlendirildiğinde PL-MKH'lerinin iki farklı hücre grubu içerdiği görüldü: Birinci gruptaki hücrelerin CD29, CD44, CD90, CD105 belirteçleri pozitif; ikinci gruptaki hücrelerin CD29, CD44, CD90 ve CD105 düzeyleri oldukça düşüktü (Şekil 7). PL-MKH'lerinin enzimatik izolasyonu ile elde edilen hücreler, hem anne hem bebek kaynaklı olabildiğinden, saf bir hücre popülasyonu elde edilemedi. Plaseenta kaynaklı hücre popülasyonlarında CD45⁺ hematopoetik veya CD31⁺ endotelial hücreler bulunmadı.

Bu tez çalışmasında, Kİ-MKH ve PL-MKH'lerin kendi yüzey antijenlerinin (CD105, CD73, CD90, CD44, CD29) yanısıra, immünomodülasyonda rol alan temel belirteçleri de (HLA-DR, CD200, CD95, CD178, HLA-G) araştırıldı. Bunlara ilaveten, Hsp10'nun MKH'ler tarafından gerçekleştirilen immünomodülasyonda rolünün olup olmadığını araştırmayı amaçlayan tez çalışmamız kapsamında, intrasellüler yerleşimli

Hsp10'un pozitifliği de FACSARIA (Becton Dickinson) akım sitometri cihazı ile değerlendirildi.



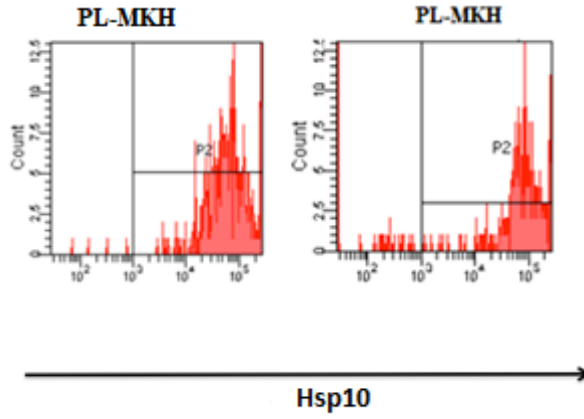
Şekil 7. KI-MKH ve PL-MKH'lerin immünofenotipik karakterizasyonunu gösteren akım sitometri sonuçları

Tablo 3. KI-MKH ve PL-MKH'lerin immünomodülatuar belirteç düzeyleri.

	HLA-DR %	CD200 %	CD95 (Fas) %	CD178 (Fas- L) %	HLA-G %	Hsp10 %
Kİ-MKH (n=6)	2,9±1,8	7,6 ± 9,4	18,8±38,7	55,5±50,3*	7,3±12,0	97,61
PL-MKH (n=6)	0,6±0,6	10,4±18 ,5	32,4±44,3	13,0±14,6	5,4±6,8	96,5 ± 2,72

(*p<0,05; Student t-Test)

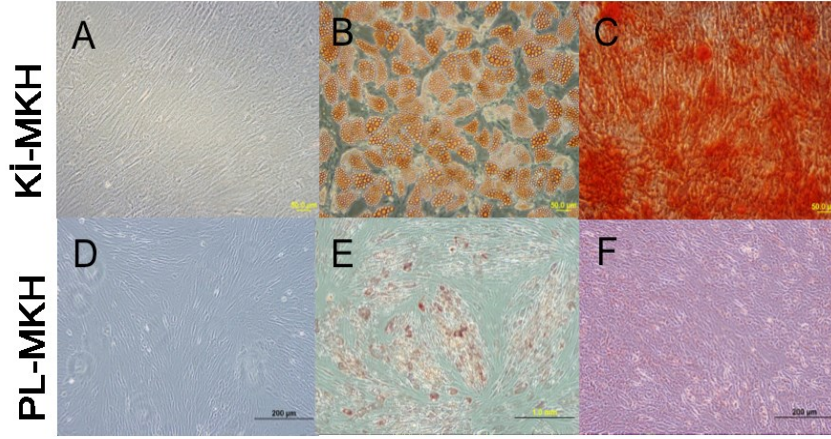
Tez çalışmasının başlangıcında, akım sitometri yöntemi kullanılarak KI-MKH'lerinin ve PL-MKH'lerinin yüzeyinde Hsp10 pozitifliği tespit edilemedi. Daha sonra Hsp10'un intrasellüler bir protein olduğu bilgisinden yola çıkarak, Tween-20 uygulamasıyla hücre dışına çıkarıp spesifik antikoruyla işaretledikten sonra akım sitometrisi ile gösterilmesi planlandı. Bu şekilde PL-MKH'lerinde yüksek düzeylerde Hsp10 pozitifliği tespit edildi (Şekil 8).



Şekil 8. PL-MKH'lerinde Hsp10'un akım sitometri analizi.

4.2. KEMİK İLİĞİ VE PLASENTA MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN FARKLILAŞMASI

Yirmibir gün boyunca adipojenik farklılaşma besiyerinde tutulan Kİ-MKH'leri Oil Red O boyası ile boyanarak nötral lipid oluşumları gözlemlendi (Resim 3B). Osteojenik farklılaşmayı sağlamak için ise Kİ-MKH'leri 21 gün boyunca osteojenik besiyerinde tutuldu ve Alizarin Red boyası ile boyandığında hücreler arasında kalsiyum depozit oluşumları gözlemlendi (Resim 3C). PL-MKH'leri de adipojenik ve osteojenik farklılaşmayı sağlamak için 21 gün boyunca özel besiyerlerinde tutulduğu halde, Kİ-MKH'lerine kıyasla hem Oil Red O ile hem de Alizarin Red boyası ile belirgin bir boyanma sergilemedi (Resim 3E, 3F).



Resim 3. KI-MKH'lerin (A,B, C) ve PL-MKH'lerin (D,E, F) 21. günde adipojenik ve osteojenik farklılaşmasını gösteren invert mikroskop görüntüleri.

A. Kontrol grubu, boyasız. B. Adipojenik Farklılaşma, Oil Red O boyası. C. Osteojenik farklılaşma, Alizarin Red S boyası. D. Kontrol gurubu, boyasız. E. Adipojenik Farklılaşma, Oil Red O boyası. F. Osteojenik farklılaşma, Alizarin Red S boyası. Tüm resimlerde objektif büyütmesi x20.

Hücrelerde Oil Red O boyası ile boyanmış olan nötral yağ içeriğinin miktarını ölçmek için, spektrofotometre ile ($\lambda = 492 \text{ nm}$) semi-kantitatif analizi yapıldı. Alizarin Red boyası ile boyanmış kalsiyum fosfat miktarını ölçmek için de Quantichrom™ Kalsiyum Analiz kiti kullanarak spektrofotometre ile ($\lambda = 620 \text{ nm}$) semi-kantitatif değerlendirme yapıldı (Tablo 4). Histolojik olarak adipojenik ve osteojenik farklılaşma bakımından PL-MKH'leri ile KI-MKH'leri arasında görsel olarak anlamlı bir fark bulunurken, örnekler arası farklarından dolayı semi-kantitatif testlerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

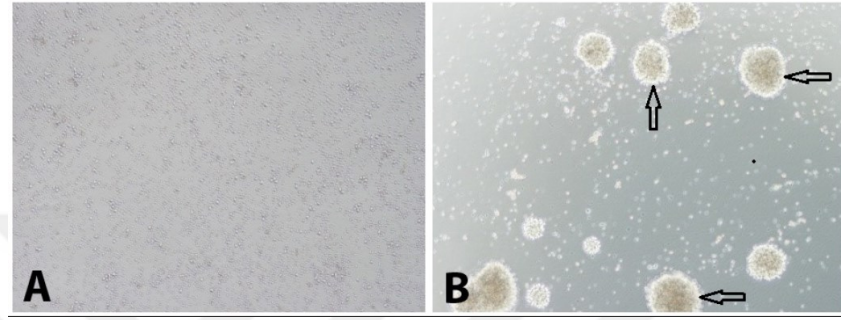
Tablo 4. Semi-kantitatif farklılaşma sonuçları

Doku	Kalsiyum Fosfatlar (mg/dL)	Nötral lipitler (mg/mL)
KI-MKH (n=5)	8,7 ± 9,1	0,4 ± 0,5
PL-MKH (n=5)	0,6 ± 1,3	0,3 ± 0,3

4.3. KEMİK İLİĞİ VE PLASENTA MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN *İN VİTRO* T HÜCRE BASKILAMASI

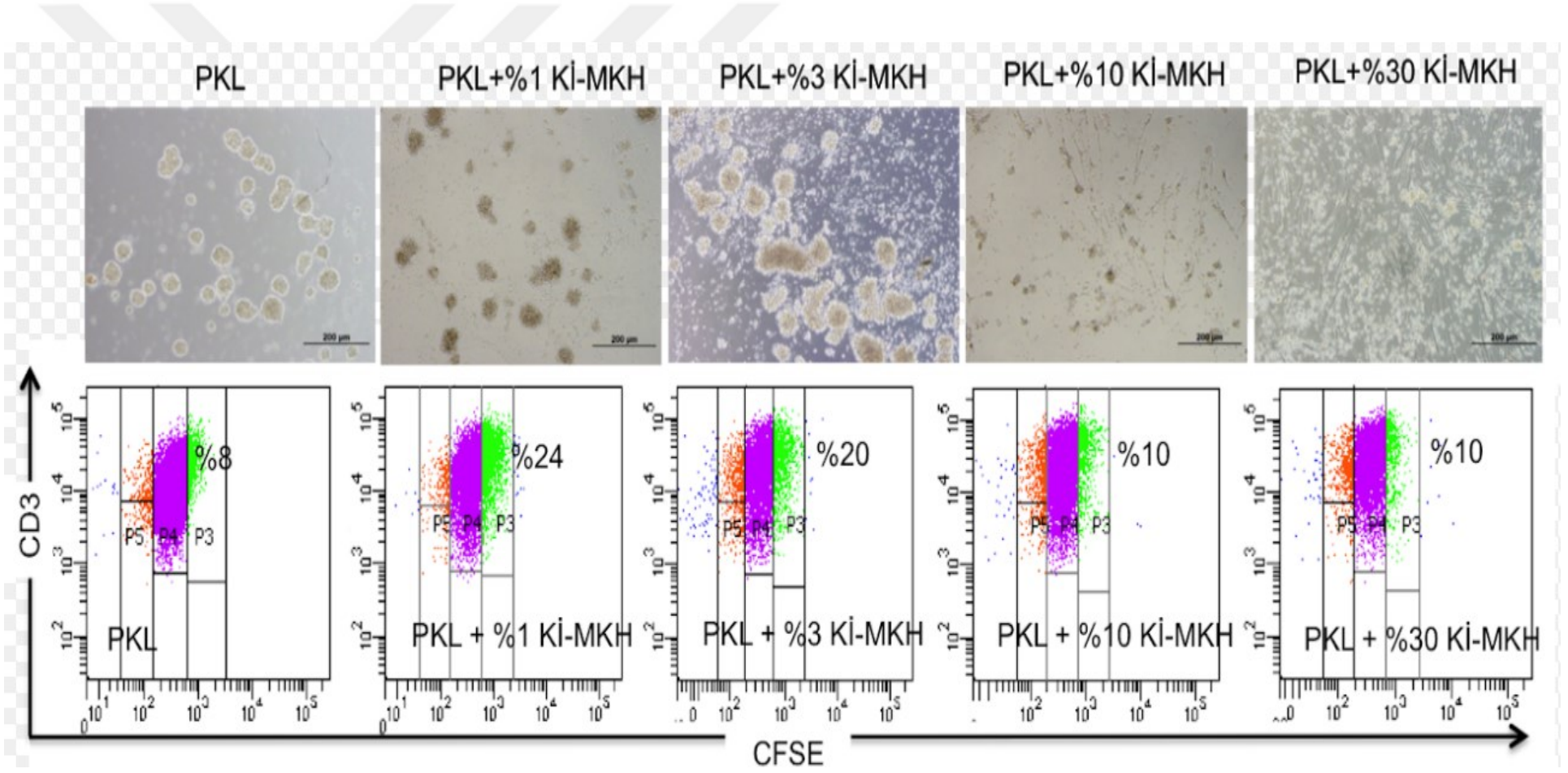
MKH'lerin, *in vitro* ortamda 4 gün boyunca birlikte kültüre edildikleri T-hücreler üzerine immünomodülatuar etkilerini incelemek amacıyla, periferik kan

lenfositlerinden (PKL) MACS yöntemi kullanılarak $CD3^+$ olan hücreler elde edildi. PKL, periferik kan mononükleer hücre fraksiyonlarından $90,9 \pm 9,7$ saflıkta izole edildi. T hücre aktivasyonunu ve proliferasyonunu sağlamak için kültür ortamına L-PHA ve IL-2 eklendi. L-PHA ve IL-2'nin eklenmediği kontrol kuyucuklarda (Resim 4A) T hücre aktivasyonu görülmezken, stimülatör eklenen kuyucuklarda belirgin T hücre aktivasyonu saptandı (Resim 4B).

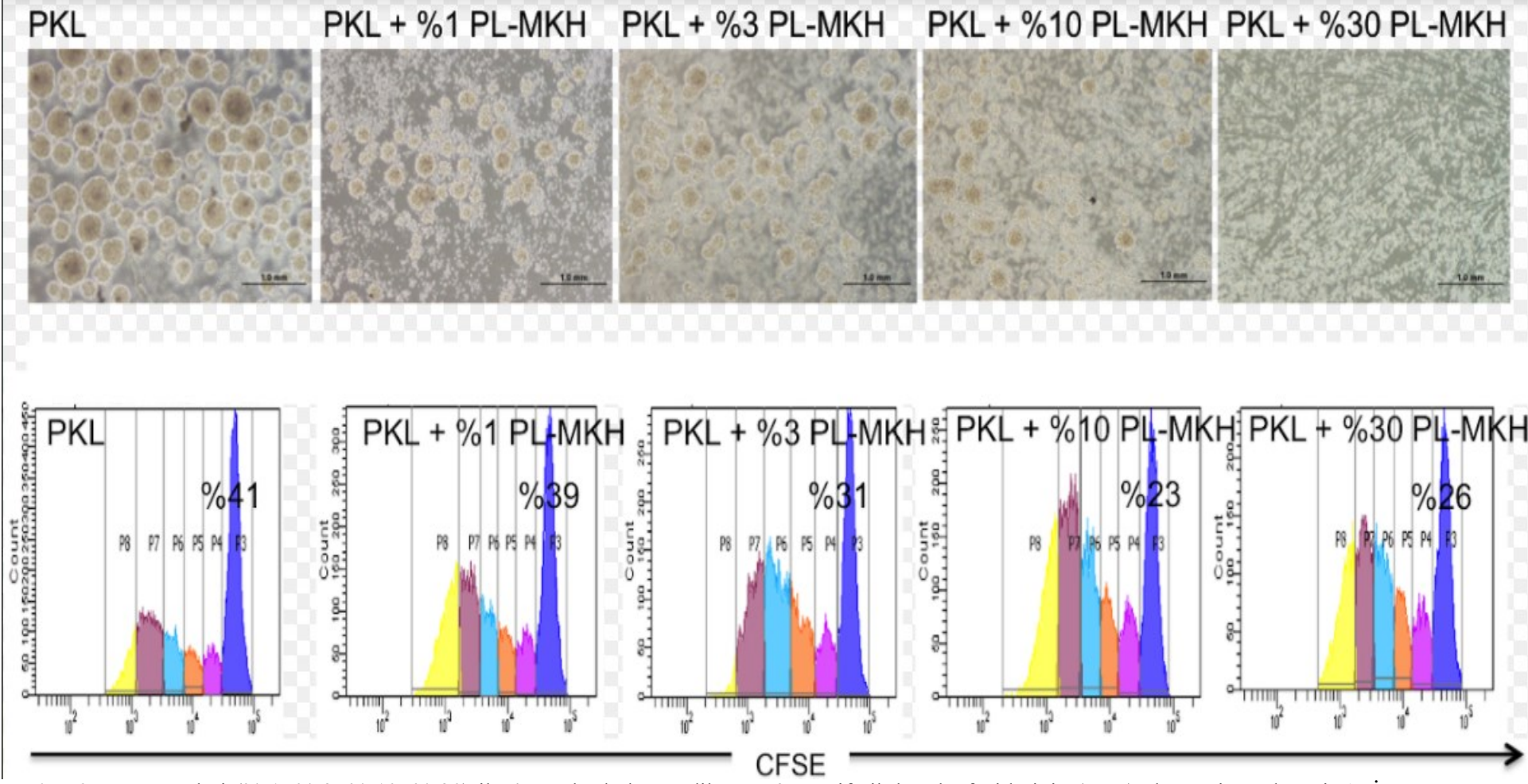


Resim 4. A. Kontrol (Stimüle edilmemiş) besiyeri; B. L-PHA ile stimüle edilmiş $CD3^+$ T-hücreleri (okla işaretli) içeren besi yerinin invert mikroskopik görüntüsü. Tüm resimlerdeki objektif büyütmesi x10

CFSE ile boyanmış 5×10^5 $CD3^+$ PKL'leri, farklı oranlarda (% 0, % 1, % 3, % 10, % 30) Kİ-MKH'ler ve PL-MKH'ler içeren kuyucuklara ekilerek, MKH'lerin miktarının T hücre proliferasyonuna (immünomodülasyonuna) etkisi araştırıldığında, yüksek konsantrasyonda (\geq % 3) Kİ-MKH içeren kuyucuklarda $CD3^+$ PKL'lerin klonal ekspansiyonunun tamamen baskılandığı hem invert mikroskopunda görüldü (Resim 5A) hem de FACS ile analiz edildi (Resim 5B). Bu şekilde, Kİ-MKH'lerinin T hücreler üzerine immünomodülatuar (immün baskılayıcı) etki gösterdiği sonucuna varıldı. Farklı oranlarda (% 0, % 1, % 3, % 10, % 30) PL-MKH'leri içeren kuyucuklara ekilerek CFSE ile boyanan 5×10^5 $CD3^+$ PKL'ler hem inverted mikroskopunda hem de FACS cihazında analiz edildiğinde ise, Kİ-MKH'lerine kıyasla PL-MKH'lerinin T-hücre ekspansiyonunu iyi baskılamadığı saptandı (Resim 6).



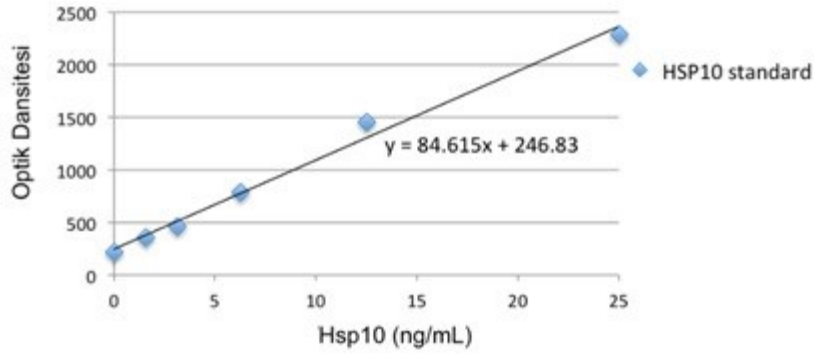
Resim 5. KI-MKH'leri (% 1, % 3, % 10, % 30) ile 4 gün ko-kültüre edilen CD3+ periferik kan lenfositlerinin (PKL) ekspansiyon düzeyi **A.** İvert mikroskopik görüntüler. Objektif büyütmesi x10. **B.** FACS analizleri; Boya: CFSE.



Resim 6. PL-MKH'leri (% 1, % 3, % 10, % 30) ile 4 gün ko-kültüre edilen CD3⁺ periferik kan lenfositlerinin (PKL) ekspansiyon düzeyi. **A.** İntert mikroskopik görüntüler. Objektif büyütmesi x10. **B.** FACS analizleri; Boya: CFSE.

4.4. KEMİK İLİĞİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNDEN HSP10 SALINIMI

IFN γ , LPS ve ısı şokuna maruz bırakılarak sitoplazmalarındaki Hsp10'u hücre dışına salgılamaları beklenen Kİ-MKH kültürlerinden 2 saat, 8 saat ve 24 saat sonra süpernatantlar toplandı ve ELISA ile Hsp10 düzeylerine bakıldı (Şekil 9).



Şekil 9. Hsp10'un ELISA standart sonuçları

Kültüre edilmiş Kİ-MKH'lerine çeşitli stresör uygulamalarından sonra toplanan süpernatantlarında Hsp10 salınımı ELISA yöntemiyle araştırıldığında, kontrol ile diğer grupların Hsp10 değerleri arasında bir farklılık tespit edilemedi (Tablo 5).

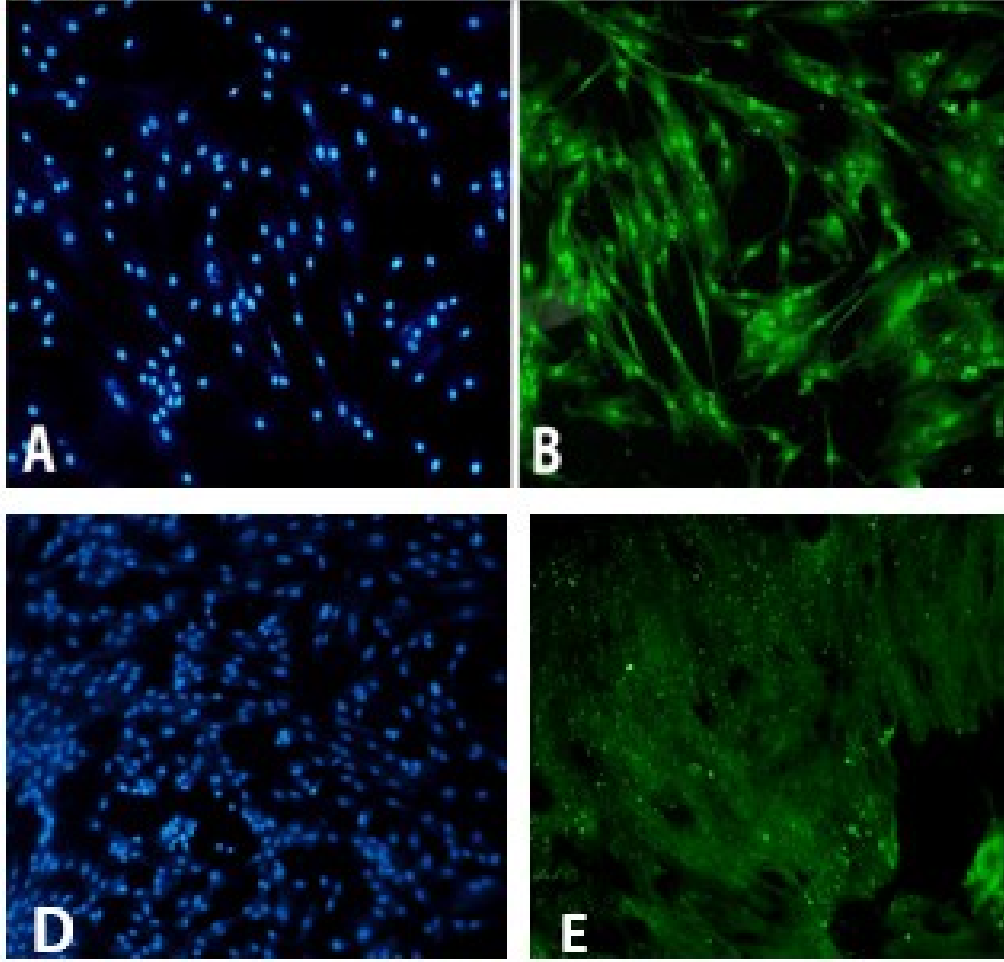
Tablo 5. Uyarılmış Kİ-MKH'lerinden Hsp10 (ng/mL) salınımı (ELISA).

Süre	HSP10 (ng/mL)			
	Kontrol grubu	IFN γ	LPS	Isı şoku
2 saat	-1,05 \pm 0,23	-1,12 \pm 0,20	-1,08 \pm 0,24	-1,10 \pm 0,14
8 saat		-0,99 \pm 0,18	-0,98 \pm 0,15	-0,97 \pm 0,23
24 saat		-0,91 \pm 0,49	-0,70 \pm 0,70	-1,10 \pm 0,12

4.5. KEMİK İLİĞİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNDE VE PLASENTA MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNDE İNTRASELLÜLER HSP10 İFADELERİ

Kİ-MKH'lerin ve PL-MKH'lerin içerisindeki Hsp10 varlığını görebilmek için immünohistokimyasal boyama yapıldı. Bu amaçla lam (chamber slide) üzerinde çoğaltılmış olan Kİ-MKH'leri ve PL-MKH'leri önce anti-Hsp10 primer antikor ile, daha sonra sekonder antikor ile [Goat anti-rabbit IgG (H+L)] muamele edildi. Hücre

çekirdekleri DAPİ ile boyandı. Primer antikorunu ile işaretlenmiş Hsp10'un sitoplazmik lokalizasyonu floresan mikroskopta tespit edildi (Resim 7).



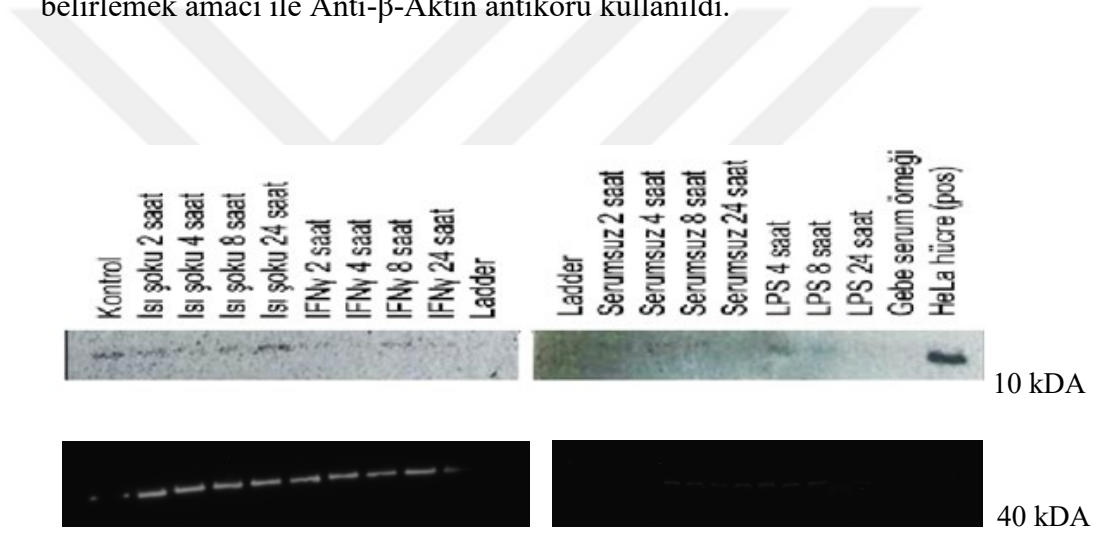
Resim 7. KI-MKH'lerindeki (A,B) ve PL-MKH'lerindeki (D,E) Hsp10'un sitoplazmik lokalizasyonunu gösteren immüno Floresan mikroskopik görüntüler. A,C. DAPİ boyası B,D. Anti-Hsp10 antikorunu ile immün işaretleme.

Bütün resimlerdeki objektif büyütmesi x10.

4.6. KEMİK İLİĞİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNDE HSP10 PROTEİN İFADELERİ

Western Blot analizi yapıldığında, herhangi bir stresör uygulanmayan kontrol KI-MKH'lerinde Hsp10 protein varlığı, pozitif kontrole (HeLa hücresi) kıyasla daha düşük miktarlarda da olsa tespit edildi. Bu analiz, Hsp10'un KI-MKH'lerde intrasitoplazmik lokalizasyonunu destekler nitelikte ve immünohistokimyasal verilerle

uyumlu olarak bulundu. Isı şoku uygulandıktan 2 saat, 4 saat ve 8 saat sonraki Kİ-MKH'lerinin içerisinde saptanan Hsp10 seviyeleri, uyarılmamış kontrole kıyasla daha düşüktü. Bu veriler de, strese maruz bırakma sonucunda intrasitoplazmik Hsp10 geçici olarak etkilendiği, ancak hücre dışına salgılandığı ELISA testi ile gösterilemedi. Kİ-MKH'lerinde, IFN γ , LPS veya serumsuz koşulları uygulandıktan sonraki hücre içi Hsp10 seviyeleri, ısı şoku uygulanlara kıyasla daha düşüktü (Resim 8). HeLa hücre lizatında yüksek düzeyde Hsp10 bulunduğu, antikor datasheet'lerinde bildirilmektedir. Bu nedenle HeLa hücreleri pozitif kontrol olarak kullanıldı. Ayrıca 2 aylık gebeden elde edilen kan serumu da kontrol olarak kullanıldı; ancak serumdan hazırlanan protein lizatında Hsp10 saptanmadı. Jellere proteinlerin eşit miktarlarda (11 μ g) yüklendiğini belirlemek amacı ile Anti- β -Aktin antikorunu kullanıldı.



Resim 8. Stresörlerle uyarılmış Kİ-MKH'lerinde Hsp10 protein ifadelerini gösteren Western Blot resimleri.

5.TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Mezenkimal Kök Hücreler erişkin multipotent kök hücrelerdir, plasenta ve kemik iliği gibi çeşitli dokulardan izole edilebilirler (Pittenger, Mackay et al. 1999). Bu hücreler kendini yenileyebilme, adezyon özelliği, adiposit ve osteojenik hücrelere farklılaşabilme yeteneğine sahiptirler (Caplan, 1991; Prockop, 1997). Kemik iliğinden köken alan MKH'ler hematopoezi destekler, dokuların yeniden şekillenmesi ve onarımından ve ayrıca anjiogenezinden sorumludurlar (Ashton et al., 1980; Hayneswirth, Goshima, Goldberg, Caplan, 1992). MKH'lerde HLA sınıf I molekülleri orta seviyelerde bulunmasına rağmen, HLA sınıf II, Fas Ligand ve ko-stimülatör molekülleri bulunmamaktadır (Angoulvant et al., 2004). İn vitro ortamda, MKH'ler, bir dizi immünomodülatör sitokinlerin salgılanması (PGE2, IL-10, IL-6, TGF β , HGF) yoluyla spesifik antijenler, mitojenler veya allojenik hücreler ile uyarıldığında T hücre proliferasyonunu baskılayabilir (Yañez, Oviedo, Aldea, Bueren, Lamana, 2010; Xu et al., 2014).

Bu bilgilerden yola çıkarak bu tez kapsamında MKH'ler kemik iliği (n=6) ve plasentadan (n=6) izole edildi. MKH'leri iki farklı kaynaktan izole etmemizin amacı, farklı dokulardan izole edilen MKH'lerin immünodülatuar özelliklerini karşılaştırmaktı. Bunun için de ilk olarak pasaj 3'teki Kİ-MKH'lerin ve PL-MKH'lerin immünofenotiplendirilmesine bakıldı. PL-MKH'lerin immünofenotiplendirilmelerinde 2 farklı hücre grubu görüldü. Bunlardan birinci grubun CD90, CD73, CD44, CD105,CD29 belirteçleri pozitifken; ikinci gruptaki hücrelerde CD90 ifadesi ekspres edilmedi ve CD73, CD44,ve CD105 düzeylerinin oldukça düşük olduğu, ancak CD29 ifadesinin normal düzeylerde olduğu gözlemlendi. Bu, Kİ-MKH'lerin aksine, plasental dokudan elde edilen aderan hücre popülasyonlarının heterojen bir hücre grubundan oluştuğunu göstermektedir. CD90 ekspresyonundaki farklılık ayrıca, elde edilen hücre karışımının olgun ve kök hücrelerin bir kombinasyonundan oluştuğunu da düşündürür. Ek olarak, izolasyon boyunca kullanılan enzimatik yöntem, ya bebeklerden kaynaklanabilen ya da anneden köken alan hücrelerin izolasyonu ile sonuçlanabilmektedir. Ayrıca, plasenta zengin vaskülatüre sahip bir organdır. Her iki durum da karışık kültür popülasyonuna katkıda bulunmuş ve hematopoetik veya endotelial hücre popülasyonlarının bulunmasına

neden olmuş olabilir. Heazlewood ve ark. 2014 yılında yaptıkları bir çalışmada, fetal kökenli insan MKH kültürlerinin kontamine olmasında maternal katkının önemli olduğunu ve pasaj 3 ile plasenta hücrelerinin tamamen maternal orjinli olabileceğini göstermişlerdir (Heazlewood et al., 2014). Choi ve ark. (2017), plasentanın farklı katmanlarından izole edilen MKH'lerin, CD90 için yüksek seviyelerde floresans yoğunluğu sergileyen maternal kökenli desidual hücreler ve koryonik villustan gelen fetal kökenli hücreler olmak üzere, immünofenotipik farklılık gösterdiğini buldular (Choi et al., 2017). Bizim çalışmamızda, amniyotik membran ve koryonik membranın çıkarılmasından sonra plasental mezenkimal kök hücreler izole edildi ise de, izole edilmiş bu hücre topluluğu hala hem koryonik hem de desidual hücreler içerebilir ve böylece plasentadan karışık bir hücre popülasyonunun izolasyonuna neden olabilir. Çalışmamızdaki hücrelerin immünofenotiplendirmesi, bu gözlemlerle tutarlılık göstermekteydi. İmmünomodülatör antijenlerin ifadesi açısından, Kİ-MKH'lerinde Fas-L (CD178) ve Hsp10 hücre içerisinde sitoplazmada tespit edildi.

Gebelik gibi özel durumlarda, Hsp10 hızlı bir şekilde ekstrasellüler sıvılara ve periferik kana salınabilmektedir. Hsp10 ekstrasellüler çevrede, özellikle immünomodülatör bir etki göstermektedir (Summers et al., 1996). Tez çalışmamız kapsamında, ısı şoku proteini Hsp10'un Kİ-MKH'lerin ve PL-MKH'lerin immünomodülatuar fonksiyonunda bir rol oynayıp oynamadığını değerlendirmek istedik. PL-MKH ve Kİ-MKH'lerindeki intrasellüler Hsp10'un immünomodülatuar etkilerini gerçekleştirilebilmek için, ekstrasellüler çevreye salınması beklenir. Bu amaçla, ilk olarak Kİ-MKH ve PL-MKH'lerin hücre içi Hsp10 oranları akım sitometri yöntemi ile belirlendi ve hem Kİ hem de PL kaynaklı mezenkimal hücrelerde yüksek oranlarda ifade edildiği gösterildi. Bu hücrelere IFN γ , ısı şoku, LPS ve serumsuz ortama maruz bırakma gibi çeşitli stresörler uygulandıktan 2 saat, 4 saat, 8 saat ve 24 saat sonra Hsp10'un hücre içi seviyeleri Western Blot tekniği ile analiz edilirken, hücre dışına salınımını araştırmak için de ekstrasellüler Hsp10 miktarı ELISA yöntemi ile ölçüldü. Western Blot yöntemiyle intrasellüler Hsp10 tespit edilebildi. Isı şoku ile uyarılmayı takiben 2 saat, 4 saat ve 8 saat sonra Kİ-MKH'leri içerisinde saptanan Hsp10 seviyeleri, uyarılmamış kontrole kıyasla daha düşüktü. Enflamatuar durumları taklit eden stres uygulamalarından sonra Hsp10'un hücre dışına salınması, kanımızca beklenen bir yanıtıdır. Elde edilen sonuçlar da bu görüşümüzü desteklemektedir. Ancak

verilerimiz, intrasitoplazmik Hsp10'un strese maruz bırakma sonucunda hücre dışına salındığını düşündürse de, ELISA testi ile hücre dışında yeterli miktarda Hsp10 gösterilemedi. Kanaatimizce bu durum, ELISA Hsp10 kitinin hassasiyetinin yeterli olmayışından ve eşik değerin altında kalmış olmasından kaynaklanabilir. Ya da Hsp10 gerçekten ekstrasellüler ortama salınmamış olabilir.

Kİ-MKH'ler 21 gün boyunca adipojenik diferansiyasyon ortamına maruz kaldıklarında nötral lipidlerin hızlı oluşumu gözlemlendi ve hücreler Oil Red O ile parlak pozitif boyandı. Benzer şekilde, osteojenik farklılaşma ortamı ile indüksiyondan sonra Kİ-MKH'leri içeren kuyucuklarda gözlenen kalsiyum birikintileri, Alizarin Red S ile pozitif boyanmıştır. Ancak, PL-MKH'lerin 21 günlük kültürden sonra adipojenik veya osteojenik yönde çok kısıtlı olarak farklılaştığı gözlemlendi. Farklılaşma kültürlerinin süresinin 4 haftaya kadar artırılması, bazı görünür farklılaşma belirtileri ile sonuçlandı, fakat yine de PL-MKH'lerin farklılaşma kapasitesi, Kİ-MKH'lere kıyasla sınırlı kaldı. Plasental dokulardan türetilen MKH'lerin farklılaşma kapasiteleri, hücrelerin kaynağına ve izolasyon yöntemlerine bağlı olarak değişebilir. Jang ve ark. (2013) tarafından plasental hücrelerin adipojenik, osteojenik ve kondrojenik soya göre farklılaşmaları boya ekstraksiyonu ve RT-PCR kullanılarak ölçüldüğünde, morfolojik olarak bu farklılaşmanın Kİ-MKH'lerin farklılaşması kadar güçlü olmadığı saptanmıştır. Barlow ve ark. da (2008) plasentadan türetilmiş tüm MKH'lerin (amniyonik membran, koryonik membran ve desidua dahil) sürekli olarak adipojenik farklılaşma için Kİ-MKH'lerinden daha düşük bir kapasite sergilediğini bulmuşlardır. Choi ve ark. (2017) plasentanın farklı katmanlarından elde edilen MKH'lerin farklılaşma kapasitelerini karşılaştırdıklarında, bunların hepsinin adipojenik farklılaşma potansiyeline sahip olduklarını, ancak en iyi seviyede adipojenik farklılaşmanın koryon ve desidüadan elde edilen MKH'lerde görüldüğünü tespit etmişlerdir. Amniyonik membran ve amniyotik epitelden türetilen hücrelerde ise en az seviyede adipojenik farklılaşma gözlemlenmiştir (Choi et al., 2017). Pelekanos ve ark. (2016) ise 21. gün sonunda Kİ-MKH'lerin adipojenik ve osteojenik farklılaşmalarının olduğunu, aynı koşullarda yapılan farklılaşma testlerinde PL-MKH'lerinde osteojenik farklılaşmanın gerçekleştiğini, fakat adipojenik farklılaşmanın olmadığını rapor etmişlerdir.

Kİ-MKH'lerin hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak T hücre proliferasyonunu baskıladığını ve Graft versus host hastalığının tedavisi için kullanıldığını bildiren çalışmalar mevcuttur (Le Blanck and Ringden, 2004). Bununla birlikte, kemik iliğinin toplanması invazif bir prosedürdür ve yeterli hücre elde etmek için hücre kültürü birkaç hafta sürer. Plasentadan elde edilen MKH'ler daha kolay kültüre edilebilir ve klinik uygulama öncesi test edilebilir. Bununla birlikte, kemikiliğinden ve plasentadan türetilen MKH'lerin immün modülasyon açısından aynı özelliklere ve potansiyele sahip olup olmadığı araştırılmaya devam edilmektedir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, plasenta MKH'lerinin, aynı donörden umbilikal kord türevi MKH'lere kıyasla, T hücre proliferasyonunun *in vitro* baskılanmasında daha etkili olduğu rapor edilmiştir (Talwadekar, Kale and Limaye, 2015). Yine aynı çalışmada, plasenta MKH'leri tarafından immün modülasyonun, IL-10 ve TGF-beta'nın salgılanması ve düzenleyici T-hücrelerinde (Tregs) bir artışla kısmen düzenlendiği bildirilmiştir. GvHD olan fare modelinde PL-MKH'ler *in vivo* ortamda transplante edildiğinde, aktive edilmiş T hücrelerinin sitokin sekresyonunu (IL-12, TNF-alfa ve IFN- γ) inhibe ettiği ve farelerin hayatta kalma süresini uzattığı gösterilmiştir (Jang et al., 2013). Kİ-MKH'lerin ve PL-MKH'lerin immünomodülatör özellikleri daha önce farklı araştırmacılar tarafından karşılaştırılmış olsa da, bunlar birbiriyle çelişebilen farklı raporlarla sonuçlanmıştır (Mattar and Bieback, 2015). Bunlardan bazıları, Kİ-MKH'lerin ve PL-MKH'lerin benzer immünomodülatör özelliklerini rapor etmişlerdir (Barlow et al., 2008), bazıları ise PL-MKH'lerin daha iyi immünsüpresyon özellikleri olduğunu bulmuşlardır (Li et al., 2014), bazıları da Kİ-MKH'lerine kıyasla PL-MKH'leri tarafından sadece zayıf immün baskılamının yapıldığını göstermişlerdir (Heo, Choi, Kim and Kim, 2016). Guo ve ark. (2015) yaptıkları bir çalışmada periferik kan lenfositlerini Kİ-MKH'leri ile ko-kültür yapmışlar ve fitohemaglutinin (PHA) ile stimüle etmişlerdir. Bu çalışmayı 4 farklı grup oluşturarak yürütmüşlerdir: (1) Kİ-MKH + lenfosit + PHA etkileşimli kültür grubu, (2) Kİ-MKH + lenfosit + PHA etkileşimsiz kültür grubu, (3) Lenfosit + PHA pozitif kontrol grubu ve (4) Lenfosit olan negatif grup. Yaptıkları çalışma sonucunda, pozitif kontrolde diğer gruplara oranla lenfosit proliferasyonunun daha fazla olduğu gözlenmiştir (Guo et al., 2015). Castro-Manreza ve Montesinos (2014) tarafından yürütülen bir çalışmada Kİ-MKH, göbek kordonu kaynaklı MKH ve PL-MKH'lerin T-hücre proliferasyonundaki etkileri

araştırılmıştır. Kİ-MKH ve göbek kordonu kaynaklı MKH'lerin T-hücrelerin klonal ekspansiyonunu baskılandığı, ancak PL-MKH'lerin hiçbir baskılama oluşturmadığı gözlenmiştir (Castro-Manrreza and Montesinos, 2014). Bu çalışmada yazarlar ayrıca, farklılaşma kapasitelerine bakıldığında Kİ-MKH'lerin adipojenik farklılaşma kapasitesinin PL-MKH'lere oranla daha yüksek olduğunu tanımlamışlardır. Lee ve ark.'nın (2012) yapmış olduğu çalışmada göbek kordonu kanından elde edilen lenfositlerle Kİ-MKH'leri, PL-MKH'leri ve adipoz dokudan elde edilen MKH'ler ko-kültüre edilmiştir. Bu MKH'ler 2×10^3 , 4×10^3 , 1×10^4 ve 2×10^4 oranlarında DMEM-F12'li kültür ortamında ekilmişlerdir. Çalışmanın sonunda yazarlar tüm kök hücre gruplarının immünomodülatör özelliklerinin olduğunu görmüşlerdir (Lee et al., 2012).

Sunulan tez çalışmasında, Kİ-MKH'lerin ve PL-MKH'lerin *in vitro* ortamda CD3+ T hücre proliferasyonu üzerine immün baskılayıcı etkisi incelendi. L-PHA ile aktive edilmiş olan CD3+ T hücreleri IL-2'nin varlığında farklı konsantrasyonlarda Kİ-MKH'lerle ve PL-MKH'lerle birlikte ko-kültüre edildi. Kİ-MKH'leri T hücrelerle birlikte düşük oranlarda ko-kültüre edildiğinde bile, T hücre proliferasyonunu önemli ölçüde inhibe etti. Bununla birlikte, PL-MKH'lerinin yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında T hücre proliferasyonunu baskıladığı gözlemlendi.

PL-MKH'lerinin immün baskılayıcı özellikleriyle ilgili olarak daha önce yapılmış, birbiriyle çelişen çalışma raporları mevcuttur. Elde edilmiş veriler arasındaki farklılıkların, plasental hücrelerin elde edilmesinde kullanılan izolasyon yöntemi, hücre kökeni (maternal veya fetal), hücre popülasyonunun saflığı (karma veya tek bir plasental tabakadan), hücre kültürü ortamı, MKH'lerin ışınlanması, sitokinlerin kullanımı ve kullanılan hücrelerin konsantrasyon oranları dahil olmak üzere kültür koşulları ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında kemik iliğinden ve plasentadan MKH'ler elde edilerek akım sitometri yöntemi ve adipojenik/osteojenik boyama teknikleri ile karakterizasyonları belirlendi. Ko-kültür ortamlarında T hücre ekspansiyonunu baskıladıkları için her iki MKH tipinin de immünomodülatuar rolünün olduğu, ancak bu etkinliğin Kİ-MKH'lerinde PL-MKH'lerine kıyasla daha yüksek olduğu saptandı. MKH immünomodülasyonunda ısı şok protein 10'un (Hsp10) rolü immünohistokimyasal boyama ve Western Blot yöntemleriyle araştırıldığında, Hsp10

sitozolde tespit edilmesine karşın, çeşitli stres faktörleriyle indüklemeye neticesinde MKH'lerin sitozoldeki Hsp10'u dış ortama (süpernatanta) salgılamadıkları görüldü. Bu nedenle MKH'lerin immünmodülasyonu başka mekanizmalarla gerçekleştirmiş olabileceği düşünüldü. Kİ-MKH'leri homojen bir hücre popülasyonundan oluşurken, PL-MKH'lerinin, muhtemelen maternal hücrelerle kontaminasyon sebebiyle kök hücreler yanında daha olgun hücre popülasyonu içermesinden dolayı daha az farklılaşma kapasitesine sahip olduğu, bu nedenle de T-hücreleri ile ko-kültürlerinde bağışıklık baskılanmasında daha düşük bir etkinlik gösterdiği düşünüldü. Kİ-MKH'leri ve PL-MKH'leri kolay temin edilebilir olmalarından ve *in vitro* ortamda kolay büyümelerinden dolayı klinik kullanımlar için iyi birer aday olarak önerilebilir. Literatüre bakıldığında fetal dokulardan izole edilen MKH'lerin farklılaşma kapasitelerinin ve immünomodülatuar etkilerinin Kİ-MKH'lere kıyasla daha düşük olduğu görülmektedir. Bu tez çalışmasından elde ettiğimiz veriler de aynı doğrultudadır. Çalışmamızda, PL-MKH kültürlerinde en azından iki farklı popülasyon tespit edilip, PL-MKH'lerin saf olmadığı ve bundan dolayı T-hücre proliferasyonunu baskılayıcı etkisinin düşük olduğu ve farklılaşmalarında bir gecikme olduğu gösterildi. Aynı zamanda bu çalışmada, Kİ-MKH'lerin anlamlı bir *in vitro* immün baskılayıcı etkisinin olduğu gözlemlenmesine karşın, bu immünomodülasyonda Hsp10'un (ekstrasellüler ortamda tespit edilemediğinden) bir rolünün olduğu ispat edilemediği için, immünomodülatuar etkinin Hsp10 aracılığı ile gerçekleşmediği düşünüldü. Ancak yine de intrasellüler Hsp10 aracılı başka yollar da bu immünomodülasyonda görev alıyor olabilir. Gelecekteki klinik çalışmalarda MKH'lerin kullanımı için, MKH'lerin immünomodülatuar etki yollarının daha detaylı araştırılması ve PL-MKH'lerin saflaştırılması için yeni yöntemlerin oluşturulması yararlı olacaktır kanısındayız.

KAYNAKLAR

Aerts F ve Wagemaker G. “Mesenchymal stem cell engineering and transplantation” Genetic engineering of mesenchymal stem cells. Ed. *JA Nolte*. 2004: 1-45.

Aerts-Kaya F ve Uçkan-Çetinkaya D. “Kalp yetmezliğinde kök hücre uygulamaları” Kalp yetmezliği El Kitabı. 2016.

Alviano F, Fossati V, Marchionni C, Arpinati M, Bonsi L, Franchina M, Lanzoni G, Cantoni S, Cavallini C, Bianchi F, Tazzari PL, Pasquinelli G, Foroni L, Ventura C, Grossi A, Bagnara GP. Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Dev Biol*. 2007: 7, 11.

Angoulvant D, Clerc A, Benchalal S, Galambrun C, Farre A, Bertrand Y, Eljaafari A. Human mesenchymal stem cells suppress induction of cytotoxic response to alloantigens. *Biorheol*. 2004: 41 (3-4), 469-76.

Arvola M, Gustafsson E, Mattsson R. Neonatal ingestion of IgG-containing milk increases the survival of adoptively transferred B-lineage cells in B cell-deficient mice. *J Reprod Immunol*. 2001: 50 (2), 121-32.

Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hattori A, Owen M. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop Relat Res*. 1980: 294-307.

Athanasas-Platsis S, Quinn KA, Wong TY, Rolfe BE, Cavanagh AC, Morton H. Passive immunization of pregnant mice against early pregnancy factor causes loss of embryonic viability. *J Reprod Fertil*. 1989: 87 (2), 495-502.

Athanasas-Platsis S, Morton H, Dunglison GF, Kaye PL. Antibodies to early pregnancy factor retard embryonic development in mice in vivo. *J Reprod Fertil*. 1991: 92, 443-51.

Athanasas-Platsis S, Corcoran CM, Kaye PL, Cavanagh AC, Morton H. Early pregnancy factor is required at two important stages of development in the mouse. *Am J Reprod Immunol*. 2000; 43, 223–33

Aufricht C. Heat-shock protein 70: molecular supertools. *Pediatr Nephrol*. 2005; 20, 707–13.

Barlow S, Brooke G, Chatterjee K, Price G, Pelekanos R, Rossetti T, Doody M, Venter D, Pain S, Gilshenan K, Atkinson K. Comparison of Human Placenta- and Bone Marrow–Derived Multipotent Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dev*. 2008; 17, 1095–108.

Bernardo ME, Locatelli F, Fibbe WE. Mesenchymal Stromal Cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2009; (1176), 101-117.

Bernardo ME, Ball LM, Cometa AM, Roelofs H, Zecca M, Avanzini MA, Bertaina A, Vinti L, Lankester A, Maccario R, Ringden O, Le Blanc K, Egeler RM, Fibbe WE, Locatelli F. Co-infusion of ex vivo-expanded, parental MSCs prevents life-threatening acute GVHD, but does not reduce the risk of graft failure in pediatric patients undergoing allogeneic umbilical cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2011; 46 (2), 200-7.

Blanco JF, Graciani IF, Sanchez-Guijo FM, Muntión S, Hernandez-Campo P, Santamaria C, Carrancio S, Barbado MV, Cruz G, Gutierrez-Cosío S, Herrero C, San Miguel JF, Briñon JG, del Cañizo MC. Isolation and characterization of mesenchymal stromal cells from human degenerated nucleus pulposus: comparison with bone marrow mesenchymal stromal cells from the same subjects. *Spine*. 2010; 32, 1528-1159.

Bulla R, Fischetti F, Bossi F, Tedesco F. Feto-maternal immune interaction at the placental level. *Lupus*. 2004; 13, 625-29.

Caplan AL. Mesenchymal Stem Cells. *J Orthop Res.* 1991: 9 (5), 641-650.

Castro-Manreza ME, Montesinos JJ. Immunoregulation by mesenchymal stem cells: biological aspects and clinical applications. *J Immunol Res.* 2015: 394917.

Cavanagh AC, Morton H. The purification of early-pregnancy factor to homogeneity from human platelets and identification as chaperonin 10. *Eur J Biochem.* 1994: 222 (2), 551-60.

Cavanagh AC. Production in vitro of mouse early pregnancy factor and purification to homogeneity. *J Reprod Fertil.* 1984: 71 (2), 581-92.

Chang CJ, Yen ML, Chen YC, Chien CC, Huang HI, Bai CH, Yen BL. Placenta-derived multipotent cells exhibit immunosuppressive properties that are enhanced in the presence of interferon- γ . *Stem Cells.* 2006: 24 (11), 2466-77.

Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, Dong XJ, Zhang GR. Mesenchymal stem cells: A promising candidate in regenerative medicine. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008: 40(5), 815-820.

Chen PM, Liu KJ, Hsu PJ, Wei CF, Bai CH, Ho LJ, Sytwu HK, Yen BL. Induction of immunomodulatory monocytes by human mesenchymal stem cell derived hepatocyte growth factor through ERK1/2. *J Leukoc Biol.* 2014: 96 (2), 295-303.

Choi SH, Stuckey DW, Pignatta S, Reinshagen C, Khalsa JK, Roozendaal NC, Martinez-Quintanilla J, Tamura K, Keles E, Shah K. Tumor resection boosts therapeutic efficacy of encapsulated stem cells expressing a highly secretable variant of interferon- β in glioblastomas. *Clin Cancer Res.* 2017: 23(22), 047-7058.

Corrao S, Campanella C, Anzalone R, Farina F, Zummo G, Conway de Macario E, Macario AJ, Cappello F, La Rocca G. Human Hsp10 and Early Pregnancy Factor (EPF) and their relationship and involvement in cancer and immunity: current knowledge and perspectives. *Life Sci.* 2010; 86, 145-52.

Czarnecka AM, Campanella C, Zummo G, Cappello F. Heat shock protein 10 and signal transduction: a "capsula eburnea" of carcinogenesis? *Cell Stress Chap* 2006; 11: 287-94.

De Lemos MA. How your mother tolerated you for nine months. *Biol Teach J.* 2003; 1, 27-30.

Di Nicola M¹, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* 2002; 99 (10), 3838-43.

Doğanay M, Gürcan B, Olşen CA, Darka İ, Alpan D. Hastalıklara yeni yaklaşım: Mezenkimal Kök Hücre. tip.baskent.edu.tr. 2012

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytother.* 2006; 8 (4), 315-7.

Friedenstein AJ, Gorskaja JF ve Kulagina NN. Fibroblast precursor in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol.* 1976; 4, 267-74.

González A, López AS, Alegre E, Alcázar JL, López-Moratalla N. Does nitric oxide play a role in maternal tolerance towards the foetus? *J Physiol Biochem.* 2004; 60 (3), 227-38.

Grossoa MC, Bellingeri RV, Schadeb R, Adriana B. Vivas. Neutralization of early pregnancy factor by passive immunization alters normal embryonic development and cytokine balance. *Immunol.* 2012: 31 (4), 106-114.

Gu YZ, Xue Q, Chen YJ, Yu GH, Qing MD, Shen Y, Wang MY, Shi Q, Zhang XG. Different roles of PD-L1 and FasL in immunomodulation mediated by human placenta-derived mesenchymal stem cells. *Hum Immunol.* 2013: 74 (3), 267-76.

Guo CH, Han LX, Wan MR, Deng GJ, Gan JH. Immunomodulatory effect of bone marrow mesenchymal stem cells on T lymphocytes in patients with decompensated liver cirrhosis. *Genet Mol Res.* 2015: 14 (2), 7039-46.

Guzeloglu A, Erdem H, Saribay MK, Thatcher WW, Tekeli T. Effect of the administration of flunixin meglumine on pregnancy rates in Holstein heifers. *Vet Rec.* 2007: 160 (12), 404-6.

Haddar R, Saldanha-Araujo F. Mechanisms of T-cell immunosuppression by mesenchymal stromal cells: what do we know so far? *Biomed Res Int.* 2014:216806.

Hansen JJ, Bross P, Westergaard M, Gregersen N. Genomic structure of the human mitochondrial chaperonin genes: HSP60 and HSP10 are localized head to head on chromosome 2 separated by a bidirectional promoter. *Hum Gen.* 2003: 11 (21), 71-7.

Hayneswirth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone.* 1992: 13 (2), 81-8

Hernández H, Sariago I, Garber G, Delgado R, López O, Sarracent J. Monoclonal antibodies against a 62 kDa proteinase of *Trichomonas vaginalis* decrease parasite cytoadherence to epithelial cells and confer protection in mice. *Parasite Immunol.* 2004: 26 (3), 119-25.

Heo JS, Choi Y, Kim HS, Kim HO. Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord, placenta and adipose tissue. *International Journal of Molecular Medicine*.2016: 37(1), 115-125.

Jang MJ, Kim HS, Lee HG, Kim GJ, Jeon HG, Shin HS, Chang SK, Hur GH, Chong SY, Oh D, Chung HM. Placenta-derived mesenchymal stem cells have an immunomodulatory effect that can control acute graft-versus-host disease in mice. *Acta Haematol*. 2013: 129 (4), 197-206.

Jia H, Halilou AI, Hu L, Cai W, Liu J, Huang B. Heat shock protein 10 inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory mediator production. *J Biol Chem*. 2005: 280, 4037-47.

Jia H, Halilou AI, Hu L, Cai W, Liu J, Huang B. Heat shock protein 10 (Hsp10) in immune-related diseases: one coin, two sides. *Int J Biochem Mol Biol*. 2011: 2 (1), 47-57.

Johnson BJ, Le TT, Dobbin CA, Banovic T, Howard CB, Flores Fde M, Vanags D, Naylor DJ, Hill GR, Suhrbier A. Heat shock protein 10 inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory mediator production. *J Biol Chem*. 2005: 280 (6), 4037-47.

Jones BJ, Brooke G, Atkinson K, McTaggart SJ. Immunosuppression by placental indoleamine 2,3-dioxygenase: a role for mesenchymal stem cell. *Placenta*. 2007: 28 (11-12), 1174-81.

Kanellopoulos-Langevin C, Caucheteux SM, Verbeke P, Ojcius DM. Tolerance of the fetus by the maternal immune system: role of inflammatory mediators at the fetomaternal interface. *Rep Biol Endocrinol*. 2003: 2, 121.

Kohm AP, Carpentier PA, Anger HA, Miller SD. Cutting edge: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and

central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2002: 169 (9), 4712-6.

Komatsu K, Honmou O, Suzuki J, Houkin K, Hamada H, Kocsis JD. Therapeutic time window of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after cerebral ischemia. *Brain Res.* 2010: 1334, 84-92.

Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Gene Ther.* 2002: 9 (11), 754-8.

Lash GE, Legge M, Fisher M. Synthesis of Early Pregnancy Factor Using Red Deer (*Cervus elaphus*) as a Delayed Implantation Model. *J Assist Reprod Genet.* 1997: 14 (1), 39-43.

Le Blanc K, Ringdén O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med.* 2007: 262 (5), 509-25.

Lee JM, Jung J, Lee HJ, Jeong SJ, Cho KJ, Hwang SG, Kim GJ. Comparison of immunomodulatory effects of placenta mesenchymal stem cells with bone marrow and adipose mesenchymal stem cells. *Int Immunopharmacol.* 2012: 13 (2), 219-24.

Lewkowicz P, Lewkowicz N, Tchorzewski H. CD4+CD25+ T regulatory cells in clinical immunology and therapy. *Postepy Hig Med Dosw.* 2005: 59, 371–6.

Li X, Bai J, Ji X, Li R, Xuan Y and Wang Y. Comprehensive characterization of four different populations of human mesenchymal stem cells as regards their immune properties, proliferation and differentiation. *International Journal of Molecular Medicine.* 2014: 34(3), 695-704.

Luan Y, Mosheir E, Menon MC, Wilson D, Woytovich C, Ochando J, Murphy B. Monocytic myeloid-derived suppressor cells accumulate in renal transplant patients

and mediate CD4(+) Foxp3(+) Treg expansion. *Am J Transplant.* 2013: 13 (12), 3123-31.

Ma X, Li W, Yu H, Yang Y, Li M, Xue L, Xu T. Bendless modulates JNK-mediated cell death and migration in *Drosophila*. *Cell Death Differ.* 2014: 21 (3), 407-415.

Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol.* 1998: 176 (1), 57-66.

Malgieri A, Kantzari E, Patrizi MP, Gambardella S. Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art. *Int J Clin Exp Med.* 2010: 3 (4), 248-69.

Mehta AR, Eessalu TE, Aggarwal BB. Purification and characterization of early pregnancy factor from human pregnancy serum. *J Biol Chem.* 1989: 264 (4), 2266-71.

Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, Scadden DT, Ma'ayan A, Enikolopov GN, Frenette PS. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature.* 2010: 466 (7308), 829-34.

Morimoto RI. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.* 1998: 12 (24), 3788-96.

Morton H, Rolfe BE, Cavanagh AC. Ovum factor and early pregnancy factor. *Curr Top Dev Biol.* 1987: 23, 73-92.

Morton H. Early pregnancy factor: An extracellular chaperonin 10 homologue. *Immunol Cell Biol.* 1998: 76, 483-96.

Mosaferi E, Majidi J, Mohammadian M, Babaloo Z, Monfaredan A, Baradaran B. HLA-G expression pattern: Reliable assessment for pregnancy outcome prediction. *Adv Pharm Bull.* 2013; 3 (2), 443-6.

Ovalle WK, Nahirney PC. (2009). Netter Temel Histoloji. Güneş Yayınları, Ankara.

Özbek E, Cengiz N, Yanar S. An Immunosuppressive Protein Supporting Embryonic Implantation and Having An Important Role in Cell Proliferation: The Early Pregnancy Factor. *Sakarya Med J.* 2013; 3(3), 157-164

Özer A. (2016) Özel Histoloji. 2. Baskı. İstanbul Tıp Kitabevleri, İstanbul.

Padua MB. Endometrial adenogenesis and uterine immune regulation in sheep. A thesis presented to the graduate school of the University of Florida in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science. 2004.

Pelekanos RA, Ting MJ, Sardesai VS, Ryan JM, Lim YC, Chan JK, Fisk NM. Intracellular trafficking and endocytosis of CXCR4 in fetal mesenchymal stem/stromal cells. *BMC Cell Biol.* 2014; 15, 15.

Petrof EO, Ciancio MJ, Chang EB. Role and regulation of intestinal epithelial heat shock proteins in health and disease. *Chin J Dig Dis.* 2004; 5 (2), 45-50.

Piccinni MP. Role of immune cells in pregnancy. *Autoimmunity.* 2003; 36 (1), 1-4.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999; 284, 143-7.

Plüddemann A, Neyen C, Gordon S. Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands, *Methods.* 2007; 43 (3), 207–217.

Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997; 276 (5309), 71-4.

Qin ZH ve Zheng ZQ. Detection of early pregnancy factor in human sera. *Am J Reprod Immunol Microbiol*. 1987; 13 (1), 15-8.

Quinn KA, Athanasas-Platsis S, Wong T-Y, Rolfe BE, Cavanagh AC, Morton H. Monoclonal antibodies to early pregnancy factor perturb tumour cell growth. *Clin Exp Immunol*. 1990; 80, 100–8.

Sadacharan SK, Cavanagh AC ve Gupta RS. Immunoelectron microscopy provides evidence for the presence of mitochondrial heat shock 10-kDa protein (chaperonin 10) in red blood cells and a variety of secretory granules. *Histochem Cell Biol* 2001; 116, 507-17.

Shahani SK, Moniz CL, Gokral JS, Meherji PK. Early pregnancy factor (EPF) as a marker for detecting subclinical embryonic loss in clomiphene citrate-treated women. *Am J Reprod Immunol*. 1995; 33, 350–353.

Sueoka K, Dharmarajan AM, Miyazaki T, Atlas SJ, Wallach EE. In vivo and in vitro determination of components of rabbit early pregnancy factors. *J Reprod Fertil*. 1989; 87(1), 47-53.

Summers KM, Murphy RM, Webb GC, Peters GB, Morton H, Cassady AI, Cavanagh AC. The human early pregnancy factor/chaperonin 10 gene family. *Biochem Mol Med*. 1996; 58 (1), 52–8.

Talwadekar MD, Kale VP, Limaye LS. Placenta-derived mesenchymal stem cells possess better immunoregulatory properties compared to their cord-derived counterparts-a paired sample study. *Sci Rep*. 2015; 5,15784

Trowsdale J, Betz AG. Mother's little helpers: mechanisms of maternal-fetal tolerance. *Nat Immunol.* 2006; 7 (3), 241-6.

Wang TT¹, Wang N, Liao XL, Meng L, Liu Y, Chen SL. Cloning, molecular characterization and expression analysis of heat shock cognate 70 (Hsc70) cDNA from turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Physiol Biochem.* 2013; 39 (6), 1377-86.

Wang XY, Subjeck JR. High molecular weight stress proteins: Identification, cloning and utilisation in cancer immunotherapy. *Int J Hyperthermia.* 2013; 29 (5), 364-75.

Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell.* 2000; 100 (1), 157-68.

Wolbank S, Peterbauer A, Fahrner M, Hennerbichler S, van Griensven M, Stadler G, Redl H, Gabriel C. Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: a comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Tissue Eng.* 2007; 13 (6), 1173-83.

Xu C, Yu P, Han X, Du L, Gan J, Wang Y, Shi Y. TGF- β promotes immune responses in the presence of mesenchymal stem cells. *J Immunol.* 2014; 192 (1), 103-9.

Yañez R, Oviedo A, Aldea M, Bueren JA, Lamana ML. Prostaglandin E2 plays a key role in the immunosuppressive properties of adipose and bone marrow tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Exp Cell Res.* 2010; 316 (19), 3109-23.


Zhang B, Walsh MD, Nguyen KB, Hillyard NC, Cavanagh AC, McCombe PA, Morton H. Early pregnancy factor treatment suppresses the inflammatory response and adhesion molecule expression in the spinal cord of SJL/J mice with

experimental autoimmune encephalomyelitis and the delayed-type hypersensitivity reaction to trinitrochlorobenzene in normal BALB/c mice. *J Neurol Sci.* 2003: 212, 37-46.

Zheng ZQ, Qin ZH, Ma AY, Qiao CX, Wang H. Detection of early pregnancy factor-like activity in human amniotic fluid. *Am J Reprod Immunol.* 1990: 22, 9-11.

EK

Ek.1.Etik Kurul Kararı



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 -25

09 Ocak 2015

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 07.01.2015 ÇARŞAMBA
Toplantı No : 2015/01
Proje No : GO 14/574 (Değerlendirme Tarihi: 05.11.2014)
Karar No : GO 14/574 - 17

Üniversitemiz Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi öğretim görevlilerinden Dr. Fatima S.F. Aerts KAYA'nın sorumlu araştırmacısı olduğu, Prof.Dr. Elvan ÖZBEK, Biyolog Aysun SARIKAYA, Uzman Biyolog Barış ULUM, Doç.Dr. Özgür ÖZYÜNCÜ ve Prof.Dr. Duygu Uçkan ÇETİNKAYA ile birlikte çalışacakları GO 14/574 kayıt numaralı ve "Isı Şok Protein 10 (HSP10)'un Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmün Modülasyonundaki Rolünün Araştırılması" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, tıbbi etik açıdan uygun bulunmuştur.

1. Prof. Dr. Nurten Akarsu (Başkan)	9 Prof. Dr. Rahime Nohutçu (Üye)
2. Prof. Dr. Nüket Örnek Buken (Üye)	10. Prof. Dr. R. Köksal Özgül (Üye)
3. Prof. Dr. M. Yıldırım Sara (Üye)	11. Prof. Dr. Ayşe Lale Doğan (Üye)
4. Prof. Dr. Sevda F. Müftüoğlu (Üye)	12. Doç. Dr. S. Kutay Demirkan (Üye)
5. Prof. Dr. Cenk Sökmenşüer (Üye)	İZİNLİ
6. Prof. Dr. Volga Bayrakçı Tunay (Üye)	13 Prof. Dr. Leyla Dinç (Üye)
7. Prof. Dr. Ali Düzova (Üye)	14. Prof. Dr. Hatice Doğan Buzoğlu (Üye)
8. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev Turnagöl (Üye)	15. Av. Meltem Onurlu (Üye)

Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1082 • Faks: 0 (312) 310 0580 • E-posta: goetik@hacettepe.edu.tr

Ayrıntılı Bilgi için:

ÖZGEÇMİŞ

I-Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Aysun SARIKAYA

Doğum Yeri ve Tarihi: Taşköprü Kastamonu, 03/08/1990

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Bekar

İletişim adresi ve telefonu: Sakarya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve

Embriyoloji A.B.D., Korucuk, Sakarya. Tel: 0264 295 31 40

Yabancı dili: İngilizce

II-Eğitimi

Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü 2010– 2013

Kastamonu Mustafa Kaya Anadolu Lisesi 2004-2008

III-Ünvanları

IV- Mesleki Deneyim

V-Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

THED Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği (2015-__)

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları

Sevinç Yanar, Şadiye Açıköz, Elvan Şahin, **Aysun Sarıkaya**. Spermatogonial Kök Hücre. Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıp Dergisi 2017: 4(1), 37-44.

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Uluslararası Hakemli Dergilerin Özel Sayılarında Yayınlanmış Bildiriler

Sarıkaya A., Teker T., Ulum B., Cetinkaya D., Aerts-Kaya F. Endoplasmic Reticulum Stress During Adipogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells

2nd International Congress on Stem Cell and Cellular Therapies, Antalya 2015
(Sözlü sunum)

Aysun Sarıkaya, Trui Visser, Özgür Özyüncü, Duygu Uçkan-Çetinkaya, Gerard Wagemaker, Fatima Aerts-Kaya. Optimization of methods for hypothermic preservation of primary human Hematopoietic Stem Cells in culture. European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT) 2016. (Poster sunum)

Sarıkaya A., Aydın G., Özyüncü Ö., Özbek Ö., Uçkan-Çetinkaya D., Aerts-Kaya F. Comparison of immunomodulatory capacities of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and placental tissue. Cell and Tissue Biology Research, 5(suppl):108, 2016

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

A. Sarıkaya, E. Sözen, O. Bulduk, N. Cengiz, E. Özbek, Y. Nasir. Preimplantasyon Genetik Tanı; Embriyo Biyopsisi, I. Ulusal Tıp Kongresi ‘Geleceğin Tıbbı’, Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2014 (Poster Bildirisi).

A.Sarıkaya, E. Özbek. 3D Modeli Yöntemiyle Alzheimer Hastalığı 8. Sinir bilim Günleri, P39. Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2014. P39 (Poster Bildirisi).

A.Sarıkaya, E. Özbek. Vitamin D Uygulamasının Nörodejeneratif Hastalıklar Üzerine Etkisi 8. Sinir Bilim Günleri, P40. Sakarya üniversitesi 29-30 kasım 2014 (Poster Bildirisi).

A. Sarıkaya, E. Sözen, O. Bulduk, N. Cengiz, E. Özbek, Y. Nasir. Preimplantasyon Genetik Tanı; Embriyo Biyopsisi, I. Ulusal Tıp Kongresi ‘Geleceğin Tıbbı’, 2014 (Poster Bildirisi)

VII- Bilimsel Etkinlikler

VIII-Diğer Bilgiler

GMP for Advanced Therapy Medicinal Products’’ Eğitim Başarı Sertifikası.
Academia Life Sciences Center 24.04.2017

Hacettepe Üniversitesi Eğitim Bilimleri Fakültesi Pedagojik Formasyon-2016
Konfokal Mikroskopi Çalıştayı, Sakarya, 2015

II. Ulusal Tıp Kongresi ‘Geleceğin Tıbbı II’, Sakarya, 18-20 Nisan 2015

Sağlık Bilimleri Araştırma Planlanması ve Bilimsel Makale Yazımı Veriden Yayına
Modul II Kurs, Sakarya, 11 Mart 2015

Ankara Üniversitesi 12.Uluslararası Histoloji-Embriyoloji Kongresi, Ankara 27-30
Mayıs 2014

Ulusal Tıp Kongresi ‘Geleceğin Tıbbı’, Sakarya, 25-27 Nisan 2014

İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, İstanbul,
02-13 Aralık 2013

Olympus Mikroskopi Semineri, Ankara, 10 Nisan 2013

Thermo Scientific Patoloji ve Sitoloji Semineri, Ankara, 8 Mayıs 2013

Ege Üniversitesi Geleneksel 4. Kök Hücre Sempozyumu 2012

Uluslararası Evrim Konferansı, Ankara, 3-4 Aralık 2011

ISO\IEC 17025: 2005 Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının
Yeterliliği 2011

ISO 9001: 2008 Kalite Yönetimi Sistemi İç Denetçi 2011

OHSAS 18001: 2007 İş Sağlığı ve Yönetimi Sistemi İç Denetçi 2011

ISO 14001: 2004 Çevre Yönetimi Sistemi İç Denetçi 2011

IX- Bilimsel Ödül

1. Sözlü bildiri ikincilik ödülü

Uluslararası katılımlı XIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi,
İzmir, 30 Nisan-03 Mayıs 2016.

