T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI

WHARTON JELİ KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN (iWJ-MKH'lerin) İMMÜNOMODULATUVAR ÖZELLİKLERİ

FIDAN GAKHIYEVA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç.Dr. AYLA EKER SARIBOYACI

Eskişehir, 2024

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI

WHARTON JELİ KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN (iWJ-MKH'lerin) İMMÜNOMODULATUVAR ÖZELLİKLERİ

FIDAN GAKHIYEVA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç.Dr. AYLA EKER SARIBOYACI

Eskişehir, 2024

Proje No: TUSEB A2 31858

ÖZET

Başlık: Wharton Jeli Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin (iWJ-MKH'lerin) İmmünomodulatuvar Özellikleri

Amaç: Bu tez çalışmasının amacı, hem potensi hem de allojenik kullanımları ile ön plana çıkmış olan iWJ-MKH'lerin immunosupresif etkinliğini artırmak için immünregülasyonda görev alan matür miRNA-181a'yı transfekte etmek ve transfeksiyonun etkisini, in vitro bağışıklık sistemi modeli olan insan pan T hücre modelinde analiz etmektir.

Yöntem: Bu tez çalışmasında miRNA transfekte iWJ-MKH'lerle ko-kültür sonrası T hücre yanıtı; canlılık ve proliferasyon (CCK8), apoptosis (AnnexinV-PI yöntemi) ve hücre siklusu değişimi (flow sitometrik hücre siklusu analizi), anti- ve pro-inflamatuar sitokinler (TGF-beta1, IL-6, TLR-4 ve STAT1), regülatuar T-hücre (Treg) (CD4+CD25+Foxp3+), T-bet ve T hücre belirteç/gen ekspresyonları (CD3,CD4, CD45, CD4+CD8 ve CD69) üzerindeki etkisi analiz edildi.

Bulgular: PHA-M ile aktive edilmiş T lenfositlerinde faz konstrat mikroskopu ile belirgin ve canlılık oranı yüksek koloni oluşturma yetenekleri gösterildi. Hem miRNA transfekte edilmiş hem de edilmemiş iWJ-MKH'lerin 4. günde apoptotik etki göstermediği üstelik apoptozun azaldığı tespit edildi. Hücre siklusu analizinde 4. günde yalnız T hücreleri ile karşılaştırdığımızda MKH'ler ile ko-kültür edilen T hücrelerinde proliferasyon ve apoptozun azaldığı ve miRNA transfekte MKH'ler ile ko-kültür edilenlerde ise proliferasyonun azaldığı ve apoptozun arttığı ($*p<0.05$) belirlendi. Her iki ko-kültür grubunda da T hücre belirteçlerini eksprese eden T hücre %'sinin azaldığı belirlendi. TGF-beta gen ekspresyonu azalmışken kokültür besiyerindeki hem MKH hem Treg'den sekreyonunun arttığı ve Tbet hücre populasyonunun artmasına rağmen salgısı olan IFN-gama sekreyonunun ise azaldığı belirlendi. MKH'lerde miRNA transfeksiyonunun, T hücre proliferasyon, apoptoz ve Treg ve T-bet populasyonunu arttırdığı gözlemlendi.

Sonuç: miR-181a transfeksiyonunun MKH'lerin immunsupresif etkilerini IL-6, STAT-1 ve DUSP5 genleri ve TGF-beta ve IFN-gama sitokinleri yoluyla düzenlediği sonucuna varıldı. Bu proje TUSEB A2 31858 nolu projesi ile desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Wharton Jeli, Mezenkimal kök hücre, İmmünosupresyon mikroRNA-181a.

ABSTRACT

Title: Immunomodulatory Properties of Wharton Jelly-derived Mesenchymal Stem Cells (iWJ-MSCs)

Objective: The aim of this thesis is to transfect mature miRNA-181a involved in immunoregulation to increase the immunosuppressive efficacy of iWJ-MSCs, which have come to the forefront with both their potency and allogeneic use, and to analyze the effect of transfection in the human pan T cell model, an in vitro immune system model.

Methods: In this thesis, T cell response after co-culture with miRNA transfected iWJ-MKCs; viability and proliferation (CCK8), apoptosis (AnnexinV-PI method) and cell cycle change (flow cytometric cell cycle analysis), anti- and pro-inflammatory cytokines (TGF-beta1, IL-6, TLR-4 and STAT1), regulatory T-cell (Treg) (CD4+CD25+Foxp3+), T-bet and T-cell marker/gene expressions (CD3, CD4, CD45, CD4+CD8 and CD69) were analyzed..

Results: PHA-M activated T lymphocytes were shown to be capable of forming distinct and highly viable colonies by phase-constrate microscopy. Both miRNA-transfected and non-miRNA-transfected iWJ-MSCs did not show apoptotic effect on day 4 and apoptosis was decreased. In cell cycle analysis, proliferation and apoptosis were decreased in T cells co-cultured with CCPs and proliferation was decreased and apoptosis was increased ($*p<0.05$) in those co-cultured with miRNA transfected CCPs compared to T cells alone on day 4. The percentage of T cells expressing T cell markers decreased in both co-culture groups. While TGF-beta gene expression was decreased, its secretion from both MSCs and Tregs in coculture medium increased and IFN-gamma secretion decreased despite the increase in Tbet cell population. It was observed that miRNA transfection increased T cell proliferation, apoptosis and Treg and T-bet populations in CRCs.

Conclusion: It was concluded that miR-181a transfection regulates the immunosuppressive effects of CCPs through IL-6, STAT-1 and DUSP5 genes and TGF-beta and IFN-gamma cytokines. This study was financially supported by grants (YL A2 31858) Turkish Institutes of Health (TÜSEB).

Keywords: Wharton Jelly, Mesenchymal Stem cell, İmmunosupression, mikcoRNA-181a

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY SAYFASI .....

ETİK BEYAN .....

TEŞEKKÜR..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

ÖZET ..... **i**

ABSTRACT ..... **iii**

İÇİNDEKİLER.....**v**

SİMGE VE KISALTMALAR..... **ix**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **xi**

TABLO LİSTESİ ..... **xiv**

1. GİRİŞ VE AMAÇ.....**1**

2. GENEL BİLGİLER **4**

2.1. İmmun Hastalıkları ve Hücresel Tedavi Yaklaşımı.....4

2.2. Kök Hücreler ve Kaynakları 6

2.2.1. Mezenkimal kök hücreler 6

2.2.2. MKH'lerin rejeneratif potansiyeli 7

2.2.3. MKH tedavisi ile ilgili zorluklar ve kısıtlamalar.....9

2.2.4. Wharton jeli kökenli mezenkimal kök hücreler.....10

2.3. İmmun Sistem ve T Lenfositler 11

2.3.1. T hücresi ve TCR kompleksi.....13

2.3.1.1. T hücresinin gelişimi.....*13*

2.3.1.2. β seleksiyon *13*

2.3.1.3. Pozitif seleksiyon.....*14*

2.3.1.4. CD4+ alt popülasyonu.....*15*

2.3.2. TCR kompleksi.....16

2.3.2.1.T hücre aktivasyonu sinyal yolakları *17*

2.4. miRNA'ların İmmune Sistemindeki Rolü.....19

2.4.1. miRNA'ların biyosentezi ve biyolojik işlevi.....19

2.4.2. miRNA-181a ve periferik T lenfositleri 21

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER 27
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler 27
3.2. Kullanılan Cihazlar 29
3.3. Deney Protokolü 31
3.3.1. Deney grupları 31
3.3.2. Hücrelerin izolasyonu, kültür edilmesi, çoğaltılması ve karakterizasyonu 31
3.3.2.1. iWJ-MKH'lerin izolasyonu ve kültüre edilmesi 31
3.3.2.2. iWJ-MKH'lerin immunofenotipik karakterizasyonu 33
3.3.2.2.1. *iWJ-MKH'lerin immunofentotipik karakterizasyonu* 33
3.3.2.2.2. *iWJ-MKH'lerin immunohistokimyasal karakterizasyon* 34
3.3.2.3. iWJ-MKH'lerin farklılaşma yoluyla karakterizasyonu ..35
3.3.3. T hücre aktivasyonu için PHA-M (mitojen) hazırlanması 37
3.3.4. Pan T hücrelerin izolasyonu ve aktivasyonu 37
3.3.4.1. T hücrelerinin flow sitometrik immunofenotipleme ile karakterizasyonu 38
3.3.4.2. T hücrelerinin flow sitometri ile aktivasyonunun doğrulanması.....38
3.3.4.3. Pan T hücrelerinin aktivasyonunun doğrulanması.....38
3.3.5. iWJ-MKH'lere miR-181a transfeksiyonu ve doğrulanması.....39
3.3.6. iWJ-MKH ve T hücrelerin indirekt birlikte kültüre edilmesi.....40
3.3.7. mir-181a transfekte edilmiş iWJ-MKH ve T hücre birlikte kültürlenmesi.....40
3.3.8. Ko-kültür (birlikte kültür) sonrası analizler 40
3.3.8.1. Ko-kültür sonrası Annexin-PI ile analizi 40
3.3.8.2. Ko-kültür sonrası T hücrelerinin cell cycle analizi.....41

3.3.8.3. Ko-kültür sonrası T hücrelerinin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyon 42

3.3.8.4. Ko-kültür sonrası proliferasyonu analizi.....42

3.3.8.5. Ko-kültür sonrası ELISA analizi 43

3.3.8.6. Ko-kültür sonrası gen ekspresyon analizi.....43

3.3.9. Sitotoksisite analizi.....44

4. BULGULAR 45

4.1. İnsan Wharton Jeli Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin (iWJ-MKH'lerin) İzolasyonu ve Kültürü 45

4.2. iWJ-MKH'lerin İmmunofenotipik Olarak Karakterize Edilmesi.....46

4.2.1. iWJ-MKH'lerin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonu 46

4.2.2. iWJ-MKH'lerin immunofluoresan işaretleme ile immunofenotiplemesi.....47

4.2.3. iWJ-MKH'lerin karakterizasyonu için in vitro farklılaşma analizleri.....47

4.3. Pan T-hücreleri İzolasyonu, Kültürü ve Karakterizasyonu 48

4.3.1. İnsan periferik kanından T hücre izolasyonu ve kültürü 48

4.3.2. T hücrelerinin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonu 50

4.3.2.1. Uyarılmamış T hücrelerin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonu 50

4.3.2.2. Uyarılmış T hücrelerin immunofenotipik karakterizasyonu 50

4.3.2.3. Uyarılmış T hücrelerinin uyarılmasının doğrulanmas ...51

4.3.3. iWJ-MKH'lere mir-181a transfekte edilmesi.....53

4.3.4. Ko-kültür sonrası analizler 55

4.3.4.1. Ko-kültür sonrası Annexin-PI analizi 55

4.3.4.2 .Ko-kültür sonrası cell cycle analizi 56

4.3.4.3. Ko-kültür sonrası T hücrelerinin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyon 58

4.3.4.4. Ko-kültür sonrası proliferasyonu analizi.....64

4.3.4.5. Ko-kültür sonrası ELISA analizi.....65

4.3.4.6. Ko-kültür sonrası qRT-PCR yöntemi gen ekspresyon analizi.....66

5. TARTIŞMA.....76

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 83

7. KAYNAKLAR DİZİNİ.....84

8. EKLER DİZİNİ..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

EK-1.İntihal Raporu

EK-2.Etik Kurul

9.ÖZGEÇMİŞ..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

10.YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI Hata! Yer işareti tanımlanma

SİMGE VE KISALTMALAR

MKH:	:	Mezenkimal kök hücre
Cdna	:	Komplementer dna
DAPİ	:	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMSO	:	Dimetil sülfoksit
EDTA	:	Etilendiamin tetraasetik asit
FBS	:	Fetal sığır serumu
mL veya ml	:	Millilitre
mAB	:	Monoklonal antikor
PBS	:	Fosfat salin tampon
mi-RNA-181a	:	mikrorna-181a
pri-miRNA	:	Primer mikro RNA
pre-miRNA	:	Prekürsör mikro RNA
qRT-PCR	:	Kantitatif real time polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	:	Ribo nükleik asit
RPMI	:	Roswell park memorial institute
TEM	:	Geçirimli elektron mikroskopu
WB	:	Wash buffer
µM	:	Mikromolar
Ml	:	Mikrolitre
mAB	:	Monoklonal antikor

SİMGE VE KISALTMALAR (Devam Ediyor)

PBS	:	Fosfat salin tampon
IF	:	Immunofloresan
miRNA	:	Mikro rna
Nm	:	Nanometre
PI	:	Propidium iyodür

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 4. miRNA'ların biyosentezi. 20

Şekil 4.1. Kültüre alındıktan sonra iWJ-MKH hücrelerinin erken ve ileri pasajlardaki faz-kontrast mikroskop görüntüleri.. 45

Şekil 4.2.3.pasaj'da iWJ-MKH'lerin flow sitometri ile karakterizasyonu. 46

Şekil 4. 3. iWJ-MKH'lerin immunofloresan işaretleme (İF/IHC) ile immunofenotipik karakterizasyonu.. 47

Şekil 4. 4. iWJ-MKH'lerin immunhistokimyasal karakterizasyon deneyleri. 48

Şekil 4. 5. Uyarılmamış T hücrelerinin ve PHA-M ile 24 saat uyarılan T hücrelerinin invert mikroskoptaki analizi. 49

Şekil 4. 6. Pan T hücrelerinin flow sitometri ile karakterizasyonu. 50

Şekil 4. 7. Pan T hücrelerinin flow sitometri ile doğrulanması.. 51

Şekil 4. 8 Aktive edilen pan T hücrelerinin aktivasyonunun doğrulanması.. 52

Şekil 4. 9. Aktive edilen pan T hücrelerinin flow sitometri ile aktivasyonunun doğrulanması. 53

Şekil 4. 10. miR-181a transfeksiyonun qRT-PCR ile doğrulanması.. 54

Şekil 4. 11. qRT-PCR ile doz optimizasyon analizi. 54

Şekil 4. 12. MKH'lerle ve miRNA transfekte MKH'ler ko-kültüre edilmiş T hücrelerin flow sitometri ile AnnexinV-PI analizi.. 55

Şekil 4. 13. MKH'lerle ve miRNA transfekte MKH'ler ko-kültüre edilmiş T hücrelerin AnnexinV-PI ile analizi.. 56

Şekil 4. 14. ko-kültüre edilmiş T hücre hücre siklusu analizlerinin karşılaştırılması.. 57

Şekil 4. 15. miRNA transfekte edilen ve edilmeyen MKH'ler ile ko-kültüre edilmiş T hücrelerin flow sitometrik hücre siklusu analizi.. 58

Şekil 4. 16. 24. saat boyunca MKH'lerle ko-kültüre edilmiş T hücrelerin flow sitometri ile karakterizasyonu.. 59

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam Ediyor)

Şekil 4. 17. 96. saat boyunca MKH'lerle ko-kültüre edilmiş T hücrelerin flow sitometri ile karakterizasyonu.. 59

Şekil 4. 18. 24. saat boyunca ko-kültüre edilmiş T hücrelerin flow sitometri ile karakterizasyonu..... 60

Şekil 4. 19. 96. saat boyunca mir-181a transfekte MKH'lerle ko-kültüre edilmiş T hücrelerin flow sitometri ile karakterizasyonu.. 60

Şekil 4. 20. Ko-kültüre edilmiş T hücrelerin flow sitometri analizlerinin karşılaştırılması. 61

Şekil 4. 21. Ko-kültüre edilmiş Treg ve Th1 hücrelerin flow sitometrik karşılaştırılması.. 61

Şekil 4. 22. Ko-kültüre edilmiş Th1 hücrelerinin flow sitometri analizinin karşılaştırılması.. 62

Şekil 4. 23. Ko-kültüre edilmiş Treg hücrelerinin flow sitometri analizinin karşılaştırılması.. 63

Şekil 4. 24. Ko-kültüre edilmiş Treg hücrelerin 24. ve 96. saat flow sitometri analizinin karşılaştırılması..... 63

Şekil 4. 25. Ko-kültüre edilmiş T hücrelerinin CFSE ile hücre proliferasyonu analizinin karşılaştırılması..... 64

Şekil 4. 26. MKH'lerle ve miRNA transfekte MKH'ler o-kültüre edilmiş T hücrelerinin salgı düzeylerinin karşılaştırılması. 65

Şekil 4. 27. MKH'lerle ve miRNA transfekte MKH'ler ko-kültüre edilmiş T hücrelerin salgı düzeylerinin karşılaştırılması..... 66

Şekil 4. 28. MKH'lerle ve miRNA transfekte MKH'ler ko-kültüre edilmiş T hücrelerin salgı düzeylerinin karşılaştırılması..... 67

Şekil 4. 29. MKH'lerle ve miRNA transfekte MKH'ler ko-kültüre edilmiş T hücrelerin salgı düzeylerinin karşılaştırılması..... 68

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam Ediyor)

Şekil 4. 30. Ko-kültüre edilmiş T hücrelerin salgı düzeylerinin karşılaştırılması. 69

Şekil 4. 31. MKH'lerle ve miRNA transfekte MKH'ler ko-kültüre edilmiş T hücrelerin salgı düzeylerinin karşılaştırılması..... 70

Şekil 4. 32. MKH'lerle ve miRNA transfekte MKH'ler ko-kültüre edilmiş T hücrelerin salgı düzeylerinin karşılaştırılması..... 71

Şekil 4. 33. MKH'lerle ve miRNA transfekte MKH'ler ko-kültüre edilmiş T hücrelerin salgı düzeylerinin karşılaştırılması..... 72

Şekil 4. 34. Ko-kültür edilen T hücrelerinin DUSP5/6 ve TGF-beta gen ekspreyon düzeylerinin karşılaştırılması 73

Şekil 4. 35. Ko-kültür edilen T hücrelerinin STAT-1, IL-6 ve TLR-4 gen ekspreyon düzeylerinin karşılaştırılması. 74

Şekil 4. 36. Ko-kültür edilen T hücrelerinin STAT-1, IL-6 ve TLR-4 gen ekspreyon düzeylerinin karşılaştırılması.. 74

TABLO DİZİNİ

Tablo 2.1. miR-181a hedef genleri..... 22

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İmmünolojik hastalıklarda; proinflamatuar sitokinlerin dolaşımdaki seviyelerindeki ani akut artışından kaynaklanan "sitokin fırtınası" ve yaşadığımız COVID-19 pandemisinde de tecrübe edildiği gibi ölümcüldür. MKH ile yapılan preklinik çalışmalar, MKH'lerin aşırı immun yanıtların tedavisinde klinik faz çalışmaların yapılmasını ve GvHD'nin tedavisinde kullanımının yolunu açmıştır. Sitokin fırtınası: ciddi sorunlara neden olabilen abartılı bir bağışıklık tepkileri dizisidir. Bağışıklık sistemi, enfeksiyonlarla savaşmanıza yardımcı olan birçok farklı bileşen içerir. Sitokinler olarak bilinen sinyal molekülleri aracılığıyla birbirleriyle iletişim kuran birçok farklı hücre türünü içerir. Bilim adamları, sitokin fırtınasının başlamasına neden olabilecek karmaşık nedenler ağını anlamak için hala çalışıyorlar. Birkaç farklı altta yatan sağlık sorunundan kaynaklanabilir; genetik sendromlar (örneğin ailesel hemofagositik lenfohistiyositoz (HLH) (Sieni., vd 2014), enfeksiyon bazı enfeksiyon türleri; influenza A virüsü (D'Elia vd., 2013), otoimmün hastalıklar (Still hastalığında, sistemik jüvenil idiyopatik artritte (JIA) ve lupusta) ortaya çıkabilir. Sitokin fırtınası bazen belirli tıbbi tedavilerin bir yan etkisi de olabilir. Örneğin, bazen CAR-T tedavisi (kimerik antijen reseptörü T hücreleri) olarak bilinen bir lösemi tedavisinden sonra ortaya çıkmıştır. Diğer immünoterapi türleri de bazen yan etki olarak sitokin fırtınasına neden olmuştur (Schulert vd., 2015). Diğer nedenler: Sitokin fırtınası, bir organ veya kök hücre nakli aldıktan sonra olduğu gibi diğer tıbbi durumlarda da ortaya çıkabilir. AIDS gibi bağışıklık sistemini etkileyen koşullar gibi bazı kanser türleri de sitokin fırtınası sendromuna neden olabilir (Wang vd., 2017).

MKH'lerin in vivo bağışık baskılayıcı etkileri, ilk kez maymunlarda gösterilmiştir (Bartholomew vd., 2002). Ardından klinik denemeler başlamış örneğin bir çalışmada MKH'ler HLA özdeş (identikal) hematopoietik kök hücrelerle birlikte nakledildiklerinde akut ve kronik GVHD'nin (graft versus host disease) azaldığı gözlenmiştir (Tyndall, 2007). Lee ve ark. (Lee vd., 2002), standart bağışık baskılayıcı tedavi ile birlikte HLA-haploidentikal babasından MKH ve periferik kan kök hücre nakli alan akut lösemi hastasında, hızlı bir engrafman olduğunu ve nakilden sonra 31 aya kadar hiçbir akut veya kronik GVHD olmaksızın yaşadığını rapor etmiştir. Benzer olarak, akut lenfositik lösemi (ALL) nedeniyle allojenik hematopoetik kök hücre (HKH) nakli sonrası bağırsak,

deri ve karaciğerdeki tedaviye dirençli GVHD'li 9 yaşındaki erkek çocuğa haploidentikal MKH'ler kullanılmıştır. Annesinden yapılan nakil sonrası çocuğun GVHD bulguları ve ilişkili klinik patoloji bulguları iyileşmiştir (Le vd., 2004). Son olarak, yakın zamanda yayımlanan iki ayrı raporda MKH'lerin GVHD'nin tedavisi ve/veya önlenmesinde oldukça olumlu sonuçları bildirilmiştir (Ball vd., 2007; Fang vd., 2007). Fang ve ark'nın (Fang vd., 2007) yaptıkları bir çalışmada, 15 yaşında akut miyeloid lösemi (AML) ve 12 yaşında akut lenfoblastik lösemi (ALL) hastası iki çocukta kan transfüzyonu sonrası şiddetli akut GVHD gelişmiş ve ilaç tedavisinde yanıt alınamamıştır.

MikroRNAlar veya miRNAlar, gen ekspresyonunu post-transkripsiyonel olarak kontrol eden 19-25 nükleotid uzunluğunda kısa moleküllerdir. mRNA'ların 3-translasyona uğramayan bölgeleriyle (UTR untransled region) baz eşleşmesi yapıp; yıkımını sağlar veya translasyona uğramalarını engellerler (Anfossi vd., 2018). Gen ekspresyonunu düzenleyerek miRNA'lar, proliferasyon, apoptoz, farklılaşma, göç ve ilaç direnci gibi çeşitli önemli biyolojik işlevleri düzenlerler. miRNA-181, miRNA-181a, miRNA-181b, miRNA-181c ve miRNA-181d'yi içeren miRNA-181 ailesine aittir (Yingxue vd., 2019). Olgun T hücrelerinde artan miRNA-181a ekspresyonunun peptit antijenlerine duyarlılığını arttırdığını, olgunlaşmamış T hücrelerinde miRNA-181a ekspresyonunu inhibe etmenin duyarlılığı azalttığını ve hem pozitif hem de negatif seçimi bozduğunu gözlemlemişler (Qi-JingLi vd., 2007).

Yaptığımız veritabanı taramalarında önerilen projenin konusuna benzeyen yalnızca Liu ve ark.'nın çalışmasına rastlayabildik. Bu çalışmada pre- miRNA-181a transfekte edildikten sonra MKH'lerin cevabı kısa süreli bir ko-kültür ile analiz edilmiş ve bir kolit hayvan in vivo modelinde kullanılmış ancak miRNA-181a transfeksiyonunun etkileri yeterince analiz edilerek değerlendirilmemiştir. Temel olarak bu çalışmada pre- miRNA-181a'nın hedef geni olarak farklı genler analiz edilerek MKH'ler üzerindeki endojen düzenleyici rolü analiz edilmiştir. 2012 yılında yapılan bu çalışmada henüz miRNA-181a'nın daha az sayıda hedef genleri bilindiği için günümüzde bilinen hedef gen ya da sinyal yolakları analiz edilmemiştir. Bu sayede özgün bir yaklaşım ile önerilen projede immun hastalıkların tedavisinde kullanılacak MKH`lerin immunsupressif etkinliğinin modifikasyonuna yönelik olarak ilk kez matür miRNA-181a-5p mimiğinin

kullanıldığı ve dolayısıyla T hücrelerinin duyarlılığını arttırmak üzere CD4 geninin hedeflendiği bir gen terapisi protokolünün kanıtlarının sunulması hedeflenmiştir. Bu amaç doğrultusunda insan göbek kordonu insan Whaton jeli kökenli mezenkimal kök hücrelerin (iWJ-MKH) izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Periferik kandan izole edilmiş, T lenfositlerin karakterizasyon gerçekleştirilmiş ve daha iyi bir *in vivo* ortamı taklit edebilmek için PHA-M mitojeni ile aktive edilerek kültürlenmiştir. iWJ-MKH'lerin immunomodulatuvar etkisini arttırmak amacıyla miRNA-181 ailesinden olan miRNA-181a transfekte edilmiştir. iWJ-MKH ve T lenfosit etkileşimini in vitro olarak belirlemek için ko-kültürü (birlikte kültür) yapılmıştır. Ko-kültür sonrası kültüre edilmiş T hücrelerinin ve birlikte kültüre edilmiş T lenfositlerinin salgıladıkları sitokin, apoptoz, hücre döngüsü siklusu, yüzey belirteçleri açısından karşılaştırılarak miRNA-181a'nın T lenfosit üzerinde immunomodulatuvar etkisi olup olmadığı araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.İmmun Hastalıkları ve Hücresel Tedavi Yaklaşımı

İmmun hastalıkları veya bozukluğu immun cevabın azalması nedeniyle ortaya çıkan bazı hastalıkları: İmmun yetmezliği, alerji, bazı kanser türleri ve otoimmun hastalıkları içerir (Pac vd., 2016).

İmmun yetmezliği kompleman sistem, fagositler ve lenfositlerde oluşan kusurlar veya yokluğundan kaynaklanmaktadır (Notarangelo vd., 2009). İmmun yetmezliği birincil veya ikincil olarak sınıflandırılmaktadır. Birincil bağışıklık yetmezliğine, T hücresi, B hücresi, hem T hücresi hem de B hücresi eksikliğine, kompleman, fagosit ve immünoglobulin A eksikliği neden olmaktadır. T hücre yetmezliğine bağlı olarak DiGeorge sendromu, kronik mukokutanöz kandidiyaz, hiper-immünoglobulin M sendromu ve interlökin-12 reseptör; B lenfosit eksikliği nedeniyle Bruton agammaglobulinemi hem t hem de b lenfositlerinin eksikliği durumunda Wiskott-Aldrich sendromu ve Major Histo-uyumluluk Kompleksi eksikliği yaranmaktadır. Kompleman eksikliğine yol açan primer immün yetmezlikler arasında kalıtsal anjiyoödem, C3 eksikliği, membran atak kompleksi eksikliği ve fagosit eksikliğine kronik granülomatöz hastalık ve lökosit adezyon eksikliği sendromu neden olur. Bağışıklık yetersizliğinin ikincil nedenleri arasında AIDS'e neden olan HIV gibi bir sıra viral enfeksiyonlar, steroidler, besin eksikliği ve obezite yer alır.

Batı ülkeleri başta olmak üzere son 50 yılın global problemi haline gelmiş alerjik hastalıklar arasında özellike egzama (atopik dermatit), besin alerjileri ve astımın görülme sıklığı çarpıcı biçimde artmıştır. Alerjik hastalıklar kronik hastalıkların en yaygın nedenlerinden biridir. Alerjik hastalıklar yardımcı T hücrelerinin (Th2) çevresel ve besin antijenlerine verdiği yetersiz immun tepkime olarak tanımlanır. Th2'in aktivasyonu IL-4, IL-5, IL-13 interlökinlerinin salgılanmasınna ve özellikle de alerjenlere karşın IgE'nin üretimine neden olur. Alerjik fenotipin korunmasına yardımcı olan interferon (IFN)-γ yoluyla Th1 aktivitesinin inhibe edilmesi, Th2 sitokin yanıtlarının indüksiyonu sağlayan Th1/Th2 dengesinin stabilitesi, GATA-3 (Th2) ve T-bet (Th1) transkripsiyon faktörleri tarafından yönetilir (Eslami vd., 2020).

Dünya sağlık örgütünün kanser araştırmaları ajansının tüm kanser türlerini içeren GLOBACAN veritabanı sonuçlarına göre 2018 yılında dünya çapında en sık teşhis edilen 15 kanser türünden biri olan ve mortalite açısından 11. sırada yer alan lösemi hematopoezis sürecinde oluşan karşılıklı kromozomal translokasyonlar, kromozomal silmeler, mutasyonlar gibi genetik hasarlar ve aynı zamanda epigenetik değişiklikler nedeniyle hücrelerin kontrol dışı çoğalması ile görülen immun bozukluğudur (Jordan vd., 2020).

İmmun sistemi, patojenlere ve kanser hücrelerine saldirmak ile vücuda zarar gelmesini önlemek arasında sürekli bir denge kurmalıdır. Bu dengenin bozulması durumunda yaranan bozukluklar, bağışıklık sisteminin kendi dokularına saldırdığı otoimmün hastalıklara neden olabilir. Genellikle çoğu araştırma edinsel bağışıklığın rolüne odaklanmış olsa da, otoimmün hastalıkların gelişiminde hem doğuştan gelen hem de edinsel bağışıklığın rol oynadığı görülmektedir (Zhernakova vd., 2009).

Otoimmün hastalıkların görülme sıklığı dünya çapında artmaya devam etmektedir (Brauer vd., 2016). Otoimmun hastalıklara yönelik yapılan araştırmaların hedefi daha efektli tedavi yöntemi geliştirmektir. Uygulanan tedavi yöntemleri hastalığın semptomlarını hafifletse bile spesifik değildir ve uzun süre etki etmemektedir. Genellikle otoimmünitenin kesin bir patogenezi bilinmemektedir ama romatid artrit (RA) gibi bazı hastalıkları destekleyen genetik polimorfizmler, antijen sunumu, sitokin düzeylerindeki dengesizlik ve lenfosit aktivasyonunun düzenlenmesinin anahtar rol oynadığını göstermektedir (Chijioke vd., 2018).

Günümüzde otoimmun hastalıkların tedavisinde hormon replasmanı ve anti-inflammatuar tedaviler gibi semptomik ve fonksiyonel müdahalelerle birlikte immunsupressif ilaçlar da kullanılmaktadır. Otoimmun hastalıkların tedavisinde kullanılan mevcut ilaçlar arasında Siklosporin (sitokin gen transkripsiyon inhibitörü) gibi immün baskılayıcı ilaçlar, Azatioprin (pürin sentezi inhibitörü) gibi anti-metabolit ilaçlar ve Belimumab (B hücresine karşı insan monoklonal antikoru aktive edici faktör) gibi biyolojik ilaçlar yer alır. Otoimmun hastalıkları tedavi etmek amacıyla geliştirilen başka bir yaklaşım yolu olan hücresel terapinin, daha az toksik olduğu ve bağışıklık toleransının yeniden sağlanmasına yardımcı olmayı hedefleyebileceği varsayılmaktadır (Ferreira vd., 2019). Otoimmun

hastalıkların tedavisi üzerine yapılmış çeşitli hücre bazlı tedavi yaklaşımları sonucu Breg ve Treg hücreleri, düzenleyici dendritik hücreler (DC'ler), mezenkimal kök hücreler, monositler ve makrofajlar dahil olmak üzere çeşitli bağışıklık hücrelerinin, otoimmun hastalıklarda iltihaplanma ve semptomları hafiflettiği gösterilmiştir (Farbod vd., 2022).

Bağışıklık hastalıkları için MSCT'nin ilk klinik raporu, 2004 yılında lösemi hastası bir çoçuğa allojenik hematopoietik kök hücre nakli (HSCT) sonrası steroide dirençli ciddi akut graft-vers-host hastalığı (GVHD) oluşumuna karşın yapılan araştırmalara aittir (Le vd., 2004).

İmmün ve inflamatuar hastalıklar için mezenkimal kök hücre tedavisi (MSCT) popüler olmaya devam etmekte ve immunsupresant ilaçlara göre daha az toksik olması nedeniyle klinik endikasyonların daha da genişlemesine yol açmaktadır (Li vd., 2021).

2.2. Kök Hücreler ve Kaynakları

Kök hücreler, asimetrik olarak bölünen, farklılaşabilen ve kendi-kendini yenileyen hücrelerdir. Kök hücrelerin sınıflandırılması kaynağına veya farklılaşma potensiyeline bağlı olarak değişmektedir. Potensine göre kök hücreler: tüm hücre türlerine farklılaşabilen totipotent, her üç germ tabakasına farklılaşabilen pluripotent ve bu hücrelerden daha az farklılaşabilen ve kendi-kendini yenileme kapasitesine sahip multipotent, birkaç hücre türüne farklılaşabilen örneğin T ve B hücrelerine farklılaşabilen oligo veya unipotent kök hücreler.

Kaynağına göre embriyonik ve yetişkin kökenli olan stromal hücrelerden totipotent hücreler zigot, pluripotent hücreler embriyonik ve bu hücrelerin farklılaşmasıyla her 3 germ tabakasını oluşturan multipotent hücreler (Aleksandra vd., 2019).

2.2.1. Mezenkimal kök hücreler

Mezenkimal kök hücreler (MKH'ler) ilk olarak 1991 yılında Arnold Caplan tarafından resmi olarak mezenkimal kök hücreler olarak tanımlanmıştır (Caplan AI 1991). Ancak o zamandan bu yana mezenkimal stromal hücreler, tıbbi sinyal hücreleri, ilik stromal hücreleri, mezodermal kök hücreler ve multipotent stromal hücreler önerileri ile tartışılmaya devam edilmiştir. Ortak olan ise MKH'lerin

kısaltılmış halidir. Şu anda MKH'ler olarak adlandırdığımız şey aslında Friedenstein ve meslektaşları tarafından 1968 gibi erken bir tarihte tanımlanmıştır (Friedenstein AJ vd., 1968), ancak 2008 yılında Uluslararası Hücresel Terapi Derneği (ISCT) tarafından yayınlanan tanıtım metnine kadar sınıflandırıldıkları kriterler; plastik yüzeye yapışma (adherent), hematopoetik hücrelerinden farklı olarak CD73, CD90 ve CD105 gibi spesifik yüzey belirteçlerinin ekspresyonu ve CD34, CD45, CD11b veya CD14, CD79a veya CD19 ve HLA-DR belirteçlerinin yokluğu, her üç germ tabakasına; adiposit, osteoblast ve kondrosit farklılaşma potensiyaline sahip olan hücreler olarak tanımlanmıştır.

Günümüzde MKH olarak adlandırdığımız hücreler ilk kez 1960'ların sonlarında kemik iliğinde tanımlanmış olsa da (Friedenstein vd., 1968), aslında hem yetişkin hem de fetüs kaynaklı bir çok dokuda; yağ dokusunun stromal vasküler fraksiyonundan (YVF) elde edilen adipoz kaynaklı MKH'ler (Tsuji vd., 2014), göbek kordonu kanı (umblikal kord), plasenta kaynaklı MKH'ler, göbek kordonunu çevreleyen bağ dokusu Wharton's jeli kaynaklı MKH'ler hem araştırmalarda hem de tedavide en çok kullanılan MKH kaynağı olmaya devam etmektedir.

2.2.2. MKH'lerin rejeneratif potansiyeli

Başlangıçta MKH'lerin hemapoetik hücreler için yalnızca destekleyici bir rol oynadığına inanılıyordu (Majumdar vd., 1998). Ancak daha sonra çok çeşitli patolojik durumlarda işlev bozukluğu varlığında faydalı koruyucu, rejeneratif ve immünomodülatör etkiler gösterdikleri keşfedilmiştir. Kardiyovasküler, bağışıklık ve enfeksiyon, dermatolojik ve yara iyileşmesi, kas-iskelet sistemi ve nörolojik gibi çok çeşitli sistemleri ve süreçleri etkileyen koşullarda kullanımları için klinik çalışmalar halen devam etmektedir (Harrell vd.,2019; Jovic vd., 2022). Yukarıda listelenen ve bir hücreyi hücre olarak tanımlamak için kriter olarak kullanılan özelliklerin dışında MKH'ler, doğrudan hücre tedavisi olarak ya da hücre ürünleri tarafından aktive edilen yollar hakkında öğrenilen bilgilerden yararlanarak terapötik faydalar sunmak için ideal bir konuma sahip olmalarını sağlayan çeşitli özelliklere sahiptir.

İlk olarak, MKH'ler transport veya yaralanma bölgesine doğru göç etme ve yerleşme kapasitesine sahiptir (Yagi vd.,2010). İn vivo MKH'lerin nişlerini terk

edip hasar alanlarına ulaşmak için kan dolaşımına girebildiğine dair kanıtlar vardır (Seppanen vd., 2013) ve sistemik olarak verildiğinde dışsal olarak uygulanan hücrelerin çoğu bir hasar bölgesine lokalize olacaktır.

İkinci bir önemli özellikleri de çok fonksiyonlu olmalarıdır. MKH'lerin karakteristiği olarak kullanılan (adiposit, osteoblast ve kondrosit) yönünde değil, aynı zamanda kardiyomiyositler (Szaraz vd., 2017), tenositler (Wang vd., 2005) ve hematopoezleri destekleyen stromal hücreler (Zhao vd., 2016) gibi çeşitli hücre tiplerine, özellikle de mezenkimal soydan olanlara farklılaşabilirler. İn vitro ortamda, belirli koşullar altında, nöral hücreler (George vd., 2019) ve keratinositler (Dos Santos vd. 2019) dahil olmak üzere endodermal soy hücrelerine ve hepatositler ve pankreatik beta hücreleri (Chen vd., 2004) dahil olmak üzere endodermal soy hücrelerine farklılaşma yeteneği de göstermişlerdir.

Aslında, kanıtlar, uygulamayı takiben, uzun vadeli hücre naklinin son derece sınırlı olduğunu göstermektedir (Toh vd., 2018; Park vd., 2015), bu da MKH tedavisinde gözlemlenen kalıcı ve onarıcı etkilere öncelikle parakrin yoluyla aracılık edilmesi olasılığını artırmaktadır (Kinnaird vd., 2004). MKH'ler hem hücre dışı veziküllere (EV) bağlı hem de kapsüllenmemiş; proteinler, özellikle sitokinler, kemokinler ve trofik faktörlerin yanı sıra mRNA'lar ve miRNA'lar gibi nükleik asit ürünlere sahiptir (Munoz-Perez vd., 2021).

MKH'lerin salgıladığı faktörlerin aracılık ettiği en sık kullanılan mekanizmalardan biri immünomodülatör işlevdir. MKH'ler inflamasyon ve immün aktivasyon üzerinde bağlama bağlı etkiler gösterebilir ve immun aktivitenin hem aktivasyonuna hem de baskılanmasına aracılık ettikleri gösterilmiştir (Augello vd., 2007, Ho vd., 2015). T-hücresi aktivasyonunu ve proliferasyonunu baskıladıkları, inflamatuar sitokin ekspresyonunu modüle ettikleri ve otoimmün yanıtları hafiflettikleri gösterilmiştir (Augello vd., 2007, Lopez-Santalla vd., 2015). Ayrıca, akciğerler, böbrekler hasarında ve sepsis sırasında immünosupresif etki gösterdikleri belirlenmiştir (Ho vd., 2015; Parekkadan vd., 2007).

Ayrıca MKH'lerin, nörolojik hastalıkları daha iyi anlamak için oluşturulmuş modellerden biri olan ve beyin felci veya inme olarakta bilinen hastalık modeli üzerinde yapılan pre-klinik araştırma sırasında anti-enflamatuar özellikler de

göstermişlerdir (Feng vd., 2020). Buna karşılık, MKH'lerdeki toll benzeri reseptör (toll-like receptor) aktivasyonu pro-inflamatuar bir fenotiple ilişkilidir (Duffy vd., 2011; Romieu-Mourez vd., 2009).

2.2.3. MKH tedavisi ile ilgili zorluklar ve kısıtlamalar

Genel olarak MKH'lere özgü uyarılar vardır ve bazıları daha spesifik olarak hücre terapisi olarak doğrudan uygulama konseptine atfedilebilir. İlk olarak, MKH'lerin sahip olduğu özellik ve etki gücündeki yüksek derecedeki değişkenlik, donörün sağlık durumu, cinsiyeti, yaş ve genetik özelliklerine bağlıdır (Zhou vd., 2021). Aynı zamanda aynı donörden defalarca kez izole edilmiş MKH'lerde de değişkenlik olduğuna dair raporlar bulunmaktadır (Mastrolia vd., 2019). Bu değişkenlik kendisini sadece donör ve alıcı arasında değil aynı ortmada kültürlenmiş MKH'ler arasında da göstermektedir (Mabuchi vd., 2021). Bu heterojenlik hücrelerin klonal proliferasyonunda da gözlenmiştir (Costa vd., 2021). Bu terapötik ürünlerin eldesini zorlaştırmaktadır. Bu duruma karşın allojenik hücreler kullanılabilir. Otolog (tedaviyi alan kişinin kendi hücreleri) veya allojenik (farklı bir donörden) arasındaki seçim çeşitli faktörlere bağlıdır (Li vd., 2021). Otolog MKH'lerin avantajı donörün kendi hücreleri olduğu için immun red riskini ortadan kaldırmasıdır. Bu durum özelliklede hassas veya hiperreaktif immun sistemine sahip kişiler için önemlidir (Petrus-Reurer vd., 2021). Buna rağmen donör için bu hücrelerin izolasyonu, kültürlenmesi, çoğaltılması zaman talep eden ve pahalı bir süreçtir (Mastrolia vd., 2019). Ayrıca, belirli hastalıkları olan kişilerde (genetik bozukluklar veya ileri yaş gibi), otolog MKH'lerin kendileri de işlevsellikleri veya rejeneratif kapasiteleri açısından risk altında olabilir (Kapetanos vd., 2021; Samsonra vd., 2021).

Diğer yandan allojenik MKH'ler sağlıklı donörlerden elde edilebilir ve gerekli olduğu durumlarda kullanılabilecek 'hazır ürün' şeklinde çoğaltılabilir (Lynggaard vd., 2022). Bu tedavi sürecini ve tedavi maliyetini düşürmektedir. Genel olarak düşük immunojeniteye sahip, yani güçlü bir immun yanıta neden olmadıkları için MKH'ler tedavi amaçlı uygulanabilir (Ryan vd., 2005). Ama allojenik nakil zamanı özellikle tekrarlanan uygalama zamanı donor için immun yanıt potansiyel risk oluşturmaktadır (Nauta vd., 2006). Ayrıca, allojenik MKH'lerin uzun süreli nakli kısıtlı olabilir (Ankrum vd., 2010) ve teorik olarak istenmeyen hücresel dönüşüm veya hastalık bulaşma riski taşıyabilir, ancak bu

risklerin mevcut kalite kontrol standartları ile genellikle düşük olduğu düşünülmektedir (Baranovskii vd., 2022).

2.2.4. Wharton jeli kökenli mezenkimal kök hücreler

Multipotent kök hücreler olarak adlandırılan kök hücreler, pluripotent kök hücrelere göre daha sınırlı bir plastisiteye sahip olup ve yalnızca belirli bir hücre tipi aralığına farklılaşabilir. Mezodermal ektodermal ve endodermal yönde farklılaşabilen bu kök hücreler yetişkinlerde akciğer, kas, yağ dokusu, kemik iliği, deri ve hatta beyin dahil hemen hemen tüm dokularda bulmaktadır. Multipotent kök hücrelerden biri olan mezenkimal Uluslararası Hücresel Terapi Derneğinin önerdiği kılavuza göre bir hücrenin mezenkimal kök hücre (MKH) olarak tanımlanması için hematopoietik belirteçlerden olan CD34 ve CD45 gibi hücre yüzeyi moleküllerinin negatif CD73, CD90 ve CD105 gibi yüzey belirteçlerinin pozitif olması, düşük seviyelerde MHC sınıf I ve kostimülatör CD40, CD80 ve CD86'yı eksprese etmesi, MHC sınıf II moleküllerinin ekspresyonundan yoksun olması, plastik yüzeye yapışma (adherent), mezodermal kökenli adiposit, osteoblast ve kondrosit yönünde farklılaşabilen ve spesifik immunomodulatuvar özellikler sergileyen kök hücre grubudur.

Embriyo kökenli bu multipotent MKH'ler amniyotik sıvı, plasenta, göbek kordonu, göbek kordonu kanında bulunmaktadır (Margit vd., 2023).

iWJ-MKH'ler, immün baskılama ve immun düzenleme yeteneklerine göre diğer MKH'lerden farklılık gösterirler. Kemik iliğinden (Kİ-MKH'ler) izole edilen MKH'lerden farklı olarak iWJ- MKH'ler İnterlökin (IL)-10, dönüştürücü büyüme faktörü-β (TGF-β) ve MKH'lerin immünosüpresif kapasitesinin önemli belirteçlerinden olan interlökin-6 (IL-6) ve vasküler endotelyal büyüme faktörünü (VEGF) eksprese ederler. Ek olarak T lenfositler, çok düşük insan lökosit antijeni (HLA) sınıf I ekspresyonu sergiler ve HLA-DR'den yoksundurlar. Ek olarak, alloantijenlere karşı efektör yanıtlarının baskılayan T hücrelerinin (Treg) indükler. iWJ-MKH'lerin T hücreler üzerinde immun düzenleme kapasitesi salgıladıkları hepatosit büyüme faktörü (HGF), prostaglandin E2 (PGE2), TGF-β1 ve indoleamin 2 3-dioksijenaz (IDO)'ya bağlıdır (Luigi vd., 2019). Nicola ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada insan kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin (iKİ-MKH) ve iWJ-MKH'lerin in vitro olarak bir mitojenle aktive edilmiş T hücreler

üzerindeki etkisi karşılaştırılıldığında, iWJ-MKH'lerin T hücre proliferasyonunun iKİ-MKH'lere göre daha fazla baskıladığını gözlediler. Fernanda Vieira Paladino vd., yapmış olduğu çalışmada ise IFN-y ile priming sonucu Treg hücrelerini de indükleyebildiğini gösterdiler (Fernanda vd., 2019).

2.3.İmmun Sistem ve T Lenfositler

Bağışıklık sistemi ciltte, dokularda ve kan gibi vücut sıvılarında bulunan mikroplarla ve yabancı maddelerle savaşır. Bağışıklık sistemi iki bölümden oluşur: Doğuştan gelen (genel) bağışıklık sistemi ve edinsel (özelleşmiş) bağışıklık sistemi.

Doğuştan gelen bağışıklığın dört tip savunma bariyerinden oluştuğu düşünülebilir: anatomik (deri ve mukoza), fizyolojik (sıcaklık, düşük pH ve kimyasal aracılar), endositik ve fagositik ve inflamatuar. Doğuştan gelen bağışıklık patojenlere karşı, sınırlı sayıdaki bağışıklık hücrelerinin, patojenle ilişkili moleküler modeller (PİMM'ler) olarak bilinen, ortak yapıları paylaşan çok çeşitli patojenleri tespit etmesine ve bunlara hızlı bir şekilde yanıt vermesine izin veren model tanıma reseptörlerine (PRR'ler) dayanır. Bunların örnekleri arasında viral enfeksiyon sırasında üretilen çift sarmallı ribonükleik asit (RNA) ve lipopolisakkaritler (LPS) gibi bakteriyel hücre duvarı bileşenleri bulunur. Bu bağışıklık sisteminin en önemli işlevi sitokin ve kemokin üretimi yoluyla immun hücrelerinin inflamasyon veya enfeksiyon olan bölgelere toplanmasını sağlamasıdır. Bakteriyel enfeksiyon sırasında erken yanıt olarak salınan temel inflamatuar sitokinler şunlardır: tümör nekroz faktörü (TNF), interlökin 1 (IL-1) ve interlökin 6 (IL-6). Bu sitokinler, patojenlerin uzaklaştırılması için hücrelerin toplanmasını ve lokal inflamasyonu başlatmak için kritik bir öneme sahiptir. Fagositler (makrofajlar ve nötrofiller), dendritik hücreler, mast hücreleri, bazofiller, eozinofiller, doğal öldürücü (NK) hücreler ve doğuştan gelen lenfoid hücreler gibi çok sayıda hücre, doğuştan gelen bağışıklık tepkisinde rol oynar. Nötrofiller bakteri ve mantar patojenlerin yok edilmesine yardımcı olan granüller ve enzimleri içerir. Uzun ömürlü makrofajlar gibi dentritik hücrelerde T hücreleri için antijen sunarak patojenlerin ölümüne yol açar. Doğuştan gelen ve adaptif immun sistemi arasında haber verici görevi taşır. Mast hücreleri ve bazofiller her ikisi de astım ve alerjik hastalıklarda görüldüğü gibi akut inflamatuar yanıtların başlatılmasında etkilidir. Aynı zamanda "nöbetçi hücreler" olarakta bilinen Mast

hücreleri enfeksiyon veya yaralanmalara yanıt olarak erken sitokin üreticileridir. Eozinofiller, fagositik özelliklere sahip granülositlerdir ve genellikle çeşitli alerjik dokularin ve parazitlerin fagositoz yoluyla yok edilmesinde önemli bir rol oynar. IFN-γ sitokinin en önemli kaynağı olarak bilinen doğal öldürücü hücreler virüsle enfekte olmuş hücreleri ve kanser hücrelerini salgıladıkları perforin ve granzimler yoluyla öldürmektedir (Jean S. Marshall vd., 2018). İnnate lenfoid hücreler (ILH'ler) hücresel stress sırasında hızlı bir şekilde çeşitli mediatörler sagılayarak yanıt veren, genellikle mukozal ve bariyer yüzeylerinde ikamet eden hücrelerdir. Hücre içi ve hücre dışı patojenlerin, helmintlerin yanı sıra kronik inflamatuvar ve otoimmün hastalıklarında CD4+TH1, Th2, ve Th17 hücreleri gibi sitokin indükleme özelliği olan ILC'lerin ILC1, ILC2, ve ILC3 üç sınıfları bilinmektedir (Keith vd., 2019).

Adaptif bağışıklık sistemi doğuştan gelen bağışıklık sitemi ile desteklenir ve patojenlerin ortadan kaldırılmasında doğuştan gelen bağışıklık sistemi yetersiz kaldığı durumlarda kritik öneme sahiptir. Edinsel bağışıklık sisteminin hücreleri timusta olgunlaşan antijene özgü T hücreleri ve antikor üreten kemik iliğinde oluşan B hücrelerini içerir. Primer lemfoid organlar olan timus ve kemik iliğinde oluşumunu tamamlayan T ve B hücreleri ikincil lemfoid organlardan olan lenf nodülleri ve dalağa geçerek dolaşımdaki antijenleri yakalarlar. İmmun tepki, homeostasis ve hastalıklara karşı bellek oluşumu ve onarımı T hücrelerine bağlıdır. T hücreleri, patojen, tümör ve çevreden gelen çeşitli antijenleri tanıma ve aynı zamanda immunolojik hafızayı ve kendi kendine toleransı koruma potansiyeline sahip bir reseptörü eksprese eder. T lenfositleri olgunlaşma, seçilim ve daha sonra dolaşıma geçmek için timusa göç eden bu progenitor hücrelerin timusda gelişmesi, progenitörlerdeki trombosit selektin glikoprotein 1'in timik epitel üzerindeki yapışma molekülü P-selektin ile etkileşimi ile desteklenir. Timusda CD4+ ve CD8+ koreseptör ekspresyonu olmayan kemik iliğinden gelen progenitörler, CD4+CD8+ çift pozitif (DP double positive) timositleri oluşturmak için T hücresi reseptörü (TCR) yeniden düzenlemesine tabi tutulur. Bu yeniden düzenleme sürecinde kendi peptit MHC kompleksleri için yüksek afiniteye sahip TCR taşıyan timositler apoptoza (negatif seçim) maruz kalırken, düşük afiniteye sahip THR taşıyanlar hayatta kalır ve olgun T hücrelerine farklılaşır (pozitif seçim). Yeniden düzenlenmeye tabi tutulmuş DP hücreler dolaşımda naiv T

hücresi CD45RA+CCR7+ fenotipini sergileyen CD4+ veya CD8+ hücrelerine dönüşürler. Yeni gelişmiş Treg CD4+CD25+ olarakta bilinen hücreler Foxp3 transkripsiyon faktörü eksprese etmektedir.

2.3.1. T hücresi ve TCR kompleksi

2.3.1.1. T hücresinin gelişimi

Bir savunma mekanizması olarak, immune sisteminin etkinliği, yabancı veya vücuta özgü olup olmamasından bağımsız olarak antijenleri ayırt etme yeteneğine bağlıdır. Bu işlev immun cevabın temel taşı olan timosit veya T lenfosit tarafından gerçekleştirilir. Timus mikro ortamı, stromal hücre türlerinden olan kortikal ve medüller epitel hücreleri, makrofajlar, dendritik hücreler ve mezenkimal fibroblastlardan oluşan karmaşık bir ağdır. Tüm bu hücreler T hücrelerinin gelişim, eliminasyon ve farklılaşmasında önemli rol oynar (Manley vd., 2003). Fetal karaciğer ve kemik iliği kökenli progenitorlerinden kaynaklanan T hücreleri gelişimlerini tamamlamak için timusun dış katmanından korteks ve medullaya doğru göç eder (Francisco vd., 2010). T hücre farklılaşması β seleksiyon, negative ve pozitif seleksiyon denilen üç kontrol noktası tarafından yönetilir.

2.3.1.2. β seleksiyon

Timik kök hücreler embriyonik gelişim aşamasında farklı hematopoetik bölgelerden kaynaklanır. Hematopoezis embriyonik gelişimde fetal karaciğer yetişkin bireylerde kemik iliğinde gerçekleşmektedir. İlk T hücre soyu timusta Lin' ckit+ IL7R+ CD41o olarak bilinmektedir (Ashton-Rickardt vd., 1994). Bu hücreler timusa geçerken CD4 ekspresyonunu durdurarak CD44 eksprese etmeye başlar ve CD4 ve CD8 eksprese etmeyen çift negative (DN) pro-timositler olarak anılır (H vd., 1993). Timositler CD44 ve CD25 ekspresyonuna bağlı alt bölümleri oluşturur. En büyük olgunlaşmamış hücre populasyonu CD44+CD25- (DN1)'dir. DN1 pro-timositleri CD44+CD25+ (DN2) pro-T hücrelerine dönüşür. IL-17 regülasyonu ile CD44 downregülasyonu ve TCR β, γ ve δ zincir genlerinin yeniden düzenlenmesi yoluyla pre-T lenfositler CD44-CD25+ (DN3) farklılaşması başlar. Bu rearranjman sonucu γδ TCR taşıyan T hücrelerin oluşumunu tamamlamak için timusu terk ederek lenf nodüllerine göç eder. αβ TCR taşıyan T lenfositler en yaygın olarak görülen CD4+ veya CD8+ T

hücreleridir. Rekombinaz aktive edici genler (RAG) RAG1 ve RAG2 proteinleri TCR rearranjmanı ve β zincir transkripsiyonunda önemli rola sahiptir ve yaklaşık 30 değişken (V), 2 sabit (C), 10 gen birleşim (J), 2 farklılık geni (D) ifade eden (VDJC) bölümlerinden oluşmaktadır. α zinciri D bölümünden yoksun olan küçük zincirdir.18 TCR α zincirinin rearranjmanı pre-T hücre (pTα) CD44-CD25- (DN4) T hücre gelişiminin ilk önemli kontrol noktasıdır. pTα-hücreleri rearranjman β zinciri ve CD3 sinyal kompleksini (γ, ζ, ε ve δ zincirlerini içerir) eksprese eder (Schatz vd., 1989).

2.3.1.3. Pozitif seleksiyon

B seleksiyon aşamasını başarı ile geçen pTα hücreler pozitif seçime tabi tutulur. Sadece TCR β zincirini eksprese eden pTα hücrelerinde α zincirinin rearranjmanı ile çift pozitif (DP) hem CD4 hem de CD8 eksprese eden DP hücrelerine dönüşür (Dominick vd., 2002). Kortikal epitelyal hücrelerle pozitif seleksiyon gerçekleşir. Bu süreçte timositler kendi-MHC tanımakla yükümlüler. Bu hücreler sadece peptide bağlı MHC sınıf I ve sınıf II moleküllerini eksprese etmekle kalmaz, aynı zamanda hayatta kalma faktörleri salgılar ve diğer dokulardaki MHC+ epitel hücrelerinin sağlamadığı özelleşmiş etkileşimleri sağlar (Noble vd., 2000). Sonuç olarak, DP timositlerinin çoğunluğu TCR eksprese eder, ancak farklılaşma gerçekleşmez ve yüksek düzeyde RAG eksprese eder. Bu seleksiyonu başarı ile geçmelerini sağlayacak bir TCR kompleksi üretmeye çalışırken birkaç tur zincir rearranjmanına maruz kalabilirler (Liu vd., 2000). Pozitif seçici sinyaller alan TCR'ler genellikle öz MHC peptitlerine düşük affiniteyle bağlanma kabiliyetleriyle karakterize edilir. Pozitif seçilime takiben, DP T hücreleri hemen CD4 veya pozitif hücrelerine dönüşmez. Pozitif seçilim geçiren DP hücreleri, CD69'un upregüle RAG pretein kompleksinin downregüle eder. CD69 ekspresyonu DP gelişiminin CD4+ veyCD8+ yönünde farklılaşmasındaakı sonunca aşamadır. Bu süreçte CD69 ekspresyonu devam etmekte olup, timositler ve kortikal epitel hücreleri arasındaki TCR-MHC etkileşimleri yoluyla üretilen sinyallerin sürdürülmesi gereken uzun bir sürecin sonuna işaret eder. Ortalama yaşam süresi yaklaşık 3-4 gün olan DP timosit popülasyonu, timustaki hücrelerin büyük bir çoğunluğunu oluşturur. Bu yaşam süresini steroid transkripsiyon faktoru RORγ ve WNT sinyal yolağı ile ilişkili TCF-1 ve LEF-1 gibi transkripsiyonel faktörlerle regüle edilir. Bu faktörler BCL-

XL ekspresyonunu kontröl eder. Nihayetinde bu süreçler γδ T hücreleri, αβ zincirli CD4 ve CD8 hücreleri ve doğal öldürücü hücreler (NK) hücrelerden oluşan hücre çeşitliliğine yol açar.

2.3.1.4. CD4+ alt popülasyonu

İlk kez Mosmann ve Coffman tarafından keşif edilmiş aktive olmuş CD4+ T hücrelerinin farklı biyolojik işlevi ve karakteristik sitokin üretimi yapan T yardımcı (Th1, Th2, Th9, Th17), foliküler yardımcı hücreler (Tfh), regulatör T hücreleri (Treg) populasyonları var. Hücreiçi bakteri, virus, mantar ve IL-12, IL-18, IFN-γ sitokin salımlarıyla STAT1 aktivasyonu gerçekleşir ve transkripsiyon faktörü olan T-bet ve IL-12R ekspresyonu ile Th1 hücrelerinin aktivasyonu başlar (Todd N. Eagar vd., 2023). IL-4, IL-5, ve IL-13 sitokinlerini salgılayan Th2 lenfositleri makrofajların antifungal yanıtını azaltır. Salgılanan IL-4 makrofajların farklılaşmasını da sağlamaktadır (Allison vd., 2019). İnterlökin-4 (IL-4), İnterlökin-9 (IL-9) ve dönüştürücü büyüme faktörü-β (TGF-β) CD4+T hücrelerinin Th9 hücrelerine farklılaşmasını indükler. TGF-β indüklemesi sonucu Th2 hücreleri Th9 hücrelerine dönüşebilmektedir. Yapılan çalışmalar sonucu farklılaşmanın ilk aşamalarında Th2 hücreleri tarafından IL-4 ve IL-9 salgılanması gözlemlenmiştir. İnterlökin-2 (IL-21) and tümör nekroz faktörü-α (TNF-α) Th9 hücrelerinin farklılaşma, sağkalım ve proliferasyonunu desteklemektedir. Th9 tümör nekroz faktörü reseptor2-sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 5 (TNFR2-STAT5) ve aktive edilmiş B hücrelerinin nükleer faktör kappa hafif zincir arttırıcısı (NF-κB) sinyal yolakları ile aktive oluyor. Th9 hücreleri IL-9 ile epitelyal hücreleri stimule ederek kemokin reseptör 6 (CCR6) ligandı olan C-C motifli kemokin ligand 20 (CCL20) üretiyor ve bu da antijen sunan hücrelerin CD8+ hücrelerinin tümör bölgesinde toplanmasını sağlıyor. Th9 hücreleri tarafından salgılanan IL-9 bronşial epitelyal hücrelerinde çeşitli kemokinlerin salgılanmasını eozinofiller ve mast hücreleri gibi bağışıklık hücrelerinin artmasına ve şiddetli solunum iltihabına aracılık ederek desteklemektedir. IL-9 IL-4 aracılı B hücre farklılaşması ve immunoglonilin E (IgE) ekspresyonu, aktive olmuş T lenfositlerinin ve mast hücrelerinin proliferasyonu arttırarak alerjik inflamasyonun oluşumunu teşvik eder (Jing vd., 2019). Diğer T lenfosit populasyonunu oluşturan hücrelerden farklı olarak B hücrelerinin affinitesine etkisi ile bilinen Tfh'lerin farklılaşması için çok aşamalı,

çok faktörlü bir süreç gerekmektedir. Doğal öldürücü hücrelerin (DC) naif CD4+'ı primingi sonucu bölünen CD4+ hücreleri bölünemenin ilk aşamasında C-X-C motifli kemokin reseptörü 5 (CXCR5) eksprese olursa Thf yönünde farklılaşma başlar. Farklılaşmanın ikinci aşaması T hücrelerinin lenf bezinin interfoliküler veya T-B sınırı bölümünde antijene özgü B hücreleri ile etkileşimi sonucu gelişir. İlk Tfh hücreleri B hücreleri tarafından CXCR5 eksprese edilmesi ve C-C kemokin reseptör 7, P-selektin glikoprotein ligandı 1 (PSGL1)'in downregüle edildiği için B hücreleri ile birlikte lokalize olurlar. Tfh hücre farklılaşmasının üçüncü aşaması lenf nodüllerinin merkezi germinal (GC) bölgesinde gerçekleşmektedir. Kanonikal olarak salgılanan Tfh hücre molekülleri C-X-C motifli kemokin 13 (CXCL13), IL-21, ve IL-4'tür. CXCR5hiPD1hiBcl6hi CD4 T hücreleri olarakta bilinen Tfh hücrlerinde CXCR5'in yüksek, C-X-C kemokin reseptör tip 4 (CXCR4), sfingozin 1 fosfat 1 reseptör receptor type 4 (S1P1R) ve PSGL1 düşük oranda eksprese edilir. Her üç aşamanın da gerçekleşmesi için Bcl6 gereklidir ve sıklıkla Tfh ana düzenleyici transkripsiyon faktörü olarak anılır.

2.3.2. TCR kompleksi

T hücrelerinin antijen sunan hücreler tarafından antijenleri tanımlaması ve buna karşın vücut savunma mekanizmasının gerçekleşmesi TCR kompleksi ile alakadardır.TCR'nun antijen peptit ile karşılaşması sonucu plazma zarı, sitoplazma ve çekirdekteki karmaşık bir dizi moleküler değişiklik nedeniyle T hücreleri aktive olur ve efektör fonksiyonlarını gerçekleştirmek için klonal büyüme ve farklılaşmaya uğrar.

İnsan genomu iki farklı heterodimer oluşturan: TCRa/TCRβ veya TCRγ/TCRδ dört TCR geni olan TCRα, TCRβ, TCRγ, and TCRδ eksprese eder. Olgun T hücrelerinin büyük bir kısmı TCRα ve TCRβ izoformlarını eksprese ederken, yaklaşık (0.5–5%) gibi çok küçük bir kısmı TCRγ, ve TCRδ eksprese eder. Buna ragmen her iki heterodimer de CD3 δ, γ, ε ve ζ zincirlerinden oluşan protein komplekslerini içerir ve bu proteinler kovalent olmayan hidrofobik etkileşimler yoluyla TCR ile birleşir TCR zincirleri hücre dışı bölge, transmembran bölgesi ve daha kısa bir sitoplazmik kuyruktan oluşur. Hücre dışı bölge, değişken bir immünoglobulin benzeri (V) alanı, sabit bir immünoglobulin benzeri (C) alanı ve bağlantı peptidini içerir. αβ ve γδ izoformları sabit C alanı ve

bağlantı peptidi açısından önemli yapısal farklılıklar gösterir ve bu durum aynı zamanda TCR komplekslerinin birleşimine, yüzey şekline ve yük dağılımına da yansır. Ancak her iki komplekste CD3 proteinlerinin üç dimeri, δε ve γε heterodimerleri ve ζζ homodimerleri mevcuttur.

T hücre sinyal aktivasyonu bu kompleksle alakadar olup aktivasyonu bir kaç saniye sürmektedir. Bu süreç LCK, FYN ve ZAP-70 gibi çeşitli PTK'lerin katılımı ile gerçekleşmektedir. Tüm SRC kinaz ailesi yüksek düzeyde korunmuş düzenleyici alanlar (SH3 ve SH2), bir protein tirozin kinaz alanı (SH1), bir C-terminal kuyruğu ve zayıf şekilde korunmuş bir N-terminal bölgesi (SH4 alanı) içerir. SH4 alanı, SFK'lerin membrana sabitlendiği bir miristoilasyon bölgesi içerir. PTK'lar T hücresi gelişimi ve CD3 üzerinde tirozin fosforilasyonu yoluyla TCR sinyallemesinin aktivasyonu için önemli sinyal bileşenleridir. CD3 proteinin sitosolik kuyruğu her iki tarafında keysin/izoleysin bulunan triozin kalıntısı ve aromatik amino asit içeren immünoreseptör tirozin temelli aktivasyon motifleri (ITAM) sahiptir. CD3δ, γ ve ε zincirlerinin her biri bir ITAM içerirken, her CD3ζ zinciri üç ITAM içerir. TCR aktivasyonu için, ITAM'lerdeki tirozin kalıntılarının, LCK ve bir dereceye kadar FYN tarafından başlatılan fosforilizasyonu gerekir (Kinjal vd., 2021).

2.3.2.1. T hücre aktivasyonu sinyal yolakları

İn vivo olarak transkripsiyonel faktörlerin aktivasyonu ile gerçekleşen TCR aktivasyonunun üç ana sinyal yolağı var: MAPK, NF-κB ve kalsiyum yolaklarıdır. İmmun hücre gelişim ve işlevinde rol oynayan NF-κB sinyal yolağı aynı zamanda sitokin ve kemokin ekspresyonlarının transkripsiyonel düzenlenmesi yoluyla bağışıklık tepkisinin modülasyonunda da kritik öneme sahiptir (Hyunju vd., 2014).

MAP kinaz yolağı, TCR uyarımı ile indüklenen ana yolaklardn biridir ve T hücresi yanıtlarında anahtar rol oynarlar. Özellikle ERK yolu, önemli MAP kinaz yollarından biridir. ERK yolunun, Th2 farklılaşması da dahil olmak üzere T hücresi aktivasyonu ve farklılaşmasının düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir (Keishi vd., 2011).

Antijenin T hücre TCR'e bağlanması Ca^{+2} mobilizasyonunu tetikler ve etkili T hücresinin aktivasyonu, anerji, gen ekspresyonu, hareketlilik, sinaps oluşumu,

sitotoksisite, gelişim ve farklılaşma için gereklidir. Antijenin TCR'ye bağlanması TCR/CD3 kompleksinin sitozolik kısmının lenfosit protein kinaz (LCK) tarafından immünreseptör tirozin bazlı aktivasyon motiflerin fosforilizasyonunu tetikler. Bu, bir dizi kinazın ve substratlarının aktivasyonuyla ligasyona ve dolayısıyla fosfolipaz C-γ'nın (PLC-γ) aktivasyonuna yol açar. PLC-γ aktivasyonu, T hücrelerinde Ca2+ hücre membranından geçerek hücre içine girmesine ve hücre içi Ca2+ düzeyinin yaklaşık ~500 nM yükselmesi sonuçta T hücre aktivasyonuna yol açmaktadır (Elsie vd., 2018).

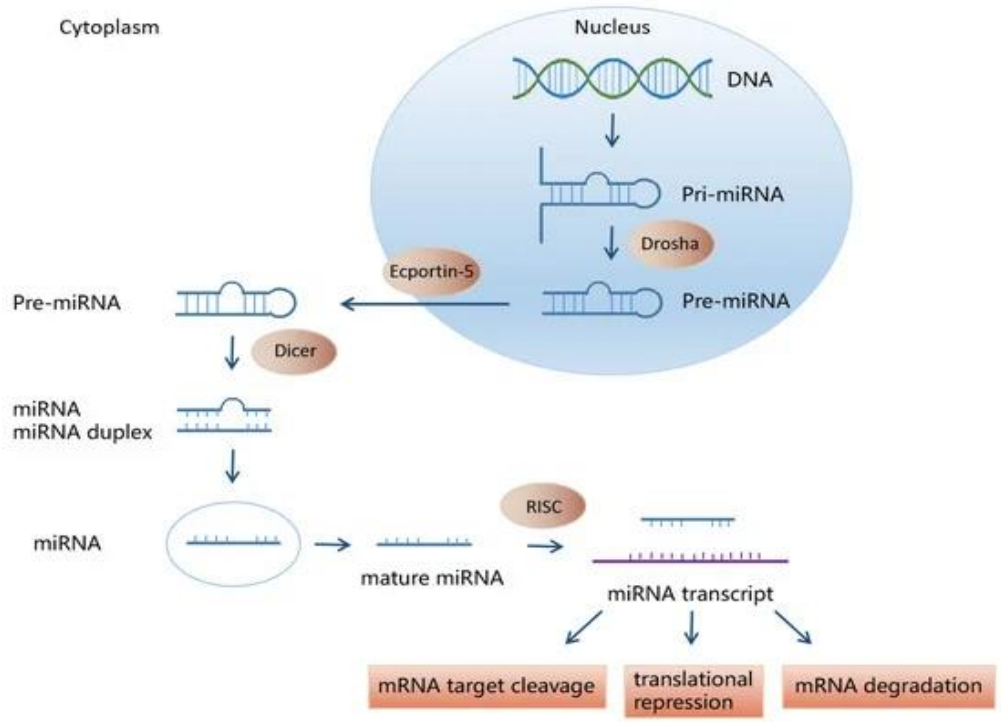
Özellikle bazı immun hastalıklarını ve kanseri daha iyi tanımlayıp tedavi yöntemi oluşturmak için genetik modifikasyon tekniğiyle T lenfosit oluşturularak hastalıkların in vitro modellenmesi yapılmaktadır. Non-Hodgkin lenfoma (NHL), multipil myeloma (MM), kronik lenfositik lösemi (KLL), hastalıklarında ilk kez transgenik kimerik antijen reseptör T (CAR-T) tedavisi bu modelleme tekniği kullanılarak klinik olarak çalışılmıştır. Kimerik antijen reseptörleri: monoklonal antikorun (mAb) antijene bağlanma alanı, T lenfosit transmembran ve hücreiçi sinyalleme alanı olan CD3ζ zincirini içeren tasarlanmış bir reseptördür. Edinilmiş bağışıklık tepkisinin önemli bir aşaması T hücresi aktivasyonudur. İmmun tepki için sitotoksik T hücresinin yanı sıra CD4+T hücresi aktivasyon da gereklidir. Aktive edilmiş CD4+T hücreleri çoğalabilir, farklılaşabilir, sitokin salgılayabilir, hedef hücreleri öldürebilir ve diğer efektör görevleri gerçekleştirebilir. Klinik olarak uygulanabilir konvansiyonel T hücresi in vitro stimülasyonu için anti-CD3 ve anti-CD28 antikorlarını gerektirmektedir. En iyi alternatiflerden biri olan kırmızı barbunya fasulyesinden türetilen fitohemaglütinin (PHA) TCR/CD3 kompleksine bağlanarak anti-CD3 antikorları tarafından tetiklenen tüm hücre içi aktivasyon olaylarını taklit ederek T lenfosit bölünmesi ve metabolik aktivasyonu stimule eder. Yaklaşık 3 haftadan bile kısa bir süre için kültüre edilebilen CD8+T hücreler IL-15 ve PHA ile birlikte kültürü sonrası bu süre 90 güne kadar artmıştır. (Gamze vd., 2023).

2.4.miRNA’ların İmmune Sistemindeki Rolü

2.4.1. miRNA’ların biyosentezi ve biyolojik işlevi

Mikro RNA (miRNA) ilk kez Hardvard Üniversitesi biyologları tarafından nematod C. elegans ile yapılan bir çalışma sırasında bulunmuştur (Lee vd., 1993). Şu anda insanlarda, potansiyel olarak insan genomunun %30'undan fazlasını hedef alan 1000'den fazla miRNA tanımlanmıştır (Griffiths-Jones vd., 2008). MikroRNA'lar veya miRNA'lar, genlerin intron, ekzon veya intergenik bölgelerinde bulunan diziler tarafından kodlanan, 19-25 nükleotid uzunluğunda kısa moleküllerdir. Transkripsiyon sonrası protein kodlayan genlerin gen ekspresyonunu kontrol etmekle tanımlanır. miRNA'lar gen ekspresyonunu düzenleyerek proliferasyon, apoptoz, farklılaşma, migrasyon, immune tepki ve ilaç direnci gibi önemli biyolojik işlevleri düzenlerler.

miRNA'ların biyogenezi, hücre çekirdeğinde başlayan birkaç adımı içerir ve koordineli bir kırpma ve kesme süreci ile sitoplazmada sonlanır (Şekil 2.4) (Kim, 2005). Bu adım, intergenik veya intragenik DNA dizilerinin, RNA tarafından transkripsiyonu ile başlar ve birincil miRNA olarak bilinen bir ila üç kilobaz (kb) uzunluğunda bir dizi oluşturan polimeraz II (Cai vd., 2004; Lee vd., 2004). Daha sonra, Drosha enzimi ve RNA bağlayıcı protein Pasha (DiGeorge sendromu kritik bölge 8 olarak da bilinir) birincil miRNA'yı daha kısa bir pre-miRNA olarak adlandırılan 70-100 nükleotidlik kök-döngü yapı dizisi (Denli vd., 2004; Gregory vd., 2004; Han vd., 2004; Landthaler vd., 2004). Exportin-5 pre-mirRNA'yı sitoplazmaya taşır (Bohnsack ve ark., 2004; Lund ve ark, 2004; Yi vd., 2003) ve burada 14-24 çift sarmallı olgun uzunluğuna bölünür. 2 Dicer adlı bir enzim tarafından oligonükleotid (Bernstein vd., 2001; Hutvagner vd., 2001). Dicer çift iplikçik daha sonra iki tek iplikçiğe ayrılır. İplikçiklerden biri olgun bir sarmala dönüşür. miRNA molekülü RNA ile indüklenen susturma kompleksine veya RISC'ye dahil olur. Bu kompleks şunları yapabilir mRNA ile tamamlanarak protein translasyonunu inhibe eder (Knight ve Bass, 2001).



Şekil 2. 1. mi-RNA'ların biyosentezi (Jinmeng Liu vd., 2022).

Bazı miRNA'lar alışılmadık derecede yüksek veya düşük konsantrasyonlarda üretilir ve sonuç olarak mRNA hedeflerine daha fazla veya daha az kapsamlı olarak bağlanabilir. Bu düzensizlik, tümör belirteçleri olarak tanımlanan protein seviyelerindeki bir değişikliğin ölçülebildiği tümör gelişiminde rol oynar (Lu vd., 2005). miRNA aktivitesinin derecesi, hedef mRNA konsantrasyonunun farklılaşma veya gelişim gibi fizyolojik bir olay sırasında veya çevresel ortamdaki değişikliklerin bir sonucu olarak değişmesi durumunda da değişebilir (Arvey vd., 2010).

miRNA'ların gen ifadesinin düzenlenmesindeki rolü, onları hem fizyolojik hem de patolojik hemen hemen her biyolojik fonksiyonda anahtar oyuncular haline getirir (O'Connell vd., 2010). Toll benzeri reseptörler (TLR), patojen yapılarını tanıyan, doğuştan gelen bağışıklık tepkilerini tetikleyen ve antijene özgü immun cevabı başlatan bir protein sınıfıdır (Eskan vd., 2008; Hajishengallis vd., 2006; Hirao vd., 2009; Kawai ve Akira, 2010; Medzhitov vd., 1997). TLR'ler transmembran bölgesinde veya hücrelerin sitoplazmasında eksprese edilen bir grup proteindir ve belirli mikrobiyal kalıpları tanır (Kopp vd., 1999). Örneğin TLR4 bakteriyel lipopolisakkariti (LPS) tanır (Medzhitov vd., 1997). Mikrobiyal uyarım üzerine TLR4, inflamatuar süreci başlatan sitokinleri ve/veya kemokinleri

üretmek için hücreyi tetikleyen bir dizi downstrem sinyali gönderir (Shimazu vd.,1999). miRNA'lar inflamasyon, metabolizma ve yara iyileştirilmesinde önemli bir post-transkripsiyonel düzenleyici olarak görülmektedir (Van vd., 2012). İnflamasyonun kilit düzenleyicileri olan miRNA'lar, TLR4 yolağı aktivasyonu yoluyla inflamatuar uyaranlara verilen homeostatik yanıtlarla (Xie vd., 2013) ve miRNA'ların inflamatuar yanıtı bastırdığı veya inflamatuar tetikleyicileri azalttığı bakteriyel enfeksiyona verilen çeşitli TLR aracılı bağışıklık yanıtlarıyla ilişkilendirilmiştir (Case vd., 2011; Liu vd., 2009).

2.4.2. miRNA-181a ve periferik T lenfositleri

miRNA'lar, seed region (miRNA'nın mRNA'ya bağlanması için gereklidir) dışında yalnızca birkaç nükleotid için farklılık gösteren birkaç üyeden oluşan aileler halinde organize edilebilir. miRNA ailesi üyeleri genellikle belirli kromozomal bölgelerde toplanır ve iki veya daha fazla kopya halinde bulunabilir. Diğer düzenleyici kodlamayan RNA'lara benzer şekilde, miRNA'lar sınırlı mekansal-zamansal lokalizasyondan her yerde olmasa da daha yaygın dağılımlara kadar değişen farklı ekspresyon modelleri sergiler. Çok sayıda deneysel kanıt, miRNA'ların temel biyolojik süreçleri düzenlediğini ve işlev bozukluklarının hem gelişimsel süreçler hem de olgun dokuların/organların homeostazı üzerinde zararlı etkileri olabileceğini göstermektedir. İnsan genomunda miR-181 ailesi dört farklı 5p uçlu olgun formdan oluşur: (a) miR-181a-5p; (b) miR-181b-5p; (c) miR-181c-5p ve (d) miR-181d-5p. Bu dört olgun miR-181 formu, aşağıdaki altı farklı öncü (stem-loop) dizisinden üretilir: olgun miR-181a-5p'nin iki özdeş kopyasını meydana getiren pre-mir-181a1 ve pre-mir-181a2; olgun miR-181b-5p'nin iki özdeş kopyasını meydana getiren pre-mir-181b1 ve pre-mir-181b2; olgun miR-181c-5p'yi meydana getiren pre-mir-181c ve olgun miR-181d-5p'yi oluşturmak üzere işlenen pre-miR-181d (Alessia vd., 2020).

miR-181 ailesinin hedef genleri bağışıklık tepkisi ve enflamasyonun düzenlenmesinde yapılan çalışmalarla önemini vurgulamaktadır (Tablo 2.1.) (Xie vd., 2011).

Tablo 2.1. miR-181a hedef genleri

miRNA	Hedef gen	Gen ürün fonnksiyonu
MiRNA-181a	Dusp5/6	T hücre reseptörü (TCR) sinyallemesinin ve aktivasyoun düzenlenmesi; T yardımcı subpopulasyonunun farklılaşması
	IL-6	Akut ve kronik enflamasyon ve b hücre olgunlaşması; Th farklılaşması
	STAT-1	Sitokin araçlı sinyal yolağı; LPS araçlı sinyal yolağı
	TGFB1	Adaptif immun yanıtı, kolajen biyosentezinin regülasyonu, kemotaksis, fibroblast migrasyonu, odontogenezis

Tablo 2.1. miR-181a hedef genleri (Devam ediyor)

miRNA-181b	CCL8	İmmun tepki, enflamasyon tepki, kemokin aktivitesi, fosfolipaz aktivasyonu
	IL-6	Sitokinlerin sagılanması, negatif regülasyon, kolejan biyosentezi, akut inflamatuar yanit, Th17 farklılaşması
	MMP9	IL-1 ve LPS'e hücre yanıtı, makrofaj farklilaşmasi, apoptoz ve anjiyogenezin regülasyonu
	TGFB1	Adaptif immun tepki, kolajen biyosentezi, kemotaksis, fibroblast migrasyonu, th17 farklılaşması
miR-181c	IL-2	Antijen ve mitojen aktivasyonuna karşı T hücre sitokin üretimi
	SOCS1	Sitokin aracılı sinyal yolağı JAK-STAT yolağının negative regülasyonu

Tablo 2.1. miR-181a hedef genleri (Devam ediyor)

miRNA-181d	MMP9	LPS ve IL1'e karşı immun yanıt, markrofaj farklılaşması, anjiyogenez ve apoptozun regülasyonu

T hücre populasyonunda, miR-181a/b-1 en belirgin şekilde, miR-181c/d daha düşük seviyelerde, miR-181a/b-2 ise hiç eksprese edilmediği tespit edilememektedir. Bu nedenle, miR-181a/b-1'in doğrudan silinmesi muhtemelen en fizyolojik işlev kaybı modelini temsil ederken, miR-181a'nın ektopik ekspresyonu önemli ölçüde diğer miR-181 ailesi üyelerinin hedeflerini de etkileyebilir. İn vitro olarak aktive olmuş CD4+ ve CD8+ hücreleri miR-181a'nın ekspresyonunu kaybeder, bu da bellek ve naif T hücrelerinde miR-181a'nın daha düşük ekspresyonuna neden olur. Dahası, miR-181a bir organizmanın ömrü boyunca T hücrelerinde dinamik olarak ifade edilir ve yaşın artmasıyle ekspresyon seviyeleri giderek azalır. İlk kez 2007 yılında Li ve arkadaşları tarafından miR-181a'nın bir TCR sinyal modülatör işlevine sahip olduğu belirlenmiştir. Olgun T hücrelerinde miR-181a ekspresyonunun ektopik olarak artması, peptit antijenlerine karşı artan hassasiyetin yanı sıra Lck ve Erk'in bazal fosforilasyon seviyelerinin artmasıyla sonuçlanmıştır. Benzer şekilde, miR-181a'nın antagomirler yoluyla inhibisyonu TCR duyarlılığını azaltmıştır. TCR sinyallemesinin düzenlenmesindeki rolüyle uyumlu olarak, TCR sinyal aktivasyonunda yer alan SHP-2, PTPN22, DUSP5 veya DUSP6 gibi fosfatazların miRNA-181a'nın hedefi olarak bilinmektedir (Li vd., 2007).

TCR aktivasyonu açısından periferik T hücreleri ve timositler karşılaştırıldığında son derecede farklı sonuçlar gözlemlenmiştir. Yüksek afiniteli periferik T lenfositlerinde miRNA-181a'nın daha düşük ekspresyona sahip olduğu bilinmektedir. Yaşlanmaya bağlı olarak immun sistemi bir dizi temel değişikliğe uğrar. Bu değişiklikler enfeksiyonlara karşı hassasiyetin artmasına neden olur. T hücre kompartımanı yaşlanma sırasında önemli değişikliklere uğrar. İlk olarak, timus atrofiye maruz kalarak daha çocukluk döneminden başlayarak naif T

hücrelerinin üretimini azaltır. Buna bağlı olarak, yetişkin insanlarda, hematopoezis naif T hücresi havuzunu koruyan ana mekanizmadır. Yaşlanma sırasında, hematostatik proliferasyon bir dereceye kadar azalır ancak uzun süreler boyunca korunur. TCR çeşitliliğinde azalma ol masına rağmen TCR repertuarında önemli "boşluklar" yaratacak ölçüde değildir. T hücresi populasyonundakı yapısal değişiklikler yaşlı bireylerde sınırlı T hücresi yanıtlarına yol açabilir. Özellikle, sitomegalovirüs (CMV) enfeksiyonunda görüldüğü gibi ‘memory inflation’ yani çok sayıda efektör bellek T hücresinin periferik dokularda biriktiği bir süreç ggrülmekte olup, bazı düşük seviyeli kalıcı virüs enfeksiyonlarında gözlemlenir (Ziętara vd., 2013).

T hücrelerinde yaşa bağlı oluşan bu değişikliklerin her birinin işlevsel sonuçları yalnızca kısmen anlaşılmıştır. Hücre içi T hücresi işlevinde yaşa bağlı değişiklikler de bildirilmiştir. Bu nedenle, yapılmış bir in vitro faare deneyinde uzun ömürlü naif CD4 T hücreleri daha az IL-2 üretmiştir ve insanlarda, yaşlı bireylerden alınan örneklerde naif CD4 T hücreleri TCR uyarımına daha az yanıt vermiş ve azalmış MAP kinaz aktivitesi sergilemiştir. Bu bireylerde DUSP6 ekspresyonundakı artım olmasına rağmen miR-181a ekspresyonu azalmıştır, bu da miR-181a ve hedefi DUSP6 aracılığıyla TCR aracılı Erk sinyalinin düzenlendiğini düşündürmektedir. Hem miR-181a'nın ektopik ekspresyonu hem de DUSP6'nın susturulması CD4 T hücrelerinin TCR aktivasyon duyarlılığını artırırken, miR-181a'nın inhibisyonu T hücre aktivasyonunu azaltmıştır. Özellikle, miR-181a'nın Ptpn22 ve SHP-2 gibi diğer tipik fosfataz hedefleri yaşlı bireylerde etkilenmeden kalmıştır ve bu da duruma bağlı hedeflemeye işaret etmektedir. Artan yaşla birlikte miR-181a ekspresyonunun giderek azalırken kordon kanından türetilen CD4 T hücrelerinde miR-181a ekspresyonu yüksek olduğu görülmüştür. miR-181a/b-1 yoksun fare modelinde periferik T hücrelerinde miR-181a'nın regülasyonundakı değişikliklerin değerlendirilmesi sonucu miR-181a/b-1 yokluğunda, efektör T hücrelerinin verimsiz farklılaşması ve çoğalması nedeniyle lenfositik koriomenenjit virüsüne (LCMV) karşı yanıt oluşumunda gecikme belirlenmiştir. Bellek CD8 T hücreleri üretilmiş olsa da, bu hücrelerin immun yanıtında da benzer şekilde kusurlar olmuştur. Batı Nil virüsü ile enfekte olmuş genç ve yaşlı hastalar arasında yapılmış başka bir çalışmada bulgular TCR sinyali ve miR-181a/b-1 işlevi arasındaki mekanik bir bağlantıyla periferik T

hücrelerinde miR-181a/b-1 kaybı DUSP6'nın upregülasyonu ve Erk'in sınırlı fosforilasyonu ile sonuçlanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucu düşük bir düzeyde ekprese olan miR-181a aktivasyon üzerine daha da azalıp periferik T hücre çoğalması ve bellek T lenfosit işlevinde önemli rol oynadığı belirlenmiştir (Todd vd., 2023).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Fetal Bovine Serum (FBS)	: FBS-12A, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya
Primocin	: ant-pm-2, İnvivogen, California, ABD
Stabil Glutamine	: STA-B, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya
RPMI-1640	: RPMI-A, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya
Dulbecco's phosphate buffered saline	: PBS-1A, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya
Tripsin-EDTA	: 25200056, Thermo Fisher Scientific, Gibco, Massachusetts, ABD
MagniSort™ human T cell enrichment kit	: 8804-6810-74, invitrogen by ThermoFisher, Massachusetts, ABD
Phytohemagglutinin (M Form)	: 10576015, Thermo Fisher Gibco, Massachusetts, ABD
FITC antı-human CD44	: 338804 , Biolegend, California, ABD
FITC antı-human CD90	: 19-04400-10, PluriSelect, Leipzig, Almanya
FITC antı-human CD73	:344016, Biolegend, California, ABD
FITC antı-human CD105	: 323204, Biolegend, California, ABD
PE antı-human CD25	: BSA-1S, Biolegend, California, ABD
PE antı-human CD19	: 302208, Biolegend, California, ABD
PE antı-human CD29	:303004, Biolegend, California, ABD

PE antı-human CD34	: 343506, Biolegend, California, ABD
PE antı-human CD14	: 301806, Biolegend, California, ABD
PE antı-human HLA-DR	: 307606, Biolegend, California, ABD
PE antı-human HLA-A-B-C	: 311406, Biolegend, California, ABD
PE / Cyanine 7 mouse IgG1, k Isotype	: 400126, Biolegend, California, ABD
PE / Cyanine 7 anti-human CD105	: 323218, Biolegend, California, ABD
FITC anti-human CD69	: 310904, Biolegend, California, ABD
PE anti-human CD45	: 304008, Biolegend, California, ABD
FITC anti-human CD25	: T-H25-100, Ankara, Türkiye
PE mouse IgG1 k	: 400114, Biolegend, California, ABD
Brilliant violet 711 anti-human CD8	: 344734, Biolegend, California, ABD
PE anti-mouse/rat/human FOXP3	: 320008, Biolegend, California, ABD
Brilliant violet ant-human T-BET	: 644819, Biolegend, California, ABD
FITC anti-human CD3	: 31706, Çankaya, Ankara
APC/Cyanine 7 anti-humann CD4	: 317418, Biolegend, California, ABD
APC Annexin V kit	: 20-6410-KIT, TONBO, California, ABD

Propidium iodide solution	: 10008351, Cyman Chemical, Michigan, ABD
Recombinant human FGF	: 571506, Biolegend, California, ABD
FITC anti human CD90 antibody	: 328108, Biolegend, California, ABD
MagniSort™ human T cell enrichment kit	: İnvitrogen by ThermoFisher, Massachusetts, ABD

3.1. Kullanılan Cihazlar

Laminar air flow-class II	: Telstar Biovanguard, Tokyo, Japonya
CO_2/O_2- çok gazlı incubator	: Panasonic MCO-170M-PE, Kadoma, Japonya
-150°C derin dondurucu	: Panasonic MDF-C2156VAN-PE, Kadoma, Japonya
Floresan ataşmanlı inverted araştırma mikroskobu	: Carl Zeıss Axıo Observer D1, Oberkochen, Almanya
Flow Sitometri	: Agilent Novacyte 3500, Kaliforniya, ABD
qRT-PCR	: QIAGEN Rotor-GeneQ, Hilden, Almanya
Thermal Cycler PCR sistemi	: THERMO FISHER SCIENTIFIC APPLIED BIOSYSTEMS SimpliAmp, Massachusetts, ABD
Floresan ataşmanlı araştırma Mikroskobu	: Leica DM2500, Wetzlar Almanya

Işık mikroskobu	: Kern, OBL-12/OBL-13, Balingen, Almanya
Otomatik pipet seti	: Eppendorf, Research® plus, Hamburg Almanya
Masaüstü soğutmalı santrifüj	: Hettich Rotına 380R, Westphalian, Almanya
Çalkalamalı su banyosu	: JeioTech BS-11, Seul, Güney Kore
Şarjlı pipetör	: Rainin PX-100 EU, Kaliforniya, ABD
Kit saklama dolabı (+4/-20˚C)	: Panasonic MPR-414F-PE, Kadoma, Japonya
Spektrofotometre (Nanodrop-one)	: THERMO FISHER SCIENTIFIC, Massachusetts, ABD
Florometre (Qubit-4)	: THERMO FISHER SCIENTIFIC INVITROGEN, Massachusetts, ABD
Sitosantrifüj	: THARMAC CellSpin I, Limburg an der Lahn, Almanya
Bilgisayar	: Lenovo Ideapad 310, Çin

3.2. Deney Protokolü

Bu tez çalışması sadece hücre kültürü ortamında (insan ya da hayvan vücudu dışında) ve Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ), Tıp fakültesi, Klinik araştırmalar Etik Kurul Başkanlığının karar iznin sayı numarası: E-80558/21-050.99-41223; No:21 10.11.2022 tarihli etik kurul izni ile insan kaynaklı dokulardan izole edilerek gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Deney grupları

Çalışmamızda, mezenkimal kök hücrelerin immunomodulatuvar özelliklerinin incelenmesi için 3 farklı hücre grubu kullanılmıştır. Bu gruplar:

Deney grupları:

1. Grup (Kontrol grubu): Yalnızca uyarılmış T hücresi

2.Grup (Deney grubu): Uyarılmış T hücresi+iWJ-MKH İndirekt Ko-Kültürü İndirekt Ko-Kültür Sistemi: Doğrudan Olmayan birlikte kültür sistemi:

3. Grup (Deney grubu): İndirekt Uyarılmış PHA-T hücresi + miRNA-181a transfekte edilmiş WJ-MKH (miRNA-181a-iWJ-MKH)

3.2.2. Hücrelerin izolasyonu, kültür edilmesi, çoğaltılması ve karakterizasyonu

3.2.2.1. iWJ-MKH'lerin izolasyonu ve kültüre edilmesi

Bu tez çalışmasında 3 vakadan (n=3) eksplant yada enzimatik sindirim yöntemi ile izole edilip primer kültüre alınan ve 3. pasajda karakterize edilen insan Wharton Jeli kökenli mezenkimal kök hücreler (iWJ-MKH'ler) kullanıldı. Eksplant kültür için öncelikle doku %10 Primocine içeren Hank'in dengeli tuz çözeltisi (HBSS) solüsyonu ile yıkandı ve dokudan küçük kesitler alınarak 6 well kültür plağının tabanına konularak 15 dakika tabana tutunması için beklenildi.15 dakika sonra üzerine %10 fötal sığır serumu (FBS, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya), %1 primocin (İnvivogen, California, ABD) ve %1 stabil glutamine (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) içeren Nutri ve Nutri supplement (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) besiyerinde, %5 CO2, %5 O2 ve %95 bağıl nemde ve 37°C inkübatörde (Panasonic, MCO-170M-PE, Kadoma, Japonya) çoğaltıldı. Çalışmada kullanılacak olan insan

Wharton jeli mezenkimal kök hücreler (iWJ-MKH) Wharton jeli dokusundan izole etmek için %0.75 oranında Collgenase tip I (Col tip I) kullanıldı. Öncelikle 12 mL PBS içerisinde 0.09 g Col tip I çözülerek 5 dakika su banyosunda bekletildikten sonra 0.22µm'lik filtreden geçirildi. Doku parçası 2 kez %10 Pencilin/Streptomicine (Pen/St) içeren HBSS içinde yıkanıp kandan arındırıldıktan sonra damarlarından ayıklanarak Col tip I enzimi eklenerek 15 dakikada bir durumu kontrol edilerek 1 saat boyunca su banyosunda bırakıldı. 1 saat sonunda enzim 1:1 oranında FBS eklenerek inaktive edildi ve 300xg'de 5 dakika santrifüj yapıldıktan sonra hücreler; %10 fötal sığır serumu (FBS, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya), %1 primocin (İnvivogen, California, ABD) ve %1 stabil glutamine (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) içeren Nutri ve Nutri supplement (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) besiyerinde, %5 CO2, %5 O2 ve %95 bağıl nemde ve 37°C inkübatörde (Panasonic, MCO-170M-PE, Kadoma, Japonya) çoğaltıldı.

iWJ-MKH'lerin günlük olarak yapılan invert faz kontrast mikroskobik (Carl Zeıss, Axıo Observer D1, Oberkochen, Almanya) morfolojik analizlerinde eksplant yoluyla izole edilenlerde eksplanttan hücre kültür plağının tabanına doğru hücre hareketleri ve enzimatik yolla izole edilenlerde ise hücreler hücre tutunmaları kontrol edildi, morfolojik analizler yapıldı ve fotoğraf çekildi. Hücrelerin durumu her gün faz konstrant mikroskobu ile gözlemlendi ve hücreler kültür sırasında kültür kabının %70 oranında hücre yoğunluğuna sahip olduğu zaman alt kültürleme yapıldı (pasajlandı). Bunun için eski besiyeri çekilerek 3 mL Ca+2 ve Mg+2 içermeyen Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (dPBS, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) ile 3 kez yıkama yapılarak eski besiyeri uzaklaştırıldı. Ardından %0.25 tripsin-EDTA (Etilendiamin tetra asetik asit, Thermo Fisher Scientific, Gibco, Massachusetts, ABD) eklendi. Üç dakika inkübatörde bekletildikten sonra mikroskopta hücrelerin kalktığı belirlenerek, tripsin-EDTA'yı nötralize etmek için tripsin miktarının en az iki katı kadar serum içeren besiyeri eklendi. Hücre solüsyonu santrifüj tüpüne (Sarstedt, Nümbrecht, Almanya) alınarak mikropipet ile nazikçe homojenize edildi. 300xg'de 5 dakika boyunca santrifüj (Hettich, Rotina 380R, Westphalian, Almanya) edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı. Bu işlem iki kez daha yapıldı. Son aşamada hücre sayımı için pellet 1 ml besiyeri ile resüspanse hale getirildi. İçerisinden 20 µl

alınarak 200 µl'lik kapaklı konik tabanlı tüpe aktarıldı. Üzerine 1:1 oranında tripan mavisi eklenerek Thoma lamında ışık mikroskobu (Kern, OBL-12/OBL-13, Balingen, Almanya) altında sayıldı. Yapılan sayım ile elde edilen sonuç aşağıdaki formül ile hesaplanarak hücre sayısı elde edildi. Toplam hücre sayısı = 16 büyük karedeki hücre sayısı x 10,000 x dilüsyon faktörü

Sonraki aşamada birlikte ve kontrol grupu kültürlerinde kullanılmak üzere iWJ-MKH hücreleri $7x10^5$ hücre/flask olacak şekilde T75 flasklara ekilerek kültürlerine devam edildi. Hücre pelletinin kalan kısmı ilerideki çalışmalarda kullanılmak üzere donduruldu. Bunu için hücreler 300xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı ve hücre pelletine daha önce hazırlanıp 2-8°C'de bekletilmiş olan kriyoprezervasyon solüsyonu (%35 FBS içeren RPMI-1640 besiyeri) ile mikropipet yardımıyla hızla homojenize hale getirildi. Hızla her kriyovialde $3x10^6$ hücre olacak şekilde viallere paylaştırıldı ve her bir kriyoviale %5 dimetil sülfoksit (DMSO) pipetaj yapılmadan eklendi. Hücrelerin homojenize olması için kriyoviallerin dış kısmından el ile tabanına yakın nazikçe vuruldu. Hızla, dondurma işleminden önce kriyoprezervasyon kayıt defterinde belirlenmiş olan yerine ulaştırılarak -150°C'de derin dondurucuya (Panasonic MDF-C2156VAN-PE, Kadoma, Japonya) yerleştirildi ve dondurularak saklandı (kriyoprezerve edildi).

3.2.2.2. iWJ-MKH'lerin immunofenotipik karakterizasyonu

3.2.2.2.1. iWJ-MKH'lerin flow sitometri ile immunofentotipik karakterizasyonu

İzole edilmiş iWJ-MKH'ler üçüncü pasaja kadar çoğaltıldı ve pasajı gelince eski besiyeri çekilerek 3 mL Ca+2 ve Mg+2 içermeyen Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (dPBS, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) ile 3 kez yıkama yapılarak eski besiyeri uzaklaştırıldı. Ardından %0.25 tripsin-EDTA (Etilendiamin tetra asetik asit, Thermo Fisher Scientific, Gibco, Massachusetts, ABD) eklendi. Üç dakika inkübatörde bekletildikten sonra mikroskopta hücrelerin kalktığı belirlenerek, tripsin-EDTA'yı nötralize etmek için tripsin miktarının en az iki katı kadar serum içeren besiyeri eklendi. Hücre solüsyonu santrifüj tüpüne (Sarstedt, Nümbrecht, Almanya) alınarak mikropipet ile nazikçe homojenize edildi. 300xg'de 5 dakika boyunca santrifüj (Hettich, Rotina 380R, Westphalian,

Almanya) edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı ve hücre pelleti soğuk PBS ile yıkandı. Hücre pelleti üzerine 100 µL bağlanma solüsyonu (%2 FBS içeren PBS) ve 2 µL ilgili antikor eklenerek, 30 dakika boyunca +4°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 300 µL PBS eklenerek flow sitometri cihazında (Agilent Novacyte, 3500) okutuldu. NovoExpress software (Agilent, CA, ABD) programında analiz işlemleri gerçekleştirildi. İzolasyonun verimliliği (saflığı ve canlılık) açısından ilgili antikor ile işaretlenerek flow sitometri analizi ile karakterizasyon işlemleri yapıldı. İzolasyon yönteminin verimliliğini değerlendirmek için FITC anti-human CD44 (Biolegend, California, ABD), FITC anti-human CD105 (Biolegend, California, ABD), FITC anti-human CD73 (Biolegend, California, ABD), FITC anti-human CD 90 (Thorvacs Çankaya, Ankara), PE anti-human CD25 (Biolegend, California, ABD), PE anti-human CD19 (Biolegend, California, ABD), PE anti-human CD29 (Biolegend, California, ABD), PE anti-human CD34 (Biolegend, California, ABD), PE anti-human CD14 (Biolegend, California, ABD), PE anti-human HLA-DR (Biolegend, California, ABD), PE anti-human HLA-A-B-C (Biolegend, California, ABD), FITC anti-human CD69 (Biolegend, California, ABD), FITC anti-human CD25 (Biolegend, California, ABD), PE anti-human 45 (Biolegend, California, ABD), antikorları kullanıldı.

3.2.2.2.2. iWJ-MKH'lerin immunofloresan işaretleme ile immunohistokimyasal karakterizasyon

iWJ-MKH'lerde adiponektin, ostenektin ve osteopontin proteinlerinin ekspresyon durumunu belirlemek için immunofloresan (İF) işaretleme ile karakterizasyon işlemleri yapıldı. Bunun için fikse edilmiş iWJ-MKH'ler Ca2+ ve Mg2+ içeren PBS ile 2-3 kez yıkandı. Cover Slipler 6 well'in her bir kuyucuğundan çıkarılarak üzerine % 0.1 Triton-X-100 eklendi ve 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücreler 2-3 kez PBS ile yıkandı. %10 Goat serum içeren PBS ile 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun bitiminde hücreler üzerine adiponektin, osteonektin ve osteopontin primer antikorları ile gece boyu +4°C'de inkübe edilerek antikorların antijene bağlanması sağlandı. Ertesi gün hücreler oda sıcaklığında PBS ile üç kez yıkanarak bağlanmayan primer antikorlar uzaklaştırıldı. Primer antikorlara uygun olarak seçilen Alexa Flour-488 (yeşil) (Cell Signaling Technology, Massachusetts, ABD) ve Alexa Flour-594 (kırmızı)

(Cell Signaling Technology, Massachusetts, ABD) sekonder antikorlar ile iki saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler üç kez PBS ile yıkanarak sekonder antikor uzaklaştırıldı. Hücreler en son nükleus belirteci olan DAPI ile boyanarak floresan mikroskopta (CARL ZEISS AXIO OBSERVER D1, Almanya) görüntülendi.

3.2.2.3. iWJ-MKH'lerin farklılaşma yoluyla karakterizasyonu ve farklılaşmanın karakterizasyonu

Bir başka karakterizasyon analizi olarak hücreler farklılaştırma kültür ortamına alındı ve WJ-MKH'ler kemik ve adipoz hücre hatlarına farklılaştırmak üzere uygun sürelerde kültür edildi. Farklılaştırma sonrasında adipojenik hücreler Oil red-O boyası, osteojenik hücreler Alirazin red boyası ile gösterilerek elde edilen hücrelerin MKH karakterinde oldukları doğrulanacaktır.

Adipojenik Farklılaşma: İzole edilmiş iWJ-MKH'ler üçüncü pasaja kadar çoğaltıldı ve pasajı gelince eski besiyeri çekilerek 3 mL Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (dPBS, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) ile 3 kez yıkama yapılarak eski besiyeri uzaklaştırıldı. Ardından %0.25 tripsin-EDTA (Etilendiamin tetra asetik asit, Thermo Fisher Scientific, Gibco, Massachusetts, ABD) eklendi. Üç dakika inkübatörde bekletildikten sonra mikroskopta hücrelerin kalktığı belirlenerek, tripsin-EDTA'yı nötralize etmek için tripsin miktarının en az iki katı kadar serum içeren besiyeri eklendi. Hücre solüsyonu santrifüj tüpüne (Sarstedt, Nümbrecht, Almanya) alınarak mikropipet ile nazikçe homojenize edildi. 300xg'de 5 dakika boyunca santrifüj (Hettich, Rotina 380R, Westphalian, Almanya) edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı ve hücre pelleti 6 well plakaların her kuyucuğuna 15x104 sayıda hücre ekilerek kültüre alındı. Kültüre alınan hücrelerin kültür sırasında kültür kabının %70 oranında hücre yoğunluğuna sahip olduğu zaman iWJ-MKH'leri; içinde %10 FBS, 0.5 mM isobutyl-methylxanthine, 10-6 M dexamethasone, 10 µg/ml insulin, 200 µM indomethacin ve 1% penisilin-streptomisin bulunan DMEM F12 kültür medyumunda iki hafta kültüre edildi ve kültür sonrası hücre içi biriken lipidler, Oil-Red-O histolojik boyaması yapılarak pozitifliği mikroskobik incelemelerle gösterildi. Ayrıca adipojenik farklılaşma sonrasında MKH hücrelerinde adiponectin antikoru ile işaretlenerek ekspresyon seviyeleri kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Bunun için adipojenik yönde

farklılaşmış hücreler üzerine PBS eklenerek 2 dakika boyunca yıkandı. Yıkamadan sonra hücreleri fikse etmek amacıyla üzerine %4 paraformaldehid eklendi, 15 dakika inkübe edildi ve PBS eklenerek 2 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra dH_2O eklendi ve 2 dakika inkübasyon sonunda %60 izoproponal eklenerek 5 dakika inkübe edildi. PBS ile yıkama yapıldıktan sonra immunofloresan işaretleme için bekletildi.

Osteojenik Farklılaşma: İzole edilmiş iWJ-MKH'ler üçüncü pasaja kadar çoğaltıldı ve pasajı gelince eski besiyeri çekilerek 3 mL Ca+2 ve Mg+2 içermeyen Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (dPBS, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) ile 3 kez yıkama yapılarak eski besiyeri uzaklaştırıldı. Ardından %0.25 tripsin-EDTA (Etilendiamin tetra asetik asit, Thermo Fisher Scientific, Gibco, Massachusetts, ABD) eklendi. Üç dakika inkübatörde bekletildikten sonra mikroskopta hücrelerin kalktığı belirlenerek, tripsin-EDTA'yı nötralize etmek için tripsin miktarının en az iki katı kadar serum içeren besiyeri eklendi. Hücre solüsyonu santrifüj tüpüne (Sarstedt, Nümbrecht, Almanya) alınarak mikropipet ile nazikçe homojenize edildi. 300xg'de 5 dakika boyunca santrifüj (Hettich, Rotina 380R, Westphalian, Almanya) edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı ve hücre pelleti 6 well plakaların her kuyucuğuna 15x104 sayıda hücre ekilerek kültüre alındı. Kültüre alınan hücrelerin kültür sırasında kültür kabının %70 oranında hücre yoğunluğuna sahip olduğu zaman iWJ-MKH'leri; içinde %10 FBS, 100 nM dexamethasone, 0.05 µM ascorbate-2-phosphate, 10 mM β-glycerophosphate, %1 penisilin- streptomisin içeren DMEM F12 kültür medyumunda 4 hafta boyunca kültüre edildi. Ayrıca osteojenik farklılaşma Alizarin Red-S ile boydı ve bu histolojik boyamanın pozitifliği mikroskobik incelemelerle gösterildi. Farklılaşmış ve farklılaşmamış MKH hücrelerinde osteonektin ve osteopontin proteinleri, immunofluoresan işaretlenerek belirlendi. Bunun için osteojenik yönde farklılaşmış hücreler üzerine PBS eklenerek 2 dakika boyunca yıkandı. Yıkamadan sonra hücreleri fikse etmek amacıyla üzerine %70 ethanol eklendi, 5 dakika inkübe edildi ve PBS eklenerek yıkama yapıldıktan sonra immunofloresan işaretleme için bekletildi.

3.2.3. T hücre aktivasyonu için PHA-M (mitojen) hazırlanması

Sıvı şeklinde olan Phytohemagglutinin (M form) PHA-M (Thermo Fisher Gibco Massachusetts, ABD) ticari olarak satın alındı. (PINAR CETINALP DEMIRCAN vd., 2011) ve PHA-M kendi protokolünde önerildiği gibi 20 µL/ml olacak şekilde 2 mL'lik ependorlarda 140 µL stoklanarak -20 C'e konuldu.

3.2.4. İnsan periferik kanından pan T hücrelerin izolasyonu ve aktivasyonu

Hemşire gözetimi altında toplanmış periferik kan iç duvarı püskürtülerek kurutulmuş K2EDTA ile kaplanmış tüpe aktarılarak öncelekle kandaki kalsiyumu uzaklaştırarak veya şelatlayarak pıhtılaşma engellendi. Tüpdeki kan 1:1 oranında %2 fötal sığır serumu (FBS, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) içeren Ca+2 ve Mg+2 içermeyen Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (dPBS, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) ile dilüe edilerek 8 ml kan/%2FBS+PBS karışımı pastör pipetle yayma yöntemi kullanılarak 4 ml Ficoll üzerine yayıldıktan sonra 800xg'de 20 dakika 24℃ sıcaklıkta santrifüjlendi. Santrifüj sonrası 'Buffy coat' kısmı toplandı %2FBS+PBS karışımı ile resüspanse edildikten sonra sayım yapıldı. Sayım sonrası hücreler 450xG'de 5 dakika 24 ℃ santrifüjlendi. Santrifüj sonrası pellet MagniSort™ Human T cell Enrichment Kit (İnvitrogen by ThermoFisher, Massachusetts, ABD) protokolüne uygun olarak hücreler negetif seleksiyona alındı. Öncelikle 18.200.000 hücre 1 ml %2FBS+PBS içinde resüspanse edilerek 12 x 75mm, 5ml tüpe alındı. Üzerine 200µL'e MagniSort™ Enrichment Antibody Cocktail eklendi ve 5 kez vortex yapılarak oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. 10 dakika bitiminde üzerine 3ml %2FBS+PBS eklenerek 300xg'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı ve 1 ml %2FBS+PBS içerisinde resüspanse edildi. 200 µL MagniSort™ Negative Selection Beads eklenerek 5 kez vortex yapıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 1 ml %2FBS+PBS eklenerek 3 kez pipetaj yapıldı ve magnet içinde oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Hücreler.tüp magnetten çıkarılmadan yeni 12 x 75mm, 5 ml'lik tüpe alındı. Hücreler üzerine 1 ml %2FBS+PBS eklenerek 300xg'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Hücreler 4 gün boyunca kültüre edilmek üzere süspanse kültür için kullanılan T75 flasklara ekilerek ve %10 fötal sığır serumu (FBS, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya), %1 primocin (İnvivogen, California, ABD) 140 µL PHA-M (Thermo Fisher Gibco Massachusetts, ABD) ve

%1 stabil glutamine (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) içeren RPMI-1640 (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) besiyerinde, %5 CO2, %5 O2 ve %95 bağıl nemde ve 37°C inkübatörde (Panasonic, MCO-170M-PE, Kadoma, Japonya) kültürlerine devam edildi.

3.2.4.1. İzole edilen T hücrelerinin flow sitometrik immunofenotipleme ile karakterizasyonu

İzolasyon sonrası hücre pelleti soğuk PBS ile yıkandı, hücre pelleti üzerine 100 µL bağlanma solüsyonu (%2 FBS içeren PBS) ve 2 µL ilgili antikor eklenerek, 30 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 300 µL PBS eklenerek flow sitometri cihazında (Agilent Novacyte, 3500) okutuldu. NovoExpress software (Agilent, CA, ABD) programında analiz işlemleri gerçekleştirildi. İzolasyonun verimliliği (saflığı ve canlılık) açısından ilgili antikor ile işaretlenerek flow sitometri analizi ile karakterizasyon işlemleri yapıldı. İzolasyon yönteminin verimliliğini değerlendirmek için FITC anti-human CD3 (Biolegend, California, ABD), APC/Cyanine7 anti-human CD4 (Biolegend, California, ABD), PE anti-human CD45 (Biolegend, California, ABD), Brilliant violet 711 anti-human CD8 (Biolegend, California, ABD) ve FITC anti human CD69 (Biolegend, California, ABD) antikorları kullanıldı.

3.2.4.2. Aktive edilen pan T hücrelerinin flow sitometri ile aktivasyonunun doğrulanması

Periferik kandan izole edilmiş ve kültür ortamına alınmış T hücrelerinin aktivasyonu ve T hücrelerin kolanal çoğalması her gün faz kontrast ışık mikroskobu altında kontrol edildi ve flow sitometri ile CD69 FITC anti human CD69 (Biolegend, California, ABD) antikoru kullanılarak belirlendi.

3.2.4.3. Pan T hücrelerinin aktivasyonunun canlılık ve proliferasyon analizi doğrulanması

T hücrelerinde PHA-M sitotoksik/proliferatif etkisinin değerlendirilmesi için CCK-8 (cell counting kit 8) analizi gerçekleştirildi. CCK-8 yöntemi; hücre canlılığının ve metabolik aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan bir spektrofotometrik yöntemdir. Bu yöntemde CCK8 tetrazolyum tuzu, hücresel dehidrojenazlar tarafından doku kültürü ortamında çözünebilen turuncu bir

formazan ürününe indirgenir. Üretilen formazan miktarı canlı hücre sayısıyla doğru orantılıdır ve 460 nm'deki absorbansla ölçülür ve proliferasyonu belirlenir.

T hücreler 100 µL RPMI-1640 besiyeri içerisinde kuyucuk başına 1x105 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür kaplarının 12 kuyucuğuna ekildi ve 6 kuyucuğa hücre ekimi sonrası PHA-M eklendi ve inkübatörde bir gün boyunca inkübe edildi. Ertesi gün her bir kuyucuğa 10µL CCK-8 eklendi. Hücreler 4 saat boyunca inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 96 kuyucuklu kültür kabı orbital karıştırıcı ile 1 dakika homojenaz hale getirildi. İnkübasyon sonunda absorbans değerleri 450 nm dalga boyunda monokromatör sistemli mikroplaka okuyucuda (BIOTEK ELx808IU, Vermont, ABD) belirlendi.

3.2.5. iWJ-MKH'lere miR-181a transfeksiyonu ve doğrulanması

miR-181a 50µl nuclease free su kullanılarak 100nM olacak şekilde stoklandı. 13x106 sayıda hücreye 990 V 40ms 1 pulse değerlerinde, miR-181a transfekte edildi. Transfeksiyondan sonra hücreler T75 flasklara ekilerek ve %10 fötal sığır serumu (FBS, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya), %1 primocin (İnvivogen, California, ABD) ve %1 stabil glutamine (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) içeren RPMI-1640 (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) besiyerinde, %5 CO_2, %5 O_2 ve %95 bağıl nemde ve 37°C inkübatörde (Panasonic, MCO-170M-PE, Kadoma, Japonya) kültürlerine devam edildi. miR-181a'nın transfeksiyonu, transfeksiyon öncesi ve sonrası qRT-PCR ile doğrulandı. Bunun için öncelikle 1.8x106 sayında hücre 6 well plakaya ekildi. Hücrelerin durumu her gün faz konstrant mikroskobu ile gözlemlendi ve hücreler kültür sırasında kültür kabının %70 oranında hücre yoğunluğuna sahip olduğu zaman alt kültürleme yapıldı (pasajlandı). Bunun için eski besiyeri çekilerek 3 mL Ca+2 ve Mg+2 içermeyen Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (dPBS, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) ile 3 kez yıkama yapılarak eski besiyeri uzaklaştırıldı. Ardından %0.25 tripsin-EDTA (Etilendiamin tetra asetik asit, Thermo Fisher Scientific, Gibco, Massachusetts, ABD) eklendi. Üç dakika inkübatörde bekletildikten sonra mikroskopta hücrelerin kalktığı belirlenerek, tripsin-EDTA'yı nötralize etmek için tripsin miktarının en az iki katı kadar serum içeren besiyeri eklendi. Hücre solüsyonu santrifüj tüpüne (Sarstedt, Nümbrecht, Almanya) alınarak mikropipet ile nazikçe homojenize edildi. 300xg'de 5 dakika boyunca santrifüj (Hettich, Rotina 380R, Westphalian,

Almanya) edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı. MKH'ler üretici firmanın protokolü izlenerek Qiagen miRNeasy Tissue/Cells Advanced Mikro kit (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak total RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen RNA'ların konsantrasyonları ölçüldü.

3.2.6. iWJ-MKH ve T hücrelerin indirekt birlikte kültüre edilmesi

Her kuyucuğa $3x10^5$ sayısında olacak şekilde 7 adet 6 well plakaya iWJ-MKH'ler ekildi. Ekimden 24 saat sonra her kuyucuğa indirekt ko-kültür oluşturmak için insert membran (Greiner bio-one, Kremsmuenster (Austria) CAT: 657641 6 well 0.4um transparent) üzerine PHA-M ile aktive edilmiş T hücreleri her kuyucuğa $3x10^5$ sayıda hücreler PRMI-1640 (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) %10 fötal sığır serumu (FBS, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya), %1 primocin (İnvivogen, California, ABD) ve %1 stabil glutamine (Capricorn Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) içeren kültür medyumu içinde ekildi.

3.2.7. mir-181a transfekte edilmiş iWJ-MKH ve T hücre birlikte kültürlenmesi

Her kuyucuğa $3x10^5$ sayısında olacak şekilde 7 adet 6 well plakaya iWJ-MKH'ler ekildi. Ekimden 24 saat sonra her kuyucuğa indirekt ko-kültür oluşturmak için insert membran (Greiner bio-one, Kremsmuenster (Austria) CAT: 657641 6 well 0.4um transparent) üzerine PHA-M ile aktive edilmiş T hücreleri her kuyucuğa 3x105 sayıda hücreler PRMI-1640 (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) %10 fötal sığır serumu (FBS, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya), %1 primocin (İnvivogen, California, ABD) ve %1 stabil glutamine (Capricorn Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) içeren kültür medyumu içinde ekildi..

3.2.8. Ko-kültür (birlikte kültür) sonrası analizler

3.2.8.1. Ko-kültür sonrası T hücrelerinin apoptozunun Annexin-PI ile flow sitometrik analizi

MKH ve miRNA transfekte MKH'ler ile ko-kültür edilmiş T hücrelerinin apoptozuna MKH ve miRNA transfekte MKH'lerin etkisini değerlendirmek için APC Annexin V apoptoz kiti (Tonbo, California, ABD) ve PE Propidium iyodür (PI, Cayman Chemical, Michigan, ABD) kullanıldı. Böylece ko-kültür edilmiş T

lenfositlerinin apoptozu analiz edildi. Bunun için; hücrelerin Annexin V/PI analizi üretici firmanın protokolü izlenerek gerçekleştirildi. iWJ-MKH'ler ve miR-181a transfekte edilmiş iWJ-MKH'ler ile ko-kültür edilmiş T hücreleri ve kontrol grubu olarak T75 flaskta kültüre edilmiş yalnız T hücreleri 450xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edilerek hücre pelleti oluşturuldu ve soğuk PBS (Thermofisher, Massachusetts, ABD) ile yıkandı. Hücre pelleti üzerine 400 µL bağlanma solüsyonu, 5 µL Annexin ve 1 µL PI boyalarından eklenerek 15 dakika süresince oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. Süre sonunda 300 µL bağlanma solüsyonu eklenerek flow sitometri cihazında (Agilent Novocyte 3500, California, ABD) okutularak NovoExpress software (Agilent, CA, ABD) ile analiz işlemleri gerçekleştirildi.

3.2.8.2. Ko-kültür sonrası T hücrelerinin proliferasyon ve apoptozunun cell cycle analizi ile flow sitometrik analizi

MKH ve miRNA transfekte MKH'ler ile ko-kültür edilmiş T hücrelerinin apoptozuna MKH ve miRNA transfekte MKH'lerin etkisini değerlendirmek için cell cycle analizi yapıldı. miR-181a transfekte edilmiş iWJ-MKH ve iWJ-MKH hücreleri ile birlikte kültüre edilmiş T hücreleri ve kontrol grubu olarak T75 flaskata kültüre edilmiş T hücreleri toplanarak 450xG'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüjden sonra pellet üzerine %80 ethanol eklenerek +4℃ 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra -20℃ inkübe edildi. 4 günün sonunda 18 ml dPBS eklenerek 600xG'de 8 dakika boyunca santrifüjlendi. Her örneğe 50µL RNAase soluation eklendi. Bunun için 200µg/ml şeklinde stoklanmış RNAase soluation'dan 70 µL alınarak 280µL dPBS içerisinde dilüe edildi. RNAase soluation eklendikten sonra 37℃ 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra her örneğe 200µL PI eklendi. Bunun için 70 µl PI üzerine 1330 µL dPBS eklenerek dilüe edildi. PI eklendikten sonra hücrler 30 dakika boyunca 37℃ inkübe edildi. 30 dakika sonra her bir örneğin üzerine 250µL dPBS eklenerek flow sitometri cihazında (Agilent Novacyte, 3500) okutuldu. NovoExpress software (Agilent, CA, ABD) programında analiz işlemleri gerçekleştirildi.

3.2.8.3. Ko-kültür sonrası T hücrelerinin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyon

MKH ve miRNA transfekte MKH'ler ile ko-kültür edilmiş T hücrelerinin ve kontrol grubu olarak T75 flaskata kültüre edilmiş T hücreleri toplanarak 450xG'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Pellet üzerine 100 µL bağlanma solüsyonu (%2 FBS içeren PBS) ve 1 µL ilgili antikor eklenerek, 30 dakika boyunca +4°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 400 µL PBS eklenerek flow sitometri cihazında okutuldu. NovoExpress software programında analiz işlemleri gerçekleştirildi.İzolasyonun verimliliğini değerlendirmek için FITC anti-human CD3 (Biolegend, California, ABD), APC/Cyanine7 anti-human CD4 (Biolegend, California, ABD), PE anti-human CD45 (Biolegend, California, ABD), Brilliant violet 711 anti-human CD8 (Biolegend, California, ABD) ve FITC anti human CD69 (Biolegend, California, ABD), PE anti-mouse/rat/human FOXP3 (Biolegend, California, ABD), Brilliant violet ant-human T-BET(Biolegend, California, ABD) antikorları kullanıldı.

3.2.8.4. Ko-kültür sonrası T hücrelerinin hücre proliferasyonu analizi

MKH ve miRNA transfekte MKH'ler ile ko-kültür edilmiş T hücrelerinin proliferasyonunu belirlemek için Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE, CellTrace CFSE Cell Proliferation Kit, Thermo Fisher, USA) kullanıldı. Bunun içiin 5mM konsentrasyonunda stoklanmış CFSE 9 mL PBS içinde dilüe edildi. 3x106 sayıda hücre 450xG'de 5 dakika boyunca santrifüjlendi. Pellet üzerene dilüe edilmiş CFSE solüsyonu eklendi ve 10 dakika boyunca 37°C'de inkübe edildi. Boyanmamış hücreleri ortamdan uzaklaştırmak için %1 oranında FBS içeren soğuk dPBS kullanıldı. 6 well'in 2 kuyusuna miR-181a transfekte edilmiş iWJ-MKH ve iWJ-MKH ekildi. 6 well'in 1 kuyusuna ve MKH'ler olan kuyulara insert membran üzerine 1x106 sayıda CFSE ile boyanmış T hücresi PRMI-1640 (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) %10 fötal sığır serumu (FBS, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya), %1 primocin (İnvivogen, California, ABD) ve %1 stabil glutamine (Capricorn Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) içeren kültür medyumu içinde ekildi. Kültürün 24, 48, 72, 96 saatlerinde 250.000 sayıda T hücre toplanarak flow sitometri ile analiz edildi.

3.2.8.5. Ko-kültür sonrası sitokin düzeylerinin ELISA analizi

MKH ve miRNA transfekte MKH'ler ile ko-kültür edilmiş T hücrelerinin bulunduğu 24 saat ve 96 saat kültür medyumu toplanarak 1000xG'de 10 dakika boyunca santrifüjlendi ve -20℃'de bırakıldı. Çözünmüş medyum Qubit-4 Flourometer (İnvitrogen, Massachusetts, ABD) cihazında okutulazrak total protein miktarları hesaplandı. Human TGF-1β (Human Transforming Growth Factor Beta 1, Elabscience, İstanbul, Türkiye) ve human IFN-γ (human İnterferon gamma, Elabscience, İstanbul, Türkiye) kitleri kullanılarak üretici firmanın protokolü izlenerek gerçekleştirildi. 96 well'in kuyucuklarına 100µL örnekten koyulup 90 dakika 37℃'de inkübe edildi. Sıvı kısım atılarak 100µL Biotinylated Detection Ab/Ag eklendi ve 1 saat boyunca 37℃'de inkübe edildi. Sıvı kısmı aspire edilerek 3 kere wash buffer ile yıkandı ve 100 µL HRP Conjugate eklenerek 30 dakika 37℃'de inkübe edildi. HRP Conjugate ortmadan uzaklaştırmak için 5 kere wash buffer ile yıkandı. 90µL substrate reagent eklendi. 15 dakika 37℃'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 50µL Stop Soluation eklendi ve absorbans değerleri 450 nm dalga boyunda monokromatör sistemli mikroplaka okuyucuda (BIOTEK ELx808IU, Vermont, ABD) belirlendi.

3.2.8.6. Ko-kültür sonrası T hücrelerinin qRT-PCR yöntemi ile DUSP5/6, IL-6, STAT-1, TGFB1 ve TLR-4 gen ekspresyon analizi

MKH ve miRNA transfekte MKH'ler ile ko-kültür edilmiş T hücrelerinde, T hücre reseptörü (TCR) sinyalleme aktivasyonuna neden olan DUSP5/6, T hücre farklılaşmasınada önemli role sahip olan IL-6, sitokin araçlı sinyal yolağı aktivasyonunu gerçekleştiren STAT-1, T hücre migrasyonu ve immun yanıta neden olan TGFB1 ve T hücre aktivasyonuna neden olan TLR-4 genleri açısından karakterizasyonları yapıldı. Bu amaçla, ilk olarak T lenfositlerinden Qiagen miRNeasy Tissue/Cells Advanced Mikro kit (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak total RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen RNA'ların konsantrasyonları NanoDrop™ One^{C} (THERMO FISHER SCIENTIFIC Nanodrop-one, Massachusetts, ABD) cihazı ile ölçüldü. cDNA sentezi (cDNA synthesis, ABT, Ankara, Türkiye) üretici firmanın protokolü izlenerek gerçekleştirildi. Ardından ilgili primerler kullanılarak RT2-PCR analizi yapıldı ve sonuçlar 2-ΔΔCT formülü kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi.

3.2.9. Sitotoksisite analizi

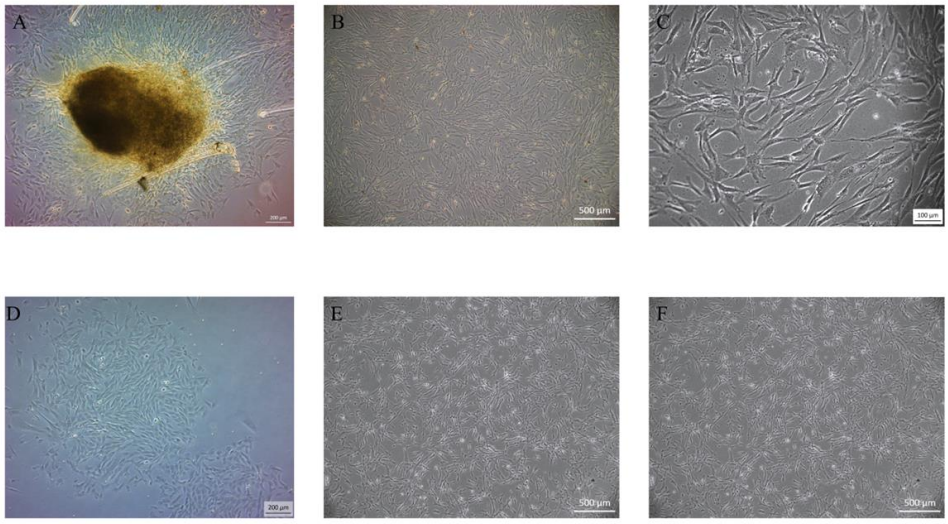
Elde edilen sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak sunuldu ve istatistiksel analizler GaphPad Prism 9.3.1 yazılımı kullanılarak yapıldı. Deney süresince grupların etkileşimli etkilerini değerlendirmek için hem tek yönlü hem de iki yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Anlamlılık düzeyleri gruplar arasında *$p<0,05$, **$p<0,01$, ***$p<0,001$ ve ****$p<0,0001$ olarak gösterildi. Ayrıca, $p<0,05$ olduğunda farklılıklar %95 güven aralığı ile anlamlı kabul edildi.

Real-time PCR analizinin istatistiksel değerlendirmesi için, elde edilen Ct değerlerinden ΔΔCt değerleri hesaplandı. Bu değerler, referans gen ile hedef gen arasındaki kat değişimini (fold change) göstermektedir. Elde edilen verilerin normal dağılım özelliklerini değerlendirmek için Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri kullanıldı. Daha sonra, ANOVA Tukey Post hoc testi ile istatistiksel anlamlıkları değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. İnsan Wharton Jeli Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin (iWJ-MKH'lerin) İzolasyonu ve Kültürü

İzole edildikten sonra kültüre alınan hücrelerin günlük invert faz kontrast mikroskobik analizlerinde eksplant yoluyla izole edilenlerde ortalama 5. günde (Şekil 4.1 A) eksplantın çevresinde hücrelerin %100 konfluent olduğu enzimatik yolla izole edilenlerde (Şekil 4.1 D) ise ortalama 3.günde hücrelerin tutunduğu 4-5.günlerde koloni oluşturduğu (Şekil 4.1 C,F) 7.günde (Figure 4.1 B,E) ise %40 konfluensiye ulaştığı görüldü. Hücreler, iğ ya da mekik şeklinde yıldız şekilli fibroblast-benzeri morfolojiye sahipti (Şekil 4.1).

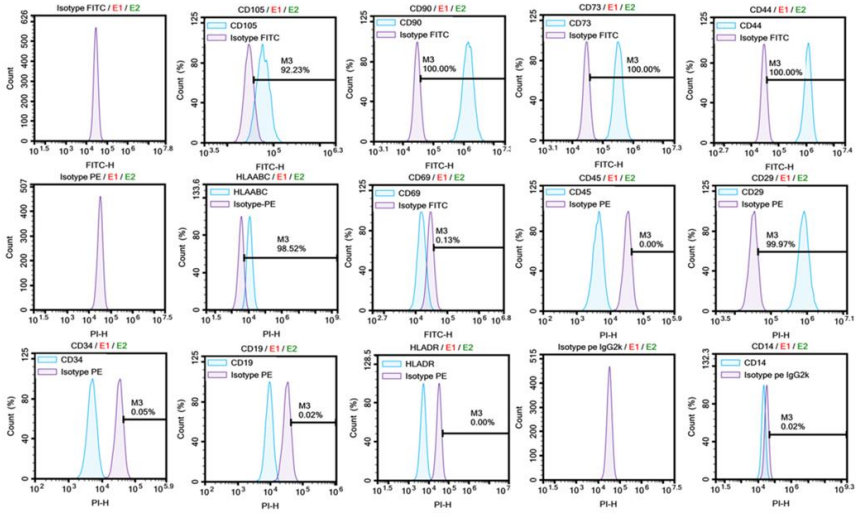


Şekil 4.1. Kültüre alındıktan sonra iWJ-MKH hücrelerinin erken ve ileri pasajlardaki faz-kontrast mikroskop görüntüleri. A: İzolasyonun 5. günü. Eksplantın çevresinde %100 konfluent olan hücreler. B: Eksplant yolla izole edilmiş iWJ-MKH'lerin izolasyonun 5. günü (P 0). %40 konfluensiye ulaşmış iğ yada mekik şeklinde yıldız şekilli fibroblast-benzeri hücreler.C: Kültürün 3. günü (P 3). D: Enzimatik yolla izole edilmiş iWJ-MKH'lerin izolasyonun 5. günü (P 0). %40 konfluensiye ulaşmış iğ yada mekik şeklinde yıldız şekilli fibroblast-benzeri hücreler F: Kültürün 3. günü. Skala barlar: A=200 µm, B=500 µm, C=200 µm, D=200 µm, E=500 µm, F=500 µm

4.2. iWJ-MKH'lerin İmmunofenotipik Olarak Karakterize Edilmesi

4.2.1. iWJ-MKH'lerin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonu

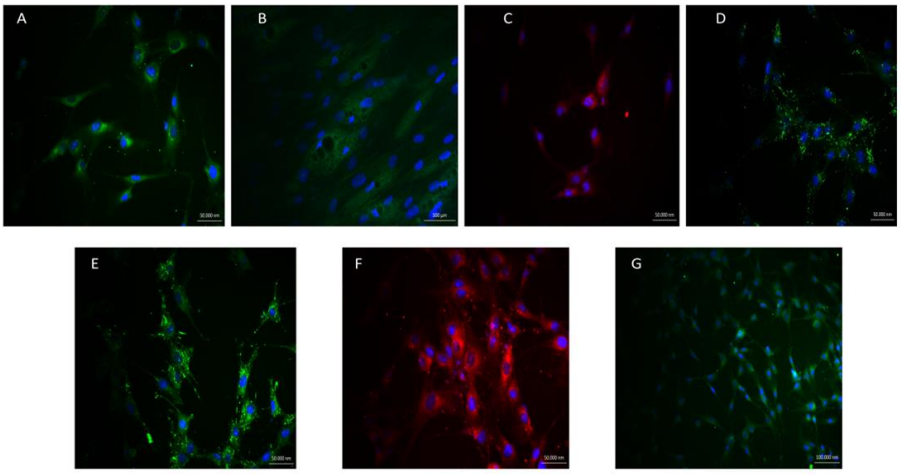
iWJ-MKH 3.pasaja geldiğinde, kök hücre belirteçleri flow sitometri ile immunofenotipik analizi yapıldığında CD105 pozitifliği %92.23, CD90 pozitifliği %100.00, CD73 %100.00; CD44 %100.00, HLA-A-B-C %98.52, negatifliği CD69 %0.13, CD45 %0.00, CD29 %99.97, CD34 %0.05, CD19 %0.02, HLA-DR %0.00, CD14 % 0.02 olarak belirlendi.



Şekil 4.2. 3.pasaj'da iWJ-MKH'lerin flow sitometri ile karakterizasyonu. CD90 (100%), CD73 (100%), HLA-B-C (98.52%), CD44 (100%), CD105 (92.23%), ve CD29 (99.97%) pozitif iken, CD69 (0.13%), CD34 (0.05%), CD25 (0.02%), CD19 (0.02%), CD45 (0.00%), CD (0.02%) ve HLA-DR (0.00%) negatifdir. Histogramda hedef antikorlar mavi ve izotip antikorlar (negatif kontrol) mor ile gösterilmiştir.

4.2.2. iWJ-MKH'lerin immunofluoresan işaretleme ile immunofenotiplemesi

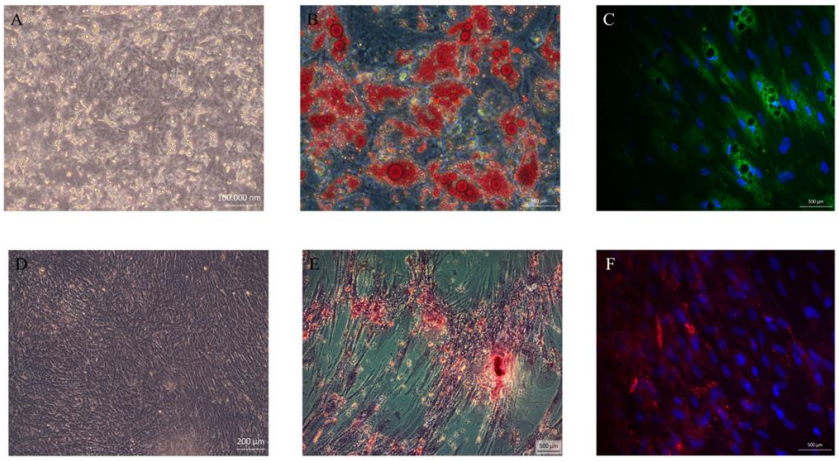
iWJ-MKH'lerin karakterizasyonu için ilaveten β-aktin, fibronektin, c-FOS, nestin, p-GAMA, α-SMA, vimentin antikorları ile IF ile işaretlendiğinde pozitif olduğu belirlendi



Şekil 4.3. iWJ-MKH'lerin immunofloresan işaretleme (İF/IHC) ile immunofenotipik karakterizasyonu. A: B-actin (Yeşil) (Skala bar=50.000µm), B: Fibronectin (Yeşil) (Skala bar=500 µm), C: c-FOS (Kırmızı) (Skala bar=50.000µm), D: Nestin (Yeşil) (Skala bar=50.000µm), E: P-GAMA (Yeşil) (Skala bar=50.000µm), F: A-SMA (Kırmızı) (Skala bar=50.000µm), G: Vimentin (Yeşil) (Skala bar=50.000µm) İF işaretlenmesi. Hücre çekirdekleri İF analizlerde DAPI boyası (Mavi) ile işaretlenmiştir.

4.2.3. iWJ-MKH'lerin karakterizasyonu için in vitro farklılaşma analizleri

MKH'lerin farklılaştırma karakterizasyonu için mezoderm kökenli hücrelere farklılaşabilme özelliklerinin gösterilebilmesi amacıyla hücreler; adipojenik, osteojenik farklılaşma analizlerine alındığında her iki tip hücreye farklılaşabildiği belirlendi. Adipojenik indüksiyon sonrasında farklılaşan iWJ-MKH'lerde nötral yağ damlacıklarının Oil Red-O boyası ile pozitifliği ve immunofloresan olarak adiponektin pozitifliği gösterilmiştir (Şekil 4.4 A, B, C). Osteojenik indüksiyon sonrasında farklılaşan iWJ-MKH'lerde mineral noduller Alizarin red S boyası ile pozitifliği ve immunofloresan olarak osteokalsin pozitifliği gösterilmiştir.



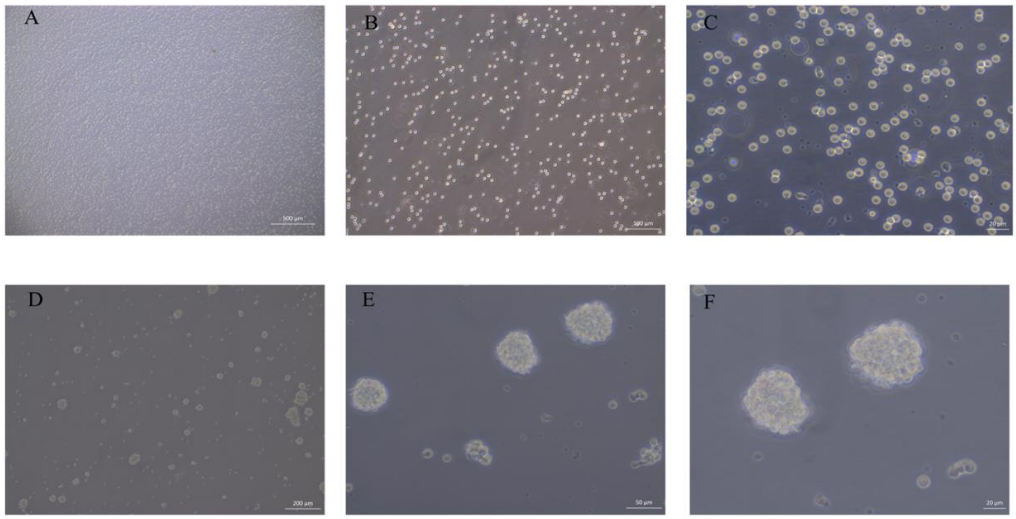
Şekil 4. 3. iWJ-MKH'lerin immunhistokimyasal boyamalar ile karakterizasyon deneyleri. Farklılaşmış hücrelerin A: Adipojenik indüksiyondan 20 gün sonra yağ hücrelerine dönüşmüş MKH'lerin zıt-faz mikroskobik görünümü (Ölçek çubuğu =100.000 µm) B: Adipojenik farklılaşmış hücrelerde nötral yağ damlacıkları Oil Red O boyası (kırmızı) ile gösterilmesi (Ölçek çubuğu =500 µm). C: iWJ-MKH'lerin adipojenik farklılaşmasının immunofloresan işaretleme (İF/IHC) ile adiponektin (yeşil) pozitifliği gösterilmesi. (Skala bar: 500 µm) D: Osteojenik indüksiyondan 22 gün sonra oluşan mineral nodüllerin zıt-faz mikroskobik görüntüleri (Ölçü çubuğu =200 µm) E: Osteojenik farklılaşmış hücrelerde mineral nodüllerin Alizarin Red S boyası ile gösterilmesi (kırmızı) (Ölçek çubuğu =500 µm). F: iWJ-MKH'lerin osteojenik farklılaşmasının immunofloresan işaretleme (İF/IHC) ile osteokalsin (kırmızı) pozitifliği gösterilmesi. (Skala bar: 500 µm).

4.3. İnsan periferik Kanından T hücrelerin (i-pan T-hücreleri) İzolasyonu, Kültürü ve Karakterizasyonu

4.3.1. İnsan periferik kanından T hücre izolasyonu ve kültürü

İnsan periferik kanından tüm/pan T-hücre izolasyonu, immunseleksiyon kiti kullanılarak negatif seleksiyon yöntemiyle gerçekleştirilerek kültüre alındı. Kültürün 0. günü ve 24. saatinde invert faz kontrast mikroskobik analizlerinde T hücrelerin durumu gözlemlendi. 0.günde yapılan analizlerde insan periferik

kandan izole edilen T hücrelerinin invert mikroskoptaki incelemelerinde hücreler, solüsyon kültür ortamında yuvarlak, hücre çekirdeği seçilmeyen ve parlak ve berrak görünümleri ile vital T hücre morfolojisinde ve tek hücre süspansiyonu halinde izlenmekteydi (Şekil 4.5 A ve B). 24 saat boyunca PHA-M ile uyarılmış pan T hücrelerinin koloni oluşturduğu, hücre morfolojilerinin sabit olmadığı, değiştiği ve yapılarında sitoplazmik uzantılar oluşturduğu gözlemlendi (Şekil 4.5.).

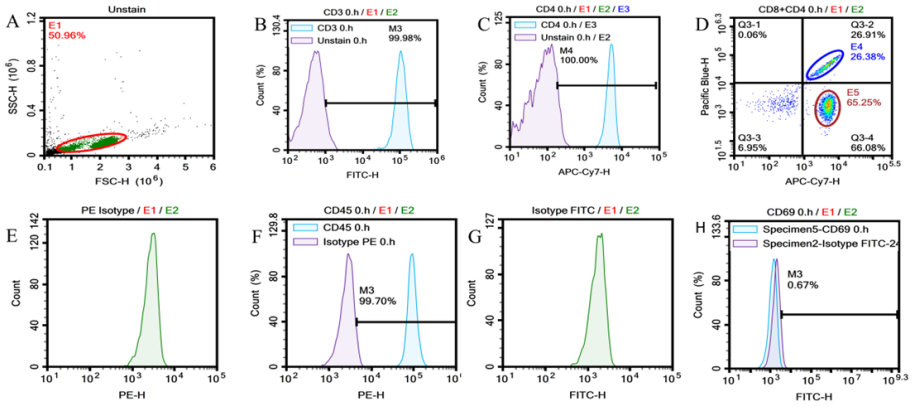


Şekil 4. 4. İnsan periferik kandan izole edilen uyarılmamış T hücrelerinin ve PHA-M ile 24 saat uyarılan T hücrelerinin invert mikroskoptaki analizi. A, B: T hücre morfolojisinde ve tek hücre süspansiyonu halinde izlenmekte. C, D, E: Uyarma sonrasında hücre morfolojilerinin sabit olmadığı, değiştiği ve yapılarında sitoplazmik uzantılar (D kırmızı ok ile gösterilmiştir) oluştuğu gözlemlendi. Aktivasyonu gösteren prolifere olan hücreler sağlıklı sferik koloniler (E koloniler mor kare içerisinde gösterilmiştir) oluşturdu. Skala barlar: A=50 µm, B=500 µm, C=500 µm, D=100 µm, E=200 µm

4.3.2. İnsan periferik kanından izole edilen T hücrelerinin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonu

4.3.2.1. İnsan periferik kanından izole edilmiş uyarılmamış T hücrelerin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonu

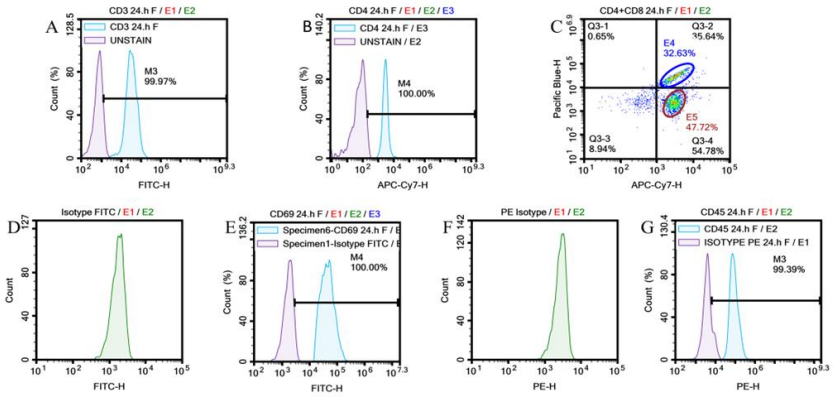
Periferik kandan izole edilen tüm/pan T hücrelerinin hücre belirteçleri flow sitometri ile immunofenotipik analizi yapıldığında CD4 pozitifliği %100.00, CD3 pozitifliği %99.98, CD45 pozitifliği %99.70, CD4+CD8 pozitifliği %26.38, CD69 negatifliği %0.67 olarak belirlendi (Şekil 4.6).



Şekil 4. 5. Periferik kandan izole edilen tüm/pan T hücrelerinin flow sitometri ile karakterizasyonu. CD3 (99.98%), CD4 (100%), CD4+CD8 (26.38%), CD45 (99.70%), pozitif iken, CD69 (0.67%) negatifdir. Histogramda hedef antikorlar mavi ve izotip antikorlar (negatif kontrol) mor ile gösterilmiştir.

4.3.2.2. İnsan periferik kanından izole edilmiş uyarılmış T hücrelerin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonu

Periferik kandan izole edilen ve 24 saat boyunca PHA-M ile uyarılmış pan T hücrelerinin hücre belirteçleri flow sitometri ile immunofenotipik analizi yapıldığında CD4 pozitifliği %100.00, CD3 pozitifliği %99.97, CD45 pozitifliği %99.39, CD4+CD8 pozitifliği %32.63, CD69 pozitifliği %100.00 olarak belirlendi (Şekil 4.7).



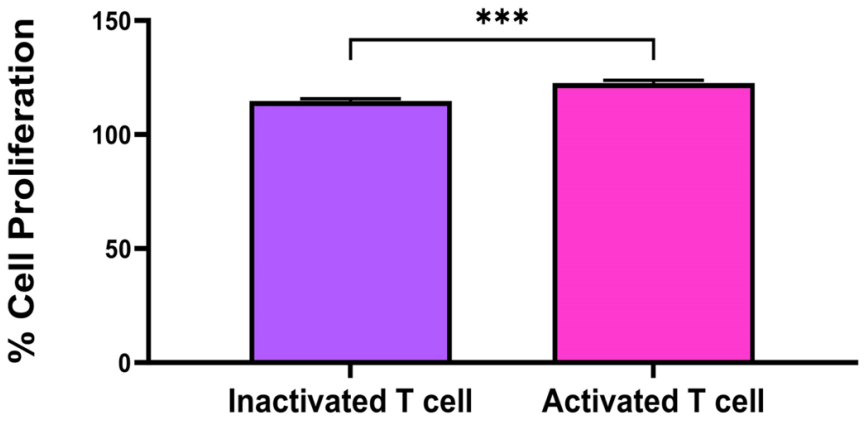
Şekil 4. 6. Aktive edilen tüm/pan T hücrelerinin flow sitometri ile doğrulanması. CD3 (99.97%), CD4 (100%), CD4+CD8 (32.63%), CD45 (99.39%), CD69 (100%) pozitifdir. Histogramda hedef antikorlar mavi ve izotip antikorlar (negatif kontrol) mor ile gösterilmiştir.

4.3.2.3. İnsan periferik kanından izole edilmiş uyarılmış T hücrelerinin uyarılmasının doğrulanmas

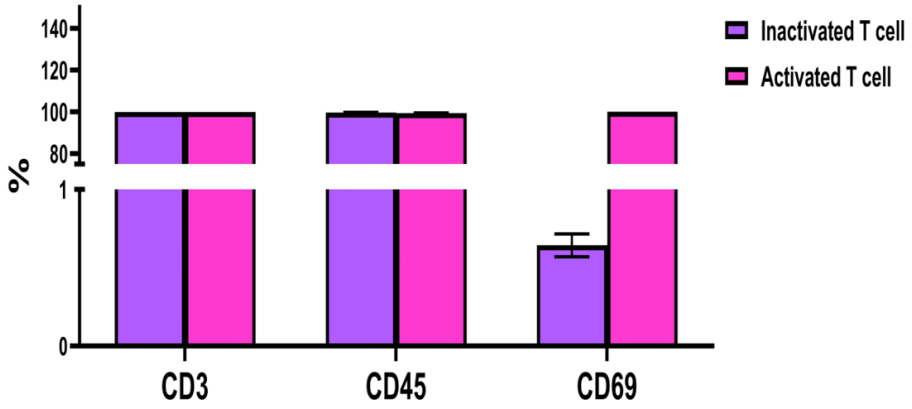
Periferik kandan izole edilen ve 24 saat boyunca PHA-M ile uyarılmış pan T hücrelerinin uyarıldığı CCK-8 testi ile canlılık ve proliferasyon açısından ve akım sitometri cihazında ise %CD45 (%lenfosit), %CD3 ve %CD69 antikor artışlarıyla tespit edildi. Aktivasyondan sonra T hücreleri; %CD3 ve %lenfosit/CD45 açısından aktive olmamış T hücreleri ile benzer ekspresyon özelliğinde iken %CD69 ekspresyonunda istatistiksel açıdan önemli artış saptandı (***p<0.001) (Şekil. 4.8.). İlaveten uyarılma öncesi ve sonrası T hücre immunofenotiplemesinde kullandığımız spesifik belirteçler açısından da flow sitometrik analiz yapıldığında, CD3 (99.97%), CD4 (100%), CD4+CD8 (32.63%), CD45 (99.39%), CD69 (100%) pozitiflik belirlendi.

Periferik kandan izole edilen pan T hücrelerinin 24 saat boyunca PHA-M ile yapılan aktivasyonu ayrıca canlılık ve proliferasyon analizi CCK-8 ile doğrulandı. İnaktive T hücreleri ile karşılaştırıldığında 24 saatlik aktivasyonun sonunda T hücrelerinin canlılık ve proliferasyonunda önemli düzeyde artış saptandı (Şekil 4.8.). Bir başka deyişle yapılan analizlerde, uyarılmamış pan T-hücrelerine göre

uyarılmış pan T-hücrelerinde PHA-M'in canlılık ve proliferasyonu arttırdığı gözlendi (Şekil 4.9). Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu (***p<0.001). Uyarılma teyit edildikten sonra indirekt ko-kültür için düzenekler hazırlandı.



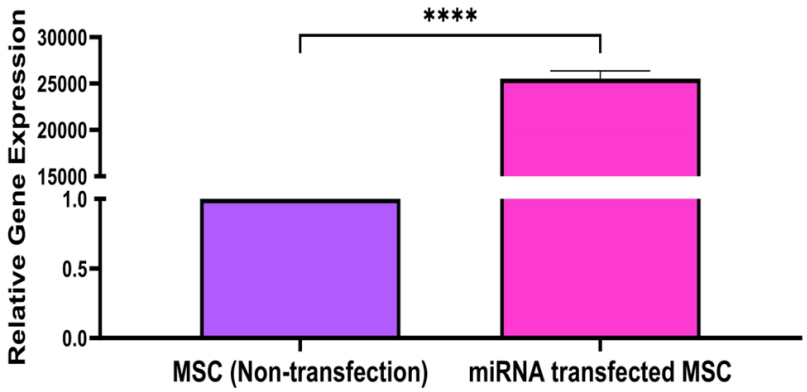
Şekil 4. 7 Aktive edilen pan T hücrelerinin canlılık ve proliferasyon ile aktivasyonunun doğrulanması. T hücrelerinin 24 saat boyunca PHA-M ile yapılan aktivasyonu ayrıca canlılık ve proliferasyon analizi CCK-8 ile doğrulandı. CCK-8 testine göre insan periferik kandan izole edilen ve PHA-M ile 24 saat uyarılan T hücreleri, uyarılmamış T hücreleri (kontrol) ile karşılaştırıldığında canlılık ve proliferasyonlarında artış tespit edildi (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).



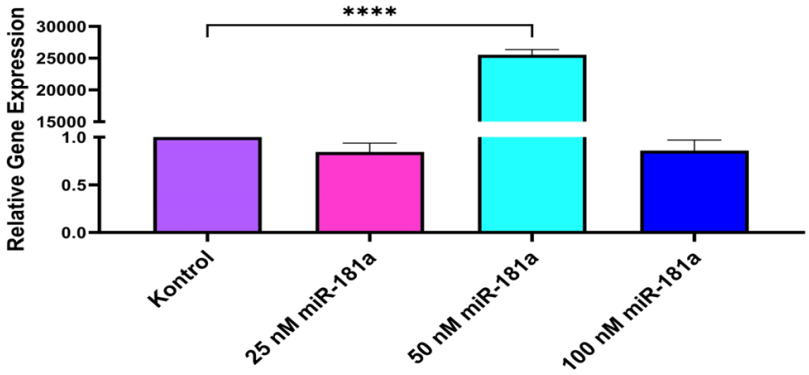
Şekil 4. 8. Aktive edilen pan T hücrelerinin flow sitometri ile aktivasyonunun doğrulanması. Aktivasyondan sonra T hücreleri; %CD3 ve %lenfosit/CD45 açısından aktive olmamış T hücreleri ile benzer ekspresyon özelliğinde iken %CD69 ekspresyonunda istatistiksel açıdan önemli artış saptandı (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

4.3.3. iWJ-MKH'lere mir-181a transfekte edilmesi

İnsan Wharton jölesnden izole edilmiş MKH'lere mir-181a transfeksiyonu ve bu transfeksiyonun verimliliğini belirlemek için qPCR yöntemi ile hedef miRNA düzeylerine bakıldı. Literatüre dayanarak 25nM, 50nM, 100nM konsentrasyonlarında transfeksiyon gerçekleştirilmiş ve kontrol grubuna 24.ve 48. saat aralıklarında qPCR uygulanmıştır (Şekil. 4.10.). 48.saat ve 50nM konsentrasyonundakı mir-181a düzeyinin trasnfeksiyon yapılması için uygun konsentrasyon olduğu belirlenmiştir (Şekil. 4.11).



Şekil 4. 9. Belirlenmiş doz ile yapılan miR-181a transfeksiyonun qRT-PCR ile doğrulanması. miR-181a tarnsfekte edilmiş iWJ-MKH'lerin (miRNA transfected MSC) transfekte edilmemiş MSC (Non-transfected) ile karşılaştırdığımızda; transfeksiyonun başarı ile gerçekleştirildiği gözlemnendi (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

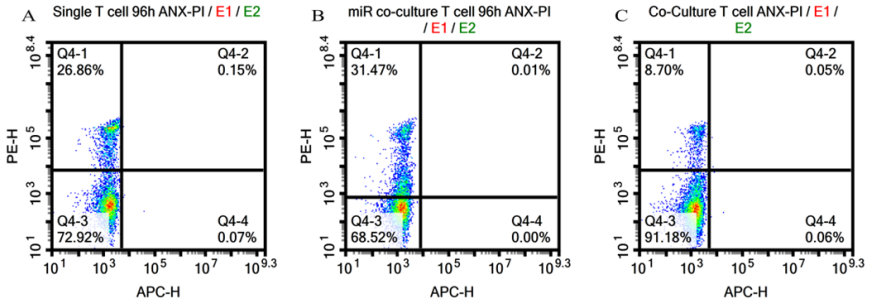


Şekil 4. 10. miR-181a trasnfeksiyonunda qRT-PCR ile doz optimizasyon analizi. miR-181a tarnsfekte edilmiş iWJ-MKH'lerin transfekte edilmemiş (kontrol) ile karşılaştırdığımızda;50nM konsentrasyondakı miR-181a dozunun uygun olduğu tespit edildi (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

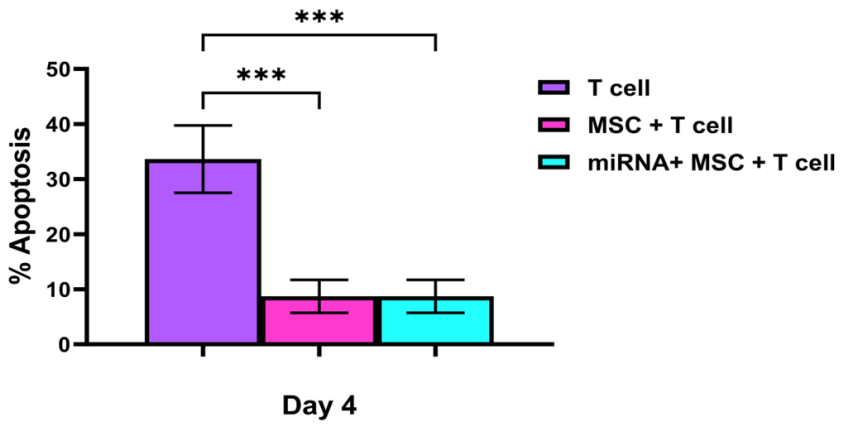
4.3.4. Ko-kültür sonrası analizler

4.3.4.1. Ko-kültür sonrası T hücrelerinin apoptozunun Annexin-PI ile flow sitometrik analizi Annexin-PI analizi

Ko-kültür sonrası pan T-hücrelerinin canlılıkları ve apoptotik aktivitelerini değerlendirmek açısından flow sitometri cihazı ile Annexin V/PI analizi yapıldı. AnnexinV-PI ile işaretlenen yalnız T hücreleri (kontrol) ile karşılaştırdığımızda; ko-kültürdeki T hücre apoptoz azalışına bağlı olarak indirekt kokültür deneylerindeki hem miRNA transfekte edilmiş hem de edilmemiş iWJ-MKH'lerin 4. günde apoptotik etki göstermediği tespit edildi. Hücrelerin flow sitometri cihazı ile gerçekleştirilen Annexin V/PI analizi (Şekil 4.12) ve istatistiksel değerlendirmeleri (Şekil 4.13) belirtilmiştir.



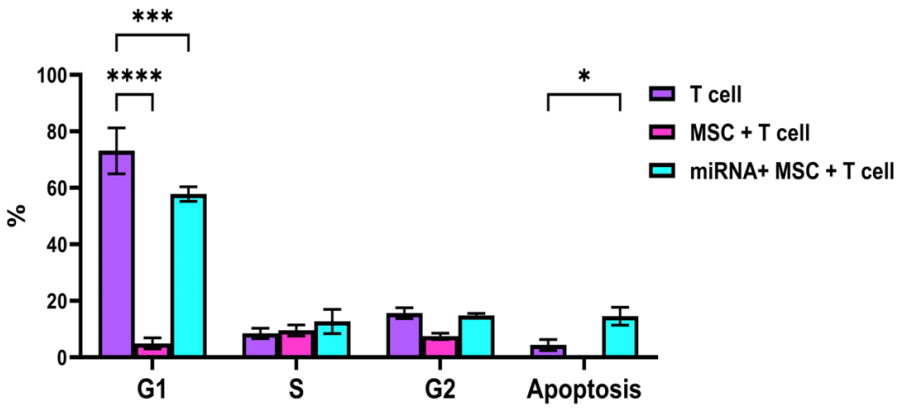
Şekil 4. 11. MKH'lerle ve miRNA transfekte MKH'ler ko-kültüre edilmiş T hücrelerin flow sitometri ile AnnexinV-PI analizi. Pan T-hücrelerinin Annexin V/PI analizi ile canlı (Q3), erken apoptoz (Q4), geç apoptoz (Q2) ve nekroz (Q1) değerlerinin flow sitometrik sonuçları. A: yalnız pan T-hücrelerini %72.92 canlılık; B: MKH-T hücre kültürü %68.52 C: miRNA+MKH+T-hücre %91.18 canlılık oranı belirlendi.



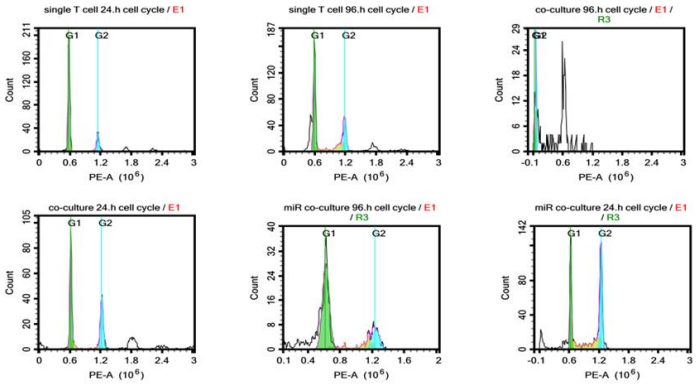
Şekil 4. 12. MKH'lerle ve miRNA transfekte MKH'ler ko-kültüre edilmiş T hücrelerin AnnexinV-PI ile analizi. AnnexinV-PI ile işaretlenen yalnız T hücreleri (kontrol) ile karşılaştırdığımızda; ko-kültürdeki T hücre apoptoz azalışına bağlı olarak indirekt ko-kültür deneylerindeki hem miRNA transfekte edilmiş hem de edilmemiş iWJ-MKH'lerin 4. günde apoptotik etki göstermediği tespit edildi (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

4.3.4.2. Ko-kültür sonrası T hücrelerinin proliferasyon ve apoptozunun cell cycle analizi ile flow sitometrik analizi

MKH ve miRNA transfekte MKH'ler ile ko-kültür sonrası T hücre proliferasyonun flow sitometri ile analizi yapıldığında; yalnız T hücreleri (kontrol) ile karşılaştırıldığında, indirekt ko-kültürdeki iWJ-MKH'lerin 4. günde proliferatif etki gösterdiği görüldü (Şekil. 4.14 ve 4.15).



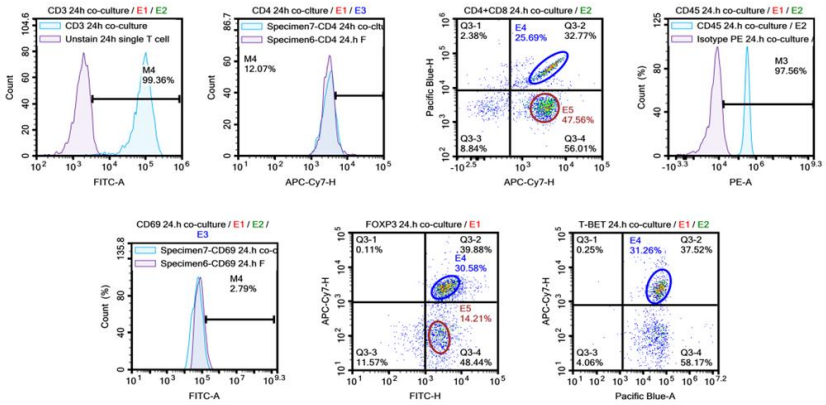
Şekil 4. 13. MKH'lerle ve miRNA transfekte MKH'ler ile ko-kültüre edilmiş T hücre hücre siklusu flow sitometri analizlerinin karşılaştırılması. Hücre siklusu analizinde indirekt ko-kültürdeki T hücrelerinin G0/G1 ve G2/M faz yüzdesi 4. günde yalnız T hücreleri ile karşılaştırdığımızda MKH'ler ile ko-kültür edilen T hücrelerinde proliferasyon ve apoptozun azaldığı ($p<0.05$) saptandı. Yalnız T hücreleri ile karşılaştırdığımızda miRNA transfekte MKH'ler ile ko-kültür edilenlerde ise proliferasyonun azaldığı ve apoptozun arttığı belirlendi. miRNA transfekte edilmemiş MKH'ler ile ko-kültür edilen T hücreleri ile karşılaştırdığımızda miRNA trasnfekte edilen MKH'ler ile kokültür edilen T hücrelerinin proliferasyonu ve apoptozunun arttığı gözlemlendi (*$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$,).



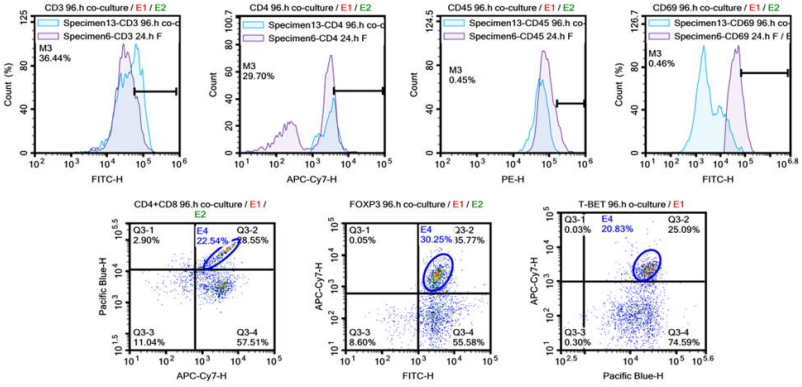
Şekil 4. 14. miRNA transfekte edilen ve edilmeyen MKH'ler ile ko-kültüre edilmiş T hücrelerin flow sitometrik hücre siklusu analizi. Hücre siklusu flow sitometri analizinde yalnız T hücrelerinin 24. ve 96. saatleri karşılaştırıldığında 96. saatde hücre siklusunun S fazında artış olduğu, miRNA trasnfekte edilen MKH'ler ile kokültür edilen T hücrelerinin 24.saatde 96.saate göre mitoz bölünmenin daha fazla olduğu, MKH'ler ile ko-kültür edilen T hücrelerinde 24.saatde G1, 96.saatde G2 fazında artış olduğu belirlenmiştir.

4.3.4.3. Ko-kültür sonrası T hücrelerinin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyon

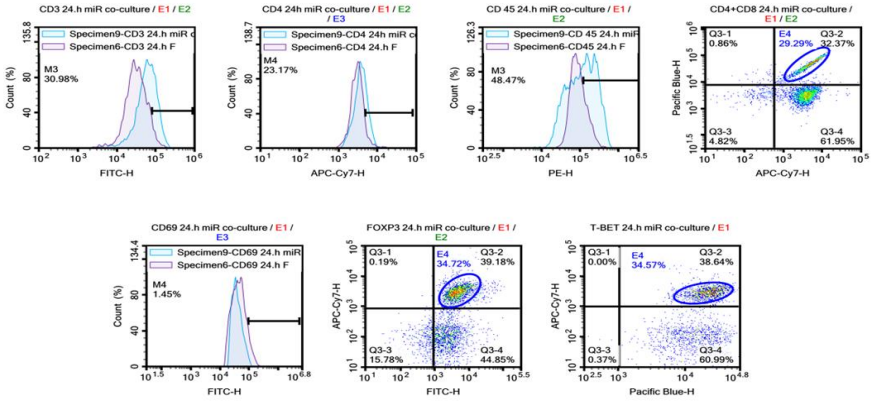
MKH ve miRNA transfekte MKH'ler ile ko-kültür sonrası T hücre spesifik belirteçleri kullanılarak yapılan flow sitometri analizi sonucunda yalnız T (kontrol grubu) ile karşılaştırdığımızda CD4 (%12.07), CD69 (%2.79) oranında kesin bir düşüş belirlendi. Ek olarak özellikle immunosupresyonu baskılayan Treg hücreleri (CD4+CD8+FOXP3) ve Th1 hücreleri miRNA trasnfekte MKH'lerle ko-kültür edilmiş T hücre popülasyonunda artış olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.16-4.24).



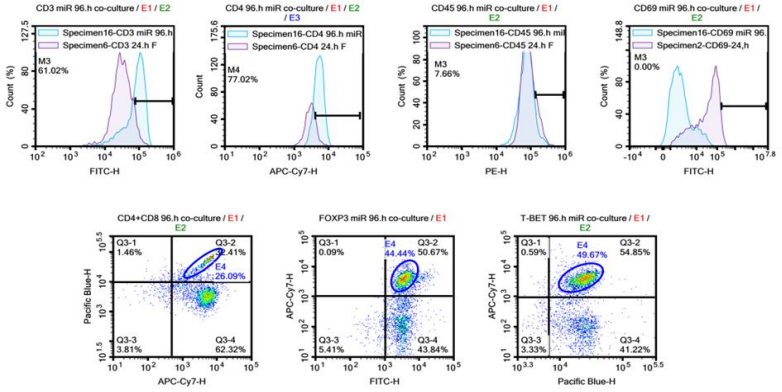
Şekil 4. 15. 24. saat boyunca MKH'lerle ko-kültüre edilmiş T hücrelerin flow sitometri ile karakterizasyonu. CD3 (99.36%), CD4+CD8 (25.69%), CD45 (97.56%), Treg (30.58%), Th1 (31.26%) pozitif iken, CD4 (12.07%), CD69 (2.79%), negatifdir. Histogramda hedef antikorlar mavi ve izotip antikorlar (negatif kontrol) mor ile gösterilmiştir.



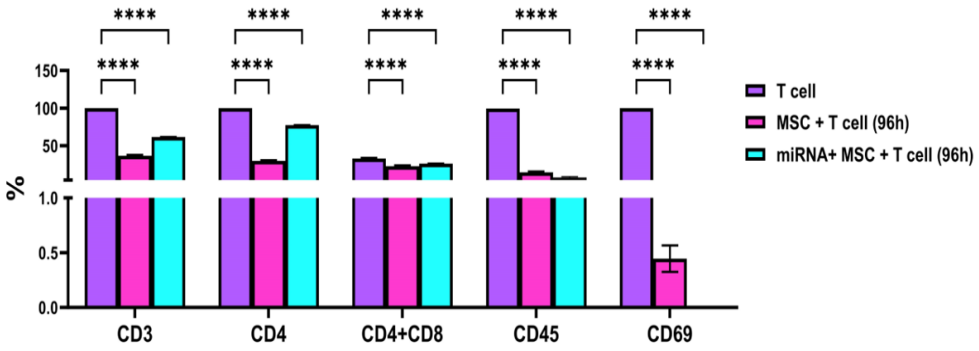
Şekil 4. 16. 96. saat boyunca MKH'lerle ko-kültüre edilmiş T hücrelerin flow sitometri ile karakterizasyonu. CD3 (36.44%), CD4+CD8 (%), CD45 (0.45%), Treg (30.25%), Th1 (20.83%) pozitif iken, CD4 (29.70%), CD69 (0.46%), negatifdir. Histogramda hedef antikorlar mavi ve izotip antikorlar (negatif kontrol) mor ile gösterilmiştir.



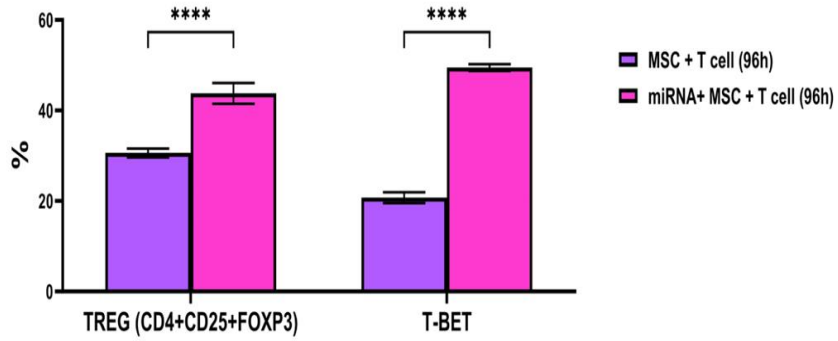
Şekil 4. 17. 24. saat boyunca mir-181a transfekte MKH'lerle ko-kültüre edilmiş T hücrelerin flow sitometri ile karakterizasyonu. CD3 (30.98%), CD4 (23.17%), CD4+CD8 (29.29%), CD45 (48.47%), Treg (34.72%), Th1 (34.57%) pozitif iken, CD69 (1.45%), negatifdir. Histogramda hedef antikorlar mavi ve izotip antikorlar (negatif kontrol) mor ile gösterilmiştir.



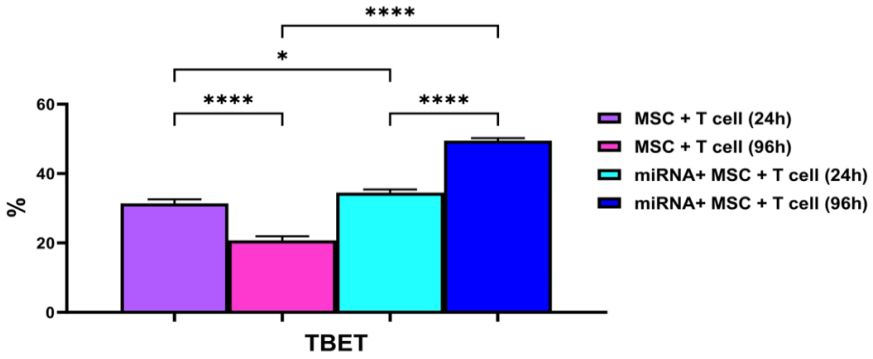
Şekil 4. 18. 96. saat boyunca mir-181a transfekte MKH'lerle ko-kültüre edilmiş T hücrelerin flow sitometri ile karakterizasyonu. CD3 (61.02%), CD4 (77.02%), CD4+CD8 (26.09%), CD45 (7.66%), Treg (44.44%), Th1 (49.67%) pozitif iken, CD69 (1.45%), negatifdir. Histogramda hedef antikorlar mavi ve izotip antikorlar (negatif kontrol) mor ile gösterilmiştir.



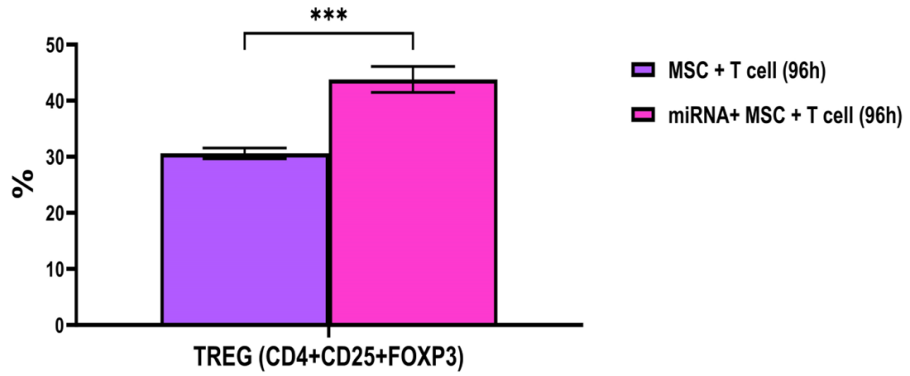
Şekil 4. 19. MKH'lerle ve miRNA transfekte MKH'ler ile ko-kültüre edilmiş T hücrelerin flow sitometri analizlerinin karşılaştırılması. MKH ve miRNA transfekte MKH'ler ile ko-kültür sonrası T hücre flow sitometrik analiz sonuçlarında; yalnız T hücrelere kıyasla MKH'lerle ko-kültüre edilmiş CD3+, CD4+, CD45+, CD4+ ve CD8+ T-hücreleri miRNA transfekte CD4+ T-hücrelerin sayında artış, yalnız T hücrelere kıyasla MKH'lerle ko-kültüre edilmiş CD69 + T-hücrelerinda azalma, miRNA transfekte CD69 T-hücrelerin sayında keskin azalma belirlenmiştir. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).



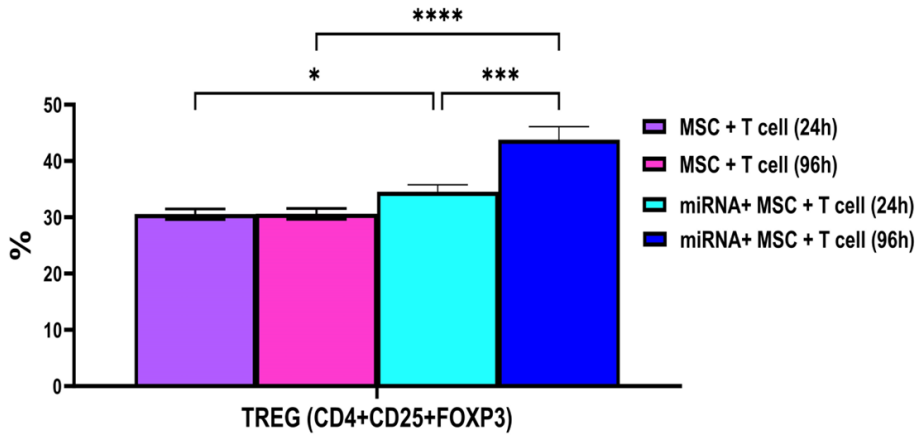
Şekil 4. 20. MKH'lerle ve miRNA transfekte MKH'ler ko-kültüre edilmiş Treg ve Th1 hücrelerin flow sitometri analizinin karşılaştırılması. MKH ve miRNA transfekte MKH'ler ile ko-kültür sonrası Treg ve Th1 hücreleri karşılaştırıldığında Treg hücreleri Th1 hücrelerine kıyasla hem MKH hemde miRNA transfekte hücrelerde artış belirlendi. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001).



Şekil 4. 21. MKH'lerle ve miRNA transfekte MKH'ler ko-kültüre edilmiş Th1 hücrelerinin flow sitometri analizinin karşılaştırılması. MKH ve miRNA transfekte MKH'ler ile ko-kültür sonrası T hücrelerin 24. ve 96. saat sonra yapılmış flow sonuçlarına göre Th1 hücreleri en çok miRNA transfekte MKH'lerle ko-kültüre edilmiş T hücre populasyonunda, en az MKH'lerle ko-kültüre edilmiş T popülasyonunda belirlenmiştir. 96.saat miRNA transfekte MKH'lerle ko-kültüre edilmiş T hücre popülasyonunda 24.saat miRNA transfekte MKH'lerle ko-kültüre edilmiş T hücre popülasyonuna kıyasla daha fazla Th1 hücrelerinin olduğu belirlenmiştir. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001).



Şekil 4. 22. MKH'lerle ve miRNA transfekte MKH'ler ko-kültüre edilmiş Treg hücrelerinin flow sitometri analizinin karşılaştırılması. MKH ve miRNA transfekte MKH'ler ile ko-kültür sonrası T hücrelerin 96. saat sonra yapılmış flow sonuçlarına göre Treg hücreleri MKH'lerle ko-kültüre edilmiş T popülasyonuna kıyasla miRNA transfekte MKH'lerle ko-kültüre edilmiş T hücre populasyonunda, daha fazla olduğu ve anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001).

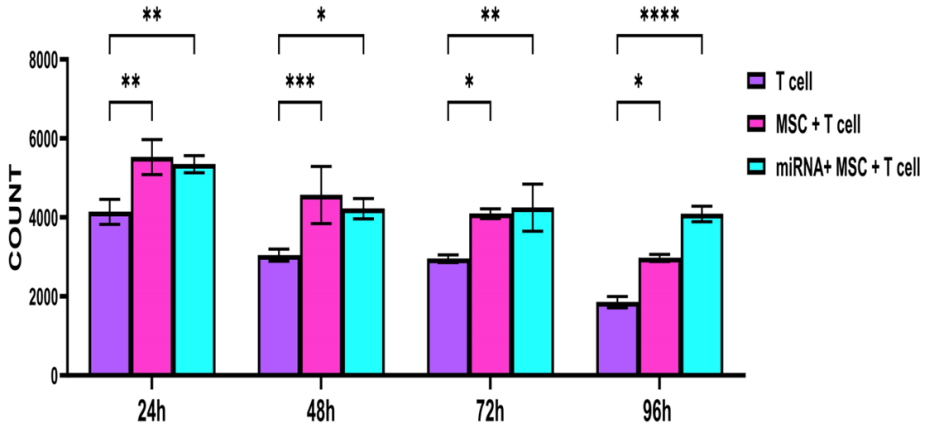


Şekil 4. 23. MKH'lerle ve miRNA transfekte MKH'ler ko-kültüre edilmiş Treg hücrelerin 24. ve 96. saat flow sitometri analizinin karşılaştırılması. MKH ve miRNA transfekte MKH'ler ile ko-kültür sonrası T

hücrelerin 24. ve 96. saat sonra yapılmış flow sonuçlarına göre Treg hücreleri en çok miRNA transfekte MKH'lerle ko-kültüre edilmiş T hücre populasyonunda, en az MKH'lerle ko-kültüre edilmiş T popülasyonlarında belirlenmiştir. 96.saat miRNA transfekte MKH'lerle ko-kültüre edilmiş T hücre popülasyonunda 24. saat miRNA transfekte MKH'lerle ko-kültüre edilmiş T hücre popülasyonuna kıyasla daha fazla Treg hücrelerinin olduğu belirlenmiştir (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001).

4.3.4.4. Ko-kültür sonrası T hücrelerinin hücre proliferasyonu analizi

MKH ve miRNA transfekte MKH'ler ile ko-kültür sonrası T hücre proliferasyonu 4 gün boyunca ko-kültürlerden örnekler alınarak gerçekleştirilen CFSE ile flow sitometri analizi yapıldığında yalnız (kontrol) grubuna kıyasla 96. saat miRNA trasfekte MKH'lerle yapılmış ko-kültürde hücre proliferasyon diğer 24. ve 96 MKH ve miRNA transfekte MKH'ler ile ko-kültür sonrası T hücre popülasyonu ile kıyaslandığında daha anlamlı olduğu belirlemiştir (Şekil. 4.25).

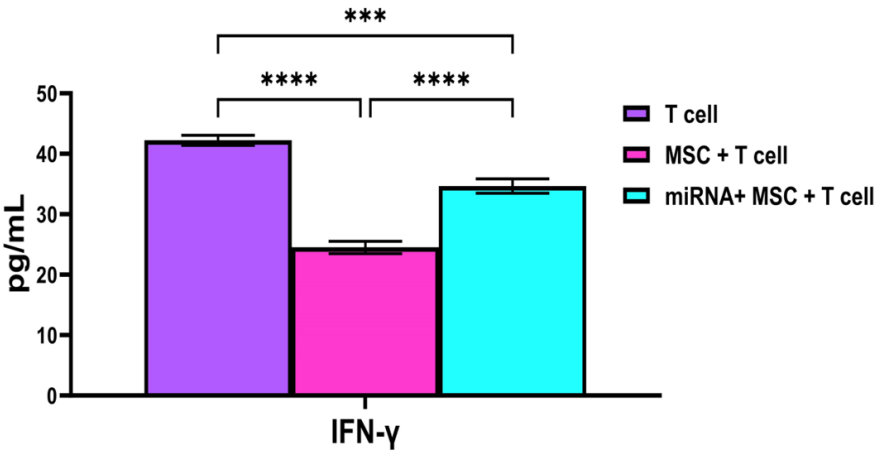


Şekil 4. 24. MKH'lerle ve miRNA transfekte MKH'ler ko-kültüre edilmiş T hücrelerinin CFSE ile hücre proliferasyonu analizinin karşılaştırılması. MKH ve miRNA transfekte MKH'ler ile ko-kültür sonrası T hücre proliferasyonun CFSE ile flow sitometri ile analizi yapıldığında; yalnız T hücreleri (kontrol) ile karşılaştırıldığında,

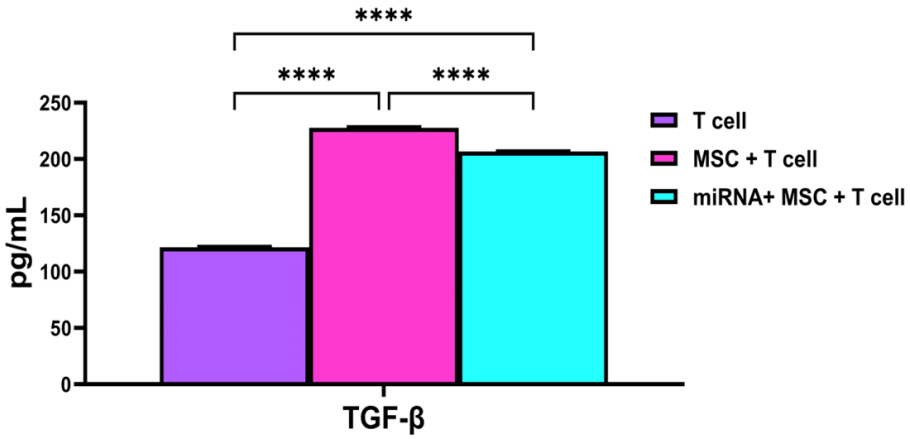
indirekt ko-kültürdeki iWJ-MKH'lerin 4. günde proliferatif etki gösterdiği görüldü.

4.3.4.5. Ko-kültür sonrası sitokin düzeylerinin ELISA analizi

MKH ve miRNA transfekte MKH'ler ile ko-kültür sonrası iWJ-MKH'lerin ortamdaki pro- ve anti-inflamatuar sitokinler olan IFN-gama ve TGF-β üzerine etkisinin ELISA analizi edildiğinde; 4.günde kontrol grubuna kıyasla miRNA transfekte MKH'ler ile ko-kültür ortamındakı IFN-gama, MKH'lerle ko-kültür ortamındakı İFN-gama oranına kıyasla daha fazla olduğu, TGF-β sitokin düzeyinin MKH'lerle ko-kültür ortamında daha fazla olduğu, kontrol grubunda ise en az olduğu görülmüştür (Şekil. 4.26 ve şekil. 4.27.).



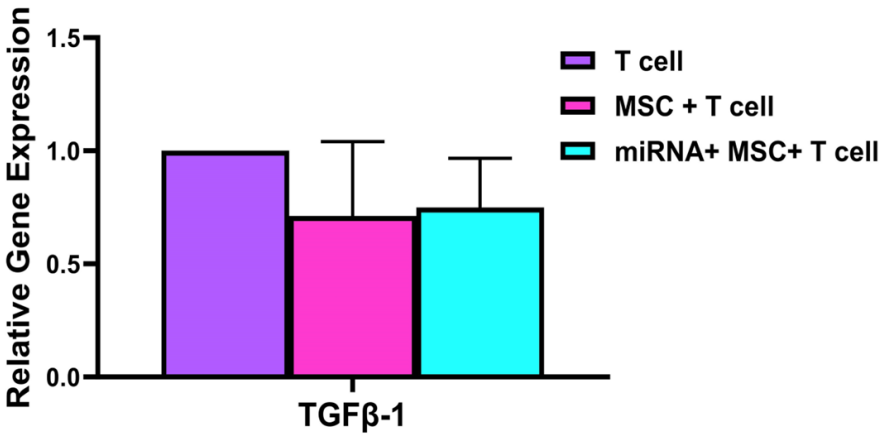
Şekil 4. 25. MKH'lerle ve miRNA transfekte MKH'ler ko-kültüre edilmiş T hücrelerinin salgı düzeylerinin karşılaştırılması. MKH ve miRNA transfekte MKH'ler ile ko-kültür sonrası iWJ-MKH'lerin ortamdaki pro-inflamatuar sitokin olan IFN-gama üzerine etkisinin ELISA analizi. 4. günde yalnız yalnız T (kontrol) kültür besiyeri ile karşılaştırdığımızda; MKH ve miRNA transfekte MKH+T hücre ko-kültür besiyerinde IFN-gama sekresyon düzeylerinde hem MKH hem de miRNA transfekte grupta azalma saptandı (*$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$) (Deney 3 defa tekrarlandı).



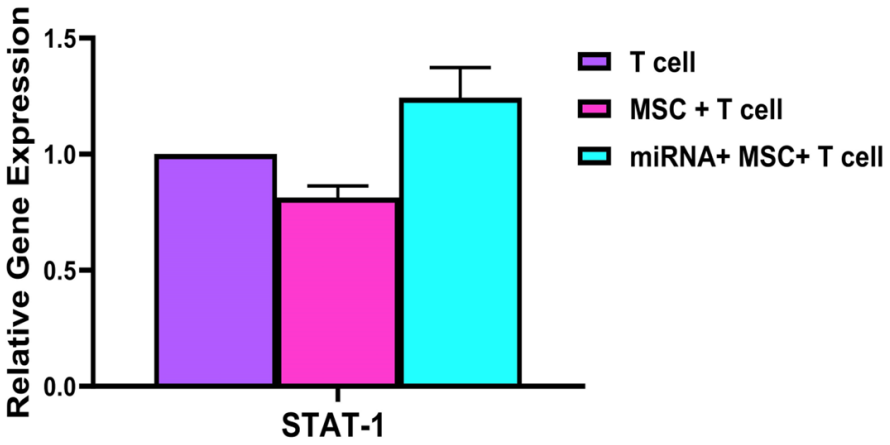
Şekil 4. 26. MKH'lerle ve miRNA transfekte MKH'ler ko-kültüre edilmiş T hücrelerin salgı düzeylerinin karşılaştırılması. MKH ve miRNA transfekte MKH'ler ile ko-kültür sonrası iWJ-MKH'lerin ortamdaki anti-inflamatuar sitokin olan TGF-beta üzerine etkisinin ELISA analizi. 4. günde yalnız yalnız T hücre (kontrol) kültür besiyeri ile karşılaştırdığımızda; MKH ve miRNA transfekte MKH+T hücre ko-kültür besiyerinde TGF-beta sekresyon düzeylerinde hem MKH hem de miRNA transfekte grupta azalma saptandı (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001) (deney 3 defa tekrarlandı).

4.3.4.6. Ko-kültür sonrası T hücrelerinin qRT-PCR yöntemi ile DUSP5/6, IL-6, STAT-1, TGFB1 ve TLR-4 gen ekspresyon analizi

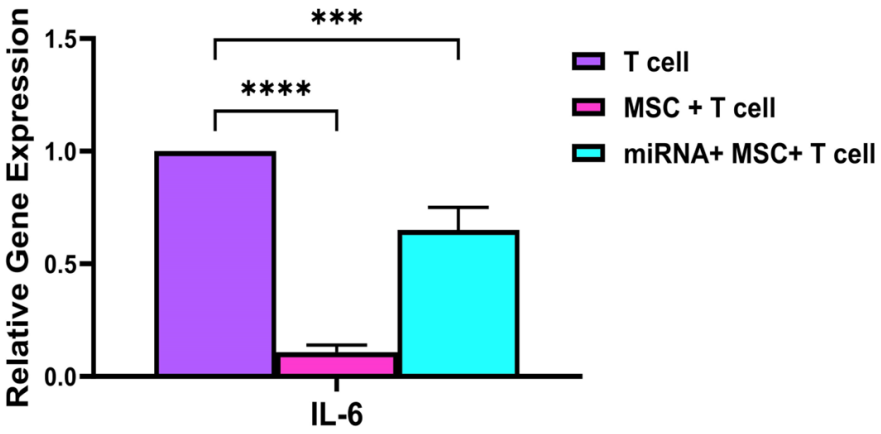
Yalnız kültür edilen T hücreleri ve MKH ve miRNA transfekte edilmiş MKH'ler ile ko-kültür edilen T hücrelerinin antiinflamatuvar TGF-beta ekspreyonu Real time PCR analizleri edildiğinde; yalnız T hücreleri (kontrol) ile karşılaştırdığımızda her iki ko-kültür grubunda da TGF-beta, IL-6 ve TLR-4 gen ekspreyonunun azaldığı, STAT-1 ekspresyonunun ise MKH ile kültür edilenlerde azaldığı ancak miRNA transfekte MKH'lerde arttığı belirlendi. Transfekte edilmemişler ile karşılaştırdığımızda, transfekte edilen MKH'ler ile ko-kültür edilen T hücrelerinde IL-6 ekspresyonunda artış, TGF-beta ve TLR-4 ekspresyonunun ise benzer olduğu belirlendi (Şekil 4.28.-4.36).



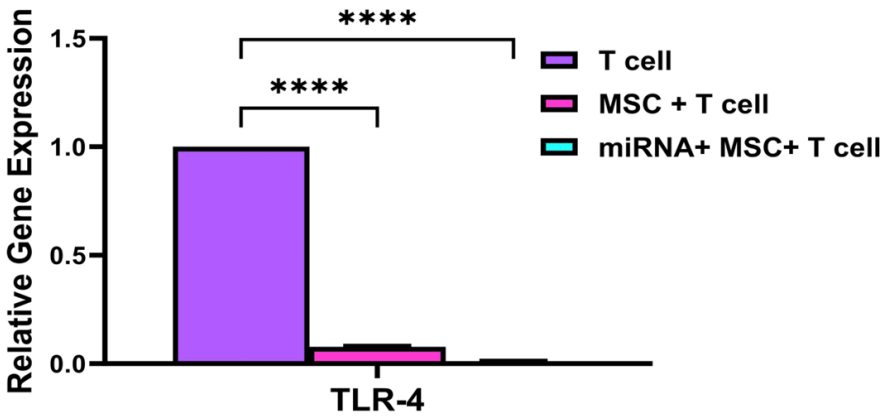
Şekil 4. 27. MKH'lerle ve miRNA transfekte MKH'ler ko-kültüre edilmiş T hücrelerin salgı düzeylerinin karşılaştırılması. Yalnız kültür edilen, MKH ve miRNA transfekte edilmiş MKH'ler ile ko-kültür edilen T hücrelerinin anti-inflamatuvar TGF-beta ekspreyonunun 4. gün Real time PCR analizleri ve karşılaştırılması. 4. günde MKH'lerle ko-kültüre edilmiş T hücrelerde TGF-beta gen ekspresyonu en az, yalnız T hücrelerde ise en fazla ekpresyona sahip olduğu saptanmıştır.



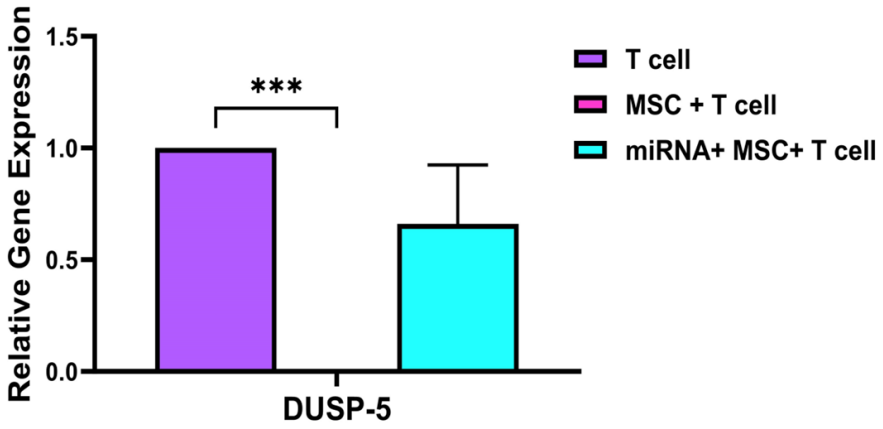
Şekil 4. 28. MKH'lerle ve miRNA transfekte MKH'ler ko-kültüre edilmiş T hücrelerin salgı düzeylerinin karşılaştırılması. Yalnız kültür edilen, MKH ve miRNA transfekte edilmiş MKH'ler ile ko-kültür edilen T hücrelerinin pro-inflamatuvar STAT-1 ekspreyonunun 4. gün Real time PCR analizleri ve karşılaştırılması. 4. günde MKH'lerle ko-kültüre edilmiş T hücrelerde STAT-1 gen ekspresyonu en az, miRNA transfekte MKH'lerle ko-kültüre edilmiş T hücrelerde ise en fazla ekpresyona sahip olduğu saptanmıştır.



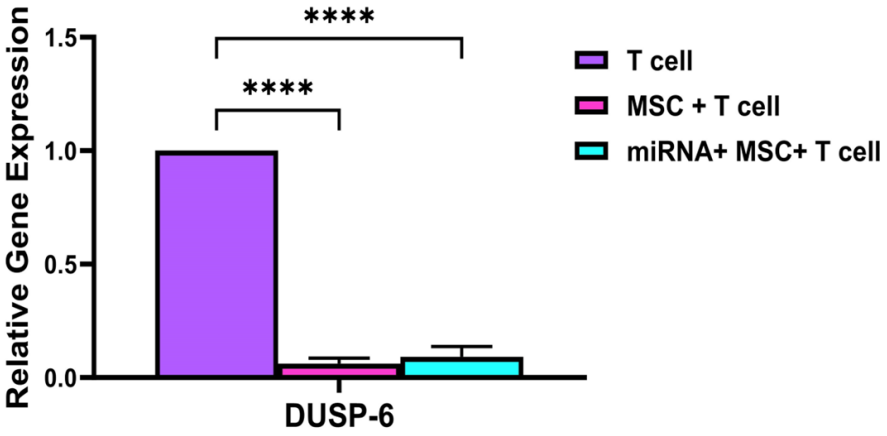
Şekil 4. 29. MKH'lerle ve miRNA transfekte MKH'ler ko-kültüre edilmiş T hücrelerin salgı düzeylerinin karşılaştırılması. Yalnız kültür edilen, MKH ve miRNA transfekte edilmiş MKH'ler ile ko-kültür edilen T hücrelerinin pro-inflamatuvar IL-6 ekspreyonunun 4.gün Real time PCR analizleri ve karşılaştırılması. 4. günde MKH'lerle ko-kültüre edilmiş T hücrelerde IL-6 gen ekspresyonu en az, yalnız kültüre edilmiş T hücrelerinde ise en fazla ekpresyona sahip olduğu saptanmıştır



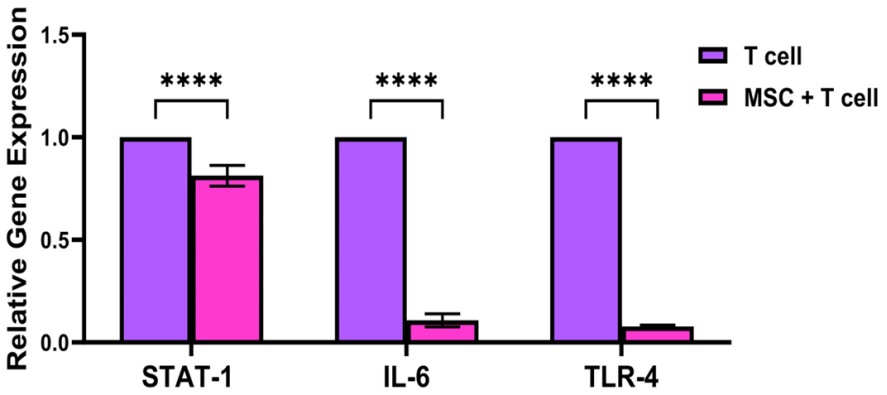
Şekil 4. 30. MKH'lerle ve miRNA transfekte MKH'ler ko-kültüre edilmiş T hücrelerin salgı düzeylerinin karşılaştırılması. Yalnız kültür edilen, MKH ve miRNA transfekte edilmiş MKH'ler ile ko-kültür edilen T hücrelerinin pro-inflamatuvar TLR-4 gen ekspreyonunun 4. gün Real time PCR analizleri ve karşılaştırılması. 4. günde MKH'lerle ko-kültüre edilmiş T hücrelerde miRNA transfekte MKH'lerle ko-kültür edilmiş T hücrelere kıyasla ekspersyon fazla, yalnız kültüre edilmiş T hücrelerinde ise en fazla TLR-4 gen ekpresyona sahip olduğu saptanmıştır.



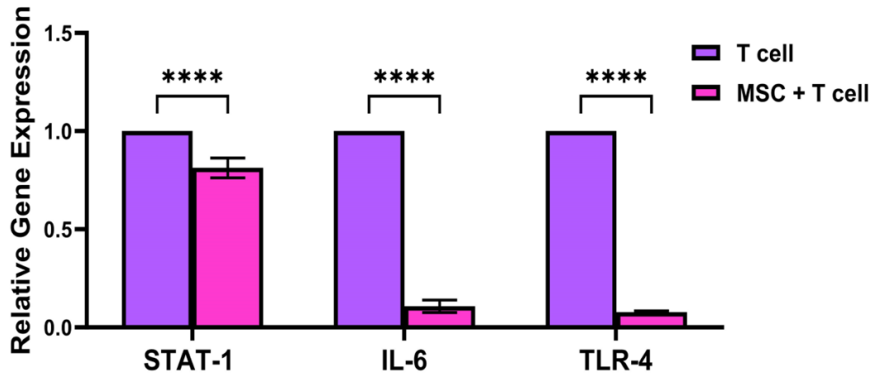
Şekil 4. 31. MKH'lerle ve miRNA transfekte MKH'ler ko-kültüre edilmiş T hücrelerin salgı düzeylerinin karşılaştırılması. Yalnız kültür edilen, MKH ve miRNA transfekte edilmiş MKH'ler ile ko-kültür edilen T hücrelerinin anti-inflamatuvar DUSP-5 gen ekspreyonunun 4.gün Real time PCR analizleri ve karşılaştırılması. 4. günde MKH'lerle ko-kültüre edilmiş T hücrelerde DUSP-5 gen ekspresyonu saptanmamış, miRNA transfekte MKH'lerle ko-kültür edilmiş T hücrelere kıyasla yalnız T hücrelerde gen ekspersyonun daha fazla olduğu belirlenmiştir.



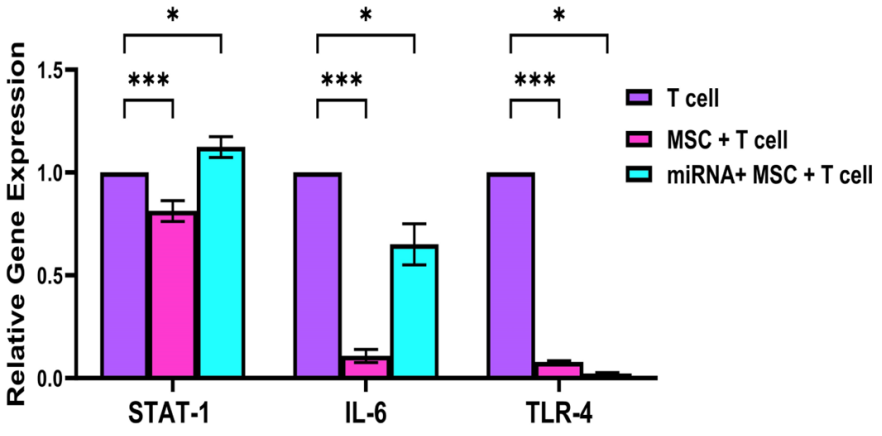
Şekil 4. 32. MKH'lerle ve miRNA transfekte MKH'ler ko-kültüre edilmiş T hücrelerin salgı düzeylerinin karşılaştırılması. Yalnız kültür edilen, MKH ve miRNA transfekte edilmiş MKH'ler ile ko-kültür edilen T hücrelerinin anti-inflamatuvar DUSP-6 gen ekspreyonunun 4.gün Real time PCR analizleri ve karşılaştırılması. 4. günde MKH'lerle ko-kültüre edilmiş T hücrelerde DUSP-6 gen ekspresyonu miRNA transfekte MKH'lerle ko-kültür edilmiş T hücrelere kıyasla fazla, yalnız T hücrelerde gen ekspersyona göre daha az eksprese olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4. 33. MKH ve miRNA transfekte edilmiş MKH'ler ile ko-kültür edilen T hücrelerinin DUSP5/6 ve TGF-beta gen ekspreyon düzeylerinin karşılaştırılması. MiRNA transfekte ve transfekte edilmeyen MKH'lerle ko-kültür edilmiş T hücrelerinde, yalnız T hücrelerine göre TGF-beta1, DUSP5 ve 6 ekspresyon düzeylerinin azaldiği belirlenmiştir. Transfekte edilmemişler ile karşılaştırdığımızda, transfekte edilen MKH'ler ile ko-kültür edilen T hücrelerinde IL-6 ekspresyonunda artış, TGF-beta ve TLR-4 ekspresyonunun ise benzer olduğu belirlendi.



Şekil 4. 34. Yalnız T hücreleri ve MKH ile ko-kültür edilen T hücrelerinin STAT-1, IL-6 ve TLR-4 gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması Yalnız T hücrelerinde her üç gen ekspresyonu MKH'lerle ko-kültür edilmiş T hücrelerine kıyasla daha fazla, MKH'lerle ko-kültür edilmiş T hücrelerinde STAT-1 IL-6 ve TLR-4'e göre daha fazla eksprese olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4. 35. MKH ve miRNA transfekte edilmiş MKH'ler ile ko-kültür edilen T hücrelerinin STAT-1, IL-6 ve TLR-4 gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması. Yalnız T hücreleri ile karşılaştırıldığında, her üç

gen ekspresyonun MKH'lerle ko-kültür edilmiş T hücrelerinde azalmışken miRNA transfekte MKH'lerle ko-kültür edilmiş T hücrelerinde STAT-1 ekspresyonun arttığı, IL-6 ve TLR-4'ün ise azaldığı belirlenmiştir.

5. TARTIŞMA

Rejeneratif tıbbın temel formu olan kök hücre bazlı tedaviler, günümüz bilim dünyasında ve tıp alanında en büyük ve en yetenekli yöntem olarak kabul edilmektedir (Drukker VD., 2006). Bu son ve ileri teknoloji tedavi yaklaşımı, en ölümcül insan hastalıkları için dönüştürücü ve potansiyel olarak iyileştirici tedavi seçenekleri için sınırsız fırsatlar yaratmıştır (Ying VD., 2008). Mezenkimal kök hücreler (MKH), bağışıklık sistemi ile ilgili patolojik durumlarda da klinik kullanımı olan yetişkin kök hücrelerdir. Hasarlı bölgelere göç edebildikleri, birden fazla hücre tipine farklılaşabildikleri ve bağışıklığı düzenleyebildikleri için çeşitli hastalıkların tedavisinde cazip adaylardır. Özellikle otoimmün hastalıklar alanında mezenkimal kök hücre tedavisine yönelik beklentiler yüksektir.

Birçok yetişkin dokusunda bulunan ve yetişkin kök hücre olarak bilinen mezenkimal kök hücreler her 3 germ tabakasına farklılaşabilme özelliği sayesinde pre-klinik çalışmalarda kullanılmaktadır. MKH'lerin izolasyon ve karakterizasyonunda bir çok farklı metod kullanılmaktadır. Wharton jölesi kökenli MKH'lerin izolasyonunda Trypsin enzimi kullanılarak hücrelerin izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Negar Varaa, vd., 2019). İzole edilmiş hücrelerin karakterizasyonu için flow sitometri ile analizi sonucunda CD44 (Cluster of Differentiation 44, farklılaşma kümesi 44; bu bir yüzey proteinini ifade eder ve bağışıklık sistemi ile ilişkilidir), CD90, CD105 belirteçleri için pozitif ve CD34 belirteci için negatif olduğu gözlemlenmiştir (Hager Abouelnaga vd., 2022).

Bu tez çalışmasında biz de MKH izolasyonunda özellikle per-klinik çalışmalar için uygulanan eksplant kültürün yanı sıra enzimatik sindirim yöntemini de kullanarak izolasyonu gerçekleştirdik. Bu çalışmada elde edilen morfolojik, immunofenotipik ve farklılaştırma karakterizasyon bulgular; insan göbek kordonu Wharton jelinden izole edilen ve 3. pasajda bulunan mezenkimal kök hücrelerin kültür kabına tutunduğunu, yıldızımsı fibroblastik morfolojide olduğunu, seçilmiş mezenkimal kök hücre belirteçlerini (CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, HLA-A-B-C/MHC sınıf I, B-ACTİN, FİBRONECTİN, C-FOS, NESTİN, P-GAMA, A-SMA ve VİMENTİN antikorları pozitif bulunurken CD14, CD69, CD45, CD34, CD19 ve HLA-DR-DQ/MHC sınıf II negatif bulundu) pozitif/negatif eksprese ettiğini ve uygun besiyeri eklentileri ile indüklendiklerinde adipo- ve osteo-jenik yönde farklılaştığını ortaya koymaktadır

(Karaoz et al., 2009). Bu çalışma için Wharton jelinden izole edilen hücreler, mezenkimal kökenli mezenkimal kök hücre karakterinde olup Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (ISCT), Mezenkimal ve Doku Kök Hücre Kurulu kılavuzunda yer alan asgari gereksinimlerini karşılamaktadır (Dominici et al., 2006).

İmmun sistem hastalıklarını daha iyi anlamak için in vitro olarak immun sistem modellerinin oluşturulması sonucu farklı dokulardan çeşitli izolasyon yöntemleri denenmiştir. Biz de deney protokolümüzde immun sistemi in vitro taklit etmek için T hücrelerini seçtik. T hücrelerini periferik kandan izole etmek için en yaygın izolasyon yöntemi olarak kullanılan Ficoll-paque Plus üzerine yayma yöntemi ve arkasından kit kullanarak el değmemiş T hücreleri elde etmeyi sağlayan negatif immunoseleksiyon yöntemini kullanmayı tercih ettik (Jinghua Wang vd., 2018). İzole edilen T hücrelerinin izolasyon sonrası saflığını değerlendirmek amacıyla flow sitometri cihazı kullanılarak T hücre popülasyonu karakterizasyonu için başta lökosit belirteci olarak CD45, Th1, Th2, Th9, Th17 ve Treg hücrelerinin belirteci olarak CD4, TCR komlpeksinin en önemli proteini olan CD3, Treg hücrelerinin spesifik yüzey belirteci olan CD25 ve transkripsiyonel faktör olan FOXP3 kullanılmasının yanı sıra CXCR3, CCR4, Cith2 (human) ve CCR6 gibi belirteçler de analiz edilmiştir (Soroosh P. vd., 2009). Biz de bu verilere dayanarak izole ettiğimiz pan/tüm T hücrelerin saflığını belirlemek için CD4, CD3, CD45, Treg hücre belirteci (CD4+CD25+FOXP3) ve Th1 (CD4+ T-BET) kullandık. Gerek izolasyon sonrası T hücrelerinin saflığını karakterize etmek için gerekse ko-kültür sonrası bu belirteçleri kullandığımızda bulgularımız bu tez yazımı aşamasına kadar yayınlanmış seçkin makalelerdekine benzer olarak deneylere devam etmek için yeterli saflıkta idi ve daha sonra bahsedileceği gibi MKH ile ko-kültür sonrası değişiklikleri ortaya koyacak şekilde sonuç verdi.

İmmun sistem hastalıkları ile ilgili çeşitli çalışmalarda, aktive/stimüle edilmiş pan T hücrelerinin davranışlarını daha iyi analiz edebilmek açısından şimdiye kadar oluşturulmuş in vitro immun sistem modellerinde; T hücrelerinin stimülasyonu için çeşitli sitokin ve mitojenler gibi farklı tipte aktivatörler kullanılmaktadır. Michael Rade ve ark yapmış oldukları çalışmada T hücre aktivasyonu için Dynabeads human T-Activator CD3/CD28 (Gibco, 11132D)

(Michael Rade vd., 2023), Sara De Biasi ve ekibinin çalışmasında ise IL-2 sitokini (Sara De Biasi vd., 2020) ve bu tez çalışmasında stimülasyon için tercih edilen PHA mitojeni kullanılarak aktivasyon gerçekleştirilmiştir. Özellikle CD8+ T hücreleri in vitro olarak yaklaşık 3 hafta kültüre edilebiliyorken, hücre metabolizmasını ve bölünmesini stimüle eden PHA-M kullanıldığında bu süreç, 90 güne kadar yükseltilebilmiştir (Gamze Gulden vd., 2022).

Bilindiği gibi profesyonel antijen sunucu hücreler (APC'ler), T hücrelerine antijen sunma konusunda özelleşmiş bağışıklık hücreleridir. Başlıca profesyonel antijen sunan hücreler dendritik hücreler, makrofajlar ve B hücreleridir. Profesyonel antijen sunucu hücreler antijeni alır, işler ve 2. sınıf majör histokompatibilite kompleksi (MHC class II) ile birlikte bir kısmını kendi yüzeyine geri alır. T hücreleri, oluşan kompleksle etkileşime geçtiğinde aktifleşir. Aktin filamentleri (F-aktin), T hücre aktivasyonunun çeşitli aşamalarında kritik bir rol oynar. Hem T hücresi hem de T hücrelerine antijen sunan hücreler, bu iki hücre arasında engel oluşturan büyük glikoproteinlerden oluşan bir tabaka olan glikokaliks ile kaplıdır. Bu etkiye karşı koymak için integrin bazlı yapışma (T hücresi üzerindeki lenfosit fonksiyonu ile ilişkili antijen-1 -LFA-1- ile APC üzerindeki ICAM-I arasında) iki hücrenin membranlarını birbirlerine 40 nm yakınlaştırır. TCR'nin pMHC kompleksine bağlanabilmesi için T hücresi ve APC'nin 15nm mesafede olması gerekir, integrin bazlı LFA-1, hedef APC'ye ulaşan T hücresinin aktin polimerizasyonuna bağlı çıkıntılarının (invaziv psödopodya) oluşumu için bir başlangıç noktası sağlar ve böylece karşıt membranlar arasındaki mesafeyi azaltır. (Sudha Kumari vd., 2016). Faz kontrast inverted mikroskop ile aktivasyon sonrası T hücrelerinde elde ettiğimiz sitoplazmik uzantılar kazanmasına yönelik morfolojik bulgularımız, literatür bilgileri ile benzer ve aktivasyon sonrası T hücrelerinin aktivasyonunu doğrular yöndedir. CD69, membrana bağlı tip II C-lektin reseptörüdür. Stimülasyondan sonra plazma membranının yüzeyinde hızlı bir şekilde ortaya çıkması nedeniyle lenfosit aktivasyonunun klasikleşmiş bir erken belirtecidir. CD69 ekspresyonu, çoğu lökositte aktivasyon sonrası artmaktadır ve bu durum esas olarak aktive edilmiş lenfositlerin ve NK hücrelerinin bir belirteci olarak yaygın kullanılmaktadır (Danay Cibrián vd., 2019). Bu iki özellik kapsamında aktivasyon sonucu faz kontrast invert mikroskopu ile aktive olmuş T hücrelerindeki

sitoplazmik çıkıntıların oluşumuna yönelik morfolojik bulgularımıza ek olarak ve flow sitometri cihazında belirlenen CD69 ekspresyon düzeyindeki keskin artış; T hücrelerinin aktivasyonunun başarı ile gerçekleştirildiğini ve literatür ile benzer olduğunu göstermektedir.

Son 10 yılda MKH'ler, immunosupresif özellikleri nedeniyle özellikle doku trasnplantasyonu ve immun hastalıklarda ilaç kullanımına alternatif ya da yanı sıra hücresel tedavi yöntemi olarak kullanılmaktadır. MKH'ler tarafından salgılanan ekstrasellüler veziküllerde bulunan HGF, TSG-6, TGF-β, PGE2, IDO, IL-10, NO, HO-1 veya HLA-G indirekt/hücre teması olmayan hücre-hücre iletişiminde rol oynamaktadır. MKH'lerin T hücreler üzerindeki etkisini daha iyi anlamak amacıyla yapılan çalışmalarda oluşturulan indirekt ko-kültür deneyleri sonucu, MKH'ler ortamdaki enflamasyonu baskılamış ve T hücrelerini, Treg hücrelerine; makrofajları, M2-makrofaja ve B hücrelerini ise regülatör Breg hücrelerine farklılaştırdığı görülmüştür (Adam G. Laing vd., 2019). Bu tez çalışmasında T hücreleri MKH'lerle ko-kültür edildiğinde MKH'lerin, T hücreleri üzerindeki etkisini özellikle ko-kültürün 4.gününde, T hücrelerinden Treg hücrelerine farklılaşmanın artışı, Th1 hücre sayısındaki azalma ve aktive olmuş T hücre belirteci olan CD69 ekspresyon düzeylerindeki keskin azalma şeklinde literatür ile benzer olarak gerçekleştirdiğini belirledik.

miRNA-181a'nın hem T hücreler hem de MKH'ler üzerinde eksprese olması ve immunosupressif özellikleri nedeniyle özellikle immun sistem hastalık ve bozuklukları ile ilgili çalışmalarda dikkat çekmiştir. miRNA-181a'nın, inflamasyondaki rolü geniş çapta araştırılmış ve T hücre gelişimi ve makrofaj aktivasyonunu düzenlediği öne sürülmüştür. Protein tirozin fosfataz reseptör olmayan tip 22 (PTPN22), PTPN11 (veya SHP2), çift özgüllüklü fosfataz5/6 (DUSP5/6) ve T hücre reseptörünü hedef almaktadır. MiR-181a'nın MKH'lerin immünosupresif özelliklerinin ve proliferasyonunun negatif bir düzenleyicisi olduğu gösterilmiştir. MiR-181a, TGFβ reseptörü 1 (TGFBR1) ve TGFBR ilişkili protein 1'i (TGFBRAP1) doğrudan hedef alarak TGFβ sinyal yolunun inhibisyonu yoluyla insan göbek kordonu Wharton jeli (WJ)-MKH'lerinin çoğalmasını önlemiştir. Ayrıca WJ-MKH'lerde miR-181a'nın aşırı ekspresyonu, kısa süreli bir kültürde T hücrelerinin çoğalmasını ve IL-6, vasküler endotelyal büyüme faktörü alfa (VEGFA) ve indolamin 2,3-dioksijenaz (IDO) salgılanmasını artırmıştır

(Yves-Marie Pers vd., 2018). Benzer olarak başka bir çalışmada miRNA-181a'nın ekspresyonu, TGF-β1/Smad sinyal yolağı aktivasyonu ile T hücrelerinin Treg yönünde farklılaşmasını sağlayarak immunomodulatuvar etki göstermiştir (Yu Wang vd., 2022). İlaveten başka bir çalışmada miR-181a'nın çoklu fosfatazları baskılayarak TCR aktivasyon eşiğini düşürmek suretiyle klasik T hücrelerinin, Treg hücrelerine farklılaşmasını kolaylaştırdığı belirlenmiştir (Chulwoo Kim vd., 2021). miRNA-181a ekspresyonunun, T hücre aktivasyonu ve farklılaşması üzerindeki etkileri, yalnızca TCR sinyal gücünü düzenlemekten daha karmaşıktır. Bilindiği gibi insan hücreleri ile elde edilen veriler, miR-181a'nın hedef genlerinden biri olan DUSP6'nın susturulması, muhtemelen TCR sinyal gücünü artırarak in vitro Th1 farklılaşmasına neden olurken, Chulwoo Kim vd.'nin farelerde yaptığı bir çalışmada miRNA-181a/b1'in susturulmasının, bir TH1 yanıtının inhibisyonunu desteklediği görülmüştür (Chulwoo Kim vd., 2021). Çalışmamızda 4.gün miRNA transfekte MKH'lerle ko-kültüre edilmiş T hücrelerinin flow sitometri sonuçlarına göre hem Treg hücreleri hem de Th1 hücrelerinin, transfeksiyon yapılmamış MKH'lerle ko-kültüre edilmiş T hücrelerine göre fazla olduğunu gözlemledik. Çalışmamızda ilginç bir şekilde miRNA-181a ekspresyonunun DUSP-6 gen ekspresyonunu susturması gerekirken eksprese olması ve negatif immunosupresyon göstermesi sonucunda Th1 hücre sayısında artış olmuştur. miRNA transfekte MKH'lerle kültüre edilmiş T hücrelerde CD69 düzeylerindeki azalma, ortamda aktive T hücre bulunmadığının ancak CD4+CD69-Treg hücre oluşumunun olduğunu ve bu durumun da CD4+CD69+Treg hücrelerine göre daha az immunosupresif etkiye neden olduğunu göstermektedir. Ayrıca artan CD4+ T hücrelerinin Th1 yönünde farklılaşmasının gerçekleşmiş olabileceğini de göstermektedir.

Bellek T hücreleri CD4+ veya CD8+ olabilir ve CD62L ve CCR7 ekspresyonuna, yüksek endotelyal venüllere ve ikincil lenfoid dokulara göçü sağlayan reseptörlere bağlı olarak merkezi hafıza (TCM) veya efektör hafıza (TEM) alt kümelerine ayrılır. TCM ve TEM fenotipleri esnek olabilir, çünkü her bir fenotipin diğerine dönüştüğü gözlemlenmiştir; TCM proliferasyonu ve klonal çoğalmasından kaynaklanan bazı TCM'lerin, TEM hücre tiplerine dönüştüğü ve TEM'in CD4+ veya CD8+ T hücresi aktivasyonunu takiben TCM'ye dönüştüğü gösterilmiştir. TCM ve TEM, CD4+ veya CD8+ olabilmesine rağmen, TCM

fenotipi CD4+ alt kümesinde daha yaygınken, TEM fenotipi CD8+ alt kümesinde daha yaygındır (Gary R. Burleson vd., 2015). Artan CD4+ ekspresyon düzeyi, T hücrelerinin bellek T hücrelerine farklılaştığını göstermektedir ve bu durum yalnız T hücrelerine kıyasla miRNA transfekte MKH'lerle ko-kültüre edilmiş T hücrelerinde apoptozun düşük olmasının nedenini açıklayabilir. Ayrıca T hücreleri, antijeni tespit etmek ve yanıt vermek için protein tirozin fosfataz CD45'e ihtiyaç duyar çünkü CD45, T hücre reseptör (TCR) kompleksini fosforile eden Src ailesi kinaz Lck'yi aktive eder. CD45, negatif düzenleyici kinaz Csk'ye karşı çıkarak Lck'yi aktive eder. Paradoksal olarak, CD45 aynı zamanda Lck'nin etki ettiği TCR kompleksi içindeki aynı sinyal motiflerini defosforile ederek TCR sinyalini baskılamakla da ilişkilendirilmiştir (Adam H. Courtney vd., 2019). Bu da yaptığımız flow sitometri analizi sonucu miRNA transfekte MKH'lerle ko-kültüre edilmiş T hücrelerinde, CD45 düzeyinin azalması ve aktivasyonun gerçekleşmemesi sonucu CD69 ekspresyonunun olmaması da bellek hücrelerine farklılaşmanın kanıtıdır.

Periferik T hücrelerinde miR-181a/b-1 kaybı, DUSP6'nın yukarı regülasyonu ve Erk'in sınırlı fosforilasyonu ile sonuçlanmıştır. Başka bir çalışmada murid gammaherpesvirus 4 enfeksiyonu modelinde viral klirensin iyileştiği (viral yükün azaltıldığı) ve aktive CD8 T hücrelerinde eşzamanlı bir artış olduğu bildirilmiştir. Bu belirgin tutarsızlığın nedeni belirsizliğini korumaktadır. Bununla birlikte, ikinci çalışmada pan-miR-181a/b-1 eksikliği olan fareler kullanılmıştır ve bu da dolaylı etki olasılığını artırmaktadır. Bu çalışmalar birlikte ele alındığında, periferik T hücrelerinde nispeten düşük ekspresyon seviyelerine rağmen, aktivasyon üzerine daha da azalan miRNA-181a/b-1'in; viral enfeksiyon, efektör T hücresi genişlemesi ve bellek T hücresi işlevinin kontrolünde önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Zoe Grewers vd., 2020). Olgun miRNA'ların ve miRNA mimik gibi yapay RNA türlerinin ekspresyon seviyelerinin, gen ifadesinde spesifik olmayan değişikliklere yol açtığı tahmin edilmektedir (Hyun Yong Jin vd., 2015). Bu tez çalışmasında transfekte ettiğimiz miRNA-181a'nın ekspresyonunun, T hücrelerinde arttığı ancak DUSP-6'nın baskılanmadığını belirledik. Toll benzeri reseptörler (TLR'ler), doğuştan gelen bağışıklığa aracılık eden ve esas olarak patojenik mikroorganizmalarla ilişkili moleküler kalıpların tanınmasında rol oynayan bir patojenik kalıp reseptörleri sınıfıdır. Sinyal

moleküllerinin transkripsiyon faktörlerinin, miRNA'ların transkripsiyonel aktivatörleri olarak hareket ederek TLR sinyal yolunda mikroRNA (miRNA) ifadesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynayabileceği ve bunun da miRNA ifadesini başlattığı gösterilmiştir. Ayrıca, miRNA'ların TLR sinyal yolu üzerinde karmaşık ve ince düzenleyici etkileri vardır ve TLR sinyal yolunun inhibisyonu aşırı inflamatuar yanıtların bastırılmasında çok önemlidir (Yixiao Tang vd., 2021). Yaptığımız çalışmada benzer çalışmalarda olduğu gibi nontransfekte grupta biraz daha az olmak üzere miRNA-181a transfekte grupta, TLR-4 gen ekspresyonunda azalma ve Treg farklılaşmasında artış ile iWJ-MKH'lerin immunosupresif etki gösterdiği ve inflamatuvar yanıtın baskılandığı görülmektedir. Bu bulguyu destekler nitelikte yaptığımız ELISA analizleri sonucunda her iki ko-kültür grubunda da pro-inflamatuvar sitokin olan IFN-γ salgısı azalırken anti-inflamatuvar sitokin olan TGF-beta salgısının arttığı ve aynı ko-kültür ortamında IFN-γ salgısının TGF-beta'ya kıyasla daha az olduğu belirlendi. Transfekte grupta bu azalmanın daha az olduğuna yönelik bulgularımız, yapılan bir çalışmada elde edilen miRNA-181a'nın transkripsiyon faktörü olan Id2'nin ekspresyonunu baskılayarak CD8+ T hücreleri tarafından IFN-γ üretimini sınırladığı yönündeki bilgilerle paralellik göstermemektedir (Tiago Amado vd., 2020).

T-hücrelerinde miR-181a artışı, DUSP5 ve DUSP6 da dahil olmak üzere çoklu tirozin fosfataz inhibisyonu ile sonuçlanmıştır (Svitlana Melnik vd., 2021). Çalışmamızda non-transfekte MKH'lerle ko-kültüre edilmiş T hücrelerde DUSP-5 gen ekspresyonu saptanmamış iken, yalnız T hücreleri ile karşılaştırıldığında miRNA transfekte MKH'lerle ko-kültür edilmiş T hücrelerinde Dusp-5 gen ekspresyonunda artış belirlenmiş olsa da istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda miRNA-181a transfekte MKH'lerle ko-külüre edilmiş T hücre popülasyonunda Treg hücrelerinin artışını belirledik. Ortamdakı inflamsyon düzeyinin dengelenmesinde rolü olan Treg hücrelerinin artışı, aktive T hücre baskılanmasına neden oldu. Kimyasal olarak modifiye edilmiş çift sarmallı RNA molekülü olan miRNA mimiklerin aktarımdan sonra endojenez gen ekspresyonunda spesifik olmayan değişikliklere neden ola bileceği için Treg hücre artımının yanı sıra Th1 farklılaşması da gerçekleşmiştir.

İmmunosupresif etkisi diğer dokulardan izole edilen MKH'lere kıyasla fazla olan iWJ-MKH'lerle yapmış olduğumuz çalışmada Treg hücre düzeylerinde 4. günde 24 saatlik aktivasyonun ardından yapmış olduğumuz flow sitometrik sonuçlara dayanarak Treg hücre sayında artış Th1 hücre sayısında azalma olduğu belirlendi. Bu da hücresel tedavi açısından iWJ-MKH'lerin kullanımını özellikle doku ve organ implantasyonu ve immun hastalıkların tedavisinde ilaçlara kıyasla daha kullanışlı hale getirir.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ

Pac M, Bernatowska E. Comprehensive activities to increase recognition of primary immunodeficiency and access to immunoglobulin replacement therapy in Poland. Eur J Pediatr. 2016 Aug;175(8):1099-105.

International Union of Immunological Societies Expert Committee on Primary Immunodeficiencies. Notarangelo LD, Fischer A, Geha RS, Casanova JL, Chapel H, Conley ME, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Hammarström L, Nonoyama S, Ochs HD, Puck J, Roifman C, Seger R, Wedgwood J. Primary immunodeficiencies: 2009 update. J Allergy Clin Immunol. 2009 Dec;124(6):1161-78.

Lambert MP, Arulselvan A, Schott A, Markham SJ, Crowley TB, Zackai EH, McDonald-McGinn DM. The 22q11.2 deletion syndrome: Cancer predisposition, platelet abnormalities and cytopenias. Am J Med Genet A. 2018 Oct;176(10):2121-2127.

Carey B, Lambourne J, Porter S, Hodgson T. Chronic mucocutaneous candidiasis due to gain-of-function mutation in STAT1. Oral Dis. 2019 Apr;25(3):684-692.

Yazdani R, Fekrvand S, Shahkarami S, Azizi G, Moazzami B, Abolhassani H, Aghamohammadi A. The hyper IgM syndromes: Epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis and management. Clin Immunol. 2019 Jan;198:19-30.

Byrne AM, Schechter T, Westmacott R. Neuropsychological Profile of a Girl with Wiskott-Aldrich Syndrome. Cogn Behav Neurol. 2018 Mar;31(1):13-17.

Aluri J, Gupta M, Dalvi A, Mhatre S, Kulkarni M, Hule G, Desai M, Shah N, Taur P, Vedam R, Madkaikar M. Clinical, Immunological, and Molecular Findings in Five Patients with Major Histocompatibility Complex Class II Deficiency from India. Front Immunol. 2018;9:188.

Kirschfink M, Mollnes TE. Modern complement analysis. Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Nov;10(6):982-9.

Zhou Q, Hui X, Ying W, Hou J, Wang W, Liu D, Wang Y, Yu Y, Wang J, Sun J, Zhang Q, Wang X. A Cohort of 169 Chronic Granulomatous Disease Patients Exposed to BCG Vaccination: Retrospective Study from a Single Center in Shanghai, China (2004-2017). J Clin Immunol. 2018 Apr;38(3):260-272.

De Rose DU, Giliani S, Notarangelo LD, Lougaris V, Lanfranchi A, Moratto D, Martire B, Specchia F, Tommasini A, Plebani A, Badolato R. Long term outcome of eight patients with type 1 Leukocyte Adhesion Deficiency (LAD-1): Not only infections, but high risk of autoimmune complications. Clin Immunol. 2018 Jun;191:75-80.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Tchatchouang S, Nzouankeu A, Donkeng V, Eyangoh S, Ngando L, Penlap V, Fonkoua MC, Pefura-Yone EW, Njouom R. Prevalence of Opportunistic Pathogens Pneumocystis jiroveci and Tubercle Bacilli in HIV-Infected Patients with Respiratory Infections in Yaounde, Cameroon. AIDS Res Hum Retroviruses. 2019 May;35(5):428-429.

Ocon AJ, Bhatt BD, Miller C, Peredo RA. Safe usage of anakinra and dexamethasone to treat refractory hemophagocytic lymphohistiocytosis secondary to acute disseminated histoplasmosis in a patient with HIV/AIDS. BMJ Case Rep. 2017 Oct 04;2017

Rehman AM, Woodd SL, Heimburger DC, Koethe JR, Friis H, PrayGod G, Kasonka L, Kelly P, Filteau S. Changes in serum phosphate and potassium and their effects on mortality in malnourished African HIV-infected adults starting antiretroviral therapy and given vitamins and minerals in lipid-based nutritional supplements: secondary analysis from the Nutritional Support for African Adults Starting Antiretroviral Therapy (NUSTART) trial. Br J Nutr. 2017 Mar;117(6):814-821

M. Eslami a, A. Bahar b, M. Keikha c, M. Karbalaei d, N.M. Kobyliak e, B. Yousefi Probiotics function and modulation of the immune system in allergic diseases. Allergologia et Immunopathologia. 2020 November–December, 771-788. https://doi.org/10.1016/j.aller.2020.04.005

Hernandez-Trujillo VP, Scalchunes C, Cunningham-Rundles C, Ochs HD, Bonilla FA, Paris K, Yel L, Sullivan KE. Autoimmunity and inflammation in X-linked agammaglobulinemia. J Clin Immunol. 2014 Aug;34(6):627-32.

Lambert MP, Arulselvan A, Schott A, Markham SJ, Crowley TB, Zackai EH, McDonald-McGinn DM. The 22q11.2 deletion syndrome: Cancer predisposition, platelet abnormalities and cytopenias. Am J Med Genet A. 2018 Oct;176(10):2121-2127.

Chinn IK, Shearer WT. Severe Combined Immunodeficiency Disorders. Immunol Allergy Clin North Am. 2015 Nov;35(4):671-94.

Kirschfink M, Mollnes TE. Modern complement analysis. Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Nov;10(6):982-9

Chijioke H Mosanya., John D Isaacs. (2019). Tolerising cellular therapies: what is their promise for autoimmune disease? Annals of the Rheumatic Diseases, 78, 297-310. http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-214024

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Zhernakova A, Van Diemen CC, Wijmenga C. Detecting shared pathogenesis from the shared genetics of immune-related diseases. Nat Rev Genet (2009) 10(1):43–55. doi: 10.1038/nrg2489

Brauer M, Freedman G, Frostad J, Van Donkelaar A, Martin RV, Dentener F, et al.. Ambient air pollution exposure estimation for the global burden of disease 2013. Environ Sci Technol (2016) 50(1):79–88. doi: 10.1021/acs.est.5b03709

Ferreira LMR, Muller YD, Bluestone JA, Tang Q. Next-generation regulatory T cell therapy. Nat Rev Drug Discovery (2019) 18(10):749–69. doi: 10.1038/s41573-019-0041-4

Farbod Ghobadinezhad, Nasim Ebrahimi, Fatemeh Mozaffari, Neda Moradi, Sheida Beiranvand, Mehran Pournazari, Fatemeh Rezaei-Tazangi, Roya Khorram, Maral Afshinpour, Rob A. Robino, Amir Reza Aref, Leonardo M. R. Ferreira. The emerging role of regulatory cell-based therapy in autoimmune disease (2022) 13, 1075813.doi: 10.3389/fimmu.2022.1075813

Li-Tzu Wang, Ko-Jiunn Liu, Huey-Kang Sytwu, Men-Luh Yen, B. Linju Yen. (2021). Advances in Mesenchymal Stem Cell Therapy for Immune and Inflammatory Diseases: Use of Cell-Free Products and Human pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells. Stem Cells Translational Medicine, Volume 10, Issue 9, September 2021, Pages 1288–1303, https://doi.org/10.1002/sctm.21-0021

Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. Lancet. 2004;363:1439-1441.

Jordan A. Baeker Bispo, Paulo S. Pinheiro, and Erin K. Kobetz (2020) Epidemiology and Etiology of Leukemia and Lymphoma. Cold Spring Harb Perspect Med. 2020 Jun; 10(6): a034819. doi: 10.1101/cshperspect.a034819

Amritha Jaishankar 1, Miguel Barthelery, Willard M Freeman, Ugur Salli, Timothy M Ritty, Kent E Vrana. (2009) Human embryonic and mesenchymal stem cells express different nuclear proteomes. Stem Cells Dev 2009 Jun;18(5):793-802. doi: 10.1089/scd.2008.0156.

Aleksandra Musiał-Wysocka,1, Marta Kot, Marcin Majka. (2019) The Pros and Cons of Mesenchymal Stem Cell-Based Therapies Cell Transplant. 2019 Jul; 28(7): 801–812. doi: 10.1177/0963689719837897

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

Margit Rosner, Stefanie Horer, Michael Feichtinger & Markus Hengstschläger. (2023) Multipotent fetal stem cells in reproductive biology research. Stem Cell Research & Therapy volume 14, Article number: 157 (2023)

Jenna R. Heil; Bruno Bordoni. Embryology, Umbilical Cord April 17, 2023

Luigi Marino, Maria Antonietta Castaldi, Rosa Rosamilio, Enrico Ragni, Rosa Vitolo, Caterina Fulgione, Salvatore Giovanni Castaldi, Bianca Serio, Rosario Bianco, Maurizio Guida, and Carmine Selleri. Mesenchymal Stem Cells from the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord: Biological Properties and Therapeutic Potential. Int J Stem Cells. 2019; 12(2): 218–226. doi: 10.15283/ijsc18034

Fernanda Vieira Paladino, Juliana de Moraes Rodrigues, Aline da Silva, Anna Carla. The Immunomodulatory Potential of Wharton's Jelly Mesenchymal Stem/Stromal Cells. Stem Cells Int. 2019 Jun 11. doi: 10.1155/2019/3548917

Jan Černý; Ilja Stříž. Adaptive innate immunity or innate adaptive immunity. Clin Sci (Lond) (2019) 133 (14): 1549–1565. https://doi.org/10.1042/CS20180548

Jean S. Marshall, Richard Warrington, Wade Watson & Harold L. Kim. An introduction to immunology and immunopathology. Allergy, Asthma & Clinical Immunology volume 14, Article number: 49 (2018)

Keith B. Elkon, Christian Lood. The Innate Immune System in SLE. Dubois' Lupus Erythematosus and Related Syndromes (Ninth Edition). 2019, Pages 93-100. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47927-1.00008-6

Francisco A. Bonilla, Hans C. Oettgen. Adaptive immunity. Journal of Allergy and Clinical Immunology. Volume 125, Issue 2, Supplement 2, February 2010, Pages S33-S40

Kinjal Shah, Amr Al-Haidari, Jianmin Sun, Julhash U. Kazi. T cell receptor (TCR) signaling in health and disease. Signal Transduction and Targeted Therapy volume 6, Article number: 412 (2021)

Hyunju Oh, Sankar Ghosh. NF-κB: roles and regulation in different CD4+ T-cell subsets. 13 February 2013. https://doi.org/10.1111/imr.12033

Keishi Adachi and Mark M. Davis. T-cell receptor ligation induces distinct signaling pathways in naïve vs. antigen-experienced T cells. December 3, 2010. https://doi.org/10.1073/pnas.1017340108

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

Elsie Samakai, Christina Go, Jonathan Soboloff. Defining the Roles of Ca2+ Signals during T Cell Activation. Signaling Mechanisms Regulating T Cell Diversity and Function. 2018

Gamze Gulden, Berranur Sert, Tarik Teymur, Yasin Ay, Nulifer Neslihan Tiryaki, Abhinava K. Mishra, Ercument Ovali, Nevzat Tarhan, Cihan Tastan. .CAR-T Cells with Phytohemagglutinin (PHA) Provide Anti-Cancer Capacity with Better Proliferation, Rejuvenated Effector Memory, and Reduced Exhausted T Cell Frequencies. Vaccines (Basel). 2023 Feb; 11(2): 313 doi: 10.3390/vaccines11020313

Todd N. Eagar, Stephen D. Miller. Helper T-Cell Subsets and Control of the Inflammatory Response. Clinical Immunology (Sixth Edition) 2023, Pages 151-161. https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-8165-1.00011-3

Allison K. Lord, Jatin M. Vyas. Host Defenses to Fungal Pathogens. Clinical Immunology (Fifth Edition). 2019, Pages 413-424. https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6896-6.00029-6

Jing Chen, Lian Guan, Lin Tang, Shiming Liu, Ya Zhou, Chao Chen, Zhixu He, Lin Xu.. T Helper 9 Cells: A New Player in Immune-Related Diseases. DNA Cell Biol. 2019 Oct 1; 38(10): 1040–1047. doi: 10.1089/dna.2019.4729

P G Ashton-Rickardt 1, A Bandeira, J R Delaney, L Van Kaer, H P Pircher, R M Zinkernagel, S Tonegawa. Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus. 1994 Feb 25;76(4):651-63. doi: 10.1016/0092-8674(94)90505-3.

H T Petrie, F Livak, D G Schatz, A Strasser, I N Crispe, K Shortman. Multiple rearrangements in T cell receptor alpha chain genes maximize the production of useful thymocytes. 1993 Aug 1;178(2):615-22. doi: 10.1084/jem.178.2.615.

D G Schatz, M A Oettinger, D Baltimore. The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. 1989 Dec 22;59(6):1035-48. doi: 10.1016/0092-8674(89)90760-5.

Dominick DeLuca, Dawn R Clark. Interleukin-7 negatively regulates the development of mature T cells in fetal thymus organ cultures. 2002 May;26(4):365-84. doi: 10.1016/s0145-305x(01)00085-4.

A Noble, J P Truman, B Vyas, M Vukmanovic-Stejic, W J Hirst, D M Kemeny. The balance of protein kinase C and calcium signaling directs T cell subset development. J Immunol 2000 Feb 15;164(4):1807-13. doi: 10.4049/jimmunol.164.4.1807

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

H Liu, M Rhodes, D L Wiest, D A Vignali. On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation. Immunity 2000 Nov;13(5):665-75. doi: 10.1016/s1074-7613(00)00066-2.

R C Lee, R L Feinbaum, V Ambros. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. 1993 Dec 3;75(5):843-54. doi: 10.1016/0092-8674(93)90529-y.

Sam Griffiths-Jones 1, Harpreet Kaur Saini, Stijn van Dongen, Anton J Enright. miRBase: tools for microRNA genomics. Nucleic Acids Res. 2008 Jan;36(Database issue):D154-8. doi: 10.1093/nar/gkm952

Alessia Indrieri, Sabrina Carrella, Pietro Carotenuto, Sandro Banfi, Brunella Franco. The Pervasive Role of the miR-181 Family in Development, Neurodegeneration, and Cancer. Int J Mol Sci. 2020 Mar; 21(6): 2092. doi: 10.3390/ijms21062092

Qi-Jing Li, Jacqueline Chau, Peter J.R. Ebert, Lawrence O. Klein Mark M. Davis, Chang-Zheng Chen. miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. Cell 2007, 129, 147–161. doi:https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.008

Natalia Ziętara, Marcin Łyszkiewicz, Katrin Witzlau, Ronald Naumann, Robert Hurwitz, Jörg Langemeier, Jens Bohne, Inga Sandrock, Matthias Ballmaier, Siegfried Weiss, Immo Prinz, and Andreas Krueger. Critical role for miR-181a/b-1 in agonist selection of invariant natural killer T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2013, 110, 7407–7412. https://doi.org/10.1073/pnas.1221984110

Xie YF, Shu R, Jiang SY, Liu DL, Zhang XL (2011). Comparison of microRNA profiles of human periodontal diseased and healthy gingival tissues. International journal of oral science 3(3):125-134.

Hager Abouelnaga, Doaa El-Khateeb, Yasmine Moemen, Ashraf El-Fert, Mohamed Elgazzar & Ashraf Khalil (2022). Characterization of mesenchymal stem cells isolated from Wharton's jelly of the human umbilical cord. Springer 2 (2022).

Negar Varaa, Saeed Azandeh, Zahra Khodabandeh, Anneh Mohammad Gharravi. (2019) Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cell: Various Protocols for Isolation and Differentiation of Hepatocyte-Like Cells; Narrative Review. Iran J Med Sci. 2019 Nov; 44(6): 437–448.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Jinghua Wang, Guoping Wu, Brian Manick, Vida Hernandez, Mark Renelt, Christian Erickson, Joanna Guan, Ravinder Singh, Simone Rollins, Alicia Solorz, Ming Bi, Jun Li, David Grabowski, Janette Dirkx, Camrin Tracy, Thomas Stuart, Chad Ellinghuysen, Daniel Desmond, Craig Foster, Vassilios Kalabokis. (2018) VSIG-3 as a ligand of VISTA inhibits human T-cell function. İmmunology insights into immunity in healthy and disease.

Soroosh P. Doherty TA. Th9 and allergic disease. Immunology. 2009; 127(4):450-458. doi: 10.1111/j. 1365-2567.209.03114.x.

Michael Rade, Sebastian Böhlen, Vanessa Neuhaus, Dennis Löffler, Conny Blumert, Maximilian Merz, Ulrike Köhl, Susann Dehmel, Katherina Sewald & Kristin Reiche. A time-resolved meta-analysis of consensus gene expression profiles during human T-cell activation. Genome Biology volume 24, Article number: 287 (2023)

Sara De Biasi, Marianna Meschiari, Lara Gibellini, Caterina Bellinazzi, Rebecca Borella, Lucia Fidanza, Licia Gozzi, Anna Iannone, Domenico Lo Tartaro, Marco Mattioli, Annamaria Paolini, Marianna Menozzi, Jovana Milić, Giacomo Franceschi, Riccardo Fantini, Roberto Tonelli, Marco Sita, Mario Sarti, Tommaso Trenti, Lucio Brugioni, Luca Cicchetti, Fabio Facchinetti, Antonello Pietrangelo, Enrico Clini, Andrea Cossarizza Nature Communications volume 11, Article number: 3434 (2020)

Gamze Gulden, Berranur Sert, Teymur, Yasin Ay, Nulifer Neslihan Tiryaki, Ercüment Ovalı, Nevzat Tarhan, Cihan Tastan. CAR-T Cells with Phytohemagglutinin (PHA) Provide Anti-Cancer Capacity with Better Proliferation, Rejuvenated Effector Memory, and Reduced Exhausted T Cell Frequencies doi: https://doi.org/10.1101/2022.10.25.509664 Now published in Vaccines doi: 10.3390/vaccines11020313

Caplan AI. Mesenchymal stem cells. Journal of Orthopaedic Research. 1991;9(5):641-50

Tsuji W, Rubin JP, Marra KG. Adipose-derived stem cells: Implications in tissue regeneration. World J Stem Cells. 2014;6(3):312-21

Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman MA, Gerson SL. Phenotypic and Functional Comparison of Cultures of Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells (MSCs) and Stromal Cells. Journal of Cellular Physiology. 1998

Harrell CR, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes and Other Extracellular Vesicles as New Remedies in the Therapy of Inflammatory Diseases. Cells. 2019

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Jovic D, Yu Y, Wang D, Wang K, Li H, Xu F, et al. A Brief Overview of Global Trends in MSC-Based Cell Therapy. Stem Cell Reviews and Reports. 2022;18(5):1525-45

Yagi H, Soto-Gutierrez A, Parekkadan B, Kitagawa Y, Tompkins RG, Kobayashi N, et al. Mesenchymal Stem Cells: Mechanisms of Immunomodulation and Homing. Cell Transplantation. 2010

Seppanen E, Roy E, Ellis R, Bou-Gharios G, Fisk NM, Khosrotehrani K. Distant mesenchymal progenitors contribute to skin wound healing and produce collagen: evidence from a murine fetal microchimerism model. PLoS One. 2013;8(5):e62662

Szaraz P, Gratch YS, Iqbal F, Librach CL. In Vitro Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells into Functional Cardiomyocyte-like Cells. J Vis Exp. 2017(126).

Wang QW, Chen ZL, Piao YJ. Mesenchymal stem cells differentiate into tenocytes by bone morphogenetic protein (BMP) 12 gene transfer. J Biosci Bioeng. 2005;100(4):418-22.

Zhao Q, Ren H, Han Z. Mesenchymal stem cells: Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases. Journal of Cellular Immunotherapy. 2016;2(1):3- 20

George S, Hamblin MR, Abrahamse H. Differentiation of Mesenchymal Stem Cells to Neuroglia: in the Context of Cell Signalling. Stem Cell Reviews and Reports. 2019;15(6):814-26.

Dos Santos JF, Borçari NR, da Silva Araújo M, Nunes VA. Mesenchymal stem cells differentiate into keratinocytes and express epidermal kallikreins: Towards an in vitro model of human epidermis. J Cell Biochem. 2019;120(8):13141-55

Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. Transplantation. 1968;6(2):230-47

Chen LB, Jiang XB, Yang L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. World J Gastroenterol. 2004;10(20):3016-20.

Zhang B, Lim SK. MSC Exosome Works Through a Protein Based Mechanism of Action. Biochemical Society Transactions. 2018.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Park J, Kim B-Y, Han J, Oh J, Park S, Ryu S, et al. Graphene Oxide Flakes as a Cellular Adhesive: Prevention of Reactive Oxygen Species Mediated Death of Implanted Cells for Cardiac Repair. Acs Nano. 2015

Kinnaird T, Stabile E, Burnett M-S, Lee C-S, Barr S, Fuchs S, et al. Marrow-Derived Stromal Cells Express Genes Encoding a Broad Spectrum of Arteriogenic Cytokines and Promote in Vitro and in Vivo Arteriogenesis Through Paracrine Mechanisms. Circulation Research. 2004.

Munoz-Perez E, Gonzalez-Pujana A, Igartua M, Santos-Vizcaino E, Hernandez RM. Mesenchymal Stromal Cell Secretome for the Treatment of Immune-Mediated Inflammatory Diseases: Latest Trends in Isolation, Content Optimization and Delivery Avenues. Pharmaceutics. 2021;13(11)

Augello A, Tasso R, Negrini S, Cancedda R, Pennesi G. Cell Therapy Using Allogeneic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Prevents Tissue Damage in Collagen-Induced Arthritis. Arthritis & Rheumatism. 2007

Ho MSH, Mei SHJ, Stewart DJ. The Immunomodulatory and Therapeutic Effects of Mesenchymal Stromal Cells for Acute Lung Injury and Sepsis. Journal of Cellular Physiology. 2015

Lopez-Santalla M, Mancheño-Corvo P, Menta R, López-Belmonte JL, DelaRosa O, Bueren JA, et al. Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Modulate Experimental Autoimmune Arthritis by Modifying Early Adaptive T Cell Responses. The International Journal of Cell Cloning. 2015

Parekkadan B, Poll Dv, Suganuma K, Carter EA, Berthiaume F, Tilles AW, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Molecules Reverse Fulminant Hepatic Failure. Plos One. 2007.

Duffy M, Ritter T, Ceredig R, Griffin MD. Mesenchymal Stem Cell Effects on T-Cell Effector Pathways. Stem Cell Research & Therapy. 2011.

Feng Y, Wu CY, Liang F, Lin T, Wanqi L, Jing Y-h, et al. hUCMSCs Mitigate LPS-Induced Trained Immunity in Ischemic Stroke. Frontiers in Immunology. 2020.

Romieu-Mourez R, François M, Boivin M-N, Bouchentouf M, Spaner D, Galipeau J. Cytokine Modulation of TLR Expression and Activation in Mesenchymal Stromal Cells Leads to a Proinflammatory Phenotype. The Journal of Immunology. 2009

Zhou T, Yuan Z, Weng J, Pei D, Du X, He C, et al. Challenges and advances in clinical applications of mesenchymal stromal cells. Journal of Hematology & Oncology. 2021;14(1):24.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Mastrolia I, Foppiani EM, Murgia A, Candini O, Samarelli AV, Grisendi G, et al. Challenges in Clinical Development of Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Concise Review. Stem Cells Translational Medicine. 2019;8(11):1135-48

Mabuchi Y, Okawara C, Méndez-Ferrer S, Akazawa C. Cellular Heterogeneity of Mesenchymal Stem/Stromal Cells in the Bone Marrow. Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2021;9

Costa LA, Eiro N, Fraile M, Gonzalez LO, Saá J, Garcia-Portabella P, et al. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells from natural niches to culture conditions: implications for further clinical uses. Cell Mol Life Sci. 2021;78(2):447-67

Li C, Zhao H, Cheng L, Wang B. Allogeneic vs. autologous mesenchymal stem/stromal cells in their medication practice. Cell & Bioscience. 2021;11(1):187

Petrus-Reurer S, Romano M, Howlett S, Jones JL, Lombardi G, Saeb-Parsy K. Immunological considerations and challenges for regenerative cellular therapies. Communications Biology. 2021;4(1):798.

Mastrolia I, Foppiani EM, Murgia A, Candini O, Samarelli AV, Grisendi G, et al. Challenges in Clinical Development of Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Concise Review. Stem Cells Transl Med. 2019;8(11):1135-48.

Kapetanos K, Asimakopoulos D, Christodoulou N, Vogt A, Khan W. Chronological Age Affects MSC Senescence In Vitro-A Systematic Review. Int J Mol Sci. 2021;22(15).

Samsonraj RM, Raghunath M, Nurcombe V, Hui JHP, Wijnen AJv, Cool SM. Concise Review: Multifaceted Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells for Use in Regenerative Medicine. Stem Cells Translational Medicine. 2017.

Lynggaard CD, Grønhøj C, Christensen R, Fischer-Nielsen A, Melchiors J, Specht L, et al. Intraglandular Off-the-Shelf Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Treatment in Patients with Radiation-Induced Xerostomia: A Safety Study (MESRIX-II). Stem Cells Translational Medicine. 2022;11(5):478-89

Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. J Inflamm (Lond). 2005;2:8.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

Nauta AJ, Westerhuis G, Kruisselbrink AB, Lurvink EGA, Willemze R, Fibbe WE. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. Blood. 2006;108(6):2114-20

Ankrum J, Karp JM. Mesenchymal stem cell therapy: Two steps forward, one step back. Trends Mol Med. 2010;16(5):203-9

Baranovskii DS, Klabukov ID, Arguchinskaya NV, Yakimova AO, Kisel AA, Yatsenko EM, et al. Adverse events, side effects and complications in mesenchymal stromal cell-based therapies. Stem Cell Investig. 2022;9:7

Sudha Kumari, Silvia Curado, Viveka Mayya, and Michael L. T cell antigen receptor activation and actin cytoskeleton remodeling. Biochim Biophys. 2013 May 14. doi: 10.1016/j.bbamem.2013.05.004

Danay Cibrián, Francisco Sánchez-Madrid. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. Eur J Immunol. 2017 Jun; 47(6): 946–953 doi: 10.1002/eji.201646837

Yves-Marie Pers, Marie Maumus, Claire Bony, Christian Jorgensen, Danièle Noël. Contribution of microRNAs to the immunosuppressive function of mesenchymal stem cells. Volume 155, December 2018, Pages 109-118. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.07.001

Yu Wang, Shenghao Tu, Ying Huang, Kai Qin, Zhe Chen. MicroRNA-181a regulates Treg functions via TGF-β1/Smad axis in the spleen of mice with acute gouty arthritis induced by MSU crystals2022 Dec 2. doi: 10.1590/1414-431X2022e12002

Chulwoo Kim, Zhongde Ye, Cornelia M. Weyand & Jörg J. Goronzy. miR-181a-regulated pathways in T-cell differentiation and aging. Immunity & Ageing volume 18, Article number: 28 (2021)

Gary R. Burleson, Stefanie C.M. Burleson, Florence G. Burleson. Pulmonary Immunology of Infectious Disease. Comparative Biology of the Normal Lung (Second Edition). 2015, Pages 581-600

Adam H. Courtney, Alexey A. Shvets, Wen Lu, Gloria Griffante, Marianne Mollenauer, Veronika Horkova, Wan-Lin Lo, Steven Yu, Ondrej Stepanek, Arup K. Chakraborty, Arthur Weiss. CD45 functions as a signaling gatekeeper in T cells. 2019 Oct 22. doi: 10.1126/scisignal.aaw8151

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Hyun Yong Jin, Alicia Gonzalez-Martin, Ana V. Miletic, Maoyi Lai, Sarah Knight, Mohsen Sabouri-Ghomi, Steven R. Head, Matthew S. Macauley, Robert C. Rickert, Changchun Xiao. Transfection of microRNA Mimics Should Be Used with Caution. 2015 Dec 2. doi: 10.3389/fgene.2015.00340

Zoe Grewers and Andreas Krueger. MicroRNA miR-181—A Rheostat for TCR Signaling in Thymic Selection and Peripheral T-Cell Function2020 Sep; 21(17): 6200. 2020 Aug 27. doi: 10.3390/ijms21176200

Yixiao Tang, Yuanxi Shen, Yang Hong, Zuhang Zhang, Qi Zhai, Zhiqiang Fu, Hao Li, Ke Lu & Jiaojiao Lin. miR-181a regulates the host immune response against Schistosoma japonicum infection through the TLR4 receptor pathway. Parasites & Vectors volume 14, Article number: 548 (2021)

Tiago Amado, Ana Amorim, Francisco J. Enguita, Paula V. Romero, Daniel Inácio, Marta Pires de Miranda, Samantha J. Winter, J. Pedro Simas, Andreas Krueger, Nina Schmolka, Bruno Silva-Santos & Anita Q. Gomes. MicroRNA-181a regulates IFN-γ expression in effector CD8+ T cell differentiation. Volume 98, pages 309–320, (2020)

Svitlana Melnik, Nina Hofmann, Jessica Gabler, Nicole Hecht, and Wiltrud Richter. miR-181a Targets RSPO2 and Regulates Bone Morphogenetic Protein

WNT Signaling Crosstalk During Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stromal Cells. 2021 Oct 29. doi: 10.3389/fcell.2021.747057.

Drukker, M, Katchman, H, Katz, G, Even-Tov Friedman, S, Shezen, E, Hornstein, E, Mandelboim, O, Reisner, Y, Benvenisty, N. Human embryonic stem cells and their differentiated derivatives are less susceptible to immune rejection than adult cells. Stem Cells 2006, 24, 221–229

Ying, Q.-L, Wray, J, Nichols, J, Batlle-Morera, L, Doble, B, Woodgett, J, Cohen, P, Smith, A. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. Nature 2008, 453, 519–523.