T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

MEZENKİMAL KÖK/STROMAL HÜCRE (MKH /MSH) VE İNSAN KAYNAKLI MAKROFAJ PLASTİSİTESİ ARASINDAKİ ETKİLEŞİMLERDE GEN İFADELERİNİN ARAŞTIRILMASI

CAN KILINÇARSLAN

İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

HAZİRAN 2018


GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

MEZENKİMAL KÖK/STROMAL HÜCRE (MKH /MSH) VE İNSAN KAYNAKLI MAKROFAJ PLASTİSİTESİ ARASINDAKİ ETKİLEŞİMLERDE GEN İFADELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Can KILINÇARSLAN

DOKTORA TEZİ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HAZİRAN 2018

Can KILINÇARSLAN tarafından hazırlanan "Mezenkimal kök/stromal hücre (MKH /MSH) ve insan kaynaklı makrofaj plastisitesi arasındaki etkileşimlerde gen ifadelerinin araştırılması" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi İmmünoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Vedat BULUT
İmmünoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~

Başkan : Prof. Dr. Ayşegül Atak YÜCEL
İmmünoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~

Üye : Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI
Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~

Üye : Prof. Dr. Bilkay BAŞTÜRK
İmmünoloji Anabilim Dalı, Başkent Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~

Üye : Prof. Dr. Cemalettin AYBAY
İmmünoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~

Tez Savunma Tarihi: 22 / 06 / 2018

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.



Can KILINÇARSLAN

22.06.2018

MEZENKİMAL KÖK/STROMAL HÜCRE (MKH /MSH) VE İNSAN KAYNAKLI MAKROFAJ PLASTİSİTESİ ARASINDAKİ ETKİLEŞİMLERDE GEN İFADELERİNİN ARAŞTIRILMASI

(Doktora Tezi)

Can KILINÇARSLAN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2018

ÖZET

Bu çalışmada mezenkimal kök/stromal hücre (MKH /MSH) ve insan kaynaklı makrofaj plastisitesi arasındaki etkileşimlerde gen ifadelerinin araştırılması amaçlanmıştır. Kemik iliğinin niş bölgesi ve burada oldukça dinamik çözünür olan kemokin ve sitokinler ve hücre-hücre etkileşimleri, kök hücrelerin plastisitesi üzerine etkilidir. İnsan kemik iliği niş bölgesi MKH'lerinin çeşitli mikroçevrelerde immünomodülatör etkilerinin nasıl değiştiğinin ve insan kemik iliği niş bölgesinde bulunan MKH'lerin *ex vivo* olarak immün modülatör etkilerinin nasıl artırılabileceğinin anlaşılması, MKH tedavileri için translasyonel tıp açısından önemlidir. Son zamanlarda yapılan ko-kültür çalışmalarında MKH'lerin ve makrofajların M1/M2 dengesinin karşılıklı olarak düzenlendikleri de gösterilmiştir. Ancak insan kemik iliğinde ve makrofajlarında yeterli ve bilimsel kesin veriler bulunmamaktadır. Makrofajlar bulundukları ortam koşullarına (sitokin yoğunluğu, hasar tipi vb) bağlı olarak fenotiplerini değiştirerek verecekleri yanıtı belirler. Çevresel faktörler tarafından bu plastisite etkilenmektedir. Bu çalışmanın MKH'ler ve insan kaynaklı makrofajların fenotipi arasındaki işlevsel ilişkinin ve makrofajların M1 /M2 dengesi üzerine etkisinin incelenmesiyle elde edilen çıktıların MKH'ler hakkında kliniğe uygulanabilir sonuçlar elde edilmesine ve kişiye özel tedavi geliştirilmesine katkı sağlayacağını ve bunun özgün bir değer taşıdığını düşünüyoruz. Ayrıca sitokinlerle plastisitesi etkilenmiş insan makrofajlarının MKH üzerine etkilerinin araştırılması kök hücre tedavileri için önemli bir adım oluşturmaktadır. MKH'lerin karakterizasyonu, immünomodülatör etkileri ve makrofajlarla etkileşimlerine yönelik insan çalışmaları çok kısıtlıdır. Bu nedenle insan monosit/makrofajlarını M1 yönüne plastisiteye sürüklemek için İFN-γ + düşük doz LPS, M2 (M2a/M2c) yönüne plastisite sağlamada İL-4, İL-10, İL-13 ve de TNF-α sitokinlerle ile muamele ederek bu makrofajların benzer sitokin profil gösteren hastalıklardaki davranışlarını modelledik. İnflamatuvar mikroçevre koşullarında MKH'lerin değişimlerini ve değişen etkilerini gen ifadesi düzeyinde görmek için, bu sitokin kokteylleri ile MKH'lerin uyarılması sonrasında MKH ve THP-1'lerin TNF-α, İL-6, İL-10, İL-12A, İL-12B, iNOS ve Arg-1 gen ifadelerini Beta Actin ve GAPDH gen ifadeleri ile birlikte gerçek zamanlı PZR ile ölçümledik. Nicel elde edilen veriler kat değişimi ve *Student's t* ile değerlendirildi. Elde edilen verilere göre farklı uyarımlar ile hem MKH hem de makrofajların sergilediği gen ifadelerinin ko-kültür yapıldığında önemli ölçüde değiştiği anlaşılmıştır.

Bilim Kodu : 1039.2

Anahtar Kelimeler : Mezenkimal kök hücre, monosit, makrofaj, makrofaj plastisite, immunomodulasyon, TNF-α, İL-6, İL-10, İL-12A, İL-12B, iNOS, Arg-1

Sayfa Adedi : 190

Danışman : Prof. Dr. Vedat BULUT

INVESTIGATION OF GENE EXPRESSIONS IN INTERACTIONS OF MESENCHYMAL STEM/STROMAL CELLS AND PLASTICITY OF HUMAN MACROPHAGES

(Ph. D. Thesis)

Can KILINÇARSLAN

GAZI UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

June 2018

ABSTRACT

In this study, it is aimed to investigate gene expression in interactions between mesenchymal stem/stromal cell (MSC) and human-derived macrophage plasticity. Chemokines and cytokines and cell-cell interactions, which are highly dynamic soluble in the niche region of the Bone Marrow, are effective on the plasticity of Stem Cells. Understanding how the immunomodulatory effects of MSCs in the niche region of the human bone marrow change in various microenvironments and how the immunomodulatory effects of MSCs in the niche region of the human bone marrow can be increased ex vivo is crucial for translational medicine for MSC treatments. Recently co-culture studies have also shown that MSCs and the M1/M2 balance of macrophages is mutually regulated. However, there is no sufficient scientific data for human bone marrow and macrophages. Macrophages determine their response by changing phenotypes depending on the ambient conditions (cytokine concentration, type of damage, etc.). This plasticity is affected by environmental factors. We believe that the results of this study by examining the functional relationship between MSCs and phenotype of human macrophages and the effect of macrophages on M1 / M2 balance will contribute to clinic outcomes and improve individualized treatment of MSCs and have a unique importance. In addition, the investigation of the effects of human macrophages, plasticity has been affected by cytokines, on MSCs is an important step for stem cell treatment. Studies about characterization of MSCs, immunomodulator effects, and interactions with macrophages in humans are very limited. Therefore, we treated human monocyte / macrophages with IFN-γ + low dose LPS to drive towards M1 plasticity and treated with IL-4, IL-10, IL-13 and TNF-α cytokines to drive towards M2 plasticity. After stimulation with these cytokine cocktails and modeling behavior of the diseases with similar cytokine profile IL-12A, IL-12B, iNOS and Arg-1 gene expressions were examined by real time PCR in order to see changes and altered effects of MSCs in inflammatory microenvironment. Quantitative data were assessed by fold change and *Student's t*. It has been understood that the gene expressions exhibited by both MSCs and macrophages vary considerably when co-cultured after different stimuli according to the obtained data.

Science Code : 1039.2

Key Words : Mesenchymal stem cells, monocytes, macrophages, macrophage plasticity, immunomodulation, TNF-α, IL-6, IL-10, IL-12A, IL-12B, iNOS, Arg-1

Page Number : 190

Advisor : Prof. Dr. Vedat BULUT

TEŞEKKÜR

Her alanda bana desteğini içtenlikle sunan; doğruluk, açık fikirlilik ve uluslararası niteliklerde bilim insanı olma gibi birçok ilkesini örnek aldığım; öğrencisi olmaktan ve tanımaktan gurur duyduğum çok saygıdeğer danışmanım Sayın Prof. Dr. Vedat Bulut'a,

Doktora eğitimim sırasında tanıma şansı bulduğum ve hayatıma estetik dokunuşlarda bulunan Sayın Prof. Dr. Bilkay Baştürk'e,

İmmünoloji doktorası yapmam için gerekli imkânları sağlayan Gazi Üniversitesi'ne;

Tez çalışmam için laboratuvarlarının kapılarını açıp gerekli cihazları kullanımıma sunan Prof. Dr. Fahriye Duygu Çetinkaya ve Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi'nin değerli ekibine, ATQ Biyoteknoloji Firmasına,

Tez çalışmamın yer aldığı proje için maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a ve proje çalışma arkadaşım Dr. Zeynep Zehra Coşkun'a,

Deneyim ve bilgilerini benimle paylaşan hocalarım;

Prof. Dr. Ayşegül Atak Yücel,

Prof. Dr. Cemalettin Aybay

Prof. Dr. E. Ümit Bağrıaçık,

ve Prof. Dr. Hüseyin Tutkak'a ve Gazi Üniversitesi İmmünoloji Anabilim dalının tüm değerli öğretim üyelerine,

Laboratuvar çalışmalarımda özveri ile destek veren değerli iş arkadaşım Burcu Kutlu ve tüm iş arkadaşlarıma,

Fedakarlıkları ve sevgileri tükenmeyen eşsiz aileme ve eşimin ailesine;

Son olarak da özverisini, desteğini, anlayışını ve sevgisini bana her zaman hissettiren; doktora eğitimim süresince hep yanımda olan çok değerli eşim Dilara Kılınçarslan'a ve mutluluk sebebim olan sevgili çocuklarım Arya, Arel ve Arden'e minnet dolu teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) SBAG tarafından (Proje no: 115S563) desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv

ABSTRACT v

TEŞEKKÜR vi

İÇİNDEKİLER vii

ÇİZELGELERİN LİSTESİ xi

ŞEKİLLERİN LİSTESİ xii

SİMGELER VE KISALTMALAR xvi

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 5

2.1. Kemik İliği 5

2.2. Hematopoetik Kök Hücreler (HKH). 6

2.3. Niş 8

2.3.1. Endosteal niş 9

2.3.2. Vasküler niş 10

2.4. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH) 10

2.5. MKH'lerin Klinik Önemi 20

2.6. Monosit / Makrofaj 21

2.6.1. Monosit 21

2.6.2. Monositleri Makrofaj'a farklılaşması yönünde etkileyen sitokinler 24

2.6.3. Makrofaj 27

2.6.4. THP-1 insan monosit hücre hattı 63

2.6.5. Fagositoz 64

2.7. Mezenkimal Kök/Stromal Hücre (MKH/MSH) ve İnsan Kaynaklı Makrofaj Plastisitesi Arasındaki Etkileşimlerde Araştırılacak Genler 65

Sayfa

2.7.1. Tümör nekroz faktörü alfa (TNF-α)..... 66
2.7.2. İnterlökin 6 (İL-6)..... 69
2.7.3. İnterlökin 10 (İL-10)..... 71
2.7.4. İnterlökin 12A (İL-12A)..... 74
2.7.5. İnterlökin 12B (İL-12B)..... 75
2.7.6. Nitrik oksit sentaz 2 (NOS2)..... 76
2.7.7. Arjinaz 1 (ARG1)..... 80
2.7.8. Aktin beta (ACTB) ve gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH)..... 82
2.7.9. Housekeeping gen..... 82
3. GEREÇ VE YÖNTEM..... 85
3.1. Kemik İliği (Ki) Donörlerinin Seçimi..... 85
3.2. Kemik İliği Örneklerinin Alınması..... 85
3.3. İnsan Ki Örneklerinden Mononükleer Hücre (MNH) Eldesi..... 86
3.4. MKH Gelişim ve Dondurma Medyumlarının Hazırlanması..... 86
3.4.1. MCDB 201 medyum..... 86
3.4.2. DM..... 87
3.4.3. DMF-10..... 87
3.4.4. Dondurma medyumu..... 87
3.4.5. FBS sıcakla inaktivasyonu..... 87
3.5. Havuz MKH Oluşturma..... 87
3.6. MKH'lerin *İn Vitro* Kültüre Ekilmesi Ve Çoğaltılması..... 88
3.7. Tripsinizasyon..... 88
3.8. MKH Ve MNH'leri Dondurma ve Çözme..... 89
3.9. Tripan Mavisi Almama Testi (Trypan Blue Exclusion Test)..... 89

Sayfa

3.10. THP 1 (Cat. No: ATCC#TIB-202) Hücre Hattı Kültürleri 90

3.10.1. THP-1 üreme medyumu 90

3.10.2. THP-1 donmuş hücre stoklarının hazırlanması 90

3.10.3. Donmuş THP-1 hücrelerin çözülmesi 90

3.10.4. THP-1 hücre kültürü 91

3.10.5. THP-1 hücrelerinin makrofajlara farklılaştırılması 91

3.10.6. Üreme medyumu 91

3.11. Hücre Kültürü Deneyleri 91

3.11.1. MKH'den elde edilen süpernatantın THP-1 monosit/makrofaj hattı hücreleri üzerine etkisinin araştırılması 92

3.11.2. Ko-kültür çalışmaları 92

3.12. Gerçek Zamanlı PZR ile Gen Ekspresyonu Düzeyinde Ölçümleme 94

3.12.1. Hücrelerden RNA eldesi 94

3.12.2. Komplementer DNA (cDNA) sentezi 101

3.12.3. Pre-amplifikasyon işlemi 103

3.12.4. Gerçek zamanlı (*real time*) polimeraz zincir reaksiyonu (pzr/pcr) 104

3.13. Veri Analizi ve İstatistik 106

4. BULGULAR 107

4.1. Ko-kültür Öncesinde Muamele Edilmiş MKH ve THP-1 Mo/Mq Gen Ekspresyonu Ölçümlemesi 124

4.2. Muamele Edilmiş MKH ve Muamele Edilmiş THP-1 Mo/Mq Gen Ekspresyonu Ölçümlemesi 133

4.3. Muamele Edilmemiş MKH ve Muamele Edilmiş THP-1 Mo/Mq Gen Ekspresyonu Ölçümlemesi 141

4.4. Muamele Edilmiş MKH ve Muamele Edilmemiş THP-1 Mo/Mq Gen Ekspresyonu Ölçümlemesi 149

Sayfa

4.5. MKH Süpernatantı ile THP-1 Mo / Mq Kültürü Sonrası Gen Ekspresyonu Ölçümlemesi..... 157

5. TARTIŞMA..... 159

6. SONUÇ VE ÖNERİLER..... 165

KAYNAKLAR..... 167

EKLER..... 179

EK-1..... 180

EK-2..... 182

EK-3..... 184

ÖZGEÇMİŞ..... 185

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 2.1. MKH derivatiflerinin MKPH'ler ve Hematopoez üzerindeki etkileri 18

Çizelge 2.2. Genetik olarak modifiye edilmiş mezenkimal kök hücreler (MKH) için kullanılan anti kanser ajanlar 19

Çizelge 2.3. Monosit sınıflandırması 27

Çizelge 2.4. İnsan M1 ve M2 Makrofaj Fenotipleri 35

Çizelge 2.5. Makrofaj çalışmalarında sık kullanılan yüzey işaretleri 38

Çizelge 3.1. Elde edilen RNA ürünlerinin konsantrasyon ölçümleri ve deney grupları 97

Çizelge 3.2. Ters Transkripsiyon Karışımı Hazırlama Çizelgesi 102

Çizelge 3.3. cDNA Sentezi Isı Profili 103

Çizelge 3.4. Pre-amplifikasyon Karışımı Hazırlama Çizelgesi 104

Çizelge 3.5. cDNA örneklerinden pre-amplifikasyon için ısı döngüleri 104

Çizelge 3.6. kPZR Reaksiyon Karışımı Hazırlama Çizelgesi 105

Çizelge 3.7. Gerçek Zamanlı PZR Isı Döngüsü 105

Çizelge 4.1. Elde edilen Ct değerleri 108

Çizelge 4.2. Housekeeping gen ct değerlerinin aritmetik ortalamalarının alınması 114

Çizelge 4.3. THP1-MØ ve MKH sonuçlarının sırasıyla kat değişimi ve P değeri dağılım Çizelgesi 118

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.1. Klasik makrofaj ve monosit türevi hücreler 29

Şekil 2.2. Yolk kesesi ve fetal karaciğer kaynaklı makrofajlar 31

Şekil 2.3. Postnatal dönem makrofajları..... 32

Şekil 2.4. Makrofajların M1 ve M2 plastisitesi. 36

Şekil 2.5. Doku hasarı, rejenerasyon ve fibrozisde makrofaj aktivasyon fenotipleri 37

Şekil 2.6. Th1 veya Th2 yönüne plastisite ve makrofajlara etkisi 38

Şekil 2.7. Regüler ve intermediate monositler..... 40

Şekil 2.8. Makrofaj plastisitesi..... 41

Şekil 2.9. M1 ve M2'de salgı farklılıkları..... 41

Şekil 2.10. Makrofajları etkileyen çevresel faktörler..... 42

Şekil 2.11. Uyarımlara göre makrofaj plastisitesi..... 42

Şekil 2.12. Makrofaj alt tiplerinin yüzey reseptör üretimleri ve salgıları 48

Şekil 2.13. Doku yerleşik makrofajların işlevleri 63

Şekil 2.14. TNF sinyalizasyon yolağı 67

Şekil 4.1. TNF-α gerçek zamanlı PZR analizi görüntüsü 107

Şekil 4.2. Arg-1 erime eğrisi analizi görüntüsü : 1-36 nolu örnekler. 108

Şekil 4.3.a. Poly I:C ile muamele edilmiş THP-1 Monosit / Makrofajlarda gen ekspresyonu dağılım grafiği..... 125

Şekil 4.3.b. Poly I:C ile muamele edilmiş MKH'lerde gen ekspresyonu dağılım grafiği 125

Şekil 4.4.a. İFN-ɣ + Düşük doz LPS ile muamele edilmiş THP-1 Monosit / Makrofajlarda gen ekspresyonu dağılım grafiği 126

Şekil 4.4.b. İFN-ɣ ve Düşük doz LPS ile muamele edilmiş MKH'larda gen ekspresyonu dağılım grafiği..... 126

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.5.a. İL-4 + İL-10 + İL-13 ile muamele edilmiş THP-1 Monosit/Makrofajlarda gen ekspresyonu dağılım grafiği 126

Şekil 4.5.b. İL-4 + İL-10 + İL-13 ile muamele edilmiş MKH'larda gen ekspresyonu dağılım grafiği..... 126

Şekil 4.6.a. TNF-α ile muamele edilmiş THP-1 Monosit/Makrofajlarda gen ekspres_ yonu dağılım grafiği..... 127

Şekil 4.6.b. TNF-α ile muamele edilmiş MKH'larda gen ekspresyonu dağılım grafiği. 127

Şekil 4.7.a. Yüksek doz LPS ile muamele edilmiş THP-1 Monosit/Makrofajlarda gen ekspresyonu dağılım grafiği 128

Şekil 4.7.b. Yüksek doz LPS ile muamele edilmiş MKH'larda gen ekspresyonu dağılım grafiği..... 128

Şekil 4.8. Çalışmamızın 1. grubundaki tüm MKH setlerine göre gen ekspresyonu analizlerinin kat değişimi dağılımları 129

Şekil 4.9. Çalışmamızın 1. grubundaki tüm THP-1 Monosit/Makrofaj setlerine göre gen ekspresyonu analizlerinin kat değişimi dağılımları..... 131

Şekil 4.10.a. Muamele edilmemiş olan MKH gen ekspresyonu dağılım grafiği..... 133

Şekil 4.10.b. Muamele edilmemiş THP-1 Mo/Mq gen ekspresyonu dağılım grafiği..... 133

Şekil 4.11.a. Poly I:C ile muamele edilmiş ve THP-1 Mo/Mq ile ko-kültüre alınan MKH gen ekspresyonu dağılım grafiği..... 134

Şekil 4.11.b. Poly I:C ile muamele edilmiş ve MKH ile ko-kültüre alınan THP-1 Mo/Mq gen ekspresyonu dağılım grafiği..... 134

Şekil 4.12.a. İFN-ɣ + DDLPS ile muamele edilmiş ve THP-1 Mo/Mq ile ko kültüre alınan MKH gen ekspresyonu dağılım grafiği..... 134

Şekil 4.12.b. İFN-ɣ + DDLPS ile muamele edilmiş ve MKH ile ko-kültüre alınan THP-1 Mo/Mq gen ekspresyonu dağılım grafiği..... 134

Şekil 4.13.a. İL-4 + İL-10 + İL-13 ile muamele edilmiş ve THP-1 Mo / Mq ile ko-kültüre alınan MKH gen ekspresyonu dağılım grafiği 135

Şekil 4.13.b. İL-4+ İL-10 + İL-13 ile muamele edilmiş ve MKH ile ko-kültüre alınan THP-1 Mo/Mq gen ekspresyonu dağılım grafiği..... 135

Şekil 4.14.a. TNF-α ile muamele edilmiş ve THP-1 Mo/Mq ile ko-kültüre alınan MKH gen ekspresyonu dağılım grafiği..... 136

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.14.b. TNF-α ile muamele edilmiş ve MKH ile ko-kültüre alınan THP-1 Mo/Mq gen ekspresyonu dağılım grafiği..... 136

Şekil 4.15.a. YDLPS ile muamele edilmiş ve THP-1 Mo/Mq ile ko-kültüre alınan MKH gen ekspresyonu dağılım grafiği..... 136

Şekil 4.15.b. YDLPS ile muamele edilmiş ve MKH ile ko-kültüre alınan THP-1 Mo/Mq gen ekspresyonu dağılım grafiği..... 136

Şekil 4.16. Çalışmamızın 2. grubundaki tüm MKH setlerine göre gen ekspresyonu analizlerinin kat değişimi dağılımları 137

Şekil 4.17. Çalışmamızın 2. grubundaki tüm THP-1 Monosit/Makrofaj setlerine göre gen ekspresyonu analizlerinin kat değişimi dağılımları..... 139

Şekil 4.18.a. Poly I:C ile muamele edilmiş THP-1 Mo/Mq ile ko-kültüre edilen muamele edilmemiş MKH'lerin gen ekspresyonu dağılım grafiği..... 141

Şekil 4.18.b. Muamele edilmemiş MKH ile ko-kültüre alınan Poly I:C ile muamele edilmiş THP-1 Mo/Mq gen ekspresyonu dağılım grafiği 141

Şekil 4.19.a. İFN-ɣ + DDLPS ile muamele edilmiş THP-1 Mo/Mq ile ko-kültüre edilen muamele edilmemiş MKH'lerin gen ekspresyonu dağılım grafiği. 142

Şekil 4.19.b. Muamele edilmemiş MKH ile ko-kültüre alınan İFN-ɣ + DDLPS ile muamele edilmiş THP-1 Mo/Mq gen ekspresyonu dağılım grafiği 142

Şekil 4.20.a. İL-4 + İL-10 + İL-13 ile muamele edilmiş THP-1 Mo/Mq ile ko kültüre edilen muamele edilmemiş MKH'lerin gen ekspresyonu dağılım grafiği. 142

Şekil 4.20.b. Muamele edilmemiş MKH ile ko kültüre alınan İL-4+ İL-10 + İL-13 ile muamele edilmiş THP-1 Mo/Mq gen ekspresyonu dağılım grafiği 142

Şekil 4.21.a. TNF-α ile muamele edilmiş THP-1 Mo/Mq ile ko-kültüre edilen muamele edilmemiş MKH'lerin gen ekspresyonu dağılım grafiği..... 143

Şekil 4.21.b. Muamele edilmemiş MKH ile ko-kültüre alınan TNF-α ile muamele edilmiş THP-1 Mo/Mq gen ekspresyonu dağılım grafiği 143

Şekil 4.22.a. YDLPS ile muamele edilmiş THP-1 Mo/Mq ile ko-kültüre edilen muamele edilmemiş MKH'lerin gen ekspresyonu dağılım grafiği..... 144

Şekil 4.22.b. Muamele edilmemiş MKH ile ko-kültüre alınan YDLPS ile muamele edilmiş THP-1 Mo/Mq gen ekspresyonu dağılım grafiği 144

Şekil 4.23. Çalışmamızın 3. grubundaki tüm MKH setlerine göre gen ekspresyonu analizlerinin kat değişimi dağılımları 145

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.24. Çalışmamızın 3. grubundaki tüm THP-1 Monosit/Makrofaj setlerine göre gen ekspresyonu analizlerinin kat değişimi dağılımları..... 147

Şekil 4.25.a. Muamele edilmemiş THP-1 Mo/Mq ile ko-kültüre edilen Poly I:C ile muamele edilmiş MKH'lerin gen ekspresyonu dağılım grafiği 149

Şekil 4.25.b. Poly I:C ile muamele edilmiş MKH ile ko-kültüre alınan muamele edilmemiş THP-1 Mo/Mq gen ekspresyonu dağılım grafiği 149

Şekil 4.26.a. Muamele edilmemiş THP-1 Mo / Mq ile ko-kültüre edilen İFN-ɣ + DDLPS ile muamele edilmiş MKH'lerin gen ekspresyonu dağılım grafiği 150

Şekil 4.26.b. İFN-ɣ + DDLPS ile muamele edilmiş MKH ile ko-kültüre alınan mua_ Mele edilmemiş THP-1 Mo/Mq gen ekspresyonu dağılım grafiği 150

Şekil 4.27.a. Muamele edilmemiş THP-1 Mo/Mq ile ko-kültüre edilen İL-4 + İL-10 + İL-13 ile muamele edilmiş MKH'lerin gen ekspresyonu dağılım grafiği . 150

Şekil 4.27.b. İL-4 + İL-10 + İL 13 ile muamele edilmiş MKH ile ko-kültüre alınan muamele edilmemiş THP-1 Mo/Mq gen ekspresyonu dağılım grafiği 150

Şekil 4.28.a. Muamele edilmemiş THP-1 Mo / Mq ile ko-kültüre edilen TNF-α ile muamele edilmiş MKH'lerin gen ekspresyonu dağılım grafiği 151

Şekil 4.28.b. TNF-α ile muamele edilmiş MKH ile ko-kültüre alınan muamele edilmemiş THP-1 Mo/Mq gen ekspresyonu dağılım grafiği 151

Şekil 4.29.a. Muamele edilmemiş THP-1 Mo / Mq ile ko-kültüre edilen YDLPS ile muamele edilmiş MKH'lerin gen ekspresyonu dağılım grafiği 152

Şekil 4.29.b. YDLPS ile muamele edilmiş MKH ile ko-kültüre alınan muamele edilmemiş THP-1 Mo/Mq gen ekspresyonu dağılım grafiği 152

Şekil 4.30. Çalışmamızın 4. grubundaki tüm MKH setlerine göre gen ekspresyonu analizlerinin kat değişimi dağılımları 153

Şekil 4.31. Çalışmamızın 4. grubundaki tüm THP-1 Monosit/Makrofaj setlerine göre gen ekspresyonu analizlerinin kat değişimi dağılımları..... 155

Şekil 4.32. MKH'lerin kültüre edildiği conditioned medyumu içerisinde kültüre edilen THP-1 Mo/Mq'larda gen ekspresyonu dağılım grafiği..... 157

Şekil 4.33. MKH'lerin kültüre edildiği conditioned medyumu içerisinde kültüre edilen THP-1 Mo/Mq'larda gen ekspresyonu oranlarının dağılımı grafiği .. 158

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	**Açıklamalar**
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
κ	Kappa
ζ	Zeta
Δ	Delta
∞	Sonsuz
pg	Pikogram
ng	Nanogram
µg	Mikrogram
kg	Kilogram
nm	Nanometre
µm	Mikrometre
ml	Mililitre
cm	Santimetre
m	Metre
m^2	Metrekare
µl	Mikrolitre
L	Litre
mM	Milimolar
sn	Saniye
dk	Dakika
cc	Cubic centimetre
Bp	Baz çifti
kb	Kilobaz
kD	Kilodalton

Simgeler	Açıklamalar
Rpm	Round per minute
Ca	Kalsiyum
CO_2	Karbondioksit
H_2O	Su
ddH2O	Bidistile Su
oC	Derece Celsius
U	Ünite
Mq/ MØ	Makrofaj

Kısaltmalar	Açıklamalar
1,25 (OH)2 D3	1,25-Dihidroksi vitamin D3
ACAMP	Apoptotik hücre ile ilişkili moleküler kalıp
ACTB	Aktin beta
AGM	Aort-gonad-mezonefroz
AIP	Aktin-etkileşimli protein
AIS	Akut iskemik inme
ALDOA	Aldolaz A
AM	Alveolar makrofaj
APC/ASH	Antijen sunan hücre (antigen presenting cell)
AREG	Amfiregulin
ARDS	Aort anevrizması
ATF3	Aktive edici transkripsiyon faktörü 3
ATP	Adenozin trifosfat
B2M	β-2-mikroglobülin
BAFF	Tümör nekroz faktörü ailesinin B-hücre-aktivasyon faktörü
BMP-4	Kemik morfojenik protein 4
BPM	Beyaz pulpa makrofajları
CCL	Kemokin (C-C motifi) ligandı
CCR	CC-kemokin reseptörü
CD	Farklılaşma kümesi (Cluster of differentiation)

Kısaltmalar	Açıklamalar
cDNA	Tamamlayıcı (complementary) DNA
CEBPA	CCAAT/Artırıcı bağlayıcı protein alfa
Chi3l3	Kitinaz 3-benzeri 3
cMoP	Ortak monosit öncülü
COX	Siklo-oksijenaz
CSF-1	Koloni uyarıcı faktör 1
CXCL	C-X-C Motifli kemokin ligandı
CVID	Genel tip değişken immün yetmezlik
DAMP	Hasar ilişkili moleküler kalıp
DC-SIGN	Dendritik hücreye özgü hücre içi adezyon molekülü
DDLPS	Düşük doz lipopolisakkarid
DER6	Gecikmiş erken yanıt proteini 6
DH	Dendritik hücre
DMEM	*Dulbecco's modified eagle medium*
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DOE	Deneysel otoimmün ensefelomiyelit
DUA	Doku uygunluk antijenleri
EBV	Epstein-barr virüsü
ECM	Ekstraselüler matriks
EDRF	Endotelyum-türevli rahatlatıcı faktör
eNOS	Endotelyal azot oksit sentaz
EP2	Prostaglandin E2 reseptörü 2
EV	Hücre dışı veziküller
FADD	Ölüm alanı bulunduran Fas ilişkili protein
FBSP	Fetal sığır serum proteini
FCS	Fetal dana serumu
FDA	Gıda ve ilaç idaresi
FEO	Ailesel genişlemeli osteoliz
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
FL	Flt-3 ligandı
FLT-3	Fms ilişkili tirozin kinaz 3

Kısaltmalar	Açıklamalar
FPN1	Ferroportin-1
G0/1	*Gap* 0/1
G6PD	Glikoz-6 fosfat dehidrogenaz
G-CSF	Granülosit koloni uyarıcı faktör
GAL-3	Galektin 3
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
gDNA	Genomik deoksiribonükleik asit
GE	Genomik eliminasyon
GIF	Glikolizasyonu engelleyici faktör
GM	Germinal merkez
GM-CSF	Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör
GMP	Granülosit/makrofaj öncülleri
GOI	İlgilenilen gen
GR	Glikokortikoid reseptör
GRO-α	Büyüme ile ilişkili onkogen α, CXCL1
GSC	Glioma kök hücresi
GTN	Gliseril trinitrat
GVHD	*Graft versus host* hastalığı
HGF	Hepatosit büyüme faktörü
HIV	İnsan bağışıklık eksikliği virüsü
HIF1 α/A	Hipoksiya ile uyarılabilir faktör 1 alfa
HKG	Housekeeping Gen
HKH	Hematopoetik kök hücre
HKÖH	Hematopoetik kök ve öncül hücre
HLA	İnsan lökosit antijeni
HLA-DR	D antijeni ilişkili insan lökosit antijeni
HNSCC	Skuamoz hücreli baş ve boyun karsinomu
HO	Heme oksijenaz
HÖH	Hematopoetik öncül hücre
HPRT-1	Hipoksantin fosforibosil-transferaz
IBD	İnflamatuar barsak (bowel) hastalığı
IBD-1	İnflamatuar barsak hastalığı tip 1

Kısaltmalar	Açıklamalar
IC	İmmün kompleks
ICAM-1	Hücre içi adhezyon molekülü-1
IDDM	İnsüline bağımlı tip 1 diyabet
İg	İmmünoglobülin
IGAD-2	İmmünoglobülin A yetmezliği tip 2
IGF1	İnsülin-benzeri büyüme faktörü 1
IHC	İmmünohistokimya
IMD-16	İmmün yetmezlik tip 16
IP-10	İnterferon gama ile uyarılabilir protein 10
IRF3/4/5	İnterferon düzenleyici faktör 3/4/5
IT-HKH	Orta dönem hematopoetik kök hücre
İDO	İndolamin 2,3-dioksijenaz
İFN-γ	İnterferon gama
İKH	İskemik kalp hastalığı
İL	İnterlökin
İL1RA	İnterlökin-1 reseptörü antagonisti
iMKH	İnsan mezenkimal kök hücresi
iNOS	Uyarılabilir nitrik oksit sentaz
JAK	Janus kinaz
JIA	Juvenil idiyopatik artrit
KBB	Kan-beyin bariyeri
kDH	Klasik dendritik hücreler
KF	Kistik fibroz
KH	Karaciğer - *Kupffer* hücreleri
Kİ	Kemik iliği
KİT	Kemik iliği transplantasyonu
KO	Nakavt
KPM	Kırmızı pulpa makrofajları
kPZR/qPCR	Gerçek zamanlı (*real time*) kantitatif PZR
LDHA	Laktat dehidrogenaz A
LH	*Langerhans* hücreleri
LIF	Lösemi inhibitör faktör

Kısaltmalar	Açıklamalar
LORD	Geç başlangıçlı retinal dejenerasyon
LPS	Lipopolisakkarit
LT-BMC	Uzun dönem kemik iliği kültürü
LT-HKH	Uzun dönem hematopoetik kök hücre
LXR	Karaciğer x reseptörü
LY6C	Lenfosit antijeni 6 kompleksi, C lokusu
MALT	Mukozaya bağlı lenfoid doku
MBM	Marjinal bölge makrofajları
M-CSF	Makrofaj kolonisi uyarıcı faktör
MCI-1	Miyokard infarktüsü, duyarlılık, tip 1
MCP-1	Monosit kemotaktik protein-1
MDC	Makrofaj türevli kemokin
MDP	Makrofaj/denritik hücre öncülleri
MHC	Ana doku uygunluk kompleksi
MIF	Makrofaj göç önleyici faktör
MIP3-α	Makrofaj enflamatuvar proteini 3 alfa
miRNA	Mikro ribo nükleik asit
MKH	Mezenkimal kök hücre
MLRS	Sıtmaya karşı duyarlılık ve direnç
MMM	Marjinal metalofilik makrofajlar
MMPs	Matriks metaloproteinazlar
MNH	Mononükleer hücre
MP	Makrofaj öncülleri
MPP	Multipotent öncülleri
MS	*Multipl skleroz*
MSH	Mezenkimal stroma hücreleri
MSS	Merkezi sinir sistemi
Myb	MYB öncül onkogen, transkripsiyon faktörü
MyD88	Miyeloid farklılaşması öncül yanıtı 88
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
NFκB	Nükleer faktör-κB
NK	Doğal öldürücü (Natural Killer)

Kısaltmalar	Açıklamalar
NKT	Doğal öldürücü T hücreler
NLR	NOD-benzeri reseptör
NMMA	NOS inhibitörü NG-monometil-L-arginin monoasetat
nNOS	Nöronal azot oksit sentaz
NO	Azot oksit
NOS	Azot oksit sentaz
NR4a1	Nükleer reseptör alt ailesi 4, A grubu üyesi 1
NTC	Boş su kontrol (Non template control)
OPG	Osteoprotegerin
OPTB-2/7	Osteoporoz, otozomal resesif, tip 2/7
P-MKH	Plasenta türevli mezenkimal kök hücre
P38MAPK	p38 mitojen uyarımlı protein kinazlar
PAI-1	Plazminojen uyarıcı inhibitör-1
PAMP	Patojen ilişkili moleküler kalıp
PanIN	Pankreatik intra-epitelyal neoplazi
PAP	Pulmoner alveolar proteinoz
PBS	Fosfat tamponlu salin
PDB-2/5	Paget kemik hastalığı, tip 2/5, erken başlangıç
PDGF	Platelet türevli büyüme faktörü
PFKP	Fosfofruktokinaz
PGAM-1	Fosfogliserat mutaz
PGE2	Prostaglandin E2
PGK-1	Fosfogliserat kinaz
PM	Peritonal boşluk makrofajları
PMA	Forbol miristat asetat (phorbol 12-myristate 13-acetate)
PMN	Polimorfonükleer lökositler
POLY (I:C)	Poliriboinosinik poliribositidilik asit
PPARg	Peroksizom çoğaltıcı-aktif reseptör g
PZR/PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RA	Romatoid artrit
RANKL	Nükleer faktör kappa-B ligandı reseptör aktivatörü

Kısaltmalar	Açıklamalar
RANTES	Uyarıma bağlı, normal T hücre tarafından üretilen ve salgılanan
RELM-α	Rezistin benzeri molekül -α, RTNLα, FIZZ1
Retnla	Rezistin benzeri molekül α
RLR	RIG-I-benzeri reseptör
RNA	Ribo nükleik asit
RNI	Reaktif azot ara maddeleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
RPMI	Roswell park memorial enstitüsü
RUNX1	Runt ilişkili transkripsiyon faktörü 1
SCF	Kök hücre faktörü (Stem cell factor)
SDF-1	Stromal hücre türevli faktör-1(Stromal cell-derived factor 1)
SDF-1α	Stromal hücre türevli faktör-1 alfa
SOCS 3	Sitokin sinyalizasyonunu baskılayıcı (Suppressor of cytokine signaling 3)
SOX-1	*SRY-Box 1*
SP	Sürfaktan ilişkili protein
SS	*Sjögren* sendromu
SSEA-4	Stage özgü embriyonik antijen-4
ST-HKH	Kısa dönem hematopoetik kök hücre
STAT	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon uyarıcı
STRO-1	Stromal hücre hattı antikoru
TB	Tüberküloz
TFH	Foliküler T hücre
TGF-β	Transforme edici büyüme faktörü β
TGFBR1	Transforme edici büyüme faktörü β reseptörü 1
TH	Yardımcı T hücre
TIE2	Tirozin proteini kinaz reseptörü TIE-2
TIMPs	Metalloproteinazların doku engelleyicileri
TLR	Toll benzeri reseptör
TNF- α	Tümor nekroz faktörü alfa

Kısaltmalar	Açıklamalar
TPO	Trombopoeitin
TRADD	TNFR1-ilişkili ölüm alanı
TRAF	Tümör nekroz faktörü reseptörü ilişkili faktör
TRAIL	Tümör nekroz faktörü ilişkili apoptoz uyaran ligand
TREG	Düzenleyici T hücre (Regülatör T hücre)
TSP-1	Trombospondin-1
TRAPS	NF reseptörü ilişkili periyodik ateş sendromu
TUBA1	α-tübulin
U-MKH	Göbek bağı türevli mezenkimal kök hücre
UTP	Üridin trifosfat
VCAM-1	Vasküler hücre adezyon molekülü-1
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VIM	Vimentin
YDLPS	Yüksek doz lipopolisakkarid

1. GİRİŞ

Mezenkimal kök hücreler (MKH) çeşitli hücre soylarına farklılaşabilen multipotent özellikle heterojen bir hücre popülasyonudur. MKH'ler, kemik iliği (BMSC'ler) ve yağ dokusu (ASC'lar) da dahil olmak üzere sayısız doku kaynağından izole edilmiştir ve kemik, kıkırdak, yağ, kas ve deri dahil olmak üzere sayısız hücre tipine farklılaşma kabiliyetini muhafaza ettiği gösterilmiştir.

MKH'lar immün yanıtı baskılayıcı kapasiteye sahiptirler. Yapılan fare deneylerinde nitrik oksit yoluyla T hücre çoğalmasını ve işlevini inhibe edebildiği bildirilmiştir. MKH'lerin bu bağışıklık (immün) düzenleyici kapasitesi, yangısal sitokinler olan İFN-γ ile TNF-α veya İL-1β beraberinde uyarılmaktadır. İnflamatuvar sitokinlerin MKH üzerindeki etkisi ile iNOS ekspresyonu ve kemokinlerin logaritmik olarak artış gösterdiği yine bu çalışmalarda raporlanmıştır.

MKH'lerin mikroçevrelere duyarlılığı, immün sistemdeki hücrelerin etkilerine ilişkin yapılan araştırmalarda açıklanmaktadır. MKH'lerin; T-Hücrelerin farklı tipleri, Doğal Öldürücü Hücreler (Natural Killer Cells; NK), Dendritik Hücreler (DH), Monositler ve Nötrofilleri içeren geniş bir spektrumdaki hücre ile etkileşimde olabileceği tanımlanmıştır. Bu çalışmaların tamamında olmasa da çoğunda hedef hücrenin çoğalmasını; hücre-hücre etkileşimi yoluyla veya prostaglandinler, indolamin 2,3-dioksijenaz, çözünür HLA-G5, İL-6, İL-10, TGB-β1, HGF, iNOS, ve heme oksijenaz-1 gibi faktörlerin salgılanması yoluyla azalttığı gösterilmiştir. İmmün (Bağışıklık) ortamında MKH'lerin aktivasyonunun özgül bir örneği, nitrik oksit (azot oksit) ve bazı sitokinlerin ekspresyonu için diğer üç sitokinden biri ile birlikte interferon-γ tarafından aktive edildiğinin raporlanmasıdır. Sitokinler T hücrelerin MKH'lere doğru göç etmesini sağlar ve sonrasında nitrik oksit T Hücrelerin çoğalmasını inhibe eder.

MKH'ler tarafından bir dizi büyüme faktörü ve anti-enflamatuvar protein salınımı; interlökin 1 (İL-1), İL-2, İL-12, tümör nekroz faktörü alfa (TNF-α) ve interferon gama (İFN-γ) gibi yangısal moleküllerine yanıt olarak modüle edilebilir. Böylece T hücreleri, doğal öldürücü hücreler (NK), B hücreleri, monositler, makrofajlar ve dendritik hücreler dahil birçok immün sistem hücresinin karmaşık sinyal iletiminde önemli rol alır. Önceki çalışmalar, pro-enflamatuvar sitokinlerin immün reaksiyonları baskılaması için insan

MKH'lerinin göçünü artırdığını göstermiştir. MKH'lerin en iyi tanımlanmış immün düzenleyici etkisi; aktive T-hücreleri G0/G1 fazında hapsederek, T-hücre çoğalmasını inhibe etmesidir. MKH'lerin İL-6, İL-10, indolamin, 2,3-dioksijenaz, iNOS ve PGE2 gibi çözünür faktörlerin salınımının anti-enflamatuvar ve rejeneratif ortamın modülasyonu yoluyla yaraya yardımcı olabileceği düşüncesine rağmen ve immünomodülatör yolaklar, bu modülasyonun gerçekleştiği tam moleküler mekanizma kısmen anlaşılmış ve görünüşte çelişkilidir; kısmen yetişkin kök hücre yaşlanmasının *in vivo* ya da *ex-vivo* immün modülatör özelliklere nasıl katkıda bulunduğu açık bir şekilde ifade edilen verilerin eksikliğinden kaynaklanmaktadır.

Bu hücreler T hücre çoğalmasını ve B hücre terminal farklılaşmasını, NK hücre sitotoksitesi ve dendritik hücre maturasyonunu engelleyebilir.

MKH'ler İnsan Lökosit Antijeni (HLA) sınıf II antijenlerini eksprese etmezler. MKH'lerin bu düşük immünogenitesine ek olarak çeşitli immün sistem hücrelerini baskılaması ve immün işlevleri düzenleyici etkileri sebebiyle rejeneratif tıp ve immün terapide önemli bir hücre kaynağı haline gelmektedir.

MKH'ler, farklılaşma ve hatta transdiferasyon ile dokuların onarımını da geliştirirler. Bununla birlikte, birçok durumda hücrelerin, hasarlı dokularda önemli ölçüde engreftman veya farklılaşma olmaksızın onarım ve işlevsel gelişme sağladığı tanımlanmıştır.

Tüm bu sebeplerden dolayı MKH'lerin birçok hastalıkta terapötik ajan olarak rolü araştırılmıştır. Kemik iliği türevli MKH'ler immün düzenleyici özelliklerinden dolayı immün sistem rahatsızlıklarının tedavisinde çok önemli bir potansiyel teşkil ederler. Son çalışmalar MKH'lerin immün düzenleyici kapasiteleri ve çeşitli enflamasyon ilişkili hastalık için terapötik potansiyeli olduğunu göstermiştir. MKH'ler güncel çalışmalarda nörodejenaratif hastalıklardan, kansere kadar bir çok hastalığın tedavisi için umut niteliği taşımaktadır.

Son çalışmalarda MKH'ler ve makrofajlar arasındaki işlevsel etkileşimler tanımlanmıştır. MKH'lerin, makrofaj işlevlerini de düzenlediği geçtiğimiz yıllarda açıklık kazanmıştır. MKH'ler ile ko-kültür; makrofajların artmış interlökin 10 (İL-10) ve düşük tümör nekroz faktörü alfa (TNF-alpha), İL-12, düşük ko-stimülatör molekülü CD86, ve insan lökosit antijeni sınıf II molekülü ekspresyonu yoluyla düzenleyici fenotip göstermeye yönlendirir.

Ancak insan kemik iliği kaynaklı MKH'ler ve fenotipleri değişmiş olan makrofajlar arasındaki ilişki henüz yeterli ve bilimsel kesin verilerle gösterilememiştir. İnsanlarda da kemik iliği kaynaklı MKH'lerin makrofajların M2 yönünde immün baskılayıcı farklılaşmasına neden olduğu ve bu nedenle bu bölgedeki MKH'lerin diğer hücrelerde özellikle insan kemik iliği nişi bölgesindeki hücrelere de etki ederek bu bölgenin immün sesiz bölge olmasında katkısının bulunduğunu düşünmekteyiz. Çeşitli mikro çevrelerde insan kemik iliğinin niş bölgesinin MKH'lerin immünmodülatör etkilerinin nasıl değiştiğinin ve insan kemik iliğinin niş bölgesinde bulunan MKH'lerin *ex vivo* olarak immün modülatör etkilerinin nasıl artırılabileceğini araştırmak için yapılan bu çalışma translasyonel bir önem taşımaktadır.

THP-1 monositik hücre hattı forbol miristat asetat (PMA) ile uyarıldığında makrofaj olarak farklılaşır ve M1 veya M2 makrofaj yönünde polarize olabilecek potansiyele sahip olur. Çalışmamızda PMA ile uyarılmış THP-1 monositleri ve MKH'lerin etkileşimi gen ifadesi düzeyinde araştırılmıştır.

MKH'lerin klinik tıp açısından kullanımı ve faydaları hala tam anlamıyla bilinmemektedir. Çeşitli mikroçevrelerde insan kemik iliği MKH'lerin immünomodülasyon etkilerinin karakterizasyonu ve bunun nasıl artırılabileceğinin anlaşılması, MKH tedavileri için translasyonel tıp açısından bir önem arz etmektedir. MKH'lerin hücre-hücre etkileşimleri ile ürettikleri protein veya sitokinlerin terapötik etkilerinin değerlendirilmesi ve araştırılması klinik tıp açısından önem arz edecektir. Bizde çalışmamızda MKH'ler ve THP-1 monositlerinin etkileşimlerini farklı koşullarda araştırdık.

Bu nedenle çalışma hedeflerimizi insan kemik iliği niş bölgesine ait MKH ile insan kemik iliği kaynaklı makrofajların fenotipi arasındaki işlevsel ilişkinin ve makrofajların M1 /M2 dengesi üzerine etkisinin incelemek, kemik iliği kaynaklı MKH lerin bu etkilerinden dolayı MKH lerin insan kemik iliği niş bölgesinin immün sesiz bir bölge olmasında rolünü belirlemek, insan kemik iliği niş bölge kaynaklı MKH hücrelerin ortamdaki immünmodülatör özelliklerin belirlenmesi ile çeşitli yangısal hastalıkların tedavisi için kemik iliği niş bölgesinden üretilen MKH ler ile kliniğe uygulanabilir sonuçlar elde edilmesine kişiye özel tedavi geliştirilmesine ön bilgilerle katkı sağlamak olarak belirledik. Aynı zamanda hem MKH'leri hem de monositleri değişik sitokin ortamlarında modelleyerek ko-kültürlerini gerçekleştirdik ve etkileşimlerini belirlediğimiz 9 gen düzeyinde gözlemleyebildik.

Daha önce TÜBİTAK ve BAP tarafından desteklenen projelerde fare J774.1 hücre hattı çalışmalarında makrofaj plastisitesi üzerine çalışmalar yapılmıştır (Aksoy H. vd. 2012). M1 veya M2 yönüne plastisite çalışma sonuçları raporlanmış ve yayımlanmak üzere SCI indeksli dergilere gönderilmiştir. Bu çalışmaların insan monosit/makrofajları ve MKH etkileşimleri açısından ilerletilmesi ve translasyonel sonuçların elde edilmesi bu proje ile mümkün olabilmiştir. Bu nedenle insan monosit/makrofajlarını M1 yönüne plastisiteye sürüklemek için İFN-γ + düşük doz LPS; M2 (M2a/M2c) yönüne plastisite sağlamada İL-4, İL-10, İL-13 ve de TNF-α sitokinlerle ile muamele ederek bu makrofajların benzer sitokin profil gösteren hastalıklardaki davranışlarını modelleyerek MKH üzerine etkilerini de inceledik. Benzer şekilde yangısal mikroçevre koşullarında MKH'lerin değişimlerini ve değişen etkilerini gen ifadesi düzeyinde görmek için, bu sitokin kokteylleri ile MKH'lerin prime edilmesi sonrasında MKH ve THP-1'lerin TNF-α, İL-6, İL-10, İL-12A, İL-12B, iNOS ve Arg-1 gen ifadeleri Beta aktin ve GAPDH gen ifadeleri ile birlikte gerçek zamanlı PZR ile ölçümledik. Böylece patojenlere ve otoimmün cevaba bağlı yangısal olayları *in vitro* modelleyerek translasyonel tıp bilgi birikimine katkılar sağlamayı hedefledik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik İliği (Ki)

Kemik, korteks ve medulladan oluşmaktadır. Korteks, kompakt kemiklerin güçlü bir tabakasıdır; Medulla, medullar boşluğu oluşturan ve süngersi kemikten bir petek kümesidir. Latince adı *Medulla ossium* olan kemik iliği; medulla içerisinde yer almaktadır. Çeşitli kan hücrelerine farklılaşma ve üreme yeteneğindeki hematopoetik hücreleri ihtiva eden kırmızı kemik iliği (*medulla ossium rubra*) veya çoğunlukla adipoz doku ihtiva eden sarı kemik iliği (*medulla ossium flava*) olmak üzere başlıca iki çeşidi tanımlanmaktadır. Kırmızı kemik iliği, kan hücrelerinin üretildiği (hematopoezin gerçekleştiği), sarı kemik iliği ise yağ hücrelerinden (adiposit) zengin olan kemik iliği çeşididir. Hematopoez fetal gelişim sırasında yolk kesesi ve para-aortik mezenşimin kan adacıklarında başlar. Gebeliğin üç ve dördüncü haftalarında fetal karaciğerde gerçekleşmeye başlar ve sonrasında kemik iliğine geçer. Doğum sonrası ilk evrede yeni doğan vücudundaki tüm kemik iliği, kırmızı kemik iliğidir. Yeni doğanda parmak kemiklerinde dahi hematopoez gerçekleşebilmektedir. Artan yaşla beraber kırmızı kemik iliği sarı kemik iliğine dönmektedir. Erişkin bireylerde kırmızı ve sarı kemik iliği miktarı birbirine yakındır. Kırmızı kemik iliği başlıca pelvis, göğüs kafesi, kafatası, kaburga, omur, skapula gibi yassı kemiklerde ve femur, humerus gibi uzun kemiklerin epifizal uçlarındaki süngerimsi dokuda bulunur. Sarı kemik iliği ise, uzun kemiklerin ilik kanalı denen merkezi boşluklarında bulunur [1,2].

Kemik iliği postnatal hematopoezin gerçekleştiği yer olmasının yanı sıra, timüsle beraber primer lenfoid dokuları oluştururlar. Kemik iliği; eritrosit, granülosit, T ve B lenfositler, monosit ve trombosit üretilen ana hematopoetik organdır ve B lenfositlerin matürasyon bölgesidir. Bu özellikleri dolayısıyla kemik iliği, dolaşım sisteminin ve immün sistemin önemli bir öğesi niteliği taşımaktadır. Kemik iliğinin başlıca bileşenleri; hematopoetik doku adacıkları, yağ hücreleri, trabeküler kemik örgüsü ve bunları saran vasküler sinüslerdir. Kemik iliğinde lenfatik drenaj yoktur. Hematopoez, kemik iliğinde bulunan multipotent niteliğindeki hematopoetik kök hücreler tarafından gerçekleştirilir. Kemik iliğindeki öncül (precursor) hücrelerin çoğalması (proliferasyonu) ve olgunlaşması (matürasyonu) çeşitli sitokinler ile yönlendirilmektedir. Bu sitokinlerin çoğu koloni uyarıcı

faktörler (colony-stimulating factors) olarak isimlendirilmektedir. Hematopoietik süreci etkileyen sitokinler, kemik iliğinde stromal hücreler ve makrofajlar tarafından üretilir. Bu sitokinler ayrıca uyarılmış T-lenfosit ve ve aktif makrofajlar tarafından da üretilebilir [1,2].

2.2. Hematopoetik Kök Hücreler (HKH)

Birçok doku postnatal yaşamda rejenerasyona özgü özelliklerini korur; bu da organ işlevinin ömür boyu sürdürülmesi için çok önemli bir süreçtir. Bu, yeni hücrelerin önemli bir kaynağı olan kök hücre adı verilen belirli hücrelerin varlığıyla mümkün olmaktadır. Kök hücreler farklılaşma süreçlerini tamamlamamıştır. Kendini yenileme ve herhangi bir olgun hücre tipine farklılaşma potansiyeli ile karakterize edilmiştir. Bir hücrenin kendini yenilemesi, farklılaşmamış durumunu korurken sayısız bölünme döngüleri gerçekleştirmesi yeteneğidir. Herhangi bir olgun hücre tipine farklılaşma potansiyeli, embriyonik kök hücrelerin karakteristiği olan sitokin ve diğer uyaranlar ile yönlendirilerek herhangi bir olgun hücre tipine farklılaşma kapasitesidir. Postnatal yaşamda, kök hücreler multipotentlerdir. Multipotent özelliği çok sayıda ama sınırlı hücre tiplerine farklılaşma yeteneği olarak tanımlanmaktadır. Kök hücrelere bir örnek de hematopoetik kök hücrelerdir (HKH'ler) ve tüm kan hücreleri bu hücrelerden gelişmektedirler. HKH'ler genomik bütünlüğü koruma, işlevsel kapasiteyi sürdürme, çoğalma ve farklılaştırma yeteneğindedirler. HKH'ler, endosteal ve vasküler nişleri içeren kemik iliği (Ki) oyuğundaki Niş olarak adlandırılan özel mikro çevrelerde organize olurlar. Her iki mikroçevre de yaşam boyunca HKH aktivitesini koruyan ve düzenleyen sinyallerin kaynağıdır. Ayrıca çeşitli kimyasal aracılar ve hücre dışı matriks de HKH'lerin kaderinin şekillenmesinde önemli bir rol oynamaktadır [3].

Hematopoez, hematopoietik kök ve öncül hücrenin (HKÖH'ler) kendini yenileme, apoptoz, çoğalma (proliferasyon) ve farklı türde olgun kan hücrelerini oluşturan çoklu soylara farklılaşma da dahil olmak üzere devam eden hücresel eylemleri gösterdiği bir prosedürdür. Bu süreç HKÖH'ler ile Mezenkimal Kök Hücreler (MKH) arasındaki işbirliğinin bir sonucudur. Farklı HKÖH alt popülasyonları CD34 belirteçi eksprese ederler. Bu hücreler hem en farklılaşmamış kök hücre grubunu; hemde çoksoylu üretim kapasitesine sahip farklılaşma hiyerarşisinin alt basamağında bulunan multipotent öncülleri (MPP'ler) temsil ederler. Kendini yenileme, HKÖH'nin yeniden yapılanmasını sürdürmek için gereklidir ve bu nedenle yaşam boyu hematopoez için bir ön şarttır. Çoğu HKÖH,

sessiz (quiescent) fazdadır ve hücre döngüsünün G0 evresindedir. Günlük hematopoezi büyük ölçüde, oldukça proliferatif olan downstream HKPK'ler sağlar [4].

Hematopoezin transkripsiyonel düzenlenmesi birçok farklı organizmada incelenmiştir ve hematopoetik kök hücrelerin miyeloid, lenfoid veya eritromegakaryositik soyları ayırt edip etmediğini belirten birçok transkripsiyon faktörü tanımlanmıştır [5].

Hematopoezin gerçekleşmesinde uygun bir mikro çevre ve büyüme faktörleri gereklidir. Eğer farklılaşmamış hücrelerin çoğalması uyarılır ya da baskılanırsa hematopoetik hücrelerin miktarı aşırı artar ya da azalır. Bu durum çeşitli hastalıklara neden olur. Hematopoez sürecindeki bu farklılaşmalar lösemi, aplastik anemi, lenfoma, miyelodisplazi, myeloproliferatif bozukluklar, hemofagositik sendrom gibi hematopoetik malignitelere yol açar.

Tüm erişkin hematopoetik sistemini yeniden yapılandırma kapasiteleri dolayısıyla HKH'ler, çoklu hematopoetik bozuklukların tedavisinde çok değerli konumdadırlar. On yıllardır HKH'lerin terapötik potansiyeli, kemik iliği transplantasyonu ile hematopoetik sistem yenilenmesinde kullanıldı. HKH'lerin kaderini belirleyen uyarı mekanizmalarını anlamak, klinik uygulamaların başarısı için çok önemli olacaktır. Genetik olarak modifiye edilmiş fare modellerini kullanan son araştırmalar, HKH'lerin kendini yenilemesinin ve çok soylu farklılaşmasının kararlarının, bu hücreleri çevreleyen niş ile olan etkileşimine bağlı olduğunu ortaya koymaktadırlar. Deneysel kanıtlar, bu mikro çevre düzenleyici mekanizmaların düzenlenmesinin, çeşitli hematopoetik hastalıklarda önemli rol oynadığını göstermiştir. Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda çeşitli hücre tipleri, HKH'lerin aktivitesini düzenleyici çeşitli sitokinleri ve diğer faktörleri sağladıkları için HKH'lerin potensiyel niş destekleyici hücreleri olarak tanımlanmıştırlar [6].

HKH'ler kendilerini yenileme (rejenerasyon) derecesi, yaşam döngüsü ve farklılaşma kabiliyetlerine göre işlevsel olarak heterojen bir hücre popülasyonudur. Rejenerasyon heterojenliği, çok soylu hematopoez yeteneğini sürdürebilmesi ve engraft yeteneğine göre sınıflandırılan uzun-dönem (Long Term - Hematopoetik Kök Hücre ; UDHKH), orta-dönem (Intermediate - Hematopoetik Kök Hücre ; ODHKH) ve kısa dönem HKH'lerin (Short Term Hematopoetik Kök Hücre; KDHKH) bu farklı kapasiteleri ile oluşmaktadır [6].

Yakın zamanda fareler üzerinde yapılan çalışmalarda UD-HKH diye adlandırılan uzun dönem rejenerasyon kapasitesine sahip olan HKH'lerin metabolik profillerinin diğer kök hücrelerden farklılık gösterdiği bildirilmiştir [7]. Bütün çalışmalar HKH'lerin yüzeyinde CD-34 yüzey glikoproteini taşıyan küçük sessiz öncül hücreler olduğunu göstermiştir [8].

HKÖH'lerin allojenik ve otolog transplantasyon için kullanımı giderek artmaktadır, ancak trombosit sayılarının normal düzeylere getirilmesi daha düşük bir oranda gerçekleşir; Bu nedenle yapılan çeşitli çalışmalarda; *in vitro*da HKÖH'lerin çoğalmasının, nakilden sonra daha hızlı iyileşmeye yardımcı olabileceğini göstermiştir [4].

2.3. Niş

Niş; kök hücreler primitif formundayken, o hücreyi çevreleyen hücreler, hücre dışı (ekstrasellüler) matriks ve çözünebilen faktörlerin bir bileşimidir. 1978'de Ray Scofield tarafından kavramsal olarak önerilen HKH nişi, işlevsel olarak ilk kez tek tip osteoblastik hücreler yerine şu anda çok hücreli bileşenlerden oluşturulduğu bilinen ve "endosteal niş" olarak adlandırılan trabeküler kemiğin endosteal bölgesinde tanımlanmıştır. Bununla birlikte, daha sonraki çalışmalarda HKH'lerin bir kısmının merkezi kemik iliğindeki venöz sinüzoidlerde bulunduğu ortaya konmuş ve "vasküler niş" tanımlanmıştır. Erişkin kemik iliğinin farklı alanlarındaki niş hücre popülasyonlarının, HKH'lerin uzun dönem korunmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını düzenlediği raporlanmıştır. HKH durağanlığı (korunumu=maintanance), genomik bütünlüğü korumak ve işlevsel kapasiteyi kaybetmemek için pasiflik ve düşük metabolik faz ile ilişkilidir. Bununla birlikte kayıp veya hasar gören kan hücrelerinin yenilenmesi için hematopoez gerçekleşmelidir. Bu durumda HKH'lerin çoğalması ve aktive edilmesi gerekir. Bu aktivasyon niş ile sağlanmaktadır [9].

Kemik iliğinde endosteal bölgenin primitif HKH'leri barındıran esas niş alanı olduğu ileri sürülmektedir. Vasküler alanda ise kök hücrelerin farklılaşarak olgun kan hücrelerine döndüğü ve bu iki farklı niş bölgesinde HKH'lerin farklı davranışlarının, o bölgelerin mikroçevre özelliklerine bağlı olarak şekillendiği düşünülmektedir. MKH'ler kemik iliği mikroçevresinin başlıca hücresel elemanlarıdır.

HKÖH'lerin hücresel etkileri hem transkripsiyonal düzenleyici ağlar gibi içsel hücresel faktörler hem de büyüme faktörleri, sitokinler, kemokinler ve mikro-veziküller gibi dışsal hücresel faktörler tarafından kontrol edilir. Örneğin; G-CSF, CXCL12 ve transforme edici büyüme faktörü β (TGF-β). Embriyonik, fetal ve erişkin yaşamda hematopoez, çözünebilir bileşenler ve hücre-hücre etkileşimleri içeren bir mikro çevreye bağlıdır. Bu mikro ortam, hematopoietik niş olarak bilinir ve çoğunlukla düzenli HKÖH sessizliğini ve aktivasyonunu ayarlayan ortak bir mezenkimal orijinli öncülden türevlenmiştir. Kök hücreler (HKPK'ler veya MKH'ler dahil) dokuların ömür boyu yenilenmesini sağlar. Araştırmalar MKH'lerden gelen sitokinler ve büyüme faktörlerinin; bağışıklık yanıtının denetimi, hücre sağkalımı, anti-apoptoz, metabolizma, çoğalma, farklılaşma, hematopoez, anjiyojenez, miyojenez, yeniden şekillendirme, yara iyileşmesi, saç büyümesi, nöroproteksiyon, kolateral gelişme ve böbrek koruma gibi süreçlerdeki etkisinin MKH ürünlerinin ilgili hücreler üzerindeki doku onarımı ve rejenerasyonunu artıran olumlu etkileri ile olduğunu göstermiştir [4].

Niş heterojenitesini oluşturan hematopoetik olmayan hücreler; osteoblastlar, endotelyal hücreler, perisitler, adipositler ve *Schwann* hücreleridir. Ayrıca sempatik sinir sisteminden gelen sinyallerde HKH nişinin düzenleyici birimlerinden olarak tanımlanmıştır. Hematopoetik hücreler ise; makrofajlar, osteoklastlar, megakaryositler, lenfositler ve nötrofillerdir [6].

2.3.1. Endosteal niş

Endosteal niş, iç kemik kabuğu (*shell*) yüzeyinde, özellikle de endokortikal ve trabeküler yüzeylerin yakınında yer almaktadır. Endosteum kemik ile kemik iliği arasında yer alan bir yapıdır. Osteoblastlar ve osteoclastları içerir; fibroblastlar, makrofajlar, endotelyal hücreler ve adipositler de endosteuma yakın lokalize olurlar. Osteoblastların HKH olgunlaşmasını etkilediği gösterilmiştir. Endosteal niş daha çok düşük çoğalma hızına sahip sessiz hücrelerle karakterizedir [3].

Endosteal niş, kök hücrelerin en korunaklı olduğu niş bölgesidir. Bu bölgede HKH'ler, N-kadherin pozitif özellikli osteoblastlar, yüksek düzeyde CXCL12 (SDF-1 alfa) eksprese eden mezenkimal kök hücreler (MKH) ve regülatör T hücrelerin (Treg) karşılıklı

etkileşimleri (*cross talk*) ile immün korunaklı (*immune privileged*) bir mikroçevre oluştuğu düşünülmektedir [10,11].

2.3.2. Vasküler niş

Kemik iliğindeki kan damarları, periferik dolaşım ve hematopoetik kısımları birbirinden ayıran bir duvar olmanın yanısıra hematopoez, kök hücre göçü ve konuşlanması gibi süreçleride düzenleme yeteneğindedir. Perivasküler niş ise, yüksek çoğalma ve diferansiyasyon kapasitesine sahip, sonunda periferik dolaşıma katılacak olan hücreleri içerir ve kemik iliği mikrovaskülatüründeki sinüzoitlerle yakın temas içindedir [3].

Nişler; adezyonu, sessizliği, kemotaksisi ve vasküler niş söz konusu olduğunda ise diferansiyasyonu sağlamak amacıyla etkileşimde bulunurlar.

Genel olarak, kök hücre nişini teşkil eden bileşenler arasında, stromal hücreler, ekstraselüler matriks, kemokin, sitokin ve büyüme faktörleri, metabolik faktörler, nöral uyarılar, hormonlar gibi parakrin etkili faktörler yer almaktadır. Kök hücrenin biyolojik özellikleri bu alandaki hücre-hücre ilişkileri, kök hücrenin matrikse sıkı yapışması, matriks proteinleri, otokrin-parakrin çözünür faktörlerin etkisi sonucu belirlenmektedir [12,13].

2.4. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH)

Mezenkimal Kök Hücreler (MKH), Mezenkimal Stroma Hücreleri (MSH) olarak da adlandırılırlar. Kemik iliğinde Mezenkimal Kök Hücreleri (MKH) ilk kez Friedenstein tanımlamıştır [14]. Osteositler, adipositler ve kondrositler gibi mezenkimal soylara farklılaşabilen heterojen bir hücre alt kümesi tarif etmiştir. MKH'ler kemik iliği, karaciğer, yağ dokusu, diş pulpası, dalak, akciğer, umbilikal kordon kanı veya normal periferik kandan fetal orijinli olsun ya da olmasın izole edilebilir. MKH'ler insan kemik iliğindeki çekirdekli hücrelerin %0,001 ila %0,01'ini oluşturur. MKH'lerin büyük oranda mezodermden türevlendiği düşünülmektedir; özellikle embriyonik vücut oluşumu sırasında MKH benzeri hücreleri sağlayan en erken nesiller aslında mezoderm yerine Sox1+ nöroepitelyumdur ve bu erken MKH'ler sonraki süreçlerde diğer kaynaklardan MKH'lere yerini bırakır [4].

MKH'lerin hematopoezi destekleyici rolü çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir [18]. Dexter ve diğerleri ilk kez uzun dönem kemik iliği kültürü (Uzun Dönem Kemik İliği Hücresi; UDKİH) için *in vitro* kültür koşullarının oluşturulmasını incelemiş ve yapışık (adherent) stromaya benzer bir kültürün HKÖH'leri destekleyebileceğini göstermiştir [15].

MKH'ler; hematopoezi teşvik eden, hematopoezin zeminini hazırlayan, primitif öncül hücreleri koruyan, UDKİH'de CD34+ hematopoetik öncül hücreler (HÖH'ler) olarak HKÖH'leri çoğaltıp muhafaza eden, hem eritroid hem de miyeloid farklılaşmayı destekleyen birçok büyüme faktörünü serbest bırakır [4].

MKH'ler gebeliğin ilk trimesterinde yetişkin türevli MKH'leri andıran morfolojik, immünfenotipik ve işlevsel özelliklerle fetal kan, karaciğer ve kemik iliğinden izole edilmiştir. CD105 (SH2, transforme edici büyüme faktörü-b reseptör III), CD73 (SH3 ve SH4, NT5E), CD90 (thy-1), CD29, CD44, CD106, CD166 gibi yüzey belirteçlerinin ve adezyon moleküllerinin birlikte ekspresyonu; CD34 (primitif hematopoetik hücre belirteci), CD45 (hematopoetik hücre belirteci), CD14 ya da CD11b (immün hücre belirteçi), CD117 (cKit), CD79α ya da CD19, HLA sınıf II, HLA-DR gibi belirteçlerin ve diğer HKH soy özgül belirteçlerininde yoksunluğu MKH'lerin saptanması için MKH immünofenotiplendirmede önemli göstergelerdendir. MKH'ler düşük düzeyde HLA sınıf I eksprese ederler. HLA-DR, İFN-γ ile uyarılmış MKH'lerde pozitifleşir [4,16]. İnsan MKH belirteçlerine son zamanlarda Stro-1, SSEA-4, CD271 ve CD146 yüzey molekülleri de eklenmiştir [17,18].

MKH'ler yüzeylerinde çeşitli Toll-benzeri reseptörler (TLR: TLR-1, TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-5, TLR-6 ve TLR-9) bulundururlar. MKH'ler yüzeylerinde bulunan TLR'lerin değişik uyaranlarla uyarılması sonucunda plastisite değişimleri gösterirler. TLR4 agonistlerin (LPS) kullanımıyla prime edilen MKH'ler pro-enflamatuvar özellikli MKH1'e dönüşürken, TLR3 agonisti poliriboinosinik poliribositidilik asit (poly (I:C)) ile uyarılan hücreler immün baskılayıcı özellikli MKH2'ye dönüşmektedir. TLR4 uyarımlı MKH1'lerde İL6, İL8 üretimleri aşırı artarken, TLR3 uyarımlı MKH2'lerde IP10 (CCL10), RANTES(CCL5), İL4, İL1RA üretimleri göze çarpmaktadır [19].

MKH'ler, *ex-vivo* olarak iğ şeklinde ve fibroblast benzeri morfoloji ile kültüre edildiğinde plastik yüzeylere yapışma özelliğine sahiptir. MKH'ler, hematopoetik yamanmayı

iyileştirebilen eritroid, miyeloid, lenfoid ve megakaryositik soyların yeniden düzenlenmesini koruyabilir. İmmün baskılayıcı özelliklere sahip MKH'ler, *graft versus host* hastalığının (GVHD) tedavisinde faydalıdır ve hücre göçünden, parakrin faktörlerin ve sitokinlerin salgılanmasına kadar çeşitli yollarla işlev gösterebilir [4].

MKH'ler, mikro çevrenin önemli bileşenlerini temsil etmektedir. Bunlar, sitokinlerin ve adhezyon moleküllerinin çözünebilir formlarının büyük bir çeşitliliğini üretirler. Adhezyon moleküllerine hematopoezi düzenleyen ve CXCL12'ye benzer şekilde bir konumlandırma etkisinde olan vasküler hücre adhezyon molekülü-1 (VCAM-1) ve hücre içi adhezyon molekülü-1 (ICAM-1) örnek verilebilir. Kemik iliğinden izole edilen MKH'ler işlevsel olarak umbilikal (göbek) kordonu kanı türevli MKH'lere benzerdir. Kemik iliği ve kordon kanı MKH'lerin sitokin profili aynıdır. Plasenta türevli MKH'ler (P-MKH) ise göbek bağı türevli MKH'lere (umbilikal kord; u-MKH) oranla daha fazla sayıda sitokin üretmektedirler. Bazı sitokinlerin rolü farklılaşmadan ziyade HKÖH'lerin sessiz kalması (quiescence), konumlandırılması ya da kendi kendine yenilenmesini içermektedir [4].

1996 yılında insan kemik iliğinden izole edilen; *in vitro* kültür ortamı içinde granülosit-kolonisi uyarıcı faktör (G-CSF), kök hücre faktörü (SCF), lösemi inhibitör faktörü (LIF), makrofaj kolonisi uyarıcı faktör (M-CSF), İL-6 ve İL-11 eksprese eden ve salgılayan MKH'lerin kemik iliği stromasından izole edilen hücrelerin, gp130 ile ilişkili reseptörleri yoluyla düzenlenen hücre farklılaşmasında bir rolünün olduğu ve sinyal iletim yolaklarıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Çoğu MKH tipi, miyeloid serisine farklılaşmayı sağlayan GRO-α (büyüme ile ilişkili onkogen α, CXCL1), İL-8 (CXCL8) ve İL-6'nın yanı sıra makrofaj göçü inhibe edici faktör (makrofaj göç önleyici faktör; MIF, GIF, DER6) ve Serpin E1 (PAI-1) dahil olan ortak bir eskpresyon ürün grubuna sahiptir [4].

Yapılan araştırmalarda monosit kemotaktik protein-1'in (MCP-1, CCL2), hem kemik iliği hem de amniotik MKH'lerde eksprese edildiği, ancak HKÖH'lerin göçünün yönlendirilmesi ve aracılığında ilişkili, stromal türevli faktör-1'in (SDF-1 veya CXCL-12) ekspresyonunun kemik iliği MKH'lerinde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. CCL2; monositler, eozinofiller, bazofiller ve T lenfositlerinin bir kısmı için güçlü bir kemotaktik faktör görevi görür. Ayrıca, CXCL1, CXCL8, Serpin E1 ve granülosit-makrofaj-CSF (GM-CSF) mobilizasyonda G-CSF'ye benzer bir rol oynamaktadır. CCR7, CCR9, CXCR4,

CXCR5 ve CXCR6 gibi benzersiz bir kemokin paneli, kemik iliği ve/veya ikincil lenfoid organlarda homeostatik lökosit yönlendirmede ve hücre konuşlandırmasında yer alır [4].

MKH'den türevlenen hücre dışı veziküller (EV); ekzozomlar, mikro-veziküller ve apoptotik cisimler olmak üzere üç ana tiptedirler. Farklı boyutlara (40-150 nm) ve üretim mekanizmalarına sahiptirler ve orijin (kaynak) hücreleri yüzey belirteçleri tarafından belirlenir. Bu parçacıklar, hücreler arası iletişimde hayati bir role sahiptir [4].

MKH'ler, hematopoezin farklı aşamalarında güçlü etkileri olan önemli bileşenleri temsil etmektedir. SCF, LIF, SDF-1, kemik morfojenik proteini (BMP)-4, Flt-3 ligandı (FL), Kit-L, TNF-α ve TGF- β1; MKH'ler tarafından salınan sitokinlerden bazılarıdır. Granülosit-makrofaj-CSF (GM-CSF), G-CSF ve ayrıca İL-1, İL-3, İL-6, İL-7, İL-11, İL-12, İL-14, İL-15 ve TPO gibi bazı MKH sitokinleri, HÖH'lerin olgunlaşmasını etkileyebilir. Yanı sıra FL; HKÖH'lerin kendi kendine yenilenmesini, çoğalmasını ve farklılaşmasını teşvik etmektedir. HKÖH genişlemesi (*expansion*) için SCF, TPO ve FL en güçlü sitokinlerdir. Bunun aksine İL-3, İL-6, İL-11 ve G-CSF farklılaşmış hücreleri üretme kapasitesine sahiptir. TPO erken megakaryosit farklılaşması için önemlidir. c-mpl reseptörü ve İL-11 aracılığıyla modüle edildiğinde de platelet oluşumuna neden olurlar. İL-6 ve G-CSF, miyeloid farklılaşması için gereklidir. İL-6, SCF ile birlikte, önemli ölçüde HKÖH çoğalımını uyarabilir [4].

MKH'ler aynı zamanda hematopoetik nişte fibronektin, laminin ve vimentin gibi hücre dışı matriks proteinlerinin ekspresyonunun yanı sıra SDF-1, FL, SCF, VCAM-1, E-selektin ve kolojen I salgılayarak HKÖH konumlanmasınla (*homing*) önemli bir role sahiptir. CCL2, CCL5, CX3CL1 (fraktalkin), CXCL8, CXCL12 ve CXCL16 gibi MKH'lerden salınan kemokinler, kemotaksisi uyarabilir. Kemik iliği MKH'lerinden türevlenen hücre dışı vezikül (EV) miRNA'ları apoptozu ve umbilikal kordon kanı CD34+ hücrelerin farklılaşmasını azaltabilir. Yapılan araştırmalarda MKH kaynaklı sitokin, kemokin ve miRNA gibi derivatiflerin apoptoz, çoğalma, hücre farklılaşması, hematopoetik ve miyeloid gelişim, konumlanma ve göç gibi birçok süreçte önemli role sahip olduğu anlaşılmıştır (Çizelge 2.1) [4].

MKH'ler immün sistemi baskılayıcı özelliklere sahiptir ve hem hücre hücresi temasıyla hem de çözünebilir faktörlerin salgılanması yoluyla doğal ve edinsel immüniteyi

etkileyebilirler; bununla birlikte, nihai etkileri bağışıklık sistemi hücrelerinin türüne ve durumuna bağlıdır [4].

Friedenstein; MKH/kemik iliği stromal hücrelerinin HKÖH'lerle transplantasyonunun, hematopoezin iyileşmesini arttırdığını ve kemik iliğinin özelliklerini yinelediğini gösterdi [20]. Peng ve diğerleri MKH'lerin İL-10 üretimi yoluyla CD5+ regulatory B hücrelerinin üretimini önemli ölçüde arttırdığını ortaya koydu [21]. MKH'ler İL-6 ve M-CSF salınımı yoluyla dendritik hücrelerin (DH) farklılaşmasını önleyebilir ve M-CSF, İL-6, prostaglandin E2 (PGE2), TGF-β, HGF, siklo-oksijenaz (COX)-1, COX-2, indolamin 2,3-dioksijenaz (İDO), azot oksit (NO) ve HLA-G5 gibi büyüme faktörleri ve sitokinlerin üretimi yoluyla da immün yanıtların şiddetini yatıştırabilirler. TNF, İL-10, İL-6 ve PGE2, dendritik hücre olgunlaşması, T-hücre işlevini ve hem B hem de NK hücrelerinin etkinleşmesini ve çoğalmasını engeller. MKH'ler tarafından HLA-G5 salınımı, NK hücresini ve T ve B hücrelerinin aktivitesini baskılamaktadır. İL-6 ve interselüler adhezyon molekülü 1 reseptörü, T hücrelerini inhibe eder ve B hücreleri üzerinde de etkileri bulunmaktadır. İDO seviyesinin artması, monositlerin immün baskılayıcı M2 makrofajlarına doğru farklılaşmasına ve dolayısıyla MKH immün baskılayıcı etkisinin teşvikine neden olur. MKH'ler T-hücre çoğalmasını baskılayabilir ve aktifleştirilmiş T hücreleri G0/G1 fazında kalırlar. MKH'ler, Notch / Jagged1 sinyali yoluyla, ligandları ile MKH bağışıklık düzenleyici etkisini baskılayabilen TLR3 ve TLR4 gibi Toll benzeri reseptörleri (TLR'ler) eksprese ederler [4]. Çalışmacılar aynı zamanda indolamin-2,3-Dioksijenaz (İDO) gen ifadelerini ölçümlemiş MKH1'de düşük MKH2'de yüksek (7 kat fazla) olduğunu rapor etmişlerdir.

Haynesworth ve diğerleri güvenilir bir *in vivo* kemik oluşturma testi geliştirdiler ve terapötik miktarlarda insan MKH'lerini (iMKH) izole edip, kültür yapabildiler. Daha sonraki *in vitro* deneyler, klonal insan MKH'lerinin osteoblastlar, kondrositler ve adipositler de dahil olmak üzere çeşitli soylara farklılaşabildiğini göstermiştir. *İn vitro* ve *in vivo* çalışmalar MKH'lerin kas, nöral öncüllere, kardiyomiyositlere ve muhtemelen diğer hücre türlerine farklılaşma kabiliyetini de göstermiştir. Ek olarak MKH'lerin hematopoietik ve embriyonik kök hücrelerin genişlemesi için sitokin ve büyüme faktörü desteği sağladığı gösterilmiştir [22].

Çeşitli hayvan modelleri ile yapılan çok sayıda çalışma MKH'lerin miyokard dokularının, hasar gören kemiklerin, tendonların, kıkırdakların ve menisküslerin onarımı veya rejenerasyonunda faydalı olabileceğini göstermiştir [22].

Daha önceki çalışmalar MKH'lerin, karışık lenfosit kültüründe uyarılmış T hücre çoğalmasını engelleyerek veya mitojenlerle inkübasyon yoluyla, devam eden bir immün yanıtı bastırabildiklerini göstermiştir. İnsan MKH'leri, en önemli pro-enflamatuvar sitokinlerden (TNF-α ve İFN-γ) ikisini inhibe ederek ve İL-10 da dahil olmak üzere baskılayıcı sitokinlerin ekspresyonunu arttırarak immün hücre tepkisinin sonuçlarını değiştirebilirler. Bazı çalışmalarda MKH'lerin, DH'ler tarafından salgılanan TNF-α'yı inhibe edebilme yetenekleri nedeniyle immünolojik toleransa neden olabileceği savunulmuştur [22].

Graft-versus-host hastalığı (GVHH); konakçı doku hasarını, pro-enflamatuvar sitokinlerin (TNF-α, İFN-γ, İL-1, İL-2, İL-12) salgılanmasını ve DH'lerin, makrofajların, NK hücrelerinin ve sitotoksik T hücrelerinin aktivasyonunu içeren bir patofizyolojiyi kapsamaktadır. Bu olayların hepsi GVHH yönetiminin çok önemli bileşenleri olup pro-enflamatuvar sitokinlerin inhibisyonunun, GVHH şiddetinin ve oluşumunun engellenmesi açısından yararlı olduğu gösterilmiştir [22].

Yapılan bazı araştırmalarda insan MKH'lerinin, İFN-γ'yı inhibe etme ve İL-4 sekresyonunu artırma kabiliyetlerinin pro-enflamatuvar Th1 hücrelerinin öncülüğünden, anti-enflamatuvar Th2 hücrelerindeki bir artışa doğru bir değişimi sağlayabileceği, dolayısıyla bunun da GVHH tedavisi için faydalı olacağı savunulmaktadır. Birçok çalışma insan MKH'lerinin kültür ortamında T hücre çoğalmasını baskıladığını göstermiştir. Bu etkinin immün baskılayıcı sitokinler TGF-β ve/veya İL-10'un salgılanmasıyla gerçekleştiğine inanılmaktadır ancak bu faktörlerin antikorlar ile engellenmesi MKH etkili immün baskılayıcı etkiyi tamamen tersine çevirmemektedir. Bu nedenlerle farklı faktörlerin etkileri araştırılmıştır. Geçtiğimiz yıllarda triptofan katabolize eden enzim indolamin 2,3-dioksijenaz (İDO) aracılı triptofan degradasyonunun rolünün, MKH aracılı immün baskılamada rol oynadığı öne sürülmüştür. Yapılan araştırmalarda geç dönemde, MKH+İFN-γ kültüründe İDO ekspresyonunun gözlendiği gösterilmiştir (5 günde). İFN-γ varlığında MKH'lerin İDO ekspresyonunu gerçekleştirdiği ve triptofan yıkıldığı için T

hücre çoğalmasının inhibe edildiği savunulmuştur. iMKH'lerin, MKH aracılı immüno-modülasyona dahil edilmek için yeterli olabilecek miktarlarda Prostaglandin E_2 (PGE_2) salgılayabileceği gösterilmiştir. Sıçan ince bağırsak lamina propriası hücrelerinde ve hava yolu mukus membranını saran hücrelerde siklo-oksijenaz-2'ye (COX-2) bağımlı PGE_2'nin kendiliğinden ve sürekli olarak üretilmesi, bu organların çevresel florasında yaşayan patojenik olmayan antijenlere uygunsuz bir yangısal cevabı azaltmada olası bir mekanizma olarak gözlemlenmiştir [22].

MKH'ler, güçlü immün baskılayıcı kapasiteye sahiptir. Fare MKH'lerinin nitrik oksit (NO) yoluyla T hücre çoğalmasını ve işlevini inhibe ettiği bildirilmiştir. MKH'lerin bu bağışıklık düzenleyici kapasitesi, yangısal sitokinler İFNγ ile birlikte ya TNFα veya İL-1β yoluyla uyarılmaktadır [23]. Farklı türlerde MKH'lerin İDO ve uyarılabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ekspresyonlarının ilgili yangısal sitokinler ile uyarıldıktan sonra farklı olduğu yapılan araştırmalarla tespit edilmiştir. Örneğin insan ve fare MKH'ler bu sitokinler ile uyarıldıktan sonra, insan MKH'lerinin aşırı yüksek seviyelerde İDO ve çok düşük seviyelerde iNOS eksprese ettiğini tespit ederken, fare MKH'lerinin bol miktarda iNOS ve az miktarda İDO eksprese ettiği gözlenmiştir [24].

Mezenkimal kök hücreler (MKH), hücre ve doku hasarının endojen onarımına aracılık etmekte merkezi bir rol oynamaktadır. Buna ek olarak MKH popülasyonlarının yaşla birlikte tükendiği ve MKH havuzlarındaki azalmanın insan yaşlanmasına ve yaşla ilişkili hastalık süreçlerinin başlangıcına katkıda bulunduğu öne sürülmüştür. Biyolojik yaşlanma sadece MKH mutlak sayısını değil aynı zamanda bu hücrelerin ekspresyon profilini de etkileyebilir. Yaşlanmanın, MKH'lerin rejeneratif tıp için terapötik potansiyeli üzerindeki etkisi ise tam olarak aydınlatılmamıştır [25].

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, mezenkimal kök hücrelerin (MKH'ler) intravenöz uygulandığında özgül olarak tümörlere ve metastatik bölgelere göç edebildiğini göstermiştir. MKH'lerin tümör yönelimi yeteneğine bağlı olarak anti-kanser ajanları sunumları bir çok araştırmacı tarafından araştırıldı. MKH'ler tarafından taşınan anti-kanser ajanlar, esas olarak tümör baskılayıcı gen eksprese eden retroviral veya adenoviral vektörleri, onkolitik virüsleri ve ilaç yüklü polimerik nanopartiküller içerir (Çizelge 2.2). Yapılan çalışmalarda İnsan MKH'leri, adenovirüs veya retrovirüs nakliyle (transdüksiyon) anti-kanser ajanlarının hedefe yönelik olarak verilmesini sağlamak üzere tasarlanmıştır.

MKH'lerin hedef kanser terapisine ilk uygulanması, doğrudan interferon β (İFN-β) geninin verilmesidir. Daha sonrasında İFN-γ, İL-12, İL-24 ve tümör nekroz faktörü- ilişkili apoptoz uyaran ligand (TRAIL) gibi tümör baskılayıcı genler bu çalışmalarda yer almıştır (Çizelge 2.2). Bu nedenlerle MKH'ler hedefe özgü anti kanser tedavisi için etkili vektörler olarak ortaya çıkmaktadır [26].

MKH'ler farklılaşma kapasitelerine ek olarak, lenfosit çoğalmasını inhibe etmek, regulatuvar T hücrelerini (Treg) uyarmak ve dendritik hücrelerin farklılaşmasını düzenleyebilen immün modülatör kapasiteye sahiptir. Son yıllarda çeşitli çalışmalar ile MKH'ler ve makrofajlar arasında da işlevsel etkileşimlerin meydana geldiği gösterilmiştir ve MKH'lerin makrofajların işlevini de düzenlediği açık hale gelmiştir. MKH'lerin makrofaj ile birlikte kültürü yapıldığında, makrofajların interlökin-10 (İL-10) ekspresyonu artarken; tümör nekroz faktörü α (TNF-α), İL-12, CD86 ve insan lökosit antijen sınıf II (HLA-class II) moleküllerinin seviyeleri azalmaktadır. MKH'ler, fare kemik iliği kaynaklı makrofajların karşılıklı olarak M1/M2 dengesini düzenlerler. Kardiak doku hasarına ilişkin yapılan araştırmalar MKH'lerin makrofaj fenotipini modüle ettiğini, dokuda rejenerasyona ve immün toleransa katkıda bulunabileceğini göstermiştir [27].

MKH'lerin; T-hücrelerin farklı tipleri, doğal öldürücü hücreler (Natural killer cells; NK), dendritik hücreler, monositler ve nötrofilleri içeren geniş bir spektrumdaki hücre ile etkileşimde olabileceği tanımlanmıştır. Bu çalışmaların tamamında olmasa da çoğunda hedef hücrenin çoğalmasını, hücre-hücre etkileşimi yoluyla veya prostaglandinler, indolamin 2,3-dioksijenaz (İDO), çözünür HLA-G5, İL-6, İL-10, TGB-β1, HGF, iNOS, ve heme oksijenaz-1 (HO-1) gibi faktörlerin salgılanması yoluyla azalttığı gösterilmiştir [28]. Stromal hücreler hem endosteal hemde vasküler nişte bulunduğundan, nişler arası iletişimin bir parçası olarak düşünülmektedirler.

iMKH'lerin çeşitli bağışıklık hücreleri ile etkileşimleri yoluyla, yangı tepkilerini inhibe ettiği veya sınırladığı, hafifletici ve anti-enflamatuvar yolakları teşvik ettiği anlaşılmaktadır. Ancak mekanizmaların daha net anlaşılması için yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Son zamanlarda yapılan MKH'lerin otoimmün hastalıklar üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalarda ise, MKH'lerin birçok yolak üzerinden immün cevabı baskıladığı

gösterilmiştir. Diyabet, artrit, multipl skleroz (MS), sistemik lupus eritematoz gibi hastalıklarda da MKH'lerin immün baskılayıcı etkisi gösterilmiştir [29,30].

Farede çalışılan bir MS modelinde, MHK'lerin *Conditioned* medyumunda STAT3 fosforilasyonunu engelleyerek CD4+ T hücre aktivasyonunu baskıladığı, İL-17 ve TNF-α miktarının azaldığı gösterilmiştir [31]. Ayrıca, otoimmün hastalıklarda uygulanan MKH'lerin İL-4, İL-6, İL-10 miktarını artırıp; TNF-α, İFN-γ, İL-1β miktarını azalttığı gösterilmiştir [32]. Bu sonuçlardan yola çıkılarak, kemik iliği MKH'lerinin immün ayrıcalığın önemli bir bileşenini oluşturduğu görülmektedir.

Çizelge 2.1. MKH derivatiflerinin MKPH'ler ve Hematopoez üzerindeki etkileri [4]

MKH Derivatifleri	**MKPH'ler ve Hematopoez üzerindeki etkileri**
SCF TPO CXCL12 flt3l PGE_2 miR221, miR451, miR654-3p	HKÖH'lerin çoğalması ve gelişimi
İL-3, İL-6, İL-11 G-CSF	HKÖH'lerin farklılaşması
TPO	Erken Megakaryosit farklılaşması
İL-11	Platelet formasyonu
İL-6 G-CSF	Miyeloid farklılaşması
İL-6 (SCF ile birlikte) Laminin miR-223	HKÖH'lerin çoğalması
SCF/c-kit (CD117)	Miyeloid ve Eritroid farklılaşması
CXCL8, CXCL12, CXCL16 CCL2, CCL5 CX3CL1 (fractalkine) Flt-3 ligand(FL) SCF, G-CSF, VEGF VCAM-1, E-selectin Collagen I Fibronectin, Laminin, Vimentin miR-126	HKÖH'lerin konuşlanması ve mobilizasyonu
CXCL12 (SDF-1)	Erken B-hücre lenfopoezi Koruma (Preservation), Sessizlik (Quiescence)

Çizelge 2.1.(devam) MKH derivatiflerinin MKPH'ler ve Hematopoez üzerindeki etkileri [4]

VEGF FGF-2 Angiopoetin-1 (Ang-1)	Konuşlanma ve apoptozun indirgenmesi
İL-10	CD5+ regulatory B hücre jenerasyonunda artış
İL-6 ve M-CSF	Dendritik Hücre farklılaşmasının inhibisyonu
M-CSF, HGF İL-6, İL-10 TNF PGE2 TGF-β COX-1, COX-2 İDO veya NO HLA-G5	İmmün baskılayıcı ve immünomodülasyon
İDO	M2 makrofaj farklılaşması
miR-451	Eritroid farklılaşması
CEBPA/miR-182 EGR2/miR-150 miR-92, miR-9, miR-150 MPO/ hsa_piR_020814_ DQ598650	Apoptoz ve farklılaşma
hsa_piR_020814_DQ598650	Miyeloid farklılaşması esnasındaki MPO sentezinin kontrolü
miR210-5p miR106b-3p miR155-5p	HKÖH'nin radyasyon ile uyarılmış apoptozunun inhibisyonu
miR-21-5p miR-181a-5p miR92a-3p	Kaspaza bağımlı apoptozun azaltılması

Çizelge 2.2. Genetik olarak modifiye edilmiş mezenkimal kök hücreler (MKH) için kullanılan anti kanser ajanlar [26]

Kategoriler	**Ajanlar**	**Modeller**
Viral Vektörler	İFN-β	Metastaz (melanoma) Ortotopik (glioma, ovarian)
	İFN-γ	Subkutanöz (akciğer) İn vitro (lösemi)
	İL-12	Ortotopik (yumurtalık) Subkutanöz (melanom, meme, hepatom)
	İL-24	Subkutanöz (akciğer)
	TRAIL	Ortotopik (hepatokarsinom, gliom) Subkutanöz (lemfoma) Metastaz (meme)
	HSV/TK	Ortotopik (gliom)
	CD	Subkutanöz (melanom, kolon)

Çizelge 2.2. (devam) Genetik olarak modifiye edilmiş mezenkimal kök hücreler (MKH) için kullanılan anti kanser ajanlar [26]

Onkolitik Virüs	CRAd	Ortotopik (gliom, meme) Metastaz (meme)
	MV	Ortotopik (hepatokarsinom, yumurtalık)
Nanopartiküller	Dox	Subkutanöz (gliom)
	Paclitaxel	Ortotopik (akciğer)

2.5. MKH'lerin Klinik Önemi

Mezenşimal kök / stromal hücrelerin (MKH'lerin) ekstraselüler veziküllerinin (EV), MKH'lerin kendileri gibi karşılaştırılabilir terapötik etkinlikleri teşvik ettiği bulunmuştur. Çeşitli in vivo modellerde, pro-enflamatuvar süreçleri bastırdığı, oksidatif stres ve fibrozu azalttığı gözlenmiştir. Pro-enflamatuvar yanıttan tolerojenik immün yanıtlara dönüşüm ile, MKH-EV'ler muhtemelen endojen kök ve öncül hücrelerin etkilenen dokuları başarıyla onarmasına olanak sağlayarak bir pro-rejeneratif ortam yaratır ve doku rejenerasyonunu teşvik ederler. MKH EV'ler Makrofajların M1'den M2 yönüne değişimini sağlayabilir ve Treg formasyonu teşvik edilir. Böylece pro-enflamatuvardan tolerojenik koşullara geçiş sağlanır. Bu bilgiler doğrultusunda böbrek, kalp, karaciğer ve beyin hasarları odaklı çeşitli MKH çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmaların yer aldığı derlemelerde MKH'lerin terapötik etkisinin daha çok immün baskılayıcı etkisi ile olduğu ifade edilirken, doku yenilenmesine olumlu etkilerinden de bahsedilmiştir [33].

Sadece ABD'de yılda 200.000 sepsise bağlı ölüm gerçekleşmektedir. Çoklu organ yetmezliğinin patojenezde temel olduğu sepsis ölümlerini azaltmak için MKH'lerin terapötik rolü farelerde ön çalışma sonuçlarını vermiştir. Kemik iliği kaynaklı MKH'lerin sepsis modellerinde kullanımı ölüm oranını azaltmış ve organların işlevlerini düzeltmiştir [34]. Sepsisde sitokin fırtınası oluşmakta ve İL-10 düzeyleri yükseldiğinde tüm sitokinlerin üretimini baskılayarak klinik tabloyu düzeltmektedir. Nemeth vd. benzer bir çalışmayı polenlerle provoke ettikleri astım modellerinde de uygulamış ve TGF-beta aracılı bir mekanizma ile klinik tabloda iyileşme gözlemlediklerini bildirmişlerdir [35].

Son dönemlerde MKH'lerin doku hasarı gidermede, kanser tedavilerinde, multipotensi yeteneğiyle nörodejeneratif hastalıklarda, immünomodulasyon uygulamalarında ve transplantasyonda operasyonel tolerans geliştirmede önemlerine yönelik pek çok araştırma ve derleme yapılmıştır [33,36-38].

2.6. Monosit / Makrofaj

2.6.1. Monosit

Monositler konumlarına, fenotiplerine ve karakteristik fasulye şeklindeki çekirdeklerine yanı sıra gen ve miRNA ekspresyon paternlerine göre tanımlanabilir. Bütün omurgalılarda bulunmaktadır. Farelerde, monositler dolaşan lökositlerin % 4'ünü temsil ederler. Dalakta ve akciğerlerde, uyarımla mobilize olabilen monosit havuzları bulunur. Fare monosit gelişimi CSF-1'e bağlıdır ve CSF-1 reseptör eksikliği ciddi monositopeni ile sonuçlanmaktadır. Monositler, ortak monosit öncüllerinden (cMoP) kemik iliğinde erişkin hematopoezi sırasında ortaya çıkarlar. Makrofaj öncülleri (MP) ve makrofaj/denritik hücre öncülleri (MDP) gibi öncüllerin aksine, bu cMoP'ler plazmasitoit DH ve klasik DH'ye farklılaşma potansiyelini kaybetmiştir [39].

Miyeloid hücrelere olan talep artışı da acil (*emergency*) hematopoeze neden olur. Monositler, miyelopoezis adı verilen bir süreçte medüller veya ekstramedüller bölgelerde üretilen mononükleer fagositlerdir. Granülosit/makrofaj öncülleri (GMP'ler) hematopoetik kök ve öncül hücrelerden kaynaklanır ve yaygın monosit öncülleri (cMoP'ler) yoluyla $Ly6C^{high}$ monositleri oluşturan makrofaj (monosit)/dendritik hücre öncüllerine (MDP'ler) olgunlaşırlar [40].

Daha önce yapılan çalışmalar CX_3CR1 (CX3-kemokin reseptör 1), LY6C (miyeloid belirteç lenfosit antijeni) ve CCR2 (CC-kemokin reseptör 2) ekspresyonlarına göre monosit altkümelerinin varlığını ortaya koymuştur. $CD115^{+}$ fare monosit altkümeleri bugün $Ly6C^{hi}$ monositleri (ayrıca $CX_3CR1^{int}CCR2^{+}CD62L^{+}CD43^{low}$ olarak tanımlanır) ve $Ly6C^{low}$ monositleri ($CX_3CR1^{hi}CCR2^{-}CD62L^{-}CD43^{hi}$) olarak ikiye ayrılır [39].

Gen ekspresyonu profillemesinin sonuçları sırasıyla iki ana $CD14^{+}$ ve $CD14^{low}CD16^{+}$ insan altkümesi ile $Ly6C^{hi}$ ve $Ly6C^{low}$ fare popülasyonlarının geliştiğini göstermektedir. Fare ve insan monositleri fenotip ve işlev bakımından daha az karakterize edilen ilave belirgin geçiş hallerini içermektedir. Faredeki çalışmalar, her iki monosit alt grubunun MDP ve cMoP'den türetildiğini ortaya koydu; bununla birlikte farklı kinetikler $Ly6C^{hi}$ ve $Ly6C^{low}$ monositlerinin bir öncü - ürün ilişkisi olduğunu düşündürmektedir. Gerçekten elde edilen kanıtlar, fare kan monosit alt-gruplarının kararlı halde bir gelişimsel diziyi temsil ettiğini gösterir; muhtemelen dolaşımda $Ly6C^{hi}$ monositleri $Ly6C^{low}$ hücrelerine

farklılaşırlar. Ly6C^{low} hücrelerinin üretilmesi, NR4a1 transkripsiyon faktörünü (Nur77) gerektirir. Ly6C^{low} hücrelerinin Ly6C^{hi} monosit ara maddesi olmaksızın üretilebileceği gösterilmektedir. Ly6C^{hi} monosit kaynaklı Ly6C^{low} hücreleri, kanda bulunan farklılaşmış makrofajlar olarak kabul edilebilir. Bu düşünce doğrultusunda, Ly6C^{low} hücrelerinin asıl işlevinin, damar dışına çıkış ve dokunun engraftmanı değil de endotel bütünlüğünün intra-vasküler sağlanması olduğu görülmektedir. Buna karşılık, farelerde Ly6C^{hi} monositleri ve insanlardaki CD14 $^{+}$ monositleri klasik monositleri temsil eder; bunlar "tümörler" gibi patolojik değişikliklerin ve yangının bulunduğu bölgelere yönlendirilir; monosit-türevli doku makrofajlarının öncülleri olarak görev yapabilirler [39].

Monositler ve makrofajlar; İL-1, İL-3, İL-6, GM-CSF ve M-CSF tarafından düzenlenen bir dizi çoğalma/farklılaşma adımıyla hematopoetik kemik iliği kök hücrelerinden ve öncüllerden (Ortak Myeloid Öncüller) türevlenmektedir. GM-CSF ve M-CSF, kemik iliği miyeloid farklılaşması sırasında etkinliklerinde farklılık gösterir; GM-CSF, granülosit ve monosit öncüllerinin çoğalmasını uyarırken, M-CSF monositlerin çoğalmasını ve farklılaşmasını teşvik eder. Buna ek olarak, her iki faktörün ve İL-3'ün sürekli varlığı, monoblast ve promonosit ara aşamaları yoluyla monositlerin oluşumunu sağlar. Transkripsiyon faktörü PU.1'in C/EBPα ve RUNX1 ile birlikte monosit farklılaşması sürecinde önemli rolü bulunmaktadır. PU.1 eksik fareler, G-CSF, M-CSF ve GM-CSF reseptörlerini kodlayan genlerin düzenlenmesindeki temel rolü ile uyumlu olarak, miyelomonositik soy eksikliği sergilemektedir. Kemik iliğinden ayrıldıktan sonra, monositler periferik kana girerek doku makrofajları ve dendritik hücreler için öncül havuz olarak hizmet eder [2].

Kemik iliğinden çıkan monosit 2 farklı işlevde rol alabilirler: CX_3CR1^{high} ve LY6C^{low} monositleri, damar endoteli etrafında gözlemci (*patrolling*) olarak işlev görürler. Bu grup monosit CCR2 (CC-kemokin reseptör 2) ekspresyonunu kaybetmiştir ve CCL2'ye yanıt vermezler. Gözlemci monositlerin gelişimi için daha önce ifade edildiği üzere NUR77 isimli transkripsiyon faktörü (nükleer reseptör alt ailesinden, grup A, Nr4α1) gereklidir. Buna karşılık ikinci grubu temsil eden LY6C^{high} monositler, yangı ile ilişkilidirler ve CCR2 bulundururlar, hızlı hareket ederler. Dalakta kırmızı pulpadaki subkapsüler monositler ikinci grup için örnek olabilir, buradaki hücreler yangı alanına hızla gidebilirler [40].

Monositler periferik kanda 24-72 saat boyunca dolaşırlar ve homeostatik veya yangısal uyaranlara yanıt olarak dokulara göç eder ve burada apoptozdan önce birkaç hafta doku makrofajları olarak kalırlar, daha sonra yeni makrofajlar bu hücrelerin yerini alırlar. CD14 ekspresyonları ile yaygın olarak tanımlanmalarına rağmen, periferik-kan monositleri morfolojik, işlevsel ve gelişimsel heterojenite sergiler. Fenotipik olarak; monosit alt-grupları, farklı CD14, CD16 ve CD64 ekspresyon seviyelerine göre tanımlanmıştır. Dolaşımdaki monositlerin çoğunluğu $CD14^{+}CD16^{-}$ 'dir ve aynı zamanda CCR2, CD64 ve CD62L'yi eksprese ederler, oysa monositlerin küçük bir kesimi (%5-10) $CD14^{low}CD16^{+}CD64^{-}$ fenotipi gösterir, CCR2 içermez ve yüksek seviyelerde CD32'yi eskprese eder. $CD16^{+}$ altkümesi ek olarak $CD14^{+}CD16^{+}CD64^{+}$ minör alt popülasyonunu içerdiği ve selektin ligand PSGL-1 üzerinde değişken seviyelerde karbonhidrat modifikasyonları sergilediği için fenotipik olarak heterojendir. Bu nedenle, küresel terimlerle tanımlanan fare monosit alt-gruplarında Gr-1 ifadesine (yüksek, orta ve düşük) göre karşılık gelen üç farklı insan monosit alt grubu tanımlanabilir ($CD14^{+}CD16^{-}CD64^{+}$ veya klasik; $CD14^{+}CD16^{+}CD64^{+}$ veya intermediate (ara form) ve $CD14^{low}CD16^{+}CD64^{-}$ veya klasik olmayan) (Çizelge 2.3). Ayrıca, diğer altkümeler, tümör anjiyogenezisine katılan $Tie2^{+}$ monosit alt popülasyonu gibi bazı özel belirteçlerin ekspresyonuna göre tanımlanmışlardır [41].

Monositlerde işlevsel olarak; yapışkan/patojen reseptörlerinin birçoğunun pasif durumda tutulduğu periferik kanda zayıf fagositik aktivite görülür. Uyarım ve/veya transendotelyal göç üzerine, $CD14^{hi}CD16^{-}$ ve $CD14^{+}CD16^{+}$ $CD64^{+}$ monosit alt grupları, $CD14^{+}CD16^{+}CD64^{-}$ makrofajlara kıyasla daha yüksek fagositik aktivite ve daha yüksek TNFα üretimi sergilerler. $CD16^{+}$ monosit alt grubunun yangısal koşullar altında yükselmesine, dentritik hücrelere farklılaşmaya daha yatkın olmasına ve daha güçlü T hücre uyarıcı etkisine sahip olmasına rağmen, farklı monosit alt gruplarının gerçek fizyolojik ilişkisi büyük oranda bilinmemektedir [41].

Gelişimsel açıdan bakıldığında periferik kan monositleri; doku ve uyarana bağımlı şekilde makrofajlara, dendritik hücrelere, osteoklastlara, mikroglia'ya, endotel benzeri hücrelere, hatta mezenkimal hücre tiplerine farklılaşabildiği için, çok yönlü ve esnek bir farklılaşma potansiyeline sahiplerdir. Sitokinler, alternatif farklılaşma yollarının her birinde ilerlemek için monositlerin en önemli uyaranlarıdır ve bir monositin maruz kaldığı ilk sitokin, onun sonrasındaki farklılaşma programını ve sitokin yanıt profilini belirlemektedir. Örneğin

monositlerin *in vitro*'da makrofajlara veya dendritik hücrelere farklılaşması esas olarak sitokin ortamına bağlıdır. İnsan sisteminde İL-4, makrofaj gelişimi pahasına dendritik hücre farklılaşmasını desteklerken, İL-6'nın varlığı dendritik hücre farklılaşmasını bozmakta ve monositleri makrofaj farklılaşma rotasında bir M-CSF'ye bağımlı şekilde yönlendirmektedir. Diğer sitokin kombinasyonları, *Langerhans* hücre benzeri hücrelerin (GM-CSF+İL-15, GM-CSF+İL-4+TGFβ) veya osteoklast benzeri hücrelerin bile üretilmesine neden olur [41].

Monosit farklılaşması dış uyaranlarının varlığına karşı da hassaslaşmış olup, bunlar farklılaşmayı tetikleyen sitokinlerin aktivitesini bozabilir. Bu bağlamda, lipopolisakkarid veya bakterinin bütünü hem *in vitro* hem de in vivo'da İL-10 ve p38MAPK bağımlı olduğu öne sürülen bir etki ile monositlerin dendritik hücrelere farklılaşmasını engeller [41].

Sağlıklı bir kişinin normal gereksiniminin ötesinde kemik iliğinde fazla miktarda nötrofil ve monosit oluşması işlemine acil miyelopoez (*emergency myelopoiesis*) denir. Bu uyaran akut veya kronik yangı veya steril yangı olabilir. *Crohn* hastalığı, transplantasyon toleransı, sepsis ve otoimmün hastalıklar gibi farklı patogenezdeki hastalıklarda kemik iliğinden perifere hücre göçü hep aynı mekanizmayla olmaktadır. Bu durumda kemokinler (CCL2 ve CCL5) ve sitokinler (G-CSF, GM-CSF) vasıtasıyla hücre yapımı ve salınımı gerçekleştirilir [42].

2.6.2. Monositleri Makrofaj'a farklılaşması yönünde etkileyen sitokinler

İL-3 ile birlikte, GM-CSF ve M-CSF makrofaj sağkalımı, farklılaşma ve kemotaksis için başlıca soy belirleyici sitokinlerdir. Bu üç koloni uyarıcı faktör, kemik iliği kaynaklı hücreler üzerinde benzer ve örtüşen etkilere sahip olduklarından işlevsel pleitotropi gösterirler ve bol miktarda bulunurlar [41].

M-CSF; sayısız hücre tipi (endotel hücreleri, fibroblastlar, kemik iliği stromal hücreleri, osteoblastlar, timik epitel hücreleri, keratinositler, astrositler, miyoblastlar) tarafından sentezlenir ve normalde serumda bulunur (normal aralık 3-8 ng/ml). GM-CSF, TNF-α, İL-1 ve İFN- γ ile hematopoetik hücrelerin ve fibroblastların aktivasyonunun üzerine üretimi de uyarılabilir. MCSF üretimi dokuya özgü bir şekilde düzenlenir; örneğin M-CSF düzeyleri steroidlere yanıt olarak gebelik sırasında kadın üreme sisteminde çarpıcı biçimde

artarken, aynı dönemde kan konsantrasyonu nispeten sabit kalır. Miyeloid gelişimde MCSF'nin kritik rolü, M-CSF'den yoksun farelerin bozuk makrofaj oluşumuna sahipken, GM-CSF nakavt (KO) farelerde önemli makrofaj kusurları gözlenmemesi ile gösterilmiştir [41].

GM-CSF; hematopoetik (makrofajlar, T lenfositler, B-lenfositler, mast hücreleri, eozinofiller, nötrofiller) ve hematopoetik olmayan (fibroblastlar, endotel hücreleri, stromal hücreler, keratinositler, plasental hücreler, astrositler, osteoblastlar) hücre tipleri tarafından üretilir. GM-CSF ekspresyonu genellikle hücre uyarımı/aktivasyonu gerektirse de, normal koşullar altında serumda bir miktar (20 ila 100 pg/ml arasında değişen) tespit edilebilir. GM-CSF, pleiotropik özelliğine rağmen, konsantrasyona bağlı işlevsel özgünlük gösterir. Hücre canlılığı üzerindeki etkilerinde, hücre çoğalması için gerekli konsantrasyonlardan çok daha düşük konsantrasyonlar yeterlidir. Ayrıca, GM-CSF ve M-CSF, kendi işlevsel faaliyetlerini çapraz modüle ederler: M-CSF ve düşük seviyelerde GM-CSF makrofaj oluşumunu önemli ölçüde artırırken yüksek konsantrasyonlarda GM-CSF M-CSF aracılı makrofaj büyümesinin baskılanmasına sebep olur. Bu etki GM-CSF'nin M-CSF reseptörünün ekspresyonu üzerindeki baskılayıcı etkisi ile açıklanabilir [41].

Her ne kadar GM-CSF ve M-CSF *in vitro* insan monosit kaynaklı makrofajların üretilmesi için birbirlerinin yerine kullanılsa da, her iki faktör de monosit üzerinde belirgin etkiler bırakır ve *in vitro* olarak fenotipik ve işlevsel olarak farklı makrofaj türleri üretilmesine neden olur. GM-CSF ile uyarılan makrofajlar, Mikobakteriye tepki olarak pro-enflamatuvar İL-23 ve İL-12 üretir ve tip 1 bağışıklığı geliştirir. İL-23, yeni görevlendirilen monositlerin farklılaşmasını sağlayabilecek GM-CSF üretimini daha da artırır. Bunun aksine, M-CSF kaynaklı makrofajlar mikobakteriye yanıt olarak büyük miktarlarda İL-10 salınımı gerçekleştirir, tip 1 bağışıklığı baskılar, periferik toleransı sürdürür ve immün kaçış mekanizmalarını teşvik ederler [41].

M-CSF düzeyleri yenidoğanın kordon kanı, tümörler ve gebelik sırasındaki gibi immün baskılayıcı koşullarda büyük ölçüde yüksekken; M-CSF seviyelerindeki azalma gebelikte düşük riskini artırmaktadır. Bu korelasyon, embriyonlara karşı maternal toleransın sağlanmasında M-CSF'nin rolünün olabileceğini düşündürmektedir [41].

Her iki makrofaj alt tipi hücresel bağışıklıkta karşıt rol oynar ve farklılıkları kemokin ekspresyon profiline kadar uzanır. M-CSF ve GM-CSF ile uyarılan makrofajlar sırasıyla anti-enflamatuvar ve pro-enflamatuvar olarak düşünülür [41].

Monosit yangı alanına gittiğinde makrofaj veya dendritik hücreye farklılaşır. İnflamasyon alanındaki İL-10'un aktive makrofajı baskılayabileceği bilinmektedir, ancak dolaşımdaki yangısal özellikteki monositler homojen değildir. Regülatuvar monositler ve yangıyı baskılayıcı monositler vardır. Graft versus Host hastasına uygulanan pre-emptive CSF-1 tedavisi baskılayıcı makrofajların çoğalmasına sebep olmuştur. CSF-1 verilen hücrelerde makrofajın TGF-β salarak T hücre çoğalmasını engellediği görülmüştür. Doku hasarı ve infeksiyona cevap olarak yangısal fenotipteki makrofajlar TNF-α, İL-1, NO gibi salgılarla antimikrobiyal mekanizmayı başlatır ve mikroorganizmanın öldürülmesini sağlarlar. İL-12 ve İL-23 gibi sitokinlerin salınımıyla Th1 ve Th17 hücre plastisitesi olur. Aktive makrofajın ürettiği reaktif oksijen ve nitrojen ara ürünleri yangıyı çevreleyen dokuda hasara sebep olur; böylece beklenmedik bir yangı başlayabilir. M1 tipindeki bu makrofajların sebep olduğu kronik otoimmün hastalıklar bilinmektedir. Doku hasarının onarılması ve yangının bitirilmesi aşamasında M2 makrofajlar devreye girer. Ortamdaki M1 makrofaj M2 tipine dönüşür. M2 makrofajlar TGF-β1, PDGF gibi büyüme faktörleri sagılayarak epitel hücresi ve fibroblastları uyarır. Makrofajdan salınan TGF-β1 ve PDGF doku yenilenmesi ve yara iyileşmesine katkıda bulunur. Fibroblastların miyofibroblastlara dönüşmesi burada rol oynayan ana mekanizmadır. Miyofibroblastlar hücreler arası kollojen fibrillerini kurar, doku metalloproteaz inhibitörlerinin üretimi artarken (TIMPs) ekstraselüler matriks (ECM) yıkımı azalır. M2 makrofajlar direkt olarak MMP ve TIMPs üretirler. Ayrıca doku hasarı sırasında oluşan hücresel atıklarını ve ölü hücreleri ortamdan uzaklaştırırlar. Antijen sunumu ile özgül Th2 ve Treg hücrelerinin oluşmasını sağlar. Bu aşamada istenmeyen fibrozisin önüne geçilebilmesi için immünoregülatuar proteinleri eksprese eder. Bu proteinler, İL-10, RELMα (*resistin like molecule-α*, RTNLα, FIZZ1), kitinaz benzeri proteinler ve arjinaz 1 (ARG1) olarak sayılabilir. Ancak yangının sonlanması aşaması hem M1 hem M2 makrofajlar için halen tam olarak açıklanamamaktadır [41,42].

1,25-Dihidroksi vitamin D3 (1,25 (OH)2 D3): Aktif vitamin D formudur ve makrofajın İL-10 ve MIP3α eksprese etmesini uyararak bu şekilde makrofajı baskılayıcı (immün

baskılayıcı) konumda tutar. Ko-stimulatör ve MHCII moleküllerinin ekspresyonunu engellerler [43].

Prostaglandin E2 (PGE2): Etkin yangısal bir aracı moleküldür. Lokal vazodilatasyon yaparak akut yangı alanına nötrofil ve monosit gelmesini sağlar. Ancak EP2 reseptörü sayesinde makrofajın baskılayıcı konumda kalmasını sağlar. PGE2 İL-10 ekspresyonunu uyarıp, TLR yoluyla olan TNFα ekspresyonunu azaltır ve makrofajın fagositik aktivitesini azaltarak onun antimikrobiyal kapasiteyi baskılar [44].

Forbol miristat asetat (PMA): İn vitro koşullarda insan monositlerini makrofajlara dönüştürmede kullanılan bu klasik bir ajandır. THP-1 insan monosit hücre hattı PMA ile 3 saat muamele edildiklerinde olgun makrofaj hücrelerine dönüşmekte ve %80 hücre yapışkan özellik kazanmaktadır [45].

Çizelge 2.3 Monosit sınıflandırması [41]

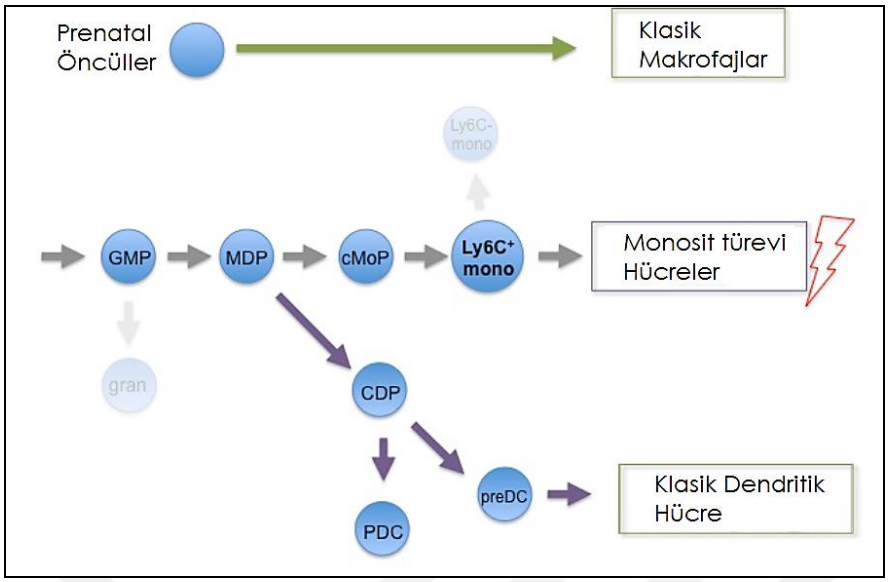
Monosit	**İsimlendirme**		**İşlev**
$CD14^{+}CD16^{-}CD64^{+}$	Klasik monosit tipi	$CCR2^{(+)}$	Fagositoz yeteneği yüksek, TNFα üretimi fazladır
$CD14^{+}CD16^{+}CD64^{+}$	Ara form monosit tipi (*intermediate*)		
$CD14l^{ow}$ $CD16^{+}CD64^{-}$	Klasik olmayan monosit tipi	$CCR2^{(-)}$, $CD32^{high}$	İnflamasyon sırasında Dendritik Hücreye (DH) dönüşür Güçlü T hücre uyarımı yapar

2.6.3. Makrofaj

Makrofajlar; vücut dokuları boyunca stratejik olarak konumlandırılan; ölü hücreleri, enkazı (debrisi) ve yabancı maddeleri yutan ve parçalayan; yangısal süreçleri düzenleyen miyeloid immün sistem hücreleridir. Makrofajlar fagositoz eğilimleri ile karakterizedirler. Hücresel immünolojinin babası olan Ilya (Eli) Metchnikoff, bu nedenle bu hücrelere Yunancada "büyük yiyiciler" olarak atıfta bulundu. Bir zoolog olan Metchnikoff makrofajların büyüleyici biyolojisini ve insan sağlığındaki merkezi rolünü öngörerek Nobel ödülünü almıştır. Metchnikoff ilk olarak denizyıldızı larvaları ve enfekte su pire'lerinde makrofaj sürülerini görselleştirmek için intra-vital mikroskopi kullandı. Bu araştırmasında omurgasız fagositozu ve omurgalı kan hücrelerinin çarpıcı benzerliklerini

kaydetti. İlk aşamada fagositoz özelliklerini ön planda tutarak yaptığı araştırmalarına ilerleyen süreçlerde immün işlevleri ve onarıma ilişkin işlevlerini ilave ederek bu hücre popülasyonunun ne denli öneme sahip olduğunu vurgulamıştır [39].

Makrofajlar, 1970'lerin ortalarında Ralph Steinman tarafından ortaya çıkarılan monositler ve dendritik hücreler (DH) ile birlikte Van Furth ve Cohn tarafından belirlenen mononükleer fagosit sisteminin bir parçası olarak sınıflandırılmıştır. Mononükleer fagositik sistem kemik iliğinde bulunan hematopoetik kök hücrelerden (*Common myeloid progenitors*) gelişmektedir. Mononükleer fagosit kavramı ile doku makrofajlarının kemik iliği (Kİ) kaynaklı monositler tarafından yenilendiği esası önerilmiştir. Bununla birlikte, doku makrofajları ile kan monositleri arasındaki doğal gelişimsel bağlantı kavramı yıllar boyunca tartışmalı kalmıştır. Yetişkin doku makrofajlarının kendini yenilemesine dayanan uzun süreli kalıcılığı (*long term persistence*) iyi belirlenmiştir. Dahası, dolaşımdaki monositlerin oluşumundan önce bazı embriyonik makrofaj popülasyonları da tanımlanmıştır. Son olarak, monositopenik hayvanlarda görünüşte normal doku makrofaj bölmeleri gözlenir ve, monositopeni çeken insan hastalarda da dokuya ait makrofaj sayıları büyük ölçüde etkilenmezler. Bu bulgular toplu olarak değerlendirildiğinde monosit harici makrofaj kaynaklarının belirlenmesi yönünde yapılacak araştırmalar değer kazanmıştır. Mononükleer fagosit sisteminin gözden geçirilmiş konsepti, esasen fare verilerine dayansa da şimdi iki farklı kökenli doku makrofajlarının varlığını kapsamaktadır. Sağlıklı dokuda bulunan makrofajların çoğu prenatal kaynaklıdır. Bu hücresel kompartmanlar kendi ikamet dokularında birbirlerinden bağımsız olarak kendi kendini idame ettirirler ve kendi kendine yeterli olup gelecek hematopoetik katkılardan bağımsızdırlar. Buna ek olarak yetişkinlikte makrofajlar, doku infiltrasyonu kabiliyetindeki monositlerden gelişebilirler. Bu yol patolojik ve aynı zamanda homeostatik yangısal reaksiyonlarla ilişkilidir. Monositten türevlenmiş makrofajlar, istisnalar rapor edilmiş olmasına rağmen, genel olarak sınırlı yaşam ömrü gösterir. Embriyonik ve erişkin kaynaklı makrofajlar belirli dokularda birlikte bulunabilir ve bunların bolluğu büyük olasılıkla ikamet dokularının doğasını ve tarihini yansıtmaktadır [39].



Şekil 2.1. Klasik makrofaj ve monosit türevi hücreler [39]

Makrofajların kökenleri

Prenatal olarak oluşturulmuş doku makrofajları

Embriyonik makrofajlar

Makrofajlar mezoderm kaynaklı hematopoietik hücrelerdir. Embriyonik hematopoez, bağımsız dalgalar halinde oluşur ve organlar arasında zamansal ve mekansal olarak koordineli bir şekilde ilerler. Kemirgenlerde ilk dalga genellikle geçici olarak kabul edilir ve embriyonik 7. günde (E7) ekstra embriyonik yolk kesesi kan adalarından başlar. "Primitif" çekirdekli eritrositler ve miyeloid hücreler üretir, ancak lenfositleri üretmez. E10.5'te embriyonun aort-gonad-mezonefroz (AGM) hematojenik endotelinde ikinci bir dalga başlatılır. 'Kesin hematopoez' olarak adlandırılan bu süreç, eritrositleri verir ve çoklu hematopoetik soy potansiyeline sahip sınırlı sayıda kök hücre üretir. Çoğunlukla AGM ancak yanı sıra yolk kesesi türevli hematopoietik öncül hücreler kolonize olarak fetal karaciğerde geçici olarak hematopoezin baskın embriyonik bölgesi haline gelirler. Dalak ve Kİ gibi postnatal fare primer hematopoietik organları, dolaşım sistemi yoluyla fetal karaciğer kaynaklı hematopoetik öncüller ile ve nihayetinde özgülleşmiş nişlerde konakçı hematopoetik kök hücreleri (HKH) ile kolonize edilirler. Primitif makrofajlar, E8.5 / E9.0'da yolk kesesi kan adalarında bulunur ve monositik ara madde olmadan üretilir. Bu hücreler kan dolaşımının kurulması üzerine yolk kesesinden kopar ve bütün embriyoya dağılırlar. Erken fetal doku makrofajları çoğalma potansiyelini korur ve bu hücreler büyük

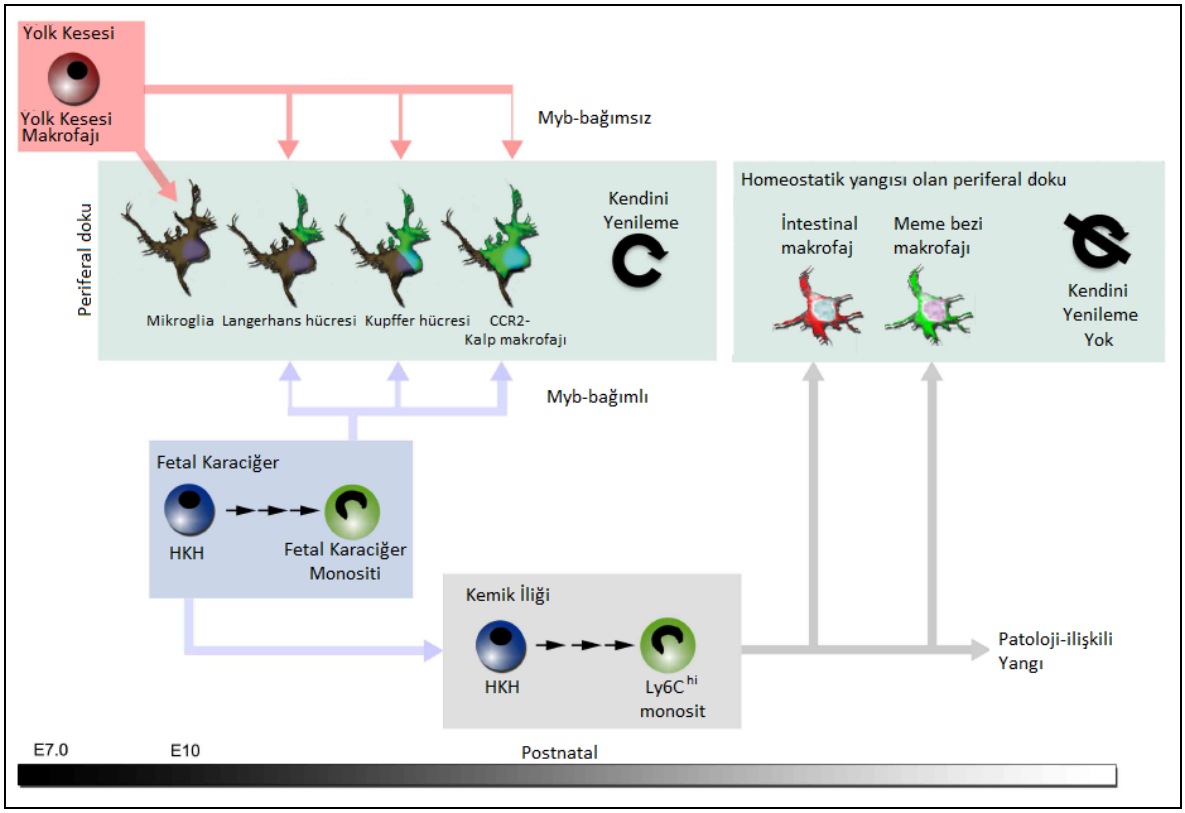
olasılıkla çeşitli hücresel süreçler ile oluşan debrisin temizlemesinden de sorumludur. Örneğin PU.1 (SPI1 olarak da bilinir) veya koloni uyarıcı faktör 1 reseptörü (CSF-1R, ayrıca M-CSFR veya CD115 olarak da bilinir) eksikliklerinden dolayı, embriyonik gelişim sırasında makrofajlardan yoksun fare mutantları, perinatal mortalite ve büyüme geriliği gösterirler. Kesin hematopoez dizileri bir kez belirlendiğinde, yetişkin monositleri andıran $CD11b^{+}F4/80^{+}Ly6C^{+}$ hücreleri gibi fetal monositlerin üretimi de dahil olmak üzere embriyonik hematopoezin ana kaynağı olur. İkincisinde olduğu gibi, fetal monositlerde CSF-1R de eksprese edilir, ancak bunların üretimi CSF-1 ve İL-34 gibi bilinen CSF-1R ligandlarından bağımsız görünmektedir [39].

Embriyonik orijinli yetişkin doku makrofajları

Embriyonik makrofajların yetişkinliğe kadar devam edip etmediği ve eğer öyleyse bu hücrelerin ve primitif hematopoezin yetişkin doku makrofaj bölmelerine önemli ölçüde katkıda bulunup bulunmadığı gibi sorular uzun süre açıklığa kavuşmamıştır. Ancak son zamanlarda gerçekleştirilen ve kesin hematopoezin selektif bir bozulmaya uğradığı ancak primitif hematopoezin uğramadığı mutant fare analizlerinde; erişkinlerde yolk kesesi kaynaklı hücrelerin doku yerleşik makrofaj populasyonlarının aslında bir parçası olabileceği tespit edilmiştir. Esasında bu deneylerde transkripsiyon faktörü Myb'nin yolk kesesi myelopoezi için vazgeçilmez olması ve yine HKH kaynaklı kesin hematopoez içinde gerekli olduğu gerçeğinden yararlanılmıştır. Buna rağmen Myb eksikliği olan embriyoların; karaciğer (Kupffer hücreleri, KH), epidermis (Langerhans hücreleri (LH)) ve beyin (mikroglia) dahil olmak üzere birden fazla organında normal doku yerleşik makrofajları barındırıyor olması ilginçtir. Bu veriler aynı zamanda, kesin hematopoez yoksun normal postnatal doku yerleşik makrofaj popülasyonlarının gözlendiği Myb mutant zebrafish verileriyle de tutarlıdır. Çoğu doku makrofaj kompartmanının doğumdan önce üretildiği, yetişkinlerde bulunmasının uzun ömürlülük veya sınırlı kendinden yenilenme ile sağlandığı savunulmaktadır (Şekil 2.2) [39].

Yetişkin Kİ mikroglia ve LH için gösterildiği gibi, gerçek uzun ömürlü doku makrofajlarına farklılaşabilen öncül hücreler içerir. Bununla birlikte mevcut veriler, bu öncül hücrelerin, sadece ilgili dokuyu geçici olarak besleyen monositlerden farklı olduğunu ileri sürmektedir. Monositik olmayan hücrelerin kimliğinin tanımlanması daha fazla araştırmayı gerektirir. Şu an için erişkin doku makrofajlarının doğumdan önce

oluşturulduğu yaygın olarak kabul görürken, Myb-bağımsız myelopoez ve kesin Myb-bağımlı hematopoezin yetişkin doku makrofajlarına katkıları belirlenmeye devam edilmektedir [39].

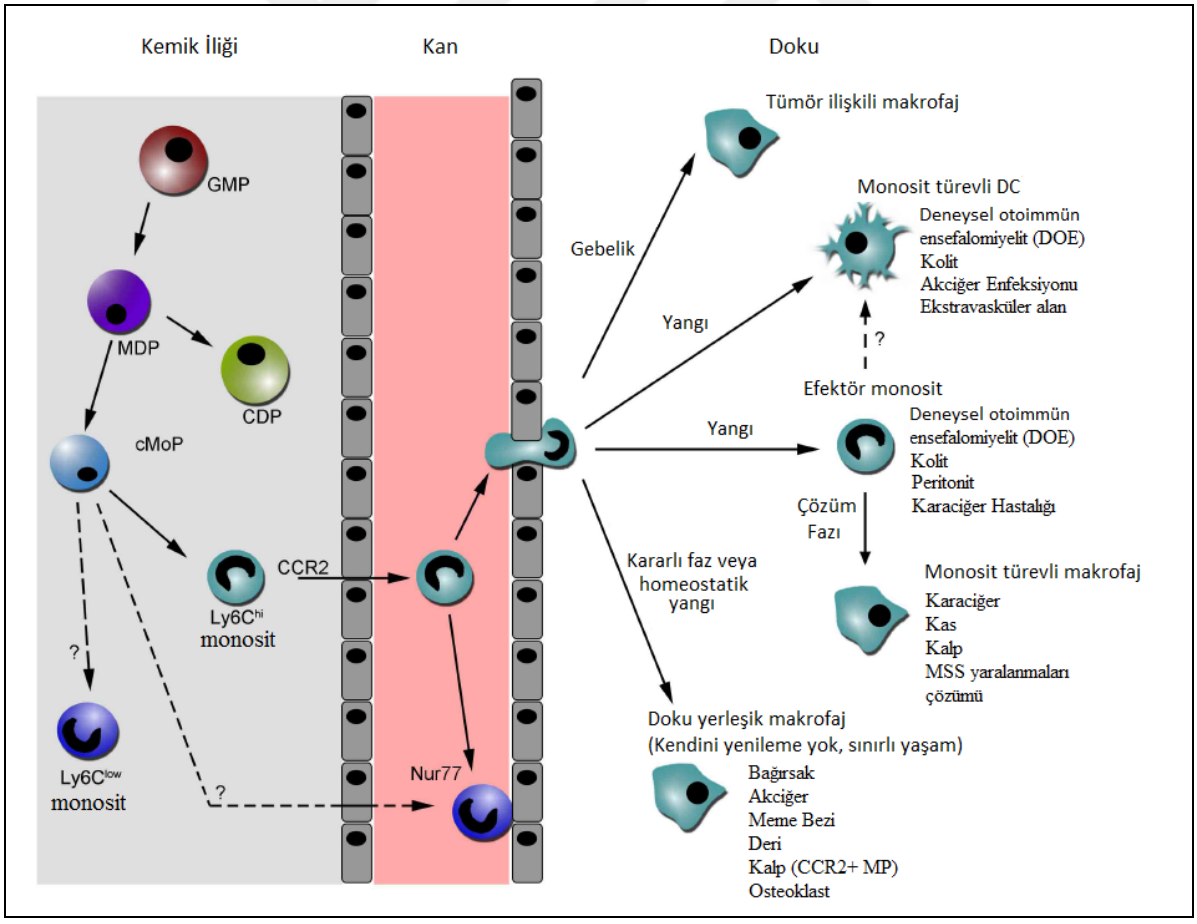


Şekil 2.2. Yolk kesesi ve fetal karaciğer kaynaklı makrofajlar [39]

Postnatal olarak oluşturulan doku makrofajları

Makrofajların dolaşımdaki monositlerden kaynaklandığı varsayımı, patolojik düzenlemelerde monositlerin makrofajlara neden olduğu klasik gözlem üzerine ortaya atılmıştır. Monositler, özellikle Ly6C^{hi} monosit alt kümesi, nötrofillere benzer şekilde kısa bir yarılanma ömrü sergilemektedirler. Bu durum, monositlerin dokuya yerleşik mononükleer fagositler için bir öncül rezervuar oluşturduğu varsayımıyla tutarlıdır. Doku makrofajlarının Kİ kökeni ile, LH ve mikroglia hücreleri haricindeki doku makrofajı popülasyonlarının neredeyse tamamının yeniden oluşturulmasına imkan veren transplantasyon deneylerinin sonuçları tarafından da bu düşünce desteklenmiştir. Yine de bu çalışmalarda yeni oluşturulan monositleri veya henüz tanımlanamayan Kİ'ndeki öncülleri içerdiği netlik kazanmış değildir. Van Furth tarafından tanıtılan, doku makrofajlarının monositik kökenleri, mononükleer fagosit konseptinin temel bir dogması

haline gelmişti. Ancak şimdi, klasik dendritik hücrelerin (kDH) özgül öncüllere dayandığı ve çoğu doku makrofajının embriyonik orijinli ve bağımsız monosit girdisine sahip olduğu iyi bir şekilde bilinmektedir. Monositler ve onların nesilleri, oluşan talep üzerine klasik doku yerleşik mononükleer fagosit kompartmanını tamamlayabilen oldukça plastik ve dinamik hücresel bir sistem olarak ortaya çıkmıştır. Bu monosit türevi hücrelerin çeşitli fizyolojik süreçlere katkısı, lenf düğümlerine göç, antijen sunumu ve bakterisidal etkinliğini içeren klasik doku makrofajları ve DH ile ilişkili aktiviteleri de içerebilir. Bununla birlikte, monositler, muhtemelen, dokulardaki kısa ömürlü efektör hücreler olarak kendi başlarına işlev görürler ve henüz tanımlanamayan spesifik aktivitelere katkıda bulunurlar. Örneğin elde edilen deneysel veriler ışığında monositlerin anjiyojenez ve arteriyogenezi teşvik edebildiği gösterilmiştir. Son olarak, yakın zamanda Ly6C^{hi} monositlerinin makrofaj veya DH benzeri bir yönelime bağlı kalmadan kararlı durumda kalmaya ve lenf düğümlerine antijen taşınmasına katkıda bulunduğu savunuldu [39].



Şekil 2.3. Postnatal dönem makrofajları [39]

Dokulardaki diferansiyel monositlerin kaderi, yani efektör monositler; monosit türevli DH veya makrofajlar, muhtemelen bir gelişimsel devamlılığı temsil eder ve dolayısıyla gelişimleri öncesinde kesin bir tanımlama yapılması zordur. Dahası, monosit türevli hücreler dokularda yerleşik embriyo kaynaklı doku makrofajlarından ayırt edilmesini zorlaştıran fenotipik özellikleri benimser. Bu teknik zorluğun üstesinden gelmek ve yine de bu farklı hücresel varlıkların potansiyel farklı katkılarını tanımlamak için bir dizi yaklaşım getirilmiştir. Başlangıçta, bu stratejiler ışınlama ve Kİ transferlerine dayanıyordu. Ancak bu yaklaşım kendiliğinden yangıya ve kan-beyin bariyeri (KBB) kopması gibi problemlere neden olduğundan sorunludur. Dahası, öncül hücreler de dahil olmak üzere Kİ hücrelerinin intravenöz transferi önemli yapay artık oluşumuna neden olabilir. Monositler Kİ'nden çıkmak için CCR2'ye ihtiyaç duyarlar ve dolayısıyla belirli bir dokuya yerleşik makrofaj popülasyonunun CCR2'ye bağımlılığı monosit kökeni göstergesi olarak kullanılabilir. Dahası, CCR2 promoteri, monositleri etiketlemek ve bu hücreleri dokuya yerleşik makrofajlardan ayırmak için bir raportör gen olarak kullanılmıştır. Bunun aksine, raportör genleri aktive eden farklılaşma yolaklarını haritalama stratejileri, embriyo türevi hücreleri spesifik olarak etiketlemek ve bunları hızla yenilenen kısa ömürlü monosit kaynaklı hücreden ayırmak için kullanılabilir [39].

Makrofajlar ve fenotipleri

Periferik kan monositleri, özellikle yangısal koşullar altında doku makrofajlarına farklılaşırlar. Bununla birlikte, kararlı durumdayken belirli dokulardaki makrofajlar, periferik kan monositleri olmadan kendi kendine oluşabilir [41].

Makrofajlar işlevsel özellikleri ve yerleştikleri dokuya göre isimlendirilebilirler. Örneğin özelleşmiş doku makrofajları kemikte osteoklast, akciğerde alveolar makrofaj, karaciğerde Kupffer hücresi, interstisiel bağ dokuda histiosit olarak isimlendirilir. Bağırsaklarda farklı özelliklerde makrofajlar uyum içinde birlikte çalışabilmektedirler, bu şekilde bağırsak florası ve besinlere karşı tolerans sağlanmaktadır. Sekonder lenfoid organlarda da özelleşmiş makrofajlar bulunmaktadır. Dalakta marjinal zon makrofajları apoptotik hücrelere karşı doğal ve edinilmiş immün yanıtı baskılar. Lenf düğümündeki subkapsüler sinüs makrofajları ise lenf düğümünden virüsleri temizler ve virüslere karşı hümoral immün yanıtı başlatır. İmmüniteden korunmuş alanlar olan (*immune priviliged sites*) beyin (nöroglia), göz ve testislerde de makrofajlar bulunmaktadır, bunların doku homeostazı ve

doku yapılanmasında (remodeling) görevli olduğu düşünülmektedir. Doku makrofajları karşılaştıkları yabancı materyalleri tanımlayarak dolaşımdan monositlerin infeksiyon veya hasar alanına gelmesini sağlarlar [42].

Makrofajlar fizyolojik ve patolojik koşullardaki çeşitli süreçlerde yer alan doğal immün sistemin miyeloid hücrelerinin heterojen bir popülasyonunu oluştururlar. Yangı ve enfeksiyonda özellikle aktiftirler. Bu gibi koşullar altında kan monositleri, makrofajlara farklılaştıkları dokuya dahil edilirler. Makrofajlar, bulundukları ortam koşullarına (sitokin yoğunluğu, hasar tipi vb) bağlı olarak fenotiplerini değiştirerek verecekleri yanıtı belirler (plastisite). Bu şekilde konak savunmasında mikroplara veya tümörlere karşı immün yanıtın oluşması veya baskılanması işlevini görebilirler. Makrofajlarda, klasik olarak aktive edilmiş tip 1 (M1) ve alternatif olarak aktive edilen tip 2 (M2) olmak üzere iki büyük plastisite durumu tanımlanmıştır [46].

Makrofajların klasik aktivasyonu yaralanma veya enfeksiyon sonrasında meydana gelir. Makrofajlar, *in vitro*'da klasik olarak bakteriyel hücre duvarı bileşenleri (LPS gibi) ve İFN-γ veya TNF-α kullanarak aktive edilir. M1 makrofajları TNF-α, İL-1β, İL-6 ve İL-12 gibi pro-enflamatuvar sitokinlerin üretimi ile karakterizedir. Aynı zamanda yüksek düzeyde reaktif oksijen ve azot türünü üretirler. M2 makrofaj plastisitesi, İL-4 ve/veya İL-13, bağışık kompleksler ve Toll benzeri reseptör (TLR), İL-1 reseptör ligandları veya İL-10 gibi farklı uyarımcılar tarafından uyarılabilir. İL-4 ve İL-13 ile polarize edilmiş alternatif olarak aktive edilen makrofajlar, sınırlı miktarda pro-enflamatuvar sitokin üretimi ile karakterize edilir, ancak İL-10, CCL18 ve CCL22 gibi anti-enflamatuvar sitokinleri salgılarlar. M2 makrofajlar ayrıca, Mannoz reseptör CD206 (veya MRC1), çöpçü (*scavenging*) reseptör CD163, dektin-1 ve DC-SIGN (Dendritik hücreye özgü hücre içi adezyon molekülü; Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin) gibi birkaç reseptörün ekspresyonu ile de karakterizedirler.[46] Farklılaşmış makrofajlar, homojen bir hücre popülasyonu olarak değil, M1 ve M2 fenotipleri olarak sınıflandırılabilen çok sayıda fenotip olarak bulunur (Çizelge 2.4) [47].

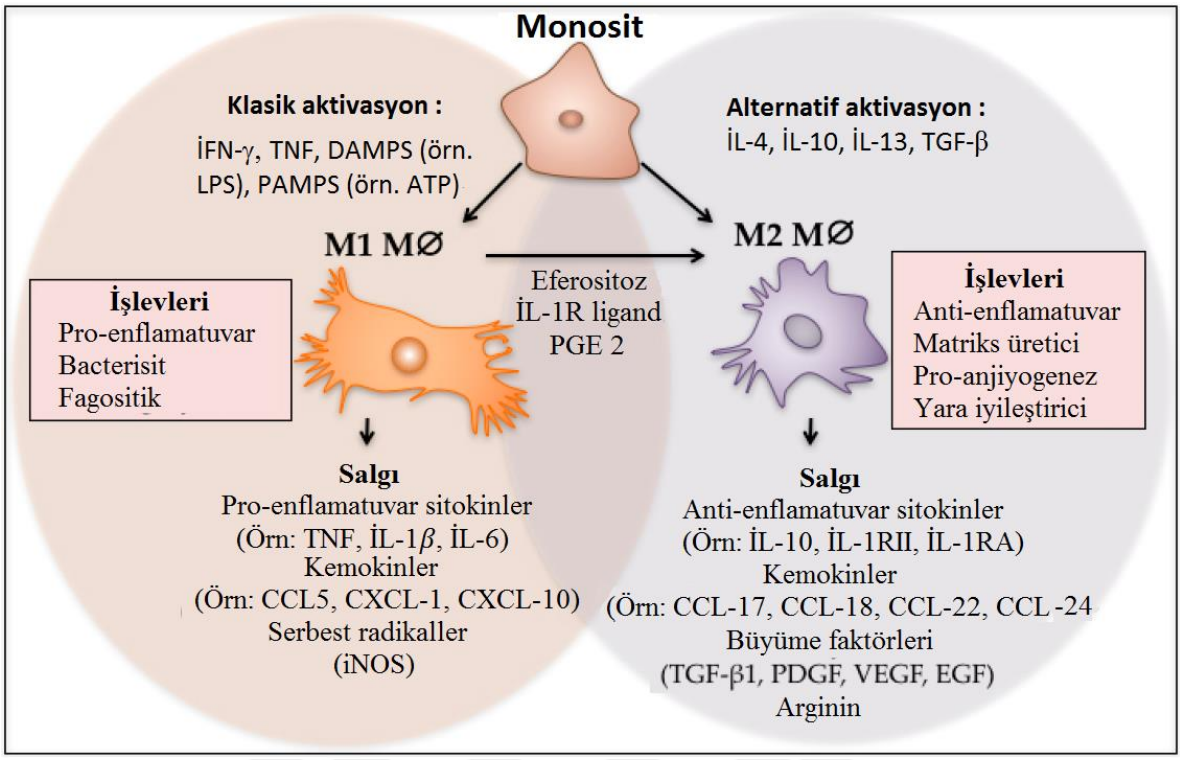
Pro-enflamatuvar mediatörler interferon-γ (İFNγ), tümör nekroz faktörü (TNF) ve Hasar ilişkili moleküler kalıpları (DAMPler), hücreleri 'klasik olarak aktive' M1 makrofajları üretmek üzere harekete geçirir. Doku hasarı ve infeksiyona cevap olarak yangısal fenotipteki makrofajlar TNFα, İL-1, NO gibi salgılarla antimikrobiyal mekanizmayı

başlatır ve mikroorganizmanın öldürülmesi sağlanır. İL-12 ve İL-23 gibi sitokinlerin salınımıyla Th1 ve Th17 hücre plastisitesi olur. Aktive makrofajın ürettiği reaktif oksijen ve nitrojen ara ürünleri yangıyı çevreleyen dokuda hasara sebep olur; böylece beklenmedik bir yangı başlayabilir. M1 tipindeki bu makrofajların sebep olduğu kronik otoimmün hastalıklar bilinmektedir. Doku hasarının onarılması ve yangının bitirilmesi aşamasında M2 makrofajlar devreye girer. M1 makrofajlar M2 makrofajlara farklılaşabilirler. M2 makrofajlar TGF-β1, PDGF gibi büyüme faktörleri sagılayarak epitel hücresi ve fibroblastları uyarır. Makrofajdan salınan TGF-β1 ve PDGF doku yenilenmesi ve yara iyileşmesine katkıda bulunur (Şekil 2.4) [42,47].

Çizelge 2.4. İnsan M1 ve M2 makrofaj Fenotipleri [47]

Ürünler	M1 (CAMØ)	M2a (AAMØ)	M2b (AAMØ)	M2c (AAMØ)	M2d (AAMØ)
Belirteç Ekspresyonu	$CD14^{++}$, $CD16^{-}$, CD68, CD86,CD80, $MHC\text{-}II^{high}$	$CD14^{+}$ $CD16^{++}$ CD68 CD163 CD206 CD3001, $MHC\text{-}II^{low}$	$CD14^{+}$ $CD16^{++}$ CD68 CD86, $MHC\text{-}II^{+}$	$CD14^{+}$, $CD16^{++}$, CD68, CD150, CD163 CD206	$CD14^{+}$, $CD16^{++}$, CD68
Sitokinler	İL-1β, İL-6, İL-12, İL-18, İL-23, TNF	İL-1ra, sİL-1R, İL-10	İL-1β, İL-6, İL-10, TNF	İL-10	İL-10, İL-12 TNF
Kemokinler	CXCL1, CXCL10, CXCL 11, CXCL 16, CCL2-5, CCL8-11	CCL-17, 18, CCL22, CCL24	CCL1 CCL20 CXCL1, CXCL3	$CXCL^{-}$-13, CCL-16, CCL-18 CCR2	CXCL-10, CXCL-16, CCL-5
Sinyalizasyon	STAT-1, STAT-4, SOCS-3	STAT-3	$SOCS3^{+}$	STAT-6, $SOCS3^{+}$	
Proteazlar	MMP-1, 2, 3, 7, 9 ve 12	MMP-1, 2, 9, 12,13,14, TIMP-1			
Büyüme Faktörleri / Diğer	ROS, RNS, NO	EGF, TGF, IGF1, Arg1,	COX-2	EGF, TGF Arg1,	VEGF, TGF iNOS

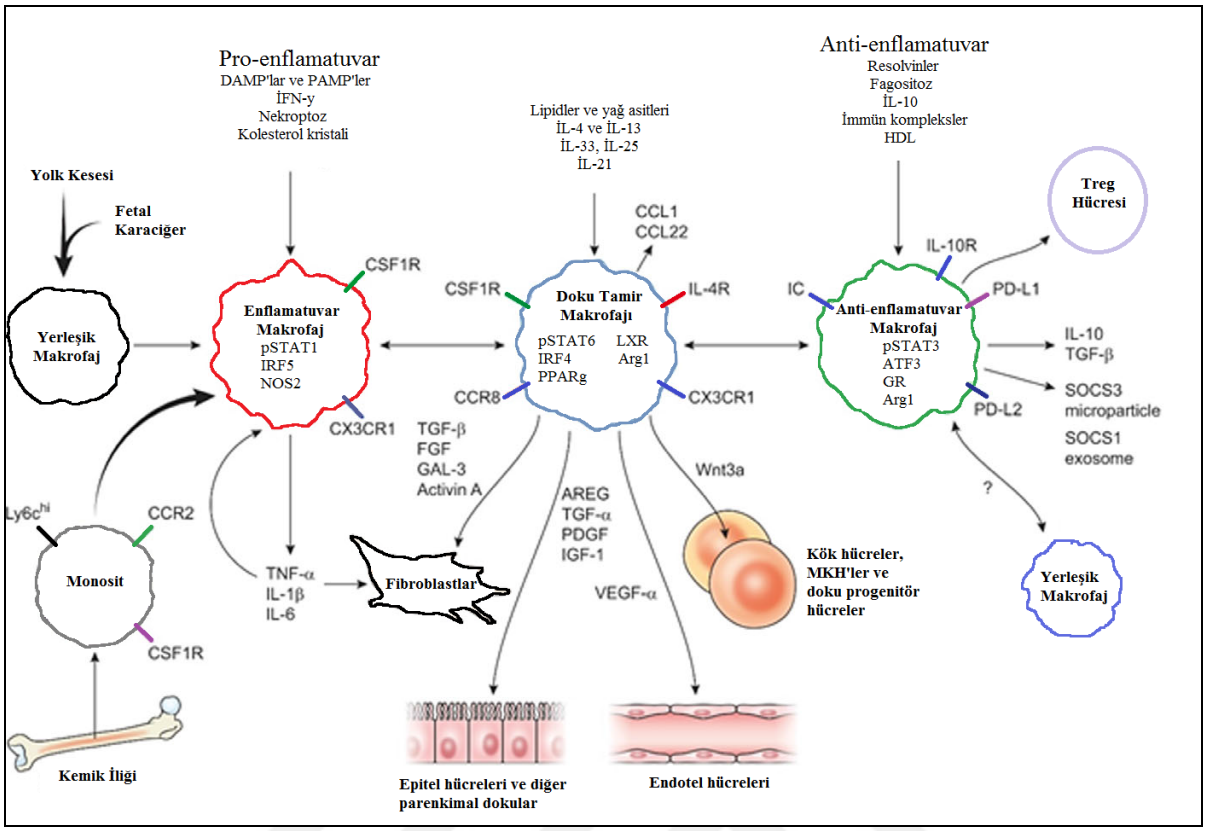
-, negatif; + pozitif (düşük); ++ pozitif (yüksek); İL, interlökin; MMP, matriks metaloproteinaz; TNF, tümör nekroz faktörü; MHC, ana doku uygunluk kompleksi (*major histocompatibility complex*); NOS, nitrik oksit sentaz; Arg, arjinaz; ROS, reaktif oksijen türleri; RNS, reaktif azot türleri; EGF, epidermal büyüme faktörü; TGF, transforme edici büyüme faktörü; IGF1, insulin-benzeri büyüme faktörü 1; VEGF, vasküler endotelyal büyüme faktörü.



Şekil 2.4. Makrofajların M1 ve M2 plastisitesi [47]

Makrofajlar klasik veya alternatif olarak sırasıyla M1 veya M2 formuna aktive edilebilirler. M1 fenotipi pro-enflamatuvar, fagositik ve bakterisidal özellikteyken; M2 fenotipi yangı durdurma, yeniden vaskülarizasyon ve yaranın kapanmasını düzenlemede görev üstlenir [47].

Makrofajların yangı ve rejenerasyonda merkezi rolleri hakkında bilgi hızla gelişmekte olup son zamanlarda yapılan pek çok araştırma mevcuttur. Şekil 2.5, yangı sırasında makrofaj fenotiplerinin değişimi hakkındaki bilgilerin birçoğunu özetlemektedir. Doku hasarını takiben nötrofillerden salınan DAMP, PAMP ve sitokinler yerleşik makrofajları ve monositleri; kemokinlerin, matriks metalloproteinazların (MMP'ler), interlökin-1β (İL-1 β) ve tümör nekroz faktörü-α (TNF-α) gibi sitokinlerin ve yangısal yanıtta birçok aktivasyonu geliştiren veya yöneten diğer salınabilir faktörlerin yerel kaynağı olması için tetikler [48].



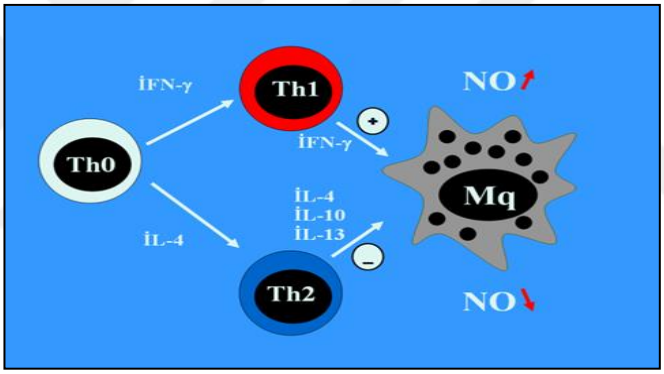
Şekil 2.5. Doku hasarı, rejenerasyon ve fibrozisde makrofaj aktivasyon fenotipleri [48]

Memelilerde yangı ve doku onarımı boyunca, yerleşik makrofajların ve göç eden monositlerin aktivasyon durumları; anjiyogenez, epitel devamlılığının yeniden düzenlenmesi, kök hücrelerin büyümesi ve farklılaşması ve yaygın fibroblast aktiviteleri uyarılması da dahil olmak üzere bir çok süreci teşvik etmek için değişir. Hasar ilişkili moleküler kalıp (DAMP); patojen ilişkili moleküler kalıp (PAMP), Düzenleyici T hücre (Treg hücresi), interferon düzenleyici faktör 5 (IRF5), nitrik oksit sentaz 2 (NOS2), Karaciğer X reseptörü (LXR), amfiregulin (AREG), arjinaz 1 (Arg1), interferon düzenleyici faktör 4 (IRF4), peroksizom çoğaltıcı-aktive reseptör g. (PPARg), fibroblast büyüme faktörü (FGF), galektin 3 (GAL-3), dönüştürücü büyüme faktörü (TGF), immün kompleks (IC), glikokortikoid reseptör (GR), aktive edici transkripsiyon faktörü 3 (ATF3), sitokin sinyalizasyonunu baskılayıcı (SOCS) [48].

Makrofajları ayırdetmek için yüzey işaretleri kullanılabilir ancak çoğunlukla farklı fenotiplerde aynı işaretler bulunabileceğinden özel gen ekspresyon profillerinin belirlenmesi daha kullanışlı gözükmektedir [42].

Makrofaj aktivasyonu

Makrofaj aktivasyonu, monositlerin yangı alanına yönlendirilip aktive edilmesi veya İL-4 vasıtasıyla doku yerleşik makrofajın çoğalmasıyla başlar. Bu süreci takiben doku hasarına ilişkin sinyaller, sinyal ağı kurularak diğer hücre ve organlara ulaştırılır. Th1 hücrelerden İFN-γ salınması için makrofajlar tarafından salgılanan İL-12 'ye ihtiyaç duyulur, İFN-γ ise makrofajın antimikrobiyal saldırı gücünü artırmaktadır. Makrofaj aktivasyonu sonrası ise anti-enflamatuvar geribildirim ihtiyacı oluşur ve İL-10 salgılanır. Son evrede makrofaj ya kronik yangı ya da homeostazis yönünde bir karar verir. Makrofajların Yardımcı T (Th) hücrelerin fenotipine göre salgılanan sitokin profilleri tarafından etkilenmeleri Şekil 2.6'da verilmiştir. Th hücre plastisitesi makrofajlar üzerinde rol oynayan en etkili olgu olarak görülmektedir. Ancak kemik iliği niş alanından nasıl etkilendikleri bu alanda çalışma yapan araştırmacılar için önemlidir [42].



Şekil 2.6. Th1 veya Th2 yönüne plastisite ve makrofajlara etkisi (Prof.Dr. Vedat Bulut'un izniyle kullanılmıştır)

Makrofajların yüzey işaretleri Çizelge 2.5'de verilmiştir.

Çizelge 2.5. Makrofaj çalışmalarında sık kullanılan yüzey işaretleri [49]

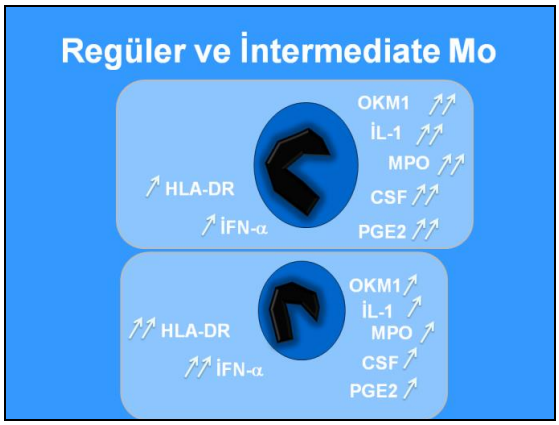
İsim	Gen	Açıklama
CD11b	Itgam	Nötrofillerinde dahil olduğu tüm miyeloid seri hücrelerinde bulunur.
F4/80	Emr1	Farede tüm doku makrofajlarında bulunur. IHC için kullanışlıdır.Emr1 ekspresyonu farklı uyaranlarla değiştirilebilir. Örneğin İFN-γ ile ekspresyonu azaltılır. İnsanda özellikle eozinofillerde ekspresyonu olup genellikle F4/80 kullanımı sınırlıdır.
CD68	CD68	Tüm makrofajlarda var, özellikle insanda parafin bloktan yapılan IHC çalışmalarında kullanışlıdır.

Çizelge 2.5. (devam) Makrofaj çalışmalarında sık kullanılan yüzey işaretleri [49]

CSF1R	Csf1r	Tüm monosit, makrofaj ve osteoklastlarda bulunur.
MAC2 (galektin3)	Lgals3	IHC için kullanışlı
CD11c	Itgax	Monosit ve makrofajlarda bulunmakla birlikte dendritik hücre ekspresyonu daha fazladır.
LY6G	Ly6g	Granülositlerde fazlaca bulunur.
LY6C	Ly6c1	Monositik miyeloid seride fazla, LY6G ile birlikte monosit-makrofaj-granülosit miktarının belirlenmesinde kullanılır.
İL-4Rα	Il4ra	En sık makrofajlarda bulunur ancak İL-4 ve İL-13'e yanıt veren tüm hücrelerde bulunabilir.
CD163	Cd163	Doku makrofajlarının çoğunda bulunur, özellikle insanda parafin bloktan yapılan IHC çalışmalarında kullanışlıdır.

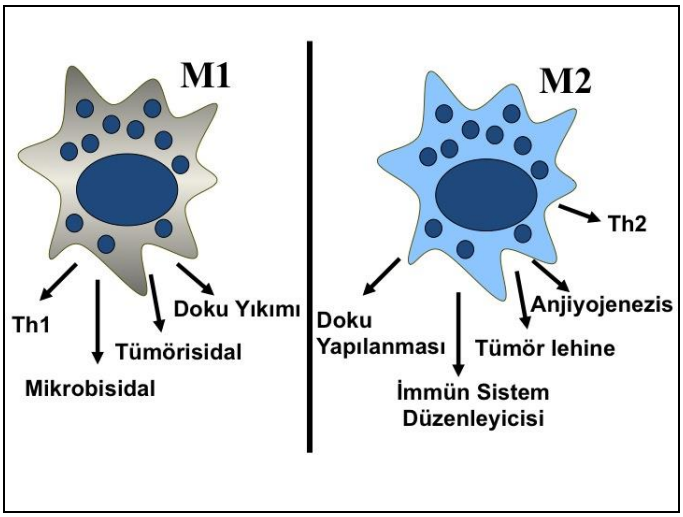
Makrofaj plastisitesi

Metchnikoff'un 1883'de ileri sürdüğü fagosit teorisinden bugüne kadar, makrofajlarla ilgili bilinen pek çok gerçek değişmiştir. Makrofajların patojenleri ve yabancı partikülleri ve hatta doku yıkımından arta kalan doku parçalarını fagosite ederek ortamdan uzaklaştırmaya çalışmaları sadece bir işlevidir. Buna ek olarak, parçaladığı patojenlere ait antijenleri, yüzey Ana Doku Uygunluk Kompleksi (ADUK, *Major Histocompatibility Complex*; MHC) aracılığıyla T hücrelerine sunmakta, salgıladıkları sitokin veya kemokinlerle immün sistemi düzenlemede rol almaktadırlar. Cohn 1965'de makrofajların monositlerden kaynak aldıklarını gösterdi. Nihayet 1983'de, Akiyama ve diğerleri monositlerin iki farklı plastisite yaşadıklarını peroksidaz etkinliklerindeki farklılıklarla gösterdiler (Şekil 2.7) [50]. Sonradan regüler ve intermediate monositler olarak adlandırdıkları, makrofaj ataları olan hücrelerin bir grubu mikrobisidal fagositik olmaya yönelirken, diğer grup daha ziyade antijen sunan hücre (ASH, *Antigen Presenting Cell*; APC) olmayı tercih etmektedir [42].

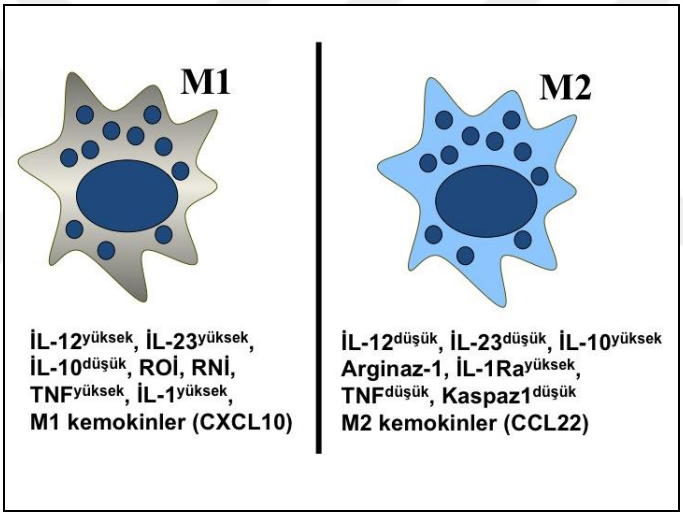


Şekil 2.7. Regüler ve intermediate monositler (Prof.Dr. Vedat Bulut'un izniyle kullanılmıştır)

Daha sonra yapılan pek çok çalışmada, makrofajların plastisitelerine ait çok sayıda veri yayımlanmıştır. Makrofajlar bulundukları ortam koşullarına (sitokin yoğunluğu, hasar tipi vb) bağlı olarak fenotiplerini değiştirerek verecekleri yanıtı belirler (Plastisite). Bu plastisitenin ilk dönemlerde monositlerden itibaren şekillendirildiği gösterilmiştir. Makrofajların mikrobisidal etkisinde önemli moleküllerden bazıları reaktif azot ara maddeleri (RNI) olarak bilinir ve nitrik oksit (NO) bu ürünlerdendir. Nitrik oksit (NO) memelilerin biyolojik etken salgısal molekülleri içinde bilinen en düşük moleküler ağırlıklı moleküldür. L-argininden NO üretimini katalize eden enzimler nitrik oksit sentazlar (NOS) (EC 1.14.13.39) olarak bilinmektedir. Makrofajlarda bulunan iNOS (inducible NOS) enzimi sitokinlerle uyarılabilir ve NO üretimi diğer iki enzim üretiminden 1000 kat daha yükseğe ulaşır. Bu enzimin LPS ile uyarılabildiği Stuehr ve Marletta tarafından 1985'te gösterilmiştir. M1 tipi makrofajlarda bu molekülün sentezi yapılmaktadır. Buna karşın, M2 tip makrofajlar daha çok immün sistem düzenleyicisi rolünü oynamakta ve antijen işleme ve sunma işlevine yönelmektedir [42]. (Şekil 2.8; Şekil 2.9)

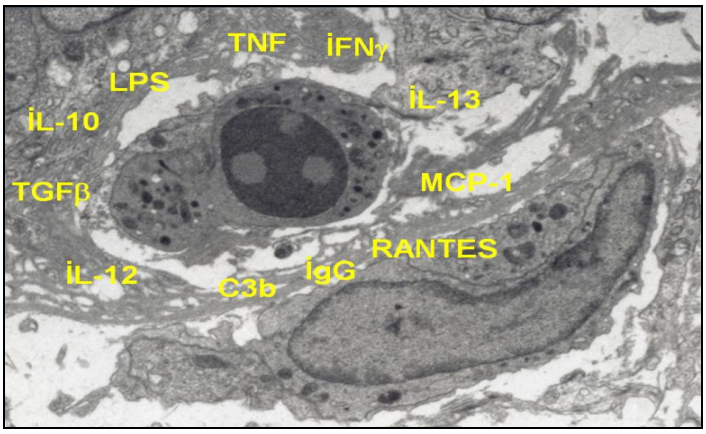


Şekil 2.8. Makrofaj plastisitesi [51]



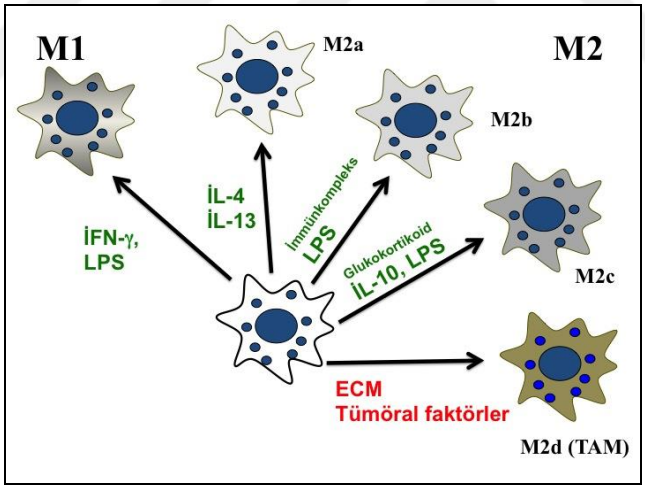
Şekil 2.9. M1 ve M2'de salgı farklılıkları [51]

Çevresel faktörler tarafından bu plastisite etkilenmektedir (Şekil 2.10.). Bakteriyel endotoksin olarak bilinen lipopolisakkaritler (LPS) bu etkenlerden biridir. Daha önce 20 saatlik 100 ng/ml LPS uygulamasıyla monositlerde LPS toleransı oluşturduklarını ve M2 yönünde plastisite gözlemlediklerini rapor etmişlerdir [52,53]. Ancak bu çalışma daha uzun süreli kültürlerde ve daha düşük dozlarla yapılmamıştır. Deneyimler göstermiştir ki, 100 ng/ml LPS uyarımı makrofajların NO üretimini tek başına yükseltebilmekte ve toleranstan ziyade aktivasyon oluşturabilmektedir [54,55]. Sonuçta, negatif geri besleme etkisiyle NO üretimi makrofajları inhibe etmektedir [56]. Nitrik oksit üretiminin immün sistemin diğer unsurları, örneğin T lenfositleri de regüle ettikleri bilinmektedir [57]. Bu nedenle, toleransın daha düşük doz LPS ve değişik zaman aralıklarında denenerek hücre uyarımı ve makrofaj plastisitesine etkilerinin gözlemlenmesi önem taşımaktadır.



Şekil 2.10. Makrofajları etkileyen çevresel faktörler [42]

Farklılaşan makrofajların kemokin üretimleri, yüzey kemokin reseptörleri, NO üretimleri, salgıladıkları veya saldıkları sitokinlerin miktar ve çeşitlilikleri farklılıklar göstermektedir [51]. Uyarımlara göre makrofaj fenotip değişimleri Şekil 2.11'de gösterilmiştir.



Şekil 2.11. Uyarımlara göre makrofaj plastisitesi [51]

Heterojenite etkisindeki plastisite

Heterojen doku yerleşik makrofajlar, doku yapısı ve işlevindeki değişiklikleri saptayacak çok çeşitli moleküller ile donatılmışlardır; hasar ilişkili moleküler kalıplar (DAMP), ekzojen patojen ilişkili moleküler kalıplar (PAMP: Toll-benzeri reseptörler, TLRs; NOD-benzeri reseptörler, NLRs; RIG-I-benzeri reseptörler, RLRs; Lektinler) ve çevresel etkilere yanıt için sitokin reseptörleri. Mikrobiyal algılama/öldürme, fagositoz ve antijen işleme/sunum gibi makrofaj yetenekleri, yangısal reaksiyonları başlatmalarına ve adaptif

immünitenin efektör kolları gibi hareket etmelerine ve yönlendirmelerine imkan sağlar. Bununla birlikte, yangının immün aracılı veya özgül olmayan yangı olmasına bakılmaksızın, makrofajlar yangısal süreci de düzenlerler. Sonuç olarak, makrofajların pro-enflamatuvar etkinliği, dokuya zararlı etkilerden kaçınmak için lokal ve geçici olarak hassas bir biçimde ayarlanmalıdır, aksi durumlarda oluşabilecek sonuçlar kanser gelişiminin yolunu açabilir [41].

Son on yılda, makrofajların yangısal reaksiyonları sona erdirme kabiliyetini gösteren sayısız örnekler öne sürülmüş ve böylece Th1 tipi sitokinler (İFNγ), PAMP'ler ve DAMP'ler tarafından ortaya çıkan "klasik aktivasyon" yerine "makrofaj alternatif aktivasyonu" kavramı vurgulanmıştır. Bu kavramların daha ayrıntılı olarak incelenmesi ile makrofajların çok sayıda ve bazen zıt işlevsel aktivasyon durumları sergilediği sonucuna varılmıştır. Karaciğerde yaralanma ve onarım sırasında makrofajların farklı ve karşıt faaliyetler sergilemesi ile bu durum örneklendirilebilir. Dolayısıyla, makrofaj aktivasyon/deaktivasyon uyarıcılarının çeşitliliği ve homeostatik koşullar altında doku yerleşik makrofajların heterojenliği birleştiğinde, bir çok aktivasyon durumunun varlığı ortaya çıkar [41].

Plastisite ve işlevsel sonuçlar açısından, makrofaj aktivasyonu, dendritik hücrelerin olgunlaşması sürecine neredeyse eşdeğerdir. Çeşitli patojenik uyaranlara yanıt olarak monosit türevi dendritik hücrelerin ekspresyonundaki değişiklikler üzerine yapılan araştırmalarda, büyük ölçüde plastisite saptandı ve işlemin uyaran özgül olduğu bulundu. Ortak bir «çekirdek tepki» gen seti, tüm olgunlaşmayı tetikleyen uyaranlara tepki olarak düzenlenir, her bir patojenik uyaran da benzersiz bir gen setini etkiler. Benzer şekilde, makrofaj aktivasyonunun uyarana spesifik olduğu ve benzer şekilde büyük bir plastisite seviyesi sergilediği gösterilmiştir. Bu şekilde, insan makrofajlarının çeşitli bakterilere (E. *coli, S. typhi, S. typhimurium, S. aureus, L. monocytogenes* ve *M. tuberculosis* dahil) maruz kalması, paylaşılan bir "bakteriye yanıt" gen ekspresyon paterninin varlığına işaret etmiştir. ("core": 132 upregüle gen, 59 bastırılmış gen), bunların çoğu TLR'ye bağlı bir şekilde düzenlenir. Üstelik monosit türevi dendritik hücrelerde olduğu gibi, patojene spesifik cevaplar da tanımlanmıştır. Makrofaj aktivasyon sürecinin patojen özgüllüğü, dört hücre içi patojene (*Leishmania major, L. donovani, Toxoplasma gondi, Mycobacterium tuberculosis*) ve hücre dışı helmint *Brugia malayi*'ye yanıt olarak insan monosit kaynaklı makrofajların gen ekspresyon profillerinin karşılaştırılmasıyla gösterilmiştir. Dört hücre içi

patojene karşı aktivasyon tepkileri açıkça birbirinden farklıdır ve Leishmania'nın her iki türü de makrofajlarda farklı gen ekspresyon programlarını başlatmaktadır. Bu nedenle, makrofaj aktivasyonunun ardından gerçekleşen gen ekspresyonundaki değişiklikler uyarıya spesifiktir ve makrofaj aktivasyonu hem ortak («çekirdek») hem de patojene spesifik bileşenleri içerir. Sonuç olarak, gen ekspresyonu profillemesi yoluyla tanımlanan makrofaj aktivasyon durumlarının çoğunun, makrofaj farklılaşma plastisitesi ve aktivasyon yanıtının heterojenliği ile kombinasyonundan geldiğini söylemek mümkündür. Son olarak, makrofaj aktivasyonu ve dendritik hücre olgunlaşma süreçlerinin nitel olarak benzer heterojenitesine rağmen, ortak patojenlere transkripsiyonel yanıtlarının yan yana karşılaştırılmaları sırasında aralarındaki niceliksel farklar gösterilmiştir. Her iki monosit türevli hücre tipi, bazal koşullar altında (3642 ortak, 130 makrofaj spesifik ve 286 dendritik hücreye spesifik aktif gen) büyük ölçüde çakışan bir gen ekspresyon profili sergilerler. Bununla birlikte, makrofajlar ve dendritik hücreler sadece patojene maruz kalma ile düzenlenen genlerin % 40'ını paylaşır; transkripsiyonel değişiklikler dendritik hücrelerde daha büyük ve karmaşıktır [41].

Klasik ve alternatif makrofaj aktivasyonu

T hücre plastisitesinin Th1/Th2 ayrımına benzer olarak, patojenik uyaranlara, endojen tehlikeli sinyallerine ve/veya tip 1 sitokinlere (İFNγ, TNFα) yanıt olarak makrofajların aktivasyonu "klasik aktivasyon" olarak adlandırılır ve ortaya çıkan makrofajlar M1 makrofajları veya CAMØ olarak tanımlanır. Bu tür aktivasyon, yüksek seviyelerde İL-12 ve İL-23 ve çok düşük seviyelerde İL-10 ekspresyonu ile sonuçlanır, bu da CAMØ'nun Th-1 yönünde kutuplaşmış güçlü immün yanıtları teşvik ettiğini göstermektedir. Buna ek olarak CAMØ; ROS, reaktif azot türleri ve pro-enflamatuvar sitokinlerin üretilmesinden kaynaklanan güçlü sitotoksik, mikrobisidal ve anti-proliferatif etkinlikler sergilemektedir [41].

Pro-enflamatuvar aktivitelerin kronik kalıcılığı dokuya zarar vermektedir. Bu durumda, yangıyı dizginlemek ve doku homeostazını yeniden kazandırmak için makrofaj aktivasyonuna alternatif bir yolun varlığına ihtiyaç duyulmaktadır. Tarihsel olarak, pro-enflamatuvar yanıtları azaltan maddeler "deaktivatörler" olarak değerlendirildi ancak daha sonraki çalışmalar, bu "deaktive edici" ajanların sadece Th1 yanıtlarını inhibe ederek değil aynı zamanda antijen sunumu, doku onarımı ve endositik kapasite gibi makrofaj işlevlerini

arttırarak hareket ettiğini ortaya koydu. Bu nedenle, CAMØ üretimini ve aktivitesini inhibe eden farklı sitokinler ve faktörler, makrofaj aktivasyonunun alternatif bir yolağının uyarımcıları olarak gruplandırılmıştır. Genel olarak alternatif aktivasyon, büyük miktarda İL-10 ve TGFβ ancak aşırı derecede düşük seviyelerde İL-12 üreten makrofajların oluşmasına neden olur. İşlevsel açıdan bakıldığında, bu alternatif olarak aktive olan makrofajlar (AAMØ veya M2) anti-enflamatuvar, immün baskılayıcı işlevleri gösterir ve T hücre çoğalmasını inhibe ederler. AAMØ ve CAMØ'nin birbirinden farklı bu faaliyetleri çeşitli *in vitro* deneyler ile gösterilmiştir. Bu deneylerde AAMØ'nin CAMØ'dan farklı olarak, fibroblastik hücre hatlarının çoğalmasını ve kollajen depolanma aktivitesini arttırma ve mitojen ile uyarılmış lenfositlerin çoğalmasını kuvvetli bir şekilde engelleme kabiliyetine sahip olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda AAMØ, in vivo vaskülarizasyona katkıda bulunur ve AAMØ ile ilişkili sitokinler (İL-10, TGFβ) veya glukokortikoidlerin mevcudiyetinde olgunlaşmış monosit türevi dendritik hücreler gibi *in vitro* anjiyojenik aktivite gösterir [41].

M1 makrofajlar

Naif makrofaj İFNγ, bakteriyel ürünler (LPS vd.), sitokinler (TNFα, İL-1β vd.) veya Toll benzeri reseptör (TLR) agonistleriyle aktive edilirse (klasik aktivasyon) M1 makrofaj ortaya çıkar. Antijen sunum kapasitesi ve patojen öldürme gücü yüksektir ve fazla miktarda İL-6, İL-12, İL-23, TNFα sitokinleri ve NOİ/ROİ gibi toksik maddeleri üretir. Diğer taraftan tümör özgül antijenleri sunmaya yarayacak olan Temel Doku Uygunluk Kompleksleri (MHC-I) ve MHC-II molekülleri yüksek düzeyde üreterek tümör öldürücü immün sistem yanıtını başlatırlar [42].

M1 makrofajlar nükleer faktör-κB (NFκB) ve İnterferon düzenleyici faktör-3 (IRF3) vasıtasıyla kemokin (C-C desen) ligand 5 (CCL5), kemokin (C-X-C desen) ligand 9 (CXCL9), CXCL10, CXCL11 ve CXCL16 eksprese ederler. NK ile Th-1 hücreleri etkileyen kemokinler salgılarlar. Bu makrofajlar tümöral hücrelerin öldürülmesinde, parçalanan hücrelerin debrislerini fagosite ederek tümoral antijenleri sunmada görev alarak antitümoral işlevlerde ilk basamak görevleri Dentritik hücrelerle (DC) birlikte yerine getirirler [42].

M2 makrofajlar

Naif makrofaj eğer İL-4 ve İL-13 ile aktive edilirse alternatif makrofaj aktivasyonundan söz edilir ve M2 makrofajlar gelişir. M2 makrofajlar yüksek miktarda İL-10 üretir, yangının sonlanması, tolerans ve doku onarımında görev yapar. Bu hücreler tümörlerin gelişiminden, anjiyojenezden, yayılmasından ve tümör mikro çevresinde immün sistemin baskılanmasından sorumlu tutulmaktadır [42].

M2 makrofajların ise farklı aktivasyon durumlarında işlevlerinin değiştiği saptanmış ve 4 alt grupta ele alınmışlardır:

M2a: İL-4 ve İL-13 ile aktive edilmiş makrofajlar
M2b: İmmün kompleksler ve TLR agonistleriyle aktive edilmiş makrofajlar
M2c: Glukokortikoid hormonlar ve İL-10 tarafından aktive edilmiş makrofajlar
M2d: Tümör mikro çevresinde tümör tarafından aktive edilmiş makrofajlar (TAM) [58]

M2a makrofajlar İL-4 ile uyarıldığında CCL17, CCL18, CCL22 ve CCL24 salgılarlar. M2b makrofajlar CCL1 ve M2c makrofajlar ise CCL16, CCL18 ve CXCL13 üretirler. M2 kemokinleri genellikle bazofil, eozinofil, Th2 ve Treg hücrelerini etkilemektedirler. Bunların arasında M2a ve M2c tarfından salınan CCL18'in farklı bir önemi vardır. CCL18 aslında MIP1α analogudur. M1α ise M1 uyarıcılarıyla üretimi artırılır ve İL-4 ve steroidler tarafından üretimi baskılanır. Oysaki CCL-18'in üretimi İL-4 ve İL-10 tarafından uyarılır ve İFNγ tarafından baskılanır. M2 hücrelerin genel olarak pro-enflamatuvar sitokin üretimi daha düşük olarak bilinmesine rağmen M2b tipi makrofaj (immün kompleks ve LPS tarafından aktive edilir) hem fazla miktarda İL-10 üretirken aynı zamanda ilginç olarak pro-enflamatuvar sitokin olan İL-12'yi fazlaca üretmektedir. Bunun LPS toksisitesine karşı organizmayı koruyucu bir davranış olduğu düşünülmektedir. M2b makrofaj Th2 farklılaşması sağlar ve humoral immüniteyi uyarır [41,42].

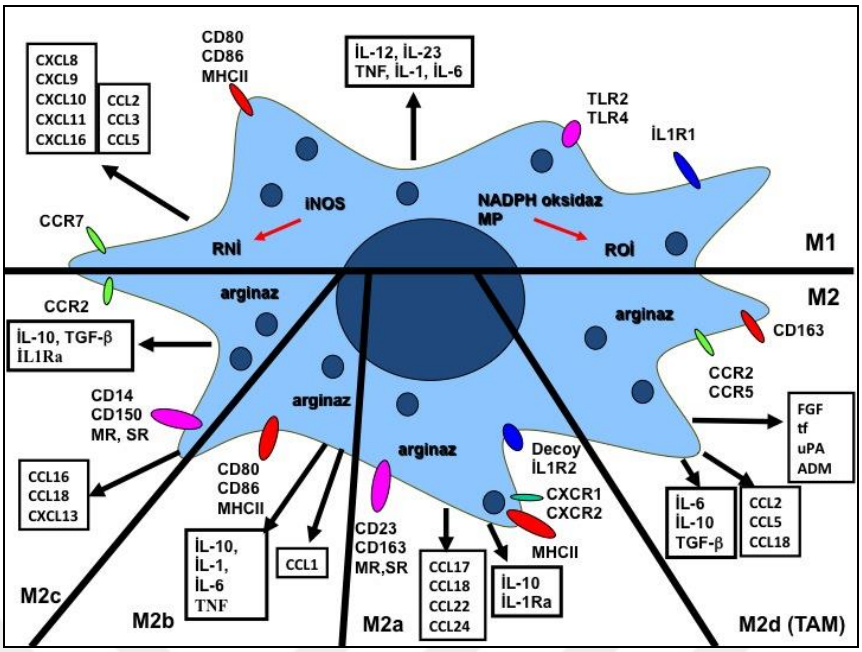
Th2 sitokinler yukarıda sözü edildiği gibi Arjinaz 1 ekspresyonunu artırırken iNOS ekspresyonunu engellemektedirler. Bu işlevi Th2 spesifik c-Maf transkripsiyon faktörü sayesinde gerçekleştirirler. M2a gen ekspresyon profili değerlendirildiğinde İL-13 ile uyarılmış insan monositlerinde erken dönemde (8 saat) yangısal, doğal immün sistem, İL-1 sistemin kontrolü ve lipid metabolizması genlerinin eksprese olduğu saptanmıştır. (85 gen

upregüle edilirken, 57 gen downregüle edilir). M2 makrofajlar, glukokortikosteroidler antioksidan, anti yangısal ve immün baskılayıcı işlevleri uyaran genleri artırırken (Adenozin A3 reseptör, CD163, İL-10), oksidatif sürece katılan genler ve İFNγ'nın uyardığı genler (CXCL9-11, CCL5) baskılanır [41,42].

M2 yönünde plastisite sağlayan diğer bir etken adenozindir ve TLR'ler aracılığıyla makrofajları yapılandırır. Örneğin Adenozin; TLR-2, TLR-4, TLR-7 ve TLR-9 ile işbirliği yaparak makrofajlarda –hipoksik ortamdaki değişime benzer olarak- damarsal endotelyal büyüme faktörü (VEGF) üretimini artırır. Adenozin ve LPS tarafından VEGF artışının mekanizması ise, LPS tarafından hipoksi uyarımlı faktör1-α'nın (HİF1-α) transkripsiyonunun uyarılması ve adenozin tarafından onun posttranskripsiyonel upregülasyonudur. Bu sinerjik çalışma sonucunda pro-enflamatuvar karakterdeki makrofaj pro-anjiojenik nitelikteki makrofaja dönüşmüş olur. Adenozin A2A reseptörünün yara iyileşmesini hızlandırdığı da çalışmalarla gösterilmiştir. Sonuçta adenozin M2 makrofaj aktivasyonu yönünde çalışır, anti-enflamatuvar sitokinler üretilmesini sağlar, anjiogenez ve tümör yayılmasında işlev görür [42,59].

Tümör gelişiminde ilk dönemde M1 yönünde değişim gösteren makrofajlar yüksek düzeyde İL-12 salgılayarak ortamdaki NK hücreleri ve T lenfositlerinin tümöre özgül yanıtını tetiklerler. Tümörün ileri evrelerinde ise tümör mikro çevresini etkileyen ve tümör kaçış mekanizmalarından kaynaklanan bir dizi uyarı sonrasında bu makrofajlar M2d (TAM) formuna dönüşerek yüksek derişimde İL-10 salgılamaya başlarlar. İL-10 diğer pro-enflamatuvar ve tümör öldürücü etkileri yöneten sitokinlerin üretimini inhibe ederek, bu mikro çevrede immün sistemin baskılanmasına yol açar [41]. TAM'ların yangısal sitokinlerinden İL-6 ise tümör mitotik indeksini artırdığı ve apoptozisi baskılayarak tümör gelişimine katkı sağladığı gösterilmiştir [42,60]. Dokularda TAM yoğunluğu artışı klinik seyiri kötüleştirdiği rapor edilmiştir [39,42,61,62].

Makrofaj plastisite değişikliklerine göre yukarıda sözü edilen makrofaj fenotiplerinin yüzey belirteçleri, salgıladıkları sitokinler ve kemokinler Şekil 2.12'de topluca verilmektedir [51].



Şekil 2.12. Makrofaj alt tiplerinin yüzey reseptör üretimleri ve salgıları [51]

Klasik (M1) ve alternatif aktive makrofajların (M2) aktivasyon belirteçleri

AAMØ'yı CAMØ'den ayırmak için faydalı fenotipik belirteçlerin belirlenmesine yönelik bir dizi çalışma yapılmıştır [41]. Bu iki alt tip farklılıları Çizelge 2.4 ve Şekil 2.4'de listelenmiştir.

iNOS ve arjinaz 1

İndüklenebilir nitrik Oksit Sentaz (iNOS, CAMØ'da) ve Arjinaz1'in (Arg-1, AAMØ'deki) ayırtedici şekilde ekspresyonu dolayısıyla arginin metabolizmasındaki farklılıklar daha önce makrofaj alt tiplerini ayırt etmekte kullanılmaktaydı. CAMØ, iNOS vasıtasıyla arginin metabolize ederek mikrobisidal nitrik oksit üretir. Buna karşılık, AAMØ'in Arjinaz-1 ekspresyonu, hücre çoğalması ve kollajen üretimi için sırasıyla gerekli olan poliaminler ve prolin üretmelerine imkan verir. iNOS ve Arjinaz-1, farklı sitokinler tarafından uyarıldıkları için zıt ekspresyon gözlenir. iNOS, İFNγ tarafından uyarılırken, AAMØ'deki Arjinaz-1 ekspresyonu İL-4/İL-13'e bağımlıdır. CAMØ ve AAMØ'yi ayırt etmek için iNOS/Arjinaz-1'in değerlendirilmesi konusunda ciddi şüpheler veren bulgularla karşı karşıya kalınmıştır [41]. Hem iNOS hem de Arg-1 genleri "1.7. Mezenkimal Kök/Stromal Hücre (MKH/MSH) ve İnsan Kaynaklı Makrofaj Plastisitesi Arasındaki Etkileşimlerde Araştırılacak Genler" bölümünde daha detaylı anlatılmıştır.

Sitokin ve kemokinler

M1 makrofajlar NFκB ve IRF3 vasıtasıyla CCL5, CXCL9, CXCL10, CXCL11 ve CXCL16 eksprese ederler. NK ile Th1 hücreleri etkileyen kemokinler salgılarlar. Buna karşılık M2a makrofajlar İL-4 ile uyarılan CCL17, CCL18, CCL22 ve CCL24 salgılar. M2b makrofajlar CCL1 ve M2c makrofajlar ise CCL16, CCL18 ve CXCL13 üretirler. M2 kemokinleri genellikle bazofil, eozinofil, Th2 ve Treg hücrelerini etkilemektedirler. Bunların arasında M2a ve M2c tarfından salınan CCL18'in farklı bir önemi vardır. CCL18 aslında MIP1α analoğudur. M1α ise M1 uyarıcılarıyla üretimi artırılır ve İL-4 ve steroidler tarafından üretimi baskılanır. Oysaki CCL-18'in üretimi İL-4 ve İL-10 tarafından uyarılır ve İFNγ tarafından üretimi baskılanır [41,42].

Kutuplaşmış makrofajlar İL-1 sitokin ailesine karşı farklı davranış paterni sergilerler. Örneğin; İL-4, İL-13 ve glukokortikoid hormonlar İL-1RII decoy reseptörünün ekspresyonunu arttırırken, İFNγ ve LPS inhibe eder, tersine İL-1RI ve İL-1RI aksesuar protein üretimini artırır. Böylece İL-1 ailesinin pro-enflamatuvar veya anti-enflamatuvar davranışı makrofajlar tarafından düzenlenmiş olmaktadır. M2 hücrelerin genel olarak pro-enflamatuvar sitokin üretimi daha düşük olarak bilinmesine rağmen M2b tipi makrofaj (immün kompleks ve LPS tarafından aktive edilir) hem fazla miktarda İL-10 üretirken aynı zamanda pro-enflamatuvar sitokin olan İL-12'yi fazlaca üretmektedir. Bunun LPS toksisitesine karşı organizmayı koruyucu bir davranış olduğu düşünülmektedir. M2b makrofaj Th2 farklılaşması sağlar ve humoral immüniteyi uyarır [42].

IP10 (CXCL10) (Interferon-induced protein of 10 kDa) ilk saptanan kemokinlerdendir. Aktive efektör CD4 ve CD8 T lenfositleri ve diğer efektör lenfositleri (NK ve NKT hücreleri) göçünü yönetir. CXCL10'un yüksek afiniteli reseptörü CXCR3 dür ve CXCL9/MiGr (monokine-induced by γ-interferon) ile CXCL11/I-TAC (interferon-inducible T cell-α chemoattractant) ile aynı reseptörü kullanır. CXCL10 ekspresyonu bazı insan hastalıklarında güçlü şekilde artmaktadır, bunlar arasında viral-bakteriyel-parazitik infeksiyonlar, deri hastalıkları, aterosklerozis gibi hastalıklar sayılabilir. CXCL10'un endotelyal hücrelerdeki anti-proliferatif etkileri, anjiostatik ve antitümör etkileri tanımlanmıştır. İn vivo olarak CXCL10'un yara iyileşmesi ve tümörde neovaskülarizasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir [42,63].

Monosit veya makrofajların LPS ile aktivasyonunda NFκB bağımlı yangısal kemokinlerin transkripsiyonu olur, bu kemokinler CXCL1, 2, 3, 5, 8, 9, 10 ve CCL2, 3, 4, 5, 11, 17, 22'dir. LPS+İFNγ uyarısıyla CXCL10, CXCL9 ve CCL5 ekspresyonu olur. LPS uyarısıyla transkripsiyon faktörü olan İFN regülatör faktör 3 (IRF-3)'ün aktivasyonu ile CXCL10, CXCL9 VE CCL5, İFNβ ve ardından STAT1 aktivasyonu olur. M2 uyarıcı sinyaller M1 kemokinlerin ekspresyonunu inhibe eder. TLR ve İFNγ bağımlı CXCL10, CXCL9 ve CCL5 uyarımı İL-4 ve İL-10 tarafından inhibe edilir. LPS ile aktive edilmiş makrofajlarda İL-10 inhibitör etkileri hem STAT3 bağımlı mekanizmayla hem de NFκB inhibisyonu yoluyla olur. İL-10 direkt olarak CXCL9 VE CXCL10 gen ekspresyonunun inhibisyonu, STAT1 fosforilasyonunun inhibisyonu yoluyla olur. Ayrıca LPS uyarımlı makrofajlarda glukokortikoidler, STAT1 inhibisyonu yoluyla CXCL10 üretimini baskılar [42,64]. Kemokinlerin antibakteriyel etkileri gösterilmiştir, bakterilerin de bu kemokini antagonize edecek maddeler sentezleyerek defans oluşturdukları ispatlanmıştır. CXCL9, CXCL10 ve CXCL11 bu kemokinlerdendir [42,65].

CCL22 (Macrophage-derived chemokine (MDC) CC motifi içeren kemokindir. MDC geni 16q13 kromozomunda yerleşmiştir. Makrofajlarda ve dendritik hücrelerde (DC) ve aktive edilmiş B lenfositlerde üretilir. MDC, DC, aktive edilmiş NK hücresi ve aktive T lenfositler için kemotaktiktir. Kemokin reseptörü olan CCR4'e bağlanır ve aktive eder. Reseptörü TARC (CCL 17) ile ortaktır. CCR4 özellikle CD4 ve CD8 lenfositlerde Th2/Tc2 fenotipinde eksprese edilir. Dolaşımdaki monositlerde MDC yapısal olarak eksprese edilmez ancak İL-4 ve İL13 gibi Th2 sitokinleri tarafından uyarıldığında monositlerde eksprese edilebilir. Th1 sitokinlerinin prototipi olan İFNγ tarafından ekspresyonu azaltılır. MDC, Th2 lenfositlerinin selektif migrasyonunda rol oynar. CCL22 kemokini M2a tipindeki makrofalar tarafından üretilir ve CCR4+ hücrelerin yangı alanına gelmesini sağlar. M2a hücreleri tarafından üretilen CCL22 düzeyleri öğütülme (scavenging), işleme (processing) ve hücrenin uyarım seviyesine göre ayarlanmaktadır [42,64].

Kemokin reseptörleri

CCR7 (CD197) kemokin reseptör ailesinin bir üyesidir, ligandı CCL19/ELC'dır. B, T ve aktive olmuş DC tarafından eksprese edilir. Sekonder lenfoid organlar için yüksek afiniteli bir reseptördür. CCR7-/- farede lenf düğümünde naif T hücre ve DC'nin olmadığı

saptanırken, kanda-dalak kırmızı pulpa ve kemik iliğinde aşırı miktarda T hücre artışı olduğu görülmüştür. Ayrıca CCR7 eksik farelerde yapılan adoptif transfer deneylerinde bu farelerde dalakta periarteriolar alanda B hücrenin geçirdiği sürenin, normal fareye göre daha az olduğu görülmüş ve bu durum CCR7 'nin T hücre-B hücre temasında önemli olduğu şeklinde açıklanmıştır [66]. CCR7'nin bu özelliklerinden hücre göçü ve aktivasyonuyla ilgili işlevleri nedeniyle klinik çalışmalarda tümörlerde lenf düğümü metastazında rol alabileceği bilinmektedir [67]. Ayrıca CCR7 insan CD34 (-) mezenkimal kök hücrelerde de bulundukları gösterilmiştir. Makrofaj plastisitesi açısından bakıldığında CCR7, M1 yönünde farklılaşmış makrofajlar için yüzey reseptörüdür [68].

CCR2 (Kemokin reseptör 2, CD192) kemokin reseptörünün iki izoformu bilinmektedir. Monosit ve aktive NK hücreleri CCR2B izoformunu eksprese ederken, CCR2A 'yı çok az bulundururlar. CCR2 pro-enflamatuvar ve anti-enflamatuvar işlev görebilir, Treg hücrede ekspresyonu anti-enflamatuvar işlev yaparken, antijen sunan hücreler ve T hücredeki ekspresyonları pro-enflamatuvar işlevlere katılırlar. Mikroçevredeki etkiler reseptör yoğunluğunu değiştirerek sitokin etkilerini kontrol eder [42].

CXCR1 (CD181) interlökin 8-alfa bir kemokin reseptörüdür. Birçok hücrede bu reseptör vardır, çoğunlukla miyeloid seride olmak üzere, olgunlaşmış PMN ve monositlerde, CD8 T lenfositlerde, mast hücresi, endotel ve epitelyum hücresinde bulunur. CXCR1 reseptörü CXCL6 (granulocyte chemotactic protein-2) ve CXCL8 (İL-8) kemokinlerine yüksek afiniteyle bağlanırken diğer CXC kemokinlerini de bağlayabilir. Nötrofiller için kemotaktik olmakla birlikte bu hücrelerin kemotaksis, degranülasyon, oksidatif yanma gibi antimikrobiyal işlevlerini de etkiler. Reseptör aktivasyonuyla hücre içinde serbest kalsiyum miktarı değişikleri ve enzim salımı olur. Makrofaj plastisitesi açısından bakıldığında CXCR1 M2 tipi makrofajlarda eksprese edilir [69,70].

Makrofaj aktivasyonunda genler

Monositler ve makrofajlar, patojenlere karşı ilk savunma hattını sağlarlar. Ayrıca antijenleri işleyip sunarak edinilmiş (adaptif) immün yanıtı başlatırlar ve devamındaki efektör işlevlerin akışında rol alırlar. Birçok farklı hücreden ve dokudan elde edilen geniş orandaki gen ekspresyonu veri setlerinin analizi, onları düzenleyen transkripsiyon faktörleri ile birlikte düzenlenen gen takımlarını da ortaya koyar. Makrofajlarda gen

kümeleri; soylara özgü genler, interferona cevap veren genler, erken yangısal genler ve endositoz ve lizozom işlevi için gerekli genler olmak üzere tanımlanabilir. Makrofajlar dokulara girer; sonrasında gelişme, organogenez, doku hasarı, malignite, steril veya patojen yangısal uyaranlara ilişkin çok çeşitli zorluklarla başa çıkmak için işlevlerini belirler. Bu uyaranlar, uyarımın nedenini ortadan kaldırmak ve homeostazı tekrar sağlamak için daha donanımlı olan "aktive edilmiş makrofajlar" üretilmesi yönünde gen ekspresyonunu değiştirirler [71].

Farklı aktive makrofajlar üzerindeki gen ekspresyon profili esas olarak fare hücreleri üzerinde ele alınmıştır. Böylece sıçangillerin CAMØ ve AAMØ'ye özgü gen setleri tanımlanmış ve işlevsel faaliyetleriyle ilişkilendirilmiştir. Örneğin AAMØ'ye özgü bir gen olarak tanımlanan ve ekspresyonu Th-2 özgü cMaf transkripsiyon faktörüne bağlı olan aktivin A, Arg-1'in ekspresyonunu artırıp; iNOS eskpresyonunu azaltan bir Th-2 sitokini olarak gösterilmektedir [41].

Makrofajlar, birçok farklı uyarana karşı yanıtta gen ekspresyonlarını değiştirirler. Bu plastisite sayesinde patojen tehditine karşı uygun bir tepki sağlanır. "Aktivasyon" terimi ilk olarak tümör önleyici ve mikrop öldürücü işleve sahip makrofajlar için tanımlanmıştır. Bu tanımdaki aktivasyon, T hücresi ürünleri tarafından başlatılan bir başlatıcı olay ve lipopolisakkarit (LPS) tarafından üretilen bir tetikleyici olay olmak üzere iki aşamada gerçekleşir. Makrofajların aktivasyon durumları o zamandan beri "M1 ve M2" veya "klasik ve alternatif olarak aktive edilmiş" şeklinde sınıflandırılmış. M1 ve M2 aktivasyonu; Th1 ve Th2 lenfositleri ile, sırasıyla İFN-γ ve aracı olarak İL-4 ile ilişkilidir. Klasik veya M1 aktivasyonu bakteriyel patojenlere karşı savunmada rol oynar. Klasik olarak aktive edilmiş makrofajlar MHC sınıf II eksprese eder ve T lenfositlere antijen sunarlar. M2 veya alternatif olarak aktive edilmiş makrofajlar; parazit enfeksiyonu ve tümörler karşısında savunmada üretilir. M2 makrofajlar, İL-4 sinyalizasyonunun hedeflerini ekprese ederler. Arg1, Retnla, Chi3l3 gibi çeşitli M2 belirteçleri tanımlanmıştır [71].

Terminoloji gittikçe karmaşık bir hal almaya başlamıştır. GM-CSF içerisinde büyüyen makrofajlar M1-benzeri (DC olarak adlandırılmadıklarında) olarak ifade edilirken, CSF1 içerisinde büyüyen M2-benzeri olarak ifade edilir. Farklı aktivasyon durumları belirli transkripsiyon faktörlerini gerektirir. Örneğin IRF transkripsiyon faktörü ailesi; STAT1 ve

IRF5 M1 yönünde plastisiteyi tetiklerken STAT6 ve IRF4 M2 yönünde plastisite için etkileşimde bulunur. Makrofajların, lipopolisakkarit (LPS) gibi toll-benzeri reseptör agonistlerine verdiği tepki de M1 yanıtı olarak isimlendirilir. Bu tepki yüzlerce genin ardışık uyarımını ve karmaşık bir geri bildirim kontrol ağını içerir. Gram negatif (-) bakterilerin hücre duvarının bir bileşeni olan LPS en çok çalışılan TLR ligandı olmuştur ve tanınması için TLR-4 gerektirir. Makrofajların LPS ile uyarımı kompleks sinyalizasyon akışlarını başlatır. MyD88 gibi adaptör proteinlerin TLR-4 reseptörüne bağlanması sinyalizasyon akışının başlangıcıdır ve akışın devamında transkripsiyon faktör komplekslerinin nükleer translokasyonu gerçekleşir. Birçok diğer yolak seriler halinde yada paralel olarak gerçekleştikten sonra LPS'ye tam bir yanıt oluşabilir. Özellikle MAPK basamaklarının başlıca alt sınıflarını nihai transkripsiyonel sonuca katkıda bulunur [72].

Yaralanma ve viral enfeksiyonun da dahil olduğu enfeksiyon durumlarında oluşan yerel ve sistemik yanıtlar, aktive makrofajlardan öncelikle salgılanan pro-enflamatuvar sitokin İL-1'in iki izoformu (α ve β) ile düzenlenir. Sistemik İL-1 ateşlenmeyi teşvik ederken, yerel İL-1 üretimi, efektör hücrelerin enfeksiyon yerlerine erişimini arttırmak için vasküler endotelde değişiklikler yapar ve lokal doku tahribatına katkıda bulunur. Ek olarak İL-1, T Hücre platisitesini düzenler ve patojenlere/adjuvanlara yanıt olarak antikorların üretiminde çok önemli bir rol oynar. Enfeksiyon esnasında siklooksijenaz (COX-2) aracılığıyla üretilen prostaglandinler aktif makrofaj tarafından salgılanan çözünür faktörler olup viral enfeksionun düzenlenmesine katılırlar. İL-1'e benzer şekilde, prostaglandin E2 (PGE2) ateşlenmeye neden olur, ödemi teşvik eder ve enfeksiyon bölgelerine immün hücresinin infiltrasyonunu kolaylaştırır. iNOS çeşitli virüslerin replikasyonunu azaltma yeteneğinden dolayı bir anti-viral yangısal gen olarak tanımlanmaktadır. iNOS yoksun farelerde viral enfeksiyona karşı yanıtların yetersiz olduğu ve ölüm oranlarının arttığı bildirilmiştir. İL-1, PGE2 ve nitrik oksit viral enfeksiyonu takiben makrofajlar tarafından yüksek seviyede üretilmektedir [73].

M2a makrofajlarında, İL-13 ile uyarılmış insan monositleri üzerindeki gen ekspresyonu profillemesi sonucunda ekspresyonu sitokin tarafından daha erken zaman noktalarında (8 saat) düzenlenmiş (85 artmış ekspresyon, 57 azalmış ekspresyon) 142 gen tespit edilmiştir. İlginç olarak İL-13'ün düzenlediği genlerin çoğu yangısal ve doğal immün yanıt (CD1b/c/e, TLR1, CLECSF6), yağ metabolizması veya İL-1 sisteminin düzenlenmesi ile ilişkilidir. İL-10 noksan farelerde yapılan deneylerde ise sıçangil M2c makrofajlarında, İL-

10‘un, STAT3 bağımlı olarak özellikle LPS uyarımlı genlerin ekpresyonunu azalttığı; SOCS3 ve İL-1Ra genlerinin ekspresyonunu ise artırdığı saptanmıştır. İnsan monositlerinde İL-10’un yaklaşık 3000 genin düzenlenmesinde etkili olduğu bulunmuştur. Bunlardan 1600 genin ekspresyonu artarken, 1300 genin ekspresyonu azalmaktadır. Tanımlanmış alternatif olarak aktive olmuş makrofaj tiplerine dahil olmayan glukokortikoid aktive makrofajlar da anti-oksidatif, anti-enflamatuvar ve immün baskılayıcı işlevlere sahip olan genlerin (Adenozin A3 reseptör, CD163, İL-10) ekspresyonlarını artırırken; oksidatif süreçlerde yer alan veya İFN-γ tarafından uyarılan genlerin (CXCL9-11, CCL5) ekspresyonunu azaltmaktadır [41].

İL-10, ortamda LPS’nin olması veya olmaması durumuna bağlı olarak farklı genlerin transkripsiyonlarını etkilemektedir. Monosit türevli dendritik hücre ile yapılan bir çalışmada İL-10 ve LPS birlikte verildiğinde İL-12 gibi pro-enflamatuvar moleküllerin üretiminin sınırlanmadığı gösterilmiştir [42].

Fare genomu ve ekspresyon ilişki veritabanlarında 65 farklı gen makrofaj aktivasyonları ile ilişkili olarak tanımlanmıştır [74].

Demir metabolizması ve İDO

Demir, mikrobiyal büyüme için ve konakta gerekli metabolik yolaklarda (oksijen taşınması, mitokondriyal solunum, transkripsiyonel regülasyon) gereklidir ve enfeksiyon süreçlerinde konakçı hücreleri ile mikroorganizmalar arasında "demir için rekabet" yapılması kritik bir konudur. Demir homeostazı ve immün yanıtın birbirini etkilediği uzun zamandan beri bilinmektedir: Th1 ve Th2 sitokinleri, demir alımı ve metabolizması ile ilgili genlerin ekspresyonunu ters yönde düzenler ve demir konsantrasyonundaki değişiklikler sayısız patojene karşı immün yanıt tipini değiştirebilir. Daha spesifik olarak demir eksikliği, infeksiyon insidansının azalması ve Th1 bağışıklık yanıtlarının daha güçlü olmasına neden olurken, demir konsantrasyonunun artması bakteriyel, fungal ve viral enfeksiyonlara duyarlılığı artırmaktadır. Makrofajlar için demir rekabeti özel bir önem taşır, çünkü makrofajların mikrop öldürücü aktivitesi esas olarak, zorunlu bir kofaktör veya protez grubu olarak demir gerektiren enzimlere bağımlı olan reaktif oksijen ve azot türleri vasıtasıyla uygulanır. Makrofajların demir alıkoymasının düzenlenmesi, demirin dolaşımdan çekilmesi ve patojenler için ortamda varlığının sınırlandırılması açısından

önemli olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, yangı koşullarında demir alımı, tutulması ve salınması mekanizmalarındaki değişiklikler, efektör bölgelerdeki makrofajları yangı bölgelerindeki demir için büyük depolama alanlarına dönüştürür ve efektör işlevleri üzerinde doğrudan bir etkisi vardır. Bu bağlamda, makrofajlardaki yüksek demir konsantrasyonunun (aşırı demir yüklemesi) mikrobik enfeksiyonu arttırdığı da bilinmektedir. Mekanik düzeyde incelendiğinde; makrofajların demir yüklemesi pro-enflamatuvar sitokinlerin İFN-γ-aracılı salgılanmasını inhibe eder ve MHC II ve İDO'nun ekspresyonunu azaltır. Böylece makrofajların fagositik, tümörisidal ve mikrobisidal etkisini azaltır. Demirin, iNOS'un sitokinler tarafından uyarılmasına aracılık ettiği CEBPβ ve HIFα üzerindeki inhibitör etkisi bulunmaktadır. Bu etki demir yüklenmiş makrofajların mikrobisidal aktivitesinde azalmaya neden olur. Ayrıca NO, ferritinin translasyonunun inhibisyonuna katkıda bulunduğundan bir geri besleme döngüsü oluşarak artan demir birikimini destekleyen bir tablo ortaya çıkar. Sonuç olarak makrofajların demir yüklenmesi, yanıtları Th2 efektör işlevlerine doğru kaydırarak yüksek mikobakteriyel büyümeye ve anti-mikrobiyal mekanizmaların sınırlandırılmasına neden olur. Bu gerçeklere dayanarak, demir konsantrasyonunun pro-enflamatuvar ve anti-enflamatuvar sitokinlerin üretimini farklı şekilde etkilediği ve CAMØ'nin efektör işlevlerini bozduğu düşünülmektedir [41].

Demirin kendisinin yanı sıra, makrofajlardaki demir metabolizmasının enzimleri ve metabolik ürünleri aynı zamanda pro-enflamatuvar ve anti-enflamatuvar sitokinlerin salımını modüle edebilir, böylece makrofaj aktivasyonunu düzenler. Makrofajın demir alımı, transferin (Transferin Reseptörü ile), laktoferrin ve hemoglobin-haptoglobin komplekslerinin endositozu (CD163 ile) yoluyla gerçekleşir. Daha sonraki endositik süreçte eritrofagositoz ile birlikte hemooglobin sitoplazmaya getirilir; burada Hem, Hem Oksijenaz (HO) enzimi ile demir, karbon monoksit ve biliverdin'e parçalanır [41].

Makrofajların işlevleri

Makrofajlar doğal immün sisteminin ayrılmaz üyeleridir. Nötrofiller, eozinofiller ve doğal öldürücü hücreler ile birlikte istilacı mikropları ve toksik makromolekülleri tespit etmek, ortadan kaldırmak veya zaptetmek için öncül bir savunma hattı işlevi görürler. Bu hedeflere yönelik makrofaj tepkileri hızlıdır ve yaygın olarak patojen ilişkili moleküler kalıplar (PAMP) olarak adlandırılan yapılar tarafından tetiklenir. Doğal bağışıklık, istilacı

bir mikroorganizmayı idare edemediğinde, makrofajlar, antijen spesifik T ve B-lenfositlerden uygun aktivasyon ve bilgiyi aldıktan sonra, adaptif bağışıklık sisteminin efektör hücreleri olarak işlev görürler [41].

Bununla birlikte, makrofajların yara iyileşmesinde, yangının çözülmesinde, hücre göçünü koordine etmede, matriksin yeniden şekillendirilmesinde ve anjiyogenezde önemli işlevleri vardır. Doku onarımı için bu süreçlerin hepsi gereklidir. Sonuç olarak, "makrofaj" terimi, nihai hedefi temizleme, patojen ve tümör hücrelerinin yok edilmesi, yaşlanan hücrelerin temizlenmesi, doku hücrelerinin büyümesinin kontrolü ve ekstraselüler çevrenin modülasyonu gibi efektör işlevleri aracılığıyla doku homeostazı ve bütünlüğünün korunması olan geniş bir hücre yelpazesi için geçerlidir. Bu zor görevleri yerine getirmek için makrofajlar, mikroçevrelerindeki değişikliklere uyum sağlamalarının ve cevap vermelerinin yanı sıra normal doku yapısını ve işlevini geri kazandırmada diğer hücre tiplerini dahil edip, koordine etmelerine izin veren oldukça esnek bir gen ekspresyon programı sergilemektedir. Bununla birlikte, tüm bu makrofaj efektör faaliyetleri eş zamanlı olarak gösterilmemektedir. Bazı faaliyetleri biribiri ile açıkça çelişkilidir (hücre dışı matriksin sentezlenmesi ve degredasyonu gibi). Sonuç olarak, doku makrofajları, temel koşullar altında işlevsel olarak heterojendir. Endojen faktörler veya harici uyaranlara bağlı aktivasyonlar neticesinde büyük bir değişkenlik sergiler [41].

Makrofajların dokuya ve organa özgü katkıları (Şekil 2.13)

Akciğer

Akciğer gerekli solunum organıdır ve mikroplara, kirleticilere ve tozlara sürekli maruz kalır. Akciğerin başlıca görevi, fırsatçı patojenlere karşı bir immün yanıt oluşturabilme özelliğini koruyarak inhale zararsız uyaranlara karşı tolerans ile son zamanlarda önem kazanan akciğer mikrobiyomu arasındaki dengeyi sağlamaktır. Oluşturulacak yanıtın düzensizliği enfeksiyonlara ve alerjik hava yolu yangısına karşı devamlı duyarlılığa neden olabilir. Bu zorluk barsak yollarındaki mukozal yerleşimlere benzemektedir ve her iki organ da lamina propriada, monosit türevli makrofajlar ve $CD103^{+}$ ve $CD11b^{+}$ DH alt grupları gibi eşdeğer doğal immün hücreleri barındırmaktadır. Akciğerde, bu hücreler doğrudan tolerans uyarımı gibi akut bağışıklık tepkilerinde bulunurlar. Bununla birlikte, $Ly6C^{hi}$ monositlerin sürekli devir yaparak ve doku makrofajlarına farklılaşması ile organ

işlevselliği koruduğu bağırsağın aksine alveolar makrofajlar (AM), fetal-monosit kökenli, CSF-2-bağımlı ve uzun ömürlü hücreler ile denge durumunda bulunurlar. Bu makrofajlar interstisyel boşlukta değil, sağlıklı hava yollarının alveolünde bulunur. Tüm akciğer makrofajlarının embriyonik kaynaklı olup olmadığı henüz netlik kazanmamıştır ve belirlenmeye çalışılmaktadır. Klasik hava yolu AM, alveoler epitel hücreleriyle CD200 ve TGFβ sinyalleri yoluyla etkileşime girer ve bu yangısal olmayan hali güvence altına alır [39].

Tip II alveoler epitel hücreleri, luminal yüzeylerinde, SIRPα, TLR2, TLR4 ve bunların ko-reseptörleri gibi immün reseptörlerine bağlanan sürfaktan ilişkili proteinleri (SP) de eksprese eder. Buna ek olarak özgül SP, nötralizasyonunu kolaylaştırmak ve pro-enflamatuvar gen aktivasyonunu doğrudan inhibe etmek için patojenlere, apoptotik hücrelere ve allerjenlere bağlanabilir. Sonuç olarak, SP-D noksan farelerden izole edilen AM spontan metalo-proteinaz ekspresyonu ve oksidan üretimini göstermektedir. Bu da kronik yangısal değişimler ile sonuçlanmaktadır. Ayrıca AM, aşırı yüzey aktif maddeleri fagositoz ile temizlemesi bakımından önemlidir. Bu aktivite, en azından kısmen Bach2 transkripsiyon faktörü tarafından kontrol edilir ve bunun yokluğu lipidlerin birikmesine ve daha sonra pulmoner alveolar proteinosis (PAP) benzeri bir hastalığa neden olur. Solunum yolu epiteli, fetal monositlerin AM'ye diferansiyasyonu için gerekli olan CSF-2'nin ana kaynağıdır. Buna göre, CSF-2 eksik fareler azalan AM sayılarıyla karakterizedir. Üstelik kalan hücreler, lipid birikimi ve PAP belirtileri ile sonuçlanan işlevsel bozukluklar gösterirler. Yüzey aktif maddeler (*surfactants*) ve yüksek CSF-2 seviyeleri, AM'in benzersiz fenotipini ve işlevlerini etkileyen potansiyel yerel faktörlerdir. AM aynı zamanda bakteri fagositozunda üstünlük sağlarken, pulmoner virüs enfeksiyonu üzerine önemli miktarda tip I interferon üretir. Böylelikle yangının gelişmesine katkıda bulunurlar. Klasik bir çevre bariyeri dokusu olarak akciğerin eşsiz mikroçevresi AM fenotipine, hiper aktivasyonu kontrol eden ve böylece bu dokuda karakteristik bir tolerojenik immünolojik yanıtı yöneten faktörleri sağlayarak önemli ölçüde katkıda bulunur [39].

Karaciğer - Kupffer hücreleri (KH)

Karaciğer; besin maddeleri, amino asitler, karbonhidratlar, lipidler ve vitaminlerin etkili bir şekilde alımı ve bunu takip eden depolamadan sorumlu hayati bir organdır. Metabolik

dönüşüm ve metabolitlerin kan ve safra içine salınmasının yanı sıra, içilen tehlikeli kimyasalların detoksifikasyonunu da düzenler [39].

Karaciğer lobülleri arteryal dolaşımdan ve gastro-intestinal kanalı boşaltan portal damardan sürekli kan desteği alır. Karaciğer; gıda antijenleri, mikrobik ürünler ve ksenobiyotiklere önemli ölçüde maruz kalır. Dolayısıyla Karaciğer konak savunmasında, yerel ve sistematik toleransın sağlanmasında önem kazanmaktadır. Karaciğer parankimine giren kan, fenestrasyonlu karaciğer sinüs endotel hücresi tabakası da dahil olmak üzere özelleşmiş nonparenchymal hücreler içeren ince cidarlı 'sinüzoid' ağından geçer. Bu özellikler, bu mikro ortamda etkili antijen yakalama ve sunum sağlar. Karaciğerin yerleşik makrofaj popülasyonu olan Kupffer hücreleri (KH), karaciğer sinüzoidlerinin üst periportal bölgelerinde bol miktarda bulunur [39].

KH, yüksek fagositik ve lizozomal aktivite gösterir. Bu da sinüzoidlere giren kanın gözlemlenmesi ve filtrelenmesine yönelik uzmanlıklarını vurgular. Böylece sistemik patojen dolaşımını önlemek için koruyucu bir bariyer oluştururlar. Buna ek olarak KH, damar içi pıhtılaşmayı önlemek için kompleman ve fibronektin kaplı partiküller, ölen hücrelerden ve hücre dışı matris bileşenlerinden salınan maddenin yanı sıra immün kompleksleri gibi potansiyel zararlı endojen bileşikleri de uzaklaştırır. Bağırsaklardan türetilen antijenlere ve bakteriyel endotoksinlere sürekli maruz kalmaları durumunda KH sağlıklı karaciğerde tolerojenik bir fenotip gösterir. Bununla birlikte hastalık koşullarında, KH patolojik olarak aktive olmuş bir duruma geçebilir ve daha sonra hepatoselüler yaralanmaya ve hasara neden olabilir. KH ayrıca karaciğere özgü metabolik işlevleri yerine getirir. Hatalı veya oksidatif olarak hasar görmüş kırmızı kan hücrelerini dolaşımdan temizlemede, eritrositin ömrü boyunca salınan hemoglobin içeren veziküllerin uzaklaştırılmasında rol alırlar. Çöpçü (*scavenger*) reseptörü CD163'ün ekspresyonu, hemoglobin-haptoglobin komplekslerinin endositozuna imkan sağlar, böylece dokuları serbest hemoglobin aracılı oksidan hasardan korurlar. KH ayrıca plazma kolesterol seviyelerini dolaşımdaki doğal ve modifiye lipoproteinlerin uzaklaştırılması yoluyla düzenler. Kupffer hücreleri, embriyo türevli makrofajlardır [39].

Kemik – Osteoklastlar

Kemik, asgari kütle ile maksimum güç sağlamak üzere tasarlanmış benzersiz, vaskülarize edilmiş, sert ancak dinamik bir organdır. Kemiğin şekli, mezenkimal osteoblastlar tarafından gerçekleştirilen kemik sentezi ve özelleşmiş kemikte yerleşik makrofajlar (osteoklastlar) tarafından gerçekleştirilen kemik erimesi ile belirlenir. Osteoblast aktivitesi ile osteoklast gelişimi veya işlevi dengesindeki anormallikler osteopetroz veya osteoporoz gibi iskelet patolojilerine neden olur. Osteoklastlar, embriyogenez sırasında normal uzun kemik oluşumu için daha da önemlidir. Bunlar, kemik yüzeyi yakınında hücre füzyonu oluşturan çok çekirdekli hücreler (polikaryonlar) 'dir. CSF-1'i veya nükleer faktör kappa-B ligandı reseptör aktivatörünü (RANKL) kodlayan genlerde mutasyonlar barındıran farelerin osteopetroz geliştirdiği gözlenmiş ve bu faktörlerin in vivo osteoklastogenez için kritik olduğu gösterilmiştir. Osteoklast farklılaşması ve yönelmesinde PU.1 ve c-Fos transkripsiyon faktörlerinin de önemli rolleri bulunmaktadır. RANKL, osteoblastlar tarafından eksprese edilir ve olgun osteoklastların plastisitesini uyarır. Bu plastisite kemik rezorpsiyonu (erimesi) için gerekli yapısal değişikliklerle kendini gösterir. Osteoblastlar tarafından üretilen, RANKL için çözünebilir bir tuzak reseptörü olan osteoprotegerin (OPG) ile hem osteoklastların farklılaşması, hem de işlevi engellenebilmektedir. Bu nedenlerle osteoklastların oluşumu osteoblastlar tarafından RANKL ve OPG dengesiyle belirlenir. Yapılan çalışmalar ile osteoklastın kararlı halde dolaşımdaki monositlerden oluşabileceğini ortaya konmuştur [39].

Beyin – Mikroglia

Mikroglia, Merkezi Sinir Sistemi'nin (MSS) doku yerleşik makrofajlarını ve MSS parankimasındaki tek yerleşimli hematopoetik, mezodermal türevli hücre tipini temsil eder. Mikroglia, yetişkin MSS'de homeostatik bakım ve immün savunma olmak üzere iki ana görevi yerine getirir. MSS, Beyin Kan Bariyeri'ni (BKB) işlevsel olarak desteklemek için fizyolojik ve biyokimyasal görevlerde bulunan, miyelin kılıfı oluşturan oligodendrositler ve astrositler gibi ek makroglia popülasyonlarını da içerir. Mikroglia, epidermal LH'nin yanı sıra uzun dönem yaşam süreli ve erişkin dönemde Kİ'den türevlenen miyeloid hücrenin yenilemesinden (*replenishment*) bağımsız olduğu deneysel olarak kanıtlanan doğal immün sisteminin ilk hücreleridir. Bununla birlikte, LH ve diğer çevresel doku yerleşik makrofajlara kıyasla, sıçan mikrogliası, embriyonik yolk kesesinde, fetal

karaciğerden bir katkı olmadan türetilmektedir. Gelişmekte olan embriyonik MSS'de mikroglia hızlı bir şekilde çoğalır ve hücre sayıları artar ancak bu istikrarlı çoğalma evresi yetişkinlikte büyük oranda kesilir. Yapılan çalışmalar ile mikroglianın bulunmadığı bir beyin parankimasında, beyinin işlevini ve canlılığını devam ettiremeyeceği düşünülmektedir. Embriyonik mikroglia, fagositiktir ve muhtemelen hücresel artıkların temizlenmesinde rol alır. Yetişkinlik döneminde, mikroglia, hipokampusun subgranular bölgesindeki nöroprojenlerinin temizlenmesinde apoptoz ile birleşen fagositoz yoluyla yer alır. P2Y ailesinin pürinerjik reseptörlerinin mikroglia üzerinde belirgin şekilde ekspresyonu, bu hücrelerin adenosin trifosfata (ATP) ve nöroglianın hasar görmesinden sonra hücre dışı boşluğa salınan uyarı faktörleri gibi metabolitlerine duyarlı olmasını sağlar. Birçok örnek, mikroglianın sinaptik ağın gelişimini aktif olarak etkilediğini ve şekillendirdiğini göstermektedir, ancak mikroglial-nöronal iletişim tek yönlü değildir. Nöronal veya oligodendroglia türevli TGFβ, inaktifleştirilmiş fenotipe katkıda bulunur ve benzersiz bir genetik mikroglia imzası oluşturur. Nöronal-mikroglia etkileşimi (*crosstalk*) yönünde ilave bir rol de mikroglia sessizliğinin korunması ile ilişkilidir. Nöronal CX3CL1, CD200 ve ekzozom türevi miR-124'ün çeşitli MSS yangı modellerinde mikroglial hücre özerk nörotoksisitesini kontrol ettiği gösterilmiştir [39].

Özetle, mikroglial biyoloji konusundaki son gelişmeler bu hücrelerin, nöroglial çevresi tarafından etkilenen ve BKB'nin arkasındaki benzersiz kapalı konumuyla ilişkili MSS'nin önemli bir bileşenini temsil ettiğini göstermektedir [39].

Splenik makrofaj popülasyonları

Dalak, vücuttaki en büyük lenfoid organdır ve kan yoluyla taşınan antijenlere T ve B hücrelerinin yanıtlarının başladığı merkez bölgedir. Bu organ afferent lenfatiklerden yoksun olduğundan, dalakların işlevleri sistemik dolaşıma odaklıdır. Dalak, eritrositler de dahil olmak üzere yaşlanmış hücreler ve potansiyel zararlı maddeler için kanın filtresi olarak görev yapmaktadır. Bu işlevlerin birçoğu, esasen farklı dalak alanlarına ayrılmış olan ve alana özgü homeostatik rolleri gerçekleştirmek için iyi uyarlanmış belirli makrofaj alt popülasyonlarına atfedilir [39].

Kırmızı pulpa makrofajları (KPM) demir geri kazanımı konusunda uzmanlaşmışlardır. Yaşlanmış veya hasar görmüş eritrositlerin temizlenmesinden başlayarak, hemoglobinin alınması, yıkılması ve demir sağlama gibi tüm geri dönüşüm evrelerinde yer alan

proteinleri eksprese ederler. KPM, KH'ne benzer şekilde, ölen eritrositlerden salınan hemoglobin-haptoglobin komplekslerinin endositozu için CD163'ü de kullanır. Sıçan KPM ($F4/80^+$ $CD206^+$ $CD11b^{lo/-}$) gelişiminde Spi-C transkripsiyon faktörü gereklidir. Heme'in son zamanlarda yapılan çalışmalar ile Spi-C salınımını transkripsiyon baskılayıcı Bach-2'nin kontrolü yoluyla artırdığı gösterilmiştir. Bu durum, belirli bir dokuya ait makrofajın metabolit odaklı farklılaşması yönünde ilk kanıtı sağlar. KPM, prenatal olarak üretilir ve destek monositik girdi olmadan kararlı durumu yetişkinlik dönemi boyunca sürdürülür [39].

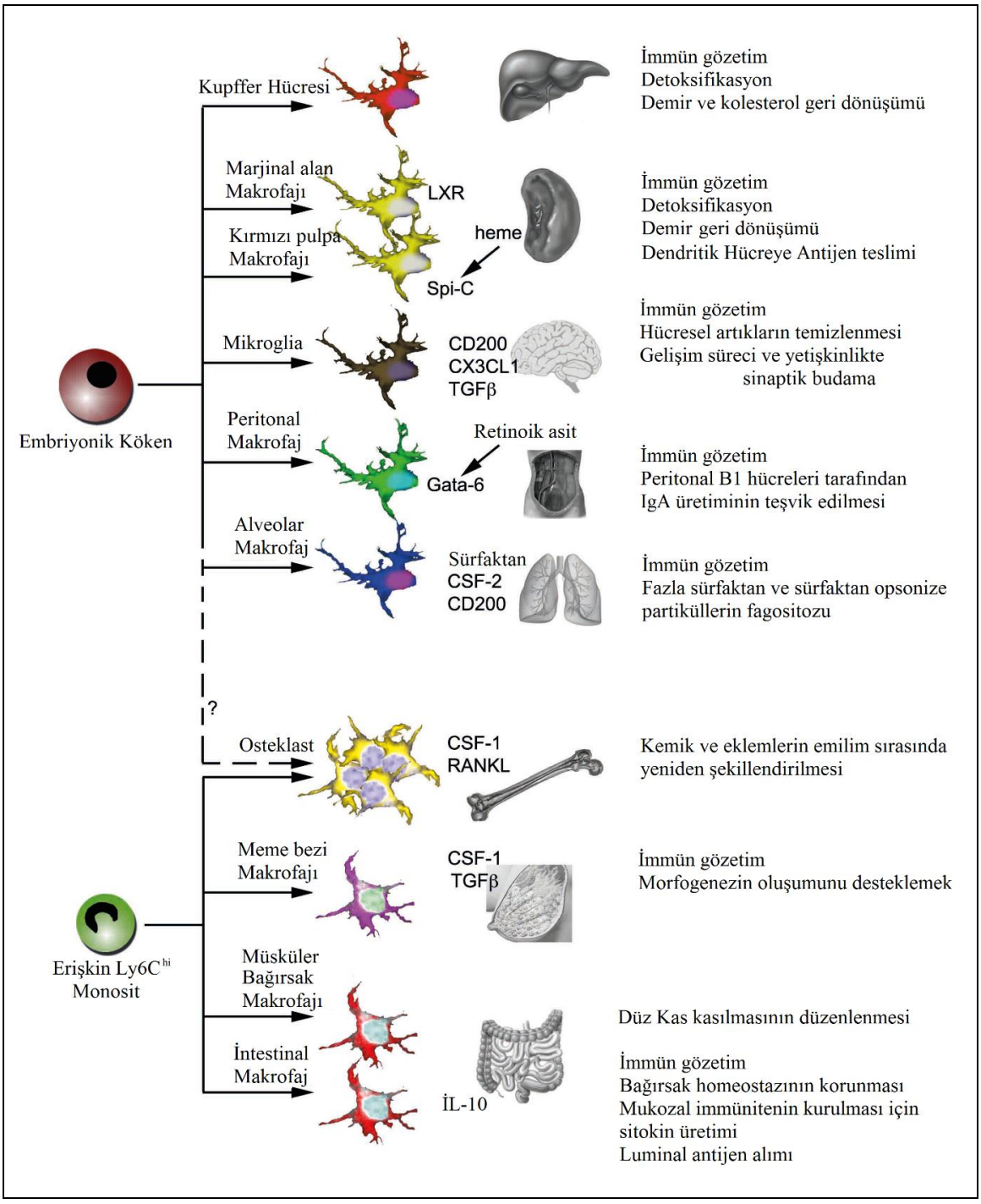
Splenik beyaz ve kırmızı pulpa ara yüzeyi "marjinal bölge" olarak adlandırılan retiküler bir ağdır ve arteriyel kanala girmek için stratejik olarak konumlandırılmış iki ayrı ikamet makrofaj popülasyonuna ev sahipliği yapar: marjinal bölge makrofajları (MBM) ve marjinal metalofilik makrofajlar (MMM). Dalak anatomisinin sonucu olarak marjinal bölgede kan akışı yavaşlar ve sistemik dolaşımda bulunan patojenler makrofaj altkümeleri tarafından etkili bir şekilde uzaklaştırılır. Bu makrofajlar aynı zamanda apoptotik hücrelerin temizlenmesini de düzenler ve $CD8^+$ splenik DH'ye, hücre ile ilişkili antijenlerin ulaştırılmasına dahil olabilirler. Her iki marjinal bölge makrofaj altkümesinin farklılaşması, nükleer reseptör LXRα'yı gerektir [39].

Beyaz pulpa makrofajları (BPM), pan makrofaj belirteçi CD68'in ortak ifadesi ile tanımlanabilir. B hücre folliküllerinin germinal merkezinde (GM) yer alan ve GC reaksiyonu sırasında ortaya çıkan fosfatidil-serin eksprese eden apoptotik B hücrelerinin temizlenmesinden sorumlu olan 'yapışkan vücut makrofajları' kapsarlar [39].

Peritonal boşluk makrofajları (PM)

Farelerin peritoneal boşluğundan izole edilen makrofajlar, makrofaj ailesi arasında en iyi incelenmiş yerleşik hücre popülasyonudur ve bu nedenle mevcut makrofaj biyolojisi anlayışımıza önemli katkıda bulunur. İzole edilen PM, patojen uyarımı sonrası sinyalizasyon basamaklarını, fagositozu ve sitokin ve kemokin sekresyonunu incelemek için kolayca erişilebilen makrofaj kaynağı olarak kullanılır. Yıllarca yoğun araştırmalar yapılmasına rağmen, PM'nin dokuya özgü işlevi ve ontogenezi büyük oranda bilinmemektedir. PM heterojen olup fenotipik ve işlevsel açıdan farklı iki alt kümeden oluşur [39].

PM'nin küçük bir kısmı (F4/80^{int} CD11b^{int}) intermediate olarak adlandırıldı. Öte yandan, kararlı durum koşulları altında periton boşluğunda egemen olan daha büyük bir kısmı ise F4/80^{hi} CD11b^{hi} PM, olgun PM olarak adlandırılmıştır. Bu hücreler prenatal kökenlidir. Uzun ömür ve sınırlı kendini yenileme özellikleri gösterirler. Bu popülasyon, yangısal koşullar altında yanıtın ilk günlerinde yok olur; bu, 'makrofaj kaybolma reaksiyonu' olarak bilinen bir reaksiyondur. Ancak muhtemelen geniş çoğalma ile tekrar ortaya çıkarlar. Peritona geçen Ly6C^{hi} monositleri ablatif koşulun iyileşme fazı esnasında önce F4/80^{int} CD11b^{int} daha sonra F4/80^{hi}CD11b^{hi} PM'lere farklılaşırlar. Bununla birlikte, bu hücrelerin embriyo kaynaklı PM'nin gerçek işlevsel eşdeğerleri olup olmadığı gösterilmeye devam etmektedir [39].



Şekil 2.13. Doku yerleşik makrofajların işlevleri [39]

2.6.4. THP-1 insan monosit hücre hattı

Akut monositer lösemili bir erkek çocuğun kanından elde edilen THP-1 insan monositik lösemi hattı Tsuchiya ve diğerleri tarafından 1980 yılında tanımlandı ve kültür ortamında 14 ay boyunca monositer özelliklerini koruduğunu gösterdiler [75]. Bu hücre hattı Fc ve

C3b reseptörlerini yüzetlerinde bulundururken, İg üretimi yapmadıklarını bildirdiler. Fagositik özellik gösterirler ve farklılaştıktan sonra TLR agonistlerine yanıt verirler.
THP-1 hücre hattı forbol 12-miristat 13-asetat (PMA) veya 1α, 25-dihidroksi vitamin D3 uyarısı sonrasında makrofaj benzeri yapışkanlık kazanırlar [76,77]. THP-1 insan monosit hücre hattının PMA kullanılarak makrofajlara dönüştürülmesi ve İL-4 ve İL-13 uyarımıyla M2, İFN-g ve LPS uyarımıyla M1 plastisitesi gösterdikleri bildirilmiştir [46]. Bu nedenle insan periferik kan monosit eldesinin yeterli olmadığı koşullarda *in vitro* çalışmalarda ideal bir model olarak kullanılmaktadır.

2.6.5. Fagositoz

Tek hücreli organizmalarda fagositoz, beslenme için önemli işlevdir; çok hücreli organizmalarda ise fagositler adı verilen özel hücreler bu işleve sahiptirler. Fagositoz, 0.5 μm'den büyük parçacıkların tanımlanması ve fagozom olarak bilinen ve plazma zarından türetilen vezikül içine alınması ile gerçekleşir. Fagositler mikrobiyal patojenleri ve apoptotik hücreleri fagositoz yoluyla yutabilirler. Bu şekilde, her gün devredilen milyarlarca hücrenin temizlenmesine katkıda bulunurlar. Bu nedenle fagositoz, sadece mikrobiyal eliminasyon için değil doku homeostazı için de gereklidir. Profesyonel fagositler arasında monositler, makrofajlar, nötrofiller, dendritik hücreler, osteoklastlar ve eozinofiller bulunur. Bu hücreler, mikroorganizmaları ortadan kaldırmak ve bunları adaptif immün sisteminin hücrelerine sunmakla görevlidir. Bu hücrelerin haricinde fibroblastlar, epitel hücreleri ve endotel hücreleri de fagositoz gerçekleştirebilirler. Bu profesyonel olmayan fagositler mikroorganizmaları yutamasa da apoptotik cisimleri ortadan kaldırmada önemlidirler. Fagositler, her tür patojen ve apoptotik hücre de dahil olmak üzere, potansiyel olarak yenilenebilecek çok sayıda farklı parçacığı tanımalıdır. Bu tanıma işlevi fagosit yüzeyinde yer alan çok sayıda farklı reseptörün varlığı ile gerçekleştirilir. Fagositlerin plazma membranındaki reseptörler, opsonik olmayan veya opsonik reseptörler olarak ikiye ayrılabilir [78].

İnsan vücudunda milyarlarca hücre her gün apoptoz ile ölür. Apoptotik hücrelerin fagositoz yoluyla temizlenmesi, ikincil nekrozu ve yangıyı artıracak, otoimmüniteyi tetikleyecek hücre içeriklerinin salınmasını önler. Buna ek olarak, apoptotik hücreler genellikle anti-enflamatuvar bir yanıtı uyarır, bu nedenle apoptotik hücrelerin uzaklaştırılması genellikle immünolojik açıdan sakin seyreder. Apoptotik hücrenin

makrofaj tarafından yutulmasının transforme edici büyüme faktörü (TGF)-β ve interlökin (İL)-10 salınımına neden olduğunun ilk kez keşfinin ardından apoptotik hücrelerin tetiklediği sayısız anti-enflamatuvar mekanizma keşfedilmiştir. Etkili temizlik başlatmak için, apoptotik hücreler CX3CL1/fraktalkin, lizofosfatidilkolin, sifingozin-1-fosfat, trombozpondin-1 (TSP-1), ATP ve UTP, endotelyal monosit-uyarıcı polipeptid II, monosit kemoatraktan protein-1, kesilmiş insan tirozil-tRNA sentetaz veya S19 ribozomal protein çapraz-bağlı dimer gibi çeşitli kemotaktik sinyalleri salgılayarak fagositik hücreleri çekerler. Fagositik hücreler, ölü hücreler ile yaşayan hücrelerin biribirinden ayrımını apoptotik hücrelerin yüzeyinde sunulan apoptotik hücre ile ilişkili moleküler kalıplarını (ACAMP'leri) tanıyarak yaparlar [79].

Doğal immün sistem klasik olarak fagositoz ve antimikrobiyal işlevlerle ilişkilendirilmiştir. İFNγ fagositozu sınırlandırmaktadır, fakat aynı zamanda İFNγ T hücre işlevlerini kontrol ederek antimikrobiyal etki göstermektedir. Mikobakteri infeksiyonu sırasında İL-15 ile programlanmış makrofaj Vitamin D aracılığıyla fagositozu engeller ancak diğer antimikrobiyal ürünler olan katelisidinlerin sentezini artırarak konak savunmasına yardımcı olur. Oysaki İL-10 ile programlanmış makrofajın fagositoz kapasitesi oldukça artar [80]. Frustrated fagositoz olarak isimlendirilen bir durumda ise içeri alınamayan bir yapı vardır. Makrofaj bu liganda temas ettiğinde makrofajın içindeki salgısal moleküller makrofaj dışına boşaltılır. Bu şekilde makrofaj salgıları etrafındaki dokulara zarar verir. Otoimmün ve kronik yangısal hastalıklarda bu şekilde bir hasar mevcuttur [81].

2.7. Mezenkimal Kök/Stromal Hücre (MKH/MSH) ve İnsan Kaynaklı Makrofaj Plastisitesi Arasındaki Etkileşimlerde Araştırılacak Genler

Daha önce ifade edildiği üzere immün yanıtlar, doku yenilenmesi, homeostaz ve apaoptoz gibi bir çok hayati süreçte hücreler ve çevresel etkenler rol oynamaktadır. Bu rollerin tanımlanması ve işlevselliği, ilişkili genlerin ekspresyonlarının gerçekleşmesiyle mümkün olmaktadır. Gen ekspresyonunun baskılanması veya susturulması, bu gen ilişkili ürünlerin üretimini durdurarak etki ettiği mekanizmaların ya aksamasına veya bozulmasına ya da tamamen işlevini kaybetmesine neden olmaktadır.

Araştırmamızda MKH ve monosit/makrofajların farklı uyaranlar ile birlikte yönlendirildikten sonraki ko-kültürlerinde TNF-α, İL-6, İL-10, İL-12A, İL-12B, iNOS ve Arg-1 gen ekspresyonları incelenmiştir. Bu genlere ek olarak housekeeping gen olarak Beta Aktin ve GAPDH ekspresyonları çalışmaya dahil edilmiştir.

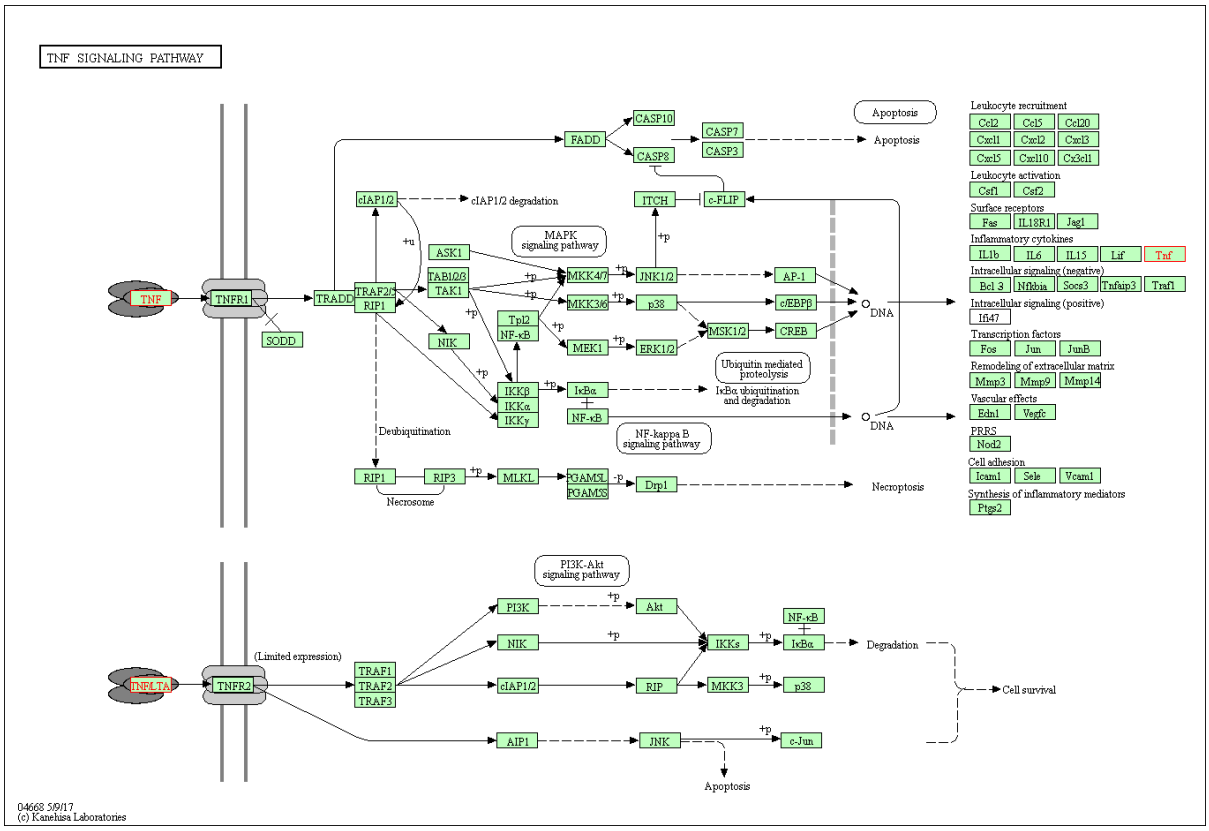
2.7.1. Tümör nekroz faktörü alfa (TNF-α)

İnsan tümör nekroz faktörü alfa (TNF-α) geninin uzunluğu 12 kilobaz (kb) olup, insan 6. kromozomunun kısa kolunda bulunur (p21.33) ve ana doku uygunluk kompleksi (MHC) sınıf III bölgesiyle düzenlenmektedir. TNF geni 4 ekzona sahiptir. DIF; TNFA; TNFSF2; TNLG1F; TNF-alpha gibi farklı isimler ile de adlandırılmaktadır [82-84].

Bu gen, tümör nekroz faktörü (TNF) süper ailesine ait çok işlevli bir pro-enflamatuvar sitokini kodlar. Bu sitokin esas olarak monosit ve makrofajlar tarafından salgılanmaktadır. TNFRSF1A / TNFR1 ve TNFRSF1B / TNFBR reseptörlerine bağlanabilir ve bu şekilde işlev görür. Bu sitokin, hücre çoğalması, farklılaşma, apoptoz, lipid metabolizması ve pıhtılaşma dahil olmak üzere geniş bir biyolojik süreç yelpazesinin düzenlenmesinde yer alır. Bu sitokin, otoimmün hastalıklar, insülin direnci ve kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir [82].

TNF; Antifolate direnci, MAPK sinyalizasyon yolağı, Sitokin-sitokin reseptörü etkileşimi, NF-kappa B sinyalizasyon yolağı, Sphingolipid sinyalizasyon yolağı, mTOR sinyalizasyon yolağı, Apoptoz, Necroptoz, TGF-beta sinyalizasyon yolağı, Osteoklast farklılaşması, Antijen işlenmesi ve sunumu, Toll-benzeri reseptör sinyalizasyon yolağı, NOD-benzeri reseptör sinyalizasyon yolağı, RIG-I- benzeri reseptör sinyalizasyon yolağı, NK hücre kaynaklı sitotoksite, İL-17 sinyalizasyon yolağı, T hücre reseptörü sinyalizasyon yolağı ve birçok patojene yanıt ilişkili yolaklar dahil birçok hücresel yolak içerisinde yer almaktadır. TNF, TNFRSF1A reseptörüne bağlandığında TRADD, FADD aktivasyonu ile kaspaz aktivasyonu, DNA fragmantasyonu ve apoptoza giden basamakları olumlu yönde etkiler. Ayrıca yine TNFRSF1A reseptörüne bağlanarak MAPK, NF-κB sinyalizasyonuna veya nekrotik hücre ölümü (nekroptoz) sürecine dahil olabilir . Sınırlı miktarda ekspresyonu olan TNFRSF1B reseptörüne bağlandığında ise TRAF 1,2,3 veya AIP-1 aktivasyonu ile hücre sağkalımında rol alabilir [85]. (Şekil 2.14)

İFN-γ ile birlikte sınıf 1 MHC yoluyla antijen işlenmesi ve sunumunda ubikutin-proteazom yolağını etkiler. Böylece doğal öldürücü (NK) hücreler ve $CD8^+$ T hücrelerin mikrop öldürücü aktivitelerinin başlamasında tetikleyici rol üstlenir. Osteoklast farklılaşmasında kemik iliği kaynaklı monosit/makrofaj öncül hücrelerinin sağ kalım, çoğalma ve sitoiskelet yapısının düzenlenmesinde erken basamaklarda yer alır [85].



Şekil 2.14. TNF sinyalizasyon yolağı [85]

Nakavt farelerde yapılan çalışmalarda bu sitokinin nöro-koruyucu işlevi de ileri sürülmüştür. TNF-α geninin ekspresyonu başlıca kemik iliği ve lenf düğümlerinde olmak üzere birçok doku ve organda gözlenmektedir. TNF-α sitokini; nöronlar, kardiyomiyosit ve düz kas hücreleri gibi hücreleri barındıran farklı dokulardaki kalsiyum homeostazını ve patofizyolojik rolleri etkiler [82,86].

TNF-α'nın transkripsiyonu genetik kontrol altında düzenlendiğinden, TNF-α genindeki farklı polimorfizmler, TNF-α'nın üretiminde farklı değişikliklere neden olabilir ve kanser, astım, allograft reddi, *Graft-versus-host* (GVHD) ve İskemik kalp hastalığı (İKH) gibi birçok farklı hastalığın sürecinde etkili olabilir. İlk kez 1998'de TNF-α geni bozukluğunun

çalışılmasından bugüne kadar, TNF-α gen polimorfizmleri ile İKH riski arasındaki ilişki üzerine çok sayıda çalışma bildirilmiştir. Çoğu çalışma TNF-α -238G/A (rs361525), -308G/A (rs1800629), -857C/T (rs1799724), -863C/A (rs1800630) ve -1031T/C (rs1799964) gibi gen polimorfizmleri için yapılmış olup bazı çalışmalarda farklı pozisyonlardaki düzensizliklerde araştırılmıştır. Bazı çalışmalar TNF-α gen polimorfizmlerinin İKH'na duyarlılığı değiştirebildiğini göstermiştir [84-86].

Solunum yollarında yangısal koşullar altında TNF-α, bronşiyal epitel hücreleri tarafından serbest bırakılabilir; Bu nedenle, solunum yolu hastalıklarının patogenezindeki rolünü ortaya koyma girişimlerinde bu sitokine odaklanan birkaç çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda TNF-α konsantrasyonu normal hastalara kıyasla astım, kronik rinosinüzit ve kistik fibroz (KF) olan hastalarda belirgin şekilde daha yüksek tespit edilmiştir [86].

Yakın tarihli çalışmalarda, TNF-α G-238A (rs361525), TNF-α G-308A (rs1800629), TNF-α T-857C'de (rs1799724) ve TNF-α T-1031C (rs1799964) pozisyonlarındaki promotor polimorfizmlerinin kanser riskini etkilediğini savunulmuştur. Bu nedenle TNF-α geninin genetik polimorfizmleri kanser risk faktörü adayı olarak düşünülmektedir. Bu çalışmalarda TNF-α G-308A (rs1800629) ve TNF-α G-238A (rs361525)'nın risk faktörü olduğu belirlenirken diğer polimorfizmler üzerindeki araştırmalar devam etmektedir [83].

TNF-α'nın plasentada, özellikle de trofoblastın ve kan damarlarının temel yapıları üzerinde düzenleyici etkileri olduğu gösterilmiştir [87].

Çeşitli veritabanlarında TNF geninin ilişkili olabileceği hastalıklar: astım; migren; genel tip değişken immün yetmezlik 2 (CVID-2); genel tip değişken immün yetmezlik 4 (CVID-4); ailesel genişlemeli osteoliz (FEO, *McCabe* hastalığı); skuamoz hücreli baş ve boyun karsinomu (HNSCC); immünoglobülin A yetmezliği tip 2 (IGAD-2); immün yetmezlik tip 16 (IMD-16); geç başlangıçlı retinal dejenerasyon (LORD); miyokard infarktüsü, duyarlılık, tip 1 (MCI-1); sıtmaya karşı duyarlılık ve direnç (MLRS); multipl skleroz duyarlılığı, tip 5 (MS-5); osteoporoz, otozomal resesif, tip 2 (OPTB-2), osteoporoz, otozomal resesif, tip 7 (OPTB-7), Paget kemik hastalığı, tip 2, erken başlangıç (PDB-2), çocuk Paget kemik hastalığı tip 5 (PDB-5, hiperfosfataz) ve TNF reseptörü ilişkili periyodik ateş sendromu (TRAPS) olarak bildirilmiştir [88].

Genel olarak makrofajlardan salgılanan TNF, yangısal özelliklere sahip olup çeşitli hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir.

2.7.2. İnterlökin 6 (İL-6)

İnsan interlökin-6 (İL-6) geninin uzunluğu 5 kilobaz (kb) olup, insan 7. Kromozomunun kısa kolunda bulunur (p15.3). İL-6 geni 6 ekzona sahiptir. CDF; HGF; HSF; BSF2; İL-6; BSF-2; İFNB2; İFN-beta-2 gibi farklı isimler ile de adlandırılmaktadır. Çok işlevli biyoaktif bir peptid olan İL-6 temel olarak mononükleer fagositlerden ve kısmen fibroblastlardan, T ve B lenfositlerinden ve vasküler endotel hücrelerinde eksprese edilir [82,88,89].

İL-6 geni yangı ve B hücrelerinin olgunlaşmasında görevli bir sitokini kodlar. Bu kodlanmış proteinin ayrıca otoimmün hastalıklar veya enfeksiyon halinde insanlarda ateşlenmeye sebep olan bir endojen pirojen olduğu gösterilmiştir. Protein öncelikle akut ve kronik yangı bölgelerinde üretilir ve buradan seruma salgılanır; interlökin 6 reseptörü alfa (Ilr-α) vasıtasıyla transkripsiyonel bir yangısal tepki başlatır. Bu genin işlevi, diabetes mellitus ve systemic juvenile rheumatoid arthritis duyarlılığı da dahil olmak üzere çok çeşitli yangı ile ilişkili hastalıkla ilişkilendirilir. İL-6 geninin ekspresyonu sırasıyla idrar kesesi, apandis, safra kesesi, kemik iliği ve akciğer başta olmak üzere birçok doku veya organda gözlenebilir [82].

İL-6, B hücrelerinin ve plasmoblastların sağkalımını, popülasyon genişlemesini ve olgunlaşmasını kontrol eder. Örneğin, STAT3 tarafından transkripsiyon faktörü Blimp-1'in düzenlenmesi, antikor sekresyonuna bağlıdır ve büyük miktarda immünoglobülin üreten uzun ömürlü plazma hücreleriyle ilişkilidir. İL-6 ayrıca T hücrelerinde İL-21'in ekspresyonunu kontrol eder. STAT3'ün İL-6 ve İL-21 tarafından aktivasyonu Bcl-6 ekspresyonunu ve Foliküler T Hücrelerinin (TFH) üretimini arttırır. B hücrelerinin tanımlanmış Toll-benzeri reseptörler vasıtasıyla doğal aktivasyonu ayrıca B hücreleri tarafından İL-6 üretimini kontrol eder ve İL-1β ile kombinasyon halinde İL-6, İL-10 salgılayan düzenleyici B hücrelerinin üretimi için gerekli sinyalleri sağlar. İL-6, T hücrelerinin çoğalmasını, sağ kalımını ve plastisitesini kontrol eder ve efektör sitokin üretimini modüle eder. İL-6; Th1 veya Th2 hücrelerinin çoğalmasını ve hayatta kalmasını destekleyici rol oynar. İL-6; tanımlanmış efektör popülasyonlarının (yardımcı T

hücrelerinin Th17, Th22 ve TFH alt kümeleri) gelişimi için veya inhibisyonu için (Treg hücreleri) kritik rol oynar [90].

İL-6 geni; EGFR tirozin kinaz inhibitör direnci, Antifolat direnci, Sitokin-sitokin reseptörü etkileşimi, HIF-1 sinyalizasyon yolağı, Hücresel yaşlanma, Toll-benzeri reseptör sinyalizasyonu yolağı, NOD-benzeri reseptör sinyalizasyonu yolağı, Jak-STAT sinyalizasyonu yolağı, Th17 hücre farklılaşması, TNF sinyalizasyonu yolağı, İgA üretimi için intestinal immün iletişim ağı, İnsülin direnci, Romatoid artrit, Graft-versus-host hastalığı ve birçok patojene yanıt ilişkili yolaklar dahil çeşitli hücresel yolaklar içerisinde yer almaktadır. Örneğin DNA hasarı ve stres kaynaklı tetiklenen kaskadlar ile işlevselleşen İL-6 yetişkinlerde İL-1α, İL-8, TGFβ ve PAI-1 ile birlikte senesens ilişkili salgısal fenotipte yer alıp parakrin hücresel yaşlanmayı gerçekleştirirler. TLR sinyalizasyon yolağında TNF-α, İL-1β ve İL-12 gibi yangısal sitokinler arasında yer alarak pro-enflamatuvar etkilere neden olurlar. Nod-benzeri reseptör sinyalizasyon yolağında da aynı etkiyi MAPK ve NFκB sinyalizasyon yolakları sonrasında TNF-α, İL-1β ve İL-18 ile birlikte gösterirler. TNF, TNFRSF1A reseptörüne bağlandığında gelişen basamakların yangısal sitokin ürünlerinden biri olarak ortaya çıkar. İg-A üretimi sürecinde dendritik hücrelerden salınarak, B1 hücrelerinin plazma hücresine farklılaşması yönünde etki sağlar. Th-17 farklılaşması basamaklarında JAK1/2-STAT3 yolağı üzerinden Th-17 farklılaşmasına olumlu destek sağlar [85].

Çeşitli veri tabanlarında İL-6 geni, Serebral arteriovenöz malformasyon, *Graft-versus-host* hastalığı, *Castleman* hastalığı, Juvenil idiyopatik artrit (JIA), Romatoid artrit, yangısal barsak hastalığı tip 1 (IBD-1) ve insüline bağımlı diyabet (IDDM) gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir [85,88].

Tümör patogeneziyle ilgili çalışmaların ilerlemesiyle birlikte, tümörlerin oluşumu ve ilerlemesi, konakçı bağışıklık sisteminin tümörler üzerindeki kontrolünün kaybolmasıyla yakından ilişkili olduğu ortaya çıkmıştır. Sitokinler immün yanıtlarda önemli düzenleyici görevler alırlar ve bazıları tümörlerin büyümesini ve istilasını doğrudan etkiler. Daha önceki araştırmalara göre bir otokrin veya parakrin faktör olarak İL-6, tümör hücrelerine direkt etki ederek tümör büyümesini düzenlemekle kalmaz aynı zamanda anti-apoptoz, neovaskülarizasyon ve akut faz yanıtlarını tetikleyerek konak ortamını etkiler ve tümör hücrelerinin büyümesini de indirekt olarak destekler. Son yıllarda, malign tümörlerin

oluşumu ve gelişmesinde İL-6'nın rolü araştırılmaya devam edilmiş ve bu sitokinin anormal ekspresyonu, myeloma, böbrek (renal) kanseri, hepatoselüler karsinoma, akciğer kanseri ve özofageal karsinoma gibi bir çok tümör dokularında gözlemlenmiştir [89].

Birçok araştırma, tümörün kronik yangı bölgelerinde ortaya çıktığını göstermiştir. Enflamatuvar hücreler, diğer mezenkimal hücreler ve tümör hücreleri tarafından salgılanan yangısal sitokinlerin upregülasyonu, tümörün oluşumunu kolaylaştırabilir ve tümör hücresi çoğalmasını ve istilasını arttırabilir. Çok sayıda yangısal sitokin arasından interlökin-6 (İL-6) dikkat çekerek, sürekli çalışmalara dahil edilmiştir. Bu çalışmalar neticesinde tümörün oluşması ve çeşitli kanserlerin progresyonunda İL-6'nın belirgin bir rol oynadığını gösteren bolca kanıt elde edilmiştir. İL-6, insan malignitelerinde tümör büyümesi, invazyon ve metastaza dahil olan pleiotropik (birden fazla fenotipik özelliği etkilemesi durumu) bir sitokin olarak tanımlanmıştır [91]. Örneğin Nguyen ve diğerleri, İL-6'nın prostat tümörogenezinin başlaması, tümör büyümesi, metastaz ve kemoterapiye direnç süreçlerinde pivotal bir modülatör olduğunu göstermiştir [92]. Zhang ve diğerleri İL-6'nın pankreatik intra-epitelyal neoplazinin (PanIN) sürekliliği ve ilerlemesi için gerekli olduğunu bildirmiştir [93]. Taniguchi ve diğerleri, İL-6 serum düzeylerinin, akciğer, özofagus, meme bezi, yumurtalık ve böbrek kanserlerindeki kötü prognoz, tümör yükü, sağkalım ve ileri evre ile korelasyonunu özetlemiştir [94]. Buna ek olarak, yakın tarihli birçok çalışmada, kolon kanseri oluşumu ve ilerlemesinde İL-6'nın rol aldığı savunulmuştur. Bu çalışmalarda kolorektal kanser hastalarında serum İL-6 düzeylerinin yükseldiği gösterilmiştir. Ayrıca *in vitro*'da İL-6'nın kolorektal kanser epitel hücrelerinin büyümesini teşvik ettiği gösterilmiştir [91].

2.7.3. İnterlökin 10 (İL-10)

İnsan interlökin-10 (İL-10) geninin uzunluğu 4,7 kilobaz (kb) olup, insan 1. Kromozomunun uzun kolunda bulunur (q32.1). İL-10 geni 5 ekzona sahiptir. CSIF; TGIF; GVHDS; İL-10; IL10A gibi farklı isimler ile de adlandırılmaktadır. İnterlökin 10 transkript başlatma mekanizması uyarana, ortama ve hücre türüne bağlıdır. Bu faktörler ayrıca İL-10 sinyalizasyonunun gücünü ve süresini de etkiler. Öncelikle myeloid ve lenfoid kaynaklı doğal (innate) immün sistemin efektör hücre tipleri (Monosit, Makrofaj, Myeloid Dendritik Hücre) ve T lenfositler ($CD4^+$ T helper, Treg) birincil İL-10 kaynağını oluştururlar. γδT hücreleri, doğal öldürücü hücreler (NK), mast hücreleri ve granülositlerin yanı sıra epitel

hücreleri keratinositler, hepatositler ve hatta tümör hücreleri de dahil olmak üzere diğer hücre tipleri ise kısıtlı kapasitede İL-10 ekspresyonu gerçekleştirmektedir [82,88,95].

Bu gen tarafından kodlanan protein esasen monositler tarafından üretilen bir sitokindir ve daha az oranda da lenfositler tarafından üretilir. Bu sitokin, immün yanıtın düzenlenmesi ve yangıda pleiotropik etkilere sahiptir. Th1 sitokinlerinin, MHC sınıf II Ag'lerin ve makrofajlar üzerindeki kostimülatör moleküllerin ekspresyonunu azaltır. B hücrelerinin sağkalımını, çoğalmasını ve antikor üretimini de arttırır. Bu sitokin, NF-kappa B aktivitesini bloke edebilir ve JAK-STAT sinyal yolunun düzenlenmesinde yer alır. Nakavt fare çalışmaları, bu sitokinin bağırsakta önemli bir immün yanıt düzenleyicisi olarak işlev gördüğünü ileri sürmektedir. Bu gendeki mutasyonlar, HIV-1 enfeksiyonu ve romatoid artrit için artmış duyarlılıkla ilişkilidir [82].

İnterlökin 10 (İL-10), patojenlere karşı konak immün yanıtının sınırlandırılmasında merkezi bir rol oynayan, böylece konağa hasarın önlenmesi ve normal doku homeostazının korunmasını sağlayan anti-enflamatuvar özellikte güçlü bir sitokindir. İL-10'un bozuk işlevleri, birçok otoimmün hastalığın gelişmesi riskini artırır. Yanı sıra enfeksiyona yanıt olarak gelişen immünopatoloji ile ilişkilidir. İL-10 eksikliği veya anormal ekspresyonu, mikrobiyal enfeksiyonda yangısal yanıtı artırabilir, aynı zamanda yangısal barsak (*bowel*) hastalığının ve bazı otoimmün hastalıkların gelişimine de neden olabilir. Kusurlu İL-10 ekspresyonu veya sinyalizasyonu, akut bir enfeksiyon sırasında patojenlerin temizlenmesini artırabilir, aynı zamanda yangısal cevabı abartır ve bu da artmış immünopatoloji ve doku hasarına neden olur. Bunun aksine, bazı patojenler de konak immün tepkisini sınırlamak için İL-10'un immün baskılayıcı kapasitesinden yararlanarak kalıcı enfeksiyona neden olabilirler. Sonuç olarak, İL-10 merkez anti-enflamatuvar yanıta aracılık etmede büyük ölçüde tek başına bir rol oynamaktadır ve dolayısıyla patolojiye bağlı kusurlu İL-10 üretimine karşı İL-10'un hücresel kaynaklarını tanımlamakla birlikte İL-10'un düzenlenmesini sağlayan moleküler mekanizmaları yönlendirici terapötik stratejilerin geliştirilmesinde kritik öneme sahiptir. İL-10 başlangıçta T yardımcı 2 kökenli sitokin olarak tanımlanmıştır ancak İL-10'un belirli T hücre alt grupları ile sınırlı olmadığı ve neredeyse tüm lökositlerde üretildiği yaygın olarak kabul edilmiştir. İn vivo olarak İL-10'un başlıca kaynakları T yardımcı hücreleri, monositler, makrofajlar ve dendritik hücreleri içerir, bununla birlikte B hücreleri, sitotoksik T hücreleri, NK hücreleri, mast hücreleri ve nötrofiller ve eozinofiller gibi granülositler sayısız immün efektör hücre tipi

bazı bağlamlarda İL-10 üretebilirler. Buna ek olarak, epitelyal hücreler ve keratinositler gibi efektör hücre tipleri, enfeksiyona veya doku hasarına olduğu kadar tümör hücrelerine de yanıt olarak İL-10 üretebilir [95].

İL-10 immün baskılayıcı aktivitesine, heterodimerik İL-10 reseptörü (İL-10R1, İL-10R2) aracılık etmektedir. İL-10 reseptör kompleksi, sayısız hücre tipinde değişen seviyelerde eksprese edilmesine rağmen, monositler ve makrofajlar İL-10'un birincil kaynağı gibi gözükmektedir. Reseptörü ile ligasyon, immün düzenleyici genlerin ekspresyon profilinde büyük değişimlere neden olan JAK / STAT yolağını aktive eder. Böylece pro-enflamatuvar düzenleyicilerin salınımının inhibisyonuna, antijen sunumu ve fagositozun azalmasına hizmet eder. Bu hücrelerin inhibisyon, tolerans ve *scavenger* (çöpçü) işlevleri ise desteklenir. Buna ek olarak, interlökin-1 reseptör antagonisti (İL-1RA), çözünür TNFα reseptörü ve interlökin 27 (İL-27) gibi anti-enflamatuvar moleküllerin salınması yoluyla veya T lenfositleri ile fiziksel etkileşimler yoluyla İL-10, doğrudan veya dolaylı olarak hücre gelişimini engelleyebilir, alerjik yanıtı baskı altına alabilir ve regülatuar T hücre işlevini arttırabilir. Buna ek olarak, İL-10, mast hücreleri, CD8 + T hücreleri, NK hücreleri ve B hücreleri de dahil olmak üzere bazı immün hücre tiplerinin aktivasyonunu ve çoğalmasını artırabilir, ancak bu tür aktivitelerin moleküler mekanizmaları ve işlevsel sonuçları henüz açıklığa kavuşturulmamıştır. Son olarak, bazı patojenler, İL-10 reseptörüne bağlanan İL-10 homologlarını eksprese ederek endojen ligandınkine benzer immünolojik etkiler uygulayarak enfeksiyon ve devamlılık için olumlu bir ortamı teşvik edebilir. Bu duruma en iyi örnek Epstein-Barr virüsünün İL-10'u taklit etme, BCRF1 ekspresyonu gerçekleştirmesidir [95].

İL-10'un sırasıyla en sık ekspresyonunun gözlendiği apandis, lenf düğümü, safra kesesi, idrar kesesi haricinde farklı organ ve dokularda gözlenebilmektedir [82]. JAK-STAT sinyal yolağı, T Hücre reseptörü sinyal yolağı, intestinal sistemde İgA üretimi yolaklarında, çeşitli hastalık ve patojen enfeksiyonuna yanıt ilişikili yolaklarda İL-10 rol almaktadır [85]. Özellikle JAK-STAT sinyal yolağında, İL-10 ile İL-10R etkileşimi STAT1, STAT3 ve bazı hallerde STAT5 aktivasyonuna neden olur. STAT3, immün hücreler üzerindeki İL-10 etkileri için kritik öneme sahiptir [96].

2.7.4. İnterlökin 12A (İL-12A)

İnsan interlökin-12A (İL-12A) geni, insan 3. Kromozomunun uzun kolunda bulunur (q25.33) ve 7 ekzona sahiptir. P35; CLMF; NFSK; NKSF1 ve İL-12A gibi farklı isimler ile de adlandırılmaktadır. İL12A, bir heterodimerik sitokin olan interlökin-12'nin (İL-12) bir alt birimini (*natural killer cell stimulatory factor* 1, *cytotoxic lymphocyte maturation factor* 1, p35) kodlar. Bu sitokin enfeksiyon sırasında antijen sunan hücreler, fagositik hücreler ve B hücreleri tarafından üretilir [82,88,97].

İlk kez keşfedildiğinde, İL-12'nin CD8+ sitotoksik lenfositleri ve doğal öldürücü hücreleri (NK) aktive ettiği bildirilmiştir. Daha sonra, İL12'nin naif CD4+ T hücrelerinin olgun Th1 ve Th2 efektör hücresine farklılaşmasını düzenleyebileceği ve T hücre bağımsız interferon-γ'nın uyarımı için gerekli olduğu ortaya çıkarılmıştır [97].

İL-12A ekspresyonu sırasıyla özafagus, akciğer, beyin, dalak, kemik iliği ve lenf düğümlerinde ve daha az miktarlarda diğer doku ve organlarda gözlenebilmektedir [82].

Son zamanlarda, İL-12'nin, Sjögren sendromu (SS), romatoid artrit (RA), Graves hastalığı, multipl skleroz ve astım gibi çeşitli otoimmün ve yangısal hastalıklarla ilişkili olduğu bulundu [97]. Ancak İL-12A'nın doğrudan ilişkili olduğu bir hastalık şu ana kadar bildirilmemiştir. İL-12A'nın; Tip I diabetes mellitus, yangısal barsak hastalığı (IBD), Allograft reddi ve farklı patojenlere (Leishmania, Legionella, Tüberküloz, İnfluenza A ve Malaria gibi) yanıt ile ilişkili yolaklarda yer aldığı bildirilmiştir. Ayrıca Toll-benzeri reseptör sinyal yolağında, RIG-I-benzeri reseptör sinyal yolağında, JAK-STAT yolağında ve Th1 ve Th2 farklılaşmasında rol almaktadır. İL-12A ve İL-12B, Toll benzeri reseptör ve RIG-I benzeri reseptör sinyalizasyonlarında NF-γB'nin uyarımıyla salınan yangısal sitokinler arasındadırlar ve pro-enflamatuvar etki gösterirler. T hücre plastisitesinde STAT 4 aktivasyonu ve Th1 yönünde plastisiteye neden olurlar. Böylece hücre için patojenlerin eliminasyonuna yönelik Th1 hücresel immün yanıtları gözlenir [85,88].

Bazı patojenler İL-12A üretimini bastırmak için mekanizmalar geliştirerek Th1 yönünde plastisiteyi baskılarlar. Bu duruma *Epstein-Barr Virüs* (EBV) miRNA'larının dolaylı olarak İL-12A salınmasını engellemesi örnek verilebilir [98].

2.7.5. İnterlökin 12B (İL-12B)

İnsan interlökin-12B (İL-12B) geni, insan 5. Kromozomunun uzun kolunda bulunur (q33.3) ve 8 ekzona sahiptir. CLMF; NKSF; CLMF2; IMD28; IMD29; NKSF2 ve İL-12B gibi farklı isimler ile de adlandırılmaktadır. İL-12B, interlökin 12'nin bir altbirimini kodlar (*natural killer cell stimulatory factor* 2, *cytotoxic lymphocyte maturation factor* 2, *p*40), bu sitokin T ve doğal öldürücü hücrelere etki eder ve geniş bir biyolojik aktiviteye sahiptir. İnterlökin 12, bu gen tarafından kodlanan 40 kD sitokin reseptörü alt birimi ve İL12A tarafından kodlanan bir 35 kD altbiriminden oluşan bir disülfid bağlı hetero dimerdir. İnterlökin-12 (İL12) esasen antijen sunan hücreler (APC'ler) tarafından üretilen önemli bir immün sistem düzenleyici sitokindir ve çoklu biyolojik işlevlere sahiptir. Patojenlere (bakteriler, virüsler, hücre içi parazitler ve maya benzeri mantarlara) cevaben, ağırlıklı olarak fagositler (monositler/MΦ ve nötrofiller) ve dendritik hücreler tarafından üretilir [82,88,99].

Bu sitokin, aktive makrofajlar tarafından eksprese edildiğinde Th1 hücrelerinin gelişiminin temel bir uyarıcısı olarak görev yapar. Hücre içi bir patojene karşı uzun süreli korumanın sağlanması için yeterli sayıda bellek/efektör Th1 hücresinin bulundurulmasında önemli olduğu bulunmuştur. Multipl skleroz (MS) hastalarının merkezi sinir sisteminde İL-12B geninin fazla ekspresyonu tespit edilmiştir, bu da hastalığın patogenezinde rolü olduğunu düşündürmektedir. Bu genin promoter bölgesindeki polimorfizmin, çocuklarda atopik ve non-atopik astım şiddeti ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [82,100].

İL-12B ekspresyonu başta dalak ve lenf düğümleri olmak üzere sırasıyla mide, akciğer, apandis, testis, özafagus, safra kesesi ve idrar torbasında ve daha az miktarlarda diğer doku ve organlarda gözlenebilmektedir [82].

İL-12B'nin; Tip I *diabetes mellitus*, yangısal barsak hastalığı (İBD), allograft reddi ve farklı patojenlere (Leishmania, Legionella, Tüberküloz, İnfluenza A ve Malaria gibi) yanıt ile ilişkili yolaklarda yer aldığı bildirilmiştir. Ayrıca Toll-benzeri reseptör sinyal yolağında, RIG-I-benzeri reseptör sinyal yolağında, JAK-STAT yolağında ve Th1 ve Th2 farklılaşmasında rol almaktadır [85,88].

İL-12A ve İL-12B, Toll benzeri reseptör ve RIG-I benzeri reseptör sinyalizasyonlarında NF-γB'nin uyarımıyla salınan yangısal sitokinler arasındadırlar ve pro-enflamatuvar etki gösterirler. T hücre plastisitesinde STAT 4 aktivasyonu ve Th1 yönünde plastisiteye neden olurlar. Böylece hücre için patojenlerin eliminasyonuna yönelik Th1 hücresel immün yanıtları gözlenir. Tip I diyabette, pankreatik adacıklarda yakalanan antijenlerin, ASH'lar tarafından pankreatik lenf düğümündeki CD4+ Th1 hücrelerine sunumu sırasında Th1'leri etkilerler. Esasen çalışmaların çoğunda İL-12A ile İL-12B işlevsel olarak bir bütün (İL-12) olarak incelenmiştir ve tanımlamalar ortak yer almaktadırlar. Ancak İL-12B; İL-12B eksikliği sonucu oluşan hastalıklar ve kanserde büyüme baskılayıcı rolü ile İL-12A'dan bağımsız farklı çalışmalara konu olmayı başarmıştır [85].

İL-12B eksikliği, İFN-γ ve İL-12 ekseni üzerinde bazı hastalıklara neden olabilmektedir. İnterferon-gamma (İFN-γ) ve İL-12 ekseni; mikobakteriler, salmonella ve listeria gibi hücre içi mikroplara karşı savunma için kritik öneme sahiptir. İFN-gama'nın her iki zincirindeki mutasyonlar, mikobakterilere karşı aşırı hassasiyetine yol açar ve tedavisi çok zordur. İL-12 p40 veya İL-12R beta 1'deki mutasyonlar klinik olarak hafif seyreder ve İFN-γ ile tedaviye devam edilebilir, çünkü bu reseptör hala bozulmamıştır. STAT1'deki tüm resesif geçişli mutasyonlar, İFN-γ ve İFN-α sinyallerini etkilediğinden diğerlerinden daha şiddetlidir [85].

İnterlökin (İL) -12B gen polimorfizmleri ile romatoid artrit (RA) arasındaki ilişkiye yönelik yayınlanmış güncel makaleler bulunmaktadır ancak çelişkilidir [101].

2.7.6. Nitrik oksit sentaz 2 (NOS2)

İnsan nitrik oksit sentaz 2 (NOS2) geni, 37 kb uzunluğunda olup, insan 17. kromozomunun uzun kolunda bulunur (q11.2). NOS2, 29 ekzona sahiptir. NOS2; NOS2A, uyarılabilir, hepatosit; nitrik oksit sentaz (iNOS); nitrik oksit sentaz, makrofaj gibi isimler ile adlandırılmaktadır. Nitrik oksit, nörotransmisyon, antimikrobiyal ve antitümöral aktiviteler de dahil olmak üzere birçok proseste biyolojik mediyatör olarak görev yapan bir reaktif serbest radikaldir. Bu gen, karaciğerde eksprese olan nitrik oksit sentazı (NOS) kodlar. NOS, lipopolisakarit ve bazı sitokinlerin kombinasyonu ile uyarılabilir. NOS ailesi, üç izoformdan oluşur: nöronal NOS (nNOS, tip I), endotelyal NOS (eNOS, tip III) ve uyarılabilir NOS (iNOS, tip II). nNOS ve eNOS, kalsiyuma bağımlı, yapısal olarak

sentezlenen enzimler iken, iNOS, kalsiyumdan bağımsızdır ve hücre hasarına ve pro-enflamatuvar sitokinlere tepki olarak büyük oranda doğal immün sistemin hücreleri tarafından eksprese edilir [82,102,103]. İnsan makrofajlarında, patojenlerin (*Mycobacterium avium-intracellulare, Trypanasoma cruzi, Leishmania major)* NO aracılı öldürülmesi sırasında, oto-immün ve kronik yangısal hastalıklara yanıt sırasında, çeşitli tümörlerde (Meme, akciğer) veya kalp damar tıkanıklığı gibi çeşitli hastalık durumlarında iNOS eksprese edilir [104].

Nitrik oksit (NO), tüm vücutta farklı işlevlere sahip bir mesajcı moleküldür. Beyin ve periferik sinir sisteminde NO, bir nörotransmitterin birçok özelliğini gösterir. NO aynı zamanda kan basıncını düzenleyen endotel kaynaklı gevşetici faktör (endothelium-derived relaxing factor, EDRF) aktivitesinden sorumludur. Makrofajlarda NO, tümörisidal ve bakterisidal etkilere aracılık eder. NO sentaz (NOS) inhibitörlerinin bu etkileri engellediği gösterilmiştir. Nöronal NOS (NOS1) ve makrofaj NOS belirgin izoformlardır [105]. Her iki formu da; FAD, FMN, NADPH ve tetrahidrobiopterin gibi bazı elektron vericilere ihtiyaç duyar ve bu gereksinimleri onları diğer oksidatif enzimlerden farklı kılar [102].

Lowenstein ve diğerleri (1992), NOS'un makrofaj formu için cDNA'yı klonlamış ve enzimi insan böbrek hücrelerinde eksprese etmiştir. Makrofaj enzimi ile nöronal enzim %50 dizi benzerliği göstermiştir [105]. Nöronal formda olduğu gibi, NOS2 de FAD, FMN ve NADPH için tanıma bölgelerine sahiptir ve ayrıca bir kalmodulin bağlanma bölgesi bulunmaktadır. Makrofaj NOS mRNA'sının uyarılabilir olduğu bulunmuştur; sessiz (quiescent) makrofajlarda veya dalakta bulunmamasına rağmen endotoksin tedavisinden 2-6 saat sonra belirgin bir biçimde ortaya çıkmaktadır. Nitrik oksit, nitrik oksit sentaz(lar) etkisi ile L-arginin'den sentezlenir ve bir yardımcı ürün olan sitrulin'i (L-citrulline) üretir. NO sentazlar ve P450 tipi heme proteinleri; NADPH, FMN ve tetrahidrobiopterin bağımlıdır [102].

NO sentaz endotel hücrelerinde ve nöronal dokularda eksprese edilir. Aktivasyonu Ca (2+) ve kalmodulin gereksinimi gösterir. Aksine, NO sentaz, makrofajlarda ve diğer bazı dokularda uyarılabilir. Bu hücrelerde uyarılabilir NO sentaz (iNOS), aktivite için eksojen Ca (2+) veya kalmodulin gerektirmez ve uyarım glukokortikoidler tarafından engellenir. NO sentaz, eklem kondrositlerinde uyarılabilir. İnterlökin-1 beta (İL1B) uyarımın Ca(2+) bağımsız ve marjinal olarak glukokortikoidlerden etkilendiği insan kondrositlerinde enzimi

uyarır. İnsan kondrositlerindeki iNOS, endotelyal NOS ve nöronal NOS ile benzer (%51-54) amino asit dizilerine sahiptir. NOS uyarımı daha önceki çalışmalarda sadece hepatositlerde gösterilmiştir [102].

Diefenbach ve diğerleri (1999) farede Leishmania parazitine karşı doğal immün yanıtta İL-12 ve NOS2 arasındaki ilişkiyi araştırmıştır. NOS2 aktivitesinin yokluğunda İL-12'nin NK hücrelerini sitotoksite için veya IF-γ salınımı uyaramamıştır ve tirozin kinaz 2'yi aktive etmede başarısız olmuştur; dolayısıyla Leishmania eliminasyonunu sağlayamamıştır. NK hücrelerinde İFN-α/β tarafından tirozin kinaz 2 aktivasyonunda NOS2 gereklidir. Bu sebeple, NOS2 kaynaklı NO, doğal immünitede sitokin sinyalizasyonu ve işlevi için bir ön şarttır [106].

İnsan pankreatik adacıklarının belirli bir sitokin karışımına maruz bırakılması iNOS ekspresyonunu uyarır, beta-hücre işlevini bozar ve apoptozu uyarır. Johannesen ve diğerleri (2001) insan NOS2 geninin tüm 27 ekzonunu taradı ve Danimarka'da ülke çapında İnsülün Bağımsız Diabetes Mellitus (IDDM) ile NOS2 polimorfizmlerinin ilişkilerini inceledi. Çalışma sonucunda insan NOS2 geninin bir hasta alt grubunda IDDM ile bağlantısının olabileceği ve bunun nitrik oksidin patojenik rolünü desteklediği sonucuna varılmıştır [107].

Nathan ve Shiloh (2000), enfeksiyonların, mikrobik ürünlerin ve sitokinlerin insan kanındaki mononükleer fagositlere uygulandıklarında NOS2 ekspresyonunu sürekli olarak uyarmadığını, ancak bu uyaranların kemirgen doku makrofajlarında bu uyarımın üretimi başlattığını belirtti. Bu nedenle de bu çalışmanın sonucunda kan makrofajları yerine doku makrofajlarının çalışılması önerilmektedir [108].

Vouldoukis ve diğerleri (1995), düşük afiniteli İgE reseptörünün (CD23) bağlanmasının *in vitro*'da insan monosit kaynaklı makrofajlar tarafından NOS üretimine neden olduğunu bulmuştur. CD23 ligasyonu, NOS inhibitörü NG-monometil-L-arginin monoasetat (NMMA) tarafından engellenebilen Leishmania parazitlerinin hücre içi öldürülmesine yol açmıştır [109].

Nicholson ve diğerleri (1996), tüberküloz (TB) hastalarından gelen akciğer makrofajlarının potansiyel olarak mikobakterisidal miktarlarda NOS2'yi eksprese ettiğini bildirmiştir [110].

Immünoblot ve immünohistokimyasal analizler kullanarak, Facchetti ve diğerleri (1999) bulaşıcı granülom dokularının yanı sıra sarkoidozis ve Kikuchi hastalığında; CD68 pozitif makrofajların sitoplazmasında 130-kD NOS2 proteininin ekspresyonunu gösterdi ancak yabancı cisim granülomları veya Omenn sendromunda bulunmadı [111].

Choi ve diğerleri (2002) 8 tüberküloz (TB) hastasının karaciğeri üzerinde yaptığı araştırmada yangısal bölgedeki CD68 pozitif epitel makrofajların iNOS, eNOS ve TNF-α eksprese ettiğini buldu. Ancak kontrol olarak alınan kanser hastalarının normal dokularında gözlenmedi [112].

iNOS degredasyonu 26S proteozom yolağı ile gerçekleştirilmektedir. iNOS'un degredasyonu için ubiquitinlenmesi gereklidir [113].

iNOS tarafından üretilen NO, migren ile de ilişkilendirilerek, tedavi üzerinde insan ve hayvan çalışmalarına konu olmuştur. Bu doğrultuda Reuter ve diğerleri (2002) NO donor glyceryl trinitrate (GTN) 'ın, sıçan makrofajlarında NOS2A ekspresyonuna neden olduğunu ve bunun NFκB1'in artmış aktivitesi ile yönetildiğini göstermiştir. Parthenolide'in yangı durumunda ve migrende NOS2A ekspresyonunu NFκB1'in inhibisyonu ile durduğu saptanmıştır [114].

Kim ve diğerleri (2005), iNOS'un spesifik olarak siklooksijenaz-2'ye (COX2) ve S-nitrosilatlara bağlandığını böylece COX2 katalitik aktivitesini arttırdığını gösterdi. Seçici olarak iNOS-COX2 bağlanmasını kesintiye uğratmak, NO aracılı COX2 aktivasyonunu engellemiştir. Kim ve diğerleri (2005), iNOS ve COX2 arasındaki moleküler sinerjinin, yangısal cevapların önemli bir mekanizmasını temsil edebileceğini önermektedir [115].

Tezuka ve diğerleri (2007) İgA sınıf değişimi (switch) rekombinasyonunun iNOS yoksun (iNOS-null) farelerde bozulduğunu göstermiştir. iNOS, T-hücre bağımlı İgA sınıf değişimi (switch) rekombinasyonunu, transforme edici büyüme faktörü-beta reseptör (TGFBR1) yoluyla; T-hücre bağımsız İgA sınıf değişimi (switch) rekombinasyonunu proliferation-inducing ligand (APRIL, TNFSF13) ve B-cell-activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) yoluyla düzenlemektedir. iNOS, komensal bakterilerin TLR tarafından tanınmasına cevaben, mukozaya bağlı lenfoid doku (MALT) dendritik hücrelerinde eksprese edilir [116].

Eyler ve diğerleri (2011) yüksek derecede tümörejenik insan glioma kök hücrelerinin (GSC'ler), artmış NOS2 ekspresyonu yoluyla yüksek NO ürettiğini buldular. Bu durumu normal nöral öncül hücrelerde saptamamışlardır [117]. Nairz ve diğerleri (2013), NOS2 yoksun farelerdeki makrofajların, ferroportin-1'in (FPN1 veya SLC40A1) ekspresyonunda azalma olduğunu gösterdi. Nos2-yoksun fare makrofajları, indirgenmiş Fpnl aktivitesinden ötürü artmış demir içeriğine sahipti [118]. NOS2, Dünya'da en sık görülen kanserlerden 9.su olan özafagal kanser sürecinde de ve diğer kanserlerde COX2 ile birlikte sürekli anjiyonegezi tetikleyerek yer almaktadır [85]. NOS2; Arginine biosentezi, Arginin ve Proline metabolizmasında, Metabolik yolaklarda, Kalsiyum sinyalizasyon yolağında ve bazı patojenlere yanıt ilişkili yolaklarda yer almaktadır. Arginin biyosentezinde (üre döngüsünde) ve Arginin-Prolin metabolizmasında L-Arginin'den L-Sitrulin ve NO üretimi ile yer alır [85].

2.7.7. Arjinaz 1 (ARG1)

İnsan Arjinaz 1 (ARG1) geni insan 6. Kromozomunun uzun kolunda bulunur (q23.2) ve 8 ekzona sahiptir. Arg-karaciğer olarak da bilinmektedir [82,88].

Arg-1 ekpresyonu başta karaciğer olmak üzere kemik iliği ve deride de gözlenmiştir. Arginin biyosentezi, Arginin ve prolin metabolizması gibi yolaklarda yer almaktadır [82,85].

Arjinaz, üre döngüsünün son adımında yer alır. ARG1 (6q23.2) ve ARG2 (14q24.1) olmak üzere iki formda bulunur. ARG-1 tarafından kodlanan ve Arg-karaciğer olarak adlandırılan izoform veya A-I izoformu, karaciğerdeki arjinaz aktivitesinin % 98'ine katkıda bulunur, aynı zamanda kırmızı kan hücrelerinde (alyuvarlar) de bulunur. ARG2, böbrekte baskın olan mitokondriyal ya da A-II izoformunu kodlar [85,102].

Arg-1; L-arginin'in L-ornithine ve üreye hidrolizini katalize eder. ARG1 ve nitrik oksit sentaz (NOS) ortak bir substrat olarak L-argini paylaştığından, ARG1, NOS'un rekabetçi bir inhibitörü olarak görülebilir. İnsanlarda Arg-1 ekspresyonu, diğer periferik kan lökositleriyle karşılaştırıldığında en yüksek oranda nötrofillerde gözlenir ve nötrofillerden salınan Arg-1 proteini, T lenfosit CD3ζ zincirinin downregülasyonu yoluyla T lenfosit

çoğalmasını baskılar. Bu durum doğal immün sistemin hücreleri tarafından üretilen Arg-1'in adaptif immün yanıta etkisini örneklemektedir [119].

İmmünolojik çalışmalarla, Spector ve diğerleri (1983) alyuvar ve karaciğerdeki arjinazın % 90'ının antikor ile çökeldiğini, buna karşılık böbrek, beyin ve gastrointestinal sistemdeki arjinazın yalnızca % 50'sinin buna tepki verdiğini bulmuştur. Arjinaz eksikliği olan hastaların kırmızı kan hücrelerinde normal miktarda enzimatik olarak inaktif arjinaz olduğu, ancak böbrek biyopsilerinde enzimatik olarak aktif arjinazın bulunduğu tespit edilmiştir. Bulgular, 2 genetik lokus tarafından tanımlanan 2 tip arginin proteinini göstermiştir [120].

Colegio ve diğerleri (2014), tümör hücreleri tarafından üretilen ve aerobik veya anaerobik glikolizin bir yan ürünü olan laktik asidin, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ekspresyonunu ve tümör ilişkili makrofajların M2 benzeri plastisitesini uyararak sinyalizasyonda kritik bir göreve sahip olduğunu göstermiştir. Araştırmacılar aynı zamanda laktik asitin bu etkisine, hipoksiya-uyarılabilir faktör 1-alfa'nın (HIF1A) aracılık ettiğini ortaya koymuştur. Son olarak, makrofajlar tarafından laktat ile uyarılan Arg-1'in ekspresyonunun tümör büyümesinde önemli bir rol oynadığını gösterdiler. Colegio ve diğerleri (2014), bulgularının makrofajlar ve tümör hücreleri de dahil olmak üzere etkileşimde oldukları hücreler arasında bir iletişim mekanizması tanımladığını bildirdiler. Bu iletişimin normal dokularda homeostazı teşvik etmek için gelişmiş olacağı, ancak tümör büyümesini teşvik etmede de rol oynayabileceği düşünülmektedir [121].

Arg-1 genindeki farklı tip mutasyonlar arjinaz noksanlığına ve farklı patolojilere neden olmaktadır. Bu enzimin kalıtsal noksanlığı, hiperamonyemi (hyperammonemia) ile karakterize otozomal resesif geçişli bir bozukluk olan argininemi ile sonuçlanır. Farklı ekzonlarında gözlenen farklı tipteki mutasyonlar argininemi ile ilişkilendirilmiştir. Örneğin Haraguchi ve diğerleri (1990) argininemi kaynaklı ciddi mental retardasyon, mikrosefali, spastik tetrapleji ve aralıklı konvülsiyonlar gösteren hastalarında farklı baz çifti (bp) uzunluğundaki heterozigt delesyonların varlığını göstermiştir [122]. Arjinaz eksikliği olan bir hastada, Grody ve diğerleri (1992) Arg-1 geninde homozigot bir mutasyon tespit etti [123]. Akut iskemik inme (AIS) hastalarının tam kanında Arg-1 ekspresyonunun artmış olduğu tespit edilmiştir [119].

2.7.8. Aktin beta (ACTB) ve gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH)

Aktin beta (ACTB) geni insan 7. Kromozomunun kısa kolunda bulunur (p22.1) ve 6 ekzona sahiptir. Beta Aktin veya Aktin sitoplazmik 1 olarak bilinmektedir. Bu gen altı farklı aktin proteininden birini kodlar. ACTB geninin ekspresyonu tüm doku ve organlarda gözlenmektedir. Aktinler, hücre hareketliliği, yapı, bütünlük ve hücreler arası sinyalizasyonda yer alan oldukça korunmuş proteinlerdir [82,88,102].

Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) geni insan 12. kromozomunun kısa kolunda bulunur (p13.31) ve 10 ekzona sahiptir. GAPD, G3PD; Oct1 Coactivator in S Phase, 38-KD Component; OCAS, p38 Component; HEL-S-162eP gibi farklı ad ve semboller ile bilinmektedir. Bu gen, gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz protein ailesinin bir üyesini kodlar. Bu protein, mekanik açıdan farklı işlevleri yerine getirme kabiliyetine sahiptir. Bu genin ürünü, karbonhidrat metabolizmasında, inorganik fosfat ve nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) varlığında gliseraldehid-3-fosfatın geri dönüşümlü oksidatif fosforilasyonu için önemli bir enerji üretme aşamasını katalize eder. Bu genin proteininin, ayrıca çekirdekte urasil DNA glikosilaz aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. GAPDH geninin ekspresyonu pankreasta diğerlerine göre bir miktar az olmakta birlikte tüm doku ve organlarda gözlenmektedir [82,88,102].

2.7.9. Housekeeping gen

Gerçek zamanlı PZR ile ekspresyon çalışmalarında; genellikle tüm doku ve organlarda ekspresyonu gözlenen ve bir hücrenin normal yaşamsal işlevlerini yerine getirebilmek için sürekli olarak eksprese edilmesi gereken housekeeping genler kullanılmaktadır. Böylece normal kabul edilecek bir ekspresyon profili ve araştırılacak gen ekspresyon profili karşılaştırılabilmektedir. ACTB, GAPDH, laktat dehidrogenaz A (LDHA), β-2-mikroglobülin (B2M), fosfogliserat mutaz (PGAM-1), aldolaz A (ALDOA), fosfogliserat kinaz (PGK-1), hipoksantin fosforibosil-transferaz (HPRT-1), α-tübulin (TUBA1), vimentin (VIM), fosfofruktokinaz (PFKP) ve glikoz-6 fosfat dehidrogenaz (G6PD) genleri housekeeping (kontrol) gen olarak kullanılmaktadır. Bu genler arasında ACTB ve GAPDH çalışmalara en çok dahil edilenlerdir. Bu güne kadar GAPDH ve ACTB, yüksek etkili (impak faktör) dergilerdeki çalışmaların % 90'ında tek kontrol geni olarak

kullanılmışlardır. Ancak housekeeping genleri tek başına kullanmanın gerçekten bir housekeeping gen ödevi gerçekleştirmeyeceği düşünülmektedir [124].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmanın hücre kültürü aşamalarının tamamı ve hücrelerden total RNA eldesi; Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Gerçek zamanlı PZR çalışmaları ise ATQ Biyoteknoloji İç ve Dış Tic. Ltd. Şti. Ar-Ge laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Kemik İliği (Ki) Donörlerinin Seçimi

Çalışmada Hacettepe Üniversitesi, Pediatrik Kemik İliği Transplantasyon Ünitesi'nde yaşları 20-50 aralığında olan gönüllü sağlıklı donörlerin (n=5) yerel etik kurul kararları uyarınca yazılı onam formları (Ek-1) alınarak kemik iliği vericisi olarak çalışmaya kabul edilmiştir. Herhangi bir hastalık için heterozigot olanlar veya tedavi amaçlı ilaç kullananlar (antibiyotik vb.) çalışmamıza dâhil edilmedi. Etik kurul başvurusu Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 18.02.2015 tarihinde yapılan toplantısında GO 5/139-25 nolu kararı ile kabul edilen ve 03.01.2017 tarih ve GO15/139-22 karar no (Ek-2) ile revize edilen bu çalışmada Hacettepe Üniversitesi, Kök Hücre Araştırma Ve Uygulama Merkezi (PEDİ-STEM) bio bankasında Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 27.01.2016 tarih ve 01 karar no ile (Ek-3) onaylanan ve örnekleri araştırma amaçlı depolanmak üzere onamları alınan 22 yaşında kadın, 23 yaşında erkek, 26 yaşında erkek, 48 yaşında kadın ve 48 yaşında kadın olmak üzere 5 adet donör kullanıldı.

3.2. Kemik İliği Örneklerinin Alınması

Hacettepe Üniversitesi Kemik İliği Nakil Ünitesinde, ameliyathane koşullarında, sağlıklı gönüllü Kİ vericilerinin çift taraflı kalça kemiklerinden (bilateral posterior iliak krest bölgelerinden) enjektörle girer girmez 1 defa aspirasyon yapılarak yaklaşık 2-3 cc yüzeyel bölgeden (osteoblastik kemik iliği nişinden) örnek alındı. Bu örneklerin alınmasında kemik iliği aspirasyon/biyopsi iğnesi kullanılmış, standart koşullarda aynı araştırmacılar tarafından kemik iliği boşluğuna girer girmez yapılan aspirasyonla kemik korteksine yakın bölgeden çalışma örnekleri alınmıştır. Daha sonra çoklu aspirasyonlar yapılarak hastalara

nakil amaçlı kemik iliği toplanmasına devam edildi (10-16 cc/ kg). Kemik iliği alımında bu ünitede rutin olarak yapılan işlemler dışında herhangi bir işlem yapılmadı.

3.3. İnsan Ki Örneklerinden Mononükleer Hücre (MNH) Eldesi

Bu çalışmada insan Kİ örneklerinden MNH (mononükleer hücreler) fikol yoğunluk gradiyenti yöntemi ile izole edildi. Her bir toplanan örnekten (yaklaşık 3 ml), oda sıcaklığında 1800 rpm 10 dk santrifüj işleminden sonra, plazması ayrıldı. Kalan örneğe yaklaşık 1 ml PBS eklenerek, örnek 6 ml'ye tamamlandı ve pastör pipetle yavaşça karıştırılarak homojenize edildi. Karışım, 1/3 ficol 2/3 örnek olacak şekilde, oda ısındaki 3 ml Lympho-Paque - Cell Separation Medium (GENAXXON, C4754) (density of 1.077) üzerine yayıldı. Frensiz olarak 2000 rpm'de (p:400xg) 15 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi. Santrifüjün sonunda üst tabaka dikkatlice pasteur pipetle toplandı ve atıldı. Yaklaşık 0.5 cm kalınlığındaki mononükleer hücreleri içeren opak ara alan pastör pipetle toplanarak yeni falkon tüpe aktarıldı. Üzerine PBS eklenerek 15 ml ye tamamlandı. Yavaşça karıştırıldıktan sonra 1500 rpm'de (p:250xg) 5 dakika oda sıcaklığında frenli santrifüj edildi. Pelletin üzerine 1 ml PBS konarak yavaşça homojenize edildi. Tripan mavisi kullanılarak hücre sayım işlemi yapıldı. 3 ml kemik iliği örneğinden yaklaşık 10-50 x 10^6 mononükleer hücre elde edildi. Bir kriyo vialde yaklaşık 20 x 10^6 MNH olacak şekilde hücre dondurma işlemi yapıldı veya yaklaşık 10 x 10^6 MNH kültür kabına ekilerek mezenkimal kök hücre elde edilmesi planlandı.

3.4. MKH Gelişim ve Dondurma Medyumlarının Hazırlanması

3.4.1. MCDB 201 medyum

MCDB 201 (SİGMA/M6770-1L) belirli hücre tiplerinin büyümesi için tasarlanmış hormonlar, büyüme faktörleri, eser elementler veya düşük seviyeler diyalize tabi tutulmuş fetal sığır serum proteini (FBSP) içermektedir. Toz halindeki medyum 200 ml oda ısındaki otoklavlanmış ddH2O içinde çözülene kadar laminar flow içinde eritildi. Final volüm 1L tamamlanıp karıştırıldıktan sonra 0,22 mikronluk filtreden geçirildi. Üzerine gerekli bilgiler (hazırlanma tarihi, sterilitesi, medyum adı) yazılan stok solüsyon folyo ile sarılarak +4^{o}C'de en fazla 2 hafta süreyle saklandı.

3.4.2. DM

%40 MCDB 201 (SİGMA,M6770-1L) medyumu ve %60 DMEM-LG (BIOCHROM,F0415) karışımı olarak hazırlanan hazırlanan medyum 0,22 µm'lik filtreden geçirildikten sonra DMF-10 hazırlamak için kullanıldı artanı üzerine gerekli bilgiler (hazırlanma tarihi, sterilitesi, medyum adı) yazılıp +4ºC'de en fazla 2 hafta süreyle saklandı.

3.4.3. DMF-10

%88 DM (MCDB:%40 DMEM-LG:%60), %10FBS (BIOWEST, S181G-500), %1 Penisilin/streptomisin (BIOCHROM 10.000U,ML/A-2213) ve %1 L-Glutamin (BIOCHROM, K-0283, 200Mm) karışımı olarak hazırlanan medyum 0,22 µm'lik filtreden geçirildikten sonra üzerine gerekli bilgiler (hazırlanma tarihi, sterilitesi, medyum adı) yazılıp +4ºC'de en fazla 2 hafta süreyle saklandı.

3.4.4. Dondurma medyumu (Freezing Medium)

%20 DMSO, %40FBS (BIOWEST,S181G-500), %40 DMEM-LG (BIOCHROM,F0415) karışımı olarak X2 olarak hazırlanan medyum 0,22 µm'lik filtreden geçirildikten sonra üzerine gerekli bilgiler (hazırlanma tarihi, sterilitesi, medyum adı) yazılıp +4ºC'de en fazla 2 hafta süreyle saklandı. Kullanışı: 10^6 MKH/ 500 ul DM eklenerek hücreler homojenize edilip kriyo vial tüplere aktarıldı. 2x olarak hazırlanan dondurma medyumundan 500 ul damla damla eklendi.

3.4.5. FBS sıcakla inaktivasyonu

37ºC su banyosunda çözülen FBS 56ºC derecede su banyosunda 45 dk bekletilerek sıcaklıkla in aktivasyonu yapıldıktan sonra tüplere bölünerek -20ºC de saklandı.

3.5. Havuz MKH Oluşturma

22 yaşında kadın, 23 yaşında erkek, 26 yaşında erkek, 48 yaşında kadın ve 48 yaşında kadın olmak üzere 5 adet vericinin pasaj 0 olarak dondurulmuş örnekleri çözüldü ve pasaj

1 olarak ekildi. İçlerinden üremesi en iyi olan 23 yaşındaki erkek ve 22 yaşındaki kadın donör seçilerek tripsinizasyon protokolüne uygun olarak toplanan hücreleri tripan mavisi ile canlılıkları kontrol edildi ve hücre sayımı yapıldı. Aynı oranda karıştırılarak MKH havuzu oluşturuldu. Bundan sonra hücreler pasajlamaya devam edilerek pasaj 3 de karakterizasyon amacıyla pasaj 4 ile 6 arasında da deneyler için kullanıldı.

3.6. MKH'lerin *İn Vitro* Kültüre Ekilmesi ve Çoğaltılması

Kemik iliği örneklerinden MNH'ler ficol dansitesi yöntemiyle ayrıştırıldıktan sonra 3ml kemik iliği örneğinden genelde 10-50x10^6 mononükleer hücre elde edildi. Bunlar dondurulduu veya MKH üretimine geçildi. MNH'lerden direk taze olarak veya dondurulmuş MNH çözülerek 10x10^6 MNH 10 ml DMF-10 içinde T75 flasklara ekildi ve P0 olarak adlandırıldı. 37°C ve % 5 CO_2 nemli inkübatörde kültüre konuldu.

Haftada 2 defa inkübatörden çıkarılan flask/kuyucuk ilk önce göz ile daha sonra invert mikroskop altında hücreler incelendi. Hücre oranı (%) kaydedildi. Laminar flow içerisine alınan flask/kuyucuk içerisindeki medyum bir kısmı pipet yardımı ile alıp atık kabına dökülüp taze medyum eklendi. 37°C'de ve %5 CO_2 içeren inkübatörde kültüre bırakıldı. Hücreler yaklaşık 15-20 gün içerisinde flaskın %70-80 ni doldurdu. %70-80 confluensiye ulaştığı zaman genelde 1-2x10^6 MKH elde edildi. Daha sonraki pasaj 2x10^5 MKH 10 ml DMF-10 içinde ekilidi ve P1 olarak adlandırıldı. Haftada 2 defa yukarda açıklandığı şekilde medyum değişimi yapılan hücreler %80 yoğunluğa kadar üretildi. Daha sonra ya stok amacıyla dondurulduu ya da aynı şekilde pasajlanmaya devam edildi. Pasaj 3 farklılaşma ve karakterizasyon için kullanıldı. Bundan sonra pasaj 6 ya kadarki pasajlar deneylerde kullanıldı.

3.7. Tripsinizasyon

Flask/plak içerisinde tabana yapışık halde bulunan hücreler %70 doluluk oranına geldiğinde yapıştıkları yüzeyden Tripsin/EDTA solüsyonu (Capricorn Scientific) kullanıldı. Tüm solüsyonlar en az 30 dakika oda ısısında bekletilerek ısıtıldı. İnkübatörden çıkarılan flask/plak ilk önce göz ile daha sonra mikroskop altında incelendi. Hücre oranı kaydedildi. Laminar flow içerisine alınan flask/plağın içerisindeki medyum pipet yardımı ile atık kabına döküldü. Medyum miktarı kadar PBS eklenerek 2 defa yıkandı. Flask/plak

içerisine cm^2 ye 40 mikrolitre olacak şekilde tripsin/EDTA solüsyonundan ilave edildi ve tabana iyice yayılarak inkübatöre kaldırıldı. Yaklaşık 5 dk süresince inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda flask/plak inkübatörden çıkarıldı ve elle vurularak hücrelerin flasktan iyice ayrışması sağlandı. Mikroskop altında ayrışıp ayrışmadıklarına bakıldı. Ayrışma gerçekleştiyse konulan tripsin miktarı 2 katı kadar taze DMF-10 eklendi ve hücre süspansiyonu toplanarak falkon içerisine aktarıldı. Flask/plak medyumla ile bir kez daha yıkanarak kalması muhtemel hücrelerde toplanarak falkon tüp içerisine aktarıldı. 1500 rpm'de 5 dk oda sıcaklığında frensiz santrifüj edildi. Peletinin üzerine 1 ml DMF-10 eklenerek hücre sayım işlemine geçildi.

3.8. MKH ve MNH' leri Dondurma ve Çözme

Kullanılacak kriyo vial tüpler üzerine tanımlayıcı bilgiler yazıldıktan sonra buz kabının üzerine 2x freezing medium ve DMEM-LG ile birlikte yerleştirildi. MKH'lar tripsinizasyon protokolüne göre toplandıktan canlılık ve hücre sayısı değerlendirildikten sonra onlarda buz kabının üzerine transfer edildi. Dondurulabilmesi için 1 kriyo vial içerisinde; mezenkimal kök hücre sayısı $0.5\text{-}1x10^6$/500 ul DMEM-LG, mononüklear hücre sayısı ise $10\text{-}50x10^6$ 500 ul DMEM-LG arasında olacak şekilde kriyo vial tüplere aktarıldı. 2x olarak hazırlanan freezing medyumdan herbir cyovial üstüne 500 ul damla damla eklendi. Bu işlemler soğukta, buz üstünde yapıldı. Yavaş-kademeli dondurma işlemi Mr. Frosty Freezing Container (Thermo Fisher Scientific) ile gerçekleştirildi. Mr. Frosty içerisindeki isopropenol -80°C'ye kadar 1 dakikada 1°C'de olacak şekilde kademeli ısı kaybı sağlar. 80°C'de 1 gün Mr. Frosty içinde bekleyen hücreler kısa sürede yapılacak deneyler için -80°C'de tutulurken uzun süre saklanmak isteyenler azot tankına kaldırıldı. -80°C'de ve azot tankında saklanan hücreler -20°C'de taşıma kabında laminarflow içine getirildi. 37°C'de su içinde döndürülerek içinde küçük bir buz tanesi kalana kadar çözüldü ve kriyo vial içeriği içinde DMF-10 bulunan falconlara aktarıldı ve çöktürüldü. Pelet dağıtıldıktan sonra DMF-10 eklendi ve tripan blue ile hücre canlılığı değerlendirilip hücre sayımı yapıldı.

3.9. Tripan Mavisi Almama Testi (Trypan Blue Exclusion Test)

RPMI 1640 medium içindeki hücrelere 50 µl Tripan mavisi (SF içinde %1 ölçüde, w/v) ilave edilmekte, daha sonra 3-5 dakika oda ısısında bekletilerek ve mikroskop altında

hücreler değerlendirilmektedir. En az 9 rastgele seçilen alanda ölü ve yaşayan hücreler sayılmaktadır. Total hücre sayısından boyanmış hücre sayısı çıkarıldıktan sonra elde edilen değerin total hücre sayısına bölünmesiyle elde edilen değer yüzde cinsinden hesaplanarak canlı hücre yüzde oranı hesaplanmaktadır. %90 canlılık deneyler için yeterli kabul edildi.

3.10. THP 1 (Cat. No: ATCC#TIB-202) Hücre Hattı Kültürleri

3.10.1. THP-1 üreme medyumu

Üreme medyumu olarak %10 FBS-hi (biowest), %1 penisilin streptomicin (Capricorn) ve %1 L-glutamin (200mM/ Capricorn) RPMI 1640 (Gibco) kullanıldı. Ve protokollerde RPMI %10 olarak adlandırıldı.

3.10.2. THP-1 donmuş hücre stokların hazırlanması

THP-1 hücreleri dondurulduktan sonra çözünürken çözünmeden dolayı meydana gelen hasara çok dayanıksızdır. Bu yüzden donmuş stoklar normalden daha dens hazırlandı. 20 ml medyumda 10^6/ml hücre yoğunluğuna ulaşıncaya kadar üretilen hücrelere çöktürülüp pelet dağıtıldıktan sonra 3,6 mls FCS eklenip karıştırıldı. Daha sonra üzerine damlalar halinde 400 ul DMSO eklenip 1ml kriyo vial tüplere transfer edildi. Mr frostide -80°C'de 24 saat bekletilen hücreler -80°C'de veya sıvı nitrojen tankında saklandı.

3.10.3. Donmuş THP-1 hücrelerin çözülmesi

Çözme işlemine başlamadan önce medyum 37˚C'ye getirildi ve 30 ml medyum 50 ml falconlara transfer edildi. Vial nitrojen tankından veya -80°C'den çıkartıldı ve -20°C'de taşıma kabında laminar flowa taşındı. Daha sonra içinde küçük bir buztanesi kalana kadar 37˚C lik su içinde döndürülerek çözüldü.Vialin içeriği içinde 30 ml medyum bulunan falconlara aktarılıp 1500 rpm de 5 dk çöktürüldükten sonra 15 ml medyum eklenerek bir gece inkübe edildi. Ertesi gün hücre sayımı yapılarak $2x10^5$ /ml olacak şekilde ekildi.

3.10.4. THP-1 hücre kültürü

Hücreler $2x10^5$ hücre / ml olacak şekilde RPMI %10 içinde ekildikten sonra 3-4 gün inkübatörde büyümeye bırakıldı.4 günün sonunda inkübatörden çıkarıp karıştırılan hücreler 1500 rpm de 5 dk çöktürüldükten sonra pelet dağıtıldı ve RPMI %10 eklendi. Tripan blue ile hücre canlılığı kontrol edildi ve hücre sayımı yapıldı.$2x10^5$ hücre / ml olacak şekilde tekrar ekildi.

3.10.5. THP-1 hücrelerinin makrofajlara farklılaştırılması

Farklılaşma için stok solusyonu DMSO içinde 2mM olarak ve farklılaşma medyumu (çalışma soluyonu) RPMI%10 içinde 100nM olarak hazırlanan PMA (phorbol 12-myristate 12-acetate) (SERVA / CAT NO: 32496) kullanıldı. Öncelikle üretilmekte olan hücreler 1500 rpm 5 dk çöktürüldü. Hücreler farklılaşma medyumu içinde 10^5 / ml.konsantrasyonda olacak şekilde hazırlandı. Herbir kuyucuğa sıfırıncı günde 4 ml farklılaşma medyumu içinde toplamda 400.000 THP-1 ekildi ve inkubasyona bırakıldı. 3. günde RPMI%10 ile medyum değişimi yapıldı. 4. günde hücreler kazıyarak toplandı veya kokültür için direk kullanıldı.

3.10.6. Üreme medyumu

%10 luk RPMI 1640 (Gibco) (%10 FBS-hi (biowest) %1 penisilin streptomicin (Capricorn) %1 L-glutamin (200mM/ Capricorn) medyum olarak kullanıldı. PMA ile uyarım, standart protokollere göre uygulandı [46,76].

3.11. Hücre Kültürü Deneyleri

Kİ niş bölgesinden elde edilen MKH'lerin, THP-1 monosit/makrofaj hücreleri ile etkileşimlerinin gen ekspresyonu düzeyinde Gerçek Zamanlı PZR yöntemiyle araştırılabilmesi için öncelikle aşağıda açıklanan hücre kültrüleri/hücre-hücre ko-kültürleri deneyleri gerçekleştirilmiştir.

3.11.1. MKH'den elde edilen süpernatantın THP-1 monosit/makrofaj hattı hücreleri üzerine etkisinin araştırılması

Kültüre edilen hücrelerin metabolitleri, büyüme faktörleri, ekstraselüler matriks proteinleri medyuma salınır. Bu sebeple Kİ niş bölgesinden elde edilen MKH'lerin kültüre edildiği conditioned mediumu, kültür sonrasında ayırıldı ve mononükleer hücreler üzerine etkisini araştırmak üzere THP-1 monosit/makrofaj hattı hücrelerinin bu medyum içerisinde kültüre edilmesi planlandı. Elde edilmiş kemik iliği ve periferal kan monositleri %10 ısı inaktivasyonlu FCS, 2mM L-glutamin, 100 U/mL penisilin ve 100 ug/mL streptomisin içeren RPMI 1640 besiyerine aktarılarak 37^{o}C %5 CO_2 inkübatöründe inkübe edildi. Bunun için 25 (T25) ve 75 (T75) cm^2 kültür kapları kullanıldı. Bu flaskların planlanması aşağıda verilmiştir:

Periferal Monositler/Makrofajlar kontrol (muamelesiz) x 3
Periferal Monositler/Makrofajlar + MKH kültürü conditioned medium (15 mL) x 3

3.11.2. Ko-kültür çalışmaları

Ko-kültür deneyleri *transwell* ile gerçekleştirildi. MKH hücre kültürlerinde besiyeri 3.- 4. gün yenilendi. *Transwell* kokültür plakları 7.gün besiyeri yenilenerek (0,4 um çaplı porlar) tabanda yayılmış makrofajlar (5 x 10^5 /kuyucuk) üzerine yerleştirilmiştir. MKH'ler 2 × 10^5 olarak *transwell*'lere aktarılmış ve 3-4 gün inkübasyon yapılmıştır.

Ko-kültür plaklarında kontrol grubu MKH'lerle kültür yapılmayan makrofajlar olmuştur. Ko-kültür grupları aşağıda verilmiştir:

a) Kontrol grubu: Monosit/makrofaj (Diğer tüm deney koşulları aynı tutulmuştur)
b) Monosit/makrofaj + MKH ko-kültür grubu

<u>Plastisitesi yönlendirilmiş monosit/makrofajlarla ko-kültürler</u>

İnsan monosit/makrofajlarını M1 yönüne plastisiteye sürüklemek için huRİFN-γ (4-40 U/mL) + düşük doz lipopolisakkarid (DDLPS) (10 ng/mL), M2 (M2a/M2c) yönüne plastisite sağlamada insan rekombinan İL-4 (10ng/mL), İL-10 (100 ng/mL), İL-13 (10-100 ng/mL) ve de TNF-α (10 ng/mL) sitokinlerle ile ve/veya yüksek doz lipopolisakkarid

(YDLPS) ile (1ug/mL) muamele ederek bu makrofajların benzer sitokin profil gösteren hastalıklardaki davranışlarını modelleyerek MKH üzerine etkilerini de araştırdık.

Muamele edilmiş THP-1 Monosit/Makrofaj ile MKH ko-kültür grupları

a) MKH Kontrol grubu x 3
b) Polinosinik-polisitidilik asit [Poly (I:C)] (1 ug/mL) uygulanan Mo/Mq+MKH x 3
c) İFN-γ ve düşük doz LPS uygulanan Mo/Mq + MKH x 3
d) İL-4 + İL-10 + İL-13 uygulanan Mo/Mq + MKH x 3
e) TNF-α uygulanan Mo/Mq + MKH x 3
f) Yüksek doz LPS ile (1ug/mL) uygulanan Mo/Mq + MKH x 3
g) Muamelesiz Mo/Mq + MKH x 3

Muamele edilmiş MKH ile edilmemiş THP-1 Monosit/Makrofaj ko-kültür grupları

a) Mo/Mq Kontrol grubu x 3
b) Poly (I:C) (1 ug/mL) uygulanan MKH + uygulanmayan Mo/Mq x 3
c) İFN-γ ve düşük doz LPS uygulanan MKH + uygulanmayan Mo/Mq x 3
d) İL-4 + İL-10 + İL-13 uygulanan MKH + uygulanmayan Mo/Mq x 3
e) TNF-α uygulanan MKH + uygulanmayan Mo/Mq x 3
f) Yüksek doz LPS ile (1ug/mL) uygulanan MKH + uygulanmayan Mo/Mq x 3
g) Muamelesiz MKH + Mo/Mq x 3

Muamele edilmemiş MKH ile edilmiş THP-1 Monosit/Makrofaj ko-kültür grupları

h) Mo/Mq Kontrol grubu x 3
i) Poly (I:C) (1 ug/mL) uygulanmayan MKH + uygulanan Mo/Mq x 3
j) İFN-γ ve düşük doz LPS uygulanmayan MKH + uygulanan Mo/Mq x 3
k) İL-4 + İL-10 + İL-13 uygulanmayan MKH + uygulanan Mo/Mq x 3
l) TNF-α uygulanmayan MKH + uygulanan Mo/Mq x 3
m) Yüksek doz LPS ile (1ug/mL) uygulanmayan MKH + uygulanan Mo/Mq x 3
n) Muamelesiz MKH + Mo/Mq x 3

Muamele edilmiş Monosit/Makrofajlar ve muamele edilmiş MKH kültürleri

Ko-kültür çalışmasında hücre-hücre etkileşimlerini dışlamak ve karşılaştırma yapmak için her iki hücre grubununda ayrı flasklerde (T25) kültürü yapılmıştır. Bu deney grubu aşağıdaki şekilde planlanmıştır:

a) Poly (I:C) (1 ug/mL) uygulanan MKH x 3 / uygulanan Mo/Mq x 3
b) İFN-γ ve düşük doz LPS uygulanan MKH x 3 / uygulanan Mo/Mqx 3
c) İL-4 + İL-10 + İL-13 uygulanan MKH x 3 / uygulanan Mo/Mq x 3
d) TNF-α uygulanan MKH x 3/ uygulanan Mo/Mq x 3
e) Yüksek doz LPS ile (1ug/mL) uygulanan MKH x 3/ uygulanan Mo/Mq x 3
f) Muamelesiz MKH x 3 / Muamelesiz Mo/Mq x 3

3.12. Gerçek Zamanlı PZR ile Gen Ekspresyonu Düzeyinde Ölçümleme

Hem MKH kültürü conditioned mediumla muamele edilen, hem de kokültür yapılan makrofajlarda ve de X driven Mo/Mq + X primed MKH ko-kültürlerinde gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemiyle tümör nekroz faktörü (TNF-α), interlökin 6 (İL-6), interlökin 10 (İL-10), interlökin 12A (İL-12A), interlökin 12B (İL-12B), uyarılabilir nitrik oksit sentaz 2 (iNOS) ve arjinaz 1 (Arg-1) gen ifadeleri nicel olarak ölçümlenmiştir. Bu çalışmalarda beta aktin (ACTB) ve gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) genleri olmak üzere 2 adet housekeeping gen çalışmaya dahil edilmiştir. Gerçek zamanlı PZR ile analiz aşamaları hücre kültürü aşamalarını takiben sırasıyla total RNA izolasyonu, komplementer DNA (cDNA) eldesi, gerçek zamanlı PZR ve analiz aşamalarını içermektedir.

3.12.1. Hücrelerden RNA eldesi

Tüm grupların hücre kültürü aşamalarının sonunda hasat edilen Mezenkimal kök/stromal hücre (MKH /MSH) ve THP-1 monosit/makrofaj hücreleri sayılmış ve en az $2x10^5$ hücre sayısı ile Ribonükleik asit (RNA) izolasyonu planlanmıştır. RNA eldesi, spin kolon yöntemi kullanılan ticari bir kit olan Rneasy Plus Mini Kit (Qiagen, 74134) ile gerçekleştirilmiştir. Hücreler 15ml'lik falkon tüplere alınmış ve 1500 RPM'de santrifügasyon ile çöktürülmüştür. Yıkama işleminin ardından aşağıdaki protokol takip edilerek hücrelerin parçalanması, RNazların inaktivasyonu, genomik Deoksiribonükleik

Asit (gDNA) eliminasyonu ve nükleaz içermeyen su içerisinde RNA eldesi sağlanmıştır. Elde edilen her bir RNA'ya kod/numara verilmiş ve deneydeki tanımı ile etiketlenmiştir. Kalitesi ve konsantrasyonu spektrofotometre cihazı (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific) ile ölçümlenmiştir. Deney gruplarına (5 Grup) göre sınıflandırılıp -80^{o}C'de muhafaza edilmiştir. Toplam 5 farklı deney grubu ve 168 farklı RNA ürünü elde edilmiştir.

Uygulanan protokol aşağıda yer almaktadır:

1. Hasat edilen hücreler medyum içerisinde 15 ml lik Falcon tüplerine alındıktan sonra 1500 rpm'de (*round per minute*) 5 dakika (dk) santrifuj edildi ve hücreler çöktürüldü.

2. Supernatan atıldı ve 15 ml Falcon tüp içindeki hücre pelleti üzerine yıkama amacıyla 1 ml PBS eklendi. Pipetaj ile homojenize edilerek ornek 2.0 ml lik ependorfa aktarıldı.

3. Mikrosantrifujde 5000 rpm'de 5 dk santrifuj edildi.

4. Supernatan pipet yardımıyla uzaklaştıldı ve pellet etrafında solusyon kalmadıgından emin olundu. Her ihtimale karşı ependorf tüp kapağı açık bırakılarak, 1-2 dk kurutmaya bırakıldı.

5. Pellet üzerine kit kitapçığında tanımlandığı üzere hücre miktarımıza uygun olarak 350 µl Buffer RLT + Betamercaptoethanol karışımından eklendi. (1000 ml RLT için 10 µl *β-mercapto-ethanol*) ve pipetaj ile homojenize edildi. Sonrasında Tissue Lyser LT cihazında (Qiagen) 50 herz'de 1 dk parçalandı. Tüm RNA eldesi çalışmalarımızda prosedüre devam edilerek yıkama aşamalarına geçildi (Bu aşamada lizat -20 ya da –80^{o}C 'de saklanabilir).

6. Homojenize edilen lizat; genomik DNA (*gDNA*) Eliminator Mini Spin kolona yüklendi. 10.000 rpm'de 30 saniye (sn) santrifuj edildi.

7. gDNA eliminator kolon atılırken, toplama tüpleri saklandı. Toplama tüpünde yer alan örnek üzerine 350 µl %70 ETOH eklendi ve pipetaj ile iyice homojenize edildi.

8. 700 µl hacimdeki bu ornek RNeasy Mini Spin kolona yüklendi ve 10.000 rpm'de 30 sn santrifuj edildi.

9. Toplama tüpünde kalanlar atıldı ve spin kolon temiz bir toplama tüpüne yerleştirildi.

10. Kolonun üzerine 700 µl RW1 tamponu eklendi. 10.000 rpm'de 30 sn santrifuj yapıldı. Toplama tüpünde kalanlar atıldı ve spin kolon temiz bir toplama tüpüne yerleştirildi.

11. Kolonun üzerine 500 µl RPE tamponu eklendi. 10.000 rpm'de 30 sn santrifuj yapıldı. Toplama tüpünde kalanlar atıldı.

12. Kolonun üzerine 500 µl RPE tamponu eklendi. 10.000 rpm'de 2 dk santrifuj yapıldı. Toplama tüpünde kalanlar atıldı ve spin kolon temiz bir toplama tüpüne yerleştirildi.

13. Kolon ilave yapılmadan boş bir şekilde 13.500 rpm'de 1 dk santrifuj edildi.

14. Elüsyon tüpü içerisine alınan kolon üzerine 30 µl nukleaz içermeyen su eklendi. Oda sıcaklığında 5 dk beklendi ve 10.000 rpm'de 30 sn santrifuj edildi.

15. Elüsyon tüpünün dibinde oluşan ürün aynı kolondan tekrar geçirilerek bu aşama tekrarlandı ve 30 µl elüsyon ürünü elde edilmiş oldu.

16. Elde edilen RNA ürünlerinin, Nanodrop cihazında (Thermo) konsantrasyon ve kalite ölçümleri yapıldı. Yapılan ölçüm sonuçları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Elde edilen RNA ürünlerinin konsantrasyon ölçümleri ve deney grupları

(-) Uyarımsız; (+) Uyarımlı

Grup	Set No	Örnek No	Örnek adı	RNA ölçüm (ng/ul)	Açıklamalar
1. Grup: Uyarım Sonrası, Ko-Kültür öncesinde Ölçümleme	1.Set	1	1.1 P-THP1-PMA-1 (+)	20,0	Poly IC ile muamele edilmiş THP-1 PMA grubu
		2	1.2 P-THP1-PMA-2 (+)	28,0	
		3	1.3 P-THP1-PMA-3 (+)	36,0	
		4	1.1 P-MKH-1 (+)	44,0	Poly IC ile muamele edilmiş MKH grubu
		5	1.2 P-MKH-2 (+)	50,0	
		6	1.3 P-MKH-3 (+)	9,0	
	2.Set	7	2.1 P-THP1-PMA İFN ɣ DDLPS-1 (+)	17,6	İFN ɣ VE DDLPS ile muamele edilmiş THP-1 PMA grubu
		8	2.2 P-THP1-PMA İFN ɣ DDLPS-2 (+)	24,8	
		9	2.3 P-THP1-PMA İFN ɣ DDLPS-3 (+)	21,0	
		10	2.1 P-MKH İFN ɣ DDLPS-1 (+)	35,0	İFN ɣ VE DDLPS ile muamele edilmiş MKH grubu
		11	2.2 P-MKH İFN ɣ DDLPS-2 (+)	42,0	
		12	2.3 P-MKH İFN ɣ DDLPS-3 (+)	37,0	
	3.Set	13	3.1 P-THP1-PMA İL4 İL10 İL13 - 1 (+)	41,0	İL4 İL10 İL13 ile muamele edilmiş THP-1 PMA grubu
		14	3.2 P-THP1-PMA İL4 İL10 İL13 - 2 (+)	59,0	
		15	3.3 P-THP1-PMA İL4 İL10 İL13 - 3 (+)	44,0	
		16	3.1 P-MKH İL4 İL10 İL13 - 1 (+)	44,0	İL4 İL10 İL13 ile muamele edilmiş MKH grubu
		17	3.2 P-MKH İL4 İL10 İL13 - 2 (+)	37,0	
		18	3.3 P-MKH İL4 İL10 İL13 - 3 (+)	40,0	
	4.Set	19	4.1 P-THP1-PMA TNF α-1 (+)	53,0	TNF α ile muamele edilmiş THP-1 PMA grubu
		20	4.2 P-THP1-PMA TNF α-2 (+)	60,0	
		21	4.3 P-THP1-PMA TNF α-3 (+)	45,0	
		22	4.1 P-MKH TNF α-1 (+)	64,0	TNF α ile muamele edilmiş MKH grubu
		23	4.2 P-MKH TNF α-2 (+)	60,0	
		24	4.3 P-MKH TNF α-3 (+)	40,0	
	5.Set	25	5.1 P-THP1-PMA YDLPS-1 (+)	26,0	YDLPS ile muamele edilmiş THP-1 PMA grubu
		26	5.2 P-THP1-PMA YDLPS-2 (+)	30,0	
		27	5.3 P-THP1-PMA YDLPS-3 (+)	30,0	
		28	5.1 P-MKH YDLPS-1 (+)	60,0	YDLPS ile muamele edilmiş MKH grubu
		29	5.2 P-MKH YDLPS-2 (+)	60,0	
		30	5.3 P-MKH YDLPS-3 (+)	55,0	
	6.Set	31	6.1 Blank THP1-PMA-1 (-)	33,0	Muamelesiz THP-1 PMA grubu
		32	6.2 Blank THP1-PMA-2 (-)	29,0	
		33	6.3 Blank THP1-PMA-3 (-)	28,0	
		34	6.1 Blank MKH-1 (-)	54,0	Muamelesiz MKH grubu
		35	6.2 Blank MKH-2 (-)	53,0	
		36	6.3 Blank MKH-3 (-)	52,0	

Çizelge 3.1. (devam) Elde edilen RNA ürünlerinin konsantrasyon ölçümleri ve deney grupları (-) Uyarımsız; (+) Uyarımlı

Grup	Set No	Örnek No	Örnek adı	RNA ölçüm (ng/ul)	Açıklamalar
2. Grup: Uyarılmış MKH ve THP-1 PMA Ko-Kültür Ölçümü	7.Set	37	7.1 Blank TS MKH (-)	61,0	Muamelesiz MKH grubu
		38	7.2 Blank TS MKH (-)	90,0	
		39	7.3 Blank TS MKH (-)	66,0	
		40	7.1 Blank TS THP1-PMA (-)	46,0	Muamelesiz THP-1 PMA grubu
		41	7.2 Blank TS THP1-PMA (-)	32,0	
		42	7.3 Blank TS THP1-PMA (-)	20,0	
	8.Set	43	6.1 KK Blank TS MKH (-)	27,0	Muamelesiz MKH + Muamelesiz THP-1 PMA Ko kültür (*Transwell*) Uyarımsız hücrelerin *transwell* ile ko-kültürü
		44	6.2 KK Blank TS MKH (-)	25,0	
		45	6.3 KK Blank TS MKH (-)	30,0	
		46	6.1 KK Blank TS THP1-PMA (-)	25,0	
		47	6.2 KK Blank TS THP1-PMA (-)	40,0	
		48	6.3 KK Blank TS THP1-PMA (-)	19,0	
	9.Set	49	1.1 POLY IC TS MKH (+)	45,0	Poly IC ile muamele edilmiş MKH + Poly IC ile muamele edilmiş THP-1 PMA Ko kültür (*Transwell*)
		50	1.2 POLY IC TS MKH (+)	30,0	
		51	1.3 POLY IC TS MKH (+)	27,0	
		52	1.1 POLY IC TS THP1-PMA (+)	25,0	
		53	1.2 POLY IC TS THP1-PMA (+)	25,0	
		54	1.3 POLY IC TS THP1-PMA (+)	20,0	
	10.Set	55	2.1 İFN ɣ- DDLPS/TS MKH (+)	20,0	İFN ɣ ve DDLPS ile muamele edilmiş MKH + İFN ɣ ve DDLPS ile muamele edilmiş THP-1 PMA Ko kültür (*Transwell*)
		56	2.2 İFN ɣ- DDLPS/TS MKH (+)	25,0	
		57	2.3 İFN ɣ- DDLPS/TS MKH (+)	30,0	
		58	2.1 İFN ɣ- DDLPS/TS THP1-PMA (+)	20,0	
		59	2.2 İFN ɣ- DDLPS/TS THP1-PMA (+)	20,0	
		60	2.3 İFN ɣ- DDLPS/TS THP1-PMA (+)	18,0	
	11.Set	61	3.1 İL4 İL10 İL13 TS MKH (+)	8,0	İL4, İL10, İL13 ile muamele edilmiş MKH + İL4, İL10, İL13 ile muamele edilmiş THP-1 PMA Ko kültür (*Transwell*)
		62	3.2 İL4 İL10 İL13 TS MKH (+)	5,0	
		63	3.3 İL4 İL10 İL13 TS MKH (+)	19,0	
		64	3.1 İL4 İL10 İL13 TS THP1-PMA (+)	10,0	
		65	3.2 İL4 İL10 İL13 TS THP1-PMA (+)	10,0	
		66	3.3 İL4 İL10 İL13 TS THP1-PMA (+)	15,0	
	12.Set	67	4.1 TNF-α TS MKH (+)	40,0	TNF-α ile muamele edilmiş MKH + TNF-α ile muamele edilmiş THP-1 PMA Ko kültür (*Transwell*)
		68	4.2 TNF-α TS MKH (+)	38,0	
		69	4.3 TNF-α TS MKH (+)	36,0	
		70	4.1 TNF-α TS THP1-PMA (+)	25,0	
		71	4.2 TNF-α TS THP1-PMA (+)	18,0	
		72	4.3 TNF-α TS THP1-PMA (+)	16,0	

Çizelge 3.1. (devam) Elde edilen RNA ürünlerinin konsantrasyon ölçümleri ve deney grupları (-) Uyarımsız; (+) Uyarımlı

Grup	Set No	Örnek No	Örnek adı	RNA ölçüm (ng/ul)	Açıklamalar
2. Grup	13.Set	73	5.1 YDLPS TS MKH (+)	44,0	YDLPS ile muamele edilmiş MKH + YDLPS ile muamele edilmiş THP-1 PMA Ko kültür (*Transwell*)
		74	5.2 YDLPS TS MKH (+)	35,0	
		75	5.3 YDLPS TS MKH (+)	35,0	
		76	5.1 YDLPS TS THP1-PMA (+)	25,0	
		77	5.2 YDLPS TS THP1-PMA (+)	30,0	
		78	5.3 YDLPS TS THP1-PMA (+)	25,0	
3. Grup: Uyarımsız MKH ve Uyarılmış THP-1 PMA Ko-Kültür Ölçümü	14.Set	79	7.1 Blank THP1-PMA (-)	24,0	Muamelesiz THP-1 PMA grubu
		80	7.2 Blank THP1-PMA (-)	25,0	
		81	7.3 Blank THP1-PMA (-)	28,0	
		82	8.1 Blank MKH (-)	50,0	Muamelesiz MKH grubu
		83	8.2 Blank MKH (-)	60,0	
		84	8.3 Blank MKH (-)	77,0	
	15.Set	85	1.1 MKH (-)	85,0	Muamelesiz MKH + Poly IC ile muamele edilmiş THP-1 PMA Ko kültür (*Transwell*)
		86	1.2 MKH (-)	80,0	
		87	1.3 MKH (-)	80,0	
		88	1.1 THP1-PMA POLY IC (+)	30,0	
		89	1.2 THP1-PMA POLY IC (+)	30,0	
		90	1.3 THP1-PMA POLY IC (+)	16,0	
	16.Set	91	2.1 MKH (-)	60,0	Muamelesiz MKH + İFN ɣ ve DDPLS ile muamele edilmiş THP-1 PMA Ko kültür (*Transwell*)
		92	2.2 MKH (-)	50,0	
		93	2.3 MKH (-)	40,0	
		94	2.1 THP1-PMA İFN ɣ- DDLPS (+)	20,0	
		95	2.2 THP1-PMA İFN ɣ- DDLPS (+)	17,0	
		96	2.3 THP1-PMA İFN ɣ- DDLPS (+)	20,0	
	17.Set	97	3.1 MKH (-)	60,0	Muamelesiz MKH + İL4, İL10, İL13 ile muamele edilmiş THP-1 PMA Ko kültür (*Transwell*)
		98	3.2 MKH (-)	47,0	
		99	3.3 MKH (-)	48,0	
		100	3.1 THP1-PMA İL4 İL10 İL13 (+)	18,0	
		101	3.2 THP1-PMA İL4 İL10 İL13 (+)	20,0	
		102	3.3 THP1-PMA İL4 İL10 İL13 (+)	15,0	
	18.Set	103	4.1 MKH (-)	15,0	Muamelesiz MKH + TNF-α ile muamele edilmiş THP-1 PMA Ko kültür (*Transwell*)
		104	4.2 MKH (-)	15,0	
		105	4.3 MKH (-)	20,0	
		106	4.1 THP1-PMA TNF-α (+)	12,0	
		107	4.2 THP1-PMA TNF-α (+)	15,0	
		108	4.3 THP1-PMA TNF-α (+)	16,0	

Çizelge 3.1. (devam) Elde edilen RNA ürünlerinin konsantrasyon ölçümleri ve deney grupları (-) Uyarımsız; (+) Uyarımlı

Grup	Set No	Örnek No	Örnek adı	RNA ölçüm (ng/ul)	Açıklamalar
3. Grup	19.Set	109	5.1 MKH (-)	40,0	Muamelesiz MKH + İFN ɣ ve YDLPS ile muamele edilmiş THP-1 PMA Ko kültür (*Transwell*)
		110	5.2 MKH (-)	35,0	
		111	5.3 MKH (-)	25,0	
		112	5.1 THP1-PMA YDLPS (+)	9,0	
		113	5.2 THP1-PMA YDLPS (+)	11,0	
		114	5.3 THP1-PMA YDLPS (+)	14,0	
	20.Set	115	6.1 KK Blank MKH (-)	20,0	Muamelesiz MKH grubu + Muamelesiz THP-1 PMA Ko kültür (*Transwell*)
		116	6.2 KK Blank MKH (-)	30,0	
		117	6.3 KK Blank MKH (-)	32,0	
		118	6.1 KK Blank THP1-PMA (-)	9,0	
		119	6.2 KK Blank THP1-PMA (-)	10,0	
		120	6.3 KK Blank THP1-PMA (-)	15,0	
4. Grup: Uyarılmış MKH ve Uyarımsız THP-1 PMA Ko-Kültür Ölçümü	21.Set	121	1.1 THP1-PMA (-)	3,5	Poly IC ile muamele edilmiş MKH + Muamelesiz THP-1 PMA Ko kültür (*Transwell*)
		122	1.2 THP1-PMA (-)	4,0	
		123	1.3 THP1-PMA (-)	19,0	
		124	1.1 POLY IC MKH (+)	45,0	
		125	1.2 POLY IC MKH (+)	44,0	
		126	1.3 POLY IC MKH (+)	55,0	
	22.Set	127	2.1 İFN ɣ- DDLPS MKH(+)	20,0	İFN ɣ- ve DDPLS ile muamele edilmiş MKH + Muamelesiz THP-1 PMA Ko kültür (*Transwell*)
		128	2.2 İFN ɣ- DDLPS MKH(+)	35,0	
		129	2.3 İFN ɣ- DDLPS MKH(+)	40,0	
		130	2.1 THP1-PMA (-)	25,0	
		131	2.2 THP1-PMA (-)	23,0	
		132	2.3 THP1-PMA (-)	15,0	
	23.Set	133	7.1 Blank MKH (-)	14,0	Muamelesiz MKH grubu
		134	7.2 Blank MKH (-)	40,0	
		135	7.3 Blank MKH (-)	30,0	
		136	7.1 Blank THP1-PMA (-)	35,0	Muamelesiz THP-1 PMA grubu
		137	7.2 Blank THP1-PMA (-)	18,0	
		138	7.3 Blank THP1-PMA (-)	10,0	
	24.Set	139	3.1 İL4 İL10 İL13 MKH (+)	30,0	İL4, İL10, İL13 ile muamele edilmiş MKH + Muamelesiz THP-1 PMA Ko kültür (*Transwell*)
		140	3.2 İL4 İL10 İL13 MKH (+)	39,0	
		141	3.3 İL4 İL10 İL13 MKH (+)	56,0	
		142	3.1 THP1-PMA (-)	25,0	
		143	3.2 THP1-PMA (-)	19,0	
		144	3.3 THP1-PMA (-)	20,0	

Çizelge 3.1. (devam) Elde edilen RNA ürünlerinin konsantrasyon ölçümleri ve deney grupları (-) Uyarımsız; (+) Uyarımlı

Grup	Set No	Örnek No	Örnek adı	RNA ölçüm (ng/ul)	Açıklamalar
4. Grup	25.Set	145	4.1 TNF-α MKH (+)	45,0	TNF-α ile muamele edilmiş MKH + Muamelesiz THP-1 PMA Ko kültür (*Transwell*)
		146	4.2 TNF-α MKH (+)	20,0	
		147	4.3 TNF-α MKH (+)	30,0	
		148	4.1 THP1-PMA (-)	16,0	
		149	4.2 THP1-PMA (-)	19,0	
		150	4.3 THP1-PMA (-)	17,0	
	26.Set	151	5.1 YDLPS MKH (+)	50,0	YDLPS ile muamele edilmiş MKH + Muamelesiz THP-1 PMA Ko kültür (*Transwell*)
		152	5.2 YDLPS MKH (+)	23,0	
		153	5.3 YDLPS MKH (+)	63,0	
		154	5.1 THP1-PMA (-)	22,0	
		155	5.2 THP1-PMA (-)	26,0	
		156	5.3 THP1-PMA (-)	16,0	
	27.Set	157	6.1 KK Blank MKH (-)	35,0	Muamelesiz MKH + Muamelesiz THP-1 PMA Ko kültür (*Transwell*) Uyarımsız hücrelerin *transwell* ile ko-kültürü
		158	6.2 KK Blank MKH (-)	45,0	
		159	6.3 KK Blank MKH (-)	40,0	
		160	6.1 KK Blank THP1-PMA (-)	18,0	
		161	6.2 KK Blank THP1-PMA (-)	35,0	
		162	6.3 KK Blank THP1-PMA (-)	13,0	
5. Grup: MKH Süpernatantı ile THP-1 PMA Kültürü	28.Set	163	1.1 THP1-PMA/MEDIUM	40,0	THP-1 PMA normal medium ile
		164	1.2 THP1-PMA/MEDIUM	25,0	
		165	1.3 THP1-PMA/MEDIUM	22,0	
		166	2.1 THP1-PMA MKH Supernatant	38,0	THP-1 PMA, MKH süpernatantı ile
		167	2.2 THP1-PMA MKH Supernatant	33,0	
		168	2.3 THP1-PMA MKH Supernatant	20	

3.12.2. Komplementer DNA (cDNA) sentezi

Komplementer DNA (*cDNA*) sentezi için RNA örneklerinin Nanodrop ile ölçümleri yapıldıktan sonra, konsantrasyonları arasındaki varyasyon kontrol edilmiştir ve konsantrasyonlar 8 ng- 70 ng arasında olduğu için sulandırma yapılmadan tüm örneklerin cDNA'ya çevirilmesi aşamasına geçilmiştir. cDNA çevrimi aşamasında ticari bir kit olan RT^2 First Strand Kit (Qiagen, 330404) kullanılmıştır. Çalışmaya dahil edilecek RNA örnekleri -80ºC'den alınıp 0ºC'ye getirilmiş ve 8µl RNA kullanılmak üzere ayırılmıştır. Reverz transkriptaz enzimi ve gerekli tampon solüsyonlar kullanılarak bir thermalcycler (Sensoquest) cihazında inkübasyon ve cDNA eldesi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen 156

adet cDNA'dan 5µl preamplifikasyonda kullanılmak üzere alınmış, kalan miktar -20ºC'de muhafaza edilmiştir. cDNA sentezi aşamasında izlenen protokol aşağıda yer almaktadır:

1. RNA konsantrasyonları ve kaliteleri ölçüldükten sonra örnekler arası varyasyon kontrol edildi ve konsantrasyonlar 8 ng- 70 ng arasında olduğu için sulandırma yapılmadan aşağıdaki aşamalara geçilmiştir. Çok düşük, yüksek veya cDNA sentezi için uygun değere sahip olmayan RNA örnekleri olması durumunda seyreltilmesi veya tekrar RNA izolasyonu planlandı.

2. –20ºC'de muhafaza edilen kitin bileşenleri olan donmuş haldeki GE tamponu, 5x tamponu BC3, Control P2, RE3 Reverse Transcriptase ve nukleaz içermeyen su 0ºC'de çözdürüldü.

3. Her bir örnek için 2 µl GE tamponu ve 8 µl RNA örneği, 0.2 ml PZR tüpü içerisinde birleştirildi ve pipetaj yapıldı.

4. 42ºC'de 5 dk Thermal cyclerda inkübe edildi, ardından 1 dakika buz üstünde inkübe edildi. Aşagıda yer alan Çizelge 3.2 şablon alınarak örnek sayısına uygun ters transkripsiyon karışımı hazırlandı.

Çizelge 3.2. Ters Transkripsiyon Karışımı Hazırlama Çizelgesi

Bileşen	**1 Reaksiyon için hacim**	**2 Reaksiyon için hacim**	**4 Reaksiyon için hacim**
5x BC3 Tamponu	4 µl	8 µl	16 µl
P2 Kontrol	1 µl	2 µl	4 µl
RE3 Reverz Transkriptaz Karışımı	2 µl	4 µl	8 µl
Rnase-free Su	3 µl	6 µl	12 µl
Toplam Hacim	10 µl	20 µl	40 µl

5. Bir önceki aşamadan hazır olan 10 µl Genomik DNA eliminasyon tamponu ve RNA karışımının üzerine çizelgeye uygun hazırlanan 10 µl ters transkripsiyon enzim karışımı eklendi ve pipetaj yapıldı. (Toplam hacim 20 µl)

6. Thermal cycler'da Çizelge 3.3'de belirtilen ısı profilinde inkübasyona bırakıldı.

Çizelge 3.3. cDNA Sentezi Isı Profili

Isı Derecesi	**Zaman**	**Döngü Adedi**
+42^{o}C	15 dk	1 döngü
+95^{o}C	5 dk	1 döngü
+4^{o}C	∞	∞

7. Sentezlenen cDNA'lar -20 ^{o}C derecede saklandı.

8. cDNA sentezini takiben pre-amplifikasyon işlemi yapılmadan devam edilecekse 20 µl cDNA ürünü + 91 µl Nukleaz içermeyen su ile sulandırılır ve -20^{o}C de saklanır. Ancak biz çalışmamızda pre-amplifikasyon işlemi yapacağımız için 20 µl cDNA sentezi ürününden 5 µl alarak pre-amplifikasyon reaksiyonuna başladık. Pre-amplifikasyon işlemi bittikten sonra ürün 84 µl ddH_2O ile sulandırıldı.

3.12.3. Pre-amplifikasyon işlemi

Pre-amplifikasyon işleminde çalışmamıza dahil edilen genlere özgü hazırlanmış primerler kullanılarak ilgili gen bölgelerinin çoğaltılması amaçlanmıştır. Pre-amplifikasyon thermalcycler cihazında gerçekleştirilip, elde edilen ürünler -20^{o}C'de muhafaza edilmiştir. Pre-amplifikasyon çalışmasında takip edilen protokol aşağıdaki gibidir:

1. Pre-amplifikasyon öncesinde, çalısılacak primerler ile kit kitapçığında yer alan yönlendirmelere göre bir havuz yapıldı. Çalışmamızda housekeeping genler dahil 9 gen oldugu için, 2 ml ependorf içerisine 9 gen'e ait primer assay'lerden 40'ar µl alınarak birleştirildi ve üzerine 640 µl nukleaz içermeyen su eklenerek bir havuz oluşturuldu.

2. cDNA ürününden (20µl) 5 µl alınarak yeni 0.2 ml PZR tüpüne aktarıldı.

3. cDNA ürünü içeren tüpün üzerine asagıdaki çizelgeye göre hazırlanmıs karışımdan 20 µl eklendi ve pipetaj yapıldı. Toplam 25 µl hacim elde edildi.

Çizelge 3.4. Pre-amplifikasyon Karışımı Hazırlama Çizelgesi

Bileşen	**1 örnek için gerekli miktar**
RT2 PreAMP PCR Mastermix	12,5 µl
RT2 qPCR Primer Assay Mix	7.5 µl
Toplam Hacim	20 µl

4. Çizelge 3.5'te yer alan protokole göre thermalcycler cihazında amplifikasyona yönelik ısı döngüsü protokolü uygulandı. HotStart Taq Polymerase ilk ısı döngüsünde (95ºC'de 10 dk) aktive olmaktadır.

Çizelge 3.5. cDNA örneklerinden pre-amplifikasyon için ısı döngüleri

Döngüler	**Süre**	**Isı Derecesi**
1 döngü	10 dk	+95ºC
12 döngü	15 sn	+95ºC +60ºC
∞		+4ºC

5. Thermal cyclerdan cıkan ürün üzerine 2 ul Side Reaction Reducer eklenip pipetaj yapıldı.

6. 37 ºC'de 15 dk, 95 ºC'de 5 dk , 4 ºC'de sonsuzda inkübe edildi.

7. Thermal Cycler cihazından cıkan ürün üzerine 84 µl nukleaz içermeyen su eklendi ve -20ºC'de saklandı.

3.12.4. Gerçek zamanlı (*real time*) polimeraz zincir reaksiyonu (PZR/PCR)

Pre-amplifikasyon ürünleri ticari bir kit olan ve *SYBR Green* interkala boyası ihtiva eden RT^2 qPCR Primer Assay (Qiagen, 330001) kitleri ile gerçek zamanlı PZR cihazında (Rotor Gene Q) çoğaltılıp, amplikonlar gerçek zamanlı olarak florasan ışıma ile tespit edildi. Florasan ışımaların tespitine ek olarak eğrime analizi de yapıldı. Tümör nekroz faktörü alfa (TNF-α), interlökin 6 (İL-6), interlökin 10 (İL-10), interlökin 12A (İL-12A), interlökin 12B (İL-12B), uyarılabilir nitrik oksit sentaz 2 (iNOS) ve arjinaz 1 (Arg-1) genlerine özgü primerler ile beta aktin (ACTB) ve gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) housekeeping genlerine özgü toplam 9 adet primer assay kullanıldı. Her bir primer

kullanılarak tüm RNA örnekleri için gerçek zamanlı PZR cihazında 1404 reaksiyon koşum yapıldı. Her koşumda su kontrolü (NTC) örneği kullanıldı. Tüm gruplarda aynı izolasyon, cDNA ve gerçek zamanlı PZR kitleri ve protokolleri uygulanarak elde edilen C_T değerleri kayıt altına alındı. Eğrime eğrisi analizinde uygun olmayan, amplifiye olmayan veya farklılık gösteren örneklerde grup olarak gerekli ise cDNA sentezi ve gerçek zamanlı PZR tekrar edildi.

Gerçek zamanlı PZR cihazına örneklerin yüklenmesi ve öncesinde izlenen protokol aşağıdaki gibidir:

1. -20ºC'de muhafaza edilen RT^2 SYBR green master mix, çalışılacak olan gene özgü RT^2 primer assay ve nukleaz içermeyen su oda sıcaklığında (24ºC) çözüldü. Aşağıda yer alan Çizelge 3.6 kılavuz alınarak kPZR ana karışım hazırlandı.

Çizelge 3.6. kPZR Reaksiyon Karışımı Hazırlama Çizelgesi

	1 reaksiyon
RT^2 SYBR Green Mastermix	12,5 µl
RT^2 qPCR Primer Assay (10 µM stok)	0,5 µl
ddH2O (Su)	7 µl
Pre-amplifikasyon ürünü	5 µl
	25 µl

2. Hazırlanan reaksiyon 0,1 ml strip tüplere 20 µl olarak dağıtıldı ve üzerine 5 µl cDNA pre-amplifikasyon ürünü eklendi.

3. Daha sonra gerçek zamanlı PZR cihazına yerleştirilerek, Çizelge 3.7'de yer alan ısı protokolü ile PZR yapıldı.

Çizelge 3.7. Gerçek Zamanlı PZR Isı Döngüsü

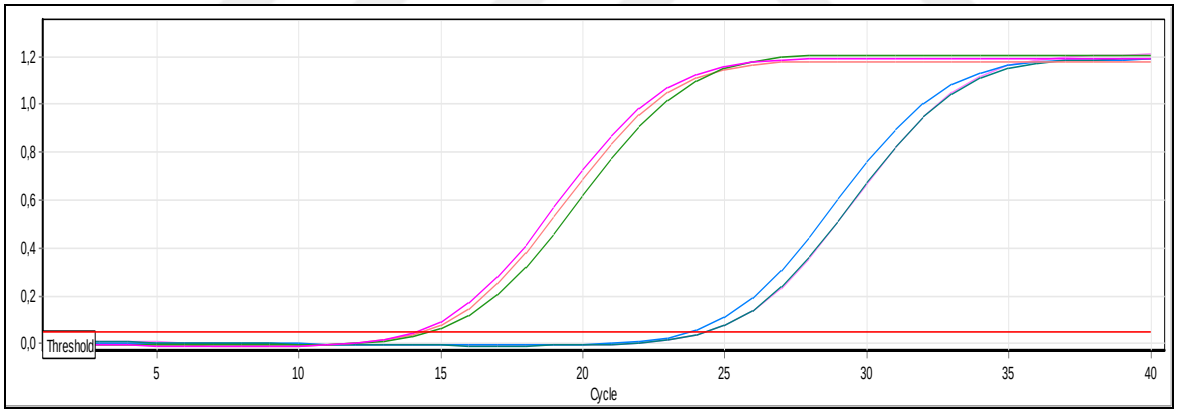
Döngü	**Süre**	**Isı**	**Açıklama**
1	10 dk	95ºC	Hot Start Taq DNA Polimeraz aktivasyonu bu basamakta gerçekleşmektedir.
40	15 sn 30 sn	95ºC 60ºC	Amplifikasyon ve florasan ışıma verilerinin toplanması bu döngülerde sağlanmaktadır. 60 ºC'de Green kanalda ışımalar toplanmıştır.

3.13. Veri Analizi ve İstatistik

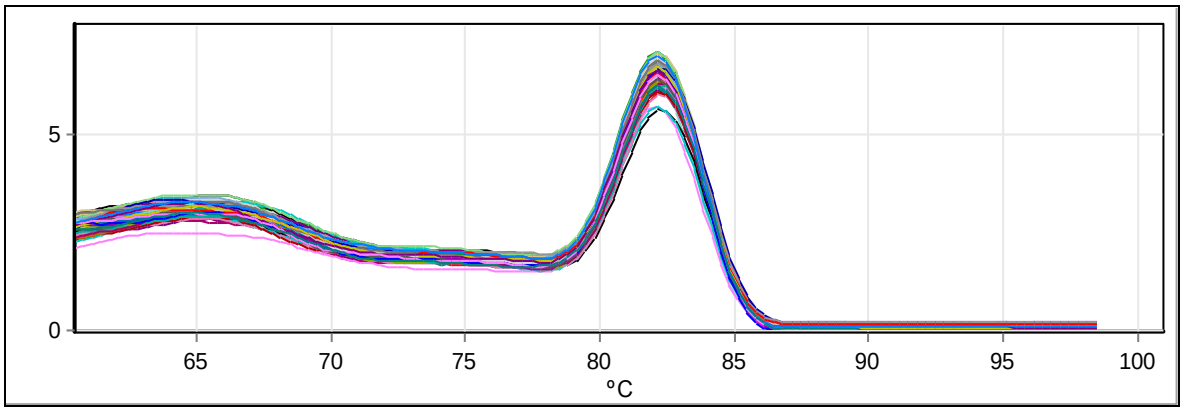
Veri Analizleri internet üzerinden verilerin *GeneGlobe* (Qiagen) sistemine yüklenmesi ile gerçekleştirildi. Veri tabanında, kat değişimi değerleri; ilgilenilen gen (GOI) ve housekeeping gen (HKG) ortlaması ile delta Ct değerlerinin elde edilmesinin ardından 2^ (-delta delta Ct) metodu ile hesaplandı. Elde edilen sonuçlar ile dağılım grafikleri oluşturuldu. Ct değerlerinin *cut-off* değeri "33" olarak belirlendi. Kontrol grupları ve çalışma grupları tanımlanarak normalizasyon yapıldı ve aritmetik ortalama ile sonuçlar değerlendirildi. Homojenite için *Levene* testi yapıldıktan sonra grupların homojenite içerdiği anlaşıldı. Bu nedenle iki grubun kıyaslamalarında *Student's t* testi uygulandı. Anlamlılık eşik değeri olarak $p<0,05$ kabul edildi.

4. BULGULAR

Deneylerde uyaranların MKH ve THP-1 hücreler üzerine etkileri ayrı ayrı ve *transwell* kültür sonrasında ölçümlendi. Tümör nekroz faktörü (TNF-α), İnterlökin 6 (İL-6), İnterlökin 10 (İL-10), İnterlökin 12A (İL-12A), İnterlökin 12B (İL-12B), nitrik oksit sentaz 2, uyarılabilir (iNOS) ve Arjinaz 1 (Arg-1) genlerine özgü primerler ile Beta Aktin (ACTB) ve Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) housekeeping genlerine özgü toplam 9 adet primer kullanıldı. Gerçek zamanlı PZR çalışmalarında Rotor Gene Q 5 + HRM cihazı (Qiagen) ve Rotor-Gene Q Software 2.1.0.6 yazılımı kullanıldı. Tüm gerçek zamanlı PZR koşumlarının analizinde threshold değeri 0,05; C_t (threshold cycle) cut-off değeri 33 olarak belirlendi. Her çalışma grubuna, genomik materyalin reaksiyona dahil edilmediği 1 (bir) örnek su kontrol olarak dahil edildi. Elde edilen sonuçlar her örnek ve gen için ayrı ayrı analiz edilerek C_t değerleri çizelgeye aktarıldı. Örnek bir gerçek zamanlı PZR görüntüsü Şekil 4.1'de verilmiştir (Şekil 4.1). Her çalışmada erime eğrisi analizi (melt analiz) yapılarak örneklerin sonuçlarının uygunluğu takip edildi. (Şekil 4.2)



Şekil 4.1. TNF-α gerçek zamanlı PZR analizi görüntüsü : Sırasıyla muamele edilmemiş THP-1 PMA Monosit/Makrofaj Ct değerleri; "14.40, 14.73, 14.18" ve muamele edilmemiş MKH Ct değerleri "24.45, 23.85, 24.41". Threshold değeri 0,05 alınmıştır.



Şekil 4.2. Arg-1 erime eğrisi analizi görüntüsü : 1-36 nolu örnekler

Gerçek zamanlı PZR ile elde edilen C_t değerlerinin genlere göre dağılımı Çizelge 4.1'de yer almaktadır.

Çizelge 4.1. Elde edilen Ct değerleri

1. Grup: Ko-Kültür öncesinde muamele edilmiş MKH ve THP-1 Mo/Mq									
Örnek No	C_T TNF-α	C_T İL-6	C_T İL-10	C_T İL-12-A	C_T İL-12-B	C_T iNOS	C_T ARG-1	C_T ACTβ	C_T GAPDH
Poly IC ile muamele edilmiş THP-1 PMA seti									
1	13,84	15,83	16,53	18,18	22,66	17,50	18,79	4,27	6,33
2	13,68	15,92	16,23	17,92	22,59	16,93	18,60	4,15	6,74
3	13,75	15,85	16,80	18,38	22,74	17,37	18,89	4,34	6,82
Poly IC ile muamele edilmiş MKH seti									
4	25,85	7,53	23,42	13,57	23,79	22,31	20,05	4,09	7,02
5	25,27	8,55	24,15	14,72	24,00	22,75	20,27	4,53	7,10
6	25,56	8,50	24,88	14,14	23,50	22,53	20,49	4,98	7,96
İFN ɣ VE DDLPS ile muamele edilmiş THP-1 PMA seti									
7	15,24	19,44	16,87	18,69	22,63	16,92	17,58	6,65	8,82
8	15,28	19,52	17,04	18,64	22,73	16,46	17,74	6,59	8,80
9	14,33	19,71	16,18	17,84	22,83	15,73	16,59	6,38	8,82
İFN ɣ VE DDLPS ile muamele edilmiş MKH seti									
10	25,36	8,46	25,00	15,08	27,22	22,30	21,05	5,12	6,85
11	25,11	7,62	25,39	14,46	27,00	22,27	21,41	4,51	6,15
12	25,61	8,07	25,60	14,62	27,40	22,07	20,65	5,78	6,29
İL4 İL10 İL13 ile muamele edilmiş THP-1 PMA seti									
13	16,32	21,69	16,72	17,78	23,01	17,21	16,45	4,60	7,17
14	17,27	22,16	17,81	19,48	24,71	17,66	17,82	6,46	8,42
15	16,85	21,73	17,54	18,64	22,41	17,39	17,80	4,53	7,76

Çizelge 4.1. (devam) Elde edilen Ct değerleri

İL4 İL10 İL13 ile muamele edilmiş MKH seti									
16	25,29	9,97	28,73	13,77	23,36	23,92	20,73	5,14	6,46
17	25,02	8,85	29,27	13,09	22,44	23,09	20,49	4,39	6,18
18	25,24	8,14	28,20	13,16	22,97	23,24	19,44	4,51	6,21
TNF α ile muamele edilmiş THP-1 PMA seti									
19	15,91	22,38	17,55	19,23	23,25	17,74	17,43	4,34	7,16
20	15,82	22,71	17,19	19,26	24,04	17,84	17,52	4,46	7,11
21	16,24	22,05	17,87	19,47	22,31	18,60	17,67	4,57	7,58
TNF α ile muamele edilmiş MKH seti									
22	25,96	7,66	24,96	13,09	21,91	22,33	19,96	4,20	6,19
23	25,77	7,48	24,94	13,05	21,80	22,25	20,74	4,13	6,11
24	25,52	7,57	24,95	13,07	21,85	22,29	20,35	4,37	6,04
YDLPS ile muamele edilmiş THP-1 PMA seti									
25	12,24	13,98	16,91	17,89	21,93	14,62	17,16	5,89	7,89
26	11,88	13,78	16,67	17,61	21,86	14,60	16,59	5,72	7,71
27	11,62	13,69	16,64	17,48	23,13	14,52	16,57	5,72	7,67
YDLPS ile muamele edilmiş MKH seti									
28	24,66	7,84	23,49	12,83	21,61	22,13	21,84	4,04	4,70
29	24,17	7,57	24,26	12,66	21,99	22,50	21,84	4,18	4,76
30	24,17	7,84	25,04	13,01	21,99	22,33	21,36	4,19	4,83
Muamelesiz THP-1 PMA seti									
31	15,43	21,76	16,41	19,43	21,81	18,44	16,52	4,34	7,61
32	15,36	22,37	16,34	19,40	21,92	18,40	16,74	4,29	7,61
33	15,57	21,15	16,25	19,38	21,71	18,42	16,67	4,20	7,09
Muamelesiz MKH seti									
34	23,26	6,79	24,74	12,24	22,71	22,58	19,39	4,03	4,56
35	25,49	6,74	24,75	12,57	23,96	22,16	19,62	4,04	4,58
36	24,37	6,70	24,75	12,40	23,33	22,37	19,17	4,05	4,63
2. Grup: Muamele edilmiş MKH ve Muamele edilmiş THP-1 Mo/Mq									
Örnek No	C_T TNF-α	C_T İL-6	C_T İL-10	C_T İL-12-A	C_T İL-12-B	C_T iNOS	C_T ARG-1	C_T ACTβ	C_T GAPDH
Muamelesiz MKH seti									
37	24,45	8,21	25,24	15,40	24,21	23,44	20,39	4,59	6,19
38	23,85	7,49	23,73	14,78	23,98	23,02	20,61	4,57	6,07
39	24,41	7,50	23,64	14,82	24,48	23,80	21,47	4,61	6,08
Muamelesiz THP-1 PMA seti									
40	14,40	20,84	17,12	18,29	22,52	20,26	16,71	5,83	8,82
41	14,73	22,13	17,50	18,27	24,34	19,79	16,46	5,84	9,60
42	14,18	20,03	17,15	17,92	22,33	19,58	15,64	5,83	8,84

Çizelge 4.1. (devam) Elde edilen Ct değerleri

Muamelesiz MKH + Muamelesiz THP-1 PMA Ko kültür (*Transwell*) Uyarımsız hücrelerin *transwell* ile ko-kültürü									
43	21,18	6,30	22,35	15,00	24,07	22,33	20,47	4,39	4,79
44	22,17	6,07	22,74	15,66	21,41	24,32	21,60	5,82	6,22
45	22,74	6,54	22,74	16,33	21,41	24,56	21,45	5,74	6,90
46	16,31	18,57	17,44	20,65	23,00	20,29	17,63	5,83	8,72
47	15,57	19,30	16,76	19,13	22,17	18,78	16,61	4,61	7,92
48	15,88	20,38	16,74	18,82	23,21	19,30	15,96	4,27	7,98
Poly IC ile muamele edilmiş MKH + Poly IC ile muamele edilmiş THP-1 PMA Ko kültür (*Transwell*)									
49	22,59	5,85	22,74	15,84	21,41	21,66	20,45	4,62	6,00
50	23,50	5,93	23,81	16,06	22,08	22,10	20,71	5,76	6,01
51	22,05	5,87	23,81	16,59	24,45	22,07	22,50	5,95	6,06
52	14,37	14,82	13,90	17,76	22,02	17,84	14,78	4,02	6,07
53	14,30	16,84	15,01	18,50	23,82	18,51	14,67	4,14	6,40
54	15,57	16,00	16,15	19,63	23,00	19,61	16,37	5,75	7,76
İFN ɣ ve DDLPS ile muamele edilmiş MKH + İFN ɣ ve DDLPS ile muamele edilmiş THP-1 PMA Ko kültür (*Transwell*)									
55	19,76	4,33	23,81	13,04	22,08	22,10	19,47	4,36	4,30
56	20,29	4,27	25,02	13,00	21,69	22,53	18,85	4,15	4,25
57	19,76	4,27	25,11	12,95	24,14	21,51	19,26	4,05	4,16
58	14,53	18,06	15,80	18,76	21,56	19,23	15,40	4,29	7,60
59	13,86	18,34	15,65	18,23	21,56	18,44	14,60	4,14	7,06
60	14,51	18,15	15,34	19,52	22,04	19,12	15,31	4,26	6,91
İL4, İL10, İL13 ile muamele edilmiş MKH + İL4, İL10, İL13 ile muamele edilmiş THP-1 PMA Ko kültür (*Transwell*)									
61	23,00	8,78	25,20	14,90	27,98	22,62	20,65	4,20	4,59
62	23,73	8,15	25,27	15,00	27,86	23,71	21,54	4,30	4,50
63	22,19	8,05	25,11	15,76	28,02	22,54	20,25	4,39	4,60
64	14,87	18,58	15,77	20,43	22,00	18,64	14,84	4,13	7,04
65	15,21	18,00	16,73	21,77	22,64	20,28	15,05	4,37	7,23
66	14,52	17,63	16,14	20,50	23,02	19,45	14,89	4,28	6,96
TNF-α ile muamele edilmiş MKH + TNF-α ile muamele edilmiş THP-1 PMA Ko kültür (*Transwell*)									
67	18,96	4,00	21,31	12,87	21,09	20,77	17,51	4,02	4,01
68	18,70	4,08	22,89	14,49	22,15	20,32	19,11	4,11	4,07
69	18,90	4,01	22,64	13,56	21,07	21,43	18,37	4,01	4,03
70	14,43	15,54	14,92	17,55	21,88	18,30	13,86	4,20	6,49
71	14,80	18,54	15,61	18,31	21,40	18,62	13,98	4,30	7,03
72	14,60	17,00	15,00	18,00	21,60	18,50	13,92	4,30	7,00

Çizelge 4.1. (devam) Elde edilen Ct değerleri

YDLPS ile muamele edilmiş MKH + YDLPS ile muamele edilmiş THP-1 PMA Ko kültür (*Transwell*)									
73	19,11	4,00	22,58	13,00	24,40	22,17	17,29	4,16	4,05
74	19,58	4,03	22,25	13,83	23,17	21,44	18,47	4,03	4,12
75	18,52	4,01	22,83	14,15	22,80	22,54	18,03	4,03	4,08
76	13,64	17,31	14,74	18,27	20,41	18,36	14,05	4,06	6,38
77	13,75	17,21	14,60	17,47	20,28	17,60	13,14	4,28	6,52
78	14,02	17,39	14,64	17,58	20,70	17,74	13,42	4,02	6,58
3. Grup: Muamele edilmemiş MKH ve muamele edilmiş THP-1 Mo/Mq Ko-Kültür									
Örnek No	C_T TNF-α	C_T İL-6	C_T İL-10	C_T İL-12-A	C_T İL-12-B	C_T iNOS	C_T ARG-1	C_T ACTβ	C_T GAPDH
Muamelesiz THP-1 PMA seti									
79	15,14	20,70	16,02	18,41	22,22	17,31	14,95	4,09	6,37
80	15,58	21,39	16,31	18,46	23,06	17,52	14,96	4,40	6,67
81	14,66	20,37	15,30	17,54	22,68	16,55	14,69	4,02	5,46
Muamelesiz MKH seti									
82	24,12	8,34	22,85	12,60	20,97	21,47	16,63	4,11	4,11
83	23,68	7,54	22,54	12,03	20,20	21,33	16,55	4,24	4,04
84	21,81	6,78	21,63	10,83	19,30	21,59	15,41	4,37	4,06
Muamelesiz MKH + Poly IC ile muamele edilmiş THP-1 PMA Ko kültür (*Transwell*)									
85	22,78	4,31	22,08	11,24	22,14	22,77	16,98	4,14	4,04
86	22,37	4,56	20,30	12,15	20,53	20,34	17,27	4,05	4,06
87	23,47	4,72	22,98	12,87	22,00	22,28	18,54	4,08	4,11
88	14,67	20,14	14,07	20,19	24,00	17,33	14,99	4,34	5,53
89	14,28	19,39	13,09	18,69	23,58	16,53	13,33	4,11	4,83
90	15,36	19,66	15,03	20,24	24,60	17,67	15,12	4,30	5,00
Muamelesiz MKH + İFN ɣ ve DDPLS ile muamele edilmiş THP-1 PMA Ko kültür (*Transwell*)									
91	22,20	4,36	21,64	12,22	23,08	21,90	16,96	4,18	4,06
92	22,50	4,15	22,67	12,23	21,04	22,26	16,57	4,18	4,06
93	22,91	4,14	21,97	12,21	23,17	22,68	17,22	4,14	4,05
94	14,42	17,78	13,72	18,48	24,76	15,72	14,25	4,03	5,25
95	14,53	17,00	13,89	19,20	22,76	16,35	14,40	4,03	6,48
96	14,73	17,75	14,30	19,31	24,00	16,69	15,19	4,03	6,49
Muamelesiz MKH + İL4, İL10, İL13 ile muamele edilmiş THP-1 PMA Ko kültür (*Transwell*)									
97	24,09	4,59	21,32	11,25	21,71	21,73	16,50	4,25	4,05
98	24,27	5,86	21,00	12,25	22,77	21,50	17,04	4,05	4,10
99	25,44	4,52	20,77	11,22	21,03	20,81	15,39	4,19	4,04
100	14,66	19,20	13,19	17,44	20,10	15,79	13,29	4,05	4,92
101	14,61	19,16	13,26	18,71	22,22	15,96	13,30	4,03	5,21
102	14,52	19,20	13,30	18,00	21,00	16,00	13,30	4,10	5,00

Çizelge 4.1. (devam) Elde edilen Ct değerleri

Muamelesiz MKH + TNF-α ile muamele edilmiş THP-1 PMA Ko kültür (*Transwell*)									
103	23,65	4,67	23,89	12,66	21,00	22,09	17,02	4,09	4,16
104	23,50	6,53	22,00	13,98	20,00	22,15	18,80	4,02	4,45
105	23,18	4,43	21,35	11,74	19,83	22,23	16,18	4,26	4,04
106	14,70	17,54	13,89	19,41	21,43	16,45	14,00	4,03	6,30
107	14,34	17,41	13,43	18,73	22,67	16,67	13,63	4,04	6,18
108	15,73	18,76	14,95	20,51	22,00	18,24	15,30	4,01	7,11
Muamelesiz MKH + İFN ɣ ve YDLPS ile muamele edilmiş THP-1 PMA Ko kültür (*Transwell*)									
109	21,02	4,06	20,98	12,34	20,67	22,12	16,23	4,30	4,04
110	21,10	4,05	21,29	12,09	21,17	22,00	16,38	4,32	4,04
111	20,01	4,12	20,78	12,37	22,39	21,61	16,60	4,04	4,14
112	11,94	13,67	14,01	18,37	20,86	14,55	13,95	4,05	6,30
113	11,40	13,62	13,37	17,85	20,12	14,48	13,40	4,01	5,38
114	11,59	12,64	13,78	17,38	20,67	14,40	13,49	4,12	6,35
4. Grup: Muamele edilmiş MKH ve muamele edilmemiş THP-1 Mo/Mq Ko-Kültürü									
Örnek No	C_T TNF-α	C_T İL-6	C_T İL-10	C_T İL-12-A	C_T İL-12-B	C_T iNOS	C_T ARG-1	C_T ACTβ	C_T GAPDH
Poly IC ile muamele edilmiş MKH + Muamelesiz THP-1 PMA Ko kültür (*Transwell*)									
121	13,72	14,58	14,32	21,33	21,17	17,43	17,37	4,03	6,09
122	13,50	15,79	14,28	20,69	20,27	17,34	16,45	4,13	6,20
123	13,45	14,52	14,58	20,49	19,98	17,14	16,12	4,32	6,35
124	17,67	4,10	22,80	13,79	21,00	22,72	18,39	4,66	4,15
125	18,14	4,24	22,53	13,79	20,33	22,52	18,05	4,03	4,02
126	17,21	4,00	23,07	13,80	20,66	21,65	17,79	4,21	4,10
İFN ɣ- ve DDPLS ile muamele edilmiş MKH + Muamelesiz THP-1 PMA Ko kültür (*Transwell*)									
127	18,80	5,98	23,40	14,73	22,30	23,50	19,97	4,07	4,46
128	19,04	4,24	23,72	15,09	22,15	23,93	18,99	4,03	4,04
129	19,70	4,33	23,61	14,52	23,00	23,73	19,25	4,14	4,03
130	9,44	14,16	13,31	18,27	19,30	15,65	14,63	4,11	7,10
131	10,03	14,16	13,31	18,82	19,07	15,58	14,32	4,11	6,50
132	10,40	14,50	13,31	18,82	18,93	15,58	14,88	4,18	7,10
İL4, İL10, İL13 ile muamele edilmiş MKH + Muamelesiz THP-1 PMA Ko kültür (*Transwell*)									
139	18,95	4,71	22,61	12,88	21,32	23,47	18,36	4,05	4,06
140	19,07	4,70	22,04	13,08	21,32	23,36	18,98	4,02	4,07
141	19,01	4,73	22,35	12,90	21,70	22,42	17,74	4,04	4,19
142	11,64	15,80	13,75	19,48	19,98	15,72	13,52	4,09	6,18
143	11,67	15,88	13,02	18,35	19,93	15,51	13,41	4,03	6,31
144	10,52	14,43	13,17	19,49	19,02	14,98	13,30	4,01	6,18

Çizelge 4.1. (devam) Elde edilen Ct değerleri

TNF-α ile muamele edilmiş MKH + Muamelesiz THP-1 PMA Ko kültür (*Transwell*)									
145	17,40	4,04	22,23	13,74	19,27	21,16	18,15	4,11	4,22
146	18,63	4,31	23,28	12,80	19,18	21,81	18,27	4,08	4,04
147	17,20	4,06	22,53	13,96	20,47	23,23	18,34	4,02	4,06
148	12,68	12,09	15,02	20,22	18,12	17,61	14,21	4,12	6,21
149	11,38	12,09	14,12	20,10	18,12	17,27	14,21	4,27	6,59
150	10,97	11,91	15,88	19,15	17,27	16,63	15,30	4,61	6,77
YDLPS ile muamele edilmiş MKH + Muamelesiz THP-1 PMA Ko kültür (*Transwell*)									
151	16,27	4,13	23,14	12,96	21,87	21,24	17,96	4,07	4,16
152	15,67	4,07	22,87	12,60	21,87	21,68	17,67	4,05	4,14
153	15,34	4,00	21,97	12,18	21,87	21,54	17,05	4,04	4,15
154	10,72	13,57	15,34	18,20	17,70	17,47	13,93	4,21	6,64
155	10,00	10,79	15,10	18,46	18,38	17,44	13,93	4,82	6,33
156	11,00	13,79	13,90	18,88	17,76	17,44	14,05	4,16	6,33
Muamelesiz MKH + Muamelesiz THP-1 PMA Ko kültür (*Transwell*) Uyarımsız hücrelerin *transwell* ile ko-kültürü									
157	22,23	5,82	21,39	12,20	21,81	26,12	17,23	4,27	4,04
158	21,18	5,99	22,95	12,63	22,81	25,13	17,35	4,11	4,07
159	21,06	4,61	22,95	13,93	24,62	24,39	18,79	4,08	4,04
160	12,88	15,31	14,94	21,05	20,39	18,67	15,22	4,32	6,35
161	12,00	14,20	15,57	21,55	21,22	18,37	15,10	4,20	6,42
162	12,30	14,90	14,66	21,35	21,08	18,58	14,67	4,15	6,31
5. Grup: MKH Süpernatantı ile THP-1 PMA Kültürü									
Örnek No	C_T TNF-α	C_T İL-6	C_T İL-10	C_T İL-12-A	C_T İL-12-B	C_T iNOS	C_T ARG-1	C_T ACTβ	C_T GAPDH
THP-1 PMA normal medium ile									
163	12,99	21,43	14,69	15,85	21,62	15,80	13,73	4,08	5,15
164	13,00	19,48	14,83	16,43	22,87	15,62	13,71	4,01	5,15
165	13,32	18,94	14,97	16,59	20,08	15,59	13,65	4,03	5,15
THP-1 PMA, MKH süpernatantı ile									
166	14,66	19,58	14,09	17,96	18,96	15,97	14,32	4,01	6,01
167	14,45	19,60	14,05	17,32	18,50	15,75	14,68	4,11	6,18
168	14,55	19,65	14,14	17,64	19,43	16,35	14,50	4,04	5,94

Çalışmanın analizleri THP-1 Monosit/Makrofaj ve MKH için 5 ayrı grup içerisinde birbirinden ayrı olarak yapıldı. Her grup içerisinde housekeeping genlerin ortalamaları hesaplandı. Öncelikle ACTB ve GAPDH için ayrı ayrı ortalama alınıp sonrasında ortak ortalamaları alındı.

Çizelge 4.2. Housekeeping gen ct değerlerinin aritmetik ortalamalarının alınması

1. Grup: Ko-Kültür öncesinde muamele edilmiş MKH ve THP-1 Mo/Mq				
Örnek No	C_T ACTβ	C_T GAPDH	Aritmetik Ortlama	Genel Aritmetik Ortalama
1	4,27	6,33	5,30	5,44
2	4,15	6,74	5,45	
3	4,34	6,82	5,58	
4	4,09	7,02	5,56	5,95
5	4,53	7,10	5,82	
6	4,98	7,96	6,47	
7	6,65	8,82	7,74	7,68
8	6,59	8,80	7,70	
9	6,38	8,82	7,60	
10	5,12	6,85	5,99	5,78
11	4,51	6,15	5,33	
12	5,78	6,29	6,04	
13	4,60	7,17	5,89	6,49
14	6,46	8,42	7,44	
15	4,53	7,76	6,15	
16	5,14	6,46	5,80	5,48
17	4,39	6,18	5,29	
18	4,51	6,21	5,36	
19	4,34	7,16	5,75	5,87
20	4,46	7,11	5,79	
21	4,57	7,58	6,08	
22	4,20	6,19	5,20	5,17
23	4,13	6,11	5,12	
24	4,37	6,04	5,21	
25	5,89	7,89	6,89	6,77
26	5,72	7,71	6,72	
27	5,72	7,67	6,70	
28	4,04	4,70	4,37	4,45
29	4,18	4,76	4,47	
30	4,19	4,83	4,51	
31	4,34	7,61	5,98	5,86
32	4,29	7,61	5,95	
33	4,20	7,09	5,65	
34	4,03	4,56	4,30	4,32
35	4,04	4,58	4,31	
36	4,05	4,63	4,34	

Çizelge 4.2. (devam) Housekeeping gen ct değerlerinin aritmetik ortalamalarının alınması

2. Grup: Muamele edilmiş MKH ve Muamele edilmiş THP-1 Mo/Mq				
Örnek No	C_T ACTβ	C_T GAPDH	Aritmetik Ortlama	Genel Aritmetik Ortalama
37	4,59	6,19	5,39	5,35
38	4,57	6,07	5,32	
39	4,61	6,08	5,35	
40	5,83	8,82	7,33	7,46
41	5,84	9,60	7,72	
42	5,83	8,84	7,34	
43	4,39	4,79	4,59	5,64
44	5,82	6,22	6,02	
45	5,74	6,90	6,32	
46	5,83	8,72	7,28	6,56
47	4,61	7,92	6,27	
48	4,27	7,98	6,13	
49	4,62	6,00	5,31	5,73
50	5,76	6,01	5,89	
51	5,95	6,06	6,01	
52	4,02	6,07	5,05	5,69
53	4,14	6,40	5,27	
54	5,75	7,76	6,76	
55	4,36	4,30	4,33	4,21
56	4,15	4,25	4,20	
57	4,05	4,16	4,11	
58	4,29	7,60	5,95	5,71
59	4,14	7,06	5,60	
60	4,26	6,91	5,59	
61	4,20	4,59	4,40	4,43
62	4,30	4,50	4,40	
63	4,39	4,60	4,50	
64	4,13	7,04	5,59	5,67
65	4,37	7,23	5,80	
66	4,28	6,96	5,62	
67	4,02	4,01	4,02	4,04
68	4,11	4,07	4,09	
69	4,01	4,03	4,02	
70	4,20	6,49	5,35	5,55
71	4,30	7,03	5,67	
72	4,30	7,00	5,65	
73	4,16	4,05	4,11	4,08
74	4,03	4,12	4,08	
75	4,03	4,08	4,06	
76	4,06	6,38	5,22	5,31
77	4,28	6,52	5,40	

Çizelge 4.2. (devam) Housekeeping gen ct değerlerinin aritmetik ortalamalarının alınması

78	4,02	6,58	5,30	
3. Grup: Muamele edilmemiş MKH ve muamele edilmiş THP-1 Mo/Mq Ko-Kültür				
Örnek No	C_T ACTβ	C_T GAPDH	Aritmetik Ortlama	Genel Aritmetik Ortalama
79	4,09	6,37	5,23	5,17
80	4,40	6,67	5,54	
81	4,02	5,46	4,74	
82	4,11	4,11	4,11	4,16
83	4,24	4,04	4,14	
84	4,37	4,06	4,22	
85	4,14	4,04	4,09	4,08
86	4,05	4,06	4,06	
87	4,08	4,11	4,10	
88	4,34	5,53	4,94	4,69
89	4,11	4,83	4,47	
90	4,30	5,00	4,65	
91	4,18	4,06	4,12	4,11
92	4,18	4,06	4,12	
93	4,14	4,05	4,10	
94	4,03	5,25	4,64	5,05
95	4,03	6,48	5,26	
96	4,03	6,49	5,26	
97	4,25	4,05	4,15	4,11
98	4,05	4,10	4,08	
99	4,19	4,04	4,12	
100	4,05	4,92	4,49	4,55
101	4,03	5,21	4,62	
102	4,10	5,00	4,55	
103	4,09	4,16	4,13	4,17
104	4,02	4,45	4,24	
105	4,26	4,04	4,15	
106	4,03	6,30	5,17	5,28
107	4,04	6,18	5,11	
108	4,01	7,11	5,56	
109	4,30	4,04	4,17	4,15
110	4,32	4,04	4,18	
111	4,04	4,14	4,09	
112	4,05	6,30	5,18	5,04
113	4,01	5,38	4,70	
114	4,12	6,35	5,24	

Çizelge 4.2. (devam) Housekeeping gen ct değerlerinin aritmetik ortalamalarının alınması

4. Grup: Muamele edilmiş MKH ve muamele edilmemiş THP-1 Mo/Mq Ko-Kültürü				
Örnek No	C_T ACTβ	C_T GAPDH	Aritmetik Ortlama	Genel Aritmetik Ortalama
121	4,03	6,09	5,06	5,19
122	4,13	6,20	5,17	
123	4,32	6,35	5,34	
124	4,66	4,15	4,41	4,20
125	4,03	4,02	4,03	
126	4,21	4,10	4,16	
127	4,07	4,46	4,27	4,13
128	4,03	4,04	4,04	
129	4,14	4,03	4,09	
130	4,11	7,10	5,61	5,52
131	4,11	6,50	5,31	
132	4,18	7,10	5,64	
139	4,05	4,06	4,06	4,07
140	4,02	4,07	4,05	
141	4,04	4,19	4,12	
142	4,09	6,18	5,14	5,13
143	4,03	6,31	5,17	
144	4,01	6,18	5,10	
145	4,11	4,22	4,17	4,09
146	4,08	4,04	4,06	
147	4,02	4,06	4,04	
148	4,12	6,21	5,17	5,43
149	4,27	6,59	5,43	
150	4,61	6,77	5,69	
151	4,07	4,16	4,12	4,10
152	4,05	4,14	4,10	
153	4,04	4,15	4,10	
154	4,21	6,64	5,43	5,42
155	4,82	6,33	5,58	
156	4,16	6,33	5,25	
157	4,27	4,04	4,16	4,10
158	4,11	4,07	4,09	
159	4,08	4,04	4,06	
160	4,32	6,35	5,34	5,29
161	4,20	6,42	5,31	
162	4,15	6,31	5,23	

Çizelge 4.2. (devam) Housekeeping gen ct değerlerinin aritmetik ortalamalarının alınması

5. Grup: MKH Süpernatantı ile THP-1 PMA Kültürü				
Örnek No	C_T ACTβ	C_T GAPDH	Aritmetik Ortlama	Genel Aritmetik Ortalama
163	4,08	5,15	4,62	4,60
164	4,01	5,15	4,58	
165	4,03	5,15	4,59	
166	4,01	6,01	5,01	5,05
167	4,11	6,18	5,15	
168	4,04	5,94	4,99	

Her set içerisinde yer alan THP-1 Monosit/Makrofaj ve MKH 3'lü tekrarları C_t sonuçlarının ortalamaları alındı ve elde edilen tüm sonuçların Delta (Δ) C_t ; Delta Delta (Δ Δ) C_t değerleri hesaplandı. $\Delta\Delta C_t$ değeri kullanılarak "kat değişimi" hesaplandı. Sonrasında *Student's t* analizi ile p değeri saptandı. Kat değişimi cut off değeri 2; p-değeri cut off değeri 0,05 olarak alındı. Buna göre elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. THP1-MØ ve MKH sonuçlarının sırasıyla Kat değişimi ve P Değeri Dağılım Çizelgesi

1. Grup: Ko-Kültür öncesinde muamele edilmiş MKH (+) ve THP-1 Mo/Mq (+)								
Set No	Örnek No	TNF-α	İL-6	İL-10	İL-12-A	İL-12-B	iNOS	ARG-1
1.Set	Poly IC ile muamele edilmiş THP-1 PMA seti (+)							
	1	2.43 0.002651	44.58 0.000064			-2.40 0.000318		-5.78 0.001017
	2							
	3							
	Poly IC ile muamele edilmiş MKH seti (+)							
	4			4.69 0.003100			2.77 0.030492	
	5							
	6							
2.Set	İFN ɣ VE DDLPS ile muamele edilmiş THP-1 PMA seti (+)							
	7	5.00 0.016677	16.26 0.000328	2.74 0.017692	7.13 0.007879		14.62 0.012444	
	8							
	9							
	İFN ɣ VE DDLPS ile muamele edilmiş MKH seti (+)							
	10					-5.30 0.026418	3.08 0.017414	
	11							
	12							

Çizelge 4.3. (devam) THP1-MØ ve MKH sonuçlarının sırasıyla Kat değişimi ve P Değeri Dağılım Çizelgesi

3.Set	İL4 İL10 İL13 ile muamele edilmiş THP-1 PMA seti (+)							
	13				2.65 0.006604			
	14							
	15							
	İL4 İL10 İL13 ile muamele edilmiş MKH seti (+)							
	16		-2.11 0.028356	-7.06 0.000014		2.98 0.008378		
	17							
	18							
4.Set	TNF α ile muamele edilmiş THP-1 PMA seti (+)							
	19			-2.28 0.000785		-2.59 0.048204		
	20							
	21							
	TNF α ile muamele edilmiş MKH seti(+)							
	22					5.06 0.000109		
	23							
	24							
5.Set	YDLPS ile muamele edilmiş THP-1 PMA seti (+)							
	25	21.86 0.000375	462.51 0.000001		6.29 0.000045		26.91 0.000007	
	26							
	27							
	YDLPS ile muamele edilmiş MKH seti (+)							
	28					3.04 0.003253		-4.44 0.001614
	29							
	30							
2. Grup: Muamele edilmiş MKH (+) ve Muamele edilmiş THP-1 Mo/Mq (+) ko-kültürü								
Set No	Örnek No	TNF-α	İL-6	İL-10	İL-12-A	İL-12-B	iNOS	ARG-1
8.Set	Muamelesiz MKH (-) + Muamelesiz THP-1 PMA (-) Ko kültür (*Transwell*) Uyarımsız hücrelerin *transwell* ile ko-kültürü							
	MKH (-)							
	43	5.65 0.000903		3.69 0.047556				
	44							
	45							
	THP-1 PMA (-)							
	46	-5.24 0.000130			-4.85 0.000999			-2.58 0.041882
	47							
	48							

Çizelge 4.3. (devam) THP1-MØ ve MKH sonuçlarının sırasıyla Kat değişimi ve P Değeri Dağılım Çizelgesi

9.Set	Poly IC ile muamele edilmiş MKH (+) + Poly IC ile muamele edilmiş THP-1 PMA (+) ko-kültürü (*Transwell*)							
	MKH (+)							
	49 50 51		4.70 0.004350	2.19 0.046168			3.68 0.000219	
	THP-1 PMA (+)							
	52 53 54	-4.23 0.000145			-4.72 0.000949			
10.Set	İFN ɣ ve DDLPS ile muamele edilmiş MKH (+) + İFN ɣ ve DDLPS ile muamele edilmiş THP-1 PMA (+) ko-kültürü (*Transwell*)							
	MKH (+)							
	55 56 57	8.94 0.001895	4.94 0.000015					
	THP-1 PMA (+)							
	58 59 60	-3.06 0.000507			-5.38 0.001292			
11.Set	İL4, İL10, İL13 ile muamele edilmiş MKH (+) + İL4, İL10, İL13 ile muamele edilmiş THP-1 PMA (+) ko-kültürü (*Transwell*)							
	MKH (+)							
	61 62 63		-2.90 0.011171		-2.21 0.013287	-24.96 0.000000		
	THP-1 PMA (+)							
	64 65 66	-4.66 0.000129			-23.13 0.000413		-2.59 0.042640	
12.Set	TNF-α ile muamele edilmiş MKH (+) + TNF-α ile muamele edilmiş THP-1 PMA (+) ko-kültürü (*Transwell*)							
	MKH (+)							
	67 68 69	16.68 0.000029	5.25 0.000008			2.76 0.030602		

Çizelge 4.3. (devam) THP1-MØ ve MKH sonuçlarının sırasıyla Kat değişimi ve P Değeri Dağılım Çizelgesi

12.Set	THP-1 PMA (+)							
	70	-4.23 0.000099			-3.25 0.001646			
	71							
	72							
13.Set	YDLPS ile muamele edilmiş MKH (+) + YDLPS ile muamele edilmiş THP-1 PMA (+) ko-kültürü (*Transwell*)							
	MKH (+)							
	73	14.86 0.010590	5.45 0.000010					
	74							
	75							
	THP-1 PMA (+)							
	76	-2.87 0.000293	2.91 0.011940		-3.40 0.002605			
	77							
	78							
3. Grup: Muamele edilmemiş MKH (-) ve muamele edilmiş THP-1 Mo/Mq (+) ko-kültürü								
Set No	Örnek No	TNF-α	İL-6	İL-10	İL-12-A	İL-12-B	iNOS	ARG-1
15.Set	Muamelesiz MKH (-) + Poly IC ile muamele edilmiş THP-1 PMA (+) ko-kültürü (*Transwell*)							
	MKH (-)							
	85		7.72 0.000899					
	86							
	87							
	THP-1 PMA (+)							
	88				-4.15 0.002517	-3.71 0.020931		
	89							
	90							
16.Set	Muamelesiz MKH (-) + İFN ɣ ve DDPLS ile muamele edilmiş THP-1 PMA (+) ko-kültürü (*Transwell*)							
	MKH (-)							
	91		9.80 0.000110					
	92							
	93							
	THP-1 PMA (+)							
	94		9.15 0.031138	3.46 0.002355				
	95							
	96							

Çizelge 4.3. (devam) THP1-MØ ve MKH sonuçlarının sırasıyla Kat değişimi ve P Değeri Dağılım Çizelgesi

17.Set	Muamelesiz MKH (-) + İL4, İL10, İL13 ile muamele edilmiş THP-1 PMA (+) ko-kültürü (*Transwell*)							
	MKH (-)							
	97		5.74 0.035008	2.41 0.028519				
	98							
	99							
	THP-1 PMA (+)							
	100		2.02 0.000639	4.03 0.000008				
	101							
	102							
18.Set	Muamelesiz MKH (-) + TNF-α ile muamele edilmiş THP-1 PMA (+) ko-kültürü (*Transwell*)							
	MKH (-)							
	103							
	104							
	105							
	THP-1 PMA (+)							
	106		8.15 0.007712	3.72 0.021908	-2.47 0.013226			
	107							
	108							
19.Set	Muamelesiz MKH (-) + İFN ɣ ve YDLPS ile muamele edilmiş THP-1 PMA (+) ko-kültürü (*Transwell*)							
	MKH (-)							
	109	5.60 0.044989	11.07 0.000044	2.49 0.019872				
	110							
	111							
	THP-1 PMA (+)							
	112	10.02 0.000379	163.33 0.035488	4.00 0.000147		3.85 0.000684	5.62 0.001791	2.14 0.010835
	113							
	114							

Çizelge 4.3. (devam) THP1-MØ ve MKH sonuçlarının sırasıyla Kat değişimi ve P Değeri Dağılım Çizelgesi

4. Grup: Muamele edilmiş MKH (+) ve muamele edilmemiş THP-1 Mo/Mq (-) ko-kültürü								
Set No	Örnek No	TNF-α	İL-6	İL-10	İL-12-A	İL-12-B	iNOS	ARG-1
21.Set	Poly IC ile muamele edilmiş MKH (+) + Muamelesiz THP-1 PMA (-) ko-kültürü (*Transwell*)							
	THP-1 PMA (-)							
	121 122 123	-2.40 0.017866					2.20 0.000348	-3.37 0.005704
	MKH (+)							
	124 125 126	15.05 0.008553	2.74 0.016648			7.19 0.001744	8.06 0.046639	
22.Set	İFN ɣ- ve DDPLS ile muamele edilmiş MKH (+) + Muamelesiz THP-1 PMA (-) ko-kültürü (*Transwell*)							
	MKH (+)							
	127 128 129	5.03 0.012251					2.83 0.008623	
	THP-1 PMA (-)							
	130 131 132	6.48 0.020173		4.01 0.000899	7.67 0.007625	4.16 0.003215	9.16 0.000188	
24.Set	İL4, İL10, İL13 ile muamele edilmiş MKH (+) + Muamelesiz THP-1 PMA (-) ko-kültürü (*Transwell*)							
	MKH (+)							
	139 140 141	5.46 0.000082						
	THP-1 PMA (-)							
	142 143 144			3.07 0.013943			8.06 0.004237	2.75 0.000386

Çizelge 4.3. (devam) THP1-MØ ve MKH sonuçlarının sırasıyla Kat değişimi ve P Değeri Dağılım Çizelgesi

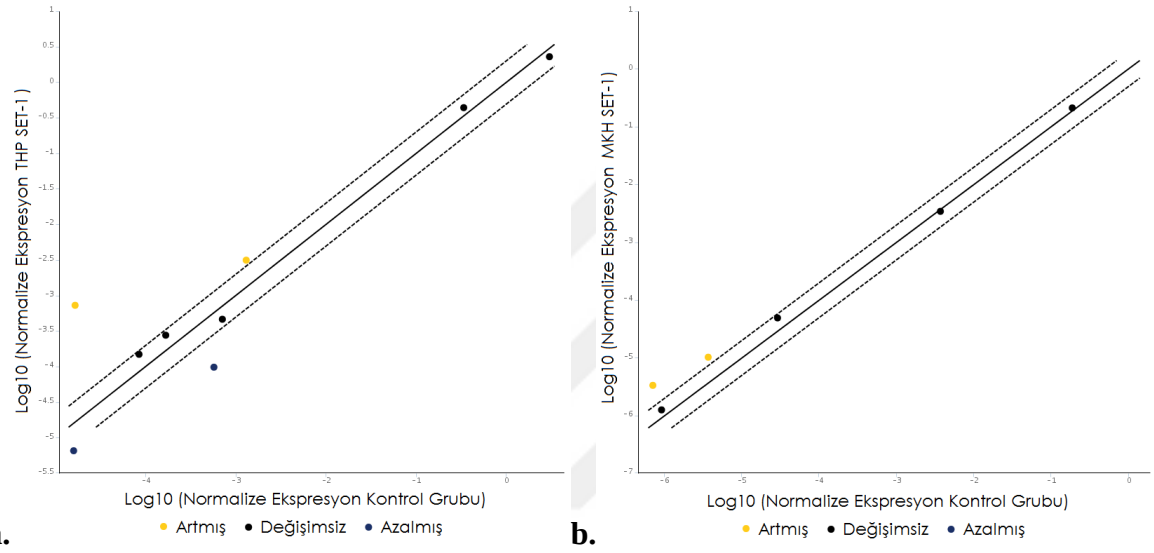
25.Set	TNF-α ile muamele edilmiş MKH (+) + Muamelesiz THP-1 PMA (-) ko-kültürü (*Transwell*)							
	MKH (+)							
	145 146 147	13.30 0.023353	2.50 0.021315			10.80 0.019568		
	THP-1 PMA (-)							
	148 149 150		7.69 0.004269			9.38 0.045929		
26.Set	YDLPS ile muamele edilmiş MKH (+) + Muamelesiz THP-1 PMA (-) ko-kültürü (*Transwell*)							
	MKH (+)							
	151 152 153	56.23 0.001450	2.65 0.010594				13.24 0.000784	
	THP-1 PMA (-)							
	154 155 156				7.78 0.006926	8.61 0.000024	2.37 0.001125	2.27 0.005299
5. Grup: MKH Süpernatantı ile THP-1 PMA Kültürü								
Set No	Örnek No	TNF-α	İL-6	İL-10	İL-12-A	İL-12-B	iNOS	ARG-1
28. Set	THP-1 PMA							
	166 167 168	-2.04 0.002378		2.23 0.000038		8.07 0.000654		

4.1. Ko-Kültür Öncesinde Muamele Edilmiş MKH ve THP-1 Mo/Mq Gen Ekspresyonu Ölçümlemesi

Ko-kültür öncesinde hem MKH hem de THP-1 Mo/Mq; 1) Polyinosinic-polycytidylic acid [Poly (I:C)], 2)Interferon-γ (İFN-γ) + Düşük doz Lipopolisakkarid (DDLPS), 3)İnterlökin-4 (İL-4) + İnterlökin-10 (İL-10) + İnterlökin-13 (İL-13), 4)Tümör Nekroz Faktörü α (TNF-α) ve 5) Yüksek doz Lipopolisakkarid (YDLPS) ile muamele edildi. Bu hücrelerde

araştırmamıza dahil edilmiş olan genlerin ekspresyonları, muamele edilmemiş hücre grupları ile karşılaştırılarak aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

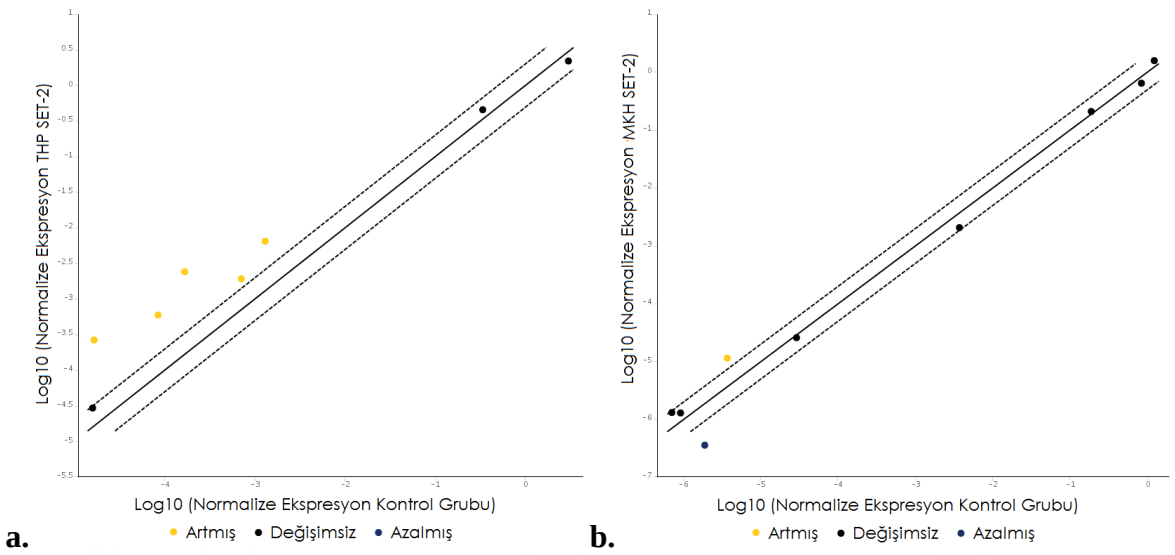
Poly I:C ile muamele edilmiş THP-1 Monosit/Makrofajlarda; yüksek oranda artmış İL-6 ve artmış TNF-α ekspresyonu ile azalan İL-12-B ve ARG-1 ekspresyon profili gözlendi. (Şekil 4.3.a) Poly I:C ile muamele edilmiş MKH'larda ise artmış İL-10 ve iNOS ekspresyonu tespit edildi. (Şekil 4.3.b)



a. **b.**

Şekil 4.3. a. Poly I:C ile muamele edilmiş THP-1 Monosit/Makrofajlarda gen ekspresyonu dağılım grafiği b. Poly I:C ile muamele edilmiş MKH'lerde gen ekspresyonu dağılım grafiği

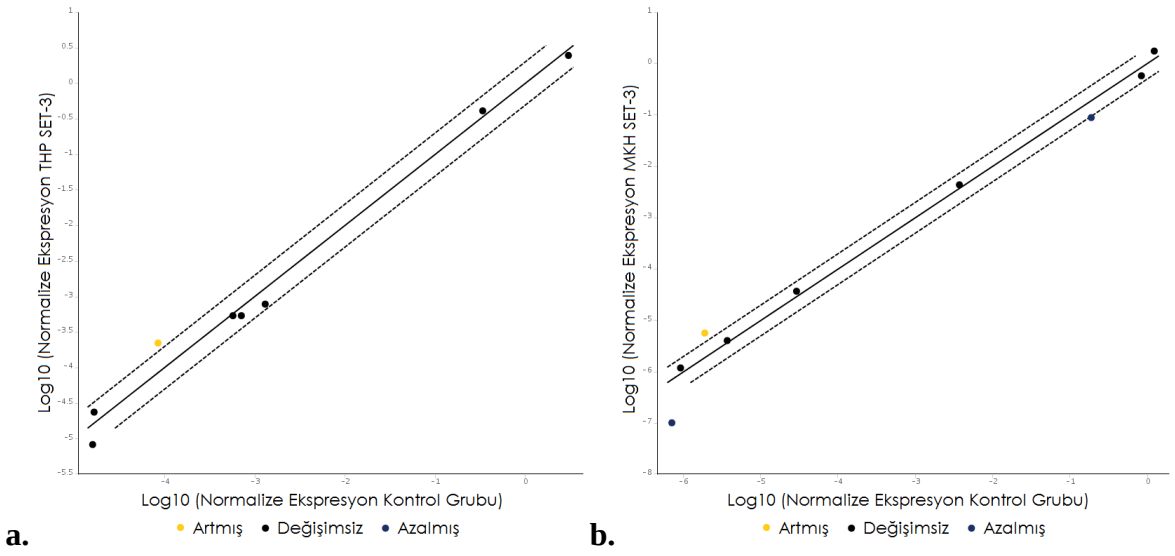
İFN-ɣ + Düşük doz LPS ile muamele edilmiş THP-1 Monosit/Makrofajlarda İL-6 ve iNOS başta olmak üzere İL-12-A, TNF-α ve İL-10 ekspresyon düzeylerinde artış saptandı (Şekil 4.4.a). İFN-ɣ ve Düşük doz LPS ile muamele edilmiş MKH'larda artmış iNOS ve azalmış İL-12-B ekspresyonu gözlendi (Şekil 4.4.b).



a. **b.**

Şekil 4.4. a. İFN-ɣ + Düşük doz LPS ile muamele edilmiş THP-1 Monosit/Makrofajlarda gen ekspresyonu dağılım grafiği b. İFN-ɣ ve Düşük doz LPS ile muamele edilmiş MKH'larda gen ekspresyonu dağılım grafiği

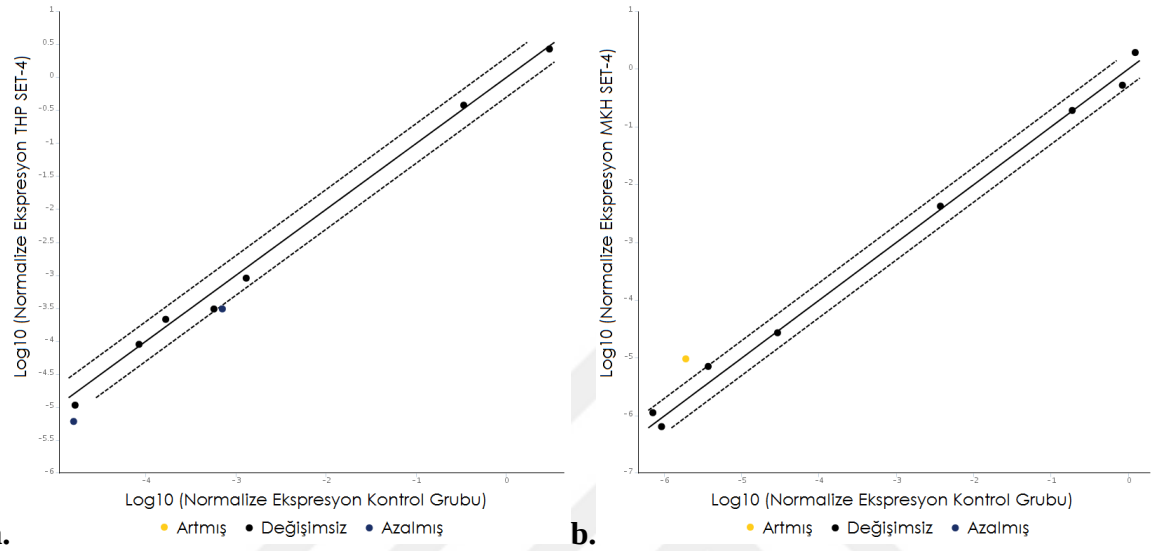
İL-4 + İL-10 + İL-13 ile muamele edilmiş THP-1 Monosit/Makrofajlarda artmış İL-12-A ekspresyonu saptanırken (Şekil 4.5.a); İL-4 + İL-10 + İL-13 ile muamele edilmiş MKH'larda artmış İL-12-B ekspresyonu ve azalmış İL-6 ve İL-10 ekspresyonu gözlendi (Şekil 4.5.b).



a. **b.**

Şekil 4.5. a. İL-4 + İL-10 + İL-13 ile muamele edilmiş THP-1 Monosit/Makrofajlarda gen ekspresyonu dağılım grafiği b. İL-4 + İL-10 + İL-13 ile muamele edilmiş MKH'larda gen ekspresyonu dağılım grafiği

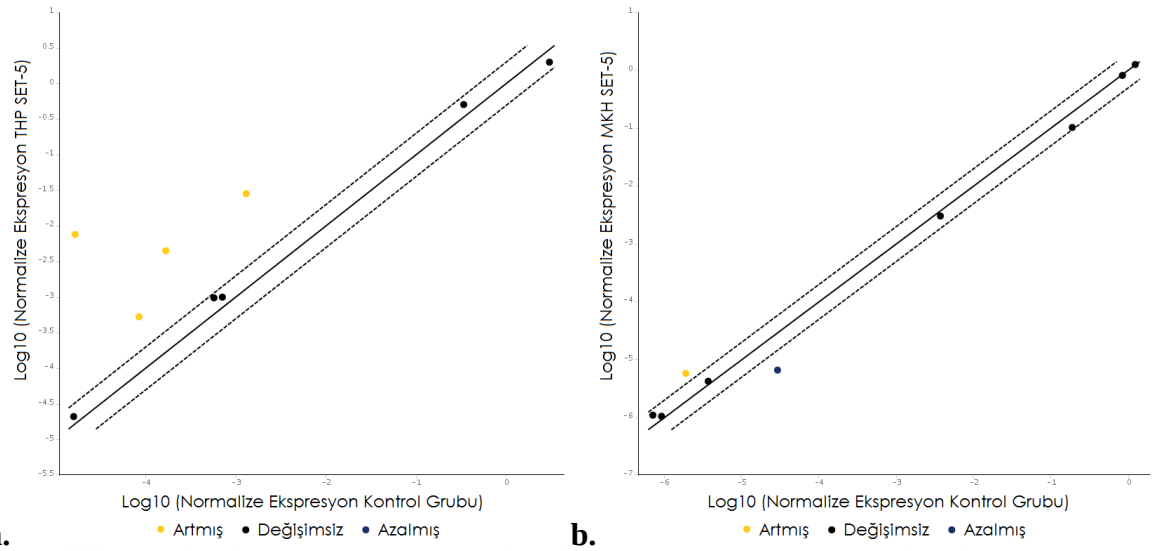
TNF-α ile muamele edilmiş THP-1 Monosit/Makrofajlarda azalan İL-10 ve İL-12-B ekspresyonu saptandı (Şekil 4.6.a). TNF-α ile muamele edilmiş MKH'larda ise artmış İL-12-B eskresyonu gözlendi (Şekil 4.6.b).



a. **b.**

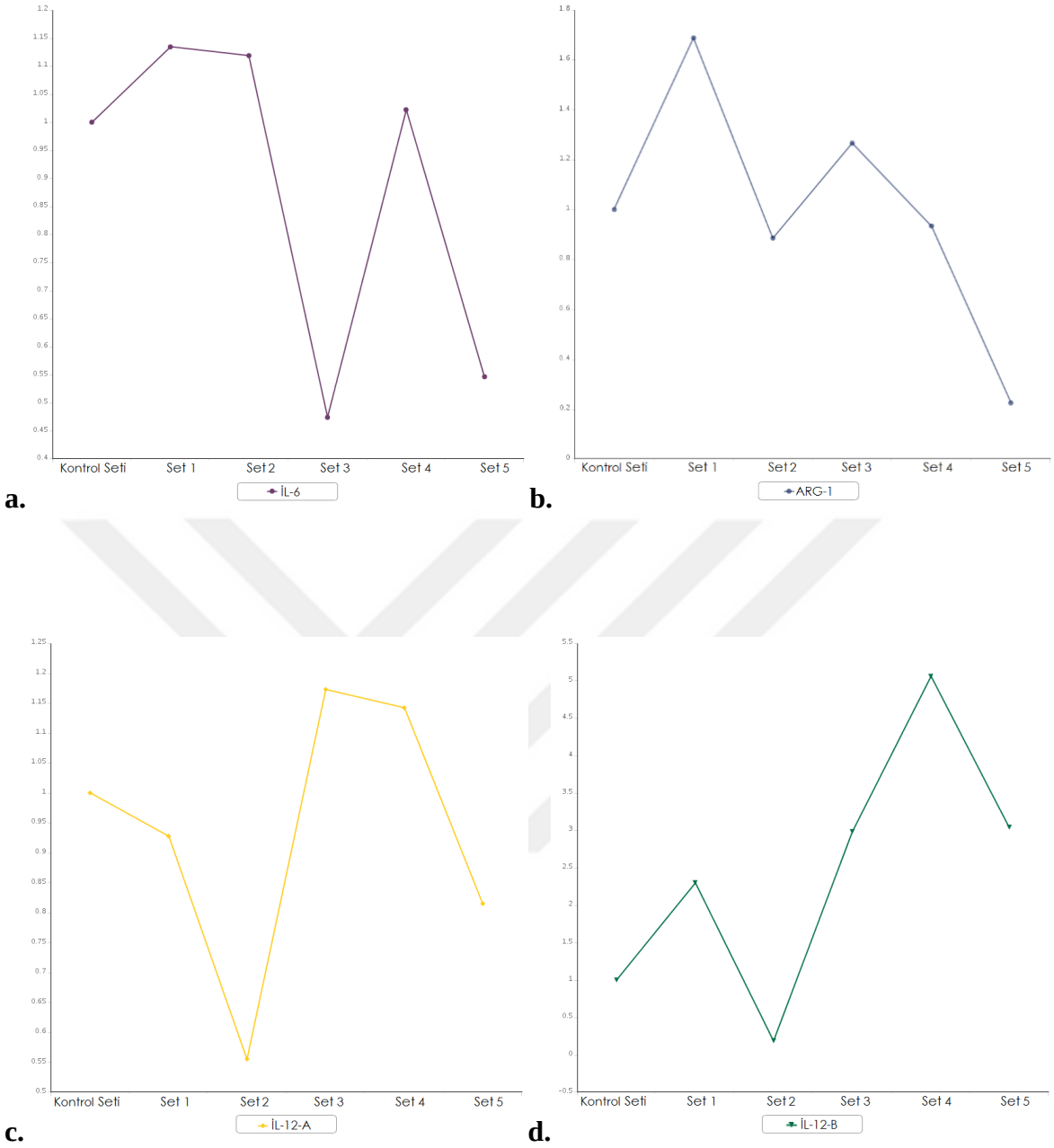
Şekil 4.6. a. TNF-α ile muamele edilmiş THP-1 Monosit/Makrofajlarda gen ekspresyonu dağılım grafiği b. TNF-α ile muamele edilmiş MKH'larda gen ekspresyonu dağılım grafiği

Yüksek doz LPS ile muamele edilmiş THP-1 Monosit/Makrofajlarda çok yüksek oranda artmış İL-6 ekspresyonunu takiben artmış TNF-α, iNOS ve İL-12-A ekspresyonu gözlendi (Şekil 4.7.a). Yüksek doz LPS ile muamele edilmiş MKH'larda artmış İL-12-B ve azalan ARG-1 ekspresyon profili saptanmıştır (Şekil 4.7.b).

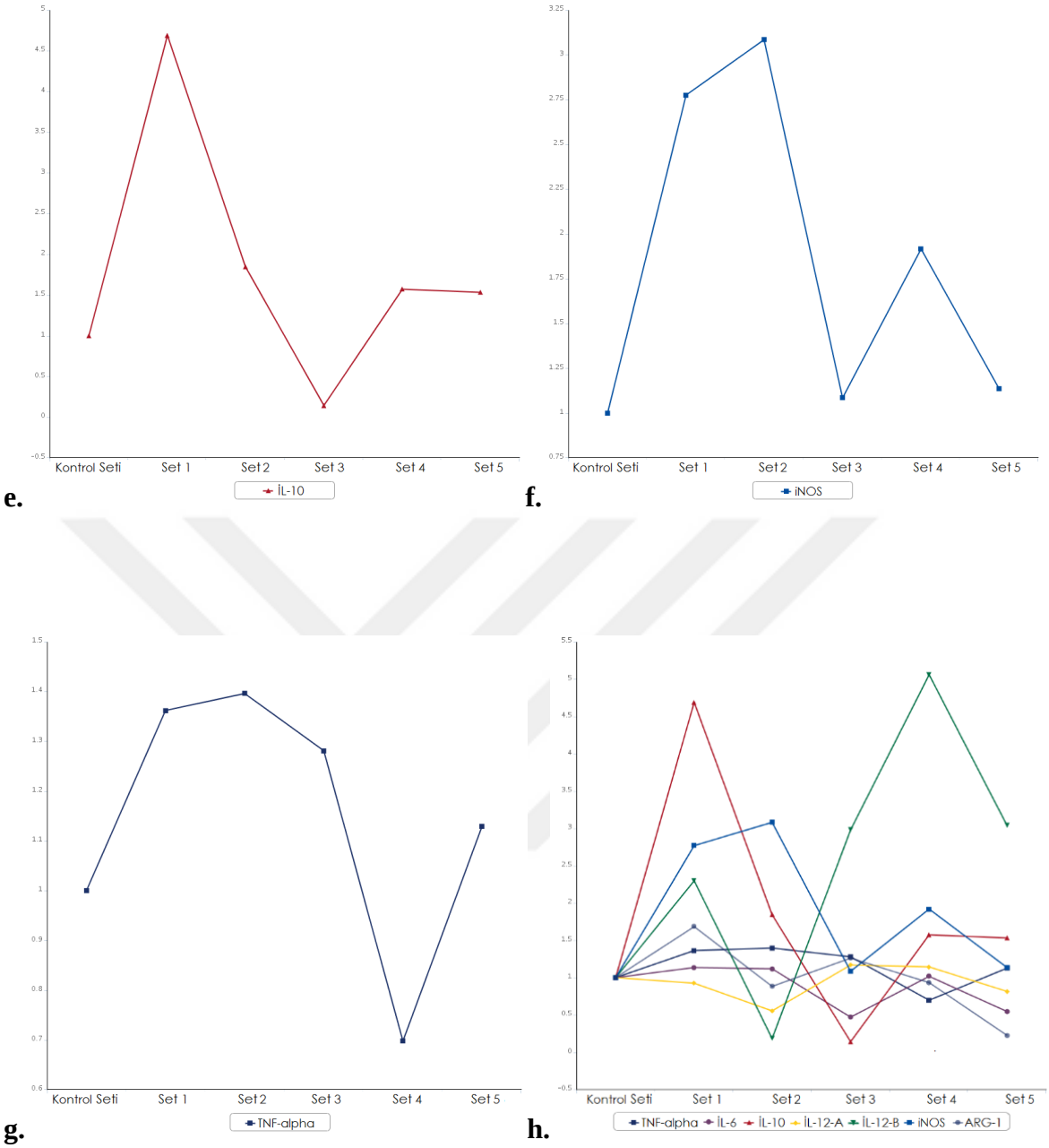


a. **b.**

Şekil 4.7. a. Yüksek doz LPS ile muamele edilmiş THP-1 Monosit/Makrofajlarda gen ekspresyonu dağılım grafiği b. Yüksek doz LPS ile muamele edilmiş MKH'larda gen ekspresyonu dağılım grafiği



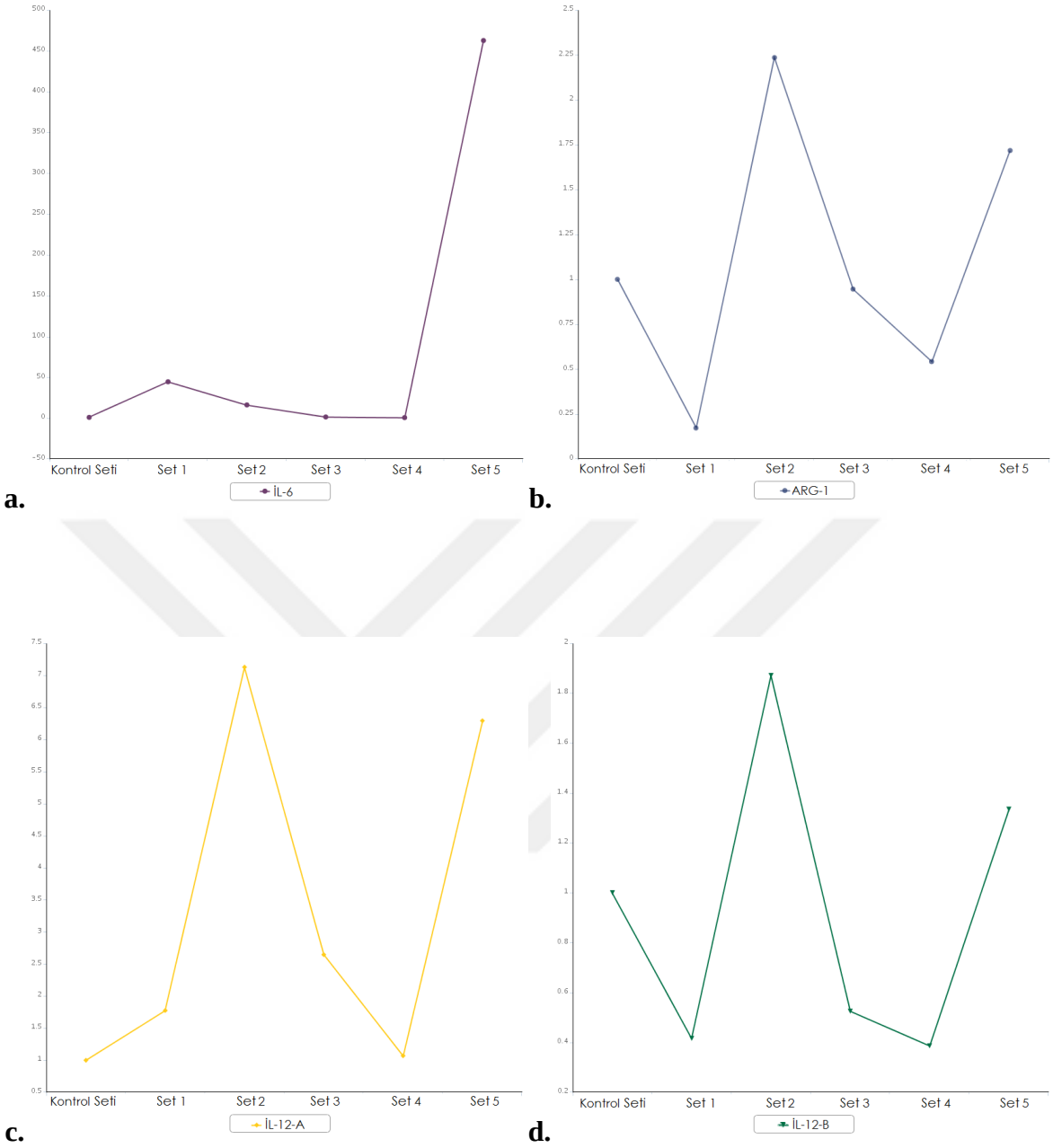
Şekil 4.8. Çalışmamızın 1. grubundaki tüm MKH setlerine göre gen ekspresyonu analizlerinin kat değişimi dağılımları a. İL-6 geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı b. Arg-1 geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı c. İL-12-A geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı d. İL-12-B geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı



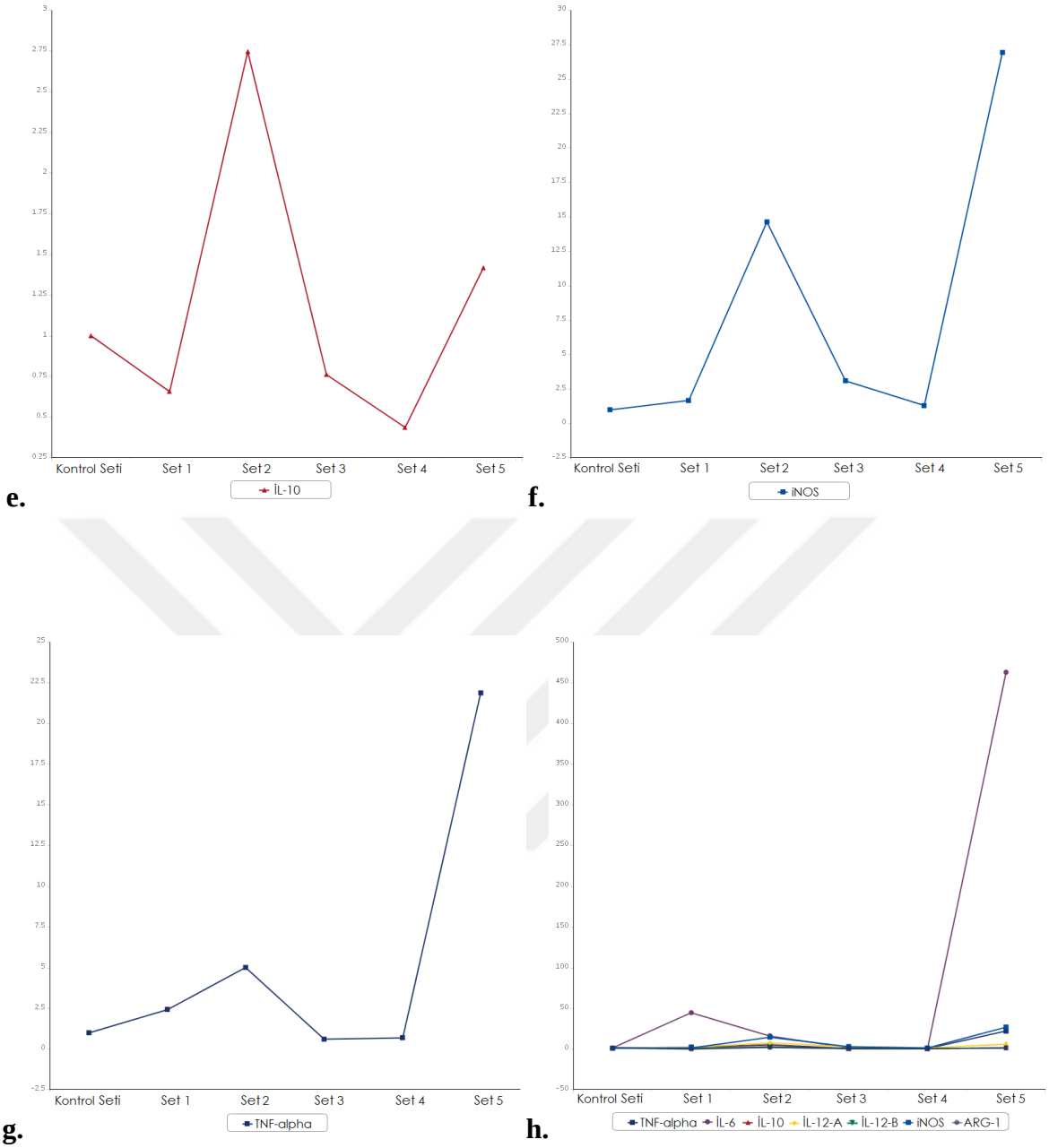
e. **f.**

g. **h.**

Şekil 4.8. (devam) Çalışmamızın 1. grubundaki tüm MKH setlerine göre gen ekspresyonu analizlerinin kat değişimi dağılımları e. İL-10 geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı f. iNOS geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı g. TNF-α geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı h. Tüm genlerin kat değişimi oranlarının çalışma setlerine göre genel dağılımı



Şekil 4.9. Çalışmamızın 1. grubundaki tüm THP-1 Monosit/Makrofaj setlerine göre gen ekspresyonu analizlerinin kat değişimi dağılımları a. İL-6 geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı b. Arg-1 geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı c. İL-12-A geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı d. İL-12-B geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı

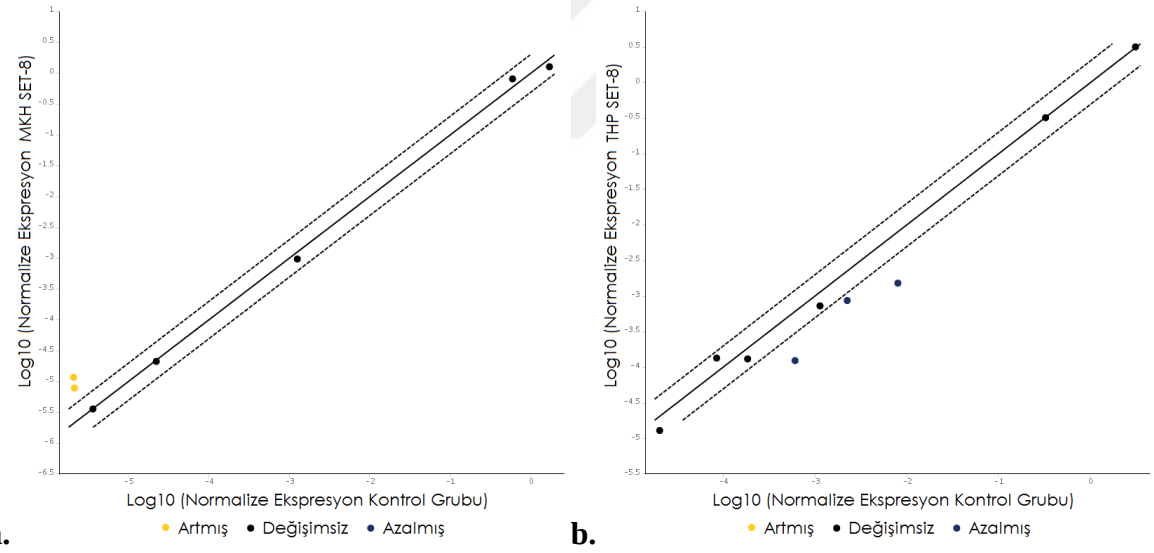


Şekil 4.9. (devam) Çalışmamızın 1. grubundaki tüm THP-1 Monosit/Makrofaj setlerine göre gen ekspresyonu analizlerinin kat değişimi dağılımları e. İL-10 geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı f. iNOS geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı g. TNF-α geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı h. Tüm genlerin kat değişimi oranlarının çalışma setlerine göre genel dağılımı

4.2. Muamele Edilmiş MKH ve Muamele Edilmiş THP-1 Mo/Mq Gen Ekspresyonu Ölçümlemesi

1)Poly (I:C), 2)İFN-γ + DDLPS, 3)İL-4 + İL-10 + İL-13, 4)TNF-α ve 5)YDLPS ile muamele edilen MKH ve THP-1 Mo/Mq etkileşimlerini ölçümlemek amacıyla bu iki hücre grubu *transwell*'de biraraya getirildi. Bu ko-kültür çalışmasındaki her hücre grubu için araştırmamıza dahil edilmiş olan genlerin ekspresyonları, muamele edilmemiş ve ko-kültüre alınmamış hücre grupları ile karşılaştırılarak aşağıdaki sonuçlar elde edildi:

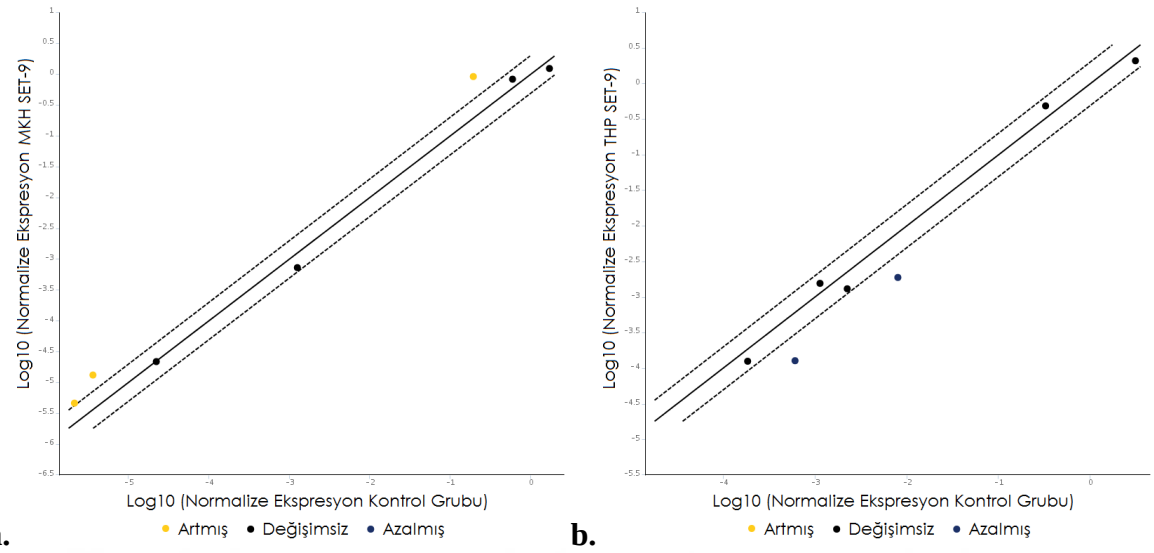
Öncelikle muamele edilmemiş olan MKH ve muamele edilmemiş THP-1 Mo/Mq etkileşimi incelendi ve uyarımsız halde hücresel etkileşim dolayısıyla oluşan gen ekspresyon profili gözlemlendi. MKH'ların artan TNF-α ve İL-10 ekspresyonuna (Şekil 4.10.a) karşılık THP-1 Mo/Mq'larda azalan TNF-α, İL-12-A ve ARG-1 ekspresyonu saptandı (Şekil 4.10.b).



a. **b.**

Şekil 4.10. a. Muamele edilmemiş olan MKH gen ekspresyonu dağılım grafiği b. Muamele edilmemiş THP-1 Mo/Mq gen ekspresyonu dağılım grafiği

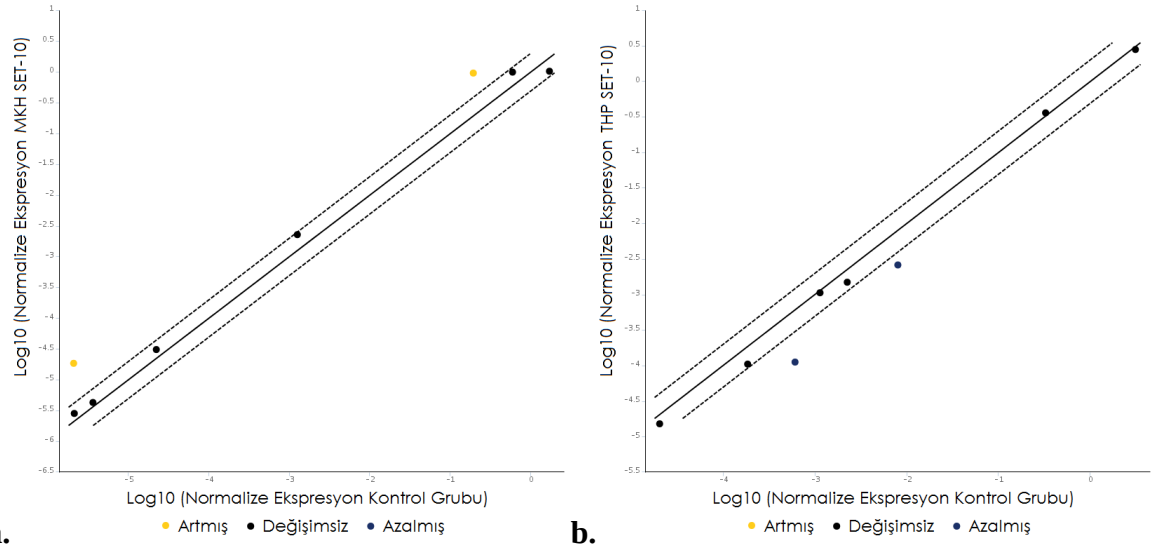
Hem MKH hem de THP-1 Mo/Mq, Poly I:C ile muamele edilip *transwell*'de kültüre alınarak, etkileşimleri incelendi. Ko-kültür sonucunda MKH'lerin artmış İL-6, İL-10 ve iNOS ekspresyon profili tespit edildi (Şekil 4.11.a). THP-1 Mo/Mq'larda ise azalan TNF-α ve İL-12-A ekspresyon profili saptandı (Şekil 4.11.b).



a. **b.**

Şekil 4.11. a. Poly I:C ile muamele edilmiş ve THP-1 Mo/Mq ile ko kültüre alınan MKH gen ekspresyonu dağılım grafiği b. Poly I:C ile muamele edilmiş ve MKH ile ko kültüre alınan THP-1 Mo/Mq gen ekspresyonu dağılım grafiği

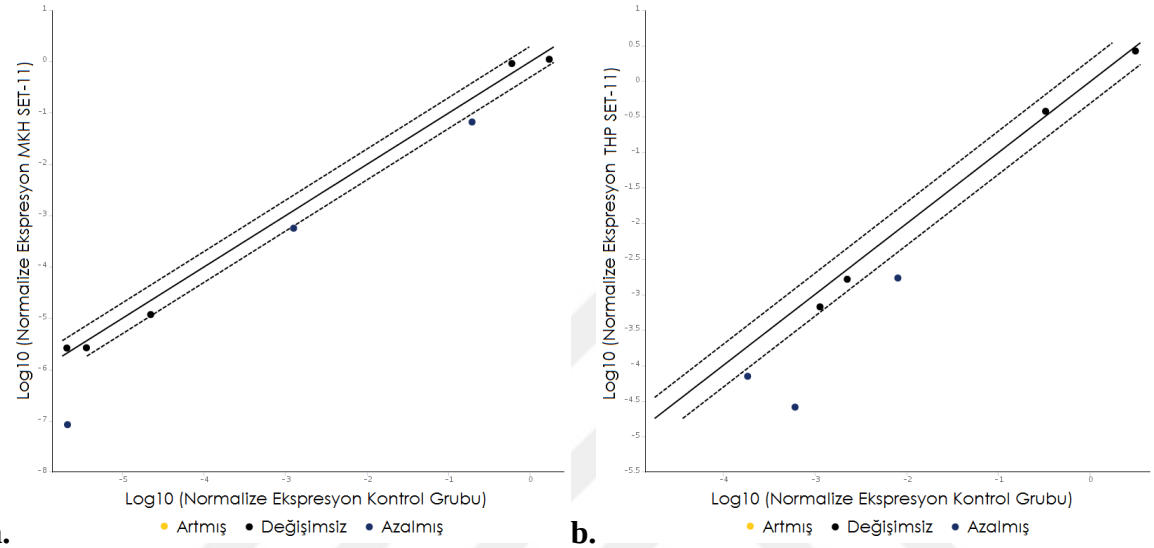
Hem MKH hem de THP-1 Mo/Mq, İFN-ɣ + DDLPS ile muamele edilip *transwell*'de kültüre alınarak, etkileşimleri incelendi. Ko-kültür sonucunda MKH'lerin artmış TNF- α ve İL-6 ekspresyon profili (Şekil 4.12.a) karşısında THP-1 Mo/Mq'larda azalan TNF-α ve İL-12-A ekspresyon profili saptandı (Şekil 4.12.b).



a. **b.**

Şekil 4.12. a. İFN-ɣ + DDLPS ile muamele edilmiş ve THP-1 Mo/Mq ile ko kültüre alınan MKH gen ekspresyonu dağılım grafiği b. İFN-ɣ + DDLPS ile muamele edilmiş ve MKH ile ko kültüre alınan THP-1 Mo/Mq gen ekspresyonu dağılım grafiği

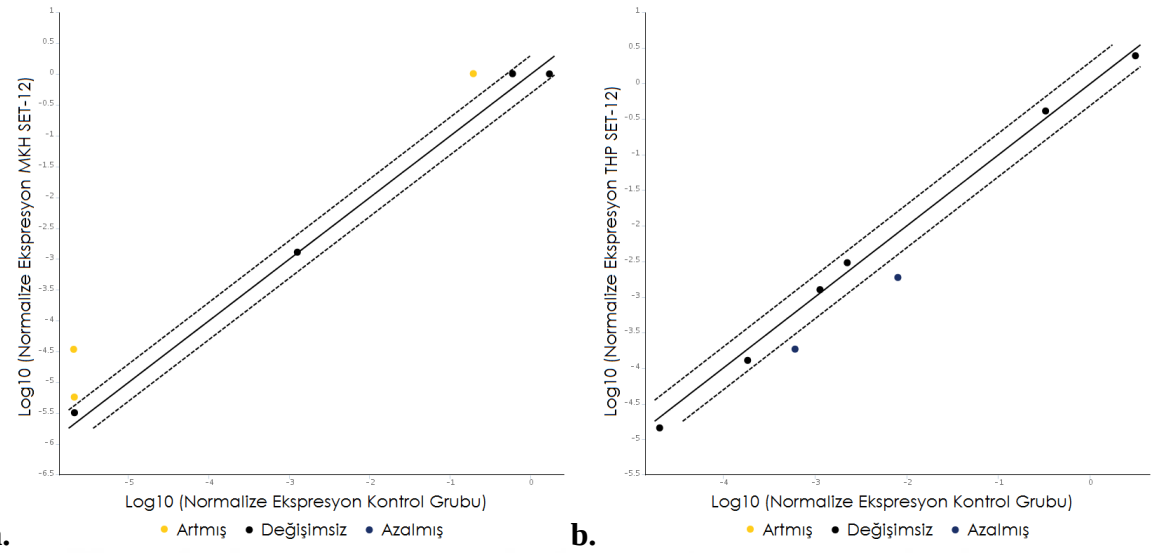
Hem MKH hem de THP-1 Mo/Mq; İL-4 + İL-10 + İL-13 ile muamele edilip *transwell*'de kültüre alınarak, etkileşimleri incelendi. Ko-kültür sonucunda MKH'lerde büyük oranda azalan İL-12-B ekspresyonunu takiben azalan İL-6 ve İL-12-A ekspresyonu gözlendi (Şekil 4.13.a). THP-1 Mo/Mq'larda ise büyük oranda azalan İL-12-A ekspresyonunu takiben azalan TNF-α ve iNOS ekspresyonu gözlendi (Şekil 4.13.b).



a. **b.**

Şekil 4.13. a. İL-4 + İL-10 + İL-13 ile muamele edilmiş ve THP-1 Mo/Mq ile ko kültüre alınan MKH gen ekspresyonu dağılım grafiği b. İL-4 + İL-10 + İL-13 ile muamele edilmiş ve MKH ile ko kültüre alınan THP-1 Mo/Mq gen ekspresyonu dağılım grafiği

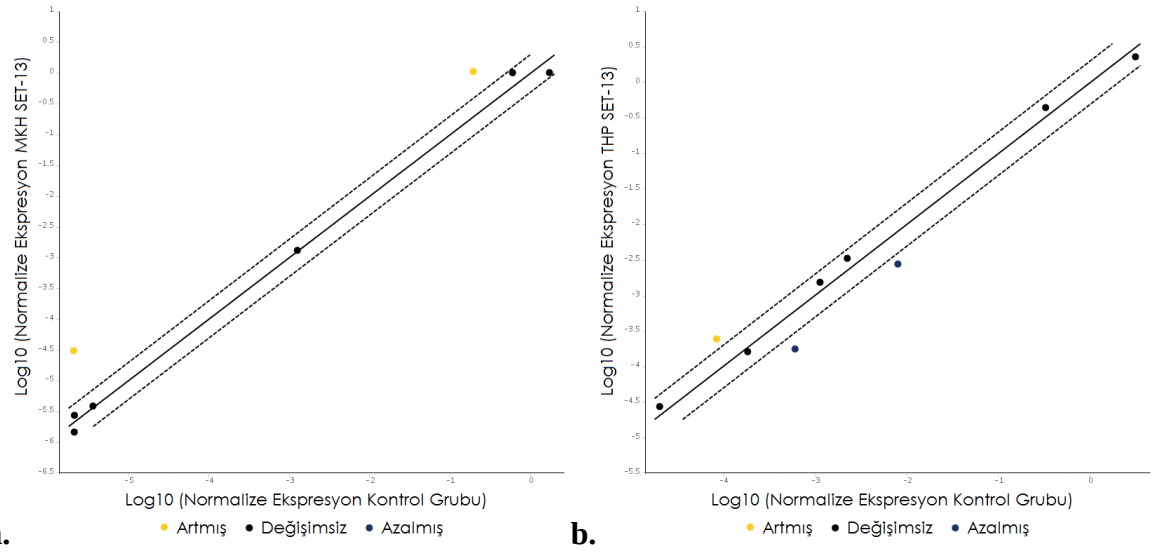
Hem MKH hem de THP-1 Mo/Mq; TNF-α ile muamele edilip *transwell*'de kültüre alınarak, etkileşimleri incelendi. Ko-kültür sonucunda MKH'lerde büyük oranda artan TNF-α ekspresyonunu takiben artan İL-6 ve İL-12-B ekspresyonu gözlenmiştir (Şekil 4.14.a). Buna karşılık THP-1 Mo/Mq'larda azalan TNF-α ve İL-12-A ekspresyonu gözlendi (Şekil 4.14.b).



a. **b.**

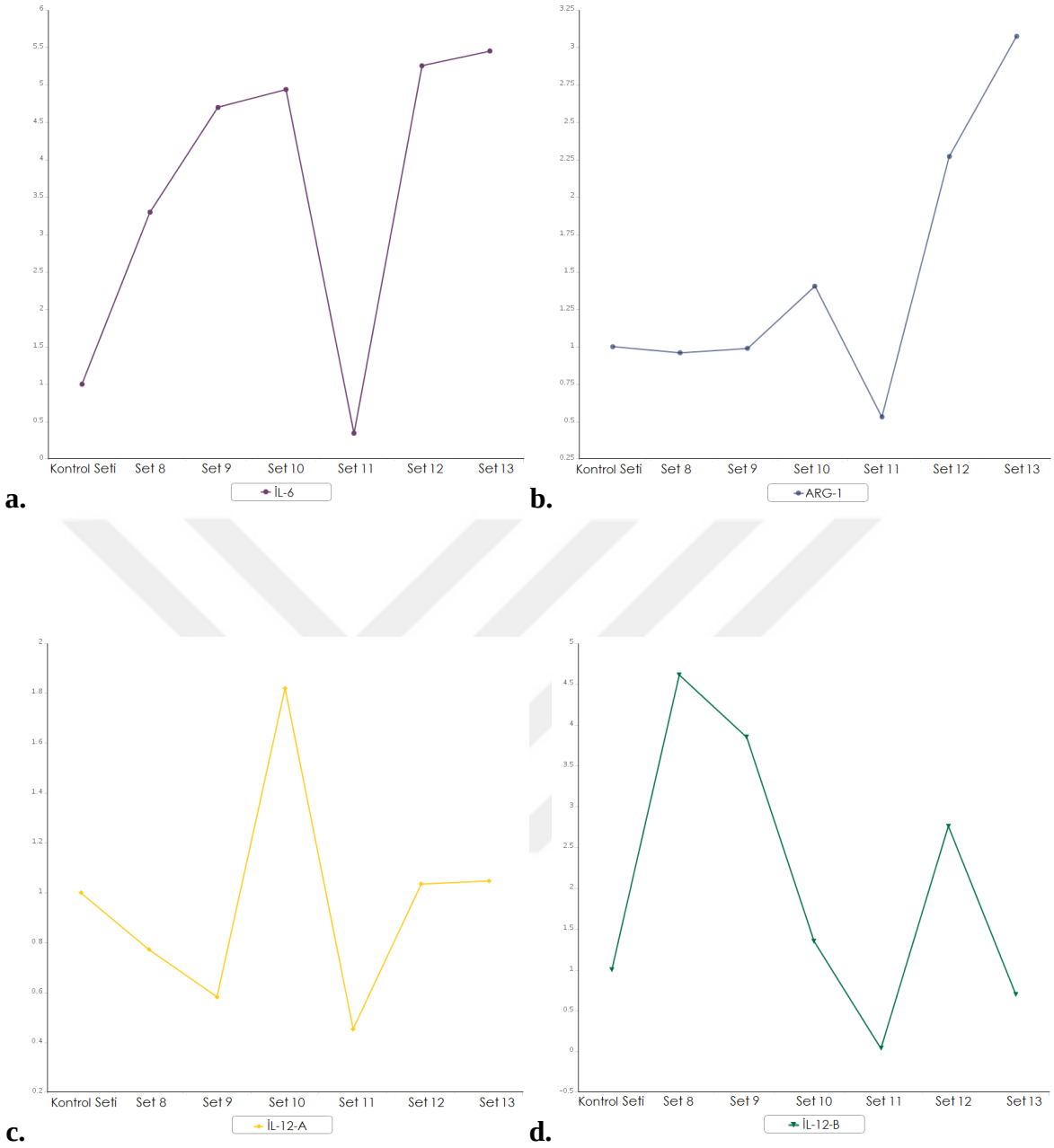
Şekil 4.14. a. TNF-α ile muamele edilmiş ve THP-1 Mo/Mq ile ko kültüre alınan MKH gen ekspresyonu dağılım grafiği b. TNF-α ile muamele edilmiş ve MKH ile ko kültüre alınan THP-1 Mo/Mq gen ekspresyonu dağılım grafiği

Hem MKH hem de THP-1 Mo/Mq; YDLPS ile muamele edilip *transwell*'de kültüre alınarak, etkileşimleri incelendi. Ko-kültür sonucunda MKH'lerde büyük oranda artan TNF-α ekspresyonunu takiben artan İL-6 ekspresyonu gözlendi (Şekil 4.15.a). THP-1 Mo/Mq'larda ise artan İL-6 ekspresyonuna karşılık azalan TNF-α ve İL-12-A ekspresyonu gözlendi (Şekil 4.15.b).

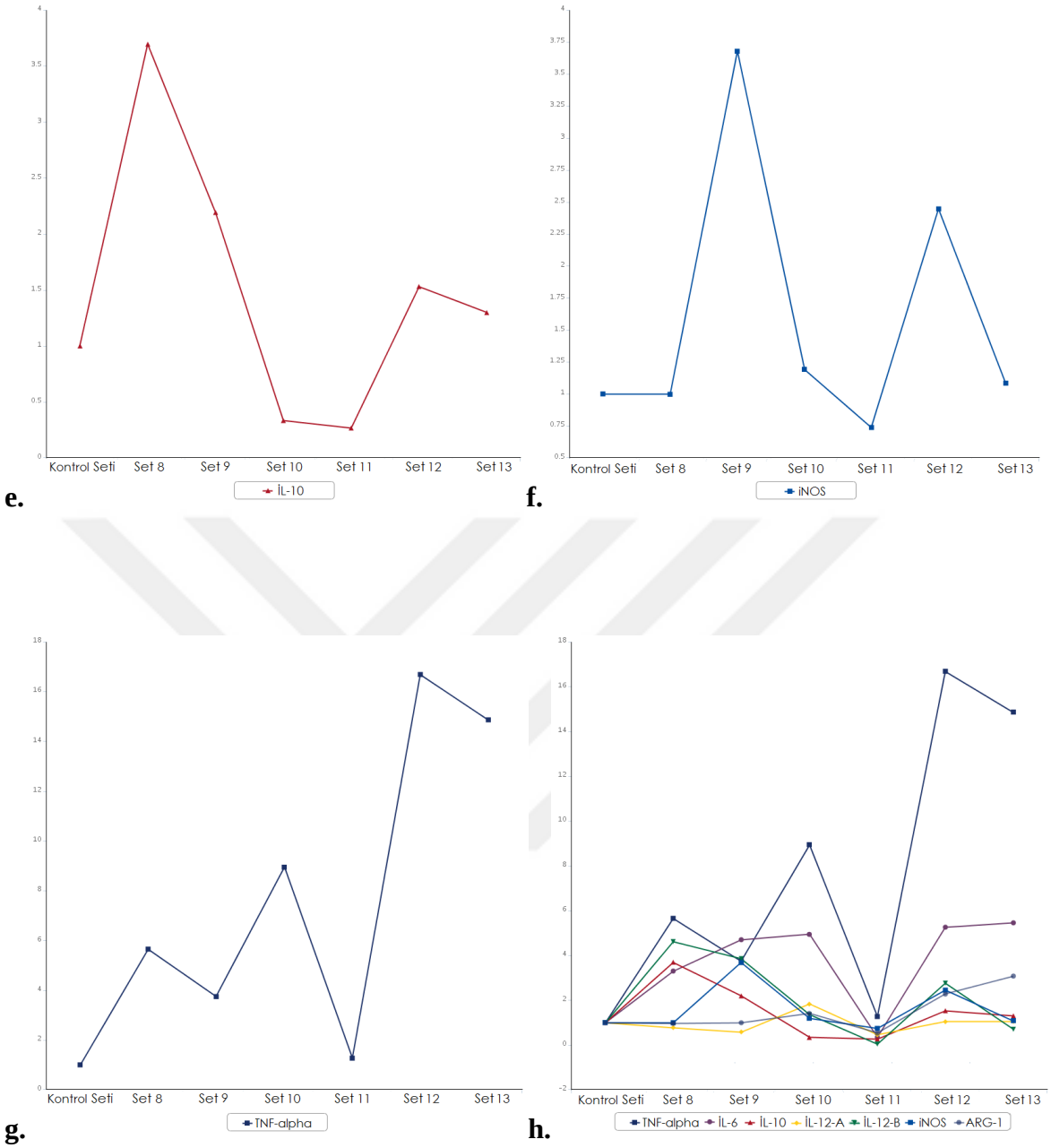


a. **b.**

Şekil 4.15. a. YDLPS ile muamele edilmiş ve THP-1 Mo/Mq ile ko kültüre alınan MKH gen ekspresyonu dağılım grafiği b. YDLPS ile muamele edilmiş ve MKH ile ko kültüre alınan THP-1 Mo/Mq gen ekspresyonu dağılım grafiği



Şekil 4.16. Çalışmamızın 2. grubundaki tüm MKH setlerine göre gen ekspresyonu analizlerinin kat değişimi dağılımları a. İL-6 geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı b. Arg-1 geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı c. İL-12-A geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı d. İL-12-B geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı



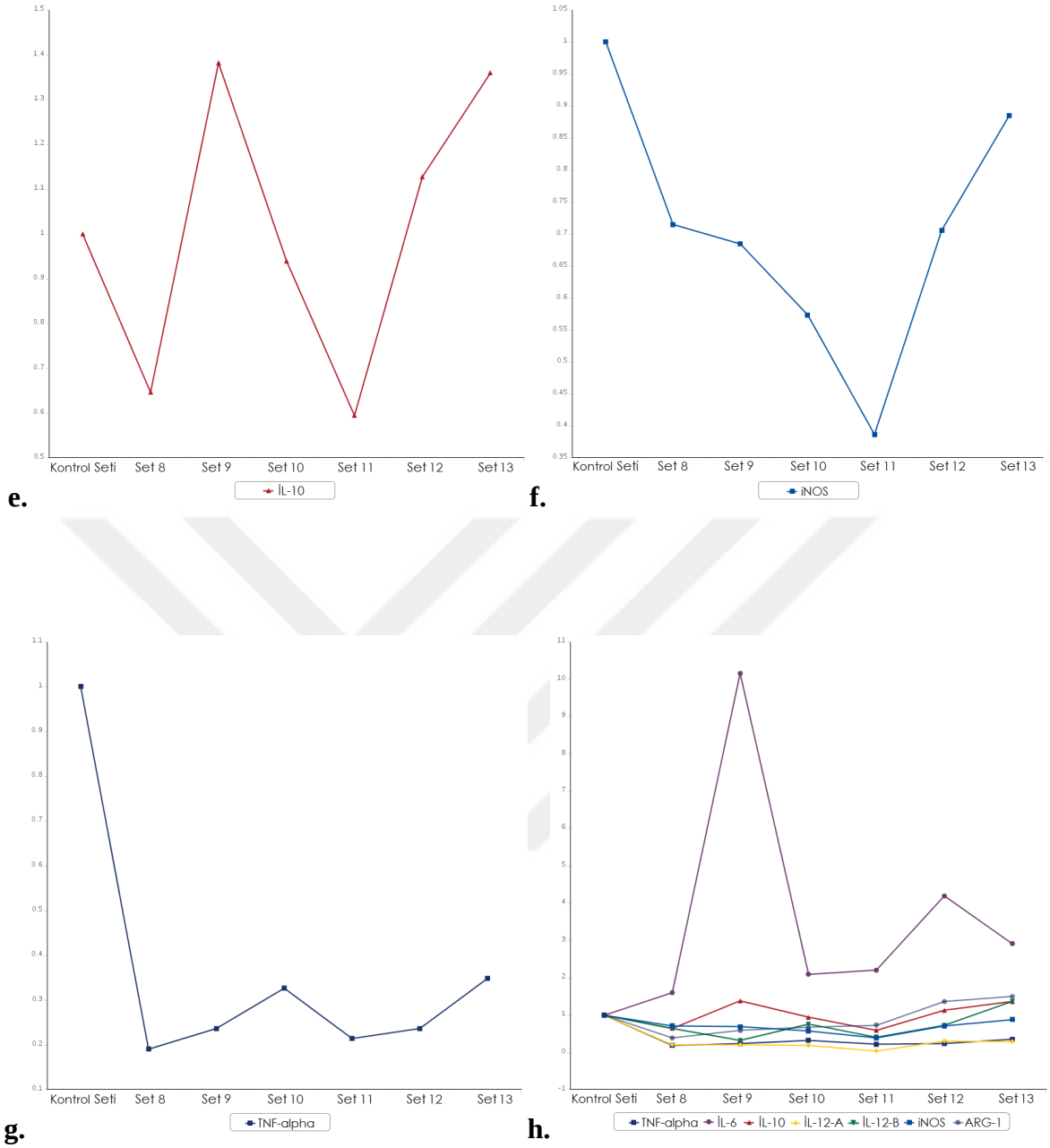
e. f.

g. h.

Şekil 4.16. (devam) Çalışmamızın 2. grubundaki tüm MKH setlerine göre gen ekspresyonu analizlerinin kat değişimi dağılımları e. İL-10 geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı f. iNOS geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı g. TNF-α geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı h. Tüm genlerin kat değişimi oranlarının çalışma setlerine göre genel dağılımı



Şekil 4.17. Çalışmamızın 2. grubundaki tüm THP-1 Monosit/Makrofaj setlerine göre gen ekspresyonu analizlerinin kat değişimi dağılımları a. İL-6 geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı b. Arg-1 geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı c. İL-12-A geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı d. İL-12-B geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı



e. f.

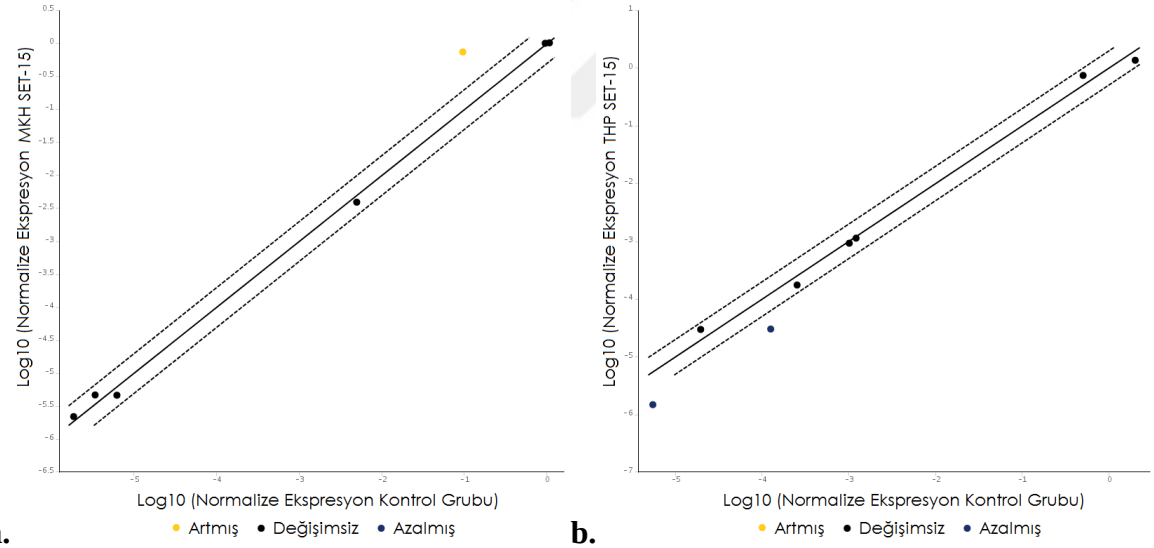
g. h.

Şekil 4.17. (devam) Çalışmamızın 2. grubundaki tüm THP-1 Monosit/Makrofaj setlerine göre gen ekspresyonu analizlerinin kat değişimi dağılımları e. İL-10 geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı f. iNOS geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı g. TNF-α geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı h. Tüm genlerin kat değişimi oranlarının çalışma setlerine göre genel dağılımı

4.3. Muamele Edilmemiş MKH ve Muamele Edilmiş THP-1 Mo/Mq Gen Ekspresyonu Ölçümlemesi

Muamele edilmemiş MKH ve 1)Poly (I:C), 2)İFN-γ + DDLPS, 3)İL-4 + İL-10 + İL-13, 4)TNF-α ve 5)YDLPS ile muamele edilen THP-1 Mo/Mq etkileşimlerini ölçümlemek amacıyla bu iki hücre grubu *transwell*'de biraraya getirildi. Bu ko-kültür çalışmasındaki her hücre grubu için araştırmamıza dahil edilmiş olan genlerin ekspresyonları, muamele edilmemiş ve ko-kültüre alınmamış hücre grupları ile karşılaştırılarak aşağıdaki sonuçlar elde edildi:

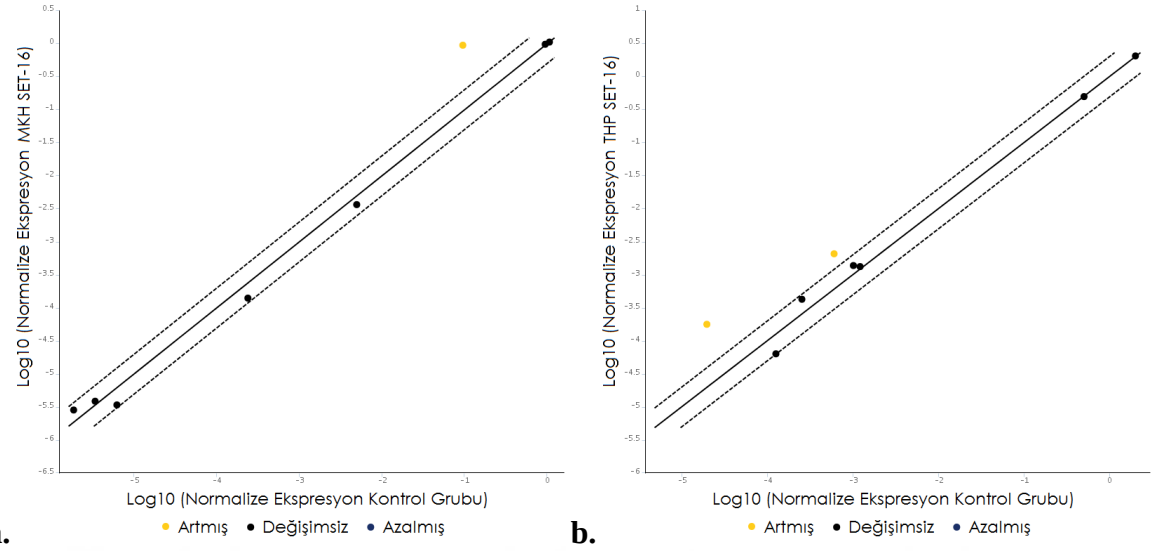
Muamele edilmemiş MKH ve Poly I:C ile muamele edilmiş THP-1 Mo/Mq *transwell*'de kültüre alınarak, etkileşimleri incelendi. Ko-kültür sonucunda MKH'larda artan İL-6 ekspresyon profili tespit edildi (Şekil 4.18.a). THP-1 Mo/Mq'larda ise azalan İL-12-A ve İL-12-B ekspresyon profili saptandı (Şekil 4.18.b).



a. **b.**

Şekil 4.18. a. Poly I:C ile muamele edilmiş THP-1 Mo/Mq ile ko kültüre edilen muamele edilmemiş MKH'lerin gen ekspresyonu dağılım grafiği b. Muamele edilmemiş MKH ile ko kültüre alınan Poly I:C ile muamele edilmiş THP-1 Mo/Mq gen ekspresyonu dağılım grafiği

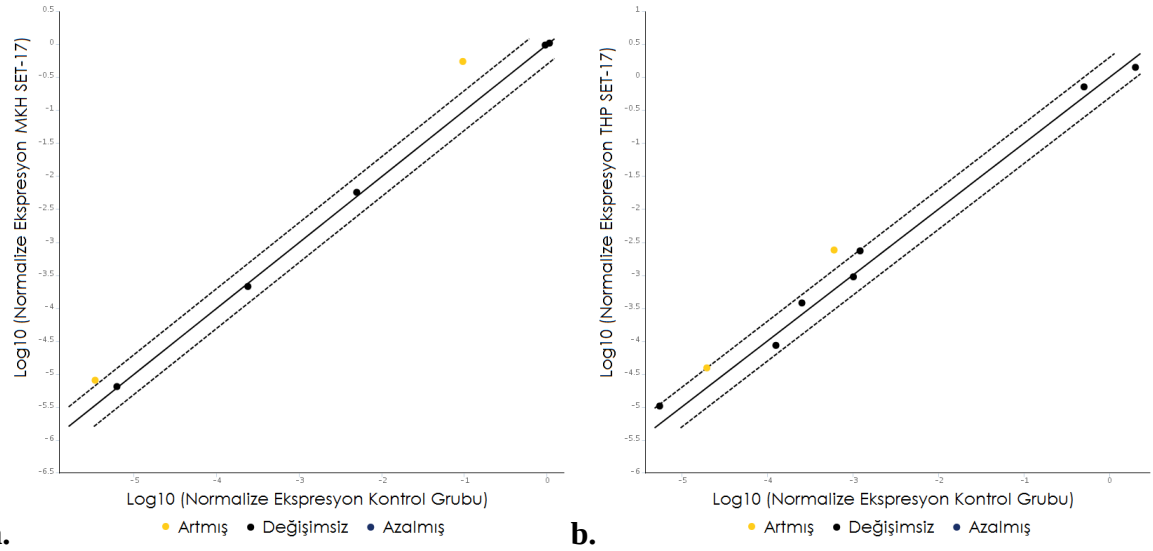
Muamele edilmemiş MKH ve İFN-ɣ + DDLPS ile muamele edilmiş THP-1 Mo/Mq *transwell*'de kültüre alınarak, etkileşimleri incelendi. Ko-kültür sonucunda MKH'larda artan İL-6 ekspresyon profili tespit edildi (Şekil 4.19.a). THP-1 Mo/Mq'larda ise artan İL-6 ve İL-10 ekspresyon profili saptandı (Şekil 4.19.b).



a. **b.**

Şekil 4.19. a. İFN-ɣ + DDLPS ile muamele edilmiş THP-1 Mo/Mq ile ko kültüre edilen muamele edilmemiş MKH'lerin gen ekspresyonu dağılım grafiği b. Muamele edilmemiş MKH ile ko kültüre alınan İFN-ɣ + DDLPS ile muamele edilmiş THP-1 Mo/Mq gen ekspresyonu dağılım grafiği

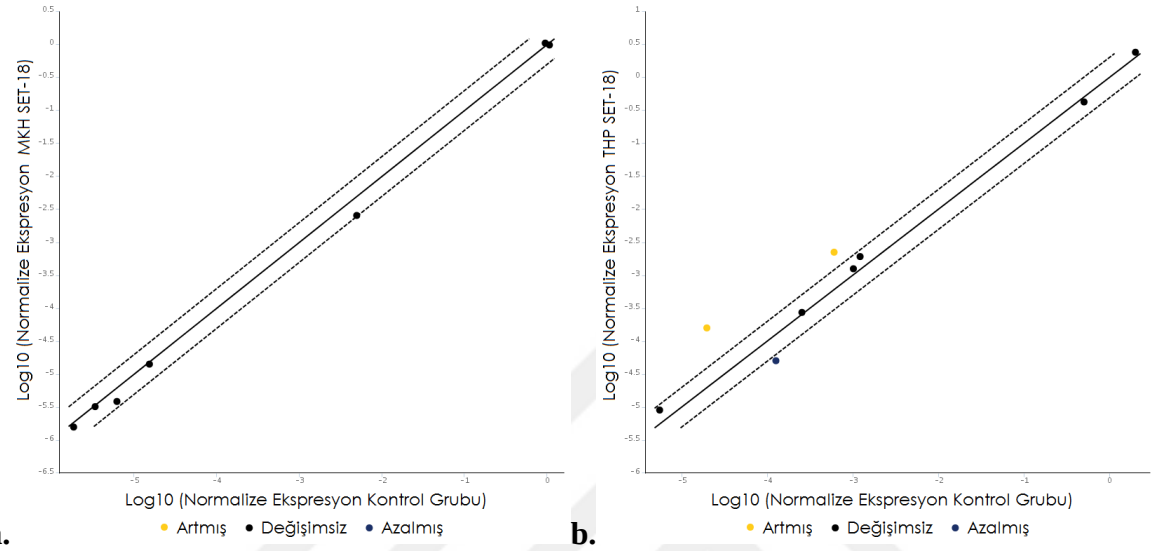
Muamele edilmemiş MKH ve İL-4 + İL-10 + İL-13 ile muamele edilmiş THP-1 Mo/Mq *transwell*'de kültüre alınarak, etkileşimleri incelendi. Ko-kültür sonucunda hem MKH'larda hemde THP-1 Mo/Mq'larda artan İL-6 ve İL-10 ekspresyon profili tespit edildi (Şekil 4.20).



a. **b.**

Şekil 4.20. a. İL-4 + İL-10 + İL-13 ile muamele edilmiş THP-1 Mo/Mq ile ko kültüre edilen muamele edilmemiş MKH'lerin gen ekspresyonu dağılım grafiği b. Muamele edilmemiş MKH ile ko kültüre alınan İL-4 + İL-10 + İL-13 ile muamele edilmiş THP-1 Mo/Mq gen ekspresyonu dağılım grafiği

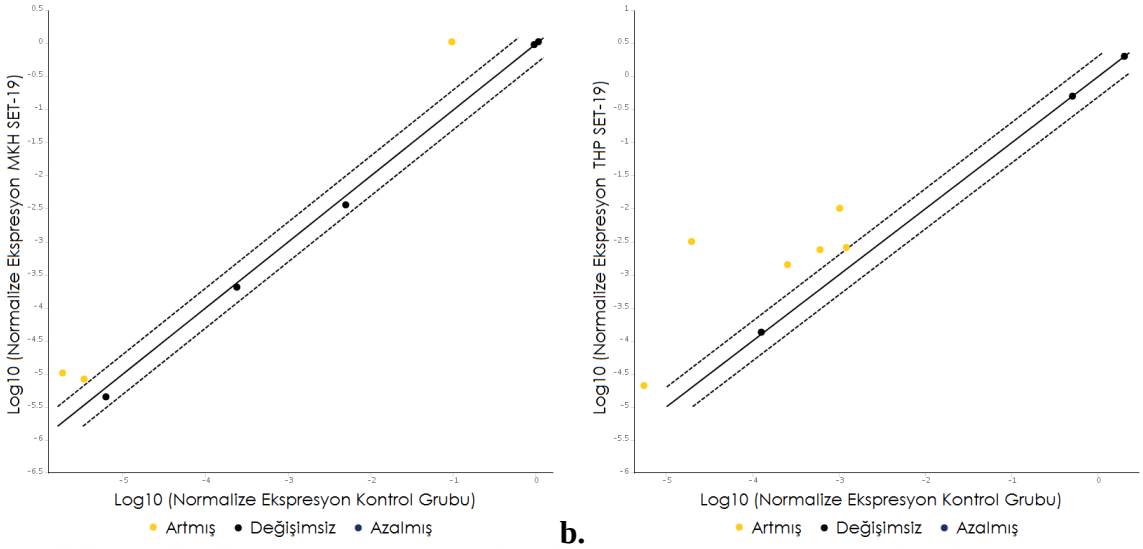
Muamele edilmemiş MKH ve TNF-α ile muamele edilmiş THP-1 Mo/Mq *transwell*'de kültüre alınarak, etkileşimleri incelendi. MKH'lerde ekspresyon profilinin değişim göstermediği saptandı (Şekil 4.21.a). Ko-kültür sonucunda THP-1 Mo/Mq'larda artan İL-6, İL-10 ve azalan İL-12-A ekspresyonu profili tespit edildi (Şekil 4.21.b).



a. **b.**

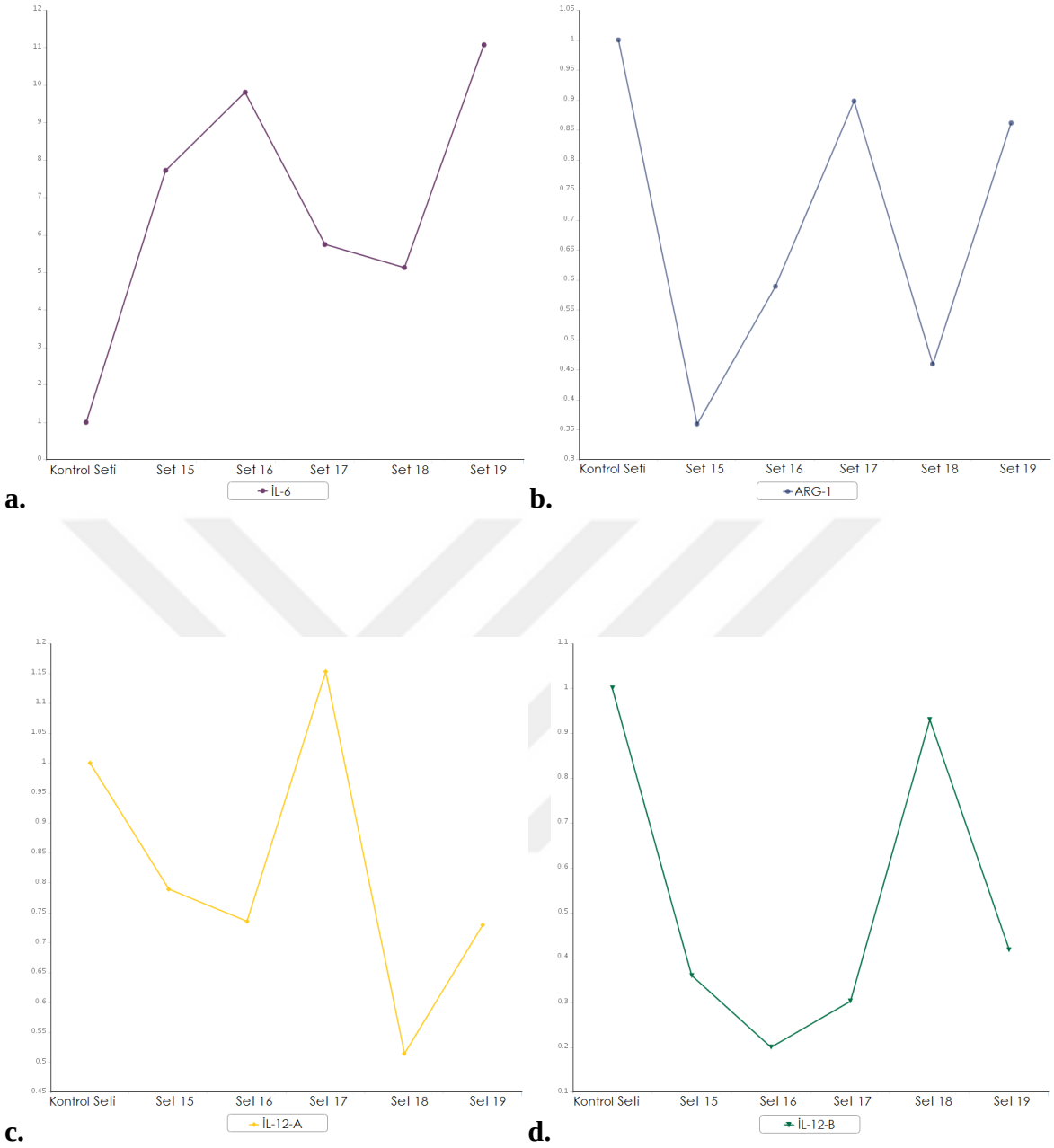
Şekil 4.21. a. TNF-α ile muamele edilmiş THP-1 Mo/Mq ile ko kültüre edilen muamele edilmemiş MKH'lerin gen ekspresyonu dağılım grafiği b. Muamele edilmemiş MKH ile ko kültüre alınan TNF-α ile muamele edilmiş THP-1 Mo/Mq gen ekspresyonu dağılım grafiği

Muamele edilmemiş MKH ve YDLPS ile muamele edilmiş THP-1 Mo/Mq *transwell*'de kültüre alınarak, etkileşimleri incelendi. Ko-kültür sonucunda MKH'larda sırasıyla artan İL-6, TNF-α ve İL-10 ekspresyon profili tespit edildi (Şekil 4.22.a). THP-1 Mo/Mq'larda ise büyük oranda artan İL-6 ekspresyonunu takiben artan TNF-α, İL-10, İL-12-B, iNOS ve Arg-1 ekspresyonu gözlendi (Şekil 4.22.b).

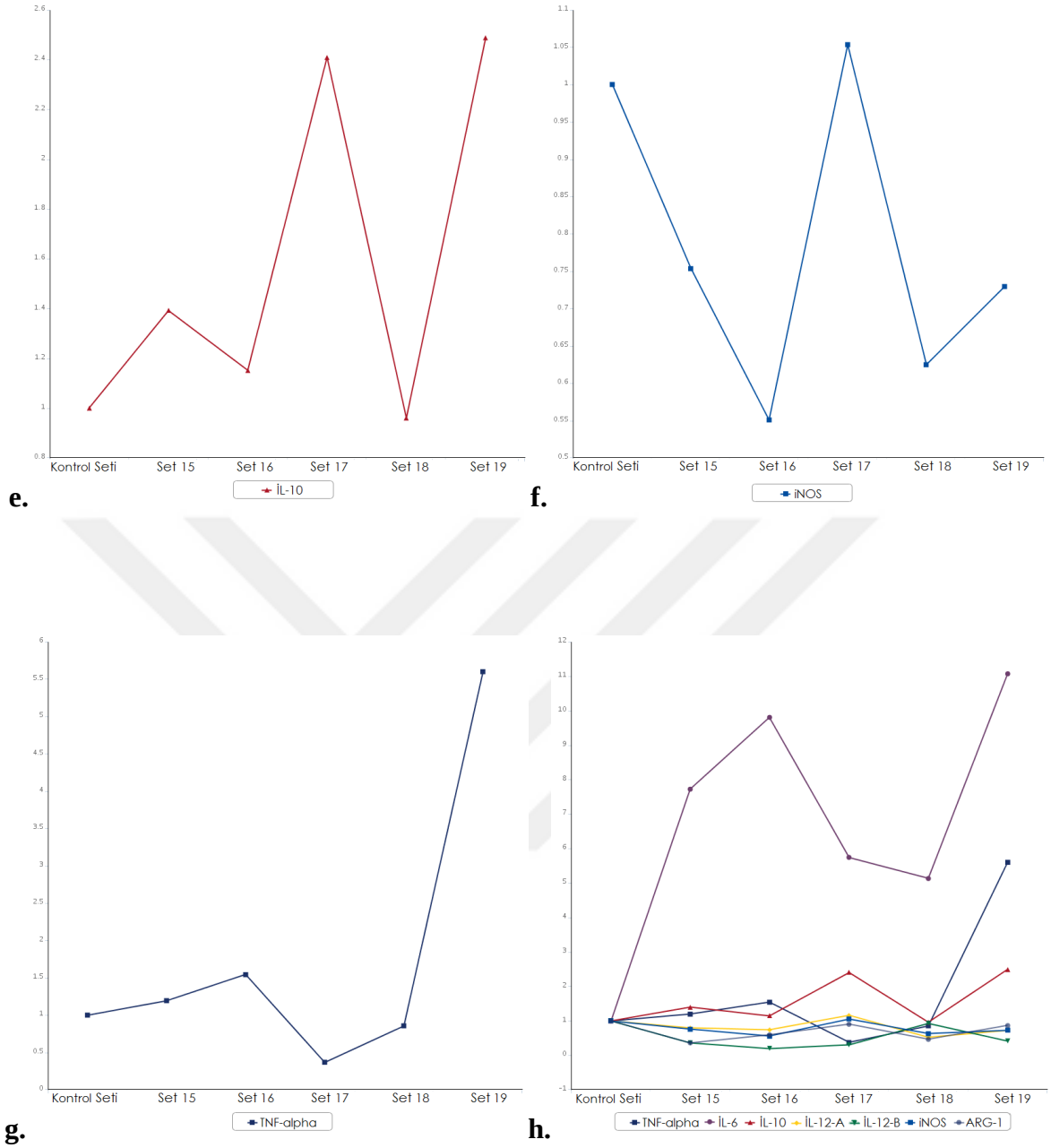


a. **b.**

Şekil 4.22. a. YDLPS ile muamele edilmiş THP-1 Mo/Mq ile ko kültüre edilen muamele edilmemiş MKH'lerin gen ekspresyonu dağılım grafiği b. Muamele edilmemiş MKH ile ko kültüre alınan YDLPS ile muamele edilmiş THP-1 Mo/Mq gen ekspresyonu dağılım grafiği



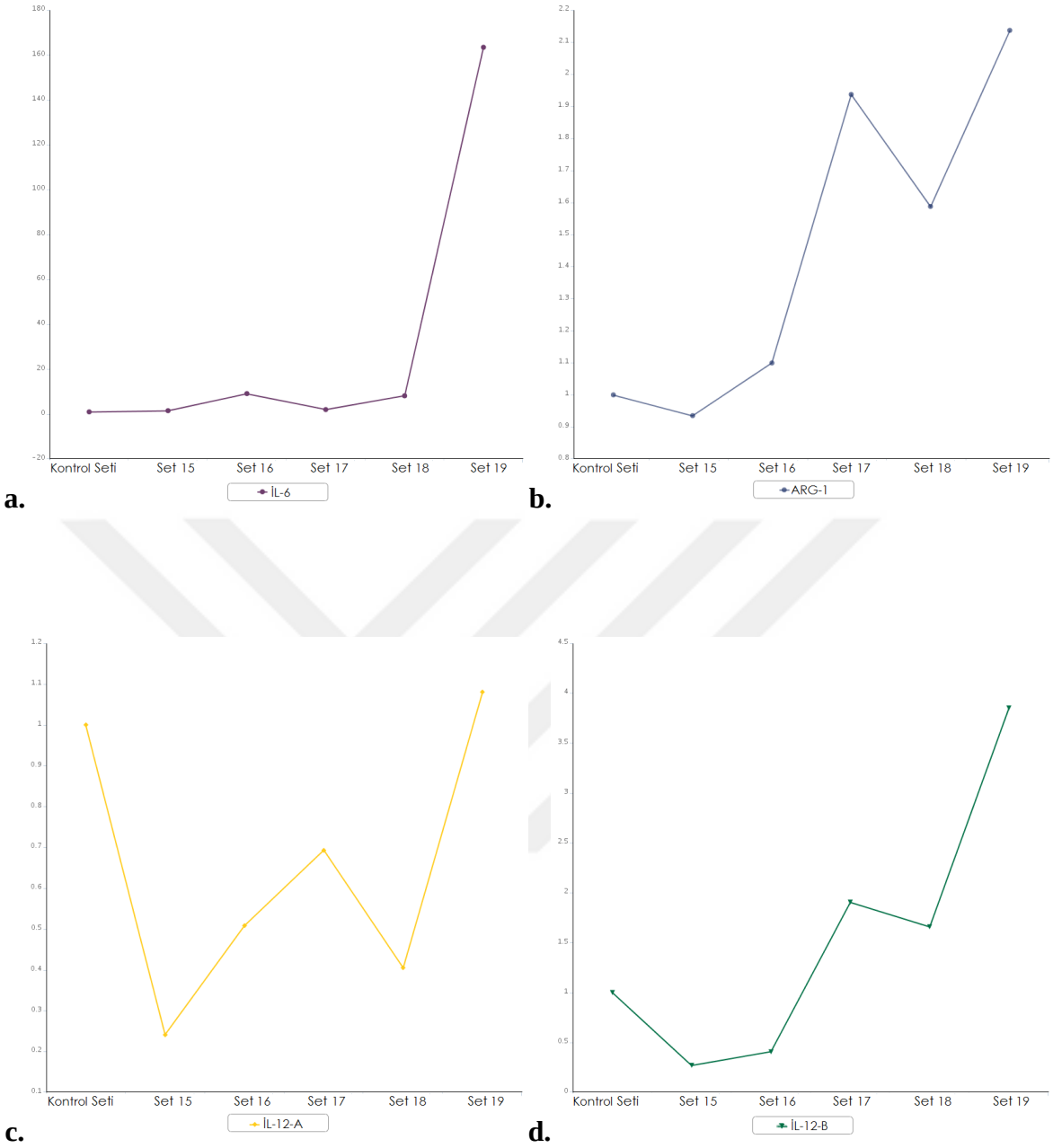
Şekil 4.23. Çalışmamızın 3. grubundaki tüm MKH setlerine göre gen ekspresyonu analizlerinin kat değişimi dağılımları a. İL-6 geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı b. Arg-1 geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı c. İL-12-A geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı d. İL-12-B geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı



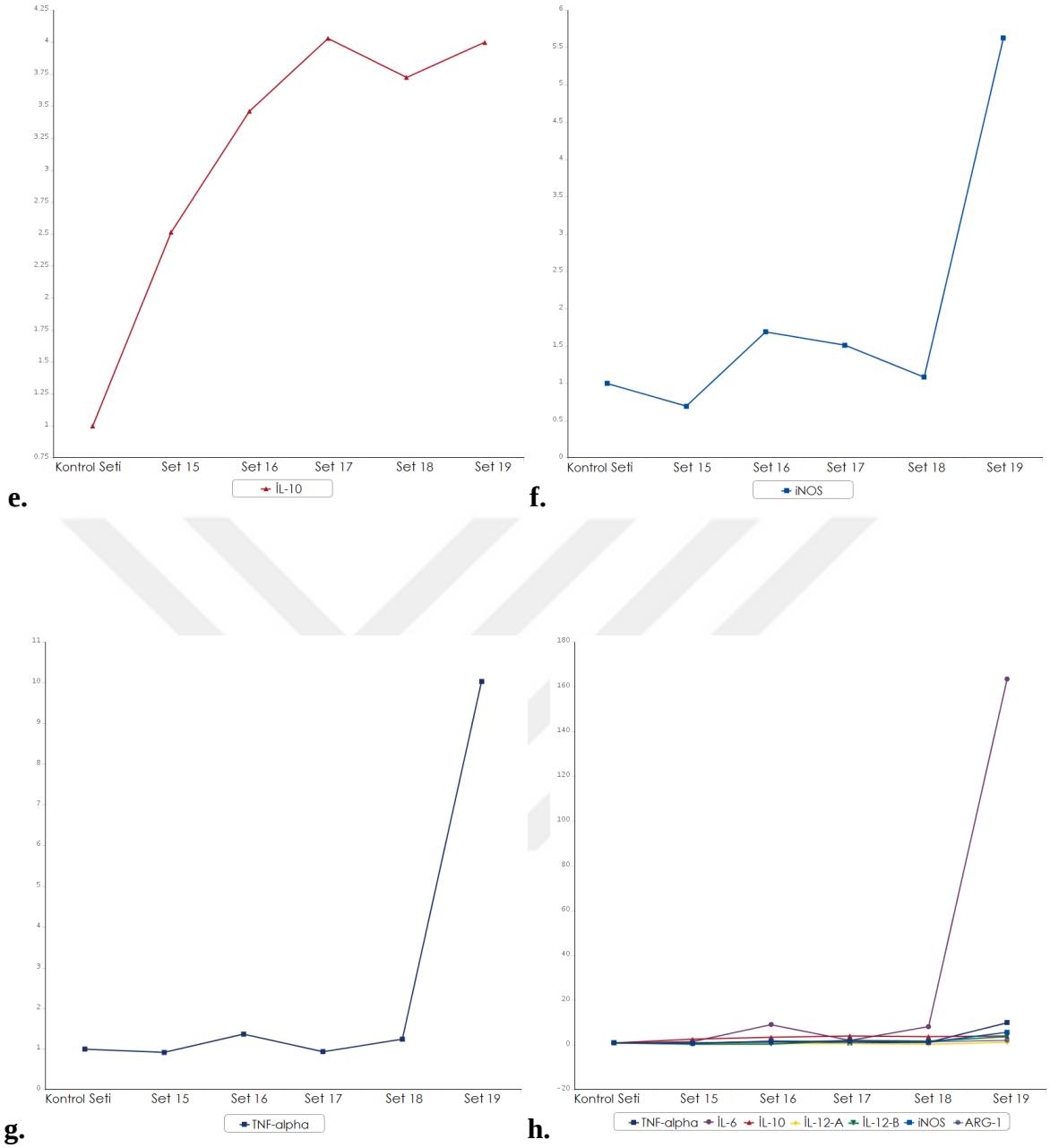
e. **f.**

g. **h.**

Şekil 4.23. (devam) Çalışmamızın 3. grubundaki tüm MKH setlerine göre gen ekspresyonu analizlerinin kat değişimi dağılımları e. İL-10 geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı f. iNOS geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı g. TNF-α geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı h. Tüm genlerin kat değişimi oranlarının çalışma setlerine göre genel dağılımı



Şekil 4.24. Çalışmamızın 3. grubundaki tüm THP-1 Monosit/Makrofaj setlerine göre gen ekspresyonu analizlerinin kat değişimi dağılımları a. İL-6 geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı b. Arg-1 geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı c. İL-12-A geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı d. İL-12-B geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı

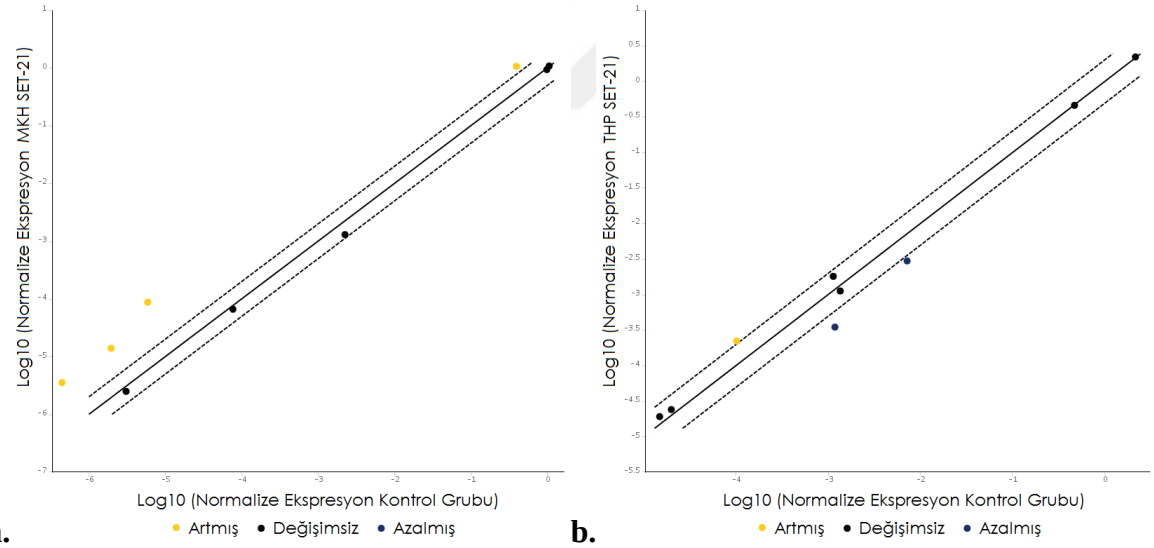


Şekil 4.24. (devam) Çalışmamızın 3. grubundaki tüm THP-1 Monosit/Makrofaj setlerine göre gen ekspresyonu analizlerinin kat değişimi dağılımları e. İL-10 geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı f. iNOS geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı g. TNF-α geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı h. Tüm genlerin kat değişimi oranlarının çalışma setlerine göre genel dağılımı

4.4. Muamele Edilmiş MKH ve Muamele Edilmemiş THP-1 Mo/Mq Gen Ekspresyonu Ölçümlemesi

1)Poly (I:C), 2)İFN-γ + DDLPS, 3)İL-4 + İL-10 + İL-13, 4)TNF-α ve 5)YDLPS ile muamele edilen MKH ve muamele edilmemiş THP-1 Mo/Mq etkileşimlerini ölçümlemek amacıyla bu iki hücre grubu *transwell*'de bir araya getirildi. Bu ko-kültür çalışmasındaki her hücre grubu için araştırmamıza dahil edilmiş olan genlerin ekspresyonları, muamele edilmemiş ve ko-kültüre alınmamış hücre grupları ile karşılaştırılarak aşağıdaki sonuçlar elde edildi:

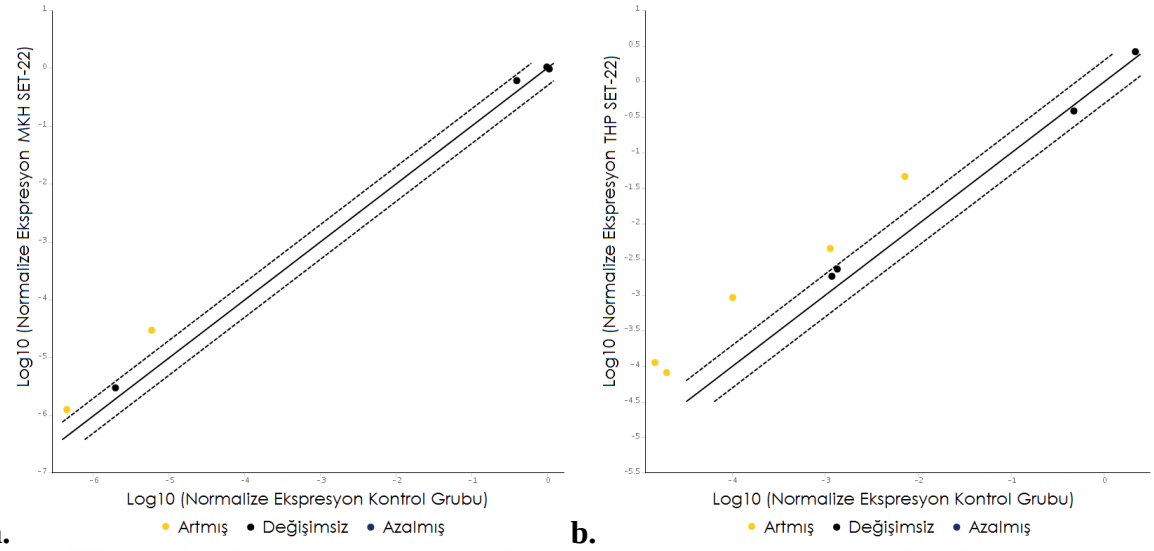
Poly I:C ile muamele edilmiş MKH ve muamele edilmemiş THP-1 Mo/Mq *transwell*'de kültüre alınarak, etkileşimleri incelendi. Ko-kültür sonucunda MKH'larda sırasıyla artan TNF-α, iNOS, İL-12-B ve İL-6 ekspresyon profili tespit edildi (Şekil 4.25.a). THP-1 Mo/Mq'larda ise artan iNOS ekspresyonunun yanısıra azalan Arg-1 ve TNF-α ekspresyon profili saptandı (Şekil 4.25.b).



a. **b.**

Şekil 4.25. a. Muamele edilmemiş THP-1 Mo/Mq ile ko kültüre edilen Poly I:C ile muamele edilmiş MKH'lerin gen ekspresyonu dağılım grafiği b. Poly I:C ile muamele edilmiş MKH ile ko kültüre alınan muamele edilmemiş THP-1 Mo/Mq gen ekspresyonu dağılım grafiği

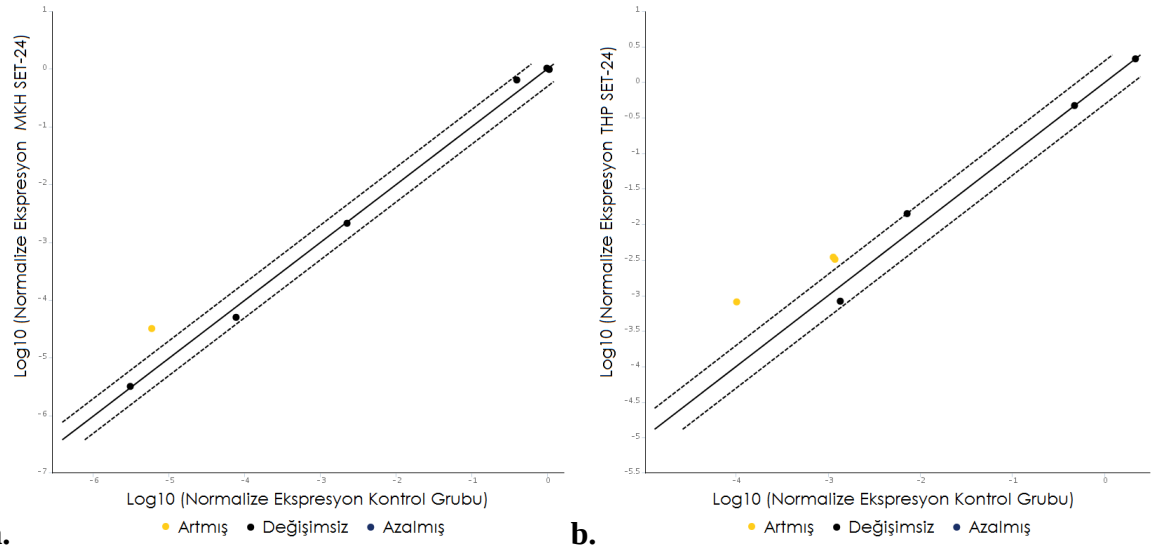
İFN-ɣ + DDLPS ile muamele edilmiş MKH ve muamele edilmemiş THP-1 Mo/Mq *transwell*'de kültüre alınarak, etkileşimleri incelendi. Ko-kültür sonucunda MKH'larda sırasıyla artan TNF-α ve iNOS ekspresyonu tespit edildi (Şekil 4.26.a). THP-1 Mo/Mq'larda ise sırasıyla artan iNOS, TNF-α, İL-12-A, İL-12-B ve İL-10 ekspresyon profili saptandı (Şekil 4.26.b).



a. **b.**

Şekil 4.26. a. Muamele edilmemiş THP-1 Mo/Mq ile ko kültüre edilen İFN-ɣ + DDLPS ile muamele edilmiş MKH'lerin gen ekspresyonu dağılım grafiği b. İFN-ɣ + DDLPS ile muamele edilmiş MKH ile ko kültüre alınan muamele edilmemiş THP-1 Mo/Mq gen ekspresyonu dağılım grafiği

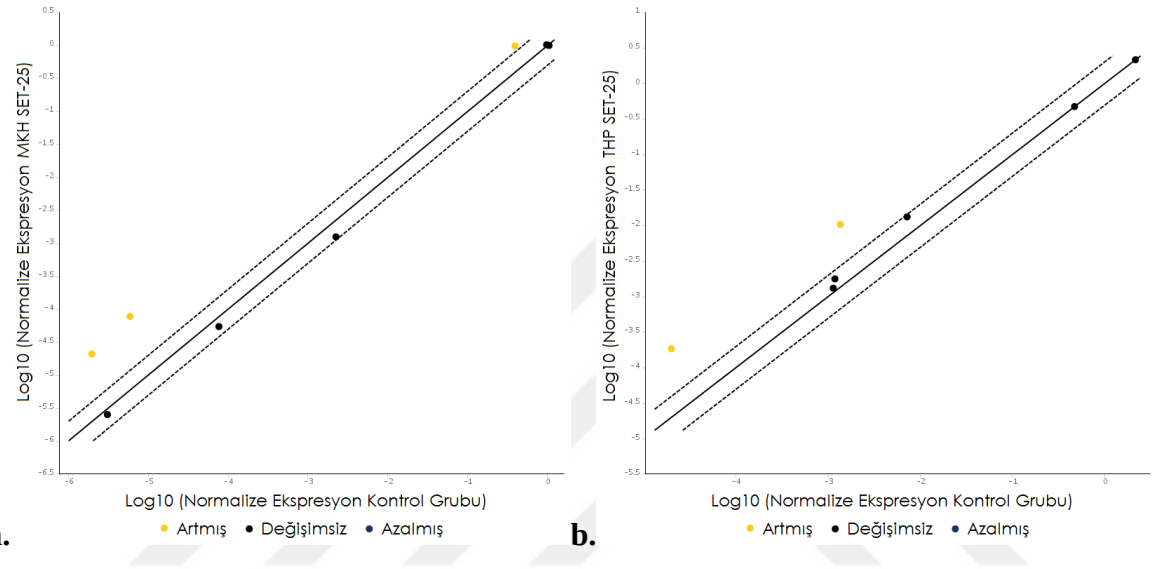
İL-4 + İL-10 + İL-13 ile muamele edilmiş MKH ve muamele edilmemiş THP-1 Mo/Mq *transwell*'de kültüre alınarak, etkileşimleri incelendi. Ko-kültür sonucunda MKH'larda artan TNF-α ekspresyonu tespit edildi (Şekil 4.27.a). THP-1 Mo/Mq'larda ise iNOS başta olmak üzere artan İL-10 ve Arg-1 ekspresyon profili saptandı (Şekil 4.27.b).



a. **b.**

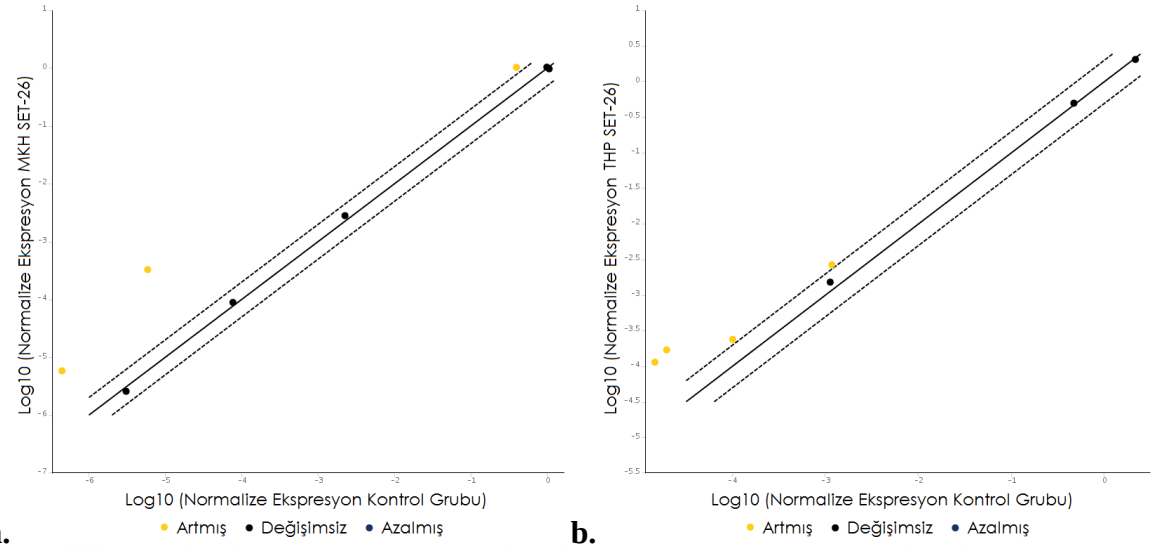
Şekil 4.27. a. Muamele edilmemiş THP-1 Mo/Mq ile ko kültüre edilen İL-4 + İL-10 + İL-13 ile muamele edilmiş MKH'lerin gen ekspresyonu dağılım grafiği **b.** İL-4 + İL-10 + İL-13 ile muamele edilmiş MKH ile ko kültüre alınan muamele edilmemiş THP-1 Mo/Mq gen ekspresyonu dağılım grafiği

TNF-α ile muamele edilmiş MKH ve muamele edilmemiş THP-1 Mo/Mq *transwell*'de kültüre alınarak, etkileşimleri incelendi. Ko-kültür sonucunda MKH'larda TNF-α ve İL-12-B başta olmak üzere artan İL-6 ekspresyonu gözlendi (Şekil 4.28.a). THP-1 Mo/Mq'larda da benzer bir biçimde artan İL-6 ve İL-12-B ekspresyon profili saptandı (Şekil 4.28.b). Ancak MKH'lara kıyasla İL-6 ekspresyonu THP-1 Mo/Mq'larda daha fazla artmış olarak saptandı.



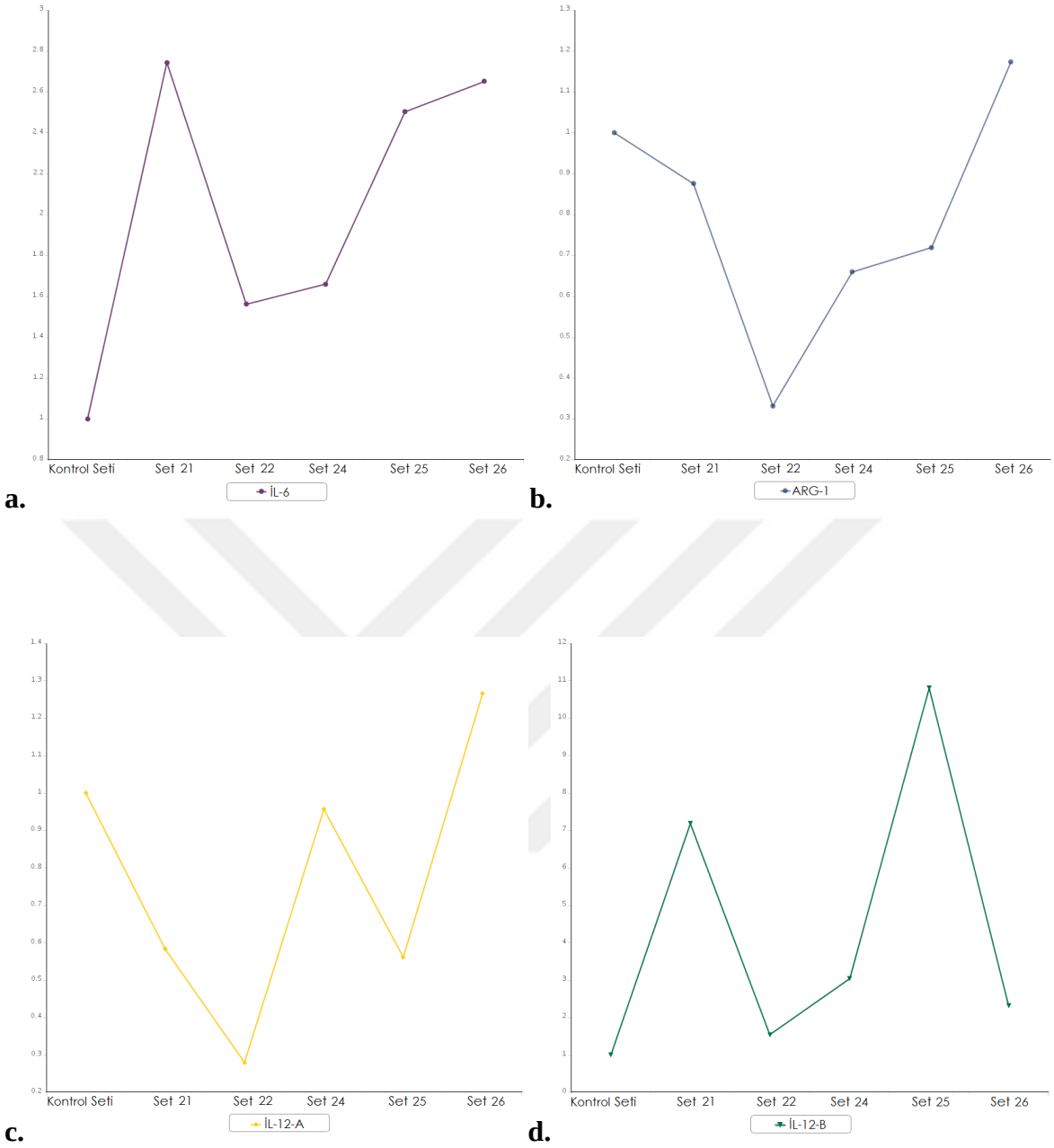
Şekil 4.28. a. Muamele edilmemiş THP-1 Mo/Mq ile ko kültüre edilen TNF-α ile muamele edilmiş MKH'lerin gen ekspresyonu dağılım grafiği b. TNF-α ile muamele edilmiş MKH ile ko kültüre alınan muamele edilmemiş THP-1 Mo/Mq gen ekspresyonu dağılım grafiği

YDLPS ile muamele edilmiş MKH ve muamele edilmemiş THP-1 Mo/Mq *transwell*'de kültüre alınarak, etkileşimleri incelendi. Ko-kültür sonucunda MKH'larda büyük oranda artmış TNF-α ekspresyonunun yanı sıra artan iNOS ve İL-6 ekspresyon profili tespit edildi (Şekil 4.29.a). THP-1 Mo/Mq'larda ise başta İL-12-A ve İL-12-B olmak üzere artan iNOS ve Arg-1 ekspresyon profili saptandı (Şekil 4.29.b).



a. **b.**

Şekil 4.29. a. Muamele edilmemiş THP-1 Mo/Mq ile ko kültüre edilen YDLPS ile muamele edilmiş MKH'lerin gen ekspresyonu dağılım grafiği b. YDLPS ile muamele edilmiş MKH ile ko kültüre alınan muamele edilmemiş THP-1 Mo/Mq gen ekspresyonu dağılım grafiği



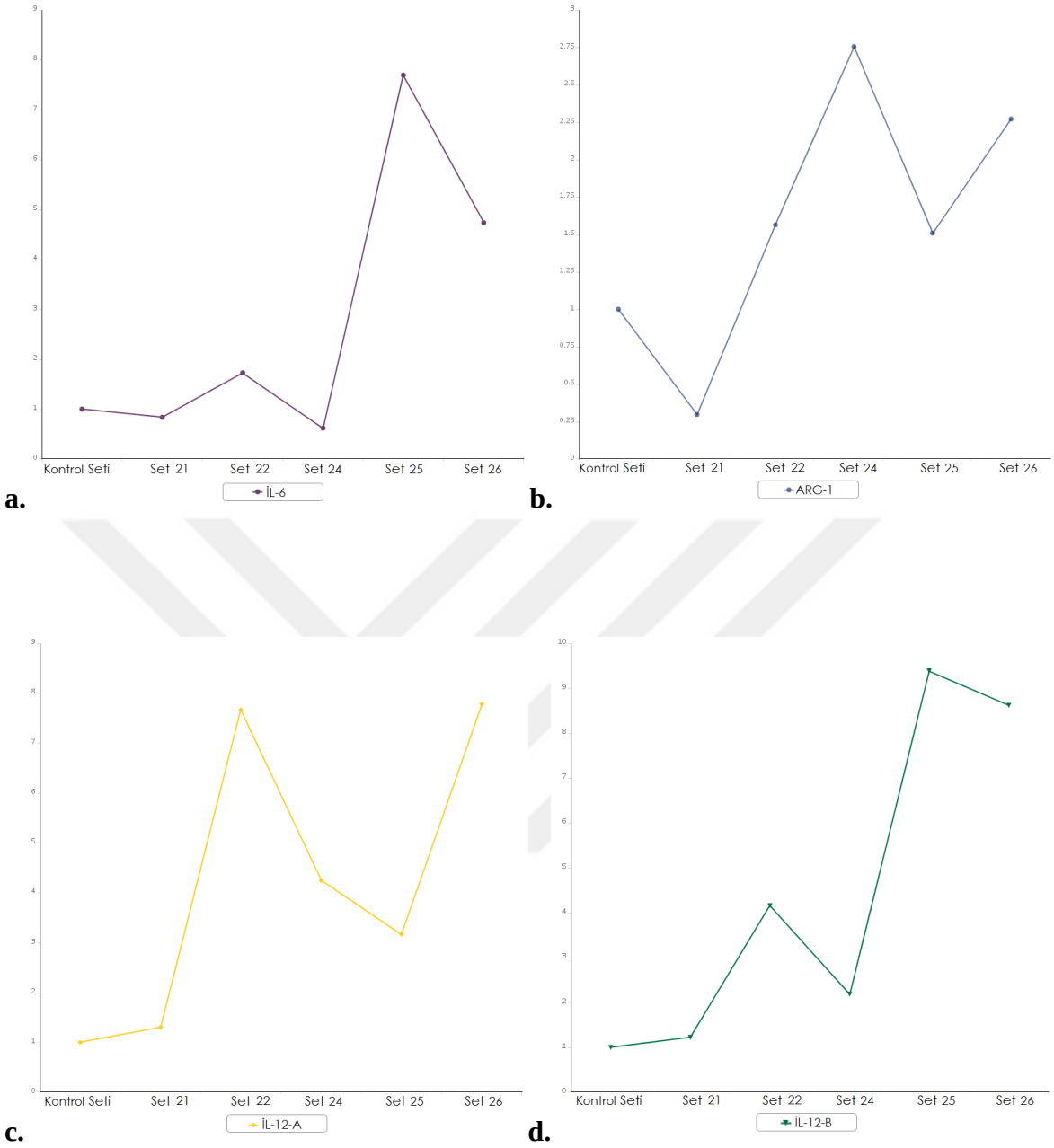
Şekil 4.30. Çalışmamızın 4. grubundaki tüm MKH setlerine göre gen ekspresyonu analizlerinin kat değişimi dağılımları a. İL-6 geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı b. Arg-1 geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı c. İL-12-A geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı d. İL-12-B geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı



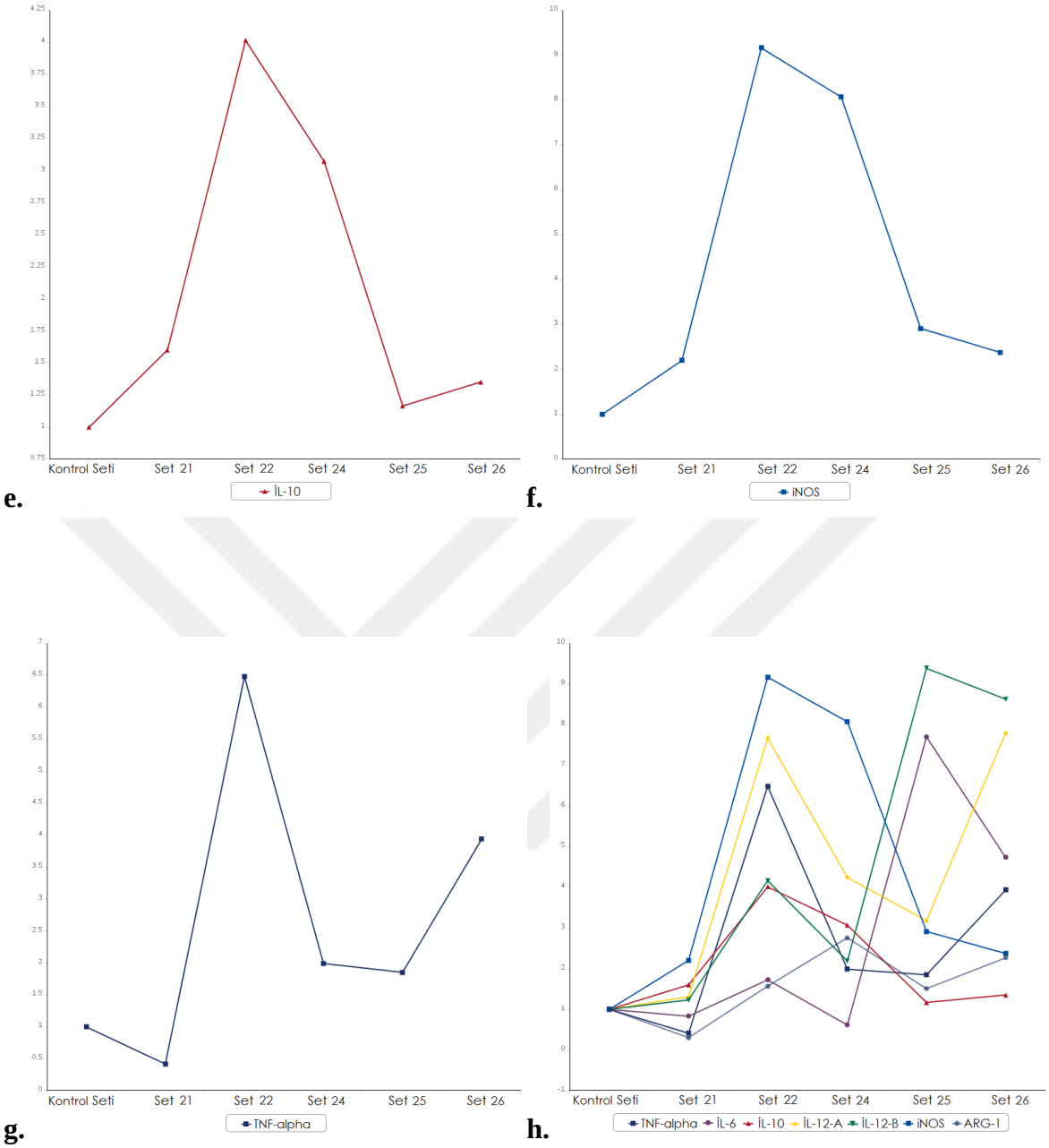
e. **f.**

g. **h.**

Şekil 4.30. (devam) Çalışmamızın 4. grubundaki tüm MKH setlerine göre gen ekspresyonu analizlerinin kat değişimi dağılımları e. İL-10 geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı f. iNOS geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı g. TNF-α geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı h. Tüm genlerin kat değişimi oranlarının çalışma setlerine göre genel dağılımı



Şekil 4.31. Çalışmamızın 4. grubundaki tüm THP-1 Monosit/Makrofaj setlerine göre gen ekspresyonu analizlerinin kat değişimi dağılımları a. İL-6 geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı b. Arg-1 geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı c. İL-12-A geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı d. İL-12-B geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı



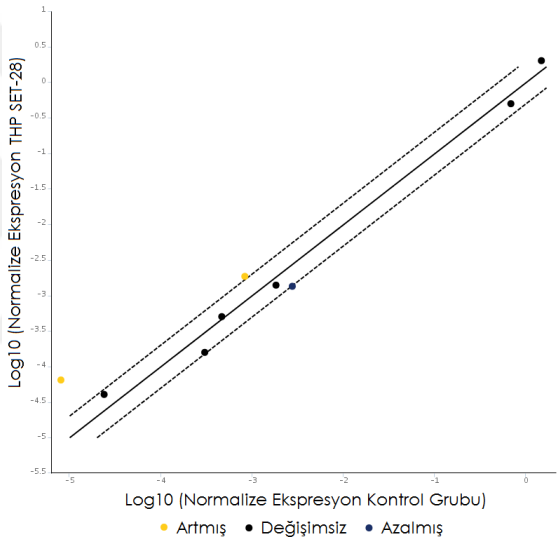
e. **f.**

g. **h.**

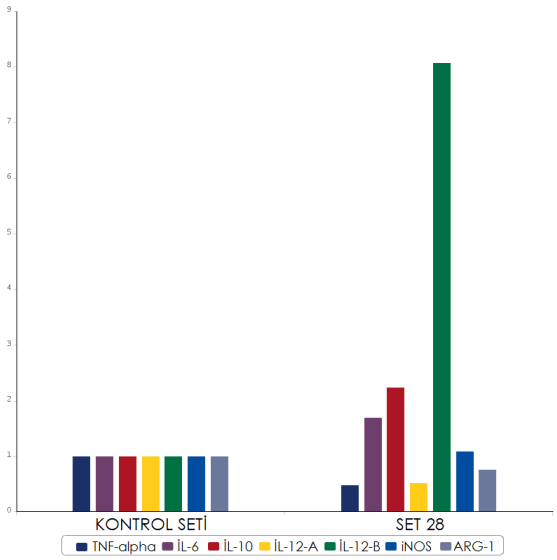
Şekil 4.31. (devam) Çalışmamızın 4. grubundaki tüm THP-1 Monosit/Makrofaj setlerine göre gen ekspresyonu analizlerinin kat değişimi dağılımları e. İL-10 geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı f. iNOS geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı g. TNF-α geni kat değişimi oranının çalışma setlerine göre dağılımı h. Tüm genlerin kat değişimi oranlarının çalışma setlerine göre genel dağılımı

4.5. MKH Süpernatantı ile THP-1 Mo/Mq Kültürü Sonrası Gen Ekspresyonu Ölçümlemesi

Kültüre edilen hücrelerin metabolitleri, büyüme faktörleri, ekstraselüler matriks proteinleri medyuma salınır. Bu sebeple Kİ niş bölgesinden elde edilen MKH'lerin kültüre edildiği conditioned mediumu, kültür sonrasında ayırıldı ve mononükleer hücreler üzerine etkisini araştırmak üzere THP-1 monosit/makrofaj hattı hücreleri bu medyum içerisinde kültüre edildi ve gen ekspresyon ölçümlemesi yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre THP-1 Mo/Mq'larda İL-12-B daha fazla olmak üzere artan İL-12-B ve İL-10 ekspresyonu ve azalan TNF- α ekspresyonu saptanmıştır (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. MKH'lerin kültüre edildiği *conditioned* medyumu içerisinde kültüre edilen THP-1 Mo/Mq'larda gen ekspresyonu dağılım grafiği



Şekil 4.33. MKH'lerin kültüre edildiği *conditioned* medyumu içerisinde kültüre edilen THP-1 Mo/Mq'larda gen ekspresyonu oranlarının dağılımı grafiği

5. TARTIŞMA

Bu çalışmanın MKH'ler ve insan kemik iliği kaynaklı makrofajların fenotipi arasındaki işlevsel ilişkinin ve makrofajların M1 /M2 dengesi üzerine etkisinin incelenmesiyle elde edilen çıktıların MKH'ler hakkında kliniğe uygulanabilir sonuçlar elde edilmesine ve kişiye özel tedavi geliştirilmesine katkı sağlayacağını ve bunun özgün bir değer taşıdığını düşünüyoruz. Ayrıca sitokinlerle plastisitesi etkilenmiş insan makrofajlarının MKH üzerine etkilerinin araştırılması kök hücre tedavileri için önemli bir adım oluşturmaktadır. MKH'lerin karakterizasyonu, immünomodülatör etkileri ve makrofajlarla etkileşimlerine yönelik insan çalışmaları çok kısıtlıdır.

İnsan kemik iliğindeki MKH'lerin immünmodülatör etkilerinin ve plastisite değişimlerine uğramış makrofajlarla etkileşimlerinin incelenmesi, bu alanda bilgi birikimine, dolayısıyla da çeşitli yangısal hastalıklarda, hemofagositik sendromda, özellikle kemik iliği transplantasyon (KİT) sonrasında gelişen komplikasyonların (GVHD) tedavisinde MKH'ler ile optimal tedavi koşulların sağlanabilmesine ve kişiye özel tedavi geliştirilmesine katkıda bulunacaktır. MKH araştırmaları akademik ve sınaî araştırmacıların odaklandıkları ve de yangısal, immün sistem kaynaklı hastalıklar için tedavi amaçlı kullanımları geliştirdikleri önemli bir alandır. Bu alanda bilimsel yayınlar ve klinik denemeler artmaktadır ve bu alandaki çalışma çıktılarının gelecekte ticarileşmesi umulmaktadır.

TÜBİTAK tarafından desteklenen 115S563 no'lu projemizin kapsamında yapılan çalışmalarda, 5 sağlıklı donörden alınan MKH'ler farklılaşmaları gösterilerek ve yüzey belirteçleri akım sitometrisinde incelenerek MKH havuzları oluşturulmuştur. %99,6 saflıkta elde edilen MKH'ler ve THP-1 hücre hattı kullanılarak deneylerimiz gerçekleştirilmiştir.

İnsan monosit/makrofajlarını M1 yönüne plastisiteye sürüklemek için huRİFN-γ (4-40 U/mL) + düşük doz LPS (10 ng/mL), M2 (M2a/M2c) yönüne plastisite sağlamada insan rekombinan İL-4 (10ng/mL), İL-10 (100 ng/mL), İL-13 (10-100 ng/mL) ve de TNF-α (10 ng/mL) sitokinleri ile ve/veya yüksek doz LPS ile (1ug/mL) muamele ederek bu

makrofajların benzer sitokin profili gösteren hastalıklardaki davranışlarını modelleyerek MKH üzerine etkilerini inceledik.

Çalışmamızda ekspresyon analizleri için MKH'ler ve PMA ile uyarılmış THP-1 monosit/makrofajlar (THP-1 PMA) Poly (I:C); İFN-γ ve düşük doz LPS; İL-4, İL-10 ve İL-13; TNF-α ve yüksek doz LPS ile ayrı ayrı 3'er tekrardan oluşan 5 farklı grupta kültüre alınmıştır. Ayrıca bu uygulamaların sonrasında hücre-hücre etkileşimlerini araştırmak için muamele edilmiş MKH'ler ve muamele edilmiş THP-1 PMA'lar; muamele edilmemiş MKH'ler ve muamele edilmiş THP-1 PMA'lar; muamele edilmiş MKH'ler ve muamele edilmemiş THP-1 PMA'lar *transwell*'de ko kültüre alınmıştır. Hücre hücre etkileşiminin haricinde MKH'lerin salgıladıkları ürünlerin THP-1 PMA üzerindeki etkisinin incelenmesi için THP-1 PMA'lar MKH süpernatantı ile kültüre edilmiştir. Her bir uygulamanın sonunda RNA izolasyonu yapılmış ve belirlemiş olduğumuz TNF-α, İL-6, İL-10, İL-12-A, İL-12-B, iNOS, ARG-1, Beta-Actin ve GAPDH gen ifadeleri için gerçek zamanlı PZR ile ölçümleme yapılmıştır. Elde edilen RNA kalitesi ve miktarına bağlı olarak cDNA sentezi ve gerçek zamanlı PZR uygulamaları planlanmıştır. Gerçek zamanlı PZR ile melting analizi ve gene özgü primeler ile SYBR Green interkala boyası kullanılarak kPZR gerçekleştirilmiştir. Actin Beta ve GAPDH sonuçları housekeeping referansı olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen ct "threshold cycle" değerleri ile ortalama ct, ortalama delta ct ve *student's t* testi ile p değerleri hesaplanmıştır.

Sonuç olarak yüksek saflıkta (%99,6) elde ettiğimiz MKH hücreler ve THP-1 insan monosit hücreleri arasındaki etkileşimler bu çalışmada gen ifadeleri yönünden kapsamlı olarak yer almıştır. THP-1 hücrelerin plastisitelerinin Th1 ve Th2 sitokinler tarafından etkilendiği gösterilmiştir. Niş alanı modellemesi için *transwell*'lerde yapılan ko-kültür çalışmalarında gen ifadeleri gerçek zamanlı PZR'la ölçümlenerek analizleri yapılmıştır.

İlk defa Kim ve Hematti, MKH'lerin makrofajları klasik pro-enflamatuvar M1 fenotipinden anti-enflamatuvar M2 fenotipine polarize edebildiğini bildirdi ve MKH'ler ile birlikte ko kültürü yapılan makrofajların yüksek oranda M2 makrofaj belirteçi eksprese ettiğini buldular. Bu makrofajların yüksek seviyede İL-10; düşük seviyelerde İL-12 ve TNF-α eksprese ettikleri gösterilmiştir.MKH ile ko kültür yapılan makrofajlarda yüksek fagositoz aktivitesi gözlenmiştir [125]. Diğer çalışmalar MKH aracılı M2 makrofaj plastisitesinin PGE2, TSG-6, İL-6, İDO ve TGF-β1 gibi çözünebilir faktörlerin salgılanmasına bağlı

olduğunu göstermiştir [126-129]. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular ile MKH'lar ile THP-1 Mo/Mq kokültürü yapıldığında THP-1 Mo/Mq; TNF-α, İL-12-A ve Arg-1 ekspresyonunun baskılandığı ancak sadece MKH süpernatantı ile yapılan deneyde TNF-α baskılanırken İL-12-B ve İL-10 ekspresyonunu arttığı gözlenmiştir. François ve diğerleri sağlıklı gönüllülerden alınan MKH'lerin TNF-α ve İFN-γ varlığında İDO ekspresyonunu arttırdığını göstermiştir. Yüksek İDO aktivitesi, monositlerin İL-10 salgılayan M2 makrofajlarına farklılaşmasında rol oynamaktadır.[129] Bizim deney sonuçlarımızda İFN-γ + DDLPS ve TNF-α ile muamele edilen THP-1 Mo/Mq ve MKH ko kültüründe İL-10 eskpresyon seviyelerinde bir değişim saptanmamıştır. İFN-γ + DDLPS ile muamele edilmiş MKH ve muamele edilmemiş THP-1 Mo/Mq ko-kültüründe THP-1 Mo/Mq'larda artmış İL-10 ekspresyonu gözlenmiştir. TNF-α ile muamele edilmiş MKH ve muamele edilmemiş THP-1 Mo/Mq ko kültüründe ise İL-10 eskpresyon seviyelerinde bir değişim saptanmamıştır. İFN-γ + DDLPS ve TNF-α ile muamele edilen THP-1 Mo/Mq ve MKH ko kültürlerinde THP-1 Mo/Mq'larda artmış İL-10 ekspresyonu gözlenmiştir. Son olarak MKH süpernatantı ile kültüre alınan THP-1 Mo/Mq'larda da artmış İL-10 ekspresyonu gözlenmiştir.

Genel olarak MKH'lerin makrofajları M2 yönünde etkilediği bilinmektedir ancak deneylerimizde muamelesiz MKH ve YDLPS ile muamele edilen THP-1 Mo/Mq ko kültürü sonucunda hem MKH'larda hemde THP-1 Mo/Mq'larda artmış TNF-α ekspresyonu saptanmıştır. İFNɣ + DDPLS ile muamele edilmiş MKH ve muamelesiz THP-1 Mo/Mq ko kültürü sonucunda da her iki hücre popülasyonunda artmış TNF-α ekspresyonu saptanmıştır. Bu istisnalar haricinde iki hücre populasyonunun ko kültürlerinde TNF-α genellikle baskılanmıştır. Buna ek olarak TNF-α ve YDLPS ile muamele edilen MKH ile muamelesiz THP-1 Mo/Mq ko kültürlerinde MKH'ların artmış TNF-α ekspresyonu profili gözlenmiştir. Waterman ve diğerleri MKH'ların sadece immün baskılayıcı etkisi olmadığını; pro-enflamatuvar MKH-1 ve immün baskılayıcı MKH-2 olmak üzere iki fenotipe ayrılabileceğini önermektedirler. MKH'ların LPS ile uyarıldıklarında pro-enflamatuvar fenotipe büründüğünü (MKH-1); artmış İL-6 ve İL-8 pro-enflamatuvar sitokin seviyelerine sahip olduğunu göstermişlerdir [19]. Bizim deneylerimizde ise ko-kültür deneylerinin çoğunluğunda MKH artmış İL-6 seviyeleri gözlenmiştir. Ancak ko-kültür haricindeki uyarılmış MKH deneylerinde İL-6 ekspresyon

seviyelerinde artış gözlenmemiştir. Deneyin tamamına bakıldığında, İL-6 düzeyinde en önemli artış YDLPS ile uyarılmış THP-1 Mo/Mq'larda gözlenmiştir.

Polyinosine-polycytidylic acid (Poly (I:C))'nin makrofajları genellikle artan İL-6, İL-8 ve TNF-α ekspresyon profiline yönelttiği çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir [130-134]. Bizim deneylerimizde THP-1 Mo/Mq'lar Poly (I:C) ile muamele edildiğinde İL-6 ekspresyonunda yüksek oranda artış ve TNF- α ekspresyonunda artış gözlenmiştir. MKH ile yapılan ko kültür deneylerinde ise THP-1 Mo/Mq'ların İL-6 ve TNF- α ekspresyonunda bir artış saptanmamıştır.

İL-4, İL-10 ve İL-13 ile muamele edilen hücrelerin deneylerinden özellikle her iki hücre populasyonununda muamele edilip ko kültüre alındığı deneyde MKH'larda İL-12-B; THP-1 Mo/Mq'larda ise İL-12-A ekspresyonunun yüksek oranda baskılandığı gözlenmiştir ancak diğer deney gruplarında benzer sonuç elde edilmemiştir.

Çeşitli çalışmalarda MKH'lerin ve makrofajların M1/M2 dengesinin karşılıklı olarak düzenlendikleri gösterilmiştir [125-129,135]. Ancak insan kemik iliğinde ve makrofajlarında yeterli veriler bulunmamaktadır, bu alanda yapılan daha fazla sayıda çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Makrofajlar bulundukları ortam koşullarına (sitokin yoğunluğu, hasar tipi vb) bağlı olarak fenotiplerini değiştirerek verecekleri yanıtı belirler. Çevresel faktörler tarafından bu plastisite etkilenmektedir. Farklılaşma üzerine sitokinlerin ve LPS'nin etkili olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Makrofajların kemokin üretimleri, yüzey kemokin reseptörleri, iNOS ve Arg1 gen ekspresyonları, salgıladıkları veya saldıkları sitokinlerin ölçümleri yapılarak plastisiteleri değerlendirilebilmektedir.

Son zamanlarda nörodejeneratif hastalıklar, otoimmün ve yangısal hastalıklar, diyabete bağlı organ hasarları, GVHD, karaciğer sirozu, miyokard enfarktüsü, konjestif kalp yetmezliği, aort anevrizması, ARDS, bronkopulmoner displazi gibi hastalıklarda MKH tedavileri önem kazanmıştır. 2012 yılı sonuna kadar tüm dünyada Araştırmaya yönelik Yeni İlaç (Investigational New Drug: IND) kapsamında MKH temelli tedaviler ve MKH ilişkili verilere ilişkin 66 adet klinik deneme sonuçları ABD-FDA'ya sunulmuştur. MKH'lerin otoimmün hastalıklar üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalarda MKH'lerin birçok yolak üzerinden immün cevabı baskıladığı gösterilmiştir. Diyabet, artrit, multipl

skleroz (MS), sistemik lupus eritematoz gibi hastalıklarda da MKH'lerin immün baskılayıcı etkisi gösterilmiştir.

Gelecekte immünomodulasyonla *in vitro* MKH'nın hedef alındığı çalışmalarla fagositer immün yetmezlikte ve neoplazilerin immünoterapisinde baskılayıcı M2, özellikle M2d (TAM), makrofajların azaltılması yoluyla tedavi yolları araştırılabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Değişik sitokin etkileri altında MKH ve insan makrofajları yanıtları ve aralarındaki etkileşimleri, direkt kültürler ve *transwell* ile ko-kültürler yapılarak, incelenen bu çalışmanın temel çıktıları aşağıda verilmiştir:

- THP-1 hücrelerin plastisitelerinin Th1 ve Th2 sitokinler tarafından etkilendiği gösterilmiştir.
- Uyarımsız THP-1 Mo/Mq kokültürü yapıldığında THP-1 Mo/Mq; TNF-α, İL-12-A ve Arg-1 ekspresyonu baskılanmıştır.
- Sadece uyarımsız MKH süpernatantı ile yapılan deneyde TNF-α baskılanırken İL-12-B ve İL-10 ekspresyonunu arttığı gözlenmiştir.
- İFN-γ + DDLPS ve TNF-α ile muamele edilen THP-1 Mo/Mq ve MKH ko kültüründe İL-10 eskpresyon seviyelerinde bir değişim saptanmamıştır.
- İFN-γ + DDLPS ile muamele edilmiş MKH ve muamele edilmemiş THP-1 Mo/Mq ko kültüründe THP-1 Mo/Mq'larda artmış İL-10 ekspresyonu gözlenmiştir.
- TNF-α ile muamele edilmiş MKH ve muamele edilmemiş THP-1 Mo/Mq ko kültüründe ise İL-10 eskpresyon seviyelerinde bir değişim saptanmamıştır.
- İFN-γ + DDLPS ve TNF-α ile muamele edilen THP-1 Mo/Mq ve MKH ko kültürlerinde THP-1 Mo/Mq'larda artmış İL-10 ekspresyonu gözlenmiştir.
- Uyarımsız MKH ve YDLPS ile muamele edilen THP-1 Mo/Mq ko kültürü sonucunda hem MKH'larda hemde THP-1 Mo/Mq'larda artmış TNF-α ekspresyonu saptanmıştır.
- İFN ɣ + DDPLS ile muamele edilmiş MKH ve muamelesiz THP-1 Mo/Mq ko kültürü sonucunda da her iki hücre populasyonunda artmış TNF-α ekspresyonu saptanmıştır.
- TNF-α ve YDLPS ile muamele edilen MKH ile muamelesiz THP-1 Mo/Mq ko kültürlerinde MKH'ların artmış TNF-α ekspresyonu profili gözlenmiştir.

- THP-1 Mo/Mq'lar Poly (I:C) ile muamele edildiğinde İL-6 ekspresyonunda yüksek oranda artış ve TNF- α ekspresyonunda artış gözlenmiştir.

- İL-4, İL-10 ve İL-13 ile muamele edilen hücrelerin deneylerinden özellikle her iki hücre populasyonununda muamele edilip ko kültüre alındığı deneyde MKH'larda İL-12-B; THP-1 Mo/Mq'larda ise İL-12-A ekspresyonunun yüksek oranda baskılandığı gözlenmiştir.

Bu veriler bizlere uyarımsız MKH ortamında insan monosit/makrofajlarının anti-enflamatuvar M2 yönünde yapılandırıldıklarını, hücresel immün sistemin İFN-γ + DDLPS uyarılarıyla tetiklenme koşullarında makrofajların İL-10 salgısıyla niş alanını bir denge halinde korumak için işlev üstlendiğini, YDLPS ile sepsis modelinde TNF- α ekspresyonunda artışın beklendiği gibi gözlendiği, Poly (I:C) ile muamele edilen ko- ve *transwell* kültürlerde akut faz yanıtının niş alanında gelişebileceği, M2 yönüne plastisiteleri sürüklenen makrofajların hücresel immün yanıtın temel tetikleyici sitokin üretimlerini bastırarak kemik iliğinde baskılanmış bir immün sistem yapılanması sağladığını göstermektedir. MKH'lerin ve makrofajların M1/M2 dengesi karşılıklı olarak düzenlenmektedir.

Ancak insan kemik iliğinde ve makrofajlarında yeterli veriler bulunmamaktadır, bu alanda yapılan daha fazla sayıda çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Biz çalışmamızda TNF-α, İL-6, İL-10, İL-12-A, İL-12-B, iNOS, ARG-1 gen ifadelerinin ölçümlerini yaparak M1/M2 plastisitesini değerlendirdik. Makrofaj plastisitesine etki eden diğer gen ifadelerini, örneğin interlökin-1β (İL-1β), İL-23, İL-4, İL-13 genlerini, araştıracak çalışmalar genel mekanizmayı anlamaya katkı sağlayacaktır.

Gelecekte immünomodulasyonla *in vitro* MKH'nın hedef alındığı çalışmalarla fagositer immün yetmezlikte ve neoplazilerin immünoterapisinde baskılayıcı M2, özellikle M2d (TAM), makrofajların azaltılması yoluyla tedavi yolları araştırılabilir. Bu çalışmaların kliniğe, özellikle çeşitli yangısal hastalıklarda, hemofagositik sendromda, özellikle kemik iliği transplantasyon (KİT) sonrasında gelişen komplikasyonların (GVHD) tedavisinde, uygulanabilir sonuçlar elde edilmesine ve kişiye özel tedavi geliştirilmesine katkı sağlayacağını ve bunun özgün bir değer taşıdığını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Bain, B. J., Clark, D. M., Lampert, I. A., Wilkins, B. S. (2009). *Bone Marrow Pathology*, 4th Edition.

2. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S. (2014). *Cellular and Molecular Immunology*, 8th Edition.

3. Tamma, R. and Ribatti, D. (2017). Bone Niches, Hematopoietic Stem Cells, and Vessel Formation. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 151.

4. Aqmasheh, S., Shamsasanjan, K., Akbarzadehlaleh, P., Sarvar, D. P., Timari, H. (2017). Effects of Mesenchymal Stem Cell Derivatives on Hematopoiesis and Hematopoietic Stem Cells. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 7(2), 165-177.

5. Krause, D. S. (2002). Regulation of hematopoietic stem cell fate. *Oncogene*, 21, 3262 - 3269.

6. Birbrair, A. and Frenette, P. S. (2016). Niche heterogeneity in the bone marrow. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1370(1), 82–96.

7. Simsek, T., Kocabas, F., Zheng, J., Deberardinis, R. J., Mahmoud, A. I., Olson, E. N., Schneider, J. W., Zhang, C. C. ve Sadek H. A. (2010). The Distinct Metabolic Profile of Hematopoietic Stem Cells Reflects Their Location in a Hypoxic Niche. *Cell Stem Cell*, 7(3), 380-390.

8. Berenson, R. J., Andrews, R. G., Bensinger, W. I., Kalamasz, D., Knitter, G., Buckner, C. D., Bernstein I. D. (1988). Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons. *The Journal of Clinical Investigation*, 81, 951-955.

9. Zhao, M. and Li L. (2016). Dissecting the bone marrow HSC niches. *Cell Research*, 26, 975-976.

10. Reya, T. (2011). Illuminating immune privilege--a role for regulatory T cells in preventing rejection. *The New England Journal of Medicine*, 365(10), 956-957.

11. Fujisaki, J., Wu, J., Carlson, A. L., Silberstein, L., Putheti, P., Larocca, R., Gao, W., Saito, T. I., Lo-Celso, C., Tsuyuzaki, H., Sato, T., Côté, D., Sykes, M., Strom, T. B., Scadden, D. T., Lin C. P. (2011). In vivo imaging of Treg cells providing immune privilege to the haematopoietic stem-cell niche. *Nature*, 474(7350), 216-219.

12. Anthony, B. A. and Link D. C. (2014). Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. *Trends in Immunology*, 35(1), 32-7.

13. Glenn, J. D. and Whartenby K. A. (2014). Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. *The World Journal of Stem Cells*, 6(5), 526-39.

14. Friedenstein, A. J., Deriglasova, U. F., Kulagina, N. N., Panasuk, A.F., Rudakowa, S. F., Luria, E. A., Ruadkow, I. A. (1974). Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the *in vitro* colony assay method. *Experimental hematology*, 2(2), 83-92.

15. Dexter, T. M. (1982). Stromal cell associated haemopoiesis. *Journal of Cellular Physiology Supplement*, 1, 87-94.

16. Schu, S., Nosov, M., O'Flynn, L., Shaw, G., Treacy, O., Barry, F., Murphy, M., O'Brien, T., Ritter, T. (2012). Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells. *Journal of cellular and molecular medicine*, 16(9), 2094–103.

17. Lin, C. S., Xin, Z. C., Dai, J., Lue, T. F. (2013). Commonly used mesenchymal stem cell markers and tracking labels: Limitations and challenges. *Histology Histopathology*, 28, 1109-1116.

18. Lv, F. J., Tuan, R. S., Cheung, K. M., Leung, V. Y. (2014). Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 32, 1408-19.

19. Waterman, R. S., Tomchuck, S. L., Henkle, S. L., Betancourt A. M. (2010). A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflamatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *Public Library of Science*, 5(4), e10088.

20. Friedenstein, A. J., Piatetzky, S., Petrakova, K. V. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of embryology and experimental morphology*, 16(3), 381-90.

21. Peng, Y., Chen, X., Liu, Q., Zhang, X., Huang, K., Liu, L., Li, H., Zhou, M., Huang, F., Fan, Z., Sun, J., Liu, Q., Ke, M., Li, X., Zhang, Q., Xiang, A. P. (2015). Mesenchymal stromal cells infusions improve refractory chronic graft versus host disease through an increase of CD5+ regulatory B cells producing interleukin 10. *Leukemia*, 29(3), 636-46.

22. Aggarwal, S. and Pittenger, M. F. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 105, 1815–1822.

23. Xu, C., Ren, G., Cao, G., Chen, Q., Shou, P., Zheng, C., Du, L., Han, X., Jiang, M., Yang, Q., Lin L., Wang, G., Yu, P., Zhang, X., Cao, W., Brewer, G., Wang, Y., and Shi, Y. (2013). miR-155 Regulates Immune Modulatory Properties of Mesenchymal Stem Cells by Targeting TAK1-binding Protein 2. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 288, No. 16, pp. 11074–11079.

24. Ren, G., Su, J., Zhang, L., Zhao, X., Ling, W., L'Huillie, A., Zhang, J., Lu, Y., Roberts, A. I., Ji, W., Zhang, H., Rabson, A. B., Shi, Y. (2009). Species Variation in the Mechanisms of Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression. *Stem Cells*, 27, 1954–1962.

25. Pandey, A. C., Semon, J. A., Kaushal, D., O'Sullivan, R. P., Glowacki, J., Gimble, J. M. and Bunnell, B. A. (2011). MicroRNA profiling reveals age-dependent differential expression of nuclear factor κB and mitogen-activated protein kinase in adipose and bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 2, 49.

26. Li, Z., Fan, D., Xiong, D. (2015). Mesenchymal stem cells as delivery vectors for anti-tumor therapy. *Stem Cell Investigation*, 2, 6.

27. Cho, D., Kim, M. R., Jeong, H., Jeong, H. C., Jeong, M. H., Yoon, S. H., Kim, Y. S. and Ahn, Y. (2014). Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance

in mouse bone marrow-derived macrophages. *Experimental & Molecular Medicine*, 46, e70, 135.

28. Prockop, D. J. (2009). Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): controversies, myths, and changing paradigms. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 17, 939-946.

29. Scherer, H. U., Van Pel, M., Toes, R. E. (2010). Mesenchymal stem cells in autoimmune diseases: hype or hope?. *Arthritis Research and Therapy*, 12(3), 126.

30. Murphy, M. B., Moncivais, K., Caplan, A. I. (2013). Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Experimental and Molecular Medicine*, 45, 54-70.

31. Rafei, M., Campeau, P. M., Aguilar-Mahecha, A., Buchanan, M., Williams, P., Birman, E., Yuan, S., Young, Y. K., Boivin, M. N., Forner, K., Basik, M., Galipeau J. (2009). Mesenchymal stromal cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting CD4 Th17 T cells in a CC chemokine ligand 2-dependent manner. *The Journal of Immunology*, 182(10), 5994-6002.

32. De Miguel, M. P., Fuentes-Julián, S., Blázquez-Martínez, A., Pascual, C. Y., Aller, M. A., Arias, J., Arnalich-Montiel F. (2012). Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. *Current Molecular Medicine*, 12(5), 574-591.

33. Börger, V., Bremer, Michel., Ferrer-Tur, R., Gockeln, L., Stambouli, O., Becic, A. and Giebel, B. (2017). Mesenchymal Stem/Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles and Their Potential as Novel Immunomodulatory Therapeutic Agents. *International journal of molecular sciences*, 18, 1450.

34. Nemeth, K., Mayer, B., Mezey, E. (2010). Modulation of bone marrow stromal cell functions in infectious diseases by toll-like receptor ligands. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 88(1), 5-10.

35. Nemeth, K., Keane-Myers, A., Brown, J. M., Metcalfe, D. D., Gorham, J. D., Bundoc, V. G., Hodges, M. G., Jelinek, I., Madala, S., Karpati, S., Mezey, E. (2010). Bone marrow stromal cells use TGF-beta to suppress allergic responses in a mouse model of ragweed-induced asthma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(12), 5652-5657.

36. Uccelli, A., Moretta, L., Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature reviews. Immunology*, 8, 726–736.

37. Dhivya, V. and Balachandar, V. (2017). Cell replacement therapy is the remedial solution for treating Parkinson's disease. *Stem Cell Investigation*, 4, 59.

38. Bulut, V. (2013). Transplantasyon ve Tolerans. *Turkiye Klinikleri Journal of Immunology Allergy Special Topics*, 6(2), 41-52.

39. Varol, C., Mildner, A., Jung, S. (2015). Macrophages: development and tissue specialization. *Annual review of immunology*, 33, 643-75.

40. Sager, H. B., Kessler, T., Schunkert, H. (2017). Monocytes and macrophages in cardiac injury and repair. *Journal of thoracic disease*, 9(Suppl 1), S30-S35.

41. Vega, M. A. and Corbí, A. L. (2006). Human macrophage activation: Too many functions and phenotypes for a single cell type. *Inmunología*, vol. 25, Núm 4, 248-272.

42. Aksoy, H. (2014). *İnterlökin-33'ün Makrofajlarda Nitrik Oksit Üretimi ve Kutuplaşma Üzerine Etkileri*. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitiüsü, Ankara.

43. Broichhausen, C., Riquelme, P., Geissler, E. K. and Hutchinson, J. A. (2012). Regulatory macrophages as therapeutic targets and therapeutic agents in solid organ transplantation. *Current Opinion in Organ Transplantation*, 17(4), 332–342.

44. Kalinski, P. (2012). Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 188(1), 21–28.

45. Tsuchiya, S., Kobayashi, Y., Goto, Y., Okumura, H., Nakae, S., Konno, T., and Tada K., (1982). Induction of maturation in culture human monocytic leukemia cells by phorbol diester. *Cancer Research*, 42,1530–1536.

46. Genin, M., Clement, F., Fattaccioli, A., Raes, M. and Michiels, C. (2015). M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer*, 15, 577.

47. Hesketh, M., Sahin, K. B., West, Zoe. E. and Murray, R. Z. (2017). Macrophage Phenotypes Regulate Scar Formation and ChronicWound Healing. *International journal of molecular sciences*, 18, 1545.

48. Mescher, A. L. (2017). Macrophages and fibroblasts during inflamation and tissue repair inmodels of organ regeneration. *Regeneration*, 4, 39–53.

49. Murray, P. J. and Wynn, T. A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews. Immunology*, 11, 723–737.

50. Akiyama, Y., Miller, P. J., Thurman, G. B., Neubauer, R. H., Oliver, C. and Stevenson, H. C. (1983). Characterization of a human blood monocyte subset with low peroxidase activity. *The Journal of Clinical Investigation*, 72(3), 1093–1105.

51. Bulut, V. (2017). Tümör Mikroçevresinde Makrofaj Plastisitesi (Macrophage Plasticity in Microenvironment of Tumour). *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Oncology Special Topics*, 10, 124-129.

52. Sica, A., Saccani, A., Borsatti, A., Power, C. A., Wells, T. N. and Mantovani, A. (1997). Bacterial lipopolysaccharide rapidly inhibits expression of C-C chemokine receptors in human monocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 185, 969–974.

53. Porta, C., Rimoldi, M., Raes, G., Brys, L., Ghezzi, P. and Sica, A. (2009). Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor kappaB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 14978–14983.

54. Bulut, V., Severn, A., Liew F. Y. (1993). Nitric oxide production by murine macrophages is inhibited by prolonged elevation of cyclic AMP. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 195(2), 1134–1138.

55. Sands, W. A., Bulut, V., Severn, A., Xu, D., Liew, F. Y. (1994). Inhibition of nitric oxide synthesis by interleukin-4 may involve inhibiting the activation of protein kinase C epsilon. *European Journal of Immunology*, 24(10), 2345–2350.

56. Assreuy, J., Cunha, F. Q., Liew, F. Y. and Moncada, S. (1993). Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. *British Journal of Pharmacology*, 108, 833-837.

57. Liew, F. Y. (1995). Regulation of lymphocyte functions by nitric oxide. *Current Opinion in Immunology*, 7, 396–399.

58. Hao, N. B., Lu, M. H., Fan, Y. H., Cao, Y. L., Zhang Z. R., Yang S. M., (2012). Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clinical & developmental immunology*, 10, 1155.

59. Montesinos, M. C., Desai, A., Chen., J-F, Yee, H., Schwarzschild, M. A. S, Cronstein, B. N. (2002). Adenosine promotes wound healing and mediates angiogenesis in response to tissue injury via occupancy of A(2A) receptors. *The American journal of pathology*, 160, 2009–2018.

60. Liao, Q., Zeng, Z., Guo, X., Li, X., Wei, F., Zhang, W., Li, X., Chen, P., Liang, F., Xiagn, B., Ma, J., Wu, M., Tang, H., Deng, M., Zeng, X., Tank, K., Xiong W, Li, G. (2014). LPLUNC1 suppresses IL-6-induced nasopharyngeal carcinoma cell proliferation via inhibiting the Stat3 activation. *Oncogene*, 33, 2098–2109.

61. Zijlmans, H. J., Fleuren, G. J., Baelde, H. J., Eilers, P. H., Kenter, G. G., Gorter, A. (2006). The absence of CCL2 expression in cervical carcinoma is associated with increased survival and loss of heterozygosity at 17q11.2. *The Journal of pathology*, 208, 507–517.

62. Tsutsui, S., Yasuda, K., Suzuki, K., Tahara, K., Higashi, H., Era, S. (2005). Macrophage infiltration and its prognostic implications in breast cancer: The relationship with VEGF expression and microvessel density. *Oncology reports*, 14, 425–431.

63. Campanella, G. S. V., Colvin, R. A. and Luster, A. D. (2010). CXCL10 can inhibit endothelial cell proliferation independently of CXCR3. *Public Library of Science one*, 5, e12700.

64. Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A. and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*, 25, 677–686.

65. Egesten, A., Eliasson, M., Johansson, H. M., Olin, A. I., Morgelin, M. and Bjorck, L. (2007). The CXC chemokine MIG/CXCL9 is important in innate immunity against Streptococcus pyogenes. *The Journal of Infectious Diseases*, 195, 684–693.

66. Förster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Müller, I. and Lipp, M. (1999). CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell*, 99, 23–33.

67. Shields, J. D., Fleury, M. E., Yong, C., Tomei, A. A., Randolph, G. J. and Swartz, M. A. (2007). Autologous chemotaxis as a mechanism of tumor cell homing to

lymphatics via interstitial flow and autocrine CCR7 signaling. *Cancer Cell*, 11, 526–538.

68. Wiken, M., Idali, F., Al Hayja, M. A., Grunewald, J., Eklund, A. and Wahlström, J. (2010). No evidence of altered alveolar macrophage polarization, but reduced expression of TLR2, in bronchoalveolar lavage cells in sarcoidosis. *Respiratory Research*, 11, 121.

69. Joerink, M., Ribeiro, C. M. S., Stet, R. J. M., Hermsen, T., Savelkoul, H. F. J. and Wiegertjes, G. F. (2006). Head kidney-derived macrophages of common carp (Cyprinus carpio L) show plasticity and functional polarization upon differential stimulation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 177, 61–69.

70. Stillie, R., Farooq, S. M., Gordon, J. R. and Stadnyk, A.W. (2009). The functional significance behind expressing two IL-8 receptor types on PMN. *Journal of Leukocyte Biology*, 86, 529–543.

71. Hume, D. A. (2015). The many alternative faces of macrophage activation. *Frontiers in immunology*, volume 6, article 370.

72. Wells, C. A., Ravasi, T., Hume, D. A. (2005). Inflammation suppressor genes: please switch out all the lights. *Journal of leukocyte biology*, 78, 9–13.

73. Shaheen, Z. R. and Corbett, J. A. (2015). Macrophage Expression of Inflammatory Genes in Response to EMCV Infection. *Biomolecules*, 5, 1938-1954.

74. İnternet: MGI, Mouse Genome Informatics. URL: http://www.webcitation.org/6znThK8S7 Son Erişim Tarihi: 15.02.2018.

75. Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., Tada, K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International journal of cancer*, 26(2), 171-6.

76. Pérez-Pérez, G. I., Shepherd, V. L., Morrow, J. D. and Blaser, M. J. (1995). Activation of human THP-1 cells and rat bone marrow-derived macrophages by Helicobacter pylori lipopolysaccharide. *Infection and Immunity*, 63, 1183-1187.

77. Fujii, T., Kadota, J., Morikawa, T., Matsubara, Y., Kawakami, K., Iida, K., Shirai, R., Taniguchi, H., Kaseda, M., Kawamoto, S. and Kohno, S. (1996). Inhibitory effect of erythromycin on interleukin 8 production by 1-alpha, 25-dihydroxyvitamin D3-stimulated THP-1 cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40, 1548–1551.

78. Rosales, C., Uribe-Querol, E. (2017). Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. *BioMed research international*, 10, 1155.

79. Szondy, Z., Sarang, Z., Kiss, B., Garabuczi, É., and Köröskényi, K. (2017). Anti-inflamatory Mechanisms Triggered by Apoptotic Cells during Their Clearance. *Frontiers in immunology*, 8, 909.

80. Underhill, D. M., Goodridge, H. S. (2012). Information processing during phagocytosis. Nature reviews. Immunology, 12(7), 492-502.

81. Male, D., Brostoff, J., Roth, B. D. and Roitt, I. (Editörler). (2006). Immunology Seventh Edition. *Elsevier Limited*, Canada: 181-203.

82. İnternet: The National Center for Biotechnology Information. URL: http://www.webcitation.org/6znTwIuiX Son Erişim Tarihi: 20.03.2018.

83. Wang, P., Wang, J., Yu, M., Li, Z. (2016). Tumor Necrosis Factor-α T-857C (rs1799724) Polymorphism and Risk of Cancers: A Meta-Analysis. *Disease Markers* volume 2016, article ID 4580323, 9 pages.

84. Zhang, P., Wu, X., Li, G., He, Q., Dai, H., Ai, C., Shi, J. (2017). Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms and susceptibility to ischemic heart disease. *Medicine* 96, 14.

85. İnternet: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. URL: http://www.webcitation.org/6znU31h4q Son Erişim Tarihi: 25.03.2018.

86. González, C., Droguett, K., Rios, M., Cohen, N. A., Villalón, M. (2016). TNFα Affects Ciliary Beat Response to Increased Viscosity in Human Pediatric Airway Epithelium. *BioMed Research International*, volume 2016, article ID 3628501.

87. Pavlov, O. V., Niauri, D. A., Selutin, A. V., Selkov, S. A. (2016). Coordinated expression of TNFα- and VEGF-mediated signaling components by placental macrophages in early and late pregnancy. *Placenta*,42, 28-36.

88. İnternet: Leiden Open Variation Database (LOVD). URL: http://www.webcitation.org/6znU7oaZR Son Erişim Tarihi: 25.03.2018.

89. Liu, T. Z., Guo, Z. Q., Wang, T., Cao, Y., Huang, D., Wang, X. H. (2017). Meta-analysis of the role of IL-6 rs1800795 polymorphism in the susceptibility to prostate cancer. *Medicine* 96, 11.

90. Hunter, C. A. and Jones, S. A. (2015). IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature Immunology* 16, 448–457.

91. Zeng, J., Tang, Z. H., Liu, S., Guo, S. S. (2017). Clinicopathological significance of overexpression of interleukin-6 in colorectal cancer. *World journal of gastroenterology*, 23(10), 1780-1786.

92. Nguyen, D. P., Li, J., Tewari, A. K. (2014). Inflamation and prostate cancer: the role of interleukin 6 (IL-6). *BJU international*, 113, 986-992.

93. Zhang, Y., Yan, W., Collins, M. A., Bednar, F., Rakshit, S., Zetter, B. R., Stanger, B. Z., Chung, I., Rhim, A. D., di Magliano, M. P. (2013). Interleukin-6 is required for pancreatic cancer progression by promoting MAPK signaling activation and oxidative stress resistance. *Cancer Research*, 73, 6359-6374.

94. Taniguchi, K. and Karin, M. (2014). IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflamation and cancer. *Seminars in immunology*, 26, 54-74.

95. Iyer, S. S. and Cheng, G. (2012). Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflamation and Autoimmune Disease. *Critical reviews in immunology*, 32(1), 23–63.

96. Rojas, J. M., Avia, M., Martín, V., Sevilla, N. (2017). IL-10: A Multifunctional Cytokine in Viral Infections. *Journal of Immunology Research*, Vol. 2017, Article ID 6104054.

97. Li, P., Lu, G., Cui, Y., Wu, Z., Chen, S., Li, J., Wen, X., Zhang, H., Mu, S. (2016). Fengchun Zhang, F., Yongzhe Li, Y. Association of IL12A Expression Quantitative Trait Loci (eQTL) With Primary Biliary Cirrhosis in a Chinese Han Population. *Medicine*, Vol. 95, No 19, e3665.

98. Tagawa, T., Albanese, M., Bouvet, M., Moosmann, A., Mautner, J., Heissmeyer, V., Zielinski, C., Lutter, D., Hoser, J., Hastreiter, M., Hayes, M., Sugden, B., Hammerschmidt, W. (2016). Epstein-Barr viral miRNAs inhibit antiviral CD4+ T cell responses targeting IL-12 and peptide processing. *The Journal of experimental medicine*, Vol. 213, No. 10, 2065–2080.

99. Kowalewska, B., Zorena, K., Szmigiero-Kawko, M., Waz, P., Mysliwiec, M. (2016). High Interleukin-12 Levels May Prevent an Increase in the Amount of Fungi in the Gastrointestinal Tract during the First Years of Diabetes Mellitus Type 1. *Disease Markers*, Vol. 2016, Article ID 4685976.

100. Javan, M. R., Shahraki, S., Safa, A., Zamani, M. R., Salmaninejad, A., Aslani, S. (2017). An interleukin 12 B single nucleotide polymorphism increases IL-12p40 production and is associated with increased disease susceptibility in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurological research*, 39(5), 435-441.

101. Wang, M. J., Xu, X. L., Mi, Y. Y., Liu, R. P. (2016). Association of IL12B Gene Polymorphisms with Rheumatoid Arthritis: A Meta-analysis. Archives of medical research, 47(2), 126-33.

102. İnternet: OMIM; Online Mendelian Inheritance in Man. URL: http://www.webcitation.org/6znUDneil Son Erişim Tarihi: 20.03.2018.

103. Maggio, D. M., Singh, A., Iorgulescu, J. B., Bleicher D. H., Ghosh, M., Lopez M. M., Tuesta L. M., Flora, G. , Dietrich, W. D., Pearse, D. D. (2017). Identifying the Long-Term Role of Inducible Nitric Oxide Synthase after Contusive Spinal Cord Injury Using a Transgenic Mouse Model. *International journal of molecular sciences*, 18(2), E245.

104. Kröncke, K. D., Fehsel, K., Kolb-Bachofen, V. (1998). Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *American Journal of Clinical and Experimental Immunology*, 113(2), 147-56.

105. Lowenstein, C. J., Glatt, C. S., Bredt, D. S., Snyder, S. H. (1992). Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 6711-6715.

106. Diefenbach, A., Schindler, H., Rollinghoff, M., Yokoyama, W. M., Bogdan, C. (1999). Requirement for type 2 NO synthase for IL-12 signaling in innate immunity. *Science*, 284, 951-955.

107. Johannesen, J., Pie, A., Pociot, F., Kristiansen, O. P., Karlsen, A. E., Nerup, J. (2001). The Danish Study Group of Diabetes in Childhood, The Danish Insulin-Dependent Diabetes Mellitus Epidemiology and Genetics Group. Linkage of the human inducible nitric oxide synthase gene to type 1 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 86, 2792-2796.

108. Nathan, C. and Shiloh, M. U. (2000). Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 8841- 8848.

109. Vouldoukis, I., Riveros-Moreno, V., Dugas, B., Ouaaz, F., Becherel, P., Debre, P., Moncada, S., Mossalayi, M. D. (1995). The killing of Leishmania major by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the Fc-epsilon-RII/CD23 surface antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 7804-7808.

110. Nicholson, S., Bonecini-Almeida, M. G., Lapa e Silva, J. R., Nathan, C., Xie, Q., Mumford, R., Weidner, J. R., Calaycay, J., Geng, J., Boechat, N., Linhares, C., Rom, W., Ho, J. L. (1996). Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *The Journal of experimental medicine*, 183, 2293-2302.

111. Facchetti, F., Vermi, W., Fiorentini, S., Chilosi, M., Caruso, A., Duse, M., Notarangelo, L. D., Badolato, R. (1999). Expression of inducible nitric oxide synthase in human granulomas and histiocytic reactions. *The American journal of pathology*, 154, 145-152.

112. Choi, H. S., Rai, P. R., Chu, H. W., Cool, C., Chan, E. D. (2001). Analysis of nitric oxide synthase and nitrotyrosine expression in human pulmonary tuberculosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 166, 178-186.

113. Kolodziejski, P. J., Musial, A., Koo, J.-S., Eissa, N. T. (2002). Ubiquitination of inducible nitric oxide synthase is required for its degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 12315-12320.

114. Reuter, U., Chiarugi, A., Bolay, H., Moskowitz, M. A. (2002). Nuclear factor-kappa B as a molecular target for migraine therapy. *Annals of neurology*, 51, 507-516.

115. Kim, S. F., Huri, D. A., Snyder, S. H. (2005). Inducible nitric oxide synthase binds, S-nitrosylates, and activates cyclooxygenase-2. *Science*, 310, 1966-1970.

116. Tezuka, H., Abe, Y., Iwata, M., Takeuchi, H., Ishikawa, H., Matsushita, M., Shiohara, T., Akira, S., Ohteki, T. (2007). Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells. *Nature*, 448, 929-933.

117. Eyler, C. E., Wu, Q., Yan, K., MacSwords, J. M., Chandler-Militello, D., Misuraca, K. L., Lathia, J. D., Forrester, M. T., Lee, J., Stamler, J. S., Goldman, S. A., Bredel, M., McLendon, R. E., Sloan, A. E., Hjelmeland, A. B., Rich, J. N. (2011). Glioma stem cell proliferation and tumor growth are promoted by nitric oxide synthase-2. *Cell*, 146, 53-66.

118. Nairz, M., Schleicher, U., Schroll, A., Sonnweber, T., Theurl, I., Ludwiczek, S., Talasz, H., Brandacher, G., Moser, P. L., Muckenthaler, M. U., Fang, F. C., Bogdan, C., Weiss, G. (2013). Nitric oxide-mediated regulation of ferroportin-1 controls macrophage iron homeostasis and immune function in Salmonella infection. *The Journal of experimental medicine*, 210, 855-873.

119. Petrone, A. B., O'Connell, G. C., Regier, M. D., Chantler, P. D., Simpkins, J. W., Barr, T. L. (2016). The Role of Arginase 1 in Post-Stroke immunosuppression and Ischemic Stroke Severity. *Translational stroke research*, 7, 103–110.

120. Spector, E. B., Rice, S. C. H., Cederbaum, S. D. (1983). Immunologic studies of arginase in tissues of normal human adult and arginase-deficient patients. *Pediatric research*, 17, 941-944.

121. Colegio, O. R., Chu, N. Q., Szabo, A. L., Chu, T., Rhebergen, A. M., Jairam, V., Cyrus, N., Brokowski, C. E., Eisenbarth, S. C., Phillips, G. M., Cline, G. W., Phillips, A. J., Medzhitov, R. (2014). Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature*, 513(7519), 559-63.

122. Haraguchi, Y., Aparicio R., J. M., Takiguchi, M., Akaboshi, I., Yoshino, M., Mori, M., Matsuda, I. (1990). Molecular basis of argininemia: identification of two discrete frame-shift deletions in the liver-type arginase gene. *The Journal of clinical investigation*, 86, 347-350.

123. Grody, W. W., Klein, D., Dodson, A. E., Kern, R. M., Wissmann, P. B., Goodman, B. K., Bassand, P., Marescau, B., Kang, S. S., Leonard, J. V., Cederbaum, S. D. (1992). Molecular genetic study of human arginase deficiency. American journal of human genetics, 50, 1281-1290.

124. Hendrik, J. M. de Jonge, Rudolf, S. N., Fehrmann, Eveline S. J. M. de Bont, Robert M. W. Hofstra, Frans Gerbens, Willem A. Kamps, Elisabeth G. E. de Vries, Ate G. J. van der Zee, Gerard J. te Meerman, Arja ter Elst. (2007). Evidence Based Selection of Housekeeping Genes. *Public Library of Science one*, 9, e898.

125. Kim, J. and Hematti, P. (2009). Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Experimental hematology*, 37(12), 1445-53.

126. Németh, K., Leelahavanichkul. A., Yuen. P. S., Mayer, B., Parmelee, A., Doi, K., Robey, P. G., Leelahavanichkul, K., Koller, B. H., Brown, J. M., Hu, X., Jelinek, I., Star, R. A., Mezey, E. (2009). Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nature medicine*, 15(1), 42-9.

127. Choi, H, Lee, R. H., Bazhanov, N., Oh, J. Y., Prockop, D. J. (2011). Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF-κB signaling in resident macrophages, *Blood*, 118(2), 330-8.

128. Melief, S. M., Geutskens, S. B., Fibbe, W. E., Roelofs, H. (2013). Multipotent stromal cells skew monocytes towards an anti-inflammatory interleukin-10-producing phenotype by production of interleukin-6. *Haematologica*, 98(6), 888–895.

129. François, M., Romieu-Mourez, R., Li, M., Galipeau, J. (2012). Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Molecular Therapy*, 20(1), 187- 195.

130. Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413(6857), 732-8.

131. Matsukura, S., Kokubu, F., Kurokawa, M., Kawaguchi, M., Ieki, K., Kuga, H., Odaka, M., Suzuki, S., Watanabe, S., Takeuchi, H., Kasama, T., Adachi, M. (2006). Synthetic double-stranded RNA induces multiple genes related to inflammation through Toll-like receptor 3 depending on NF-kappaB and/or IRF-3 in airway epithelial cells. *Clinical and experimental immunology*, 36(8), 1049-62.

132. Mazaleuskaya, L., Veltrop, R., Ikpeze N., Martin-Garcia, J., Navas-Martin, S. (2012). Protective Role of Toll-like Receptor 3-Induced Type I Interferon in Murine Coronavirus Infection of Macrophages. *Viruses*. 4(5), 901- 923.

133. Town, T., Jeng, D., Alexopoulou, L., Tan, J., Flavell, R. A. (2006). Microglia recognize double-stranded RNA via TLR3. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(6), 3804-12.

134. Oliveira, A. C. P., Yousif, N. M., Bhatia, H. S., Hermanek J., Huell, M., Bernd L. Fiebich. (2016). Poly(I:C) increases the expression of mPGES-1 and COX-2 in rat primary microglia. *Journal of Neuroinflammation*, 13, 11.

135. Coulson-Thomas, V. J., Coulson-Thomas, Y. M., Gesteira, T. F., Winston W. Y. K. (2016). Extrinsic and intrinsic mechanisms by which mesenchymal stem cells suppress the immune system. *The ocular surface*, 14(2), 121–134.

EKLER

EK-1. Tıbbi Onam Formu

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

KÖK HÜCRE ARAŞTIRMA VE UYGULAMA MERKEZİ

EK-1 BİYOBANKA ONAM FORMU

Biyobankalar: Hücre/ doku/ DNA/ serum/ plazma/ idrar gibi biyolojik örnek tanımına giren tüm örneklerin saklandığı ve bu örneklerle ilgili bilgilerin veri tabanlarında arşivlenerek gelecekteki çalışmalarda kullanılmak üzere uzun süreli korunduğu alt yapılardır.

H.Ü. Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi Kök Hücre ve Hücre Bankası: Kan, kemik iliği veya diğer dokulardan elde edilen ve farklı dokulara farklılaşabilen, kendi kendini yenileme özelliğine sahip olan hücrelere kök hücre denilmektedir. Kök Hücre ve Hücre Bankası; söz konusu biyolojik örneklerden geliştirilen kök hücrelerin ve bu örneklerle ilişkili bilgilerin özellikle çocukluk çağı hastalıklarında hastalık mekanizmalarının aydınlatılması ve yeni tedavi yöntemlerinin bulunması için uzun süre depolandığı birimdir.

Kişisel Bilgilerin Korunması

- Size/çocuğunuza ait kişisel ve tıbbi bilgiler şifreli bir bilgisayarda korunacaktır ve bu bilgisayara erişim sadece yetkilendirilmiş biyobanka çalışanları tarafından mümkündür.
- Biyolojik örnekler kodlanarak saklanacaktır, bireyi tanımlayıcı kişisel bilgiler (isim, soyadı, gibi kimlik bilgileri) laboratuvar sonuçlarında ve araştırma sonuçlarının çıktılarında kullanılmayacaktır
- Kişisel ve tıbbi bilgileriniz iş yeri, eğitim kurumu ve sigorta şirketi gibi üçüncü şahıslara aktarılmayacaktır. Örnekler gönüllük esasına dayalı olarak toplanmaktadır. Ticari bir karşılığı yoktur.
- Sizden alınan örnekler en az 10 yıl süre ile saklanacaktır.

Örneklere erişim

- Örnek bankalama şu anda size/çocuğunuza bir tanı hizmeti vermeyebilir ancak uzun vadede sizin/çocuğunuzun hastalığı ile ilgili elde edilebilecek bilgiler size ve bu hastalıktan etkilenmiş diğer kişilere/ ailelere/ topluma tanı ve tedavi açısından yarar sağlayabilecektir
- Örnekler araştırma amaçlı kullanıldığı durumda kişisel ve tıbbi bilgileriniz gizli tutulacaktır.
- Biyolojik örnek bankalama sistemi gönüllülük esasına dayalıdır. Örneklerin bankalanma süresi içerisinde onamınızı ve sizin biyolojik örneğinizi çekme hakkına sahipsiniz. Bu durumda talebinize bağlı olarak örneğiniz ve verileriniz imha edilecektir.Çocuğunuz 16 yaşına geldiğinde örneklerin saklanması ya da imhası için tekrar onayına başvurulacaktır.

Sonuç Bildirimi

Olası araştırma sonuçlarının geri dönüşümü hakkında aşağıdakilerden hangisini kabul ediyorsunuz

☐Bildirilmesini istemiyorum.

☐Tanı ve tedaviye yol açmasa bile bildirilmesini istiyorum.

☐Sonuçların önleyici veya tedaviye yönelik olduğu durumlarda bildirilmesini istiyorum.

EK-1. (devam) Tıbbi Onam Formu

Sonuçların veri bankalarına eklenmesi Tıbbi bilgileriniz kimlik bilgileriniz ile ilişkilendirilmeden veri bankalarına eklenebilir ve ulusal/uluslararası araştırma çalışmalarında kullanılabilir. Veri bankalarına eklenme konusunda aşağıdakilerden hangisini kabul ediyorsunuz

☐ Tıbbi bilgilerimin veri bankalarına eklenmesini, başka araştırmalarda kullanılmak üzere veri değişimi yapılmasını ONAYLAMIYORUM

☐ Tıbbi bigileriminveri bankalarına eklenmesini, başka araştırmalarda kullanılmak üzere veri değişimi yapılmasını ONAYLIYORUM

Katılmayı kabul ettiğiniz takdirde sizden/çocuğunuzdan tanı ya da tıbbi izlem amacı ile alınan kan, kemik iliği, biyopsi materyallerinin bir kısmı ile kök hücre/hücreler geliştirilerek saklanılacaktır. Bunun için size/çocuğunuza örnek alma amaçlı olarak ek bir girişim yapılmayacaktır.

Sizden alınan biyolojik örnek halen devam eden bir araştırmada kullanılabileceği gibi henüz tanımlanmamış ileride yapılacak araştırmalarda da kullanılabilecektir. Ancak bu araştırmalar şu anda tanımlanmamış olsa bile sizin ya da çocuğunuzun hastalığının tanı ve tedavisine yönelik olacaktır.

Katılmayı kabul ettiğiniz takdirde lütfen bu formu imzalayınız.

- ***Çocuğunuz 16 yaşına geldiğinde; örneklerin saklanması, araştırmalarda kullanılması, imhası ve sonuç bildirimi konularında onun iznine de başvurulacaktır.***

Yukarıdaki bilgileri okudum Kök Hücre/Hücre Bankası amaç ve içeriği hakkında açıklamalar yapıldı. Örnek vermeyi kabul ediyorum.

_____

_____ İsim Soyadı, İmza (Katılımcı/Ebeveyn) Tarih

_____

_____ İsim Soyadı, İmza (Tanık) Tarih

Katılımcı/ebeveyne yukarıdaki bilgiler sözel olarak verilmiş KökHücre/Hücre bankası amaç ve içeriği açıklanmıştır.

_____

_____ İsim Soyadı, İmza (Klinik Sorumlusu/Araştırma Sorumlusu) Tarih

Sorularınız için 0 312-305-2821 no'lu telefondan bilgi alabilirsiniz.

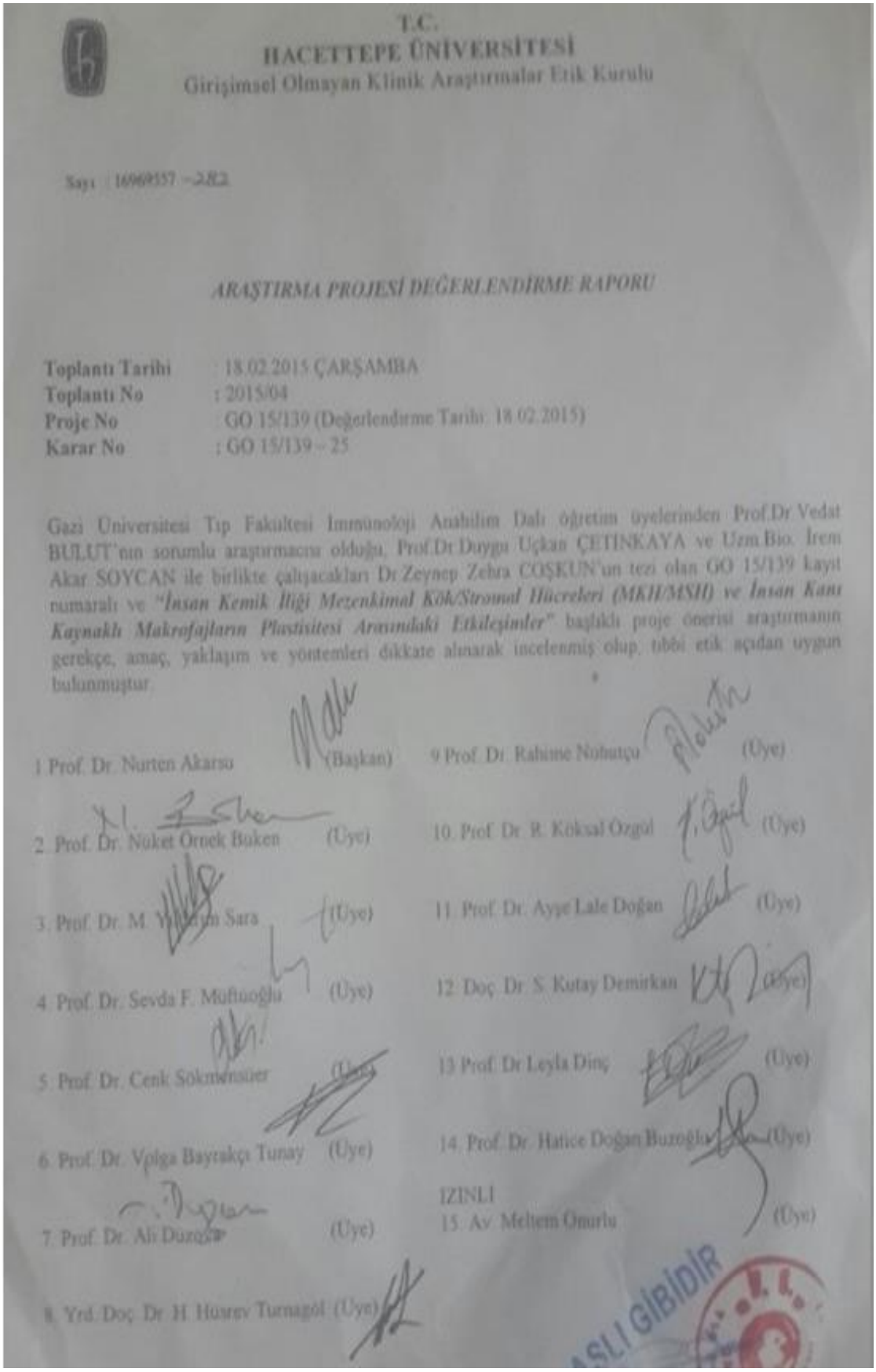
Müdür: Prof. Dr. Duygu Uçkan Çetinkaya

Sorumlular:Klinik Araştırma Hemşiresi:Hacer Cüzdancı

_____

Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi, Sıhhiye Kampüsü, 06100, Ankara.

EK-2. Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Kararları



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

Sayı : 16969557 -282

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

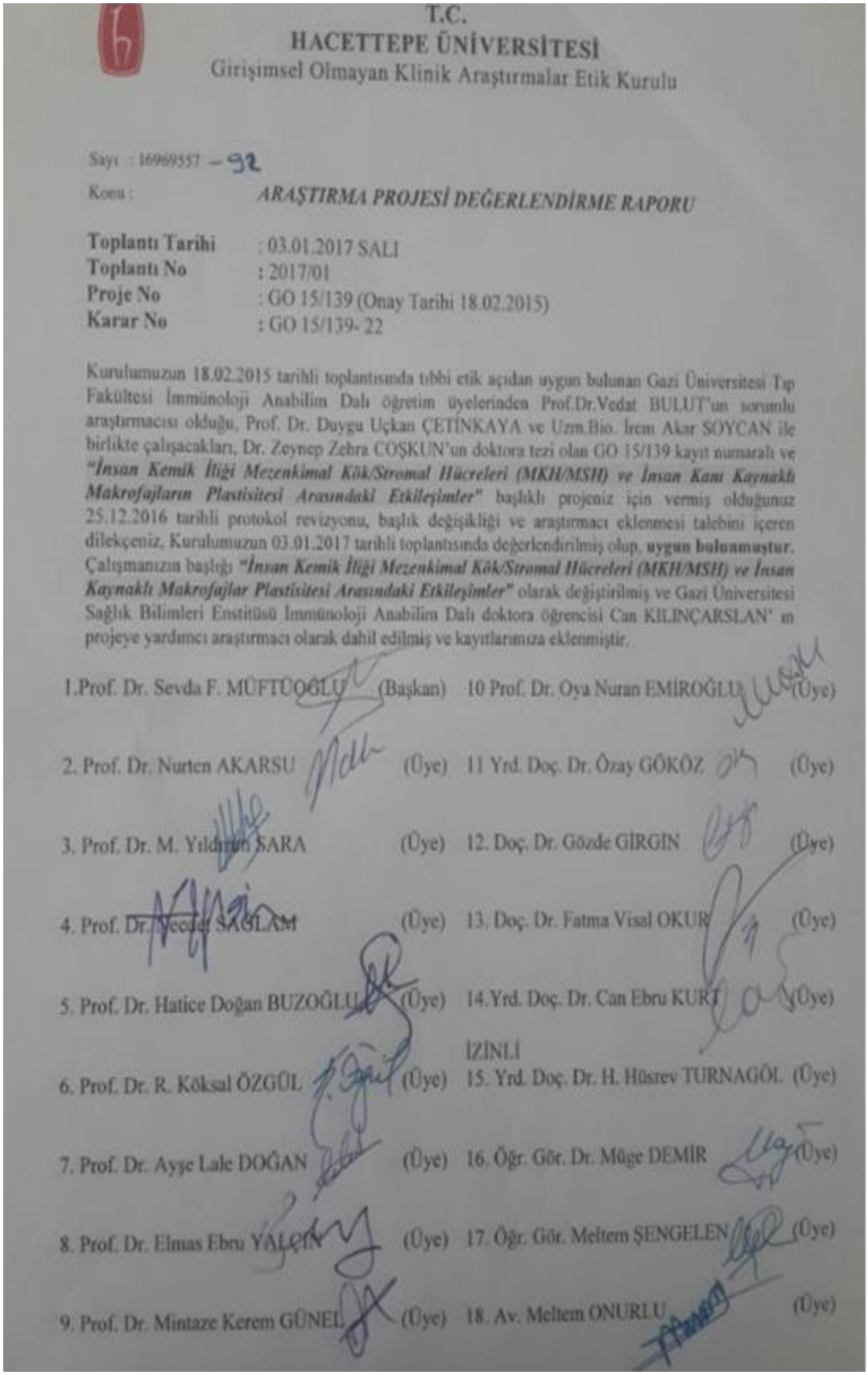
Toplantı Tarihi : 18.02.2015 ÇARŞAMBA
Toplantı No : 2015/04
Proje No : GO 15/139 (Değerlendirme Tarihi: 18.02.2015)
Karar No : GO 15/139 – 25

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmunoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Vedat BULUT'ın sorumlu araştırmacısı olduğu, Prof.Dr.Duygu Uçkan ÇETİNKAYA ve Uzm.Bio. İrem Akar SOYCAN ile birlikte çalışacakları Dr.Zeynep Zehra COŞKUN'un tezi olan GO 15/139 kayıt numaralı ve ***"İnsan Kemik İliği Mezenkimal Kök/Stromal Hücreleri (MKH/MSH) ve İnsan Kanı Kaynaklı Makrofajların Plastisitesi Arasındaki Etkileşimler"*** başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, tıbbi etik açıdan uygun bulunmuştur.

1. Prof. Dr. Nurten Akarsu (Başkan)
2. Prof. Dr. Nuket Örnek Buken (Üye)
3. Prof. Dr. M. Y[illegible]m Sara (Üye)
4. Prof. Dr. Sevda F. Müftüoğlu (Üye)
5. Prof. Dr. Cenk Sökmensüer (Üye)
6. Prof. Dr. Volga Bayraktçı Tunay (Üye)
7. Prof. Dr. Ali Duzgün (Üye)
8. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev Turnagöl (Üye)
9. Prof. Dr. Rahime Nohutçu (Üye)
10. Prof. Dr. R. Köksal Özgül (Üye)
11. Prof. Dr. Ayşe Lale Doğan (Üye)
12. Doç. Dr. S. Kutay Demirkan (Üye)
13. Prof. Dr. Leyla Diç (Üye)
14. Prof. Dr. Hatice Doğan Buzoğlu (Üye)
15. Av. Meltem Onurlu (Üye) İZİNLİ

ASLI GİBİDİR

EK-2. (devam) Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Kararları



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

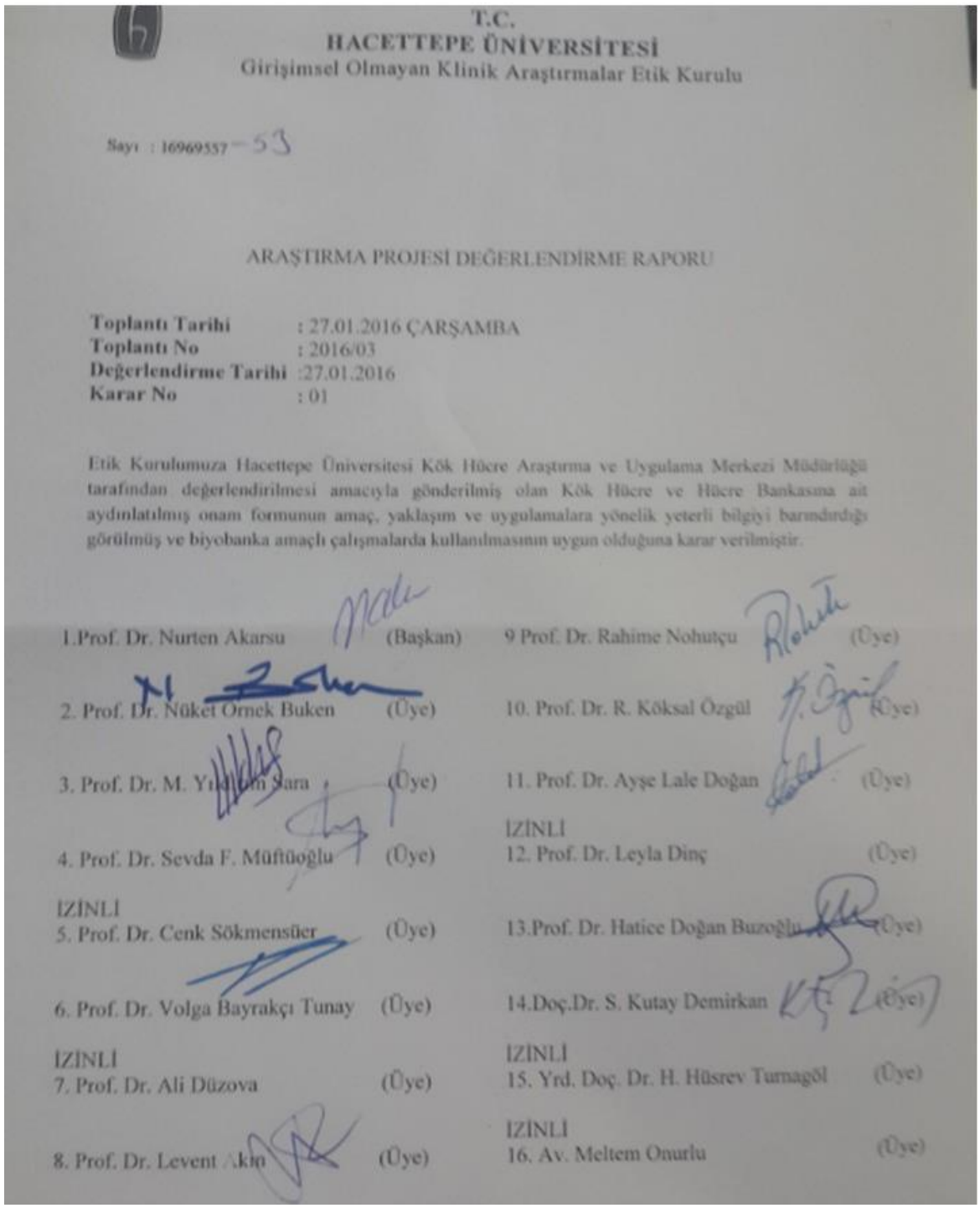
Sayı : 16969557 – 92
Konu : *ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU*

Toplantı Tarihi : 03.01.2017 SALI
Toplantı No : 2017/01
Proje No : GO 15/139 (Onay Tarihi 18.02.2015)
Karar No : GO 15/139- 22

Kurulumuzun 18.02.2015 tarihli toplantısında tıbbi etik açıdan uygun bulunan Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Vedat BULUT'un sorumlu araştırmacısı olduğu, Prof. Dr. Duygu Uçkan ÇETİNKAYA ve Uzm.Bio. İrem Akar SOYCAN ile birlikte çalışacakları, Dr. Zeynep Zehra COŞKUN'un doktora tezi olan GO 15/139 kayıt numaralı ve ***"İnsan Kemik İliği Mezenkimal Kök/Stromal Hücreleri (MKH/MSH) ve İnsan Kanı Kaynaklı Makrofajların Plastisitesi Arasındaki Etkileşimler"*** başlıklı projeniz için vermiş olduğunuz 25.12.2016 tarihli protokol revizyonu, başlık değişikliği ve araştırmacı eklenmesi talebini içeren dilekçeniz, Kurulumuzun 03.01.2017 tarihli toplantısında değerlendirilmiş olup, **uygun bulunmuştur.** Çalışmanızın başlığı ***"İnsan Kemik İliği Mezenkimal Kök/Stromal Hücreleri (MKH/MSH) ve İnsan Kaynaklı Makrofajlar Plastisitesi Arasındaki Etkileşimler"*** olarak değiştirilmiş ve Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İmmünoloji Anabilim Dalı doktora öğrencisi Can KILINÇARSLAN' ın projeye yardımcı araştırmacı olarak dahil edilmiş ve kayıtlarımıza eklenmiştir.

1.Prof. Dr. Sevda F. MÜFTÜOĞLU	(Başkan)	10 Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU	(Üye)
2. Prof. Dr. Nurten AKARSU	(Üye)	11 Yrd. Doç. Dr. Özay GÖKÖZ	(Üye)
3. Prof. Dr. M. Yıldırım SARA	(Üye)	12. Doç. Dr. Gözde GİRGİN	(Üye)
4. Prof. Dr. Necdet SAĞLAM	(Üye)	13. Doç. Dr. Fatma Visal OKUR	(Üye)
5. Prof. Dr. Hatice Doğan BUZOĞLU	(Üye)	14.Yrd. Doç. Dr. Can Ebru KURT	(Üye)
6. Prof. Dr. R. Köksal ÖZGÜL	(Üye)	İZİNLİ 15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev TURNAGÖL	(Üye)
7. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN	(Üye)	16. Öğr. Gör. Dr. Müge DEMİR	(Üye)
8. Prof. Dr. Elmas Ebru YALÇIN	(Üye)	17. Öğr. Gör. Meltem ŞENGELEN	(Üye)
9. Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜNEL	(Üye)	18. Av. Meltem ONURLU	(Üye)

EK-3. Tıbbi Onam formu için Etik Kurul Kararı



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

Sayı : 16969557-53

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 27.01.2016 ÇARŞAMBA
Toplantı No : 2016/03
Değerlendirme Tarihi :27.01.2016
Karar No : 01

Etik Kurulumuza Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdürlüğü tarafından değerlendirilmesi amacıyla gönderilmiş olan Kök Hücre ve Hücre Bankasına ait aydınlatılmış onam formunun amaç, yaklaşım ve uygulamalara yönelik yeterli bilgiyi barındırdığı görülmüş ve biyobanka amaçlı çalışmalarda kullanılmasının uygun olduğuna karar verilmiştir.

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

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler



Soyadı, adı : Kılınçarslan Can
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
Doğum tarihi ve yeri : 17.06.1982 Devrek
Medeni hali : Evli
Telefon : 0544 402 47 90
e-mail : can.kilincarslan@gazi.edu.tr
can_kilincarslan@hotmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü – İmmünoloji ABD.	Devam ediyor
Yüksek Lisans	Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü – Tıbbi Biyoloji (YL) (Tezli)	2009
Lisans	Ege Üniversitesi Fen Fakültesi - Biyoloji	2006

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2012- Devam ediyor	ATQ Biyoteknoloji İç ve Dış Tic.	Proje Müdürü
2010-2012	Lösev Vakfı	Uzman Biyolog
2010	Atatürk İlköğretim Okulu Zonguldak	Sözleşmeli Öğretmen
2009-2010	Gülhane Askeri Tıp Akademisi	Sağlık Asteğmen
2006-2008	Gaziantep Üniversitesi Hastanesi	Uzman Biyolog

Yabancı Dil

İngilizce	Middle – Upper Advanced
Almanca	Lower Intermediate

Yayınlar

Ulusal ve Uluslararası Dergi Bildirileri :

1. Kilincarslan C, Pehlivan S. Saglikli Turk Populasyonunda Kolesterol Ester Transfer Protein Genindeki TaqIB Polimorfizm Sikliginin Arastirilmasi. Cukurova Üniversitesi Tip Fakültesi Dergisi 2005; cilt.30: 1-6.
   (*Kilincarslan C, Pehlivan S. The Frequency of TaqIB polymorphism in Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP) Gene in Western Anatolia. Cukurova Medical Journal. 2005; vol.30: 1-6*)
2. TNF-α, TGF-β, IL-10, IL-6 and İFN-γ gene polymorphisms as risk factors for brucellosis. Ilkay Karaoglan, Sacide Pehlivan, Mustafa Namiduru, Mustafa Pehlivan, Can Kilinçarslan, Yasemin Balkan, Ibrahim Baydar. New Microbiologica, 32, 173-178, 2009.
3. Gaziantep ilinde Thalassemi Mutasyonlarının Sıklığı. Sacide Pehlivan, Vahap Okan, Elif Güler, Mehmet Yılmaz, Tuğçe Sever, Ebru Dikensoy, Can Kılınçarslan, Özcan Balat, Mustafa Pehlivan.. Turkish Journal Of Hematology Vol.24 No:4 2007 XXXIII. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Özel Kitabı Bildiri:120 Poster No:P0048 Sayfa:99
   (*The Frequency of Thalasemmia Mutations in Gaziantep. S. Pehlivan, V. Okan, E. Guler, M. Yilmaz, T. Sever, E. Dikensoy, C. Kilincarslan, O. Balat, M. Pehlivan. Turkish Journal Of Hematology 2007 Vol.24 No:4 P.99*)
4. Multipl Myelomalı Olgularda Tromboza Yatkınlıkta Rolü Olan G Polimorfizmlerinin Sıklığı. Mustafa Pehlivan, Vahap Okan, Mehmet Yılmaz, Can Kılınçarslan, Tuğçe Sever, Sacide Pehlivan. Bildiri:267 Poster No:P0195 Sayfa 156-157 Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Özel Kitabı. Turkish Journal Of Hematology Vol.24 No:4 2007
   (*The Frequency of G Polymorphisms that have role in Thrombosis with Multiple Myeloma Patients. S. Pehlivan, V. Okan, E. Guler, M. Yilmaz, T. Sever, E. Dikensoy, C. Kilincarslan, O. Balat, M. Pehlivan. Turkish Journal Of Hematology 2007 Vol.24 No:4 P.99*)
5. Nefrotik Sendromlu Çocuklarda İnterlökin 1 reseptör Antagonisti Gen Polimorfizminin Araştırılması. Balat A., Sever T., Kilincarslan C., Büyükçelik M., Çöl A., Oguzkan Balci S., Pehlivan S.. Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi. Oct 2007 Vol.16 No:4, P;102.
6. Gene methylation of SFRP2, P16, DAPK1, HIC1, and MGMT and KRAS mutations in sporadic colorectal cancer. Sacide Pehlivan, Mehmet Artac, Tugce Sever, Hakan Bozcuk, Can Kilincarslan, Mustafa Pehlivan. Cancer Genetics and Cytogenetics. Sep 2010, Vol.

201, No. 2: 128-132.

Kongre Bildirileri :

1. Saglikli Turk Populasyonunda Kolesterol Ester Transfer Protein (CETP) Genindeki Taq1B polimorfizm Sikliginin Arastirilmasi. Kilincarslan C. Pehlivan S. Adnan Menderes University / 18. Ulusal Biyoloji Kongresi/ 2006
   (The Frequency of TaqIB polymorphism in Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP) Gene in Western Anatolia. Kilincarslan C. Pehlivan S. Adnan Menderes University / 18. National Biology Congress / 2006 Oral Presentation)
2. Silver Russell Sendromlu Hastalarda 7. kromozom uniparental Disomisi Gorulme Sikligi. Karaca E., Pehlivan S., Ozkinay F., Kilincarslan C. VII. Ulusal Prenatal Tani ve Tibbi Genetik Kongresi 17-20 Mayis 2006, Kayseri. (Oral Presentation)
   (The Frequency of 7th Chromosome Uniparental Disomy in Patients with Silver Russell. Karaca E., Pehlivan S., Ozkinay F., Kilincarslan C. VII. National Prenatal Diagnosis and Medical Genetics Congress 17-20 May 2006, Kayseri. Oral Presentation)
3. Interleukin 1 Receptor Antagonist Gene Polymorphism in Childhood Nephrotic Syndrome. A. Balat, T. Sever, C. Kilincarslan, M. Buyukcelik, N. Araz, S. Pehlivan. 14th Congress of the International Pediatric Nephrology Association 31 August- 4 September 2007, Budapest, Hungary. 385 (P) 1506.
4. Complete Androgen Insensitivity Syndrome Within a Large Turkish Family From Southeast of Anatolia G. Cankus, G. Ogur, E. Ozturk, C. Kilicarslan, O. Balat, S. Pehlivan. Poster. EJHG Volume 16 P01.262 Supplement 2 May 2008
5. The Frequency of Cholestryl Ester Transfer Protein TaqIB Polymorphism in the Western Anatolia C. Kilincarslan, S. Pehlivan. Poster. EJHG Volume 16 P07.025 Supplement 2 May 2008.
6. Molecular Basis Of B-Thalassemia Mutations in an Urban Area of Gaziantep Turkey. S.Pehlivan, V.Okan, E. Guler, M. Yilmaz, T. Sever, E. Dikensoy, C. Kilincarslan, O. Balat, M. Pehlivan. Haematologica The Hematology Journal 13th Congress of the European Hematology Association Copenhagen, Denmark, June 12-15,2008. ISSN 0390-6078 P.0849.

Katılınan Kurslar ve Kongreler :

1. 18th National Biology Congress – 26-30 June 2006 - Kusadasi (Oral Presentation) - Turkey
2. VII. Ulusal Prenatal Tani ve Tibbi Genetik Kongresi (VII. National Prenatal Diagnosis and Medical Genetics Congress) - Turkey
3. 1. Ege Genetik Kongresi (Aegean Genetics Congress) – Ege University Faculty Of Medicine Izmir - Turkey
4. II. Congress Of Molecular Medicine 2007 – İstanbul - Turkey
5. QF-PCR Workshop 2006 – Ege University Faculty Of Medicine Medical Genetics Dept. Izmir - Turkey
6. PGD Course 2007 in II. Congress Of Molecular Medicine 2007 – İstanbul - Turkey
7. Bertinoro Course in Molecular Cytogenetics and DNA microarrays, October, 14-16, 2007 – Bertinoro – Italy
7. Many courses about Qiagen Products, Sales Strategies and Product Management in several locations like: London,England; Monaco,Monte Carlo; Hilden,Germany; Malta; Istanbul and Ankara,Turkey etc. from 2012 to 2016
8. ISO 9001:2008 Quality Management Information System 2- 3 May 2011 Türk Loydu.
9. ISO 9001:2008 Management and Process Improvement 12 May 2011 Türk Loydu.
10. Miller Heiman Strategic Sales Training. 04.Nov.2014
11. ISO 9001:2008 Quality Management Information System 2-6 June 2014
12. X. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi 19-23 Aralık 2012 Bursa- Türkiye
13. 4. Ulusal Lenfoma Myeloma Kongresi 02-05 Mayıs 2013 Antalya- Türkiye
14. 39. Ulusal Hematoloji Kongresi 23-26 Ekim 2013 Antalya- Türkiye
15. 24. Ulusal Patoloji Kongresi 06-10 Kasım 2013 İzmir Türkiye
16. XI. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi 24-17 Eylül 2014 İstanbul- Türkiye
17. 5. Ulusal Lenfoma Myeloma Kongresi 24-27 Nisan 2014 Antalya- Türkiye
18. 8. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi 4-7 Haziran 2014 Ankara Türkiye-Türkiye
19. 40. Ulusal Hematoloji Kongresi 22-25 Ekim 2014 Antalya- Türkiye
20. 24. Ulusal Patoloji Kongresi 19-23 Kasım 2014 Trabzon Türkiye
21. 41. Ulusal Hematoloji Kongresi 21-24 Ekim 2015 Antalya - Türkiye
22. 6. Ulusal Lenfoma Myeloma Kongresi 09-12 Nisan 2015 Antalya- Türkiye
23. 25. Ulusal Patoloji Kongresi ve 6. Sitopatoloji Kongresi 14-17 Ekim 2015 Bursa- Türkiye

24. XII. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi 05-09 Ekim 2016 Çeşme İzmir- Türkiye
25. 42. Ulusal Hematoloji Kongresi 19-22 Ekim 2016 Antalya- Türkiye
26. 26. Ulusal Patoloji ve 7. Ulusal Sitopatoloji Kongresi 2-6 Kasım 2016 Antalya- Türkiye
27. 9. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi 18 Kasım 2016 Antalya- Türkiye
28. XV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi 26-29 Ekim 2017 Fethiye, Muğla- Türkiye
29. 43. UHK Ulusal Hematoloji Kongresi 01-04 Kasım 2017 Belek – Antalya – Türkiye
30. 4.Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi 08-12 Kasım 2017 Antalya
31. 27.Ulusal Patoloji Kongresi 15-18 Kasım 2017 Belek – Antalya – Türkiye
32. 3. Çocuk Genetik Sempozyumu'nun 11-13 Ekim 2017 Antalya – Türkiye

Laboratuvar Deneyimi :

2004-2006 Ege Universitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Genetik Laboratuvarı
2004-2007 Ege Universitesi, Tıp Fakültesi, Moleküler ve Sitogenetik Laboratuvarı
2006-2008 Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Bölümü, Moleküler Genetik Tanı Laboratuvarı
2009-2010 Gülhane Askeri Tıp Akademisi (GATA) Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD.
2010-2012 Lösemili Çocuklar Vakfı (LÖSEV), Genetik Laboratuvarı
2012- ATQ Biyoteknoloji Ar-Ge Laboratuvarı

Ödüller :

ESHG Fellowship of 2007 Courses

TUBİTAK 18. Ulusal Biyoloji Kongresi 2006

II. Congress of Molecular Medicine 2007

Hobiler :

Spor ; Tüplü Dalış, Tenis, Futbol, Yüzme.

Sosyal ; Opera, Tiyatro, Sinema, Müzik (Klasik, Türk Sanat Müziği),

Playing Music Instruments (Gitar, Vurmalı çalgılar)

Bilgisayar Bilgisi :

Microsoft Office (Word,Excel,Powerpoint etc.)

Windows, Linux etc.

Basic, c++ etc. (not dominated)

Çeşitli Laboratuvar Cihazlarının ve yazılımlarının kullanımı

1. ABI PRISM® 310, 3100 Genetic Analyzers and related softwares.
2. Cepheid GeneXpert softwares.
3. ABI PRISM® 310, 3100 Genetic Analyzer ve ilişkili yazılımlar.
4. Cepheid GeneXpert software.
5. Roche LightCycler 480 Systems.
6. Roche MagnaPure Compact Systems.
7. Rotor Gene Q Real Time PCR
8. Pyrosequence PyroMark Q system
9. EZ1 Adv. & XL; Qiasymphony systems vs.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

