



ARAŞTIRMA MAKALESİ
RESEARCH ARTICLE
CBU-SBED, 2019, 6(4):313-321

İnsan Amniyon Sıvısı Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmunosupresyon Etkileri: Treg Regülasyonu

Onur Uysal*, Tuğba Semerci Sevimli, Sibel Güneş, Ahmad Fahim Tokhi, Ceren Özel, Ayla Eker Sarıboyacı

¹ Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Hücresel Tedavi ve Kök Hücre Üretim, Uygulama ve Araştırma Merkezi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre AD Eskişehir, Türkiye
email: ouysal1971@gmail.com, drtuğbasevimli@gmail.com, gunesibel@gmail.com, ftokhi@me.com, ceren.zel@gmail.com, aylaekersariboyaci@yahoo.com

Orcid: 0000-0001-6800-5607
Orcid: 0000-0003-4856-2304
Orcid: 0000-0003-0202-5052
Orcid: 0000-0001-8955-2394
Orcid: 0000-0002-5648-3174
Orcid: 0000-0003-4536-9859

„Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Sorumlu Yazar: Onur Uysal

Gönderim Tarihi / Received: 06.09.2019

Kabul Tarihi / Accepted: 23.12.2019

DOI: 10.34087/cbusbed.616566

Öz

Amaç: Mezenkimal kök hücreler (MKH), rejeneratif, immunosupresif, non-immunojenik, anjiyojenik, antiapoptotik ve antiinflamatuvar özellikleri sayesinde hem prelinik araştırmalarda hem de klinikte önem taşımaktadır. MKH'lerin immunosupresif fonksiyonlarının keşfi, otoimmün hastalıklarda patojenik immun yanıtı düşürmek için yeni terapötik araç olarak araştırmalara konu olmuştur. Plasenta, göbek kordonu ve amniyon sıvısı; kemik iliği ve yağ kökenli MKH'lere göre non-invazif eldesi ve pluripotensi kapasitesiyle avantajlı kök hücre kaynakları arasındadır. Bu çalışmada immün yanıtların incelenmesi için in vitro bir model kullanılarak insan amniyotik sıvı kökenli MKH'lerin (iAS-MKH), fitohemagglütinin ile aktive edilmiş T-hücreleri (PHA-T hücreleri) üzerindeki etkisini; hücre proliferasyonu, apoptoz, sitokin düzeyleri ve regülatuar T hücre (Treg) farklılaşması açısından analiz edilmesi amaçlandı.

Gereç ve yöntem: Periferik kandan immunoseleksiyon yöntemi ile izole edilen T-hücreleri karakterize edilip PHA ile uyarıldıktan sonra, iAS-MKH'ler ile insertler kullanılarak indirekt yolla 4 gün ko-kültür (transwell) edildi. Kültür sonrasında PHA-T-hücreleri flow sitometri ve ELISA ile hücre canlılığı ve proliferasyon, sitokin düzeyleri, Treg-farklılaşması ve apoptotik açıdan analiz edildi.

Bulgular: iAS-MKH'lerin; in vitroda ko-kültür edildikleri PHA-T hücrelerinin sitokin profilini değiştirerek, canlılık ve proliferasyonu azaltarak ve apoptoz ve Treg farklılaşmasını indükleyerek immunosupresif etki gösterdiği gözlemlendi.

Sonuç: Erken dönemde (prenatal-natal) ve non-invazif tekniklerle eldesi ve atık bir doku olması şeklinde avantajları olan amniyon sıvısındaki bu kök hücrelerin, immunosupresif etkileri olduğu ve ileriye yönelik olarak daha ayrıntılı analizlerle ve in vivo çalışmalarla desteklenmesi gerektiği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: İnsan Amniyon Sıvısı, Mezenkimal Kök Hücre, İmmunosupresyon.

Abstract

Aim: Mesenchymal stem cells (MSCs) are important in both preclinical researchs and clinical studies due to their regenerative, immunosuppressive, non-immunogenic, angiogenic, antiapoptotic and antiinflammatory properties. The discovery of the immunosuppressive property of MSCs has been the subject of recent researches as a new therapeutic tool for reducing the pathogenic immune response in autoimmune diseases. Harvesting stem cells from placenta, umbilical cord and amniotic fluid compared with bone marrow and fat-derived MSCs is non-invasive and its pluripotency capacity is another advantage. In this study we used an in vitro model to study immune response of human amniotic fluid derived mesenchymal stem cells (hA-MSCs) on phytohemagglutinin (PHA) activated T cells in respect of cell viability, proliferation, apoptosis, cytokine levels and regulatory T cell (Treg) differentiation.

Materials and methods: T cells were isolated from blood by immunoselection and it was characterized and indirectly co-cultured (transwell) using inserts for 4 days. After culture, PHA-T cells were analyzed by flow cytometry and ELISA for cell viability and proliferation, cytokine levels, Treg differentiation and apoptotic analysis. **Results:** It was observed that the PHA-T cells co-cultured with hA-MSCs in vitro showed an immunosuppressive effect by altering the cytokine profile, decreasing viability and proliferation, and inducing apoptosis and Treg differentiation.

Conclusion: It was concluded that these stem cells in the amniotic fluid, which has the advantage of being a waste tissue and obtained by prenatal in a non-invasive method in early period, have immunoregulatory effects and should be further researched in invivo studies.

Keywords: Human Amnion Fluid, Mesenchymal Stem Cell, İmmunosuppression.

1. Giriş

Mezenkimal kök hücreler (MKH), vücudun farklı dokularından izole edilebilen multipotent/pluripotent hücrelerdir. Uygun mikroçevrede bu hücreler; mezodermal kökenli kardiyomyosit, kondroblast ve osteoblast, endodermal hepatosit ve ektodermal nöronlara farklılaşabilmektedir. İlk olarak, kemik iliğinden elde edilmiş olsa da; günümüzde adipoz doku, kordon kanı, plasenta, göbek kordonu, amniyon sıvısı, periferik kan, dermis bağ dokusu ve iskelet kasından izole edilebilmektedir. Belirtilen dokulardan izole edilen hücreler, her ne kadar MKH grubuna ait hücreler olsalar da hücrel farklılaşma potansiyelleri, gen ekspresyon profilleri, yüzey belirteçleri ve bölünebilme sayıları bakımından farklılıklara sahiptir. Bu özellikler MKH'leri hücrel replasman tedavisinde kullanılacak tek hücre grubu yapmaktadır [1-4].

MKH'lerin immunoregülatuar etki mekanizmalarını amaçlayan çalışmalarda MKH'lerin, T hücreleri ile indirekt ko-kültür (transwell kültür) edildiğinde, antiinflamatuvar etki veya toleran fenotipi teşvik etmek için dendritik hücreler (DH), efektör T hücreleri ve doğal öldürücü (NK) hücrelerinin sitokin salgılama profillerini değiştirdiği bildirilmiştir. Araştırmacılar T hücreleri ve NK hücreleri gibi hücrelerden salınan interferon- γ ve monositlerden salınan interlökin-1 (IL-1) gibi sitokinler ile MKH'lerin aktive olduğunu ve bu hücrelerin interlökin-10 (IL-10) ve interlökin-6 (IL-6) gibi sitokinleri ve transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β), hepatosit büyüme faktörü- β (HGF- β), indolamin 2,3 dioksijenaz (IDO), prostaglandin E2 (PGE2), insan lökosit antijen-G (HLA-G) ve nitrik oksit (NO) gibi çözünen faktörleri salgılayarak inhibitör etkide bulduklarını tespit etmiştir [5-8]. Suva ve ark. aktive T hücrelerin in vitro koşullarda allojenik MKH'lere sıkıca bağlandığını, 4 saat içerisinde onların altına göç ettiğini (transmigrasyon) ve yaklaşık 60 saat süreyle orada kaldıklarını saptamışlardır [9]. Bu göç, MKH-T hücre temasının MKH'lerden kaynaklanan inhibitör ya da stimülatör sinyal moleküllerinin etkinliği için gerekli olduğunu göstermektedir. MKH'lerin T hücre etkileşimini sağlayan vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1:CD106), intrasellüler adezyon molekülü-2 (ICAM-2:CD102) ve lenfosit fonksiyon antijeni-3 (LFA-3) gibi bazı adezyon moleküllerini sentezlediğinin gösterilmesi, MKH-T hücre temasının nasıl gerçekleştiğini açıklamaktadır [10].

İlk keşfedilen MKH kaynağı olması ve uzun bir süre tek MKH kaynağı sanılmasının da etkisiyle, hakkında en

uzun süre ve en çok araştırma yapılan kök hücreler, kemik iliği kaynaklı MKH'lerdir. Ancak elde edilmelerindeki zorluklar nedeniyle başka kaynaklar araştırıldığında plasenta ve amniyon sıvısı, non-invazif eldesi ve pluripotensi kapasitesi ile dikkat çekmiştir. Amniyotik sıvı, gelişen fetustan köken alan embriyonik ve ekstraembriyonik doku kaynaklı çeşitli progenitor hücreleri içermektedir [1-4, 11,12]. Çalışmalardan elde edilen verilere göre iAS-MKH'lerin, oldukça geniş multipotansiyel ve/veya pluripotansiyel özelliklere sahip olduğu ve erişkin kök hücreler ile embriyonik kök hücreler arasında bir yerde tanımlanabileceği gözlenmiştir. iAS-MKH'lerin, çok sayıda farklı hücre tipine farklılaşabildiği, kolay elde edilebildiği ve çoğaltılabildiği, tümör oluşumuna neden olmayabileceği, yenidoğan çocuk için genetik uyumluluğa sahip olabileceği ve eğer tedavide kullanılacaklar ise doku reddi şansının azalacağını gösteren bulgular elde edilmiştir. iAS-MKH'leri, tüm embriyonik germ tabakalarını kapsayacak şekilde adipojenik, osteojenik, miyojenik, endotelial, nörojenik ve hepatik farklılaşma potansiyeline sahip olduğundan, rejeneratif tıp için geniş bir potansiyele sahiptir [13-31]. Bu çalışmada iAS-MKH'lerin immunosupresif etkisinden sorumlu hücrel immun yanıtların moleküler mekanizmalarını belirlemek için bir in vitro model kullanarak, iAS-MKH'lerin fitohemaglutinin (PHA) ile aktive edilmiş T hücrelerinin üzerindeki etkisini hücre canlılığı, proliferasyon, apoptoz, sitokin düzeyleri ve Treg farklılaşması açısından analiz etmeyi amaçladık. Aynı zamanda immunolojik hastalıkların etiyojisi ve patogeneğinde rol oynayan mekanizmaların aydınlatılması ile ilgili çalışmalara katkı sağlamayı hedefledik.

2. Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada, daha önce başka bir araştırma için (ESOGÜ Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 80558721-237/05.08.2015 sayı ve tarihli izni ve ESOĞÜ-BAP 201541E01 no'lu projesi kapsamında) izole edilip, karakterizasyon analizleri tamamlanıp dondurulmuş ve saklanmış olan iAS-MKH'ler kullanıldı. Bu hücreler çözüldükten sonra canlılık ve proliferasyon ve yüzey belirteçleri açısından immunofenotipik olarak analiz edildi. İlaveten çalışmada kullanılacak ikinci hücre tipi olan ve daha önce yapılan bir çalışmada (Kocaeli Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu izni ve TÜBİTAK 108S291 nolu proje) negatif immunoseleksiyon kiti (Human Peripheral Blood Pan-T Cells, Stem Cell Technologies,

Vancouver, Canada) ile izole edilip karakterizasyonu tamamlandıktan sonra dondurularak saklanmış olan T hücreleri, canlılık ve proliferasyon ve yüzey belirteçleri açısından immunofenotipik olarak analiz edildi.

2.1 Çözülen iAS-MK- ve T-hücrelerinin flow sitometrik analizi

iAS-MK ve T-hücreleri analiz edilmek istenen yüzey belirteçlerine uygun fluorescein isothiocyanate (FITC)-ve phycoerythrin (PE)-konjuge monoklonal antikorları ile sırasıyla CD29, CD90, CD54 ve HLA-A, B, C (MHC class I), CD45, RT1B, HLA-DR, DP, DQ (MHC class II) ve CD3 (TCR T-hücre reseptörü) antikorları ile işaretlendikten sonra flow sitometride (FACS Calibur, BD Biosciences, San Diego, USA) okutuldu. Cell Quest programında (BD Biosciences, San Diego, USA) analiz işlemleri gerçekleştirildi.

2.2 T-hücrelerinin uyarılması ve WST-1 analizi ile uyarılmanın doğrulanması

T hücreleri, solüsyon kültür flasklarına %10 FBS, 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin ve 200 mM glutamax (Invitrogen/GIBCO) içeren RPMI-1640 besiyerinde (Invitrogen/GIBCO) ekildi. Besiyerine uyarılmak amacıyla 10 µg/ml mitojen PHA (Invitrogen/GIBCO) eklenerek 24 saat boyunca inkübe edildi. Kontrol grubu için (uyarılmamış T hücreleri) hücreler gerekli miktarda, aynı kültür koşullarında ekildi ve PHA besiyerine eklenmedi. T hücre uyarılmasının teyit edilmesi için WST-1 [2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium (WST)-1; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany] analizine almak üzere kültürün sonunda, her bir kuyucukta uyarılmış (PHA-T hücreleri) ve uyarılmamış (kontrol grubu) T hücreleri, 1x10⁵/kuyucuk ve her bir kuyucukta 200 µl besiyeri/medyum olan 96-kuyucuklu petrilere (BD Labware), her bir gruptan 3 kuyucuk olacak şekilde (n=3) ekildi. Her bir kuyucuktaki besiyerine 10 µl WST-1 eklendi. 37°C ve %5CO₂'te, 4 saat karanlıkta inkübe edildi. Örneklerin optik dansite (OD) değerleri, mikropilaka enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) okuyucuda (BIOTEK ELx808IU, Winooski, Vermont, USA) 480 nm dalga boyunda ölçüldü.

2.3 iAS-MKH'ler ile PHA-T hücrelerinin indirekt ko-kültür/transwell deneyleri

PHA-T hücreleri 6-kuyucuklu petrilere yalnız (kontrol) ya da iAS-MKH'ler ile 1:1 oranında indirekt yolla (MKH-T hücre teması olmaksızın) ko-kültür (transwell kültür) edildi. Aynı besiyerini kullanan iki hücre kültürü odacığında elde etmek amacıyla 2 odacık, 0.4 µm por çaplarına sahip olan yarı-geçirgen bir membran olan transwell insertler (kültür ara bölmeler) (BD Biosciences) kullanılarak birbirinden ayrıldı. Öncelikle iAS-MKH'ler, 6-kuyucuklu petrilere 3x10⁵/kuyucuk hücre olacak şekilde ekildi ve yapışması için 24 saat inkübe edildi. 24 saat sonra, kuyucuklardaki iAS-MKH'lerin üzerine 0.4 µm çapında porlara sahip membranlar içeren transwell insertler yerleştirildi. İnsertlerin üzerine eşit sayıda (1:1 oranında) PHA-T hücreleri ekildi ve 4 gün süreyle inkübe edildi. Yalnızca uyarılmış T hücresi içeren kuyucuklara (kontrol grubu,

n=3) eşit sayıda T hücresi eklendi. Her deney grubu için 4 günlük ko-kültürün sonunda, analizin türüne göre T hücreleri ya da besiyerleri WST-1 ve kaspaz-3 analizleri için ELISA ve flow sitometri yöntemlerine uygun olarak toplandı. Toplanan örnekler, analizin türüne göre değerlendirilmek üzere taze ya da daha sonra analiz edilmek için uygun koşullarda dondurularak saklandı. Her deney 3 kez tekrarlandı.

İndirekt ko-kültür/transwell sonrası analizler

PHA-T hücre canlılık ve proliferasyon analizleri

WST-1. iAS-MKH'ler ile transwell kültür sonrası 4.günde T hücrelerinin canlılığı ve proliferasyon analizleri WST-1 kiti (Roche Diagnostics) kullanılarak yapıldı. WST-1 analizi yukarıda anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

Flow Sitometri. iAS-MKH'ler ile transwell kültür sonrası 4.günde T hücrelerinin canlılığı ve proliferasyonunu belirlemek için CD4 ve CD8 antikorları ve onların izotipik kontrollerinin ekspresyon yüzdeleri flow sitometride (FACS Calibur, BD Biosciences) okutuldu. Cell Quest programında (BD Biosciences) analiz işlemleri gerçekleştirildi.

2.4 PHA-T hücrelerinde apoptoz analizi

İmmunofloresan (İF) analizi. Hücresel belirteçleri tanımlamak için PHA-T hücreleri chamber slide'lara (8-kuyucuklu kültür lamelleri; BD Biosciences) ekildi ve daha önce tanımlandığı gibi aktif kaspaz-3 ile işaretlenerek İF olarak analiz edildi [32,33]. Kısaca İF analizleri için PHA-T hücreleri soğuk metanolde (Carlo Erba Reactifs, Val-De-Reuil Cedex, France) fikse edildi. %0,025 Triton X-100 (Merck, Darmstadt, Germany) ile permeabilize edildikten sonra non-spesifik IgG bağlanmalarını baskılamak için PBS'te (Invitrogen/GIBCO) hazırlanmış %1.5'lük normal goat blok serumunda (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) inkübe edildi. Hücreler yıkandıktan sonra biotin işaretli goat anti-rabbit IgG (Millipore, Billerica, MA, USA) ile inkübe edildi ve ardından aktif kaspaz-3 primeri (anti-caspase 3-cleaved; Millipore) ile bir gece inkübe edildi. Ardından uygun fluorescein isothiocyanate (FITC)- ya da Texas Red-(Santa Cruz) işaretli sekonder antikorlar ile inkübe edildi. Hücreler tekrar yıkandıktan sonra 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Santa Cruz) içeren kapatma medyumunu ile preparatlar lamel ile kapatıldı. Herbir deney için rastgele seçilmiş alanlarda 500'er hücre sayıldı. Bu işlem üç kez tekrarlandı (n=3). Apoptotik hücrelerin oranı; apoptotik hücre sayısı, toplam hücre sayısına bölündükten sonra 100 ile çarpılarak hesaplandı.

2.5 PHA-T hücrelerinin sitokin ekspresyon profili

2.5.1 Transwell kültür supernatantlarının ELISA analizi. iAS-MKH'ler ile transwell kültür edilen T hücrelerinin besiyerinden kültürün 4. gününde alınan örnekler (supernatant/kondisyonel medyum), PHA-T hücrelerinden salgılanan sitokin (TGF-β ve IL-4) düzeylerinin kantitatif tayini için toplandı. Bu analizler ELISA kiti (Invitrogen/GIBCO) ve ELISA okuyucu (BIOTEK ELx808IU, Winooski, Vermont, U.S.A) kullanılarak daha önce tanımlandığı gibi gerçekleştirildi

[32]. Sitokin düzeyleri monokromatör sistemli mikropilaka okuyucu (BIOTEK ELx808IU, USA) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda ölçüldü.

2.5.2 PHA-T hücrelerinin Treg belirteçleri (CD4+CD25+Foxp3) açısından flow sitometrik analizi

iAS-MKH'ler ile transwell kültür ve yalnız kültür sonrası PHA-T hücrelerinden farklılaşan Treg hücrelerinin yüzdesi, panel belirteçleri [CD4+CD25+Foxp3] ile flow sitometride analiz edilerek belirlendi. Hücreler, belirlenen hücre yüzey belirteçlerine özel -FITC, -PE ve PerCP konjuge monoklonal antikorlar ve uygun izotip kontrolleri ile oda ısısında, karanlıkta 45 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası yıkama solüsyonu (%0.1 sodyum azide içeren PBS) eklendi ve 5 dk, 1300 rpm'de santrifüj edildi. Hazırlanan hücre süspansiyonları flow sitometride okutuldu ve analizi BD CellQuest software programı ile yapıldı.

2.6 İstatistiksel değerlendirme

Her deney en az üç kez tekrarlandı. Elde edilen veriler ortalama \pm SD olarak değerlendirildi. Veriler, Student T-test kullanılarak değerlendirildi. Çalışma ve kontrol grupları arasındaki farklar için anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı sayıldı.

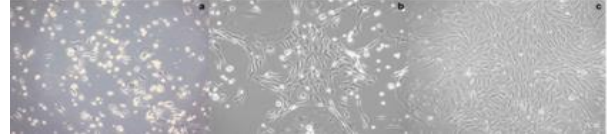
3. Bulgular

Çözülen iAS-MK ve T hücrelerinin dondurma sonrası toluidin blue ile canlılık analizleri yapıldığında hücrelerin sırasıyla; %98.8 ve %97.8 oranlarında canlılık gösterdiği belirlendi. Yapılan immunofenotipik analizlerde iAS-MKH'lerin üçüncü pasajda (P3) CD29 (%96.64), CD54 (%99.89), CD90 (%86.29), ve HLA-A, B, C (MHC class I) (%74.88) açısından pozitif ekspresyon gösterirken; CD45 (%0.94), RT1B (%4.56), HLA-DR, DP, DQ (MHC class II) (%0.74) açısından negatif olduğu; T hücrelerinin ise %90.31 oranında CD3 pozitif olduğu belirlendi (Tablo 1).

Tablo 1: iAS-MKH'lerin (üçüncü pasaj, P3) immunofenotipik özelliklerinin flow sitometrik analizi.

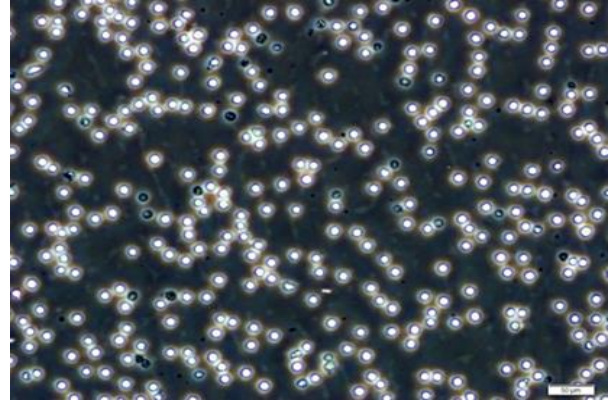
Antikor/Belirteç Adı	iAS-MKH'lerin % Değeri
CD29	% 96.64
CD54	% 99.89
CD90	% 86.29
MHC I	% 74.88
CD45	% 0.94
RT1B	% 4.56
MHC II	% 0.74
CD3	% 90.31

Çözülen iAS-MKH'lerin invert mikroskopta yapılan günlük morfolojik incelemelerinde, MKH hücrelerine özgü fibroblastik ya da yıldızsı şekilli hücrelerin büyük ve eksantrik yerleşimli bir nükleusa sahip olduğu izlendi (Şekil 1).

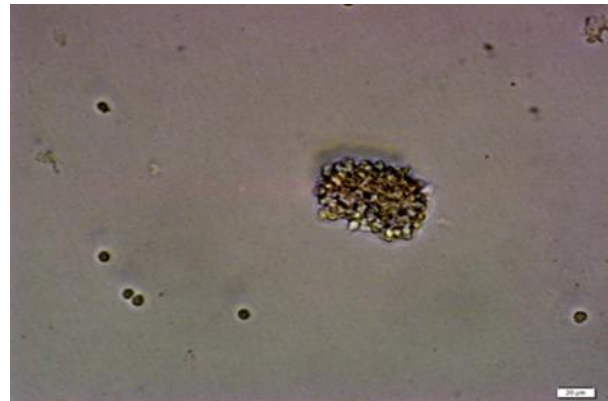


Şekil 1. Kültürdeki iAS-MKH'lerin morfolojik görünüşleri. a- Pasaj (P) 0, 3.gün. b-iAS-MKH'ler P0, 4.günde geniş, yassılaştırmış veya fibroblast-benzeri morfoloji gösteriyordu. c- iAS-MKH'ler P0, 7.günde %70 konfluensi gösteriyordu. iAS-MKH'lerin fibroblastik, iğsi ve uzantılı yapıları belirgin olarak görülmektedir. Skala bar: 100µm.

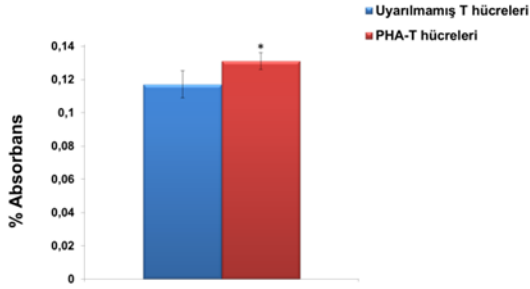
Ko-kültür çalışmaları öncesinde, insan periferik kanından negatif immunomagnetik separasyon tekniği ile izole edilen uyarılmamış T hücreleriyle (Şekil 2), PHA ile uyarılan T hücrelerinin (Şekil 3), karşılaştırmalı olarak WST-1 testi ile absorbans değerleri analiz edildiğinde; canlılık ve proliferasyonlarında artış ($p > 0.05$) olduğu gözlemlendi (Şekil 4) (Deney 3 kez tekrarlandı).



Şekil 2. İnsan periferik kanından negatif immunomagnetik separasyon tekniği ile izole edilen uyarılmamış T hücrelerinin ko-kültür öncesi invert mikroskoptaki görüntüsü. Skala bar: 50 µm.

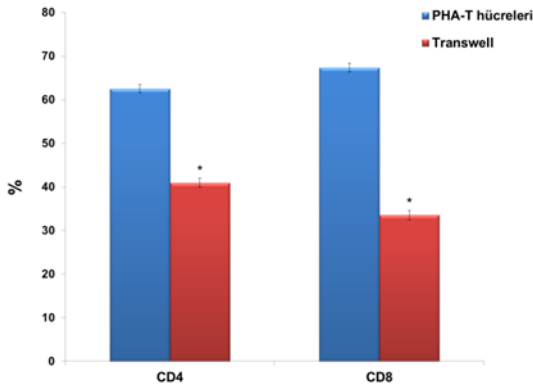


Şekil 3. Ko-kültür öncesi hazırlık için insan periferik kanından izole edilip PHA ile 24 saat boyunca uyarılan T hücrelerinin invert mikroskoptaki görüntüsü. Uyarılma sonrası sferik şekilli koloniler oluşturan T hücrelerinin morfolojilerinin sabit olmadığı, değiştiği ve yapılarında sitoplazmik uzantılar oluştuğu gözlemlendi. Skala bar: 20 µm



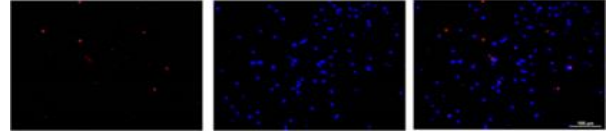
Şekil 4. Ko-kültür öncesinde, T hücrelerinin PHA ile uyarılmasının doğrulanması için WST-1 ile canlılık ve proliferasyon analizi. WST-1 analizine göre periferik kandan izole edilen ve PHA ile uyarılan T hücrelerinin, uyarılmamış T hücreleri (kontrol) ile karşılaştırıldığında, canlılık ve proliferasyonlarında artış (* $p>0.05$) tespit edildi (Deney 3 kez tekrarlandı).

Ko-kültür deneyinin sonunda (4. gün) yapılan immunofenotipik analizde; yalnız PHA-T hücreleri (kontrol), transwell kültürdeki PHA-T hücreleri ile karşılaştırıldığında; transwell kültürdeki PHA-T hücrelerinde ekprese olan CD4 ve CD8 % düzeylerinde, direkt kültür yapılan PHA-T hücrelerine göre azalma ($p>0.05$) saptandı (Şekil 5) (Deney 3 kez tekrarlandı).



Şekil 5. Ko-kültür sonrası, iAS-MKH'lerle transwell kültür edilen PHA-T hücrelerinin, 4 gün flow sitometri ile fenotiplerin tanımlanması ve değişimleri. Ko-kültürün 4. gününde iAS-MKH'lerle transwell kültür edilen PHA T-hücrelerinde, yalnız kültür edilenlere göre CD4 ve CD8 ekspresyon seviyeleri belirgin şekilde ($n=3$, ort \pm SD, * $p>0.05$) azaldı. (Deney 3 kez tekrarlandı).

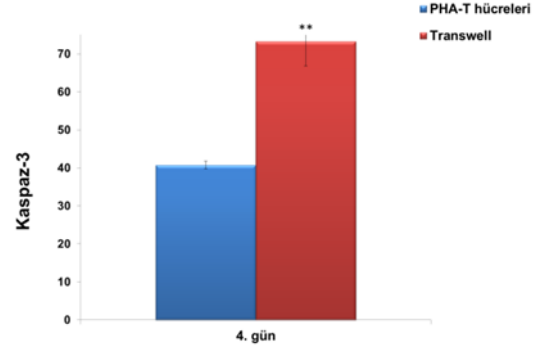
4. günde immunofloresan yöntemle aktif kaspaz-3 (kırmızı) ile boyanan yalnız PHA-T hücrelerinin (kontrol) %40.74'ünde ($p<0.01$) apoptoz tespit edildi. 4. günde immunofloresan yöntemle aktif kaspaz-3 (kırmızı) ile boyanan transwell kültürdeki PHA-T hücrelerinin %73.26'sında ($p<0.01$) apoptoz tespit edildi. (Şekil 6, 7 ve 8).



Şekil-6. Ko-kültür sonrası, aktif kaspaz-3 ile işaretlenen yalnız PHA-T hücrelerinin apoptotik analizi. Ko-kültürün 4. gününde aktif kaspaz-3 (kırmızı) ile immunofloresan işaretlenen yalnız PHA-T hücrelerinin (kontrol) %40.74'ünde apoptoz tespit edildi. Çekirdekler, DAPI ile işaretlendi (mavi). Skala bar: 100 μ m.

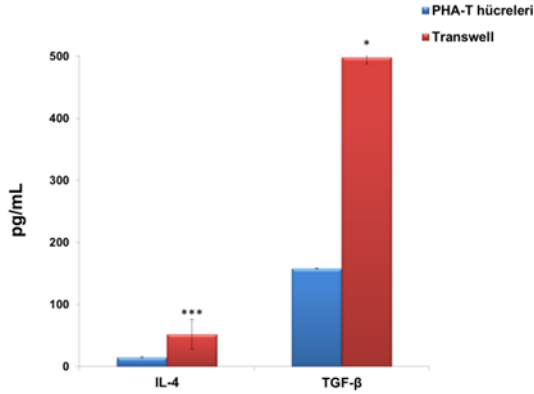


Şekil 7. Ko-kültür sonrası, aktif kaspaz-3 ile işaretlenen iAS-MKH'lerle transwells kültürü yapılan PHA-T hücrelerinin apoptotik analizi. Ko-kültürün 4. gününde aktif kaspaz-3 (kırmızı) ile immunofloresan işaretlenen iAS-MKH'lerle transwell kültür edilen PHA-T hücrelerinin ise %73.26'sında apoptoz tespit edildi. Çekirdekler, DAPI ile işaretlendi (mavi). Skala bar: 100 μ m.



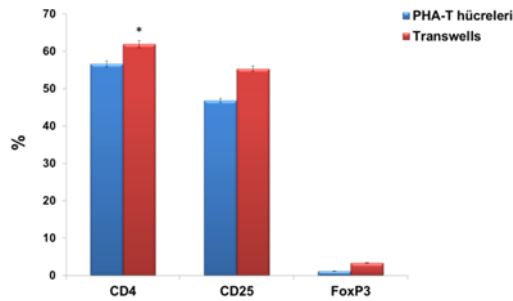
Şekil 8. Ko-kültür sonrası, aktif kaspaz-3 ile işaretlenen iAS-MKH'lerle transwells kültürü edilen ve edilmeyen (kontrol) PHA-T hücrelerinin apoptozunun karşılaştırılması. Ko-kültürün 4. gününde transwells kültür edilen PHA-T hücrelerinde apoptoz, yalnız kültür edilenlere (kontrol) göre belirgin bir şekilde indüklendi ($n=3$, ort \pm SD, ** $p<0.01$).

Yalnız PHA-T (kontrol) ve transwell kültür PHA-T hücrelerinin IL-4 ve TGF- β ekspresyon seviyeleri 4. günde kantitatif olarak ELISA yöntemiyle ölçüldü. Yalnız PHA-T hücreleri IL-4 ve TGF- β sitokin düzeyleri bakımından kıyaslandığında; yalnız PHA-T hücrelerindeki IL-4 ($p<0.001$) ve TGF- β ($p>0.05$) seviyeleri transwell kültürdeki PHA-T hücrelerine göre artış gösterdi (Şekil 9). (Deney 3 kez tekrarlandı).



Şekil 9. Ko-kültür sonrası, yalnız PHA-T hücreleri (kontrol) ile iAS-MKH'lerle transwell kültür edilen PHA-T hücrelerinin süpernatant besiyerlerinde ELISA analizi ile sitokin değişikliklerinin karşılaştırılması. Ko-kültürün 4. gününde transwells kültür edilen PHA-T hücrelerinde anti-inflamatuvar sitokinler olan IL-4 (***) ve TGF-β (*p>0.05) salgısı, yalnız (kontrol) kültür edilenlere göre belirgin şekilde arttı (n=3, ort ± SD, ***p<0.001, *p>0.05). (Deney 3 kez tekrarlandı).

PHA ile uyarılmış ve transwell kültürdeki T hücreleri, flow sitometrik aktivasyon belirteçleri ile analiz edildi. 4. günde yalnız PHA-T hücreleri (kontrol) ile karşılaştırdığımızda; yalnız PHA-T (kontrol) ve transwell kültürdeki PHA-T hücrelerinin Treg hücre (CD4+CD25+FoxP3) % ekspresyon düzeylerinde artış (p>0.05) olduğu saptandı (Şekil 10). (Deney 3 kez tekrarlandı).



Şekil 10. Ko-kültür sonrası yalnız PHA-T hücreleri (kontrol) ile iAS-MKH'lerle transwell kültür edilen T hücrelerinin flow sitometri ile Treg hücre farklılaşma (CD4+CD25+FoxP3) analizi. Ko-kültürün 4. gününde transwell kültürdeki T hücrelerinin Treg belirteç (CD4+CD25+FoxP3) ekspresyonu, yalnız PHA-T hücrelerine göre belirgin derecede artmıştı (n=3, ort ± SD, *p>0.05). (Deney 3 kez tekrarlandı).

4. Tartışma ve Sonuç

Günümüzde kök hücreler, birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle insan kemik iliği kaynaklı hematopoetik kök hücreler, yıllardır hematolojik malignensilerin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak kemik iliği az miktarda ve invazif yolla elde edilebildiği için alternatif kök hücre kaynaklarının bulunması zorunludur. Doğum sonrası elde edilen insan amniyotik sıvısı, elde edilmesi

sırasında invazif bir girişim gerekmemesi, zaten doğumdan sonra atılacak bir kaynaktan elde edilmesi ve zengin bir kök hücre kaynağı olması ile dikkat çeken amniyon sıvısı kaynaklı MKH'lerin, sınıflandırılması ve terapötik amaçlı kullanılabilmesi için biyolojilerinin daha fazla araştırılması gerekmektedir. Son yıllarda, iAS-MKH'lerin (stromal) gelişimsel plastisitesi ve terapötik potansiyeline olan ilgi büyük oranda artmıştır. Kök hücre kaynağı olarak amniyon sıvısının önemi; bol miktarda, pratik ve otolog hücre replasmanı yapılabilmesi açısından çekici bir donör doku kaynağı olmasıdır. Çeşitli çalışmalarla, amniyon sıvısındaki MKH'lerin, in vivo ve in vitro multipotent/pluripotent gelişimsel bir plastisite gösterdiği belirlenmiştir. Uygun kültür koşulları sağlanarak MKH'lerin osteoblast, adiposit ve kondrositlere farklılaşmak üzere indüklenebildikleri pek çok araştırma ile ortaya koyulmuştur. Amniyotik sıvı, MKH'lerin yanı sıra gelişen fetustan köken alan çeşitli tipte hücreler içermektedir [1,2]. Bu heterojen populasyon içinde adipoz, kas, kemik ve nöronal yönde farklılaşmış hücreler yer almaktadır [3,4,11,12]. Morfolojik olarak, MKH'ler farklılaşmamış dönemlerinde iğsi şekilli ve fibroblastlara benzer özellik sergilemektedir. Grzesiak ve ark.'nın (2011) yaptığı çalışmada koyun adipoz kökenli MKH'lerin, izolasyondan bir gün sonra yuvarlak, eksantrik nükleuslu ve düşük nükleus:sitoplazma oranına sahip olduğu gösterilmiştir [8].

İlk kez Fridenshtein tarafından kemik iliğinden izole edilen, kemik ve adipoz hücrelerine farklılaşan ve fibroblastlara benzer hücreler olarak tanımlanan MKH'lerin, minimum karakteristik özelliklerinin kemik, adiposit, hepatosit, kıkırdak, sinir, kas hücrelerine farklılaşabilen, multipotent özellikte ve hematopoietik olmayan hücreler olduğu rapor edilmiştir [1]. Fenotipik olarak MKH'ler CD29, CD73 (SH3/SH4), CD44, CD90, CD105, CD166 belirteçlerini eksprese ettikleri, fakat CD11b, CD14, CD31, CD45 hematopoetik belirteçleri ve HLA-DR'yi eksprese etmedikleri bildirilmiştir [5]. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, erişkin kök hücrelerin proliferasyon ve elde edildiği dokunun farklılaşmış hücrelerini oluşturabilme yeteneğinin, daha önceki düşüncelerin aksine, daha esnek olduğu ve ilişkili olmadığı dokulardaki hücreleri de oluşturabildiği gözlenmiştir [13,14].

Çalışmamızda daha önce karakterizasyon analizleri yapılan ve MKH karakterinde olduğu belirlenen hücreler, dondurma-çözme prosedürünün negatif etkilerini elemine etmek için, canlılık ve proliferasyon, morfolojik ve immunofenotipik açıdan analiz edildi. Yapılan analizler sonucunda çözülen hücrelerin hem yüksek oranda canlılık gösterdiği, hem de morfolojik ve fenotipik özelliklerinin MKH karakterinde olduğu [34] ve bu sonuçların dondurma öncesi analizler ile benzer olduğu belirlendi. Çalışmada kullanılacak ikinci tip hücre olan T hücrelerinin de aynı doğrulama analizleri ile yüksek oranda canlılık ve T hücre karakterinde

oldukları [32,33] ve dondurma öncesi analizleri ile benzerlik gösterdiği belirlendi. Çözülen iAS-MK ve T hücrelerinin dondurma sonrası Toluidin blue ile canlılık analizleri yapıldığında hücrelerin sırasıyla %98.8 ve %97.8 oranlarında canlılık gösterdiği belirlendi. Yapılan immunofenotipik analizlerde iAS-MKH'lerin üçüncü pasajda (P3) CD29 (%96.64), CD54 (%99.89), CD90 (%86.29) ve HLA-A, B, C (MHC class I) (%74.88) açısından pozitif ekspresyon gösterirken; CD45 (%0.94), RT1B (%4.56), HLA-DR, DP, DQ (MHC class II) (%0.74) açısından negatif olduğu; T hücrelerinin ise %90.31 oranında CD3 pozitif olduğu belirlendi. Sonuçta, uyarılmamış T hücreleri (kontrol) ile karşılaştırdığımızda, uyarılmış T hücrelerinde uyarılmaya bağlı olarak proliferasyon artışı tespit edildi. Böylece izole ettiğimiz ve PHA ile uyardığımız T hücrelerinin indirekt ve direkt ko-kültür deneylerimizde kullanılmaya hazır olduğunu belirlemiş olduk.

Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda MKH'lerin, immun sistem hücrelerinden dendritik hücre (DH) maturasyonunu, T hücre, B hücre ve NK hücre fonksiyonunu inhibe etme ve Treg hücrelerini indüklemeye yoluyla, özellikle graft versus host hastalığı (GVHH) başta olmak üzere birçok immun hastalığı önleme/televi etme yeteneği ortaya çıkarılmıştır. Birçok farklı raporda, insan kemik iliği, adipoz doku, Wharton jeli, kordon kanı, plasenta ve amniyon sıvısı kaynaklı MKH'lerin uyarılmış T hücre yanıtını baskıladığı gösterilmiştir [35]. Bu raporlara genel olarak bakarsak farklı deney koşullarına bağlı olarak farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmada iAS-MKH'lerin immunosupresif etkisinden sorumlu hücrel immun yanıtın moleküler mekanizmalarını belirlemek için bir in vitro model kullanarak, iAS-MKH'lerin fitohemaglutinin ile aktive edilmiş T hücrelerinin üzerindeki etkisini; hücre canlılığı, proliferasyon, apoptoz, sitokin düzeyleri ve Treg farklılaşması açısından analiz etmeyi amaçladık.

Elde ettiğimiz olumlu sonuçlara göre; iAS-MKH'lerin fitohemaglutinin ile aktive edilmiş T hücreleri üzerinde immunoreglatuvar etkileri olabileceğini düşündük. Bir çok in vitro ve in vivo çalışmada MKH'lerin immunoreglatuvar etkisini; IFN- γ , IL-2, IL-12 ve TNF- α gibi T helper 1 (Th1) kaynaklı pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimini inhibe ederek IL-4, IL-6, IL-10 ve IL-13 gibi T helper 2 (Th2) kaynaklı anti-inflamatuvar sitokinlerin üretimini ve Treg hücre farklılaşmasını ise indükleyerek gösterdiği bildirilmiştir [36]. Bugün hala MKH'lerin immunoreglatuvar etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olsa da, muhtemelen hem hücre-hücre kontaklı hem de MKH'lerden salınan ve parakrin etkili HLA-G, HGF- β , ICAM-1, IDO, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, PGE2, TGF- β ve VCAM-1 gibi çözünür faktörlerle gerçekleştiği bildirilmiştir. Ayrıca bu faktörlerin T hücre ve NK hücrelerinden salınan IFN- γ , TNF- α , IL-1- α ve IL-1- β gibi sitokinler tarafından uyarılan MKH'lerden salgılandığı belirlenmiştir [37]. Sonuçlarımızda iAS-MKH'lerin

PHA-T hücre regülasyonunda; PHA-T hücreleri ile transwell kültür edilen iAS-MKH'lerindeki IL-4 ve TGF- β sekresyon düzeylerinde artış saptandı. Öte yandan, 4. günde yalnız PHA-T hücre (kontrol) ile karşılaştırdığımızda; transwell kültürdeki PHA-T hücrelerinde IL-4 ($p < 0.001$) ve TGF- β ($p > 0.05$) sitokinlerinin sekresyon düzeylerinin arttığı gözlemlendi. İn vitro çalışmalar antijen sunan hücrelerin aktivasyonu ve maturasyonu üzerinde MKH'lerin inhibitör etkisinin JAK/STAT sinyalleşmesini aktive ederek gerçekleştirebileceğini göstermiştir [38]. Sonuç olarak, daha önce MKH'lerin PHA ile uyarılmış T hücre farklılaşması, proliferasyonu, canlılığı ve sitokin salınımları üzerine supresif etkisi bildirilmiştir [39]. Çalışmamızda iAS-MKH'lerin T hücre supresyonunu; PHA-T hücrelerinden IL-1 α , IL-2, IL-12B, IFN- γ ve TNF- α gibi pro-inflamatuvar sitokin ekspresyonunu inhibe ederek, aynı zamanda T hücre apoptozu, Treg hücre farklılaşması ve IL-4 ve TGF- β ekspresyonunu/sekresyonunu arttırarak sağladığını izledik. Bulgularımıza dayanarak iAS-MKH'lerin gösterdiği bu reglatuvar etkilerin, PHA-T hücreleriyle transwell kültür edildiklerinde, MKH'lerden salgılanan TGF- β 1 ve IL-4 faktörleriyle gerçekleştirilebileceğini düşündük.

İmmun yanıtın dikkatli bir şekilde dengelenmesi; immun efektör hücrelerin gelişimini, göçünü ve fonksiyonunu yönlendiren sitokinlerin hareketleriyle sağlanır. TGF- β , IL-6 veya IL-2'nin varlığına bağlı olarak Th17 veya Treg hücrelerinin farklılaşmasını destekleyebilir. Bu koşulların her biri Th2 hücrelerinin gelişimini baskılar. Aksine, IL-4 Th2 gelişimini teşvik eder ve Th17 veya Treg farklılaşmasını baskılar [40]. Çeşitli araştırmalarda Treg hücrelerinin otoimmün hastalıklara karşı koruyucu özelliğinde oldukları açıklanmıştır [41]. İn vitro çalışmalara göre MKH'lerin Treg hücre ekspresyonlarını/farklılaşmalarını indüklediği MKH/T hücre ko-kültür sistemlerinde bildirilmiştir [42]. Bu çalışmada 4. günde yalnız PHA-T hücreleri (kontrol) ile karşılaştırdığımızda; yalnız PHA-T (kontrol) ve transwell kültürdeki PHA-T hücrelerinin Treg hücre (CD4+CD25+FoxP3) % ekspresyon düzeylerinde artış ($p > 0.05$) olduğu saptandı.

Plumas ve ark. MKH'lerin, PHA ile uyarılan T hücre proliferasyon ve inhibisyonunu apoptozu indükleyerek gerçekleştirdiğini, ancak aynı etkiyi dinlenme halindeki, aktiflenmemiş hücrelerde göstermediğini açıklamıştır. Bu araştırmacılar MKH varlığında aktive T hücrelerinin apoptotik bir mekanizma ile öldüklerini karışık lenfosit reaksiyon sisteminde tespit etmiştir [43]. Bu çalışmada, iAS-MKH'lerin PHA-T hücre apoptozunu önemli oranda indüklediğini ($p < 0.01$) ve ilk 24 saatte gerçekleşen bu apoptozu iAS-MKH'lerin tetiklediğini transwell kültür sisteminde tespit ettik. Hücre-hücre kontakının yanısıra muhtemelen özellikle iAS-MKH'lerden salınan HGF- β 1, TGF- β 1, ICAM-1, VCAM-1, IL-4, IL-6, IL-6R IL-10 ve IL-13 gibi bazı

moleküler sinyallerin ve çözünür faktörlerin PHA-T hücre apoptozunda rol oynadığını düşünmekteyiz. Deneylemiz sonucunu olarak, iAS-MKH'lerin PHA ile uyarılmış T-hücreleri üzerinde, MKH'lerde olduğu gibi, immunoregulator özellikler gösterdiğini tespit ettik. Dolayısıyla gelecekte amniyon sıvısı kaynaklı kök hücrelerin, başta GVHH tedavisi olmak üzere tüm otoimmün ve/veya alloimmünite hastalarının tedavisinde, rejeneratif tıpta, doku/organ mühendisliğinde ve kemik iliği engraftmanlarında alternatif bir kaynak olabileceğini düşünmekteyiz. MKH karakteristiğinde olmaları ve bunun sonucu olarak immunoregulator olmaları, immün hasarın supresyonu ve modülasyonunda önemli aktörler olabilecekleri düşüncemizi desteklemektedir. Ancak bu çok geniş kapsamlı çalışmamızın yeni yapılacak ilave analizler içeren çalışmalarla desteklenmesi ve in vitro koşullarda gerçekleştirdiğimiz çalışmamızın in vivo hayvan deney modellerinin yapılması gerektiği düşüncesindeyiz.

5. Teşekkürler

Bu çalışma, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyonunun projesi (Proje No: 2018-46D16 ve 2015-821, 201541E01) ile desteklenmiştir. Mükemmel teknik yardımları için Bahar Demir Cevizlidere ve Merve Nur Soykan'a teşekkür ediyoruz.

6. Kaynaklar

1. Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Experimental Hematology*. 2005;33(11):1402-16.
2. Burrow KL, Hoyland JA, Richardson SM. Human adipose-derived stem cells exhibit enhanced proliferative capacity and retain multipotency longer than donor-matched bone marrow mesenchymal stem cells during expansion in vitro. *Stem Cells International*. 2017.
3. Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005;328(1):258-64.
4. Cao Y, Sun Z, Liao L, Meng Y, Han Q, Zhao RC. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005;332(2):370-9.
5. Caplan, AI. Mesenchymal stem cells: Time to change the name!. *Stem Cells Translational Medicine*, 2017; (6.6): 1445-1451
6. Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*. 2003;101(9):3722-9.
7. Nasef A, Mathieu N, Chapel A, Frick J, François S, Mazurier C, et al. Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: involvement of HLA-G. *Transplantation*. 2007;84(2):231-7.
8. Grzesiak, J., Krzysztof, M., Karol, W., & Joanna, C.). Isolation and morphological characterisation of ovine adipose-derived mesenchymal stem cells in culture. *International Journal of Stem Cells*. 2011;4(2): 99.
9. Suva D, Passweg J, Arnaudeau S, Hoffmeyer P, Kindler V. In vitro activated human T lymphocytes very efficiently attach to allogenic multipotent mesenchymal stromal cells and transmigrate under them. *Journal of Cellular Physiology*. 2008;214(3):588-94.
10. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental Hematology*. 2002;30(1):42-8.
11. Garcia-Olmo D, Garcia-Arnan M, Herreros D, Pascual I, Peiro C, Rodriguez-Montes JA. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Diseases of The Colon & Rectum*. 2005;48(7):1416-23.
12. Peterson B, Zhang J, Iglesias R, Kabo M, Hedrick M, Benhaim P, et al. Healing of critically sized femoral defects, using genetically modified mesenchymal stem cells from human adipose tissue. *Tissue Engineering*. 2005;11(1-2):120-.
13. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *Journal of Cellular Biochemistry*. 1997;64(2):295-312.
14. Rosenblatt JD, Lunt AI, Parry DJ, Partridge TA. Culturing satellite cells from living single muscle fiber explants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*. 1995;31(10):773-9.
15. Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *The Journal of Clinical Investigation*. 2002;109(10):1291-302.
16. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *Journal of Neuroscience Research*. 2000;61(4):364-70.
17. Perrier AL, Tabar V, Barberi T, Rubio ME, Bruses J, Topf N, et al. Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004;101(34):12543-8.
18. Prusa A-R, Hengstschlager M. Amniotic fluid cells and human stem cell research: a new connection. *Medical Science Monitor*. 2002;8(11):RA253-RA7.
19. Bossolasco P, Montemurro T, Cova L, Zangrossi S, Calzarossa C, Buiatoti S, et al. Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid cells and their differentiation potential. *Cell Research*. 2006;16(4):329.
20. Kim J, Lee Y, Kim H, Hwang K, Kwon H, Kim S-K, et al. Human amniotic fluid-derived stem cells have characteristics of multipotent stem cells. *Cell Proliferation*. 2007;40(1):75-90.
21. Holden C, Vogel G. Plasticity: time for a reappraisal? *American Association for The Advancement of Science*; 2002.
22. Rice C, Scolding N. Adult stem cells-reprogramming neurological repair? *The Lancet*. 2004;364(9429):193-9.
23. Fauza D. Amniotic fluid and placental stem cells. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2004;18(6):877-91.
24. Hoehn H, Salk D. Morphological and Biochemical Heterogeneity of Amniotic Fluid Cells in Culture. *Methods In Cell Biology*. 26: Elsevier; 1982. p. 11-34.
25. Gosden CM. Amniotic fluid cell types and culture. *British Medical Bulletin*. 1983;39(4):348-54.
26. Masuoka K, Asazuma T, Hattori H, Yoshihara Y, Sato M, Matsumura K, et al. Tissue engineering of articular cartilage with autologous cultured adipose tissue-derived stromal cells using atelocollagen honeycomb-shaped scaffold with a membrane sealing in rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. 2006;79(1):25-34.
27. Kamolz L-P, Kolbus A, Wick N, Mazal P, Eisenbock B, Burjak S, et al. Cultured human epithelium: human umbilical cord blood stem cells differentiate into

- keratinocytes under in vitro conditions. *Burns*. 2006;32(1):16-9.
28. Richardson SM, Walker RV, Parker S, Rhodes NP, Hunt JA, Freemont AJ, et al. Intervertebral disc cell-mediated mesenchymal stem cell differentiation. *Stem Cells*. 2006;24(3):707-16.
 29. Kundu AK, Putnam AJ. Vitronectin and collagen I differentially regulate osteogenesis in mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006;347(1):347-57.
 30. Hattori H, Sato M, Masuoka K, Ishihara M, Kikuchi T, Matsui T, et al. Osteogenic potential of human adipose tissue-derived stromal cells as an alternative stem cell source. *Cells Tissues Organs*. 2004;178(1):2-12.
 31. Zhang X, Mitsuru A, Igura K, Takahashi K, Ichinose S, Yamaguchi S, et al. Mesenchymal progenitor cells derived from chorionic villi of human placenta for cartilage tissue engineering. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006;340(3):944-52.
 32. Sariboyaci, A. E., Demircan, P. C., Gacar, G., Unal, Z. S., Erman, G., & Karaoz, E. (2014). Immunomodulatory properties of pancreatic islet-derived stem cells co-cultured with T cells: Does it contribute to the pathogenesis of type 1 diabetes? *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 122(03), 179-189.
 33. Demircan, P. C., Sariboyaci, A. E., Unal, Z. S., Gacar, G., Subasi, C., & Karaoz, E. (2011). Immunoregulatory effects of human dental pulp-derived stem cells on T cells: comparison of transwell co-culture and mixed lymphocyte reaction systems. *Cytotherapy*, 13(10), 1205-1220.
 34. Sariboyaci AE, Okcu A, Kokturk S, Gacar G, Kasap M, Demircan PÇ, Caliskan E, Ozogul C, Karaoz E. (2009). Isolation, Characterization And Differentiation Potential of Human Amniotic Fluid Derived Multipotent Mesenchymal Stem Cells.. 14th Congress Of The European Hematology Association, Berlin, Germany, *Haematologica-The Hematology Journal*. 94(2), 458-459.
 35. Demircan P, Gacar G, Eker A, Karaöz E. Study on the immuno-suppressive characteristics of human dental pulp derived mesenchymal stem cells on T cells in-vitro: initial study outputs. *Haematologica*. 2010;95:652.
 36. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005;105(4):1815-22.
 37. Ryan J, Barry F, Murphy J, Mahon BP. Interferon- γ does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clinical & Experimental Immunology*. 2007;149(2):353-63.
 38. Bian L, Guo Z-K, Wang H-X, Wang J-S, Wang H, Li Q-F, et al. In vitro and in vivo immunosuppressive characteristics of hepatocyte growth factor-modified murine mesenchymal stem cells. *In vivo*. 2009;23(1):21-7.
 39. Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, Rondelli D, Arpinati M, Chirumbolo G, et al. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation*. 2005;80(6):836-42.
 40. Macey MR, Sturgill JL, Morales JK, Falanga YT, Morales J, Norton SK, Yerram N, Shim H, Fernando J, Gifillan AM, Gomez G, Schwartz L, Oskeritzian C, Spiegel S, Conrad D, JRyan JJ. IL-4 and TGF- β 1 counterbalance one another while regulating mast cell homeostasis. *The Journal of Immunology*. 2010;184(9): 4688-4695.
 41. Asano M, Toda M, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *Journal of Experimental Medicine*. 1996;184(2):387-96.
 42. Maccario R, Podestà M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica*. 2005;90(4):516-25.
 43. Plumas J, Chaperot L, Richard M-J, Molens J-P, Bensa J-C, Favrot M-C. Mesenchymal stem cells induce apoptosis of activated T cells. *Leukemia*. 2005;19(9):1597.

<http://edergi.cbu.edu.tr/ojs/index.php/cbusbed> isimli yazarın CBU-SBED başlıklı eseri bu Creative Commons Alıntı-Gayriticari4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

