



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



PROBİYOTİK BAKTERİLERİN
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER
ÜZERİNDEKİ İMMÜNOMODÜLATÖR
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Gizem YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Mayıs-2021
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PROBİYOTİK BAKTERİLERİN MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER ÜZERİNDEKİ İMMÜNOMODÜLATÖR ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Gizem YILMAZ

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Suray PEHLİVANOĞLU

2021, 68 Sayfa

Jüri

Dr. Öğr. Üyesi Suray PEHLİVANOĞLU
Doç. Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAKÇI
Doç. Dr. Gökhan GÖRGİŞEN

Son yıllarda probiyotik bakteriler insan sağlığı üzerindeki olumlu etkilerinden dolayı araştırmalara konu olmuştur. Genellikle *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinslerindeki probiyotikler, bağırsağın doğal florasında bulunurlar. Probiyotikler konak canlıyı patojenlere karşı koruyarak ve immün sistemini güçlendirerek etki gösterirler. İmmün sistemin regülasyonunu sağlayan etkenlerden biri de kök hücrelerdir. Mezenkimal kök hücreler (MKH), güçlü immünomodülatör ve rejeneratif özelliklere sahip somatik, multipotent stromal hücrelerdir. MKH'ler çoğalma ve farklılaşma kapasiteleri olan çok yönelimli, öncü hücrelerdir. MKH'ler birçok dokudan kolayca izole edilebilirler. Kolay çoğalma, yüksek farklılaşma ve bağışıklık sistemini baskılayıcı özelliklerinden dolayı klinikte bu hücrelere duyulan ilgi her geçen gün artmaktadır. MKH'ler immünoşüpressif özellikleri nedeniyle birçok otoimmün hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır.

Tez projemizde, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ve *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* probiyotik bakterileri ile *Staphylococcus aureus* ve *Enterococcus faecalis* patojen bakterilerin insan mezenkimal kök hücre üzerindeki immünomodülatör etkilerini araştırdık. Bunun için, bakterileri uygun ortamlarda kültüre ederek ekstraselüler faktörlerini içeren supernatantlarını elde ettik. Bu bakteriyel süpernatantları içeren besiyerlerinde insan kemik iliği-derive mezenkimal kök hücrelerin (Kİ-MKH) kültürasyonunu sağladık. Muamele edilen Kİ-MKH'lerin koşullandırılmış besiyerlerini izole ettikten sonra ELISA yöntemi ile Kİ-MKH'lerin ürettiği immünomodülatör faktörler olan TGF- β 1, IL-10, Prostaglandin E-2 (PGE-2) ve ayrıca Netrin-1 ve NGF seviyelerini belirledik. Çalışmamız sonucunda, probiyotik bakterilerin, patojen bakterilerden farklı olarak, bu immünomodülatör faktörlerin üretimini artırdığını ve in vitro mikroçevrelerini düzenlediğini belirledik. Bunun yanı sıra, wound healing deneyi ile probiyotik bakteri ekstraselüler faktörleri Kİ-MKH'lerin migrasyon kabiliyetini azalttığını saptadık.

Sonuç olarak, probiyotik bakteri ekstraselüler faktörlerinin Kİ-MKH'lerin immünomodülatör özelliklerine katkı sağladığını söyleyebiliriz. Elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda, probiyotikler sayesinde MKH'lerin in vitro ortamda terapötik özelliklerinin artırılacağı ve hücre tedaviler açısından yeni stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlayabileceği kanısındayız.

Anahtar Kelimeler: İmmünomodülasyon, Mezenkimal Kök Hücreler, Probiyotik bakteriler.

ABSTRACT

MS THESIS

INVESTIGATION OF THE IMMUNOMODULATORY EFFECTS OF PROBIOTIC BACTERIA ON MESENCHYMAL STEM CELLS

Gizem YILMAZ

**Necmettin Erbakan University Institute of Science and Technology
Department of Molecular Biology and Genetics**

THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

Advisor: Asst. Prof. Dr. Suray PEHLIVANOĞLU

2021, 68 Pages

Jury

**Assist Prof. Suray PEHLIVANOĞLU
Assoc. Prof. Ceyda ÖZFİDAN KONAĞI
Assoc. Prof. Gökhan GÖRGİŞEN**

Recently, probiotic bacteria have been a subject of curiosity because of the positive effects on human health. Generally, probiotic bacteria such as *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* are found in the intestinal flora. Probiotic bacteria act as protecting agents of host-living against pathogens by supporting the immune system. Stem cells are one of the factors that regulate the immune system. Mesenchymal stem cells are somatic, multipotent stromal cells with strong immunomodulator and regenerative properties. Mesenchymal stem cells (MSCs) are multifunctional precursor cells with proliferation and differentiation capability. MSCs can be easily isolated from many tissues. Investigation interest in these cells is increasing due to its easy proliferation, high differentiation and immunosuppressive properties. MSCs have been tested for the therapy of many autoimmune diseases because of their immunosuppressive properties.

In our thesis project, we investigated the immunomodulatory effects of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus paracasei* subsp. of *paracasei* probiotic bacteria and *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* pathogen bacteria on human mesenchymal stem cells. For this, we have obtained bacterial supernatants containing extracellular factors by culturing. We cultured the human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs) in media containing these bacterial supernatants. After obtaining the conditioned media of the treated BM-MSCs, we determined the immunomodulatory factors levels of TGF-1, IL-10, Prostaglandin E-2 (PGE-2) and also Netrin-1 and NGF of BM-MSCs by ELISA method. As a result, we determined that unlike pathogenic bacteria, probiotic bacteria increased the production of these immunomodulatory factors and regulate BM-MSCs microenvironment in vitro. In addition, we found that probiotic bacteria extracellular factors decreased the migration ability of BM-MSCs by wound healing assay.

Eventually, it could be said that probiotic bacterial extracellular factors could contribute to the immunomodulatory properties of BM-MSCs. In line with our findings, we believe that probiotics could increase the therapeutic properties of MSCs in vitro and contribute to the development of new strategies in terms of cellular therapies.

Keywords: Immunomodulation, Mesenchymal Stem Cell, Probiotic

ÖNSÖZ

"Probiyotik Bakterilerin Mezenkimal Kök Hücreler Üzerindeki İmmünomodülatör Etkilerinin Araştırılması " başlıklı tezimin oluşmasında çok değerli fikirleri ve eleştirileriyle kendimi geliştirmemi sağlayan, bilimsel ve akademik olarak birikim ve tecrübelerini benimle paylaşan, bana yol gösteren saygıdeğer danışman hocam Dr. Suray PEHLİVANOĞLU'na teşekkür ederim.

Tez çalışmamda kullandığım probiyotik bakterilerin izolasyonu için Namık Kemal Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik bölümünden Dr. Öğr. Üyesi Nazan Tokatlı Demirok'a, mezenkimal kök hücrelerin teminatı için de Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden Prof. Dr. Duygu Uçkan Çetinkaya'ya çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmalarım boyunca en yoğun günlerimde desteğiyle motivasyonumu yüksek tutmamı sağlayan Nazife Nur ERDOĞMUŞ'a, bana her anlamda destek olan laboratuvar çalışma arkadaşım Feyza KOSTAK ve Fatma Nur ÇOBAN'a teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, bugüne gelmemde verdikleri tüm emekler için annem Ayşe YILMAZ ve babam Ferhat YILMAZ'a, her zaman daha başarılı olmamı isteyen abim Mesut YILMAZ ve ablam Seda YILMAZ'a çok teşekkür ederim.

Son olarak, hayatım boyunca her zaman desteklerini yanımda hissettiğim Recep DEMİR'e sabır ve anlayışı için sonsuz teşekkür ederim.

Gizem YILMAZ
KONYA-2021

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Probiyotik Bakteriler.....	1
1.1.1. Probiyotik Bakterilerin İmmünomodülatör Özellikleri	1
1.2.Mezenkimal Kök Hücreler.....	1
1.2.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünomodülatör Özellikleri	2
1.3. Mezenkimal Kök Hücre ve Probiyotik Bakteri Etkileşimi.....	2
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Gastrointestinal Sistem	3
2.1.1.Probiyotik Bakteriler.....	3
2.1.2. Probiyotik Bakterilerin Tarihçesi.....	5
2.1.3.Laktik Asit Bakterileri	6
2.1.4.Probiyotiklerin İmmün Sistem Üzerindeki Etkileri	7
2.1.5.Probiyotik GİS İlişkisi	10
2.2. Mezenkimal Kök Hücreler.....	13
2.2.1.Mezenkimal Kök Hücre Kaynakları	15
2.2.2.Mezenkimal Kök Hücre Nişi	19
2.2.3. Mezenkimal Kök Hücreler ve Güncel Çalışmalar	21
2.2.4.Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünomodülatör Etkileri	23
2.2.5.Mezenkimal Kök Hücrenin Salgıladığı Sitokinler.....	25
2.2.6.Mezenkimal Kök Hücrelerin Hücreyel Tedavideki Rolü	28

2.3. Probiyotik Bakteriler ve Mezenkimal Kök Hücreler	31
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	34
3.1. Hücre Kültürü	34
3.2. Bakterilerin Kültürasyonu.....	34
3.3. İnsan Kemik İliği-Mezenkimal Kök Hücrelerin Bakteri Supernatantı ile Muamelesi ve Koşullandırılmış Besiyerlerinin Elde Edilmesi.....	35
3.4. Enzym-LinkedImmunosorbentAssay (ELISA)	36
3.5. In vitro Wound Healing Deneyi.....	36
3.6. İstatistiksel Analiz.....	37
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	38
4.1. Bulgular	38
4.1.1. Probiyotik Bakterilerin16S rRNA Dizi Analizleri ve BLAST Verileri.....	38
4.1.3. Kİ-MKH'lerin TGF-β1 Üretim Düzeyleri	42
4.1.4. Kİ-MKH'lerin PGE2 Üretim Düzeyleri	42
4.1.5. Kİ-MKH'lerin IL-10 Üretim Düzeyleri.....	43
4.1.6. Kİ-MKH'lerin NGF Üretim Düzeyleri	44
4.1.7. Kİ-MKH'lerin Netrin-1 Üretim Düzeyleri	45
4.1.8. Ekstraselüler ProbiyotikFaktörlerin Kİ-MKH'lerin Hücre Göçü Kabiliyetleri Üzerindeki Etkisi	46
4.2. Tartışma	48
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	55
5.1 Sonuçlar	55
5.2. Öneriler	56
6. KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

TABLolar VE ŐEKİLLER LİSTESİ

- Tablo 2.1.1.** Probiyotik Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar
- Şekil 2.1.4.1.** Probiyotiklerin genel etkileşim mekanizması
- Şekil 1.1.4.2.** Probiyotik ve patojenik bakterilerin TLR'ler ile etkileşime girerek farklı bağışıklık tepkilerinin potansiyel etki mekanizması
- Şekil 2.2.** Mezenkimal kök hücrelerin farklı hücre tiplerine farklılaşabilme kapasitesi
- Şekil 2.2.2.** Mezenkimal kök hücre nişini oluşturan faktörler
- Şekil 2.2.4.** Mezenkimal kök hücrelerin immünomodülatör kabiliyeti ile etkilediği immün sistem hücreleri
- Şekil 2.2.5.** Mezenkimal kök hücrelerin ürettiği immünomodülatör sitokinler ve etki mekanizmaları
- Şekil 2.2.6.1.** Mezenkimal kök hücre temelli tedavilerin faz çalışmalarına göre dağılımı
- Şekil 2.2.6.2.** Mezenkimal kök hücrelerin iskemik bölgede gerçekleştirdiği immünomodülasyon olayları
- Şekil 3.3.1.** Mezenkimal kök hücrelerin bakteri supernatantları ile kültürasyonu
- Şekil 3.3.2.** Kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin 20X mikroskop görüntüsü
- Şekil 4.1.1.1.** *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* 16S rRNA dizi analizi
- Şekil 4.1.1.2.** *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* 16S rRNA BLAST analizi
- Şekil 4.1.1.3.** *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* 16S rRNA dizi analizi
- Şekil 4.1.1.4.** *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* 16S rRNA BLAST analizi

- Şekil 4.1.2.** Bakteri supernatantının dilüsyon oranının MTT testi ile belirlenmesi
- Şekil 4.1.3.** Mezenkimal kök hücrelerin koşullandırılmış besiyerindeki TGF- β 1 seviyesinin kontrole göre değişim grafiği
- Şekil 4.1.4.** Mezenkimal kök hücrelerin koşullandırılmış besiyerindeki TGF- β 1 seviyesinin kontrole göre değişim grafiği
- Şekil 4.1.5.** Mezenkimal kök hücrelerin koşullandırılmış besiyerindeki IL-10 seviyesinin kontrole göre değişim grafiği
- Şekil 4.1.6.** Mezenkimal kök hücrelerin koşullandırılmış besiyerindeki NGF seviyesinin kontrole göre değişim grafiği
- Şekil 4.1.7.** Mezenkimal kök hücrelerin koşullandırılmış besiyerindeki Netrin-1 seviyesinin kontrole göre değişim grafiği
- Şekil 4.1.8.1.** MKH'lerin *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* ve *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* supernatantları ile kültürasyonunda migrasyon kabiliyeti değişimi
- Şekil 4.1.8.2.** MKH'lerin *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* ve *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* ekstraselüler faktörleri ile muamelesi sonrasında hücre göçündeki % değişimi grafiği
- Şekil 4.2.** Mezenkimal kök hücrelerin ürettiği PGE2 ile immün sistem hücreleri üzerindeki etkisi

KISALTMALAR VE SİMGELER

ALS	Amiyotrofik lateral skleroz
APRIL	Proliferasyon indükleyen ligand
BDNF	Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
Breg	B regülatör
CD	Cluster of differentiation
COX2	Siklooksijenaz 2
DC	Dendritik hücre
DC-SIGN	Dendritik hücreye ait DC-ICAM3 yakalayan integrin olmayan
DMEM-LG	Dulbecco's Modified Eagle's Medium Low glukose
DSS	Dekstran sülfat sodyum
FBS	ELISA Enzym-Linked Immunosorbent Assay
GALT	Fetal Bovine Serum
GİS	Gastrointestinal mukoza ve bağırsakla ilişkili lenfoid doku
GVHD	Gastrointestinal sistem
HCELL	Graft versus host hastalığı
HGF	Hematopoietik hücre E-selektin/L-selektin ligandı
HKH	Hepatosit büyüme faktörü
HLA sınıf II	Hematopoietik kök hücre
IBD	İnsan lökosit antijeni sınıf II
IBS	İrritabl bağırsak hastalığı
IDO	İrritabl bağırsak sendromu
IgA	Indolamin 2,3 dioksijenaz
IKK	Immünoglobülin A
IL	İkB Kinaz
ISCT	İnterlökin
	Uluslararası Hücresel Terapi Derneği

iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
Kİ-MKH	Kemik iliği mezenkimal kök hücreleri
LAB	Laktik asit bakterileri
LB	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
LGG	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG
MAMP	Mikroorganizma ile ilişkili moleküler paternler
MAPK	Mitojenle aktifleşen protein kinaz
MHC-II	Major histokompabilite kompleksi-II
MKH	Mezenkimal kök hücreler
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
MRS	De Man, Rogosa, Sharpe
MS	Multipl skleroz
MSC	Mezenkimal stromal hücreler
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
MUC	Müsin
Myd88	Myeloid farklılaşma birincil yanıt 88
NF-κB	Nükleer faktör κB
NGF	Sinir büyüme faktörü
NK	Natural killer
NKG2D	Doğal öldürücü grup 2D
NKp30	Doğal öldürücü protein 30
NLR	Hücre içi Nod benzeri reseptörleri
NLRP3	Nod-like receptor pyrin domain-containing 3
NO	Nitrik oksit
PBS	Phosphate buffered saline
Pen-Strep	Penisilin-Streptomisin
PGE2	Prostaglandin E2
PLA	İşlenmiş lipoaspirat
PRR	Patern tanıma reseptörleri
RA	Romatoidartrit
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
RT-PCR	Real-time polimeraz zincir reaksiyonu
SIgA	Salgı Immünoglobülin A

SLE	Sistemik lupuseritomatozus
ST	<i>Salmonellatyphimurium</i>
TGF- β	Transforme edici büyüme faktörü- β
Th	T yardımcı hücre
TJ	Sıkı bağlantı protein kompleksleri
TLR	Toll benzeri reseptörleri
TNF	Tümör nekroz faktör
Treg	T regülatör hücre
VCAM-1	Vasküler hücre adezyon molekülü 1
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
WJ	Wharton Jeli
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
κ	Kappa

1. GİRİŞ

1.1. Probiyotik Bakteriler

Probiyotik bakteriler yeterli miktarda alındığında konakçı canlının sağlığına ve gastrointestinal sistemine katkıda bulunan mikroorganizmalardır. Probiyotikler konakçı canlıda bağırsak mikroflorasının korunmasını sağlarken aynı zamanda da patojenik mikroorganizmaların büyümesini engeller. Ayrıca antimikrobiyal ajanların ve vitaminlerin sentezini sağlayarak bağışıklık sisteminin uyarılmasını sağlarlar. Gastrointestinal sistemde bağırsağa kadar hayatta kalabildiklerinden dolayı laktik asit bakterileri (LAB) sıklıkla kullanılmaktadır. En yaygın kullanılan probiyotik laktik asit bakteri türleri arasında *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türleri yer almaktadır.

1.1.1. Probiyotik Bakterilerin İmmünomodülatör Özellikleri

Probiyotik bakteriler mikrobiyotanın bir parçası olarak bağırsak homeostazına katkıda bulunmaktadır. Bağırsak homeostazı bakterilerin ürettiği mikroorganizma ilişkili moleküler patternleri tanıyan pattern tanıma reseptörleri aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bu reseptörlere mikroorganizma ilişkili bir ligand bağlandığında bazı hücre içi sinyal yollarının aktive olmasıyla pro-enflamatuar faktörlerin ifadesi olur. Probiyotik bakteriler bu hücre içi sinyal yolağına müdahale ederek pro-enflamatuar sitokin salınımını engeller ve bağırsak homeostazına katkıda bulunurlar. Birçok probiyotik suş bağırsaktaki konakçı mukozal immün sistemini hücrel sinyal yollarını salgıladığı immünomodülatörler ile indükleyebilmektedir. Ayrıca probiyotik bakteriler salgıladığı immünomodülatör sitokinler ile bağırsaktaki dendritik hücre, T yardımcı hücreler ve makrofajlar gibi immün sistem hücrelerinin proliferasyonunu ve polarizasyonunu etkilemektedir.

1.2. Mezenkimal Kök Hücreler

1974'de Alexander Friedenstein tarafından ilk kez izole edilen mezenkimal kök hücreler (MKH) adipojenik, osteojenik ve kondrojenik gibi birçok hücre tipine farklılaşabilme ve kendini yenileyebilme özelliğine sahiptir. Bu eşsiz özelliklerinden dolayı rejeneratif tıp uygulamalarında ilgi odağı olmuştur. Mezenkimal kök hücreler immün sistemi düzenleyebilme ve hasarlı bölgeye göç edebilme özelliklerine sahiptir. Mezenkimal kök hücreler yağ dokusu, diş pulpası, kemik iliği ve amniyotik sıvı gibi birçok dokudan elde edilebilmektedir. Mezenkimal kök hücreler bu özelliklerinden

dolayı son yıllarda immün sistem hastalıklarında, doku hasarı tedavisinde ve rejenerasyonunda, hücresele tedavide önemli rol oynamaktadır.

1.2.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünomodülatör Özellikleri

Mezenkimal kök hücreler, insan lökosit antijeni sınıf II (HLA sınıf II) içermediğinden dolayı düşük immünojeniteye sahiptir. Hem doğuştan hem de adaptif immün sistemde baskılayıcı etkiler gösterir. Mezenkimal kök hücreler salgıladığı immünomodülatör sitokinler ile immün sistem hücrelerinin aktivasyonunu ve proliferasyonunu baskılamaktadır. MKH'ler özellikle TGF β ve PGE2 aracılığıyla direkt temas ederek NK hücrelerini baskılamak bu inhibitör etkilere IL-10, IDO HLA-G5 gibi çözünür faktörler de aracılık etmektedir. MKH'lerin B hücre proliferasyonunu ve immünglobülin (IgM, IgG, IgA) üretimini inhibe ettiği de gösterilmiştir. Mezenkimal kök hücreler çeşitli immün sistem hücreleri ile etkileşime girerek bağışıklık sistemini düzenlemektedir.

1.3. Mezenkimal Kök Hücre ve Probiyotik Bakteri Etkileşimi

Gastrointestinal sistemdeki bakterilerle mezenkimal kök hücrelerin ilişkili olduğu düşünülerek birçok çalışma yapılmıştır. Mezenkimal kök hücreler ile mikrobiyal canlıların etkileşimi incelenerek MKH'ler üzerindeki morfolojik ve fizyolojik değişimler, immünomodülasyon özelliğindeki farklılıklar incelenmiştir. Yapılan çalışmalarda probiyotik bakterilerin, mezenkimal kök hücrelerin immünomodülasyonuna katkıda bulunduğu ve bazı immün sistem bozukluğu hastalıklarında terapötik özelliğini artırdığı bulunmuştur. Ayrıca mezenkimal kök hücrelerin hasarlı dokuda iyileşmeyi sağlamasına katkıda bulunmuştur.

Biz de bu literatür bilgilerine dayanarak probiyotik bakterilerin çözünür faktörlerinin mezenkimal kök hücreler üzerindeki etkisini araştırdık. Mezenkimal kök hücrelerin immün baskılayıcı faktör salınımını nasıl değiştirdiğini gözlemledik. Sonuçlarımıza göre mezenkimal kök hücrelerin immünomodülatör özelliğini probiyotik bakteri supernatantları ile düzenleyerek MKH temelli yeni bir tedavi yaklaşımı olabileceğini düşünmekteyiz.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Gastrointestinal Sistem

Memelilerin gastrointestinal sistemleri (GİS), bağırsak mikrobiyotası olarak bilinen çok sayıda canlıya ev sahipliği yapar. Bakteriler, arkeler, mantarlar ve virüsler özellikle epitelyal ve bağışıklık hücreleri ile birlikte yaşar ve karşılıklı etkileşim içerisindedir (Sánchez ve ark., 2017). Mikrobiyal antijenlere ve patojenik bakterilere karşı savunmada intestinal epitelyal hücrelerinin katkıları kayda değerdir. Memeli bağırsağında, konakçı epitel hücreleri ile yakından ilişkisi olan karmaşık ve çeşitli bir mikrobiyal topluluk yaşar. Gastrointestinal sistemin mikrobiyal kolonizasyonu, farklı habitatlar ve ekolojik koşullar tarafından belirlenir (Blum ve ark., 2003). İnsan bağırsak mikrobiyotasının bir kısmında bugüne kadar 1500 farklı canlı türü tanımlanmıştır. Toplamda bakıldığında ise bağırsak mikrobiyotasının, 10^{13} - 10^{14} mikrobiyal hücre içerdiği ve kendi ökaryotik hücrelerimizden 10 kat daha fazla hücre bulundurduğu öngörülmüştür. Bugün bağırsak mikrobiyota bileşimi ve aktivitesinin karakterizasyonu, mikrobiyoloji, immünoloji ve sağlık alanlarında çalışan bilim insanları için araştırma konusu olmuştur ve bu araştırmalar genellikle probiyotik bakteriler ile bağlantılıdır (Sánchez ve ark., 2017).

2.1.1. Probiyotik Bakteriler

Günümüzde birçok bakteri ve mantar türü insan sağlığı açısından faydalı mikroorganizmalar olarak değerlendirilmektedir. *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türleri gibi probiyotik bakteriler insan sağlığı açısından önemli role sahiptir. Bu mikroorganizmalar yeterli miktarda alındıklarında konakçı canlının sağlığına ve gastrointestinal sistemine olumlu yönde katkıda bulunurlar (Yousefi ve ark., 2019).

Probiyotik kelimesi Yunancada "yaşam için" anlamına gelmektedir ve konakçı canlıya yeterli miktarda verildiğinde yarar sağlayan canlılar olarak tanımlanmıştır (Ashraf ve ark., 2014). Probiyotikler, konakçı canlıda patojenik büyümenin inhibisyonunu, bağırsak mikroflorasının korunmasını, bağışıklık sisteminin uyarılmasını, vitaminlerin ve antimikrobiyal ajanların sentezini sağlayan mikroorganizmalardır. Belirli probiyotik canlıların konakçıya sağladığı yararlar kanıtlanmıştır. Probiyotik terimi sadece bakteriler değil mayaların da dahil olduğu birçok mikroorganizmayı içerir. Günümüzde probiyotik üretiminde gıda, yem ve gıda katkı maddelerine birçok faydalı mikroorganizma eklenmektedir (Tablo 1) (Lee, 1995;

Uymaz, 2010).Gastrointestinal sistemde bağırsaklara kadar hayatta kalabildiklerinden ve konakçıya yarar sağladıklarından dolayı laktik asit bakterileri (LAB), laktik asit olmayan bakteriler ve mayalar probiyotik olarak kabul edilmektedirler (Chavarri ve ark., 2012).

Probiyotik bakterilerin sağlığa katkıları mikroorganizma türüne ve suşuna özgü olarak değişebilir. Bu yüzden tüm faydaları sağlayan evrensel bir tür yoktur. Ancak, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *S. cerevisiae* Boulardii, *L. casei* Shirota, *L. acidophilus* ve *Bifidobacterium animalis* Bb-12 türleri, insan sağlığı etkin verilerine göre en fazla çalışılan probiyotiklerdir (Ashraf ve ark., 2014).

Tablo 2.1.1. Probiyotik Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar (Uymaz, 2010)

<i>Lactobacillus</i> türleri	<i>Lactobacillus cellobiosus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus johnsonii</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus salivarius</i> , <i>Lactobacillus gasseri</i>
<i>Bifidobacterium</i> türleri	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium thermophilum</i>
<i>Bacillus</i> türleri	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus lentus</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus coagulans</i>
<i>Pediococcus</i> türleri	<i>Pediococcus cerevisiae</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Streptococcus</i> türleri	<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> , <i>Streptococcus intermedius</i>
<i>Bacteriodes</i> türleri	<i>Bacteriodes capillus</i> , <i>Bacteriodes suis</i> , <i>Bacteriodes ruminicola</i> , <i>Bacteriodes amylophilus</i>
<i>Propionibacterium</i> türleri	<i>Propionibacterium shermanii</i> , <i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>Leuconostoc</i> türleri	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i>
Küfler	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus oryzae</i>
Mayalar	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida torulopsis</i>

Probiyotiklerin insan sağlığı üzerindeki etki mekanizmaları henüz tam olarak açıklanmamıştır. Fakat insan vücuduna yararlı katkıları klinik olarak belirlenmiştir (Sarowska, 2013). Bu etkilerden bazıları;

- Bağırsak mikroflorası üzerinde faydalı etki
- Bağırsak enfeksiyonlarının önlenmesi
- Laktoza karşı artan tolerans

- Bağışıklık sisteminin iyileştirilmesi
- Anti-alerjik etkiler
- Kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi
- Kanserin önlenmesi

Literatüre göre, probiyotikler hücre reseptörlerine veya endotelial hücre yüzeyine tutunabilme özellikleri söz konusudur. Bu sayede patojenik bakterilerin bağırsak epiteline yapışmasını önlerler (Servin, 2004), ayrıca antimikrobiyal bileşenler üretirler (Review, 2001), lenfosit aktivasyonu ve fagositozun uyarılmasını sağlarlar, IgA antikor ve sitokinlerin üretilmesi ile hücresel bağışıklığın düzenlenmesine katkıda bulunurlar (Wold, 2001). Probiyotik tüketiminin, ishal, antibiyotikle ilişkili ishal, *Helicobacter pylori* enfeksiyonları, enflamatuar bağırsak hastalıklarının yanında kanser ve jinekolojik ürogenital enfeksiyonları gibi klinik durumların iyileşmesine de katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Angmo ve ark., 2016).

2.1.2. Probiyotik Bakterilerin Tarihçesi

Probiyotik kelimesi Alman bilim adamı Werner Kollath tarafından 1953'te “yaşamın sağlıklı gelişimi için gerekli olan aktif maddeleri” belirtmek için kullanılmıştır (Gasbarrini ve ark., 2016). “Probiyotik” terimi ilk olarak 1965 yılında Lilly ve Stillwell tarafından bir organizmanın salgılanmasını, diğerinin büyümesini uyaran maddeleri tanımlamak için kullanılmıştır (Gupta, 2009). Daha spesifik olarak Fuller 1992'de probiyotikleri “konakçı hayvana, bağırsak mikrobiyal dengesini geliştirerek yararlı etki sağlayan canlı mikrobiyal besin takviyesi” olarak tanımlamıştır.

Modern probiyotik tarihi 1900'lü yılların başında, Paris'teki Pasteur Enstitüsü'nde çalışan bir Rus bilim adamı olan Nobel ödüllü Elie Metchnikoff'un öncü çalışmalarıyla başlamıştır. Louis Pasteur fermantasyon sürecinden sorumlu mikroorganizmaları tanımlarken, Metchnikoff öncelikle bu mikroorganizmaların insan sağlığı üzerindeki olası etkilerini keşfetmeye çalışmıştır. İlk olarak Bulgar kırsal kesimin uzun ömürlü olmasını, düzenli olarak günlük fermente yoğurt tüketimi ile ilişkilendirmiştir. Bunu 27 yaşındaki Bulgar doktor Stamen Grigorov'un keşfettiği Bulgar basiline bağlamıştır. Daha sonra laktobasilin, hastalığa ve yaşlanmaya katkıda bulunan gastrointestinal metabolizmanın çürütücü etkilerine karşı koyabileceğini öne sürmüştür. Metchnikoff ayrıca toksinlerin kalın bağırsaktaki bakteriyel çürümeden

kaynaklandığını iddia etti ve bağırsak mikroplarının gıdaya bağlı olarak vücudumuzdaki florayı değiştirebileceğini ve zararlı mikroorganizmaların yararlı olanlar ile değiştirilebileceğinin mümkün olduğunu belirtmiştir. Bu cümle açık bir şekilde "probiyotik kavramı"nı tanımlar. Metchnikoff'un bilimsel hipotezi, *Bacillus bulgaricus* probiyotik bakterisinden elde edilen fermente süt kullanımı sayesinde, Avrupa'da birincisi olan Fransa'daki süt endüstrisinin ortaya çıkmasını ve gelişimini desteklemiştir. 2013 yılında uzmanlar tarafından fikir birliği ile probiyotik terimi "yeterli miktarlarda uygulandığında konakçı canlıya sağlık yardımı sağlayan canlı mikroorganizmalar" olarak tanımlanmıştır. Yayınlanan belgeye göre fermente süttten yapılan yoğurt ve diğer gıdalar ilk fonksiyonel gıdalar olarak kabul edilmiştir (Gasbarrini ve ark., 2016).

Günümüzde özellikle laktik asit bakterileri olmak üzere probiyotikler, gastrointestinal sistem hastalıkları ve otoimmün bozuklukların tedavisinde büyük öneme sahiptir (Sarowska, 2013).

2.1.3.Laktik Asit Bakterileri

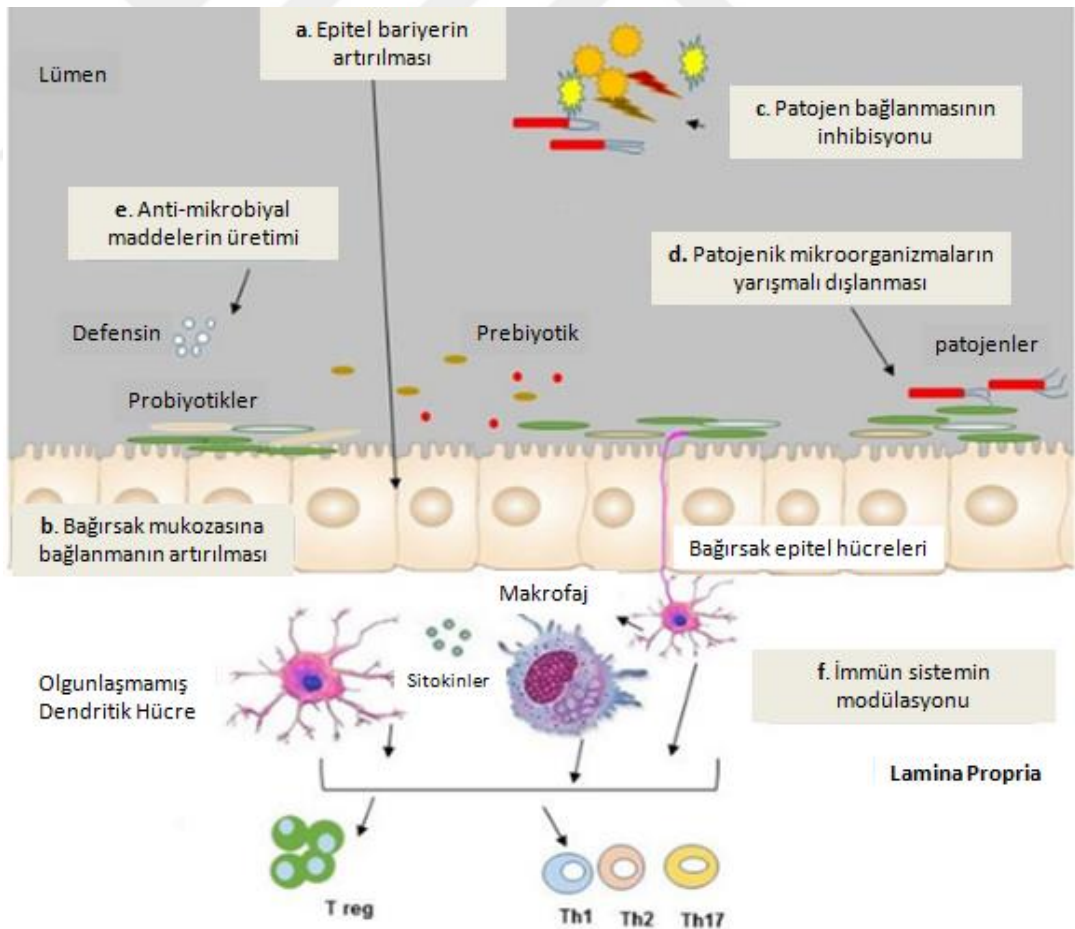
19. yüzyılın sonlarına doğru laktik asit bakterilerine olan ilgi artmıştır (J., 2015). Laktik asit bakterileri (LAB), karbonhidrat fermentasyonunun ana son ürünü olarak laktik asit üreten Gram-pozitif bakterilerin bir grubunu oluşturur (Seddik ve ark., 2017). Probiyotik olarak genellikle *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* laktik asit bakterileri suşları kullanılmaktadır (Campana ve ark., 2017). İki yüz yirmiden fazla tanımlanan türüyle *Lactobacillus* cinsi ana ve en çeşitli LAB grubudur (Seddik ve ark., 2017). İlk olarak Laktik asit bakterileri gastrointestinal sistemin ihtiyaç duyduğu mikroorganizmalardır ve bu yüzden güvenli olarak bilinirler. İkinci olarak da gıdaların korunmasında önemli rol oynarlar ve laktik asit, asetik asit, hidrojen peroksit, bakteriyosin, diasetil ve karbondioksit üretimi ile gıdaların bozulmasına sebep olan mikroorganizmaları inhibe ederler (Angmo ve ark., 2016). LAB, insan ve hayvanların gastrointestinal sistemindeki mide asidinde ve safra tuzlarında hayatta kalabilmektedir. Ayrıca lizozim enzimine de dirençli oldukları bulunmuştur. Fakat laktik asit bakterilerinin suşlarına göre direnç seviyeleri farklılık göstermektedir (J. ve ark., 2015).

Anne sütü, yenidoğanın bağırsak mikrobiyotasının gelişimi ve hastalıklara karşı savunma mekanizmasının oluşması için yararlı mikroorganizmaları içeren son derece besleyici bir gıdadır. Probiyotik laktik asit bakterileri fizyolojik özellikleri ve anne sütündeki büyüme faktörlerinin mevcudiyetinden dolayı yenidoğanın bağırsağında kolonize olmaktadır(Reis ve ark., 2016).

2.1.4. Probiyotiklerin İmmün Sistem Üzerindeki Etkileri

Bağışıklık sistemi, doğal (spesifik olmayan) ve adaptif (edinilmiş) olmak üzere iki genel gruba ayrılır. Adaptif immün yanıt memelilerde sistemik ve mukozal tipte yanıt verebilir. Buradaki immün yanıt hücre ve molekülleri bakteri, virüs, parazit gibi mikrobiyal patojenlere karşı koruma sağlamak amacıyla birbiri ile etkileşir. Mikrobiyota içermeyen hayvanlarda yapılan in vitro çalışmalar, sağlıklı bir bağırsak mikrobiyotasının, bağırsak regülasyonu ve homeostazında önemli rol oynadığını göstermiştir (Kemgang ve ark., 2014).

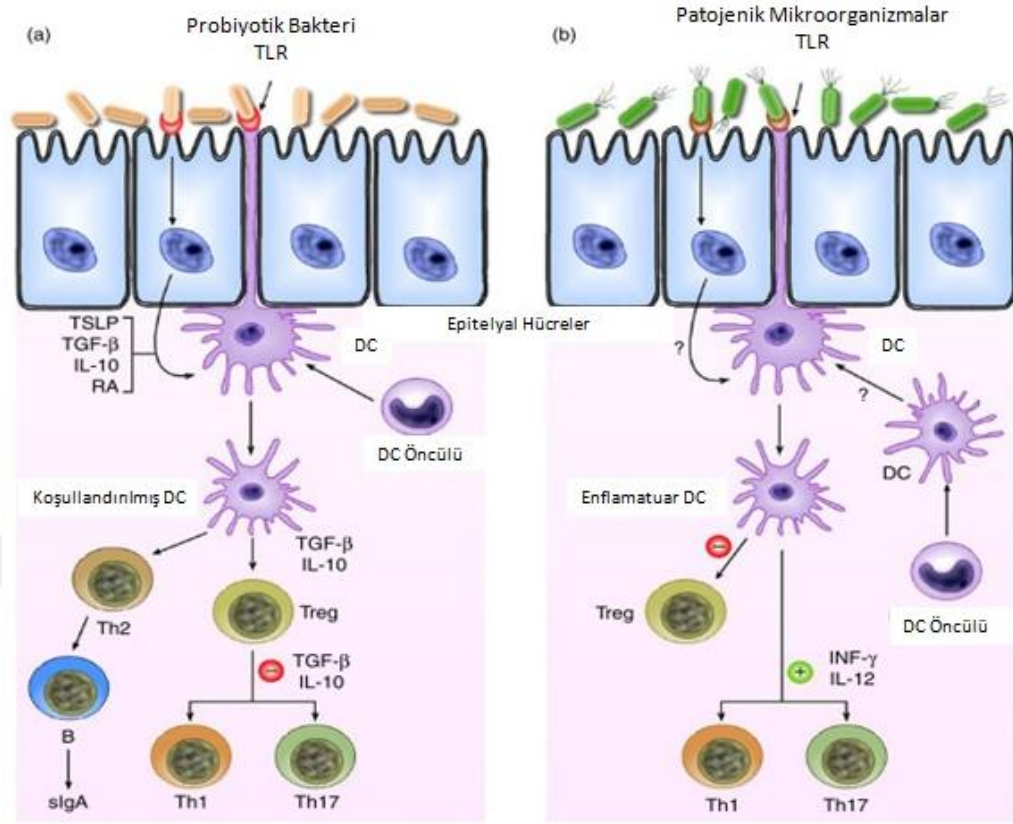
Probiyotik bakterilerin etki mekanizması genel olarak şöyledir; epitel bariyer bütünlüğünü artırır, bağırsak lümenlerindeki patojenler ile rekabet ederek onları ortadan kaldırır, bağırsak mukozasına yerleştiklerinde patojenlerin yapışmasını inhibe ederler, ayrıca dendritik hücre fonksiyonlarını, T hücre polaritesini ve dolayısıyla immün sistemi düzenlerler (Şekil 1)(Yousefi ve ark., 2019).



Şekil 2.1.4.1. Probiyotiklerin genel etkileşim mekanizması (Yousefi, 2019)

Probiyotik bakteriler, mikrobiyotanın bir parçası olarak bağırsak homeostazına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (van Baarlen, 2013). Homeostaz, probiyotikler de dahil olmak üzere mevcut bakterilerden üretilen “mikroorganizma ile ilişkili moleküler paternleri” (MAMP) tanıyan, sitokinlerin ve kemokinlerin üretimini sağlayan “patern tanıma reseptörleri” (PRR) ile düzenlenir. PRR ailesi, Toll benzeri reseptörleri (TLR), hücre içi Nod benzeri reseptörleri (NLR), C tipi lektin reseptörleri gibi reseptörleri içerir (Bron, 2012). Bağırsak mukozasında PRR'ler, antijenlerin giriş bölgelerini koruyan epitel hücre membranlarında ve bu bariyerinin alt tabakasında bulunan makrofaj ve dendritik hücre membranlarında ifade edilmektedir (Blum, 2003). TLR'ler ligand veya adaptör moleküllerin bağlanmasıyla farklı sinyal yollarını aktive ederler ve transkripsiyon faktörlerinin nükleer translokasyonuna yol açarlar. Bu faktörler, pro-enflamatuar ve anti-enflamatuar sitokin ve kemokinlerin regülasyonunu modüle eder (Amdekar, 2011). TLR'lerin hücre dışı bölgeleri lösün tekrarları bakımından zengin motiflerinden oluşan amino-terminal uca sahiptir (Gómez-Llorente, 2010). TLR sinyali MAMP bağlanması ile aktive olur. MAMP bağlanması ile birlikte TLR'ler dimerize olur ve aktifleşerek myeloid farklılaşma birincil yanıt 88 (MyD88) gibi adaptör moleküllerin bağlanmasına sebep olur. MyD88, mitojenle aktifleşen protein kinaz (MAPK) yolağını ve nükleer faktör κ B (NF- κ B) yolağını aktive eder (Jeong, 2016). Uyarıcı koşullar olmadığında NF- κ B sitoplazmada, inhibitör molekülü olan I κ B molekülüne bağlı şekilde bulunmaktadır. Pro-enflamatuar sitokin uyarımı oluştuğunda I κ B molekülü I κ B Kinaz (IKK) tarafından ubiquitinasyon ve proteozomal degradasyon için hedeflenir. I κ B'nin parçalanmasıyla serbest kalan NF- κ B çekirdeğe transloke olur. Hedef promotörlere bağlanır ve pro-enflamatuar genlerin transkripsiyonunu indükler. Bazı probiyotik suşları I κ B'nin bozulmasını önler ve intestinal epitelyal hücrelerden pro-enflamatuar sitokinlerin salınmasını engellemiş olur (Thomas, 2010). Zhang ve arkadaşları yüksek sıcaklık ile inaktive edilmiş *Lactobacillus GG* suşunun I κ B'nin degradasyonunu ve böylece NF- κ B'nin çekirdeğe translokasyonu engelleyerek tümör nekroz faktör (TNF) ile ilişkili IL-8 üretimini azalttığını göstermiştir (Zhang, 2005). TLR ailesi çeşitli patojenlerin farklı moleküler yapıları ile uyarılabilmektedir. Örneğin TLR ailesinden TLR2, Gram-pozitif bakterilerin lipoteikoik asit, lipopeptid, peptidoglikan ve lipoprotein yapılarını tanıyabilmektedir. Çünkü TLR2 formu, TLR1 ve TLR6 ile heterodimerik yapı oluşturmaktadırlar. Özellikle TLR1-TLR6

heterokompleksi *S.aureus*'a karşı spesifik yanıt oluşturmaktadır (Gómez-Llorente, 2010).



Şekil 2.1.4.2. Probiyotik ve patojenik bakterilerin TLR'ler ile etkileşime girerek farklı bağışıklık tepkilerinin potansiyel etki mekanizması (Gómez-Llorente, 2010)

Probiyotiklerin etki mekanizmaları arasında bağırsakta immüoglobülin A (IgA) seviyesinin ve IgA üreten hücrelerin artırılması da yer almaktadır (Ashraf, 2014). Salgılanmış-immüoglobülin A (SIgA) memelilerin bağırsak mukozasında en çok bulunan immüoglobülinidir. SIgA patojenik bakteri ve mikroorganizmalara karşı spesifik immün cevaba katkıda bulunur. Probiyotiklerin ve patojenik olmayan bakterilerin suşa bağlı olmak koşuluyla SIgA üretimini tetiklediği ve böylece immün sistemi modüle ettiği belirtilmiştir (Corthésy, 2007). B hücreleri bağırsağın lamina proprialarında plazma hücrelerine farklılaşır ve dimerik IgA salgılar. Salgılanan IgA bağırsak epitel yüzeyindeki polimerik Immüoglobülin reseptörüne bağlanır ve apikal hücre yüzeyine taşınır. Örneğin, kontrol ile karşılaştırıldığında doza bağlı olarak, *Lactobacillus casei Zhang* suşunun bağırsak mukozasında SIgA ve IgA üreten hücrelerin sayısını artırarak patojenik enfeksiyonlara karşı mukozal bağışıklığı geliştirdiği gösterilmiştir (Kemgang, 2014).

2.1.5. Probiyotik GİS İlişkisi

Gastrointestinal sistem (GİS) insan vücudu ve dış çevre arasındaki en geniş arayüzü temsil eder. Gastrointestinal sistem mikrobiyotası yaklaşık olarak 10^{13} - 10^{14} mikroorganizma içerir. Mikroorganizmaların sayısı ve çeşitliliği GİS'in bölgelerine göre farklılık göstermektedir. Kommensal (zararlı olmayan), mutualistik (faydalı) ve patojenik (fırsatçı) bakterilere tolerans arasında bir denge sağlandığında gastrointestinal sistem homeostazı sağlanır. Probiyotikler immün sistemi geliştirmek ve bağırsak homeostazını sağlamak için katkıda bulunurlar (La Fata, 2018).

Bağırsak mukozası, bağırsak lümenini ikinci bir katman olan lamina propriadan ayıran tek hücreli epitel hücre tabakasıdır. Lamina propria bağırsağın steril olarak tanımlanabilen ve çok çeşitli immün sistem hücrelerini içeren bağ dokusu türüdür (Bron, 2012). Lamina propria B lenfosit, T lenfosit, dendritik hücreler (DC), makrofajlar ve plazma hücreleri gibi immün sistem hücrelerini bulundurur. Plazma ve T hücreleri IgA ve bazı enflamatuar sitokinleri salgılamasıyla GİS'in humoral yanıtını düzenler (La Fata, 2018). Epitel tabaka, besin emiliminin en üst düzeyde yapılmasını sağlarken konakçı organizmaya ait olmayan bileşenlerin geçişini engeller. Bu da bir dizi reaksiyonla pro-enflamatuar konakçı tepkilerini indükler (Bron, 2012).

Mukus tabakası ve intestinal epitelyum özel hücre tiplerinden oluşan, bağırsağın fiziksel bariyeridir. Bağırsak epitelyumu; besinlerin emiliminden sorumlu enterositlerden, patojenik bakterilerin temas etmesi durumunda antimikrobiyal peptitlerin sentezlenmesinde görev alan Paneth hücrelerinden ve mukus tabakasını oluşturan müsin salgısını üreten Goblet hücrelerinden oluşmaktadır (La Fata, 2018). Birçok probiyotik suş bağırsaktaki konakçı mukozal immün sistemini hücrel sinyal yollarını salgıladığı immünomodülatörler ile indükleyebilir (Kemgang, 2014). Oral yolla alınan probiyotikler gastrointestinal mukoza ve bağırsakla ilişkili lenfoid doku (GALT) ile etkileşimde bulunabilir (Kang, 2015). Probiyotiklerin epitel bariyerin geçirgenliğini düzenlediği, epitel hücrelerin enflamatuarsitokin salınımını değiştirdiği, patojenlerle rekabet ederek ya da onları direkt inhibe ederek mukus tabakasına yapışmalarını önlediği ve immün sistem hücrelerini doğrudan modifiye ettiği gösterilmiştir (Dongarrà, 2013).

Dış çevre ile konakçı organizmanın immün sistemi arasında bariyer oluşturmak GİS epitel hücrelerinin fonksiyonlarından biridir. Bu bariyerin sağlamlığı ve bütünlüğü sıkı bağlantı protein kompleksleri (TJ) tarafından sağlanmaktadır (La Fata, 2018). Sıkı bağlantı proteinleri (TJs) intestinalepitel hücrelerin apikal birleşim yerlerinde bulunan

lipid-protein kompleksidir ve epitel bariyerin seçici geçirgen olmasını sağlayarak iyonların ve elektrolitlerin geçişine izin verir (Lebeer, Vanderleyden, n.d.). Sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonu ve hücredeki konumunun değişmesi durumunda bariyer bütünlüğünün bozulması ve sızdıran bağırsak durumu gelişebilir. Sızdıran bağırsak, lümeninden lamina propriaya epitelyal geçirgenliğin artmasıdır. Sızdıran bağırsak irritabl bağırsak hastalığı (IBD), irritabl bağırsak sendromu (IBS) ve çölyak hastalığı gibi patolojik durumların gelişmesine neden olur. Probiyotiklerin sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonunu düzenlediği belirtilmiştir. *Lactobacillus casei* suşunun T84 epitel hücre modelinde sıkı bağlantı proteinlerini düzenleyerek patojenik *Escherichia coli* bakterisine karşı stabilizasyon sağladığı, bu şekilde enflamasyonu önlediği görülmüştür (La Fata, 2018). Karczewski ve arkadaşları *Lactobacillus plantarum* suşunu insan duodenumuna uygulayarak bağırsak bariyeri üzerinde bazı parametreleri test ettiler. Bu probiyotik suşunun TLR2 ilişkili yolu kullanarak sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonunu ve lokalizasyonunu etkilediğini gösterdiler (Karczewski, 2010). Sonuç olarak probiyotikler, patojenlere ve mikrobiyal ürünlerin epitelyal geçişini engelleyen sıkı bağlantı proteinlerinin stabilitesini artırır ve düzenler (Ohland, 2010).

Mukozal immün sistem, patojenlere karşı savunmada büyük öneme sahiptir. Mukus tabakası, patojenik bakterilerin enflamasyon oluşturmadan önce bağırsakta karşılaştıkları ilk engeldir. Bu jelimsi tabaka hem bağırsak epitel hücrelerini antijenik ve mikrobiyal moleküllerden korur hem de bağırsak hareketliliği için kaygan bir yapı sağlamaktadır (Ohland, 2010). Mukus, goblet hücrelerinde üretilir ve daha sonra villuslar arasında hareket eder (Dongarrà ve ark., 2013). Goblet hücreleri bağırsak boyunca ve diğer mukus tabakası olan yerlerde bulunur. Bu hücreler mukozayı oluşturmak için yüksek moleküler ağırlıklı ve çubuk şeklindeki müsin glikoproteinlerini lümen salgılar (Ohland, 2010). Probiyotiklerin, antibakteriyel özelliğe sahip olan mukus tabakasını güçlendirmek amacıyla müsin üretimini artırdığı ve bu şekilde bağışıklık sistemini düzenlediği belirtilmiştir (Sarao, 2017). *Lactobacillus plantarum* suşunun in vitro çalışmalarda HT29 hücre hattı üzerinde MUC2 ve MUC3 genlerinin mRNA ekspresyonunu artırarak *Escherichia coli* bakterisinin adezyonunu engellediği, aynı şekilde *Lactobacillus casei* suşunun MUC2 gen ekspresyonunu artırarak enterik bakterilerin translokasyonunu önlediği gösterilmiştir. Bu probiyotiklerin müsin salgılayan epitel hücreleri indüklediği düşünülmektedir. Müsin ekspresyonunun değişmesi Crohn hastalığı, ülseratif kolit gibi gastrointestinal hastalıkların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (La Fata, 2018).

Mukoza ilişkili bağışıklıkta salgı IgA (SIgA) bakteri, virüs ve mantarlara bağlanarak konağın korunmasında önemli bir role sahiptir. Bu mekanizma ile patojenik mikroorganizmaların sistemik bölgeye girişini ve yayılmasını engellemektedir (Thomas, 2010). SIgA, bağırsak lümeninde olan proteolize karşı dirençli olduğundan, aynı zamanda enflamatuar tepkileri direkt olarak aktive etmediğinden dolayı mukozal yüzeylerin korunması için ideal bir moleküldür. İnsan vücudunda, ince bağırsakta IgA1 izotipi çoğunlukta bulunurken, IgA2 kolon mukozasında bulunmaktadır (Bodera, 2009). Komensal bakteriler tarafından indüklenen bağırsak immün yanıtında antijen sunumu ya da sistemik immünite harekete geçirilmeden büyük miktarlarda immüoglobulin A oluşumunu sağlarlar. Probiyotik bakterilerin ya da fermente süt yoğurdunun IgA üreten hücrelerin sayısını artırdığı birçok çalışmada gösterilmiştir. (Galdeano ve ark., 2007). *L. casei* ve *L. bulgaricus* gibi probiyotiklerin B hücreleri tarafından üretilen IgA antikorunun üretimini artırdığı bilinmektedir. Probiyotiklerin, antijen sunumu olmadan ve T bağımsız bir şekilde, proliferasyon indükleyen ligand (APRIL), CD40 ligand ve TGF- β gibi moleküller üreterek IgA salgılanmasını tetikleyen epitelyal ve dendritik hücreleri (DC) etkilediği düşünülmektedir (Kemgang , 2014).

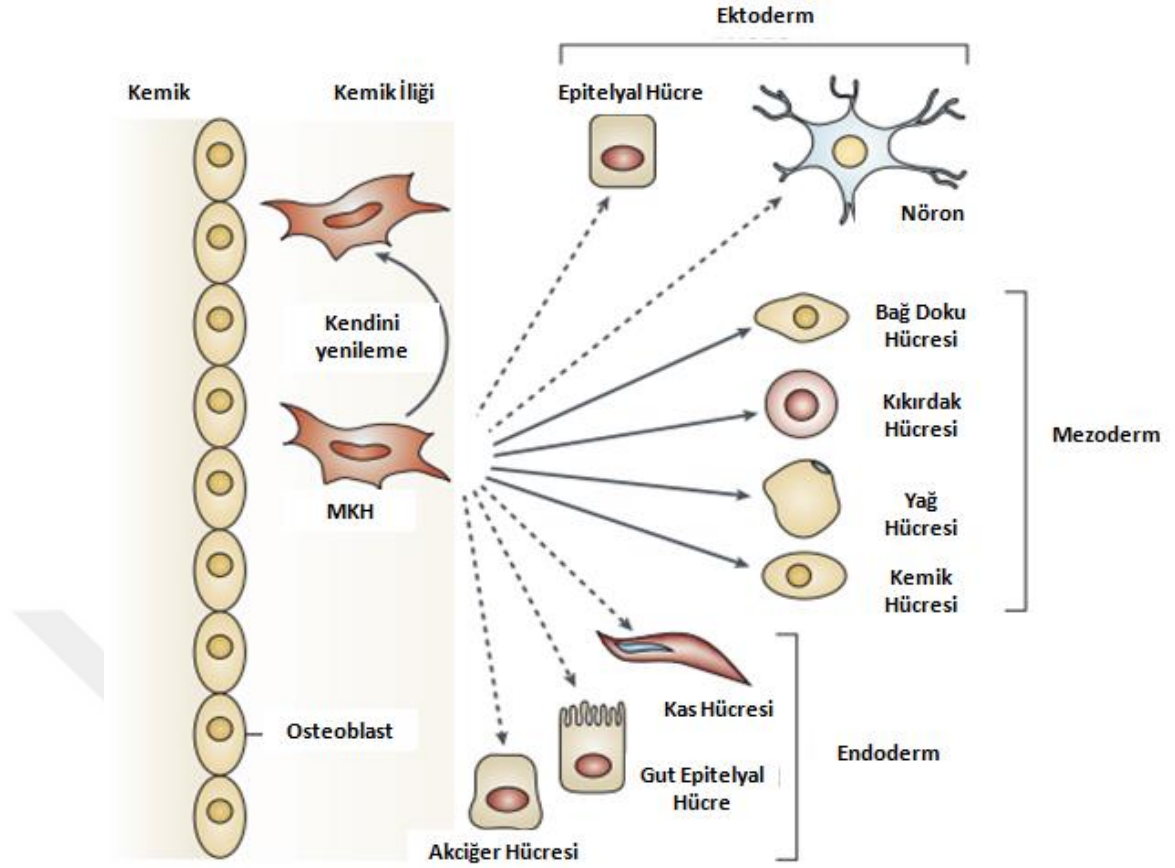
Bağırsaktaki dendritik hücreler (DC), mikrobiyal ajanlar tarafından uyarılma, birincil immün tepkileri indükleyebilme ve güçlü bir şekilde antijen sunma yeteneğine sahiptir. Dendritik hücrelerin modülasyonu probiyotik bakteriler gibi mikroorganizmalar tarafından indüklenerek sağlanır. *Lactobacillus* grubunun yüzeydeki dendritik hücre ekspresyonunu düzenlediği ve sitokin üretimini modüle ettiği rapor edilmiştir (Van Den Noortgate, 2017). Dendritik hücreler T hücrelerine antijen sunumu yapmasının yanında, immün regülatör sitokinlerin salgılanmasını indükleyerek T hücre polarizasyonunu (Th1, Th2, Th3 ve Treg) etkiler. *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* gibi probiyotik suşların DC ve sitokin üretimini değiştirdiği ve bir anti-enflamatuar sitokin olan IL-10 üretimini artırdığı belirtilmiştir (Corthésy, 2007). *Lactobacillus acidophilus* suşunun yüzey tabakası proteini (SlpA), dendritik hücreye ait DC-ICAM3 yakalayan integrin olmayan (DC-SIGN) olarak adlandırılan bir çıkıntı tarafından tanınır. *L. plantarum* ve *L. rhamnosus* suşlarında SlpA proteinleri olmamasına rağmen bu suşlar PRR aracılı sinyalizasyon ile diğer mikrobiyal proteinlerin var olmasıyla tanınırlar. Çeşitli *Lactobacillus* türleri ve suşlarının *in vitro* çalışmalarda dendritik hücrelerin supernatantlarındaki sitokin seviyelerini etkilediği belirtilmiştir. Örneğin *L. plantarum* suşları ile indüklenen dendritik hücrelerin besi ortamlarında IL-10'u 30 kat, IL-12'yi 600 kat artırdığı belirlenmiştir (Bron, 2012). Son çalışmalarda, IL-17 üreten yardımcı T

hücrelerinin (Th17) enflamatuvar bağırsak hastalığı (IBD) ve multiple skleroz gibi hastalıklarda önemli fonksiyonları olduğu bilinmektedir. Bağırsakta bol miktarda bulunan bu Th17 hücre üretiminin lamina propriadaki dendritik hücreler ve makrofajlar tarafından düzenlendiği düşünülmektedir. Bu nedenle oral yolla uygulanan probiyotik bakterilerin, örneğin *Lactobacillus rhamnosus*, Th17 üretimini indüklediği ve bu enflamatuvar hastalıkların iyileştirilmesinde rol oynadığı rapor edilmiştir (Dongarrà, 2013).

Bazı probiyotik bakteriler bakteriyosin gibi antimikrobiyal moleküllerin ekspresyonuyla patojenleri direkt öldürebilir ya da büyümelerini ve çoğalmalarını inhibe edebilir (Ohland, 2010). *Lactobacillus* türlerinin hidrojen peroksit üreterek *E.coli*'nin büyümesini engellediği ayrıca IL-10 ve MyD88 üreterek TLR-2'yi aktive ettiği bu şekilde de enfeksiyonu önlediği belirtilmiştir (Amdekar, 2011).

2.2. Mezenkimal Kök Hücreler

1974'te Alexander Friedenstein tarafından ilk defa izole edilen multipotent stromal hücreler ya da mezenkimal stromal hücreler (MSC) olarak adlandırılan kök hücreler, uzun yıllardan beri birçok bilimsel çalışmanın temel konusu olmuştur. Adipojenik, osteojenik, kondrojenik ve diğer mezenkimal dokulara farklılaşabilen kendini yenileyebilme ve multipotensi özelliğine sahip fibroblastoid progenitör hücrelerdir (Şekil 2.2). Bu farklılaşabilme kabiliyetlerinden dolayı rejeneratif tıpta kullanılabileceği konusu merak uyandırmıştır (Spees, 2016).



Şekil 2.2. Mezenkimal kök hücrelerin farklı hücre tiplerine farklılaşabilme kapasitesi (Uccelli, 2008)

Mezenkimal kök hücreler (MKH), immün sistemi düzenleyebilme, hasarlı bölgeye göç edebilme ve farklılaşabilme özelliklerine sahip hücre tipleridir. İmmünomodülatör etkileri ve düşük immünojeniteleri nedeniyle immün bozuklukların sebep olduğu hastalıklarda kullanılmıştır. MKH'ler infüze edildiklerinde hasarlı veya enflamasyon olan bölgeye göç edebilirler, bu yüzden doku onarımında görev alabilirler (Qu, 2018).

MKH'lerin immün sistemde yer alan birçok temel hücreyi baskıladığı ve bu şekilde immün sistemi düzenlediği bilinmektedir. Bu yüzden bağışıklık sistemi bozukluklarında kullanılmak üzere tıp alanında ilgi görmektedir. MKH'lerin klinik tedavilerde kullanımı konusunda bilinen 800'den fazla çalışma bulunmaktadır. Salgıladığı sitokinlerle, hücre-hücre kontakt yoluyla ve hücrel veziküllerle immün sistemi düzenlemektedir (Börger, 2017).

2.2.1.Mezenkimal Kök Hücre Kaynakları

Mezenkimal kök hücreler kemik iliği, yağ, göbek kordonu ve diş pulpası gibi dokulardan izole edilebilmektedir (Beksaç, 2014). Mezenkimal kök hücreler elde edildikleri kaynağa göre de sınıflandırılabilir. MKH'ler vücudun birçok yerinde, farklı miktarlarda bulunur. Kemik iliği, adipoz doku, kordon kanı, wharton jeli, amniyotik sıvı, diş pulpası, endometriyum, periferik kan ve sinoviyal sıvı gibi birçok yerden MKH izole edilebilmektedir (Gugjoo, 2020).

2.2.1.1. Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücreler kemik iliğinde oldukça yoğun bulunmaktadır. Kemik iliği mezenkimal kök hücreleri (Kİ-MKH) klinik ve *in vitro* deneysel çalışmalarda en çok kullanılan kök hücre çeşididir. Kİ-MKH oldukça fazla hücre tipi içerdiğinden dolayı tek bir isimle adlandırılması konusunda hala tereddütler bulunmaktadır. Uluslararası Hücresel Terapi Derneği (ISCT) kemik iliği mezenkimal kök hücre olarak adlandırılması için belirli kriterler sunmuştur (Barcellos-de-Souza, 2013). Bu kriterler şu şekildedir;

- Standart hücre kültürü koşullarında yapışabilme özelliği
- Negatif CD34, CD45, HLA-DR, CD14 ya da CD11b, CD79a pozitif CD73, CD90 ve CD105 gibi yüzey belirteçlerinin eksprese edilmesi
- İn vitro şartlarda adiposit, kondrosit ve osteoblast gibi hücrelere farklılaşabilme yeteneğine sahip olması.

Kemik iliğinde hematopoietik kök hücreler ve mezenkimal kök hücreler yakın temas halindedir (Sudres, 2006). Kemik iliğinden mezenkimal kök hücreler çok sayıda elde edilebilmektedir. Fakat izolasyon esnasında fibroblastlar da beraberinde gelebilir. Fenotip olarak fibroblastlar ve mezenkimal kök hücreler oldukça benzediğinden dolayı ayırt edilmeleri zordur. Fibroblastların ve MKH'lerin birçok ortak yüzey belirteciye sahip olduğu bulunmuştur. Bu iki hücre tipini birbirinden ayırmak için Ishii ve arkadaşları RT-PCR yöntemi ile gen ekspresyon seviyelerini incelemişlerdir. Bu hücreler arasında 13 farklı gen ifadesinin değişiklik gösterdiğini saptamışlardır (Ishii, 2005).

Kemik iliği mezenkimal kök hücreleri, mitojenler tarafından aktive edilmesiyle olgun T hücrelerin fonksiyonunu inhibe etmektedir (Nicola, 2002). Krampera ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kemik iliğinden izole edilen mezenkimal kök hücrelerin

CD4⁺ ve CD8⁺ T hücre proliferasyonunu inhibe etmesinin yanında NK hücre proliferasyonunu da inhibe ettiğini, fakat B hücre proliferasyonu üzerinde bir etki görmediklerini belirtmişlerdir (Krampera, 2006).

2.2.1.2. Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler

Yağ dokusu (adipoz doku) bir diğer mezenkimal kök hücre kaynağıdır. Kemik iliğine kıyasla daha fazla miktarda mezenkimal kök hücre adipoz dokudan elde edilebilir. Bu dokudan elde edilen kemik iliği mezenkimal kök hücre benzeri hücreler işlenmiş lipoaspirat (PLA) hücreleri olarak adlandırılmıştır. Bu hücreler fibroblast ve aynı zamanda mezenkimal kök hücre benzeri yapıda olduğundan farklarını araştırmak için birçok çalışma yapılmıştır (Zuk, 2001). PLA hücreleri de mezenkimal kök hücreler gibi belirli spesifik faktörlere maruz kaldığında *in vitro* koşullarda osteojenik, adipojenik, miyojenik ve kondrojenik hücre tiplerine farklılaşabilmektedir. Yapılan biyokimyasal karakterizasyon analizleri sonucunda adipoz dokudan izole edilen PLA hücrelerinin Kİ-MKH'ler ile benzer olarak bazı ortak CD belirteçleri olduğu bulunmuştur. Ayrıca farklılaşabilme özelliğinden dolayı bu hücrelerin kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler gibi rejenetratif tıpta kullanılabileceği konusu da ilgi uyandırmıştır (Scherl, 2002). Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin Kİ-MKH'lerin immünomodülatör özelliklerine benzer özellikler gösterdiği belirlenmiştir. Ancak, Kİ-MKH'lerin aksine CD34 yüzey belirtecini ekspres etmektedirler (Yañez, 2006). Adipoz doku mezenkimal kök hücrelerin kemik iliği transplantasyon uygulamalarında infüze edilmesi sonucunda, toleransın sağlandığı aynı zamanda graft versus host hastalığının azaltıldığı belirtilmiştir (Puissant, 2005).

2.2.1.3. Kordon Bağı Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler

Kordon bağından elde edilen mezenkimal kök hücreler kordon kanı, wharton jeli ve amniyotik membran gibi farklı bölgelerden izole edilebilir (Ding, 2015).

Kordon Kanı Mezenkimal Kök Hücreleri

Kordon kanında, hematopoietik kök hücrelerin yanısıra başka hücre tiplerine farklılaşma kabiliyeti gösteren mezenkimal kök hücreler de bulunmaktadır. Kordon kanı mezenkimal kök hücreleri kemik iliği mezenkimal kök hücreler ile benzerlikler

göstermektedir. Hatta Kİ-MKH'ye göre avantajları da bulunmaktadır. Kİ-MKH'lerin proliferasyon ve farklılaşabilme kabiliyeti donör yaşının artmasıyla, azalmaktadır. Kordon kanı mezenkimal kök hücreler ise en genç MKH'ler olarak bilinir. Bu yüzden kordon kanı mezenkimal kök hücreler tıp alanında kullanılmak üzere oldukça önemli bir kaynaktır (O. K. Lee, 2004).

Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücreleri

Kordon bağı Wharton Jeli (WJ) adı verilen mukoid bağ dokusu ile çevrili iki arter ve bir ven içerir. Wharton Jeli terimi ilk olarak 1656 yılında Thomas Wharton tarafından tanımlanan doğumdan sonra kolayca elde edilebilen ekstraembriyonik bir yapıdır (Friedman, 2007). Wharton jelinde en fazla bulunan glikozaminoglikan, fibroblast ve kollajen lifleri etrafında bir jel oluşturan ve kordon bağını basınçtan koruyan bir hyaluronik asittir (H.-S. Wang, 2004). 2002 yılında Mitchell ve arkadaşları kordon bağı Wharton jelinden izole ettikleri mezenkimal kök hücreleri tanımlamışlardır. Wharton jelinden elde edilen bu hücrelerin in vitro ortamda fibroblast büyüme faktörü ve düşük serum varlığında, ortama bütül hidroksianisol ve dimetilsülfoksit eklenmesiyle nöron ve glia hücrelerine farklılaştığı gösterilmiştir (Words, 2002). MKH kaynağı olarak WJ'nin kullanılması diğer kaynaklara göre bazı avantajları bulunmaktadır. Kordon kanı alındıktan sonra acısız bir şekilde mezenkimal kök hücre toplanabilir. Ayrıca etik açıdan problem oluşturmamaktadır (McGuirk ve ark., 2015). İlave olarak WJ-MKH'ler kemik iliği ya da adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler gibi çoğalma hızına sahiptir. Teratoma oluşumuna sebep olmaz ve diğer MKH'lere benzer immünomodülatör özelliklere sahiptir (El Omar, 2014). WJ-MKH'lerin farklılaşabilme ve immünregülatör özelliğinden dolayı nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde terapotik olarak kullanılabileceği ve klinik çalışmalarda MKH için alternatif bir kaynak olabileceği düşünülmüştür (Liu, 2013).

2.2.1.4. Amniyotik Sıvı Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler

Amniyotik sıvı, fetüsün içinde büyüdüğü, endometriyum içerisinde rahatça hareket etmesini sağlayan ve dış darbelere karşı koruyan berrak sıvıdır (Cananzi, 2009). Amniyotik sıvıda kemik iliği mezenkimal kök hücrelerine benzer fenotipe ve farklılaşma özelliğine sahip mezenkimal kök hücrelerin bulunduğunu ilk olarak In't Anker ve arkadaşları 2003 yılında yaptıkları çalışmada göstermişlerdir (In 't Anker ve

ark., 2003). İnsan amniyon sıvısında Oct-4 eksprese eden mezenkimal kök hücrelerin bulunduğu belirlenmiş ve bu hücrelerin embriyonik kök hücreler gibi etik sorunlar oluşturmadan pluripotensi özelliğinden faydalanarak terapötik olarak kullanılabilir olduğu öngörülmüştür (Prusa ve ark., 2003). Gebelik döneminin ikinci trimesterında rutin amniyosentez sırasında alınan amniyon sıvısından mezenkimal kök hücreler elde edilebilir ve *in vitro* ortamda çoğaltılabilir. Ayrıca *in vitro* koşullarda belirli faktörlerin varlığında bu hücrelerin hem mezodermal hücre tiplerine hem de ektodermal nöron hücrelerine farklılaşabildiği gösterilmiştir (Tsai ve ark., 2004). Amniyotik sıvı mezenkimal kök hücreler diğer kaynaklardan elde edilen mezenkimal kök hücreler gibi plastiğe yapışabilme, yüzey moleküllerinin ekspresyonu ve çeşitli hücre tipine farklılaşabilme özelliğine sahiptir. Aynı zamanda temel mezenkimal kök hücreler gibi immünomodülatör ve anti-tümör özelliğe sahip olduğundan dolayı rejeneratif tıp ve doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabilir (Zhou, 2014). Yapılan son çalışmalarda amniyotik sıvı mezenkimal kök hücrelerin erişkin beyin bozuklukları gibi ektodermal rejeneratif tıp çalışmaları kapsamında hayvan modellerinde incelenmektedir (Joerger-Messerli, 2016).

2.2.1.5. Diş Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler

Diş dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücreler de diğer karakterize edilmiş kök hücre grupları arasında yer almaktadır (Huang ve ark., 2009). Gronthos ve arkadaşları ilk kez diş kaynaklı kök hücreleri elde etmeyi başarmış ve bu hücreleri post-natal dental pulpa kök hücreler olarak adlandırmışlardır (Gronthos ve ark., 2000). Benzer bir çalışmada, dental pulpadan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin kendini yenileme ve nöral ya da adipojenik hücre tiplerine farklılaşabilme özelliğine sahip olduğu belirlenmiştir (Gronthos, 2002). Diş pulpasından, insan süt dişlerinden, apikal papilladan ve yetişkin periodontal ligament gibi farklı tip diş kaynaklı kök hücreler elde edilmiştir (S. Shi ve ark., 2005). Diş dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücreler, kemik iliği mezenkimal kök hücrelerine kıyasla farklılaşma potansiyeli açısından daha kararlı hücrelerdir (Huang, 2009). Diş pulpasından izole edildikten mezenkimal kök hücrelerin periferik nöral rejenerasyonda önemli rol oynamaktadır (Martens ve ark., 2013). Diş pulpası mezenkimal kök hücreler, temel mezenkimal kök hücrelerde bulunan CD29, CD105, CD146 ve CD166 gibi yüzey antijenlerini eksprese eder (Kaneko, 2018). Diş kaynaklı mezenkimal kök hücreler fenotipik olarak adipoz doku mezenkimal

kök hücrelerine kıyasla daha küçük olmalarının yanı sıra daha yüksek proliferasyon oranına sahiptir (Jin, 2019). Bu hücrelerin çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilme kabiliyetlerinden dolayı rejeneratif tıp ve doku mühendisliği uygulamalarında yeni bir kaynak oluşturmaktadır. Diş kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin rejeneratif tıp alanındaki en büyük avantajlarından biri, ortodontik nedenlerden dolayı çekilen işlevsiz yirmi yaş dişlerinden kolayca izole edilebiliyor olmasıdır. Bu hücreler terapötik kullanımda alternatif ve ideal bir mezenkimal kök hücre kaynağı olmasına rağmen diğer MKH kaynaklarına göre az miktarda elde edilmesi bir dezavantajdır. Doku rejenerasyonu gibi uygulamada kullanımdan önce *in vitro* olarak çoğaltılması gerekmektedir (Noda, 2019).

2.2.1.6. Endometriyum Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler

Chan ve ark. 2004 yılında endometriyumda farklılaşma potansiyeline sahip hücrelerin bulunduğunu ileri sürdü ve bu hücrelerin izolasyonunu gerçekleştirdi (Zuo, 2018). Endometriyal mezenkimal kök hücreler rejeneratif tıp için ideal bir kaynaktır. Yapılan çalışmalar endometriyal kök hücrelerin yüksek proliferasyon hızına sahip olduğunu ve çeşitli hücre hatlarına farklılaşabildiğini göstermiştir (Darzi ve ark., 2016). Endometriyal mezenkimal kök hücrelerin anestezi olmaksızın kolayca elde edilebilmesi bir avantaj oluşturmaktadır (Darzi, 2016).

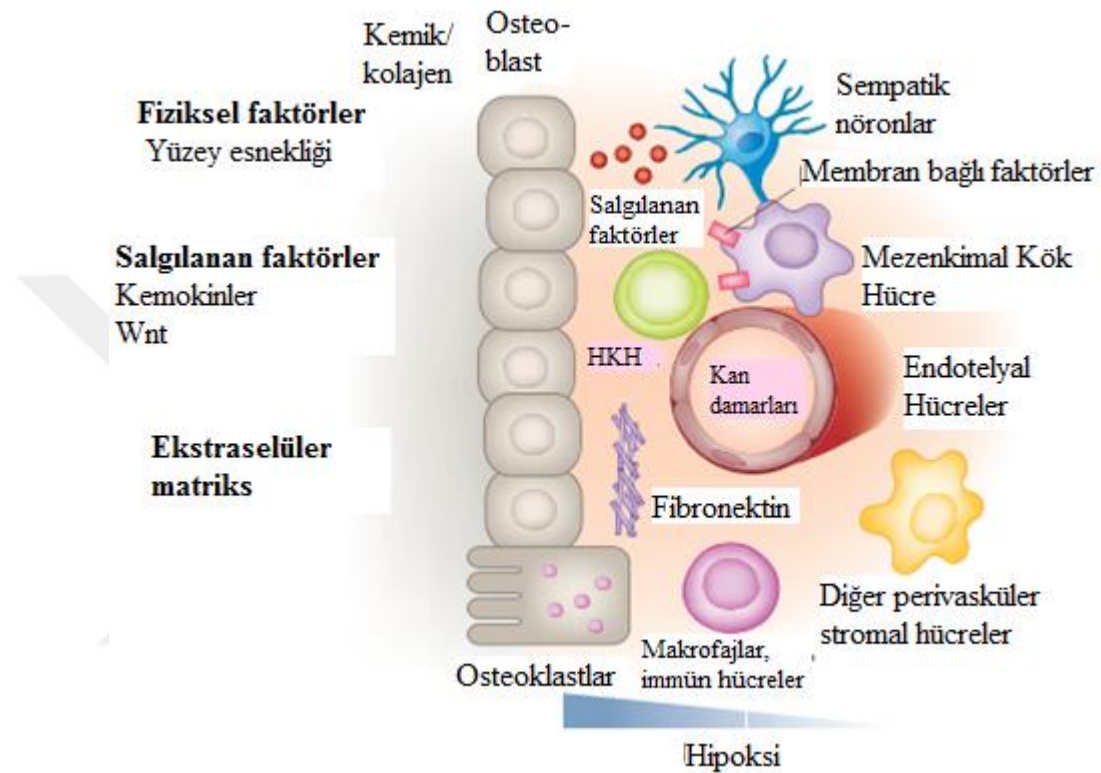
2.2.1.7. Periferik Kan Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler

Son zamanlarda, periferik kanda mezenkimal kök hücrelerin bulunduğu gösterilmiştir. Periferik kan mezenkimal kök hücreleri temel mezenkimal kök hücre özelliklerini taşımaktadır. Periferik kandan kaynaklı mezenkimal kök hücreler kolayca elde edilebilmekte ve *in vitro* çoğaltılabilmektedir (Tondreau, 2005). Bu hücreler osteoblast, fibroblast ve adiposit hücre hatlarına farklılaşabilme yeteneğine sahiptir (Ukai, 2007). Periferik kan, diğer MKH kaynaklarına göre izole edilmesi kolay olduğundan klinik uygulamalar için ideal bir kaynaktır (Lyahyai, 2012).

2.2.2. Mezenkimal Kök Hücre Nişi

1978 yılında ilk defa Schofield kök hücreleri destekleyen fizyolojik ortamı niş olarak tanımladı (Schofield, 1978). Nişi oluşturan temel bileşenler, kök hücreler ve

komşu hücreler arasındaki etkileşimler, salgılanan sitokinler, inflamasyon, hücre dışı matriks, doku sertliği gibi fiziksel ve hipoksi gibi çevresel faktörler bulunmaktadır (Şekil 2.2.2)(Lane ve ark., 2014). Nişi oluşturan bu faktörler kök hücreleri farklılaşmamış şekilde tutmak için birlikte hareket eder. Sonrasında farklı hücre tiplerine farklılaşmalarını ve doku rejenerasyonunu sağlamak amacıyla belirli sinyallerin niş içine girmesine izin verirler (Kolf, 2007).



Şekil 2.2.2. Mezenkimal kök hücre nişini oluşturan faktörler (Lane, 2014)

Kök hücre nişleri, germ hattı, kemik iliği, sindirim ve solunum sistemleri, iskelet kası, deri, saç folikülü, merkezi ve periferik sinir sistemleri dahil olmak üzere birçok dokuda tanımlanmış ve karakterize edilmiştir (Wagers, 2012).

İlk çalışmalar kemik iliğindeki hematopoietik kök hücre (HKH) nişi üzerinde yapılmıştır. MKH'lerin hematopoietik kök hücre nişine katkıda bulunduğu anlaşılmıştır. MKH'ler osteoblastlara farklılaşarak, hematopoietik kök hücrelerin çoğalmasını destekleyerek ve kendini yenileyerek bu nişe katkıda bulunur. Ayrıca MKH ve HKH arasında karşılıklı etkileşim söz konusudur (Schraufstatter, 2011). Kemik kaynaklı osteoblastlar ile doğrudan iletişim halinde olan mezenkimal kök hücreler *in vitro* koşullarda deksametazon, β -gliserofosfat ve askorbat varlığında osteojenik farklılaşmayı indükler. MKH'ler tarafından yüksek oranda üretilen vimentin, hücreler

için mekanik destekleyici olmasının yanında kondrojenik farklılaşmayı da düzenlemektedir (Kuhn, 2010).Kemik iliğindeki mezenkimal kök hücreler ile komşu hücrelerin etkileşimini anlamak için *in vivo* çalışmaların gerçekleştirilmesi zor olduğundan, hücresel düzeyde bu etkileşimleri anlamak için *in vitro* deneyler yapılmaktadır (Kuhn, 2010).

2.2.3. Mezenkimal Kök Hücreler ve Güncel Çalışmalar

Mezenkimal kök hücreler kendini yenileme, farklılaşabilme ve immünomodülatör özelliklerinden dolayı terapötik olarak rejeneratif tıp uygulamalarında önemli bir aday olarak düşünülmüştür. MKH'ler herhangi bir immün reaksiyon olmadan fare dokularına aktarılmış ve bu dokuya özgü farklılaşma göstermişlerdir. Aynı şekilde hiçbir toksisite olmaksızın insanlara intravenöz olarak nakledilmiştir. MKH ve HKH'lerin birlikte transplantasyonu, HKH oluşumuna sebep olmuştur. Allojenik MKH transplantasyonu akut ve kronik graft versus host hastalığı tepkilerini azaltmıştır. Elde edilen bu sonuçlar MKH'lerinin *in vivo* olarak kullanılması için kanıt niteliği taşımaktadır (Karimineko, 2016).

Yeterli miktarda kemik iliği mezenkimal kök hücre elde edilememesi ve allograftlerin olmaması, kemik hastalıklarında MKH tedavisinin uygulanması için bir sebep olmuştur. İlk kez 1951 yılında MKH'ler kemik rejenerasyonu için başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Patel, 2013). MKH'ler çok çeşitli farklılaşma kabiliyetlerinden dolayı büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından immunosupresif özellik kazanarak, özellikle osteoartrit, osteogenezis imperfekta, eklem kıkırdak defektleri, osteonekroz ve kemik kırığı gibi kemikle ilgili hastalıklarda klinik olarak çalışılmaktadır (Maumus ve ark., 2011).Mezenkimal kök hücreler osteoblastlara farklılaşma yeteneğine sahiptir, fakat kendiliğinden kemiğe göç edemediğinden dolayı enzimatik olarak tasarlanmış MKH çalışmalarına odaklanılmıştır. Hücre canlılığını bozmadan hücre göçünü sağlamak amacıyla enzimatik modifikasyon yapılmıştır. MKH'lerdeki hücre yüzey reseptörü CD44'ün güçlü bir E-selektin ligandı olan HCELL'e (hematopoietik hücre E-selektin/L-selektin ligandı) dönüşebildiği gösterilmiştir. Modifikasyon yapılmış HCELL'e sahip MKH'ler bağışıklığı zayıflatılmış farelere enjekte edildiğinde saatler içerisinde bu hücrelerin kemik iliğine göçtüğü görülmüştür. Bu da kemik iliği rejenerasyonunda MKH kullanımını için önemli bir bulgu olmuştur (Sackstein, 2008). Ek olarak patolojik kemik ve kıkırdak yaralanmalarında yetişkinlerde bu dokuların yenilenmesi uzun zaman almaktadır. Ameliyat dışında MKH tedavisi alternatif ve cazip

bir fikir olmuştur. MKH'ler kullanılarak kırıldak defektlerinde birkaç iskelet yapısı kullanılmış ve yenilenme sürecini hızlandırdığı görülmüştür (Vinatier ve ark., 2009).

Son yıllarda kalp yetmezliği ciddi derecede ölüme sebep olan bir hastalık haline gelmiştir ve tedavilerin yetersiz olmasından dolayı yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmuştur. MKH temelli hücresel tedavi akut ve kronik kalp yetmezliği için umut verici olmuştur. Kalp yetmezliği için MKH temelli birçok klinik uygulama yapılmış ve sonucunda terapötik etkinliğinin yüksek ve güvenilir olduğu bulunmuştur. Ayrıca MKH uygulamasının pro-enflamatuar sitokin olan TNF sinyalini inhibe ederek kalp ve akciğerdeki enflamatuar olayları azaltabileceği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda beklenen sonuçlar alınmasına rağmen klinik olarak uygulanabilir olması için bazı kritik konulara yanıt verilmesi gerekmektedir (Jie Wang, 2020).

Diyabet, insülin sekresyonundaki ya da insülinin etkisindeki bozulmalardan kaynaklanan, hiperglisemiye sebep olan bir hastalıktır. Tip1 diyabet çocukluk çağında başlayan ve glikozu metabolize etmek için gerekli olan insülinin etkisiz olmasından kaynaklanmaktadır. T hücre aracılığıyla pankreasta bulunan beta hücrelerinin yıkılmasıyla glikozun metabolize edilememesi sebebiyle oluşmaktadır. Tip2 diyabet ise yetişkinlikte ortaya çıkan, insülinin glikozu az miktarda metabolize etmesinden kaynaklanır. Dışarıdan alınan insülin vücudun kendi insülini ile birebir aynı değildir ve hipoglisemi durumuna neden olabilir. Bu nedenle tedavi amacıyla insülin üreten beta hücrelerinin vücut içerisinde mezenkimal kök hücreler ile yeniden oluşturulması fikri ilgi çekmektedir (Patel, 2013). Kemik iliği kaynaklı MKH birçok farklılaşma protokolünden geçirilmiş ve sonucunda pankreas adacık benzeri hücreler oluştuğu gözlenmiştir. Ayrıca insülin ve glukagon gen ekspresyonunda artış tespit edilmiştir (Yu, 2007).

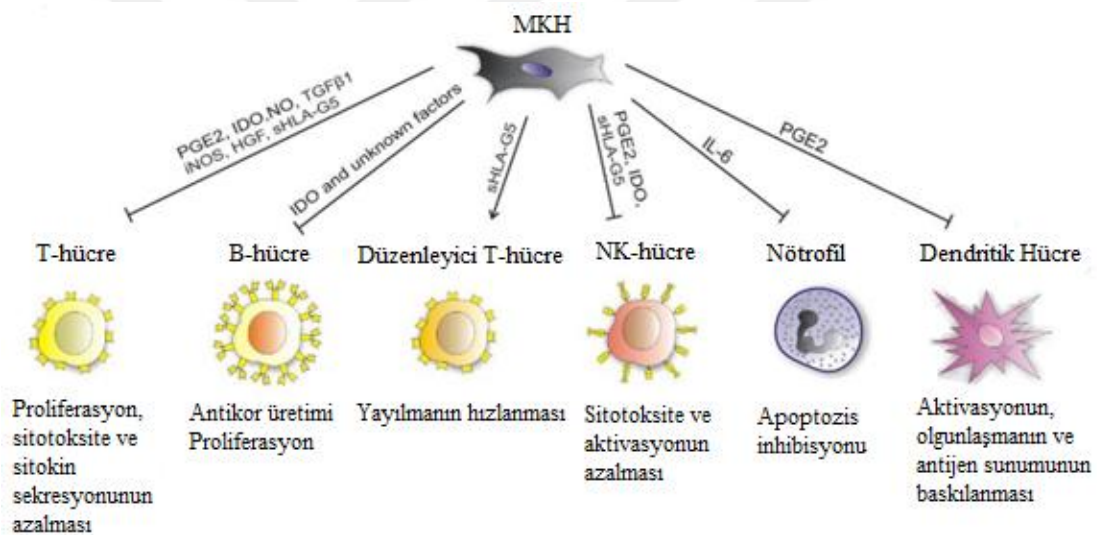
Graft versus host hastalığı (GVHD), allojenik doku aktarımında donör T hücrelerinin alıcı dokusuna saldırmasıyla ortaya çıkan enflamatuar durumdur. MKH'lerin T hücreleri inhibe ederek immün baskılama özelliğinden dolayı GVHD tedavisinde kullanılabilirliği düşünülmüştür. Akut GVHD hastası olan 33 çocuğa dört hafta boyunca aralıklarla MKH tedavisi uygulanmış ve tedavi boyunca çocuklar takip edilerek belirtiler gözlemlenmiştir. Deri, gastrointestinal ve karaciğer enflamasyonlu hastalarda sırasıyla %75, %65.5 ve % 35.7 oranlarında tüm belirtilerin ortadan kalktığı görülmüştür (Erbey ve ark., 2016).

MKH tedavisi, böbrek ve karaciğer hastalıkları, Crohn hastalığı, ülseratif kolit, osteoartrit, miyokard enfarktüs ve birçok otoimmün hastalıkta klinik çalışmalar

yapılarak test edilmiştir. Tüm olumlu sonuçlara dayanarak MKH tedavisinin güvenilirliği artmış ve geleneksel tedavilere göre daha umut verici bir onarım şekli olmuştur (Gao ve ark., 2016).

2.2.4.Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünomodülatör Etkileri

Mezenkimal kök hücreler, insan lökosit antijeni sınıf II (HLA sınıf II) içermediğinden dolayı düşük immünojeniteye sahiptir. MKH'lerin immün sistem hücreleri ile etkileşimi incelendiğinde düşük antijeniteye sahip olmasının yanında bazı hücrelerin aktivasyonunu ve proliferasyonunu baskılayarak düzenleyici etkisi olduğu bulunmuştur (Börger, 2017). MKH'ler doğrudan hücre-hücre bağlantısıyla ya da dolaylı olarak sitokin salınımıyla, T hücreleri, B hücreleri, dendritik hücreleri ve makrofajları düzenleyebilir (Şekil 2.2.4). MKH'ler hem doğuştan hem de adaptif immün sistemde baskılayıcı etkiler gösterir (M. Wang, 2018).



Şekil 2.2.4. Mezenkimal kök hücrelerin immünomodülatör kabiliyeti ile etkilediği immün sistem hücreleri (Salami, 2018)

Dendritik hücreler, antijen sunumunu ve pro-enflamatuar ya da anti-enflamatuar sitokinler aracılığıyla T hücre indüklenmesini sağlayan doğal bağışıklığın temel hücreleridir. MKH'ler Prostoglandin E2 (PGE2) gibi sitokinlerin üretimini artırarak dendritik hücre farklılaşmasını ve aktivasyonunu baskılamaktadır (Regmi, 2019). Yapılan bir çalışmada hem MKH'lerin hem de kültür supernatantlarının dendritik hücrelerin IL-12 salgılaya kapasitesini azalttığı, olgunlaşmasını engellediği ve T hücreleri indüklenme yeteneğini inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca in-vitro çalışmalarda

MKH'ler ile uyarılan dendritik hücreler fareye verildiğinde lenfosit proliferasyonunu inhibe ettiği ve T regülatör (Treg) hücrelerini artırdığı belirtilmiştir. Günümüzde halen, MKH'lerin dendritik hücreler üzerindeki etkileri birçok immün sistem hastalığında kullanılmak üzere çalışmalar yapılmaktadır (N. Li, 2017).

Doğal öldürücü (NK) hücreler hem doğal hem de adaptif immün yanıtta önemli rol oynayan sitolitik lenfosit hücrelerdir. TNF- α , IL-10 ve IFN- γ gibi birçok sitokin üretirler (D. K. Lee, 2018). MKH'lerin NK hücrelerinin sitolitik aktivitesini ve proliferasyonunu, sitokin salınımı ile inhibe etmesinin yanında hücre-hücre temas yoluyla direkt olarak da etkilediği bilinmektedir (Regmi, 2019). NK hücrelerinin aktivitesi yüzeylerindeki inhibe ve aktive edici reseptörlerin ligandları ile etkileşime geçmesiyle gerçekleşmektedir. MKH'ler NK hücrelerinin aktive olması için yüzeylerinde eksprese olan NKp30 ve NKG2D'nin ifadesini inhibe ederek NK hücre aktivasyonunu baskılar. Ayrıca MKH'ler üzerinde bulunan TLR4 reseptörü, NK hücrelerinin direkt temas yoluyla inhibe edilmesinde önemli rol oynamaktadır. Yapılan birçok çalışma sonucunda MKH ve NK hücrelerinin oranının inhibisyonunda önemli olduğu anlaşılmıştır (M. Wang, 2018). MKH'ler özellikle TGF β ve PGE2 aracılığıyla direkt temas ederek NK hücrelerini baskılamaktadır. Bu inhibitör etkilere IL-10, IDO HLA-G5 gibi çözümler faktörler de aracılık etmektedir (D. K. Lee, 2018).

Makrofajlar, doğal bağışıklığın en önemli hücreleridir. MKH'lerin mikroçevresine göre klasik olarak aktifleşmiş M1 hücrelerine ve alternatif olarak M2 hücrelerine dönüşebilir. M1 makrofaj hücreleri enflamatuar sitokin salınımını sağlarken M2 makrofajları IL-10 gibi sitokin salınımını artırarak enflamasyonu hafifletip doku onarımına katkıda bulunmaktadır. Makrofaj hücrelerinin MKH'ler ile beraber kültürasyonu sonucunda pro-enflamatuar sitokinlerin salınımını azaltan M2 makrofajlarına dönüşmesini indükler. Ayrıca MKH'lerin yara bölgelerine makrofaj yoğunluğunu artırarak doku onarımını ve yara iyileşmesini hızlandırdığı bilinmektedir (M. Wang, 2018).

T hücreler, adaptif immün sistemde organizmayı enfeksiyon oluşumuna karşı savunan timusta hematopoietik kök hücreden farklılaşan lenfositlerdir. MKH'lerin T hücre çoğalmasını baskıladığı birçok çalışmada gösterilmiştir. MKH'ler indüklenmiş T hücrelerinin bölünmesini hücre döngüsünün S evresine girişini engelleyerek proliferasyonu baskılar (D. K. Lee, 2018). MKH'ler T hücre aktivasyonunu ve proliferasyonunu inhibe etmesinin yanında, farklılaşmasını da düzenlemektedir. Güçlü enflamatuar faktörlerin bulunduğu bir ortamda MKH'ler Th1 pro-enflamatuar

mekanizmayı inhibe ederek Th2 aracılı anti-enflamatuar olayları indükler. Ayrıca MKH'ler farklılaşmamış Th0 hücrelerinin pro-enflamatuar IL-17 üreten Th17 hücrelerine dönüşmesini engeller. Ek olarak CD4⁺ T hücrelerinin, aşırı bağışıklık tepkisini düzenleyen T regülatör (Treg) hücrelerine dönüşmesini de indüklemektedir (Kim, 2015). Fakat birkaç çalışma MKH'lerin öncesinde IFN- γ , TNF α , IL-1 α ya da IL-1 β gibi sitokinler tarafından uyarılmadığı sürece T hücrelerini baskılayamadığını göstermiştir. Bu enflamatuar sitokinler tarafından uyarıldığında MKH'ler yanıt olarak indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve siklooksijenaz2 (COX2) ekspresyonlarını yükseltir. Bu da immün baskılayıcı moleküller olan nitrik oksit (NO) ve PGE2 üretimine neden olur (N. Li, 2017).

MKH'ler B lenfosit hücreleri ile birlikte kültüre edildiğinde, B hücre proliferasyonunu ve immünglobülin (IgM, IgG, IgA) üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca KI-MKH'ler B hücrelerinin antikor üreten plazma hücrelerine dönüşmesini engellemektedir (Salami, 2018). Ayrıca MKH'ler IL-10 üretimini artırarak Th1/Th2 dengesini Th2 yönünde düzenleyen B regülatör (Breg) hücrelerinin çoğalmasında desteklemektedir. Breg hücreleri Th17 farklılaşmasını baskılar ve Treg hücre proliferasyonunu artırır (D. K. Lee, 2018). B hücre yanıtları T hücre yanıtlarını da etkilediğinden MKH'lerin B hücreleri üzerindeki etkileri aynı zamanda T hücre inhibisyonunu da sağlamaktadır (Regmi, 2019).

2.2.5. Mezenkimal Kök Hücrenin Salgıladığı Sitokinler

Mezenkimal kök hücreler çeşitli immün sistem hücreleri ile etkileşime girer ve bağışıklık sistemini düzenler. MKH temelli immünomodülasyon hücre-hücre teması düzenlemenin yanında, dönüştürücü büyüme faktörü-beta1 (TGF- β 1), hepatosit büyüme faktörü (HGF), nitrik oksit (NO), hemoksijenaz (HO), interlökin-6 (IL-6), prostoglandin E2 (PGE2) ve indolamin 2,3 dioksijenaz (IDO) gibi sitokinlerin salgılanmasıyla da immün sistemi düzenler (Şekil 2.2.5) (Kim, 2015). MKH'ler yapısal olarak immün baskılayıcı özelliğe sahip değildir. Ortamda az miktarda pro-enflamatuar sitokinlerin varlığı MKH'leri etkilemezken, bol miktarda bulunması anti-enflamatuar kemokin ve sitokinlerin MKH'ler tarafından salgılanmasına sebep olur (Volarevic, 2017). Bu sitokinlerin salgılanmasıyla immün sistem hücrelerinin aktivitesi düzenlenir ve doku homeostazı da sağlanır (M. Wang, 2018).

IL-6 ve TGF- β 1 kombinasyonu naif T hücrelerinin Th17 hücrelerine dönüştürülmesine neden olur (Kim, 2015).

2.2.5.2. Prostoglandin E2 (PGE2)

Mezenkimal kök hücrelerin salgıladığı diğer bir enflamasyon düzenleyici faktör prostaglandin E2 (PGE2)'dir. PGE2, MKH'lerin T lenfosit, NK hücreleri ve makrofajlar üzerindeki baskılayıcı özelliğine katkıda bulunur (M. Wang ve ark., 2018). Araştırmacılar bir fare modelinde MKH'ler ile birlikte IL-10 aracılığıyla PGE2'nin sepsisin tedavisinde önemli role sahip olduğu göstermiştir (Németh, 2009). MKH kaynaklı PGE2, NK hücre aktivitesini baskılamasının yanında, T hücre proliferasyonunu ve sitotoksik etkisini inhibe etmek amacıylaIDO ile birlikte hareket etmektedir (Spaggiari, 2008). MKH'lerin mononükleer hücreler ile ko-kültüre edilmesi çalışmaları göstermiştir ki, PGE2 ve TGF- β 1 stimülasyonu aracılığıyla FoxP3+ Treg hücrelerinin farklılaşması indüklenmektedir (English, 2009).MKH'lerin ürettiği PGE2, dendritik hücrelerin yüzeyindeki CD40, CD80, CD86 ve MHC-II'nin ifade seviyelerini azaltarak T hücrelerine antijen sunma kabiliyetlerini zayıflatmaktadır. Bu şekilde MKH tarafından üretilen PGE2 aracılığıyla immün baskılama gerçekleşebilmektedir (Volarevic, 2017). Ayrıca hücre kültürü koşullarında PGE2'nin inhibe edilerek ve IL-6 stimülasyonu uygulanarak, dendritik hücre farklılaşmasının baskılanmadığını dolayısıyla dendritik hücre olgunlaşmasında IL-6'dan daha çok PGE2'nin önemli olduğu gösterilmiştir (Spaggiari ve ark., 2009).

2.2.5.3. İnterlökin-10 (IL-10)

IL-10, MKH'ler tarafından düzenlenen immünomodülasyonda önemli role sahiptir. Monositler ve dendritik hücreler dahil olmak üzere antijen sunan hücreler MKH'ler ile birlikte IL-10 salgılanmasına katkıda bulunmaktadırlar. Örneğin, MKH aracılı IL-10, nötrofillerin hücre göçü kabiliyetini engellediği rapor edilmiştir (M. Wang, 2018).

2.2.5.4. Sinir Büyüme Faktörü (NGF)

Sinir büyüme faktörü (NGF), sempatik ve duyuşal nöronların büyümesini ve farklılaşmasını düzenleyen bir polipeptiddir (Levi-montalcini, 1991). NGF, hasar görmüş sinirleri onarabilir, Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkları önleyebilir ve nöroblastların nöron hücrelerine farklılaşmasını sağlayabilir (Fan, 2011). Ayrıca NGF, nöral gelişimde anti-apoptotik özelliğe sahip ilk nörotrofik moleküldür. İlave olarak NGF, aksonları ve miyelin kılıfı enflamatuar hasardan korur ve bağışıklık sistemini modüle etmektedir. NGF, Kİ-MKH'lerin nöron hücrelerine farklılaşmasında önemli role sahiptir (Yuan, 2013). Mezenkimal kök hücreler bazı büyüme faktörlerinin yanı sıra beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), NGF ve retinoik asit gibi nöronal farklılaşmayı sağlayan faktörler de salgırlar. MKH sekretomları beyin bölgesinde nöral progenitörlerin farklılaşmasını ve proliferasyonunu tetiklemektedir. Yapılan çalışmalarda nöral farklılaşmada sekretomların önemli olduğu ve PC-12 farklılaşmamış nöron hücrelerinin kültür ortamının MKH'ler üzerine verilmesiyle mezenkimal kök hücrelerin nöron hücrelerine farklılaşma kapasitesini %50 artırdığı görülmüştür (Srivastava, 2018). MKH'ler salgıladığı BDNF ve NGF gibi nörotrofik faktör ile omurilik hasarını hafifletmektedir. Ayrıca MKH'lerin salgıladığı NGF'in p75 reseptörü aracılığıyla hepatik hücre apoptozunu indüklediği ve bu şekilde karaciğer fibrozunu azalttığı görülmüştür (Harrell, 2019).

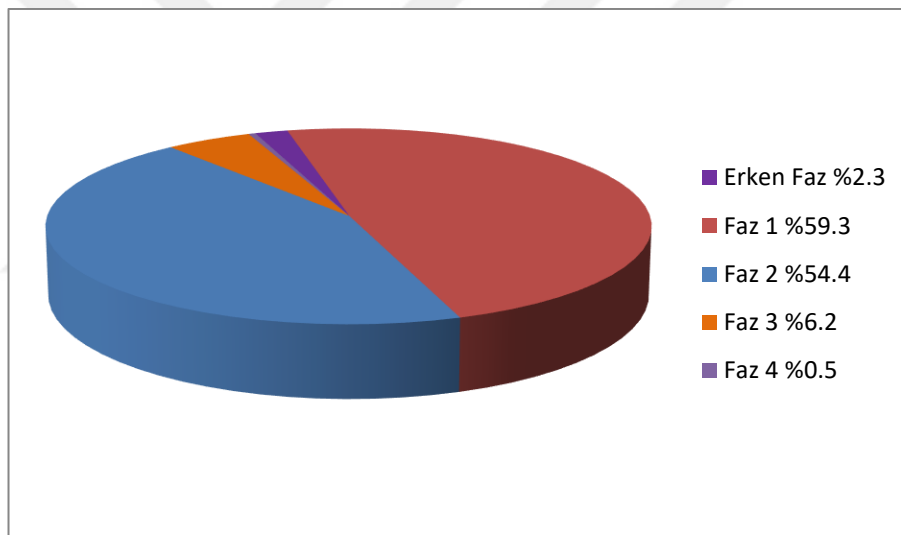
2.2.5.5. Netrin-1

Netrinler, nöral hücre gelişimi sırasında nöronal hücrelerin ve aksonların büyümesine ve göçüne katkı sağlayan bir protein ailesidir (Ke ve ark., 2015). Netrin-1, epitel hücrelerin göçünü, çoğalmasını, farklılaşmasını, yapışmasını ve hayatta kalmasını destekleyen önemli bir aracı proteindir. Ayrıca mezenkimal kök hücrelerin göçünde önemli rol oynayan bir anjiyojenik faktördür. Netrin-1'in merkezi sinir sisteminde kan damarı oluşumunu desteklediğini ve serebrovasküler gelişimi üzerinde iyileştirici etkiye sahip olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (Ke ve ark., 2016).

2.2.6.Mezenkimal Kök Hücrelerin Hücre Tedavideki Rolü

Hücre terapisi, birçok geleneksel tedavi yöntemlerine göre alternatif olarak kullanılan bir rejeneratif tıp tedavi yöntemidir. Kök hücre temelli hücre terapisi, kök

hücrelere herhangi bir gen eklenerek ya da eklenmeden hasarlı dokuya direkt olarak verilmesi sürecidir. Hematopoietik kök hücreler uzun süredir tedavi amacıyla allojenik olarak hastalara transplante edilmektedir. Yapılan araştırmalara göre embriyonik kök hücrelerin de farklı hücre tiplerine farklılaşabildiği keşfedildiğinden bu yana rejeneratif tıp alanında hücre tedavisinde kullanılmak üzere umut vaat ettiği görülmektedir. Bu hücreler izolasyonundan dolayı etik problemler yarattığından indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin tedavide kullanılması daha cazip gelmektedir. Fakat bu iki hücre çeşidinin de teratom oluşturma riskinden dolayı tedavi açısından güvenilirliği tartışmalıdır. Bu yüzden etik kaygı oluşturmamayan mezenkimal kök hücrelerin kullanılması fikri öne atılmıştır (Wei ve ark., 2013). Clinicaltrials.gov verilerine göre mezenkimal kök hücre temelli tedavi olarak farklı faz aşamalarında yürütülen toplam 979 çalışma bulunmaktadır (Şekil 2.2.6)



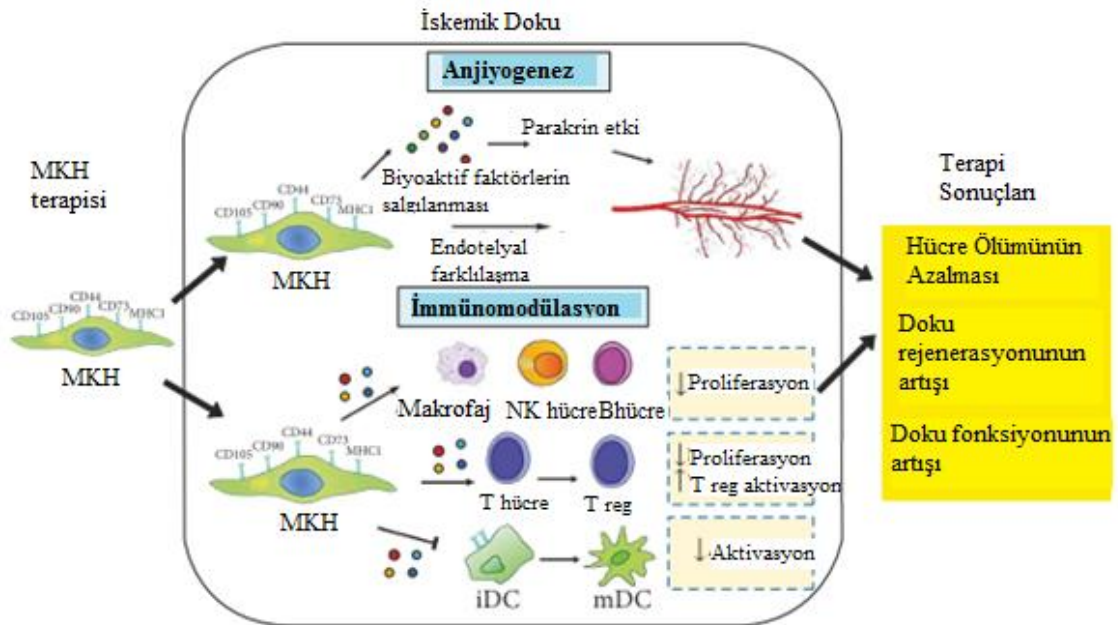
Şekil 2.2.6.1. Mezenkimal kök hücre temelli tedavilerin faz çalışmalarına göre dağılımı (Clinicaltrials.gov)

Mezenkimal kök hücrelerin birçok hücre tipine farklılaşmasının yanında salgıladığı moleküller ve ekzozomal veziküller ile sağladığı parakrin etki ile bağışıklık tepkisini düzenlemesi tedavi alanında önemli gelişmeler sağlamıştır. Son yıllarda tedavi amaçlı mezenkimal kök hücrelerin kullanılması açısından çok fazla çalışma yapılmıştır. Fakat MKH temelli tedavi çalışmalarında bazı yan etkilerin olduğu da göz ardı edilmemelidir (Lukomska, 2019).

MKH'ler immünmodülasyon ve anjiyogenez için birçok faktör salgılayarak doku rejenerasyonunu sağlarlar. MKH'lerin iskemiye önlemek için kan damarlarının onarılmasına efektif T hücrelerini baskılayarak fayda sağladığı ve onarımı hızlandırdığı

belirtilmiştir. Hasarlı damar bölgesinde vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi faktörler salgılayarak anjiyogenezi artırır ve yeni endotel hücrelerin oluşmasını sağlayarak doku rejenerasyonunu başlatır. MKH'lerin iskemik bölgede gerçekleştirdiği immünomodülasyon olayları Şekil 2.2.6.2'de gösterilmiştir (Yong, 2018).

Mezenkimal kök hücreler, doku hasarını iyileştirme özelliğine ek olarak,immünregülasyon bozukluğu ilişkili hastalıklara da yararlı katkı sağlamaktadır. Kemik iliği transplantasyonu uygulanan GVHD hastalarında MKH'lerin uygulanmasıyla olumlu sonuçlar alınmıştır. Ayrıca sistemik lupus eritematozus (SLE), multipl skleroz (MS), amiyotrofik lateral skleroz (ALS) ve Crohn hastalığındaMKH'lerin immün baskılayıcı özelliklerinin tedaviyi olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir. Bu konuda Faz 3 aşamasını başarıyla geçen GVHD ve Crohn hastalıklarında kullanılmak üzere FDA onayı alan ilk kök hücre ilacı Osiris'Prochymal klinik vakalarda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Wei ve ark., 2013).



Şekil 2.2.6.2. Mezenkimal kök hücrelerin iskemik bölgede gerçekleştirdiği immünomodülasyon olayları (Yong, 2018)

İnsan mezenkimal kök hücreleri, monositler üzerindeki CD73 ekspresyonunu artırarak kardiyotoksik M1 monositlerini anti-enflamatuar ve kardiyoprotektif M2 monositlerine dönüştürmektedir. Bu CD73+ monosit hücreleri diğer bağışıklık hücrelerini inhibe eden güçlü anti-enflamatuar adozin moleküllerini üretmektedir.

Yapılan çalışmada MKH'lerin fare modeline aktarılmasıyla CD73 ekspresyonu artmış ve miyokard enfarktüsünün azaldığı görülmüştür (Monguió-Tortajada, 2017).

Diyabetis mellitus dünya çapında çok büyük bir sağlık sorunudur. Mezenkimal kök hücrelerin insülin üreten pankreas beta hücrelerinin rejenerasyonunu sağladığı görülmüştür. Dışarıdan sürekli insülin alınması ya da pankreas adacık hücrelerinin nakledilmesine alternatif bir tedavi olarak mezenkimal kök hücrelerin hastaya verilmesi bir çözüm yolu olarak düşünülmüştür. Mezenkimal kök hücrelerin aynı zamanda endojen beta hücrelerini apoptozdan koruduğu, sağladığı parakrin etki ve oluşturduğu mikroçevre ile periferik hücrelerin insülin direncini iyileştirdiği belirtilmiştir (Zang, 2017). Araştırmacılar Wharton Jeli mezenkimal kök hücrelerinin, kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelere kıyasla çok daha iyi farklılaşma yeteneğinin olduğunu ve başarılı bir şekilde insülin üreten pankreas beta hücrelerine dönüşebildiklerini göstermişlerdir. Fakat farklılaşan hücrelerin ömrünün kısa olması temel sorunu teşkil etmektedir(Wu, Wang, 2009).

Mezenkimal kök hücrelerin rejeneratif tıbbın birçok alanında uygulanabilmesi için bazı belirsizliklerin ve şüphelerin cevap bulması gerekmektedir. Örneğin teratom oluşturma riski, hangi hastalığa hangi kaynaktan alınan mezenkimal kök hücrelerin ne kadar dozda verilmesi gerektiği ve bu tedavinin kalıcılığı konularında daha ileri araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yüzden mezenkimal kök hücrelerin immünomodülasyon özelliğini ile doku rejenerasyonu ve iyileşmesinde başarılı sonuçlar alınmasına rağmen klinik olarak uygulanabilmesi için daha birçok kriterin belirlenmesi gerekmektedir (Mundra, 2013).

2.3. Probiyotik Bakteriler ve Mezenkimal Kök Hücreler

Gastrointestinal sistemdeki bakterilerle mezenkimal kök hücrelerin ilişkili olduğu düşünülerek birçok çalışma yapılmıştır. Mezenkimal kök hücreler ile mikrobiyal canlıların etkileşimi incelenerek MKH'ler üzerindeki morfolojik ve fizyolojik değişimler, immünomodülasyon özelliğindeki farklılıklar incelenmiştir. Hem patojen bakteriler hem de probiyotik bakteriler ile MKH'lerin ilişkisi araştırılmıştır. Bu ilişkiyi araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada patojen olarak *Salmonella typhimurium* (ST) ve probiyotik bakteri olarak da *Lactobacillus acidophilus* (LB) kullanılmıştır. ST mezenkimal kök hücrelerin aktivasyonunu engellerken LB'un MKH membranına yapıştığı görülmüştür. Salmonella bakteri topluluğunun MKH göçünü inhibe etmesinin yanında ilginç bir şekilde T hücre proliferasyonunu baskılamasına katkıda bulunduğu

gözlemlenmiştir. LB'un MKH göçünü belirgin bir şekilde değiştirmedeği görülmüştür (Kol, 2014).

Romatoidartrit (RA) bağırsak mikrobiyotası ile ilişkilendirilen otoimmün bir hastalıktır. RA, Th17 hücreleri ile Treg arasındaki dengesizlikten kaynaklanan enflamatuvar yanıttır. RA hastalığına sahip farelere insan göbek kordonu mezenkimal kök hücreleri verilmiş ve kontrol grubuna kıyasla IL-10 ve TGF- β seviyelerinin arttığı, IL-17a ve TNF- α seviyelerinin azaldığı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre mezenkimal kök hücre transplantasyonunun romatoid artrit hastalığı üzerindeki terapötik etkisini bağırsak mikrobiyotası ile ilişkili olarak etkilediği düşünülmektedir (X. Li, 2020).

Obezite hastalığında bağırsak mikrobiyotası kemik iliği işlevini bozarak hematopoietik kök hücre farklılaşmasını değiştirmektedir. Hem mikrobiyota hem de damarlanmanın yüksek olduğu bağırsak mukozası kronik hipoksi durumuna oldukça duyarlıdır. Bu nedenle kronik hipoksi durumunda bağırsak mikrobiyotası etkilenerek homeostaz değişebilir. Aynı zamanda oksijen, kemik iliği nişinin önemli bir bileşenidir ve kök hücrelerin farklılaşması ve kendini yenileyebilmesi için gereklidir. Bu ilişkiye dayanarak hipoksi durumunda mikrobiyotanın değişmesiyle MKH'lerin de nasıl etkilendiğini anlamak amacıyla bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada kronik hipoksi durumunda kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin olumsuz etkilendiğini fakat *Lactobacillus* takviyesi ile bu kök hücrelerin işlevinin geri kazandırıldığı gösterilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak otolog kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin kullanılarak kronik hipoksi hastalarında rejeneratif tedavi etkinliğinin artırılacağı ileri sürülmüştür (Xing, 2018). Yapılan bu çalışmalar aynı zamanda doğal ve sentetik dokunun çevresel ve mikrobiyal koşullar altında nasıl tepki oluşturduğunu, bu mikrobiyal etkileşimlerin mezenkimal kök hücreler üzerinde neden olduğu değişimleri anlamamızı sağlayacaktır (Shaffiey, 2016).

Nannan Han ve arkadaşları 2020 yılında patojenik ve probiyotik bakteriler arasındaki dengenin mezenkimal kök hücreleri nasıl etkilediğini ve bu etkinin yara iyileşmesine nasıl yansıdığını belirlemek için çalışmalar yapmışlardır. *P. gingivalis* patojenik bakterisinde bulunan lipopolisakkarit, immün yanıtta önemli rol oynayan ve birçok hastalığa sebep olan NLRP3 inflamazomunu aktive ederek MKH'lerin fonksiyonunu inhibe etmektedir. Böylece MKH göçünün inhibe ederek yara iyileşmesini geciktirmektedir. Buna karşılık *L. reuteri* probiyotik bakterisinin MKH'lerin göçünü desteklediği bulunmuştur. Oral *P. gingivalis* patojenik bakterisi ve *L.*

reuteri probiyotik bakterisi arasındaki dengeyi değiştirerek *in vitro* dişeti mezenkimal kök hücrelerin migrasyon, osteojenik farklılaşma kabiliyetinin ve proliferasyon hızının değiştiğini bulmuşlardır. Bu etkinin oral yumuşak doku rejenerasyonunda önemli olabileceğini vurgulamışlardır (Han, 2020).

Sepsisli fare modelinde bağırsak mikrobiyotasında hasarlı olduğu görülmüştür. Bu farelere yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücreler verilmiştir ve etkilerine bakılmıştır. Bu mezenkimal kök hücrelerin enflamatuvar infüzyonunu ve akciğerlerdeki organ hasarını azalttığı görülmüştür. Ayrıca sepsisli farelerde mikrobiyota bozukluğu farkedilmiş ve MKH verildikten sonra yararlı bakterileri artırıp, patojenik bakterileri azaltarak bağırsak mikrobiyotasını değiştirdiği görülmüştür. Bu sonuçlara göre MKH uygulamasının sepsis için bir tedavi modeli olabileceği düşünülmüştür (Sun, 2020).

Mezenkimal kök hücreler probiyotik bakteriler ile etkileşimi sayesinde radyasyon hasarını iyileştirmektedir. *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) probiyotik bakterisinin de bağırsakta radyoprotektif olduğu fare modelinde gösterilmiştir. LGG'nin radyasyondan koruyucu etkisi TLR-2 ve siklooksijenaz-2 (COX-2) bağımlıdır ve COX-2 eksprese eden MKH'lerin epitel hücrelerin yanına göç etmesine katkı sağlamaktadır. LGG, radyoprotektif etkisini PGE2 aracılığıyla sağlamaktadır. COX-2 eksprese eden MKH'lerin salgıladığı PGE2'nin de bağırsak epitel hücrelerini radyasyona bağlı apoptozdan koruduğu görülmüştür (Riehl, 2019).

Mezenkimal kök hücre ve mikrobiyota etkileşimleri MKH üzerinde birçok etkiye sahiptir. Yapılan çalışmaların sonuçlarına bakarak da MKH'lerin Crohn hastalığı, sepsis, kronik hipoksi ve iyileşmeyen yaralar için mikrobiyal bağlamda önemli terapötikler olduğunu görmekteyiz (Kol, 2014).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

İnsan kemik iliği mezenkimal kök hücreleri (ATCC® PCS-500-012™), ısıyla inaktive edilmiş %10 Fetal Bovine Serum (FBS) (Merck, Lot.1347D), %1 penisilin-streptomisin (gibco, Lot.1780183) antibiyotik ile desteklenen Dulbecco's Modified Eagle's Medium Low glukose (DMEM-LG) (sigma, Lot.RNBG5532) içinde, 37 °C %5 CO₂ içeren inkübatörde (ESCO) T25 flasklarda kültüre edildi. Hücre morfolojileri inverted mikroskop (Zeiss) ile takip edildi. Besiyerleri haftada iki kez değiştirildi. Hücreleri deney için tercihen 2. pasajda olmak üzere 6 kuyucuklu platalere ekildi.

3.2. Bakterilerin Kültürasyonu

Peynirden elde edilen *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* ve yoğurttan elde edilen *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* probiyotik bakterileri De Man, Rogosa, Sharpe (MRS) katı besiyerlerine inoküle edildi. *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* ve *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* probiyotik bakterilerinin karakterizasyonu ve tanımlanması için 16S rRNAdizi analizi yapıldı. BLAST analizi ile probiyotik bakterilerin tür doğrulaması gerçekleştirildi.

Katı besiyerinden tek koloni olacak şekilde aldığımız bakterileri otoklavda hazırladığımız 5 ml MRS Broth (Merck, Lot.VM815661 748) besiyeri içerisine ekleyerek 37°C etüvde gece boyu inkübe edildi. Patojenik bakteriler olan *Staphylococcus aureus* (ATCC® 12600™) ve *Enterococcus faecalis* (ATCC® 19433™) 5 ml LB Broth (VWR Chemicals, Lot.1088) içerisine alındı ve gece boyu çalkalamalı inkübatörde 170 rpm 37°C'de inkübe edildi.

Kültüre edilen bakteri örneklerinden 100 µL alınarak antibiyotiksiz DMEM-LG (sigma, Lot.RNBG5532) besiyerine alındı ve gece boyu inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda OD600'de spektrofotometrik ölçümler yapıldı. Log fazında bakteriler en yüksek bölünme yeteneğine ve maksimum gelişme hızına sahip olduklarından dolayı OD değeri ortalama 0,2 olarak belirlendi. Sonrasında bakteri kültürü 9000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Bakteri supernatanı 0,22 µm'lik enjektör filtresinden geçirilerek yeni bir tüpe alındı. Supernatanları deney zamanına kadar -80°C'de saklandı.

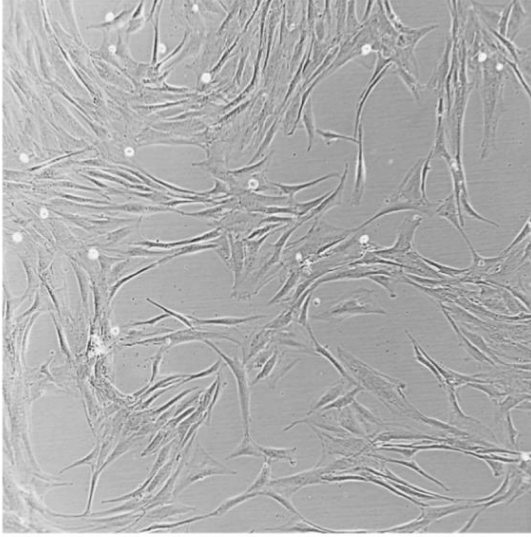
3.3. İnsan Kemik İliği-Mezenkimal Kök Hücrelerin Bakteri Supernatantı ile Muamelesi ve Koşullandırılmış Besiyerlerinin Elde Edilmesi

İnsan kemik iliği-mezenkimal kök hücreleri 96-kuyucuklu kültür kabına bir kuyuda 2000 hücre olacak şekilde ekildi. Ertesi gün, filtre edilen bakteri supernatantları 1:2 şeklinde seri dilüsyon yaparak dört tekrarlı olacak şekilde hücrelere verildi. 48 saat sonunda MTT yöntemi (Sigma, Lot.MKCJ1703) uygulanarak canlılık oranları spektrofotometrik olarak belirlendi. Deney sonucuna göre bakteri supernatantının hücrelere verilebilecek optimum dilüsyon oranı 1:1 (bakteri supernatantı:besiyeri) olarak belirlendi.

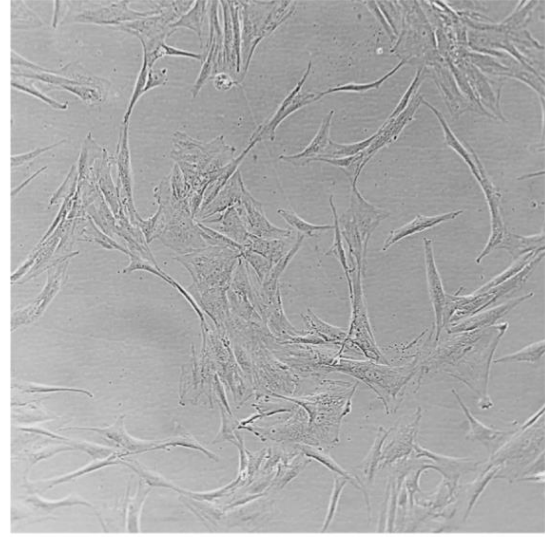


Şekil 3.3.1.Mezenkimal kök hücrelerin bakteri supernatantları ile kültürasyonu.

İnsan kemik iliği-mezenkimal kök hücreleri 6-kuyucuklu kültür kabına 10.000 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. Gece boyu %0,2 FBS %1 Pen-Strep içeren DMEM-LG'de inkübasyona bırakıldı. Besiyerleri aspire edilerek hücreler 1X PBS ile 2 kez yıkandı. Antibiyotik içermeyen DMEM-LG ile 1:1 oranında hazırladığımız bakteri supernatantları ile hücreler muamele edildi. Kontrol hücreler, supernatant içermeyen DMEM-LG ile beslendi. Deney seti 72 saat %5 CO₂'li 37 °C etüvde kültüre edildi. Süre sonunda, besiyeri toplandı ve -80 °C'de saklandı. Hücreler tekrar 1X PBS ile 2 kez yıkandı. Her kuyuya 1 ml %0,2 FBS %1 Pen-Strep içeren DMEM-LG eklendi ve 48 saat boyunca kültüre edildi. Süre sonunda koşullandırılmış besiyerleri elde edildi. Her örnek ELISA deneyleri için 300'er µl tüplere bölündü ve -80 °C'de saklandı.



İnsan KI-MKH DMEM-LG Besiyerinde



İnsan KI-MKH 1:1 L. paracasei supernatant-DMEM-LG Besiyerinde

Şekil 3.3.2. İnsan kemik iliği-mezenkimal kök hücrelerin 20X mikroskop görüntüsü

3.4. Enzym-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Dolaylı ELISA yöntemi kullanılarak koşullandırılmış besiyerindeki miktarlarını belirlemek için TGF- β 1 (LegendMax, Lot.B246843), PGE2 (MyBioSource, Lot.H4233D120), IL-10, Netrin-1 (Bioassay Technology Laboratory, Lot.202008009) ve β -NGF (ThermoScientific, Lot.241061319) ELISA yöntemleri uygulandı. Ticari olarak temin edilen ELISA kitlerinin protokolüne uygun olarak deney prosedürü uygulandı. Optik dansite değerleri (450 nm) MultiscanGO spektrofotometre yardımı ile belirlendi. Elde edilen veriler ile kit içeriğindeki standart grafikler oluşturularak her örneğin ilgili sitokin düzeyi hesaplandı ve elisaanalyses.com online yazılımı kullanılarak analiz edildi ve grafikleri oluşturuldu.

3.5. In vitro Wound Healing Deneyi

İnsan kemik iliği-mezenkimal kök hücreleri 6-kuyucuklu hücre kültür kaplarına konfluent olacak şekilde ekildi. Ertesi gün, 200 μ l pipet ucu yardımı ile kuyunun orta hizasında yara alanı manuel olarak oluşturuldu. 1:1 oranında hazırladığımız bakteri supernatantları ve DMEM-LG besiyeri kuyulara yavaşça verildi. Kültür kaplarındaki yara alanı başlangıçta 0. saat olarak belirlendi ve devamında 6. 12. ve 24. saatlerde kuyuların görüntüleri alındı. Hücre görüntülerindeki yara alanı ImageJ yazılımı yardımı ile hesaplandı ve kontrole kıyasla muamele edilen hücrelerin migrasyon kabiliyetleri analiz edildi.

3.6. İstatistiksel Analiz

ELISA deney sonuçları elisaanalyses.com online yazılımı ile değerlendirildi. Elde edilen verilerin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri hesaplandı. GraphPad Prism 8 online yazılımı kullanılarak t testi yapıldı, güven aralıkları ve p değerleri hesaplandı. Sonuçların istatistiksel anlamlılık düzeyleri belirlendi ve grafikleri çizildi.



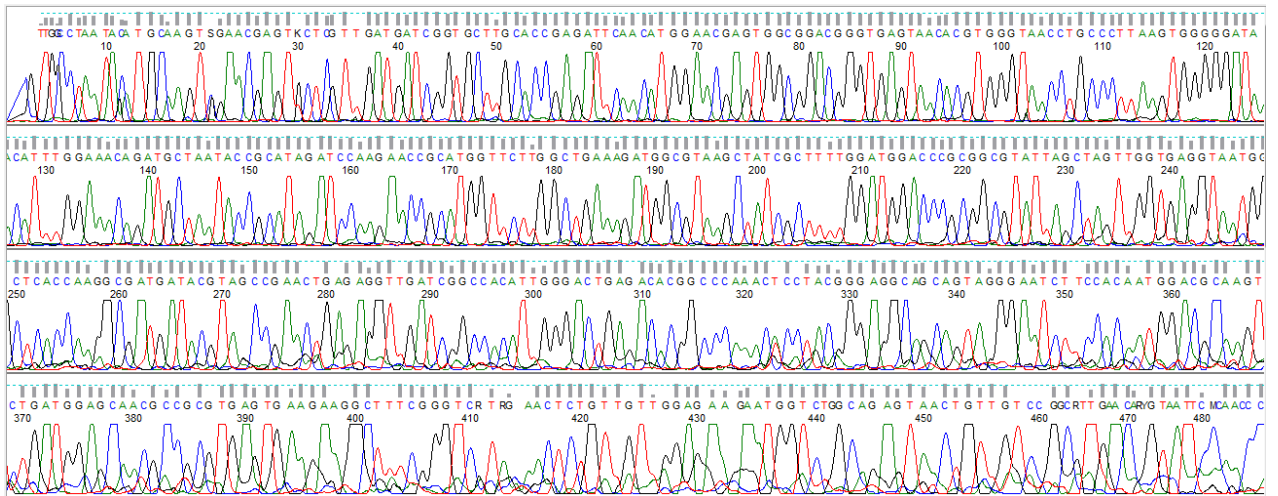
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

Tez projesi kapsamında probiyotik bakterilerin log fazında salgıladığı ekstraselüler faktörlerin kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin immünomodülatör özellikleri üzerindeki etkisini araştırdık. Öncelikle izole edilen probiyotik bakterilerin 16S rRNA dizi ve BLAST analizlerini yaparak karakterize ettik ve sistematik türlerini doğruladık. İzole edilen probiyotik bakterileri ve temin edilen patojenik bakterileri uygun besi ortamlarında çoğalttık. Bakteri kültürlerinin log fazındaki supernatantlarını elde ettik ve kültüre edilen insan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerini bu elde ettiğimiz supernatant ile muamele ettik. MKH'lerin salgıladığı immünomodülatör faktörlerin seviyesindeki değişimleri ELISA yöntemi ile değerlendirdik. Ayrıca MKH'lerin bakteriyel faktörlerin varlığında migrasyon kabiliyetindeki değişimleri de in vitro wound healing deneyi ile inceledik.

4.1.1. Probiyotik Bakterilerin 16S rRNA Dizi Analizleri ve BLAST Verileri

Lactobacillus paracasei subsp. paracasei ve *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* probiyotik bakterilerinin 16S rRNA dizi analizi klasik Sanger sekans yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi ve BLAST algoritması ile sekans sonuçları doğrulandı.



Şekil 4.1.1.1. *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* 16S rRNA dizi analizi

Lactobacillus paracasei subsp. paracasei strain 28-140 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

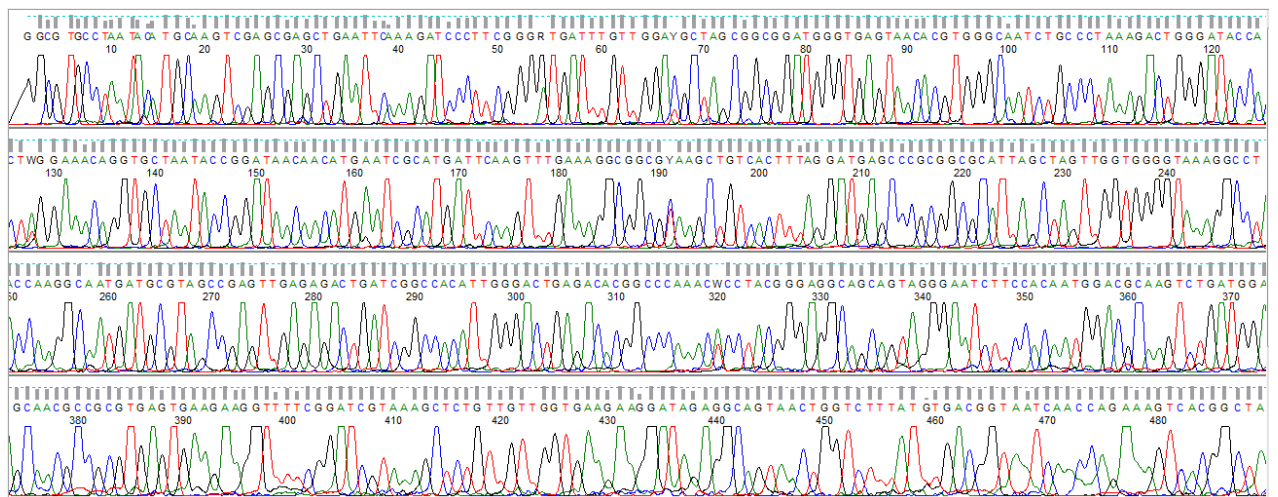
Sequence ID: [HQ697606.1](#) Length: 510 Number of Matches: 1

Range 1: 44 to 504 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
803 bits(890)	0.0	454/462(98%)	1/462(0%)	Plus/Plus
Query 4	GCCTAATACATGCAAGTSGAACGAGTKCTCGTTGATGATCGGTGCTTGCACCGAGATTCA	63		
Sbjct 44	GCCTAATACATGCAAGTSGAACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGCACCGAGATTCA	103		
Query 64	ACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGA	123		
Sbjct 104	ACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGA	163		
Query 124	TAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCAGCATGGTTCTTGGCTG	183		
Sbjct 164	TAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCAGCATGGTTCTTGGCTG	223		
Query 184	AAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGG	243		
Sbjct 224	AAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGG	283		
Query 244	TAATGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGG	303		
Sbjct 284	TAATGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGG	343		
Query 304	ACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACG	363		
Sbjct 344	ACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACG	403		
Query 364	CAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCRTRGAACTCTGTT	423		
Sbjct 404	CAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCRTRGAACTCTGTT	463		
Query 424	GTTGGAGAAGAATGGTCTGGCAGAGTAACTGTTGTCCGGCRT	465		
Sbjct 464	GTTGGAGAAGAATGGTC-GGCAGAGTAACTGTTGTCCGGCGT	504		

Şekil 4.1.1.2. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 16S rRNA BLAST analizi



Şekil 4.1.1.3. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 16S rRNA dizi analizi

Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus strain IMAU40158 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [FJ915696.1](#) Length: 1460 Number of Matches: 1

Range 1: 6 to 672 [GenBank](#) [Graphics](#)

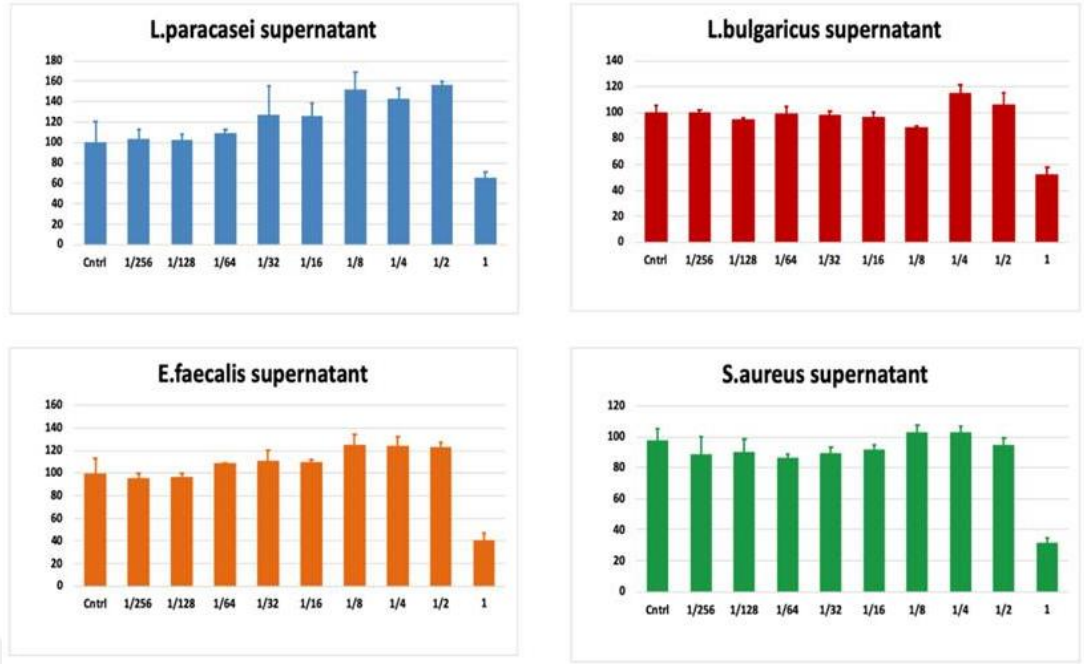
[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1098 bits(594)	0.0	643/671(96%)	4/671(0%)	Plus/Plus
Query 1	GGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGCTGAATTCAAAGATCCCTTCGGGRTGATTT	60		
Sbjct 6	GGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGCTGAATTCAAAGATCCCTTCGGGRTGATTT	65		
Query 61	GTTGGAYGCTAGCGGGGATGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTAAAGACTGGGA	120		
Sbjct 66	GTTGGACGCTAGCGGGGATGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTAAAGACTGGGA	125		
Query 121	TACCACTWGGAAACAGGTGCTAATACCGGATAACAACATGAATCGCATGATTCAAGTTTG	180		
Sbjct 126	TACCACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGGATAACAACATGAATCGCATGATTCAAGTTTG	185		
Query 181	AAAGGCGGCGYAAAGCTGTCACTTTAGGATGAGCCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGG	240		
Sbjct 186	AAAGGCGGCGCAAGCTGTCACTTTAGGATGAGCCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGG	245		
Query 241	TAAAGGCCTACCAAGGCAATGATGCGTAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGG	300		
Sbjct 246	TAAAGGCCTACCAAGGCAATGATGCGTAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGG	305		
Query 301	ACTGAGACACGGCCCAAACWCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACG	360		
Sbjct 306	ACTGAGACACGGCCCAAACWCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACG	365		
Query 361	CAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTT	420		
Sbjct 366	CAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTT	425		
Query 421	GTTGGTGAAGAAGGATAGAGGCAAGTAACTGGTCTTTATGTGACGGTAATCAACCAGAAAG	480		
Sbjct 426	GTTGGTGAAGAAGGATAGAGGCAAGTAACTGGTCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAG	485		
Query 481	TCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTGGTCCGGAK	540		
Sbjct 486	TCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTGGTCCGGAT	545		
Query 541	SKMTTGGSCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGAATGATAAGGCTGATGTGAAAGCCACAGCTC	600		
Sbjct 546	TTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGAATGATAAGTCTGATGTGAAAGCCACAGCTC	605		
Query 601	AGCCGTGGATCTGCATCGGAGACTGCTTTCTTGACTGCAGGAAAACGAAAGTGCACCTG	660		
Sbjct 606	AACCGTGGAACTGCATCGGAACTGTCTTTCTTGAGTGCA-GAAGAGGAGAGTGGAACT-	663		
Query 661	CGCATGCTGTA	671		
Sbjct 664	C-CATG-TGTA	672		

Şekil 4.1.1.4. *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* 16S rRNA BLAST analizi

4.1.2. Bakteriyel Supernatantların Dilüsyon Oranlarının Belirlenmesi

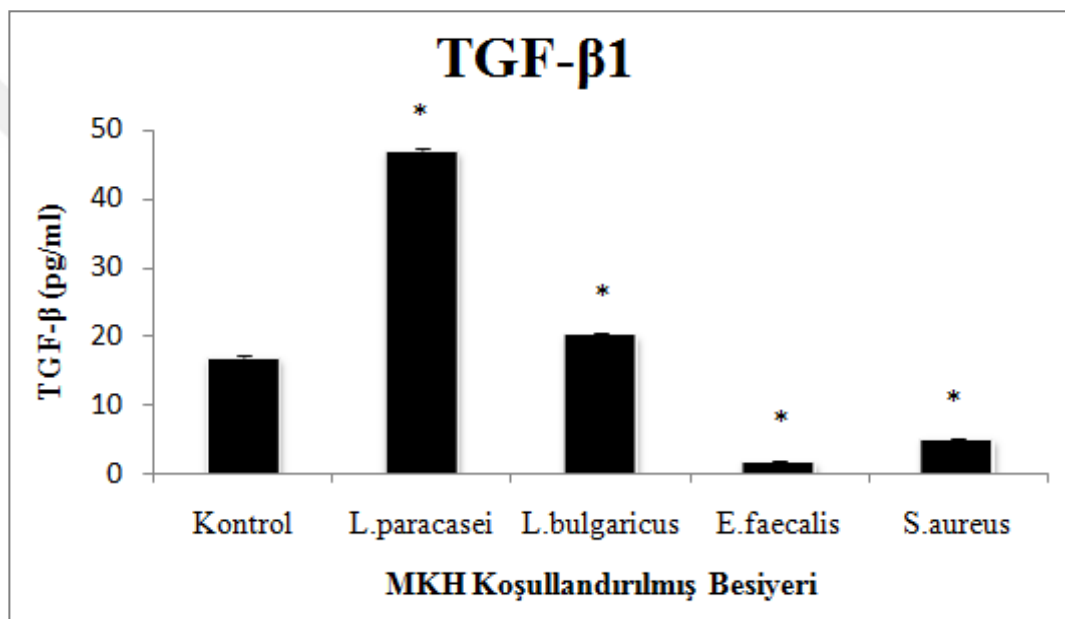
Probiyotik ve patojenik bakterileri 37°C'de çoğaltıldıktan sonra santrifüj ettik ve supernatantlarını 0,22 µm filtreden geçirdik. Bakteri supernatantlarını DMEM-LG ile 1/2 oranında 9 kez dilüsyonlarını oluşturduk. Dilüe ettiğimiz supernatantlar ile kültüre edilen Kİ-MKH'leri 72 saat boyunca muamele ettik. Süre sonunda MTT testi yardımı ile Kİ-MKH'lerin canlılık düzeylerini belirledik. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, dilüe edilmeyen bakteriyel supernatantların hücreler üzerinde toksik etkiye neden olduğunu belirledik. 1:1 oranında seyrelttiğimiz supernatantların ise Kİ-MKH'lerin üzerinde toksik etkiye neden olmadığını, hatta istatistiksel olarak anlamlı olmasa da proliferasyonlarına olumlu etki sağladığını ve buna göre 1:1 dilüsyonun deneysel aşamalarda kullanılabileceğini belirledik.



Şekil 4.1.2. Bakteri supernatantının dilüsyon oranının MTT testi ile belirlenmesi

4.1.3. Kİ-MKH'lerin TGF-β1 Üretim Düzeyleri

Probiyotik ve patojenik bakterilerin supernatantları ile muamele edilen Kİ-MKH'lerin koşullandırılmış besiyerindeki TGF-β1 konsantrasyonlarını ELISA yöntemi ile belirledik. *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* ve *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* supernatantları ile koşullandırılmış besiyerlerindeki TGF-β1 konsantrasyonları kontrole göre sırasıyla %178 ve %20 oranlarında artmış olduğunu saptadık. Ayrıca, *Enterococcus faecalis* ve *Staphylococcus aureus* patojenik bakteri supernatantları ile koşullandırılmış besiyerlerinde ise TGF-β1 konsantrasyonları sırasıyla %90 ve %70 oranlarında azalmış olduğunu belirledik.



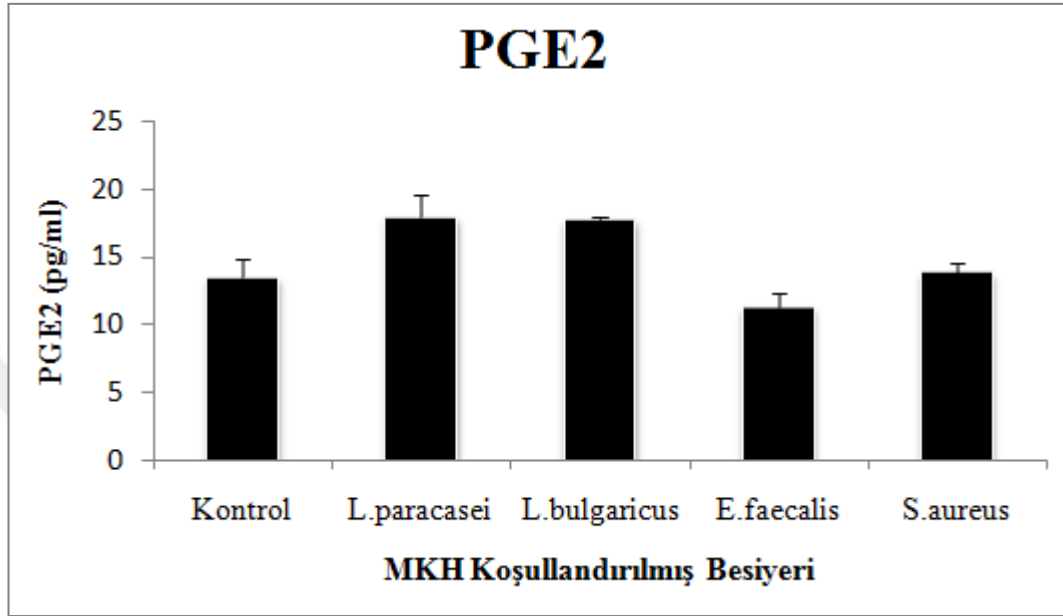
Şekil 4.1.3. Mezenkimal kök hücrelerin koşullandırılmış besiyerindeki TGF-β1 seviyesinin kontrole göre değişim grafiği

Ayrıntılı olarak, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* ve *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* supernatantları ile muamele edilen Kİ-MKH'lerin ürettiği TGF-β1 seviyeleri kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olarak sırasıyla 1,8 ve 1,2 kat artışı gözlemledik ($p=0,0002$ ve $p=0,0121$). *Enterococcus faecalis* ve *Staphylococcus aureus* patojenik bakteri supernatantları ile kültüre ettiğimiz Kİ-MKH'lerin ürettiği TGF-β1 seviyesleri ise istatistiksel olarak anlamlı 10,4 ve 3,3 kat azalmış olduğunu belirledik ($p=0,006$ ve $p=0,0008$).

4.1.4. Kİ-MKH'lerin PGE2 Üretim Düzeyleri

Lactobacillus paracasei subsp. paracasei ve *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* supernatantlarını ile muamele ettiğimiz Kİ-MKH'lerin koşullu besiyerlerinde

PGE2 düzeylerinde kontrole kıyasla %33,2 ve %32 oranlarında artış gözlemledik. Patojen *Enterococcus faecalis* ve *Staphylococcus aureus* supernatantları ile muamele ettiğimiz Kİ-MKH'lerin koşullu besiyerlerindeki PGE2 seviyesi sırasıyla %16 ve %2,7 oranında azaldığını belirledik.

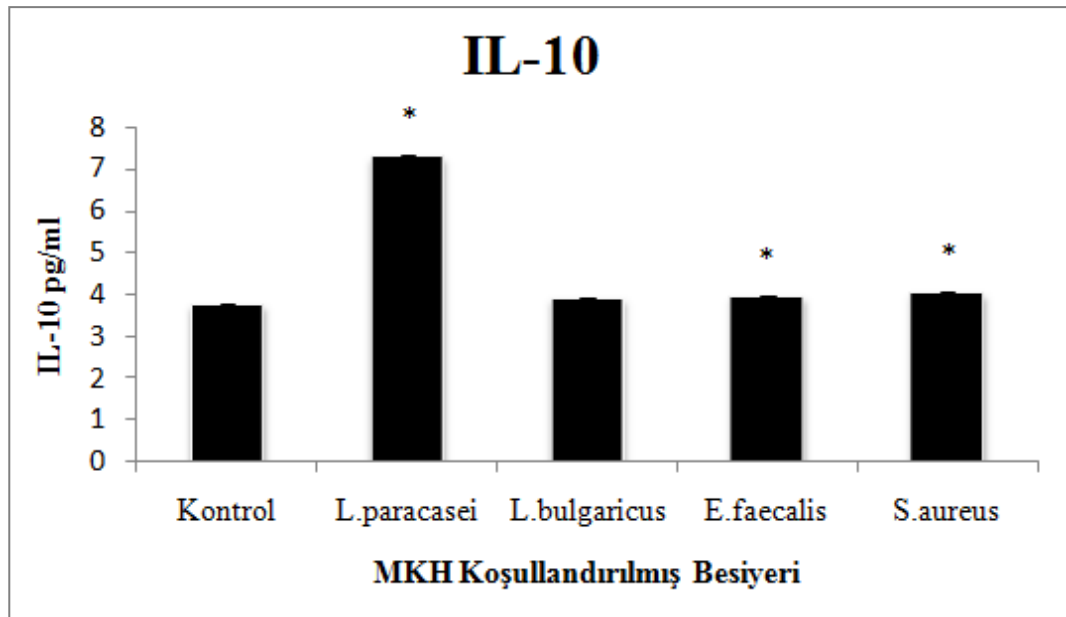


Şekil 4.1.4. Mezenkimal kök hücrelerin koşullandırılmış besiyerindeki PGE2 seviyesinin kontrole göre değişim grafiği

Kat artışlarına baktığımızda, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* ve *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* supernatantları ile kültüre ettiğimiz Kİ-MKH'lerin ifade ettiği PGE2 seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmese de her ikisinde de yaklaşık 1,3 kat artış gözlemledik ($p=0,1752$ ve $p=0,0915$). Patojenik bakteri supernatantları ile muamele ettiğimiz Kİ-MKH'lerin ürettiği PGE2 seviyelerinde azalma olsa da anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir ($p=0,3324$ ve $p=0,8382$).

4.1.5. Kİ-MKH'lerin IL-10 Üretim Düzeyleri

Probiyotik ve patojenik bakterilerin supernatantları ile muamele edilen Kİ-MKH'lerin ürettiği IL-10 seviyelerinin değişimini ELISA yöntemi ile belirledik. *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* supernatantı ile muamele edilen Kİ-MKH'lerin IL-10 salımını farkedilir bir şekilde %93 oranında artmış olduğunu belirledik. *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus*, *Enterococcus faecalis* ve *Staphylococcus aureus* supernatantları ile muamele edilen hücrelerde ise sırasıyla %3,9 %4,8, ve %7 oranında artırmıştır.

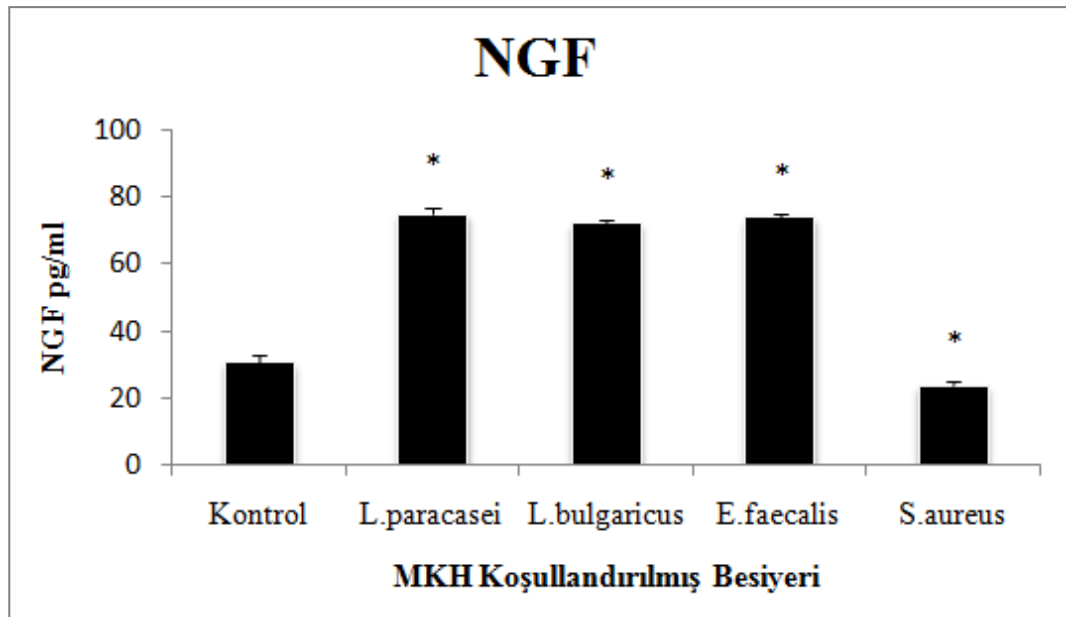


Şekil 4.1.5. Mezenkimal kök hücrelerin koşullandırılmış besiyerindeki IL-10 seviyesinin kontrole göre değişim grafiği

Lactobacillus paracasei subsp. paracasei ekstraselüler faktörleri ile kültüre ettiğimiz Kİ-MKH'lerinin koşullandırılmış besiyerindeki IL-10 seviyesinde yaklaşık 1,9 kat artış saptadık ($p=0,0001$). *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus*, *Enterococcus faecalis* ve *Staphylococcus aureus* supernatantları ile kültüre ettiğimiz Kİ-MKH koşullu besiyerlerindeki IL-10 seviyesinde önemli düzeyde bir artış belirlenmemiştir ($p=0,0559$, $p=0,0385$ ve $p=0,0367$).

4.1.6. Kİ-MKH'lerin NGF Üretim Düzeyleri

Lactobacillus paracasei subsp. paracasei, *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* ve *Enterococcus faecalis* supernatantları ile muamele ettiğimiz Kİ-MKH'lerin NGF üretimi miktarlarını kontrole göre kıyasladığımızda %144, %135 ve %141 oranlarında artış belirledik. *Staphylococcus aureus* supernatantı ise Kİ-MKH'lerden NGF salımını %22,3 oranında azaltmıştır.

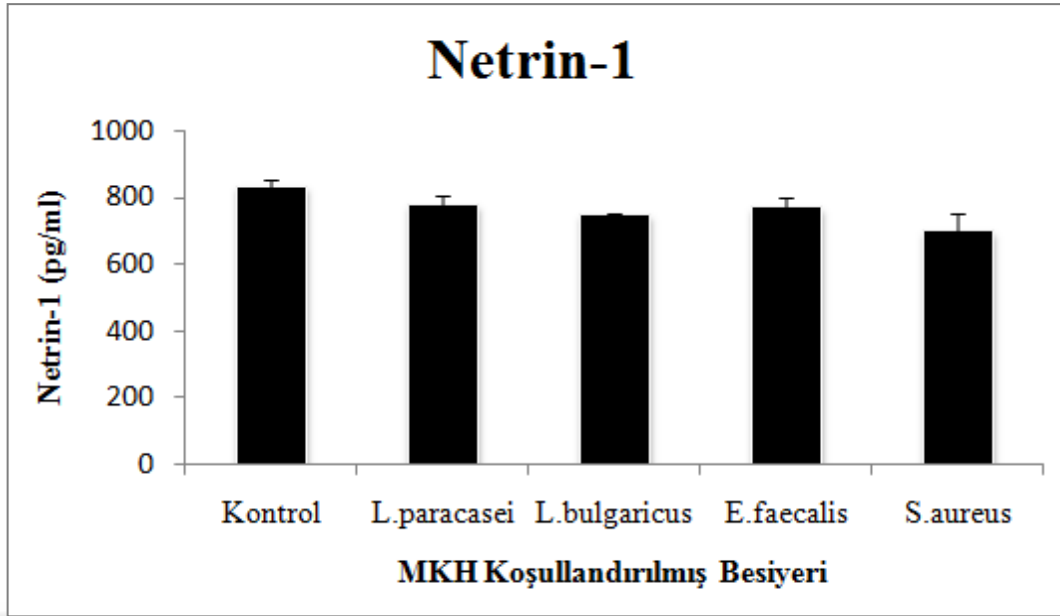


Şekil 4.1.6. Mezenkimal kök hücrelerin koşullandırılmış besiyerindeki NGF seviyesinin kontrole göre değişim grafiği

Lactobacillus paracasei subsp. paracasei ve *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* probiyotik bakteri supernatantları ile kültüre ettiğimiz Kİ-MKH'lerin ifade ettiği NGF seviyeleri kontrole göre kıyasladığımızda sırasıyla 2,4 ve 2,3 kat istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemledik ($p=0,0051$ ve $p=0,0044$). *Enterococcus faecalis* supernatantı da anlamlı bir şekilde Kİ-MKH'lerden NGF salımını 2,4 artırmıştır. *Staphylococcus aureus* supernatantı ile muamelede ise NGF seviyesinde istatistiksel olarak da anlamlı bir değişiklik saptamadık ($p=0,1496$).

4.1.7. Kİ-MKH'lerin Netrin-1 Üretim Düzeyleri

Lactobacillus paracasei subsp. paracasei, *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus*, *Enterococcus faecalis* ve *Staphylococcus aureus* supernatantları ile muamele ettiğimiz Kİ-MKH'lerin Netrin-1 üretimi miktarlarını kontrole göre kıyasladığımızda %6,7, %10,2, %7,7 ve %16,3 oranlarında azalma belirledik.

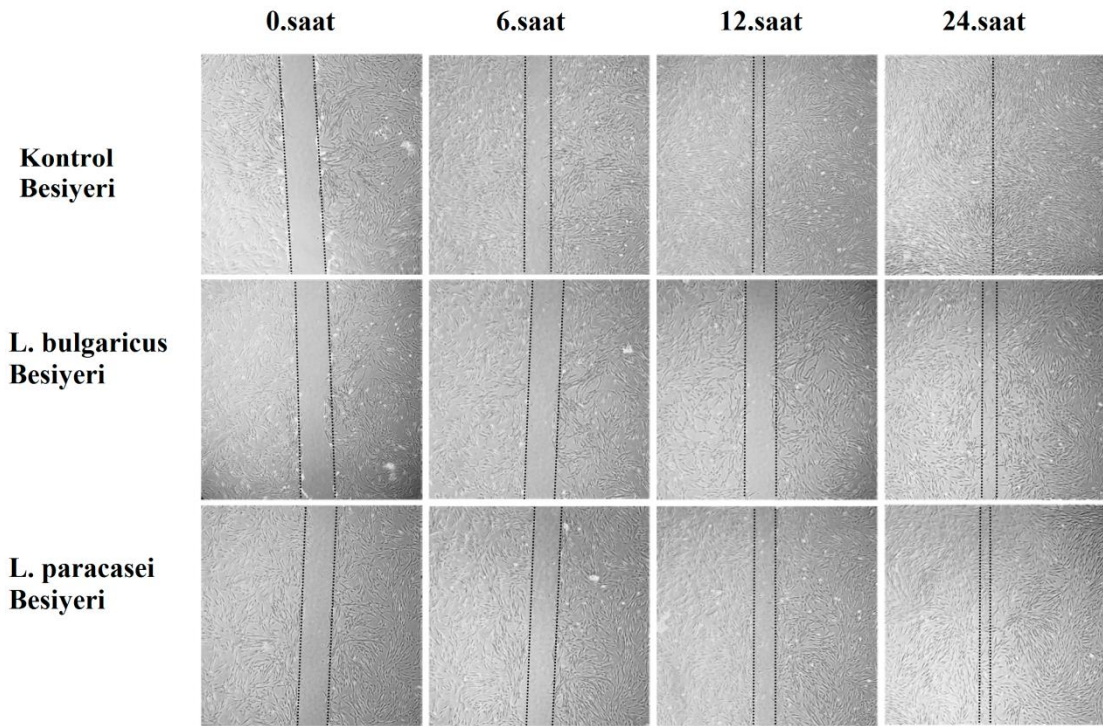


Şekil 4.1.7. Mezenkimal kök hücrelerin koşullandırılmış besiyerindeki Netrin-1 seviyesinin kontrole göre değişim grafiği

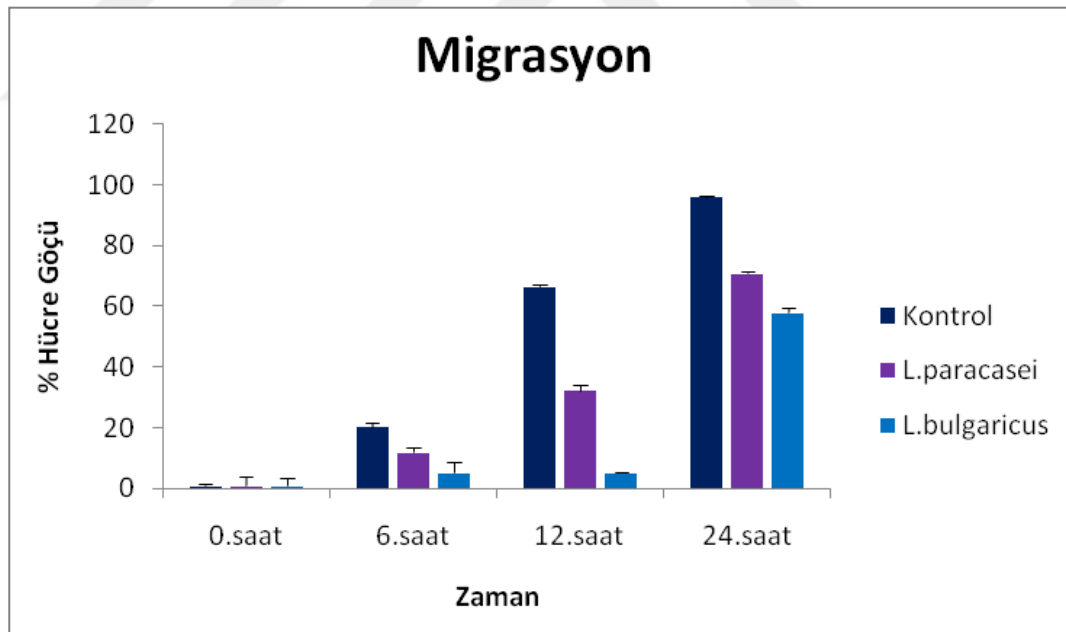
Lactobacillus paracasei subsp. paracasei ve *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* probiyotik bakteri supernatantları ile kültüre ettiğimiz Kİ-MKH'lerin ifade ettiği Netrin-1 seviyelerini kontrole göre kıyasladığımızda istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemektedir ($p=0,2792$ ve $p=0,0599$). Aynı şekilde *Enterococcus faecalis* ve *Staphylococcus aureus* supernatantı da Kİ-MKH'lerden Netrin-1 salımını anlamlı bir şekilde değiştirmemiştir ($p=0,2148$ ve $p=0,1594$).

4.1.8. Ekstraselüler Probiyotik Faktörlerin Kİ-MKH'lerin Hücre Göçü Kabiliyetleri Üzerindeki Etkisi

İnsan Kİ-MKH'lerinin probiyotik bakteri supernatantlarının Kİ-MKH'lerin migrasyon kabiliyetleri üzerindeki etkilerini 24 saat kültüre ederek değerlendirdik. Kontrole göre kıyasladığımızda *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* ve *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* ekstraselüler faktörleri Kİ-MKH'lerin migrasyon yeteneğini azaltmaktadır. Hücre kültürü görüntülerinde 24. saatte kontrol kuyusunda oluşturduğumuz yara alanında kapanma görülürken, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* ve *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* supernatantları ile kültüre edilen hücrelerde migrasyon kabiliyeti azalmış olduğundan yara alanında beklenen kapanma görülmemektedir.



Şekil 4.1.8.1. MKH'lerin *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* ve *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* supernatantları ile kültürasyonunda migrasyon kabiliyeti değişimi



Şekil 4.1.8.2. MKH'lerin *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* ve *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* ekstraselüler faktörleri ile muamelesi sonrasında hücre göçündeki % değişimi grafiği

24. saat sonunda normal besiyeri ile kültüre ettiğimiz kontrol kuyusunda, yara alanında %96 kapanma gerçekleşti. *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* ve *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* ekstraselüler faktörleri ile kültüre ettiğimiz

Kİ-MKH'leri ise 24. saat sonunda, oluşturduğumuz yara alanında %70 ve % 57 kapanma gerçekleştirdi.

4.2. Tartışma

Probiyotik bakteriler bağışıklık sistemini geliştirmeye ve bağırsaktaki patojenik bakteriler ile dengenin sağlanmasına katkıda bulunurlar. Bu özellikleri sayesinde takviye gıda ve tedavi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (La Fata, 2018). Mezenkimal kök hücreler (MKH) HLA sınıf II ifade etmediğinden bu hücreler düşük immünojeniteye sahiptir. MKH'ler doğrudan ya da salgıladığı sitokinler ve aracı faktörler ile immün sistem hücrelerini etkiler ve immün sistemi baskılayarak modüle eder (Börger, 2017). Bugüne kadar probiyotik bakterilerin ve mezenkimal kök hücrelerin terapötik etkisini araştıran birçok çalışma yapılmıştır. Fakat probiyotik bakteriler ve mezenkimal kök hücrelerin birbirleri ile etkileşimini inceleyen çok az çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada probiyotik bakterilerin ortama salgıladığı moleküllerin insan Kİ-MKH'ler üzerinde nasıl bir etkisi olduğunu ve bu MKH'lerin immünomodülatör sitokin seviyelerini nasıl değiştirdiğini araştırdık.

TGF- β 1, MKH'lerin sinerjistik olarak salgıladığı, iyi bilinen bir immün baskılayıcı faktördür. MingfenLi ve arkadaşları Kİ-MKH'lerini izole ettikleri CD8+ T hücreleri ile beraber kültüre ettikten sonra T hücrelerinin baskılandığını göstermişlerdir. Bu baskılamanın MKH'lerin salgıladığı faktörler aracılığıyla olduğunu ileri sürmüşlerdir. Daha sonra Kİ-MKH'ler ile CD8+ T hücrelerin beraber kültürasyonunda normal kültüre göre TGF- β 1 ve PGE2 seviyelerinin arttığını bulmuşlardır. TGF- β 1 ve PGE2 inhibitörleri kullandıklarında T hücre baskılamasının azaldığını göstererek bu düşüncelerini doğrulamışlardır. Kİ-MKH'lerin immün baskılayıcı özelliğinin bu çözünür faktörler aracılığıyla sağlanması GVHD gibi hastalıklar için önemli ve araştırılabilir bir bulgu olmuştur (M. Li, 2014).Daneshmandi ve arkadaşları TGF- β 1'i aşırı eksprese eden MKH'ler tasarlamış ve bu tasarlanmış MKH'leri Tip 1 diyabet hastalığına sahip farelere enjekte etmişlerdir. Diyabetik hayvan modellerinde kontrol grubuna kıyasla MKH'lerin pro-enflamatuar Th1'lerin anti-enflamatuar Th2'lere polarizasyonunu indüklediği görülmüştür. Sonucunda serumdaki insülin seviyesinin arttığını ve farelerde iyileşme sağladığını göstermişlerdir (Daneshmandi ve ark., 2017). Biz de yaptığımız çalışmada Kİ-MKH'ler tarafından salgılanan TGF- β 1 seviyesinin probiyotik *Lactobacillus paracasei subsp.* ve *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* bakterileri tarafından artırıldığını, buna dayanarak da probiyotik-MKH ilişkisiyle Kİ-

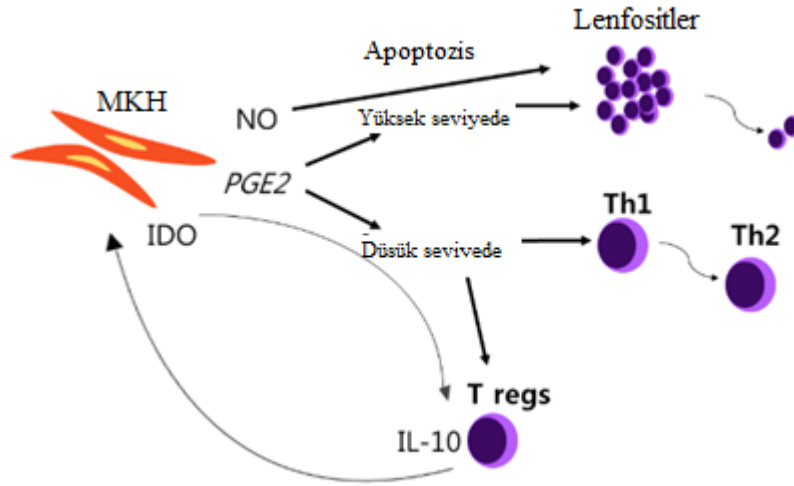
MKH'lerin salgıladığı çözünür faktörlerin terapötik özelliğini artırabileceğini düşünmekteyiz.

PGE2'nin MKH aracılı inhibisyonda önemli bir faktör olduğu yapılan çalışmalarda belirlenmiştir. Spaggiari ve arkadaşları dendritik hücrelerin olgunlaşmasını indükleyen monositler ile kemik iliği mezenkimal kök hücreleri beraber kültüre etmişler ve sadece MKH kültür şartlarına göre monositler ile beraber kültürasyonda PGE2 seviyesinin arttığını bulmuşlardır. Ortama PGE2 inhibitörü eklendiğinde dendritik hücre olgunlaşmasının gerçekleştiğini, IL-6'nın tek başına dendritik hücre inhibisyonunu sağlayamadığı anlaşılmıştır. Bu sebepten dolayı MKH aracılı inhibisyonda PGE2'nin önemli bir faktör olduğunu göstermişlerdir (Spaggiari, 2009). PGE2, COX1 ya da COX2 aracılığıyla membran fosfolipitlerinden salınır (Jiang, 2020). Wang ve arkadaşları akut karaciğer yetmezliğinin tedavisinde MKH'den salgılanan PGE2'nin rolünün belirsizliğini ortadan kaldırmak için çalışmalar yapmışlardır. PGE2 sentezi COX2 aracılığıyla üretildiğinden dolayı öncelikle MKH'lerde lentivirüs ile COX2 inhibe (-) ve COX2 aşırı eksprese (+) hücre tipleri elde edildi. Karaciğer hasarı model çalışmalarında, MKH ve MKH COX2(+) hücrelerinin koşullandırılmış besiyerleri ile kültüre edildiğinde hepatosit hücrelerinin nekroz ve apoptozunu azalttığı, aksine MKH COX2(-) hücre besiyerlerinin ise hepatosit hücreleri üzerinde etkisinin olmadığı immünohistokimyasal yöntem ile anlaşılmıştır. Ayrıca akut karaciğer yetmezliğinde aktive olan NF-κB sinyal yolağının, MKH ve MKH COX2(+) hücrelerinin salgıladığı PGE2 aracılığıyla inaktive olduğu, MKH COX2(-) hücrelerinin ise iyileşmede hiçbir etkisi olmadığı gösterildi. Ek olarak MKH'lerin salgıladığı PGE2'nin pro-enflamatuar M1 makrofajlarının anti-enflamatuar M2 makrofajlarına polarizasyonunu da indüklediği gösterilmiştir (Jinglin Wang ve ark., 2021). Biz de MKH aracılı immünomodülasyonda PGE2'nin önemli role sahip olduğunu bilerek, elde ettiğimiz bakteri supernatantlarının Kİ-MKH'lerden PGE2 salınımını ne şekilde değiştireceğini inceledik. Bulgularımıza göre probiyotik bakteriler olan *Lactobacillus paracasei* ve *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* supernatantlarındaki ekstraselüler çözünür faktörler Kİ-MKH'lerden salınan PGE2 miktarını artırdı. MKH temelli hücresel tedavilerde bu artışın önemli olabileceğini ve enflamasyonu yüksek oranda azaltabileceğini düşünmekteyiz. Daha önce yapılan çalışmalarda MKH'den salgılanan PGE2'nin doza bağlı olarak immün baskılamada önemli bir biyoaktif lipid olduğu görülmüştür. Fakat bu artışın probiyotik bakteriler tarafından indüklendiğini bildiren çok az çalışma bulunmaktadır. Bakteri

çözünür faktörlerinin MKH'leri indüklemesiyle PGE2 aracılı immün regülasyonun sağlanması yeni bir yaklaşım modeli oluşturmaktadır.

TGF- β ve PGE2'e ek olarak IL-10 da immün baskılayıcı sitokinlerdendir (Jiang, 2020). IL-10 ekspresyonu PGE2 ve TLR ligandları tarafından artırılabilir (Saraiva, 2010). Javorkova ve arkadaşları ALS (Amiyotrofik Lateral Skleroz) hastalarından ve sağlıklı donörlerden elde edilen MKH'lerin IL-10 ve TNF- α üretimlerini test ettiklerinde önemli bir fark tespit edememişlerdir. Bununla birlikte pro-enflamatuar sitokin seviyesi yüksek ALS hastalarından elde edilen MKH'lerin ürettiği immün baskılayıcı sitokin miktarının da düşük olduğu belirlenmiştir (Javorkova et al., 2019). Bu araştırma sonucunda MKH'lerin bulunduğu mikroçevrenin immünomodülasyon etkisi üzerinde ne kadar önemli bir kriter olduğunu vurgulayabiliriz. Biz de bu verilere dayanarak Kİ-MKH'leri probiyotik bakteri supernatantları ile muamele ederek hücrelerin immün baskılayıcı özelliğini artırabileceğimizi düşündük. Yaptığımız in vitro çalışmalarda bakteri supernatantlarındaki ekstraselüler faktörlerin Kİ-MKH'lerin ürettiği PGE2, TGF- β ve IL-10 gibi immün baskılayıcı faktörlerin miktarında artışa neden olduğunu belirledik.

MKH'lerin immün baskılayıcı özelliğini özellikle Treg hücrelerinin artması ve Th1 hücre proliferasyonunun azalması yoluyla gerçekleştirdiği bilinmektedir (Engela ve ark., 2012). MKH'lerin ürettiği PGE2'nin T hücre regülasyonu üzerindeki etkisi miktara bağlı olarak değişiklik göstermektedir. PGE2'nin yüksek seviyede bulunması T lenfosit hücre proliferasyonunu azaltarak IL-2 ve IL-2 reseptörünü inhibe etmektedir. PGE2 düşük seviyede bulunuyorsa Th1 lenfositlerinin Th2 lenfositlerine dönüşmesini indükleyerek daha düzenleyici bir etki göstermektedir. Ayrıca PGE2'nin düşük miktarda bulunması Foxp3+ Treg hücrelerinin de aktivasyonunu sağlamaktadır (Şekil 4.2) (Burr ve ark., 2013). Bu önemli bir özelliktir. Çünkü hem MKH'lerin hem de Treg hücrelerinin beraber terapisinde kullanılması fırsatını sağlamaktadır. MKH ve Treglerin birbirleri ile etkileşime girmeden sinerjistik olarak çalışmaları, hemIDO ifade eden MKH'lerin aktivasyonunu hem de Treg hücrelerinin anti-enflamatuar sitokin IL-10 üretimini de tetiklemektedir (Engela, 2012). Probiyotik bakteri supernatantları ile kültüre ettiğimiz MKH'lerin salgıladığı immünomodülatör sitokin miktarlarını incelediğimizde PGE2 ve IL-10 miktarlarının arttığını saptadık. Önceki araştırmalara ve bulgularımıza dayanarak MKH'lerin immün baskılayıcı özelliğini in vitro ortamda artırabildiğimizi söyleyebiliriz. IL-10 ve PGE2 üretimi ile Treg hücrelerinin düzenleyici kapasitesinin artırılacağı ve sinerjistik olarak çalışabileceğini öngörmekteyiz.



Şekil 4.2. Mezenkimal kök hücrelerin ürettiği PGE2 ile immün sistem hücreleri üzerindeki etkisi (Ayala-Cuellar, 2019)

MKH'lerin ürettiği sitokinler, özellikle beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) ve sinir büyüme faktörü (NGF) omurilik hasarının hafifletilmesinde önemli role sahiptir (Harrell, 2019). Sinir büyüme faktörü (NGF) sinir hücrelerinin hayatta kalmasını ve büyümesini destekleyen ayrıca hücre büyümesini düzenleyerek nöronal farklılaşmayı destekleyen homodimerik yapıya sahip bir polipeptittir (Yuan, 2013). Owen ve arkadaşı yaptığı *in vitro* hücre ve doku kültürü çalışmalarında MKH'lerin karaciğer sirozunu NGF aracılı iyileştirdiği sonucuna varmışlardır. Karaciğer sirozuna sebep olan yıldız şekilli hücreler p75 reseptörü eksprese eder. MKH'lerin salgıladığı NGF bu hücrelerdeki p75 reseptörlerine bağlanarak hücreyi apoptoza götürmektedir (Owen, 2015). Yapılan birçok çalışmada NGF'in yara iyileşmesini hızlandırdığı, ayrıca hasarlı sinirleri onardığı ve Alzheimer gibi nörolojik hastalıkları önlediği gösterilmiştir. MKH'ler salgıladığı sekretomlar ve nörotrofik faktörler ile nöral progenitör hücrelerde farklılaşmayı ve proliferasyonu teşvik eder. Srivasta ve arkadaşları mezenkimal kök hücreleri, nöral progenitör hücreler olan PC-12 hücrelerinin çoğaldığı besiyeri ile kültüre ederek MKH'lerin nöronal farklılaşmalarını incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda hem PC-12 besiyerinin hem de NGF'in MKH'lerde nöral farklılaşma sağladığını göstermişlerdir (Srivastava, 2018). MKH'lerin ekzojen ve endojen NGF aracılığıyla nöron hücrelerini koruyucu etki sağladığı ve hasarlı bölgede iyileşmeyi hızlandırdığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmada da olduğu gibi MKH'lerin immünomodülasyonu mikroçevre ile yüksek oranda etkilendiğinden dolayı farklı koşullandırılmış besiyeri şartlarında sitokin seviyelerine bakılmıştır. Biz de yaptığımız çalışmada *Lactobacillus paracasei subsp.* ve *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* probiyotik bakteri

supernatantları ile MKH'leri kültüre ettiğimizde MKH'lerin ifade ettiği NGF seviyesinin arttığını gözlemledik. NGF artışı, özellikle nörodejeneratif hastalıklarda önemli role sahiptir. MKH'lerin ifade ettiği NGF miktarının probiyotik bakterilerin supernatantı ile artırılması Alzheimer gibi hastalıkların tedavisini ve nöral hasarların iyileşmesini artırabilir. Bu bulgulara dayanarak immünomodülasyon özelliği probiyotik bakteriler ile artırılmış MKH'lerin tedavide kullanılabilir hale getirilebileceğini düşünmekteyiz.

Netrin-1 epitel hücrelerin farklılaşmasını, göçünü, çoğalmasını ve hayatta kalımını destekleyen bir faktördür. Ayrıca Netrin-1 proteininin progenitör hücre farklılaşmasına katkıda bulunan anjiyojenik bir faktör olduğu bilinmektedir. Nöronal farklılaşmayı indükleme ve nöron hücrelerinin korunmasını sağlamaktadır (Ke, 2016). Xianjin Ke ve arkadaşları kemik iliği-mezenkimal kök hücreler tarafından Netrin-1'in aşırı ekspresyonu ile Schwann hücrelerinin ve endotel hücrelerin hayatta kalmasına katkıda bulunduğunu, ayrıca Kİ-MKH'lerin salgıladığı VEGF, NGF ve BDNF gibi faktörler ile nöron hücrelerine farklılaşmasını ve damar oluşumuna katıldığını göstermişlerdir (Ke, 2015). Biz de yaptığımız çalışmada *Lactobacillus paracasei subsp.* ve *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* probiyotik bakterileri ve *Enterococcus faecalis* ve *Staphylococcus aureus* bakteri supernatantları ile MKH'leri kültüre ettiğimizde MKH'lerin ifade ettiği Netrin-1 seviyesinin kontrole kıyasla anlamlı bir değişme göstermediğini gözlemledik. Yaptığımız in vitro çalışmada MKH'lerin ifade ettiği Netrin-1 seviyesinin hücre göçüne ve immünomodülasyona etkisi olmadığını tespit ettik. Daha çok çalışma yapılması durumunda Netrin-1 seviyesinin değişiminin incelenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

MKH'lerin terapötik özelliklerinden biri de hasarlı bölgeye göç etme kabiliyetidir. MKH'lerin hasarlı bölgeye göçü vasküler hücre adezyon molekülü 1 (VCAM-1) ve G protein bağlı reseptör sinyallemesini içeren lökosit göçüne benzer şekilde gerçekleşir (Vizoso ve ark., 2017). MKH'ler hücre yüzey ekspresyonlarını (MHC-II, CD86, CD40 gibi), migrasyon potansiyellerini ve pro-enflamatuar kapasitelerini azaltarak immüno-supresif etkiler üretirler (Gugjoo, 2020). Kültür koşulları, pasaj sayıları ve donör yaşı gibi bazı kriterler MKH'lerin migrasyonunda önemli rol oynar. Özellikle kültür koşulları MKH'lerin migrasyonunda önemlidir. Çünkü MKH'lerin migrasyonunda görev alan bir kemokin reseptörü olan CXCR4'ün ifadesinin, Kİ-MKH'lerde kültür koşullarında yok olduğu gösterilmiştir (Musiał-Wysocka, 2019). Ciorba ve arkadaşları probiyotik suşları ve bu suşların supernatantları ile kültüre ettikleri, ince bağırsakta yer alan COX-2 eksprese eden MKH'lerin TLR-2'ye

bağlı bir şekilde göç ettiği gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda COX-2 eksprese eden MKH'lerin PGE2 salınımlarıyla epitel hücre çoğalmasında da desteklediği bu şekilde radyasyon hasarına yanıt olarak epitelyal apoptozda azalma sağladığı bulunmuştur. Bu sonuçlar COX-2 eksprese eden MKH'lerin TLR-2'ye bağlı migrasyonunun DSS (dekstran sülfat sodyum)-kolitte yer aldığını ve ince bağırsakta radyoprotektif olduğunu göstermiştir (Ciorba, 2012). Hepatosit büyüme faktörü (HGF), MKH'ler tarafından yapısal olarak eksprese edilen, hücre büyümesinde, anjiyogenezinde ve migrasyonunda rol oynayan bir faktördür. Di Nicola ve arkadaşları yaptıkları çalışmada MKH'lerin T hücre proliferasyonunu baskılamasında HGF'nin TGF- β 1 ile sinerjistik olarak hareket ettiğini göstermiştir (Nicola, 2002). Biz de probiyotik bakteri supernatantı ile Kİ-MKH'leri kültüre ettiğimizde, MKH'lerden TGF- β 1 üretiminin arttığı sonucuna vardık. Bu sonuca dayanarak artan TGF- β 1 seviyesinin HGF ile sinerjistik olarak hareket ederek T hücre baskılanmasını sağladığını düşünebiliriz.

Kanser tedavisinde ve doku rejenerasyonunda kullanılmak üzere MKH temelli birçok strateji geliştirilmiştir. Fakat MKH tedavisinde kanserin tekrarının tetiklenmesi ve onkolojik potansiyel oluşturması gibi birçok endişe bulunmaktadır. Multipotensi, kendini yenileme ve migrasyon kabiliyeti gibi özellikleriyle kök hücreler malesef tümör gelişimi ve metastazı ile birçok neoplaziyle karakterizedir. Bu sebeple MKH'lerin kullanılmadığı sadece MKH sekretomları ve koşullandırılmış besiyeri ile yapılan tedaviler bu endişeleri ortadan kaldırmaktadır (Tran, 2015). Biz de ilk olarak MKH'leri probiyotik bakterilerin supernatantı ile kültüre ederek onların immün baskılayıcı özelliğini artırdık. Bu artış ile hücre tedavide MKH koşullandırılmış besiyerinin kullanılabilirliğini düşünmekteyiz. Ayrıca probiyotik bakteri supernatantının MKH'lerin migrasyon kabiliyetini azalttığını gözlemledik. Bu sonuca dayanarak da MKH'leri önce probiyotik bakteri supernatantları ile kültüre ederek migrasyon yeteneğini azalttığımızda hasarlı bölgeye uygulanan bu koşullandırılmış MKH'ler başka bölgeye göç etmeden sadece o bölgede iyileşmeyi hızlandıracağını düşünebiliriz.

Yaptığımız tez projesi kapsamında literatürde böyle bir çalışmanın yer almadığını ve sonuçlarımıza göre yenilikçi bir bakış açısı olabileceğini öngörmekteyiz. Probiyotik bakteriler olan *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* ve *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* türlerinin supernatantı ile *in vitro* koşullarda oluşturduğumuz mikroçevrenin MKH'lerin immün baskılayıcı özelliğini artırdığını

gözlemledik. Bulgularımıza dayanarak mezenkimal kök hücre temelli tedavilerde birçok hastalığın tedavisinde yeni bir yaklaşım olabileceğini düşünmekteyiz.



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Tez çalışmamız kapsamında Kİ-MKH'leri probiyotik bakteriler olan *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* ve *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* türlerinin supernatantları ile kültüre ettiğimizde hücrelerin ifade ettiği immünomodülatör sitokin seviyelerinin ne oranda değiştiğini inceledik. Elde ettiğimiz sonuçlara göre probiyotik bakteri çözünür faktörleri Kİ-MKH'lerin ürettiği immün baskılayıcı sitokinler olan TGF- β 1, PGE2, IL-10 ve NGF miktarını artırmıştır. Çalışmaya bu fikir doğrultusunda devam edilmesi durumunda probiyotik bakteri supernatantları ile kültüre edilen mezenkimal kök hücrelerin diğer immün baskılayıcı sitokinleri artıracaklarını ve bu şekilde MKH'lerin immünomodülasyon özelliğinin etkinliğinin artırılabilirliğini düşünmekteyiz. Ayrıca probiyotik bakteri supernatantları ile kültürasyonunda MKH'lerin migrasyon kabiliyetinin kontrole göre azaldığını gözlemledik.

MKH terapötik özellikleri nedeniyle birçok hastalıkta umut verici tedavi yollarından biri olmuştur. Bu tedavi yöntemlerinde bazı şüpheler olmasına rağmen devam eden çalışmalar ile gelişmeye açık bir konu olmuştur. Yaptığımız tez çalışmasında bu şüpheleri de ortadan kaldıracak yenilikçi bir fikirle MKH'lerin koşullandırılmış besiyerini hücrel tedavide kullanmayı amaçladık. MKH'lerin immün baskılayıcı özelliği yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Bu özelliği yine insan sağlığı açısından faydalı olan ve immün düzenleyici etkisi bilinen probiyotik bakterilerin çözünür faktörleri ile artırdık. İmmün baskılayıcı özelliği artırılmış MKH'lerintedavide daha etkin kullanılabilirliği kanısındayız.

Yaptığımız *in vitro* çalışmalar yeterli olmasa da aldığımız sonuçlar MKH'lerinimmün baskılayıcı özelliğinin probiyotik bakterilerin çözünür faktörleri ile artırılabilirliğini göstermektedir. Bu zamana kadar yapılan çalışmalarda probiyotik bakteriler ve MKH'ler arasındaki ilişki incelenmiştir. Fakat probiyotik bakterilerin çözünür faktörlerini kullanarak MKH'lerinimmün baskılayıcı özelliğini artırmamız yeni bir yaklaşım olmaktadır. Bu yenilikçi hücrel tedavi fikrinin yapılacak birçok *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar ile geliştirilebileceğini düşünmekteyiz.

5.2. Öneriler

1. MKH'lerin immün baskılayıcı özelliğinin probiyotik bakterilerin ekstraselüler çözünür faktörleri ile artırılabilmesi konusundaki sorumlu hücresel mekanizmalar ayrıntılı bir şekilde çalışılabilir.

2. MKH'lerin ifade ettiği immün baskılayıcı sitokin seviyelerinin farklı probiyotik bakteriler tarafından ne oranda değiştiği test edilebilir.

3. Probiyotik bakterilerin supernatantları ile kültüre edilen MKH'lerin osteojenik, adipojenik, kondrojenik ve nörojenik farklılaşma potansiyelleri üzerindeki etkileri araştırılabilir.

4. Probiyotik bakterilerin supernatantı ile kültüre edilen MKH'lerin yüzey reseptör belirteçlerinin ifade düzeylerindeki olası değişimler belirlenebilir.

6. KAYNAKLAR

- Amdekar, S., Singh, V., & Deepak, D. (2011). Probiotic therapy: Immunomodulating approach toward urinary tract infection. *Current Microbiology*, *63*(5), 484–490.
- Angmo, K., Kumari, A., Savitri, & Bhalla, T. C. (2016). Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT - Food Science and Technology*, *66*, 428–435.
- Ashraf, R., & Shah, N. P. (2014). Immune System Stimulation by Probiotic Microorganisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *54*(7), 938–956.
- Ayala-Cuellar, A. P., Kang, J. H., Jeung, E. B., & Choi, K. C. (2019). Roles of mesenchymal stem cells in tissue regeneration and immunomodulation. *Biomolecules and Therapeutics*, *27*(1), 25–33.
- Barcellos-de-Souza, P., Gori, V., Bambi, F., & Chiarugi, P. (2013). Tumor microenvironment: Bone marrow-mesenchymal stem cells as key players. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, *1836*(2), 321–335.
- Beksaç, M. (2014). Erratum to Bone marrow and stem cell transplantation. *Methods in Molecular Biology*, *1109*, E1.
- Blum, S., & Schiffrin, E. J. (2003). Intestinal microflora and homeostasis of the mucosal immune response: Implications for probiotic bacteria? *Current Issues in Intestinal Microbiology*, *4*(2), 53–60.
- Bodera, P., & Chcialowski, A. (2009). Immunomodulatory Effect of Probiotic Bacteria. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, *3*(1), 58–64.
- Börger, V., Bremer, M., Ferrer-Tur, R., Gockeln, L., Stambouli, O., Becic, A., & Giebel, B. (2017). Mesenchymal stem/stromal cell-derived extracellular vesicles and their potential as novel immunomodulatory therapeutic agents. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(7).
- Bron, P. A., Van Baarlen, P., & Kleerebezem, M. (2012). Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. *Nature Reviews Microbiology*, *10*(1), 66–78.
- Burr, S. P., Dazzi, F., & Garden, O. A. (2013). Mesenchymal stromal cells and regulatory T cells: The Yin and Yang of peripheral tolerance. *Immunology and Cell Biology*, *91*(1), 12–18.
- Campana, R., Van Hemert, S., & Baffone, W. (2017). Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. *Gut Pathogens*, *9*(1), 1–12.
- Cananzi, M., Atala, A., & De Coppi, P. (2009). Stem cells derived from amniotic fluid:

- New potentials in regenerative medicine. *Reproductive BioMedicine Online*, 18(SUPPL. 1), 17–27.
- Chavarri, M., Maranon, I., & Carmen, M. (2012). Encapsulation Technology to Protect Probiotic Bacteria. *Probiotics*.
- Ciorba, M. A., Riehl, T. E., Rao, M. S., Moon, C., Ee, X., Nava, G. M., ... Stenson, W. F. (2012). Lactobacillus probiotic protects intestinal epithelium from radiation injury in a TLR-2/cyclo-oxygenase-2-dependent manner. *Gut*, 61(6), 829–838.
- Corthésy, B., Gaskins, H. R., & Mercenier, A. (2007). Cross-Talk between Probiotic Bacteria and the Host Immune System. *The Journal of Nutrition*, 137(3), 781S–790S.
- Daneshmandi, S., Karimi, M. H., & Pourfathollah, A. A. (2017). TGF- β engineered mesenchymal stem cells (TGF- β /MSCs) for treatment of Type 1 diabetes (T1D) mice model. *International Immunopharmacology*, 44, 191–196.
- Darzi, S., Werkmeister, J. A., Deane, J. A., & Gargett, C. E. (2016). Identification and Characterization of Human Endometrial Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Potential for Cellular Therapy. *STEM CELLS Translational Medicine*, 5(9), 1127–1132.
- Ding, D. C., Chang, Y. H., Shyu, W. C., & Lin, S. Z. (2015). Human umbilical cord mesenchymal stem cells: A new era for stem cell therapy. *Cell Transplantation*, 24(3), 339–347.
- Dongarrà, M. L., Rizzello, V., Muccio, L., Fries, W., Cascio, A., Bonaccorsi, I., & Ferlazzo, G. (2013). Mucosal immunology and probiotics. *Current Allergy and Asthma Reports*, 13(1), 19–26.
- El Omar, R., Beroud, J., Stoltz, J. F., Menu, P., Velot, E., & Decot, V. (2014). Umbilical cord mesenchymal stem cells: The new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies? *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, 20(5), 523–544.
- Engela, A. U., Baan, C. C., Dor, F. J. M. F., Weimar, W., & Hoogduijn, M. J. (2012). On the interactions between mesenchymal stem cells and regulatory T cells for immunomodulation in transplantation. *Frontiers in Immunology*, 3(MAY), 1–8.
- English, K., Ryan, J. M., Tobin, L., Murphy, M. J., Barry, F. P., & Mahon, B. P. (2009). Cell contact, prostaglandin E2 and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25Highforkhead box P3+ regulatory T cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 156(1), 149–160.
- Erbey, F., Atay, D., Akcay, A., Ovali, E., & Ozturk, G. (2016). Mesenchymal stem cell treatment for steroid refractory graft-versus-host disease in children: A pilot and first study from Turkey. *Stem Cells International*, 2016.
- Fan, B. S., & Lou, J. Y. (2011). Enhancement of angiogenic effect of co-transfection

- human NGF and VEGF genes in rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Gene*, 485(2), 167–171.
- Friedman, R., Betancur, M., Boissel, L., Tuncer, H., Cetrulo, C., & Klingemann, H. (2007). Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells: Adjuvants for Human Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 13(12), 1477–1486.
- Gao, F., Chiu, S. M., Motan, D. A. L., Zhang, Z., Chen, L., Ji, H. L., ... Lian, Q. (2016). Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death & Disease*, 7, e2062.
- Gasbarrini, G., Bonvicini, F., & Gramenzi, A. (2016). Probiotics History. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 50(December), S116–S119.
- Gómez-Llorente, C., Muñoz, S., & Gil, A. (2010). Role of Toll-like receptors in the development of immunotolerance mediated by probiotics. *Proceedings of the Nutrition Society*, 69(3), 381–389.
- Gronthos, S., Brahim, J., Li, W., Fisher, L. W., Cherman, N., Boyde, A., ... Shi, S. (2002). Stem Cell Properties of. *Journal of Dental Research*, 81, 531 – 535.
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahim, J., Robey, P. G., & Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25), 13625–13630.
- Gugjoo, M. B., Hussain, S., Amarpal, Shah, R. A., & Dhama, K. (2020). Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immuno-Modulatory and Anti- Inflammatory Mechanisms in Immune and Allergic Disorders. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 14(1), 3–14.
- Gupta, V., & Garg, R. (2009). Probiotics. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 27(3), 202–209.
- Han, N., Jia, L., Guo, L., Su, Y., Luo, Z., Du, J., ... Liu, Y. (2020). Balanced oral pathogenic bacteria and probiotics promoted wound healing via maintaining mesenchymal stem cell homeostasis. *Stem Cell Research and Therapy*, 11(1), 1–12.
- Harrell, C. R., Fellabaum, C., Jovicic, N., Djonov, V., Arsenijevic, N., & Volarevic, V. (2019). Molecular Mechanisms Responsible for Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome. *Cells*, 8(5), 467.
- Huang, G. T. J., Gronthos, S., & Shi, S. (2009). Critical reviews in oral biology & medicine: Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: Their biology and role in Regenerative Medicine. *Journal of Dental Research*, 88(9), 792–806.
- In 't Anker, P. S., Scherjon, S. A., Kleijburg-van der Keur, C., Noort, W. A., Claas, F. H. J., Willemze, R., ... Kanhai, H. H. H. (2003). Amniotic fluid as a novel source

- of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation [1]. *Blood*, 102(4), 1548–1549.
- Ishii, M., Koike, C., Igarashi, A., Yamanaka, K., Pan, H., Higashi, Y., ... Kato, Y. (2005). Molecular markers distinguish bone marrow mesenchymal stem cells from fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 332(1), 297–303.
- J., J., M., T., P., K., & Z., K. (2015). Tuberculosis of the urogenital tract in adults in a tertiary referral center. *Adv Exp. Medicine, Biology-Neuroscience and Respiration.*, 6(October 2014), 57–66.
- Javorkova, E., Matejkova, N., Zajicova, A., Hermankova, B., Hajkova, M., Bohacova, P., ... Holan, V. (2019). *Immunomodulatory Properties of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells from Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis and Healthy Donors*. 215–225.
- Jeong, J. H., Lee, C. Y., & Chung, D. K. (2016). Probiotic Lactic Acid Bacteria and Skin Health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(14), 2331–2337.
- Jiang, W., & Xu, J. (2020). Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Cell Proliferation*, 53(1), 1–16.
- Jin, Q., Yuan, K., Lin, W., Niu, C., Ma, R., & Huang, Z. (2019). Comparative characterization of mesenchymal stem cells from human dental pulp and adipose tissue for bone regeneration potential. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 47(1), 1577–1584.
- Joerger-Messerli, M. S., Marx, C., Oppliger, B., Mueller, M., Surbek, D. V., & Schoeberlein, A. (2016). Mesenchymal Stem Cells from Wharton's Jelly and Amniotic Fluid. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 31, 30–44.
- Kaneko, T., Gu, B., Sone, P. P., Zaw, S. Y. M., Murano, H., Zaw, Z. C. T., & Okiji, T. (2018). Dental Pulp Tissue Engineering Using Mesenchymal Stem Cells: a Review with a Protocol. *Stem Cell Reviews and Reports*, 14(5), 668–676.
- Kang, H. J., & Im, S. H. (2015). Probiotics as an immune modulator. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 61, S103–S105.
- Karczewski, J., Troost, F. J., Konings, I., Dekker, J., Kleerebezem, M., Brummer, R. J. M., & Wells, J. M. (2010). Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* in vivo and protective effects on the epithelial barrier. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 298(6), 851–859.
- Karimineko, S., Movassaghpour, A., Rahimzadeh, A., Talebi, M., Shamsasenjan, K., & Akbarzadeh, A. (2016). Implications of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 44(3), 749–757.

- Ke, X., Li, Q., Xu, L., Zhang, Y., Li, D., Ma, J., & Mao, X. (2015). Netrin-1 overexpression in bone marrow mesenchymal stem cells promotes functional recovery in a rat model of peripheral nerve injury. *Journal of Biomedical Research*, 29(5), 380–389.
- Ke, X., Liu, C., Wang, Y., Ma, J., Mao, X., & Li, Q. (2016). Netrin-1 promotes mesenchymal stem cell revascularization of limb ischaemia. *Diabetes and Vascular Disease Research*, 13(2), 145–156.
- Kemgang, T. S., Kapila, S., Shanmugam, V. P., & Kapila, R. (2014). Cross-talk between probiotic lactobacilli and host immune system. *Journal of Applied Microbiology*, 117(2), 303–319.
- Kim, N., & Cho, S. G. (2015). New strategies for overcoming limitations of mesenchymal stem cell-based immune modulation. *International Journal of Stem Cells*, 8(1), 54–68.
- Kol, A., Foutouhi, S., Walker, N. J., Kong, N. T., Weimer, B. C., & Borjesson, D. L. (2014). Gastrointestinal Microbes Interact with Canine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells In Vitro and Enhance Immunomodulatory Functions. *Stem Cells and Development*, 23(16), 1831–1843.
- Kolf, C. M., Cho, E., & Tuan, R. S. (2007). Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: Regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Research and Therapy*, 9(1), 1–10.
- Krampera, M., Cosmi, L., Angeli, R., Pasini, A., Liotta, F., Andreini, A., ... Annunziato, F. (2006). Role for Interferon- γ in the Immunomodulatory Activity of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, 24(2), 386–398.
- Kuhn, N. Z., & Tuan, R. S. (2010). Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: Implications in tumorigenesis and metastasis. *Journal of Cellular Physiology*, 222(2), 268–277.
- La Fata, G., Weber, P., & Mohajeri, M. H. (2018). Probiotics and the Gut Immune System: Indirect Regulation. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10(1), 11–21.
- Lane, S. W., Williams, D. A., & Watt, F. M. (2014). Modulating the stem cell niche for tissue regeneration. *Nature Biotechnology*, 32(8), 795–803.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., & Keersmaecker, S. C. J. De. (n.d.). Host interactions of probiotic bacterial. *Nature Reviews Microbiology*.
- Lee, D. K., & Song, S. U. (2018). Immunomodulatory mechanisms of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Cellular Immunology*, 326(April), 68–76.
- Lee, O. K., Kuo, T. K., Chen, W. M., Lee, K. Der, Hsieh, S. L., & Chen, T. H. (2004). Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*, 103(5), 1669–1675.

- Levi-montalcini, R. (1991). *Years Later*. 237(May 1987).
- Li, M., Sun, X., Kuang, X., Liao, Y., Li, H., & Luo, D. (2014). Mesenchymal stem cells suppress CD8⁺ T cell-mediated activation by suppressing natural killer group 2, member D protein receptor expression and secretion of prostaglandin E₂, indoleamine 2, 3-dioxygenase and transforming growth factor- β . *Clinical and Experimental Immunology*, 178(3), 516–524.
- Li, N., & Hua, J. (2017). Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(13), 2345–2360.
- Li, X., Lu, C., Fan, D., Lu, X., Xia, Y., Zhao, H., ... Xiao, C. (2020). Human Umbilical Mesenchymal Stem Cells Display Therapeutic Potential in Rheumatoid Arthritis by Regulating Interactions Between Immunity and Gut Microbiota via the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(March), 1–19.
- Liu, J., Han, D., Wang, Z., Xue, M., Zhu, L., Yan, H., ... Wang, H. (2013). Clinical analysis of the treatment of spinal cord injury with umbilical cord mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*, 15(2), 185–191.
- Lukomska, B., Stanaszek, L., Zuba-Surma, E., Legosz, P., Sarzynska, S., & Drela, K. (2019). Challenges and Controversies in Human Mesenchymal Stem Cell Therapy. *Stem Cells International*, 2019.
- Lyahyai, J., Mediano, D. R., Ranera, B., Sanz, A., Remacha, A. R., Bolea, R., ... Martín-Burriel, I. (2012). Isolation and characterization of ovine mesenchymal stem cells derived from peripheral blood. *BMC Veterinary Research*, 8.
- Maldonado Galdeano, C., De Moreno De Leblanc, A., Vinderola, G., Bibas Bonet, M. E., & Perdígón, G. (2007). Proposed model: Mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14(5), 485–492.
- Martens, W., Bronckaers, A., Politis, C., Jacobs, R., & Lambrichts, I. (2013). Dental stem cells and their promising role in neural regeneration: An update. *Clinical Oral Investigations*, 17(9), 1969–1983.
- Maumus, M., Guérit, D., Toupet, K., Jorgensen, C., & Noël, D. (2011). Mesenchymal stem cell-based therapies in regenerative medicine: Applications in rheumatology. *Stem Cell Research and Therapy*, 2(2).
- McGuirk, J. P., Robert Smith, J., Divine, C. L., Zuniga, M., & Weiss, M. L. (2015). Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells as a promising cellular therapeutic strategy for the management of graft-versus-host disease. *Pharmaceuticals*, 8(2), 196–220.
- Monguió-Tortajada, M., Roura, S., Gálvez-Montón, C., Franquesa, M., Bayes-Genis, A., & Borràs, F. E. (2017). Mesenchymal stem cells induce expression of CD73 in human monocytes in vitro and in a swine model of myocardial infarction in vivo.

- Frontiers in Immunology*, 8(NOV), 1–13.
- Mundra, V., Gerling, I. C., & Mahato, R. I. (2013). Mesenchymal stem cell-based therapy. *Molecular Pharmaceutics*, 10(1), 77–89.
- Musiał-Wysocka, A., Kot, M., & Majka, M. (2019). The Pros and Cons of Mesenchymal Stem Cell-Based Therapies. *Cell Transplantation*, 28(7), 801–812.
- Németh, K., Leelahavanichkul, A., Yuen, P. S. T., Mayer, B., Parmelee, A., Doi, K., ... Mezey, É. (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), 42–49.
- Nicola, M. Di, Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P. D., Matteucci, P., ... Gianni, A. M. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 99(10), 3838–3843.
- Noda, S., Kawashima, N., Yamamoto, M., Hashimoto, K., Nara, K., Sekiya, I., & Okiji, T. (2019). Effect of cell culture density on dental pulp-derived mesenchymal stem cells with reference to osteogenic differentiation. *Scientific Reports*, 9(1), 1–5.
- Ohland, C. L., & MacNaughton, W. K. (2010). Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 298(6).
- Owen, A., & Newsome, P. N. (2015). Mesenchymal stromal cell therapy in liver disease: Opportunities and lessons to be learnt? *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 309(10), 791–800.
- Patel, D. M., Shah, J., & Srivastava, A. S. (2013). Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. *Stem Cells International*, 2013.
- Prusa, A. R., Marton, E., Rosner, M., Bernaschek, G., & Hengstschläger, M. (2003). Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: A new source for stem cell research? *Human Reproduction*, 18(7), 1489–1493.
- Puissant, B., Barreau, C., Bourin, P., Clavel, C., Corre, J., Bousquet, C., ... Blancher, A. (2005). Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: Comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *British Journal of Haematology*, 129(1), 118–129.
- Qu, G., Xie, X., Li, X., Chen, Y., Isla, N. De, Huselstein, C., ... Li, Y. (2018). Immunomodulatory function of mesenchymal stem cells: regulation and application. *Journal of Cellular Immunotherapy*, 4(1), 1–3.
- Regmi, S., Pathak, S., Kim, J. O., Yong, C. S., & Jeong, J. H. (2019). Mesenchymal stem cell therapy for the treatment of inflammatory diseases: Challenges, opportunities, and future perspectives. *European Journal of Cell Biology*, 98(5–8), 151041.

- Reis, N. A., Saraiva, M. A. F., Duarte, E. A. A., de Carvalho, E. A., Vieira, B. B., & Evangelista-Barreto, N. S. (2016). Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from human milk. *Journal of Applied Microbiology*, *121*(3), 811–820.
- Review, C. (2001). *Probiotics: "Living drugs."* *58*, 1101–1109.
- Riehl, T. E., Alvarado, D., Ee, X., Zuckerman, A., Foster, L., Kapoor, V., ... Stenson, W. F. (2019). Lactobacillus rhamnosus GG protects the intestinal epithelium from radiation injury through release of lipoteichoic acid, macrophage activation and the migration of mesenchymal stem cells. *Gut*, *68*(6), 1003–1013.
- Sackstein, R., Merzaban, J. S., Cain, D. W., Dagia, N. M., Spencer, J. A., Lin, C. P., & Wohlgemuth, R. (2008). Ex vivo glycan engineering of CD44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone. *Nature Medicine*, *14*(2), 181–187.
- Salami, F., Tavassoli, A., Mehrzad, J., & Parham, A. (2018). Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells on leukocytes with emphasis on neutrophils. *Immunobiology*, *223*(12), 786–791.
- Sánchez, B., Delgado, S., Blanco-Míguez, A., Lourenço, A., Gueimonde, M., & Margolles, A. (2017). Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Molecular Nutrition and Food Research*, *61*(1), 1–15.
- Saraiva, M., & O'Garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology*, *10*(3), 170–181.
- Sarao, L. K., & Arora, M. (2017). Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *57*(2), 344–371.
- Sarowska, J., & Jama-kmiecik, A. (2013). The Therapeutic Effect of Probiotic Bacteria. *Adv Clin Exp Med*, *22*(5), 759–766.
- Scherl, A., Coute, Y., De, C., Calle, A., Sanchez, J., Greco, A., ... Laennec, R. T. H. (2002). Functional Proteomic Analysis of Human Nucleolus □. *Molecular Biology of the Cell*, *13*(November), 4100–4109.
- Schraufstatter, I. U., Discipio, R. G., & Khaldoyanidi, S. (2011). Torrey Pines Institute for Molecular Studies, 3550 General Atomics Court San Diego, CA 92121. *Sophia*, *2271–2288*.
- Seddik, H. A., Bendali, F., Gancel, F., Fliss, I., Spano, G., & Drider, D. (2017). Lactobacillus plantarum and Its Probiotic and Food Potentialities. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *9*(2), 111–122.
- Servin, A. L. (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, *28*(4), 405–440.
- Shaffiey, S. A., Jia, H., Keane, T., Costello, C., Wasserman, D., Quidgley, M., ...

- Hackam, D. J. (2016). Intestinal stem cell growth and differentiation on a tubular scaffold with evaluation in small and large animals. *Regenerative Medicine*, *11*(1), 45–61.
- Shi, S., Miura, M., Seo, B. M., Robey, P. G., Bartold, P. M., & Gronthos, S. (2005). The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthodontics and Craniofacial Research*, *8*(3), 191–199.
- Shi, Y., Su, J., Roberts, A. I., Shou, P., Rabson, A. B., & Ren, G. (2012). How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends in Immunology*, *33*(3), 136–143.
- Spaggiari, G. M., Abdelrazik, H., Becchetti, F., & Moretta, L. (2009). MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: Central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood*, *113*(26), 6576–6583.
- Spaggiari, G. M., Capobianco, A., Abdelrazik, H., Becchetti, F., Mingari, M. C., & Moretta, L. (2008). Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: Role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*, *111*(3), 1327–1333.
- Spees, J. L., Lee, R. H., & Gregory, C. A. (2016). Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Research and Therapy*, *7*(1), 1–13.
- Sporn, M. B., Roberts, A. B., Wakefield, L. M., & Assoian, R. K. (1986). Transforming growth factor- β : Biological function and chemical structure. *Science*, *233*(4763), 532–534.
- Srivastava, A., Singh, S., Pandey, A., Kumar, D., Rajpurohit, C. S., Khanna, V. K., & Pant, A. B. (2018). Secretome of Differentiated PC12 Cells Enhances Neuronal Differentiation in Human Mesenchymal Stem Cells Via NGF-Like Mechanism. *Molecular Neurobiology*, *55*(11), 8293–8305.
- Sudres, M., Norol, F., Trenado, A., Grégoire, S., Charlotte, F., Levacher, B., ... Cohen, J. L. (2006). Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Suppress Lymphocyte Proliferation In Vitro but Fail to Prevent Graft-versus-Host Disease in Mice. *The Journal of Immunology*, *176*(12), 7761–7767.
- Sun, J., Ding, X., Liu, S., Duan, X., Liang, H., & Sun, T. (2020). Adipose-derived mesenchymal stem cells attenuate acute lung injury and improve the gut microbiota in septic rats. *Stem Cell Research and Therapy*, *11*(1), 1–11.
- Thomas, C. M., & Versalovic, J. (2010). Probiotics-host communication modulation of signaling pathways in the intestine. *Gut Microbes*, *1*(3), 1–16.
- Tondreau, T., Meuleman, N., Delforge, A., Dejeneffe, M., Leroy, R., Massy, M., ... Lagneaux, L. (2005). Mesenchymal Stem Cells Derived from CD133-Positive Cells in Mobilized Peripheral Blood and Cord Blood: Proliferation, Oct4 Expression, and Plasticity. *Stem Cells*, *23*(8), 1105–1112.

- Tran, C., & Damaser, M. S. (2015). Stem cells as drug delivery methods: Application of stem cell secretome for regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 82, 1–11.
- Tsai, M. S., Lee, J. L., Chang, Y. J., & Hwang, S. M. (2004). Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Human Reproduction*, 19(6), 1450–1456.
- Uccelli, A., Moretta, L., & Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 8(9), 726–736.
- Ukai, R., Honmou, O., Harada, K., Houkin, K., Hamada, H., & Kocsis, J. D. (2007). Mesenchymal stem cells derived from peripheral blood protects against ischemia. *Journal of Neurotrauma*, 24(3), 508–520.
- Uymaz, B. (2010). Probiyotikler ve Kullanım Alanları. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 16(1), 95–104.
- van Baarlen, P., Wells, J. M., & Kleerebezem, M. (2013). Regulation of intestinal homeostasis and immunity with probiotic lactobacilli. *Trends in Immunology*, 34(5), 208–215.
- Van Den Noortgate, N., Berghe, P. V., De Lepeleire, J., Ghijsebrechts, G., Lisaerde, J., & Beyen, A. (2017). Tiredness of life in older adults | La lassitude chez la personne âgée. *Revue Medicale de Liege*, 72(12), 552–562.
- Vinatier, C., Mrugala, D., Jorgensen, C., Guicheux, J., & Noël, D. (2009). Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends in Biotechnology*, 27(5), 307–314.
- Vizoso, F. J., Eiro, N., Cid, S., Schneider, J., & Perez-Fernandez, R. (2017). Mesenchymal stem cell secretome: Toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9).
- Volarevic, V., Gazdic, M., Simovic Markovic, B., Jovicic, N., Djonov, V., & Arsenijevic, N. (2017). Mesenchymal stem cell-derived factors: Immunomodulatory effects and therapeutic potential. *BioFactors*, 43(5), 633–644.
- Wagers, A. J. (2012). The stem cell niche in regenerative medicine. *Cell Stem Cell*, 10(4), 362–369.
- Wang, H.-S., Hung, S.-C., Peng, S.-T., Huang, C.-C., Wei, H.-M., Guo, Y.-J., ... Chen, C.-C. (2004). Mesenchymal Stem Cells in the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord. *Stem Cells*, 22(7), 1330–1337.
- Wang, Jie, Chen, Z., Sun, M., Xu, H., Gao, Y., Liu, J., & Li, M. (2020). Characterization and therapeutic applications of mesenchymal stem cells for regenerative medicine. *Tissue and Cell*, 64(126), 101330.
- Wang, Jinglin, Liu, Y., Ding, H., Shi, X., & Ren, H. (2021). Mesenchymal stem cell-

- secreted prostaglandin E2 ameliorates acute liver failure via Wang, J., Liu, Y., Ding, H., Shi, X., & Ren, H. (2021). Mesenchymal stem cell-secreted prostaglandin E2 ameliorates acute liver failure via attenuation of cell death and re. *Stem Cell Research and Therapy*, 12(1), 1–13.
- Wang, M., Yuan, Q., & Xie, L. (2018). Mesenchymal stem cell-based immunomodulation: Properties and clinical application. *Stem Cells International*, 2018.
- Wei, X., Yang, X., Han, Z. P., Qu, F. F., Shao, L., & Shi, Y. F. (2013). Mesenchymal stem cells: A new trend for cell therapy. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34(6), 747–754.
- Wold, A. E. (2001). Immune effects of probiotics. *Scandinavian Journal of Nutrition/Naringsforskning*, 45(2), 76–85.
- Words, K., & Green, A. (2002). *Riginal Rtitle* ®. 338–346.
- Wu, L. F., Wang, N. N., Liu, Y. S., & Wei, X. (2009). Differentiation of wharton's jelly primitive stromal cells into insulin-producing cells in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering - Part A*, 15(10), 2865–2873.
- Xing, J., Ying, Y., Mao, C., Liu, Y., Wang, T., Zhao, Q., ... Zhang, H. (2018). Hypoxia induces senescence of bone marrow mesenchymal stem cells via altered gut microbiota. *Nature Communications*, 9(1).
- Yañez, R., Lamana, M. L., García-Castro, J., Colmenero, I., Ramírez, M., & Bueren, J. A. (2006). Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Have In Vivo Immunosuppressive Properties Applicable for the Control of the Graft-Versus-Host Disease. *Stem Cells*, 24(11), 2582–2591.
- Yong, K. W., Choi, J. R., Mohammadi, M., Mitha, A. P., Sanati-Nezhad, A., & Sen, A. (2018). Mesenchymal stem cell therapy for ischemic tissues. *Stem Cells International*, 2018.
- Yousefi, B., Eslami, M., Ghasemian, A., Kokhaei, P., Salek Farrokhi, A., & Darabi, N. (2019). Probiotics importance and their immunomodulatory properties. *Journal of Cellular Physiology*, 234(6), 8008–8018.
- Yu, S. U. N., Li, C., Xin-guo, H. O. U., Wei-kai, H. O. U., Jian-jun, D., Lei, S. U. N., ... Bin, W. (2007). *Original article*. 120(9), 771–776.
- Yuan, J., Huang, G., Xiao, Z., Lin, L., & Han, T. (2013). Overexpression of β -NGF promotes differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into neurons through regulation of AKT and MAPK pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 383(1–2), 201–211.
- Zang, L., Hao, H., Liu, J., Li, Y., Han, W., & Mu, Y. (2017). Mesenchymal stem cell therapy in type 2 diabetes mellitus. *Diabetology and Metabolic Syndrome*, 9(1), 1–11.

- Zhang, L., Li, N., Caicedo, R., & Neu, J. (2005). Alive and Dead *Lactobacillus rhamnosus* GG Decrease Tumor Necrosis Factor- α -Induced Interleukin-8 Production in Caco-2 Cells. *The Journal of Nutrition*, 135(7), 1752–1756.
- Zhou, J., Wang, D., Liang, T., Guo, Q., & Zhang, G. (2014). Amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells: Characteristics and therapeutic applications. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 290(2), 223–231.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., ... Hedrick, M. H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 7(2), 211–228.
- Zuo, W., Xie, B., Li, C., Yan, Y., Zhang, Y., Liu, W., ... Chen, D. (2018). The Clinical Applications of Endometrial Mesenchymal Stem Cells. *Biopreservation and Biobanking*, 16(2), 158–164.

