TC

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK VE REKONSTRÜKTİF CERRAHİ

ANABİLİM DALI

SIÇANLARDA ALLOGREFT REJEKSİYONUNUN YAĞ DOKUSU KÖKENLi MEZENKİMAL KÖK HÜCRE İLE İMMÜNMODULASYONU

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DR. BİLGE ANIL TOSYALIOĞLU

İZMİR 2016

TC

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK VE REKONSTRÜKTİF CERRAHİ

ANABİLİM DALI

SIÇANLARDA ALLOGREFT REJEKSİYONUNUN YAĞ DOKUSU KÖKENLi MEZENKİMAL KÖK HÜCRE İLE İMMÜNMODULASYONU

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DR. BİLGE ANIL TOSYALIOĞLU

İZMİR 2016

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ

PROF. DR. MUSTAFA YILMAZ

Proje DEÜ BAP birimi tarafından desteklenmiştir. (2015-2016 / İzmir)

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR **iv**
TABLO LİSTESİ **vi**
ŞEKİL LİSTESİ **vii**
RESİM LİSTESİ **ix**
1. PROJE ÖZETİ **1**
2. İNGİLİZCE ÖZET **4**
3. GİRİŞ VE AMAÇ **6**
4. GENEL BİLGİLER **10**
4.1.Transplantasyon İmmunolojisi **10**
4.1.1. Transplantasyon Tarihçesi 10
4.1.2. Transplantasyon 16
4.2. Allogreft Rejeksiyon Mekanizması **19**
4.2.1. Transplantasyon İmmunolojisi Antijenleri 19
4.2.2. İmmunolojik Allogreft Rejeksiyonu 21
4.2.3. Hücresel İmmun Yanıt Moleküler Tanıma 29
4.2.4. Allojenik Rejeksiyonda Rol Oynayan İmmunolojik Parametreler 31
4.2.5. Deri Allogreft Rejeksiyon Paradigması ve Rol Oynayan Parametreler 31
4.2.6. Allorejeksiyon Dinamiği 32
4.2.7. Rejeksiyon Histopatolojisi 35
4.3. Allogreft Rejeksiyonu Önlenmesi /İmmun Modülasyon **36**
4.3.1. İmmun Modülasyon 36
4.3.2. İmmunolojik Tolerans 37
4.3.3. İmmun Tolerans Mekanizmaları 38
4.3.4. Transplantasyon Toleransı 39
4.3.5. Transplantasyon Toleransı, Mekanizma ve Endikasyonlar 43
4.3.6. Transplant Toleransı Stratejisi ve Yöntemler 44
4.3.7. Transplantasyon Tolerans İndüksiyon Tedavisinde Kullanılan Stratejiler 45
4.4. İmmun Modülasyon, İmmunoterapi ve Komplikasyonları **45**
4.4.1. İmmun Modülatör İlaçlar Etki Mekanizmaları 45
4.4.2. Transplantasyon Tolerans İndüksiyonunda Kullanılan İmmunsüpresif İlaçlar 45
4.4.3. Transplantasyon Tolerans İndüksiyonunda Kullanılan Antikorlar 47

4.4.4. Transplantasyon Toleransı Oluşturmak için Kullanılan İlaç ve Antikorlar 47
4.4.5. Deri İçerikli Allogreft Rejeksiyonunu Önlemede Kullanılan İmmunsüpresif İlaçlar 50
4.4.6. Allogreft Rejeksiyonunu Önleyici İmmunosüpresif Tedavi Komplikasyonları 51
4.4.7. Allogreft Rejeksiyonunu Önleyici Yaklaşım 52
4.5. Tolerans İndüksiyon Stratejileri 52
4.5.1. Kimerizm, Mikst Kimerizm Ve Transplant Toleransı 53
4.5.2. Treg Hücre (CD4+CD25+FOX+Treg) ve Ts Hücreler ve İmmun Modülasyon 55
4.5.3. Dendritik Hücre Tedavisi 57
4.5.4. Mezenkimal Kök Hücre Tedavileri 59
4.5.5. Gen Terapi 59
4.6. Kök Hücre Tedavisi 59
4.6.1. Kök Hücre 59
4.6.2. MSC (Mezenkimal Stromal Kök Hücre 62
4.6.3. MSC İmmun Modülatuar Özellikleri 65
4.6.4. ADAS (Adipoz Kökenli Mezenkimal Kök Hücre) 71
4.6.5. MSC İmmunolojik Özellikleri 76
4.6.6. MSC ve ADAS'ların In vivo İmmunmodülatuar Özellikler 77
4.6.7. Doku Mühendisliği ve ADAS 80
5. Gereç ve Yöntemler 82
5.1. Gereçler 82
5.1.1. Deney Hayvanları 82
5.1.2. Deneyde Kullanılan Laboratuarlar ve Olanaklar 85
5.1.3. Deneyde Kullanılan Malzemeler 85
5.2. Yöntem 86
5.2.1. Deney Cerrahi Akış Planı 86
5.2.2. ADAS Eldesi için Yağ Grefti Alınması 87
5.2.3. ADAS İzolasyonu 92
5.2.4. Greft Cerrahisi ve SC ADAS Uygulaması 97
5.2.5. IV ADAS Uygulaması 103
5.2.6. Patolojik Örnek Alınması 104
5.2.7. Hayvanların Sakrifikasyonu 104
5.2.8. Histopatolojik İşlemler 105
5.2.9. Değerlendirme 107

6. BULGULAR VE SONUÇLAR **110**
6.1. Tedavi Gruplarında Kullanılan ADAS'ların Tanımlanması, Diferansiyasyonu **110**
6.1.1. İzole edilen ADAS'ların IM altında tanınması ve dil boyası ile işaretlenmesi 110
6.1.2. İzole edilen ADAS'ların akış sitometri yöntemi ile analizi 110
6.1.3. İzole edilen ADAS'ların Diferensiyasyonu 111
6.2. Greft Görsel Takip Bulgu ve Sonuçları **112**
6.2.1. Pansuman Uygulaması, Postoperatif bakım 112
6.2.2. Allogreft Nekroz Karakteristik Özellikleri ve Görsel Takip 112
6.2.3. İstatistiksel Değerlendirme/Görsel 113
6.2.4. Fotoğraflar/ Görsel Takip 117
6.3. Histopatolojik Bulgu ve Sonuçlar **121**
6.3.1. 7.Gün Gruplardaki Histopatolojik Mikroskobik Görünüm ve Yorumlar 121
6.3.2. Histopatolojik İstatistiksel Değerlendirme 122
6.4. Dil Boyası ile değerlendirme **123**
7. TARTIŞMA **125**
8. SONUÇ VE ÖNERİLER **138**
9. KAYNAKLAR **141**

KISALTMALAR

ADAS	Adipoz doku kökenli kök hücre	Adipose derivated adult stem cell
AICD	Aktivasyonla başlayan hücre ölümü	Activation Induced Cell Death
ALT	Antilenfosit serum	Antilymphocyte serum
ATG	Antitimosit globulin	Antithymocyte globulin
BMCS	Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre	Bone morrow derivated mesenchymal stem cell
c-GMP	Siklik guanozin monofosfat	Cyclic adenosine monophosphate
CMV	Sitomegalo virus	Cytomegalo virus
DAMPs	Tehlike veya Hasar Molekül Örüntüsü	Danger or Damage Molecular Patterns
dk	Dakika	
DM	Diabetes mellitus	Diabetes mellitus
DMEM	Hücre kültürü büyütme ortamı	Dulbecco/vogt modified eagle's minimal essential medium
EBV	Ebstein barr virusu	Ebstein barr virus
EPG	Epidermal büyüme faktörü	Epidermal growth factor
FACS	Fluoresans Aktive hücre ayırma	Flourescence-activated cell sorting
FBS	Fetal sığır serumu	Fetal bovine serum
FGF 2	Fibroblast büyüme faktörü 2	Fibroblast growth factor 2
gr/g	Gram	Gram
GVHD	Greft versus host hastalığı	Greft versus host disease
HGF	Hepatosit büyüme faktörü	Hepatocyte growth factor
HLA	İnsan lökosit antijeni	Human leukocyte antigen
IDO	Indolamin 2,3-dioksijenaz	Indoleamine 2,3-dioxygenase
Ig	İmmunglobülin	İmmunoglobulin
IM	Işık mikroskobu	
IV	İntravenöz	Intravenous
İBG	İzmir Biyoteknoloji ve Genom Enstitüsü	
MAC	Membran saldırı kompleksi	Membrane attack complex
mcg/µg	Mikrogram	Microgram
M-CSF	Makrofaj koloni stimüle edici faktör	Macrophage colony stimulating factor
MHC	Büyük doku uyumluluk gen kompleksi	Major histocompatibility complex
mL	Mililitre	Mililiter

MLR	Mikst lenfosit reaksiyon	Mixed lymphocyte reaction
mm	Milimetre	Milimeter
MSC	Mezenkimal kök hücre	Mesenchymal stem cell
mTOR	Memelilerdeki Rapamisin hedefi	Mammalian Target of Rapamycin
NK	Doğal öldürücü	Natural killer
nm	Nanometre	Nanometer
NO	Nitrik oksit	Nitric oxide
PAS	Periyodik Asit Şif boyası	Periodic Acid Schiff
PBS	Fosfat tampon serumu	Phosphate Buffer Saline
PDGF	Trombosit kökenli Büyüme Faktörü	Platelet Derivated Growth Factor
PFA	Paraformaldehit	Paraformaldehyde
PGE2	Prostoglandin E_2	Prostoglandin E_2
PMNL	Polimorfomononükleer lökosit	Polymorphonuclear leukocytes
PRRs	Patern tanıma reseptörleri	Pattern recognition receptors
Rpm	Dakikadaki devir sayısı.	Revolutions per minute
SK / SC	Subkutan	Subcutaneous
SF	Serum fizyolojik	
SLE	Sistemik lupus eritematozus	Systemic lupus erythematosus
SVF	Stromal vasküler fraksiyon	Stromal vascular fraction
Tc	Sitotoksik T hücreleri	Cytotoxic T cells
Th	Yardımcı T hücreleri	Helper T cells
TLRs	Çan tipi reseptörler	Toll-like Receptors
Treg	Regulatuar T hücreleri	Regulatory T cells
Ts	Süpresör T hücreleri	Supressor T cells
ul	Mikrolitre	Microliter
um	Mikrometre	Micrometer
VCA	Vaskülarize kompozit doku allotransplantasyonu	Vascularized composite tissue allotransplantation
VEGF	Vasküler endoteliyal büyüme faktörü	Vascular endothelial growth factor
vWF	Von Willebrand Faktörü	Von Willebrand Factor

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Deri greftleri kalınlığına göre
Tablo 2: Deri greftleri alındığı bölgenin genetik orijinine göre
Tablo 3: Kronik allogreft rejeksiyonu riskler
Tablo 4: The Banff (2007) rejeksiyon histopatolojisi
Tablo 5: Tolerans indüksiyonunda strateji ve yöntemler
Tablo 6: Transplantasyonda kullanılan immunsüpresif ilaçlar mekanizma, hedef, komplikasyonlar
Tablo 7: T hücre deplesyonu (selektif ve non selektif)
Tablo 8: İmmunsüpresif tedavi/deri içerikli allogreft (VCA)
Tablo 9: Tolerans indüksiyon stratejileri
Tablo 10: Kimerizm tipleri
Tablo 11: MSC İmmunmodülatuar etki mekanizmaları
Tablo 12: Deneyde kullanılan laboratuarlar ve olanaklar
Tablo 13: Rutin doku takibi protokolü
Tablo 14: Hematoksilen-Eozin boya protokolü
Tablo 15: Kruskal Wallis; Histolojik istatistiksel değerlendirmeler ve allogreft yaşam süresi değerlendirmeleri ikili karşılaştırmalar
Tablo 16: Kaplan Meier ve Log Rank testi; Allogreft yaşam süresi analizi

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Owen, dizigotik ikizlerde fetal sirkülasyonla oluşan doğal immun tolerans
Şekil 2: Kapalı döngü antijenik yanıt
Şekil 3: Kimerizm düşüncesi
Şekil 4: İmmunoloji alanındaki önemli gelişmeler
Şekil 5: MHC T hücre etkileşimi
Şekil 6: Dendritik hücre allojenik doğal immun aktivasyonu
Şekil 7: Deri allogreft rejeksiyonu dendritik hücre yanıtı
Şekil 8: Allogreft rejeksiyonunda APC (antijen sunan hücre) etkisi
Şekil 9: T hücre aktivasyonunda sinyal mekanizmaları
Şekil 10: T hücre aktivasyonu kostimülatuar moleküller
Şekil 11: Allogreft rejeksiyonunda hücresel yolak ile PMNL aktivasyonu
Şekil 12: Allogreft hasarı Th1 ve Th2 hücre etkileri
Şekil 13: Allogreft rejeksiyonu moleküler mekanizma
Şekil 14: İndirekt/direkt yolak ile immun yanıt
Şekil 15: Th1-Th2 dengesi/ allotransplantasyon
Şekil 16: Antikor aracılı hasar ve kompleman aktivasyonu
Şekil 17: İmmunolojik T hücre aracılı akut rejeksiyon, litik vasküler oklüzyon mekanizması
Şekil 18: İmmun modülasyon mekanizmaları
Şekil 19: Santral ve periferik tolerans
Şekil 20: Transplant tolerans mekanizmaları
Şekil 21: Stabil donör spesifik tolerans
Şekil 22: Periferik tolerans mekanizmaları
Şekil 23: Anerji, delesyon ve immun yön değiştirme (deviasyon)/süpresyon
Şekil 24: İmmunosüpresif ilaçların bulunuşu
Şekil 25: Ko-stimülatuar moleküller ve sinyal I-II-III
Şekil 26: İmmunosüpresif ilaçlar ve immun modülatuar antikorların etki mekanizmaları
Şekil 27: Mikst kimerizm indüksiyonu
Şekil 28: Telerojenik dendritik hücre, TS ve Treg hücre ilişkileri; immun stimülasyon ve tolerans mekanizmaları
Şekil 29: Tolerans indüksiyonunda dendritik hücre ve Treg hücre ilişkisi
Şekil 30: Dendritik hücre periferik immunobiyolojik yanıt
Şekil 31: Diferansiyasyon özelliklerine göre kök hücreler
Şekil 32: MSC kaynakları ve diferansiyasyonu

Şekil 33: MSC özellikleri
Şekil 34: İnflamatuar bir niş bölgesinde MSC'lerin aktivasyonu ve lenfosit aktivasyonu, proliferasyon inhibisyonu ve Treg indüksiyonu
Şekil 35: MSC; hücre-hücre kontak mekanizma ve çözünür faktörler
Şekil 36: MSC PGE2 ve sitokinler üzerinden immun modülatuar etkisi
Şekil 37: MSC'lerin farklı hücre tiplerine immunolojik etkisi
Şekil 38: ADAS eldesi ve diferansiyasyonu
Şekil 39: ADAS uygun mikroçevrede çeşitli dokulara diferansiyasyon
Şekil 41: ADAS yüzey markerleri ve immunsüpresif özellikler
Şekil 42: Genetik orijinine göre MSC uygulaması
Şekil 43: MCS allografte etkisi
Şekil 44: Deney şematik gösterimi
Şekil 45: Enzimatik parçalama basamağı ardından SVF'nin olgun adiposit hücre ve dokulardan ayrılması amacıyla yapılan santrifüj sonrası elde edilen fraksiyonlar
Şekil 46: İzole edilen ADAS'ların erişkin kök hücre belirteçleri kullanılarak akış sitometri (flow cytometry) yöntemi ile analizi
Şekil 47: Kruskal Wallis: Deney gruplara göre greft median yaşam süresi değerlendirmesi / Grafi
Şekil 48: Kaplan Meier ve Log Rank Test: Deney gruplarına göre greft yaşam süresi /Grafi
Şekil 49: Deney gruplarına ait H&E boyamaları
Şekil 50: Kruskal Wallis: Deney gruplarına göre rejeksiyon patolojisi değerlendirmesi /Grafi

RESİM LİSTESİ

Fotoğraf 1: Kullanılan Anestetikler
Fotoğraf 2: Yağ Grefti Eldesi İçin Yapılan Tıraşlama İşlemi
Fotoğraf 3: Yağ Grefti Eldesi İçin Yapılan İnsizyon
Fotoğraf 4: Yağ Grefti Eldesi
Fotoğraf 5: Yağ Grefti Eldesi Cerrahi Saha Yakın Çekim
Fotoğraf 6: Yağ Grefti: 1x1,1,5 cm ort. Büyüklüğünde Yağ Grefti
Fotoğraf 7: Yağ Grefti Eldesi Sonrası Sütür Hattı
Fotoğraf 8: Postoperatif Işık Altında Bakım
Fotoğraf 9: Yağ Dokunun Küçük Parçalara Ayrılması
Fotoğraf 10: Deneyimizde SVF eldesi
Fotoğraf 11: Deneyimizde Elekten Geçirilme İşlemi
Fotoğraf 12: Otogreft boyutu ve eksizyon sonrası görünüm
Fotoğraf 13: Otogreft Cerrahisi Sonrası Postoperatif Greftin Görünümü
Fotoğraf 14: Allogreft Yerleşimi Öncesi Sahanın Görünümü
Fotoğraf 15: Eş Zamanlı Allogreft Transferi
Fotoğraf 16: Allogreftlerin Greftlerin Görünümü
Fotoğraf 17: Postoperatif Allogreft Yerleştirilmesi Sonrası Görünüm
Fotoğraf 18: Tie-over Pansuman Uygulaması
Fotoğraf 19: Patolojik Örnekleme
Fotoğraf 20: Patoloji için kullanılan 4mm Punch biyopsi Aleti
Fotoğraf 21: ADAS'ların mikroskobik incelemesi
Fotoğraf 22: Kültür ortamında; kondrogeneze, adipogeneze ve osteogeneze yönlendirilen ADAS'ların spesifik boyalarla boyanması ardından ışık mikroskobu ile görüntülenmesi.
Fotoğraf 23: Grup 1; Otogreft Uygulaması (Görsel Takip)
Fotoğraf 24: Grup 2; Allogreft Uygulaması (Görsel Takip)
Fotoğraf 25: Grup 3; Allogreft Uygulaması ve SC ADAS Tedavisi (Görsel Takip)
Fotoğraf 26: Grup 4; Allogreft Uygulaması ve IV ADAS Tedavisi (Görsel Takip)
Fotoğraf 27: Grup 5; Allogreft Uygulaması ve IV ve SC ADAS Tedavisi (Görsel Takip)
Fotoğraf 28: Grup III: Allogreft + SC; yakın çekim
Fotoğraf 29: İmmunfluoresan altında dil boyalı hücrelerin mikroskop altında histopatolojik kesitte değerlendirilmesi

1. PROJE ÖZET

Proje Başlığı

Sıçanlarda Allogreft Rejeksiyonunun Yağ Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücre ile İmmun Modülasyonu

Araştırmacının Adı, Fakültesi, Yazışma Adresi

Dr. Bilge Anıl Tosyalıoğlu

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı İnciraltı/İzmir

Adres: Korutürk Mah. Öykü sok. No:19 Daire:11 MAB apt. Balçova/İzmir

Amaç ve Hipotez

Doku kaybı ile oluşan fonksiyonel ve estetik deformiteler için ilk rekonstrüksiyon seçeneği otolog rekonstrüksiyonlardır. Otolog rekonstrüksiyon seçenekleri tükendiğinde, yüz ve ekstremitelerde oluşan defektlere yönelik protez ve epitez uygulamaları kullanılmaktadır. İnsanlarda kompozit içerikli allogreft transplantasyonu fonksiyonel ve estetik rekonstrüksiyon için alternatif bir yöntem olarak değerlendirilmektedir. Uygun endikasyonlar sağlandığında, sınırlı sayıda ve seçilmiş vakalarda alternatif rekonstrüksiyon seçeneği olarak vaskülarize kompozit doku nakli (VCA) insanlarda tüm dünyada uygulanmaya başlamıştır. Hayat boyu idame immunsüpresif tedavi gerektirmesi ve immunsüpresif ilaçların yan etkileri nedeni ile etkili bir rekonstrüksiyon seçeneği olarak kullanılamamaktadır. Split tolereans VCA'nın farklı içerikte dokularının farklı zamanlarda ve hızlarda rejekte edilmesidir. Deri VCA'nın en antijenik yapısı olmakla beraber deriye yönelik yüksek antijenik alloimmun yanıt mevcuttur. VCA'larda önemli bir bariyerdir. Deriye yönelik split tolerans kavramı ile ilgili deneysel çalışmalarının başladığı 1950'li yıllardan bu yana çok sayıda çalışma yapılmış olmasına rağmen split tolerans kavramı halen aşılamamıştır. Günümüzde bu nedenle allogreft rejeksiyonunu önlemeyi amaçlayan, immunsüpresif ajanların dozunu minimize eden immun modülasyon yöntemleri ve tolerans indüksiyon stratejileri üzerinde deneysel çalışmalar yapılmaktadır.

Bu çalışmada yağ doku kökenli mezenkimal kök hücre (ADAS), immun modülatuar özelliklerinin etkin olduğu yönünde yayınların yapılması, kemik iliği kökenli MSC (BMSC) ile aynı immun modülatuar özelliklerinin olduğunun deneysel olarak gösterilmesi, daha kolay

ve çabuk elde edilebilmesi nedeni ile bir tolerans indüksiyon stratejisi ve immun modülasyon yöntemi olarak kemik iliği kökenli MSC'ye alternatif olarak düşünülmüştür. Donör kökenli ADAS'ların intravenöz (IV), lokal subkutan (SC), IV ve SC uygulamasının allogreft rejeksiyon sürecine ve allogreft yaşam süresine olan in vivo immun modülatuar etkileri araştırılmıştır. Deriye yönelik split tolerans kavramına immun modülatuar strateji oluşturmak amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Deney modelimizde n= 21 Lewis (inbred) sıçan ve n=14 Brown Norway (inbred) sıçan, ortalama 8-12 haftalık, 300-350 gram (gr.), alıcı ve donör olarak kullanıldı. Hayvanlar beş gruba ayrıldı.

Kontrol grupları:

Grup 1: Otogreft (negatif kontrol)

Grup 2: Allogreft (pozitif kontrol)

Tedavi grupları:

Grup 3: Allogreft ve SC ADAS tedavisi

Grup 4: Allogreft ve IV ADAS tedavisi

Grup 5: Allogreft ve IV ve SC ADAS tedavisi

Grup II- IV-V'ten ADAS üretimi için yağ grefti alındı. ADAS eldesini takiben greft cerrahisine geçildi. Grup I'de otogreft uygulaması, Grup II-III-IV-V'te allogreft uygulaması yapıldı. Tedavi gruplarında alıcıya, IV ve allogreft yatağına lokal SC donör kökenli ADAS tedavisi uygulandı. Grup III'te sadece SC, Grup IV'te IV (intravenöz) ve Grup V'te IV (intravenöz) ve SC ADAS tedavisi yapıldı. Tüm denekler greft cerrahisinin yapıldığı günden itibaren günlük takibe alındı. Greft rejeksiyonu görsel takipleri günlük yapıldı. Tüm deneklerden yedinci günde patolojik örnekler alındı. Patolojik örneklerde Banff skorlamasına göre rejeksiyon patolojisi ve derecesi bakıldı. Dil boyası ile immunfluoresan altında kök hücre görüntülemesi için patolojik kesitlerde inceleme yapıldı.

Bulgular ve Sonuç

Donör kökenli ADAS tedavisi immun defisiti olmayan sıçanlarda, immunsüpresif ajan kullanılmadan yapılan deri allografti uygulamasında allogreft yaşam süresini lokal SC uygulama, IV uygulama ve SC+IV uygulamayla anlamlı olarak uzatmış, tüm gruplarda rejeksiyon süresini geciktirmiştir. Tek başına donör kökenli SC ADAS tedavisi alan grupta en

yüksek ortalama allogreft yaşam süresi saptanmıştır. Tek başına donör kökenli IV ADAS tedavisi erken dönemde allogreft yaşam süresini anlamlı olarak uzatmıştır. Fakat tek başına IV donör kökenli ADAS tedavisi alan grupta geç dönemde allogreft rejeksiyonu sadece SC ve IV+ SC donör kökenli ADAS tedavisi alan gruplara göre anlamlı olarak daha erken gerçekleşmiştir. IV ADAS tedavisi geç dönemde allogreft yaşam süresini sadece SC ve IV+SC ADAS tedavisi alan gruplara göre anlamlı şekilde azaltmıştır.

Anahtar Kelimeler: Allogreft rejeksiyonu, yağ doku kökenli mezenkimal kök hücre, immun modülasyon, sıçan.

2. İNGİLİZCE ÖZET

Project Title

Immun modulation of Allograft Rejection by Adipose Derivated Mesencymal Stem Cells in Rats

Background and Hypothesis

The first reconstructive option for functional and aesthetic deformities that occur with tissue loss is autologous reconstruction. When autologous reconstruction options limited, prostheses and epitheses are used for the defects that occur in the face and extremities. Vascularized composite tissue allotransplantation (VCA) in humans is considered to be an alternative reconstruction method for functional and aesthetic deformities. VCA can be used in selected cases despite lifelong immunosuppressive treatment and side effects. When appropriate indications are provided, in a limited number of cases in humans, VCA is a new treatment option and is performed by surgeons all over the world. VCA requires lifelong immunosuppressive therapy and these immunosuppressive drugs have side effects. Therefore VCA can not be used as an effective alternative reconstruction option. 'Split rejection' suggests that various tissues in VCA will reject at different times and rates. Skin component of VCA is highly antigenic. Antigenic response to skin is an important barrier for VCA. Experimental studies about split tolerance to skin began in the 1950s. There are many experimental studies in this regard. Nevertheless, split tolerance is still not preventable. Therefore, immune modulation and various tolerance induction strategies are performed to prevent allograft rejection in experimental studies. The purpose of these studies is to prevent and modulate alloimmune rejection, to minimize immune suppressive drugs and side effects with various tolerance induction strategies.

Mesenchymal stem cells (MSCs) posses immunomodulatory properties demonstrated in vivo and in vitro studies. On the basis of these studies MSCs therapy is used to prolong the allograft survival as a tolerance induction strategy in experimental animal studies. In vitro and in vivo studies demonstrated that ADASs has immunomodulatory properties seems like bone morrow derivated MSC (BMCS). It is easy and quick to obtain ADAS instead of BMSC. ADAS can be an alternative immunmodulatory therapy.

In this study we evaluated in vivo immunomodulatory effects of donor derivated IV and SC ADAS therapy on allograft rejection episode and allograft survival. The purpose of the study is to suggest an immunomodulatory strategy for split tolerance to skin allograft.

Materials and Methods

In this experiment; n = 21 Lewis (inbreed) and n = 14 Brown Norway rats, (inbreed) meanly 8-12 week, 300-350 gr, were used as recipients and donors. Animals divided into five groups.

Control Groups:

Group 1: Autograft (negative control)

Group 2: Allograft (positive control)

Treatment Groups:

Group 3: Allografts and SC ADAS therapy

Group 4: Allograft and IV ADAS therapy

Group 5: Allograft IV and SC ADAS therapy

Fat graft was obtained from Group II-IV-V to derivate ADAS. After we started autograft and allograft surgery. Autograft surgery was performed to Group I. Allograft surgery was performed to Group II-III-VI-V. We treated the recipient with IV and locally administered SC ADAS therapy. We treated Group III with SC ADAS, Group IV with IV ADAS, Group V with IV and SC ADAS. All the grafts were taken postoperative care and were daily observed. We obtained pathology samples from all the groups at the day of seven. We evaluated grade of rejection pathology (The Banff 2007). We observed ADAS under the immune fluorescent dye with the labeled cell detection method on pathologic sections on the day of seven.

Results and Conclusion

According to the results, IV and locally SC administered donor derivated ADAS therapy significantly prolonged allograft survival as a tolerance induction strategy without using immunosuppressive therapy in immunocompetence rats. Group III that we only used locally administered SC ADAS therapy alone for immune modulation has the longest graft survival time. IV (intravenous) administered ADAS therapy prolonged the allograft survival although allorejection occurred significantly earlier in Group IV that we administered IV ADAS therapy when we compared to the Group III-V that we administered SC and IV+SC ADAS therapy. IV ADAS therapy significantly decreased the allograft survival in later phases of allotransplantation when we compared to the Group III-V that we administered SC and IV+SC ADAS therapy.

Keywords: Allograft rejection, adipose derivated mesencymal stem cell, immun modulation, rat

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Travma, tümör cerrahisi, konjenital hastalıklar, yanık gibi sebeplerle yaşanan doku kaybı ile beraber oluşan fonksiyonel ve estetik deformiteler için ilk rekonstrüksiyon seçeneği otolog rekonstrüksiyonlardır. Otolog rekonstrüksiyon seçenekleri tükendiğinde, yüz ve ekstremitelerde oluşan defektlere yönelik protez/epitez uygulamaları kullanılmaktadır (1). İnsanlarda aynı türden farklı genetik özellikteki bir donörden allogreft transplantasyonu uygulamaları fonksiyonel ve estetik alternatif bir rekonstrüksiyon seçeneği olarak değerlendirilmektedir (2, 3). Farklı türler arasındaki zenogreft transplantasyonlarına yönelik deneysel çalışmalar halen devam etmektedir (4, 5).

Ektoderm ve mezodermden gelişen kompozit içerikteki dokuların tek bir fonksiyonel ünite şeklinde mikrovasküler transferi vaskülarize kompozit doku nakli (VCA) olarak tanımlanır. Kompozit doku damar, sinir, kemik, tendon, kas, deri içerebilir. Kompozit doku kavramı ilk defa Kleinert ve Peacock tarafından tanımlanmıştır (2). Vaskülerize kompozit doku allotransplantasyonu (VCA) immunoloji alanındaki yeni gelişmeler ile kompleks fonksiyonel ve estetik ünitelerin rekonstrüksiyonu için tüm dünyada fayda zarar değerlendirmeleri yapıldıktan sonra, uygun endikasyonlar sağlanıyorsa, sınırlı sayıda ve seçilmiş vakalarda uygulanmaktadır. Plastik cerrahi alanında el ve yüz allotransplantasyonları olarak uygulanmaktadır (2, 6-8). İmmun yanıt, kompozit dokuların antijenitesi ve immunsüpresif ilaçlar hakkındaki çalışmalar ve gelişmelerle birlikte insanlarda ilk başarılı el transplantasyonu 1999 yılında geniş seri hayvan deneylerinde alınan olumlu sonuçlar sonrasında uygulanmıştır (9, 10). Takiben ilk başarılı yüz transplantasyonu 2005 yılında yapılmıştır (11). İnsanlarda ilk başarılı el transplantasyonu yapıldığından bugüne Türkiye de dahil dünyada yüzün üzerinde hastaya VCA yapılmıştır (12). VCA hayat kurtarıcı bir işlem olmamakla birlikte fonksiyonel ve estetik sonuçları ile hayat değiştirici bir rekonstrüksiyon seçeneğidir.

Allogreft rejeksiyonunu önlemek için immunsüpresif tedavi indüksiyon, idame ve akut rejeksiyon atağında kurtarıcı tedavi şeklinde uygulanarak yapılmaktadır. VCA uygulaması hayat boyu süren idame immunsüpresif tedavi gerektirmektedir. VCA uygulamalarında immunsüpresif tedavide poliklonal antilenfosit ajanlar, monoklonal yapıda antikorlar, kalsinörin inhibitörleri (siklosporin, takrolimus), mTOR (mammalian target of rapamycin) inhibitörleri, antimetabolit ajanlar (mikofenolat mofetil (MMF)) ve kortikosteroidler

kullanılmaktadır. Fırsatçı enfeksiyonlar, metabolik komplikasyonlar, lenfoproliferatif maligniteler önemli risklerdir (9, 13). Konkomitan transplantasyonların beraberinde getirdiği riskler daha fazladır (14). Akut rejeksiyon atağı ilk bir yıl içerisinde en sık görülen komplikasyondur. Sıklıkla allogreft kaybı önlenerek rejeksiyon atakları immunsüpresif tedavilerle kontrol altına alınmaktadır (15, 16). Kullanılan immunsüpresiflerin yan etkilerinin oluşturduğu mortalite, morbidite ve psikososyal nedenler ile VCA uygulama endikasyonları ile ilgili etik tartışmalar devam etmektedir. Her bir hasta için klinik ve etik açıdan titiz kazanç ve risk değerlendirmesi ve yönetimi yapılması gerekmektedir (3, 17). Allojenik transplantlarda transplante edilen kompozit dokunun içeriğine göre immun yanıt değişmektedir. Deri en antijenik yapı olmakla beraber kas ılımlı, kemik düşük, kartilaj ve tendon en az antijenik içerikli yapıdır (18). Split tolereans VCA'nın farklı içerikte dokularının farklı zamanlarda ve hızlarda rejekte edilmesidir. Deriye yüksek immun cevap ve antijenik alloimmun yanıt mevcuttur ve split tolerans VCA'larda önemli bir bariyerdir. Deriye yönelik split tolerans kavramı tanımlandığı ve deneysel çalışmalar başladığı 1950'li yıllardan beri aşılamamıştır. Tek başına uygulanan deri greftleri ve VCA'larda mevcut deri içeriği uygun immun modülasyon yapılmadığında rejekte edilmektedir. Bu durum derinin yüksek antijenik içeriğine, deriye özel antijenlere bağlanmaktadır.

İmmunsüpresif tedaviye rağmen ilk bir yıl içerisinde deri içeriği yüksek olan VCA'larda akut rejeksiyon atakları görülmektedir (2, 19). Yüksek antijenik karakterde ve antijenik yükün fazla olduğu yüzey alanı büyük deri içerikli konkomitan allotransplantasyonlarda, donör kökenli kemik iliği transplantı yapılan vakalarda, kompozit dokunun kemik iliği hücreleri içermesi halinde GVHD (Greft Versus Host Disease) görülme riski artmaktadır (20, 21). Tüm bu sebeplerle VCA alternatif bir estetik ve rekonstrüktif tedavi seçeneği olarak sınırlı olarak kullanılabilmektedir.

'Donör spesifik tolerans' alıcı kişinin kendisine ait olmayan hücre serileri içeren bir donörden alınmış allogreft ile uyumlu bir şekilde yaşayabilmesi halidir. Gerek solid organ transplantasyonlarında, gerek VCA'da donör spesifik tolerans allogreft vitalitesi için gerekli bir durumdur. Temel problem olan allogreft rejeksiyon süreci donör spesifik tolerans sağlayacak en az risk içeren immun modülasyon yöntemleri ve tolerans indüksiyon stratejileri üzerinde deneysel araştırmalar yapılarak aşılmaya çalışılmaktadır (21). Deneysel çalışmalar kemik iliği kökenli hematopoietik kök hücre transplantasyonu yapılarak (22) ve vaskülarize kemik iliği içeren doku transplantasyonu ile kimerizm oluşturularak (23), T hücre deplesyon protokolleri kullanılarak, T hücre proliferasyonunda mevcut kostimülatuar moleküllere yönelik blokaj yapan antikorlar uygulanarak (24), immun modülatuar hücreler olan T

regülatuar hücre (Treg) (25, 26) ve dendritik hücreler kullanılarak (27), kök hücre tedavisi uygulamaları (20) ile devam etmektedir. Güncelliğini korumaktadır. Çalışmalardaki temel amaç alıcıdaki immunsüpresiflere ait komplikasyon ve risklerini en aza indiren tolerans indüksiyon stratejisi ile immun modülasyon yapmak, donör spesifik tolerans hali oluşturmak ve VCA'yı etkin bir rekonstrüksiyon seçeneği olarak ortaya koymaktır (28).

Erişkin mezenkimal kök hücreler (MSC) multipotent özellikte, kendi kendini yenileme ve diferansiyasyon yeteneği olan, erişkinde çok çeşitli dokulardan elde edilebilen bir kök hücre tipidir (29). MSC'lerin en önemli genetik bariyer olan MHC bariyerini geçtiği, in vitro ve in vivo deneysel çalışmalarda gösterilmiştir. MSC'lerin alloantijeni tanıma özelliği olan, alloantijen eliminasyonunda rol oynayan immun sistem hücreleri olan NK, B hücre, T hücreleri, antijen sunan hücreler, PLMN (polimorfomononükleer hücreler) üzerinde immun regülatuar ve immun modülatuar etkisi vardır (30). MSC'lerin salgıladığı çözünür faktörler (sitokinler, büyüme faktörleri) ve hücre-hücre teması ile ancak uygun mikroçevrede immun modülatuar etkileri mevcuttur. MSC'lerin immunsüpresif veya immun stimulan olması mikroçevresi ile ilgilidir (31) ve plastisitesi yüksektir (32). MSC'ler immun modülatuar özellikleri ile deneysel çalışmalarda, otoimmun hastalıklarda (33), kronik inflamatuar hastalıklarda (34), kemik iliği transplantasyonlarında, GVHD tedavisine yönelik deneysel çalışmalarda kullanılmaktadır. Solid organ ve VCA allotransplantasyonunda tolerans indüksiyonu ve allogreft rejeksiyonunun geciktirilmesi ve önlenmesi amacıyla tek başına veya 'kombine immunsüpresif ajanlarla' deneysel çalışmalarda yeni bir strateji olarak önerilmektedir (35-39). Kemik iliği kökenli MSC çalışmalarda tercih edilmiştir (20). Kemik iliği kökenli MSC'lerin allojenik stimülasyonla uyarılan hücresel immun yanıt ve non spesifik mitojene yanıt olarak gelişen immun yanıt üzerinde immunsüpresif etkileri deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (30). Kemik iliği kökenli MSC'lerin eldesinin zor olması, hücre üretiminin daha uzun zaman alması ve yeterli hücre sayısına erişimde yaşanan zorluklar nedeni ile ADAS kemik iliği kökenli MSC'lere alternatif oluşturmuş, araştırma konusu olmuştur (40). İn vitro çalışmalar kemik iliği kökenli MSC ve ADAS immun modülatuar özelliklerinin benzer olduğunu göstermiştir (41). Yakın dönemde yapılan bir deneysel çalışmada ADAS'ların immun modülatuar etkileri daha potent olarak gösterilmiştir (42). Bu sonuçlar ile beraber ADAS bir tolerans indüksiyon stratejisi ve immun modülasyon yöntemi olarak donör kökenli veya alıcı kökenli $5x10^5$ -$5x10^7$ hücre/kg olarak (37) beraberinde çeşitli tartışmalarla çeşitli protokollerle hayvan deneylerinde kullanılmaktadır (43).

Bir tolerans indüksiyon stratejisi olarak allojenik ADAS, SC ve IV olarak allotransplantasyon öncesinde, peroperatif ve postoperatif uyguladığımız protokolde (doz, gün ve uygulama biçimi) henüz kullanılmamıştır. Bu bilgilerden hareketle deneyimizde uyguladığımız protokollerle donör kökenli ADAS IV ve SC kullanımı ile immun modülasyon, immunsüpresif ajan kullanılmadan allogreft yaşam süresinde uzama amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1.Transplantasyon İmmunolojisi
4.1.1. Transplantasyon Tarihçesi

Allotransplantasyon adına ilk bilinen cerrahi beşinci yüzyılda ikiz azizler Cosmos ve Damian tarafından yapılmıştır. İkiz azizler bacağını kaybetmiş bir hastaya yeni ölmüş Etiyopyalı bir köleden aldıkları bacağı transplante etmişlerdir (44). M.Ö. ikinci yüzyılda, Hint cerrah Sushruta burun rekonstrüksiyonu için otolog deri grefti kullanmıştır. Rönesans döneminde İtalya'da Bologna şehrinde Gaspare Tagliacozzi (1547-1599) köleden efendisine olmak üzere burun allotransplantasyonu ve otolog burun rekonstrüksiyonu yapmıştır. Otolog burun rekonstrüksiyonu başarılı olurken, allotransplantasyon başarısız olmuştur. Tagliacozzi bu konuda bireyin özgünlüğünü ve bir bireyden diğerine aktarımın bu nedenle olamayacağını ön gören fikirlerini 1596'da ifade etmiştir (9).

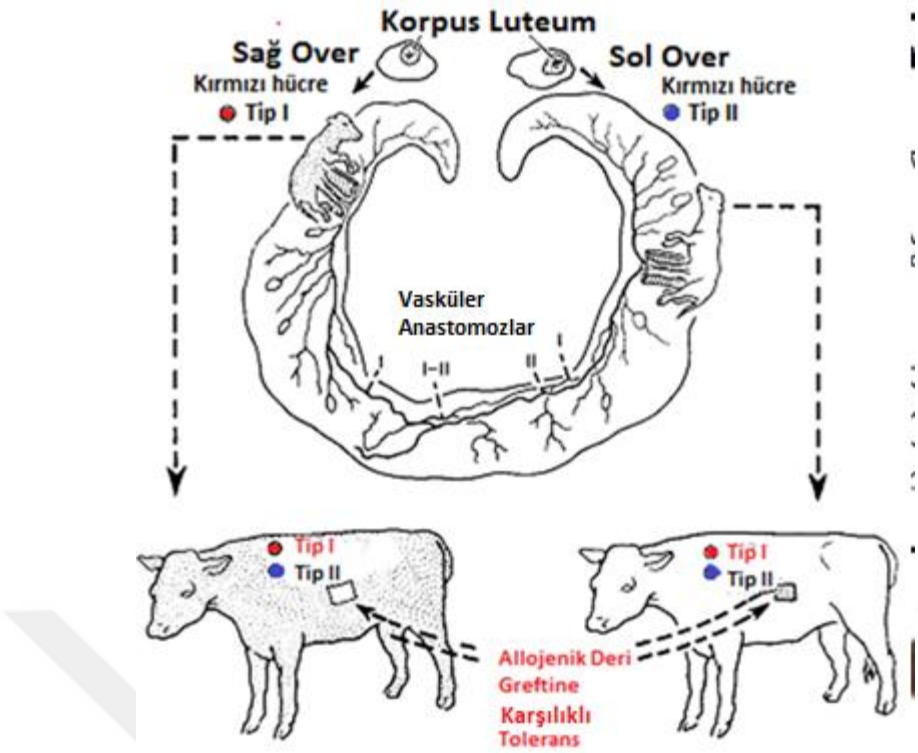
1800'lü yılların sonunda T. Kochen tarafından tiroid implantasyonu ile tiroid rezeksiyonu yapılan hastalarda görülen hipotiroidinin kaybolması ile tiroid fonksiyonları ortaya konmuştur. Bu yıllarda transplantasyon yoluyla bir organın yerine başka bir organın tranplante edilebileceği düşüncesi kabul edilmiştir. A. Eisellberg hemen ardından pankreas, over, testis zenotransplantasyon ve allotransplantasyon denemeleri yapmıştır (45).

1900'lu yılların başlarında A.Carrel köpeklerde başarılı arka bacak nakilleri, C. Guthrie köpeklerde kısa süreli başarılı göz kapağı ve tükürük salınımı elde edilen baş allotransplantasyonu yapmıştır. M. Jaboulay tarafından domuzlardan insanlara böbrek zenotransplantasyonu denemeleri yapılmıştır (9, 45). Fakat zenotransplantasyonların bir hafta içerisinde rejekte edilmesi ve mortalite nedeni ile zenotransplantasyon immunsüpresif ilaçlar keşfedilene dek denenmemiştir. A. Carrel yaptığı çalışmalarla allojenik rejeksiyonu tanımlamış, allotransplantasyon için sinir ve damar mikrocerrahi anastomozu gerekli olduğunu ortaya koymuştur (46). Allojenik rejeksiyon tanımlanması sonrasında transplantasyon immunolojisi kavramı G. Schöne tarafından ortaya konulmuştur (45). Allojenik rejeksiyonu önlemek için 1900'lu yılların başlarında tanımlanan antikorlar, radyoterapi, benzen, splenektomi ile retiküloendoteliyal sistem baskılanmaya çalışılmıştır. Fakat bu tedaviler enfeksiyonlara, immun süpresyona yol açması ve sebep olduğu morbidite ve mortalite nedeni ile klinik olarak uygulanabilir bir pratik olmaktan uzakta kalmıştır. 1930'lu yıllara gelindiğinde böbrek allotransplantasyonu denemeleri yapılmaya başlanmıştır. Fakat denemeler başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Bu dönemde Traub transplasental embriyo

enfeksiyonu sonrası lenfatik bir virüsün yaşayabildiğini, erişkindeki enfeksiyondan sonra yaşayamadığını göstermiştir. Bu erişkindeki immun yanıtın göstergesi olmuştur (47).

1940'lı yıllarda allojenik immunolojik bariyerlerin (MHC) henüz tanımlanmadığı II. Dünya Savaşı sırasında yanık ile yaralamış olan pilotlar için İngiltere Tıp Araştırmaları Konseyi genç bir plastik cerrah olan T. Gibson'u görevlendirmiştir. Yanık tedavisinde ilk allogreft uygulamaları bu dönemde kullanılmıştır. T. Gibson bu hastaları tedavi ederken aynı donörden alınmış allogreftlerin ikinci deneme transplantasyonlarda daha hızlı rejekte olduğunu gözlemlemiştir. Bu konudaki gözlemleri için P. Medavar ile birlikte hayvan deneyleri ve allogreftler üzerinde çalışmalar yapmıştır. Bu deneylerde alıcı tarafından yaratılan immun cevap ile kişiye özel spesifik deri allogreft rejeksiyonu kavramını tanımlamışlardır (48, 49). MHC (Büyük doku uyumluluk kompleksi) kavramı fark edilmiştir (50).

1950'lili yıllarda Owen dizigotik ikizlerde fetal sirkülasyonda mevcut vasküler anastomozlar ile oluşan doğal immun tolerans kavramı ortaya konmuş, birbirlerinin hematopoietik hücrelerini aldıkları ve birbirlerinin deri greftine karşı immun tolerans oluşturdukları ve kimeralar oldukları gösterilmiştir (51) (Şekil 1). Billingram, Brent ve Medavar immun defisiti olmayan erişkin donör fareden fetal veya prenatal farelere inoküle olan dalak hücrelerinin alıcıda allotoleransa yol açtığını göstermiştir. Yenidoğanda intravenöz allojenik hücre enjeksiyonu ile kazanılmış neonatal immun tolerans oluşturulmuş ve allografte yönelik donör spesifik tolerans geliştirilmiştir. Bu deneyler ilk defa neonatal kazanılmış allojenik toleransın oluşabileceğini göstermiştir (52, 53). Yine 1950'li yıllarda plastik cerrah Joseph Murray köpeklerde immun tolerans oluşturmak amacıyla deri ve böbrek nakli çalışmaları yapmıştır. J. Murray ve J. H. Harrison, 1954 yılında, tek yumurta ikizleri arasında ilk başarılı böbrek naklini gerçekleşmiştir (54).

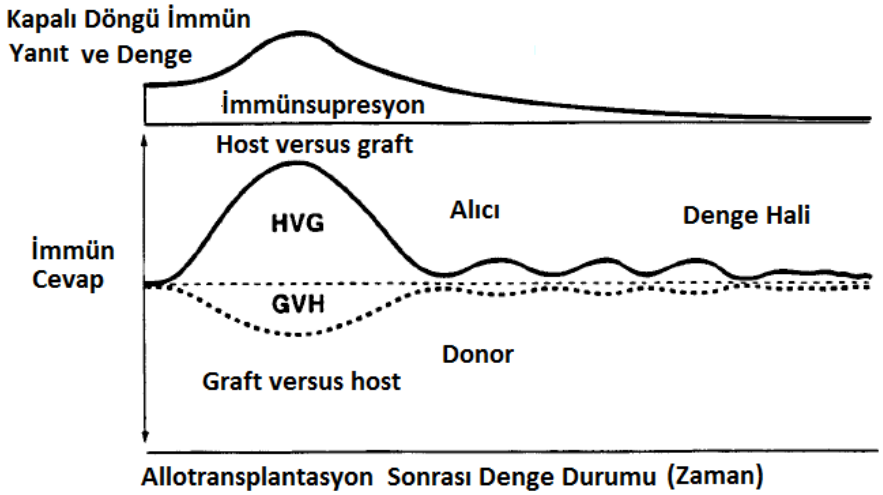


Şekil 1: Owen, dizigotik ikizlerde fetal sirkülasyonla oluşan doğal immun tolerans (55) (Free Martin Cattle)

1950'li yıllarda steroid bulunmuş ve Radyoterapi (RT) ile sitoablasyon ve tolerans indüksiyonu çalışmaları başlamıştır. İlk denemelerde steroid ve RT kullanılarak deri allogreft yaşam süresi tavşanlarda sadece bir kaç gün uzatılabilmiştir. Canon ve Longmire steroid kullanımının sadece allogreft rejeksiyon sıklığını azalttığını, engellemediğini ve kesildiğinde rejeksiyonun gerçekleştiğini ortaya koymuştur. Daha sonra Main ve Prehn yaptıkları çalışmalarda total myeloablasyon ve allojenik kemik iliği hücreleri inokülasyonu ile donör spesifik tolerans oluşturma kavramını ortaya koymuştur. Fakat bu dönemde GVHD ve total myeloablasyonun mortalitesi ve morbiditesi, MHC bariyeri önemli bir problemdi. Bu yıllarda bir miyeloablatif nitrojen mustard olan alkilleyici ajan siklofosfomid allojenik greft uygulamalarında tolerans indüksiyon stratejisi olarak kullanılmış, allogreft yaşam süresinde bir üç güne kadar uzama kaydedilmiştir (55-58).

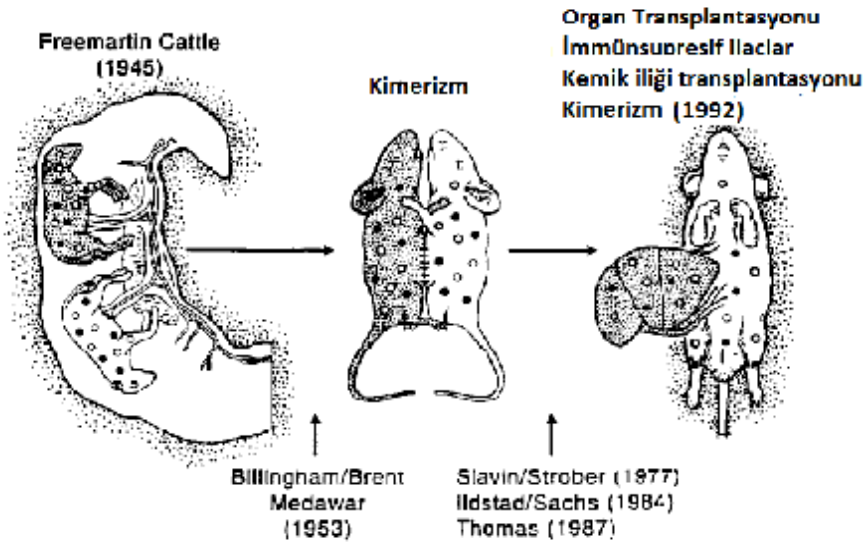
Owen tarafından ortaya konan dizigotik ikizlerde fetal sirkülasyonla oluşan doğal immun tolerans kavramı, Bilingham, Medavar ve Brent tarafından deri allogreftlerine karşı neonatal maruziyetle kazanılmış immun tolerans sağlanabileceği gösterilmesi (59), immunoterapi ve organ allogreft transferleri ile immunsüpresif ilaçlarca indüklenen donör spesifik immun tolerans oluşturduğunun gösterilmesi (60), allogreftin antijenik değil immunojenik olduğu

fark edilmesi (53), MHC bariyerinin fark edilmesi modern transplantasyon immunolojisinin başlangıcı sayılmıştır. Daha sonra bu deneylerden yola çıkılarak Burnet ve Fenner tarafından allotransplant yapılan canlılar arasında yakın genetik ilişki olmadığında antijenik yanıt kapalı döngü bir reaksiyon haline dönüştüğü fark edilmiş ve GVHD tanımlanmıştır (55) (Şekil 2).



Şekil 2: Kapalı döngü antijenik yanıt

1960'lı yılların başında azatiyopürin, 6-merkaptopürin bulundu ve hayvan deneylerinde solid organ allotransplantasyonlarında allogreft yaşayabilirliğini uzattıkları ortaya konuldu (61). 1963'te Ekvator'da azatiyopürin ve hidrokortizon kullanılarak ilk el allotransplantasyonu yapıldı. Üç hafta sonra immun rejeksiyon gelişmesi üzerine transplante edilen el geri alınmıştır (62). 1967 yılında Peacock tarafından ilk başarılı allojenik en-bloc dijital tendon mekanizması transferi uygulaması yapıldı. Kompozit doku allotransplantasyonu tanımlaması olarak literatüre girdi (63). İlerleyen yıllarda silikon kullanımı ile yapılan otogreft uygulamalarındaki başarı nedeni ile önemini kaybetti. 1970'li yıllara gelindiğinde RT tedavisi, kemik iliği transplantasyonu ve kimerizm düşüncesi myeloproliferatif hastalıklarda ve allotransplantasyonlarda tolerans indüksiyonu amaçlı kullanılmaya başlandı (64) (Şekil 3).



Şekil 3: Kimerizm düşüncesi

Bu yıllarda allojenik deriye yönelik tolerans önemli bir bariyerdi. İlk defa Billingham (65) tarafından ortaya atılan split tolerans kavramı ile Boys ve Old tarafından ortaya atılan deri antijenleri kavramı ile bir dokuya tolerans geliştiren alıcının aynı donörden bir başka dokuya karşı geliştiremeyebileceği düşünülmüştür (66). Split tolerans allotransplante edilen dokunun farklı yapılarına karşı farklı rejeksiyon yanıtının gelişmesi halidir (19). Dolayısıyla bu dönemde en antijenik yapı olan deri içerikli allogreft transplantasyonlarında deri rejeksiyonu önemli bir bariyerdi.

1976'da siklosporinin bulunması ile solid organ allotransplantasyonlarında bir devrim oluştu. 1981 yılında ilk başarılı kalp-akciğer nakli gerçekleşti. Allojenik böbrek transplantasyonu yapılan hastalarda akut rejeksiyon atakları %70'den %50'lere düşerken, ilk bir yıl içerisinde greft yaşayabilirliği %50'den %80'lere çıktı (67). Kalp, böbrek, karaciğer ve pankreas allotransplantasyonlarında alınan olumlu sonuçlar üzerine akut rejeksiyon hızını azaltmak ve allogreft yaşam süresini uzatmak amacı ile küçük hayvan deneylerinde arka bacak ve mandibula allotransplantasyon denemeleri yapılmaya başlandı (68).

1970'lerin sonu, 1980'lerin başında üst ekstremite transplantasyonları üzerinde siklosporinin efikasitesi test edildi. İlk defa 1984 yılında sıçanlarda siklosporin kullanılarak ekstremite transplantasyonu yapılabileceği gösterildi. Fakat siklosporinin toksik etkileri nedeni ile deri içeriği fazla olan üst ekstremite allogreftleri yüksek oranda transplantasyon sonrasındaki bir kaç ay içerisinde split tolerans kavramına uygun bir şekilde rejekte oldu (2, 69).

1990'lı yılların başlarında takrolimus, ortalarında mikofenolat mofetil (MMF) (70), sonlarında rapamisinin kullanılmaya başlamasıyla, monoklonal antikor teknolojisindeki gelişmelerle (71), MHC gen kompleksi ve immun yanıttaki rolü ile ilgili keşiflerle (72), kök hücrelerin immun modülatuar ve immunsüpresif etkilerinin (73), plastisitesi yüksek telerojenik hücrelerin (74) ve immun regülatuar hücrelerin keşfi (75) ile kompozit doku nakli alanında yeni deneysel çalışmalar yapılmaya başladı (Şekil 4). Ekstremite, vaskülarize diz, larinks, allotransplantasyonu siklosporin ile başarılı olarak uygulandı. Takibinde sinir, tendon, vakülarize iskelet kası, yüz, penis, dil allotransplantasyonları yapıldı (2). Deneysel hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda elde edilen olumlu sonuçlar ile I. Uluslararası Kompozit Doku Sempozyumu düzenlendi. İmmunolojik ve etik bariyerler tartışılarak mevcut hayvan deneylerinin insanlarda kompozit doku nakillerinin uygulanabilmesi açısından yeterli olduğu ve insanlarda kompozit doku nakline klinik olarak geçilmesi gerektiği fikrinde uzlaşma sağlandı. Temel olarak kompozit doku naklinde mevcut deri yükünün fazlalığı nedeni ile tedavi prensibi maksimum immunsüpresyon, minimum immunsüpresif kullanımı ve minimum yan etki şeklinde karar alındı. Altın standart takrolimus, MMF, steroid kombinasyonu olarak belirlenerek el transplantasyonlarının insanlarda denenmesinin uygun olduğuna karar verildi (76). Fransa'da 1998'de, ilk unilateral el transplantasyonu yapıldı. Postoperatif değerlendirmelerin olumlu olması üzerine bilateral el transplantasyonları yapıldı (9, 77). Takibinde 2005'te Fransa da ilk yüz allotransplantasyonu yapıldı (11). Halen VCA sınırlı sayıda ve seçilmiş vakalarda, uygun endikasyonlar mevcut ise tek başına veya konkomitan, ekstremite ve yüz olmak üzere uygulanmaktadır. 2016 yılına dek yapılmış VCA hastaları takip edilmekte, fonksiyonel ve estetik sonuçlar, immunsüpresif uygulamalarla ilgili tartışmalar yapılmaktadır. Fakat VCA'larda önemli problem immunsüpresif tedavilerle kontrol altına alınsa bile kompozit içerik nedeni ile mevcut antijenik yüke bağlı yaşanan akut rejeksiyon atakları ve en yüksek antijenik özellikteki deriye yönelik gelişen split tolerans kavramıdır. Bu sebeplerle çeşitli immun modülatuar yöntemlerle allojenik deriye yönelik tolerans indüksiyon çalışmaları devam etmektedir. T Gibson, P. Medavar, Owen, Bilingham, Brent'in deri greftine yönelik tolerans indüksiyonu çalışmalarının üzerinden 70 sene geçmiş olmasına, HLA doku uyumluluk antijenleri ve immun sistem ve immun modülasyon yöntemleri ile ilgili keşiflere rağmen hala deri allogreft rejeksiyon mekanizması ortaya konamamıştır, bu konudaki deneysel çalışmalar devam etmektedir (78).



Şekil 4: İmmunoloji alanındaki önemli gelişmeler (79)

4.1.2. Transplantasyon

Cerrahi olarak transplantasyon yaşayan hücre, doku ve organların bulunduğu bölgeden ayrılıp başka bir bölgeye yerleştirilmesidir. Greft deri veya kemik doku gibi yaşayan bir canlı dokunun aynı canlıda bulunduğu bölgeden başka bir bölgeye yerleştirilmesi veya farklı canlılar arasında aktarılarak farklı bölgelere yerleştirilmesidir (80). Transplantasyonlar transplantasyonun içerdiği organ, fonksiyonel ünite, doku, hücre yapısı bileşimine (kompleksite), transplante içeriğin alındığı donöre (genetik orijin), göre sınıflandırılır. Alıcı ve donörün aynı canlı olduğu transplantasyonlara ‘ototransplantasyon’, aynı tür içerisinde izogenetik canlılar arasındaki transplantasyonlara ‘izotransplantasyon’, aynı tür içerisinde farklı genetik yapıdaki canlılar arasındaki transplantasyona ‘allotransplantasyon’, farklı türde canlılar arasındaki transplantasyonlara ‘zenotransplantasyon’ denir (81).

4.1.2.1. Deri Grefti

Epidermis ve dermisin kısmi ya da totalini içeren donörden tamamen devaskülarize şekilde ayrılmış, yerleştirileceği bölgeden plazmatik imbibisyon ve kapiller neovaskülarizasyon, revaskülarizasyon ile iyileşmesi hedeflenen dokudur (Tablo 1). Otolog, zenotransplantasyon veya allotranplantasyon şeklinde deri grefti uygulamaları yapılmaktadır (Tablo 2). Greft

yatağına yerleştirildikten sonraki ilk 48 saat serum inhibisyonu dönemidir. Greft yatağında oluşan fibrin doku greftin yatağına yerleşmesini sağlar. Bu dönemde beslenme difüzyon yardımı ile olur. Takiben kapiller neovaskülarizasyon, revaskülarizasyon aşamasıyla deri grefti yerleştirildiği yatakta vitalite kazanır. Kısmi kalınlıkta deri greftleri epidermisin bir kısmını içerirken, tam kat deri greftleri tüm dermisi içeren deri greftleridir (82, 83) (Tablo 1).

Tablo 1: Deri greftleri kalınlığına göre (83)

Deri Grefti	**İsim**	**Kalınlık (mm)**
Kısmi kalınlıkta deri grefti	İnce (Thiersch-Ollier) Orta (Blair-Brown) Kalın (Padget)	0,15- 0,30 0,30- 0,45 0,45- 0,60
Tam kat deri grefti	Wolfe-Krause	>12,60

Tablo 2: Deri greftleri alındığı bölgenin genetik orijinine göre (81, 83)

İsim	**Orijin**
Otogreft	Donör ve alıcı aynı kişi ise
Homogreft Allogreft İzogreft	 Aynı tür içerisinde; farklı genetik özellikte canlılar arasında Aynı tür içerisinde izogenetik canlılar arasında (ikizler)
Zenogreft	Farklı türler arasında

4.1.2.2. Otolog Deri Grefti

Kişinin kendisinden yapılan otolog deri grefti transferleri plastik cerrahide bir çok rekonstrüksiyon uygulamasında primer ya da ana cerrahiye yardımcı olacak şekilde sıklıkla kullanılmaktadır. Sekonder yara iyileşmesine bağlı kontraktürleri önler. Hızlı bir rekonstrüksiyon seçeneği olarak bir çok endikasyonda olumlu sonuçlarıyla basit ve etkili bir yöntemdir (83). Kültür koşullarında kişinin kendisinden alınmış otolog deri greftleri oluşturulmasının zaman alması, otogreftin ince, nazik olması ve zedelenmeye meyilli olması yanık hastalarında akut dönemde dezavantajdır.

4.1.2.3. Allojenik Deri Grefti

Kronik yaraların ve yanık hastalarının tedavisinde kültür koşullarında oluşturulmuş allojenik hücre içerikli biyosentetik deri allogreftleri kullanımdadır. Kronik yaralarda, yara iyileşmesi için erken dönemde yara iyileşmesi başlayana kadar yerleştirilerek, uygun yara yatağı sağlama ve iyileşme sürecini hızlandırmak için kullanılmaktadır. Tam kat oluşmuş yanıklarda otolog kaynaklar sınırlı olduğunda allogreftler kullanılabilir. Erken dönemde hızlı rekonstrüksiyon için debridman sonrasında dehidratasyonu, enfeksiyonu önlemek, yanık

yarasını korumak için gliserol ile muamele edilerek devitalize edilmiş ve antijenitesi azaltılmış olarak allojenik yapay deriyi taklit eden kültür koşullarında oluşturulmuş biyosentetik materyaller pahalı olması bir dezavantaj olmakla beraber kullanılmaktadır. (84, 85). Gliserol ile muamelenin antiimmunojenik, antibakteriyal ve antiviral etkileri vardır. İşlem görmemiş canlı allogreft immunojeniktir. Sağlıklı ve immun defisiti olmayan bir alıcıya allogreft transplante edildiğinde rejekte edilir. İnsan kadavrasından elde edilmiş allojenik hücreler ile üretilen doku mühendisliği ürünleri allojenik deri greftleri kronik ülser ve yanık tedavisinde kullanılmasına rağmen allorejeksiyon önlenememiştir. Bu nedenle tedavide allojenik deri grefti kullanımını takiben otojenik greft kullanımı zorunludur (18, 86, 87). İmmunoloji alanında yeni gelişmeler ve keşiflerle allojenik deri rejeksiyonunu önlemeye yönelik deneysel çalışmalar hız kazanmıştır (88, 89).

4.1.2.4. Zenojenik Deri Grefti

Transplantasyon için aynı türden donör bulunmasında oluşan zorluklar nedeni ile alternatif olarak hücre, doku ve organların başka bir türden elde edilmesi konusu bir araştırma konusudur. Yakın ilişkili türler arasında, maymun (primat)-insan ve uzak ilişkili türler arasında, domuz (non primat)-insan yapılabilir. Zenogreftlere sağlanacak immun tolerans sayesinde hızlı, kolay ve çok sayıda organ donasyonu sağlanabilir (4).

Yara iyileşmesine zenogreft etkileri ile ilgili ilk çalışmalar Davies ve Silvetti tarafından yapılmış, ilk uygulamalar sığır embriyo derisi ile yapılmıştır. Günümüzde domuz sığır ve koyun zenogreftleri kullanılabilmektedir. Domuzdan elde edilen zenogreftler ucuz olması ve histolojik yapısının insan derisine benzemesi nedeni ile tercih edilmektedir. Domuz zenografti taze veya gliserol ile kimyasal dehidratasyon uygulanarak veya lipofilizasyon yöntemi ile devitalize edilerek kullanılabilir. Domuz zenografti deri grefti alınmış donör alanlarda, geniş yanıklarda, Stevens-Johnson Sendromu gibi eksfolyatif hastalıklarda, enfekte veya kabuklu yaralar ve yanıklarda, sandviç greft tekniği şeklinde uygulanarak tedavi amaçlı kullanılabilir. Isı, sıvı ve elektrolit kaybını azaltır. Ağrıyı ve bakteriyel çoğalmayı azaltır. Reepitelize olan yaraya fiziksel koruma yapar. Demarke olması beklenen yarada, greft alacak yeterli otolog saha bulunmadığında ve total deri grefti için hazırlık uygun olmadığı durumlarda kullanılabilir (90).

Mevcut immunsüpresif tedaviler ile zenogreftlere yönelik immun tolerans oluşturma ve zenogreft yaşam süresinde artış hedeflenerek deneysel çalışmalar yapılmaya devam etmektedir (4, 5, 91).

4.2. Allogreft Rejeksiyon Mekanizması

4.2.1. Transplantasyon İmmunolojisi Antijenleri

Organizmada immun yanıt oluşturan ve immun yanıt sonucunda ortaya çıkan antikor ve hücre yüzey molekülleri ile birleşme özelliği gösteren, organizmanın yapısına yabancı olan maddelere 'antijen' denir (81, 92).

Transplantasyon Antijenleri:

1-Major MHC antijenleri
2- Minör MHC antijenleri
3-ABO kan grubu antijenleri
4-Dokuya özel antijenler ve split tolerans

4.2.1.1. Major MHC (Büyük Doku Uyumluluk Gen Kompleksi) Proteinleri

MHC gen kompleksi altıncı kromozomun kısa kolu üzerinde lokalize olan gen topluluğudur. MHC gen bölgesi immun sistem fonksiyonunun %40'ı ile ilişkili tanımlanmış 200'den fazla gen içermektedir. HLA (insan lökosit antijen) sınıfı proteinlerin yapımından sorumlu bölgedir. MHC antijenleri HLA olarak tanımlanır. Bu ismin verilmesinin sebebi ilk defa lökosit yüzeyinde bulunmuş olmasıdır (93). İmmun sistem kendi MHC gen kompleksi ile uyumsuz MHC ekpresyonu protein (HLA molekülleri) içeren allojenik hücreyi immun yanıt oluşturarak rejekte eder (94, 95).

MHC Sınıf I Bölgesi

HLA sınıf I doku uyumluluk moleküllerini kodlar. Vücuttaki tüm nükleus bulunduran hücrelerde bulunan proteinleri kodlar (94).

Sınıf I: HLA- A,B,C

MHC Sınıf II Bölgesi

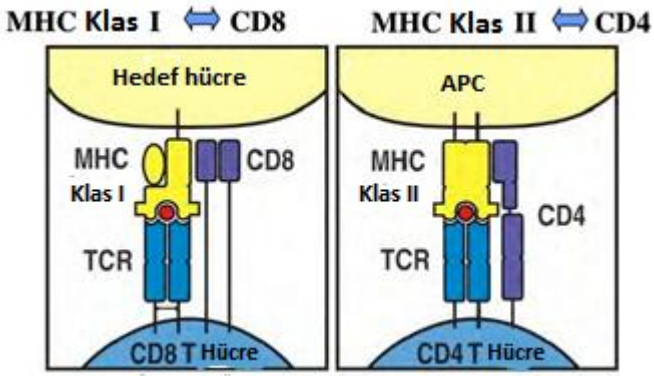
HLA sınıf II doku uyumluluk moleküllerini kodlar. Kazanılmış immuniteyi aktive eden T lenfositleri uyaran antijen sunan hücre yüzeylerinde, B hücreler, makrofaj, monosit, foliküler dendritik hücre yüzeylerinde bulunan protein grubunu kodlar. Yüksek polimorfizmi vardır. Alloantijen cevabında MHC II molekülleri çok önemlidir (94).

Sınıf II: HLA- DR, DQ, DP

MHC Sınıf III Bölgesi

Kompleman faktörleri (C2-C4), ısı şok proteinleri ve TNF ile ilgili proteinleri kodlar (93, 96).

Farklı tipteki T hücrelerinin olgunlaşma ve proliferasyon süreci TCR peptid-MHC kompleksi birleşmesi ile olur. Efektör (CD4+)Th hücreler hücre dışı patojenleri temizlerken, efektör (CD8+)Ts hücreler hücre içi organizmalarla enfekte hücreleri doğrudan yok eder. Bir antijenik peptidin (CD4+)Th veya (CD8+)Tc hücresinden hangisini uyaracağına peptidi sunan MHC proteinleri belirler. T hücreleri yalnız protein yapıda antijenleri tanır ve kazanılmış immun yanıtta rol oynar. MHC sınıf II molekülleri ile birlikte sunulan antijenleri, (CD4+)Th hücreler tanır. MHC sınıf I molekülü ile birlikte sunulan antijenleri ise (CD8+)Tc lenfositleri tanır (97, 98) (Şekil 5).



Şekil 5: MHC T hücre etkileşimi

MHC ekspresyonu proteinler allogreft rejeksiyonunda doğal ve kazanılmış immunite aracılığı ile rol oynar. Major MHC ekspresyonu proteinlerde (HLA) uyumsuzluk olması doku uyumsuzluğu anlamına gelir ve allotransplantasyonun postoperatif seyrini olumsuz etkiler. 1970'li yıllarda Paul Terasaki tarafından bulunan ve allotransplantasyon öncesinde negatif çıkması ile allorejeksiyon riskini düşüren doku uyumluluk testlerinin allotransplantasyon alanında uygulanmaya başlamasıyla çığır açılmıştır. Bu testler donör HLA tiplendirilmesi, HLA'ya yönelik oluşan antikorların sensitif, spesifik testler ile belirlenmesi ve alıcı ve verici arasında doku uyumluluğu olduğunu gösteren 'cross matching' yöntemlerini içerir. Preoperatif ve postoperatif alloreaktif T hücreleri, alloantikorlar çeşitli yöntemlerle tespit edilebilmektedir (94, 99).

4.2.1.2. Minör MHC antijenleri

MHC majör doku uyumluluğu olsa bile minör MHC proteinleri allotransplantasyon sonrasında rejeksiyonu tetikleyebilir. Bu nedenle MHC uyumluluğu mevcut transplantasyonlarda rejeksiyon görülebilir (79, 81).

4.2.1.3. ABO antijenleri

ABO kan grubu antijenleri transplantasyon için önemli bir bariyerdir. Fakat bu bariyer ABO uyumlu allotransplantasyon uygulaması ile aşılabilir. Rh antijenleri allogreft rejeksiyonunda rol oynamaz. Anti A ve anti B antikorları doğumda mevcut değildir. Bağırsak florasında mevcut çapraz antijenlere karşı doğumdan sonra bir kaç gün içerisinde gelişir. ABO uyumsuz nakillerde hızlı hiperakut rejeksiyon riski vardır. Kalp ve karaciğer allotransplantasyonları akut ABO antijenlerine bağlı gelişmiş rejeksiyona daha az duyarlıdır (81). Daha önce kan transfüzyonu almış kişilerde, gebelik esnasında veya geçirilmiş bir allotransplantasyon öyküsünde bu antikorlar pozitif olabilir. Hiperakut rejeksiyona sebep olabilir (100, 101).

4.2.1.4. Dokuya Özel Antijenler ve Split tolerans

Cilt allojenik transplante edilen dokular içerisinde en antijenik yapıdır (18). İlk defa Billingham (65) tarafından ortaya atılan split tolerans kavramı ve Boys ve Old tarafından ortaya atılan deri antijenleri kavramı ile bir dokuya tolerans geliştiren alıcının aynı donörden bir başka dokuya karşı geliştiremeyebileceği düşünülmüştür (66). Split tolerans allotransplante edilen dokunun farklı yapılarına karşı farklı rejeksiyon yanıtının gelişmesi halidir. Split tolerans ile uyumlu deri rejeksiyonunda deriye spesifik antijenler rol oynar (78).

4.2.2. İmmunolojik Allogreft Rejeksiyonu

Transplantasyon yapılan hastalarda allogreft immunsüpresif tedavi uygulanmazsa humoral ve hücresel immun sistem tarafından rejekte edilmektedir.

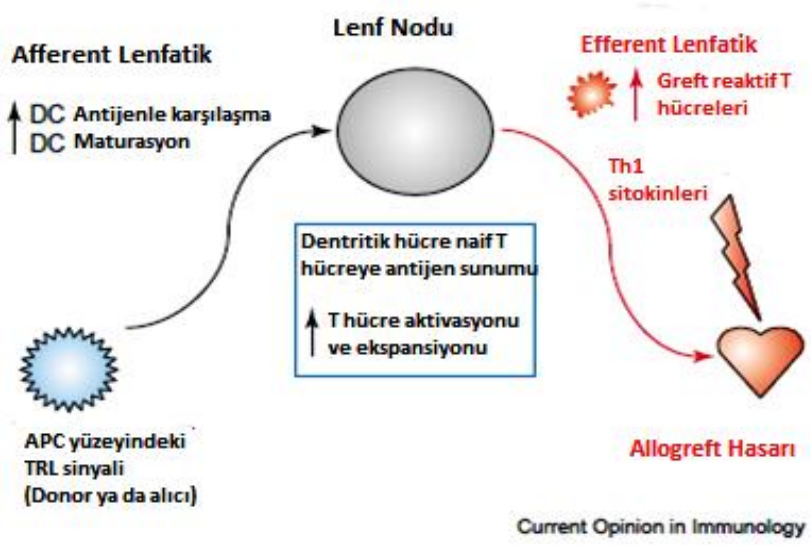
4.2.2.1. Humoral İmmun Yanıt / Antikor Aracılı Yanıt

Humoral allogreft rejeksiyonunda rejeksiyon mekanizması antikorlar aracılığı ile olur. Antikorlar hiperakut, akut ve kronik allogreft rejeksiyonunda rol alır. Doğal immun sistem hem erken doğal bağışıklık yanıtı olarak antikor üretimine başlayarak, hem de gebelik, kan transfüzyonu veya geçirilmiş transplantasyon öyküsü nedeni ile önceden mevcut antikorlar yolu ile allojenik rejeksiyon mekanizmasını tetikler. Endotel üzerindeki ABO ve HLA antijenlerine bağlanan antikorlar ‘antikor bağımlı hücre hasarı’ yapar. Kompleman bağımlı yollar olan membran saldırı kompleksi (MAC) yolağı, kompleman aracılı reseptör bağımlı fagositoz, inflamatuar süreçler, koagülasyon kaskadı allorejeksiyonda rol oynar. Hücresel veya humoral yol ile oluşmuş antikor antijen kompleksleri direkt organ veya doku hasarı yapar ve akut rejeksiyonu tetikler. Akut rejeksiyonu önlemek için doku uyumluluğu ve alıcıda mevcut antikorlara yönelik testler uygulanarak allotransplantasyon yapılır. Antikor üreten hücreler üzerinde deplesyon yapan immunsüpresif protokoller, antikorları elimine etme

yöntemleri (plazmaferez, IV Ig), steroid ve antikoagülan tedavi ile allogreft hasarını ve sekonder organ hasarını önlemeye yönelik tedaviler uygulanmaktadır (100, 102, 103).

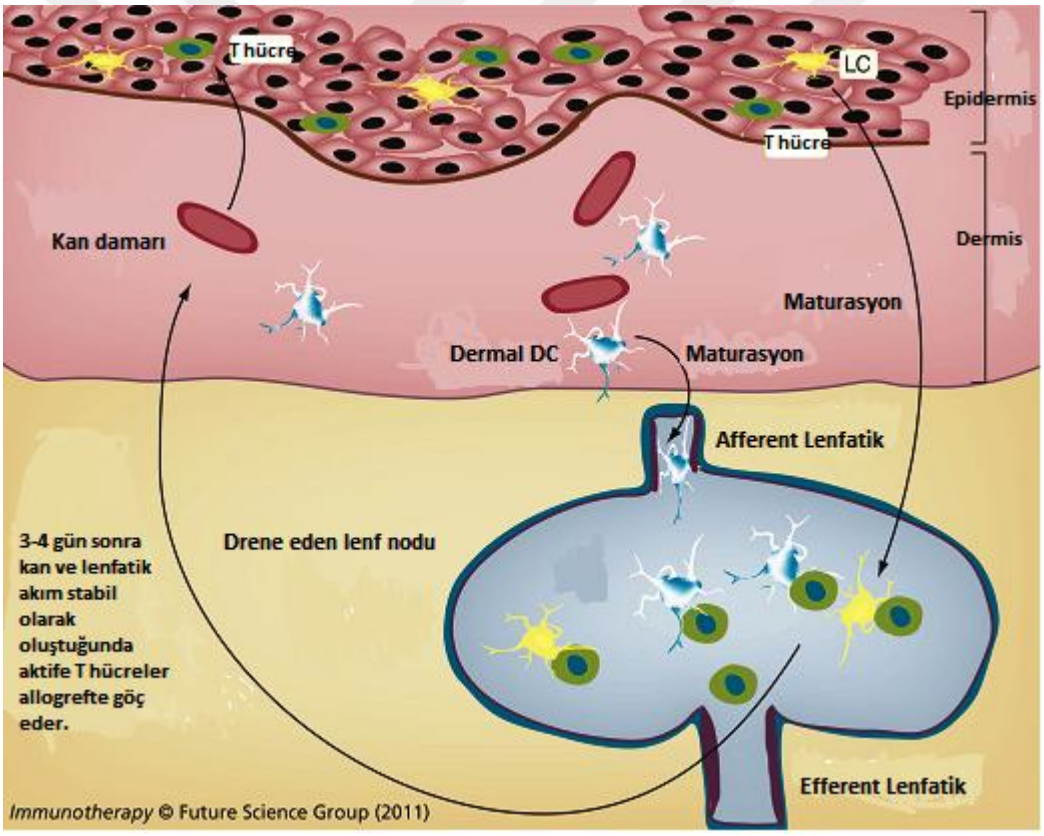
Deri Allogreft Rejeksiyonu

Allogreftin yerleşmesini takiben ilk doğal immun sistem aktive olur. Doğal immun sistemin etkili olan hücreleri dendritik hücreler, makrofajlar ve NK hücreler allotransplant rejeksiyonunda ilk olarak harekete geçerler ve kazanılmış immun sistemi uyararak allogreft rejeksiyonuna sebep olurlar (104-106). Doğal immun sistemi aktive eden konakçıya ait veya donöre ait ligandlar DAMPs (Danger or damage molecular patterns) adı verilen moleküllerdir. Bu moleküller TLRs (Toll-like receptors) reseptörlerini aktive etmektedirler (107) (Şekil 6). Dendritik hücrelerde eksprese edilen TLRs reseptörleri, PRRs (Patern Recognition Receptors) reseptörlerinin bir alt grubu olup allojenik antijenlerin tanınmasında rol oynamaktadır (108). Deneysel çalışmalar dendritik hücrelerce eksprese edilen TLRs reseptörlerinin deri allojenik rejeksiyonunda doğal immunite üzerinden humoral immun rejeksiyon mekanizmasında etkili olduğunu göstermiştir. TLRs reseptör sinyal adaptör proteini bloke edildiğinde lenf nodlarına drene olan matür dendritik hücre drenajı azalır, reaktif T hücreleri azalır ve Th1 cevabı bozulur. Bu cevap erken doğal allojenik yanıtın hücresel yanıt ile bağlantısını göstermektedir (109) (Şekil 6). Allojenik deri rejeksiyonunda T hücre yanıtı dermis ve epidermis ayrılmasına ve deri rejeksiyonuna yol açmaktadır. Bu doğal immun yanıtta rol oynayan adhezyon molekülleri, sitokin ve kemokinler vardır (110). Bu moleküllerden ICAM-1 ve selektin bloke edildiğinde allogreft rejeksiyonun geciktiği deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (111).



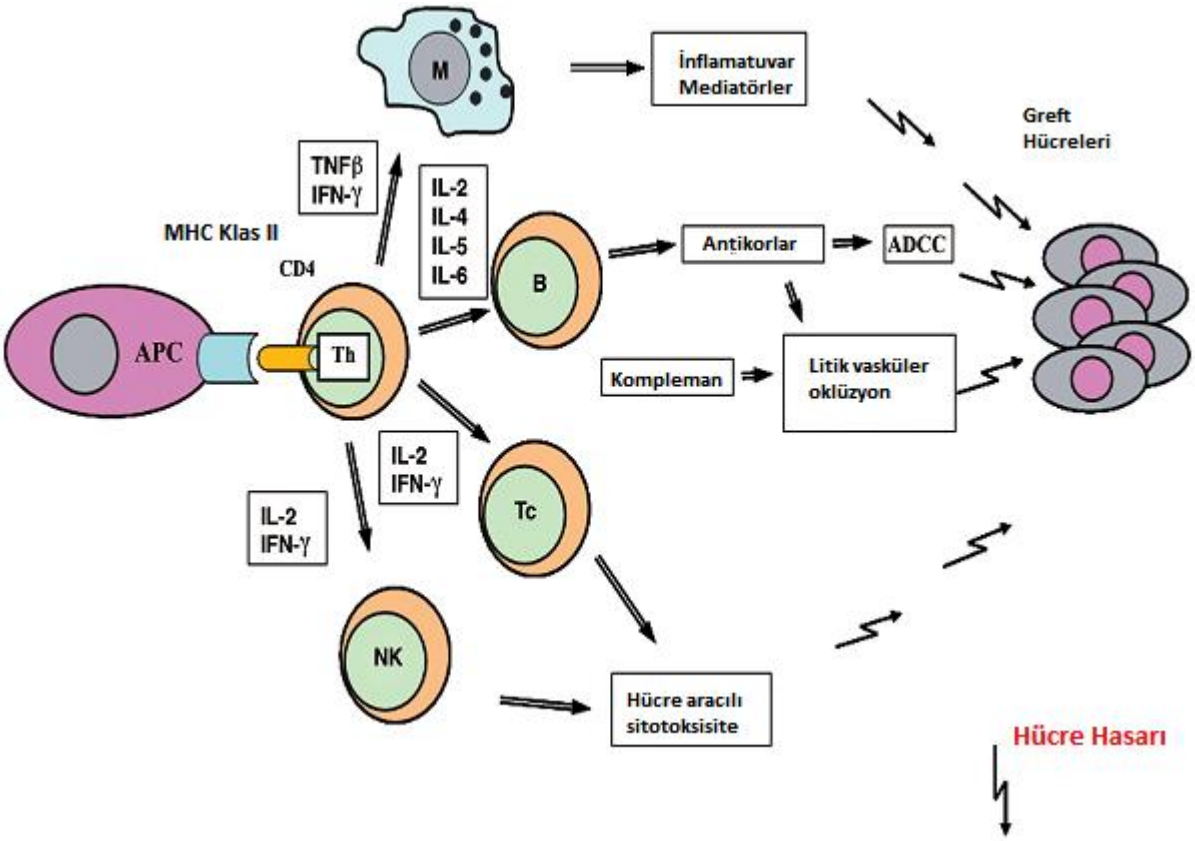
Şekil 6: Dendritik hücre allojenik doğal immun aktivasyonu (104)

Allojenik deri rejeksiyonu sırasında epidermiste bulunan Langerhans hücreleri, dermiste bulunan dermal dendritik hücreler ve makrofajlar aktive olarak kan dolaşımına ve lenfatik dolaşıma geçmekte, lenf nodlarına giderek alloreaktif T hücrelerine antijen sunarak hücresel immuniteyi ve alloreaktif T hücre proliferasyonunu aktive etmektedir. Bu süreçte en etkili hücre antijen sunan dendritik hücrelerdir. Langerhans hücreleri mezenkimal orijinlidir. Epidermisin tüm tabakalarında olmakla beraber, özellikle stratum spinosum'un üst bölümünde bulunmaktadır. Alloimmun dermal yanıtta başat uyarıcı hücredir (112) (Şekil 7). Deride yerleşik bellek T hücreleri ve Treg hücreler vardır. Langerhans hücreleri antijen stimülasyonu varlığında bellek T hücre proliferasyonunu, antijen stimülasyonu yokluğunda ise kutanöz Treg hücrelerin proliferasyonunu uyarır (113).



Şekil 7: Deri allogreft rejeksiyonu dendritik hücre yanıtı (112)

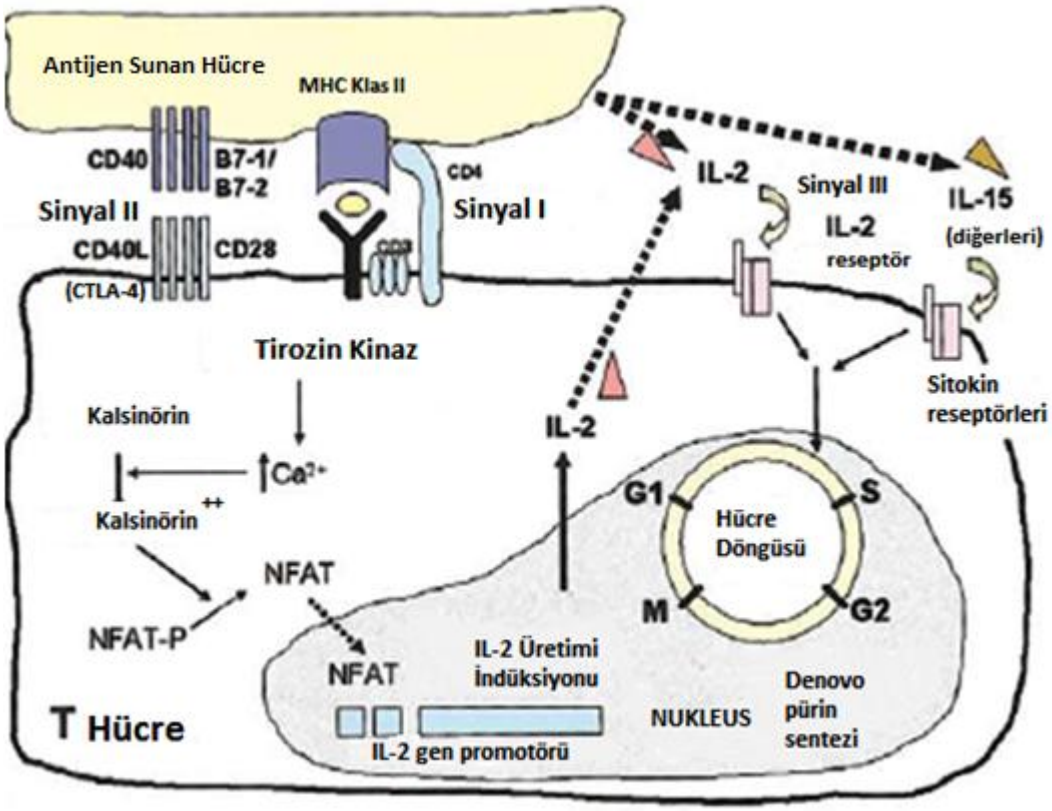
Zaman ilerledikçe doğal immun sistem ve antijen sunan hücreler tarafından uyarılan kazanılmış immunite/hücresel immun yanıt allorejeksiyon sürecine katılır. Hücresel immun yanıtın da katılımıyla kuvvetlenen humoral/antikor aracılı immun allogreft hasarı devam eder (Şekil 8).



Şekil 8: Allogreft rejeksiyonu APC (antijen sunan hücre) etkisi (101) ADCC: Antikor aracılı immunite

4.2.2.2. Hücresel İmmun Yanıt

Antijen sunumunu takiben hücresel immun yanıt, kazanılmış immunite devreye girer. T hücreler direkt, indirekt ve semidirekt moleküler yolaklarla allogreft rejeksiyonun oluşmasında rol oynar. T hücrelerinin alloantijene yanıt olarak immun aktivasyonu ve rejeksiyon sürecinin başlaması için üç sinyal vardır (114, 115) (Şekil 9).



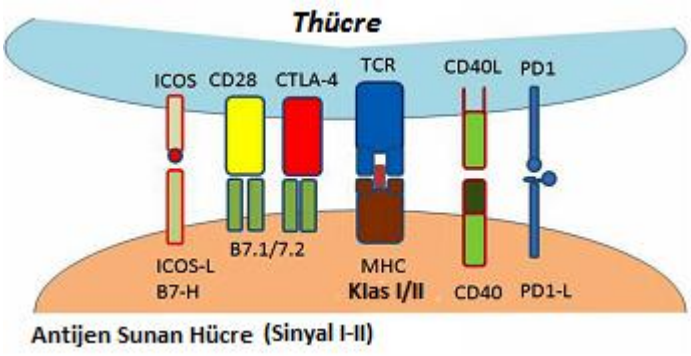
Şekil 9: T hücre aktivasyonunda sinyal mekanizmaları (114)

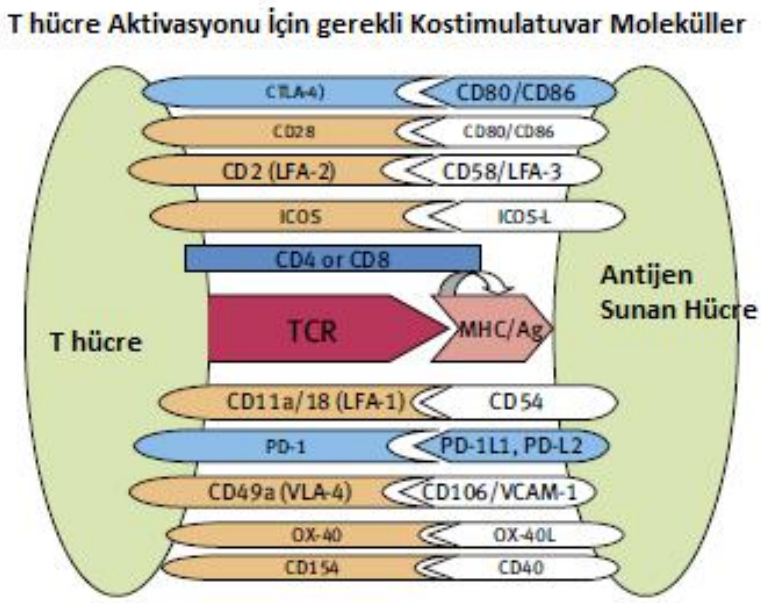
Birinci sinyal:

Antijen sunan hücreler T hücre aktivasyonu yapar. Dendritik hücreler ile T hücreler arasında karşılıklı etkileşim vardır. donöre ait antijenlerin TCR-MHC kompleksi birleşimi ile T hücreleri uyarılır (94) (Şekil 9-10).

İkinci sinyal:

T hücre yüzeylerinde bulunan kostimülatör moleküllerin (CD28), makrofaj, dendritik hücre ve B lenfosit yüzeyindeki ligandları ile (B7-1 veya B7-2, CD80/CD86) birleşmeleridir (Şekil 10). . Bu birinci yolaktır, burada inhibitör molekülü CTLA-4'tür. CTLA-4 Ig kullanılarak akut rejeksiyon baskılanabilir. Dendritik hücrelerdeki CD40 ile T hücrelerdeki CD154 (CD40 ligand) birleşmesi ile T hücrelerde B7 protein sentezi indüklenir. CD40:CD154 etkileşimi ikinci yolaktır. Bu etkileşimin anti CD40, anti CD154 ile blokajı halinde, T hücre aktivasyonu ve proliferasyonu inhibe olur. Anerji ve allotolerans gelişir. Diğer kostimülatör yolaklar ICOS:ICOSL, PD-1:PD-L1/L2, OX40:OX40L, 41BB:41BBL, CD27:CD70, LFA-1:ICAM, VLA-4:VCAM, TIM moleküllerdir (116, 117) (Şekil 9-10).





Şekil 10: T hücre aktivasyonu kostimülatuar moleküller (114, 118, 119)

Üçüncü sinyal:

Aktive T hücreleri IL-2 salgılamaya başlarlar. T hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonu hızlanır (114) (Şekil 9).

Allografte Yönelik Hücresel İmmun Yanıtta Rol Oynayan İmmun Hücreler

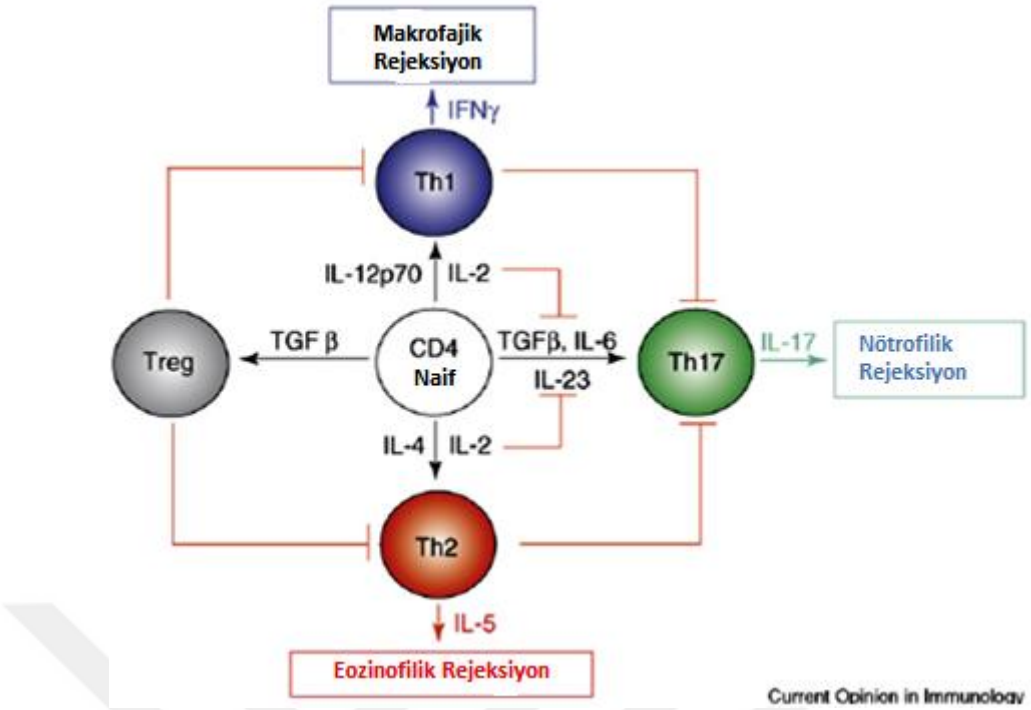
Doğal immun sisteme ait antijen sunan hücrelerce gerçekleştirilen antijen sunumunu takiben **Th hücreler,** IL-12 ve INF-γ varlığında **Th1** hücrelere dönüşür. Th1, IL-2 ve INF-γ ile NK, T sitotoksik hücreler ve makrofajları aktive ederler (79) (Şekil 12). T hücreler IL-4 varlığında **Th2** hücrelere dönüşür. IL-6 ve IL-4 aracılığıyla B hücreleri ve eozinofilleri aktive eder. Th2 hücreler IL-10 salgılayarak immun yanıt üzerinde inhibitör kontrolü sağlarlar (79, 120) (Şekil 11-12).

B hücreler, Th2 hücrelerce aktive edilip donöre ait antijenler için antikor üretmeye başlar. Kompleman bağımlı yolak veya opsonizasyon ile antikor aracılı sitotoksik yanıt oluşturur. donöre spesifik hafıza oluşumunu efektör ve bellek T hücrelerinin devamlılığını sağlar (112).

NK hücrelerin kendine ait MHC I dışındaki moleküllere saldırma özelliği vardır. Alloantijen ile temasta direkt sitotoksik etki ile donör hücrelere saldırır ve sitotoksik yanıt oluşturur. Th1 lehine immun stimülasyon yaparak allorejeksiyonda rol oynadıkları düşünülmektedir. Alloreaktif T hücrelerin aktivasyonunu kuvvetlendirir. Deplesyonları allogreft rejeksiyonunu engellemez. NK hücreler transplantasyon toleransında etkili olacak güçlü immun modülatuar faktörler salgılamaktadır. Deri allogreft deney modelinde yapılmış bir çalışmada alıcıya ait NK hücrelerin APC'ler üzerinde regüle edici faktörler ile etkili olduğu bu yolla T hücre fonksiyonlarını etkilediği gösterilmiştir (121).

Tc hücreler aktivasyonu takiben perforinler ve granzimler aracılığı ile direk sitolizis ve apopitotik hücre ölümü yapar (119). Bellek (CD8+)Tc hücreler (Memory (CD8+) T cell) rejeksiyonda önemli rol oynarken allogreft toleransına önemli bir bariyerdir (120).

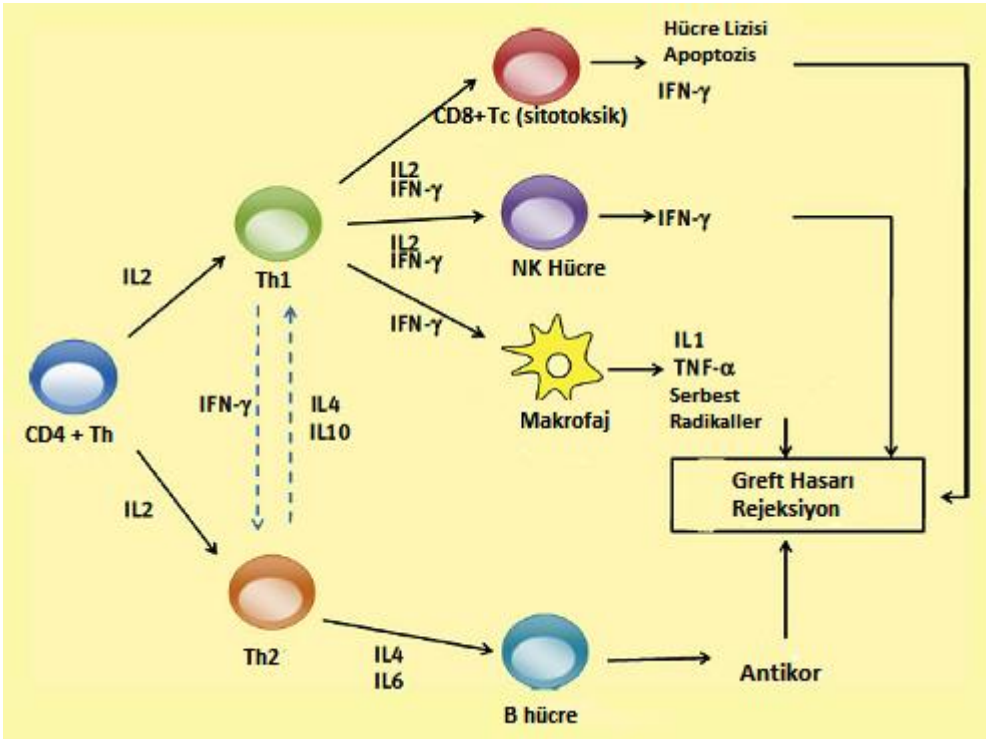
PMNL akut allorejeksiyonda allogrefti infiltre eder. IL-2 varlığında diferansiye olan alloreaktif Th2 hücreleri tarafından aktive edilen eozinofiller IL-4 aracılığı ile aktive olup allogrefti infiltre eder. Alloreaktif Th1 hücreler INF-γ aracılığı makrofaj aracılı rejeksiyonu aktive eder. IL-6 varlığında diferansiye olan Th17 ve IL-17 aracılığı ile nötrofilik rejeksiyon uyarılır (120). TGF-β varlığında diferansiye olan **Treg hücreler** TGF-β aracılığı ile immun süpresyon ve allogrefte yönelik immun yanıtta inhibitör etki yapar (79) (Şekil 11).



Şekil 11: Allogreft rejeksiyonunda hücresel yolak ile PMNL aktivasyonu (120)

4.2.2.3. Hücresel ve Humoral yanıt

Süreç ilerledikçe doğal ve kazanılmış immunite hücresel ve humoral mekanizmalarla allogreft rejeksiyonunda bir arada etkili olur. (Şekil 12).



Şekil 12: Allogreft hasarı Th1 ve Th2 hücre etkileri (79)

4.2.3. Hücresel İmmun Yanıt Moleküler Tanıma

4.2.3.1. Direkt Yolak

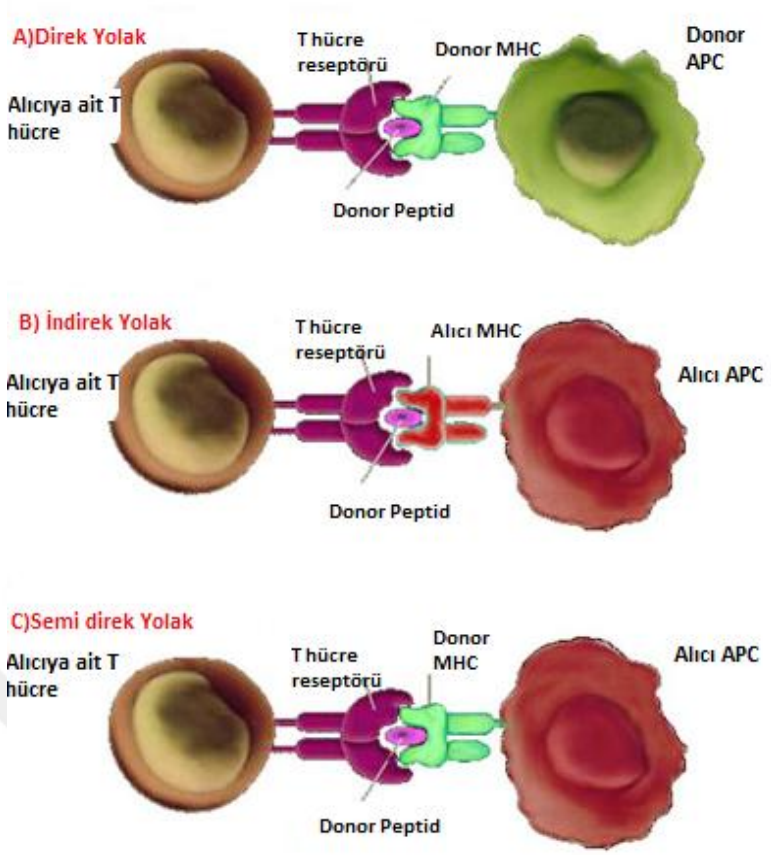
Alıcıdaki T hücreleri TCR reseptörleri ile donör kökenli MHC molekülü içeren passenger lökositler üzerindeki allojenik MHC moleküllerini tanıyarak aktive olur. Bu yolak çok sayıda allojenik lökosit transferi olursa akut rejeksiyon patolojisinde rol oynar. Direk alloreaktif T hücreler allojenik MHC'ye spesifik yanıt verir. T hücre bağımlı kazanılmış bir yanıt vardır. Direkt yolak ile B hücre proliferasyonu, antikor aracılı yanıt ve hücre aracılı sitotoksik yanıt aktive olur (94, 119, 122, 123) (Şekil 13-14). Donör ve alıcının MHC moleküllerinin konformosyonel ve yapısal farklılıkları arttıkça direkt allojenik yanıt şiddetlenir (124). İlk bakışta bu yolak MHC polimorfizmi nedeni ile daha etkili olabilecek gibi ön görülürken in vivo deneysel çalışmalarda allojenik antijen sunan hücrelerin NK hücrelerce erken eliminasyonu sonucu etkinliğini kaybetmektedir (125).

4.2.3.2. İndirekt Yolak

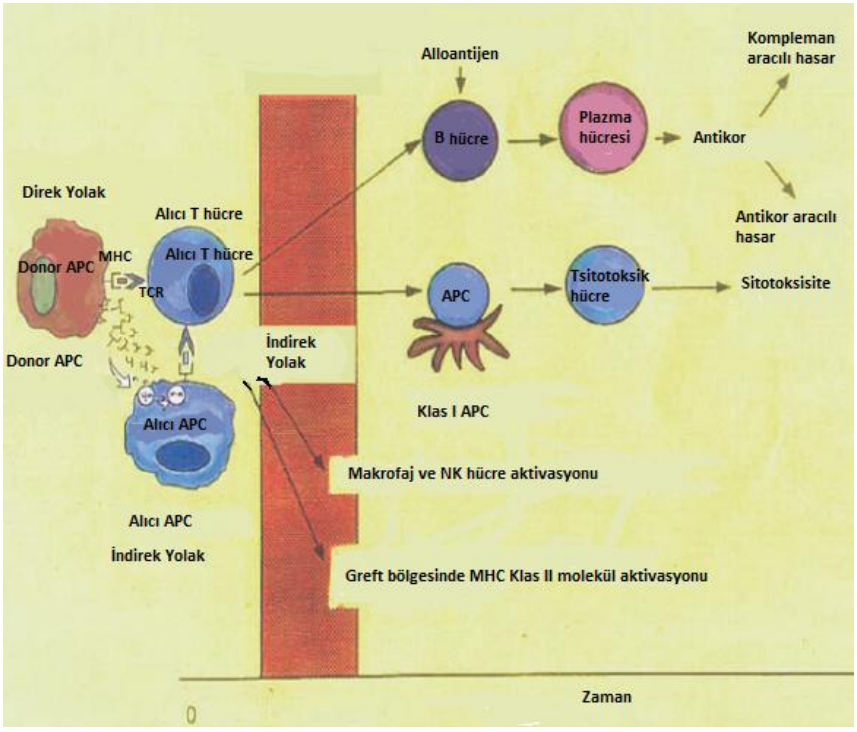
Bu yolak erken doğal immun yanıt, doğal bağışıklık hücrelerinin (NK) ve APC'lerin (makrofaj) aktivasyonu ile başlar. Alıcıdaki antijen sunan hücreler self MHC molekülleri ile donöre ait antijenleri alıcı T hücrelerine sunar. Allogreft yerinde durduğu sürece bu yolak sürekli çalışmaktadır. Erken rejeksiyon reaksiyonu ile NK hücreler ve makrofajlar donöre ait APC'leri elimine ettiği için in vivo allorejeksiyonda indirekt yolak daha etkilidir, devamlı antijenik stimülasyonla kronik rejeksiyonda rol oynar (94, 125, 126). İndirekt yolak yüksek plastisite özelliği ile immun modülasyon yöntemleri ile hedef alınarak allogreft toleransı oluşturulmasında rol oynayabilir (127) (Şekil 13-14).

4.2.3.3. Semi Direkt Yolak

Alıcıdaki antijen sunan hücreler donörün MHC protein-allojenik antijen kompleksini T hücrelere sunar (Şekil 13). Yukarıda bahsedilen yollar olmasına rağmen immun yanıta çok sayıda diğer faktörler (iskemi-reperfüzyon hasarı, alıcının bağışıklık durumu, immunsüpresör yan etkileri / immun modülatör protokolleri, enfeksiyöz komplikasyonlar) katkıda bulunabilir. İmmun reaksiyon başlangıcının farklı nedenlerle gelişmesi mümkündür (122).



Şekil 13: Allogreft rejeksiyonu moleküler mekanizma (122)

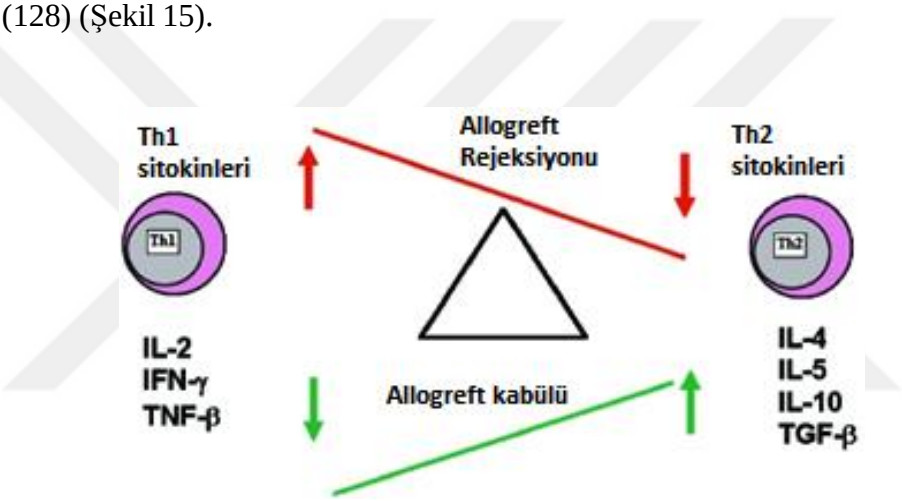


Şekil 14: İndirekt/direkt yolak ile immun yanıt (94)

4.2.4. Allojenik Rejeksiyonda Rol Oynayan İmmunolojik ve Non İmmunolojik Parametreler

1. MHC uyumsuz transplantasyonda anti-donör HLA antikorları, ABO uyumsuz transplantasyonlarda anti donör A ve B antikorları mevcudiyetinde hiperakut akselere doğal immun yanıt ve allorejeksiyon gelişebilir. Doku uyumluluğu mevcudiyetinde donör minör anti HLA antikorları nedeni ile rejeksiyon gelişebilir (79).

2. Th hücrelerin dengesi önemlidir. Th1 hücreler ve sitokinleri hücresel immuniteyi başlatarak rejeksiyona sebep olurken, Th2 hücresel humoral yanıtta rol oynar, immun yanıtı sınırlayıcı sitokin olan IL-10 salınımı ile kontrollü inhibisyon yaparak allogreft kabulünde etkili olur. Th1 –Th2 dengesi allogreft kabulünde önemlidir. Th2 yönüne denge olduğunda allogreft kabulü artar (128) (Şekil 15).



Şekil 15: Th1-Th2 dengesi/ allotransplantasyon (128)

3. Antijen sunan hücreler alloantijen sunumu ile hücresel yanıtta rol oynamaktadır (118).

4. İmmun regülatuar ve allojenik yanıtı regüle eden ve allotolerans sağlayan Treg hücre popülasyonunun ve oranının yüksek olması allografte toleransı sağlamaktadır (129).

5. Allograftte iskemik veya travmatik hasar olması, posttransplantasyonel enfeksiyon gelişimi, doğal immun sistemin aktivasyonunu tetikleyerek akut rejeksiyon atak insidansını arttırmaktadır (128, 130, 131).

4.2.5. Deri Allogreft Rejeksiyon Paradigması ve Rol Oynayan Parametreler

4.2.5.1. Deri Allogreft Rejeksiyon Paradigması

Deri allografti rejeksiyonuna yönelik çalışmalar ve teoriler P. Medavar tarafından ortaya konmuştur. Daha sonra J. Murray tarafından azatiyopürin ve azaserin ile böbrek allogreft

rejeksiyonunun önlendiği deneklerde aynı donörden transplante edilen deri allogreftlerinin yaşam süresinde uzama oluştuğu ortaya kondu. Siklosporinin bulunmasıyla deri allogreft yaşam süresinde uzama oluşmasına rağmen deri içeriği olmayan allogreftlere göre anlamlı uzama sağlanamadı ve allorejeksiyon engellenemedi. Total vücut ışınlama, donöre ait hücrelerinin intratimik enjeksiyonu, gelişen immun modülatuar yöntemler, kök hücre tedavileri, antikor teknolojisi ve gen tedavilerine rağmen deri allogreftine yönelik tolerans indüksiyonu deri içermeyen allogreftlere göre halen daha zordur. Split tolerans kavramı halen aşılamamıştır (89).

4.2.5.2. Deri Allogreft Rejeksiyonunda Rol Oynayan Parametreler

1. Deri allogreft transplantasyonunun mikrocerrahi yöntemlerle vasküler pediküle transferi veya doğal vaskülarizasyonla transferi ile rejeksiyon patolojisi arasındaki ilişki üzerinde çalışmalar devam etmektedir.

2. Transfer edilen deri allogreftinin lenfatik yatağının intakt olması immunolojik yanıtı hızlandırmaktadır.

3. Deriye özel immun sistem mevcudiyeti, deri dokusuna spesifik antijenlerin bulunması, Langerhans hücrelerinin ve deriye özel dendritik hücrelerin mevcudiyeti, yaygın MHC Class II antijen ekspresyonu, keratinositlerden çok sayıda ve yoğun inflamatuar stokin salınımı, dendritik epidermal T hücrelerince canlıya yabancı MHC uyumsuz keratinositlerin yıkımı ve deride yüksek konsantrasyonlardaki ekstrasellüler glikoprotein içeriği deri allogreft rejeksiyon dinamiğini hızlandırmaktadır (89).

4.2.6. Allorejeksiyon Dinamiği

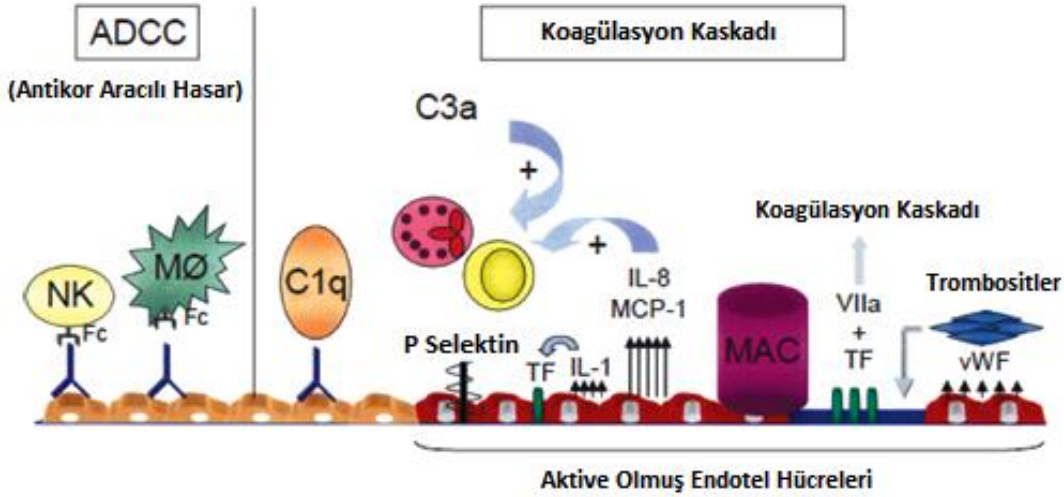
Akut ve kronik rejeksiyon olarak değerlendirilir.

4.2.6.1. Akut Rejeksiyon

1. Hiperakut Rejeksiyon

Transplantasyon anastomozunu takiben bir kaç dakika içerisinde gerçekleşir. Dakikalar içerisinde allogreftte başarısızlık görülür (128). Antikor aracılı yanıttır. Anti donör MHC antikorların küçük arteriyoller ve kapiller damar endotel hücrelerine bağlanıp birikerek kompleman aktivasyonu yapar. Kompleman aktivasyonu ile MAC (membrane attack complex (C5b-9)) aktivasyonu ile endotel hücre hasarı oluşur. Anafilatoksinler olan C5a ve C3a ile trombositleri ve inflamatuar hücreler aktive eder. Aktive Endoteliyal hücreler IL-1 aracılığı doku faktörünü ve vWF'i (von Willebrand faktör); selektinler aracılığı ile trombositler ve nötrofilleri stimüle eder. IL-8 aracılığı ile nötrofil ve monositleri aktive eder. Erken ve hızlı

inflamasyon, tromboz ve vasküler oklüzyon oluşur. Organda veya dokuda kalıcı iskemik hasar oluşur (103) (Şekil 16). En önemli sebepler eski transplantasyonlar veya multipl gebelik durumların veya kan transfüzyonları sonrasında oluşmuş antikorlarıdır. ABO grubu antijenlere karşı gelişmiş antikorlar da sebebiyet verebilir (101, 128).



Şekil 16: Antikor aracılı hasar ve kompleman aktivasyonu (103)

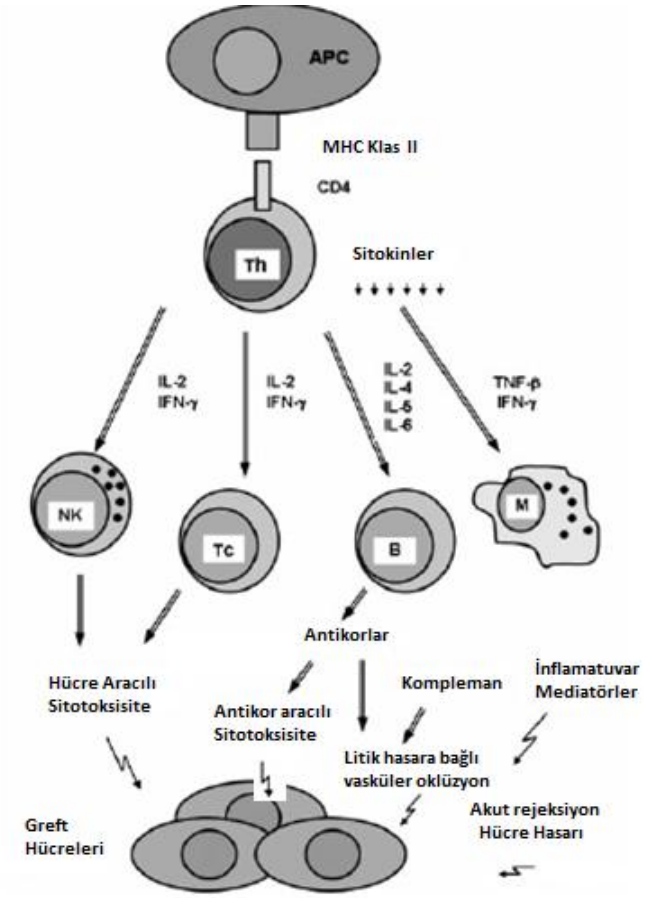
2. Hızlı Akut Rejeksiyon

Transplantasyondan sonra 24 saatle beş gün arasında gerçekleşen rejeksiyondur. İnterstisiyel hemoraji vasküler tromboz, lökosit infiltrasyonu ile karakterizedir. Klasik bir humoral rejeksiyon yanıtıdır ve hücresel rejeksiyonu uyarır. Endoteliyal hücrelerde hiperakut rejeksiyondaki trombotik oklüzyondan çok bir vaskülit söz konusudur. Ig M, Ig G, izotipinde alloantikorlar sorumludur. Proinflamatuar sitokinler IFN-γ ve IL-6 aracılığı ile lökosit infiltrasyonu, fibrin, C3 ve alloantikor içerikli endoteliyal depozitler oluşur. Parankimal hücrelerde nekroz ile karakterize ve genellikle lenfosit ve makrofaj infiltrasyonu ile birliktedir. Bu infiltrasyondaki lökositler greft parankim hücrelerinin lizisinden sorumludurlar (101, 128).

3. Akut Rejeksiyon

Transplantasyon sonrası bir kaç gün ile bir kaç hafta içerisinde gelişebilir. Bir, altı ay arasında akut rejeksiyon atağı oluşabilir. T hücre aktivasyonu ile humoral ve hücresel immunite beraber çalışır. Arterlerin media tabakalarında fibrinoid nekroz, platelet agrevasyonu ile karakterize vasküler oklüzyon görülür. Bu esnada allogreftte lökosit infiltrasyonu ve fokal nekroz odakları gözlenir (Şekil 17). Vaskülit, dermatit, miyozit, perinöral infiltrasyon, çeşitli bölgelerden alınan deri biyopsilerinde gözlenir. Klinik gözlemlerde solid organ

transplantasyonlarında akut rejeksiyonda refrakter organ disfonksiyonu, MHC antikorları gözlenirken, steroide dirençli iken el transplantasyonlarında bunun tersi bir şekilde MHC antikorları gözlenmez ve humoral mekanizmanın etkili olmadığı düşünülmektedir. Allogreft iskemi süresi uzadıkça akut rejeksiyon riski artar (101, 128, 130).



Şekil 17: İmmunolojik T hücre aracılı akut allojenik rejeksiyon, litik vasküler oklüzyon mekanizması (128)

4.2.6.2. Kronik Reaksiyon

Transplantasyondan bir yıl veya daha sonra görülür. Kronik rejeksiyon nonimmunolojik ve immunolojik faktörlere bağlı değişir. Normal doku fonksiyon ve yapısının kaybolduğu, fibrozis ile karakterize bir durumdur. Akut rejeksiyon sıklığına alıcıdaki sensitizasyona ve MHC antikorlarına, alıcının yaşına, immunsüpresyon tedavisine, HT (hipertansiyon), CMV enfeksiyonları, sigara kullanımı, hiperlipidemi gibi faktöre bağlı değişir (132) (Tablo 3).

Kronik rejeksiyon görsel bulgu vermez veya görsel bulgular çok geç dönemde ortaya çıkar. Bu yüzden kronik fibrozisi takip etmek için VCA'larda allogreft cildi üzerinden aralıklı derin doku biyopsileri alınmalıdır. Kronik rejeksiyon akut ataklara ve rejeksiyona göre

immunsüpresif tedavinin gün geçtikçe artan başarısı nedeni ile daha az görülmektedir. VCA'larda solid organ allotransplantasyonlarına göre kronik rejeksiyon insidansı daha azdır. Kronik rejeksiyon VCA'da daha az sıklıkla görülmesinin etiyopatogenezi henüz bilinmemektedir. Fakat önemli farklılıklar solid organ transplantasyonlarına göre görsel akut rejeksiyon takibinin daha etkili olması, uzun dönem sonuçlarının henüz tam olarak ortaya çıkmamış olmaması ve immunsüpresyon dozlarının mümkün olduğunca az uygulanması olası sebeplerdir (9).

Tablo 3: Kronik allogreft rejeksiyonu riskler (132)

İmmunolojik	**Non İmmunolojik**
Donör spesifik MHC antikorları varlığı	Transplant tipi
Akut rejeksiyon sıklığı	Mekanik travma
T hücre aracılı rejeksiyon	Allografte olan kan akımı (iskemik süresi)
Antikor aracılı rejeksiyon	Lenfatik rejenerasyon durumu
Allogreftin deri yükü varlığı	Greft denervasyonu
CMV pozitifliği, enjeksiyon durumu	Sistemik vasküler direnç
VCA kemik iliği komponent içeriği	

4.2.7. Rejeksiyon Histopatolojisi

4.2.7.1. Akut Rejeksiyon Histopatolojisi

Deri en antijenik yapı olduğu için allotransplant içeriğinde deri varsa allorejeksiyon takibi transplante edilen kompozit doku içerikli allogreft cildi üzerinden alınan cilt biyopsileri ile takip edilebilmektedir (112, 122). VCA rejeksiyon epizotlarının histopatolojik takibinde histopatolojik değerlendirme rejeksiyonun tipini, rejeksiyonun ciddiyetini değerlendirmektedir. Histopatolojik skorlamada The Banff (2007) skorlaması kullanılmaktadır (133) (Tablo 4). The Banff histopatolojik değerlendirmesinde dermisi adneksiyel yapıları infiltre eden inflamatuar hücreler, epiteliyal apopitozis, diskeratoz, dermal nekroz değerlendirilmesi yapılmaktadır.

Tablo 4: The Banff (2007) rejeksiyon histopatolojisi (133)

Grade 0	İnflamasyon yok ya da çok az inflamasyon mevcut.
Grade I	Hafif dereceli perivasküler infiltrasyon epidermis ayrılması yok.
Grade II	Ilımlı-ciddi perivasküler infiltrasyon, hafif epidermis ayrılması, diskeratoz veya keratinolizis, epidermal diskeratoz ve apoptozis yok.
Grade III	Ciddi yoğun inflamasyon ve epidermal ayrılma, apoptoz, diskeratoz veya keratinolizis mevcut.

Grade IV	Nekrotizan akut rejeksiyon, dermal nekroz odakları mevcut.

4.2.7.2. Kronik Rejeksiyon Histopatolojisi

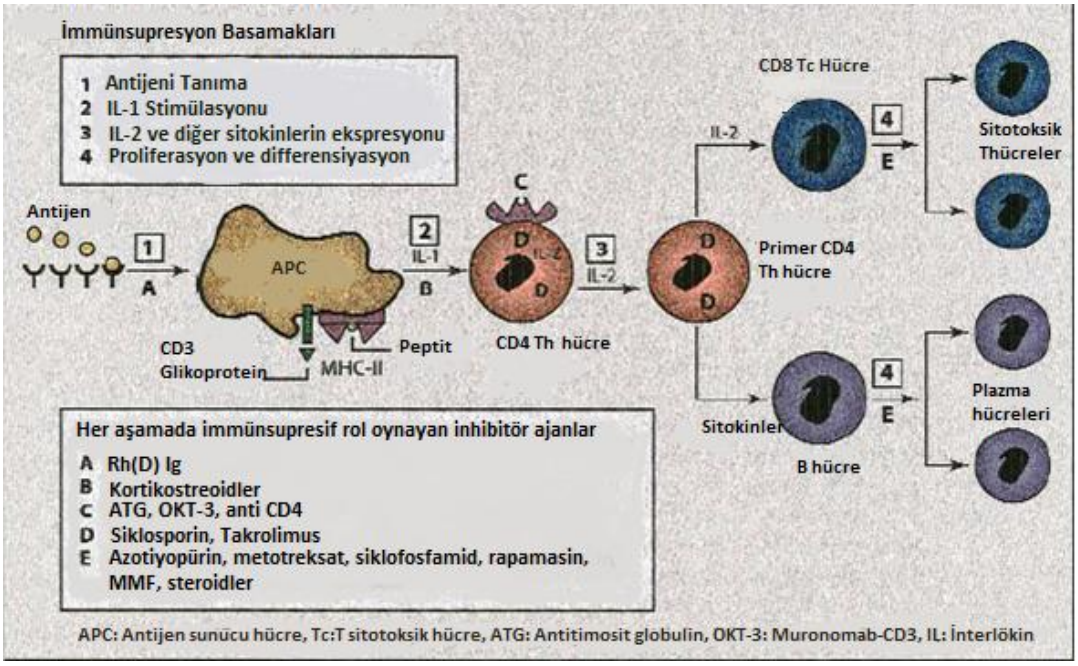
Kronik allojenik rejeksiyon histopatolojisi intimal hiperplazi, fibrozis, lenfoid foliküllerde artış ve transplantasyon vaskülopatisi ile seyreder. Bu nedenle VCA'da düzenli olarak derin doku biyopsileri ile kronik rejeksiyon takibi önerilir. Solid organ transplantasyonlarında fonksiyonel gerileme ve kayıp ile bulgu verir (132).

4.3. Allogreft Rejeksiyonu Önlenmesi /İmmun Modülasyon

4.3.1. İmmun Modülasyon

Otoimmun hastalıklara (134) sebep olan immun yanıtta, transplante edilen bir allogreftin reddine sebep olan alloimmun yanıtta (135) veya kanserli hücrelere karşı immun cevabın yeterli olmadığı (136) durumlarda, immun sistem yanıtını değiştirmek için gelişmiş ve özelleşmiş immun cevabın regüle edilmesi için yapılan müdahaleler 'immun modülasyon' olarak tanımlanır. İmmun cevabın arka planı bilindiği ölçüde immunoterapi ile immunolojik yanıt regüle edilebilir (137).

İmmunolojik spesifik tanıma mekanizmaları, immun sistem aktivasyon ve regülasyon mekanizmaları ve bu mekanizmalarda rol oynayan hücreler ve ürünleri üzerinden bir alloantijene karşı spesifik immun tolerans geliştirilebilir. Temel olarak, antijen-antikor kompleksine yönelik antikorlar (Rh antikorları), IL-1 (glukortikoidler), T hücre reseptörlerine yönelik ajanlar (OKT3, ALT, anti CD4), IL-2 (siklosporin, takrolimus) ve T hücre proliferasyonuna yönelik ajanlar (azatiyopürin, metotreksat, rapamisin, siklofosfamid, MMF, steroid) üzerinden immun modülasyon sağlanabilir (137) (Şekil 18).



Şekil 18: İmmun modülasyon mekanizmaları (137)

4.3.1.1. İmmun Modülasyonda Kullanılan Yöntemler

1. Radyoterapi (RT)

Hematopoietik kök hücre transplantasyonu öncesi myeloablatif yüksek doz tüm vücut RT hazırlık tedavisinde kullanılmaktadır. Total vücut ışınlama sonrasında lenfositlerin % 80'i ölmektedir. RT parsiyel myeloablatif tedavi olarak düşük doz veya bölgesel olarak lenfoma gibi hastalıkların tedavisinde, tolerans indüksiyonunda hazırlık rejimi olarak kullanılmaktadır.

2-İmmun modülatuar ilaçlar: İmmunsüpresif ilaçlar, antimetabolitler

3-Sitokinler: IFN, Hepatik büyüme faktörleri, IL-2

4-Terapötik antikorlar: Poliklonal, monoklonal

5-Sitokin reseptör inhibitörleri: TNF, IL-2, IL-1

6-Plazmaferez: İntravasküler dolaşımdan antijen antikor komplekslerini ve Ig'leri uzaklaştırma yöntemidir (137).

İmmun sistem kendisine ait MHC I-II doku uyumluluk antijeni dışındaki yabancı antijenik yükü, dokuyu, mikroorganizmayı eradike eder (128). İmmun modülasyon ile konakçıda kendine ait olmayan donöre ait MHC moleküllerine karşı immun tolerans geliştirilip, allorejeksiyon geciktirilerek veya engellenerek donör spesifik tolerans oluşturulabilir (138).

4.3.2. İmmunolojik Tolerans

Self antijene yanıtın süprese edilmesi, persistan ve uzun süreli yabancı antijen ile temasta immunolojik cevabın kontrol edilmesidir. İmmunolojik tolerans santral ve periferik mekanizmalarla gelişir. Self tolerans ve spesifik tolerans olmak üzere iki çeşittir (92, 118).

4.3.2.1. Self Tolerans

İmmun savunmacı konakçının kendine ait antijenlere immun yanıt oluşturmaması, self tolerans olarak ifade edilir. İmmun tolerans farklı self antijenler ile temas yolu ile organlarda daha lenfositler oluşurken sağlanabileceği gibi, lenfositlerin periferik organlarda self antijenlerle karşılaşması sonucu da oluşur (92, 139, 140).

4.3.2.2. Spesifik İmmun Tolerans

Kendine yabancı tüm antijenlere immunolojik yanıt veren konağın, bir grup antijene yanıt vermemesi halidir. Spesifik immun yanıtsızlık halidir (140).

4.3.2.3. Allojenik İmmun Tolerans/ Transplantasyon Toleransı

Spesifik immun tolerans transplante edilen bir allografte yönelik olursa donör spesifik tolerans/transplantasyon toleransı olarak isimlendirilir. Donör spesifik tolerans oluştuğunda kronik immunsüpresif tedavi olmadan alıcının lenfositleri donöre ait hücreleri tehlikeli veya yabancı olarak görmez. Aynı zamanda üçüncü bir kişiden gelen alloantijene yanıt mevcuttur. Yıkıcı allorejeksiyon mevcut değildir. (141). Donör spesifik toleransta in vitro T hücre aktivitesi mevcuttur. Sadece donör antijenlerine karşı T hücre reaktivitesi yoktur (140, 142).

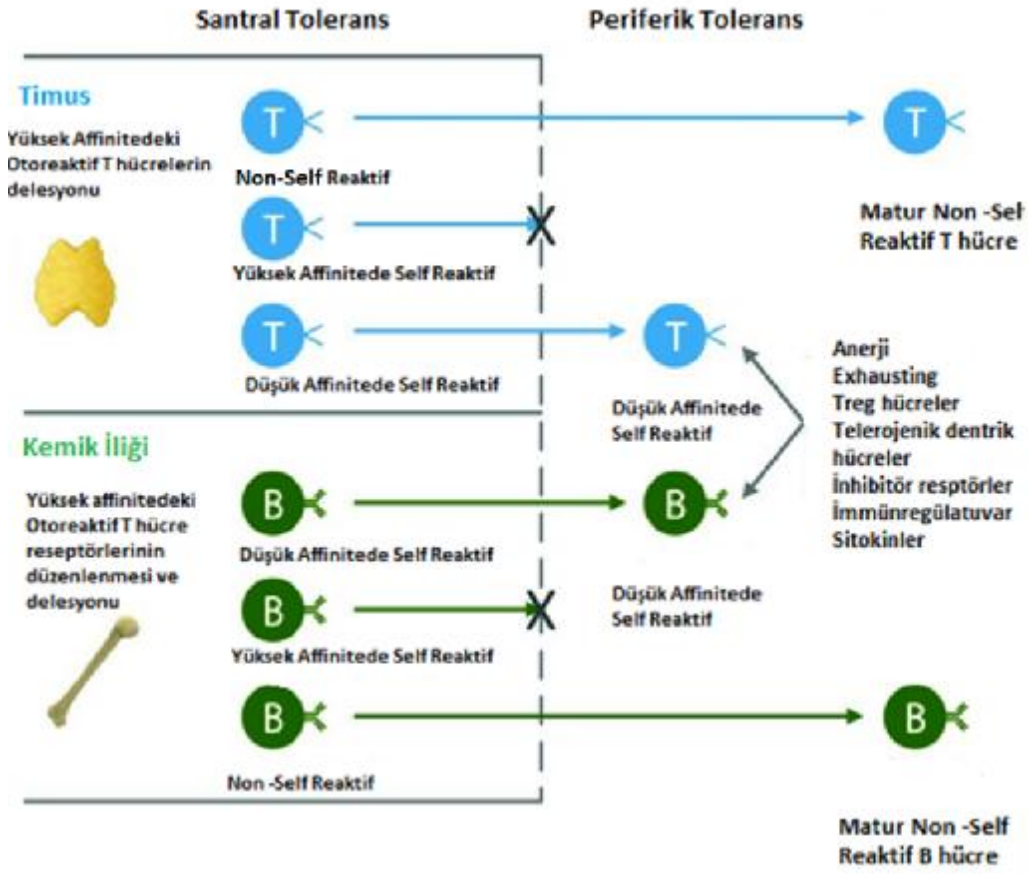
4.3.3. İmmun Tolerans Mekanizmaları

4.3.3.1. Santral Tolerans / Klonal Delesyon

Santral tolerans kendine ait antijenlere yüksek afinite gösteren self reaktif ve antijen spesifik T ve B hücrelerinin timusta ve kemik iliğinde delesyon mekanizması ile elimine edilmesidir (143, 144) (Şekil 19).

4.3.3.2. Periferik Tolerans

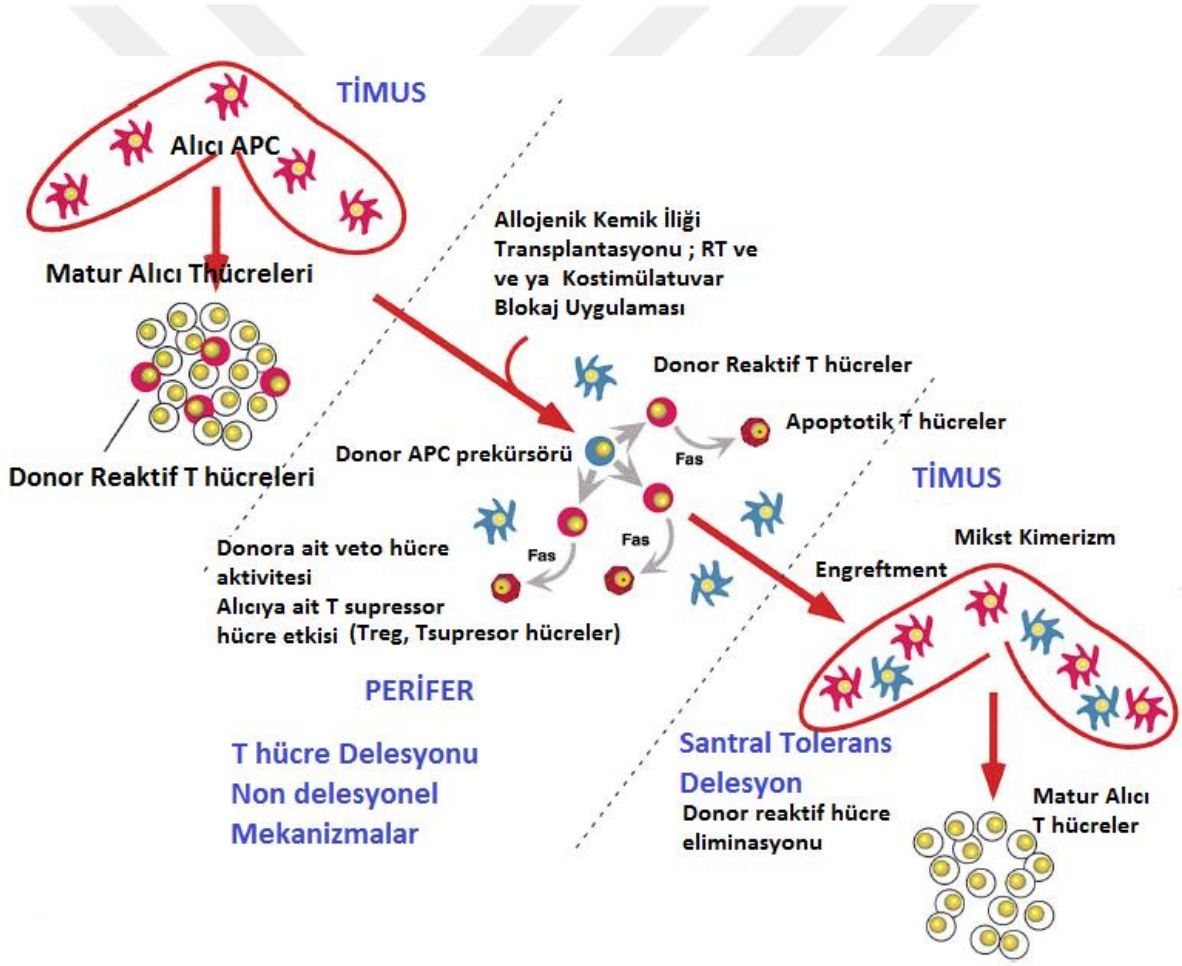
Santral toleranstan kaçan düşük afinitede self reaktif T ve B lenfositleri periferik lenfoid organlarda periferik tolerans ile delesyonel (143) veya nondelesyonel mekanizmalar (145) ile elimine edilir (Şekil 19-20).



Şekil 19: Santral ve periferik tolerans (144)

4.3.4. Transplantasyon Toleransı

'Holly Gray of organ transplantation' kavramı farmakolojik idame immun süpresyon kullanılmadığı halde devamlı transplantation toleransı, uzun süreli allogreft yaşam süresi oluşmasıdır. Klinik olarak tolerans transplante edilen organın fonksiyonel olarak çalışması, histolojik rejeksiyon bulgularının mevcut olmamasıdır. İmmunsüpresif tedavi alan transplantasyon hastalarında idame tedavi ile 'operasyonel tolerans' hali gelişmektedir (145). Transplantasyon toleransı santral delesyonel-timik; periferik delesyonel ve nondelesyonel mekanizmalarla oluşabilir (Şekil 20) (Tablo 5). Etkili bir tolerans indüksiyon mekanizması klinik olarak uygulanabilir, güçlü, stabil, ölçülebilir ve allogreft ile uyumlu olmalıdır (140).



Şekil 20: Transplant Tolerans Mekanizmaları

4.3.4.1. T hücreler ve İmmun Tolerans

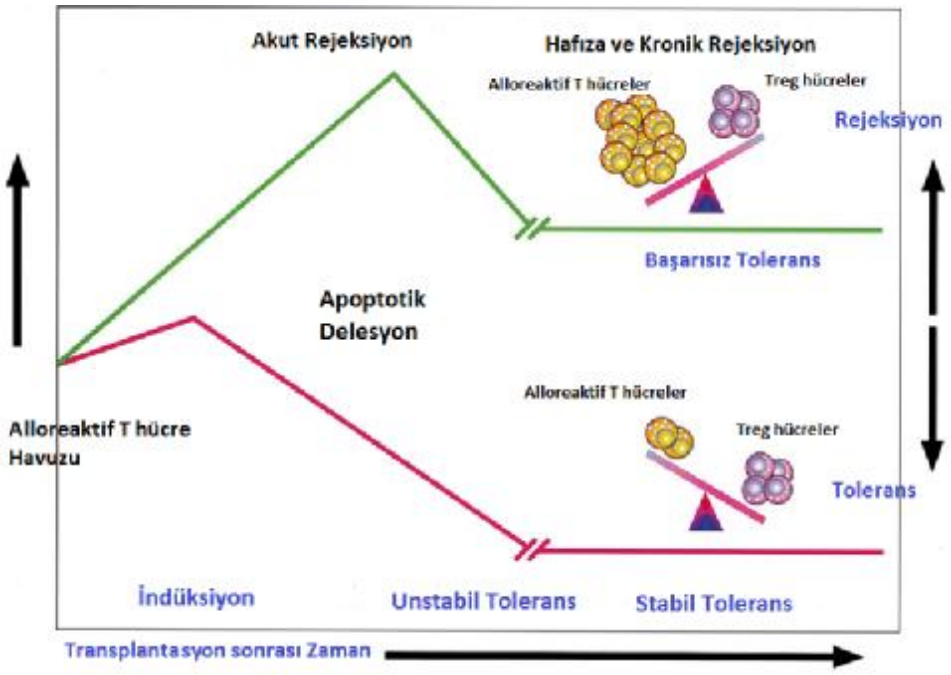
A. Santral tolerans / Klonal delesyon

Timusta gerçekleşen santral T hücre toleransına **klonal seçilim** denir (143).

Negatif Seçilim/Delesyon: Erken dönemde timusta medüller timik epitelde Aire transkripsiyon faktörü kontrolünde otoreaktif self antijenlere karşı aktif yüksek afinite gösteren T hücreler delesyona uğrar (144).

Pozitif Seçilim: MHC-peptid kompleksini tanıyan self reaktif olmayan T hücrelerin seçilimidir (146)

Timus: Timus self toleransta hayat boyunca etkilidir. Allografte yönelik donör spesifik tolerans stratejisi olarak da rol alabilir. Karaciğer gibi telerojenik hücrelerin yoğun olduğu allotransplantasyonlardan sonra allografte yönelik toleransın immunsüpresif tedavi kesildiğinde de devam ettiği görülmüştür. Bunun sebebi allografttte mevcut passenger lenfositlerin alıcının organ ve dokularına ekilmesi ve kimerizm hali oluşturmasıdır. Kalp ve böbrek gibi telerojenik hücrelerden zengin olmayan organlarda aynı durumu sağlamak için nonmyeloablatif indüksiyon tedavisi sonrası allojenik kemik iliği kökenli hematopoietik kök hücreler kullanılabilir. Fakat bu yolla oluşan periferik kimerizm uzun süreli ve stabil değildir. Santral lenfoid organ olan timusta yapılacak manipülasyonlarla alloantijenle indüklenmiş intratimik T hücre delesyonu ile tolerans sağlayabilir. Timus içerisine direkt alloantijen enjeksiyonu ile santral tolerans indüksiyonu hayvan deneylerinde gösterilmiştir (147). Sıçanlarda santral delesyonel tolerans mekanizması ile intratimik donör kemik iliği kökenli hücre enjeksiyonu ile allojenik deri grefti yaşam süresi uzadığı gösterilmiştir (148). Transplant toleransında amaç stabil donör spesifik immun toleranstır (Şekil 21).



Şekil 21: Stabil Donör Spesifik Tolerans

B. Periferik Tolerans

1. Ekstratimik Delesyon: İlaçlar (rapamisin), süpresör veya regülatuar hücreler T hücreler üzerinde periferik apoptozis ve ekstratimik delesyon, anerji ve süpresyona yol açabilir (143, 149). Kostimulatuar blokaj ve kemik iliği transplantasyonu ile ekstratimik delesyon gözlenmiştir (150). Mekanizması AICD (activation induced cell death)'tir (142). Burada hücre yüzeyinde bulunan apoptozis tetikleyici faz reseptörleri rol alır (117) (Şekil 23).

Veto fenomeni (CD8+) Tc hücrelerin sitotoksik T hücrelerini öldürebilme yeteneğinin olmasıdır (142). (CD34+) Hematopoietik hücrelerin **veto etkisi** donör alloantijenlerine karşı gelişmiş sitotoksik T lenfosit prekürsörlerinin apoptozis yolu ile elimine edilmesidir. Megadoz pürifiye (CD34+) hematopoietik kök hücreler ile allojenik tolerans arttırılıp immun tolerans sağlanabilir (151, 152).

2. Anerji: Efektör fonksiyonlarını yerine getiremeyecek şekilde intrensik moleküler değişiklere uğramış T lenfositleri etkisizleştirilir etkili immun yanıt gelişmez. Buna 'anerji' denir. Kostimulatuar moleküller ve sinyal yolaklarında blokaj uygulaması anerji gelişimini sağlar. Anerjik hücreler antijen ile stimüle edildiğinde yanıt vermez (81, 144, 150) (Şekil 22-23).

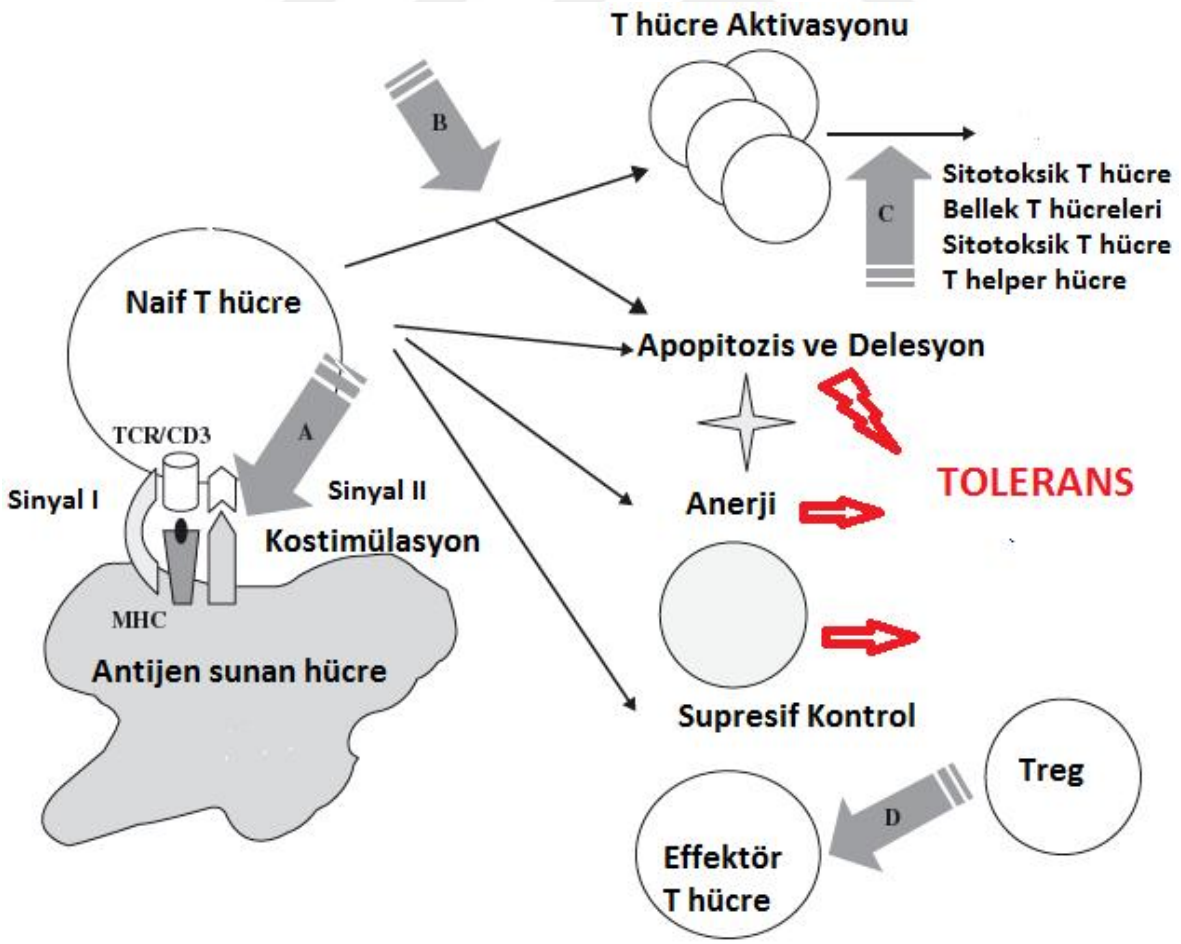
3. İnhibitör Moleküler Sinyaller: CTLA-4 ve PD-1 inhibitör immunmodülatuar sinyallerdir. Bu moleküllere yönelik stümülatuar veya inhibitör antikorlar kullanılarak immun stimülasyon veya immun tolerans geliştirilebilir. PD-1 inhibitör molekülün yokluğunda farelerde SLE gibi otoimmun hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Kronik viral hastalıklarda ise bu molekülün fazla yükselmesi ile santral toleranstan kaçan düşük afinitedeki otoreaktif T hücreler periferik delesyondan kaçarak otoimmun hastalıklara sebebiyet verebilir (144).

4. Sitokinler: Çözünür faktörler ve sitokinler immun regülasyonda önemli rol oynar. IL-17 ve INF-γ inflamatuar ve hemostatik etkilidir, inhibisyonlarında otoimmun hastalıklar ortaya çıkabilir. IL-10 ve TGF-β ise immun toleransın devamında rol oynar. IL-6 gibi sitokinler ise Th17 aracılığı ile Treg gelişimini antagonize ederek inflamatuar hastalıklarda rol almaktadır. Efektör T hücreleri ve Treg hücre fonksiyonları ve yaşamları IL-2'ye bağlıdır. IL-2 konsantrasyonlarında düşüş olursa T efektör hücre gelişiminde baskılanma ve immun tolerans gelişir. Dolayısıyla regülatuar ve efektör hücre dengesi ve burada rol oynayan sitokinler önemlidir (144).

5. Treg hücreler: Periferik tolerans mekanizmasında önemli rol oynayan immun regülatuar Treg hücrelerdir. Treg hücreler hücre-hücre kontakt mekanizması ile otokrin etki ile (IL-10, TGF-β) ve parakrin mekanizma ile diğer hücreleri etkileyerek immun regülatuar görev yapar (153) (Şekil 22).

6. Telerojenik dendritik hücreler (periferik lenfoid organlar): Plastisitesi yüksek dendritik hücreler Treg hücrelerin fonksiyonları ve proliferasyonları üzerinde etkilidir (154)**.**

7. İhmal edilme (Ignorance): İmmunoterapi altında transplante edilen allografte yönelik yanıt ve nihai olarak stabil transplantasyon toleransı oluşurken yeni oluşmuş alloreaktif T hücre kolonlarının tamamı santral delesyona uğramamış iken alloreaktif T hücreler ve regülatuar mekanizmalar arasında dengenin sağlandığı stabil olmayan immun yanıtsızlık aşamasını ifade eder (141, 153). Eğer donöre ait hücreler alıcının lenfatik dolaşımına ulaşmaz ise ve vericide T efektör lenfositler işlevsizse yine bu mekanizma devreye girer. Korneal allotransplantasyonlar veya kapsüle edilmiş pankreas adacık allotransplantasyonlarına karşı olan immun tolerans örnek verilebilir (155) (Şekil 22-23).



Şekil 22: Periferik Tolerans Mekanizmaları

4.3.4.2. B hücreleri ve İmmun Tolerans (Santral ve Periferik tolerans)

Yüzeyinde self antijenlere karşı yüksek afinitede Ig bulunduran B lenfositler kemik iliğinde delesyon ve reseptör denetlenmesi ile elimine edilir. Düşük afinitede self reaktif B hücreleri ise periferik lenfoid organlarda nondelesyonel mekanizmalar olan anerji, inhibitor reseptörler, exhausting, Treg hücreler, immun regülatuar sitokinler ve telerojenik dendritik hücreler ile elimine edilir (144) (Şekil 19).

4.3.5. Transplantasyon Toleransı, Mekanizma ve Endikasyonlar

4.3.5.1. Allojenik Transplantasyon Endikasyonları

1. Nonfonksiyonel hayati veya fonksiyonel, estetik bir organ ve doku kaybında transplantasyon

2. Hematolojik maligniteler ve hastalıklar (145)

4.3.5.2. Transplantasyon Toleransı Mekanizması (155)

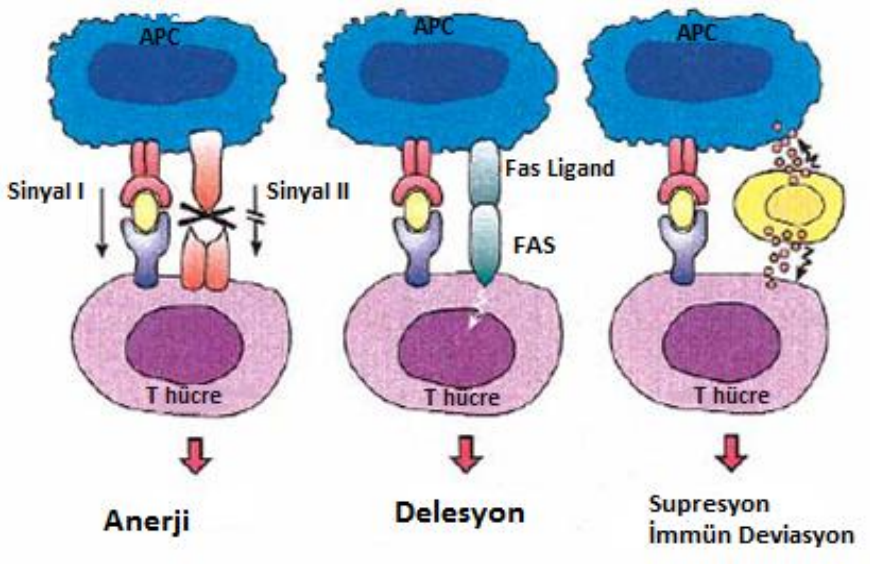
1. Klonal delesyon (santral ve periferik)

2. Anerji: T hücrelerinde efektör immun yanıtta baskılanma oluşmasıdır.

3. Süpresyon: TGF-β, IL-10 aracılığı ile regülatuar ve telerojenik hücre indüksiyonu ile T efektör hücrelerde baskılanma oluşmasıdır.

4. İhmal edilme (Ignorance)

5. İmmun yön değiştirme (Immune Deviation): Sitokinler, büyüme faktörler, ile efektör T hücre popülasyonlarında apoptotik değişim gelişmesi ve immun cevaplarında baskılanma oluşması (117) (Şekil 23).



Şekil 23: Anerji, delesyon ve immun yön değiştirme (deviasyon)/süpresyon (117)

Allogreft kaybına antijene bağlı olmayan rejeksiyon yanıtı allogreftte iskemi reperfüzyon hasarı olması ve allogreftte travmatik hasar olması ve Toll like reseptörler aracılığı ile olur. Allogreft kaybına antijene bağlı rejeksiyon yanıtı ise daha önce oluşmuş antikorlar üzerinden doğal immun yanıtın gelişmesi ile hücresel ve humoral immun yanıt ile olur. T hücre ve B hücre bağımlıdır (142).

4.3.6. Transplant Toleransı Stratejisi ve Yöntemler

Tablo 5: Tolerans indüksiyonunda strateji ve yöntemler (142).

Kategori	**Strateji**	**Yöntem**
Timik Delesyonel	Timusta T hücrelerinin eliminasyonu	1. Tam veya mikst hematopoietik kimerizm indüksiyonu 2. İntratimik alloantijen enjeksiyonu veya intratimik donör kemik iliği kökenli kök hücre enjeksiyonu enjeksiyon
Periferik Delesyonel	Donör spesifik efektör T hücrelerin eliminasyonu	1. Veto aktivitesi ve veto hücreleri kullanımı 2. Aktivasyonla indüklenen hücre ölümü, periferik T hücre apoptozisi (AICD) yaratan yöntemler
Periferik Non-delesyonel	Donör alloantijenleri ile alıcıda T lenfosit cevabını regüle etme	1. Treg hücre indüksiyonu 2. Kostimulatuar molekül blokajı ve inhibitör moleküllerin indüksiyonu

Myeloablatif tedavi sonrası donör hematopoietik makrokimerizm transplant toleransı açısından en güvenilir yöntemdir. Çünkü intratimik klonal delesyon mekanizması donör reaktif T lenfositlerin delesyonuna sebep olur. Non-delesyonel mekanizmalar olan anerji süpresyon ve immun modülasyon stabil kalıcı bir mikst kimerizm hali oluşturmaz (145). Myeloablatif tedavi sonrası kemik iliği kökenli hematopoietik hücre ve böbrek transplantasyonu ile GVHD oluşmadan tam makrokimerizm oluşturulmuş ve bir yıl sonra immunsüpresif tedavi ihtiyacı kalmamıştır (156).

Allotransplantasyon yapılan hastalarda immunsüpresif ilaç tedavisi ile operasyonel tolerans sağlanmaktadır (145, 157). Bu hastaların bir çoğunda immunsüpresif tedavi devam ettiği sürece saptanabilir bir hematopoietik kimerizm oluşmaktadır. Hematopoietik kimerizm hali transplantasyon toleransı için gerekli bir durumdur. Solid organ, VCA transplantasyonları ve hematopoietik kök hücre transplantasyonları, allojenik cevap biyolojisi, solid organ ve VCA transplantasyonlarında hematopoietik kimerizmin rolü, telerojenik ve immun regülatuar

hücreler ve yeni tolerans indüksiyon stratejileri hakkında çalışmalar devam etmektedir (145).

4.3.7. Transplantasyon Tolerans İndüksiyon Tedavisinde Kullanılan Eski ve Yeni Stratejiler

1. RT
2. İmmun modülatuar/ immunsüpresif ilaçlar ve antikorlar
3. Stabil mikst kimerizm
4. Hücresel tedaviler (Treg hücre, dendritik hücre, MSC tedavileri)
5. Genetik tedaviler

4.4. İmmun modülasyon, İmmunoterapi ve Komplikasyonları

İmmun cevabı düzenlemeyi, inflamatuar, otoimmun hastalıkların tedavisini, kanser tedavisini ve allorejeksiyonların önlenmesini amaçlayan etkili immun modülatuar tedaviler immunsüpresif ilaçlar, sitokinler ve sitokin reseptörleri ve hedefe yönelik antikorlar ile yapılmaktadır (137).

4.4.1. İmmun Modülatör İlaçlar Etki Mekanizmaları

Yabancı antijen stimülasyonu ile IL-12 etkisi ile T hücre proliferasyonu başlar. Th hücrelerin devreye girmesiyle T hücre aktivasyonu artar. Antijen sürekli ise bellek T hücre oluşumu ile hafıza oluşur. Sinyal I TCR-MHC birleşmesi, sinyal II kostimülatuar molekül etkileşimi ve sinyal III antijenik yanıtın hızlanması ile hücre içine giden sinyallerle gen transkripsiyonu ve sitokin sentezi gerçekleşir. Hücrede protein kinaz aktivasyonu ile fosforilasyon ve hücre içi sinyal moleküllerinin aktive olması sağlanır. Bu işlem Th hücrenin sitokin üretimi için gereklidir. Th hücre kaynaklı sitokinlerin T hücre reseptörlerine (IL-2/IL-2 reseptörleri) bağlanması ile T lenfositlerde mitotik aktivite başlar ve proliferasyon aşaması gelişir. IL-2 reseptör aracılığı ile sinyal iletimi çoğalma için gereklidir. İmmun modülatuar ilaçlar ve antikorlar bu yolaklar üzerinden etki göstermektedir (115, 158).

İmmunsüpresif ilaç tedavisi merkezden merkeze, hastadan hastaya, allotransplante edilen doku veya organa göre değişir. Amaç minimum immunsüpresyon, morbidite ve mortalite oluşturacak yan etkiden kaçınma, minimum komplikasyon, iyi oluşmuş bir allogreft toleransı ve allogreft rejeksiyonun önlenmesi yani immun modülasyondur. Allotransplantasyon öncesi ve sırasında indüksiyon, hemen arkasından idame, akut rejeksiyon ataklarında kurtarma tedavisi olarak immunsüpresif ilaçlar kullanılır (158, 159).

4.4.2. Transplantasyon Tolerans İndüksiyonunda Kullanılan İmmunsüpresif İlaçlar

İlk olarak steroid ve azatiyopürin kullanılmış olup (61), siklosporinin keşfi ile akut rejeksiyon atakları allotransplantasyonlarda dramatik olarak düşmüştür. Takrolimusun bulunmasıyla,

siklosporinden daha potent olması nedeni ile iyi bir alternatif olmuştur. Takrolimus antiproliferatif ajan MMF ile kombine tedavide kullanıldığında akut rejeksiyon atak insidansını düşürmüştür. Nefrotoksik özellikleri olmayan TOR inhibitörlerinin (rapamisin; sirolimus, everomilus) bulunması ile nefrotoksik yan etkilerden kaçınmak için TOR inhibitörleri düşük doz kalsinörin inhibitörleri ile beraber kullanılmaya başlamıştır (160) (Şekil 24) (Tablo 6).

1949	**Kortizol**	Hench et al. (1949)
1959	**Siklofosfamid**	Stender et al. (1959)
1959	**6-Merkaptopürin**	Schwartz and Dameshek (1959)
1961	**Metotreksat**	Friedman et al. (1961)
1975	**Mizobirin**	Sakaguchi et al. (1975)
1976	**Siklosporin-A**	Borel et al. (1976)
1977	**Rapamisin**	Martel et al. (1977)
1978	**Leflunamid**	Schleyerbach (1978)
1987	**Takrolimus**	Kino et al. (1987)
1991	**MMF**	Allison et al. (1991)

Şekil 24: İmmunosüpresif ilaçların bulunuşu (161)

Tablo 6: Günümüzde kullanılan immunsüpresif ilaçlar; mekanizma, hedef ve komplikasyonlar (115, 161, 162)

Mekanizma	**İlaç**	**Hedef**	**Komplikasyonlar**
Gen ekspresyonunun regülasyonu	GK	GK reseptör inhibitörleri	Gerilemiş yara iyileşmesi Katarakt DM Hiperlipidemi
Alkilasyon	Siklofosfamid	DNA	Lökopeni Hemorajik sistit Kardiyotoksisite Alopesi
Kinaz ve fosfataz inhibitörleri	Siklosporin	Kalsinörin, JKN/p38 kinaz inhibitörü	Nefrotoksisite
	Takrolimus	Kalsinörin, JKN/p38 kinaz inhibitörü	HT, Hiperglisemi GİS semptomları Hiperkalemi
	Rapamisin	Siklin kinaz kaskatı	Hiperkolesterolemi, hiperlipidemi, lökopeni, trombositopeni

Pürin sentez inhibisyonu	Azatiyopürin MMF	Çeşitli enzimler IMPDH	Kemik iliği süpresyonu (Lökopeni, trombositemi, anemi) Malignite gelişme riski Kemik iliği süpresyonu GİS toksisitesi Diare, lökopeni, trombositopeni

IMPDH: İnozin 5 monofosfat dehidrogenaz GK: Glukortikoid

4.4.3. Transplantasyon Tolerans İndüksiyonunda Kullanılan Antikorlar

Allorejeksiyonu önlemede kullanılan antikorlar kostimulatuar moleküllere, TCR reseptörlerine veya IL-2'ye yönelik olabilir (162). VCA'da indüksiyon terapisinde sıklıkla antilenfosit antikorları, anti T hücre antikorları içeren tedavi protokolleri kullanılmaktadır (21). Poliklonal veya monoklonal üretilmiş olabilirler. Selektif ve non selektif etkileri vardır.

4.4.3.1. Poliklonal Antikorlar

İnsan lenfositleri tarafından uyarılmış at veya tavşan kanındaki IgG tipi antikorların izole edilmesiyle elde edilir. Tipik insan antijenlere yanıt olarak üretilen antikorlar farklı plazma hücre serileri tarafından üretildiği için heterojen yani poliklonaldır. Spesifik değildirler (163). Lenfositler üzerinde deplesyon etkisi olan poliklonal antikorlar ATG (antitimosit globulin) gibi (9) allotransplantasyon cerrahisinde indüksiyon tedavisinde kullanılmaktadırlar.

4.4.3.2. Monoklonal Antikorlar

Monoklonal antikor üretim metodolojisi farelerin spesifik antijenlerle aşılanması ve B lenfositlerle myelom kanser hücrelerinin hibridoma oluşturmasına dayanmaktadır. Homojendir, yani monoklonaldır. Belirli bir hedef antijene karşı üretilirler (71). Allotransplantasyonlarda (Daklizumab, Basiliximab; anti IL-2) indüksiyon tedavisinde kullanılmaktadır (9).

4.4.4. Mekanizmalara Göre Transplantasyon Toleransı Oluşturmak için kullanılan İlaç ve Antikorlar

4.4.4.1. Sinyal I /T hücre Deplesyonu

TCR-MHC kompleksine yönelik blokaj T hücre deplesyonu yapar. T hücre proliferasyonunu bloke eder. T hücre deplesyonu allogreft kabulü için insanlarda allotransplantasyon esnasında kullanılan bir protokoldür. Tek başına etkili değildir. Genellikle kombine kullanılır (21). Hayvan deneylerinde kompozit doku allotransplantasyonlarında siklosporin ile kombine kullanılmış T hücre deplesyon protokollerinin allogreft yaşamını uzatarak kimerizm indüksiyonu yaptığı gösterilmiştir (164, 165). Aktive T hücrelerinin sayısının düşürülmesi, T hücre deplesyonu ile allogreft kabulü artar (166) (Şekil 26). T hücre deplesyonu selektif ve non selektif yapılabilir (21, 164) (Tablo 7)

Tablo 7: T hücre deplesyonu (selektif ve non selektif)

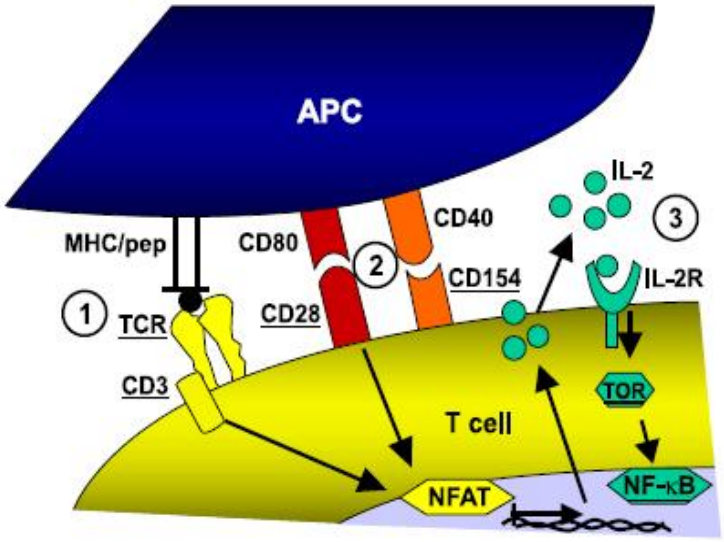
Selekif Seçici olarak aktive T hücrelerini hedef alır, aktivasyonu önler. NK monositler ve diğer lenfositleri hedef almaz. Komplikasyon daha azdır. Tek başlarına yeterli immunsüpresyon yapmazlar.	**Siklosporin** Anti α- β-TCR antikor (matür T lenfositte bulunan T hücre aktivasyonunu sağlayan proteine karşıdır.)
Non Selektif Lenfodeplesyon yapar, komplikasyon daha fazladır.	**Poliklonal** Anti lenfosit serum (ALT) Antitimosit globulin (ATG) **Monoklonal antikorlar** Anti CD3 = Muronab / OKT 3 Anti CD52 = Campath-IH / Alemtuzumab

4.4.4.2. Sinyal II / Kostimulatuar Moleküller

Çok çeşitli kostimulatuar etkileşim ve molekül vardır (155, 167). Kostimülatuar moleküller periferik tolerans oluşumda anerji, delesyon, Treg hücre indüksiyonu yaparak etkili olur (116) (Şekil 25).

T hücre yüzeylerinde bulunan kostimülatör moleküllerin (CD28), makrofaj, dendritik hücre ve B lenfosit yüzeyindeki ligandları (B7 ligandları; B7.1:CD80, B7.2:CD86) ile birleşmeleri T hücre aktivasyonuna yol açar (Sinyal II). Kostimulatuar moleküllerin etkisi olmazsa, T hücre aktivasyonu gelişmez ve immun yanıt baskılanır. T hücre yüzeyinde bulunan CD28 molekülü B7 (CD80, CD86) ile etkileştiğinde T hücre aktivasyonu maksimum düzeye ulaştığında CTLA-4 (CD152) ekspresyonu artar, CD40 ile etkileşerek CD28 ile yarışarak aktivasyonu sınırlı tutar ve IL-2 yapımı azalır. CTLA-4 immun yanıttı sınırlayıcı inhibitör rol oynayan bir moleküldür. Aktivasyon esnasında reseptör ligand ilişkisi içerisinde antijen sunan hücreler ve T hücreler arasında kostimulatuar moleküller salgılanır. Bu moleküllerin blokajı T hücre aktivasyonunu TCR reseptöründen bağımsız olarak bloke eder. Bu nedenle immun tolerans stratejisi sadece aktive olan T hücrelere yöneliktir. CTLA-Ig'ler CD28-B7 etkileşimini bloke ederek T hücre proliferasyonunun inhibe eder (Şekil 25).

Kostimulatuar CTLA-4 Ig kullanılarak allojenik kök hücre engreftmanı, allojenik deriye yönelik tolerans, ekstratimik T hücre delesyonu ve T hücre toleransı sağlanabilir (168, 169).



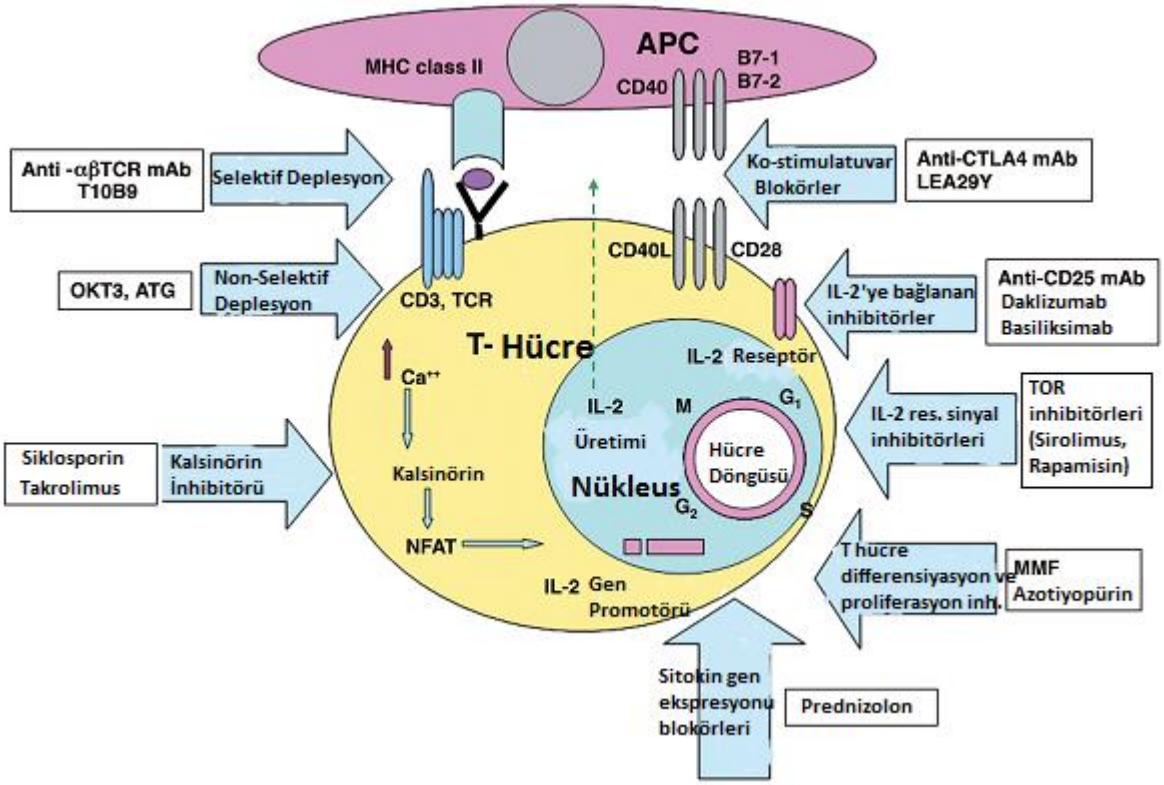
Şekil 25: Kostimülatuar moleküller ve sinyal I-II-III (155)

CD154-CD40 etkileşimine yönelik kullanılan spesifik monoklonal antikorların (anti CD40) hayvan deneylerinde deri ve kardiyak greft rejeksiyonunu engellediği ve uzun dönem allogreft yaşam süresini uzattığı bildirilmiştir (170). Anti-CD40 antikorlarının CTLA-4 Ig ile sinerjistik etki yaratarak deri allogreft yaşam süresini kemik iliği transplantasyonu ile beraber uzattığı gösterilmiştir (171).

Anti CD154 antikorları T efektör hücre aktivasyon ve proliferasyonunu sınırladığı, Treg hücre indüksiyonu yaptığı gösterilmiştir (172).

4.4.4.3. Sinyal III

Kalsinörin enzim inhibitörleri (siklosporin, takrolimus), pürin sentez inhibitörleri (MMF, azatiyopürin), TOR inhibitörleri (rapamisin), IL-2 reseptör blokörü antikorlar (daclizumab, basiliksimab) ve steroidler sinyal III yani T hücre proliferasyonu ve aktivasyonu için gerekli IL-2 sentezini bloke ederler (158) (Şekil 26).



Şekil 26: İmmunsüpresif ilaçlar ve immun modülatuar antikorların etki mekanizmaları (101)

4.4.5. Deri İçerikli Allogreft (VCA) rejeksiyonunu önlemede kullanılan immunsüpresif ilaçlar

Temel amaç VCA akut ve kronik rejeksiyonunu önleyecek şekilde minimal dozda immunsüpresif kullanımı, minimum immunsüpresif komplikasyon, düşük enfeksiyon ve malignite riski ile beraber GVHD hastalığı olmadan allogreft ve hasta yaşam süresini uzatmaktır (21) (Tablo 8).

Tablo 8: İmmunsüpresif Tedavi/Deri İçerikli Allogreft (VCA)

İndüksiyon Terapisi (9)	**1-Antitimosit Globülin (ATG)** T hücre antijenlerine yönelik poliklonal antikordur. Kompleman aracılı lizis, non selektif lenfosit deplesyonu yapar. **2-Anti IL 2 / Monoklonal antikor** Daclizumab ve Basiliximab Aktive T hücrelerindeki IL-2 reseptörü alfa subünitine bağlanır. T hücre proliferasyonunu ve diferansiyasyonunu önler. T hücre deplesyonu yapar. **3-Anti-CD52 / Monoklonal antikor (campath-1H)** Alemtuzumab; T ve B hücre deplesyonu yapar. **4-Anti CD3 / Monoklonal antikoru (OKT3)** T hücrelerine bağlanarak T hücrelerini siler.
İdame Tedavi (9)	**1-Tacrolimus / Kalsinörin inhibitörü** Siklosporinden 10-100 kat güçlüdür. Streptomyces tsukubaensis'dan üretilen bir makroliddir. Kalsiyum bağımlı IL-2 üretimini bloke eder. **2-MMF / Pürin sentez inhibitörü** Lenfositlerdeki guanin nükleotid sentezini inhibe ederek lenfosit proliferasyonunun inhibe eder. T ve B lenfosit inhibisyonu yapar. **3-Kortikosteroid** Non selektiftir. IL-2 proliferasyonunu baskılar. Antijen sunan hücreleri ve T lenfositlere etkilidir.
Kurtarma Tedavisi (9)	**1- Sirolimus/ Rapamisin:** TOR inhibitörleri makrosiklik laktonlardır. **2-Steroid:** Yüksek doz IV bolus şeklinde uygulanır. **3-Antikorlar:** Yüksek doz IV infüzyon şeklinde uygulanır.

4.4.6. Allogreft Rejeksiyonunu Önleyici İmmunosüpresif Tedavi Komplikasyonları (9)

1. GVHD

Allojenik transplantasyon sonrası donöre ait immun hücrelerin alıcıya saldırması ile doku ve organlarda immun yanıt sonrasında oluşan antijen antikor komplekslerinin doku ve organlarda birikerek organ disfonksiyonu yapması ve allogreft rejeksiyonunu indüklemesi halidir. Donör lenfositlerinden zengin kompozit içerikli allogreft transplantasyonu GVHD riskini arttırmaktadır. Allotransplantasyonlarda önemli bir problem olmakla beraber kontrolü önemlidir. Allotransplante edilen dokuda, kemik iliği ve lenf nodlarının bulunması ve ışınlanmadan transplantasyon yapılması GVHD riskini beraberinde getirmektedir. VCA transplantasyonu öncesi total allogreft ışınlaması, lenfadenektomi, cross match çalışması, bu sebeple uygulanmaktadır (21, 173-175).

2. Metabolik

Kreatinin yüksekliği, renal disfonksiyon, cushing sendromu, hiperglisemi, arteriyel hipertansiyon, hiperparatiroidi, avasküler kalça nekrozu görülebilmektedir (13).

3. Fırsatçı Enfeksiyon

CMV, herpes, bakteriyel enfeksiyonlar, kutanöz mikoz, Clostridium difficile enfeksiyonu görülebilmektedir (13).

4-Lenfoproliferatif Hastalıklar ve Maligniteler (13)

4.4.7. Allogreft Rejeksiyonunu Önleyici Yaklaşım

4.4.7.1. Preoperatif

A. Hiperakut rejeksiyona neden olabilecek önceden oluşmuş antikorların tespiti (ABO, anti HLA antikorları)

B. Alloantikorların tespiti (akış sitometri) ve doku uyumluluk testleri (Cross Match): Her ne kadar majör MHC antijenleri ve antikorları açısından uygun sonuçlar ile transplantasyon yapılsa da minör MHC antijenleri nedeni ile akut rejeksiyon ihtimali mevcuttur.

C. İndüksiyon immunoterapi

D. Allogreftte travmatik hasarın ekarte edilmesi (79)

4.4.7.2. Peroperatif

A. Uzamış iskemik süre allogreft transplantasyonunda doku hasarını arttırmakta ve rejeksiyon riskini beraberinde getirmektedir (130).

B. Allogreftin travmatize edilmesi endotel hasarını arttırmakta doğal immun yanıtı kuvvetlendirmekte ve rejeksiyon sürecini tetiklemektedir (79).

4.4.7.3. Postoperatif

İdame immunsüpresif tedavi düzenlenmeli ve akut rejeksiyon açısından hasta takibe alınmalıdır.

4.5. Tolerans İndüksiyon Stratejileri

Allojenik doku nakillerini sınırlayan en önemli faktör immunsüpresif kullanımı ve yan etkileridir. Tolerans indüksiyon çalışmalarının odak noktası, alıcıda immunsüpresyon oluşturmadan transplante edilmiş allogreftin rejeksiyonunu önlemek, donör spesifik tolerans hali oluşturmaktır. En az zarar veren ve en etkili metotla allotoleransın devamlılığını sağlamak, allogreft yaşam süresini uzatmak, immunsüpresif tedavileri azaltmak, donör spesifik tolerans temel amaçtır (164) (Tablo 9).

Tablo 9: Tolerans indüksiyon stratejileri (21)

Tolerans İndüksiyon Stratejileri	**Mekanizma**
1. Mikst kimerizm	Kemik iliği transplantasyonu Vaskülarize kemik iliği transplantasyonu
2. Treg hücre	İn vitro manipülasyon ile çoğaltılmış Treg hücre IV enjeksiyonu T hücre deplesyonu
3. Dendritik hücre	İn vitro alloantijenle manipülasyon sonrasında IV infüzyon
4. MSC	Otolog veya allojenik kök hücre infüzyonu İmmunmodülatuar etki
5. Gen Terapi	MHC gen terapi

4.5.1. Kimerizm, Mikst Kimerizm ve Tranplant Toleransı

Kimerizm kişinin belirli bir yüzdede kendine ait olmayan hematopoietik seriden hücreler bulundurması halidir. Tipleri mevcuttur (150, 164) (Tablo 10).

Tablo 10: Kimerizm tipleri (150)

TİP	**Tanım**	**Klinik Tablo**
1. Kimerizm	Kendine yabancı antijenik hücre bulundurmak.	
2. Mikrokimerizm	<%1 kendine ait olmayan hematopoietik seride hücre bulundurmak.	Organ transplantasyonlarından sonra görülebilir.
3. Makrokimerizm **Total** **Mikst**	Tüm hematopoietik seri donöre aittir. %1- %100 arasında donör hücre bulundurmak.	Total myeloablatif Kİ Tx sonrasında görülür. Parsiyel myeloablasyon ile yapılan Kİ Tx. sonrasında görülebilir.

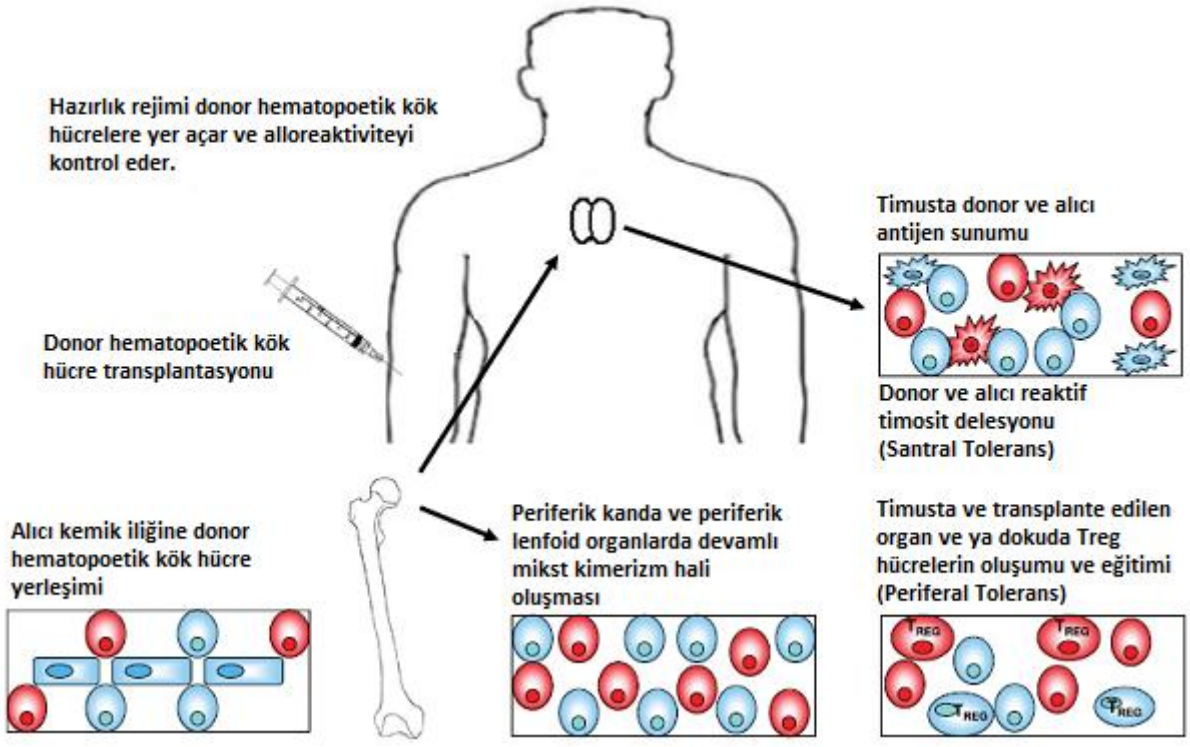
Kİ: Kemik iliği, Tx: Transplantasyon

Total ve Mikst Kimerizm

Total kimerizme göre mikst kimerizm transplantasyon toleransı açısından daha avantajlıdır. Total kimerizmde olduğu gibi alıcıya ait bütün immun sistemin yerine donör immun sistem geçmez. Alıcının immun sistemine ait cevap sağlamdır. Hem allojenik reaktif hem alıcıya ait reaktif immun sistem hücreleri bir arada bulunur. Bu durum üçüncü bir vericiden gelen antijene immun savunma sağlar. Timusta santral tolerans hem alıcıya hem de donöre karşı gelişir. Hazırlık rejimi ardından hematopoietik kök hücre transplantasyonu ile periferde ve timusta mikst kimerizm oluşturularak hem alıcıya hem de donöre karşı immun tolerans sağlanabilir. Total kimerizmde GVHD riski daha fazladır (176). Allotransplantasyonlarda

GVHD riski alıcının immunolojik durumu, donör ve alıcının arasındaki doku uyumluluğu derecesi ile ilişkilidir. İmmun süpresif hastada doku uyumluluğu mevcut değilse görülür. Allogreftin hematopoietik hücre ve lenfoid doku içeriği arttıkça artar. Allogreft kabulü için kimerizm indüksiyonu nonmyeloablatif olarak düşük doz total vücut RT, timik RT, poliklonal ve monoklonal antikorlarla, siklofosfamid gibi sitoredüktif ilaçlarla, MMF, rapamisin gibi immunsüpresif özellikteki ilaçlar ile yapılabilir. Myeloablatif ablasyon mortalite ve morbidite riski nedeni ile transplantasyon toleransında kullanılmamakta, mikst kimerizm indüksiyonu tercih edilmektedir (158, 173, 177, 178).

İmmunsüpresif tedavi altında VCA yapılan hastalarda kemik iliği veya vaskülarize kemik iliği içeren kompozit doku transplantasyonu yapılmışsa, donöre ait hücreler alıcının vücudunda mikst kimerizm oluşmaktadır. GVHD riski (179) mevcuttur. Oluşan mikst kimerizm allogreftte donör spesifik immun tolerans sağlamaktadır (180). Uzun dönem immunsüpresif ihtiyacını azaltmak amacıyla yapılan geniş seri hayvan deneylerinde hematopoietik kök hücre nakli ile beraber yeni geliştirilen stratejilerle oluşturulan mikst allojenik kimerizmin allojenik kompozit doku naklinde allogreft yaşam süresini uzattığı gösterilmiştir (181-183). Mikst kimerizm solid organ transplantasyonlarında da bir tolerans indüksiyon stratejisi olarak değerlendirilmektedir (184) (Şekil 27).



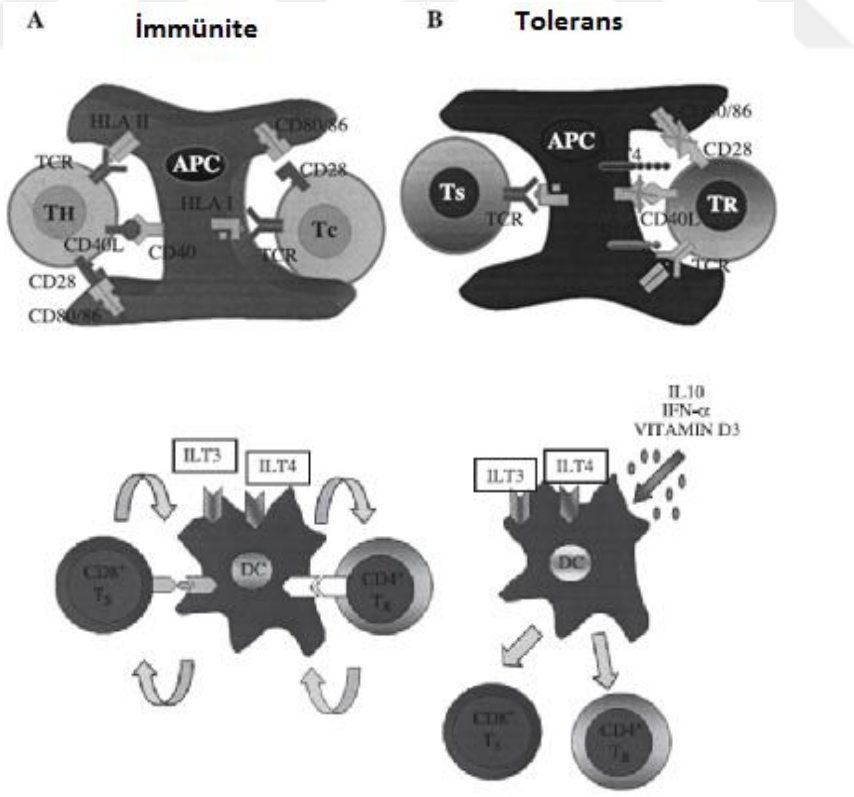
Şekil 27: Mikst kimerizm indüksiyonu. Non myeloablatif hazırlayıcı rejimin ardından donör hematopoietik kök hücre transplantasyonu, alıcı kemik iliğinde gerçekleşen kök hücre

yerleşimi, timusta donör ve alıcı antijen sunumu, donör ve alıcı reaktif timosit klonal delesyonu, Treg hücre gelişimi, mikst kimerizm oluşması ve transplant toleransı gelişmesi (178).

4.5.2. Treg Hücre (CD4+CD25+Foxp3+Treg) ve Ts ve İmmun Modülasyon

Allojenik stimülasyon halinde T hücrelerin süpresör özelliği olan (CD8+) ve (CD28-) bir alt grubu olan **T supresor (Ts)** hücrelerin geliştiği ve zenojenik ve allojenik immun yanıtı MLR'da baskıladığı gösterilmiştir (185). Ts hücreler MHC I taşır ve Th2 antijen spesifik alloreaktif yanıtı süprese ederek, Th2 hücrelerin immunsüpresif fonksiyonlarını ortaya çıkarır. Ts hücreler APC'lerdeki kostimulatuar moleküllerin inhibisyonu ve inhibitör moleküllerin stimülasyonu ile anerji oluşturarak APC'lerde telerojenik dönüşüme sebep olur. Treg hücre oluşumunu stimüle eder. İmmun süpresif etkileri vardır. Telerojenik APC'ler (dendritik hücreler), Ts hücreler ve Treg hücreler arasında etkileşim vardır (186) (Şekil 28).

Telerojenik dendritik hücreler yüzeylerinde bulunan reseptörler (ILT-3 (Ig like transcript inhibitor receptor 3), ILT-4 (Ig like transcript inhibitor receptor 4)) yardımıyla sitokinler (IL-10, IFN-α ve vitamin-D) yolu ile Ts ve Treg hücre oluşumunda ve periferik tolerans ve anerjide rol oynar. Telerojenik olmayan dendritik hücreler ise T hücre alloaktivasyonu yapar (187) (Şekil 28).



Şekil 28: Telerojenik dendritik hücre, Ts ve Treg hücre ilişkileri; immun stimülasyon ve tolerans mekanizmaları (187)

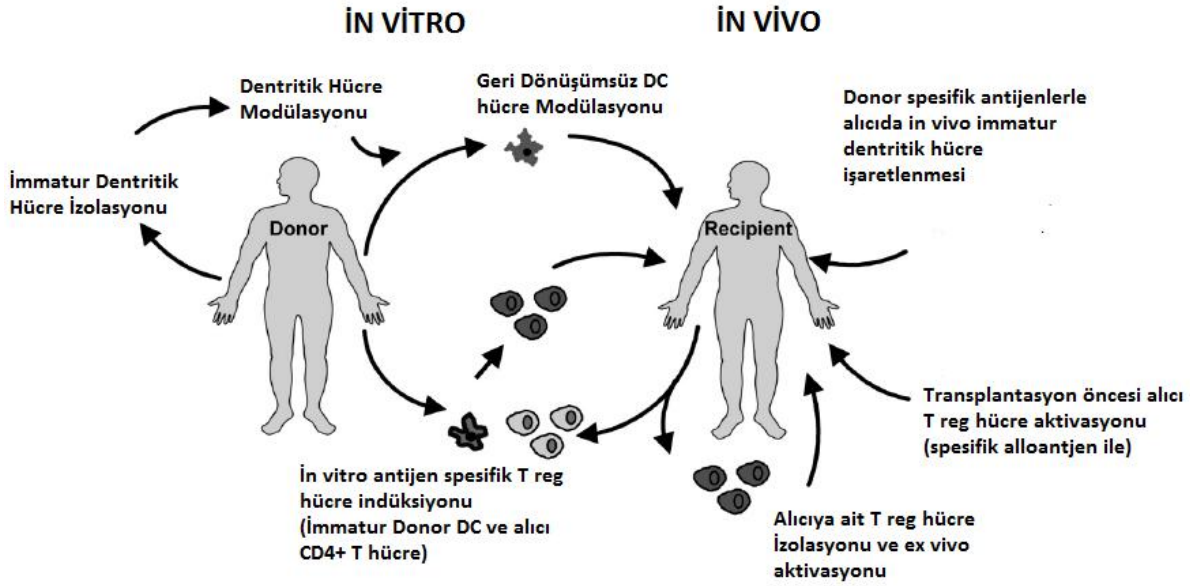
Doğal (CD4+) (CD8+) (Foxp3+)Treg hücreler timusta gelişir. Yüzeylerinde CD4 ve CD25 ekspresyonu vardır ve diferansiyasyonları transkripsiyon faktör Foxp3'e bağlıdır. Treg'ler (CD4+)T hücrelerinin farklılaşmış bir grubudur. Periferik (CD4+)T lenfositlerin %10'udur. Bunlar doğal Treg hücrelerdir. Self proteinlere toleranstan ve otoimmun hastalıkların baskılanmasından sorumludur. İmmun regülatuar hücredir. Allojenik kemik iliği kök hücre transplantasyonunda GVHD tedavisinde kullanılmışlardır (188-190). Yeni doğmuş farelerde timus kökenli (CD4+) (CD8+) (FOXP3+)Treg hücrelerin baskılanması sonucu otoimmun hastalıklar gelişir (191). Bu çalışmalarla Treg hücrelerin immun regülatuar hücre oldukları fark edilmiştir.

Periferde naif (CD4+)T hücrelerin telerojenik koşullar ve antijen varlığında farklılaşması ile **periferik (CD4+) (CD8+) (Foxp3+)Treg hücreler** gelişir (189, 192). Periferik Treg hücreler TGF- β salgılayan Th3 hücreleri ve IL-10 salgılayan Trl hücreleri olarak ikiye ayrılırlar. Bu hücreler ekstrasellüler ATP sentezi, IL-2 tüketimi, immun baskılayıcı sitokinler olan IL-10 ve TGF- β sentezi ile dendritik hücre matürasyonunu inhibe eder. İn vivo ve in vitro aktive edilmiş periferik Treg hücreler periferik tolerans ve allografte yönelik immun toleransta rol oynar (189, 193, 194).

Hem doğal hem de periferik indüklenmiş Treg hücreleri transkripsiyon faktörü Foxp3 ekspresyonu ve CD25 yüzey ekspresyonu ile karakterizedir. Foxp3 up-regülasyonu Treg hücre oluşumu ve fonksiyonları için önemlidir. Treg hücreler immun baskılayıcı etkilerini IL-10 ve TGF-β gibi baskılayıcı sitokinlerin salınımı, IL-2 lokal konsantrasyonunun tüketimi ve inhibisyon (195), apopitozisin tetiklenmesi ve hücre-hücre temasında hücre döngüsünün durdurulması ile gösterir (196). Treg hücreler transplantasyon tolerans indüksiyon çalışmalarında donör spesifik tolerans oluşturmak için deneysel aşamada kullanılmaktadır (Şekil 29). Allojenik transplantasyonlarda allogreftin reddinin engellenmesinde önemli bir rolü vardır. Geniş hayvan serilerinde (Foxp3+)Treg hücre ile immuntolerans oluşturmak için yapılmış deneyler ve olumlu sonuçlar vardır. GVHD tedavisinde etkileri halen araştırılmaktadır (75, 197, 198).

Treg hücrelerin indirekt allospesifitesi vardır. Otoantijenlerin desensitizasyonda rol oynamaktadır. Alıcıdan alınan Treg hücreler ex vivo olarak donör alloantijenleri ile muamele edilip çoğaltılarak alıcıya geri verildiğinde indirekt allospesifisitenin tolerans indüksiyonunda önemli rol oynayabileceği hayvan deneylerinde gösterilmiştir (25). Bu bilgi transplant toleransında Treg hücrelerin kullanılmasının yolunu açmıştır. Alıcıdan alınan (Foxp3+)Treg

hücreler ex vivo olarak donör antijenlerinde allosentize edilen Treg hücre tedavisinin kemik iliği transplantı ile beraber sitoredüktif tedaviye ihtiyaç olmadan, deri allogreftinin yaşam süresini uzattığı farelerde gösterilmiştir (199).

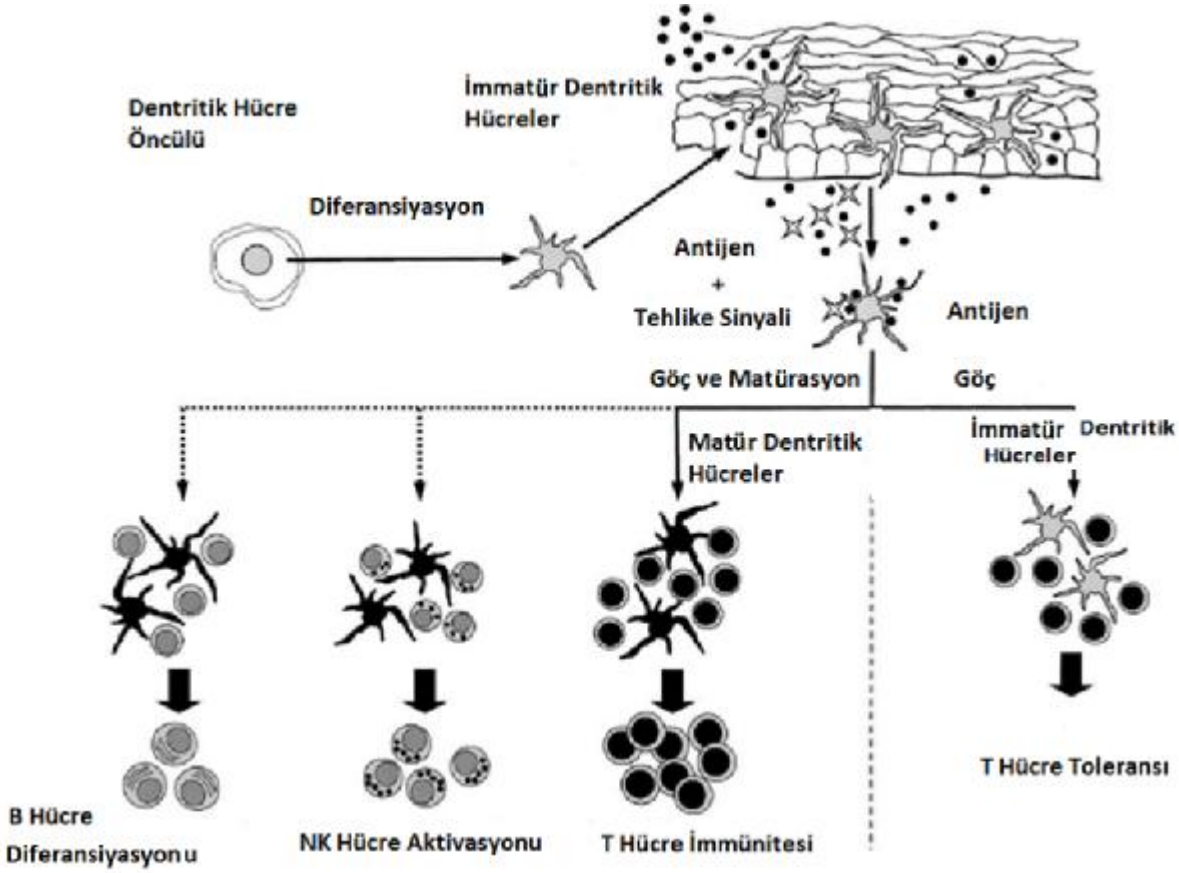


Şekil 29: Tolerans indüksiyonunda dendritik hücre ve Treg hücre ilişkisi (200)

4.5.3. Dendritik Hücre Tedavisi

Dendritik Hücreler/ Langerhans Hücreleri

Kemik iliği orijinli olan dendritik hücreler myeloid veya lenfoid seriden farklılaşabilir. Plastisitesi yüksektir. **Öncül dendritik hücreler** kemik iliğinde**, matür dendritik hücreler** sekonder lenfoid organlarda bulunurken**, immatür dendritik hücreler** kan ve periferik dokuda bulunur. Periferde dermiste yerleşmiş olan immatür dendritik hücreler antijen stimülasyonu ile olgunlaşma süreci geçirerek kana geçerler. Kan yolu ile T hücrelerden zengin sekonder lenfoid organlara ulaşırlar**.** Matür dendritik hücreler, lenfoid organlarda antijeni naif T hücrelerine sunarlar ve onları aktive ederler. Aynı şekilde B hücrelerinin proliferasyonunu ve antikor oluşumunu, NK hücrelerinin aktivasyonunu sağlarlar. Antijen stimülasyonu olmadığında ise kostimülatuar moleküllerin yokluğu ile telerojenik özellik kazanan dendritik immatür hücrelerin T hücre toleransı sağladıkları düşünülür (201, 202) (Şekil 30).



Şekil 30: Dendritik hücre periferik immunobiyolojik yanıt (201)

Lenfoid organlarda (interdigitating), aferent lenf nodlarında (Veil), kanda sirkülasyon halinde, dermiste (Dermal), epidermiste (Langerhans hücreleri), dokularda interstisiyel alanlarda (İnterstisiyel), lenfoid foliküllerde (Foliküler), timüste (Timik dendritik hücreler) bulunabilirler (203).

Lenfoid dokularda bulunan **foliküler dendritik hücreler**, B hücrelerine antijen sunumu yaparlar ve bellek B hücre oluşumunda, anerji ve self toleransta rol oynadıkları düşünülür. Periferik lenfoid organların germinal merkezlerine veya foliküllerine ulaşan antijenleri tanırlar (204).

Timusta korteks ve medullada bulunan **timik dendritik hücreler** antijen sunumu yaparlar. Self antijen ve MHC klas II antijenden zengin olup, timus içinde self antijenlerle reaksiyona giren lenfositlerin negatif seleksiyon, klonal delesyon ile yok edilmelerinde, self tolerans oluşmasında belirleyici rol oynarlar (202).

İmmatür dendritik hücreler MHC class II stimülasyonu ve kostimulatuar sinyaller olmazsa anerji ile periferik T hücre tolerasına yol açar. İmmatür dendritik hücreler Periferik T hücre

toleransı ve delesyonda rol oynar. Th1 proliferasyon inhibisyonunda, Treg hücre indüksiyonunda, matürasyon sürecinde antijen stimulasyonu ile T hücre immunitesinde rol oynarlar (205). Tüm bu özellikler dendritik hücrelerin matürasyon ve fonksiyonel diferansiyasyonu ve telerojenik özellikleri ile ilgilidir (206, 207).

Telerojenik dendritik hücrelerin telerojenik özelliklerinin transplantasyon immunolojisinde kullanımında önemli sorular, bu hücrelerin bellek T hücreleri ve Treg hücreleri olan ilişkileri, immuntolerans için uygun fenotipik özellikte olan dendritik hücrelerin tespiti, hangi sürede ve zamanlamada, hangi immunsüpresif ajanlarla kullanımının fayda sağlayabileceği konularıdır (74). Otolog kemik iliği kökenli dendritik hücreler in vitro donör alloantijen ile stimüle edildiğinde alloantijen spesifik Treg hücre oluşumunu ve proliferasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (27). Sacks ve arkadaşları kısa dönem geçici immunsüpresif tedavi ile alıcının donöre ait alloantijenle stimüle edilmiş verici kemik iliğinden elde edilmiş immatür dendritik hücrelerin kullanımının sıçanlarda arka bacak allotransplantasyonunda allogreft ömrünü uzattığını ortaya koymuştur (208). Garrovillo ve arkadaşları sıçanlarda antitimosit globulin ile beraber donör alloantijen ile temas eden alıcıya ait IV dendritik hücre tedavisi ile kalp allogreft ömrünü uzatmıştır (209).

4.5.4. Mezenkimal Kök Hücre Tedavileri

Salgıladığı çözünür faktörler ve hücre-hücre etkileşimine yol açan faktörler etkisi ile immun modülasyon ve immunsüpresyon yapan MSC'ler hem solid organ hem kompozit doku transplantasyonlarında tolerans indüksiyonu deneylerinde umut vermektedir.

4.5.5. Gen Terapi

Sitokinler, antikorlar ve rekombinant ligandlar gibi terapötik ajanların retrovirus, adenovirus veya non viral yöntemlerle gen transferi ile aktarılan immunolojik özellikleri immun modülasyon amaçlı allotransplantasyonlarda, allogreft rejeksiyonunu ve iskemik hasarı önlemek, donör alloantijenlerine yönelik tolerans geliştirme amaçlı kullanılmaktadır ve umut vermektedir (210). MSC'lerle ilgili genetik araştırmalar devam etmektedir (31).

4.6. Kök Hücre Tedavisi

4.6.1. Kök Hücre

İlk defa 1963 yılında ışınlanmış bir fareye kemik iliği hücreleri enjekte eden Becker ve arkadaşları dalakta nodül oluşumunu izlemiş ve enjekte edilen miktar arttıkça dalakta nodül oluşumunun artmasıyla kök hücre kavramını fark etmişlerdir. Kök hücre, çoğalarak kendini yenileyebilen, uygun koşullarda vücuttaki diğer hücre tiplerine diferansiye olma potansiyeli

olan özelleşmemiş bir hücre tipidir. Kemik iliği kökenli kök hücre Dexter ve arkadaşları (1977), Allen ve arkadaşları (1981), Tavassoli ve Friedenstein (1983) tarafından tanımlanmıştır. Kök hücre mikroçevresine niş denir. Kök hücre ve mikroçevresi yani ekstra hücresel matriksi arasında sinyal molekülleri aracılığı ile intersellüler iletişim etkileşim mevcuttur. Mikroçevre değişirse diferansiyasyonun yönü de değişir.

Kök hücreye ait üç önemli özellik:vardır:

1. Kendi kendini yenileyebilme
2. Uzun süre bölünerek çoğalma
3. Uygun hücre kültürlerinde özelleşmiş farklı hücre serilerine dönüşebilme

Kök hücreler elde edildiği dokuya ve farklılaşma özelliklerine göre çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Deriden elde edilen kök hücreler, iskelet ve kas hücrelerinden elde edilen kök hücreler, hematopoietik kök hücreler (kemik iliği, kordon kanı, periferik kan), nöronal kök hücreler, somatik MSC'ler (kemik, kıkırdak, kemik iliği stroması, yağ) farklı hastalıkların tedavisinde deneysel ve klinik olarak kullanılmaktadır. Kök hücrelerin tedavide kullanımı immunolojik özelliklerinin tam olarak bilinmiyor oluşu, insanlarda uygulanmış tedavilerin sınırlı olması ve insanlarda teratojenik tümörler oluşturma riski nedeniyle henüz sınırlıdır. Bir çok çalışma deneysel aşamadadır (29).

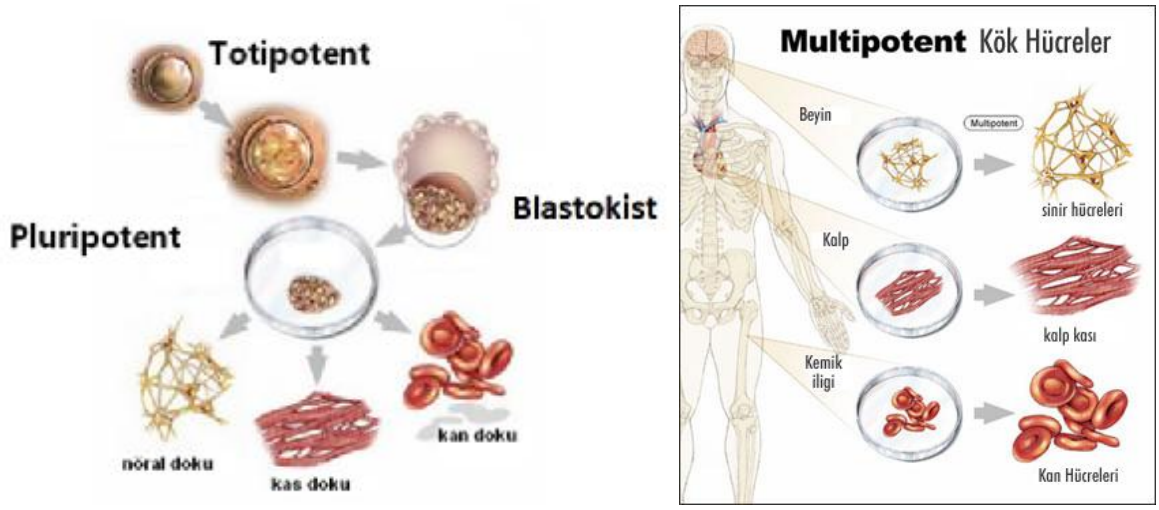
4.6.1.1. Bölünme ve Farklılaşma Özelliklerine Göre:

Totipotent Kök Hücreler

Sınırsız farklılaşma özelliği olan, tüm ekstraembriyonik yapılara dönüşebilen, farklı yönlere diferansiye olabilme yeteneğine sahip döllenmiş yumurta ve sperm birleşimden oluşan erken embriyonel kök hücrelerdir. Totipotent hücre tüm organizmayı oluşturma kapasitesindedir. Zigot oluştuktan sonra 2, 4, 8, 16 blastomere kadar totipotenttir (211, 212) (Şekil 31).

Pluripotent Kök Hücreler

Organizmada üç germ yaprağına ait birçok dokunun oluşmasına kaynak oluşturan kök hücrelerdir. Tüm organizmayı oluşturma kapasitesi yoktur. Embriyoda beşinci ve altıncı günlerde oluşan blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilebilirler. Pluripotent hücreler üç farklı embriyolojik kökendeki hücrelere (bilinen 200 hücre çeşidine) dönüşebilirler (29, 211, 212) (Şekil 31).



Şekil 31: Diferansiyasyon özelliklerine göre kök hücreler (www.kokhucredernegi.org.tr)

Multipotent Kök Hücreler

Multipotent kök hücre bulunduğu dokudaki hücrelere ve dokuya dönüşebilme, sınırlı diferansiyasyon kapasitesi olarak tarif edilir. Pluripotent özelliklerini kaybetmişlerdir. Kök hücre hiyerarşisinde en altta bulunurlar (29) (Şekil 31).

4.6.1.2. Elde Edildiği Kaynakların Tipine Göre:

Embriyonik Kök Hücre

Embriyonik kök hücreler pluripotenttir. Beşinci ve altıncı günlerde embriyoya ait blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilir. Ölümsüzdür. Telomeraz gen ekspresyonu vardır. Teratoma oluşturma özelliğindedir. Pasajlarda stabil karyotip özelliği gösterir. Klonal çoğalma özelliği vardır. Oct-4 pluripotent marker ekspresyonu vardır. Pluripotent embriyonik kök hücreler üç germ yaprağına ait dokulara dönüşebilir. Düşük yapılmış fetüsten (kadavra), in vitro fertilizasyon çalışmalarında kullanılmayan embriyolardan, laboratuar koşullarında sadece kök hücre elde etmek için yaratılmış embriyolardan elde edilebilir. İnsan embriyosunun kullanımına dair etik tartışmalar halen devam etmektedir (29, 212, 213).

Non-Embriyonik Kök Hücre/ Erişkin kök hücre

Erişkin kök hücreler bir doku veya organda farklılaşma aşamasını tamamlamış matür hücreler arasında bulunan farklılaşmamış hücreler olup, kendi kendini yenileyebilme kapasitesine sahiptir. İçerisinde bulunduğu dokuya ait hücrelere dönüşerek (kemik, kas, kemik iliği stroması, tendon, ligaman, kartilaj, yağ gibi) dokunun devamlılığı sağlar (212). Multipotent özelliktedir. Fakat son çalışmalar kemik iliği kökenli hematopoietik kök hücrelerin, nöronal kök hücrelerin ve iskelet kasından elde edilen kök hücrelerin değişik dokulara

dönüşebileceğini raporlamıştır (214-216). Bu durum erişkin kök hücrelerin plastisitesini (217), bir dokudan diğer bir dokuya dönüşebilme yeteneğini yani transdiferansiyasyon yeteneğini gösterir. Bu özellikleri ile embriyonik gelişim aşamalarındaki sıkı soy bağlılığı ve hiyerarşiye meydan okumaktadır (29, 212).

Non embriyonik erişkin kök hücreler

1. Kemik iliği kökenli hematopoietik kök hücreler (periferik kan, kordon kanı, kemik iliği)

2. Mezenkimal stromal kök hücreler (Kemik, kas, kıkırdak, deri,kemik iliği stromal alan, nöral doku)

4.6.2. MSC (Mezenkimal Stromal Kök Hücre)

İlk defa Fridestein kemik iliğinde bulunan fibroblastik klonal özellikte nonhematopoietik hücrelerin osteojenik diferansiyasyon kapasitesi olduğunu göstermiştir (218). Stromal dokudan elde edilen MSC sistematiği Owen (219) tarafından tanımlanmıştır. 1980'li yıllarda oluşan bu gelişmeler konnektif doku mühendisliğinin, hücre transplantasyonunun, stromal MSC transplantasyonunun çeşitli alanlarda kullanılmasının ve bu konudaki deneysel çalışmaların önünü açmıştır (211). MSC'ler pluripotent özelliklerini yitirmişlerdir. Multipotent özelliktedirler. Köken aldıkları özelleşmiş doku ve ilişkili diğer dokulardan gelişirler. Adiposit, osteoblast, kondrosit, myosit gibi çok çeşitli hücreye dönüşebilirler (29).

Fakat bazı MSC'lerin nonmezodermal hepatosit (220) ve nöronal hücrelere diferansiye olduğu, yüksek diferansiyasyon kapasitesi, transdiferansiyasyon özelliği ve yüksek plastisitesi olduğu gösterilmiştir (211). Pluripotent özellikleri olan bu hücrelere MAPC (multipotent erişkin kök hücre) denmektedir. Tedavide ve deneysel çalışmalarda embriyonel kök hücrelere alternatif olarak kullanılmaktadır (221).

4.6.2.1. MSC Dünya Hücresel Tedavi Derneği Minimum Kriterleri (222)

1. Kültür koşullarında plastik yapışma

2. CD105, CD73, CD90 pozitifliği

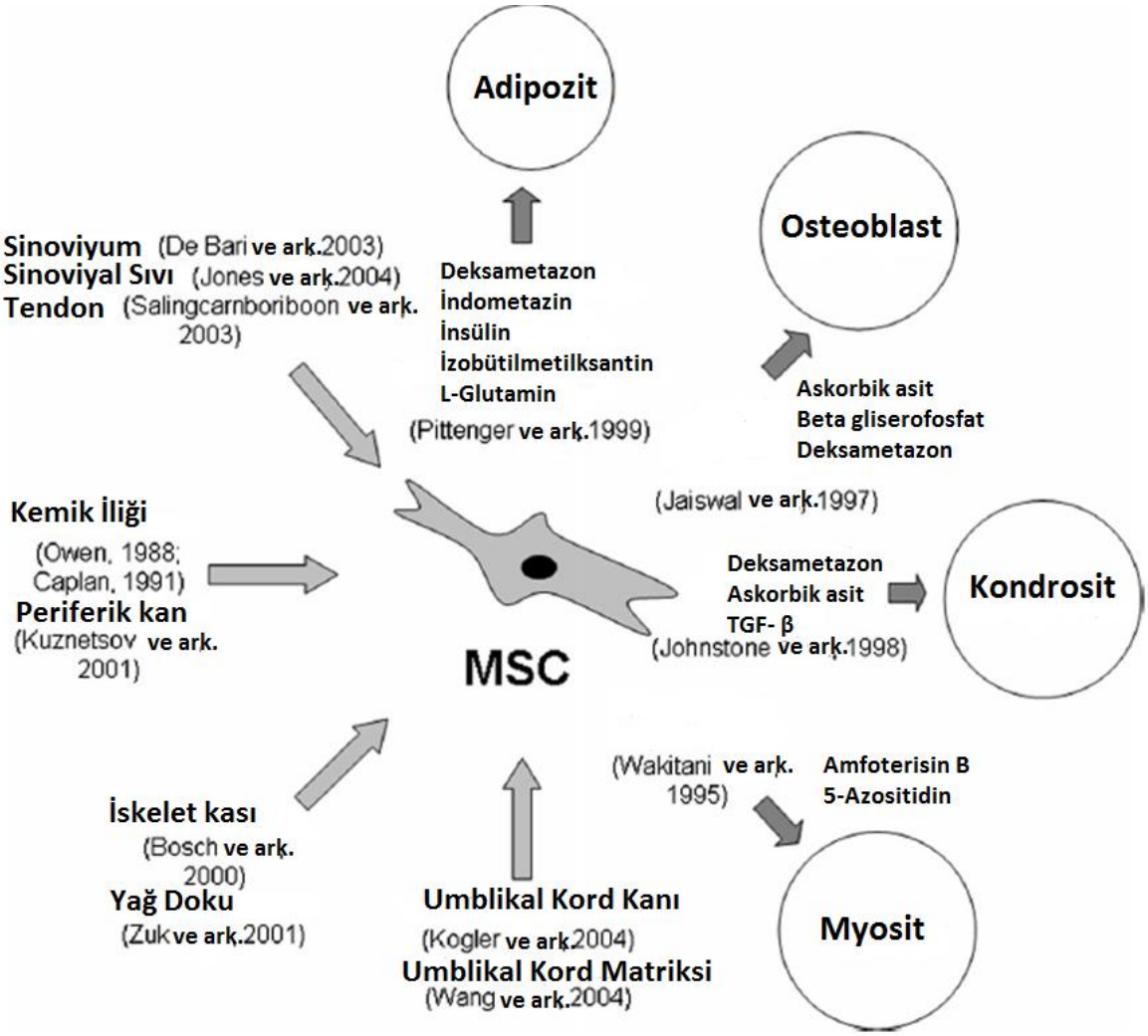
3. CD34, CD45, CD11a,CD19 veya CD79a, CD14 ve MHC II (HLA-DR) negatifliği (Hematopoietik belirteçler)

4. İn vitro diferansiyasyon kapasitesi

4.6.2.2. Erişkinde MSC Elde Edilebilecek Dokular

Amniyotik sıvı (D. Coppi; 2007), umbilikal kord-Wharton jeli (Wang ve arkadaşları; 2004), yağ doku (Zuck ve arkadaşları; 2001), santral sinir sistemi (Gage; 2001), kemik iliği (Caplan; 1991), retina (Troppe ve arkadaşları; 2000), deriden (Toma ve arkadaşları; 2001) gibi bir çok

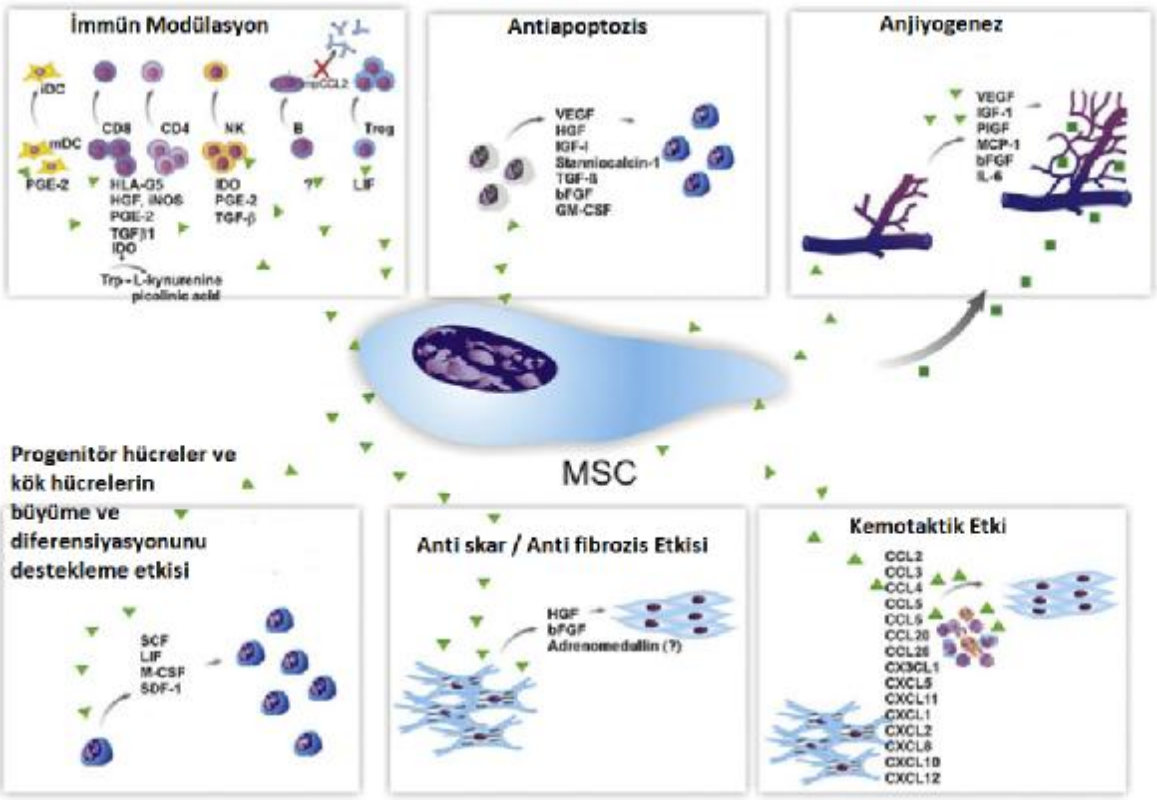
dokudan elde edilebildiği uygun ortamda farklı dokulara dönüşebildiği gösterilmiştir (29) (Şekil 32).



Şekil 32: MSC kaynakları ve diferansiyasyon (29)

4.6.2.3. MSC'lerin Genel Özellikleri ve Kullanım Alanları

Antiapopitotik, immun modülatuardır. Skar iyileşmesinde antifibrotik, proliferasyon ve diferansiyasyon yeteneği ile anjiyogenetik ve rejeneratiftir (223) (Şekil 33).



Şekil 33: MSC özellikleri (223)

Kök hücrelerin immun modülatuar ve rejeneratif özellikleri, diferansiyasyon kapasiteleri her alanda umut göstermektedir (29, 223, 224).

1. Dejeneratif ve nöroinflamatuar hastalıklar, iskemik hasar, travma sonrası doku defekti

2. Kemik kaybı; malunion, non union içeren kırıklar, osteogenezis imperfekta

3. Kıkırdak kaybı

4. Tendinöz ve ligamentöz kayıplar

5. Spinal kord yaralanmaları, spinal müsküler atrofiler

6. Konjenital veya miyokard enfarktüsü sonrası kardiyak kas güçsüzlüğüne bağlı kalp yetmezliği

7. Doku mühendisliği rejeneratif çalışmaları

8. Myeloproliferatif hastalıkların tedavisi, GVHD tedavisi

9. Transplantasyon immunolojisi

10. Estetik uygulamalar

11. Antikanser tedavileri

12. Otoimmun hastalıklar

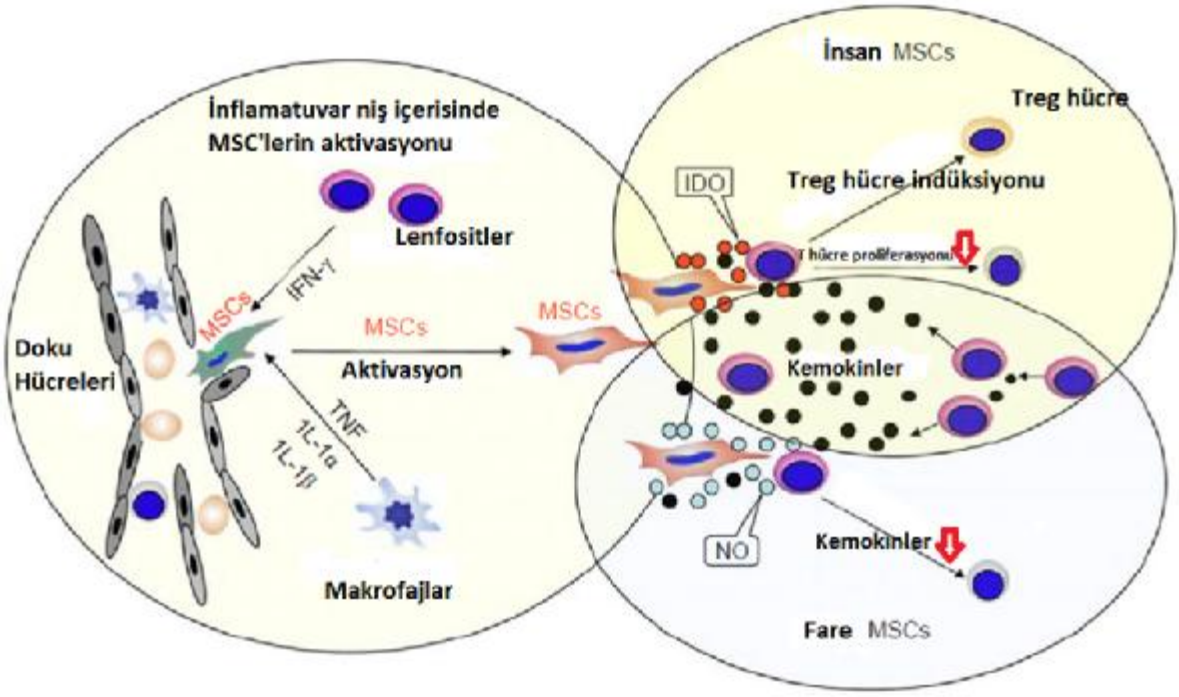
4.6.3. MSC İmmun Modülatuar Özellikleri

Yeni keşifler ve deneysel çalışmalarla beraber MSC'lerin immun regülatuar etkileri ve özellikleri ortaya konmuştur. İn vitro MSC'lerin alloimmun hücre yanıtını regüle ettiği gösterilmiştir (225). MSC'ler ile antijen sunan hücreler, T hücreler ve inflamatuar hücreler arasında etkileşim vardır. Non spesifik veya hücresel mitojenle uyarılan olgun T hücrelerinin aktivasyonunu ve fonksiyonlarını inhibe eder (226). Naif ve bellek T hücrelerinin spesifik antijene MHC yanıtını dramatik olarak baskılarlar (227). Tip I matür dendritik hücrelerin TNF-α salgılamasını süprese eder. Tip II matür dendritik hücrelerden IL-10 salınımını arttırırlar. dendritik hücre matürasyon ve aktivasyonunu inhibe ederler. Th1 hücrelerden interferon salgılanmasını azaltırlar. Th2 hücrelerden IL-4 salınımını arttırırlar. Treg hücre oranını MLR'de artırırlar (228).

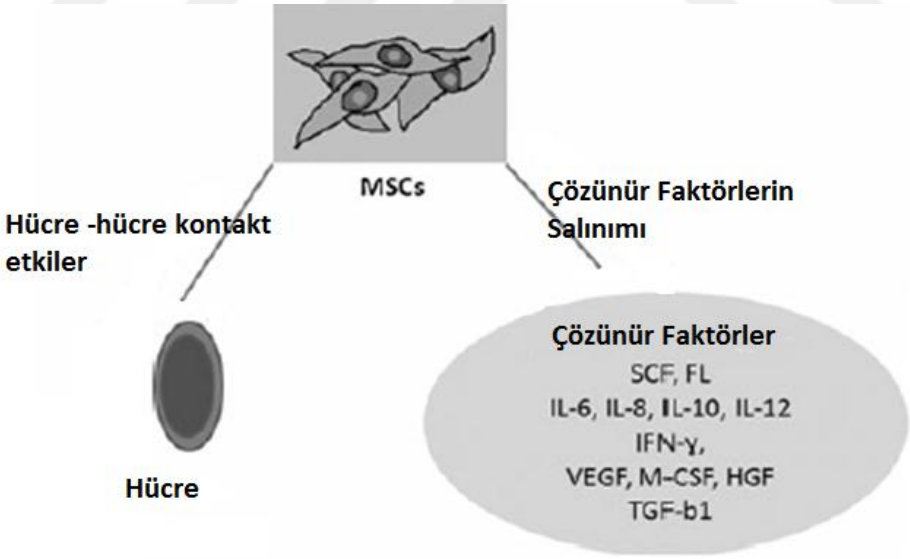
4.6.3.1. MSC'lerin İmmun Modülatuar Etki Mekanizması

MSC'lerin T hücreler üzerinde antiproliferatif ve immun modülatuar etkilerini humoral; çözünür (soluble) faktörlerin etkisi ile ve hücresel; hücre-hücre teması etkisi ile yaptığı ön görülmektedir (31, 73) (Şekil 35).

Çözünür faktörler kültür ortamında immun sistem hücreleriyle stimüle edilen MSC'lerin aktive olmasıyla salgılanan faktörlerdir (228). İmmun modülasyonda rol oynayan çözünür faktörler SCF (Stem cell factor), IL-6, 8, 10, 12, HGF, TGF-β1, PGE2, IFN-γ, M-CSF, VEGF'dir. MSC'lerin immunsüpresif etkisini gösterebilmesi için çözünür faktörler, direkt hücre-hücre teması ve inflamatuar bir mikroçevre gerekmektedir. Aralarındaki etkileşim halen çalışılma konusudur ve tam olarak ortaya konamamıştır (73). Hücreler arası kontakt etkileşimde intersellüler adezyon moleküllerinin (ICAM-1) ve vasküler adhezyon moleküllerinin (VCAM-1) rol oynadığı gösterilmiştir (229). Yaralanmış bölgelerdeki inflamatuar hücrelerden salınan faktörler inflamatuar mikroçevre MSC'ler için kemotaktik uyarıcıdır. Dolayısıyla MSC'lerin immun modülatuar etkileri doğal değildir. İnflamatuar faktörler tarafından stimüle edilir (31) (Şekil 34).



Şekil 34: İnflamatuar mikroçevrede MSC'lerin aktivasyonu, lenfosit aktivasyon, proliferasyon inhibisyonu ve Treg indüksiyonu (31).



Şekil 35: MSC; hücre-hücre kontakt mekanizma ve çözünür faktörler (73).

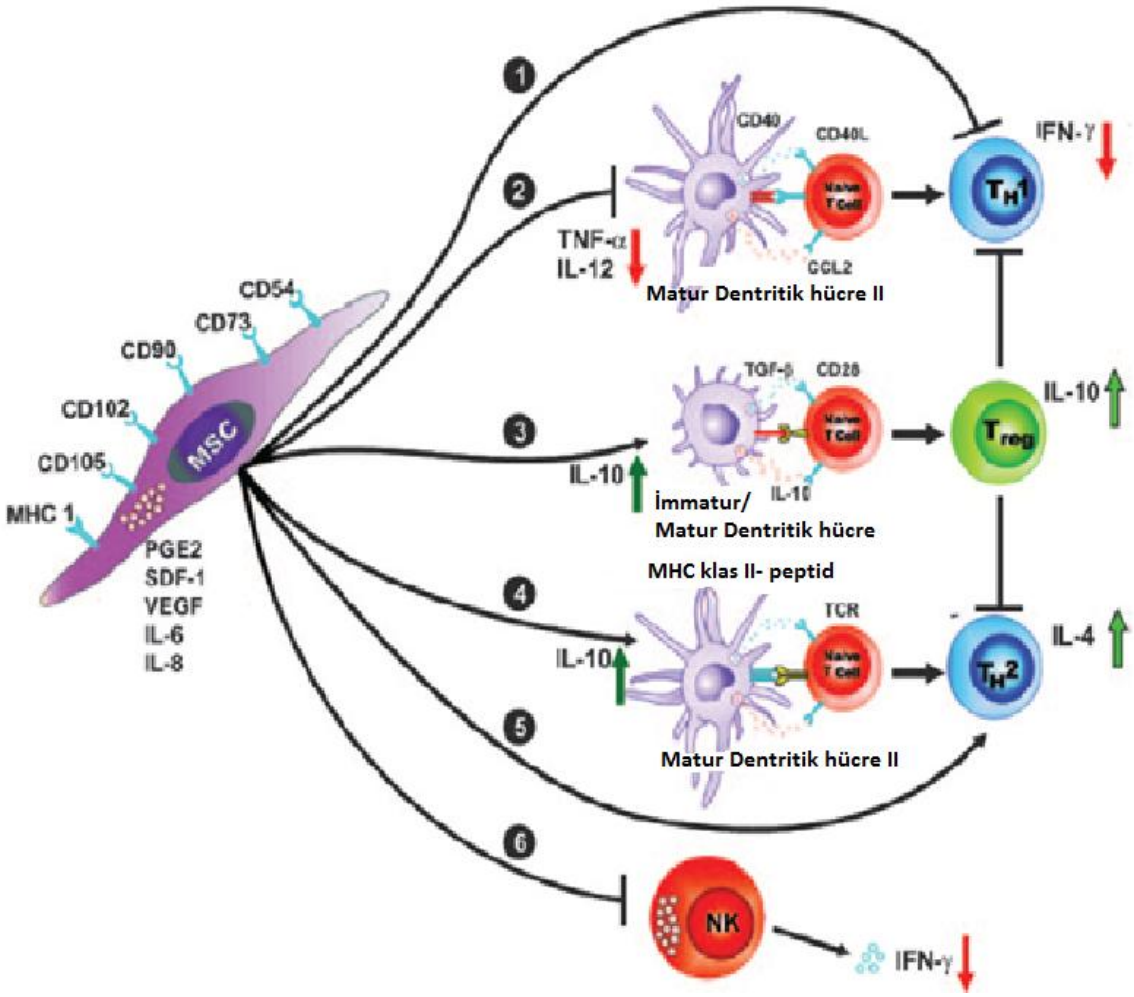
4.6.3.2. MSC'lerin İmmun Sistem Hücreleri ile İlişkisi

MSC'ler lenfositlerde anerji, apoptozis oluşturarak lenfosit proliferasyon inhibisyonu, Treg hücre indüksiyonu yapar. Antijen sunan hücrelerin matürasyon ve diferansiyasyonu inhibe eder. MSC'lerin immun sistem hücrelerine etkisi vardır (Tablo 11) (Şekil 37).

MSC T hücre ilişkisi

MSC'ler non spesifik mitojenik uyarı veya allojenik mitojenik uyarı ile gelişen T hücre proliferasyonunu inhibe eder (226). MSC periferik tolerans mekanizmasında (CD8+) veto hücreleri (facilitating cells) ile telerojenik hücreler ile periferik anerji oluşturarak, Treg ve Ts (T süpresör hücre) hücre oluşumu ile, Th1 ve Th2 hücrelerine olan etkileri ile Tc ve NK hücreler aracılığı ile gelişen hücre aracılı sitotoksik yanıtı baskılama yolu ile immun modülasyonda rol oynar (30, 225, 228, 230, 231).

Kemik iliği kökenli MSC'lerin TNF-α ve IFN-γ salınımı ile miktarı artan PGE2 (232) ve IDO (233) üzerinden immunsüpresif etkileri vardır. Monositlerden gelişen dendritik hücreler ve kemik iliği kökenli MSC'ler arasında alloreaktif T hücrelerini inhibe edici bir kontrol mekanizması vardır (228). İn vitro bir çalışmada, Proglandin E2 (PGE2) etkisi ile MSC'lerin IL-10 ve IL-4 salınımını arttırdığı, TNF-α, IFN-γ, IL-12 salınımını azalttığı, Th2 yönüne dengeyi değiştirdiği, IL-1β miktarını ve Treg miktarını artırdığı, Th1, NK hücreler üzerinde inhibitör etki yaptığı, dengeyi Th2 tarafına çevirdiği gösterilmiştir (225) (Şekil 36).



Şekil 36: MSC PGE2 ve sitokinler üzerinden immun modülatuar etkisi (225)

MSC Dendritik hücre ilişkisi

MSC dendritik hücrelerden IL-12 salınımını azaltarak, Th yolağına karşı çalışır. Salgıladığı TGF-β ile dendritik hücrelerin matürasyonunu inhibe eder. Ayrıca Treg indüksiyonu ile dendritik hücre matürasyonunu geciktirir. İmmun stimülasyon ve TNF-β sekresyonu yapan dendritik hücre (DC1) sayısını azaltırken; IL-10 salgılayan, IL-12 salınımını azaltan, MLR'da T hücre proliferasyonunu azaltan dendritik hücre (DC2) sayısını arttırır (30). MSC'ler monosit kökenli dendritik hücre matürasyonunu inhibe eder (234, 235).

MSC- B hücre ilişkisi

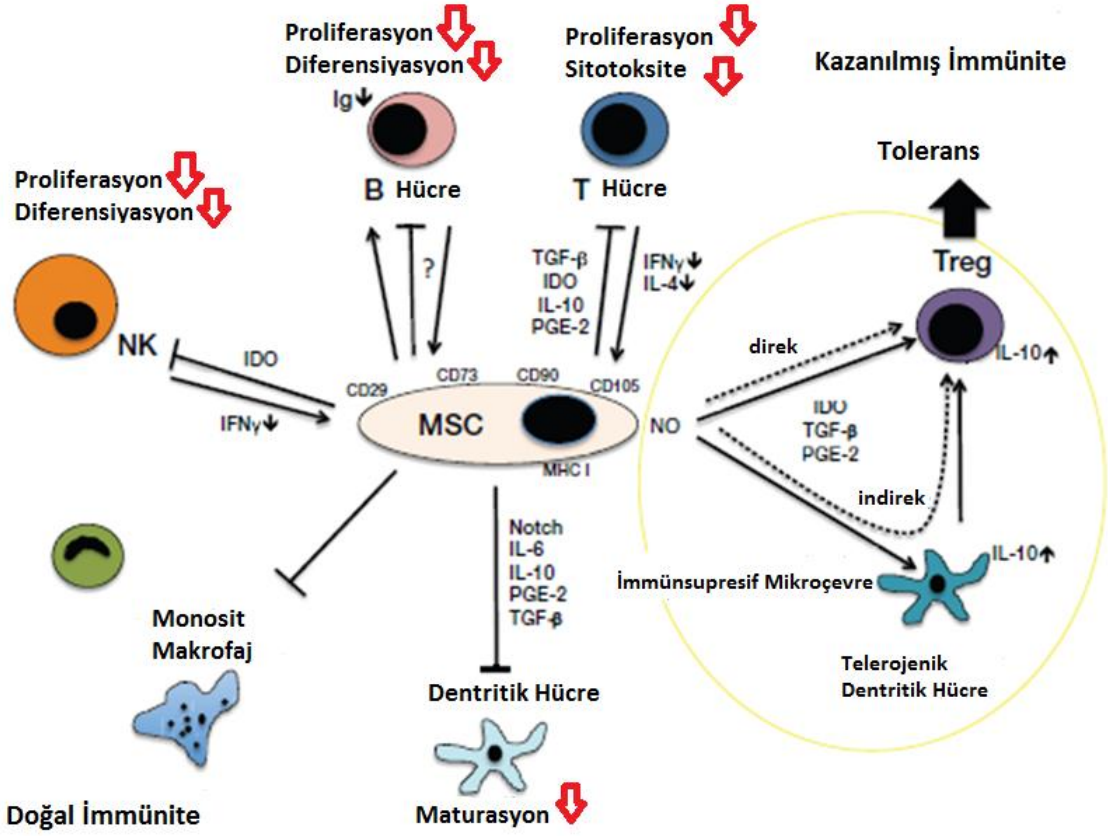
MSC'ler B hücrelerin proliferasyonunu PD-1 (Programmed death-1), PD-L1 (Programmed death ligand-1), PD-L2 (Programmed death-2) yolağı ve çözünür faktörler etkisi ile süprese eder (193, 236).

MSC- NK ilişkisi

Kemik iliği kökenli MSC'ler IL-2 ile uyarılmış NK hücre proliferasyonunu INF-γ salınımını azaltarak, TGF-β, PGE-2 ve IDO üzerinden inhibe eder (30, 225, 237).

Tablo 11: MSC İmmun modülatuar etki mekanizmaları (73)

MSC İmmun Modülatuar Etkiler	**Mekanizma**
Lenfosit proliferasyon inhibisyonu	IDO, NO
T lenfosit anerjisi indüksiyonu	Çözünür faktörler ve hücre-hücre teması
Treg hücre indüksiyonu	Çözünür faktörler ve hücre-hücre teması
T lenfosit apoptozisi	IDO, IFN-γ, HLA-G bağımlı
Antijen sunan hücre modülasyonu	MHC II ekspresyonunun, kostimülatuar moleküllerin baskılanması IFN-γ TNFα**,** IL-2, IL-12 inhibisyonu



Şekil 37: MSC'lerin farklı hücre tiplerine immunolojik etkisi (37)

4.6.3.3. MSC İmmun Modülatuar Sitokin ve Faktörler (238)

1. (1-2,3-dioksijenaz) (IDO)

Demir içerikli triptofan indirgeyicidir. Triptofan yıkıcıdır. İntrasellüler bir enzimdir. İnflamasyon sırasında inflamasyonu sınırlayıcı bir faktör olarak salınır. T hücre inaktivasyonunda önemli bir faktördür (239).

2. Nitrik oksit (NO)

Dendritik hücrelerin gelişimini TNF-α üretimini bloke ederek engeller. Antijen sunumunu bloke eder. Antioksidan ve antiinflamatuar bir faktördür. T hücrelerini baskılar. Periferik mononükleer hücrelerini Th2 hücrelerini bloke eder ve IL-4 salınımını süprese eder. Alveoler makrofajlarda yaygın bulunur ve T hücre proliferasyonunu önler. c-GMP inhibisyonu yaparak T hücre aktivasyonunu ve dendritik hücre diferansiyasyonunu önler (240, 241).

3. Proglandin E2 (PGE 2)

Araşidonik asit mekanizmasında rol oynar. T hücre ve makrofajlarda mevcut sistem üzerinden T hücre ve makrofajların etkisini sınırlandırır. TNF-α ve IL-12 salınımını inhibe eder. Makrofajlar üzerindeki MHC II ekspresyonunu baskılar. T hücre proliferasyonunu süprese

eder. Th1 hücresel cevabı sınırlar ve IL-4 ve IL-5 üzerinden dengeyi Th2 yönüne çevirir (238).

4. HLA-G (Doku Uyumluluk Antijeni)

Lökositler, T, B, NK hücrelerinde reseptörleri vardır. Bu reseptörlere bağlandığında bu hücreleri baskılar. Gebelerde immun toleransı sağlar. Trofoblastlarda yoğun olarak bulunur (238). HLA-G5 (çözünür formda HLA) IL-10 stimülasyonu sonrasında MSC'lerce üretilir. NK ve (CD8+)T hücre inhibisyonu, Treg hücre indüksiyonu ve Th2 yönüne değişim yolu ile immunsüpresyon yapar (242).

5. TGF-β1

P53 genini süprese ederek apoptozisi hızlandırır ve proliferasyonu inhibe eder. Bu yol ile immun sistem hücrelerine etki yapar. Makrofaj ve lenfositlerden inflamatuar sitokinlerin salınımını engeller (238).

6. INF- γ

Varlığı ile IDO üretimini arttırarak antiinflamatuar etki gösterir.

7. IL-1β

Kemik iliği kökenli MSC'ler ile monosit hücreleri arasında inhibisyon mekanizmasında rol alır (228).

8. IL-10

İmmunsüpresif sitokindir. IL-2, INF- γ, IL-12, TNF-α üretimini inhibe eder. MHC I ekspresyonunu baskılar. İmmun cevabın baskılanmasından sorumludur.

9. M-CSF (Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör)

Çözünür faktörler ve M-CSF'nin etkileşim içerisine girerek dendritik hücre diferansiyasyonunu inhibe ettiği düşünülmektedir (73).

10. Hepatosit Büyüme Faktörü (HPG)

Multifonksiyonel bir sitokindir. Hücre büyümesi, morfogenez, hücre mobilizasyonu ve anjiyogenezde rol oynar. Hepatositlerden salınan HPG'nin otoimmun ansefalit deney hayvan modelinde, Treg hücreler dışında inflamatuar hücre sayısını azalttığı, T hücre apopitozisini uyardığı ve dendritik hücre kontrolünde rol oynadığı gösterilmiştir (243, 244).

4.6.4. ADAS (Yağ Dokusu Kökenli Mezenkimal Kök Hücre)

Yağ dokusu embriyonik mezodermden köken alır. Yağ dokusunun iskeleti mekanik hasardan korumak, canlıyı soğuktan korunmak, stres durumu için yağ depolamak olmak üzere önemli işlevleri vardır. Bir endokrin organdır. Fonksiyonel hücresinin adı adipositttir. Leptin ve adiponektin salgılar. Adiposit dokunun % 90 ı adipositlerdir. ADAS multipotent özellikte bir kök hücredir. Uygun kültür ortamında kas kemik kıkırdak yağ dokuya dönüşebilir. İlk defa Zuk ve arkadaşları tarafından 2001 (29) yılında yağ dokunun kök hücre kaynağı olduğu gösterilmiştir (245, 246).

Yağ dokusu çok çeşitli hücre içerir.

1. Yağ dokusu kökenli kök hücre (ADAS)
2. Preadipositler, adipositler
3. Endoteliyal hücreler
4. Damardan köken alan perisitler
5. Fibroblastlar
6. Hematopoietik seri hücreleri

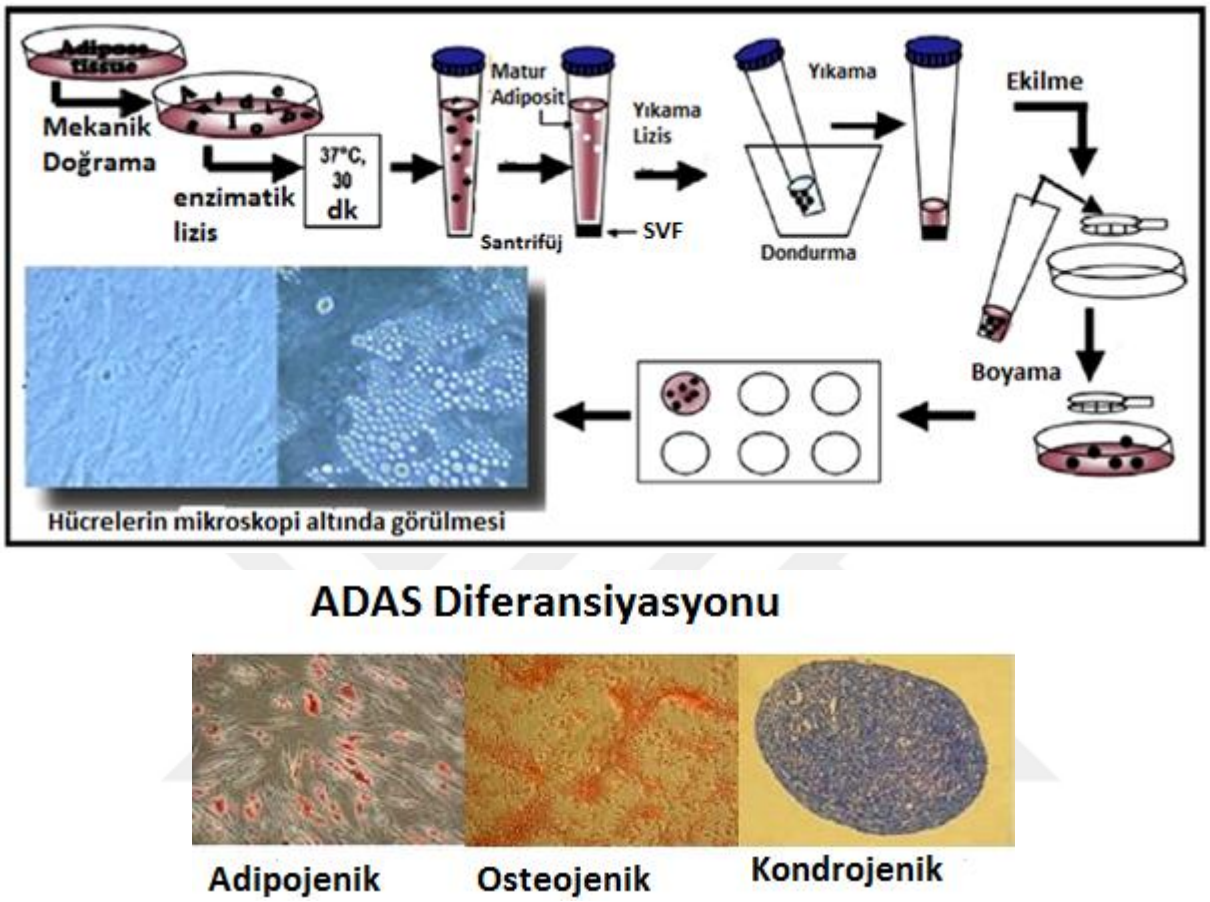
4.6.4.1. ADAS Elde Edilmesi

Subkutan yağ dokusu ve omental yağdan elde edilebilir. Örnek alırken çok sayıda kök hücre içermesi minimal invaziv bir yöntemle alınması amaçlanır. Kemik iliğinde total mononükleer hücreler içerisinde MSC'lerin frekansı düşüktür (0.001-0.01). ADAS frekansı yağ dokuda 500 kat daha fazla olduğu gibi eldesi kolay ve risk azdır (42). Liposakşın yöntemi ile elde edilen lipoaspirat incelendiğinde adipositlerin %98-%100 canlı olduğu tespit edilmiştir. Liposakşın kök hücre eldesi için yağ doku eldesi yöntemi olarak güvenli, risksiz ve tolere edilebilir bir yoldur. 300 ml. lipoaspirat $1x10^7$-$6x10^8$ ADAS aralığında >% 90 canlı kök hücre bulundur (247, 248).

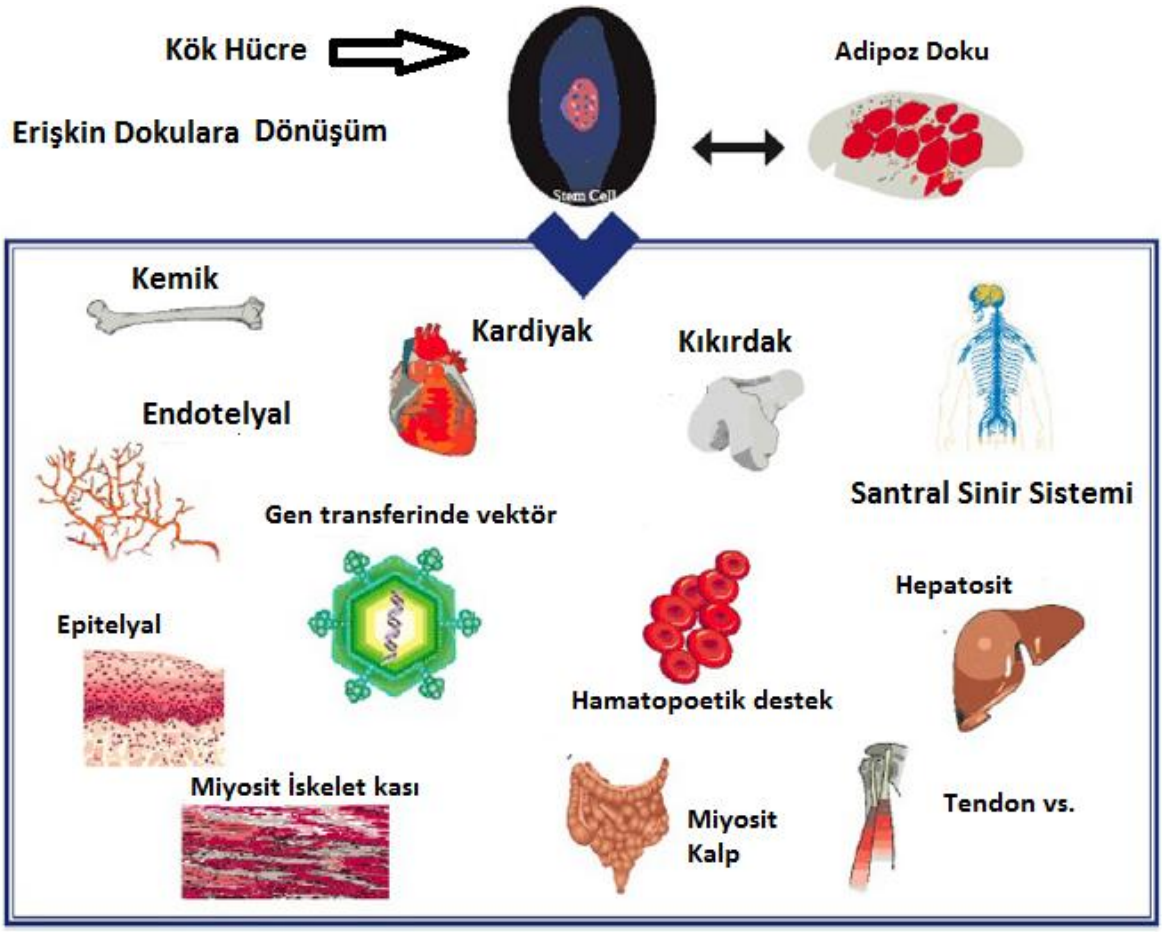
4.6.4.2. ADAS İzolasyonu ve Diferansiyasyonu

Elde edilen yağ dokusu enzimatik parçalama öncesinde parçalara ayrılır, yıkanır, Yüzen adipoz dokusu ayırt edilir. Takiben ekstrasellüler matriksten ayrılması istenen yağ dokuya kollajenaz enzimi ile işlem yapılır. Daha sonra filtre edilip santrifüj yapılır. Ortaya çıkan görüntüde çökmüş olan yapı stromal vasküler fraksiyon (SVF)'dur. SVF ADAS'ları içeren yapıdır. SVF içerisinde düz kas hücreleri, endotel hücreleri, perisitler, fibroblastlar, lökositler, Hematopoietik hücreler, endoteliyal progenitör hücreler vardır. Daha sonra SVF'den enzimatik parçalanma ve santrifüj yöntemleri ile ADAS'lar diğer hücrelerden

ayrılarak uygun kültür ortamına aktarılır. ADAS'lar kök hücreye spesifik antikorlar ile seçilir ve diferansiyasyon yetenekleri test edilerek elde edilmiş oldukları ispatlanır. Sonrasında kullanıma geçilir (247, 248) (Şekil 38-39).



Şekil 38: ADAS Eldesi ve Diferansiyasyonu (248)



Şekil 39: ADAS uygun mikroçevrede çeşitli dokulara diferansiyasyon (248)

4.6.4.3. ADAS Özellikleri ve Kullanım

Kolay elde edilebilir ve az miktarda dokudan çok sayıda üretilebilir olması avantajdır. Endotele yapışabilmesi ve orada Endoteliyal hücrelere dönüşebilmesi nedeniyle damar stabilizasyon ve onarımında vasküler frame ile beraber kullanılabilir. Uzamış kültür süresinin diferansiyasyon ve proliferasyonu olumsuz etkisi düşünüldüğünde, ADAS kemik iliği kökenli MSC ye göre daha avantajlı görünmektedir (40, 249).

Kemik iliğinde MSC frekansı total mononükleer hücrelere göre %0.001-%0.01'dir. Adipoz dokuda 500 kat daha fazla yoğunluktadır. Kemik iliğinden doku eldesi ağrılı ve zordur. Komplikasyon riski adipoz dokuya göre daha fazladır. Elde edilmesi daha uzun süre almaktadır. Bu nedenlerle kullanımda ADAS bir alternatiftir (42).

ADAS tarafından salgılanan VEGF, HGF, TGF anjiyogenez ve yara iyileşmesinde; IL-10, PGE2 immun modülatuar süpresif etkilerde; G-MSF, IL-6, -7, -8, -11 ve TNF-α gibi proinflamatuar faktörlerle debrisin makrofajlar üzerinden uzaklaştırılmasında etkilidir.

Kültürde salgılanan ADAS faktörleri Endoteliyal hücre migrasyonu, tüp formasyonu ve anjiyogenezi arttırmaktadır. İn vitro ADAS tarafından sekrete edilen faktörler hücresel apopitotik, fibrotik ve hipertrofik belirteçleri azaltır (246).

ADAS kronik inflamatuar hastalıklarda (250), hematolojik kök hücre transplantasyonlarda, GVHD tedavisinde (251), VCA (252) ve solid organ transplantasyonlarında (253) tolerans indüksiyonunda deneysel aşamada kullanılmaktadır. ADAS tarafından salgılan faktörlerin böbrek hasarı, geçici iskemik atak ve inmede (254), miyokard enfarktüsünde (255), periferik sinir iyileşmesinde (256) ve spinal kord yaralanmasında (257) rejeneratif etkileri deneysel çalışmalarda gösterilmiştir.

4.6.4.4. ADAS İmmun Modülatuar Özellikleri ve Mekanizması

ADAS salgıladığı faktörler etkisi ile periferik kan hücreleri ve lenfositleri etkileyerek doza bağlı immun modülasyon ve lenfosit proliferasyon inhibisyon yapmaktadır (258). ADAS MLR'da alloreaktiviteyi provoke etmemekte ve mitojenle stimüle edilen lenfosit proliferasyonunu inhibe etmektedir (259). ADAS'lar immunsüpresif etkilerini hücre-hücre temasıyla yani kontakt faktörler aracılığı ile ve çözünür faktörler ile yani PGE2, IDO, Lösemi inhibitör faktör ve IL-6 bağımlı mekanizmalarla gerçekleşir (260).

ADAS'ların ve kemik iliği kökenli MSC'lerin TNF-α ve INF-γ gibi proinflamatuar faktörler ve aktive T hücre varlığında PGE2 ve IDO salınımı artar. ADAS'ların bu çözünür faktörler üzerinden immunsüpresif etkileri vardır (261, 262). ADAS'lar TGF-β, PGE2, IDO, IL-6, IL-2 üzerinden immun modülasyon, T hücre proliferasyon inhibisyonu yapar (263).

ADAS 13 pasajdan yapıldığında SLE hastalarında IL-17 miktarını azaltıp süpresif etki yaparken, sekizinci pasaja çıktığında IL-17 değerini arttırarak proinflamatuar olabilir. Etki uzatılmış pasajlardan bağımsız değildir. ADAS L-arginini metabolize ederek, T hücre proliferasyonunu süprese etmektedir. Galaktin salgılayarak T hücre ölümünü stimüle etmektedir (246, 263, 264).

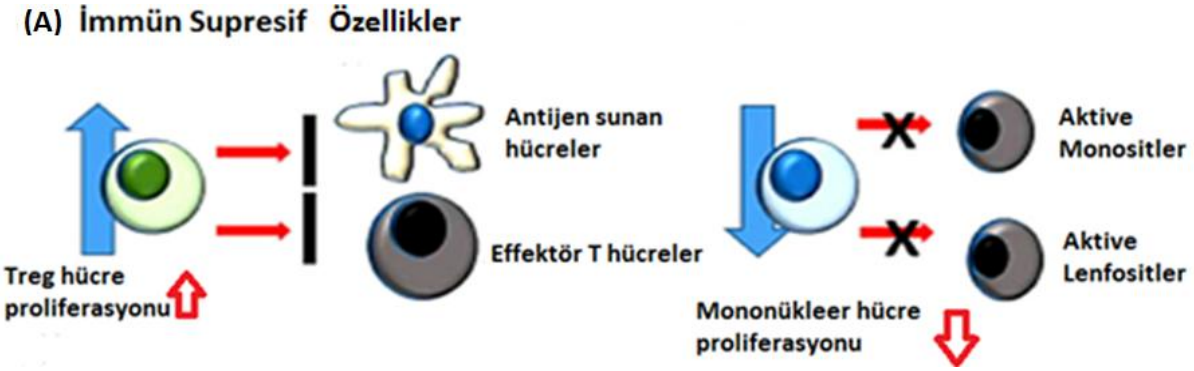
4.6.4.5. MSC- ADAS İmmun modülatuar Özellikleri Karşılaştırma

Bir MSC olan ADAS'ların sitokinler ve trofik faktörler üzerinden immun modülatuar etkileri önemlidir. Bir çok çalışmada çeşitli dokulardan elde edilmiş MSC'lerin ve yağ dokudan elde edilmiş bir MSC olan ADAS'ların immun modülatuar etkilerindeki benzerlik gösterilmiştir (265). İnsan kemik iliği kökenli MSC ve ADAS karşılaştırıldığında aktive T hücrelerden salgılanan TNF-α ve IFN-γ üzerinden IDO salınımı artmış ve T hücre proliferasyonu inhibe

olmuştur. Mitojenle indüklenen T hücre proliferasyonu üzerinde Warton jelinden, umbilikal korddan ve yağ dokudan elde edilen MSC'ler (ADAS) ve kemik iliği kökenli MCS'ler aynı şekilde inhibitör etki göstermiştir (232).

İnsandan elde edilen ADAS ve kemik iliği kökenli MSC karşılaştırıldığında yüzey belirteçleri arasında bir fark gözlenmemiştir. ADAS hücrelerinde farklı olarak endoteliyal diferansiyasyon gözlenmiştir. Mikst lenfoid reaksiyon (MLR) çalışmasında inhibisyon potensleri aynı bulunmuştur. T lenfosit proliferasyonunu aynı şekilde inhibe etmişlerdir. TGF-β, HFG ve IL-10 salınımları aynı bulunmuştur. Hücresel mesafe açıldığında etkide bir gerileme gözlenmemiştir. Dolayısıyla çözünür faktörlerin inhibitör etkisi ön planda gözlemlenmiştir (265). ADAS'lar IL-6 bağımlı bir mekanizma ile dendritik hücre diferansiyasyonunu inhibe eder, matür dendritik hücreler üzerindeki MHC II CD40 ve CD86 ekspresyonunu (kostimülatuar moleküller) baskılar. ADAS PMNL'ler baskılanmasında, dendritik hücre proliferasyonu inhibisyonunda daha potent ve sitokin salınım konsantrasyonu daha yüksek gösterilmiştir (266). İnsan amniyotik membranından elde edilen epiteliyal ve mezenkimal kök hücrelerle, yağ dokudan elde edilen ADAS'ların doza bağlı immunsüpresif etkisi aynı bulunmuştur. ADAS'ların kemik iliği kökenli MSC'ye alternatif olarak immun modülasyonda kullanılması önerilmiştir (258).

ADAS kemik iliği kökenli MSC gibi alloimmun yanıtı ve T hücre proliferasyonunu inhibe eder. İmmun sistem ve immun sistem hücreleri üzerine immun modülatuar etkisi in vitro çalışmalarda benzer bulunmuştur. Bütün bu bulgular eşliğinde ADAS'ların kemik iliği kökenli MSC ye alternatif olarak kullanılabileceği konusunu gündeme gelmiştir.



(B) Yüzey Markerları	ADAS	MSC
CD34	±	–
CD45	–	–
CD13	++	++
CD73	++	++
CD90	++	++
CD105	++	++
CD10	++	±
CD36	+	–
CD106	±	+
CFU-F	>%5	>%5

Şekil 41: ADAS yüzey belirteçleri ve immunsüpresif özellikleri (246)

4.6.5. MSC İmmunolojik Özellikleri

Undiferansiye MSC'ler düşük derecede HLA I taşırken, HLA II ve kostimülatuar moleküller taşımaz. Mevcut özelliklerle alloreaktif T hücre reaksiyonunu tetiklemesi gerekirken yapılan in vitro çalışmalarda diferansiye veya undiferansiye MSC'lerde MHC II ekspresyonu gelişmediği veya INF-γ varlığında az miktarda (%10) geliştiği, MSC'ye yönelik allojenik T hücre yanıtı gelişmediği gösterilmiştir. Bu durum allojenik kökenli kök hücrelerin immun modülasyonda kullanılabileceğini göstermiştir (260, 267, 268). İnsan kökenli undiferansiye ve osteojenik diferansiye ADAS'ların ve kemik iliği kökenli MSC'lerin zenojenik transplantasyonlarda kullanılabileceği gösterilmiştir (260, 269, 270).

MSC'ler taze elde edilmiş NK hücrelerince lizise uğramaz. IL-2 ile stimüle edilmiş NK hücreler, IL-15 ile aktive olmuş NK hücreler MSC lizisine yol açabilmektedir. Fakat ortama INF-γ eklendiğinde MSC'ler aktive NK hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir. MSC'ler IL-2 salınımını baskılayarak IL-2 ile indüklenmiş NK proliferasyonunu inhibe etmektedir. NK ve MSC'ler arasındaki etkileşim önemli araştırma konusudur (30, 271, 272).

Embriyonik kök hücre çalışmalarında embriyonik kök hücre üzerinde düşük miktarda MHC I molekülü bulunduğu diferansiyasyon ile in vitro ve in vivo bu MHC molekülünün arttığı gösterilmiştir. INF-γ tedavisi MHC I ekspresyonunu attırmaktadır. MHC II yokluğu ve MHC I ekspresyonundaki artış Tc hücrelerin sitotoksik aktivitesini embriyonik kök hücrelere yöneltebilir. INF-γ'nın NK hücrelerinin sitotoksik aktivitesini transplante edilen embriyonik kök hücrelere yöneltebileceği düşünülmüştür (273).

Kök hücre kullanımına karşı bariyerler:

1. Kök hücrelerin immun defisit halinde teratojenik etkileri ve etik bariyerler (274)

2. Kök hücrelerin elde edilmesi, pasaj sayısı ve beraberinde kullanılan immun tolerans stratejisi (37, 275)

3. Kök hücrelerin immunojenik özellikleri (273)

4. Kök hücrelerin veriliş zamanlaması ve dozajı (31, 258)

VCA protokollerinde hayvan deneyler modellerinde $5x10^5$-$5x10^7$ hücre/kg olarak uygulanmaktadır ve üç pasajdan ileri pasajlar kullanılmamaktadır (37).

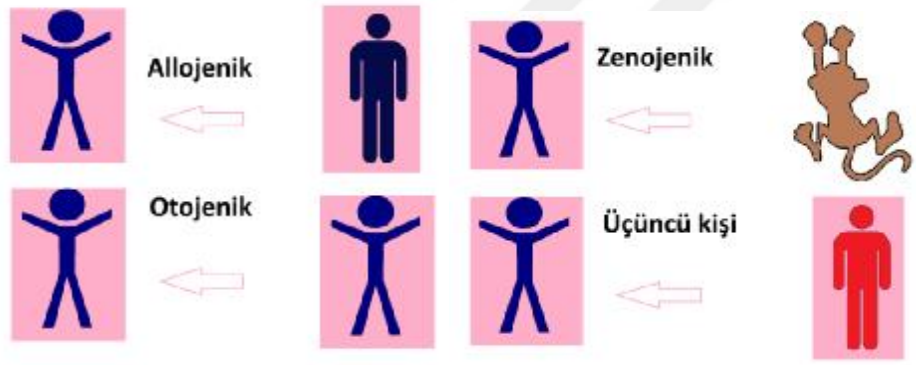
4.6.6. MSC ve ADAS'ların İn-vivo İmmun modülatuar Özellikler

İn vitro ve in vivo ADAS ve MSC'lerin immunsüpresif etkilerinin ortaya konmasıyla ADAS ve MSC'ler organ transplantasyonları (276) ve kompozit doku nakillerinde çeşitli hayvan deney modellerinde (39) donör spesifik immun tolerans oluşturmak amacıyla kullanılmıştır. Tolerans indüksiyonu ve allogreft rejeksiyon süresinde uzama, GVHD baskılama beklentisi ile immun modülasyon yöntemi olarak alloimmun yanıtı baskılama amaçlı in vivo hayvan deney modellerinde halen kullanılmaktadır (Şekil43). Donör kökenli MSC uygulamasının kardiyak allogreft yaşam süresini uzattığı bildirilmiştir (277). ADAS böbrek allotransplantasyonlarında hayvan deneylerinde kullanılmış ve akut rejeksiyon atağını önlediği gösterilmiştir (278).

Bartholomev ve arkadaşları tarafından immunsüpresif kullanılmadan allojenik tam kat deri grefti transferi yapılan maymunlarda, IV allojenik kemik iliği kökenli MSC tedavisi kullanılmış, allogreft sağkalımında uzama belirtilmiştir (279). Fakat kemik iliği kökenli MSC tedavisinin immunojenik olduğu ve siklosporin tedavisi almayan immun fonksiyonları sağlam sıçanlarda deri allogreft rejeksiyonunu hiçbir tedavi almayan kontrol grubuna kıyasla tetiklediği ve immunojenik olduğu, siklosporin tedavisi ile allogreft yaşam süresini uzattığı yönünde yayınlarda vardır (280).

Sıçanlarda non myeloablatif tedavi allojenik kemik iliği kökenli MSC tedavisi ve allojenik hematopoietik kök hücre transplantayonu ile GVHD olmadan mikst kimerizm oluştuğu gösterilmiştir (20).

Sıçanlarda ADAS'lar 2x 10^6 olacak şekilde 7. 14. ve 21. günlerde uygulanmıştır. ADAS'lar geçici immunsüpresif tedavi ile immun modülatuar oluşturup allogreft yaşam süresini uzatmıştır (43). Sıçanlarda yapılan arka bacak transplantasyonunda, tiletamine ve zolazepam altında donör ADAS peroperatif ve operasyonu takiben 4 gün boyunca, 1x 10^5 olacak şekilde, 4 doz olarak IV verilmiş. Transplante edilen arka bacak allorejeksiyonu tedavi alan grupta 12.0 ± 3.7 gün, tedavi almayan grupta ortalama 6.8 ± 1.4 günde gerçekleşmiştir. Arka bacak naklinde ADAS tedavisi almayan gruba göre alan grupta allogreft yaşam süresinde anlamlı uzama gözlenmiştir MSC uygulamaları otolog, allojenik veya üçüncü allojenik vericiden veya zenojenik olmak üzere uygulanabilmektedir (Şekil 42).



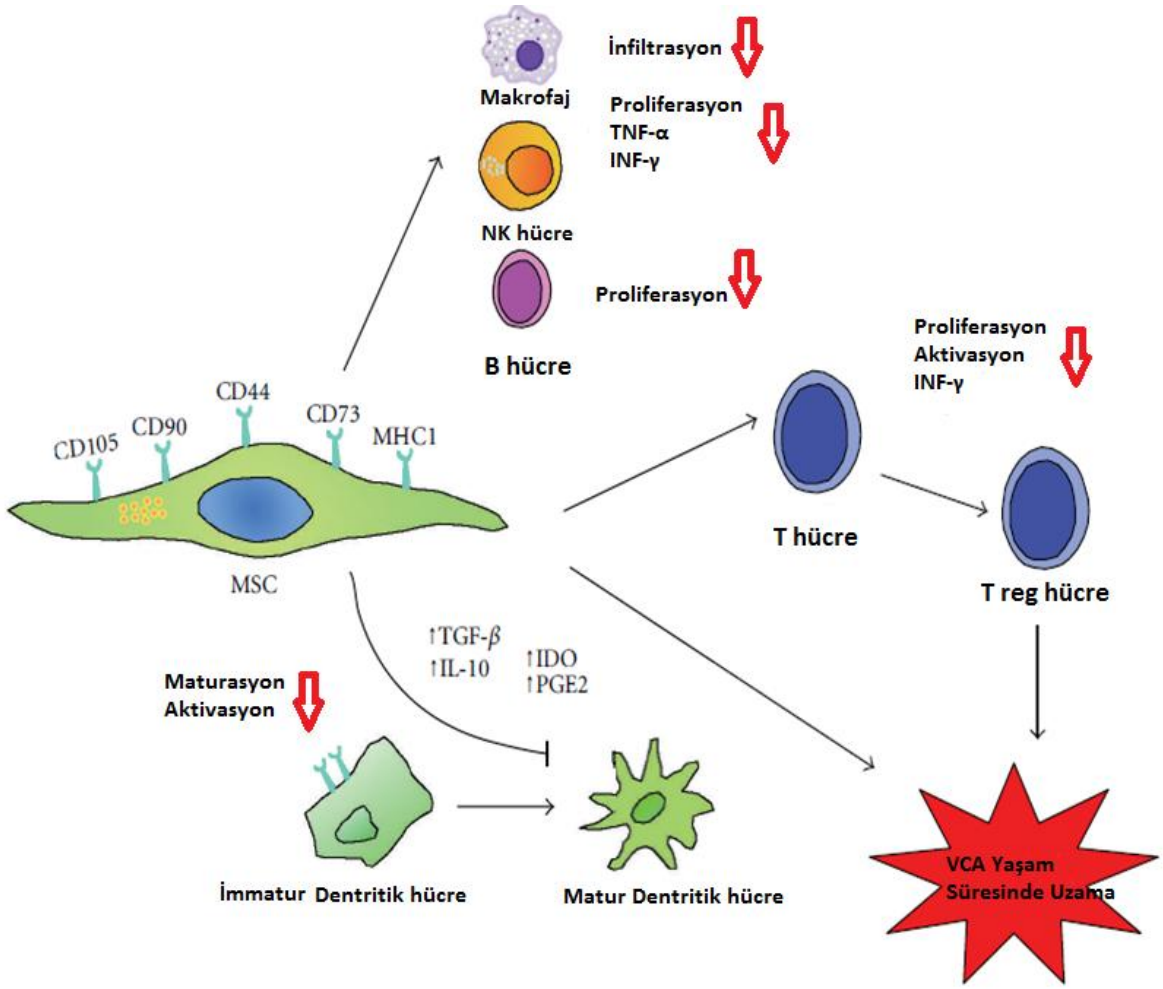
Şekil 42: Genetik orijinine göre MSC uygulaması

MSC allojenik kullanımla ilgili tolerans indüksiyonu yaptığı ve allogreft yaşam süresini uzattığını gösteren çalışmaları olduğu gibi allojenik MSC'lerin immunojenik olduğu yönünde yayınlar da vardır (281).

MSC'lerin MHC II ekspresyonunun olmaması zenojenik bir mikroçevrede de yaşayıp fonksiyon gösterebileceği fikrini düşündürtmüştür. Saite ve arkadaşları erişkin sıçanlara enjekte ettiği kemik iliği kökenli fare MSC'leri sonrasında koroner arter ligasyonu yaptığında 12 hafta sonra sıçanda kemik iliğinde miyorkardiyal enfarktüs olmadan veya olarak fareye ait kök hücre ekilmesini ve dolaşımda fareye ait hücreleri bulmuştur (282). Fakat aynı deney insan kökenli ADAS'lar kullanıldığında başarısız olmuştur (283). Bu durum insan kökenli MSC'ler ile fare kökenli MSC'ler arasında farklı immunolojik özellikler olduğunu düşündürtmüştür. Fakat insana ait ADAS'lar kullanılarak hayvanlarda yapılan zenojenik

ADAS transferi ile serebral iskemi (284) ve müsküler distrofi (285) modellerinde olumlu sonuçlar gösterilmesi ile MSC'lerde MHC II ekspresyonunun olmamasının bir avantaj olduğu ve zenojenik transplantasyonlarda deneysel çalışmalarda kullanılabileceği düşünülmüştür. Son yapılan bir çalışmada undiferansiye ve ostejenik diferansiye zenojenik ADAS ve kemik iliği kökenli MSC SC enjeksiyonu sonrasında undiferansiye MSC ve ADAS hücrelerinin sekiz hafta boyunca yaşadığı, fakat osteojenik diferansiyasyon gösteren MSC ve ADAS'ların dört haftada elimine olduğu gösterilmiştir. Bu bulguyu ADAS ve MSC'lerin zenojenik transplantasyonda kullanılabileceği yönünde değerlendirmişlerdir (269). Non myeloablatif tedavi ile donör kemik iliği transplantasyonu ile insan kökenli ADAS farelerde allojenik deri grefti yaşam süresini uzatmıştır (286). Fakat allojenik uygulanan ADAS'lar için bile henüz çalışmalar yeni ve beraberinde bir çok tartışmayı getirirken ADAS'ların allojenik transplantasyonunun otolog transferine göre in vivo hayvan deneyleriyle değerlendirilmesi ilk aşamada daha iyi bir seçenek olarak görülebilir (260).

Embryonik kök hücrelerin ve MSC'lerin immun modülatuar tedavi olmadan kullanıldığında allogreft yaşam süresini uzatmadığı yönünde yayınlar vardır (287). ADAS halen tolerans indüksiyonu ve allogreft yaşam süresinde uzama beklentisi ile hayvan deneylerinde allojenik, zenojenik ve otojenik transplantasyon şeklinde kullanılmaya devam etmektedir.



Şekil 43: MCS Allografte Etkisi (39)

4.6.7. Doku Mühendisliği ve ADAS

4.6.7.1. Doku Mühendisliği

Konjenital anomali, travma veya kanser nedeni ile hasar görmüş hayati veya fonksiyonel doku ve organlar konvansiyonel yöntemlerle ve otolog dokularla tedavi edilemiyorsa organ veya doku allotransplantasyonu ilk tedavi seçeneğidir. Organ transplantasyonlarında immun rejeksiyon, allotransplante edilen doku ve organın yaşam süresinin kısa oluşu ve immunsüpresif tedavi gerekliliği ve immunsüpresif komplikasyonları önemli problemlerdir.

Hasar görmüş doku ve organların biyolojik eşdeğerlerinin in vitro geliştirilmesi ile rekonstrüksiyonu üzerine çalışan interdisipliner biyomühendislik alanı doku mühendisliğidir. Organ ve doku üretimi iddiası ile transplantasyona alternatif oluşturmaktadır (288). Doku mühendisliğinin Avrupa Komisyonu tarafından tanımlanması canlı ve rejeneratif kapasitesi olan hücrelerin ekstrasellüler sentetik veya biyolojik materyallerle desteklenerek biyolojik, fonksiyonel, eşdeğer doku veya organ oluşturulmasıdır. Doku mühendisliğinin amacı onarmak, yerine koymak ve rejenere etmektir. Yeni organ ve doku geliştirilmesi için rejeneratif kapasitesi olan kök hücreler, büyüme faktörleri ve üç boyutlu skafoldlar gereklidir. Bu üç bileşenin olmadığı tedaviler yalnızca kök hücre tedavileri olarak değerlendirilir. Kök hücrelerin desteklenmesi için kullanılan biyolojik ekstrasellüler matrikslere skafold denir. Skafoldların en önemli özellikleri hücre proliferasyonunu, hücre-hücre kontakt etkileşimini, migrasyon ve tutunmayı desteklemesi ve mevcut defekte doğru kök hücreleri yönlendirmesidir. Skafoldlar immunolojik değildirler. Hücrelerin çoğalması sırasında hücrelere yapısal destek sağlar. Skafoldlar kollajen, hyalüran, glikozaminoglikan, fibronektin, ipek, polietilen, polilaktin gibi sentetik veya doğal biyopolimerler içerebilir. İdeal skafoldlar dokuya özel ektrasellüler matriksten elde edilen üç boyutlu yapısal fonksiyonel moleküllerin karışımından oluşur. Diferansiyasyon ve proliferasyon yeteneği olan kök hücreler doku mühendisliğinde ana kaynaklardır. İstenilen dokunun veya organın organogenezini diferansiyasyonu ve proliferasyonu indükleyen büyüme faktörleri ve ideal üç boyutlu skafold mevcudiyetinde kök hücreler doku mühendisliği ve rejeneratif tıp açısından umut vermektedir. Günümüzde deri, kıkırdak ve kemik üretimi yapılabilmektedir (289, 290).

4.6.7.2. Üç boyutlu Biyoyazıcı Yöntemi

Kök hücre, büyüme faktörleri ve skafoldların aslına uygun şekilde üç boyutlu hassas dağılımı ile fonksiyonel doku ve organların oluşturulması için uygulanan bir fabrikasyon teknolojisidir. Cilt, damar, nöral doku, iskelet kası, yağ doku, kıkırdak ve kemik üretimleri ile rejeneratif tıpta son yıllarda etkinlik kazanmıştır. Yüksek çözünürlükte hücre birikimi,

kontrollü hücre dağılımı, vaskülarizasyon, inervasyon gibi güçlükler üç boyutlu oluşturulmak istenen doku veya organ için üzerinde çalışmalar için sınırlayıcı faktörlerdir (291).

4.6.7.3. Deri Doku Mühendisliği

Kollajen hiyolüronik asit çeşitli sentetik polimerlerden elde edilmiş bir skafold üzerine ekilmiş çeşitli deri hücreleri (fibroblast, kerotinosit,) ile oluşturulan doku mühendisliği ürünleri yara iyileşmesi, yanık ve kronik ülserlerde kullanılmaktadır.

Uygun özellikte skafoldlar kullanılarak ADAS'ların çeşitli immun modülatuar, anjiyojenik, antiapopitotik, antiskatrisiyel, antiinflamatuar özellikleri transplantasyon immunolojisinde de kullanıma girebilir. Kullanılacak olan canlı hücrenin in vivo etkileri açısından deneysel çalışmalar bu nedenle gerek skafoldlarla gerek sadece kök hücre tedavisi (ADAS) olarak devam etmektedir.

4.6.7.4. ADAS Lokal Uygulamada Etkileri

1. Yara iyileşmesi

Nonimmunolojik, anjiyojenik, antiapoptotik, rejeneratif, antiinflamatuar özellikleri ile yara iyileşmesine katkıda bulur. Lokal uygulanmış ADAS salgıladığı büyüme faktörleri etkisiyle, anjiyogenetik faktör artışını sağlar, anjiyogenezi hızlandırır, endoteliyal diferansiyasyon göstererek vasküler yapılara dönüşür, neovaskülarizasyonu uyarır (PDGF, VEGF, HGF, FGF-2). Epitelizasyonu ve epiteliyal stabiliteyi artırır (EGF). İskemik hasarı azaltır. Granülasyon dokusu oluşmasını hızlandırır. Antiinflamatuar etki gösterir (TGFβ). Yara kapanmasını hızlandırır. Domuzlarda lokal uygulanmış ADAS'ların tam kat deri grefti iyileşmesinde iskemiyi azalttığı epidermal iyileşmeyi hızlandırdığı gösterilmiştir (292-296). Sıçanlarda skafold kullanılarak uygulanan ADAS'lar otolog deri grefti uygulamasında mikrodamarlanmayı ve kollajen artışını arttırmıştır (297).

2. İmmunolojik

Allojenik kök hücre ekilmiş özel skafold ve siklosporin uygulaması ile 8x8 mm boyutundaki deri allogreftine yönelik inflamatuar reaksiyonun baskılandığı gösterilmiştir (298).

5. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (DEÜTF) Deney Hayvanları araştırmaları etik kuruluna tez projesi sunuldu ve etik kurul onayı alındı. DEÜTF BAP kuruluna yapılan başvurunun onaylanmasının ardından deney için malzeme alımları yapıldı. Deneyin her basamağında ülkemizde yürürlükte olan hayvan refahı yasası göz önüne alınarak hareket edildi.

5.1. Gereçler

5.1.1. Deney Hayvanları

Lewis, inbred özellikte, 21 adet erkek sıçan; Brown Norway, inbred özellikte, 14 adet erkek sıçan, ortalama altı, sekiz haftalık, 150-200 gr olarak Kobay Deney Hayvanları Limited Şirketi yolu ile Charles River Deney Hayvanları Laboratuarı ABD'den ithal edilmiştir. Deney hayvanları mikrobiyolojik testleri yapılmış onaylanmış, patojenden arındırılmış, sağ ve sağlıklı olarak altı haftalık olarak veteriner hekimden teslim alınmıştır. Teslim alınan deney hayvanları DEÜTF Deney hayvanları bölümüne deney öncesinde bakım, karantina ve sağaltım açısından yerleştirilmiştir. Günlük kilo alımları, genel durumları, cerrahi öncesinde takip edilmiştir. Takiplerde komplikasyon, enfeksiyon görülmemiş, düzenli kilo alınımı gözlenmiş, komplikasyon gelişmemiştir. 8-12 haftalık, 300-350 gr. aralığına ulaşan denekler ile deney aşamasına geçilmiştir.

5.1.1.1. Deney Hayvanların Genetik Özellikleri

Hayvanlar genetik olarak tanımlanıp tanımlanmamalarına göre ikiye ayrılırlar. Genetik olarak tanımlanmamış soylar 'outbred' olarak tanımlanır. Outbred soylar hayvanların genetik özelliklerinin önemli olmadığı çalışmalarda kullanılmaktadır. İnbred soylar ise izogenetik yani genetik olarak tanımlanmış soylardır. Bu soylar genellikle genetik homojenitenin önemli olduğu immunolojik deneylerde kullanılmaktadır.

5.1.1.2. İnbred Hayvan

Bir ana babadan doğan yavrular çiftleştirilerek yapılan üretim şeklidir. Bu üretimin amacı genetik heterojeniteyi azaltıp homojeniteyi artırarak genetik değişkenliği immunolojik deneylerde en aza indirgemektir. İnbred soylar, yirmi ve daha fazla ardışık jenerasyon erkek ve dişi kardeşlerin çiftleştirilmesiyle elde edilir. Yirmi veya daha fazla jenerasyon boyunca tüm yavrular tek bir atasal çifte kadar geri izlenebilir. Bu şekilde inbred üretilen soylar izogenik (genetik olarak tanımlanmış) soylar olarak tanımlanır. Soylar fenotipik olarak tek tip olma eğilimindedirler. Bu soylar bir çok jenerasyon boyunca stabil olarak kalırlar ve önemli

bir kısmı genotiplendirilmiş durumdadır. Her soy için köken, geçmiş, genotipik ve fenotipik bilgiler mevcuttur. En sık kullanılan yöntem erkek ve kız kardeşlerin ya da ana veya baba ile yavrusunun çiftleştirilmesidir.

Projemizde kullanılacak sıçan suşları immunolojik bir deneyde kullanıldığı için alıcı ve verici gruplarda genetik homojenitenin oluşması için aynı genetik özellikte, yani inbred yetiştirilmiş sıçan suşlarından seçilmiştir. Yapılan transplantasyonun 'allotransplantasyon' olarak kabul edilmesi ve sonuçların değerlendirilmesi aşamasında projenin anlamlı olması için aynı türe ait, ayrı genetik özellikte olan iki ayrı inbred sıçan türünde 'transplantasyon' yapılması gerekmektedir. Deneyimizde bu nedenle inbred iki ayrı suş kullanılmıştır. DEÜTF deney hayvanlarında konvansiyonel şekilde barındırılmıştır. İki hayvan için bir adet kafes kullanımı yapılmıştır. Günlük ortalama 15-25 gr. besin ve 30-45 ml. su alımları sağlanacak standart şekilde beslenmiştir.

5.1.1.3. Deney Grupları (Şekil 44)

Kontrol grubu: Otogreft ve allogreft kontrol grupları

1. Otogreft: Lewis sıçan (7 adet)

2. Allogreft: Lewis sıçan (7 adet)

Donör olarak; Grup III ve Grup III'ten alınan deri allografti kullanılmıştır.

ADAS tedavisi uygulanmamıştır.

Deney grubu: Allogreft ve tedavi grupları

1. Allogreft: Brown Norway sıçan alıcı (7 adet)

2. Donör olarak; Grup II ve Grup II'den alınan deri allografti kullanılmıştır.

3. Tedavi: SC ADAS (Grup II'den alınan yağ greftinden elde edilen ADAS kullanılmıştır.)

4. Allogreft tedavi: Brown Norway sıçan alıcı (7 adet)

5. Donör olarak; Grup V, Grup V'ten alınan deri allografti kullanılmıştır.

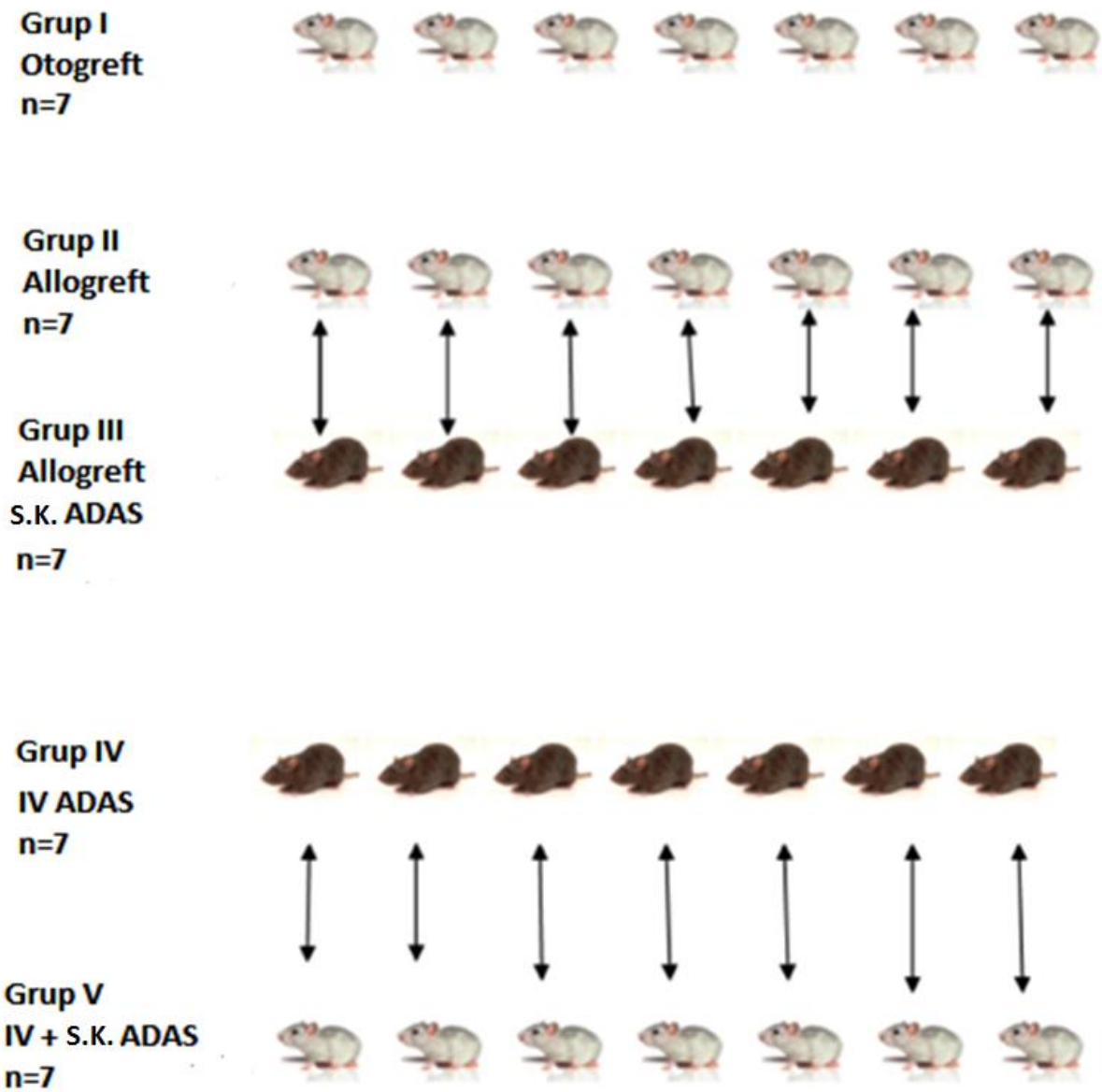
6. Tedavi: IV ADAS (Grup V'ten alınan yağ greftinden elde edilen ADAS kullanılmıştır.)

7. Allogreft tedavi: Lewis sıçan alıcı (7 adet)

Donör olarak Grup IV, Grup IV'ten alınan deri allografti kullanılmıştır.

Tedavi: IV ve SC ADAS (Grup IV ten alınan yağ greftinden elde edilen ADAS kullanılmıştır.)

II-III, IV-V. gruplarda mevcut denekler alıcı ve donör olarak çaprazlanarak aynı anda iki denekte greft cerrahisi uygulanarak allogreft yerleştirme işlemi yapılmıştır. Allogreft uygulaması aşağıda şematize edilmiştir.



Şekil 44: Deney şematik gösterimi (Ok işaretleri yerleştirilen allogreftlerin alıcı ve verici olarak çaprazlanmasını göstermektedir)

5.1.2. Deneyde Kullanılan Laboratuarlar ve Olanaklar

Tablo 12: Deneyde kullanılan laboratuarlar ve olanaklar

DEÜTF, Histoloji Embriyoloji AD/İZMİR	Mikrotom Kameralı Mikroskop Faz kontrast Mikroskobu Monoküler ve Binoküler Mikroskop Işık Mikroskobu (Olympus dp70) Dijital kamera (Olympus dp71) Bilgisayarlı analiz sistemi (Imagetool Analiz Programı)
DEÜTF, İBG (İzmir Biyotıp ve Genom Enstitüsü) /İZMİR	Faz-kontrast inverted mikroskobu (Nikon LWD O.52) Roller (Labnet Labroller-II) Hibridizasyon Fırını (Atto AB-1950) CO2li İnkübatör (Thermo Scientific Steri Cycle) Laminar kabinet (Thermo Scientific MSC Advantage) Hücre Kültürü Santrifüjü (Hettich Zentrifugen Rotanta 460R) Hücre Kültürü Su Banyosu (Nüve Nb9) 80 Soğutucu (Thermo Scientific Forma 700 series) PH metre (Hanna instruments Microprossesor) Fluoresans mikroskobu (Nicon Y-FL) İnverted Floresans Mikroskobu (Olympus) Sıvı Azot Hücre Saklama Tankı (Thermo Scientific 8031) Santrifüj (Hettichzentrifugenmicro 200R) Soğutmalı Santrifüj (Eppendorf 5415R)
DEÜTF Deney Hayvanları Bilimi	Kafes içerisinde hayvan barındırma ve bakım alanı (konvansiyonel) Hayvan cerrahisi için cerrahi ameliyathane ve cerrahi donanım

5.1.3. Deneyde Kullanılan Malzemeler

Cerrahi işlemler için gerekli **cerrahi set temini** kimlik karşılığında DEÜTF hastanesinden alınmıştır.

Cerrahide Kullanılan Sütür Materyalleri:

- **Poliglaktin 910** sütür materyali
- **Poliglaktin 910** sütür materyali
- **İpek** sütür materyali

Tie-over Uygulaması: Bactigras™ ve Steril pamuk

Pansuman Esnasında Kullanılan Malzemeler: SF (serum fizyolojik), Batticon, Octanicept, 1/100 (%1) oranda sulandırılmış Savlon solüsyonu (klorheksidin glukonat ve setrimid içerir.)

Yağ grefti patolojik örnekleri **steril idrar kabında steril SF solüsyonu** içerisinde alındıktan sonra yarım saat içerisinde DEÜTF/İBG bölümüne teslim edilmiştir.

Patolojik örnekler için % 10'luk **formol solüsyonu** Histoloji Embriyoloji ABD dan aynı gün temin edilmiştir.

Deneyde Kullanılan Anestezi: Deney hayvanlarına IV enjeksiyonlar ve patoloji işlemleri sırasında **hafif eter anestezisi** uygulanmıştır. Yağ grefti alınması ve deri grefti cerrahisi esnasında **ketamin ve ksilazin** ile intraperitoneal genel anestezi sağlanmıştır (Fotoğraf 1).



Fotoğraf 1: Kullanılan Anestetikler: Ketamin: 80-100 mg/kg (Ketalar), Ksilazin: 5-10 mg/kg (Ksilazol)

5.2. YÖNTEM

5.2.1. Deney Cerrahi Akış Planı

Greft cerrahisi uygulanmadan önce ADAS hazırlanacak Grup II-IV-V'ten inguinal bölgeden alınan yağ grefti alınmıştır. Alınan yağ greftleri DEÜTF/İBG Bölümüne teslime edilmiştir.

Alınan yağ greftlerinden ADAS hazırlanma aşamasına geçilmiştir. Çalışmada kullanan ADAS'lar yağ dokudan ve olgun adipositlerden SVF olarak ayrıştırılmıştır. SVF içerisinden enzimatik yöntemlerle ayrılan kök hücreler hücre kültürüne alınmıştır. Yıldızsı uzantıları olan ve flaska yapışan kök hücreler görüntülenmiştir. Elde edilen kök hücrelerin görüntülenme aşamasını takiben flow/akış sitometri yöntemi ile kök hücreye spesifik antikorlarla belirlenen kök hücrelerin diferansiyasyon özellikleri değerlendirilmiştir. Hücreler, in vivo ortamda izlenebilmeleri için takip edilebilir lipofilik fluoresan boyayla (dil) işaretlenmiştir. Elde edilen ADAS'ların etkinliği ve karakterizasyonu bu yolla gösterilmiştir. ADAS eldesini takiben greft cerrahisi IV ve SC ADAS terapisi içeren deney aşamasına geçilmiştir.

5.2.2. ADAS eldesi için Yağ Grefti Alınması

Cerrahi prosedür öncesinde eter anestezisi altında, sıçanlarda dört gün önceden cerrahi alan tıraşlaması yapıldı. ADAS uygulaması yapılacak üç grup (Grup III-IV-V) için üç gruptan (Grup II-IV-V) inguinal bölgeden yağ grefti alındı.

Uygun oda sıcaklığı ve cerrahi alan sağlandıktan sonra, sıçan tartılarak uygun doz hesaplanıp, ketamin ksilazin ile intraperiyoneal GAA sıçanın önce Batticon daha sonra 1/100 (%1) oranda sulandırılmış Savlon solüsyonu ile iki defa tüm cerrahi alanı yıkandı. Yıkamayı takiben sıçan cerrahi sahaya alındı. Sol femoral bölgesinden daha önce tıraşlanmış olan alandan insizyon ile cilt ve cilt altı yapılar geçilerek inguinal bölge subkutan yağ dokusuna ulaşıldı. Subkutan yağ dokusu total olarak diseke edilip eksize edildikten sonra işlem 4.0 poliglaktin 910 ile primer sütür ile sonlandırıldı (Fotoğraf 2, 3, 4,5).

Elde edilen yağ doku steril idrar kabında ve steril SF içerisinde cerrahi sonrası 30 dk içerisinde DEÜTF İBG bölümüne uygun şekilde teslim edildi (Fotoğraf 6).

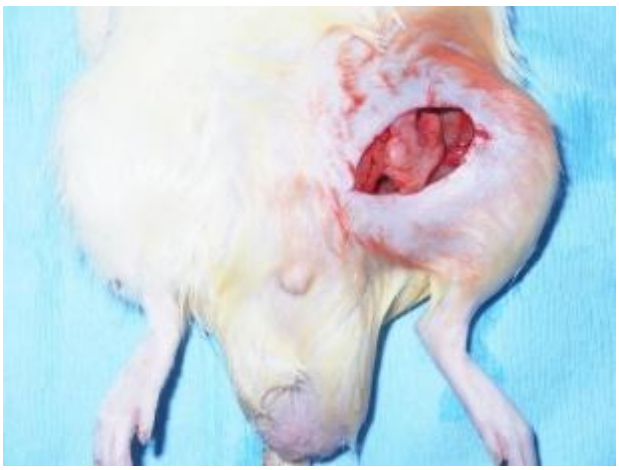


Fotoğraf 2: Yağ Grefti Eldesi İçin Yapılan Tıraşlama İşlemi



Fotoğraf 3: Yağ Grefti Eldesi İçin Yapılan İnsizyon





Fotoğraf 4: Yağ Grefti Eldesi



Brown Norway Sıçan



Lewis Sıçan

Fotoğraf 5: Yağ Grefti Eldesi Cerrahi Saha Yakın Çekim



Fotoğraf 6: Yağ grefti: Ortalama 1x1,5 cm büyüklüğünde yağ grefti görünümü

Postoperatif dönemde her gün Batticon ile pansuman uygulaması yapıldı. Sıçanlarda cerrahi yara yeri enfeksiyonu ve komplikasyon gözlenmedi (Fotoğraf 7).



Fotoğraf 7: Yağ Grefti Eldesi Sonrası Sütür Hattı



Fotoğraf 8: Postoperatif Işık Altında Bakım

5.2.3. ADAS İzolasyonu

Hazırlanması gereken solüsyonlar

PBS enzimatik parçalama öncesi yıkama tamponu: 1X PBS (Phosphate Buffer Saline) içine %1 Penicillin/Streptomycin (10,000 units/mL of penicillin ve 10,000 µg/mL of streptomycin) ile 2.5ug/ml amfoterisin eklenerek hazırlandı.

Tip 2 kollajenaz solüsyonu: Küçük parçalara ayrılan doku parçalarının hacminin yarısı kadar DMEM (hücre kültürü büyüme ortamı) içinde son konsantrasyon %0.2 olacak şekilde eklenen kollajenaz iyice çözündü, 0.45um filtreden süzüldü ve son konsantrasyonu %1 olacak şekilde pen/strep solüsyona eklendi.

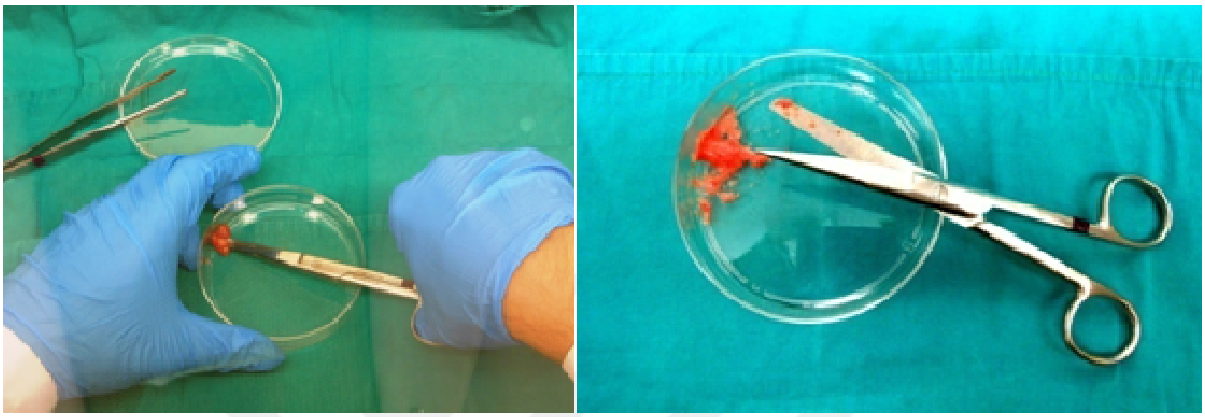
PBS enzimatik parçalama sonrası yıkama tamponu: 1X PBS içine %1 Penicillin/Streptomicin (10,000 units/mL of penicillin ve 10,000 µg/mL of streptomycin) ile 2.5ug/ml amfoterisin ve %2 FBS (Fetal Bovine Serum) eklenerek hazırlandı.

Kırmızı kan hücresi lizis tamponu: 2.06 g/L Tris Base, pH 7.2, 7.49 g/L NH_4Cl. Hazırlandıktan sonra steril olarak filtrelendi.

5.2.3.1. Rat Adipoz Dokudan Stromal-Vasküler Fraksiyonun (SVF) Elde Edilmesi

A. Yağ dokunun yıkanması ve küçük parçalara ayrılması

Kasıktan alınan yağ dokusu %1 Penisilin/Streptomisin (10,000 units/mL of penisillin ve 10,000 µg/mL of streptomisin), 2.5ug/ml amfoterisin içeren PBS ile birkaç kez yıkanarak kan ve diğer yapıların uzaklaştırılması sağlandı. Doku, steril doku makası ve penset yardımıyla küçük parçalara ayrıldı ve steril 50 ml'lik flakon tüp içine alındı (Fotoğraf 9).



Fotoğraf 9: Yağ Dokunun Küçük Parçalara Ayrılması

B. Enzimatik parçalama

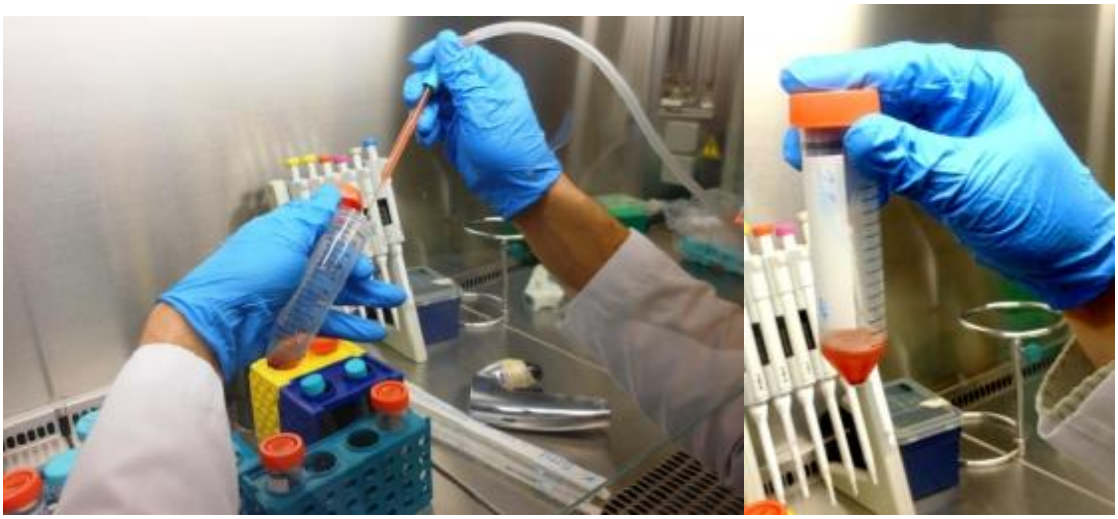
Küçük parçalara ayrılan doku hacminin yarısı kadar hacimde hazırlanan %0,2 Tip II kollajenaz solüsyonu ile, 37^{o}C'de yaklaşık iki saat çalkalamalı olarak inkübe edilerek enzimatik parçalama işlemi yapıldı. İnkübasyon sonunda %10 FBS eklenerek kollajenaz aktivitesi durduruldu.

C. SVF'nin olgun adiposit hücre ve dokulardan ayrılması

400xg de 10 dk. boyunca satrifüj yapılır (Şekil 45) (Fotoğraf 10).



Şekil 45: Enzimatik parçalama basamağı ardından SVF'nin olgun adiposit hücre ve dokulardan ayrılması amacıyla yapılan santrifüj sonrası elde edilen fraksiyonlar.



Fotoğraf 10: Deneyimizde SVF eldesi

5.2.3.2. ADAS'ların SVF'dan ayrılması

A. Eritrositlerin uzaklaştırılması

B. Hücre pelleti içindeki eritrositleri uzaklaştırmak için 20 ml kırmızı kan hücresi lizis tamponu eklendi ve oda sıcaklığında 10 dk. inkübe edildi. 300xg de 10 dk. santrifüj edildi.

Büyük hücre gruplarının ve enzimatik olarak parçalanmayan doku parçalarının eliminasyonu

Hücre pelleti 5 ml PBS ile resüspanse edildikten sonra 100 µm çaplı steril elekten (mesh) geçirildi. Ardından 40 µm çaplı steril elekten geçirildi. Bu işlem ile hücre dışındaki büyük yapılar elimine edildi (Fotoğraf 11).

Bu hücre süspansiyonuna hacmi kadar 1xPBS ile hazırlanan enzimatik parçalama sonrası yıkama tamponu eklendi ve 300xg de 10 dk. santrifüj edildi. Yıkama işlemi üç kez tekrarlandı.



Fotoğraf 11: Deneyimizde Elekten Geçirilme İşlemi

5.2.3.3. ADAS'ların Kültürü

Elde edilen hücreler, %10 FBS ve amfoterisin içeren DMEM/F12 hücre büyüme ve idame ortamı ile hücre kültürü kaplarına ekildi. Ertesi gün hücrelerin ortamı taze ortam ile değiştirildi ve hücre yoğunluğuna göre pasajlanarak idame ettirildi. 1. pasajdan stok alınarak sıvı azotta saklandı. Tüm enjeksiyonlar birinci ve üçüncü pasaj sayılı hücrelerden yapıldı.

5.2.3.4. ADAS'ların kök hücreye spesifik antikorlar ile akış sitometri kullanılarak belirlenmesi

Adiposit dokudan elde edilen ADAS'ların kök hücre belirteçleri CD45, CD54 ve CD29 oranlarının belirlenmesi amacıyla akış sitometri (flow cytometry) yöntemi ile hücreler analiz edildi. $0.3x10^6$ hücre hiçbir antikorla muamele edilmeyen kontrol hücreleri ve tek tek CD29, CD45, CD54 oranları belirlenecek olan örnekler hazırlandı.

Boyama yapılmayan kontrol örneği:

Hiçbir antikor ile muamele edilmeden 500ul FACS (Flourescence-activated cell sorting) solüsyonu (1X PBS, 1mM EDTA, 25mM HEPES, %1 FBS. 0.2um filtreden geçirilip, $+4^0$C'de saklanmıştır) ile çözüldü.

Boyama örneklerinin hazırlanması:

FACS solüsyonu ile çözülen hücre pelletleri, antikorların kullanım kılavuzlarına uygun olarak 10^6 hücre/100ul FACS tampon olacak şekilde eppendorf tüplere hazırlandıktan sonra hücrelere ayrı ayrı 2ul FITC anti-mouse/rat CD29 *(*Biolegend, 102205 *)*, 0.5ul FITC anti-rat CD45 (Biolegend, 202025) ve 1.25ul PE anti-rat CD54 (Biolegend, 202405) antikorları eklendi. Hücreler karanlıkta, 10 dakika $+4^o$C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra hücreler FACS buffer ile yıkandı. Hücre süspansiyonu 1500rpm'de 5 dk. santrifüjlendikten sonra pellet 500ul FACS buffer ile çözülüp analiz edildi (BD FACSCANTO II).

5.2.3.4. ADAS'ların 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine (Dil) ile işaretlenmesi

Hücreler, in-vivo ortamda izlenebilmeleri için takip edilebilir Dil lipofilik fluoresan boyayla işaretlendi. Dil (Molecular Probes, Eugene, OR) 99%'luk etanol içerisinde % 25'lik konsantrasyonda çözüldü ve kullanım için 20°C 'de saklandı. Hücreler üreticinin önerdiği talimatlarına göre fluoresan dil ile işaretlendi; hücre süspansiyonu Dil ile 2.5 µg/mL

konsantrasyonda PBS içinde 15 dk. 37°C'de inkübe edildi. Membrana bağlı Dil boyasının maksimum emisyonu 565 nm'ye karşılık gelmektedir.

5.2.3.5. İzole edilen ADAS'ların farklı dokulara dönüşme potansiyellerinin incelenmesi.

A. Adipoz dokuya yönlendirme (Adipogenez)

Hücre kültürü ortamında çoğaltılan ADAS'lar 12 kuyulu hücre kültür kabına 12 x 10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. Ertesi gün %80-85 yoğunluğa ulaşan hücreler adipogenezis kit (Millipore SCR020) önerisine göre, kit içerisinde yer alan adipogenez indükleyici ve adipogenez sürdürücü kimyasal bileşenlerin önerilen oranlarda büyüme ortamına eklenmesi ile 21 günlük farklılaşma takvimine uyularak gerçekleştirildi. Adipogenez indükleyici kültür ortamı 1., 3., 5., 9., 11., 13., 17., 19. ve 21. günlerde yenilendi. 7. ve 15. günlerde adipogenez sürdürücü ortam ile hücre ortamı değiştirildi. Adipogeneze yönlendirilmiş ADAS'ların diferansiyasyonu sürecinde ışık mikroskobu ile yapılan gözlemlerde lipid damlacıklarının oluşmaya başladığı ilk haftadan itibaren gözlendi. Literatürde kabul edilmiş adiposit boyası olan **Red Oil boyası** ile boyanarak bu lipid damlacıkları gösterildi. Boyama için hücre kültür ortamından uzaklaştırılan farklılaşma süresi tamamlanan ADAS'lar %4'lük paraformaldehit (PFA) solüsyonu ile 40 dk. oda sıcaklığında inkübe edilerek fikse edildi. PBS'le yıkanıp PFA uzaklaştırıldıktan sonra red-oil boyası ile 50 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Distile su ile üç kez yıkanarak uzaklaştırılan boyanın ardından hematoksilen boyası ile çekirdekler boyandı. Hücreler ışık mikroskobunda görüntülendi.

B. Kemik dokuya yönlendirme (Osteogenez)

Hücre kültürü ortamında çoğaltılan ADAS'lar bir gün önceden vitronektin ve kollajen ile kaplanmış 12 kuyulu hücre kültür kabına 12X10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. Ertesi gün %80-85 yoğunluğa ulaşan hücreler osteogenezis kit (millipore SCR028) önerisine göre, kit içerisinde yer alan osteogenezisi indükleyici kimyasal bileşenlerin önerilen oranlarda büyüme ortamına eklenmesi ile iki günde bir ortamın yenilenmesi ile 21 günlük süreçte gerçekleştirildi. Osteogeneze yönlendirilmiş ADAS'ların diferansiyasyonu **Alizarin Red boyası** kullanılarak, hücreler arası kalsiyum depozitlerinin boyanması ile gösterildi. Boyama için hücreler, fiksasyon amacıyla %70'lik soğuk etanol ile bir saat oda sıcaklığında inkübe edildi. PBS ile yıkama ardından etanol ortamdan uzaklaştırıldı ve oda sıcaklığında 30 dk. Alizarin Red boyası ile inkübe edildi. Distile su ile yıkamalar ardından hücreler ışık mikroskobunda görüntülendi.

C. Kıkırdak dokuya yönlendirme (Kondrogenez)

Hücre kültürü ortamında çoğaltılan ADAS'lar 12 kuyulu hücre kültür kabına $12X10^4$ hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. Ertesi gün %80-85 yoğunluğa ulaşan hücrelerin kondrogenez yönlendirme ortamı (GIBCO STEMPRO A10071-01) ile ortamları değiştirildi. iki günde bir ortamları değiştirilen hücreler 18. günün sonunda %4'lük paraformaldehit (PFA) solüsyonu ile 40 dk. oda sıcaklığında inkübe edilerek fikse edildi. PBS ile yıkanıp PFA uzaklaştırıldıktan sonra **Alcian Blue boyası** ile 50 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi. Distile su ile üç kez yıkanan hücreler ışık mikroskobunda görüntülendi.

5.2.3.6. ADAS'ların IV ve SC Enjeksiyon İçin Hazırlanması

Dil boyası ile boyanmış hücreler %90 yoğunluğa ulaşana kadar 10 cm'lik hücre kültür kaplarında büyütüldü. Enjeksiyon/operasyon günü PBS ile bir kere yıkandıktan sonra beş dk. 37^oC'de 1 ml Trypsin-EDTA solüsyonu ile inkübe edildi. Enzimatik olarak ayrılan hücreler toplanarak bir sefer besi yeriyle yıkandıktan sonra PBS içine alındı ve 0.4%'lik Trypan Blue ile ölü hücreler boyandı. Hemositometri ile canlı hücre sayısı belirlendi. İntravenöz (IV) enjeksiyon için $5x10^5$ hücre, 1ml PBS içinde çözüldü; SC enjeksiyon için yine $5x10^5$ hücre 0.5ml PBS içinde çözülüp Eppendorf tüp içinde deney ekibine ulaştırıldı.

5.2.4. Greft Cerrahisi ve SC ADAS Uygulaması

Greft boyutu: 3x3 cm büyüklüğünde, 9 cm^2 tam kat deri greftidir.

5.2.4.1. Otogreft uygulaması

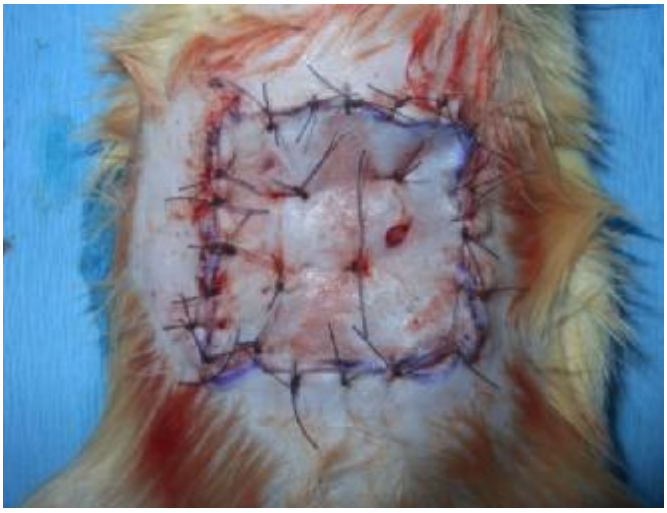
Cerrahi öncesinde anestezi süresinin azalması ve inflamasyon reaksiyonun önlemek amacıyla üç gün önce hafif eter anestezisi altında cerrahi alanda kıl kısaltma işlemi yapılmıştır.

Otogreft Cerrahi

Uygun oda sıcaklığı ve cerrahi alan sağlandıktan sonra hayvan tartılarak uygun doz hesaplanıp ketamin ve ksilazin ile intraperitoneal GAA (Genel anestezi altında) sıçanın önce Batticon daha sonra 1/100 (%1) oranda sulandırılmış Savlon solüsyonu ile iki defa tüm cerrahi alanı yıkandı. Yıkamayı takiben sıçan cerrahi sahaya alındı. Önceden çizilmiş olan boyutlara uyularak 10 numara bistüri yardımı ile greft eleve edildi. Greftte mevcut subkutan dokular cerrahi makas ile temizlendi. Aynı yatağa yerleştirilerek 4.0 poliglaktin 910 ile sekiz ayrı yerden fikse edildi. Kalan boşluklar 5.0 poliglaktin 910 kullanılarak sütüre edildi. Greft üzerine Bactigras yerleştirildi. Bactigrasın üzerine steril pamuk yerleştirildi. Takiben 3.0 ipek sütür yardımı ile tie-over pansuman uygulaması yapıldı (Fotoğraf 12, 13).



Fotoğraf 12: Otogreft boyutu ve eksizyon sonrası görünüm



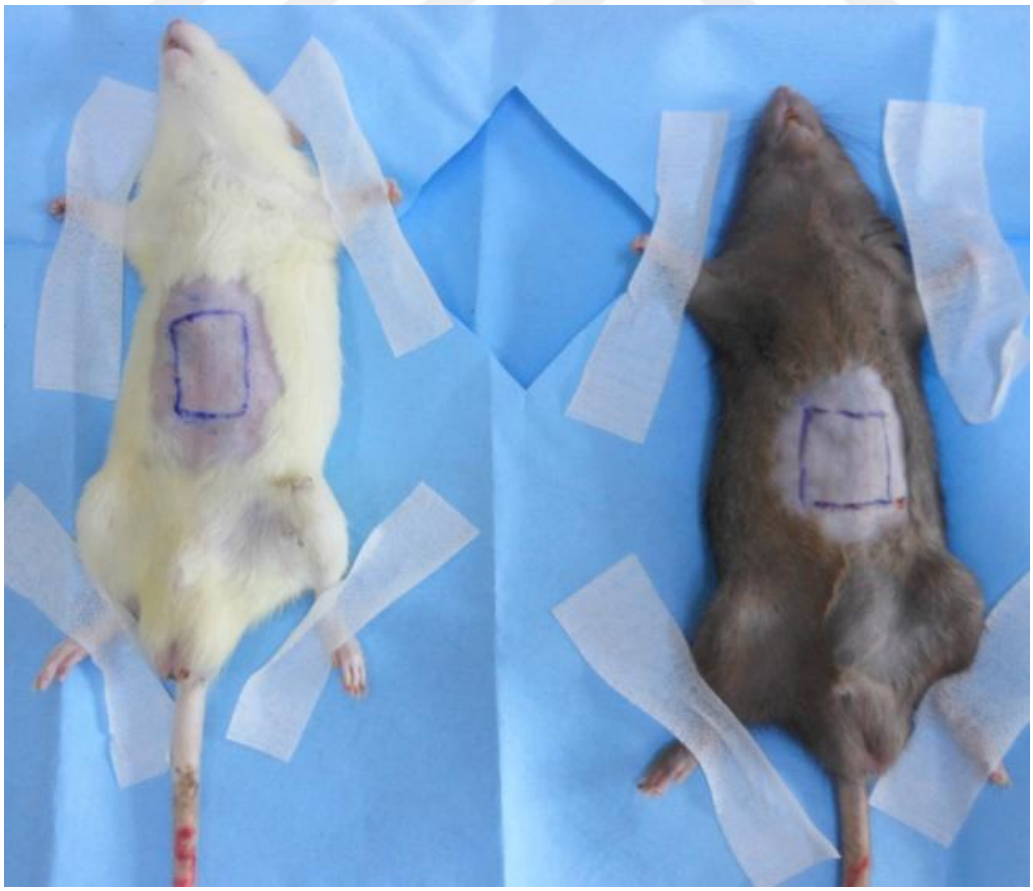
Fotoğraf 13: Otogreft cerrahisi sonrası postoperatif greftin görünümü

5.2.4.2. Çaprazlama ile allogreft yerleştirme

Cerrahi öncesinde zaman kaybını ve inflamasyon reaksiyonun önlemek amacıyla üç gün önce cerrahi alanda kıl kısaltma işlemi yapılmıştır.

Allogreft Cerrahi

Uygun oda sıcaklığı ve cerrahi alan sağlandıktan sonra sıçan tartılarak uygun doz hesaplanıp ketamin ve ksilazin ile intraperitoneal GAA sıçanların, önce Batticon daha sonra 1/100 (%1) oranda sulandırılmış Savlon solüsyonu ile iki defa tüm cerrahi alanı yıkanmıştır. Yıkamayı takiben sıçanlar cerrahi sahaya alınmıştır. 10 numara bistüri yardımı ile her iki greft eleve edilerek, greftteki subkutan dokular eksize edilerek greft tam kat deri grefti halinde çaprazlanarak allogreft şeklinde yerleştirilmiştir. 4.0 poliglaktin 910 yardımı ile sekiz ayrı yerden fikse edilen greftlerdeki boşluklar 5.0 poliglaktin 910 ile sütüre edilmiştir. Greft yerleştirildikten sonra Grup III- V'te SC ADAS uygulaması yapılmıştır. Takibinde her iki greftin üzerine Bactigras yerleştirilerek steril pamuk ile tie-over uygulaması yapılarak her iki sıçanda allogreft yerleştirilmesi işlemi sonlandırılmıştır (Fotoğraf 14, 15, 16, 17).



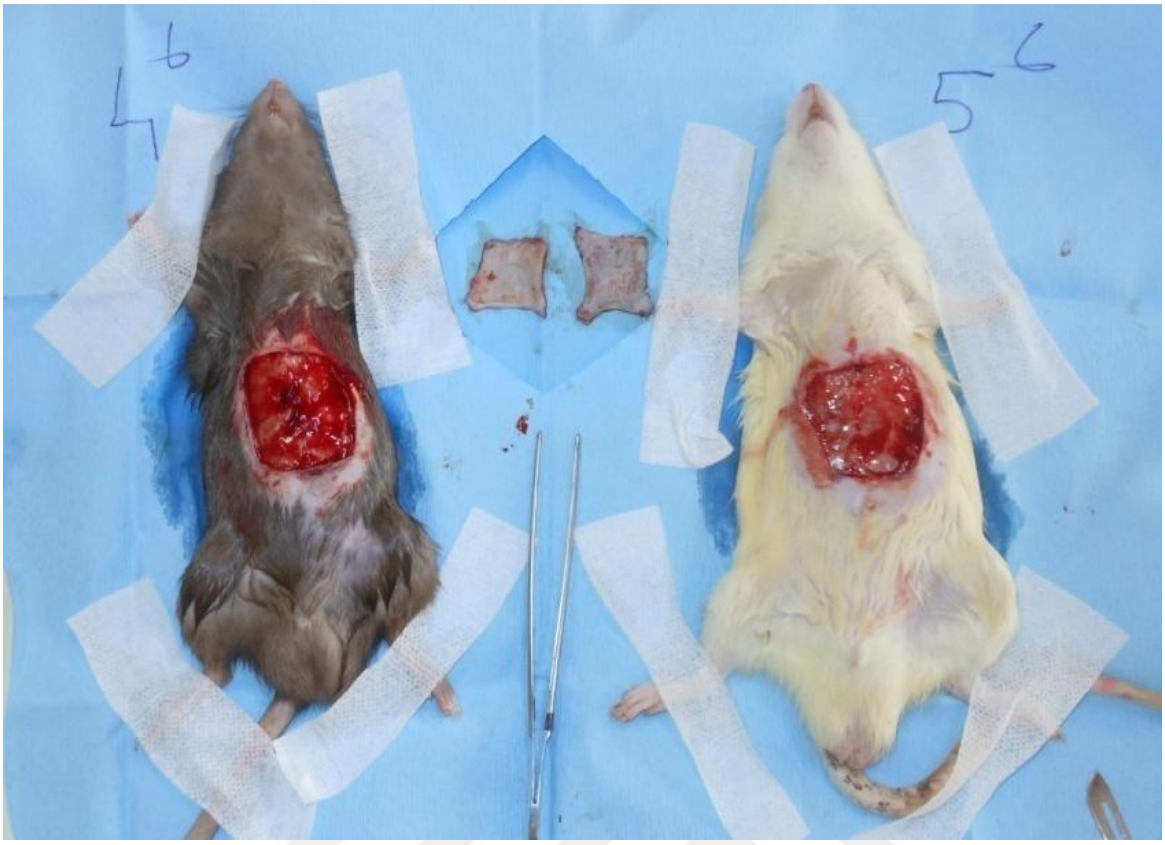
Fotoğraf 14: Allogreft Yerleşimi Öncesi Sahanın Görünümü



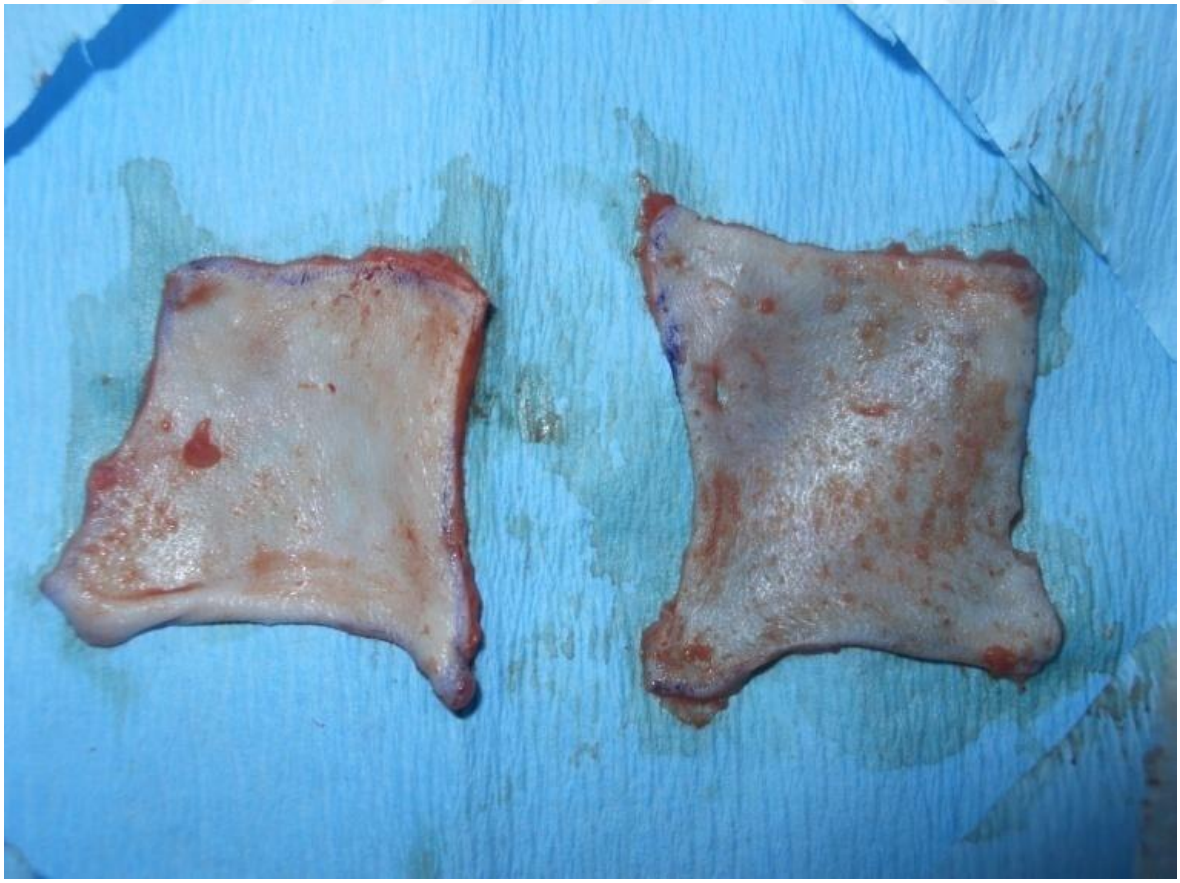
Fotoğraf: 15: Eş Zamanlı Allogreft Transferi



Fotoğraf 15: Eşzamanlı Allogreft Transferi



Fotoğraf 15: Eş Zamanlı Allogreft Transferi



Fotoğraf 16: Eş Zamanlı Alınan Allogreftlerin Görünümü



Fotoğraf 17: Postoperatif Allogreft Yerleştirilmesi Sonrası Görünüm

Tüm greft yerleştirilme işlemlerinden sonra cerrahi tie-over pansuman uygulaması yapıldı (Fotoğraf 18).



Fotoğraf 18: Tie-over Pansuman Uygulaması

5.2.4.3. SC ADAS Uygulaması

SC ADAS uygulaması peroperatif greft cerrahisi bittikten sonra allogreft sahası dört ayrı alana ayrılıp, 0.5 cc olarak hazırlanmış ADAS her alana diffüz yayılacak şekilde SC. enjeksiyon şeklinde uygulanmıştır.

Grup III ve Grup V'e cerrahi günü peroperatif, greft yerleştirildikten hemen sonra, SC olarak intraoperatif, tek doz 0.5 cc içerisinde 5x 10^5 uygulanmıştır.

Cerrahi Günü

5.2.5. IV ADAS Uygulaması

IV ADAS uygulaması kuyruk veninden sarı branül yardımı ile ortam ısısı ayarlandıktan sonra denek hafif eter anestezisi altına alınarak yavaş infüzyon şeklinde 1 cc olarak yapılmıştır. Her IV uygulama yapıldığında ADAS verilmeyen gruplara da IV 1 cc SF uygulaması yapılmıştır.

Cerrahi gününde cerrahi başlamadan üç saat öncesinde IV kök hücre infüzyon uygulamaları yapılmıştır. -7., 0., 3., 7. günde her deneğe aynı saat dilimleri içerisinde (11.00) ADAS IV infüzyonu yapılmıştır.

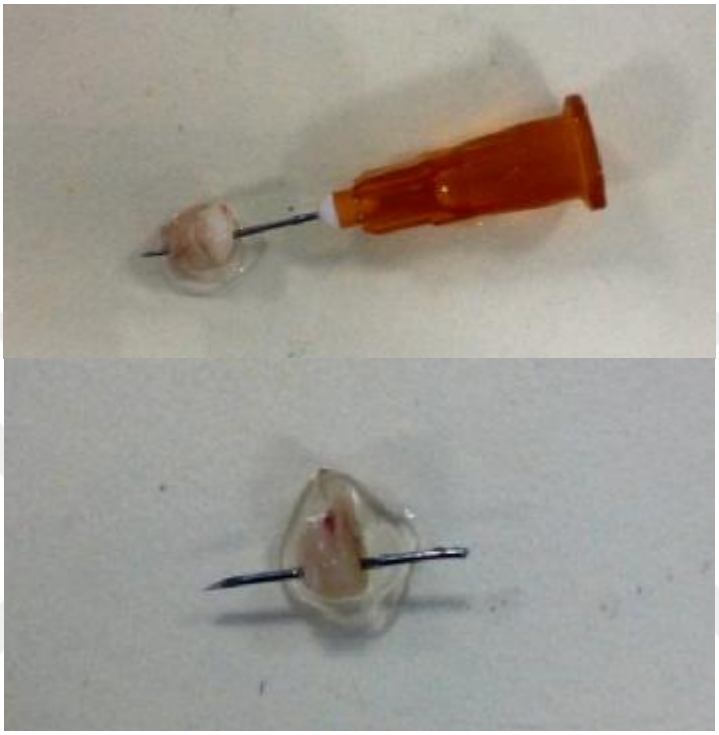
ADAS; IV Protokol: yavaş infüzyon şeklinde tek doz 5x10^5

-7. gün	Cerrahi Günü	Postop 3. Gün	Postop 7. Gün	Postop. 14. Gün

Allogreft 14. güne dek yaşarsa 14. günde IV tek doz ADAS tedavisi planlanmıştır.

5.2.6. Patolojik Örnek alınması

Hafif anestezi altında, 4 mm punch biyopsi aleti kullanılarak 4 mm çapında olacak şekilde, postoperatif yedinci günde (vital bölgeden olmak üzere) patoloji örneği alınmıştır. Patoloji materyalinin bütünlüğü ve stabilitesi insülin enjektörü yardımı ile epidermisten dermis ve subkutan dokuya doğru fiksasyon sağlanarak alınmıştır (Fotoğraf 19, 20).



Fotoğraf 19: Patolojik Örnekleme



Fotoğraf 20: Patoloji için kullanılan 4mm Punch biyopsi Aleti

5.2.7. Hayvanların Sakrifikasyonu

Sıçanlar cerrahi sonrası Grup I'de 15 günlük takibin sonunda, Grup II-III-IV-V'te allogreftler nekroza uğradığında sakrifikasyona geçildi. Sakrifikasyon deneklere anestezi (ketamin-

ksilazin) verilerek, abdominal kavite açılıp vena kava kaudalisten kan almak yöntemi ile eksanguinasyon (kansızlaştırma) ile yapıldı.

5.2.8. Histopatolojik İşlemler

5.2.8.1. Rutin Doku Takip Protokolü

Alınan dokular histokimyasal incelemeler için %10'luk formolde 24–48 saat bekletilerek fikse edildi. Daha sonra fiksatifin uzaklaştırılması amacıyla bir gece akarsu altında yıkandı. Dehidratasyon amacıyla sırasıyla %70, %80 ve %96'lık etil alkol serilerinde 20'şer dk.; ardından dört farklı aseton serisinde 20'şer dk. tutuldu. Şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dk. iki farklı ksilene tabi tutuldu. Birer saatlik iki kez yumuşak parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular sert parafin bloklar içerisine gömüldü. Rotary mikrotom (RM 2255, Leica) aracılığı ile 5µ kalınlığında kesitler alındı (Tablo13).

Tablo 13: Rutin doku takibi protokolü

İşlem	**Madde**	**Süre**
Fiksasyon	%10'luk formol	24-48 saat
Fiksatiften Uzaklaştırma	Akarsu	1 gece
Dehidratasyon	%70-80-96'lık alkol serileri	20'şer dakika
Post Fiksasyon	Aseton-1 Aseton-2 Aseton-3 Aseton-4	20'şer dakika
Şeffaflandırma	Xylol-1 Xylol-2	30'ar dakika
	Yumuşak parafin-1 Yumuşak parafin-2	1'er saat
Bloklama	Sert parafin	

5.2.8.2. Hematoksilen-Eozin Boya Protokolü

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için bir gece 60˚C'lik etüvde tutuldu. Ardından ilk 20 dk. (etüvde) diğer ikisi 10'ar dk.'lık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra ilk dehidratasyon işlemi için beş değişim azalan alkol serilerinden geçirildi, kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra beş dk. hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyandı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için beş dk. akarsuda yıkanan kesitler, iki dakika eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Boyamadan sonra sırasıyla %70, %80, %96 ve iki seri absolü alkolden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dk. üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 14).

Tablo 14: Hematoksilen-Eozin boya protokolü

İşlem	**Madde**	**Süre**
Deparafinizasyon	60°C etüvde	30 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (etüvde)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 (oda ısısında)	10 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 3 (oda ısısında)	10 dakika
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%96'lık alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%80'lik alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Hematoksilen	10 dakika
Yıkama	Akarsu	10 dakika
Boyama	Eozin	2 dakika
Yıkama	%70-80-96-100-100'lük alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 2	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 3	20 dakika
Kapama	Entellan	

5.2.9. Değerlendirme

5.2.9.1. Greft Vitalitesi /Görsel Takip

A. Allogreft Uygulaması ile İlgili Bilgiler

Deneyimizde '3x3 cm=9 $cm^{2'}$ olacak şekilde tam kat allojenik deri grefti uygulaması yapılmıştır. Kompozit doku allotranplantasyonlarında deri antijenitesi en yüksek doku olduğu için rejeksiyonda önemli bir takip kriteridir (299, 300). Geniş seri hayvan deney serilerinde deri rejeksiyonu olmasına rağmen kas-iskelet kompartmanının rejekte olmadığı görülmüştür. Bu durum ilk olarak Billingham tarafından tanımlanan split toleransa bağlanmıştır. Allotransplante edilen kompozit dokunun bir bileşenini rejeksiyon görülürken bir bileşenine görülmemesi split tolerans olarak isimlendirilmiştir. İlk tanımlandığı günden beri split toleransın aşılması ve allojenik deriye yönelik donör spesifik immun tolerans sağlanması önemli bir çalışma alanıdır (301). Deri allogreft uygulamasında en önemli tartışma konuları lenfatik blokaj veya geciktirme uygulanması, vasküler anastomozun doğal seyrine bırakılması veya mikrocerrahi vaskülarizasyon yapılması, deriye özel antijenlere yanıt ve deride yerleşik immun sistem ve hücreleri, deri ekstrasellüler matriksidir. Allojenik deriye özel antijenler olan skn ve epa'ya yönelik allojenik immun yanıt deri allogreftinin rejeksiyonunda rol oynamaktadır. Bu antijenlerin MHC geni üzerinden taşındığı ve alloimmun yanıtın bu antijenlere spesifik geliştiği düşünülmektedir (89). Allojenik deriye yönelik tolerans oluşumu ve rejeksiyon epizodu kemik iliğinde üretilen deriye yerleşen dendritik hücre tipleri (Langerhans), deride yerleşik bulunan bellek T hücreleri aracılığı ile allojenik deriye ait antijenlere yanıt olarak gelişmektedir. İmmun tolerans ise deride bulunan yine telerojenik özellikte antijenle stimüle edilmemiş Langerhans hücrelerince ve Treg hücreler aracılığı gelişmektedir. Bu bağlamda bu konuda ilerleme sağlamak için bu olayda rol alabilecek Treg ve bellek T hücreleri hakkında çalışmalara, bu aşamada rol oynayabileceği düşünülen T hücre tiplerinin tanımlanmasına yönelik çalışmalara ve bunların homeostatik ve immun regülatuar özelliklerinin ortaya konmasına ihtiyaç vardır (300, 302).

Doğal seyrinde vaskülarize olan deri allogreft rejeksiyonuna yönelik tanımlanmış standardize edilmiş görsel bir klinik takip derecelendirmesi veya kriterleri yoktur. Çalışmalarda total veya parsiyel nekroz, eskar formasyonu ve deri değiştirme kriter alınmıştır (279, 280, 303, 304). Deri allografti nekroz kriterleri inspeksiyonla olan renk değişikliği, ödem, deskuamasyon ve total nekroz gibi değişiklikler alınmıştır (305). VCA deney hayvan modellerinde sıçan arka bacak transplantalarında rejeksiyonuna yönelik görsel takiplerde çalışmacılar rejeksiyon

bulguları olarak VCA derisinin hafif dokunuş ile sıyrılmasını ardından, kıl kaybı ve VCA derisinin total eskarifikasyonu almıştır (306). VCA deri rejeksiyon görsel bulgularının eritem bulgusu ile başlar (307), eritemin üzerine ödemin eklenerek flepte kıl kaybı gelişmesidir (308). Eritem ile başlayan allorejeksiyon epizodunun epidermolizis, deskuamasyon ve eskar formasyonu ile ilerlediği raporlanmıştır (309, 310).

B. Allogreft Görsel Nekroz Bulguları

Greft cerrahisini takiben beş gün süreyle tie-over uygulaması yapılmış olan sıçanlar pansuman ile takip edildi. Enfeksiyon açısından değerlendirme yapıldı. Kötü kokulu akıntı, klinik enfeksiyon bulgusu, genel durum açısından denekler her gün değerlendirildi. Tie-over açılması ile beraber beşinci günde görsel değerlendirmeye geçildi. Her gün sıçanlar greft nekrozu, allorejeksiyon görsel karakterizasyonu açısından değerlendirilerek greft nekroz görsel özellikleri ve yaygınlığı değerlendirildi.

Takiplerde allogreft rejeksiyonu literatürle uyumlu bir şekilde **eritem** bulgusu ve greft alanına yaygınlığı, eritemin üzerine binen **ödem**, **deskuamasyon** (hafif dokunuşla greftte sıyrılma olup olmadığı) bulgusu ve greft alanına yaygınlığı, greft yatağında insülin enjektörü ile kanama olup olmadığı, bül formasyonu, greftteki mavi mor renk değişikleri, **eskar formasyonu** ile **nekroz bulguları** ve yaygınlığı takip edilmiştir. Bu bulgularla eskar formasyonu ve nekroz bulgusunun total greft alanına yaygınlığı izlendi.

Eskar formasyonu ve nekroz alanının total greft alanının %75'ini geçtiği tüm allogreftler total nekroz olarak kabul edildi. Literatürde yapılmış allogreft takipleri total veya belirlenmiş parsiyel nekroz eskar alanı görüldüğünde allogreft nekrozu olarak kabul etmiştir (279, 280, 303, 304).

5.2.9.2. ADAS in vivo/ in vitro Değerlendirmeleri

A. ADAS'ların in vitro etkinliklerinin gösterilmesi

Elde edilen kök hücrelerin görüntülenme aşamasını takiben, akış sitometri yöntemi ile kök hücreye spesifik antikorlarla belirlendi. Elde edilen kök hücrelerin diferansiyasyon özellikleri değerlendirildi. Kök hücrelerin, in vivo ortamda izlenebilmeleri ve patolojik kesitlerde immunfluoresan altında takip edilebilmesi için lipofilik fluoresan boyayla (dil) işaretlendi. Allotransplantasyon sonrasında histopatolojik örneklerde immunfluoresan altında dil boyası ile işaretli ADAS içeren bölgeler gösterildi.

B. ADAS'ların in vivo immun modülatuar etkinliklerinin takip edilmesi

Allorejeksiyon görsel değerlendirmesi ile değerlendirilmiştir.

5.2.9.3. Histopatolojik Değerlendirmeler

Tüm deneklerden takip süresince; yedinci günde rutin patolojik örnekleme alındı. biyopsi örnekleri 4 mm punch biyopsi aleti ile çapı 4 mm çapında olacak şekilde alındı.

Alınan biyopsi örneklerinde nekroz patolojisi değerlendirmesi ve allorejeksiyon derecelendirmesi (skorlaması) Banf skorlamasına göre yapıldı (Tablo 4). Işık mikroskobunda skorlamalar yapıldı ve histolojik kesitler değerlendirildi.

Sınıflamada temel kriterler dermisi, adneksiyel yapıları infiltre eden inflamatuar hücreler, epiteliyal apopitozis, diskeratoz ve dermal nekroz değerlendirilmesidir.

5.2.9.4. Biyoistatistiksel Yöntem

Verilerin analizinde SPSS 22.0 (IBM Corparation, Armonk, New York, United States) programı kullanıldı. Histopatolojik ve görsel takip verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Bağımsız ikiden fazla grupların nicel değişkenlere göre bir biriyle karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis H Testi Monte Carlo simülasyon yöntemleri kullanılırken, Post Hoc analizleri için Dunn Testi kullanıldı.

Gruplarda uygulanan greftlerin mortalite ile yaşam sürelerine göre karşılaştırmak için Kaplan-Meier (product limit method)-LogRank (Mantel-Cox) analizi kullanılmıştır.

Kantitatif veriler tablolarda ortalama ± sh. (standart hata) ve medyan Range (Maximum-Minimum) değerleri şeklinde ifade edilmiştir.

Kategorik veriler ise n (sayı) ve yüzdelerle (%) ifade edilmiştir. Veriler %95 güven düzeyinde incelenmiş olup, p değeri 0,05 ten küçük anlamlı kabul edilmiştir.

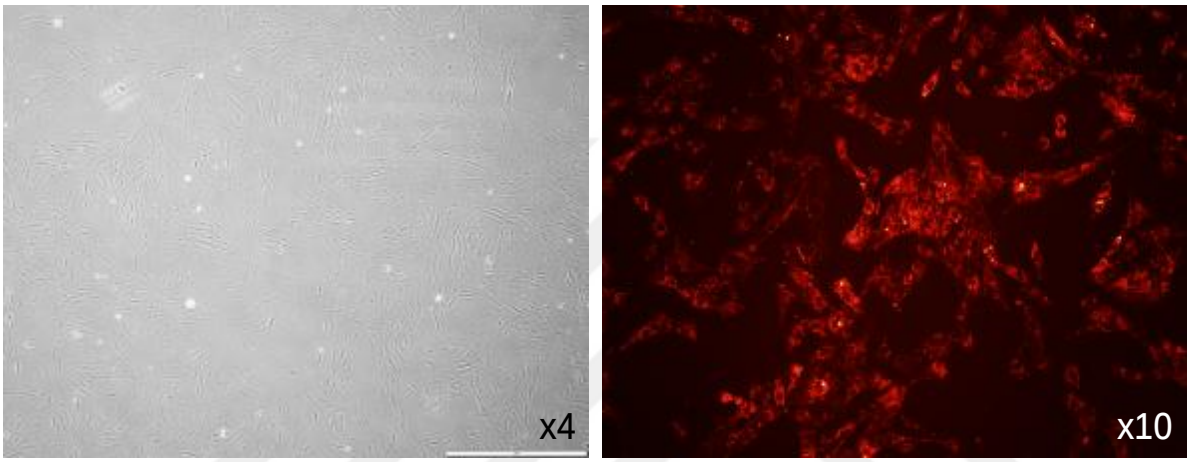
6. BULGULAR VE SONUÇLAR

6.1. Tedavi Gruplarında Kullanılan ADAS'ların Tanımlanması, Diferansiyasyonu

Deneyin cerrahi aşamaları başlamadan önce kök hücreler aşağıdaki bulgular teyit edilmiştir.

6.1.1. İzole edilen ADAS'ların ışık mikroskobu altında tanınması ve dil boyası ile işaretlenmesi

İzole edilen ADAS'lar tipik olarak yıldızsı uzantıları olan ve flaska yapışan yapıları ile ışık mikroskobu altında görüldü ve tanındı. Lipofilik dil boyası ile in vivo takip için işaretlendi (Fotoğraf 21).



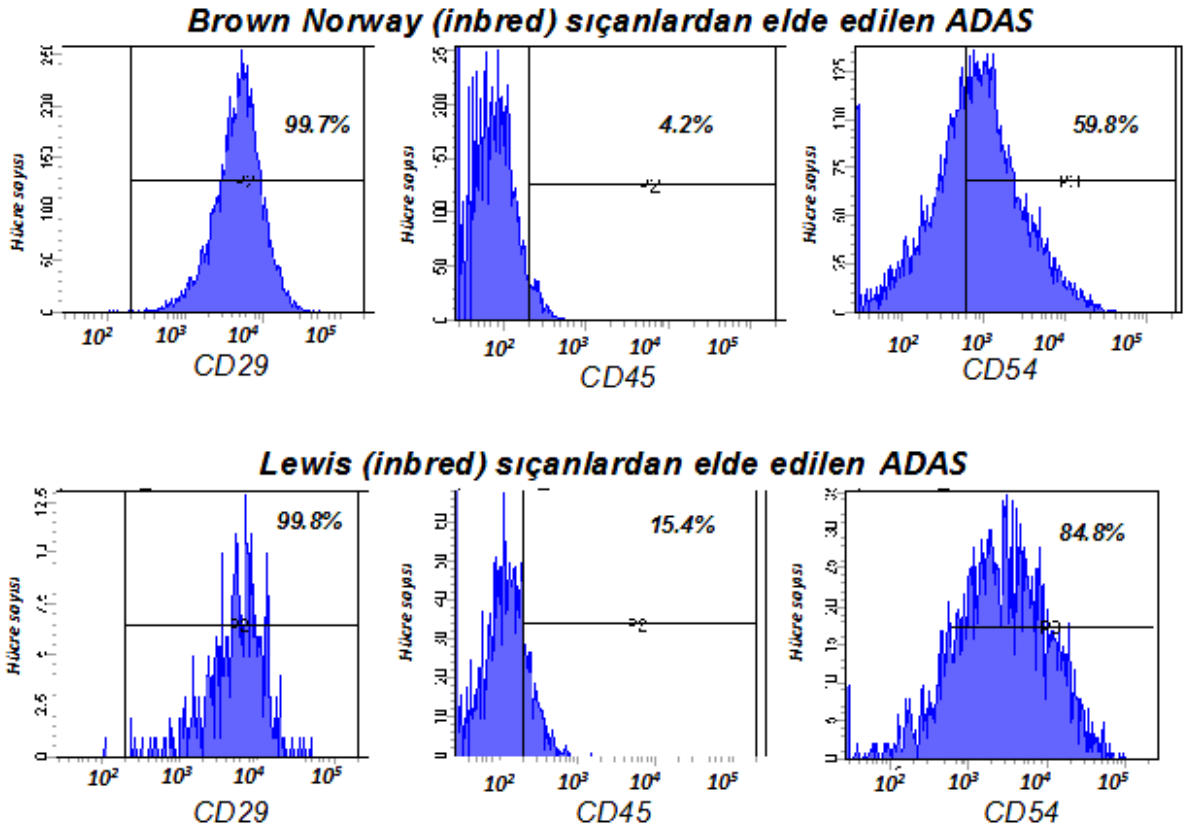
a. **b.**

Fotoğraf 21: ADAS'ların mikroskobik incelemesi. **a.** İzole edildikten sonra kültüre edilen canlı ADAS'lar, **b.** Enjeksiyon öncesi dil boyası ile boyanmış ve kültüre edilmiş canlı ADAS'ların fluoresans mikroskop görüntüsü

6.1.2. İzole edilen ADAS'ların erişkin kök hücre belirteçleri kullanılarak akış sitometri (flow cytometry) yöntemi ile analizi

Deneylerde kullanılan; Lewis ve Brown Norway olmak üzere iki farklı inbred sıçan türünden izole edilen ADAS'lar, kök hücre yüzey belirteçlerinin belirlenmesi yani kök hücre karakterizasyonu amacıyla, CD54 ve CD29 gibi kök hücreye spesifik antikorlar kullanılarak ve aynı zamanda kök hücreler için bir negatif belirteç olan, farklılaşmasını tamamlamış hücrelerin yüzeylerinde eksprese ettiği CD45 antikoru kullanılarak akış sitometri yöntemi ile analiz edilmiştir (Şekil 35). Brown Norway türü sıçanlardan izole edilen ADAS'lar %99.7 oranında CD29, %59.8 oranında CD54 pozitif belirteçleri eksprese ederken CD45 negatif belirteci %4.2 oranında eksprese etmektedir. Lewis türü sıçanlardan izole edilen ADAS'lar %99.8 oranında CD29, %84.8 oranında CD54 pozitif belirteçleri eksprese ederken CD45 negatif belirteci %15.4 oranında eksprese etmektedir. Literatürden de bilindiği üzere türler

arasında ve ayrıca tür içinde yaş gibi bireysel değişkenlere de bağlı olarak bu hücre yüzey belirteçlerinin ekspresyonu değişkenlik göstermektedir (311).



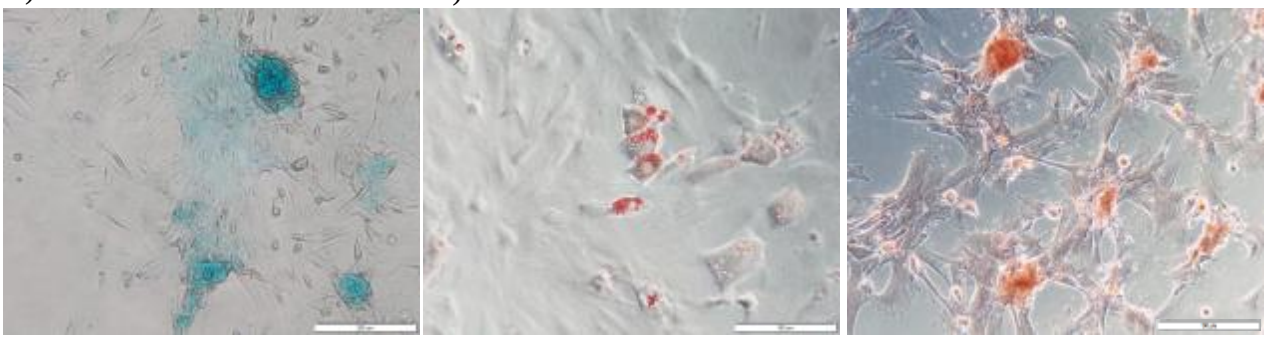
Şekil 35: İzole edilen ADAS'ların erişkin kök hücre belirteçleri kullanılarak akış sitometri (flow cytometry) yöntemi ile analizi. Hücreler, ADAS'lar için pozitif belirteç olan CD29 ve CD54'ü yüksek oranda eksprese ederlerken, hücrelerde negatif belirteç olan CD45 ekspresyonu oldukça düşüktür.

6.1.3. İzole edilen ADAS'ların Diferansiasyonu

Kondrogenez, Adipogenez ve Osteogenez

İzole edilen ADAS'ların in vitro koşullarda farklılaşma deneyleri yapılmıştır. Osteogeneze yönlendirilen kök hücrelerin osteositlere özgün kalsiyum depositleri oluşturdukları **Alizarin Red boyası** ile, adipositlere yönlendirilen kök hücrelerin adipositlere özgün yağ damlacıkları oluşturdukları, **Oil Red boyası** ile ve kondrojeneze yönlendirilen kök hücrelerin kondrositlere özgün proteoglikan sentezledikleri **Alcian Blue** boyaması ile ışık mikroskobu altında belirlenmiştir (Fotoğraf 22).

a) b) c)



Fotoğraf 22: Kültür ortamında; kondrojeneze, adipogeneze ve osteogeneze yönlendirilen ADAS'ların spesifik boyalarla boyanması ardından ışık mikroskobu ile görüntülenmesi.

A. Kondrojeneze yönlendirilen ADAS'ların **'Alcian Blue'** ile boyanması ardından "Alcian Blue" boyası kondrositler tarafından sentezlenen proteoglikanlara spesifik olarak bağlanmaktadır.

B. Adipojeneze yönlendirilen ADAS'ların **'Oil Red O'** ile boyanması ardından, Oil Red O boyası adipositler tarafından sentezlenen lipid damlacıklarına spesifik olarak bağlanmaktadır.

C. Osteogeneze yönlendirilen ADAS'ların **'Alizarin Red'** ile boyanması ardından, Alizarin Red boyası osteositler tarafından üretilen kalsiyum depolarına spesifik olarak bağlanmaktadır.

6.2. Greft Görsel Takip Bulgu ve Sonuçları

6.2.1. Pansuman Uygulaması, Postoperatif bakım

İlk beş gün tie-over pansumanı ile takip edilmiştir. Her gün tie-over pansumanı ıslatılmış enfeksiyon kötü kokulu akıntı açısından takip edilmiştir. Postoperatif dönemde tie-over pansuman her gün Octanicept solüsyonu ile ıslatıldı. Greftlerde total fulminan nekroza yol açacak şekilde enfeksiyonla uyumlu bulgu gözlenmedi.

Beşinci günde tie-over açılıp greftler vitalite açısından değerlendirilmiştir. Önce Batticon sonra SF ile temizlik sonrasında mupirocin pomad uygulaması yapılmıştır.

6.2.2. Allogreft Nekrozu Karakteristik Özellikleri ve Görsel Takip

Takiplerde allogreft rejeksiyonu literatürle uyumlu bir şekilde **eritem** bulgusu ve greft alanına yaygınlığı, eritemin üzerine binen **ödem**, **deskuamasyon** (hafif dokunuşla greftte sıyrılma olup olmadığı) bulgusu ve greft alanına yaygınlığı, greft yatağında insülin enjektörü ile kanama olup olmadığı, bül formasyonu, greftteki mavi mor renk değişikleri, **eskar formasyonu** ile **nekroz bulguları** ve yaygınlığı takip edildi. Bu bulgularla eskar formasyonu ve nekroz bulgusunun total greft alanına yaygınlığı izlendi. Total greft alanının %75'ini aşan nekroz ve eskar formasyonu nekroz olarak kabul edildi. Eritem bulgusu ile başlayan peteşiyal

bulguları takiben milimetrik büllöz odaklar, deskuamasyon, nekroz odakları ve takibinde de total nekroz gözlendi. % 75'i geçen nekroz alanlarının görülmesini takiben vitalite için insülin enjektörü ile kanama kontrolü yapıldı. Kapiller kanama gözlenmedi. Farklı olarak hiçbir tedavi almayan Grup II'de allojenik rejeksiyon ve nekroz hızlı bir şekilde oluşurken, Grup V'te ödem bulgusu nekroz ile beraber gözlenmiştir.

6.2.3. İstatistiksel Değerlendirme/Görsel

Kruskal Wallis Allogreft Yaşam Süresi Değerlendirmesi

Tüm gruplar değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p< 0.001$).

Greft Yaşam Süreleri Kruskal Wallis Değerlendirmesi İkili Kıyaslamalar

Negatif kontrol grubu otogreft uygulaması yapılan Grup I median yaşam süresi ile Grup II, Grup IV allogreft median yaşam süresi arasında anlamlı fark izlenirken, Grup III ve Grup V allogreft median yaşan süresi ile anlamlı fark izlenmemiştir. Grup I median yaşam süresine Grup III ve V allogreft median yaşam süresi anlamlı olarak yakındır.

Pozitif kontrol grubu olan allogreft uygulaması yapılan tedavi verilmeyen Grup II allogreft median yaşam süresi ile Grup III ve Grup V allogreft median yaşam süresi arasında anlamlı fark izlenirken, Grup IV allogreft median yaşam süresi ile izlenmemiştir.

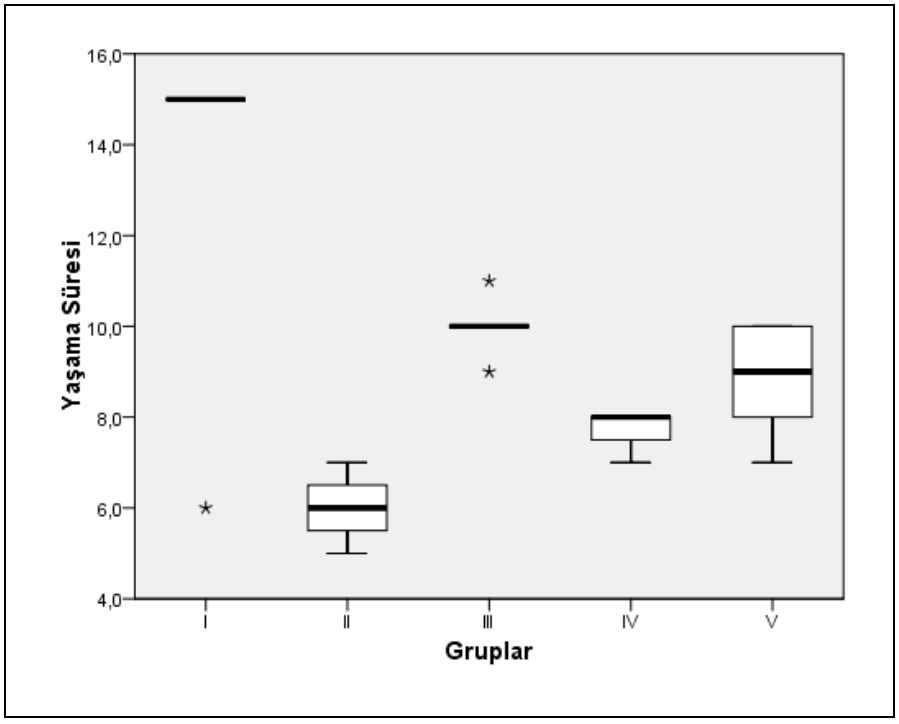
Sadece SC tedavi alan Grup III allogreft median yaşam süresi ile Grup V allogreft median yaşam süresi arasında anlamlı fark izlenmezken, Grup II-IV allogreft median yaşam süresi ile anlamlı fark izlenmiştir.

IV ve SC tedavi alan Grup V ile Grup IV allogreft median yaşam süresi arasında anlamlı fark izlenmemiştir (Şekil46) (Tablo 13).

Kaplan Meier sağkalım analizine göre; median yaşam süresi değerlendirmelerinde farklı olarak allogreft median yaşam süresi değerlendirilmelerinde Grup II ile Grup IV arasında, Grup IV ile Grup V arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Tablo 15).

Tablo 15: Kruskal Wallis; Histolojik istatistiksel değerlendirmeler ve allogreft yaşam süresi değerlendirmeleri ikili karşılaştırmalar

Gruplar		**Yaşama Süresi**		**Rejeksiyon patolojisi**
		Medyan (Max-Min)		**Medyan (Max-Min)**
I	**(n=6)**	15 (15-15)		2 (4-1)
II	**(n=7)**	6 (7-5)		4 (4-4)
III	**(n=7)**	10 (11-9)		3,6 (4-3)
IV	**(n=7)**	7,7 (8-7)		3,7 (4-3)
V	**(n=7)**	9 (10-7)		3,7 (4-3)
Total	**(n=35)**	8,4 (15-5)		3,6 (4-1)
p Değeri		**<0,001**		**<0,013**
Post Hoc Test	**I→II**	**<0,001**		**<0,001**
	I→III	1		0,207
	I→IV	**0,010**		**0,006**
	I→V	1		**0,006**
	II→III	**0,002**		1
	II→IV	1		1
	II→V	**0,008**		1
	III→IV	**0,034**		1
	III→V	1		1
	IV→V	1		1
Kruskal Wallis Test (Monte Carlo) -Post Hoc Test: Dunn Test Max.:Maximum Min.:Minimum				



Şekil 46: Kruskal Wallis; Deney gruplara göre greft median yaşam süresi değerlendirmesi/grafik

Kaplan-Meier Greft Sağkalım Analizi İkili Değerlendirmeler (Tablo14) (Şekil 47).

Greft ortalama yaşam süreleri ve greft Sağkalım analizi yapılmış, log rank testi uygulanarak gruplar arası ikili karşılaştırmalar yapılmıştır (p değeri<0.005 anlamlı kabul edilmiştir).

Pozitif kontrol grubu otogreft uygulanmış olan Grup I ile Grup II, Grup III, Grup IV, Grup V allogreft yaşam süreleri arasında anlamlı bir fark görülmüştür.

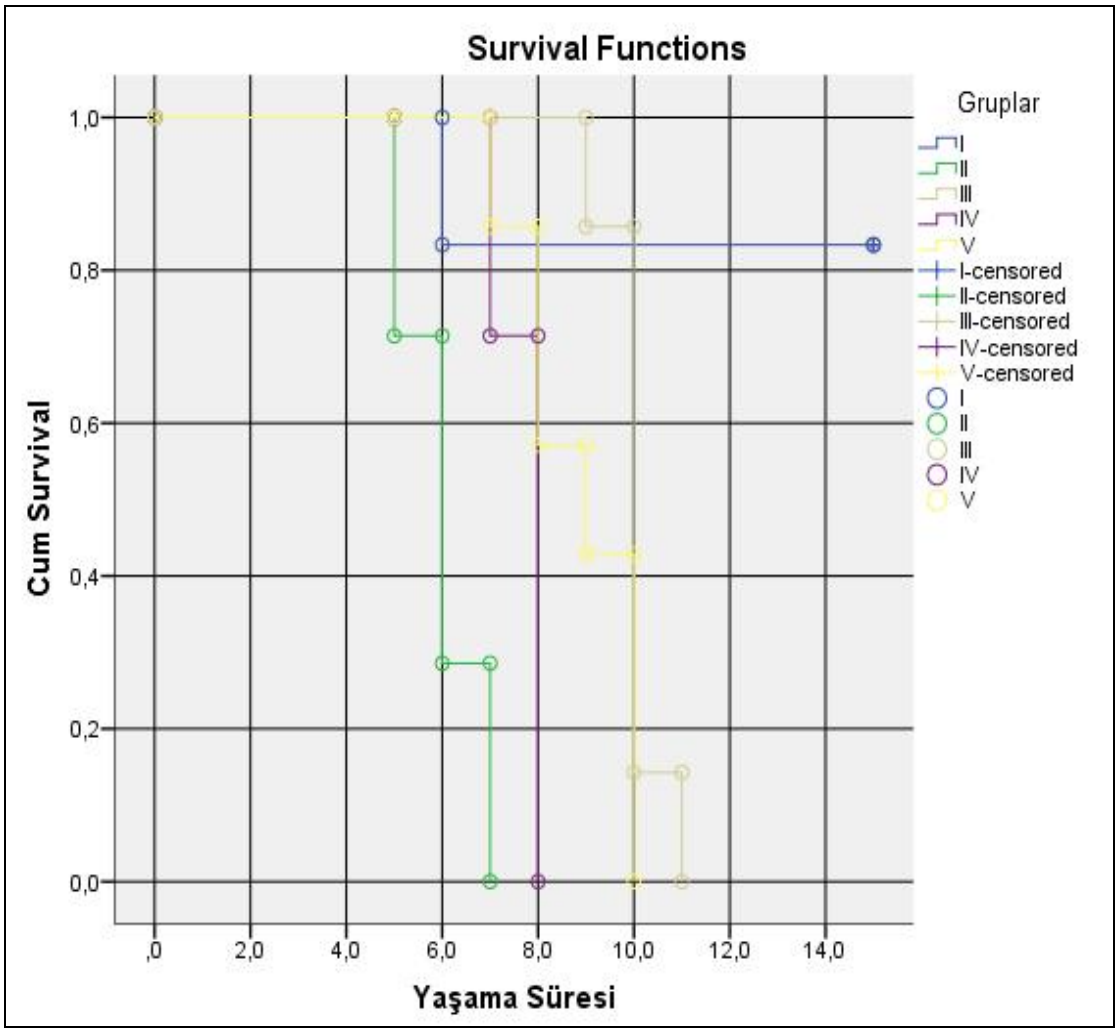
Negatif kontrol grubu olan allogreft uygulaması yapılan ve tedavi verilmeyen Grup II ile Grup III, Grup IV, Grup V allogreft yaşam süreleri arasında anlamlı fark görülmüştür.

Allogreft uygulaması yapılan sadece SC ADAS tedavisi alan Grup III ile Grup IV allogreft yaşam süreleri arasında anlamlı fark görülmüş, Grup V allogreft yaşam süresi arasında anlamlı fark gözlenmemiştir.

Allogreft uygulaması yapılan IV ve SC ADAS tedavisi alan Grup V ile Grup IV allogreft yaşam süreleri arasında anlamlı fark gözlenmiştir.

Tablo16: Kaplan Meier ve Log Rank testi; Allogreft yaşam süresi analizi

Gruplar	**Tahmin Edilen Yaşam Süresi**	**Sağ**	**Ex**
	Ortalama ± Sh	**n (%)**	**n (%)**
I	13,5±1,37	1 (16,7)	5 (83,3)
II	6,0±0,31	7 (100,0)	0 (0,0)
III	10,0±0,22	7 (100,0)	0 (0,0)
IV	7,7±0,18	7 (100,0)	0 (0,0)
V	8,9±0,46	7 (100,0)	0 (0,0)
Total (n=35)	9,1±0,50	29 (85,3)	5 (14,7)
İkili karşılaştırma	**P Değeri**	**İkili karşılaştırma**	**P Değeri**
I→II	**0,004**	**II→IV**	**0,002**
I→III	**0,011**	**II→V**	**0,001**
I→IV	**0,018**	**III→IV**	**<0,001**
I→V	**0,013**	**III→V**	0,060
II→III	**<0,001**	**IV→V**	**0,044**
Kaplan Meier Test LogRank (Mantel-Cox) - Sh.: Standart Hata			



Şekil 47: Kaplan Meier ve Log Rank Test: Deney gruplarına göre greft yaşam süresi /grafi

Kaplan-Meier Greft Sağkalım Analizi Sonuç

Kaplan Meier greft Sağkalım analizi değerlendirildiğinde tüm gruplarda uygulanan SC ve IV ADAS tedavisinin allogreft yaşam süresini hiçbir tedavi almayan Grup II'ye göre anlamlı bir şekilde uzattığı gözlenmiştir. En uzun allogreft yaşam süresi sadece SC ADAS tedavisi alan Grup III'te gözlenmiştir. Grup III'te ve Grup V'te sadece IV tedavi alan Grup IV'e göre allogreft yaşam süresinde anlamlı bir uzama gözlenmiştir. Grup III ve Grup V kıyaslandığında ortalama yaşam süresi sadece SC ADAS tedavisi alan Grup III'te daha iyi iken Grup III ile IV ve SC ADAS tedavisi alan Grup V arasında allogreft yaşam süresi açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir. IV ve SC ADAS tedavisi alan Grup V'te sadece IV tedavi alan Grup IV'e göre allogreft yaşam süresi anlamlı bir şekilde uzamıştır.

Sonuç olarak SC ve IV ADAS tedavisi allogreft yaşam süresini Grup III, IV, V'te anlamlı olarak uzatmıştır. Sadece SC ADAS tedavisi allogreft yaşam süresini sadece IV ADAS

tedavisi alan Grup IV'e ve hiç tedavi almayan Grup II'ye göre anlamlı olarak uzatmıştır. IV ADAS tedavisi Grup V'te allogreft yaşam süresini istatistiksel olarak anlamlı olmasa da median yaşam süresi değerine bakıldığında sadece SC ADAS tedavisi alan gruba göre olumsuz olarak etkilemiştir. IV (intravenöz) ADAS tedavisi Grup IV'te allogreft yaşam süresini sadece SC. ADAS tedavisi alan Grup III'e, IV (intravenöz) ve SC ADAS tedavisi alan Grup V'e göre anlamlı bir şekilde kısaltmıştır (Tablo 16).

6.2.4. Fotoğraflar/ Görsel Takip

Hiçbir denek grubunda total nekroz gözlenmedi. Grup I'de bir denek postoperatif beşinci günde kaybedildi.

Denek 1:A-B-C



A.7.gün B. 9.gün C.14.gün

Fotoğraf 23: Grup I Otogreft Uygulaması

Denek 1: A-B-C



A.5.gün B. 6.gün C. 7.gün/ nekroz

Fotoğraf 24: Grup II; Allogreft Uygulaması

Denek 1: A-B-C-D-E



A. 5. gün B. 7.gün



C. 9.gün D. 10.gün E. 11.gün /nekroz

Fotoğraf 25: Grup III; Allogreft Uygulaması ve SC ADAS Tedavisi (Denek 1,2 ve 3)

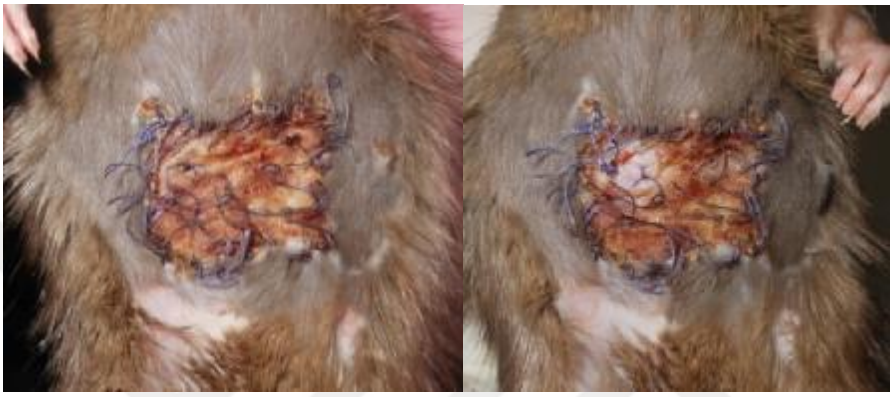
Denek 2: A-B-C-D-E-F



A. 5.gün B. 6.gün



C. 7.gün D. 8.gün



E. 9.gün F. 10.gün/ nekroz

Denek 3: A-B-C-D-E-



A. 5.gün B. 7.gün



C. 8.gün D. 9.gün E. 10.gün/ nekroz

Denek 1:



A. 5.gün B. 6.gün



C. 7.gün D. 8.gün

Fotoğraf 26: Grup IV; Allogreft Uygulaması ve IV ADAS Tedavisi

Denek 1:



A. 5.gün B. 7.gün

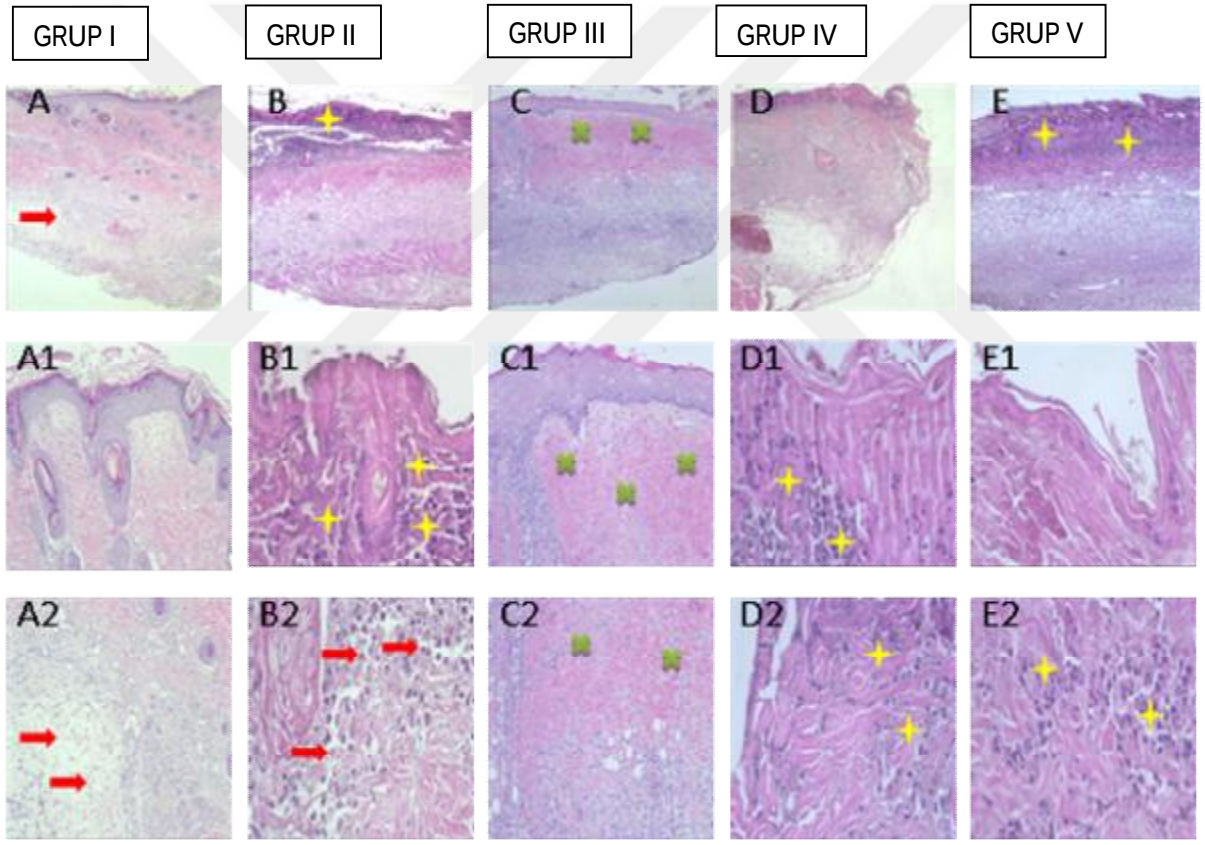


C. 8.gün D. 9.gün nekroz E. 10.gün

Fotoğraf 27: Grup V; Allogreft Uygulaması IV ve SC ADAS Uygulaması

6.3. Histopatolojik Bulgu ve Sonuçlar

6.3.1. 7.Gün Gruplardaki Histopatolojik mikroskobik Görünüm ve Yorumlar



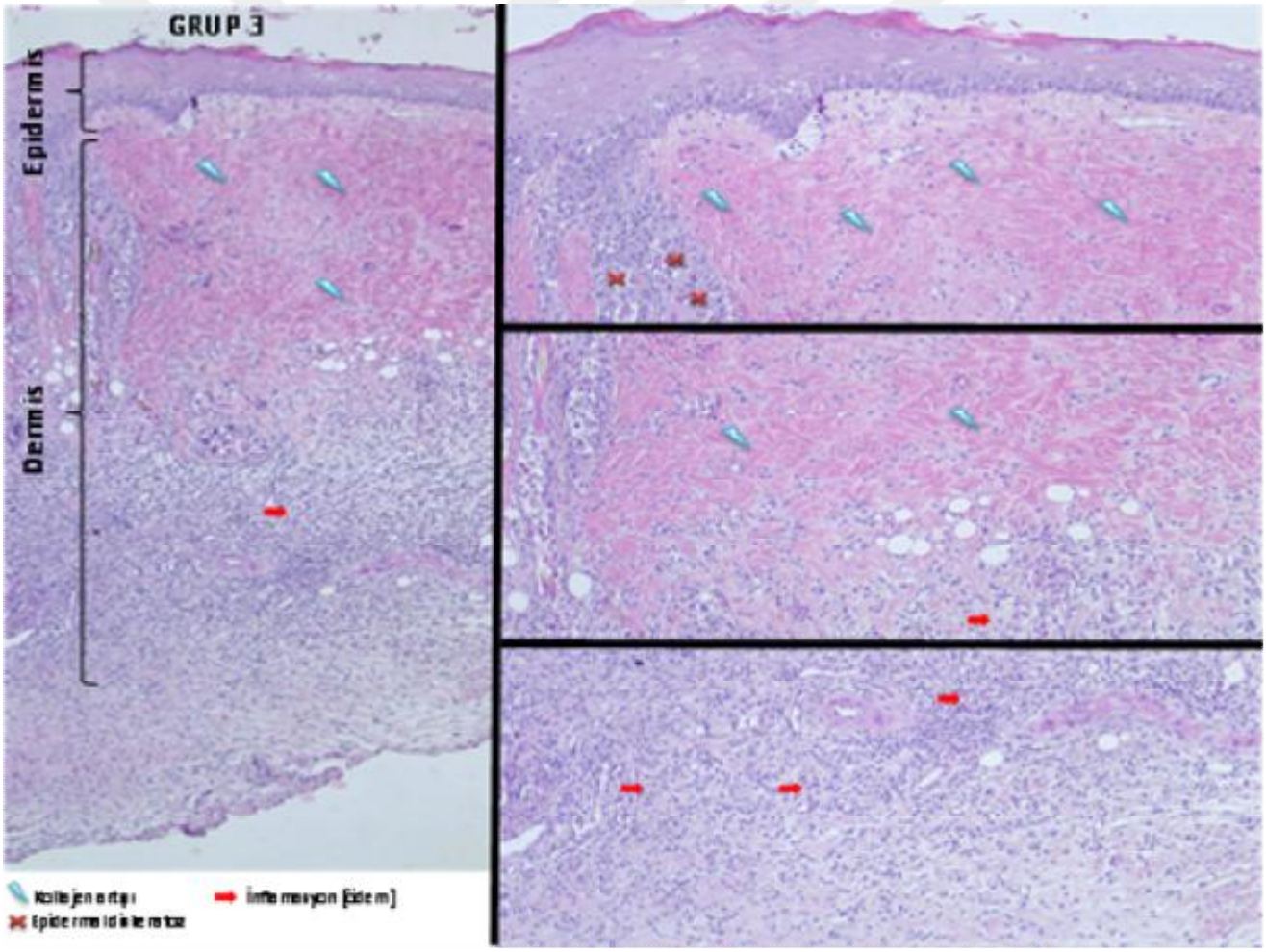
Şekil 48: Gruplara ait H&E boyamaları. (✦Nekrotik alanlar, ➡inflamasyon (ödem), ✖ kollajen artışı)

Grup I'e ait deneklerin deri kesitleri histolojik olarak incelendiğinde (A,A1 ve A2) deri morfolojisinin normal yapıda olduğu gözlendi. Deneklere ait histolojik incelemelerde dermiste hafif ve orta şiddette inflamasyon olduğu gözlendi.

Grup II'ye ait deneklerin deri kesitleri incelendiğinde (B,B1 ve B2) epidermis ve dermis tabakalarında nekroz gözlendi. Ayrıca deri ekleri etrafında (yağ bezi) yoğun inflamasyon gözlendi.
Grup III'e ait deneklerin deri kesitleri incelendiğinde (C,C1 ve C2) epidermiste diskeratoz gözlendi. Dermis tabakasında kollajen artışı ve aynı zamanda yoğun perivasküler inflamasyon gözlendi. (Fotoğraf 28)

Grup IV'e ait deneklerin deri kesitleri incelendiğinde (D,D1 ve D2) epidermis ve dermis tabakalarında nekrotik alanlar gözlendi. Dermiste hemorajik alanlar gözlendi.

Grup V'e ait deneklerin deri kesitleri incelendiğinde (E,E1 ve E2) epidermiste nekrotik alanlar, dermiste yoğun inflamasyon gözlendi. Grup III'te diğer gruplardan farklı olarak kollajen artışı izlenmiştir.



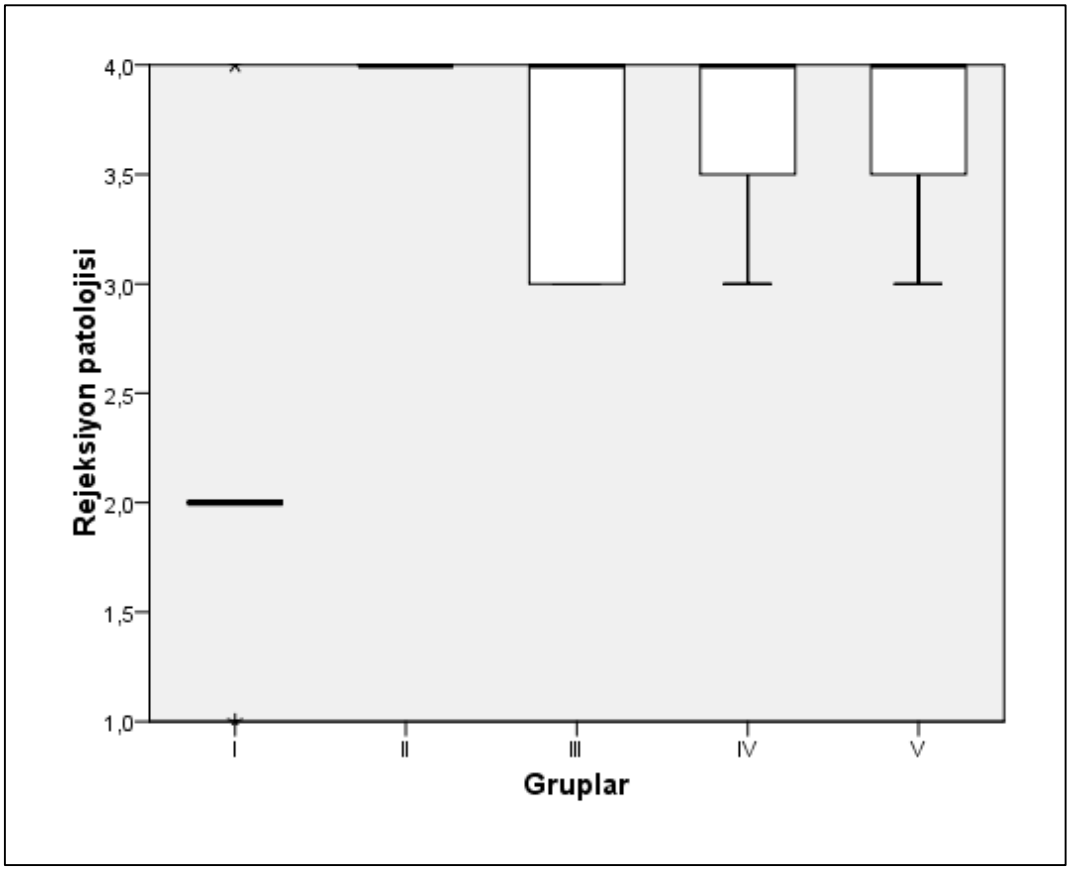
Fotoğraf 28: Grup III: Allogreft +SC ADAS tedavisi alan grup.; yakın histolojik görüntü

6.3.2. Histopatolojik İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel olarak yapılan değerlendirmede histopatolojik skorlar açısından gruplar arasında anlamlı fark bulundu (p=0.013).

İstatistiksel olarak anlamlı fark sadece Grup I (otogreft grubu) ile Grup II-IV-V arasında bulundu. Grup I ve Grup III arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi. Grup II ile Grup III-IV-V arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi.

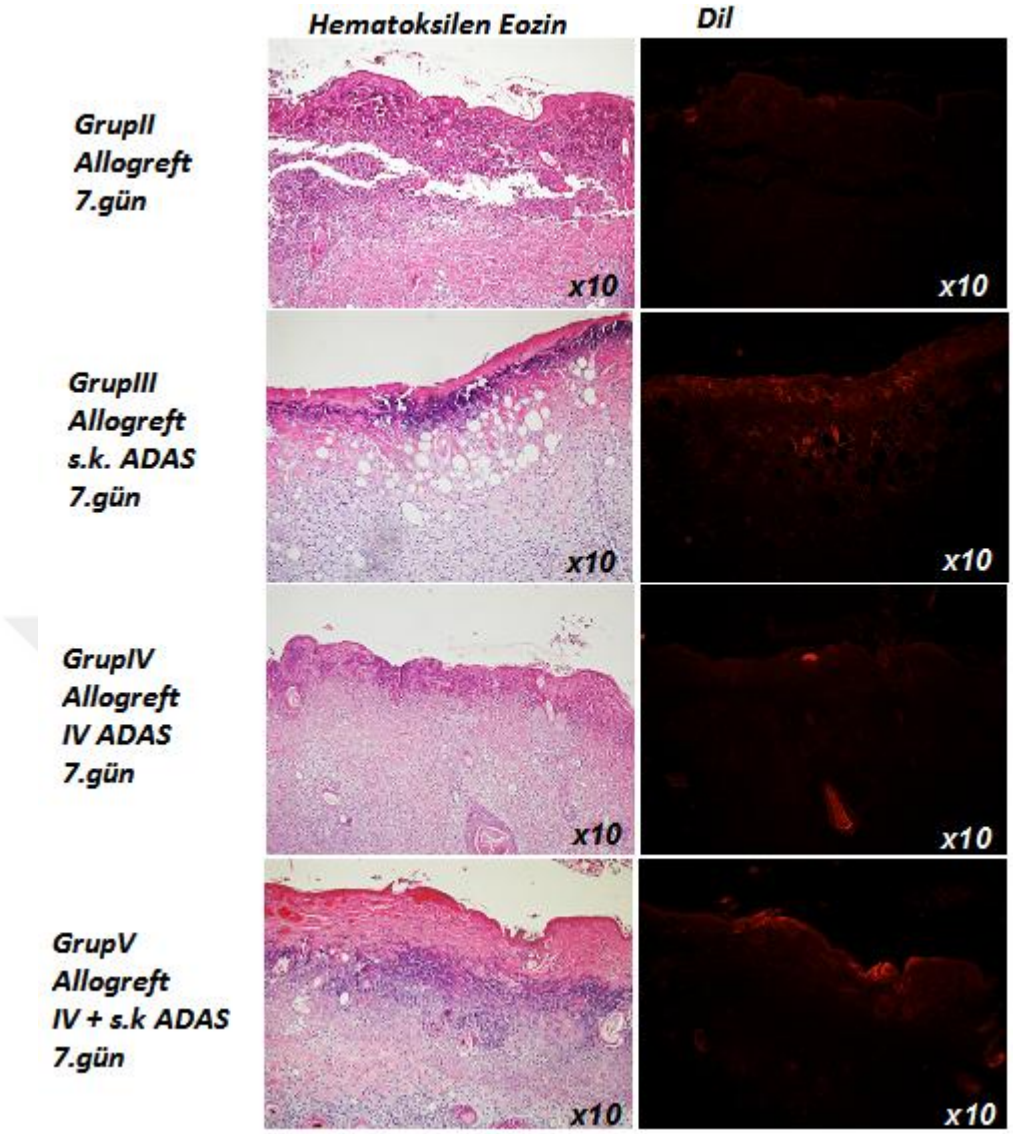
Grup I ve Grup III arasında anlamlı fark izlenmemesi bize Grup II-III-IV-V arasında değerlendirildiğinde Grup III'te histopatoloji sonuçlarının Grup I'e en yakın özellikte olduğunu göstermektedir (Tablo 13) (Şekil 49).



Şekil 49: Kruskall Wallis: Deney gruplarına göre rejeksiyon patolojisi değerlendirmesi /grafi

6.4. Dil Boyası ile değerlendirme

Deri grefti örneklerinden kesitler alınarak mikroskobik incelemeler yapılmıştır. Deney grupları içerisinde SC ADAS enjekte edilen grup (Grup III) ile IV ve SC ADAS enjekte edilen (Grup V) örneklerinde Dil boyalı hücrelerin bulunduğu ve epidermis çevresinde lokalize oldukları belirlenmiştir (Fotoğraf 29).



Fotoğraf 29: İzlem gününde deneklerden alınan deri grefti örneklerinde Dil boyalı hücrelerin varlığının fluoresan mikroskop ile belirlenmesi. Alınan seri kesitlerde H/E boyamaları da ışık mikroskobu ile görüntülenmiştir.

7. TARTIŞMA

A. Carrel tarafından 1900'lu yılların başında mikrocerrahi anastomozun tanımlanması ile cerrahi transplantasyon mümkün hale gelmiştir. Fakat aynı tür içerisindeki faklı genetik canlılar üzerinde yaptığı transplantasyon denemeleri başarısız olan A. Carrel immunolojik allojenik rejeksiyon kavramının doğmasına giden süreçte büyük rol oynamıştır. P. Medavar ve T. Gibson, 1943 yılında deri allogreft rejeksiyonu kavramını ortaya koyarak deri allogreft rejeksiyonu üzerinde çalışmalar yapmıştır (53, 312). P. Medavar tarafından allogreft rejeksiyonunun immunolojik bir cevap olduğu ifade edilmiştir. Bu gelişmelerden 10 yıl sonra Owen tarafından dizigotik ikizlerde fetal sirkülasyonda mevcut vasküler anastomozlar ile oluşan doğal immun tolerans kavramı ortaya konmuş, birbirlerinin hematopoietik hücrelerini aldıkları ve birbirlerinin deri greftine karşı immun tolerans oluşturdukları ve kimeralar oldukları gösterilmiştir. Bilingham, Medavar ve Brent tarafından yenidoğanda intravenöz allojenik hücre enjeksiyonu ile kazanılmış neonatal immun tolerans oluşturulmuş ve allografte yönelik donör spesifik tolerans geliştirilmiştir (59, 313, 314). Organ allogreftlerinin, organ allotransplantasyonu ve immunsüpresif ilaç kullanımı ile donör spesifik immun tolerans oluşturduğu gösterilmiştir. Tüm bu gelişmeler modern transplantasyon immunolojisinin başlangıcı sayılmıştır (55). MHC tanımlanmış (50), immunsüpresifler bulunmuş ve immun tolerans kavramı ortaya konarak, spesifik bir antijene yanıtsızlık hali olan immun tolerans çalışmaları başlamıştır (315). Neonatal kimerizm oluştuğunda, donör spesifik tolerans hali oluşmasına karşın immunokompetan erişkin donörden geçen hematopoietik hücrelerin GVHD oluşturduğunun gösterilmesiyle kapalı döngü bir antijenik immunolojik genetik yanıt olduğu fark edildi (316). 1970'lı yıllara gelindiğinde RT tedavisi ve kemik iliği transplantasyonu myeloproliferatif hastalarda kullanılmaya başlandı (64). 1950'li yıllarda ortaya konulan kimerizm düşüncesi deneysel çalışmalarda uygulanmaya, organ allogreftleri, deri allogreftleri ve vaskülerize allojenik dokulara karşı tolerans indüksiyonunda kullanılmaya başlandı. Hayvan deneylerinde deri rejeksiyonu split tolerans ile uyumlu bir şekilde gerçekleşmekte ve allojenik deriye yönelik tolerans indüksiyonu çalışmaları allogreft yaşam sürelerinde uzama elde edilse bile yeni bulunan ilaçlara rağmen başarısız olmaktaydı. İlk defa Billingham (65) tarafından ortaya atılan split tolerans kavramı ve Boys ve Old tarafından ortaya atılan deri antijenleri kavramını ile allojenik bir dokuya tolerans geliştiren alıcının aynı donörden bir başka allojenik dokuya karşı geliştiremeyebileceği düşünüldü (66). Hayvan deneylerinde sıçanlarda stabil mikst kimerizmin organ allogreftlerinin kabulünde işe yaramasına karşın, deri allorejeksiyonunu önleyemediği split tolerans kavramına uygun şekilde gösterildi (317).

Split tolerans dokuya özel alloantijen grupları, hazırlık rejimindeki eksiklikler, stabil olmayan kimerizm gibi sebeplerle gelişir (314). Dolayısıyla bu dönemde en antijenik yapı olan deri içerikli allogreft transplantasyonlarında deri rejeksiyonu önemli bir bariyerdi. 1987 yılında ilk defa Ilds ve arkadaşları tarafından mikst kimerizmin zenogreft ve allogreftlere tolerans sağladığı raporlandı (318).

1990'lı yılların başında deri içermeyen tendon, sinir, kas, kemik, eklem ve larinks, abdominal kas, dil ve uterus allotransplantasyonu siklosporin ve azatiyopürin rejimleriyle başarılı olarak uygulandı (319). Takrolimus, rapamisin ve MMF'un bulunması ile 1990'lı yılların ortalarında deri içerikli kompozit doku nakilleri için hayvan deneyleri yapan el cerrahları maksimum immunsüpresyon minimum yan etki sağlamayı amaçladılar. Bu amaçla lokal ve IV düşük doz immunsüpresif ilaçlarla, tolerans indüksiyonu ve lenf nodu eksizyonu yaparak hayvan deney modelleri ortaya koydular. Yapılan deneysel çalışmalarda domuzlarda arka bacak naklinde takrolimus, kortikosteroid ve MMF (70) tedavisi allogreftin yaşamını uzatırken minimum yan etki oluşturdu. Gelinen noktada takrolimus ve MMF idame immunsüpresyonda el ve yüz nakillerinde tedavide iyi bir seçenek haline geldi (15). VCA indüksiyon tedavisinde monoklonal antikorlar, akut rejeksiyon ataklarında ise yüksek doz steroid antikor ve yüksek doz takrolimus ve rapamisin infüzyonu halen kullanılmaktadır (9).

2000'li yıllara gelindiğinde insanlarda ilk başarılı el transplantı yapıldı, maksimum immunsüpresyon, minimum immunsüpresif ajan ve yan etki prensibi ile deney hayvanlarında tolerans indüksiyon çalışmaları hız kazandı. Çalışmalarda amaç kompozit doku nakilleri için temel bariyer olan rejeksiyon sürecini engellemek, immunsüpresif dozlarını minimize ederek morbidite ve mortaliteyi azaltmak, deriye yönelik split tolerans kavramına yönelik en etkili tedavi protokolüne ulaşmak, kompozit doku nakillerini etkili bir rekonstrüksiyon seçeneği olarak kullanmak, MHC bariyerlerini aşabilmektir. Günümüzde deneysel çalışmalarda kostimulatuar moleküllere yönelik monoklonal antikorlar, telerojenik ve regülatuar hücre tedavileri (Treg, dendritik hücre), kök hücre tedavileri, non myeloablatif, non sitoredüktif protokollerle hematopoietik kök hücre transplantasyonu ile kimerizm indüksiyonu, gen terapileri gibi tolerans indüksiyon stratejileri ve MSC tedavileri immun modülasyon stratejileri olarak kullanılmaktadır (164).

Stabil mikst hematopoietik kimerizm ömür boyu süren santral delesyonel T hücre toleransı, immunsüpresyon olmadan allogreftin kabulü ile karakterizedir. Kimerizm oluştuğunda donöre ait hematopoietik kök hücreler alıcıda yerleşerek multipl seri hücreler üretmeye başlar. Yeni

bir immun sistem ve denge hali oluşur. Böyle bir durum geliştiğinde artık alıcıda immun süpresyon kullanma ihtiyacı azalır veya kaybolur. Mikst kimerizm 1987 yılında ilk defa Ilds ve arkadaşları tarafından mikst kimerizmin zenogreft ve allogreftlere tolerans sağladığı raporlanmasını takiben kompozit doku allotransplantasyonlarında bir tolerans indüksiyonu metodu olarak kullanılmaya başlandı Bu konuda deneysel çalışmalarda olumlu sonuçlar raporlandı (181-183, 318, 320). Mikst kimeralar donör ve alıcı hücrelerinin beraber bulunduğu alıcılardır. Mikst kimerizm nonmyeloablatif veya myeloablatif metotlarla oluşturulabilir. Timusta gerçekleşen santral tolerans, periferde anerji, delesyon ve süpresif mekanizmalarla oluşan periferik tolerans allojenik transplante edilen dokuya karşı spesifik immun tolerans gelişmesini sağlar. Mikst kimerizm immun defisit yaratmadan, alıcıya en az zarar veren hazırlık rejimi kombinasyonu ile yapıldığında düşük GVHD riski ile iyi bir tolerans indüksiyon stratejisidir. Total myeloablatif metotlar mortalite ve morbidite riski nedeni ile tercih edilmemektedir (173, 321).

VCA'da teorik avantaj VCA'nın kemik iliği içerikli bir dokunun transferi ile kemik iliği transplantasyonu yapmış gibi bir mikro çevre oluşturması ve bu durumun immun modülatuar etki oluşturarak kimerizm indüksiyonu ile donör spesifik tolerans geliştirmesi ve allogreftin yaşam süresini uzatmasıdır (173). VCA'da total deri yükü, antijenik karakter ile lenfoid doku ve komponent (kemik iliği ve lenf nodları) arasındaki denge önemlidir. Allotransplante edilen VCA'da deri içeriği antijenik stimulus yaparken, lenfoid yapılar, vaskülerize transplante edilen kemik iliği içeriği kimerizm oluşturarak immun modülatuar etki yapmaktadır. VCA transplantasyonunda immunolojik yanıtlar immunoloji açısından halen bir çok soru işareti barındırmaktadır. Birçok çalışmacı non myeloablatif metotlarla stabil mikst kimerizm oluşturarak tolerans indüksiyonu oluşturma amacıyla hayvan deney modelleri üzerinde çalışmaktadır. Donörden geçen passenger lökositlerin ve vaskülerize transferi yapılan kemik iliğine ait kök hücrelerin bu kimerizm halinde etkili olduğu düşünülmektedir. Alıcının immun cevabının iyi olmadığı durumlarda, alıcı ve verici arasında doku uyumsuzluğu olduğunda ve lenfoid allotransplant yükü arttıkça GVHD riski artmaktadır. VCA içeriğine ait lenfoid ve vaskülerize kemik iliği komponenti ve VCA'nın alıcı ile hızlı mikrovasküler cerrahiyle sağlanan vaskülerize bağı alıcıda kimerizmin hızlı oluşmasına ve alıcıda immun tolerans gelişimine sebep olması mümkün olarak görülmektedir (322).

Prabhune ve arkadaşları sıçanlarda non myeloablatif hazırlık sonrasında donör kökenli kemik iliği transplantasyonu ve arka bacak allotransplantasyonu uygulamasında mikst kimerizm oluşturarak tolerans indüksiyonu yapmış ve allogreft yaşam süresini uzatmıştır. Bu çalışmada

nonmyeloablatif RT, T hücre deplesyonu yapılmış kemik iliği transplantasyonu ve immunoterapi (MMF ve takrolimus) yapılmış grup hayvanlarda allogreft yaşam süresi uzamış bulunurken hiçbir tedavi almamış kimeralar allografti 10 içerisinde rejekte etmiştir (323).

Demir ve arkadaşları siklosporin monoterapisi ile donör spesifik kimerizm ve tolerans indüksiyonun hemifasiyal allogreft uygulaması üzerinde göstermiştir. Bu çalışmada yapılan siklosporin monoterapisi ile fasiyal allogreftler takip edilmiş, tedavi uygulanmış olan allogreftlerde 21. ve 62. günlerde donör spesifik kimerizm gelişmiş, allogreft yaşam süresi 240 güne kadar uzamıştır. Hiç tedavi almayan allogreftlerde rejeksiyon beş yedi gün içerisinde gerçekleşmiştir (324).

Bu çalışmalarda allojenik kompozit içerikli (lenfoid doku içeren) ve kemik iliği içeren allogreftler kullanılmıştır. Dolayısıyla kemik iliği allotransplantasyonu yapılmıştır. Vaskülerize kemik iliği içerikli nakillerde (sıçanlarda arka bacak nakli) kimerizm yüzdesi artmakta ve tolerans indüksiyonu oluşmaktadır. Buna karşın allogreft rejeksiyonu immunsüpresif kullanılmadığında hızlı bir şekilde izlenmiş ve allogreft yaşam süresi immunsüpresif kullanılmadığında VCA ile beraber allojenik kemik iliği transplantasyonu yapılmış olmasına rağmen anlamlı bir şekilde uzamamıştır. Vaskülerize kemik iliğine ait immun modülatuar etki allogreft yaşam süresini uzatmamıştır.

Bizim uyguladığımız deney modelinde allojenik ADAS tedavisi dışında kimerizm oluşturmaya yönelik hiçbir manipülasyon mevcut değildir. Transplante ettiğimiz allogreft vasküler anastomoz içermeyen tam kat allojenik deri grefti uygulaması olup, boyutu 3x3 cm büyüklüğündedir. Antijenik yükü fazla olup, tolerans indüksiyonu açısından değerlendirildiğinde vaskülerize allojenik kemik iliği yükü olan VCA transplantasyonlarındaki rejeksiyon süreleri ile kıyaslanması mümkün değildir.

Sadece kemik iliği transplantasyonu, siklosporin tedavisi ve böbrek transplantasyonu ile beraber yapılan deneysel çalışmalarda neonatal kimerizm oluşmuş ve deri allogreft yaşam süresi yedi günden 27 güne kadar uzatılmıştır (325). Hayvan deneylerinde sıçanlarda stabil mikst kimerizmin organ allogreftlerinin kabulünde işe yaramasına karşın, deri allorejeksiyonunun önleyemediği gösterilmiştir (317). Geniş seri hayvan deneylerinde kas-iskelet yapıları rejekte edilmezken, cilt rejeksiyonu gösterilmiştir (301) Split tolerans nedeni ile immun süpresyon altında bile deri allogreftlerine karşı immuntoleran oluşturulması zordur (326). Bu güçlükte deriye spesifik antijenler, derinin özel immun sistemi, derinin ekstrasellüler matriksi rol oynar. Deri grefti uygulaması mikrovasküler pedikül transferi veya

doğal vaskülarizasyon süreci ile yapılabilir. Mikrovasküler anastomoz ile yapıldığında avantaj iskemi süresinin az olması ve donöre ait hücrelerin alıcıya erken geçişiyle hızlı kimerizm oluşmasıdır. Fakat vasküler allojenik hücre geçişinin hızlı olması, revaskülarizasyon sürecinin hızlı olması ile alloimmun yanıtın hızlanması dezavantajdır. Doğal vaskülarizasyon süreciyle uygulanmış deri greftlerinde avantaj vaskülarizasyonun geç oluşması nedeni ile immun hücrelerin allojenik grefte geç ulaşması ve immunolojik saldırının geç oluşması, iskemik dönemde lenfatik blokaj olması iken; dezavantajlar erken vaskülarizasyon ile kimerizm gelişmemesi ve iskemik immunolojik doğal immun yanıtın erken dönemde oluşmasıdır. Bu konuda yapılmış çalışmalarda deri allogreft rejeksiyonunu etkileyen anlamlı önemli bir sonuç çıkmamış ve konuya açıklık getirilememiştir. Deri greftlerinde diğer rejeksiyonu etkileyen faktörler deriye özel antijenler (Skn-1, Skn-2, Epa-1), greftin büyüklüğü (antijen yükü), deride mevcut özel immun sistem, deriye ait ekstrasellüler matrikstir (78). Sıçan deneylerinde değişik bölgelerden alınmış mikrovasküler anastomoz içermeyen deri allogreftleri değerlendirilmiş, Langerhans hücrelerinden en zengin olan gövde cildi en çabuk rejekte edilirken, en antijenik bulunmuştur. Langerhans hücreleri ile hızlı allorejeksiyon arasında korelasyon bulunmuştur (327).

Deriye yönelik tolerans kemik iliği transplantasyonu içeren metotlarla yapılabileceği gibi kemik iliği transplantasyonu yapılmadan kısa süreli immun süpresyon, kostimülatör moleküller kullanılarak ve T hücre deplesyon protokolleriyle yapılabilir. (78, 89). T Gibson ve P. Medavar tarafından başlatılan allogreft rejeksiyon sürecine yönelik gözlemlerinin, Owen, Bilingham, Brent'in deriye yönelik tolerans indüksiyonu çalışmalarının üzerinden 60 sene geçmiş olmasına rağmen hala deri allogreft rejeksiyonu mekanizması tam olarak ortaya konamamıştır (78).

Serdar ve arkadaşları allotransplante edilen vasküler anastomoz içeren ve içermeyen deri greftinde allogreftin büyüklüğü, kimerizm yüzdesi ve vaskülarizasyon şeklini siklosporin monoterapisi altında (dört hafta süresinde 16 mg/kg-2 mg /kg) değerlendirmiştir. En yüksek kimerizm yüzdesi vasküler anastomoz içeren deri allogreft uygulamasında saptanmıştır. Vasküler anastomoz içeren deri greftlerinde allogreftin büyüklüğü arttıkça kimerizm yüzdesi artış göstermiştir. Vasküler anastomoz içeren allogreft boyutu arttıkça alıcıya geçen donör kökenli passenger lenfosit miktarı artarken, boyut azaldıkça miktar azalmaktadır. Vasküler anastomoz içermeyen deri greftlerinde kimerizm oluşumunu gösterilmiştir, fakat allogreftin boyutu arttıkça kimerizm yüzdesinin düştüğü gözlemlenmiştir. Vasküler anastomoz içermeyen deri allogrefti uygulamasında (6x6 cm büyüklüğünde) siklosporin monoterapisi ile

48-105 güne dek uzama kaydedilmiştir. (305). Vasküler anastomoz içermeyen deri greftleri allogreft yaşam süresi açısından değerlendirildiğinde tepe değer 150 günün üzerinde, vasküler anastomoz içeren deri greftleri 200 günün üzerinde bulunmuştur. Buradan yola çıkılırsa vasküler anastomoz içermeyen deri allogrefti yerleştirildiğinde greftin vaskülarizasyonu oluşana kadar erken anastomozlarla alıcıya donör kökenli lenfatik hücreler ve donöre ait lenfositler hızlı geçemez. İskemi süresi artar. Erken dönemde vasküler anastomoz içeremeyen allogreft uygulamasında derinin boyutu arttıkça antijen yükü artar. Kimerizm oluşma ihtimali geç vaskülarizasyon nedeni ile gecikeceği için tolerans indüksiyonu daha zordur. Bu çalışma baz alındığında rejeksiyon hızı transplante edilen derinin boyutuyla yani antijen yük artışı ile artar ve kimerizm yüzdesi azaldıkça azalır (78).

T hücre deplesyon protokolleri (siklosproin ile kombine edilmiş TCR ve FK506) ile yapılan bir çalışmada 3x4 cm büyüklüğünde vasküler anastomoz içeren deri grefti uygulamasında allogreft yaşam süresinin 84 güne kadar uzadığı ve donör spesifik kimerizm geliştiği gösterilmiştir. Hiç tedavi almamış gruplarda allorejeksiyon ortalama beş ile yedinci günlerde gözlenmiştir (328). ATG tedavisi ile 22-26 güne kadar deri allogreft yaşam süresinde uzama ortaya konmuştur. T hücre deplesyonu periferik tolerans indüksiyon mekanizmasında rol oynar (329).

Primatlarda tekrarlayan kostimülatuar molekül (anti CD158) uygulamalarında deri allogreft yaşam süresinde yedi günden 13 güne dek uzama sağlamıştır. Rapamisin donör, spesifik kan transfüzyonu ve kostimülatuar moleküller (anti CD158 antikor) ile yapılan bir çalışmada deri allogreft yaşam süresi 142 güne dek uzamıştır. Deri allogrefti eritematöz bulguların takibi, palpasyon ile takip edilmiş ve total ülsere nekroz geliştiğinde nekroz olarak kabul edilmiştir (330).

Telerojenik hücrelerin keşfiyle beraber tolerans indüksiyon çalışmaları bu hücreler üzerinde yoğunlaşmaya başlamıştır. Treg hücrelerin allojenik antijene yanıtta T efektör hücrelerin aktivasyonunu engelleyerek immun sistem üzerinde süpresör etki yaptığı gösterilmiştir (331). Bozulic ve arkadaşları sıçan deneylerinde Treg hücrelerin Periferik toleransta etkili olduğu göstermiştir (332). Tolerans indüksiyonunda, GVHD'de ve rejeksiyon ataklarında kanda ve dokulardaki klinik periyotlara göre Treg seviyeleri hakkında deneysel çalışmalar mevcut olmakla beraber konu halen tartışmaya ve araştırmaya açık görünmektedir (333).

Antijen spesifik Treg hücrelerin deri allogreft yaşam süresine etkisini araştıran bir in vivo deneysel çalışmada hiçbir tedavi alamayan deri allogrefti yaşam süresi ortalama 6.9 gün

olarak rapor edilmiştir. Bu çalışmaya göre donör alloantijenleri ile muamele edilmiş alıcıya ait immatür dendritik hücre kültür ortamında çoğaltılan antijen spesifik Treg hücreler ve immunsüpresif tedavi allogreft yaşam süresinde 19 güne kadar anlamlı uzama gösterilmiş (75).

Plastisitesi yüksek bir telerojenik hücre olan dendritik hücrelerle yapılan immun tolerans çalışmalarında; alıcıya ait immatür dendritik hücreler alloantijen stimülasyonu sonrasında puls olarak verilmiş. Gruplarda hiçbir tedavi almayan grupta sıçan arka bacak transplantasyonunda allogreft yaşam süresi 5-14. gün olarak değişmiş. Tedavi gruplarından siklosporin, antitimosit globülün ve dendritik hücre tedavisi alan grupta en yüksek allogreft yaşam süresi ve Treg hücrelerde artış tespit edilmiş (27).

Alıcıya ait Treg hücrelerin donöre ait immatür dendritik hücrelerce stimüle edilerek kullanılması sonrası uygulanan tedavi ile allojenik deri grefti yaşam süresi 17 güne çıkmıştır. Hiç tedavi almayan grupta 6.9 gün olarak raporlanmıştır (75).

Rekombinant IL-10 ve yüksek ve düşük doz siklosporinle (5/10 mg kg) intramüsküler kombine tedavide tavşanlarda allogreft süresinde uzama kaydedilirken hiç tedavi almamış grupta 1,5x1,5 cm büyüklüğünde allogreft rejeksiyonu ortalama beş günde gözlenmiştir (334).

Mikst kimerizmin tolerans indüksiyon çalışmalarında kullanılmaya başlamasıyla klinik pilot çalışmalarda allojenik böbrek ve aynı anda donörden yapılan kemik iliği transplantasyonlarında allotolerans oluşturulmuş ve antitümör etkilerde (GVHD) gerileme sağlanmıştır (335).

Kemik iliği transplantasyonu nonmyeloablatif hazırlık sonrasında mikst kimerizm oluşturmaktadır. Buradan yola çıkarak kemik iliğinde bulunan MSC'lerin tolerans indüksiyonu için kullanımı ile ilgili in vitro ve in vivo deneysel çalışmalar başlamıştır. Kemik iliği kökenli hematopoietik kök hücreler kemik iliği içerisinde özel bir mikro çevrede tüm hematopoietik seri hücrelere dönüşebilmektedir. Kemik iliğinden elde edilen MSC'ler bir çok mezenkimal hücre tiplerine dönüşebilen multipotent nonhematopoietik progenitor hücrelerdir (336). Yapılan deneysel çalışmalarda kemik iliği kökenli MSC'lerin ve ADAS'ların immun sistem hücreleri üzerindeki immun modülatuar etkileri in vivo ve in vitro olarak gösterilmiştir. Mezenkimal kök hücreler immun sistem hücreleri üzerinde çözünür faktörler ve hücre-hücre kontakt mekanizmaları ile etkili olur. Mezenkimal kök hücrelerin immun T hücreleri üzerinde düzenleyici etki ile modülatuar karakterleri in vitro ve in vivo çalışmalarda

gösterilmiştir (227). Bu etkileri ile T hücre aktivasyon ve proliferasyonunu baskılar, Th1 yolağını Th2 tarafına çevirir. MSC'ler dendritik hücre diferansiyasyon ve matürasyonu inhibe eder, dendritik hücrelerin telerojenik hücrelere dönüşümünü sağlar. Treg hücre indüksiyonu yapar. Dendritik hücrelerin göç özelliğini azaltarak T hücre aktivasyon inhibisyonu yapar (281). NK hücre aktivasyonunu inhibe eder. B hücrelerinin aktivasyonunu inhibe eder. Mezenkimal kök hücreler immun sistem hücreleri olan antijen sunan hücreler (dendritik hücre makrofaj), NK, B ve T hücreler üzerinde uygun mikroçevre ve stimulasyonda immun regülatuar etkileşime girer. Birçok çalışma mezenkimal kök hücrelerin immunojenik kostimulatuar moleküller içermediğini ve alloreaktif T hücre uyarısı yapmadığını göstermiştir (337).

İlk olarak Bartholomew tarafından kemik iliği kökenli MSC'lerin immunsüpresif kullanılmadan deri allogreftinin ve üçüncü bir donörden transplante edilen deri greftinin yaşam süresini maymunlarda 7 günden 11.3-11.8 güne kadar uzattığı gösterilmiştir. Fakat burada uygulanan deri greftinin boyutu raporlanmamıştır. Nekroz total eskar formasyonu ve epidermisin sıyrılması olarak değerlendirilmiştir. Burada donöre ait kemik iliği kökenli kök hücreler IV ve SC kullanılmış, doz 1.14-3.6X10^7 uygulanmıştır. Subkutan uygulama yapılan hayvanlar teknik nedenlerle kaybedildiği için değerlendirilememiştir. Deri greftinin boyu olmadığı için çalışma sağlıklı değerlendirilememiştir (279).

Sıçanlarda kemik iliği transplantasyonu ile beraber yapılan 1x1,5 cm büyüklüğünde allogreft uygulamasında sadece MSC tedavisi alan grupta 16.6 gün yaşam süresi gösterilmiştir. Kontrol grubunda 15.5 gün yaşam süresi bildirilmiştir. Kemik iliği kökenli hematopoietik kök hücre transplantasyonu ve kemik iliği kökenli MSC transplantasyonu ile allogreftte bir yılı aşkın yaşam süresi bildirilmiştir. Burada kullanılan deri grefti boyutu düşük olup bizim uyguladığımız allogreftin antijen yüküne göre altı kat daha azdır ve donör kemik iliği kökenli MSC kullanılmıştır (338)

Sbano sıçanlarda yaptığı bir çalışmada siklosporin kullanılmadan yapılan donör kemik iliği kökenli kök hücrelerin IV uygulama ile hızlanmış deri allogreft rejeksiyonuna (1,5x1,5 cm) yol açtığını göstermiştir, bu grupta 13 günde rejeksiyon gelişmiştir. Kemik iliği kökenli MSC'lerin allojenik ve IV uygulandığında siklosporin tedavisi alınmadığında; siklosporin tedavisi ve MSC tedavisi almayan kontrol grubuna (17 gün) göre allogreftin daha çabuk rejekte olduğu (13 gün) gösterilmiştir. Kemik iliği kökenli MSC'lerin IV ve immunsüpresif kullanılmadığında ve donörden alındığında antijenik olduğu yönünde fikir beyan edilmiştir.

Allojenik IV kemik iliği kökenli MSC tedavisine siklosporin eklendiğinde allogreft yaşam süresi 19 güne çıkmıştır. Çalışmada dikkat çeken özellik siklosporin tedavisi altında allogreftin yaşam süresinin hiçbir tedavi almayan gruba göre daha düşük raporlanmasıdır. (15 gün). Klasik literatürle örtüşmemektedir. Burada antijenik yük bizim çalışmamıza göre dokuz kat daha azdır ve kullanılan allojenik kök hücre kemik iliği kökenli kök hücredir (280).

Badillo hiçbir tedavi almayan immun defisiti olmayan sıçanlarda yapmış olduğu bir çalışmada kemik iliği kökenli allojenik MSC'lerin immunojenik olduğunu 1,5x 0.5 cm allogreft rejeksiyon izlemi ile ve kontrol gruplarıyla kıyaslamalarla in vivo ve in vitro olarak da hücresel ve humoral alloimmun cevabı arttırdığını göstererek ifade etmiştir. Allojenik kemik iliği kökenli MSC tedavisi alan grupta allogreft rejeksiyon median değeri 6.71 ± 0.39 gün olarak bildirilmiştir (339).

Kompozit doku transplantasyonu yapılan deneysel çalışmalarda allojenik MSC tedavisinin allogreft yaşam süresini uzattığı ve immun modülasyon yaptığı gösterilmiştir. Domuzlarda yapılan bir çalışmada hemifasiyal allogreft uygulaması ile beraber siklosporin ve donör kemik iliği kökenli MSC uygulaması akut rejeksiyon atakları ve inflamasyonu azaltırken, allografte toleransı arttırmış ve allogreft yaşam süresini anlamlı olarak uzatmıştır. MSC'ler salgıladıkları sitokinler üzerinden T hücreler üzerinde immun modülasyon yapmıştır. Aynı çalışmada hiçbir tedavi almayan kompozit içerikli allogreft grubunda 7- 9 günde allogreftler rejekte olmuştur (340). Burada kemik iliği içermeyen bir uygulama mevcuttur. Dolayısıyla kemik iliği transplantasyonu ve kimerizm indüksiyonu yoktur. Sıçanlarda yapılan deneysel çalışmalarda kemik iliği kökenli allojenik MSC tedavisinin arka bacak transplantasyonunda Rapamisin, total vücut ışınlama, anti timosit globulin tedavisi ile allogreft yaşam süresini uzattığı gösterilmiştir (20).

ADAS hücrelerinin MSC'lere benzer diferansiyasyon potansiyeli, in vivo (304, 341) ve in vitro (342) immunsüpresif kapasitesi (265) vardır. Kolay elde edilebilir olması, daha yüksek yoğunlukta bulunması ve minimal donör morbiditesi nedeniyle ADAS hücreleri bir alternatif tedavi olarak düşünülmüş ve deneysel çalışmalar başlamıştır.

Donör kökenli, alıcı kökenli ve üçüncü bir vericiden elde edilen intraperitoneal verilen $5x10^5$ ADAS'lar, farelerde 1-2 cm çaplı deri allogreftleri yerleştirilerek çalışılmış. Rejeksiyon zamanlaması olarak tedavi almayan grupta ortalama yaşam süresi 12 gün bulunurken, üçüncü bir alıcıdan ve alıcı kökenli ADAS alan grupta yaşam süresi 11 gün olarak bulunmuş (304). Allojenik MSC tedavisi alan grupta allogreft yaşam süresi uzayarak ortalama 17 gün olarak

raporlanmış. Bu çalışmaya kıyasla çalışmamızda kullanılan antijenik yük çok daha fazla olup (3x3cm büyüklüğünde allogreft uygulaması yapılmıştır.), ADAS'ların tedavi protokolü ve uygulaması farklıdır. Aynı zamanda deney düzeneğimizde IV ve SC ADAS uygulaması ve IV+SC uygulaması ayrı ayrı gruplarda gözlenmiş olup ADAS veriliş biçimi (protokol) farklıdır ve gruplar arası değerlendirmeler yapılmıştır. Çalışmamızda ADAS'ların hem in vivo allogreft yaşam süresi üzerindeki etkileri gözlenmiş, hem de veriliş biçimlerine göre ADAS'ların allogreft rejeksiyonuna etkisi gözlemlenmiş ve karşılaştırılmıştır.

Sıçanlarda allojenik siklosporin ve antimosit globulin tedavisi altında arka bacak transplantasyonu yapılan bir çalışmada $2x10^6$ dozda 7., 14., 21. günde IV uygulanan donör kökenli ADAS'ların allogreft yaşam süresini 150 günün üzerine çıkardığı gösterilmiştir. Hiçbir tedavi almayan grupta sekiz gün içerisinde rejeksiyon izlenmiş (43).

Sıçanlarda yapılan arka bacak transplantasyonunda, tiletamine ve zolazepam altında donör kökenli ADAS peroperatif ve operasyonu takiben 3 günde $1x10^5$ olacak şekilde, 4 doz olarak IV verilmiş. Transplante edilen arka bacak ADAS tedavisi alan grupta rejeksiyon 12.0 ± 3.7 gün, tedavi almayan grupta ortalama 6.8 ± 1.4 günde gerçekleşmiş. Arka bacak naklinde ADAS tedavisi almayan gruba göre alan grupta allogreft yaşam süresinde anlamlı uzama gözlenmiştir (252). Fakat bu çalışmalarda kompozit içerikli doku ve beraberinde kemik iliği transplantı yapılmış olup tolerans indüksiyonu yapılmıştır. Dolayısıyla hiçbir tedavi almaksızın sekiz ve 12 gün süresi bir vaskülerize kemik iliği transplantı ve teorik olarak kimerizm halinde yani tolerans indüksiyonu altında bulunmuş bir süredir.

Mezenkimal kök hücrelerin otojenik, allojenik ve üçüncü bir donörden kullanımı ile ilgili farklı yönde yayınlar vardır. Allojenik MSC kullanımı ile ilgili tartışmalı konular vardır. Bazı çalışmalar olumlu sonuçlar raporlarken bazıları olumsuz sonuçlar raporlamıştır. Han ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kemik iliği kökenli MSC ve embriyonik MSC'lerin allogreft rejeksiyonunu engellemediğini raporlamıştır (287). Sıçanlarda yapılan bir çalışmada bahsettiğimiz üzere donör kökenli kemik iliği MSC'lerin siklosporin altında tolerans indüksiyonu yapmasına rağmen tek başına kullanıldığında hızlı rejeksiyona sebep verdiği gösterilmiş; donör kökenli MSC'lerin antijenik olup olamayacağı yönünde bir tartışma konusu açılmıştır (280). Buna tam ters bir şekilde yine bahsettiğimiz üzere maymunlarda allojenik kemik iliği kökenli MSC transplantasyonun allogreft rejeksiyonunu yukarıda belirtildiği üzere boyutları belirsiz vasküler anastomoz içermeyen bir deri greftinde standart

bir protokol ve uygulama ile olmamak kaydıyla in vivo çalışmalar gözlenerek IV ve tek başına uygulandığında geciktirdiği yönünde yayınlar da vardır (279).

Cashiragi semiallojenik kalp transplantasyonu öncesinde allojenik mezenkimal kök hücre monoterapisinin allogreft yaşam süresini kısa süreli uzattığını raporlamıştır (343). Bu çalışma akut rejeksiyonun önlenmesine karşın, kronik vaskülitin allogreftte önlenemediğini, solid organ transplantasyonunda göstermiştir. Pop ve Egghenhofer allojenik MSC transplantasyonun kardiyak allogreftlerde alıcıda donör spesifik immun yanıt başlattığını kalp allogreft rejeksiyonunu hızlandırdığını raporlamıştır (344).

Farelerde yapılan bir deneysel çalışmada allojenik kemik iliği transplantasyonu yapılan alıcıda kemik iliği kökenli allojenik MSC uygulaması yapılmıştır. MSC'lerin T hücre proliferasyonunu engellediği, kimerizm indüksiyonu yaptığı, donör antijenlerine tolerans sağladığı gösterilmesine rağmen, alıcıda kemik iliği engreftmanını azalttığı raporlanmış, allojenik MSC'lerin immunolojik olabileceği fikri ortaya konmuştur. Dikkat çekilen nokta allojenik MSC'lerin in vivo T hücre proliferasyonunu engellemesine donör ve alıcıya spesifik antijenlere allotoleransı olan kemik iliği hücrelerinin engreftmanını artırmasına karşın, dalak hücrelerinde donör hücrelere karşı güçlü proliferatif ve immunolojik etki yaparak engreftman sonrası donöre ait engreftman sağlayan kök hücrelerin yaşam süresini düşürmesidir. Burada MSC'lerin bellek T hücrelerin proliferasyonunu tetiklediği düşünülmüştür (345).

Zenojenik ADAS uygulaması çalışmalarında insan kökenli ADAS ($3x10^6$) ve donör kökenli kemik iliği hematopoietik kök hücre transplantasyonu ve minimal hazırlık rejimi ile sıçanlarda 4 cm^2 lik bir allojenik deri greftinde yaşam süresini 200 günün üzerine çıkardığı gösterilmiştir (286).

Transplantasyon toleransı çalışmalarında zenojenik, üçüncü bir kişiden, allojenik veya otolog kökenli ADAS'ların SC ve IV uygulamada kullanımı in vivo immunsüpresif etkileri araştırma konusudur. Uygulanan protokoldeki tedavi zamanlamaları da henüz konuda etkin bir çalışma olmadığı için ayrı bir araştırma konusudur (281).

Bizim çalışmamızda immun defisiti olmayan sıçanda immunsüpresif kullanılmadan allojenik kullanılan ADAS SC ve IV olarak standart bir protokolle preoperatif, peroperatif, postoperatif olmak üzere IV ve cerrahi gününde SC olarak uygulanmıştır. Allogreftin boyutu 3x3 cm (9 cm^2), non-vaskülerize olup, ADAS tedavisi dışında herhangi bir tolerans indüksiyonu mekanizması devreye girmemiştir. Sonuçlarımızda SC ve IV ADAS tedavisi tüm allogreft

uygulamalarında allogreft yaşam süresini istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde uzatmıştır. En yüksek median allogreft yaşam süresi sadece SC ADAS uygulaması yapılan grupta gözlenmiştir. Gruplar karşılaştırıldığında SC allojenik ADAS uygulaması yapılan grupta ve SC+IV ADAS uygulaması yapılan grupta allogreft yaşam süresi sadece IV ADAS tedavisi kullanılan gruba göre anlamlı olarak uzamıştır. Dolayısıyla tek başına allojenik IV ADAS kullanımının SC ve IV+SC ADAS kullanımına göre allogreft yaşam süresini azalttığı in vivo olarak sıçanlarda gözlemlenmiştir. Tek başına IV ADAS uygulaması allogreft yaşam süresinde hiçbir tedavi almayan allogreft yaşam süresine göre anlamlı uzama sağlamış olsa da sadece SC ve SC+IV ADAS kullanılan gruba göre allogreft yaşam süresini anlamlı biçimde azalmıştır. SC+IV ADAS tedavisi sadece SC ADAS uygulaması yapılan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde olmasa da allogreft yaşam süresini azalmıştır. Dolayısıyla burada tek başına IV allojenik ADAS kullanımının bir tolerans indüksiyonu metodu olarak allorejeksiyonu SC ve IV+SC allojenik ADAS kullanımına göre hızlandırmış olduğu gözlenmiştir. IV+SC ADAS kullanımı ile allogreft yaşam süresinin sadece SC ADAS kullanımına göre düşük olması istatistiksel olarak anlamlı olmasa da aynı düşüncemizi kuvvetlendirmektedir. Literatürde henüz böyle bir çalışma mevcut değildir (281).

Çalışmamızda yedinci günde alınan histopatolojik değerlendirmelerde Banf histopatolojik değerlendirmesine göre gruplar arasında anlamlı bir istatistiksel fark bulunamamıştır. Histopatolojik Banf skorlaması hasta yönetiminde, araştırmalarda, veri değerlendirmelerinde ve istatistiksel değerlendirmelerde objektiflik ve standardizasyon sağlar. Fakat sınırlamaları mevcuttur. Gözlemcinin tecrübesizliliği nedeni ile T hücre dominant inflamatuar reaksiyon ve allorejeksiyon karakteristiği karıştırılabilir. Sınırda (Borderline) akut rejeksiyon ile akut rejeksiyon arasında kesişmeler olduğunda tanıda güçlük çıkabilmektedir (122). Bu konu önemli bir tartışma konusu olurken organ transplantasyonlarında histopatolojik akut rejeksiyon bulgusu klinik yaklaşım olmadan yetersiz görülmektedir (346). Bazı çalışmalarda VCA hayvan deneylerinde histopatolojik olarak ciddi dereceli rejeksiyon gözlenmemesine karşılık klinik olarak rejeksiyon bulgusu gözlenmemiştir (122, 347). Allogreft rejeksiyonun histopatolojik Banf skorlaması değerlendirmesi ciddi tecrübe isteyen ve allogreft rejeksiyon değerlendirmesinde standardizasyon sağlayan bir yöntem olmasına karşın güvenilirliği hakkında tartışmalar mevcuttur. Çalışmamızda yedinci günde değerlendirilen patolojik örneklerin arasında hiçbir tedavi almayan allorejeksiyon grubu ile ADAS tedavisi uygulanan allogreft grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Denek sayısının azlığı, histolojik kesitlerin patolojik örnekten alınma biçimi, skorlamanın dermal nekroz odağının gözlenip

gözlenmemesine göre yapılması (Banf skorlaması) bu sonuca yol açmış olabilir. Histopatolojik incelemelerde sadece SC ADAS tedavisi alan grupta farklı olarak kollajen oluşumu ve daha az dermal nekroz odakları gözlenmiştir. Bu gösterge SC ADAS tedavisi yönünde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da olumlu bir gösterge olarak kabul edilebilir. Değerlendirmede daha sık aralıklarla örnek alınırsa ve histolojik kesitler daha çok alınırsa ve immunsüpresif tedavi ile beraber uygulanırsa istatistiksel sonuçlar değişken olabilir.

Dil boyası ile kök hücrelerin allogreft sahasına yerleşimi immunfluoresan altında histopatolojik örnekler incelendiğinde gözlemlenmiştir. Deri allogrefti uygulamalarında dil boyası ile kök hücrelerin işaretlenmesi tekniği kök hücrelerin hedef sahada olup olmadığına yönelik bir bulgu olarak kullanılabilecek güvenilir bir metot olarak kullanılabilir.

8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda ortaya koyduğumuz tolerans indüksiyon stratejisi multipotent ADAS'ların allogreft rejeksiyonuna olan etkilerini ortaya koymak üzerinden planlanmıştır. MSC'lerin son yıllarda ortaya çıkan immun modülatuar etkileri literatüre geçmiş olup yağ dokusundan elde edilen ADAS'ların özellikleri de kemik iliği kökenli MSC'lerin immun modülatuar özellikleriyle aynı bulunmuştur. Bu durum kolay elde edilmesi donör alan morbidite ve mortalitesinin az olması ve bu konuda yapılmış çalışmaların sınırlı sayıda olması dolayısıyla bizi bu tolerans indüksiyonu üzerinde çalışmaya ve gözlem yapmaya yönlendirmiştir. İmmun modülatuar strateji ortaya konurken MSC'lerin kullanıldığı dozlar, elde edildiği pasaj sayısı hakkında literatürde yapılmış çalışmalar baz alınmıştır.

ADAS'ların veriliş günleri açısından çok çeşitli stratejiler denenmiş olup bizim ortaya koyduğumuz immun modülatuar stratejimizde, veriliş biçiminde, deney düzeneğinde uygulama mevcut değildir. Hem preoperatif yedinci günde hem peroperatif hem de postoperatif üç ve yedinci günde uygulayarak ADAS etkisini mümkün olduğunca geniş bir zaman diliminde etkili kılmaya çalıştık. MSC'lerin MHC II molekülleri ve kostimülatuar molekül taşımadığına ve immun sistemden kaçtığına, vücutta yıkılmadığına yönelik yapılmış yayınlar bizi preoperatif ADAS uygulaması yapmaya yönlendirmiştir. MSC'lerin allojenik, otojenik, üçüncü bir kişiden ve zenojenik olarak uygulamasına yönelik çok sayıda çalışma vardır. Birbirini destekleyen sonuçlar olduğu gibi tam tersi yönde sonuçlarda ortaya konmuştur. ADAS'ların uygulama biçimi ve bu biçimin allorejeksiyona olan etkileri gruplar değerlendirildiğinde onların allogreft rejeksiyonuna etki mekanizmaları üzerinde bize in vivo yaptığımız deneysel çalışmada fikir vermiştir. Uyguladığımız allogreft boyutları ve vaskülarizasyon biçimi itibari ile immun modülasyon ve immun tolerans stratejimizle modüle edilmesi oldukça zor bir vasküler anastomoz içermeyen tam kat allojenik deri greftidir.

Deri allogreftlerine yönelik tolerans indüksiyonu çalışmaları 1940'lı yıllarda başlamış olup halen bir araştırma konusudur. Split tolerans kavramı derinin allojenik reaksiyonu halen aydınlatılamamıştır ve split rejeksiyon immunsüpresif ilaçlar kullanılmadan mevcut immun tolerans stratejileriyle aşılamamıştır. İmmun modülasyon stratejilerdeki temel amaç immun tolerans oluşturmak, immunsüpresif ilaç dozlarını minimize etmek ve azaltarak ortadan kaldırmaktır. İnsanlarda oluşmuş fonksiyonel ve estetik deformitelerin tedavileri otolog rekonstrüksiyonlar tükendiğinde protez ve epitez uygularımı dışında yapılamamaktadır ve

ancak sınırlı sayıda ve seçilmiş vakalarda uygun endikasyonlar sağlandığında allogreft transplantasyonu yapılabilmektedir.

Doku mühendisliği alanda yapılan çalışmalar, kök hücre ve gen tedavilerinde yeni gelişmeler, immunolojik mekanizmaların anlaşılması ile yeni immun tolerans stratejileri oluşturulurken split tolerans aşılmaya ve VCA'lar yaygın bir rekonstrüksiyon seçeneği olarak ortaya konmaya çalışılmaktadır.

Bir başka önemli konu olan yanık hastalarında yüzey alanı büyüdüğünde oluşan sistemik inflamatuar ve enfeksiyöz yanıt, donör alan yetersizliği, morbidite ve mortalite sebebidir. Bu hastaların akut dönem tedavilerinde biyosentetik çeşitli kök hücre içeren allojenik ve zenojenik doku mühendisliği ürünleri, allogreftler kullanımdadır. Fakat erken dönemde komplikasyonları azaltmaya yönelik yapılan bu tedaviler allogreft immun rejeksiyon nedeni ile rejeksiyon sonrası otolog deri grefti ile rekonstrüksiyonu zorunlu kılmaktadır. Deriye yönelik immun tolerans çalışmalarının yanık hastalarının erken dönemde rekonstrüksiyonu ve yaşamsal desteği ve allogreftle rekonstrüksiyon açısından önemli gelişmelere yol açabilmesi söz konusudur.

Yaptığımız in vivo deneysel çalışmada ADAS'lar allogreft rejeksiyonunu tedavi olarak uygulandığı tüm gruplarda anlamlı olarak geciktirmiştir. En yüksek allogreft yaşam süresi sadece SC ADAS uygulaması yapılan grupta bulunmuştur. IV ADAS uygulaması tek başına uygulandığı diğer gruplara göre rejeksiyonu geciktirmiş olsa da anlamlı olarak daha erken rejeksiyona sebebiyet vermiştir. Buradan yola çıkıldığında IV ve SC ADAS tedavisinin allogreft rejeksiyonunu geciktirme açısından immun modülasyon stratejisi olarak tedavide beraberinde başka ajanlarla kullanılabileceğini ortaya koymuştur. Tek başına SC ADAS tedavisinin IV ADAS tedavisi alan gruba göre allogreft yaşam süresinde anlamlı olarak uzama sağlaması, tek başına kullanıldığında en uzun allogreft yaşam süresi sağlamada yeterli olduğunu ortaya koymuştur. ADAS'ların SC ve IV uygulamada in vivo in vitro immun modülatuar etkileri üzerinde alternatif çok sayıda immun modülatuar strateji içeren çalışmaya ihtiyaç vardır. Aynı zamanda ADAS'ların veriliş zamanı ve dozlar üzerinde daha fazla kombinasyonla yapılmış hayvan deneylerine konu hakkında yoğun literatür birikimine ihtiyaç vardır.

Önerimiz kombine immunsüpresif ajanlarla yeni stratejiler oluşturulması, doz ve zamanlama için daha fazla in vivo ve in vitro çalışma yapılarak konunun desteklenmesidir. Allogreft rejeksiyonunun moleküler ve immunolojik alt yapısına yönelik daha fazla in vitro çalışmaya

ihtiyaç vardır. Split rejeksiyon kavramının aşılması immunoloji alanında ve plastik cerrahi alanında yeni bir aydınlanma olacak ve rekonstrüktif alanında allorekonstrüksiyon çağını açacaktır. Otolog kaynakların tükendiği mortalite ve morbiditesi yüksek yanık vakalarında oldukça etkili bir şekilde allogreft kullanımının yolunu açacaktır. Otolog kaynakların tükendiği durumlarda veya hızlı allojenik deri rekonstrüksiyonu gerektiren yüksek yüzdeli yanık hastalarında allojenik doku mühendisliği ürünleri kullanımında temel bariyer olan allogreft rejeksiyonu aşıldığında bu alanda daha kolay elde edilebilir hazır ve etkili ürünler ortaya konulabilecektir.

9. KAYNAKLAR

1. Selçuk CT, Sahin Ü, Çelebioglu S, Erbas O, Aydin C, Yüce S. Complex craniofacial reconstruction with prostheses as an alternative method to autogenous reconstruction. Journal of Craniofacial Surgery 2011;22 (6):2090-2093.
2. Ravindra KV, Wu S, Bozulic L, Xu H, Breidenbach WC, Ildstad ST. Composite tissue transplantation: a rapidly advancing field. Transplant Proc 2008;40 (5):1237-48.
3. Chopra K, Susarla SM, Goodrich D, Bernard S, Zins JE, Papay F, et al. Clinical application of the FACES score for face transplantation. Journal of Craniofacial Surgery 2014;25 (1):64-69.
4. Buehler LH, Friedman T, Iacomini J, Cooper D. Xenotransplantation--state of the art--update 1999. Frontiers in bioscience 1999;4:D416-32.
5. Kawauchi M, Gundry S, De Begona JA, Razzouk A, Bouchart F, Fukushima N, et al. Prolonged Sağkalım of orthotopically transplanted heart xenograft in infant baboons. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery 1993;106 (5):779-786.
6. Gordon CR, Siemionow M, Coffman K, Alam D, Eghtesad B, Zins JE, et al. The Cleveland Clinic FACES Score: a preliminary assessment tool for identifying the optimal face transplant candidate. J Craniofac Surg 2009;20 (6):1969-74.
7. Giuglea C, Coman C, Marinescu S, Florescu I, Lascar I. Transplantation of composite tissue allografts Scientific bases and clinical applications. Journal of medicine and life 2013;6 (1):40.
8. Gander B, Brown CS, Vasilic D, Furr A, Banis JC, Jr., Cunningham M, et al. Composite tissue allotransplantation of the hand and face: a new frontier in transplant and reconstructive surgery. Transpl Int 2006;19 (11):868-80.
9. Whitaker IS, Duggan EM, Alloway RR, Brown C, McGuire S, Woodle ES, et al. Composite tissue allotransplantation: a review of relevant immunological issues for plastic surgeons. J Plast Reconstr Aesthet Surg 2008;61 (5):481-92.
10. Shores JT, Brandacher G, Lee WA. Hand and Upper Extremity Transplantation: An Update of Outcomes in the Worldwide Experience. Plast Reconstr Surg 2014.
11. Petruzzo P, Testelin S, Kanitakis J, Badet L, Lengele B, Girbon JP, et al. First human face transplantation: 5 years outcomes. Transplantation 2012;93 (2):236-40.
12. Ozkan O, Demirkan F, Ozkan O, Dinckan A, Hadimioglu N, Tuzuner S, et al. The first (double) hand transplantation in Turkey. Transplant Proc 2011;43 (9):3557-60.

13. Morelon E, Kanitakis J, Petruzzo P. Immunological issues in clinical composite tissue allotransplantation: where do we stand today? Transplantation 2012;93 (9):855-9.
14. Gordon CR, Zor F, Cetrulo C, Jr., Brandacher G, Sacks J, Lee WP. Concomitant face and hand transplantation: perfect solution or perfect storm? Ann Plast Surg 2011;67 (3):309-1
15. Petruzzo P, Dubernard JM. The International Registry on Hand and Composite Tissue allotransplantation. Clin Transpl 2011:247-53.
16. Sarhane KA, Tuffaha SH, Broyles JM, Ibrahim AE, Khalifian S, Baltodano P, et al. A critical analysis of rejection in vascularized composite allotransplantation: clinical, cellular and molecular aspects, current challenges, and novel concepts. Front Immunol 2013;4:406.
17. Tobin GR, Breidenbach WC, Klapheke MM, Bentley FR, Pidwell DJ, Simmons PD. Ethical considerations in the early composite tissue allograft experience: a review of the Louisville Ethics Program. Transplant Proc 2005;37 (2):1392-5.
18. Lee WA, Yaremchuk MJ, Pan Y-C, Randolph MA, Tan CM, Weiland AJ. Relative antigenicity of components of a vascularized limb allograft. Plastic and reconstructive surgery 1991;87 (3):401-411.
19. Sinha I, Pomahac B. Split rejection in vascularized composite allotransplantation. Eplasty 2013;13.
20. Pan H, Zhao K, Wang L, Zheng Y, Zhang G, Mai H, et al. Mesenchymal stem cells enhance the induction of mixed chimerism and tolerance to rat hind-limb allografts after bone marrow transplantation. J Surg Res 2010;160 (2):315-24.
21. Huang WC, Lin JY, Wallace CG, Wei FC, Liao SK. Improving the safety of tolerance induction: chimerism and cellular co-treatment strategies applied to vascularized composite allografts. Clin Dev Immunol 2012;2012:107901.
22. Nikolic B, Sykes M. Bone marrow chimerism and transplantation tolerance. Current opinion in immunology 1997;9 (5):634-640.
23. Wang Y, Liu J, Xu C, Zhang W, Bai L, Li N, et al. Bone marrow transplantation combined with mesenchymal stem cells induces immune tolerance without cytotoxic conditioning. J Surg Res 2011;171 (1):e123-31.
24. Graca L, Daley S, Fairchild PJ, Cobbold SP, Waldmann H. Co-receptor and co-stimulation blockade for mixed chimerism and tolerance without myelosuppressive conditioning. BMC Immunol 2006;7:9.
25. Jiang S, Golshayan D, Tsang J, Lombardi G, Lechler RI. In vitro expanded alloantigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cell treatment for the induction of donör-specific transplantation tolerance. Int Immunopharmacol 2006;6 (13-14):1879-82.

26. Tian C, Yuan X, Bagley J, Blazar BR, Sayegh MH, Iacomini J. Induction of transplantation tolerance by combining non-myeloablative conditioning with delivery of alloantigen by T cells. Clin Immunol 2008;127 (2):130-7.
27. Kuo YR, Huang CW, Goto S, Wang CT, Hsu LW, Lin YC, et al. Alloantigen-pulsed host dendritic cells induce T-cell regulation and prolong allograft Sağkalım in a rat model of hindlimb allotransplantation. J Surg Res 2009;153 (2):317-25.
28. Ravindra KV, Xu H, Bozulic LD, Song DD, Ildstad ST. The need for inducing tolerance in vascularized composite allotransplantation. Clin Dev Immunol 2012;2012:438078.
29. Bajada S, Mazakova I, Richardson JB, Ashammakhi N. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. J Tissue Eng Regen Med 2008;2 (4):169-83.
30. Chen X, Armstrong MA, Li G. Mesenchymal stem cells in immunoregulation. Immunology and cell biology 2006;84 (5):413-421.
31. Shi Y, Hu G, Su J, Li W, Chen Q, Shou P, et al. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. Cell research 2010;20 (5):510-518.
32. Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. Nature immunology 2014;15 (11):1009-1016.
33. Liang J, Zhang H, Hua B, Wang H, Lu L, Shi S, et al. Allogenic mesenchymal stem cells transplantation in refractory systemic lupus erythematosus: a pilot clinical study. Annals of the rheumatic diseases 2010;69 (8):1423-1429.
34. García-Olmo D, García-Arranz M, Herreros D, Pascual I, Peiro C, Rodríguez-Montes JA. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. Diseases of the colon & rectum 2005;48 (7):1416-1423.
35. Guo K, Ikehara S, Meng X. Mesenchymal stem cells for inducing tolerance in organ transplantation. Front Cell Dev Biol 2014;2:8.
36. Uccelli A, Pistoia V, Moretta L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? Trends Immunol 2007;28 (5):219-26.
37. Plock JA, Schnider JT, Solari MG, Zheng XX, Gorantla VS. Perspectives on the use of mesenchymal stem cells in vascularized composite allotransplantation. Frontiers in immunology 2013;4:175.
38. Schweizer R, Gorantla VS, Plock JA. Premise and promise of mesenchymal stem cell-based therapies in clinical vascularized composite allotransplantation. Current opinion in organ transplantation 2015;20 (6):608-614.

39. Kuo YR, Chen CC, Goto S, Lin PY, Wei FC, Chen CL. Mesenchymal stem cells as immunomodulators in a vascularized composite allotransplantation. Clin Dev Immunol 2012;2012:854846.

40. Strioga M, Viswanathan S, Darinskas A, Slaby O, Michalek J. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. Stem Cells Dev 2012;21 (14):2724-52.

41. Yoo KH, Jang IK, Lee MW, Kim HE, Yang MS, Eom Y, et al. Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. Cellular immunology 2009;259 (2):150-156.

42. Melief SM, Zwaginga JJ, Fibbe WE, Roelofs H. Adipose tissue-derived multipotent stromal cells have a higher immunomodulatory capacity than their bone marrow-derived counterparts. Stem Cells Transl Med 2013;2 (6):455-63.

43. Kuo YR, Chen CC, Goto S, Lee IT, Huang CW, Tsai CC, et al. Modulation of immune response and T-cell regulation by donör adipose-derived stem cells in a rodent hind-limb allotransplant model. Plast Reconstr Surg 2011;128 (6):661e-72e.

44. Maggioni F, Maggioni G. A closer look at depictions of Cosmas and Damian. Am J Transplant 2014;14 (2):494-5.

45. Schlich T. The origins of organ transplantation. The Lancet 2011;378 (9800):1372-1373.

46. Carrel A. The preservation of tissues and its applications in surgery. Journal of the American Medical Association 1912;59 (7):523-527.

47. Traub E. Persistence of Lymphocytic Choriomeningitis Virus in Immune Animals and Its Relation to Immunity. J Exp Med 1936;63 (6):847-61.

48. Gibson T, Medawar PB. The fate of skin homografts in man. J Anat 1943;77 (Pt 4):299-310 4.

49. Medawar PB. The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits: A report to the War Wounds Committee of the Medical Research Council. J Anat 1944;78 (Pt 5):176-99.

50. Snell GD, Higgins GF. Alleles at the histocompatibility-2 locus in the mouse as determined by tumor transplantation. Genetics 1951;36 (3):306.

51. Anderson D, Billingham RE, Lampkin GH, Medawar PB. The use of skin grafting to distinguish between monozygotic and dizygotic twins in cattle. Heredity 1951;5 (3):379-97.

52. Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Quantitative studies on tissue transplantation immunity. III. Actively acquired tolerance. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences 1956;239 (666):357-414.
53. Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance'of foreign cells. Nature 1953;172:603-6.
54. Murray JE, Merrill JP, Harrison JH. Kidney transplantation between seven pairs of identical twins. Annals of surgery 1958;148 (3):343.
55. Starzl TE. History of clinical transplantation. World Journal of Surgery 2000;24 (7):759-782.
56. Berenbaum M, Brown I. Prolongation of homograft Sağkalım in mice with single doses of cyclophosphamide. 1963.
57. Main JM, Prehn RT. Successful skin homografts after the administration of high dosage X radiation and homologous bone marrow. Journal of the National Cancer Institute 1955;15 (4):1023-1029.
58. Billingham RE, Krohn P, Medawar P. Effect of cortisone on Sağkalım of skin homografts in rabbits. British medical journal 1951;1 (4716):1157.
59. Billingham R, Brent L, Medawar P. Acquired tolerance of skin homografts. Annals of the New York Academy of Sciences 1955;59 (3):409-416.
60. Starzl TE, MARCHIORO TL, WADDELL WR. The reversal of rejection in human renal homografts with subsequent development of homograft tolerance. Surgery, gynecology & obstetrics 1963;117:385.
61. Doi K. Homotransplantation of Limbs in Rats: A Preliminary Report on an Experimental Study with Nonspecific Immunosuppressive Drugs. Plastic and reconstructive surgery 1979;64 (5):613-621.
62. Tobin G, Breidenbach W, Ildstad S, Marvin M, Buell J, Ravindra K. The history of human composite tissue allotransplantation. In: Transplantation proceedings; 2009: Elsevier; 2009. p. 466-471.
63. Peacock EE, Jr., Madden JW. Human composite flexor tendon allografts. Ann Surg 1967;166 (4):624-9.
64. Starzl TE, Demetris AJ. Transplantation tolerance, microchimerism, and the two-way paradigm. Theoretical medicine and bioethics 1998;19 (5):441-455.
65. Billingham RE, Brent L, Medawar P, Sparrow EM. Quantitative studies on tissue transplantation immunity. I. The Sağkalım times of skin homografts exchanged between

members of different inbred strains of mice. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences 1954;143 (910):43-58.

66. BOYSE EA, OLD LJ. Loss of skin allograft tolerance by chimeras. Transplantation 1968;6 (4):619.

67. Curfman G, Heinsimer J, Lozner E, Fung H. A randomized clinical trial of cyclosporine in cadaveric renal transplantation. Am J Cardiol 1983;47:163-73.

68. Press BH, Sibley RK, Shons AR. Limb allotransplantation in the rat: extended Sağkalım and return of nerve function with continuous cyclosporin/prednisone immunosuppression. Annals of plastic surgery 1986;16 (4):313-321.

69. Daniel RK, Egerszegi EP, Samulack DD, Skanes SE, Dykes RW, Rennie WR. Tissue transplants in primates for upper extremity reconstruction: a preliminary report. The Journal of hand surgery 1986;11 (1):1-8.

70. Jones JW, Üstüner ET, Zdichavsky M, Edelstein J, Ren X, Maldonado C, et al. Long-term Sağkalım of an extremity composite tissue allograft with FK506–mycophenolate mofetil therapy. Surgery 1999;126 (2):384-388.

71. Marx U, Embleton MJ, Fischer R, Gruber FP, Hansson U, Heuer J, et al. Monoclonal antibody production. ATLA-NOTTINGHAM- 1997;25:121-138.

72. Thorsby E. A short history of HLA. Tissue Antigens 2009;74 (2):101-116.

73. Abumaree M, Al Jumah M, Pace RA, Kalionis B. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. Stem Cell Rev 2012;8 (2):375-92.

74. Thomson AW, Sacks JM, Kuo YR, Ikeguchi R, Horibe EK, Unadkat J, et al. Dendritic cell therapy in composite tissue allotransplantation. Transplant Proc 2009;41 (2):537-8.

75. Yu S, Fu B, He X, Peng X, Hu A, Ma Y. Antigen-Specific T-Regulatory Cells Can Extend Skin Graft Sağkalım Time in Mice. In: Transplantation proceedings; 2011: Elsevier; 2011. p. 2033-2040.

76. Gander B, Brown CS, Vasilic D, Furr A, Banis JC, Cunningham M, et al. Composite tissue allotransplantation of the hand and face: a new frontier in transplant and reconstructive surgery. Transplant International 2006;19 (11):868-880.

77. Dubernard JM, Petruzzo P, Lanzetta M, Parmentier H, Martin X, Dawahra M, et al. Functional results of the first human double-hand transplantation. Ann Surg 2003;238 (1):128-36.

78. Horner BM, Randolph MA, Huang CA, Butler PE. Skin tolerance: in search of the Holy Grail. Transplant International 2008;21 (2):101-112.

79. Somasundaran M, Quiroga I. Principles in transplantation: immunology. Surgery (Oxford) 2011;29 (7):295-300.

80. Burd A, Lam P, Lau H. Allogenic skin: transplant or dressing? Burns 2002;28 (4):358-366.

81. Callaghan C, Bradley JA. Principles of Transplantation. Surgery (Oxford) 2003;21 (4):iii-vi.

82. Mathes D. Grabb and Smith's plastic surgery. JAMA 2008;299 (20):2450-2450.

83. Andreassi A, Bilenchi R, Biagioli M, D'Aniello C. Classification and pathophysiology of skin grafts. Clinics in dermatology 2005;23 (4):332-337.

84. Pham C, Greenwood J, Cleland H, Woodruff P, Maddern G. Bioengineered skin substitutes for the management of burns: a systematic review. Burns 2007;33 (8):946-957.

85. Jones I, Currie L, Martin R. A guide to biological skin substitutes. British journal of plastic surgery 2002;55 (3):185-193.

86. Richters CD, Hoekstra MJ, van Baare J, du Pont JS, Kamperdijk EW. Morphology of glycerol-preserved human cadaver skin. Burns 1996;22 (2):113-6.

87. Richters CD, Hoekstra MJ, du Pont JS, Kreis RW, Kamperdijk EW. Immunology of skin transplantation. Clin Dermatol 2005;23 (4):338-42.

88. Horner BM, Randolph MA, Duran-Struuck R, Hirsh EL, Ferguson KK, Teague AG, et al. Induction of tolerance to an allogeneic skin flap transplant in a preclinical large animal model. Transplant Proc 2009;41 (2):539-41.

89. Steinmuller D. The enigma of skin allograft rejection. Transplantation Reviews 1998;12 (1):42-57.

90. Chiu T, Burd A. "Xenograft" dressing in the treatment of burns. Clinics in dermatology 2005;23 (4):419-423.

91. Sadeghi A, Robbins R, Smith C, Kurlansky R, Michler R, Reemtsma K, et al. Cardiac xenograft Sağkalım in baboons treated with cyclosporine in combination with conventional immunosuppression. In: Transplantation proceedings; 1987; 1987. p. 1149.

92. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology: Elsevier Health Sciences; 2014.

93. Grimholt U. MHC and Evolution in Teleosts. Biology 2016;5 (1):6.

94. Trivedi H. Immunobiology of rejection and adaptation. In: Transplantation proceedings; 2007: Elsevier; 2007. p. 647-652.

95. Kazansky DB. MHC restriction and allogeneic immune responses. J Immunotoxicol 2008;5 (4):369-84.

96. Sargent CA, Dunham I, Trowsdale J, Campbell RD. Human major histocompatibility complex contains genes for the major heat shock protein HSP70. Proceedings of the National Academy of Sciences 1989;86 (6):1968-1972.
97. Moser M, Leo O. Key concepts in immunology. Vaccine 2010;28:C2-C13.
98. Larosa DF, Orange JS. 1. Lymphocytes. J Allergy Clin Immunol 2008;121 (2 Suppl):S364-9; quiz S412.
99. Tinckam K. Histocompatibility methods. Transplantation reviews 2009;23 (2):80-93.
100. Cai J, Terasaki PI. Humoral theory of transplantation: mechanism, prevention, and treatment. Human immunology 2005;66 (4):334-342.
101. Siemionow M, Klimczak A. Basics of Immune Responses in Transplantation in Preparation for Application of Composite Tissue Allografts in Plastic and Reconstructive Surgery: Part I. Plastic and Reconstructive Surgery 2008;121 (1):4E-12E.
102. Terasaki PI, Cai J. Humoral theory of transplantation: further evidence. Current opinion in immunology 2005;17 (5):541-545.
103. Rocha PN, Plumb TJ, Crowley SD, Coffman TM. Effector mechanisms in transplant rejection. Immunological reviews 2003;196 (1):51-64.
104. Goldstein DR. Toll-like receptors and other links between innate and acquired alloimmunity. Current opinion in immunology 2004;16 (5):538-544.
105. Obhrai J, Goldstein DR. The role of toll-like receptors in solid organ transplantation. Transplantation 2006;81 (4):497-502.
106. Goldstein DR. Toll like receptors and acute allograft rejection. Transplant immunology 2006;17 (1):11-15.
107. Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. Nature 2003;425 (6957):516-521.
108. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. Nature immunology 2004;5 (10):987-995.
109. Goldstein DR, Tesar BM, Akira S, Lakkis FG. Critical role of the Toll-like receptor signal adaptor protein MyD88 in acute allograft rejection. The Journal of clinical investigation 2003;111 (10):1571-1578.
110. Hautz T, Wolfram D, Grahammer J, Starzl R, Krapf C, Pratschke J, et al. Mechanisms and mediators of inflammation: potential models for skin rejection and targeted therapy in vascularized composite allotransplantation. Clinical and Developmental Immunology 2012;2012.

111. Hautz T, Zelger B, Grahammer J, Krapf C, Amberger A, Brandacher G, et al. Molecular markers and targeted therapy of skin rejection in composite tissue allotransplantation. American Journal of Transplantation 2010;10 (5):1200-1209.
112. Benichou G, Yamada Y, Yun SH, Lin C, Fray M, Tocco G. Immune recognition and rejection of allogeneic skin grafts. Immunotherapy 2011;3 (6):757-70.
113. Chadha R, Leonard DA, Kurtz JM, Cetrulo Jr CL. The unique immunobiology of the skin: implications for tolerance of vascularized composite allografts. Current opinion in organ transplantation 2014;19 (6):566-572.
114. Aw MM. Transplant immunology. Journal of pediatric surgery 2003;38 (9):1275-1280.
115. Wallace CJ, Kingsmore DB. Transplantation and immunosuppressive therapy. Anaesthesia & Intensive Care Medicine 2006;7 (6):196-199.
116. Kinnear G, Jones ND, Wood KJ. Costimulation blockade: current perspectives and implications for therapy. Transplantation 2013;95 (4):527-35.
117. Rotrosen D, Bluestone JA. The immune tolerance network: a new paradigm for developing tolerance-inducing therapies. Journal of Allergy and Clinical Immunology 2002;110 (1):17-23.
118. Alpdogan O, van den Brink MR. Immune tolerance and transplantation. Semin Oncol 2012;39 (6):629-42.
119. Rose ML, Hutchinson IV. Transplant immunology I: immunological mechanisms of graft injury. Surgery (Oxford) 2009;27 (10):403-408.
120. Alegre ML, Florquin S, Goldman M. Cellular mechanisms underlying acute graft rejection: time for reassessment. Curr Opin Immunol 2007;19 (5):563-8.
121. Yu G, Xu X, Vu MD, Kilpatrick ED, Li XC. NK cells promote transplant tolerance by killing donör antigen-presenting cells. The Journal of experimental medicine 2006;203 (8):1851-1858.
122. Sarhane KA, Khalifian S, Ibrahim Z, Cooney DS, Hautz T, Lee WP, et al. Diagnosing skin rejection in vascularized composite allotransplantation: advances and challenges. Clin Transplant 2014;28 (3):277-85.
123. Game DS, Lechler RI. Pathways of allorecognition: implications for transplantation tolerance. Transpl Immunol 2002;10 (2-3):101-8.
124. Whitelegg A, Barber LD. The structural basis of T-cell allorecognition. Tissue Antigens 2004;63 (2):101-8.

125. Liu W, Xiao X, Demirci G, Madsen J, Li XC. Innate NK cells and macrophages recognize and reject allogeneic nonself in vivo via different mechanisms. The Journal of Immunology 2012;188 (6):2703-2711.
126. Lin CM, Gill RG. Direct and indirect allograft recognition: pathways dictating graft rejection mechanisms. Current opinion in organ transplantation 2016;21 (1):40-44.
127. Okumi M, Fishbein JM, Griesemer AD, Gianello PR, Hirakata A, Nobori S, et al. Role of persistence of antigen and indirect recognition in the maintenance of tolerance to renal allografts. Transplantation 2008;85 (2):270.
128. Klimczak A, Siemionow M. Immune responses in transplantation: application to composite tissue allograft. Semin Plast Surg 2007;21 (4):226-33.
129. Graca L, Thompson S, Lin CY, Adams E, Cobbold SP, Waldmann H. Both CD4 (+)CD25 (+) and CD4 (+)CD25 (-) regulatory cells mediate dominant transplantation tolerance. J Immunol 2002;168 (11):5558-65.
130. Pradka SP, Ong YS, Zhang Y, Davis SJ, Baccarani A, Messmer C, et al. Increased signs of acute rejection with ischemic time in a rat musculocutaneous allotransplant model. Transplant Proc 2009;41 (2):531-6.
131. Goldstein D. The identity of innate immune activators in organ transplantation: origins from within or exterior to the host? American journal of transplantation 2007;7 (7):1692-1694.
132. Mundinger GS, Drachenberg CB. Chronic rejection in vascularized composite allografts. Curr Opin Organ Transplant 2014;19 (3):309-14.
133. Cendales LC, Kanitakis J, Schneeberger S, Burns C, Ruiz P, Landin L, et al. The Banff 2007 working classification of skin-containing composite tissue allograft pathology. Am J Transplant 2008;8 (7):1396-400.
134. Sun L, Akiyama K, Zhang H, Yamaza T, Hou Y, Zhao S, et al. Mesenchymal stem cell transplantation reverses multiorgan dysfunction in systemic lupus erythematosus mice and humans. Stem cells 2009;27 (6):1421-1432.
135. Shirwan H, Barwari L, Khan NS. Predominant Expression Of T Helper 2 Cytokines And Altered Expression Of T Helper 1 Cytokines In Long-Term Allograft Sağkalim Induced By Intrathymic Immune Modulation With Donor Class I Major Histocompatibility Complex Peptides1, 2. Transplantation 1998;66 (12):1802-1809.
136. Siva A, Xin H, Qin F, Oltean D, Bowdish K, Kretz-Rommel A. Immune modulation by melanoma and ovarian tumor cells through expression of the immunosuppressive molecule CD200. Cancer Immunology, Immunotherapy 2008;57 (7):987-996.

137. Nelson RP, Ballow M. 26. Immunomodulation and immunotherapy: drugs, cytokines, cytokine receptors, and antibodies. Journal of allergy and clinical immunology 2003;111 (2):S720-S732.

138. Foster RD, Fan L, Neipp M, Kaufman C, McCalmont T, Ascher N, et al. Donör-specific tolerance induction in composite tissue allografts. Am J Surg 1998;176 (5):418-21.

139. Miller J. Self-nonself discrimination by T lymphocytes. C R Biol 2004;327 (5):399-408.

140. Auchincloss H, Jr. In search of the elusive Holy Grail: the mechanisms and prospects for achieving clinical transplantation tolerance. Am J Transplant 2001;1 (1):6-12.

141. Li XC, Strom TB, Turka LA, Wells AD. T cell death and transplantation tolerance. Immunity 2001;14 (4):407-416.

142. Fändrich F, Ruhnke M, Dresske B, Kremer B. Tolerance-inducing strategies in transplantation surgery—current status and perspectives. Langenbeck's Archives of Surgery 2004;389 (1):60-66.

143. Sprent J, Webb SR. Intrathymic and extrathymic clonal deletion of T cells. Current opinion in immunology 1995;7 (2):196-205.

144. Smilek DE, Ehlers MR, Nepom GT. Restoring the balance: immunotherapeutic combinations for autoimmune disease. Disease Models and Mechanisms 2014;7 (5):503-513.

145. Fuchs EJ. Transplantation tolerance: from theory to clinic. Immunol Rev 2014;258 (1):64-79.

146. Fowlkes B, Schweighoffer E. Positive selection of T cells. Current opinion in immunology 1995;7 (2):188-195.

147. Remuzzi G. Cellular basis of long-term organ transplant acceptance: pivotal role of intrathymic clonal deletion and thymic dependence of bone marrow microchimerism-associated tolerance. American journal of kidney diseases 1998;31 (2):197-212.

148. Cober SR, Randolph MA, Lee WA. Skin allograft Sağkalım following intrathymic injection of donör bone marrow. Journal of Surgical Research 1999;85 (2):204-208.

149. Wells AD, Li XC, Strom TB, Turka LA. The role of peripheral T–cell deletion in transplantation tolerance. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences 2001;356 (1409):617-623.

150. Wekerle T. Transplantation tolerance induced by mixed chimerism. The Journal of heart and lung transplantation 2001;20 (8):816-823.

151. Or-Geva N, Reisner Y. Megadose stem cell administration as a route to mixed chimerism. Curr Opin Organ Transplant 2014;19 (4):334-41.

152. Rachamim N, Gan J, Segall H, Krauthgamer R, Marcus H, Berrebi A, et al. Tolerance Induction By" Megadose" Hematopoietic Transplants: Donor-Type Human CD34 Stem Cells Induce Potent Specific Reduction of Host Anti-Donör Cytotoxic T Lymphocyte Precursors in Mixed Lymphocyte Culture1. Transplantation 1998;65 (10):1386-1393.

153. Yong Z, Chang L, Mei YX, Yi L. Role and mechanisms of CD4+CD25+ regulatory T cells in the induction and maintenance of transplantation tolerance. Transpl Immunol 2007;17 (2):120-9.

154. Yamazaki S, Steinman RM. Dendritic cells as controllers of antigen-specific Foxp3+ regulatory T cells. Journal of dermatological science 2009;54 (2):69-75.

155. Fehr T, Sykes M. Tolerance induction in clinical transplantation. Transpl Immunol 2004;13 (2):117-30.

156. Leventhal J, Abecassis M, Miller J, Gallon L, Ravindra K, Tollerud DJ, et al. Chimerism and tolerance without GVHD or engraftment syndrome in HLA-mismatched combined kidney and hematopoietic stem cell transplantation. Science translational medicine 2012;4 (124):124ra28-124ra28.

157. Bishop GA, Ierino FL, Sharland AF, Hall BM, Alexander SI, Sandrin MS, et al. Approaching the promise of operational tolerance in clinical transplantation. Transplantation 2011;91 (10):1065-1074.

158. Golshayan D, Buhler L, Lechler RI, Pascual M. From current immunosuppressive strategies to clinical tolerance of allografts. Transpl Int 2007;20 (1):12-24.

159. Patel J, Kobashigawa JA. Minimization of immunosuppression: transplant immunology. Transpl Immunol 2008;20 (1-2):48-54.

160. Monguió-Tortajada M, Lauzurica-Valdemoros R, Borràs FE. Tolerance in organ transplantation: from conventional immunosuppression to extracellular vesicles. Front Immunol 2014;5 (416.10):3389.

161. Allison AC. Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward. Immunopharmacology 2000;47 (2):63-83.

162. Krieger NR, Emre S. Novel immunosuppressants. Pediatric transplantation 2004;8 (6):594-599.

163. Stills HF, Suckow M, Stevens K, Wilson R. Polyclonal antibody production. The laboratory rabbit, guinea pig, hamster and other rodents. Oxford, UK: Elsevier Inc 2012:259--74.

164. Leonard DA, McGrouther DA, Kurtz JM, Cetrulo CL. Tolerance induction strategies in vascularized composite allotransplantation: mixed chimerism and novel developments. Clinical and Developmental Immunology 2012;2012.

165. Siemionow M, Klimczak A. Immunodepletive anti-alpha/beta-TCR antibody in transplantation of composite tissue allografts: Cleveland Clinic research experience. Immunotherapy 2009;1 (4):585-98.

166. Li Z, Benghiat F, Charbonnier LM, Kubjak C, Rivas MN, Cobbold S, et al. CD8+ T-Cell Depletion and Rapamycin Synergize with Combined Coreceptor/Stimulation Blockade to Induce Robust Limb Allograft Tolerance in Mice. American Journal of Transplantation 2008;8 (12):2527-2536.

167. Konig R. Interactions between MHC molecules and co-receptors of the TCR. Curr Opin Immunol 2002;14 (1):75-83.

168. Wekerle T, Sayegh MH, Hill J, Zhao Y, Chandraker A, Swenson KG, et al. Extrathymic T cell deletion and allogeneic stem cell engraftment induced with costimulatory blockade is followed by central T cell tolerance. The Journal of experimental medicine 1998;187 (12):2037-2044.

169. Golshayan D, Buhler L, Lechler RI, Pascual M. From current immunosuppressive strategies to clinical tolerance of allografts. Transplant International 2007;20 (1):12-24.

170. Larsen CP, Elwood ET, Alexander DZ, Ritchie SC, Hendrix R, Tucker-Burden C, et al. Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. Nature 1996;381 (6581):434-8.

171. Gilson CR, Milas Z, Gangappa S, Hollenbaugh D, Pearson TC, Ford ML, et al. Anti-CD40 monoclonal antibody synergizes with CTLA4-Ig in promoting long-term graft Sağkalım in murine models of transplantation. The Journal of Immunology 2009;183 (3):1625-1635.

172. Meng L, Wu Z, Wang Y, Lassman C, Busuttil RW, Zhai Y, et al. Differential impact of CD154 costimulation blockade on alloreactive effector and regulatory T cells in murine renal transplant recipients. Transplantation 2008;85 (9):1332-1338.

173. Siemionow M, Nasir S. Impact of donör bone marrow on Sağkalım of composite tissue allografts. Ann Plast Surg 2008;60 (4):455-62.

174. Brouha PC, Perez-Abadia G, Francois CG, Laurentin-Perez LA, Gorantla V, Vossen M, et al. Lymphadenectomy prior to rat hind limb allotransplantation prevents graft-versus-host disease in chimeric hosts. Transpl Int 2004;17 (7):341-50.

175. Petruzzo P, Lanzetta M, Dubernard JM, Landin L, Cavadas P, Margreiter R, et al. The International Registry on Hand and Composite Tissue Transplantation. Transplantation 2010;90 (12):1590-4.
176. Sykes M. Mixed chimerism and transplant tolerance. Immunity 2001;14 (4):417-424.
177. Exner B, Acholonu I, Bergheim M, Mueller Y, Ildstad S. Mixed allogeneic chimerism to induce tolerance to solid organ and cellular grafts. Acta haematologica 1999;101 (2):78-81.
178. Leonard DA, Cetrulo CL, Jr., McGrouther DA, Sachs DH. Induction of tolerance of vascularized composite allografts. Transplantation 2013;95 (3):403-9.
179. Exner BG, Acholonu I, Ildstad ST. Hematopoietic chimerism, tolerance induction and graft-versus-host disease: considerations for composite tissue transfer. Transplant Proc 1998;30 (6):2718-20.
180. Bradley JA. Induction of transplant tolerance through mixed hematopoietic chimerism. Am J Transplant 2012;12 (5):1073-4.
181. Muramatsu K, Kuriyama R, You-Xin S, Hashimoto T, Matsunaga T, Taguchi T. Chimerism studies as an approach for the induction of tolerance to extremity allografts. J Plast Reconstr Aesthet Surg 2008;61 (9):1009-15.
182. Siemionow M, Klimczak A. Chimerism-based experimental models for tolerance induction in vascularized composite allografts: Cleveland clinic research experience. Clin Dev Immunol 2013;2013:831410.
183. Foster RD, Ascher NL, McCalmont TH, Neipp M, Anthony JP, Mathes SJ. Mixed allogeneic chimerism as a reliable model for composite tissue allograft tolerance induction across major and minor histocompatibility barriers. Transplantation 2001;72 (5):791-7.
184. Kawai T, Cosimi AB, Sachs DH. Preclinical and clinical studies on the induction of renal allograft tolerance through transient mixed chimerism. Current opinion in organ transplantation 2011;16 (4):366.
185. Liu Z, Tugulea S, Cortesini R, Suciu-Foca N. Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+ CD28-T cells. International immunology 1998;10 (6):775-783.
186. Suciu-Foca N, Manavalan JS, Cortesini R. Generation and function of antigen-specific suppressor and regulatory T cells. Transplant immunology 2003;11 (3):235-244.
187. Suciu-Foca N, Manavalan JS, Scotto L, Kim-Schulze S, Galluzzo S, Naiyer AJ, et al. Molecular characterization of allospecific T suppressor and tolerogenic dendritic cells: review. International immunopharmacology 2005;5 (1):7-11.

188. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? Int Immunol 2009;21 (10):1105-11.
189. Walsh PT, Taylor DK, Turka LA. Tregs and transplantation tolerance. The Journal of clinical investigation 2004;114 (10):1398-1403.
190. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+ CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. Nature immunology 2005;6 (4):345-352.
191. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+ CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. International immunology 1998;10 (12):1969-1980.
192. Wan YY, Flavell RA. How diverse—CD4 effector T cells and their functions. Journal of molecular cell biology 2009;1 (1):20-36.
193. Ebrahimi A, Hosseini SA, Rahim F. Immunosuppressive therapy in allograft transplantation: from novel insights and strategies to tolerance and challenges. Central-European Journal of Immunology 2014;39 (3):400.
194. de Lafaille MAC, Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? Immunity 2009;30 (5):626-635.
195. Thornton AM, Shevach EM. CD4+ CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. The Journal of experimental medicine 1998;188 (2):287-296.
196. Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ Tregulatory cell-mediated suppression. Immunity 2009;30 (5):636-45.
197. Zhang L, Xia C. Ex vivo expansion of regulatory T cells for clinical applications against graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Chinese medical journal 2013;126 (23):4575-4582.
198. Bozulic LD, Wen Y, Xu H, Ildstad ST. Evidence that FoxP3+ regulatory T cells may play a role in promoting long-term acceptance of composite tissue allotransplants. Transplantation 2011;91 (8):908-15.
199. Pilat N, Baranyi U, Klaus C, Jaeckel E, Mpofu N, Wrba F, et al. Treg-therapy allows mixed chimerism and transplantation tolerance without cytoreductive conditioning. Am J Transplant 2010;10 (4):751-62.
200. Jonuleit H, Adema G, Schmitt E. Immune regulation by regulatory T cells: implications for transplantation. Transplant immunology 2003;11 (3):267-276.

201. Ardavín C, Amigorena S, e Sousa CR. Dendritic cells: immunobiology and cancer immunotherapy. Immunity 2004;20 (1):17-23.
202. Sim WJ. Metabolism is Central to Tolerogenic Dendritic Cell Function. Journal of experimental medicine 2009;206 (3):549-59.
203. Makala LH, Nagasawa H. Dendritic cells: a specialized complex system of antigen presenting cells. J Vet Med Sci 2002;64 (3):181-93.
204. El Shikh MEM, El Sayed RM, Sukumar S, Szakal AK, Tew JG. Activation of B cells by antigens on follicular dendritic cells. Trends in immunology 2010;31 (6):205-211.
205. Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, Berneman ZN. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. J Leukoc Biol 2007;82 (6):1365-74.
206. Rutella S, Danese S, Leone G. Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. Blood 2006;108 (5):1435-1440.
207. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells*. Annual review of immunology 2003;21 (1):685-711.
208. Sacks JM, Kuo Y-R, Taieb A, Breitinger J, Nguyen VT, Thomson AW, et al. Prolongation of composite tissue allograft Sağkalım by immature recipient dendritic cells pulsed with donör antigen and transient low-dose immunosuppression. Plastic and reconstructive surgery 2008;121 (1):37-49.
209. Garrovillo M, Ali A, Oluwole SF. Indirect Allorecognition in Acquired Thymic Tolerance: Induction of Donör-Specific Tolerance to Rat Cardiac Allografts By Allopeptide-Pulsed Host Dendritic Cells1, 2. Transplantation 1999;68 (12):1827-1834.
210. Wood KJ. Gene therapy and allotransplantation. Current opinion in immunology 1997;9 (5):662-668.
211. Wagner W, Ho AD. Mesenchymal stem cell preparations—comparing apples and oranges. Stem cell reviews 2007;3 (4):239-248.
212. Bongso A, Richards M. History and perspective of stem cell research. Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology 2004;18 (6):827-842.
213. Rippon H, Bishop A. Embryonic stem cells. Cell proliferation 2004;37 (1):23-34.
214. Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlström H, et al. Generalized potential of adult neural stem cells. Science 2000;288 (5471):1660-1663.
215. Jackson KA, Mi T, Goodell MA. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. Proceedings of the National Academy of Sciences 1999;96 (25):14482-14486.

216. Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. Cell 2001;105 (3):369-377.
217. Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. Blood 2003;102 (10):3483-3493.
218. Fridenshteĭn A. [Stromal bone marrow cells and the hematopoietic microenvironment]. Arkhiv patologii 1981;44 (10):3-11.
219. Owen M. Marrow stromal stem cells. Journal of Cell Science 1988;1988 (Supplement 10):63-76.
220. Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. The Journal of clinical investigation 2002;109 (10):1291-1302.
221. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature 2002;418 (6893):41-49.
222. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy 2006;8 (4):315-317.
223. Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. Cytokine Growth Factor Rev 2009;20 (5-6):419-27.
224. Krampera M, Pasini A, Pizzolo G, Cosmi L, Romagnani S, Annunziato F. Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells. Curr Opin Pharmacol 2006;6 (4):435-41.
225. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. Blood 2005;105 (4):1815-1822.
226. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. Blood 2002;99 (10):3838-43.
227. Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. Blood 2003;101 (9):3722-3729.

228. Groh ME, Maitra B, Szekely E, Koç ON. Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells. Experimental hematology 2005;33 (8):928-934.
229. Ren G, Zhao X, Zhang L, Zhang J, L'Huillier A, Ling W, et al. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. The Journal of Immunology 2010;184 (5):2321-2328.
230. Rasmusson I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. Exp Cell Res 2006;312 (12):2169-79.
231. Maccario R, Podestà M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. Haematologica 2005;90 (4):516-525.
232. Yoo KH, Jang IK, Lee MW, Kim HE, Yang MS, Eom Y, et al. Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. Cell Immunol 2009;259 (2):150-6.
233. Gieseke F, Schütt B, Viebahn S, Koscielniak E, Friedrich W, Handgretinger R, et al. Human multipotent mesenchymal stromal cells inhibit proliferation of PBMCs independently of IFNγR1 signaling and IDO expression. Blood 2007;110 (6):2197-2200.
234. Jiang X-X, Zhang Y, Liu B, Zhang S-X, Wu Y, Yu X-D, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. Blood 2005;105 (10):4120-4126.
235. Djouad F, Charbonnier LM, Bouffi C, Louis-Plence P, Bony C, Apparailly F, et al. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. Stem Cells 2007;25 (8):2025-32.
236. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. Blood 2006;107 (1):367-372.
237. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. Stem cells 2006;24 (1):74-85.
238. Soleymaninejadian E, Pramanik K, Samadian E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: cytokines and factors. Am J Reprod Immunol 2012;67 (1):1-8.

239. Chabannes D, Hill M, Merieau E, Rossignol J, Brion R, Soulillou JP, et al. A role for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive effect of adult rat and human mesenchymal stem cells. Blood 2007;110 (10):3691-3694.
240. Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, et al. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. Blood 2007;109 (1):228-234.
241. Paolucci C, Rovere P, De Nadai C, Manfredi AA, Clementi E. Nitric oxide inhibits the tumor necrosis factor α-regulated endocytosis of human dendritic cells in a cyclic GMP-dependent way. Journal of Biological Chemistry 2000;275 (26):19638-19644.
242. Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+ CD25highFOXP3+ regulatory T cells. Stem cells 2008;26 (1):212-222.
243. Benkhoucha M, Santiago-Raber M-L, Schneiter G, Chofflon M, Funakoshi H, Nakamura T, et al. Hepatocyte growth factor inhibits CNS autoimmunity by inducing tolerogenic dendritic cells and CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. Proceedings of the National Academy of Sciences 2010;107 (14):6424-6429.
244. Yang HR, Chou HS, Gu X, Wang L, Brown KE, Fung JJ, et al. Mechanistic insights into immunomodulation by hepatic stellate cells in mice: A critical role of interferon-γ signaling. Hepatology 2009;50 (6):1981-1991.
245. Rodriguez AM, Elabd C, Amri EZ, Ailhaud G, Dani C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Biochimie 2005;87 (1):125-8.
246. Kokai LE, Marra K, Rubin JP. Adipose stem cells: biology and clinical applications for tissue repair and regeneration. Transl Res 2014;163 (4):399-408.
247. Locke M, Windsor J, Dunbar PR. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. ANZ J Surg 2009;79 (4):235-44.
248. Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. Methods 2008;45 (2):115-20.
249. Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. BMC cell biology 2006;7 (1):1.
250. Garcia-Olmo D, Garcia-Arranz M, Herreros D. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula including Crohn's disease. Expert Opin Biol Ther 2008;8 (9):1417-23.

251. Fang B, Song Y, Liao L, Zhang Y, Zhao R. Favorable response to human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in steroid-refractory acute graft-versus-host disease. In: Transplantation proceedings; 2007: Elsevier; 2007. p. 3358-3362.
252. Jeong SH, Ji YH, Yoon ES. Immunosuppressive activity of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in a rat model of hind limb allotransplantation. Transplant Proc 2014;46 (5):1606-14.
253. Tholpady SS, Ogle RC, Katz AJ. Adipose stem cells and solid organ transplantation. Curr Opin Organ Transplant 2009;14 (1):51-5.
254. Ikegame Y, Yamashita K, Hayashi S-I, Mizuno H, Tawada M, You F, et al. Comparison of mesenchymal stem cells from adipose tissue and bone marrow for ischemic stroke therapy. Cytotherapy 2011;13 (6):675-685.
255. Gnecchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. Circulation research 2008;103 (11):1204-1219.
256. Marconi S, Castiglione G, Turano E, Bissolotti G, Angiari S, Farinazzo A, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells systemically injected promote peripheral nerve regeneration in the mouse model of sciatic crush. Tissue Engineering Part A 2012;18 (11-12):1264-1272.
257. Ryu H-H, Lim J-H, Byeon Y-E, Park J-R, Seo M-S, Lee Y-W, et al. Functional recovery and neural differentiation after transplantation of allogenic adipose-derived stem cells in a canine model of acute spinal cord injury. Journal of veterinary science 2009;10 (4):273-284.
258. Wolbank S, Peterbauer A, Fahrner M, Hennerbichler S, van Griensven M, Stadler G, et al. Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: a comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue. Tissue Eng 2007;13 (6):1173-83.
259. Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. British journal of haematology 2005;129 (1):118-129.
260. Lin CS, Lin G, Lue TF. Allogeneic and xenogeneic transplantation of adipose-derived stem cells in immunocompetent recipients without immunosuppressants. Stem Cells Dev 2012;21 (15):2770-8.
261. Cui L, Yin S, Liu W, Li N, Zhang W, Cao Y. Expanded adipose-derived stem cells suppress mixed lymphocyte reaction by secretion of prostaglandin E2. Tissue engineering 2007;13 (6):1185-1195.

262. DelaRosa O, Lombardo E, Beraza A, Mancheño-Corvo P, Ramirez C, Menta R, et al. Requirement of IFN-γ–Mediated Indoleamine 2, 3-Dioxygenase Expression in the Modulation of Lymphocyte Proliferation by Human Adipose–Derived Stem Cells. Tissue Engineering Part A 2009;15 (10):2795-2806.

263. Patrikoski M, Sivula J, Huhtala H, Helminen M, Salo F, Mannerstrom B, et al. Different culture conditions modulate the immunological properties of adipose stem cells. Stem cells transl med 2014;3 (10):1220-1230.

264. Sioud M, Mobergslien A, Boudabous A, Fløisand Y. Mesenchymal stem cell-mediated T cell suppression occurs through secreted galectins. International journal of oncology 2011;38 (2):385-390.

265. Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. Br J Haematol 2005;129 (1):118-29.

266. Ivanova-Todorova E, Bochev I, Mourdjeva M, Dimitrov R, Bukarev D, Kyurkchiev S, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Immunology letters 2009;126 (1):37-42.

267. Götherström C, Ringdén O, Tammik C, Zetterberg E, Westgren M, Le Blanc K. Immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells. American journal of obstetrics and gynecology 2004;190 (1):239-245.

268. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O. HLA expression and immunologic propertiesof differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. Experimental hematology 2003;31 (10):890-896.

269. Niemeyer P, Vohrer J, Schmal H, Kasten P, Fellenberg J, Suedkamp N, et al. Sağkalım of human mesenchymal stromal cells from bone marrow and adipose tissue after xenogenic transplantation in immunocompetent mice. Cytotherapy 2009.

270. Kang HM, Kim J, Park S, Kim J, Kim H, Kim KS, et al. Insulin-Secreting Cells from Human Eyelid-Derived Stem Cells Alleviate Type I Diabetes in Immunocompetent Mice. Stem Cells 2009;27 (8):1999-2008.

271. Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. Blood 2006;107 (4):1484-1490.

272. Spaggiari GM, Moretta L. Mesenchymal Stem Cell-Natural Killer Cell Interactions. In: Stem Cells and Cancer Stem Cells, Volume 4: Springer; 2012. p. 217-224.
273. Batten P, Rosenthal NA, Yacoub MH. Immune response to stem cells and strategies to induce tolerance. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2007;362 (1484):1343-56.
274. Kishi Y, Tanaka Y, Shibata H, Nakamura S, Takeuchi K, Masuda S, et al. Variation in the incidence of teratomas after the transplantation of nonhuman primate ES cells into immunodeficient mice. Cell transplantation 2008;17 (9):1095-1102.
275. Strom TB, Field LJ, Ruediger M. Allogeneic stem cells, clinical transplantation and the origins of regenerative medicine. Current opinion in immunology 2002;14 (5):601-605.
276. Pileggi A, Xu X, Tan J, Ricordi C. Mesenchymal stromal (stem) cells to improve solid organ transplant outcome: lessons from the initial clinical trials. Curr Opin Organ Transplant 2013;18 (6):672-81.
277. Zhou HP, Yi DH, Yu SQ, Sun GC, Cui Q, Zhu HL, et al. Administration of donör-derived mesenchymal stem cells can prolong the Sağkalım of rat cardiac allograft. Transplant Proc 2006;38 (9):3046-51.
278. Kato T, Okumi M, Tanemura M, Yazawa K, Kakuta Y, Yamanaka K, et al. Adipose tissue-derived stem cells suppress acute cellular rejection by TSG-6 and CD44 interaction in rat kidney transplantation. Transplantation 2014;98 (3):277-84.
279. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft Sağkalım in vivo. Exp Hematol 2002;30 (1):42-8.
280. Sbano P, Cuccia A, Mazzanti B, Urbani S, Giusti B, Lapini I, et al. Use of donör bone marrow mesenchymal stem cells for treatment of skin allograft rejection in a preclinical rat model. Archives of Dermatological Research 2008;300 (3):115-124.
281. Sivanathan KN, Gronthos S, Rojas-Canales D, Thierry B, Coates PT. Interferon-gamma modification of mesenchymal stem cells: implications of autologous and allogeneic mesenchymal stem cell therapy in allotransplantation. Stem Cell Reviews and Reports 2014;10 (3):351-375.
282. Saito T, Kuang J-Q, Bittira B, Al-Khaldi A, Chiu RC-J. Xenotransplant cardiac chimera: immune tolerance of adult stem cells. The Annals of thoracic surgery 2002;74 (1):19-24.
283. Grinnemo KH, Månsson-Broberg A, Leblanc K, Corbascio M, Wärdell E, Siddiqui AJ, et al. Human mesenchymal stem cells do not differentiate into cardiomyocytes in a cardiac ischemic xenomodel. Annals of medicine 2006;38 (2):144-153.

284. Kang SK, Lee DH, Bae YC, Kim HK, Baik SY, Jung JS. Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats. Experimental neurology 2003;183 (2):355-366.

285. Rodriguez A-M, Pisani D, Dechesne CA, Turc-Carel C, Kurzenne J-Y, Wdziekonski B, et al. Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. The Journal of experimental medicine 2005;201 (9):1397-1405.

286. Davis TA, Anam K, Lazdun Y, Gimble JM, Elster EA. Adipose-derived stromal cells promote allograft tolerance induction. Stem cells translational medicine 2014;3 (12):1444-1450.

287. Han KH, Kang HG, Gil HJ, Lee EM, Ahn C, Yang J. The immunosuppressive effect of embryonic stem cells and mesenchymal stem cells on both primary and secondary alloimmune responses. Transplant immunology 2010;23 (3):141-146.

288. Chua CK, Yeong WY. Bioprinting: principles and applications: World Scientific; 2014.

289. Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. Science 2002;295 (5557):1009-1014.

290. Theoret C. Tissue engineering in wound repair: the three “R” s—repair, replace, regenerate. Veterinary Surgery 2009;38 (8):905-913.

291. Mandrycky C, Wang Z, Kim K, Kim D-H. 3D bioprinting for engineering complex tissues. Biotechnology advances 2015.

292. Nie C, Yang D, Xu J, Si Z, Jin X, Zhang J. Locally administered adipose-derived stem cells accelerate wound healing through differentiation and vasculogenesis. Cell Transplant 2011;20 (2):205-16.

293. Lu F, Mizuno H, Uysal CA, Cai X, Ogawa R, Hyakusoku H. Improved viability of random pattern skin flaps through the use of adipose-derived stem cells. Plast Reconstr Surg 2008;121 (1):50-8.

294. Hong SJ, Traktuev DO, March KL. Therapeutic potential of adipose-derived stem cells in vascular growth and tissue repair. Curr Opin Organ Transplant 2010;15 (1):86-91.

295. Uysal CA, Tobita M, Hyakusoku H, Mizuno H. The Effect of Bone-Marrow-Derived Stem Cells and Adipose-Derived Stem Cells on Wound Contraction and Epithelization. Adv Wound Care (New Rochelle) 2014;3 (6):405-413.

296. Puolakkainen PA, Twardzik DR, Ranchalis JE, Pankey SC, Reed MJ, Gombotz WR. The enhancement in wound healing by transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) depends on the topical delivery system. J Surg Res 1995;58 (3):321-9.

297. Zografou A, Tsigris C, Papadopoulos O, Kavantzas N, Patsouris E, Donta I, et al. Improvement of skin-graft Sağkalım after autologous transplantation of adipose-derived stem cells in rats. J Plast Reconstr Aesthet Surg 2011;64 (12):1647-56.

298. Holan V, Chudickova M, Trosan P, Svobodova E, Krulova M, Kubinova S, et al. Cyclosporine A-loaded and stem cell-seeded electrospun nanofibers for cell-based therapy and local immunosuppression. Journal of controlled release 2011;156 (3):406-412.

299. Lee WP, Yaremchuk MJ, Pan YC, Randolph MA, Tan CM, Weiland AJ. Relative antigenicity of components of a vascularized limb allograft. Plast Reconstr Surg 1991;87 (3):401-11.

300. Chadha R, Leonard DA, Kurtz JM, Cetrulo CL, Jr. The unique immunobiology of the skin: implications for tolerance of vascularized composite allografts. Curr Opin Organ Transplant 2014;19 (6):566-72.

301. Hettiaratchy S, Melendy E, Randolph MA, Coburn RC, Neville DM, Jr., Sachs DH, et al. Tolerance to composite tissue allografts across a major histocompatibility barrier in miniature swine. Transplantation 2004;77 (4):514-21.

302. Leonard DA, Kurtz JM, Cetrulo Jr CL. Vascularized composite allotransplantation: towards tolerance and the importance of skin-specific immunobiology. Current opinion in organ transplantation 2013;18 (6):645-651.

303. Markees TG, Phillips NE, Gordon EJ, Noelle RJ, Shultz LD, Mordes JP, et al. Long-term Sağkalım of skin allografts induced by donör splenocytes and anti-CD154 antibody in thymectomized mice requires CD4 (+) T cells, interferon-gamma, and CTLA4. Journal of Clinical Investigation 1998;101 (11):2446.

304. Larocca RA, Moraes-Vieira PM, Bassi ÊJ, Semedo P, de Almeida DC, da Silva MB, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells increase skin allograft Sağkalım and inhibit Th-17 immune response. PloS one 2013;8 (10):e76396.

305. Nasir S, Bozkurt M, Krokowicz L, Klimczak A, Siemionow M. Correlation of chimerism with graft size and revascularization in vascularized and nonvascularized skin allografts. Ann Plast Surg 2009;62 (4):430-8.

306. Arai K, Hotokebuchi T, Miyahara H, Arita C, Mohtai M, Sugioka Y, et al. Prolonged limb allograft Sağkalım with short-term treatment with FK-506 in rats. In: Transplantation proceedings; 1989; 1989. p. 3191-3193.

307. Muramatsu K, Doi K, Akino T, Shigetomi M, Kawai S. Longer Sağkalım of rat limb allograft: combined immunosuppression of FK-506 and 15-deoxyspergualin. Acta Orthopaedica Scandinavica 1997;68 (6):581-585.

308. Fealy MJ, Umansky WS, Bickel KD, Nino JJ, Morris RE, Press B. Efficacy of rapamycin and FK 506 in prolonging rat hind limb allograft Sağkalım. Annals of surgery 1994;219 (1):88.

309. Min Z, Jones NF. Limb transplantation in rats: immunosuppression with FK-506. The Journal of hand surgery 1995;20 (1):77-87.

310. Zdichavsky M, Jones JW, Ustuner ET, Ren X, Edelstein J, Maldonado C, et al. Scoring of skin rejection in a swine composite tissue allograft model. Journal of Surgical Research 1999;85 (1):1-8.

311. Kuhbier JW, Weyand B, Radtke C, Vogt PM, Kasper C, Reimers K. Isolation, characterization, differentiation, and application of adipose-derived stem cells. In: Bioreactor Systems for Tissue Engineering II: Springer; 2010. p. 55-105.

312. Gibson T, Medawar PB. The fate of skin homografts in man. Journal of Anatomy 1943;77 (Pt 4):299.

313. Adams AB, Pearson TC, Larsen CP. Heterologous immunity: an overlooked barrier to tolerance. Immunological reviews 2003;196 (1):147-160.

314. Al-Adra DP, Anderson CC. Mixed chimerism and split tolerance: mechanisms and clinical correlations. Chimerism 2011;2 (4):89-101.

315. Müller-Ruchholtz W. Glances at the history of transplantation immunology. Transplantation Proceedings 1999;31 (3):1443-1451.

316. Billingham RE, Brent L. A simple method for inducing tolerance of skin homografts in mice. Transplantation bulletin 1957;4 (2):67.

317. Fuchimoto Y, Gleit ZL, Huang CA, Kitamura H, Schwarze ML, Menard MT, et al. Skin-Specific Alloantigens In Miniature Swine1. Transplantation 2001;72 (1):122-126.

318. Ildstad ST, Sachs DH. Reconstitution with syngeneic plus allogeneic or xenogeneic bone marrow leads to specific acceptance of allografts or xenografts. 1984.

319. Ravindra K, Wu S, Bozulic L, Xu H, Breidenbach W, Ildstad S. Composite tissue transplantation: a rapidly advancing field. In: Transplantation proceedings; 2008: Elsevier; 2008. p. 1237-1248.

320. Huang CA, Fuchimoto Y, Scheier-Dolberg R, Murphy MC, Neville DM, Sachs DH. Stable mixed chimerism and tolerance using a nonmyeloablative preparative regimen in a large-animal model. The Journal of clinical investigation 2000;105 (2):173-181.

321. Claas F. Chimerism as a tool to induce clinical transplantation tolerance. Current opinion in immunology 2004;16 (5):578-583.
322. Thaunat O, Badet L, El-Jaafari A, Kanitakis J, Dubernard JM, Morelon E. Composite tissue allograft extends a helping hand to transplant immunologists. American journal of transplantation 2006;6 (10):2238-2242.
323. Prabhune KA, Gorantla VS, Perez-Abadia G, Francois CG, Vossen M, Laurentin-Perez LA, et al. Composite tissue allotransplantation in chimeric hosts part II. A clinically relevant protocol to induce tolerance in a rat model. Transplantation 2003;76 (11):1548-1555.
324. Demir Y, Ozmen S, Klimczak A, Mukherjee AL, Siemionow M. Tolerance Induction in Composite Facial Allograft Transplantation in the Rat Model. Plastic and Reconstructive Surgery 2004;114 (7):1790-1801.
325. Mathes DW, Solari MG, Randolph MA, Gazelle GS, Yamada K, Huang CA, et al. Long-term acceptance of renal allografts following prenatal inoculation with adult bone marrow. Transplantation 2005;80 (9):1300-1308.
326. Petit F, Minns AB, Nazzal JA, Hettiaratchy SP, Lantieri LA, Randolph MA, et al. Prolongation of skin allograft Sağkalım after neonatal injection of donör bone marrow and epidermal cells. Plastic and reconstructive surgery 2004;113 (1):270-276.
327. Chen H-D, Silvers WK. Influence of Langerhans cells on the Sağkalım of HY incompatible skin grafts in rats. Journal of Investigative Dermatology 1983;81 (1):20-23.
328. Demir Y, Ozmen S, Klimczak A, Mukherjee AL, Siemionow MZ. Strategies to develop chimerism in vascularized skin allografts across MHC barrier. Microsurgery 2005;25 (5):415-422.
329. Préville X, Flacher M, LeMauff B, Beauchard S, Davelu P, Tiollier J, et al. Mechanisms Involved in Antithymocyte Globulin Immunosuppressive Activity In A Nonhuman Primate Model 1. Transplantation 2001;71 (3):460-468.
330. Xu H, Montgomery SP, Preston EH, Tadaki DK, Hale DA, Harlan DM, et al. Studies investigating pretransplant donör-specific blood transfusion, rapamycin, and the CD154-specific antibody IDEC-131 in a nonhuman primate model of skin allotransplantation. The Journal of Immunology 2003;170 (5):2776-2782.
331. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. Cell 2008;133 (5):775-787.
332. Bozulic LD, Wen Y, Xu H, Ildstad ST. Evidence that FoxP3+ Treg may play a role in promoting long-term acceptance of CTA. Transplantation 2011;91 (8):908.

333. Hautz T, Brandacher G, Zelger B, Müller H, Lee A, Fuchs D, et al. Indoleamine 2, 3-dioxygenase and foxp3 expression in skin rejection of human hand allografts. In: Transplantation proceedings; 2009: Elsevier; 2009. p. 509-512.

334. Liu KS, Fan XQ, Zhang L, Wen QN, Feng JH, Chen FC, et al. Effects of recombinant human interleukin‐10 on Treg cells, IL‐10 and TGF‐β in transplantation of rabbit skin. Molecular medicine reports 2014;9 (2):639-644.

335. Bühler LH, Spitzer TR, Sykes M, Sachs DH, Delmonico FL, Tolkoff-Rubin N, et al. Induction Of Kidney Allograft Tolerance After Transient Lymphohematopoietic Chimerism In Patients With Multiple Myeloma And End-Stage Renal Disease1. Transplantation 2002;74 (10):1405-1409.

336. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. science 1999;284 (5411):143--7.

337. Yagi H, Soto-Gutierrez A, Parekkadan B, Kitagawa Y, Tompkins RG, Kobayashi N, et al. Mesenchymal stem cells: mechanisms of immunomodulation and homing. Cell transplantation 2010;19 (6):667.

338. Wang Y, Liu J, Xu C, Zhang W, Bai L, Li N, et al. Bone marrow transplantation combined with mesenchymal stem cells induces immune tolerance without cytotoxic conditioning. Journal of Surgical Research 2011;171 (1):e123-e131.

339. Badillo AT, Beggs KJ, Javazon EH, Tebbets JC, Flake AW. Murine bone marrow stromal progenitor cells elicit an in vivo cellular and humoral alloimmune response. Biology of Blood and Marrow Transplantation 2007;13 (4):412-422.

340. Kuo Y-R, Chen C-C, Goto S, Huang Y-T, Wang C-T, Tsai C-C, et al. Immunomodulatory effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a swine hemi-facial allotransplantation model. PLoS One 2012;7 (4):e35459.

341. Fang B, Song Y, Lin Q, Zhang Y, Cao Y, Zhao RC, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells as salvage therapy for treatment of severe refractory acute graft-vs.-host disease in two children. Pediatric transplantation 2007;11 (7):814-817.

342. Bochev I, Elmadjian G, Kyurkchiev D, Tzvetanov L, Altankova I, Tivchev P, et al. Mesenchymal stem cells from human bone marrow or adipose tissue differently modulate mitogen-stimulated B-cell immunoglobulin production in vitro. Cell biology international 2008;32 (4):384-393.

343. Casiraghi F, Azzollini N, Cassis P, Imberti B, Morigi M, Cugini D, et al. Pretransplant infusion of mesenchymal stem cells prolongs the Sağkalım of a semiallogeneic heart transplant through the generation of regulatory T cells. The Journal of Immunology 2008;181 (6):3933-46.

344. Eggenhofer E, Steinmann J, Renner P, Slowik P, Piso P, Geissler E, et al. Mesenchymal stem cells together with mycophenolate mofetil inhibit antigen presenting cell and T cell infiltration into allogeneic heart grafts. Transplant immunology 2011;24 (3):157--63.

345. Nauta AJ, Westerhuis G, Kruisselbrink AB, Lurvink EG, Willemze R, Fibbe WE. Donör-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donör graft rejection in a nonmyeloablative setting. Blood 2006;108 (6):2114-2120.

346. Beimler J, Zeier M. Borderline rejection after renal transplantation–to treat or not to treat. Clinical transplantation 2009;23 (s21):19-25.

347. Dvorak HF, Mihm MC, Dvorak AM, Barnes BA, Galli SJ. The microvasculature is the critical target of the immune response in vascularized skin allograft rejection. Journal of Investigative Dermatology 1980;74 (5):280-284.