



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

OKRELİZUMAB MADDESİNİN DENTAL PULPA KAYNAKLI
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ

DOKTORA TEZİ

BELMA AKPINAR YILMAZ

Tez Danışmanı
PROF. DR. CÜNEYT AKI

ÇANAKKALE - 2023



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**OKRELİZUMAB MADDESİNİN DENTAL PULPA KAYNAKLI MEZENKİMAL
KÖK HÜCRELER ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

BELMA AKPINAR YILMAZ

Tez Danışmanı

PROF. DR. CÜNEYT AKI

ÇANAKKALE – 2023



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



Belma AKPINAR YILMAZ tarafından Prof. Dr. Cüneyt AKI yönetiminde hazırlanan ve **27/01/2023** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Okrelizumab Maddesinin Dental Pulpa Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyoloji **Anabilim Dalı**’nda **DOKTORA TEZİ** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Prof. Dr. Cüneyt AKI
(Danışman)

.....

Doç. Dr. Gökhan DURUKSU

.....

Doç. Dr. Nurşen ÇÖRDÜK

.....

Dr. Öğr. Üyesi Neslihan DEMİR

.....

Dr. Öğr. Üyesi Büşra ÖNCEL DUMAN

.....

Tez No :

Tez Savunma Tarihi : 27/01/2023

Doç. Dr. Yener PAZARCIK

Enstitü Müdürü

.././20..

ETİK BEYAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kuralları'na uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında; tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi taahhüt ve beyan ederim.

Belma AKPINAR YILMAZ

27/01/2023

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması ile kök hücre konusunda yeni bilimsel ufuklara yelken açma şansını yakaladım. Bu süreçte desteğini her zaman hissettiğim, bilgi ve tecrübeleri ile yoluma ışık tutan, zorlu durumlardan çıkabilmem için eşsiz çözüm önerileri sunan, duruşu ve kişiliği ile her zaman örnek olan çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Cüneyt AKI'ya, tez çalışmamın şekillenmesinde ve ilerlemesinde çok değerli fikirlerini ve özverili çalışmalarını benden esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. Gökhan DURUKSU'ya, Tez İzleme Komitesi Üyesi olan varlığını ve desteğini her zaman hissettiren değerli hocam Sayın Dr. Öğretim Üyesi Neslihan DEMİR'e, Doktora eğitim sürecinde tanıştığım ve her türlü desteği ile hep yanımda hissettiğim değerli hocam Sayın Doç. Dr. Meliha Merve ÇİÇEKLYURT'a, tezim için kullandığım ilaçların teminini sağlayan çok değerli doktorum Nöroloji Uzmanı Doç. Dr. Mustafa ÇAM'a çok teşekkür ederim.

Doktora eğitiminin zorlu süreçlerinde gücümü kaybettiğim anlarda bana olan inançlarıyla güç topladığım canım annem Dr. Selma AKPINAR'a, canım babam Dr. Hıdır AKPINAR'a ve biricik kardeşim Mehmet Onur AKPINAR'a, benim olmadığım her an çocuklarıma yokluğumu hissettirmeyen kayınvalidem değil annem olan Birsen YILMAZ'a ve canım babam Feridun YILMAZ'a, benlik arayışında çıktığım yolda yol arkadaşım Aynur ÇELENK'e ve çok değerli ailem, canımın içi yavrularım Ateş ve Güneş kardeşlere, hayat arkadaşım Emir YILMAZ'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Varlığınızla hayatıma kattığınız anlam için minnettarım...

Belma AKPINAR YILMAZ

Çanakkale, Ocak 2023

ÖZET

OKRELİZUMAB MADDESİNİN DENTAL PULPA KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Belma AKPINAR YILMAZ

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Cüneyt AKI

27/01/2023, 52

Multipl Skleroz (MS) enflamasyon, demiyelinizasyon ve akson hasarı ile karakterize olan, kronik seyirli, otoimmün bir merkezi sinir sistemi (MSS) hastalığıdır. MS tedavisindeki en önemli amaç nörorejenerasyonu sağlamaktır; fakat mevcut tedaviler sadece MS'in ilerlemesini yavaşlatmak yönünde etki gösterirler. Okrelizumab, MS tedavisinde kullanılan humanize anti CD20 monoklonal antikorudur. Kök hücre tedavisi, rejeneratif tıpta etkili bir tedavidir ve mevcut tedavilerin yetersiz kaldığı durumlarda umut verici yeni bir yaklaşımdır. Bu çalışmada, Okrelizumab'ın, dental pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (DP-MKH) proliferasyonu ve farklılaşma potansiyeli üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç kapsamında normal kültür ortamına üç farklı dozda (1,5 µg/mL, 15 µg/mL ve 150 µg/mL) Okrelizumab ilave edildikten sonra WST- 1 ile 24, 48 ve 72. saatlerde proliferasyon analizleri yapıldı. 24 ve 48 saatlik Okrelizumab tedavisinin doza bağlı olarak kök hücre proliferasyonunu azalttığı gözlemlendi ayrıca 72 saatte ilacın proliferasyon üzerindeki etkinliğinin düşük dozlarda kaybolduğu görüldü. Benzer şekilde, köklük belirteci Rex-1'in ifadesinde doza bağımlı bir düşüş tespit edildi. İlacın kök hücrelerin farklılaşma potansiyeli üzerindeki etkisini belirlemek için; adipojenik farklılaşma belirteci ADFP, osteojenik farklılaşma belirteci RUNX-2, kondrojenik farklılaşma belirteci SOX-9 ve nörojenik farklılaşma belirteci TUBB3 ekspresyonu eş zamanlı PCR ile değerlendirildi. RUNX-2, SOX-9 ve TUBB3 ekspresyonları doza bağlı olarak artarken, ADFP ekspresyonunda ilaç dozuna paralel olarak azalma olduğu görülmüştür. Aynı zamanda nörojenik farklılaşma sonrasında TUBB3 ve GFAP immünfloresan boyama

yapılmış ve sonuçların birbirini desteklediği gözlenmiştir. Doktora tez çalışması sonuçlarına göre; MS tedavi ajanlarından olan Okrelizumab, DP-MKH'lerinin nörojenik yönde farklılaşmalarını indükleyerek nöroprotektif etki gösteriyor olabilir ayrıca osteojenik, kondrojenik ve nörojenik farklılaşmasını indükleyerek kök hücrelerin rejeneratif etkilerini destekleyebildiği düşünölmektedir.

Anahtar Kelimeler: Multipl Skleroz, Mezenkimal Kök Hücre, Okrelizumab, Nörojenik Farklılaşma, Hücresel Tedavi



ABSTRACT

DETERMINATION THE EFFECTS OF OCRELIZUMAB ON DENTAL PULP DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS

Belma AKPINAR YILMAZ

Çanakkale Onsekiz Mart University

School of Graduate Studies

Doctoral Dissertation in Biological Science

Advisor: Prof. Dr. Cüneyt AKI

27/01/2023, 52

Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune central nervous system (CNS) disease characterized by inflammation, demyelination and axonal damage. The most important goal in MS treatment is to provide neuroregeneration; however, current treatments only work to slow the progression of MS. Ocrelizumab is a humanized anti-CD20 monoclonal antibody used in the treatment of MS. Stem cell therapy is an effective treatment in regenerative medicine and a promising new approach in cases where current treatments are insufficient. In this study, it was aimed to investigate the effects of Ocrelizumab on the proliferation and differentiation potential of dental pulp-derived mesenchymal stem cells (DP-MSC). For this purpose, three different doses of Ocrelizumab (1.5 µg/mL, 15 µg/mL and 150 µg/mL) were added to the normal culture medium, and proliferation analyzes were performed with WST-1 at 24, 48 and 72 hours. It was observed that 24-hours and 48-hours Ocrelizumab treatment decreased stem cell proliferation dose-dependently, and it was observed that the effectiveness of the drug on proliferation was lost at low doses in 72 hours. Similarly, a dose-dependent decrease in expression of the stemness marker Rex-1 was detected. To determine the effect of the drug on the differentiation potential of stem cells; expression of the adipogenic differentiation marker ADFP, the osteogenic differentiation marker RUNX-2, the chondrogenic differentiation marker SOX-9 and the neurogenic differentiation marker TUBB3 were evaluated by real-time PCR. While RUNX-2, SOX-9 and TUBB3 expressions increased in a dose-dependent manner, there was a decrease in ADFP expression in parallel with the drug dose. At the same time, TUBB3 and GFAP immunofluorescence staining was performed after neurogenic differentiation and it was

observed that the results supported each other. According to the results of the doctoral thesis; Ocrelizumab, one of the MS treatment agents, may have a neuroprotective effect by inducing neurogenic differentiation of DP-MSCs, and it is thought that it may support the regenerative effects of stem cells by inducing osteogenic, chondrogenic and neurogenic differentiation.

Keywords: Multiple Sclerosis, Mesenchymal Stem Cell, Ocrelizumab, Neurogenic Differentiation, Cellular Therapy



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

JÜRİ ONAY SAYFASI.....	i
ETİK BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii

BİRİNCİ BÖLÜM GİRİŞ

1.1. Genel Bilgi.....	1
1.2. Multipl Skleroz.....	3
1.2.1. Multipl Skleroz Tanımı.....	3
1.2.2. Multipl Skleroz Tarihçesi.....	3
1.2.3. Multipl Skleroz Epidemiyolojisi.....	4
1.2.4. Multipl Skleroz Etiyolojisi.....	5
1.2.5. Multipl Skleroz Patolojisi.....	6
1.2.6. Klinik Belirtiler ve Bulgular.....	8
1.2.7. Multipl Skleroz Teşhisi.....	8
1.2.8. Multipl Skleroz Tipleri.....	10
1.2.9. Multipl Skleroz Tedavisi.....	11
Atak Tedavisi.....	11
Koruyucu Tedaviler.....	12
1.3. Kök Hücreler Hakkında Genel Bilgi.....	14
1.3.1. Kök Hücrelerin Sınıflandırılması.....	14

1.3.2. Mezenkimal Kök Hücreler.....	16
1.3.3. Kök Hücrelerin Tedavide Kullanımları.....	17
1.3.4. Kök Hücrelerin Nörodejenarit Hastalıklarda Kullanımı.....	18

İKİNCİ BÖLÜM ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. MS Hastalığının İlaç ile Tedavisi.....	20
2.2. MS Hastalığının Kök Hücre ile Tedavisi.....	22

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. İn-vitro Deney Grupları.....	25
3.2. Hücre Kültürü.....	25
3.3. Hücre Canlılık Analizi (WST-1 Testi)	26
3.4. Gen Ekspresyon Analizi.....	27
3.5. Nörojenik Farklılaştırma.....	29
3.6. İmmünfloresan Boyama.....	29
3.7. Akım Sitometri Analizi.....	29
3.8. İstatistiki Değerlendirme.....	30

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Hücre Kültürü Bulguları.....	31
4.2. Hücre Canlılık Analizi (WST-1 Testi) Bulguları	32
4.3. Gen Ekspresyon Analizi Bulguları	35
4.4. İmmünfloresan Boyama Bulguları	39
4.5. Akım Sitometri Bulguları.....	41
4.6. Tartışma.....	42

BEŞİNCİ BÖLÜM SONUÇ ve ÖNERİLER 45



SİMGELER VE KISALTMALAR

MS	Multipl Skleroz
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
RRMS	Relapsing Remiting Multipl Skleroz
PPMS	Primer Progresif Multipl Skleroz
SPMS	Sekonder Progresif Multipl Skleroz
KİS	Klinik İzole Sendrom
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
HKH	Hematopoetik Kök Hücre
EKH	Embriyonik Kök Hücre
iPKH	İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre
DP-MKH	Dentap Pulpa kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre
Kİ-MKH	Kemik İliği kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre
EBV	Epstein-Barr Virüsü
KBB	Kan-Beyin Bariyeri
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
DOE	Denysel Otoimmün Ensefalomyelit
ALS	Amyotrofik Lateral Skleroz
RA	Retinoik Asit
MMP	Matris Metaloproteinazlar
ACTH	Adrenokortikotropik Hormon
MCP-1	Monosit Kemoatraktan Protein-1
S1P	Sfingozin-1-fosfat
α	Alfa
β	Beta
μ g	Mikrogram
mg	Miligram
ml	Mililitre
nM	Nanomolar

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Tablo Adı	Sayfa No
Tablo 1	2017 Revize McDonald Kriterleri	9
Tablo 2	Okrelizumab uygulamasından 24 saat sonra hücre canlılık indeksi.	33
Tablo 3	Okrelizumab uygulamasından 48 saat sonra hücre canlılık indeksi.	34
Tablo 4	Okrelizumab uygulamasından 72 saat sonra hücre canlılık indeksi.	34
Tablo 5	Okrelizumab uygulamasından 24, 48 ve 72 saat sonra REX-1 ekspresyonu.	35
Tablo 6	Okrelizumab uygulamasından 24, 48 ve 72 saat sonra RUNX-2 ekspresyonu.	36
Tablo 7	Okrelizumab uygulamasından 24, 48 ve 72 saat sonra SOX-9 ekspresyonu.	37
Tablo 8	Okrelizumab uygulamasından 24, 48 ve 72 saat sonra ADFP ekspresyonu.	38
Tablo 9	Okrelizumab uygulamasından 24, 48 ve 72 saat sonra TUBB-3 ekspresyonu.	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa No
Şekil 1	Multipl Sklerozun 2013 yılı küresel prevalansı	5
Şekil 2	Multipl Skleroz immünopatogenezi	7
Şekil 3	Multipl Sklerozda görülen belirtiler	8
Şekil 4	Multipl Skleroz Tipleri	11
Şekil 5	MS'de immünopatojenik mekanizmalar ve farklı hastalık modifiye edici tedavilerin önerilen hedefleri	13
Şekil 6	Farklılaşma kapasitelerine göre kök hücre çeşitleri	15
Şekil 7	Nörodejeneratif hastalıklarda kök hücre kullanımı	19
Şekil 8	6-kuyucuklu kültür kaplarında DP-MKH'lerin kültüre edilmesi	26
Şekil 9	DP-MKH'lerin Okrelizumab' ın farklı dozları ile 48 saat kültürü sonrasındaki görüntüleri	32
Şekil 10	Okrelizumab ilavesinin ardından Nörojenik farklılaşma belirteci immünfloresan boyama görüntüleri	40
Şekil 11	1,5 µg/mL Okrelizumab ve 1nM Retinoik Asit eklenmiş nörojenik farklılaşma sonrası immünfloresan boyama görüntüleri	41
Şekil 12	DP-MKH'lerin akım sitometri cihazı ile CD20 yüzey antijeni ekspresyon analizi	42

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

1.1. Genel Bilgi

İnsanların hastalıklarla savaşı insanlık tarihi kadar uzun bir geçmişe sahiptir. Bazı hastalıklar salgınlar halinde ilerleyerek çoklu ölümlere sebep olurken, bazıları ise insanların sahip olduğu savunma mekanizmasına yenilerek yıkıcı etkilerini kaybetmiştir. Gelişen teknoloji ile birlikte hastalıklara sebep olan etkenler bulunarak tedavi seçenekleri genişletilmiş ve pek çok hastalık için insanlık bu savaşı kazanmıştır. Kimi hastalıklar insanları küresel düzeyde etkileyerek pandemilerin oluşmasına neden olmaktadır. Son dönemlerde bu duruma sıklıkla rastlanmaktadır. Domuz gribi, kuş gribi, MERS, SARS, Covid 19 gibi pandemi yaratan hastalık etmenleri sonucunda çok fazla sayıda insan yaşamını yitirmiştir.

İnsanlar açısından günümüzde en yaygın gözlemlenen sağlık sorunlarından bir tanesi de nörodejeneratif hastalıklardır. Nörodejeneratif hastalıklar beyin veya omurilikteki nöronların dejenerasyonu veya kaybı ile karakterize edilen bir hastalık grubudur. Nörodejeneratif hastalıklar arasında MS, Parkinson, Huntington, Alzheimer gibi hastalıklar toplumda sıklıkla görülmektedir. Bu hastalıklar temel olarak bilişsel bozukluklara sebep olmakta ve hastanın yaşam kalitesi üzerinde olumsuz etkilerde bulunmaktadır. Nörodejeneratif hastalıkların tedavi yaklaşımları geçmişten günümüze çok fazla değişiklik göstermiştir. Bu hastalıkların kesin tedavisi bulunmamakla birlikte hastaların yaşam kalitesini arttırmaya yönelik tedavi yaklaşımları uygulanmaktadır.

Araştırma konumuzun temelini oluşturmakta olan nörodejeneratif hastalıklardan Multipl Skleroz (MS) hastalığının en erken tanımı, otobiyografik günlüklerde 14. yüzyıla dayanır, ancak en kapsamlı tanımı Fransız nörolog Jean-Martin Charcot tarafından 1868 yılında otopsi örnekleri incelenerek klinik bulguların birleştirilmesi ile “çoklu plak” terimi kullanılarak yapılmış olup ilk tedaviler ancak 20. yüzyılın sonlarında bulunmuştur.

MS enflamasyon, demiyelinizasyon ve akson hasarı ile karakterize olan, kronik seyirli, otoimmün bir merkezi sinir sistemi (MSS) hastalığıdır. MS, dünya çapında yaklaşık

iki buçuk milyon insanı etkileyen, etkin bir tedavisi olmayan, kadınlarda erkeklere oranla yaklaşık iki kat daha fazla görülen bir hastalıktır. Miyelin kılıfların demiyelinizasyonuna sebep olan ataklar ile ilerleyen, sıklıkla genç bireyleri etkileyen en yaygın nörodejeneratif hastalıklardan biridir.

Miyelin kılıfın hasarlanması sonucu beyin ve omurilikte çok sayıda plaklar oluşur. MS tedavisindeki en önemli amaç nörorejenerasyonu sağlamaktır; fakat mevcut tedaviler sadece MS'in ilerlemesini yavaşlatmak yönünde etki gösterirler. MS için mevcut terapötik yöntemler, immün baskılayıcıları, immünomodülatörleri ve monoklonal antikoları içerir. İmmünomodülatör ve immünsüpresif tedaviler hastalığın seyrini değiştirmek için kullanılır, bu tedaviler hastalar için günlük tedavidir ve etkinliği, hastalığın agresif seyrinin başlangıcını geciktirmeye dayanır.

MS tedavisinde son yıllarda çok ilerleme kaydedilmiştir. Son zamanlarda CD20'ye özgü monoklonal antikolarla (örneğin Rituksimab, Okrelizumab ve Ofatumumab) yapılan çalışmalar, B hücresi baskılanmasının, tekrarlayan MS atakları için güvenli ve etkili bir tedavi stratejisi olduğunu göstermiştir. Bu ajanlar esas olarak hastalığın immün yönlerini ve tekrarlayan enflamasyonu hedefler ancak nörolojik fonksiyonların korunmasında ve kurtarılmasında kritik öneme sahip remiyelinizasyonun istenen uzun vadeli sonucunu ele almakta yetersiz kalmaktadırlar.

Okrelizumab, humanize anti CD20 monoklonal antikorudur. CD20 antijeni, B hücrelerinde eksprese edilir, ancak kök hücreler, pro-B hücreleri veya plazma hücreleri üzerinde eksprese edilmez. Okrelizumab her altı ayda bir 600 mg dozunda intravenöz olarak uygulanmaktadır. Genel olarak iyi tolere edilebilen ve Relapsing-Remitting Multipl Skleroz (RRMS) için etkili bir tedavi yöntemi olmakla birlikte Primer Progresif Multipl Skleroz (PPMS) için onay alan ilk tedavi ajanıdır.

Okrelizumabın mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır, ancak CD20 eksprese eden B hücrelerinin sayısında ve işlevinde azalma yoluyla immünomodülasyonu sağladığı düşünülmektedir. Okrelizumab, CD20'ye bağlanır, hücre aracılı sitotoksisite, fagositoz, komplemana bağımlı sitotoksisite ve apoptoz yoluyla CD20 eksprese eden B hücrelerini seçici olarak ortadan kaldırır.

Okrelizumab'ın MS'in ilerlemesini baskılamak için büyük bir potansiyele sahip olduğu, ancak nöronal dokudaki hasarı iyileştirmede hiçbir etkisi olmadığı gösterilmiştir. DP-MKH'ler, nöral krista kökenli olup nörojenik farklılaşma kapasiteleri yüksek hücreler olduğundan nörodejeneratif hastalıklarda kullanımı için uygun bir aday olabilir. Ancak, Okrelizumab'ın DP-MKH'ler ile etkileşimine odaklanan herhangi bir yayınlanmış çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı, MS tedavisinde kullanılan Okrelizumab'ın DP-MKH'lerin çoğalma ve farklılaşma kapasiteleri üzerindeki etkisini araştırmaktır.

1.2. Multipl Skleroz

1.2.1. Multipl Skleroz Tanımı

Multipl skleroz (MS), merkezi sinir sisteminin (MSS) kronik, inflamatuvar, demiyelinizan ve otoimmün bir hastalığıdır. Otoreaktif T ve B hücreleri, nöronlar arasındaki miyelin kılıfa saldırarak hücreler arası iletişimin kopmasına ve sonunda nörolojik sakatlığın ortaya çıkmasına neden olurlar (Genc vd., 2019).

1.2.2. Multipl Skleroz Tarihçesi

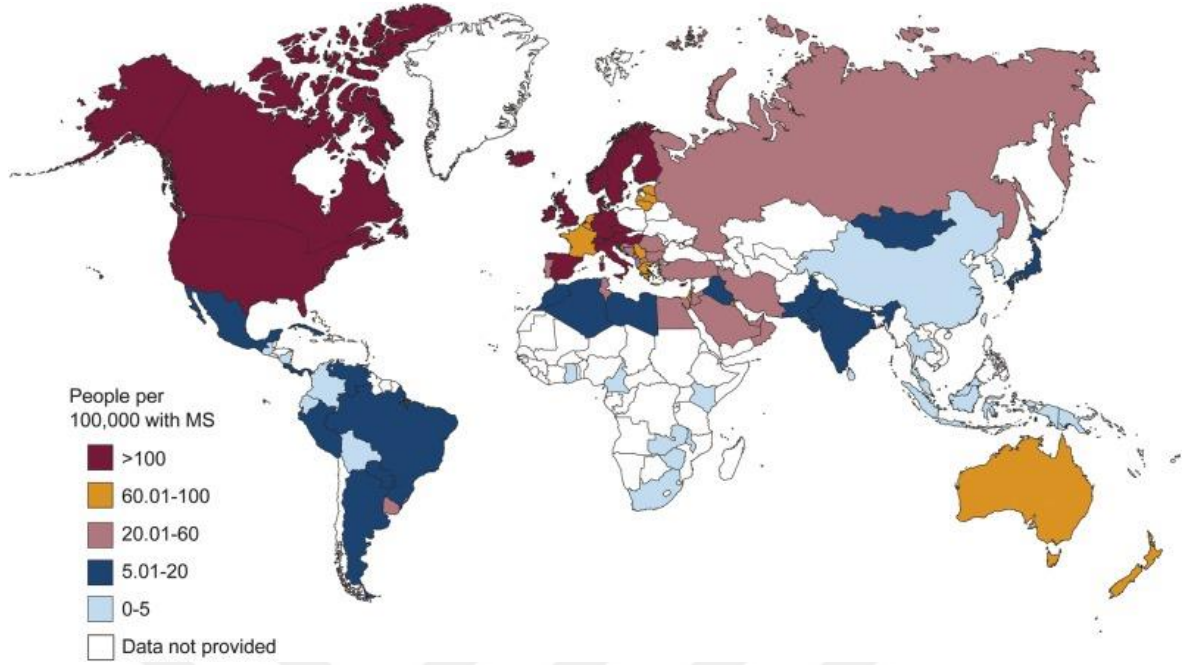
MS, ilk olarak 1868 yılında, beynin ve medulla spinalisin beyaz maddesinde çok sayıda lezyon ve glial skar (plak) alanı gözlemleyen Jean-Martin Charcot tarafından bildirilmiştir. 1933 yılında Amerikalı bilim insanı olan Dr. Thomas Rivers, yaptığı hayvan deneylerinde viral bir hastalık olarak bilinen MS'in viral bir hastalık olmadığını, otoimmün bir hastalık olduğunu göstermiştir. 1959 yılında ise Amerikalı bilim insanı Dr. Philip Paterson, hastalığın gelişmesinde T hücrelerinin rolü olduğunu keşfetmiştir. 1960 yılında ise MS'li hastaların beyin omurilik sıvısında B lenfosit hücreleri tespit edilmiş ve tanıda modern prosedürlerin gelişimi sağlanmıştır. Bu durum MS'in otoimmün bir hastalık olduğunun ilk kanıtıdır (Hemmer ve Mühlau 2017).

1.2.3. Multipl Skleroz Epidemiyolojisi

MS dünya çapında yaklaşık olarak iki buçuk milyon kişiyi etkileyen, etkili bir tedavisi olmayan, kadınlarda erkeklere oranla iki kat daha fazla görülen bir küresel hastalıktır. MS'in görülme sıklığı coğrafi bölgelere göre çeşitlilik göstermektedir. Kuzey yarım kürede, güneyden kuzeye doğru; güney yarım kürede ise kuzeyden güneye doğru gidildikçe hastalığın görülme sıklığında artış olduğu bildirilmiştir. Aynı coğrafyada olsa da farklı ırk ve etnik topluluklarda çarpıcı dağılımlar gözlenmekte; beyaz ırkta daha fazla görüldüğü vurgulanmaktadır. Afrika'da yaşayan siyahlarda hastalığın çok ender olduğu, ABD'de yaşayan siyahlarda ise hastalığın görülme sıklığının beyazların yarısı kadar olduğu bilinmektedir (Weinshenker, 1995). Avrupa ve Kuzey Amerika'nın kuzey bölgelerinde yüksek oranda MS görülmektedir. MS hastalığının küresel dağılımı Şekil 1'de gösterilmiştir (Browne vd., 2014).

Ülkemizde son yıllarda yapılan epidemiyolojik çalışmalara göre, MS prevalansı yüzbin kişide 41,1 ila 101,4 arasındadır. MS, ilerleyici, kronik ve zayıflatıcı etkilerinin yanında, herhangi bir tedavinin bulunmayışı ve hedef yaş grubu, nüfusun en üretken genç yetişkinleri olması nedeniyle, modern toplumlar için ekonomik ve sosyal anlamda büyük bir kayıptır (Türk Börü vd., 2018).

MS'in ekonomik yükünün Avrupa'da 2010 yılında 14,6 milyar Euro, ABD'de ise 2013'te 4,3 milyar dolar olduğu tahmin edilmektedir (Gustavsson vd., 2011, Chen vd., 2017).



Şekil 1. Multipl Sklerozun 2013 yılı küresel prevalansı (Browne vd., 2014)

1.2.4. Multipl Skleroz Etiyolojisi

MS'in nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte, D vitamini eksikliği, UVB ışığına maruz kalma, Epstein-Barr virüsü (EBV) enfeksiyonu, obezite ve sigara içme gibi çevresel koşullar hastalığın ortaya çıkmasıyla ilişkilidir. Ek olarak, şimdiye kadar MS'e yatkınlık ile ilişkili olan bağışıklık sistemi ile ilgili genlerde 150'den fazla tek nükleotid polimorfizmi tanımlanmıştır. Genetik yatkınlık ve çevresel koşulların bir araya gelmesi MS riskini artırabilir (Dobson ve Giovanni, 2019).

MS'in, bazı ırklarda daha yaygın olması, ikizlerde görülme oranının yüksek olması ve MS'li bireylerin birinci derece akrabalarında MS'in daha sık görülmesi gibi nedenlerle genetik etkenlerin giderek önem kazanmaktadır. MS hastalarının yaklaşık %15'inin ailelerinde de bu hastalığa yakalanmış başka bir birey daha bulunmaktadır. Hastalık riskinin, tek yumurta ikizlerinde, çift yumurta ikizlerine oranla 10 kat fazla olduğunu gösteren bulgular mevcuttur (Ebers vd., 1983). Kardeşler ve ikizlerde yürütülen çalışmalarda, monozigot ikizlerde normal popülasyona göre hastalık riski 150-300 kat daha fazla

bulunmuştur (Hafler vd., 2005). Kısacası, genetik olarak yatkınlığı olan bireylerin, hayatlarının başlangıç dönemlerinde karşılaşmış oldukları bir uyucunun, bağışıklık sistemini harekete geçirerek miyelin hasarına ve kaybına yol açtığı sanılmaktadır (Rowland, 2008).

1.2.5. Multipl Skleroz Patolojisi

MS, miyelin kılıf proteinlerinin lenfositler tarafından antijen olarak algılanıp yıkıma uğratılmasıyla başlayan otoimmün bir hastalıktır. MS'in karakteristik patolojik özelliği, inflamatuvar lezyonların neden olduğu demiyelinizan plaklardır. Periferde aktive olmuş T ve B lenfositler Kan Beyin Bariyerini (KBB) geçerek miyelin kılıf ve oligodentrosit antijenlerine karşı hücrel mekanizmalar geliştirmektedir. Lenfositlerin KBB'ne transmigasyonları için çeşitli adezyon moleküllerinin, kemokinlerin ve matriks metaloproteinazların (MMP'ler) ekspresyonu söz konusudur. Merkezi sinir sistemine giren otreaktif lenfositler, antijen sunan hücreler tarafından eksprese edilen MHC sınıf II molekülleri aracılığıyla beyin parankimi içindeki otoantijenik peptitlerle karşılaştıklarında, sitokinlerin ve kemokinlerin salınmasına, inflamatuvar hücrelerin (T hücreleri, monositler ve B hücreleri) toplanmasına ve miyelin hasarıyla sonuçlanan mikrogliya ve makrofajların kalıcı aktivasyonuna yol açar (Garg ve Smith, 2015).

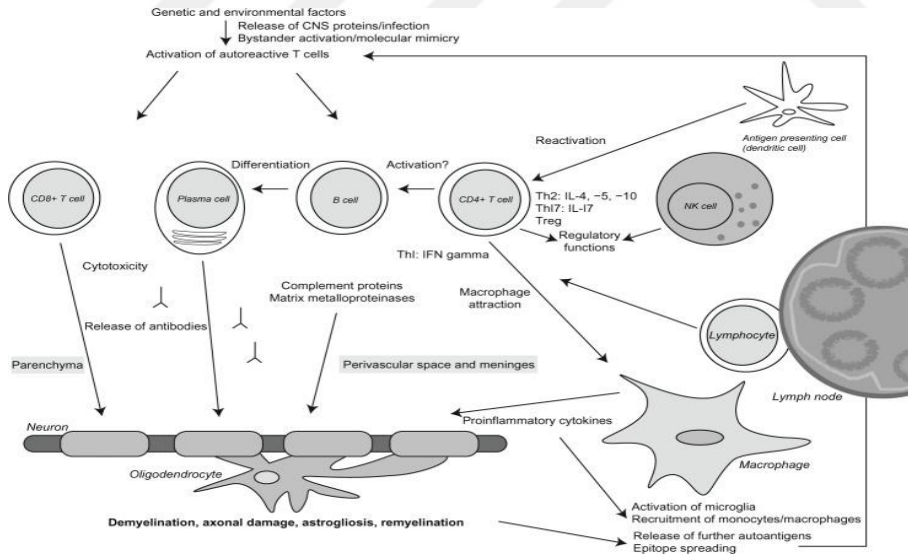
Histopatolojik olarak MS lezyonları, aktifleştirilmiş T hücreleri, B hücreleri, plazma hücreleri ve makrofajlardan oluşan inflamatuvar infiltratlar ile karakterize edilir. CD4+T hücreleri esas olarak perivasküler boşluklarda ve meninklerde bulunurken, CD8+T hücreleri MS lezyonlarının parankiminde bulunur. MS lezyonlarında derin demiyelinizasyon, aksonal hasar, astrogliosis ve remiyelinizasyon görülür (Selter ve Hemer, 2013).

Manyetik Rezonans görüntüleme (MRG) ile gözlenen inflamatuvar plaklar MS'in patolojik özelliğidir. MS için tipik lezyon özellikleri ve yerleşim alanları vardır. McDonald tanı kriterlerinde yer alan tipik yerleşim alanları periventriküler, juktakortikal, infratentoryal bölgeler ve spinal korddur (McDonald vd., 2001).

MS'in immünopatogenezi hakkındaki bilgilerin çoğu, demiyelinizasyon hayvan modeli olan deneysel otoimmün ensefalomyelit (DOE) çalışmasından elde edilmiştir. DOE, demiyelinizasyon, oligodendrosit ve aksonal kayıp gibi MS ile ilgili histolojik özellikleri taklit etmede en uygun deney modelidir (Garg ve Smith, 2015).

Hayvan deneyleri, interferon-gama salan yardımcı T (Th1) hücrelerinin ve Th17 hücrelerinin, MSS içindeki iltihaplanmada anahtar rol oynadığını düşündürmektedir.

T hücrelerinin yanı sıra B hücrelerinin de MS patogenezi de önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır. B hücreleri, periferik bağışıklık sisteminde ve muhtemelen MSS'de önemli antijen sunan hücrelerdir. B hücresi reseptörleri ile çözünebilir proteinleri yakalayabilir, MHC-II moleküllerine bağlı peptit antijenlerini oreaktif T hücrelerine sunabilirler. MS immünopatogenezi ile ilgili açıklama Şekil 2'de verilmiştir (Selter ve Hemer, 2013).



Şekil 2. Multipl Skleroz immünopatogenezi (Selter ve Hemer, 2013).

1.2.6. Klinik Belirtiler ve Bulgular

Beyin ve omuriliğin hangi bölgesinde dejenerasyon meydana gelmişse o alanla ilgili belirti ve bulgular görülür. Bu belirtiler arasında en sık görülenleri, motor omurilik semptomları (bir veya daha fazla uzuvda uyuşma veya zayıflık), otonomik omurilik semptomları (mesane ve bağırsak fonksiyon bozukluğu), duyuşsal kayıp (parestezi), serebellar semptomlar (ataksi ve titreme), optik nörit (kısmi veya tam görme kaybı), bulanık görme, fasiyal miyokimi, ısı intoleransı, yorgunluk, baş dönmesi, uyku eksikliği, ağrı, öznel bilişsel zorluklar ve depresyondur (Miljkovic ve Spasojevic, 2013). Daha nadir olarak; konuşma güçlüğü, yutma güçlüğü, baş ağrısı, işitme kayıpları da görülebilir. Bu belirtiler tek tek veya bir arada görülebilirler (Şekil 3).

Motor Semptomları	Somatosensoriyal Semptomlar	Kognitif ve Psikiyatrik Semptomlar	Diğer Semptomlar
Kortikospinal yol tutulumu	Uyuşukluk	Depresyon	Yorgunluk
Başlangıçta tek bacakta daha sonra iki taraflı tutulum	Yanma	Bipolar bozukluk	Bulanık görme
Derin tendon reflekslerinde artış	Gerilme	Görsel ve işitsel dikkat eksikliği	Dizartrik konuşma
Spasitede artış	Karıncalanma	Bellek çağırışım sorunları	Optik nörit
Spasite sebebiyle ağrı, kramp, spazm	Gövde ve ekstremitelerde bant şeklinde anormal duyuşlar		Başlangıçta yürüme ataksisi, kronik hastalarda gövde ataksisi
	Lhermitte belirtisi (boynun ani öne fleksiyonunda omurilikte, kol ve bacaklarda ani elektrikleme, çarpılma hissi)		Miksiyon ve defekasyon bozuklukları

Şekil 3. Multipl Sklerozda görülen belirtiler (Öztürk vd., 2017).

1.2.7. Multipl Skleroz Teşhisi

MS tanısı manyetik rezonans görüntüleme (MRG), beyin omurilik sıvısı ve nörolojik bulgulara dayanan klinik bir tanıdır (Garg ve Smith 2015). MRG, MS'te teşhis koymak için en önemli araçlardan biridir. MRG lezyonlarının zaman ve mekanda dağılımı MS tanısı için kritik öneme sahiptir. MS için ilk tanı kriterleri 1956 yılında, Shumacher tarafından yayınlanmış, sonrasında Poser kriterleri yayınlanmış ve son olarak 2001 yılında McDonald

kriterleri yayınlanarak 2005, 2010 ve 2017 revize edilmiştir (Thompson vd., 2018). McDonald kriterleri, MS'in güvenli ve erken teşhisine olanak sağlamıştır. Tablo 1'de 2017 revize kriterleri belirtilmiştir.

Tablo 1

2017 Revize McDonald Kriterleri (Thompson vd., 2018).

Atak	Objektik Klinik Bulgulu Lezyon sayısı	MS Tanısı için Gerekli Ek Veri
≥ 2 atak	≥ 2 atak	Yok ^a
≥ 2 atak	1+ öyküde başka bir alanda ki lezyona ait atak ^b	Yok ^a
≥ 2 atak	1	MSS ^c de farklı bir alandaki lezyona ait yeni atak veya MRG ^f ile mekanda yayılımının gösterilmesi
1 atak	≥ 2 atak	Ek bir klinik atak veya MRG ^d ile zamanda yayılımın gösterilmesi veya BOS-spesifik OKB ^e varlığı
1 atak	1 lezyona ait objektif klinik bulgu	SSS ^c de farklı bir alandaki lezyona ait yeni bir atak veya MRG ^f ile mekanda yayılımın gösterilmesi ve ek bir klinik atak veya MRG ^d ile zamanda yayılımın gösterilmesi veya BOS-spesifik OKB ^e varlığı
Sinsi progresyon	1 yıl klinik progresyon (retrospektif veya prospektif, ataktan bağımsız olarak)	Aşağıdakilerin 2'si <ul style="list-style-type: none"> • MS tipik (periventriküler, kortikal/jukstakortikal veya infratentoryal) alanlarda ≥1 lezyon • Spinal kordda ≥2 lezyon • BOS-spesifik OKB varlığı

a: Mekanda ve zamanda yayılımı göstermek için ek bir teste gerek olmasa da beyin MRG tüm hastalara yapılmalıdır. Tanıyı destekleyecek yetersiz klinik ve MR bulguları olanlarda, tipik KİS olmayanlarda, atipik özellikleri olan hastalarda ek olarak spinal kord MRG ve BOS tetkiki yapılmalıdır. Bu tetkikler yapılamadıysa ya da negatifse MS tanısı koymadan önce dikkat edilmeli ve alternatif tanılar göz önünde bulundurulmalıdır.

b: Atak için objektif nörolojik bulgular temelinde konulmuş klinik tanı en güveniliridir. Öyküdeki atağa ait dökümanite edilmiş objektif nörolojik bulgular yoksa, öykü enflamatuvar demiyelinizan olaya ait tipik semptom ve klinik gelişim özelliklerini içermelidir. Ancak en az bir atak objektif bulgularla desteklenmelidir. Objektif kanıtların yokluğunda dikkatli olunmalıdır.

c: MRG’de alanda yayılım; MS tipik (periventriküler, kortikal/jukstakortikal, infratentoryal ve spinal kord) 4 alanın ≥ 2 ’sinde ≥ 1 lezyon olması.

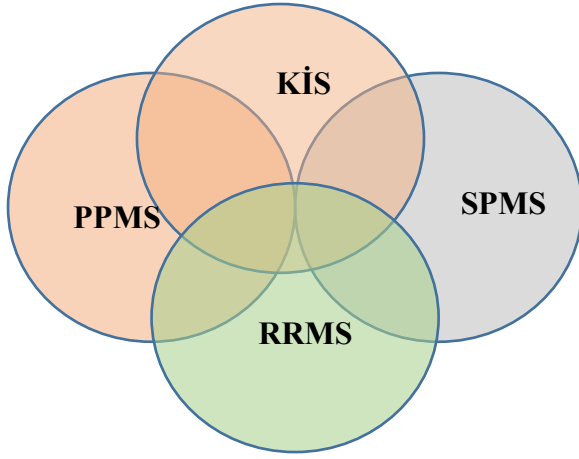
d: MRG’de zamanda yayılım; herhangi bir zamanda çekilen MRG’de kontrast tutan ve tutmayan lezyonların aynı anda bulunması veya takip MRG’sinde ilk MRG (çekildiği zamandan bağımsız olarak) referans alındığında yeni bir T2 hiperintens lezyonun ya da kontrast tutan lezyonun olması.

e: BOS-spesifik OKB varlığı zamanda yayılımı göstermez ama tanıda onun yerine geçer.

MS: Multipl skleroz, SSS: Santral sinir sistemi, MRG: Manyetik rezonans görüntüleme, BOS: Beyin omurilik sıvısı, OKB: Oligoklonal band

1.2.8. Multipl Skleroz Tipleri

MS’in klinik ilerleyişine göre 4 alt tipi tanımlanmıştır. Klinik İzole Sendrom (KİS) enflamatuvar demiyelinizasyon özellikleri gösteren ilk klinik atak olarak tanımlanır. KİS olgularında, hasta hayatı boyunca tek bir atak yaşayabilirken ilerleyen zamanlarda relapsing-remitting MS (RRMS)’e dönüşme ihtimali bulunmaktadır. RRMS, akut nüksetmelerin ardından değişen derecelerde iyileşme gösteren nükseden-düzelen MS formudur. 20-25 yıl içinde hastaların %90’ı SPMS’e dönüşebilmektedir. Başlangıçta tekrarlayan-düzelen bir seyir gösteren ve geri dönüşü olmayan bir ilerleme ve ciddi sakatlık birikimi ile karakterize edilen sekonder progresif MS (SPMS) olarak tanımlanır. Hastalığın başlangıcından itibaren kesintisiz bir ilerleme ile karakterize edilen primer progresif MS (PPMS) olarak adlandırılmaktadır (Şekil 4) (Lublin vd., 2014).



Şekil 4. Multipl Skleroz Tipleri (Lublin vd., 2014).

1.2.9. Multipl Skleroz Tedavisi

MS'in tedavisi yoktur. MS için şu anda mevcut olan tedaviler, akut MS ataklarının tekrarlamaya sıklığını ve şiddetini önleyerek hastanın genel yaşam kalitesini iyileştirmeye ve uzun vadeli sakatlığı en aza indirmeye yardımcı olur. Genel olarak akut atakların etkisini azaltan atak tedavisi ve koruyucu tedavi olarak iki grupta incelenirler.

Atak Tedavisi

Vücutta enfeksiyon olma ihtimali, stres, menstruel dönem gibi faktörler elendikten sonra 24 saatten uzun süren semptomlar, atak olarak kabul edilir ve tedavide antiinflamatuvar etkisi olan kortikosteroidler kullanılır. Atak tedavisinin asıl amacı atak süresini azaltmak, semptomları baskılamak ve sekel oluşumunu engellemektir. Atak tedavisi olarak intravenöz yada oral yolla steroid veya Adrenokortikotropik hormon (ACTH) tercih edilmektedir. Steroidi tolere edemeyen hastalarda plazma değişimi bir başka seçenek olabilmektedir. Steroid tedavisinde hiperglisemi, hipertansiyon, ülser, depresyon, ödem, kognitif bozukluklar gibi yan etkiler görülebilirken bu etkilerden korunabilmek için tedaviyi kısa sürede tamamlamak etkili olacaktır (Calabresi, 2004).

Koruyucu Tedaviler

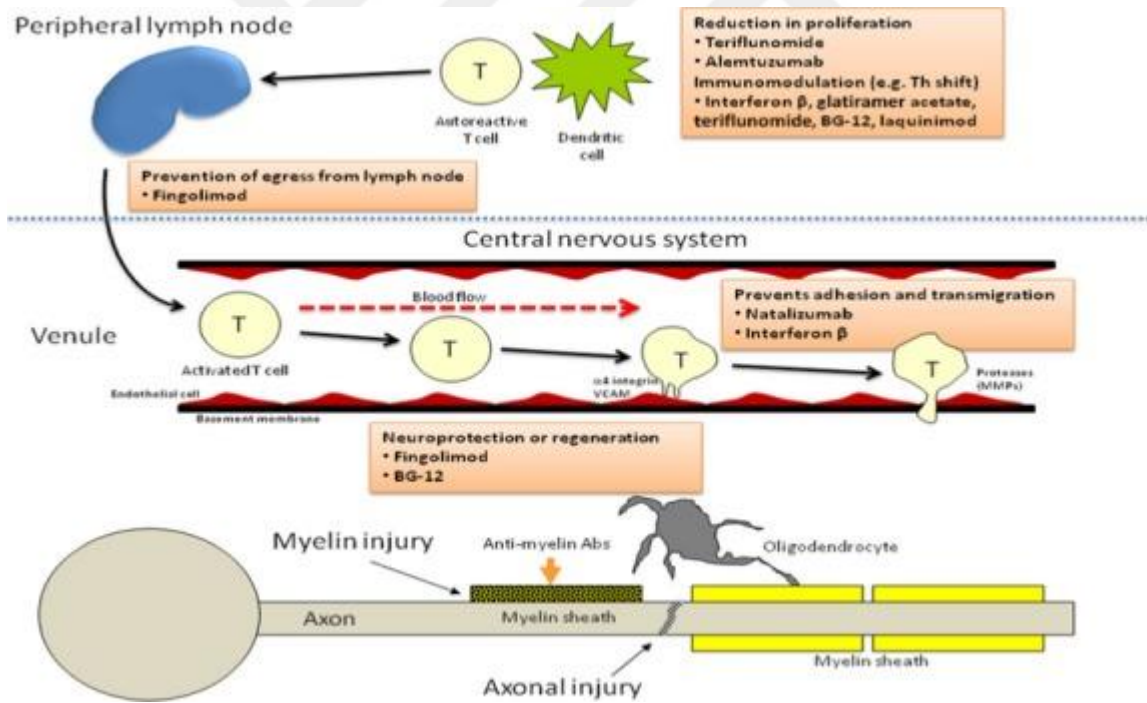
MS'de atak sıklığının kontrol altında tutulması özür lülüğün ilerlemesini engellemek adına önemlidir. İmmünomodülatör ve immünsüpresif tedaviler hastalığın seyrini değıştirmek için kullanılır, özellikle iyileşmelerle giden RRMS türünde genellikle IFN β -1a, glatiramer asetat, natalizumab, fingolimod, teriflunomid, mitoksantron ve dimetilfumarat reçete edilir. SPMS olan hastalar için sadece IFN β -1a ve mitoksantron yaygın olarak kullanılır. Bu tedaviler hastalar için günlük tedavidir ve etkinliğı, hastalığın agresif seyrinin başlangıcını geciktirmeye dayanır (Kavaliunas vd., 2015).

Farmakolojik tedavilerin uygulama yolları, intramüsküler (IFN β 1a), oral (fingolimod) ve intravenöz (IFN β 1a, glatiramer asetat ve natalizumab) olarak değışkenlik gösterir. MS tedavisinde son yıllarda çok ilerleme kaydedilmiştir. Tüm onaylanmış bağışıklık odaklı tedaviler için etkinlik ve güvenlik ters orantılı olmakla birlikte, son zamanlarda CD20'ye özgü monoklonal antikolarla (örneğin Rituksimab, Ocrelizumab ve Ofatumumab) yapılan çalışmalar, B hücresi baskılanmasının, tekrarlayan MS atakları için güvenli ve etkili bir tedavi stratejisi olduğunu göstermiştir (Hemmer ve Mühlau, 2017). Bu ajanlar esas olarak hastalığın immün yönlerini ve tekrarlayan enflamasyonu hedefler ancak nörolojik fonksiyonların korunmasında ve kurtarılmasında kritik öneme sahip remiyelinizasyonun istenen uzun vadeli sonucunu ele almakta yetersiz kalmaktadırlar (Skaper, 2019).

Okrelizumab, intravenöz olarak 6 ay ara ile 4 kür uygulanan humanize anti CD20 monoklonal antikoru olup, rekombinant DNA teknolojisiyle Çin Hamsteri Yumurtalığı hücre dizilerinde üretilmektedir. CD20 antijeni, B hücresi soyunun çoğı hücresinde, öncü B hücrelerinden matür B hücreleri dahil eksprese edilir, ancak kök hücreler, pro-B hücreleri veya plazma hücreleri üzerinde eksprese edilmez (Milo, 2016).

Okrelizumab, B hücrelerinin yüzey reseptörü olan CD20 antijenine bağlanarak, antikora bağımlı hücre aracılı sitotoksinite, antikora bağımlı hücrel fagositoz, komplemente bağlı sitotoksinite ve apoptoz yoluyla B hücrelerinin seçici olarak baskılanmasını sağlar (Sorensen ve Blinkenberg, 2016). CD20 esas olarak B hücrelerinde anlatımı olan bir yüzey antikoru olmakla beraber, T hücrelerinin bir alt kümesinde (CD3⁺ CD20⁺ T hücreleri) de anlatımı mevcuttur. MS hastalarının beyin omurilik sıvılarında yapılan incelemede CD20⁺ T hücrelerinin B hücreleriyle benzer bir frekansta olduğu bulunmuştur (Gustavsson vd., 2011). Gingele ve ark yaptığı çalışmada Okrelizumab etken maddesinin T hücrelerini de baskıladığı gösterilmiştir.

Multipl skleroz hastalarında gelişen immünopatojenik mekanizmalar ve farklı hastalık modifiye edici tedavilerin önerilen hedefleri Şekil 5’de verilmiştir. (Garg ve Smith, 2015).



Şekil 5. MS'de immünopatojenik mekanizmalar ve farklı hastalık modifiye edici tedavilerin önerilen hedefleri (Garg ve Smith, 2015).

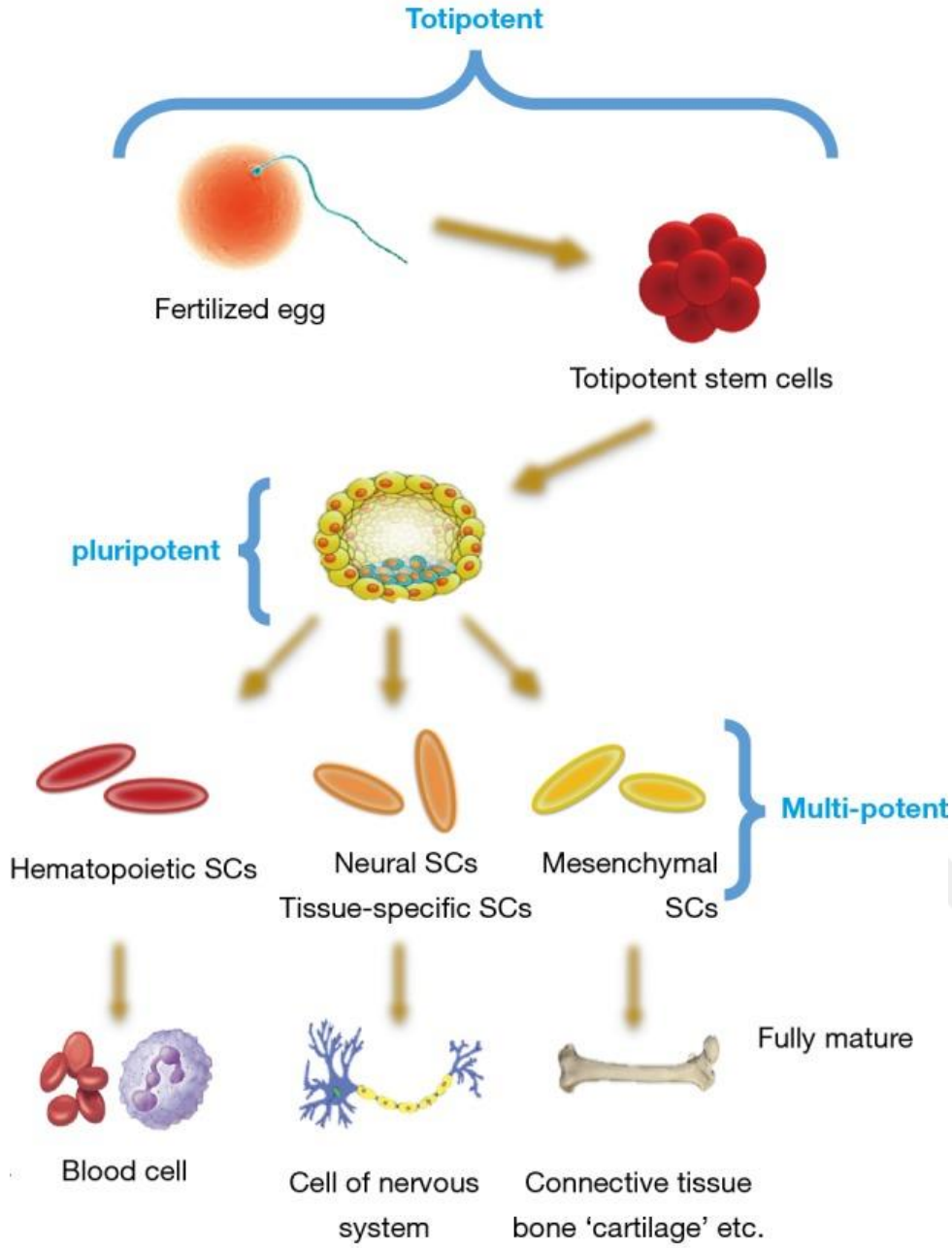
1.3. Kök Hücreler Hakkında Genel Bilgi

Kök hücreler, sınırsız bölünme ve farklı hücre tiplerine dönüşebilmeleri ile karakterize edilen özel hücrelerdir. Kendini yenileme potansiyeli ve farklılaşma kapasitesi ile kök hücreler, gelişimin birçok aşamasında önemli roller oynar. Kendini yenileme ve farklılaşma mekanizmaları üzerindeki kilitler açıldıkça kök hücrelerin medikal kullanımları açısından yeni modeller geliştirilebilmektedir.

Kök hücrelerde kendini yenileme olarak adlandırılan durum asimetrik hücre bölünmesi ile gerçekleşmektedir. Kök hücre havuzunun tükenmemesi için hücre bölünmesi sırasında iki farklı fenotipe ait hücre oluşarak hücrelerden biri kök hücre karakterinde devam ederken diğer hücre bir adım farklılaşmış hücreyi meydana getirmektedir.

1.3.1. Kök Hücrelerin Sınıflandırılması

Kök hücreler, hem farklılaşma kapasitelerine göre hem de elde edilmiş kaynaklarına göre sınıflandırılmaktadır. Farklılaşma kapasitelerine göre totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent olarak isimlendirilirler (Şekil 6). Totipotent hücreler bütün bir organizmayı oluşturan hücrelere farklılaşma yeteneğinde olan embriyonik dönemde bulunan kök hücrelerdir. Totipotent karakterde olan tek hücre tipi döllenmiş yumurta hücresi olan zigottur. Pluripotent kök hücreler, 5-6 günlük embriyo içinde bulunan iç hücre kitlesinden elde edilen ve yetişkin bir organizmada bulunan canlılık ve üreme işlevleri için gerekli olan bütün hücre tiplerini oluşturan kök hücrelerdir. Totipotent kök hücrelerden farkı ise ekstraembriyonik yapıları oluşturmamalarıdır. Multipotent kök hücreler ise, farklı hücre tiplerine daha sınırlı farklılaşabilme potansiyeline sahiptir. Unipotent kök hücreler ise tek bir doku tipi hücrelerine farklılaşabilen kök hücreleri ifade etmektedir (Rajabzadeh vd., 2019).



Şekil 6. Farklılaşma kapasitelerine göre kök hücre çeşitleri (Rajabzadeh vd., 2019).

Kök hücreler pek çok farklı kaynaklardan elde edilebilirler. Embriyonik döneme ait olan kök hücreler Embriyonik Kök Hücreler (EKH) olarak isimlendirilir ve plasenta gibi ekstraembriyonik dokular haricindeki bütün bir organizmayı oluşturan hücelere farklılaşma yeteneğinde olduklarından pluripotent hücrelerdir. Ancak elde edilmiş yöntemlerindeki etik kaygılar ve klinik uygulamalarda teratom oluşturabilme potansiyellerinden dolayı tedavi amaçlı kullanımları kısıtlı kalmaktadır. Yetişkin dokulardan elde edilen kök hücreler genel

olarak Hematopoetik Kök Hücreler (HKH) ve Mezenekimal Kök Hücrelerdir (MKH). Kemik iliği nakli olarak bilinen tedavi esasında HKH naklidir ve vücudtaki bütün kan hücrelerini oluşturabilmektedir.

1.3.2. Mezenkimal Kök Hücreler

MKH'ler ilk olarak 1960'larda kemik iliğinde kan yapıcı kök hücrelerden farklı olarak osteojenik hücre hattına farklılaşabilen hücre grubu olarak keşfedilmişlerdir. MKH'ler mezoderm tabakasından köken alır ve organizmada bulunan çeşitli dokulardan elde edilebilirler: Kemik iliği, yağ dokusu, kordon kanı, göbek kordonu, diş pulpası, periodental ligament, menstruel kan bunlardan bazılarıdır. Heterojen bir hücre grubu oldukları için Uluslararası Hücresel Tedaviler Derneği tarafından MKH'ler için bazı kriterler belirlenmiştir. Bu kriterler doğrultusunda bir hücrenin MKH olarak tanımlanması için sahip olması gereken özellikler; öncelikle plastik kültür kabına yapışmaları (adherent olmaları), yüzey belirteçleri bakımından CD105, CD73 ve CD90 pozitif, CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19 ve HLA-DR negatif olmaları ve son olarak in-vitro adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşma kapasitesine sahip olmaları gerektiği bildirilmiştir (Domici vd., 2006).

MKH'ler, bağışıklık sistemi yetersiz olduğu durumlarda iltihaplanmayı teşvik edebilirken otoreaktiviteyi önlemek için bağışıklık sistemi aşırı aktifleştiginde iltihaplanmayı önleyebilir. MKH'ler, monositlerin/makrofajların, dendritik hücrelerin, T hücrelerinin, B hücrelerinin ve doğal öldürücü hücreler üzerindeki fonksiyonel değişiklikleri yoluyla immünmodülatör potansiyellerini ortaya koymaktadır (Jiang ve Xu, 2020). Bu immünmodülatör etkinin özellikle MKH yüzeyinde eksprese edilen HLA-G antijeni üzerinden olduğu bildirilmiştir.

MKH'ler, sahip oldukları bazı özellikler sayesinde klinik kullanımda avantaj sağlayabilmektedirler. Bu avantajlar, elde edilme yöntemlerinin kolay olmaları, farklılaşma yeteneğine sahip olmaları, immünregülatör özelliklere sahip olmaları, nöral kök hücreleri uyaran faktörler salgılamaları, immünsüpresyona ihtiyaç duymadan otolog olarak

güvenli bir şekilde enjekte edilebilmeleri, enjeksiyon sonrası malignite oluşturma ihtimalinin düşük olmasıdır (Petrou vd., 2022).

1.3.3. Kök Hücrelerin Tedavide Kullanımları

Kök hücre tedavisi, rejeneratif tıpta etkili bir tedavidir ve mevcut tedavilerin yetersiz kaldığı durumlarda umut verici yeni bir yaklaşımdır. Kök hücrelerle tedavi nöroproteksiyon, immünomodülasyon ve nörorejenerasyon dahil olmak üzere birçok mekanizma ile etkili olabilir.

Kök hücreler doku gelişiminde, rejenerasyonunda ve yenilenmesinde önemli etkilerinden dolayı yıllardır bilimsel arenada önem kazanmaktadır. Kök hücrelerin sonsuz yeteneklerinden dolayı tedaviye yönelik bilimsel araştırmalarda popülerlikleri giderek artmaktadır. Bu hücrelere bağlı olarak geliştirilen ve geliştirilmekte olan potansiyel tedaviler yaşamları bu hücre kaynaklarına bağlı olan ve kök hücrelerden beklentisi yüksek olan hasta grupları için önemli bir umut kaynağı niteliği taşımaktadır.

MKH'ler, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, graft-versus-host hastalığı ve otoimmün hastalıklar gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde başarıyla uygulanmıştır (Cipriani vd., 2013). Hatta son yıllarda küresel sorun haline gelen COVID 19 tedavisinde de kök hücre uygulaması ile başarılı sonuçlar alınmıştır (Li vd., 2020).

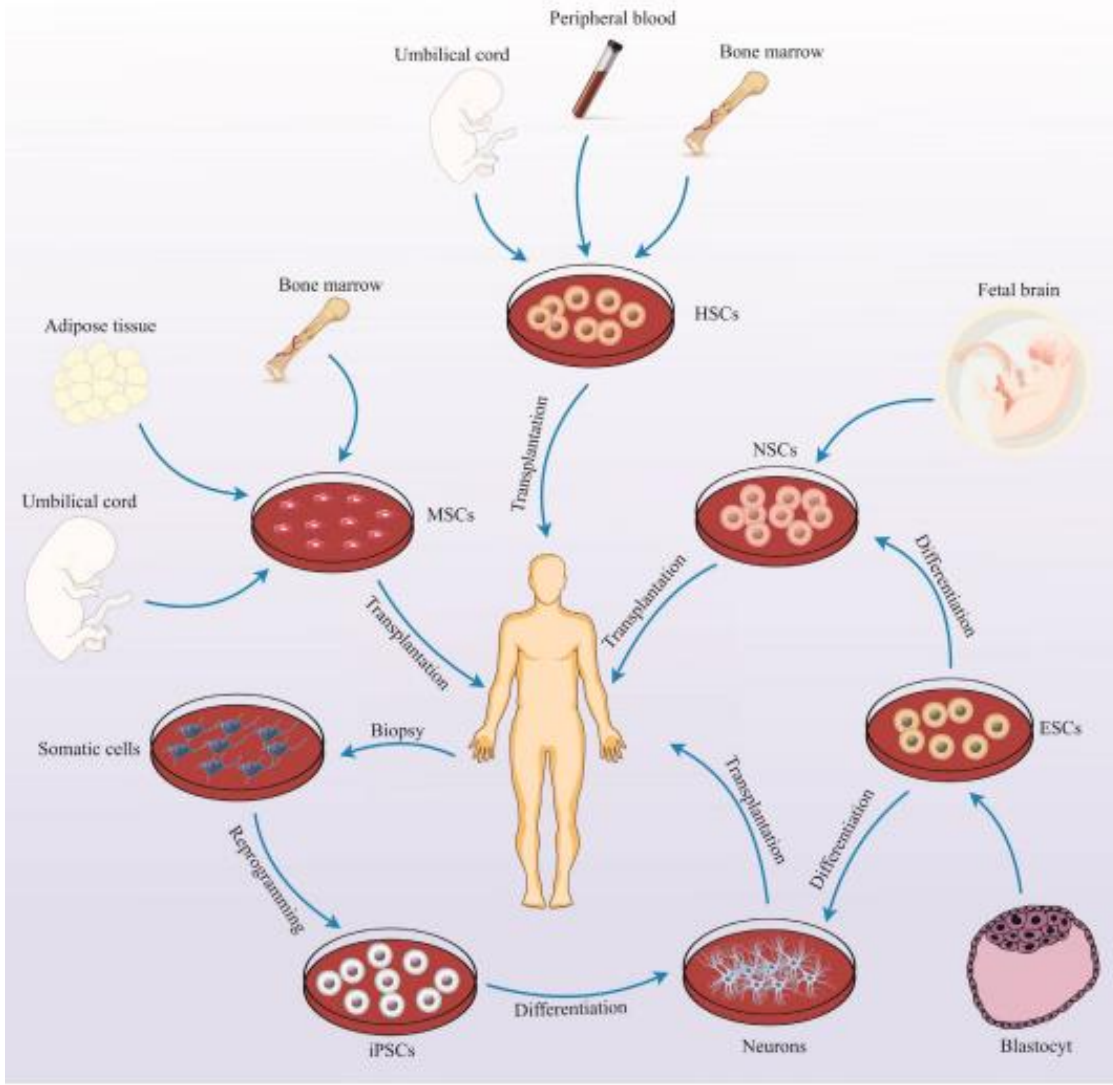
2009 yılında Tip 2 diyabetli 10 hasta üzerinde yapılan bir çalışmada otolog kemik iliği hücreleri, hematopoetik ve mezenimal kök hücreler ayrıştırılmadan birlikte kullanılarak, gastro-duodenal arter yoluyla doğrudan pankreasa enjekte edilmiş ve insülin kullanımı gerekliliğinde önemli bir azalma olduğu, β adacık hücrelerinin rejenerasyonuna yardımcı olup olmadığı veya in situ insülin üreten hücreler oluşturup oluşturmadıkları konusunun netleştirilemediği bildirilmiştir (Bhansali vd., 2009).

1.3.4. Kök Hücrelerin Nörodejeneratif Hastalıklarda Kullanımı

Nörodejeneratif hastalılarda, farklı kök hücre kaynaklarının kullanımı söz konusudur. Şekil 7’de, mezenkimal kök hücre, hematopoetik kök hücre, nöral kök hücre, embriyonik kök hücre ve indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin (iPKH) farklı yollarla kullanımı gösterilmiştir (Ahani vd., 2021). Nörolojik bozuklukların tedavisi için içlerinden en uygun seçenek nöral kök hücreler olmaktadır. Fakat nöral kök hücre kaynağı olarak düşük yapılan fetüsler kullanılmaktadır. Bu durum hem etik sorunları hem de allojenik nakil kaynaklı red sorununu beraberinde getirmektedir. Dolayısıyla alternatif kaynaklara olan ihtiyaç, diğer kök hücrelerin kullanımını düşündürmektedir.

Pluripotent kök hücrelerin (hem EKH'ler hem de iPKH'ler) kullanımı yüksek proliferasyon kapasiteleri ve tümör oluşturma riskleri göz önüne alındığında, doğrudan tedavi amacıyla kullanılmaz, bunun yerine hedeflenen tedaviye dönük hücre tipine, nöral progenitör veya NKH'lere farklılaştırarak kullanımları mümkündür. HKH ve MKH'ler nörolojik hastalıkların klinik denemelerinde yaygın olarak tercih edilebilmektedir.

2015 yılında 7 Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) hastasında uygulanan faz 1 çalışmasında, 26 gün ara ile 2 defa intratekal olarak kilogram başına 1×10^6 otolog Kİ-MKH uygulanmış ve hastalarda ciddi yan etkiler görülmezken sadece ateş, ağrı ve baş ağrısı gibi geçici yan etkiler gözlemlendiği bildirilmiştir. İntratekal MKH uygulamasından 12 ay sonra hastalarda, TGF- β ve IL-10 düzeylerinin yükseldiği, ALS'de kemokin ilişkili ve motor nöron hasarını şiddetlendiren Monosit Kemoatraktan Protein-1'in (MCP-1) azaldığı gözlemlenmiştir. Bu bulgu, ALS hastalarında bağışıklık tepkisi üzerindeki olumlu etkisi ile ilişkili olabileceği ve MKH uygulamasının güvenli ve etkili olduğu bildirilmiştir (Oh vd., 2015).



Şekil 7. Nörodejeneratif hastalıklarda kök hücre kullanımı (Ahani vd., 2021).

Doktora tez araştırmamız kapsamında, dental pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücreler kültür koşullarına farklılaştırma ortamı eklenmeden kültür besiyerine farklı dozlarda Okrelizumab ile inkübe edilerek, takip eden üç günün sonunda farklılaşma belirteçlerinin gen ekspresyonları incelenmiştir. Doktora tez araştırmamız kapsamında anti-CD20 antikorunun insan dental pulpa mezenkimal kök hücrelerinin proliferasyon ve farklılaşma belirteçleri üzerindeki etkilerin incelenmesi amaçlanmıştır.

İKİNCİ BÖLÜM

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1 MS Hastalığının İlaç ile Tedavisi

MS yıllarca T lenfositlerinin aracılığıyla meydana gelen bir hastalık olarak tanımlanmıştır. Birkaç yıl öncesine kadar MS hastalarının çoğunda bulunan oligoklonal bantlar, B lenfositlerinin de hastalığın merkez etkenlerinden olduğu anlaşılmış ve tedavi modaliteleri yenilenmiştir (Greenfield ve Hauser, 2018).

Fingolimod, RRMS için onay alan ilk oral tedavi ajanıdır. Otoreaktif lenfositlerin MMS'ne girişini bloke ederek ikincil lenfoid organlardan lenfositlerin çıkışını önleyen bir S1P inhibitörüdür. 2010 yılında, 1153 hasta üzerinde yapılmış bir çalışmada, fingolimodun intramüsküler interferon beta-1a ile karşılaştırıldığında atakların tekrarı ve MRG sonuçları açısından etkinliğinin daha fazla olduğu gösterilmiştir (Cohen vd., 2018).

Diğer bir oral tedavi ajanı olan dimetil fumarat ile yapılan faz 3 çalışmasında, dimetil fumarat verilen hastalarda atakların sayısının azaldığı ve lezyonların küçüldüğü bildirilmiştir (Fox vd., 2012).

2013 yılında Avrupa'da RRMS hastaları için onaylanan alemtuzumab anti CD52 monoklonal antikoru olarak T ve B hücreleri üzerinde etkilidir. Alemtuzumab ile yapılan faz II ve faz III çalışmalarıyla hastalık üzerindeki etkinliği kanıtlanmış ve atakları baskıladığı bildirilmiştir (Cohen vd., 2018).

Siponimod aktif SPMS için onay almış sfingozin-1-fosfat (S1P) inhibitörüdür. 1651 hasta üzerinde yapılan faz 3 çalışmasında, diğer S1P inhibitörleri gibi sakatlığın ilerleme riskini azalttığı aynı zamanda lenfopeni, bradikardi, ödem, hipertansiyon gibi yan etkilerin plaseboya göre daha fazla görüldüğü bildirilmiştir (Kappos vd., 2018).

Natalizumab, iyi tolere edilebilen, hümanize bir monoklonal antikor olan, lenfositlerin yüzeyinde bulunan ve MSS'ne transmigrasyonda görev alan bir adezyon

molekölü olan $\alpha 4\beta 1$ integrin inhibitörüdür (Yednock vd., 1992). 942 RRMS hastası üzerinde yapılmış olan faz 3 çalışmasında Natalizumabin'in sakatlığın ilerleme riskini ve atak sayısını azalttığı bildirilmiştir (Polman vd., 2006).

Rudick vd. (2006) tarafından yapılan çalışmada, Natalizumab ve interferon beta 1a'nın birlikte uygulandığı 1171 RRMS hastası üzerinde yapılan faz 3 çalışmasında, ikili tedavinin sadece interferon beta-1a kullanımına oranla sakatlık ilerlemesinde ve yeni plakların oluşumunda daha etkili olduğu bildirilmiştir.

Hauser vd. (2017) tarafından yapılan faz 3 çalışmasında, 1656 MS hastasına 96 hafta boyunca 24 haftada bir 600 mg dozunda intravenöz okrelizumab veya haftada üç kez 44 µg dozunda subkutan interferon beta-1a verilerek, RRMS formu üzerinde okrelizumab ve interferon beta-1a etkinliklerinin karşılaştırılması yapılmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre Okrelizumab tedavisi interferon beta-1a ile karşılaştırıldığında sakatlığın iyileştirilmesi, beyindeki lezyonları küçülmesi ve yeni lezyonların oluşumu açısından daha verimli olduğu bildirilmiştir.

2020 yılında yapılan diğer bir çalışmada, başka bir anti CD20 monoklonal antikoru olan Ofatumumab ile oral ajanlardan ve pirimidin sentezi inhibitörü olarak T ve B hücrelerinin aktivasyonunu azaltarak etki eden Teriflunomid karşılaştırmalı olarak 1882 RRMS hastası üzerinde faz 3 çalışmasında kullanılmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre Ofatumumab tedavisi yeni atakların oranını daha fazla azaltmış ve MRG bulgularına göre lezyonların sayısında ki azalma ile konfirme edilmiş olduğu bildirilmiştir (Hauser vd., 2020).

Steinman vd. (2022) tarafından yapılan başka bir faz 3 klinik denemede, anti CD20 monoklonal antikoru olan Ublitüksimab ve Teriflunomid karşılaştırmalı olarak incelendiğinde elde edilen sonuçlar, Ublitüksimabın yeni atakların gelişiminde ve lezyonların sayısını azaltmada Teriflunomid'e göre daha etkili olduğu fakat sakatlığın iyileşmesi üzerinde anlamlı fark yaratmadığı bildirilmiştir.

Okrelizumab ile yapılan faz 3 çalışmasında, 732 PPMS hastası belirlenmiş olup hastalara 120 hafta boyunca her 24 haftada bir intravenöz ocrelizumab (600 mg) verilerek uygulanmıştır. MRG'de beyin lezyonlarının toplam hacmi ocrelizumab verilen hastalarda %3,4 azaldığı, plasebo grubunda ise %7,4 arttığı belirtilmiştir. Aynı zamanda okrelizumab üst solunum yolu ve Herpes virüs enfeksiyonlarına sebep olmuştur (Lamb, 2022). Okrelizumabın uzun süreli etkileri ise henüz tam olarak bilinmemektedir.

2.2. MS Hastalığının Kök Hücre ile Tedavisi

MS hastalarında hematopoetik kök hücre nakli gerçekleştirilen klinik denemelerde, uygulamanın hastalığın klinik seyrini iyileştirmede etkili bir yöntem olduğu belirtilmiştir. Fakat, otolog hematopoetik kök hücre naklinin hastalık seyrini etkilemediğini bildiren çalışmalar da vardır. Bu nedenle otolog hematopoetik kök hücre nakli rutin tedavilere cevap vermeyen RRMS hastalarına önerilirken PPMS tedavisinde önerilmemektedir (Cohen vd., 2018).

2012 yılında 10 SPMS hastası üzerinde yapılan otolog Kİ-MKH naklinde, hastalara kilogram başına $1,6 \times 10^6$ hücre enjekte edilmiş ve 10 ay boyunca hastalar izlenmiştir. 1 hastada tedaviden kısa süre sonra geçici döküntüler oluşmuş, 2 hastada bakteriyel enfeksiyon oluşmasına rağmen hastalarda görme yetisinde iyileşme olduğu ve bu iyileşmenin MKH'lerin nöroprotektif etkisinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Connick vd., 2012).

2014 yılında yapılan randomize, plasebo kontrollü faz II çalışmasında, 9 RRMS hastasına kilogram başına $1-2 \times 10^6$ otolog Kİ-MKH intravenöz olarak verilmiştir. Enjeksiyondan sonra hiçbir hastada ciddi yan etki gözlenmezken MKH tedavisi sonrası hastaların kanında Th1 hücrelerinin sıklığında anlamlı olmayan bir azalma olduğu ve lezyonların küçüldüğü, immünmodülatör etkilerinin MRG ile desteklendiği bildirilmiştir. (Llufriu vd., 2014)

2018 yılında yapılan faz II çalışmasında 20 SPMS hastasına Kİ-MKH'lerden üretilmiş nöral progenitör hücreler intratekal yolla 1×10^7 hücre olarak 3 ay ara ile 3 doz şeklinde uygulanmış. Uygulama sonrası hastalarda ciddi yan etki görülmezken, tedavinin kas gücünde ve mesane işlevinde iyileşmeye neden olduğu bildirilmiştir (Harris vd., 2018).

2018 yılında yapılan başka bir klinik denemede, 10 RRMS ve 14 SPMS hastasına intravenöz yolla kilogram başına $1-2 \times 10^6$ hücre olacak şekilde otolog Kİ-MKH enjekte edilmiş ve tedavi sonrasında hastaların 18'inde nüks görülmezken, 3'ünde tek bir nüks, 3'ünde de 2 nüks yaşandığı, MS'te otolog MSC transplantasyonu uygulanabilir, güvenli ve iyi tolere edilebilir olduğu bildirilmiştir (Cohen vd., 2018).

20 MS hastası üzerinde yapılan bir çalışmada göbek kordonu MKH'leri kullanılmış ve hastalara 20×10^6 hücre toplamda 7 defa intravenöz olarak uygulanmıştır. Hastalarda ciddi yan etki görülmezken mesane, barsak ve cinsel işlev bozukluklarında, yürüme sürelerinde iyileşmeler görüldüğü ve göbek kordonu MKH'lerinin MS tedavisinde güvenli ama sonuçlarının daha fazla araştırılması gerektiği bildirilmiştir (Riordan vd., 2018)

48 PPMS hastası üzerinde yapılan çift kör randomize faz 2 klinik denemede otolog MKH hem intratekal hem de intravenöz olarak kullanılmış ve tedaviden 6 ay sonra hastaların BOS analizlerinde Nörofilament Hafif Zincir (NHZ) ve CXCL13 seviyelerine bakılmış. MKH tedavisinin, NHZ seviyesindeki azalmanın nöroprotektif ve nörotrofik etkilerinden, CXCL13 seviyesindeki azalmanın ise immünmodülasyon etkilerinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Petrou vd., 2022).

2016 yılında 20 MS hastası üzerinde yapılan klinik denemede otolog yağ doku MKH'leri 3 ay ara ile 3 doz 4×10^6 hücre intratekal yolla enjekte edilmiş, tedaviden 18 ay sonra hastalarda yan etki görülmediği, 2 hastada yeni lezyonların oluştuğu, hastaların hiçbirinde sakatlığın ilerlemesi veya nüks meydana gelmediği bildirilmiştir (Stepien vd., 2016).

Visweswaran vd. (2022) tarafından 22 MS hastasına otolog HKH nakli yapılmış ve hastaların 36 ay boyunca bağışıklık sistemindeki proinflamatuvar ve immünregülatör hücrelerinin sayısının azaldığı bildirilmiştir. Çalışmada, hastaların klinik seyri hakkında bilgiye yer verilmemiştir.

Bose vd. (2019) tarafından yapılan çalışmada, 23 MS hastasına otolog HKH nakli sonrası hastalığın önemli bir belirtisi ve hastaların yaşamını ciddi şekilde etkileyen yorgunluğun azalması üzerinde oldukça etkili olduğunu ve bunun sonucu olarak hastaların araba bile kullanmaya başlayarak özgürleşebildiklerini bildirmişlerdir.

Tremblay vd. (2022), 20 MS hastasına otolog MKH nakli uygulamasının sonuçlarını yayınlarken, MKH naklinin klinik ve nörofizyolojik açıdan bir iyileşme göstermediğini, kök hücre tedavisinin umut verici olmasına rağmen MS hastalığı aktivitesini etkilemediğini bildirmişlerdir.

Nöral kök hücrelerin remiyelinasyon kapasitelerinin daha iyi olduğu bilinmektedir. MS hastalarında nöral kök hücrelerin klinik uygulamaları üzerine yapılan denemelerin olduğu bilinmesine rağmen sonuçları yayınlanan çalışmalar henüz bulunmamaktadır.

MS hastalığının tedavisinde kullanılmakta olan ilaç ve kök hücre tedavilerinden elde edilen sonuçlar bu hastalığın tamamen ortadan kaldırılmasını sağlayacak nitelikte değildir. Kök hücrelerin nöroprotektif etkileri olmasına rağmen tedavi için yeterli seviyede olmadığı yapılan çalışmalarla görülmektedir. Bu nöroprotektif etkilerin artırılmasına yönelik yaklaşımların geliştirilmesi gerekmektedir.

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. İn Vitro Deney Grupları

Okrelizumab'ın, DP-MKH'lerinin canlılık ve farklılaşma kapasiteleri üzerindeki etkisini incelemek için 4 farklı doz (1,5 µg/mL, 15 µg/mL, 150 µg/mL ve 1500 µg/mL) ilaç, hem normal kültür ortamına hemde nörojenik farklılaşma ortamına eklenmiştir. 1500 µg/mL ilaç grubu sadece Hücre canlılık analizi çalışmalarında kullanılmıştır. Nörojenik farklılaşmayı desteklediği bilinen Retinoik Asit (RA) eklenerek (0,1 nM) farklı bir grup oluşturulmuş ve immünfloresan boyama ile incelenmiştir.

1. Grup (C0): Okrelizumab içermeyen + Normal kültür besiyeri (Kontrol)
2. Grup (C1): 1,5 µg/mL Okrelizumab + Normal kültür besiyeri
3. Grup (C2): 15 µg/mL Okrelizumab + Normal kültür besiyeri
4. Grup (C3): 150 µg/mL Okrelizumab + Normal kültür besiyeri
5. Grup (D0): Okrelizumab içermeyen + Nörojenik farklılaşma besiyeri
6. Grup (D1): 1,5 µg/mL Okrelizumab + Nörojenik farklılaşma besiyeri
7. Grup (D2): 15 µg/mL Okrelizumab + Nörojenik farklılaşma besiyeri
8. Grup (D3): 150 µg/mL Okrelizumab + Nörojenik farklılaşma besiyeri
9. Grup (RC0): Okrelizumab içermeyen + Normal kültür besiyeri + RA (Kontrol)
10. Grup (RC1): 1,5 µg/mL Okrelizumab + Normal kültür besiyeri + RA

3.2. Hücre Kültürü

Çalışmamızda kullanılan insan diş pulpası mezenkimal kök hücreleri (DP-MKH)'ler Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi (KÖGEM) kök hücre koleksiyonundan elde edilmiştir. Hücreler, %10 FBS (Gibco) ve %1 Pen/Strep (Gibco) içeren DMEM'de (Gibco) standart kültür koşulu altında 37°C'de, %5 CO₂ içeren %100 nemli atmosferde kültüre edilmiştir. Hücreler kültür kabında %70-80 yoğunluğa ulaştığında, 37°C'de %0.25 Trypsin/EDTA solüsyonu (Gibco) ile yüzeyden kaldırılmış, 1800 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve (1:4) oranında yeni kültür kaplarında

kültüre alınmıştır (Şekil 8). Besiyeri iki günde bir değiştirilmiştir. Okrelizumab, pH 7.2'de steril PBS tamponunda (Gibco) seyreltilmiş ve 1.5 µg/mL, 15 µg/mL, 150 µg/mL ve 1500 µg/mL'lik ilaç dozları kültür ortamlarına eklenmiştir. Okrelizumab takviyesi olmayan grup, kontrol olarak kullanılmıştır.



Şekil 8. 6-kuyucuklu kültür kaplarında DP-MKH'lerin kültüre edilmesi.

3.3. Hücre Canlılık Analizi (WST-1 Testi)

Okrelizumab'ın DP-MKH'lerin canlılığı üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla, ilaç uygulamasını takip eden 24, 48 ve 72 saat sonrasında WST-1 testi uygulanmıştır. Bu testte vital hücrelerde bulunan mitokondrideki dehidrogenaz enzimi WST-1 formasyonundaki tetrazolyum formazan şekline dönüşür. Vital hücrelerin sayısal proliferasyonu ile doğru orantılı olacak şekilde hücrelerdeki mtDHG enzim oranlarında yükselme meydana gelmektedir. Bu olay neticesinde formazan kristalleri artış göstererek koyu renkte ayraç oluştururlar. Aktif olan hücre sayısı ile meydana gelmiş olan formazan kristalleri doğru orantılı olmaktadır.

WST-1 için; 6-kuyucuklu kültür kaplarından toplanan hücreler 15ml'lik falkonlara alınarak 1800 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak, pelet 100 µl hazır besiyeri ile birlikte 96-kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Her kuyucuğa 10 µl WST-1 (Roche) eklenmiş, ışık almaması için, 96-kuyucuklu plaka folyo ile sarılıp 37°C'de, %5 CO₂'li inkübatörde 3-4 saat bekletilmiştir. Ardından mikrolaka okuyucu (VersaMax) kullanılarak 480 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuştur.

3.4. Gen Ekspresyon Analizi

Hücre kültürü yapıldıktan sonra hücreler PBS ile yıkanmışlardır. Daha sonra buldukları kültür kabından kazıma işlemiyle kaldırılmış ve daha sonra santrifüjlenerek hücrelerin çökmesi sağlanmıştır. İzolasyon işlemi yapılana dek -80° 'de muhafaza edilmiştir. RNA izolasyonu High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Mannheim, Almanya) ile önerilen izolasyon prosedürü yapılmıştır. Hücreler 200 µl DPBS ilave edilerek yeniden süspanse hale getirilmiştir. Ardından üzerine 400 µl Lysis/Binding Buffer ilave edilmiş ve hücreler parçalanmıştır. Daha sonra örnekler toplama tüpüne yerleştirilmiş bir filtre tüpün üzerine pipet yardımıyla aktarılmıştır. Daha sonra 8000g'de 15 saniye santrifüjlenmiştir. Örneklerin üzerine 1:10 oranında 10µl DNaseI enzimi ilave edilerek 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra Wash Buffer 1 ile bir kez ve Wash Buffer 2 ile iki kez yıkanmıştır. İşlemler sonunda 30 µl Elution Buffer filtre kısmın üzerine gelecek şekilde ilave edilerek 2 dakika 8000g'de santrifüj edilmiştir. Son olarak hücrelerin total RNA ayırıştırması yapılmıştır. Ayırıştırılan RNA, cDNA sentezi gerçekleştirilene kadar -80°C'da korunmuştur.

cDNA sentezi için Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche) ürünü kullanılmıştır. İşlemler üretici firmanın protokolü doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Her gruba ait RNA örneklerinden 10 µl alınarak üzerine 1µl oligo-dT eklenmiştir. Tüpler 65°C'da 10 dakika olacak şekilde PCR cihazına (Takara, Tokyo, Japonya) yerleştirilmiştir. 10 dakika sonra tekrar buz üzerine alınarak her bir örneğin üzerine 8,6 µl cDNA master karışımı eklenmiştir. PCR cihazına örnekler yeniden yerleştirilmiş ve 55°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Ardından 85°C'de 5 dakika enzimin inaktivasyonu sağlanmıştır. Son olarak tüm örnekler buz üzerine alınmış ve gen ekspresyonu analizi yapılınca kadar -20°C'da saklanmıştır.

Okrelizumab'ın kök hücrelerin farklılaşmaları üzerindeki etkilerinin gen düzeyinde incelenebilmesi için Real Time PCR (LightCycler-II 480, Roche, Mannheim, Almanya) gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem ile osteojenik, adipojenik, kondrojenik ve nörojenik farklılaşmaları için önemli proteinlerin gen ekspresyon oranları kantitatif olarak tespit edilmiştir. Bu yöntemde SYBR Green master karışımı (Jena Biotechnology, Jena, Almanya), bidistile su ve hücrelerden izole edilen total RNA'ların cDNA'ları 1:1:0,05 oranında karıştırılarak ürün protokolünde olduğu gibi reaksiyon kurulmuştur. İlgili genlerin primerleri 30 nM oranında reaksiyona eklenmiştir. 96 kuyucuklu plakalara kurulan reaksiyonlar 480/500 nm Ex/Em dalga boyunda okutularak ilgili genlerin çoğalmaları takip edilmiştir. Tüm reaksiyonlar 94°C'de, 15 saniye denatüre, 60°C'de, 60 saniye bağlanma ve uzama sikluslarına alınmış ve örnekler 45 siklus boyunca ışığa artışları izlenmiştir. Cihaza entegre program ile hesaplanan Cp sonuçları doğrultusunda analizleri yapılmıştır. Housekeeping gen olarak ActB geni kullanılmıştır. Çalışmamızda kullanılan primer listesi aşağıda verilmiştir.

Actin beta (ActB):

f-TTCTACAATGAGCTGCGTGTG

r-GGGGTGTTGAAGGTCTCAA

Sox9:

f-AGGAGAACACGTTCCCAAG

r-GTTGTGCAGATGCGGGTACT

Runx2:

f-GCCGGGAATGATGAGAACTA

r-TTGGGGAGGATTTGTGAAGA

Rex1 (ZFP42 Zinc Finger Protein):

f-TCTGAGTACATGACAGGCAAG

r-TCTGATAGGTCAATGCCAGGT

Adipophilin (ADFP):

f-CGCTGTCACTGGGGCAAAGA

r-ATCCGACTCCCAAGACTGTGTTA

Tubullin-beta3 (TUBB3):

f-CATGGACAGTGTCCGCTCAG
r-CAGGCAGTCGCAGTTTTTCAC

3.5. Nörojenik Farklılaştırma

Hücreler laminin kaplı kültür plakasına 3,000/cm² oranında ekimi gerçekleştirilmiştir. Kültür ortamı, nörojenik farklılaşma besiyeri (%5 FBS, %1 Pen/Strep, 1XN2 ortamı (Gibco), 1XB27 ortamı (Gibco), 1 mM retinoik asit (Sigma) ilave edilmiş DMEM) ile değiştirilmiştir. Farklılaşma besiyeri iki günde bir değiştirilmiş ve 8 günlük inkübasyonun ardından hücreler, anti-Tubb3 (Tubulin beta 3) antikoruna karşı immün boyama yoluyla farklılaşma açısından incelenmiştir.

3.6. İmmünfloresan Boyama

Nörojenik farklılaşma sonrası hücreler %4 paraformaldehit ile 15 dakika fikse edilmiş ve PBS (Thermo) ile yıkanmıştır. Daha sonra örnekler %1,5 blok serum (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) ile bloke edilmiştir. Tubb3'e karşı primer antikor, üreticinin tavsiyesine göre seyreltilmiş ve 4°C'de 16 saat inkübe edilmiştir. Anti-Tubb3 antikor, nöronal hücre farklılaşması için belirteç olarak kullanılmıştır. İmmünfloresan çalışmalar için oda sıcaklığında 1 saat TexasRed konjuge sekonder antikor ile inkübe edilmiş ve kapatma ortamı (DAPI ile UltraCruz Mounting Medium, Santa Cruz Biotechnology) ile kaplanmıştır. Boyalı hücreler floresan mikroskop (Leica DMI 4000 Microsystems) altında incelenmiştir.

3.7. Akım Sitometri Analizi

3. ve 21. pasajda, 2 farklı bireye ait dental pulpa mezenkimal kök hücreleri akım sitometri cihazı (BD Biosciences FACS Calibur) ile CellQuest™ yazılımı (BD Pharmingen) kullanılarak hücrelerin yüzey antijenleri CD20 monoklonal antikoruna için analiz edilmiştir. Bunun için hücreler kültür kabından tripsin enzimi ile kaldırılarak deney tüplerine alınmıştır. Deney tüplerine floresan izotiyosiyonat (FITC) konjuge monoklonal CD20 antikoruna (Biolegend 302303) ve izotip kontrolü 10 µl eklenerek oda sıcaklığında 45 dakika

inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda hücreler yıkama solüsyonu ile yıkanarak akım sitometri cihazı için hazır hale getirilmiştir.

3.8. İstatistiki Değerlendirme

Toplanan veriler SPSS 10.0 istatistik programı kullanılarak analiz edilmiştir. Tüm veriler ortalama \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir. Verilerin istatistiksel analizi tek yönlü ANOVA ve Turkey testleri ile belirlenmiştir.

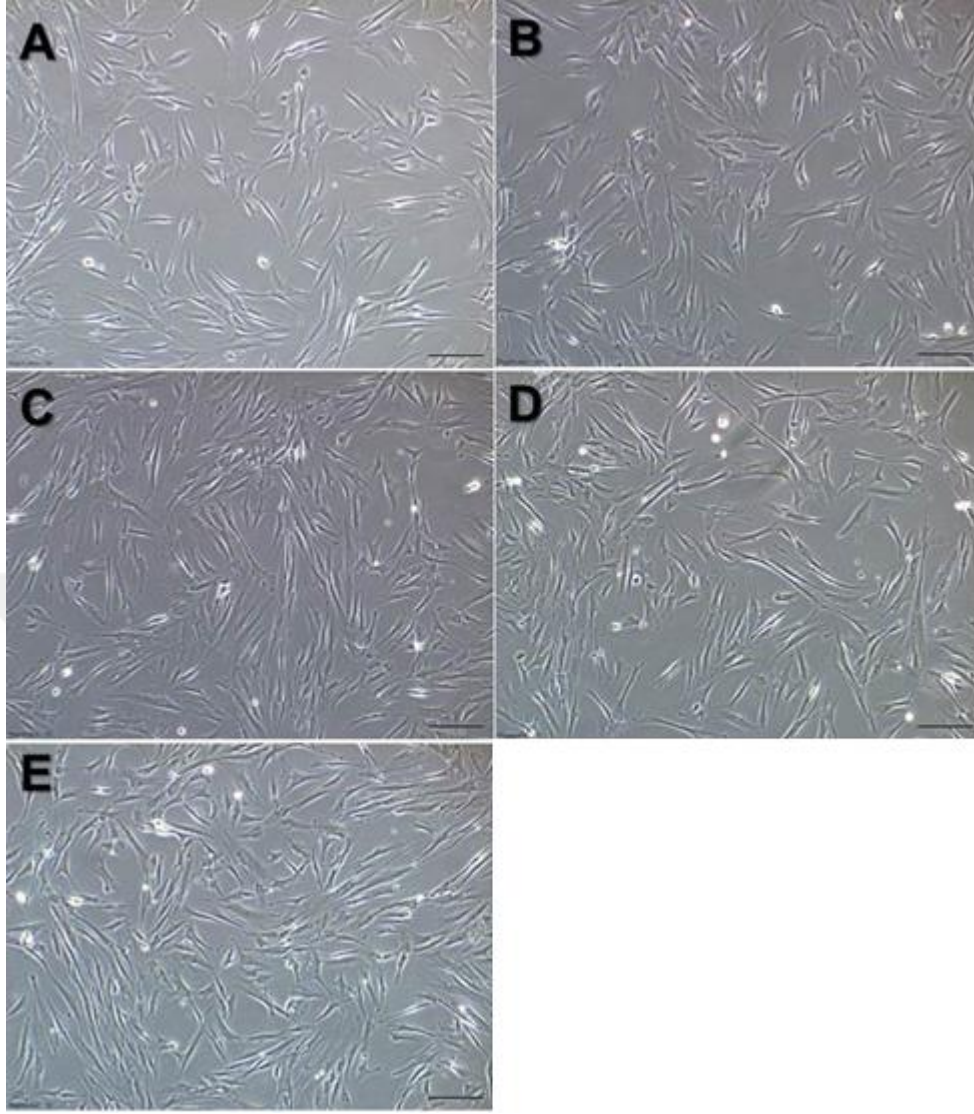


DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Hücre Kültürü Bulguları

Araştırmamızda kontrol grubu olarak kullanılan okrelizumab içermeyen dental pulpa mezenkimal kök hücre (DP-MKH) grubunda ince ve iğsi yapıda hücre morfolojisi gözlenmiştir. Okrelizumab'ın hücre kültürü ortamına 1.5 ve 15 µg/mL'lik dozlarda eklenmesinden 48 saat sonra hücre morfolojisi üzerinde görünür bir etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir. Hücre kültürü ortamına eklenen 150 ve 1500 µg/mL'lik Okrelizumab'ın en yüksek dozlarında, hücrelerin kontrol grubuna göre morfolojik olarak daha uzun yapıda oldukları belirlenmiştir. Hücre kültürlerinin hiçbirinde hücre ölümü görülmemiştir. Uygulamadan 48 saat sonra DP-MKH'lerin tipik fibroblast benzeri morfolojilerini kaybetmediği gözlenmiştir (Şekil 9).



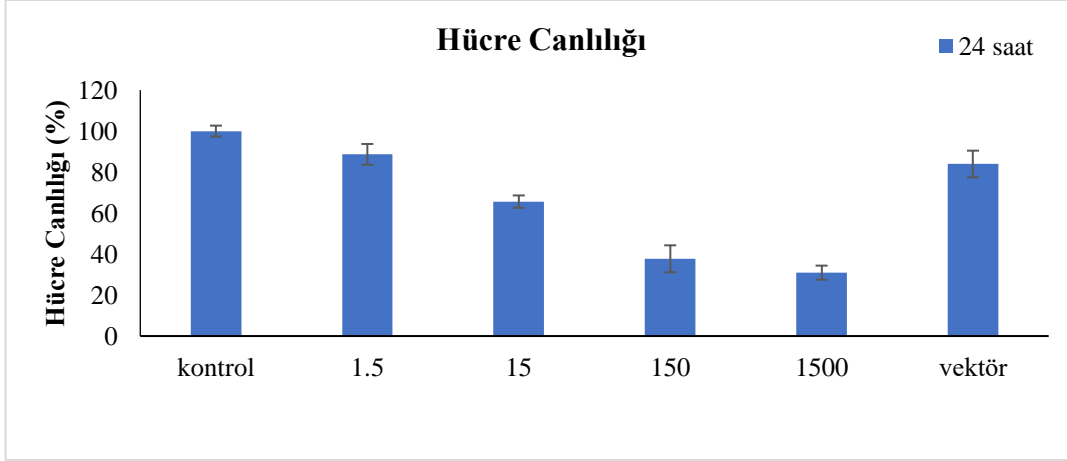
Şekil 9. Okrelizumab' in farklı dozları ile 48 saat kültürü sonrasında DP-MKH görüntüleri. A, 1,5 µg/mL; B, 15 µg/mL; C, 150 µg/mL; D, 1500 µg/mL; E, Okrelizumab eklenmemiş (kontrol). Ölçek çubuğu 100 µm.

4.2. Hücre Canlılık Analizi (WST-1 Testi) Bulguları

WST-1 sonuçlarına göre ilk 24 saatte Okrelizumab doz artışına paralel olarak hücre proliferasyonu baskılanmıştır ($p < 0.05$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en büyük baskılanma en yüksek doz olan 1500 µg/mL Okrelizumab uygulamasından 24 saat sonra %75 olarak gerçekleşmiştir. En az baskılanma ise en düşük doz olan 1,5 µg/mL Okrelizumab uygulamasından 24 saat sonra %15 olarak gerçekleşmiştir (Tablo 2).

Tablo 2

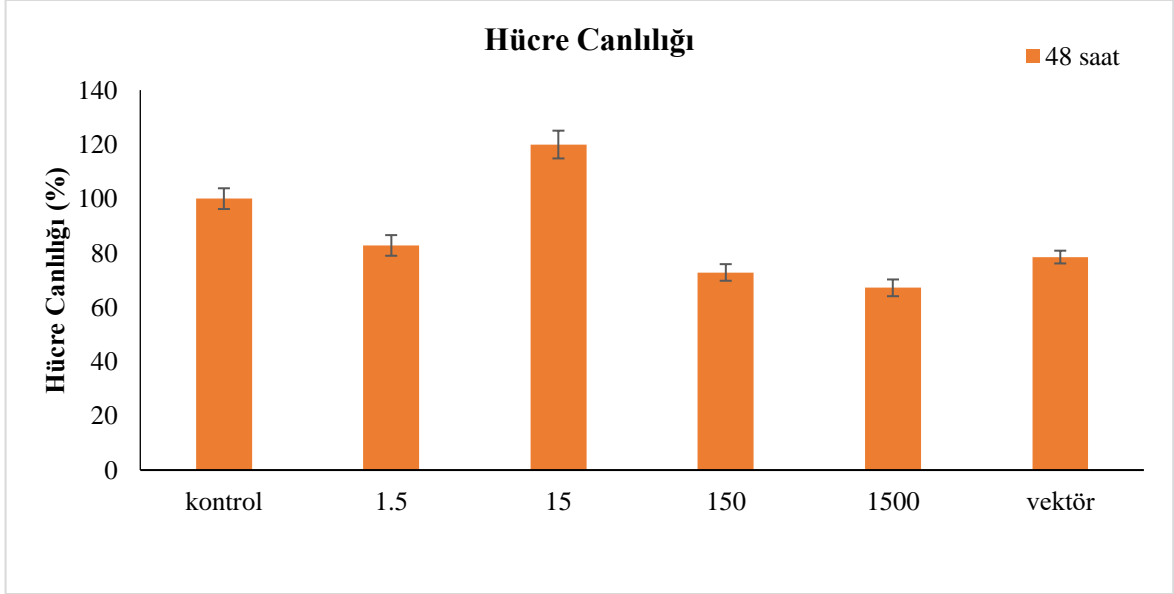
Okrelizumab uygulamasından 24 saat sonra hücre canlılık indeksi.



WST-1 sonuçlarına göre Okrelizumab uygulamasından 48 saat sonra 15 $\mu\text{g/mL}$ Okrelizumab uygulaması dışında ki gruplarda hücre proliferasyonu baskılanmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en büyük baskılanma en yüksek doz olan 1500 $\mu\text{g/mL}$ Okrelizumab uygulamasından 48 saat sonra %30 olarak gerçekleşmiştir. En az baskılanma ise en düşük doz olan 1,5 $\mu\text{g/mL}$ Okrelizumab uygulamasından 24 saat sonra yaklaşık %15 olarak gerçekleşmiştir. 15 $\mu\text{g/mL}$ Okrelizumab uygulaması 48 saat sonra hücre canlılığı, kontrole kıyasla $119,9 \pm 5,5\%$ ($p < 0,01$) yükselmiştir (Tablo 3).

Tablo 3

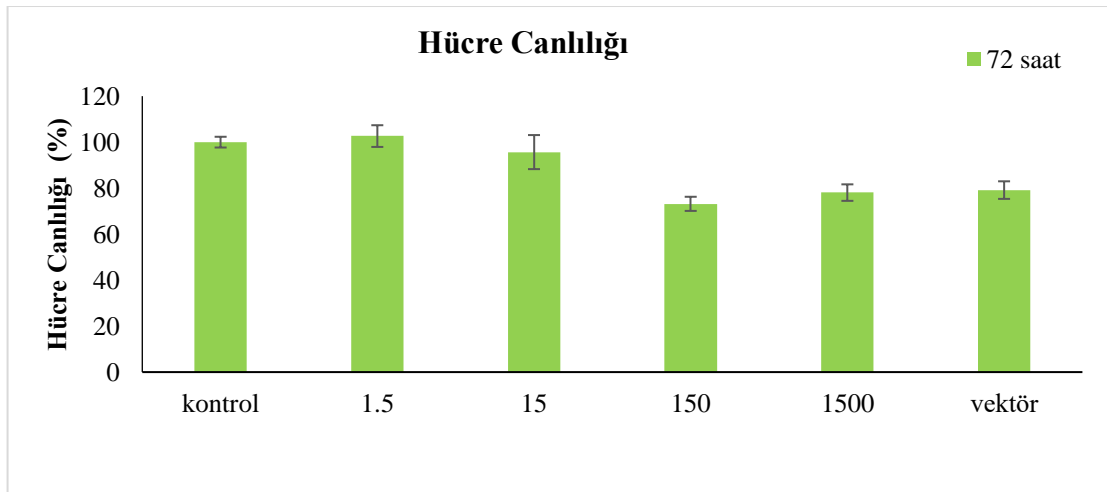
Okrelizumab uygulamasından 48 saat sonra hücre canlılık indeksi.



WST-1 sonuçlarına göre Okrelizumab uygulamasından 72 saat sonra, Okrelizumab'ın hücre çoğalmasını baskılaması kaybolmuştur. 72 saat sonra hücre proliferasyonunda gözlenen azalma, muhtemelen pH'ın hücre kültürü üzerindeki etkisinden dolayı vektör grubu ile aynı seviyede olmuştur (Tablo 4).

Tablo 4

Okrelizumab uygulamasından 72 saat sonra hücre canlılık indeksi.

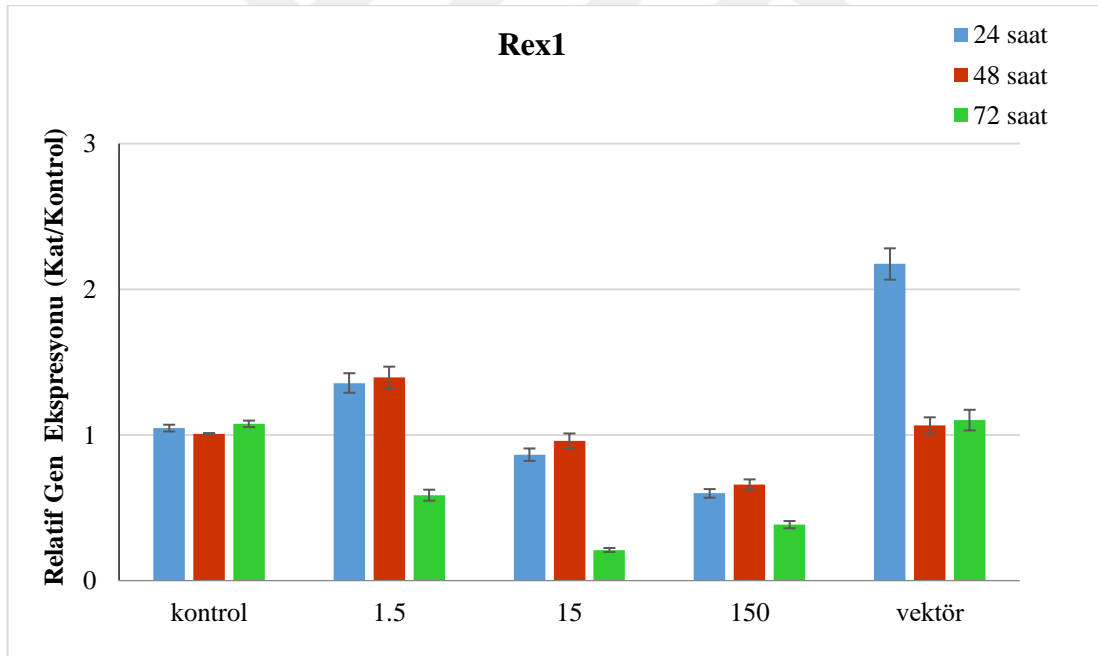


4.3. Gen Ekspresyon Analizi Bulguları

Pluripotensi belirteci olan REX1'in ifadesi, yetişkin kök hücrelerde kendini yenileme ve farklılaşma ile ilgilidir. REX1 ekspresyonunun, kontrole kıyasla 24 ve 48 saatte 1.5 µg/mL dozda önemli ölçüde artarken daha yüksek ilaç dozlarında azaldığı belirlenmiştir. Ekspresyondaki düşüş ise en çok 150 µg/mL'de anlamlı olduğu görülmüştür (p<0.01 ve Tablo 5). Bu düşüş kontrole kıyasla, 24 ve 48 saat sonra yaklaşık 1,7 kat iken, 72 saat sonra 2,6 olduğu görülmüştür. Pluripotensi belirtecinin ekspresyonu, PBS'de pH 7.2'de 24 saat sonra 2.2 kat önemli ölçüde iyileşmiş ve 48 saat sonra aniden kontrol seviyelerine düştüğü belirlenmiştir.

Tablo 5

Okrelizumab uygulamasından 24, 48 ve 72 saat sonra REX-1 ekspresyonu.

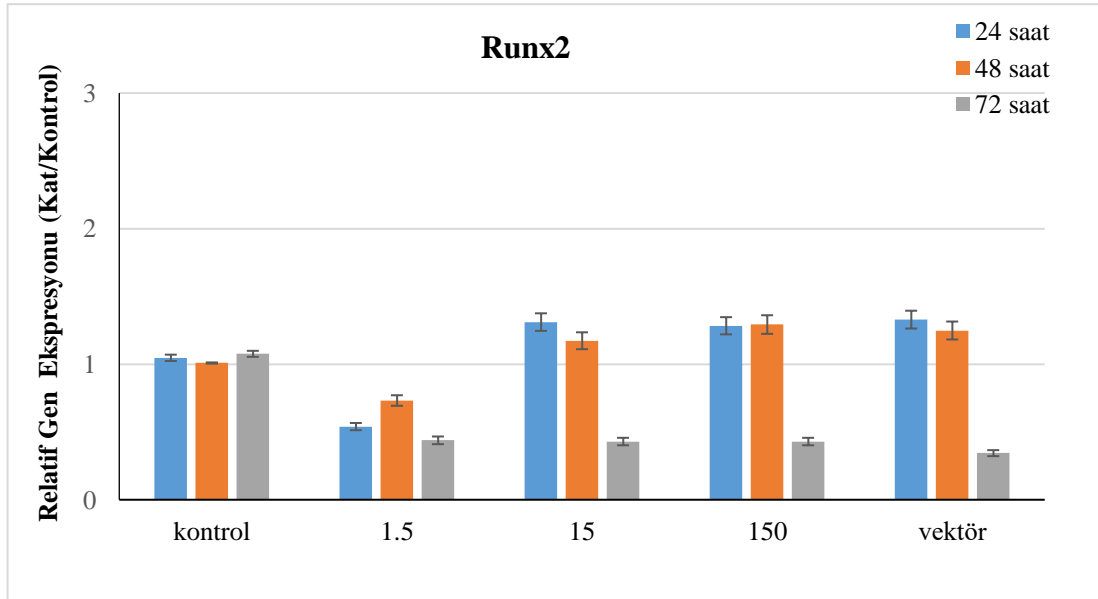


Okrelizumab'ın DP-MKH'lerin farklılaşma potansiyeli üzerindeki etkisi, yalnızca osteojenik, adipojenik, kondrojenik ve nörojenik belirteçler açısından değerlendirilmiştir. Farklılaşma belirteçleri, 24, 48 ve 72 saatlik Okrelizumab tedavisinden sonra Real Time PCR ile analiz edilerek belirlenmiştir.

Erken osteojenik farklılaşma belirteci olan RUNX-2'nin ifadesi, Okrelizumab'ın etkisi altında 24, 48 ve 72 saat sonra 1,5 µg/mL'de ($p<0,001$) düştüğü görülmüştür (Tablo 6). Daha yüksek dozlarda, 72 saatlik hücre kültürleri dışında aşağı regülasyon gözlenmemiştir. RUNX2 ekspresyonu, ilaç dozlarından bağımsız olarak kontrole göre yaklaşık 2 kat azalmıştır ($p<0,005$).

Tablo 6

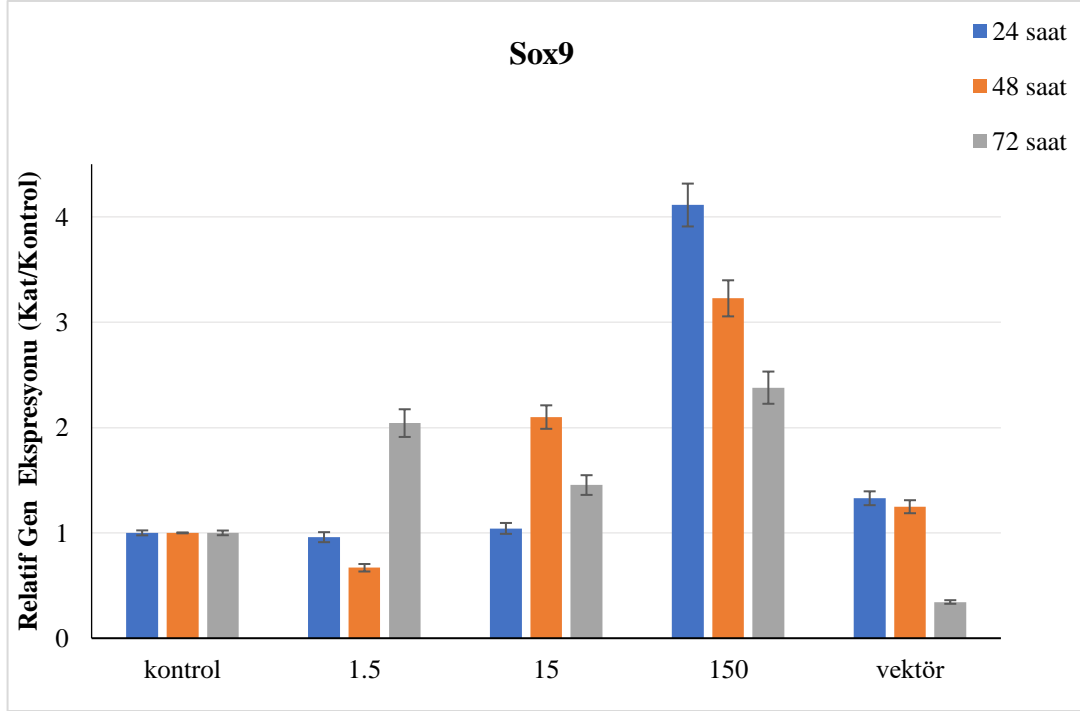
Okrelizumab uygulamasından 24, 48 ve 72 saat sonra RUNX-2 ekspresyonu.



Kondrojenik farklılaşma belirteci olan SOX-9'un ifadesi, RUNX-2 ifadesinin aksine 24 saat sonra önemli ölçüde değişmemiştir. Ancak 1,5 µg/mL Okrelizumab dozunda SOX-9 ekspresyonunun 48 saat sonra baskılanmış ve 72 saat sonra aniden anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir ($p<0,005$). SOX-9 ekspresyonundaki en dikkat çekici değişiklik 150 µg/mL Okrelizumab dozunda 24 saat sonra ve 48 saat sonra sırasıyla 4,1 ve 3,2 kat artışla gözlenmiştir (Tablo 7). 72 saat sonra bile SOX-9 ekspresyon seviyesi, kontrole göre yaklaşık 2,4 kat kadar yüksek olduğu görülmüştür.

Tablo 7

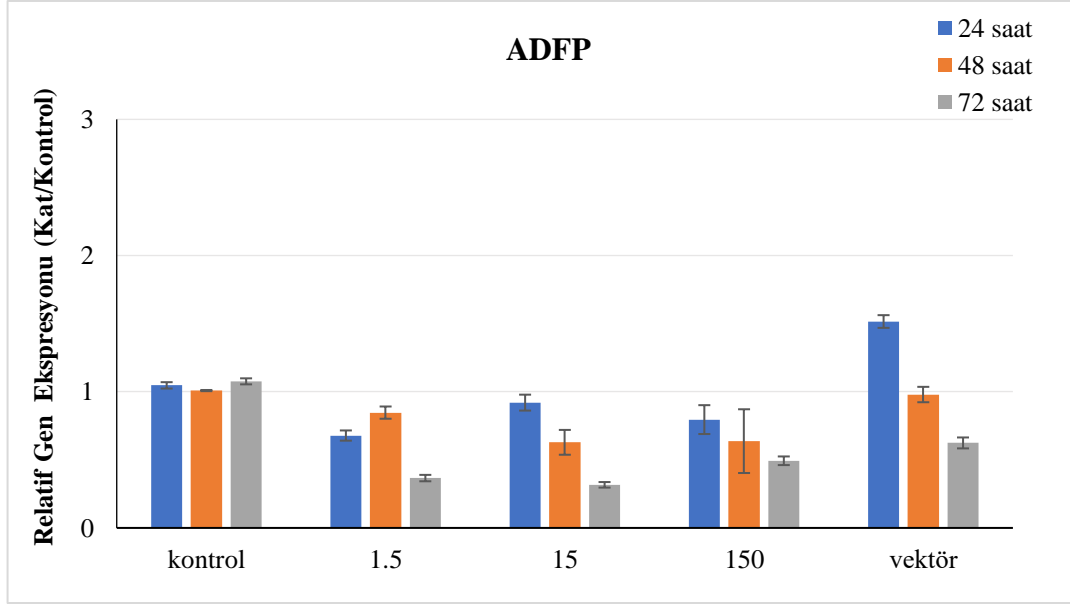
Okrelizumab uygulamasından 24, 48 ve 72 saat sonra SOX-9 ekspresyonu.



İlaç uygulaması genel olarak DP-MKH'nin osteojenik ve kondrojenik farklılaşmasını iyileştirmesine rağmen, Okrelizumab, DP-MKH'lerin adipojenik farklılaşma kapasitesi üzerinde olumsuz etki göstermiştir. Adipojenik farklılaşma için bir belirteç olan ADFP'nin ifadesi, kontrol veya vektör grubuna kıyasla ilaç dozuna bakılmaksızın ilacın varlığında düşmüştür (Tablo 8).

Tablo 8

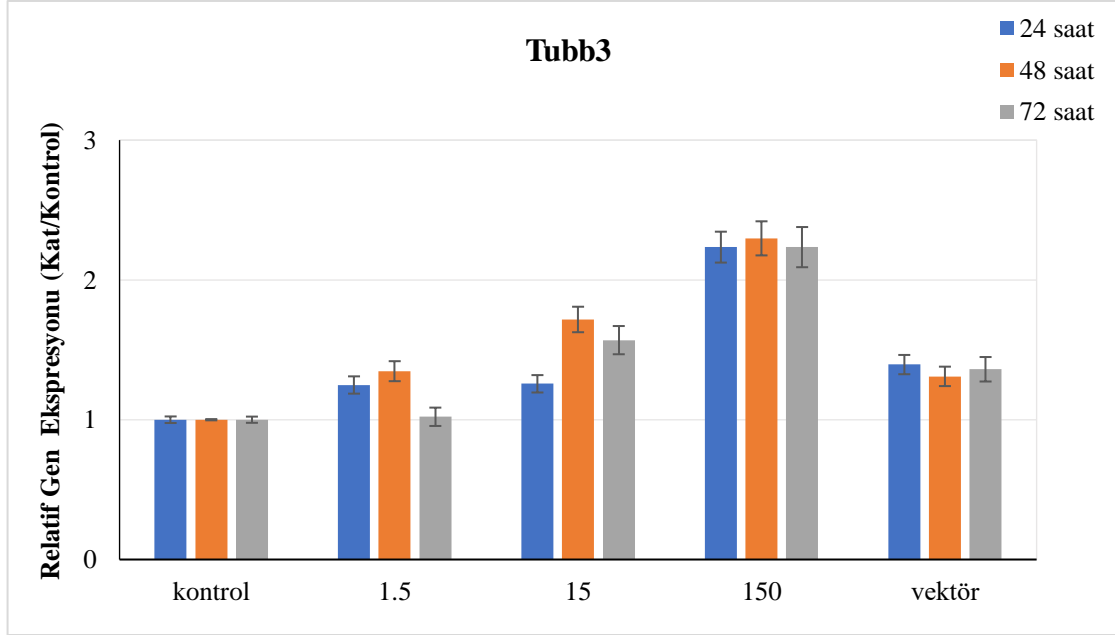
Okrelizumab uygulamasından 24, 48 ve 72 saat sonra ADFP ekspresyonu.



Bir nörojenik farklılaşma belirteci olan TUBB-3'ün ekspresyonu, artan Okrelizumab dozuna paralel olarak anlamlı şekilde artmıştır ($p < 0,005$ ve Tablo 9). Vektör grubu kontrole göre gelişmiş bir TUBB3 ekspresyonu (1,3 kat) gösterse de değişen Okrelizumab dozlarına sahip deney grupları yaklaşık 2,3 kat daha yüksek TUBB3 ekspresyonu göstermiştir. Ayrıca Okrelizumab, DP-MKH'lerin nörojenik farklılaşma besiyerine ek olarak eklenmiştir. 15 ve 150 $\mu\text{g/mL}$ Okrelizumab dozlarının protein seviyesini önemli ölçüde iyileştirdiği gösterilmiştir.

Tablo 9

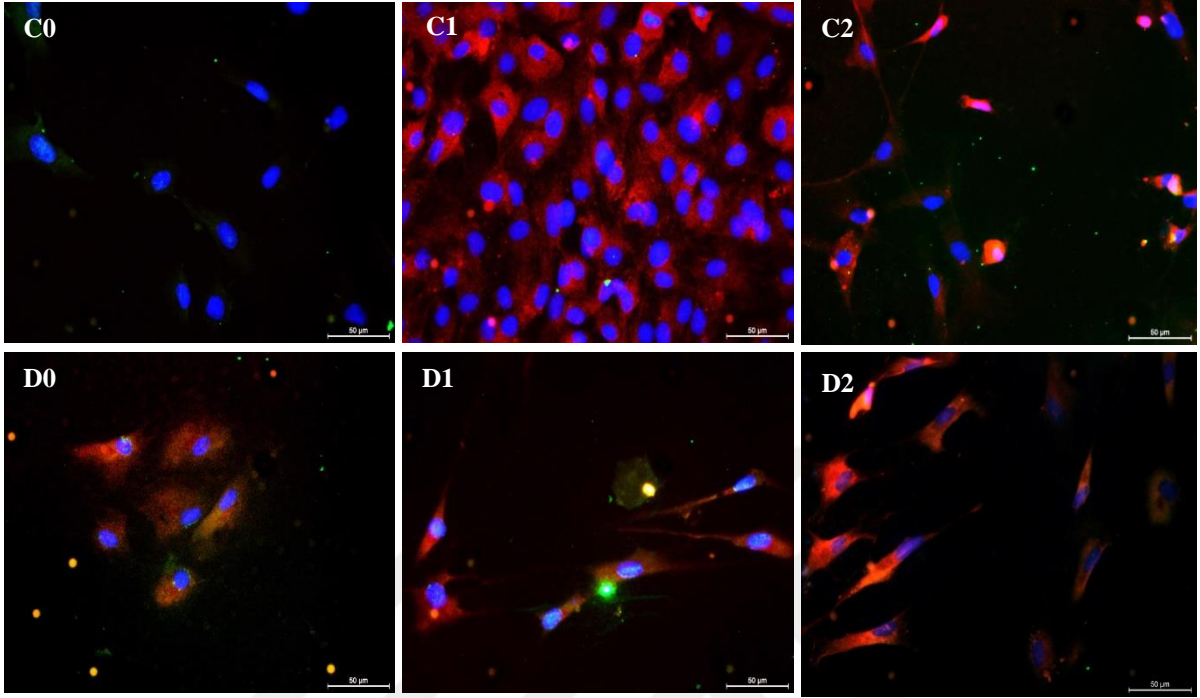
Okrelizumab uygulamasından 24, 48 ve 72 saat sonra TUBB-3 ekspresyonu.



4.4. İmmüno Floresan Boyama Bulguları

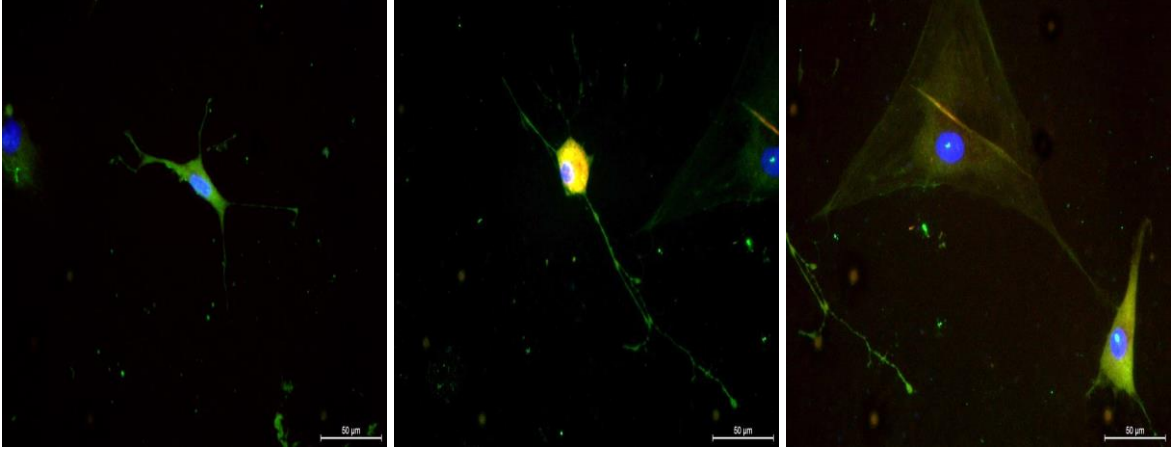
150 µg/mL ilaç dozunun TUBB-3 ekspresyonu üzerinde en yüksek etkiye sahip olmasına rağmen, hücre canlılığı olumsuz etkilenmiş ve hücreler, 8 gün boyunca tanımlanan nörojenik farklılaşma süresi boyunca kültürlenememiştir. Nörojenik indüksiyonun ardından hücreler, anti-TUBB3 (kırmızı) ve anti-GFAP (yeşil) antikoruna karşı immüno floresan yöntemiyle boyanmıştır (Şekil 10). TUBB-3 ilaçsız kontrolde (Şekil 10-C0) tespit edilememiştir fakat GFAP ekspresyonu az da olsa tespit edildiği görülmüştür. Normal kültür grubunda düşük dozda Okrelizumab (1,5 µg/mL, Şekil 10-C1) ilaç takviyesi, hücre canlılığında önemli bir kayıp olmaksızın hücrelerde TUBB3 ekspresyonunu önemli ölçüde iyileştirmiştir. Normal kültür grubunda (Şekil 10-C2) 15 µg/mL dozda, hala yoğun şekilde boyanmış hücrelerin olduğu görülürken, hücre canlılığı kaybına paralel olarak hücre sayısı azalmıştır. 8 günlük nörojenik farklılaşmanın ardından, ilaç eklenmeyen farklılaşma grubu (Şekil 10-D0), TUBB3 ve GFAP protein ifadesini göstermiştir, ancak önemli bir morfolojik değişiklik görülmemiştir. TUBB3 ekspresyonu, ilaç eklentili farklılaşma gruplarında hala yüksek olduğu gözlenirken (Şekil 10-D1, D2), morfolojik değişiklik olduğu da görülmüştür.

Farklılaşmadan sonra nöron benzeri morfoloji göstermişlerdir ve Okrelizumab tedavisinin bu etkiyi arttırdığı belirlenmiştir.



Şekil 10. Okrelizumab ilavesinin ardından Nörojenik farklılaşma belirteci TUBB-3 (kırmızı) ve GFAP (yeşil) immünfloresan boyama görüntüleri. C0. Okrelizumab eklenmemiş normal kültür besiyeri, C1. 1,5 µg/mL Okrelizumab normal kültür besiyeri, C2. 15 µg/mL Okrelizumab normal kültür besiyeri, D0. Okrelizumab eklenmemiş Nörojenik farklılaşma D1. 1,5 µg/mL Okrelizumab nörojenik farklılaşma D2. 15 µg/mL Okrelizumab nörojenik farklılaşma. Nükleuslar DAPI ile boyandı (mavi). Ölçek çubuğu 50 µm.

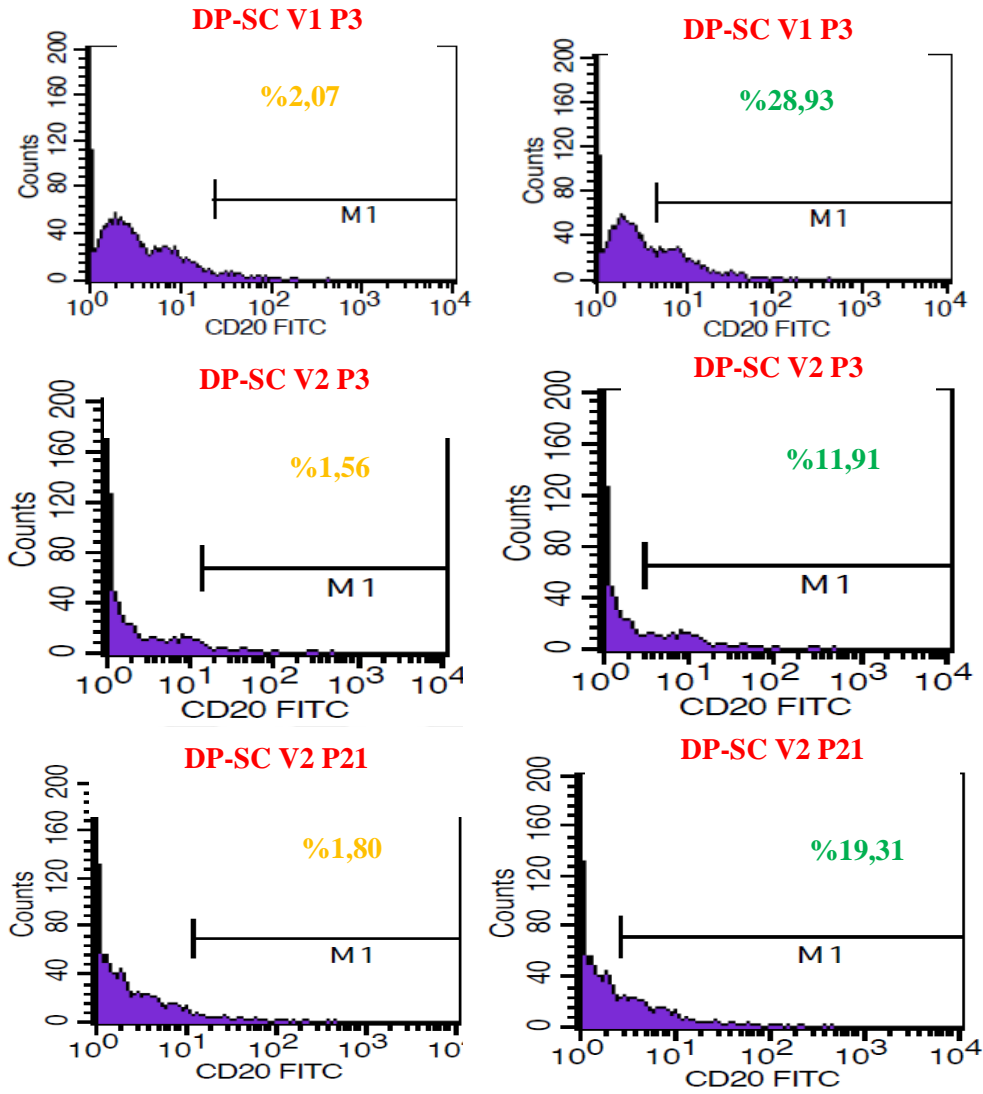
Retinoik asit ve 1,5 µg/mL Okrelizumab ilavesi yapılan nörojenik farklılaşmaya alınan grupta, hücreler tipik olarak astrosit hücre benzeri uzantılar sergilediği gözlenmiştir (Şekil 11). Oligodendrosit hücre belirteci olan GFAP (Glial Fibrillar Asidik Protein) ekspresyonunda artış olduğu gözlenmiştir.



Şekil 11. 1,5 µg/mL Okrelizumab ve 1nM Retinoik Asit eklenmiş nörojenik farklılaşma sonrası GFAP (yeşil) boyama. Nükleuslar DAPI ile boyandı (mavi). Ölçek çubuğu 50 µm.

4.5. Akım Sitometri Bulguları

DP-MKH'lerin CD20 yüzey antijenlerinin belirlenmesi için 2 farklı kaynaktan ve hem pasaj 3'te hem de pasaj 21'de Akım Sitometri cihazı ile analizleri yapılmıştır. Aşağıda Şekil 12'de görüldüğü gibi V2 hücrelerinin pasaj 3'te iken CD20'yi %11,91'i eksprese ederken ilerleyen pasajlarda bu oran %19,31'e yükselmiştir. Daha genç bir bireyden elde edilen diğer örnekte (V2) ise ekspresyon %28,93 olarak görülmektedir. Bu durum bugüne kadar CD20 negatif olduğu düşünülen MKH'lerin CD20'yi eksprese eden alt popülasyonları olduğunu ortaya çıkaran ilk bulgudur.



Şekil 12. 2 farklı kaynaktan elde edilen DP-MKH'lerin akım sitometri cihazı ile CD20 yüzey antijeni ekspresyon analizi.

4.6. Tartışma

Okrelizumab, MS tedavisinde kullanılması önerilen ve CD20 eksprese eden B hücrelerinin selektif olarak depleksiyonunda cesaret verici sonuçlar veren bir anti-CD20 monoklonal antikordur (Lamb, 2022). Kök hücre tedavisi, rejeneratif tıpta etkili bir tedavi ve mevcut tedavilerin yetersiz kaldığı durumlarda umut verici yeni bir yaklaşımdır. Kök hücrelerle tedavi, nöroproteksiyon, immünomodülasyon ve nörorejenerasyon dahil olmak üzere birçok mekanizma ile etkili olabilir.

16 hasta üzerinde yapılan bir klinik çalışmada plasenta kaynaklı mezenkimal kök hücreler kullanılmış ve hastalık progresyonunun durdurulduğu bildirilmiştir (Lublin vd., 2014). 48 hasta üzerinde yapılan başka bir klinik çalışmada ise otolog kemik iliği mezenkimal kök hücreleri intratekal ve intravenöz olarak uygulanmış ve hastalardaki iyileşmenin nöroprotektif, nörorejeneratif ve immünomodülatör etkilerinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Petrou vd., 2022).

İnsan diş pulpası kök hücrelerinin yüksek anjiyojenik ve nörojenik farklılaşma potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir (Hakki vd., 2015). Bu makalede, dental pulpa kök hücrelerin TUBB3 gibi erken nörojenik farklılaşma belirteçlerini ifade ettiği bildirilmiştir. Bu özellikler, hücrelerin nöron benzeri hücrelere daha etkili bir şekilde farklılaşmasını desteklemiştir. Dental pulpa kök hücreleri mezenkimal kök hücrelere çok benzemelerine rağmen nöronal spesifik belirteçleri ifade etmeleri ile onlardan ayrılırlar (Karaöz vd., 2011). İlginç bir şekilde, Okrelizumab, osteojenik ve kondrojenik farklılaşmalarda olduğu gibi, nöronal farklılaşmayı olumlu yönde etkilediği tez çalışmamızda gösterildi. DP-MKH'lerde ERK/MAPK'nin nöronal farklılaşma için gerekli olduğu gösterilmiştir (Al-Maswary vd., 2022).

Başka bir çalışmada, MAPK ve TGF- β sinyal yollarının nörojenik farklılaşmada merkezi bir rol oynadığı gösterilmiş ve DP-KH'ler ile MKH'ler arasındaki bu yollardaki fark, DP-KH'leri nöron benzeri hücreleri ayırt etmek için daha fazla potansiyel haline getirdiği belirtilmiştir (Song vd., 2017). DP-KH'lerde gelişmiş MAPK ve TGF- β sinyali, Okrelizumab'ın hedefi olmasının nedeni olabilir. CD20'nin işlevi hücrelerde net olarak bilinmemekle birlikte diğer hücrelerde TGF- β sinyalizasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Yanagisawa vd., 1998). Kesin mekanizma hala net değil, ancak Okrelizumab'ın nöronal farklılaşmayı iyileştirme potansiyeli olabilir.

Çalışmamızda diğer kaynaklara göre nörojenik farklılaşma kapasitesi daha yüksek olan nöral krisat kaynaklı dental pulpa kök hücreleri tercih edilmiş ve MS tedavisinde kullanılan okrelizumabın kök hücrelerin rejeneratif etkilerini arttırdığı gösterilmiştir. Kök hücrelerin elde edilmesinin kolaylığı ve benzersiz mekanizmaları, onlarla yapılan klinik

Çalışmaların başarısını sağlasa da, kök hücrelerle çalışmanın bazı sınırlamaları vardır. Klinik kullanımları için standart kültür koşulları, tedavi dozajı ve kullanılacak hücre sayısı tam olarak belirlenmemiştir. Bu anlamda çalışmamız okrelizumabın kök hücreler üzerindeki olası etkilerini ortaya koymasđ açısından literatüre yenilikçi bir bakış açısı getirmektedir.



BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER

MS üzerine yapılan çalışmalarla, genetik yatkınlık, bazı viral enfeksiyonlar ve çevresel faktörlerin biraraya gelerek indüklendiği öne sürülsede, hastalığın patogenezi henüz tam olarak anlaşılammıştır. Bu nedenle, MS'in mevcut immünosupresyona dayalı tedavilerinin etkinliği çok düşüktür ve hastalık modifiye edici immünomodülatör ajanlar, ilerleyici nörodejeneratif süreci durdurmakta yetersiz kalmaktadır.

Bu nedenle, nöronal hücre kaybı ve remiyelinizasyon başarısızlığının üstesinden gelmeyi ve miyelin onarım kapasitesini artırmayı hedefleyen hücre replasman tedavisi yaklaşımı alternatif bir tedavi seçeneği olarak değerlendirilmektedir.

İlaçların araştırma döneminde, model hücreler olarak kök hücreler sıklıkla tercih edilmektedir. Araştırmacılara pek çok avantaj sağlayarak, güvenilir sonuçların elde edilmesine olanak tanır. Fakat Okrelizumab ile sadece kök hücre ile değil hücrelerel ilişki bazlı çalışmalara da rastlanmamıştır. Bu anlamda çalışmamız literatürde bu konuda yapılan ilk çalışma özelliğini taşımaktadır.

Bu tez çalışmasında dental pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücreler, ön çalışma verilerinden elde ettiğimiz sonuçlar dikkate alınarak belirlenen farklı dozajlarda (1,5 µg/ml, 15 µg/ml ve 150 µg/ml) Okrelizumab ile tedavi edildikten sonra morfolojik olarak etkilenmedikleri görülmüş, gen ekspresyon profillerinde meydana gelen değişiklikler ise real-time PCR ile gösterilmiştir. Adipojenik, kondrojenik, osteojenik ve nörojenik farklılaşma genleri üzerinde anlamlı değişiklikler yapan Okrelizumab tedavisinin aynı zamanda hücrelerin proliferasyonlarını baskıladığı belirlenmiştir.

MS'in klinik tedavisinde kullanılan Okrelizumab'ın mezenkimal kök hücreler üzerindeki etkilerini ortaya çıkardığımız çalışmamız literatüre katkı sağlayacak niteliktedir. Daha önce benzeri bulunmayan çalışmamızla elde ettiğimiz sonuçlar,

mezenkimal kök hücrelerin rejeneratif etkilerinin arttığını ortaya çıkarmıştır. Bu durum immün baskılayıcı olarak kullanılan ilacın aynı zamanda kök hücrelerin oligodentrositlere farklılaşmasını arttırarak miyelin kılıfın yeniden oluşumuna katkı sağlıyor olabilir.

Bugüne kadar klinik denemeleri yapılan kök hücre çalışmalarına bakıldığında elde edilen sonuçlar kök hücre potansiyelinden beklenen düzeyin altında kalmaktadır. Klinik denemelerde kullanılacak olan kök hücrelerin rejeneratif etkilerinin arttırılmasına dönük uygulamalardan sonra hastalara verilmesi, hastalık üzerindeki iyileştirici etkilerini arttırabilir. Çalışmamızda Okrelizumab'ın rejeneratif etkilerinin arttırdığı gösterilmiş olup olası başka moleküller de bu anlamda denenmelidir.

Tez çalışması sonuçlarından elde edilen DP-MKH'lerinin CD20 yüzey antijenini eksprese ettiklerinin gösterilmesi ile diğer kaynaklardan izole edilen mezenkimal kök hücreler için de bu antijene bakılarak karşılaştırma yapılması önem arz etmektedir.

İlacın kan-beyin bariyerini geçtiği bilinmektedir. Bu durumda nöral kök hücrelerle de etkileşimde olduğu kesindir. Aynı şekilde ilacın nöral kök hücreler üzerindeki etkilerinin de çalışılması, hastalığın tedavisi sürecinde yeni bakış açıları kazandırabilecek bir uygulama olabilir.

KAYNAKÇA

- Ahani-Nahayati, M., Shariati, A., Mahmoodi, M., Olegovna Zekiy, A., Javidi, K., Shamlou, S., Mousakhani, A., Zamani, M. and Hassanzadeh, A. (2021). “Stem cell in neurodegenerative disorders; an emerging strategy.”, *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 81(4), 291–311. <https://doi.org/10.1002/jdn.10101>
- Al-Maswary, A. A., O'Reilly, M., Holmes, A. P., Walmsley, A. D., Cooper, P. R. and Scheven, B. A. (2022). “Exploring the neurogenic differentiation of human dental pulp stem cells.” *PloS One*, 17(11), e0277134.
- Bhansali, A., Upreti, V., Khandelwal, N., Marwaha, N., Gupta, V., Sachdeva, N., Sharma, R. R., Saluja, K., Dutta, P., Walia, R., Minz, R., Bhadada, S., Das, S. and Ramakrishnan, S. (2009). “Efficacy of autologous bone marrow-derived stem cell transplantation in patients with type 2 diabetes mellitus.”, *Stem Cells and Development*, 18(10), 1407–1416.
- Bose, G., Atkins, H. L., Bowman, M. and Freedman, M. S. (2019). “Autologous hematopoietic stem cell transplantation improves fatigue in multiple sclerosis.”, *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 25(13), 1764–1772.
- Browne, P., Chandraratna, D., Angood, C., Tremlett, H., Baker, C., Taylor, B. V. and Thompson, A. J. (2014). Atlas of multiple sclerosis 2013: a growing global problem with widespread inequity. *Neurology*, 83(11), 1022-1024.
- Calabresi, P.A. (2004). “Diagnosis And Management Of Multiple Sclerosis.” *Am Fam Physician*, 70(10): P. 1935-44.
- Chen, A. Y., Chonghasawat, A. O. and Leadholm, K. L. (2017). “Multiple sclerosis: frequency, cost, and economic burden in the United States.”, *Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of The Neurosurgical Society of Australasia*, 45, 180–186.
- Cipriani, P., Carubbi, F., Liakouli, V., Marrelli, A., Perricone, C., Perricone, R., Alesse, E. and Giacomelli, R. (2013). “Stem cells in autoimmune diseases: Implications for pathogenesis and future trends in therapy.”, *Autoimmunity Reviews*, 12(7), 709–716.

- Clifford, D. M., Fisher, S. A., Brunskill, S. J., Doree, C., Mathur, A., Watt, S. and Martin-Rendon, E. (2012). “Stem cell treatment for acute myocardial infarction.”, *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (2), CD006536.
- Cohen, J. A., Imrey, P. B., Planchon, S. M., Bermel, R. A., Fisher, E., Fox, R. J., Bar-Or, A., Sharp, S. L., Skaramagas, T. T., Jagodnik, P., Karafa, M., Morrison, S., Reese Koc, J., Gerson, S. L. and Lazarus, H. M. (2018). “Pilot trial of intravenous autologous culture-expanded mesenchymal stem cell transplantation in multiple sclerosis.”, *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 24(4), 501–511.
- Connick, P., Kolappan, M., Crawley, C., Webber, D. J., Patani, R., Michell, A. W., Du, M. Q., Luan, S. L., Altmann, D. R., Thompson, A. J., Compston, A., Scott, M. A., Miller, D. H. and Chandran, S. (2012). “Autologous mesenchymal stem cells for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: an open-label phase 2a proof-of-concept study.”, *The Lancet. Neurology*, 11(2), 150–156.
- Dobson R. and Giovannoni G., (2019) “Multiple sclerosis - a review.” *Eur J Neurol.* Jan; 26(1):27-40.
- Ebers, G. C. (1983). “Genetic factors in multiple sclerosis.” *Neurologic Clinics*, 1(3), 645–654.
- Fox, R. J., Miller, D. H., Phillips, J. T., Hutchinson, M., Havrdova, E., Kita, M., Yang, M., Raghupathi, K., Novas, M., Sweetser, M. T., Vigiotta, V., Dawson, K. T. and CONFIRM Study Investigators (2012). “Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis.”, *The New England Journal of Medicine*, 367(12), 1087–1097.
- Garg, N. and Smith, T. W. (2015). “An update on immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of multiple sclerosis.” *Brain and Behavior*, 5(9), e00362. <https://doi.org/10.1002/brb3.362>
- Genc, B., Bozan, H. R., Genc, S. and Genc, K. (2019). “Stem Cell Therapy for Multiple Sclerosis” *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1084, 145–174. https://doi.org/10.1007/5584_2018_247
- Greenfield A.L. and Hauser S.L. (2018) “B-cell Therapy for Multiple Sclerosis: Entering an era.”, *Annals of Neurology*. 83(1):13–26.

- Gustavsson, A., Svensson, M., Jacobi, F., Allgulander, C., Alonso, J., Beghi, E., Dodel, R., Ekman, M., Faravelli, C., Fratiglioni, L., Gannon, B., Jones, D. H., Jennum, P., Jordanova, A., Jönsson, L., Karampampa, K., Knapp, M., Kobelt, G., Kurth, T., Lieb, R., ... CDBE2010Study Group. (2011). "Cost of disorders of the brain in Europe 2010.", *European Neuropsychopharmacology: The Journal of The European College of Neuropsychopharmacology*, 21(10), 718–779.
- Hafler D.A., Slavik J.M. and Anderson D.E. (2005). "Multipl Sclerosis." *Immunological Reviews*, 204:208-231.
- Hakki, S. S., Kayis, S. A., Hakki, E. E., Bozkurt, S. B., Duruksu, G., Unal, Z. S., Turaç, G. and Karaoz, E. (2015). "Comparison of mesenchymal stem cells isolated from pulp and periodontal ligament." *Journal of Periodontology*, 86(2), 283–291.
- Harris, V. K., Stark, J., Vyshkina, T., Blackshear, L., Joo, G., Stefanova, V., Sara, G. and Sadiq, S. A. (2018). "Phase I Trial of Intrathecal Mesenchymal Stem Cell-derived Neural Progenitors in Progressive Multipl Sclerosis.", *EBioMedicine*, 29, 23–30.
- Hauser, S. L., Bar-Or, A., Cohen, J. A., Comi, G., Correale, J., Coyle, P. K., Cross, A. H., de Seze, J., Leppert, D., Montalban, X., Selmaj, K., Wiendl, H., Kerloeguen, C., Willi, R., Li, B., Kakarieka, A., Tomic, D., Goodyear, A., Pingili, R., Häring, D. A., ... ASCLEPIOS I and ASCLEPIOS II Trial Groups (2020). "Ofatumumab versus Teriflunomide in Multipl Sclerosis.", *The New England Journal of Medicine*, 383(6), 546–557.
- Hemmer, B. and Mühlau, M. (2017). "Multipl sclerosis in 2016: Immune-directed therapies in MS-efficacy and limitations.", *Nature Reviews. Neurology*, 13(2), 72–74.
- Holmoy, T. (2009). "The discovery of oligoclonal bands: a 50-year anniversary", *European Neurology*, 62(5), 311–315.
- Jiang, W. and Xu, J. (2020). "Immune modulation by mesenchymal stem cells.", *Cell Proliferation*, 53(1), e12712. <https://doi.org/10.1111/cpr.12712>
- Karaöz, E., Demircan, P. C., Sağlam, O., Aksoy, A., Kaymaz, F. and Duruksu, G. (2011). "Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells." *Histochemistry and Cell Biology*, 136(4), 455–473.
- Kavaliunas, A., Stawiarz, L., Hedbom, J., Glaser, A. and Hillert, J. (2015). "The influence of immunomodulatory treatment on the clinical course of multipl sclerosis", *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 822, 19–24.

- Lamb Y. N. (2022). "Ocrelizumab: A Review in Multiple Sclerosis." *Drugs*, 82(3), 323–334.
- Li, Z., Niu, S., Guo, B., Gao, T., Wang, L., Wang, Y., Wang, L., Tan, Y., Wu, J. and Hao, J. (2020). "Stem cell therapy for COVID-19, ARDS and pulmonary fibrosis.", *Cell Proliferation*, 53(12), e12939.
- Lublin, F. D., Reingold, S. C., Cohen, J. A., Cutter, G. R., Sørensen, P. S., Thompson, A. J., Wolinsky, J. S., Balcer, L. J., Banwell, B., Barkhof, F., Bebo, B., Jr, Calabresi, P. A., Clanet, M., Comi, G., Fox, R. J., Freedman, M. S., Goodman, A. D., Inglese, M., Kappos, L., Kieseier, B. C. and Polman, C. H. (2014). "Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions.", *Neurology*, 83(3), 278–286.
- McDonald, W. I., Compston, A., Edan, G., Goodkin, D., Hartung, H. P., Lublin, F. D., McFarland, H. F., Paty, D. W., Polman, C. H., Reingold, S. C., Sandberg-Wollheim, M., Sibley, W., Thompson, A., van den Noort, S., Weinshenker, B. Y. and Wolinsky, J. S. (2001). "Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis", *Annals of Neurology*, 50(1), 121–127.
- Miljkovic, D. and Spasojevic, I. (2013). "Multiple sclerosis: molecular mechanisms and therapeutic opportunities", *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(18), 2286–2334.
- Milo, R. (2016). "Therapeutic strategies targeting B-cells in multiple sclerosis", *Autoimmunity Reviews*, 15(7), 714–718.
- Oh, K. W., Moon, C., Kim, H. Y., Oh, S. I., Park, J., Lee, J. H., Chang, I. Y., Kim, K. S. and Kim, S. H. (2015). "Phase I trial of repeated intrathecal autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in amyotrophic lateral sclerosis.", *Stem Cells Translational Medicine*, 4(6), 590–597.
- Öztürk, S., Aytaç, G., Kızılay, F. and Sindel, M. (2017) "Multiple Skleroz". *Akdeniz Tıp Dergisi* 3: 137-147
- Peng, Y., Chen, X., Liu, Q., Zhang, X., Huang, K., Liu, L., Li, H., Zhou, M., Huang, F., Fan, Z., Sun, J., Liu, Q., Ke, M., Li, X., Zhang, Q. and Xiang, A. P. (2015). "Mesenchymal stromal cells infusions improve refractory chronic graft versus host disease through an increase of CD5+ regulatory B cells producing interleukin 10.", *Leukemia*, 29(3), 636–646.

- Petrou, P., Kassis, I., Ginzberg, A., Hallimi, M. and Karussis, D. (2022). “Effects of Mesenchymal Stem Cell Transplantation on Cerebrospinal Fluid Biomarkers in Progressive Multiple Sclerosis.”, *Stem Cells Translational Medicine*, 11(1), 55–58.
- Polman, C. H., O'Connor, P. W., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Miller, D. H., Phillips, J. T., Lublin, F. D., Giovannoni, G., Wajgt, A., Toal, M., Lynn, F., Panzara, M. A., Sandrock, A. W. and AFFIRM Investigators (2006). “A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis.”, *The New England Journal of Medicine*, 354(9), 899–910.
- Riordan, N. H., Morales, I., Fernández, G., Allen, N., Fearnot, N. E., Leckrone, M. E., Markovich, D. J., Mansfield, D., Avila, D., Patel, A. N., Kesari, S. and Paz Rodriguez, J. (2018). “Clinical feasibility of umbilical cord tissue-derived mesenchymal stem cells in the treatment of multiple sclerosis.”, *Journal of Translational Medicine*, 16(1), 57.
- Rowland, P.L. (2008). “Multiple Skleroz.”, *Merritt's Neurology* (11. Türkçe Baskı). İstanbul: Güneş kitabevi; s.941-961.
- Rudick, R. A., Stuart, W. H., Calabresi, P. A., Confavreux, C., Galetta, S. L., Radue, E. W., Lublin, F. D., Weinstock-Guttman, B., Wynn, D. R., Lynn, F., Panzara, M. A., Sandrock, A. W. and SENTINEL Investigators (2006). “Natalizumab plus interferon beta-1a for relapsing multiple sclerosis.”, *The New England Journal of Medicine*, 354(9), 911–923.
- Selter, R. C. and Hemmer, B. (2013). “Update on immunopathogenesis and immunotherapy in multiple sclerosis.”, *Immuno Targets and Therapy*, 2, 21–30.
- Skaper, S.D. (2019). “Oligodendrocyte precursor cells as a therapeutic target for demyelinating diseases”, *Progress in Brain Research*, 245, 119–144.
- Song, M., Lee, J. H., Bae, J., Bu, Y. and Kim, E. C. (2017). “Human Dental Pulp Stem Cells Are More Effective Than Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Cerebral Ischemic Injury.”, *Cell Transplantation*, 26(6), 1001–1016.
- Sorensen, P. S. and Blinkenberg, M. (2016). “The potential role for ocrelizumab in the treatment of multiple sclerosis: current evidence and future prospects”, *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 9(1), 44–52.

- Stepien, A., Dabrowska, N. L., Maciagowska, M., Macoch, R. P., Zolocinska, A., Mazur, S., Siennicka, K., Frankowska, E., Kidzinski, R., Chalimoniuk, M. and Pojda, Z. (2016). “Clinical Application of Autologous Adipose Stem Cells in Patients with Multiple Sclerosis: Preliminary Results.”, *Mediators of Inflammation*, 2016, 5302120.
- Thompson, A. J., Banwell, B. L., Barkhof, F., Carroll, W. M., Coetzee, T., Comi, G., Correale, J., Fazekas, F., Filippi, M., Freedman, M. S., Fujihara, K., Galetta, S. L., Hartung, H. P., Kappos, L., Lublin, F. D., Marrie, R. A., Miller, A. E., Miller, D. H., Montalban, X., Mowry, E. M., ... Cohen, J. A. (2018). “Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria.”, *The Lancet. Neurology*, 17(2), 162–173.
- Tremblay, F., Ansari, Y., Remaud, A. and Freedman, M. S. (2022). “Neurophysiological outcomes following mesenchymal stem cell therapy in multiple sclerosis.”, *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, 136, 69–81.
- Türk Börü, Ü., Duman, A., Kulualp, A. Ş., Güler, N., Taşdemir, M., Yılmaz, Ü., Alp, R. and Bölük, C. (2018). “Multiple sclerosis prevalence study: The comparison of 3 coastal cities, located in the black sea and mediterranean regions of Turkey”, *Medicine*, 97(42), e12856.
- Visweswaran, M., Hendrawan, K., Massey, J. C., Khoo, M. L., Ford, C. D., Zaunders, J. J., Withers, B., Sutton, I. J., Ma, D. D. F. and Moore, J. J. (2022). “Sustained immunotolerance in multiple sclerosis after stem cell transplant.”, *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 9(2), 206–220.
- Vozikis, A. and Sotiropoulou, E. (2013). “Economic Burden of Multiple Sclerosis on patients: Research Findings from Greece”, *Journal of Finance and Economics*, 1(3), 36-40.
- Weinshenker B. G. (1995). “The natural history of multiple sclerosis”, *Neurologic Clinics*, 13(1), 119–146.