



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENTAL FOLİKÜL KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN
EV TOZU AKARINA DUYARLI ASTIMLI HASTALARIN
LENFOSİTLERİ ÜZERİNE İMMÜNOLOJİK ETKİLERİNİN İN VİTRO
ORTAMDA ARAŞTIRILMASI**

ÜLKÜ ARIĞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ALLERJİ VE İMMÜNOLOJİ BİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Tunç AKKOÇ

II. DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Esra ÇAĞAVİ

2016-İSTANBUL



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENTAL FOLİKÜL KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN
EV TOZU AKARINA DUYARLI ASTIMLI HASTALARIN
LENFOSİTLERİ ÜZERİNE İMMÜNOLOJİK ETKİLERİNİN İN VİTRO
ORTAMDA ARAŞTIRILMASI**

ÜLKÜ ARIĞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ALLERJİ VE İMMÜNOLOJİ BİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Tunç AKKOÇ

II. DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Esra ÇAĞAVİ

2016-İSTANBUL

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Programın seviyesi : Yüksek Lisans

Anabilim Dalı : Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları

Tez Sahibi : Ülkü ARIĞ

Tez Başlığı :Dental Folikül Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Ev Tozu Akarına Duyarlı Astımlı Hastaların Lenfositleri Üzerine İmmünolojik Etkilerinin İnvitro Ortamda Araştırılması

Sınav Yeri : Sağlık Bakanlığı Marmara Üniversitesi Pendik E.AH.

Sınav Tarihi : 23.12.2016

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Kurumu

İmza

Prof. Dr. Tunç Akkoç

Marmara Üni.

Yrd. Doç. Dr. Esra Çağavi

Medipol Üni.

Sınav Jüri Üyeleri

(Unvan, Adı, Soyadı)

Doç. Dr. Elif Aydın Karakoç

Marmara Üni.

Doç. Dr. Betül Karademir

Marmara Üni.

Doç. Dr. Esin Aktaş Çetin

İstanbul Üni.

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu' nun 29/12/2016 tarih ve 32. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Göksel ŞENER

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



ÜLKÜ ARIĞ

İmza

TEŞEKKÜR

Bilgi birikimi ve değerli görüşlerini özveriyle benimle paylaşan ve desteklerini esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Işıl Barlan' a,

Yüksek Lisans öğrenimimin ve tez çalışmamın tüm aşamalarında her türlü bilimsel desteği sağlayan, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan ve beni yönlendiren tez danışmanım değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Tunç Akkoç ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Esra Çağavi' ye,

Tez çalışmam sırasında kendilerini hep arkamda hissettiğim ve yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Elif Karakoç-Aydiner, Doç. Dr. Ahmet Özen ve Doç. Dr. Safa Barış' a,

Tez çalışmamda kullandığım dişlerin elde edilmesinde emeği geçen Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı başkanı sayın Prof. Dr. Mehmet Kamil Göker' e ve doktora öğrencilerine, çalışmama katılan tüm çocuk ve ailelerine ve Sayın Dr. Ercan Naim' e,

Tezimin birçok aşamasında yardımlarını aldığım bilgi birikimini benimle paylaşan, her konuda bana destek olan sevgili Ozan Veranyurt' a

Tez çalışmamda önemli bir yeri olan istatistiğimi yapmada bana yardımcı olan biricik kardeşim Alperen Arığ' a,

Çalışmamın her aşamasında yanımda olan, desteğini, bilgisini, deneyimini hiç esirgemeyen Deniz Genç' e, çalışma arkadaşlarım Dilek Çiçekkökü, Noushin Zibandeh, Gamze Akgün, Tuba Akgül, İsmail Öğülür ve bu yola beraber başladığım canım arkadaşım Selin Yıldırım Kılınç' a,

Her zaman sabırla, sevgiyle bana destek veren, hep yanımda olan en yakın arkadaşım Eda Yetgin' e,

Tüm hayatım boyunca attığım her adımda yanımda olan, varlıkları ile bana güç veren, her şeyimi borçlu olduğum annem, babam ve aileme,

Bu süreçteki destek ve sabırları için sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu Başkanlığı tarafından SAG-C-YLP-130515-0161 numaralı proje ile desteklenmiştir.



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xii
TABLolar LİSTESİ.....	xiv
KISALTMALAR.....	xv
1 ÖZET	xvii
2 SUMMARY.....	1
3 GİRİŞ VE AMAÇ.....	2
4 GENEL BİLGİLER	8
4.1 Astım	8
4.1.1 Astımın tanımı ve tarihçesi	8
4.1.2 Astımın epidemiyolojisi	8
4.1.3 Alerjik astımın immünopatogenezi	9
4.1.3.1 Th1/Th2 Dengesi	9
4.1.4 Regülatör hücreler	9
4.1.4.1 Astımda CD4 ⁺ CD25 ⁺ regülatör T hücreler (Treg).....	10
4.2 Kök Hücre.....	11
4.2.1 Kök hücrenin tanımı ve özellikleri.....	11
4.2.2 Kök hücrenin tarihçesi	12
4.2.3 Kök hücrenin çeşitleri	12
4.2.3.1 Farklılaşma özelliklerine göre kök hücreler	12
4.2.3.2 Elde edildikleri kaynaklara göre kök hücreler	13
4.3 Mezenkimal Kök Hücre.....	14
4.3.1 Dental folikül kaynaklı mezenkimal kök hücreler (DF-MKH).....	15
5 GEREÇ VE YÖNTEM	17

5.1	Çalışmaya Dahil Edilen Bireylerin Temini	17
5.2	Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler.....	18
5.3	Çalışmada Kullanılan Hücre Kültürü Malzemeleri	20
5.4	Kullanılan Cihazlar.....	21
5.5	Kullanılan Solüsyonlar	22
5.5.1	MKH' ların besiyeri ortamının hazırlanması	22
5.5.2	Anti-CD3/Anti-CD28 (CDmix) uyarınının hazırlanması.....	22
5.5.3	IFN- γ uyarınının hazırlanması.....	22
5.5.4	Dexametasone uyarınının hazırlanması.....	22
5.5.5	Derp 1 uyarınının hazırlanması	22
	Kollajenaz solüsyonunun hazırlanması.....	22
5.5.6	Alizarin red solüsyonunun hazırlanması	23
5.5.7	Oil red o solüsyonunun hazırlanması	23
5.5.8	Alcian blue solüsyonunun hazırlanması.....	23
5.6	Çalışmanın Ana Basamakları	24
5.6.1	Diş folikülünün transport solüsyonu ile izolasyon yapılacak laboratuvara getirilmesi	24
5.6.2	Diş folikülü kaynaklı mezenkimal kök hücre izolasyonu	25
5.6.3	İzole edilen hücrelerin pasajlanması	25
5.6.4	İzole edilen kök hücrelerin karakterizasyonu ve farklılaştırılması	26
5.6.4.1	Osteojenik farklılaştırılması.....	26
5.6.4.2	Adipojenik farklılaştırılması	27
5.6.4.3	Kondrojenik farklılaştırılması.....	27
5.6.5	Akım sitometri analizi.....	28
5.6.6	iDF-MKH' ların kültür plaklarına ekilmesi, uyarıların eklenmesi ve görüntüleme	28

5.6.6.1	iDF-MKH'ların 48 kuyucuklu kültür plaklarına ekilmesi	29
5.6.6.2	Kültürdeki iDF-MKH'ların 24. saatte IFN- γ ile uyarılması	29
5.6.7	Sağlıklı ve ev tozuna duyarlı astımlı bireylerden alınan venöz kandan lenfosit izolasyonu yapılması.....	29
5.6.8	Lenfositlerin CFSE ile işaretlenmesi.....	30
5.6.9	Kök hücre ve lenfositlerin ko-kültürünün yapılması.....	31
5.6.9.1	iDF-MKH hücreleri ile lenfositlerin ko-kültürlerinin yapılması	31
5.6.9.2	Hücrelerin 48. saatte IFN- γ ile uyarılması	32
5.6.9.3	Hücrelerin Derp1 ile uyarılması.....	32
5.6.9.4	Hücrelerin Dexametasone ile uyarılması	32
5.6.9.5	Görüntüleme ve Xcellinge cihazı ile hücre proliferasyonu ve ölümü	33
5.6.10	Lenfositlerin proliferasyon analizi	36
5.6.10.1	Lenfositlerin CD3/CD4/CD8 hücre analizi	37
5.6.10.2	Lenfositlerin CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ hücre analizi.....	37
5.6.10.3	Lenfositlerin Annexin V analizi.....	38
5.6.10.4	Hücre kültür süpernatantlarında sitokin tayini.....	39
5.6.10.5	İstatistiksel analiz.....	40
6	BULGULAR.....	41
6.1	Diş Folikülü Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu	41
6.2	Diş Folikülü Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	41
6.2.1	iDF-MKH hücrelerin akım sitometri analizi	41
6.2.2	iDF-MKH hücrelerin kondrojenik, adipojenik ve osteojenik farklılaştırılması. 42	
6.3	Görüntüleme	43
6.3.1	Ko-kültürlerin görüntülenmesi.....	43
6.3.2	Hücre proliferasyonunun XCELLigence RTCA ile belirlenmesi	44
6.4	iDF-MKH' lar Lenfosit Proliferasyonunu İn Vitro Ortamda Baskıladı.....	46

6.5	iDF-MKH Hücresinin CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ Regulator T Hücresinin Analizi.....	52
6.6	iDF-MKH Hücresi Lenfosit Hücresindeki Annexin V canlı hücre Gösteriminin Arttırımı.....	59
6.7	iDF-MKH Hücresinin Lenfosit Hücresinden Salgılanan IL-4 ve IFN- γ Sitokin Miktarını Azaltırken IL-10 Sitokin Miktarını Arttırdı	66
7	TARTIŞMA.....	72
8	KAYNAKLAR	77
9	ÖZGEÇMİŞ	85



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 5.1.Çalışmanın ana basamaklarının şematik gösterimi.....	24
Şekil 5.2. iDF-MKH' ların 48 kuyucuklu plaklara ekilmesinin şematik gösterimi.....	29
Şekil 5.3. 48 kuyucuklu plaklardaki iDF-MKH'ların IFN- γ ile uyarımının şematik gösterimi	29
Şekil 5.4.Hücrelerin 48. Saatte IFN- γ ile uyarılmasının gösterimi.....	32
Şekil 5.5.Hücrelerin Derp 1 ile uyarılmasının gösterimi.....	32
Şekil 5.6.Hücrelerin dexametasone ile uyarılmasının gösterimi.....	33
Şekil 5.7. DF-MKH'ların floradish cam plağa ekimi için hücre konsantrasyonları.....	33
Şekil 5.8. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA).....	35
Şekil 5.9. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi uygulamasının 3 adımda şematik gösterimi (1) hücrelerin ekimi, (2) toksik ajanın eklenmesi, (3) otomatik görüntüleme.....	36
Şekil 6.1.iDF-MKH hücrelerinin morfolojik görünümü.....	41
Şekil 6.2.iDF-MKH hücrelerinin immunofenotipik özelliklerinin akım sitometri sonuçları ..	42
Şekil 6.3. iDF-MKH hücrelerinin kondrojenik farklılaşma özellikleri.....	43
Şekil 6.4. A)Sağlıklı bireylerin lenfosit hücreleriyle iDF-MKH+CDmix hücrelerinin, B) iDF- MKH+CDmix+IFN- γ hücrelerinin karşılaştırmalı mikroskop görüntüsü (1. gün aynı anda alındı görüntüler, büyütme: x20).....	44
Şekil 6.5. A)Derp 1 + astımlı bireylerin lenfosit hücreleriyle iDF-MKH+CDmix hücrelerinin, B)iDF-MKH+CDmix+IFN- γ hücrelerinin karşılaştırmalı mikroskop görüntüsü (1.gün aynı anda alındı görüntüler, büyütme: x20).....	44
Şekil 6.6. Hücre proliferasyonunun Xcelligence RTCA ile belirlenmesinde kullanılan gruplar ve grafikteki renkleri (her grup, ikişerli çalışıldı).....	45
Şekil 6.7. iDF-MKH'ların 16 kuyucuklu e-plate'lere üzerine Derp 1 + astımlı ve saplıklı bireylerin PBMC hücreleri ve uyarılar konduktan sonra 72 saatte ki hücrelerin proliferasyonu grafiği.....	45

Şekil 6.8. iDF-MKH hücrelerinin sağlıklı (kontrol) bireylerin lenfosit hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki immün baskılayıcı etkisi	49
Şekil 6.9. İDF-MKH hücrelerinin ev tozuna duyarlı (Derp1 +) astımlı bireylerin lenfosit hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki immün baskılayıcı etkisi	50
Şekil 6.10. iDF-MKH hücrelerinin ev tozuna duyarlı (Derp 1 +) bireyler ile sağlıklı (kontrol) bireylerin lenfosit hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki immün baskılayıcı etkisinin karşılaştırmalı istatistiksel olarak gösterimi	52
Şekil 6.11. iDF-MKH hücrelerinin; sağlıklı (kontrol) bireylerin CD4 ⁺ FOXP3 ⁺ lenfosit hücreleri üzerine etkisi	55
Şekil 6.12. iDF-MKH hücrelerinin; astımlı ev tozuna duyarlı (Derp 1 +) bireylerin CD4 ⁺ FOXP3 ⁺ lenfosit hücreleri üzerine etkisi	57
Şekil 6.13. iDF-MKH hücrelerinin; sağlıklı (kontrol) bireylerin ve ev tozuna duyarlı (Derp 1 +) astımlı bireylerin CD4 ⁺ FOXP3 ⁺ lenfosit hücreleri üzerine etkisi	59
Şekil 6.14. iDF-MKH hücrelerinin sağlıklı (kontrol) bireylerin lenfosit hücrelerindeki Annexin V canlı hücre oranı üzerindeki arttırıcı etkisi istatistiksel olarak gösterimi.....	62
Şekil 6.15. iDF-MKH hücrelerinin; ev tozuna duyarlı (Derp 1 +) astımlı bireylerin lenfosit hücrelerindeki Annexin V canlı hücre gösterimi üzerine etkisi.....	64
Şekil 6.16. iDF-MKH hücrelerinin; sağlıklı (kontrol) bireylerin ve ev tozuna duyarlı (Derp1 +) lenfosit hücrelerindeki Annexin V canlı hücre gösterimi üzerine etkisi	65
Şekil 6.17. iDF-MKH hücrelerinin; sağlıklı (kontrol) bireylerin ve ev tozuna duyarlı (Derp 1 +) lenfosit hücrelerinden IL-4 sitokin salgılanması üzerine etkisi.....	67
Şekil 6.18. iDF-MKH hücrelerinin; sağlıklı (kontrol) bireylerin ve ev tozuna duyarlı (Derp 1 +) lenfosit hücrelerinden IFN- γ sitokin salgılanması üzerine etkisi	69
Şekil 6.19. iDF-MKH hücrelerinin; sağlıklı (kontrol) bireylerin ve ev tozuna duyarlı (Derp 1 +) lenfosit hücrelerinden ıL-10 sitokin düzeyini diğer gruplara oranla daha fazla ve anlamlı olarak arttırdığı görüldü	71

TABLolar LİSTESİ

Tablo 5.1. Çalışmaya dahil edilen sağlıklı (kontrol) ve Derp 1 + astımlı bireyler	18
Tablo 5.2. Çalışmada kullanılan cihazlar	21
Tablo 5.3. iDF-MKH'ların lenfosit hücreleriyle ko-kültürü görüntüleme gruplarının tabloda gösterimi	34
Tablo 5.4. Xcellinge cihazı hücre proliferasyonu ve ölümü için kullanılan gruplar	36
Tablo 6.1. iDF-MKH hücrelerinin sağlıklı (kontrol) ve ev tozuna duyarlı (Derp 1 +) bireylerin lenfosit hücrelerinin proliferasyonu gösterimi	47
Tablo 6.2. iDF-MKH hücrelerinin; sağlıklı (kontrol) ve ev tozuna duyarlı (Derp 1 +) astımlı bireylerin CD4 ⁺ FOXP3 ⁺ lenfosit hücreleri üzerine etkisi	53
Tablo 6.3. iDF-MKH hücrelerinin; sağlıklı (kontrol) ve ev tozuna duyarlı (Derp 1 +) bireylerin lenfosit hücrelerindeki Annexin V canlı hücre gösterimi üzerine etkisinin istatistiksel verileri	60
Tablo 6.4. idf-MKH hücrelerinin; sağlıklı (kontrol) ve ev tozuna duyarlı (Derp 1 +) bireylerin lenfosit hücrelerinden salgılanan IL-4 miktarının gösterimi	66
Tablo 6.5. iDF-MKH hücrelerinin; sağlıklı (kontrol) ve ev tozuna duyarlı (Derp 1 +) bireylerin lenfosit hücrelerinden salgılanan IFN- γ miktarının gösterimi	68
Tablo 6.6. iDF-MKH hücrelerinin; sağlıklı (kontrol) ve ev tozuna duyarlı (Derp 1 +) bireylerin lenfosit hücrelerinden salgılanan IL-10 miktarının gösterimi	70

KISALTMALAR

AHR	: Hava yolu aşırı duyarlılığı
APC	: Antigen sunucu hücre
AP-MKH	: Apikal papilla kaynaklı mezenkimal kök hücre
CDmix	: anti-CD2, anti-CD28
CFSE	: Karboksi floresan süksinimidil ester
CFU-F	: Hücreleri fibroblast kolonisi yapan ünit
DFSC	: Diş folikülü kaynaklı mezenkimal kök hücre
DMEM	: Dulbescco's modified eagle's medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DPBS	: Dulbecco's phosphate buffered saline
DP-MKH	: Diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücre
EKH	: Embriyonik kök hücre
FBS	: Fötal sığır serumu
FoxP3	: Forkhead box p3
GINA	: Astım için küresel girişim
GMCSF	: Granülosit makrofaj-koloni stimule edici faktör
HKH	: Hematopoetik kök hücre
ICAM	: Hücreler arası adezyon molekülü

IFN	: İnterferon
ISAAC	: The international study of asthma and allergies in childhood
IV	: İntravenöz
iDF-MKH	: İnsan dental folikül kaynaklı mezankimal kök hücre
iSD-MKH	: İnsan süt dişi kaynaklı mezenkimal kök hücre
MCP	: Monosit kemoatraktan protein
MHC	: Majör histokompatibilite kompleks
MKH	: Mezenkimal kök hücre
PBMC	: Periferel kan mononükleer hücre
PL-MKH	: Periodontal ligament kaynaklı mezenkimal kök hücre
PMKH	: Periferel kan mononükleer hücre
SD	: Standart deviasyon
TCR	: T hücre reseptörü
VCAM	: Vasküler hücre adezyon molekülü

Dental Folikül Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Ev Tozu Akarına Duyarlı Astımlı Hastaların Lenfositleri Üzerine İmmunolojik Etkilerinin İnvitro Ortamda Araştırılması

Öğrencinin Adı: Ülku ARIĞ

Danışmanı: Prof. Dr. Tunç AKKOÇ

Anabilim Dalı: Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.B.D. Allerji ve İmmünoloji Bilim Dalı

1 ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, İnsan Dental Folikül Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin (iDF-MKH); astım hastalığında, immünolojik ve hücresel parametreler üzerine immünomodülatör etkisini araştırması planlandı.

Gereç ve Yöntem: Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim başvuran 19-25 yaş bireylerin diş folikülünden mezenkimal kök hücre izolasyonları, karakterizasyonları yapıldı. Sağlıklı ve Derp 1+ astımlı bireylerin venöz kanlarından periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC) izole edildi. Lenfositlerin iDF-MKH' larla birlikte, iDF-MKH'sız kültürde uyarımsız, IFN- γ , Derp 1, dexametasone ve anti-CD3 anti-CD28 (CDmix) uyarımlı koşullarda 72 saat kültürleri yapıldı. Lenfosit proliferasyonu, Annexin V/PI ile apoptoz ve CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regülatör hücre oranlarının analizi ve sitokin miktarlarına bakıldı.

Bulgular ve Sonuçlar: Derp1, IFN- γ ve CDmix ile uyarılmış iDF-MKH'ların lenfosit proliferasyonunu baskıladığı ve CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T lenfositleri iDF-MKH olmayan PBMC kültürlerine göre arttırdı. iDF-MKH' lar CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T hücre proliferasyonunu önemli ölçüde baskıladı (p < 0.05). IFN- γ ile uyarılmış iDF-MKH' lar CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T hücre proliferasyonunu uyarılmamış MKH' lardan daha etkin baskıladı (p<0.01). IFN- γ ile uyarılmış iDF-MKH' lar T düzenleyici hücre oranını uyarılmamış MKH'lere göre arttırdı (p = 0.01). IFN- γ ile uyarılan ve uyarılmayan iDF-MKH' lar lenfosit apoptozunu baskıladı (p<0.05). iDF-MKH'lar lenfosit proliferasyonunu baskıladı ve bu baskılama iDF-MKH'ların IFN- γ ön uyarımı ile arttı. IFN- γ ile uyarılmış iDF-MKH' lar Derp 1 + astım hastaların lenfositlerindeki CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg hücreleri arttırdı. Kültür süpernatantındaki sitokin analizlerinde kök hücrelerin IL-4 sitokin miktarını baskıladığı, iDF-MKH hücrelerinin ise diğer kök hücrelere oranla IL-10 sitokin miktarını arttırdı. Sonuçta bu hücrelerin immün sistemi düzenleyici etkileri olduğu görüldü.

Anahtar Sözcükler: Allerjik Astım, Ev Tozu Akarı, DF-MKH, İmmünomodülasyon.

The Investigation Of Immunological Effects Of Dental Follicle Mesenchymal Stem Cells On House Dust Mites Sensitive Asthma Patients' Lymphocytes In Vitro

Student's Name: Ülkü ARIĞ

Advisor: Prof. Dr. Tunç AKKOÇ

The Department: The Department of Pediatric Allergy – Immunology

2 SUMMARY

Aim: This study aims to investigate the immunomodulatory effects of human dental follicle mesenchymal stem cells (hDF-MSCs) pre-stimulated with/without IFN- γ ; in Der p 1 + asthma patients lymphocytes in vitro.

Method: Dental follicles obtained from University of Marmara Faculty of Dentistry Oral and Maxillofacial Surgery Department were isolated, characterized into osteogenic, chondrogenic lineages. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolated from healthy (hPBMC) and Derp 1 + asthma patients (aPBMC) and hPBMCs, aPBMC were cultured with and without hDF-MSCs and were stimulated with Derp 1, dexametasone and anti-CD3 anti-CD28 (CDmix), pre and post stimulated IFN- γ . Lymphocyte proliferation, Annexin V / PI apoptosis and CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cell ratio and cytokine were analyzed after 72 hours of culture period.

Results and Conclusions: Derp 1, IFN- γ and CDmix stimulated hDF-MSCs suppressed lymphocyte proliferation, and enhanced CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regulatory lymphocyte compared to PBMC cultures without MSCs. HDF-MSCs suppressed CD4⁺ T cell proliferation ($p < 0.05$). IFN- γ -stimulation of hDF-MSCs enhanced T regulatory cell. Both hDF-MSCs suppressed lymphocyte apoptosis ($p < 0.05$). hDF-MSCs + suppressed lymphocyte proliferation increased with pre IFN- γ stimulation of hDF-MSCs. IFN- γ pre-stimulated hDF-MSCs suppressed lymphocyte proliferation, apoptosis and increased CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg cells of Derp 1 + asthma patients' lymphocytes. IFN- γ stimulation of hDF-MSCs has more suppressive effect on CD4⁺ T cell response by enhanced CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg cells. Cytokine analysis shows that stem cells suppress the IL-4 cytokine too. HDF-MSCs suppressed the proliferation of lymphocytes. Thus, one can assume that these cells can modulate immune system cells.

Keywords: Allergic Asthma, House Dust Mites, Dental Follicle, Immunomodulation.

3 GİRİŞ VE AMAÇ

Astım havayolu inflamasyonu ve yeniden düzenlenmesi ile karakterize, geridönüşümlü havayolu obstrüksiyonunun görüldüğü kronik bir havayolu hastalığıdır (Meyer ve ark., 2008). Özellikle son yıllarda çocuk ve genç erişkinlerde görülme sıklığı giderek artmaktadır (Beasley ve ark., 2000). Astımın ağırlığı ve doğal seyri hastadan hastaya bireysel farklılıklar gösterir (İkinciogulları ve ark., 2004). Ülkemizde ki Toraks Derneği Astım Çalışma Grubu tarafından 1996 ve 2000 yıllarında hazırlanan "Ulusal Astım Tanı ve Tedavi Rehberi"ne göre; kronik hava yolu inflamasyonu ile oluşan bronş hiperreaktivitesi ve nöbetler şeklinde öksürük, dispne, hışıltılı/hırıltılı solunum, göğüste sıkışma yakınmalarının bir veya bir kaçı ile seyreden, yaygın, değişken, dünyada her yaşta bireyi etkileyebilen ciddi bir halk sağlığı sorunudur (Toraks Derneği Bronş Astımı Çalışma Grubu, 2000).

Allerjik astımın patojenik özellikleri; hava yolu inflamasyonu ve mast hücrelerin, basofillerin, monositlerin, ve izotip-spesifik IgE üretimi ile birlikte Th2 tip lenfositlerin toplanması ile ilgilidir. Astımın kronik aşamalarında, akciğer dokusu ve hava yollarında morfolojik tahribe yol açan önemli bir morbidite oluşmaktadır (Bonfield ve ark., 2010).

Astım patogenezi akut veya kronik olarak sınıflandırılmaktadır. Akut astım; histamin salınımı, hava yolu reaktivitesi ve bronkospazm ile karakterize edilen erken faz reaksiyonları içermektedir. Kronik astım ise, akut astım bileşenlerini içermekte, buna ek olarak sürekli inflamasyon ve kontrolsüz akciğer yeniden yapılanması ile karakterize edilmektedir (Massaro ve ark., 1995).

Özellikle çocukluk çağında yaşam kalitesini düşürmeye başlayan allerjik astım tedavisine yönelik birçok yaklaşım vardır. Tüm bu yaklaşımlarda amaç immün sistemi etkin Th2 yanıtından uzaklaştırmak ve etken antijene karşı yanıtızsızlık geliştirmektir. Bu amaçla yapılan klinik ve deneysel hayvan çalışmalarında mikobakteriyel ajanların kullanılması, mukozal immünoterapinin etken olan antijene karşı geliştirilmesi gibi ekibimizin de üzerinde çalıştığı yaklaşımlar vardır. Akkoç ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda özellikle antijen spesifik mukozal immünoterapinin hem klinik çalışmalarda hem de geliştirdikleri fare astım modelinde etkili rol oynadığını ve immün sistemi Th2' den uzaklaştırarak immün regülasyonda rol alan regülatör hücreleri aktive ettiğini gösterilmiştir. (Akkoc ve ark., 2008). Allerji, otoimmünite ve inflamator bağirsak hastalıklarında belirli antijenlere karşı inflamatuvar yanıt meydana gelirken, sağlıklı bireylerde aynı antijene karşı immün yanıt oluşmamakta veya çok düşük yanıt meydana gelmektedir. Bu hastalıklarda toleransın ve homestazın bozulmasının sebebi tam olarak bilinmemekle birlikte, epidemiyolojik ve deneysel

çalışmalar genetik faktörlerin, mikrobiyal karşılaşmanın ve immün sistem yanıt şeklinin bu hastalıkların patogeneğinde kuvvetli rol oynadığı gösterilmiştir.

Özellikle batılı ülkelerde allerjik hastalıkların insidansının hızla arttığı klinik verilerle ortaya konmuştur. Allerjik hastalıklarda immün sistem Th2 yönüne doğru kaymakta ve bu hücrelerin salgıladığı IL-4, IL-5 ve IL-13 gibi mediatörlerle sırasıyla, IgE artışı, eosinofil öncü hücre aktivasyonu ve akciğerde mukus salgısının artışıında rol oynamaktadır (Akkoc ve ark., 2008). Astım tedavisi için anti-inflamatuvar terapi ve kısa-sürekli bronkodilatörler olmak üzere iki temel tip medikasyon vardır. Fakat tedaviye karşı oluşan immün yanıt değişiklikleri astımın izlenmesini zor kılmaktadır. Ayrıca günümüz tedavileri, bireylerde inflamasyonu minimize etmesine rağmen astımda oluşan yeniden modellenme işlemini azaltma ya da tersine çevirme kapasitesine sahip değildir. Kronik ve akut astımı bulunan hastalarda meydana gelen patofizyolojik durumların düzelmesi için yeni tedavi opsiyonlarının bulunması gerekmektedir (Akkoc ve ark., 2008).

İmmün sistem; organizmaya çeşitli yollardan girmiş olan yabancı antijenleri tanıyarak bunlara yanıt oluşturur. Hastalığa özellikle enfeksiyon hastalıklarına karşı gösterilen dirence immünite, enfeksiyona yol açan patojenlere karşı verilen tepkiye de immün yanıt adı verilir. İmmün sistem, fonksiyonel olarak doğal ve edinsel immünite diye ikiye ayrılır. Doğal immün sistemi oluşturan başlıca bileşenler; fagositler (nötrofiller, monosit/makrofajlar), NK hücreleri, doğal bağışıklık sitokinleri (TNF, IL-1, IL-12, IFN γ), kompleman sistemi ve diğer plazma proteinleri (akut faz proteinleri)' dir. Ayrıca monosit ve makrofajlar doğal ve edinsel immün sistemler arasında köprü oluştururlar.

Mikroplara karşı savaş bir yandan doğal savunma mekanizmaları ile yürütülürken diğer taraftan yabancı antijenlerle sekonder lenfoid organlarda edinsel immün sisteme tanıtılırlar. Başlıca bileşenleri B ve T lenfositler olan edinsel immün yanıtın en önemli özelliği antijene özgü olması ve hafıza (bellek) hücrelerinin bulunmasıdır.

Humoral ve hücreli olmak üzere iki tip edinsel immün yanıt vardır. Humoral immüniteden sorumlu B lenfositler antikor salgılayarak hücre dışı mikropların yok edilmesine aracılık ederlerken, hücreli immüniteden sorumlu T lenfositler sitokin salgılayarak fagositoza uğramış mikropların yok edilmesinde makrofajlara yardım ederler veya bizzat mikroplar üzerinde sitotoksik etki gösterirler (Abbas ve Lichtman, 2007).

Canlı vücudunda uzun süre bölünebilen, kendini yenileyen ve aynı zamanda vücudun ihtiyacına göre farklılaşarak diğer doku hücrelerine dönüşebilen hücreler "kök hücreler" olarak

bilinmektedir. Farklılaşmamış kök hücrelerin, diğer hücrelerden farklı olarak başlangıçtaki hücrenin karakteristik özelliklerini taşıyan en az bir benzer hücre oluşturabilme yeteneği (selfrenewal); tek bir hücreden birden fazla hücre serisine farklılaşabilme yeteneği (multi-lineage differentiation) ve bir dokunun işlevsel olarak yeniden yapılandırılması özellikleri vardır (Weissman, 2000). Kök hücreler; totipotent, pluripotent ve multipotent olmak üzere 3 grup altında tanımlanmaktadır. Kök hücreler, embriyonik kök hücreler ve yetişkin kök hücreler olarak iki geniş kategoriye ayrılırlar (Weissman, 2000). Embriyonik kök hücreler pluripotent hücrelerdir ve hemen hemen birçok hücre tipine farklılaşabilme yeteneğindedir ve ayrıca farklılaşmadan da sınırsız olarak çoğalabilirler. Embriyonik kök hücrelerin kullanımıyla ilgili etki sorunlar nedeniyle, son olarak yetişkin dokulardan türetilen kök hücreler üzerine odaklanılmıştır. Yetişkin kök hücreler, embriyonik kök hücreler ile kıyaslandığında farklılaşma potansiyellerinin daha sınırlı olduğu düşünülmektedir (Suchánek ve ark., 2010).

Mezankimal kök hücreler (MKH): Kemik iliği kökenli mezankimal hücrelerini kemik iliği aspirasyonu ile elde etmek mümkündür ve kemik iliğindeki toplam çekirdekli hücre sayısının küçük bir kısmını oluştururlar (%0,0001). Kemik iliği haricinde bu hücreler kas, fetal kemik iliği, karaciğer, kan ve kordon kanında da bulunurlar. Standart kültür teknikleri ile in vitro koşullarda çoğaltılabilirler, morfolojik olarak fibroblastları andırırlar. Kemik iliğindeki bu hücre popülasyonunu gösterebilmek için birçok monoklonal antikor oluşturulmuştur. Stro-1, nonhematopoetik progenitor kemik iliği stroma hücrelerini tanımlamakta kullanılır. SB-10, diferansiye olmamış mezankimal hücrelerde bulunan bir antijenle reaksiyona giren antikordur. Hücre osteojenik hücreye diferansiye oldukça kaybolur ve hücre yüzey alkale fosfatı ekspresyona başlar. Spesifik SB-10 antijeni CD166 (aktif lökosit adezyon molekülü, ALCAM) olarak tanımlanmıştır ve hücrenin osteojenik diferansiyasyonunda sorumlu olabilir. SH-2 antikoru da insan mezankimal hücrelerini tanımlamakta kullanılır, TGF- β üzerindeki epitopla (CD105) reaksiyona girer. Bu antikor insan mezankimal hücrelerinin immünomagnetik seleksiyonunda da kullanılmıştır. Ancak, CD105 sıklıkla endotel hücreleri ile birlikte bulunur. SH-3 ve SH-4 antikoru da membrana bağlı ekto-5' nükleotidazlarındaki (CD73) farklı epitopları tanır. SH-2 gibi bunlar da osteosit veya hematopoetik hücrelerle reaksiyona girmezler. Ancak bu belirteçlerin hiçbirisi mezankimal hücreler için spesifik değildir. MKH'ler özellikle hücre bağlanması ve homing özelliklerinden sorumlu olmak üzere integrinlerden yüksek oranda $\alpha 1$, $\alpha 5$, $\beta 1$ ve düşük oranda $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$, αV , $\beta 2$ ve $\beta 4$ ekspresyona ederken, $\alpha 4$, αL , $\beta 2$ ekspresyonu yoktur. İnsan mezankimal hücreleri HLA-ABC ekspresyonu gösterirken, HLA-DR ekspresyonu yoktur, HLA-DR ancak γ -interferon tedavisini takiben upregüle olur. T lenfositlerin allojeneik periferik lenfositler, dentritik hücreler ve fithemaglutinin tarafından proliferasyonu mezankimal

hücrelerince baskılanır. Bu etki, TGF- β 1 ve hepatosit büyüme faktörüne karşı antikorlarca tersine çevrilir. İnsan mezankimal hücreleri farklı immünojenotipik özelliklerine bakılmaksızın, HLA-II ekspresyonunun olmaması ve düşük oranda kostimulatuar moleküllerin olması nedeniyle non-immünojenik veya hipoiimmunojeniktir. MKH' ların IV infüzyonunu takiben, kemik kırığı, miyokard enfarktüsü ve iskemik serebral hasarlı yörelere özel migrasyon kapasiteleri vardır. Serebral iskemik dokudaki kemokin monosit kemoatraktan protein (MCP-1) verilen mezankimal hücrelerin hasar yöresine migrasyonuna sağlar. Normal beyinde bulunmayan MCP1, ratlarda orta serebral arter oklüzyonunu takiben süratle upregüle olur ve mezankimal hücreler için kemotaktiktir. Hücrelerin homing özellikleri uzun süreli kültürü takiben azalır, bu nedenle tedavi amacıyla bu hücrelerin hazırlanışı esnasında dikkat edilmesi gerekli bir konudur. MKH' lar doku mühendisliği açısından kemik, kırıkta, kemik iliği stroması, kas, yağ, tendon rejenerasyonunda ve gen tedavisi, vasküler destek, nöronal çevre temininde önemlidir (de Kok ve ark, 2003; Bianchi G, 2001; Herzog, 2003; Meirelles, 2003). MKH' ların fenotipik özellikleri ile ilgili çalışmalar genellikle primer hücreden ziyade, kültürde çoğaltılmış hücrelerde araştırılmıştır. Kültürde çoğaltılmış hücrelerin özelliklerinin *in vivo* fenotipik özellikleri yansıttığı konusunda şüpheler bulunmaktadır. Çoğaltılmış hücreler ile yapılan analizlerin aksine fetal akciğer ve karaciğer dokularından elde edilen ve çoğaltılmadan yapılan incelemelerde MKH' ların CD4 pozitif olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular da MKH' ların kültür ortamında antijenik özelliklerinin değiştiğini düşündürmektedir (Weissman, 2000; Verfaillie, 2002; Lakshmiathy ve Verfaillie, 2005; Krause, 2002). Kültürde çoğaltılmış mezenkimal kök hücrelerin antijenik özelliklerine bakıldığında kendilerine has bir belirteç taşımadıkları; endotel, epitel ve kas hücrelerine benzer fenotipik özelliklere sahip oldukları görülmektedir. Kültürde çoğaltılmış MKH' lerde CD45, CD34, CD14, CD11, HLA sınıf II, CD α veya CD1 gibi hematopoetik belirteçlerdeki gibi pozitiflik oranının %2' yi geçmemesi gerekmektedir. Mezenkimal kök hücre için tipik olarak kabul edilen belirteçler CD90, CD29, CD44, CD105 (SH2) ve CD73 (SH3/4)' dür. Fibroblast yüzey markeri olan STRO-1 MKH' ler tarafından da eksprese edilmektedir. Ayrıca MKH' ler CD71 (transferin reseptör) ve CD90 (thy-1) taşırlar. Farklı dokulardan elde edilen hücreler genel olarak benzer fenotipik özelliklere sahip olmakla birlikte bazı farklılıklar da göze çarpmaktadır. Örneğin, yağ dokusundan elde edilen MKH' ler yüzeyinde CD49d taşıırken, CD106 taşımamaktadır; kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerde ise aksine CD49d negatif, CD106 pozitifdir. Kemik iliğinde bulunan fibronektin, laminin, kollojen gibi ekstraselüler matriks elemanlarına ve diğer komşu hücrelere sıkı bağlanmakta olan bu hücrelerin yüzeyinde çeşitli adezyon molekülleri bulunmaktadır. Hücreler arası adezyon molekülü-1 [ICAM-1(CD4)], ICAM2 (CD102), CD0, vasküler hücre adezyon molekülü-1 [VCAM-1 (CD10)], L-Selektin (CD2L)

pozitiflikleri değişen oranlarda bildirilmiştir (Pittenger ve ark., 1999). Dişin 5 farklı bölgesinden MKH izole edilebilmektedir. Bunlar sırasıyla diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücreler (DP-MKH) , insan süt dişi kaynaklı mezenkimal kök hücreler (iSD-MKH), periodontal ligament kaynaklı mezenkimal kök hücreler (PL-MKH), dental folikül progenitor kaynaklı mezenkimal kök hücreler (DF-MKH) ve apikal papilla kaynaklı mezenkimal kök hücreler (AP-MKH). DF-MKH yetişkin insan diş pulpasından izole edilir ve bunların odontoblast/osteoblastlara, adipositlere ve nöral hücrelere farklılaşabildiği gösterilmiştir. Bu hücreler CD73, CD90 ve CD105 olan mezenkimal kök hücre belirteçlerini yüzeylerinde eksprese ederler (Morszeck ve ark., 2008; Huang ve ark., 2009; Zhang ve ark., 2012; Ferro ve ark., 2012; Rodriguez-Lozano ve ark., 2011).

Dental folikül gelişmekte olan diş germi çevreleyen mezenkimal dokudur. Diş kök gelişimi süresince sement, periodontal ligament ve alveolar kemiği dental folikül progenitör hücreleri tarafından oluşturulur (Yokoi ve ark., 2007). Dental folikülün, gelişim sürecinde olan yirmi yaş dişinin çekiminden sonra kolaylıkla izole edilebilmesi, kolay ulaşılabilir olmasını sağlar. Dental folikül kaynaklı kök hücreler ilk olarak sığır kaynaklı diş germilerinden Handa ve arkadaşları tarafından izole edilmiştir. Bu hücrelerin farklılaşma yetenekleri, immunsuprese farelerde in vivo olarak incelendiğinde; sığır kaynaklı fibroblastlar veya alveoler osteoblastlarının aksine bu hücrelerin sement benzeri matriks bir yapı oluşturduğu bildirilmiştir (Handa ve ark., 2002). Morszeck ve arkadaşları, insanlarda gömülü 3. molar dişlerden elde ettikleri dental follikül dokusunda progenitör hücreler olduğunu rapor etmişlerdir. Bu fibroblast benzeri, koloni oluşturabilen ve plastik adherent hücrelerin; kök hücre belirteçleri olduğu varsayılan Notch-1 ve Nestin' i eksprese ettiği belirtilmiş, taşıyıcı matriks olarak hidroksiapatit/trikalsiyum fosfat toz ile karıştırılıp immun deprese farelere implante edildiklerinden 8 hafta sonraki incelemelerde, rijid veya fibroz bağ dokusunun olduğu, osteoblastik antijen ekspresyonunun arttığı, fakat sement veya kemik formasyonunun oluşmadığı görülmüştür (Morszeck ve ark., 2002).

Biz bu çalışmamızda, İnsan Dental Folikül Kaynaklı Mezankimal Kök Hücrelerin (iDF-MKH); astım hastalığında, immünolojik ve hücresele parametreler üzerine immünomodülatör etkisini araştırmak amacı ile planlanmıştır. Böylece, iDF-MKH hücrelerinin ko-kültür uygulamalarıyla astım hastalarından alınan venöz kandan PMKH izolasyonu sonucu elde edilen hücrelere uygulanarak astımlı hasta grubu üzerine etkisinin araştırılması planlanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda son yıllarda birçok hastalığın tedavisinde rol alması beklenen kök hücrelerin astım üzerine etkisi araştırılacak ve immünomodülatör etkisi görüldüğü takdirde klinik uygulama için çok önemli bir temel adım atılmış olacaktır, kök hücrelerin immünolojik hastalıkların tedavisinde

yeni opsiyon olup olmayacağı hakkında bize fikir vermiş olacaktır, böylece çalışmamızın çıktıları da literatüre önemli katkılarda bulunacaktır.



4 GENEL BİLGİLER

4.1 Astım

4.1.1 Astımın tanımı ve tarihçesi

Astım, solunum yolu inflamasyonu içeren kronik obstrüktif hava yolu hastalığıdır. Astım İçin Küresel Girişim (GINA) tanımına göre: "Astım, bir çok hücrenin veya hücresel elemanın rol oynadığı hava yollarının kronik inflamatuvar hastalığıdır; kronik inflamasyon hırıltı, nefes darlığı, göğüste sıkışma hissi ve özellikle gece veya sabah gözlenen öksürük ataklarına yol açan hava yolu aşırı duyarlılığı (AHR) ile ilişkilidir; bu nöbetler genelde yaygındır, ancak kendiliğinden ya da tedavi ile genellikle geri dönüşümlüdür" (Agostinis ve ark., 2008). Astım, Yunanca "soluksuzluk" veya "ağzı açık solumak" sözlük anlamlarını taşır. Hipokrat astımda hava giriş ve çıkışını engelleyen çeşitli maddelerden söz etmiştir. Hipokrat'ın arteritli hastalarda nefes darlığı olduğunu belirttiğine dair bilgiler olmakla birlikte ilk ayrıntılı bilgiler Galen ve Aretaeus tarafından ortaya konmuştur. Astım kelimesi ingilizcede ilk defa 1542 yılında, Yunanca "üfleme, zorlu üfleme" köklerinden türetilerek kullanılmıştır (Sears ve ark., 2003).

4.1.2 Astımın epidemiyolojisi

Astım çocukluk çağının en sık görülen sağlık sorunlarından biridir. Astım prevalansı sanayileşmiş ülkelerde daha yüksektir. 1980-1990 yılları arasında dünyada hemen her ülkede astım prevalansında ve mortalitesinde belirgin artışlar olduğu tespit edilmiştir. Astım, Amerika Birleşik Devletleri gibi gelişmiş ülkelerde yaygın olmakla birlikte tüm dünya ülkelerinin sorunudur. Çocuklarda prevalans çalışmaları, 3-16 yaş grubunda prevalansın ülkelere göre % 0.6-49 arasında değiştiğini göstermiştir. ISAAC (The International Study of Asthma and Allergies in Childhood) sonuçlarına göre astımda en yüksek prevalansının İngiltere, Avustralya, Yeni Zelanda ve İrlanda Cumhuriyetine ait olduğu bunu Kuzey, Güney ve Orta Amerikanın izlediği görülmüştür. Avustralya ve Yeni Zelanda'da sıklık %15-20 olarak bulunmuştur. Avrupa ülkelerindeki prevalans %5-10 arasında değişmektedir. En düşük prevalanslar ise Endonezya, Yunanistan, Çin, Tayvan, Özbekistan, Hindistan ve Etiyopya'da bulunmuştur. Asya ülkeleri, Kuzey Amerika, Kızılderililer ve Eskimolarda prevalans %1' den az olarak bildirilmiştir (Fallier, 2004). Ülkemizde astım prevalansı %2.8-%14.5 arasında değişmektedir (Saraclar ve ark., 2003).

4.1.3 Alerjik astımın immünopatogenezi

Allerjik astım bireyin çevresel ve hava yolu alerjenlerine karşı allerjik reaksiyon verdiği kronik bir akciğer hastalığıdır. Astım Th2 hücrelerinde salınan IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 ve granülosit makrofaj-koloni stimule edici faktör (GMCSF) tarafından kontrol edilir. Ayrıca immün sistemde görevli olan hücrelerden mast hücreleri ve eozinofiller astım cevabında görevli hücrelerdendir (Van Rijt ve Lambrect, 2005).

4.1.3.1 Th1/Th2 Dengesi

T hücrelerini sitokin profillerine göre Th1 ve Th2 olarak ayırımı 1986'da Mosmann ve Coffman tarafından yapılmıştır. IFN- γ , TGF- β ve IL-2 üreten T hücrelerini Th1; IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 üreten T hücrelerini Th2 olarak tanımlayıp bu hücrelerin birbiri üzerinde karşılıklı olarak düzenleyici etkisi olduğunu belirtmişlerdir (Mosmann ve Coffman, 1989). Astımı olan hastaların biyopsi ve BAL sıvılarında yapılan incelemede IL-4 ve IL-5 miktarlarında artış gözlenmiş olup; T hücreleri, eozinofiller ve mast hücrelerinde herhangi bir değişim olmamıştır. Bu durum gösteriyor ki astım hastalığı Th2 baskın bir immün cevap ile karakterizedir. Allerjik olmayan bireylerde Th1 tip sitokin profili baskın olduğu (Wierenga ve ark., 1991), ayrıca allerjen immünoterapisi alan allerjik bireylerde sitokin profilinin Th2'den Th1'e kaydığı görülmüştür (Secrist ve ark., 1993). Allerjen ile artan havayolu aşırı duyarlılığının oluşmasında Th2 hücrelerinin ve sitokinlerinin önemi yapılan pek çok çalışmada gösterilmiştir (Raz ve ark., 1996). Yapılan bu araştırmalarda Th2 hücre klonunun pasif transferinin havayolu aşırı duyarlılığını arttırdığı görülmüştür. Th1 hücreleri, Th2 hücre gelişimini inhibe edebilir ancak Th2 efektör hücrelerinin fonksiyonunu inhibe edemez. Aynı şekilde Th2 hücreleri de, Th1 hücrelerinin gelişimini inhibe edebilmektedir (Umetsu ve ark., 2003).

İmmün cevapta Th1/Th2 dengesini etkileyen faktörler sırasında; antijen tipi, antijenin dozu, duyarlılaştırma yolu, antijen sunan hücrenin fonksiyonu, farklı tip kostimülatör moleküllerin seçici aktivasyonu, lokal olarak üretilen sitokin mikroçevresi, bireyin genetik yapısı ve enfeksiyonlar sayılabilir (Tournoy ve ark., 2002).

4.1.4 Regülatör hücreler

İmmünolojik tolerans olarak adlandırılan öz antijenlere yönelik yanıtızlık hali, lenfosit reseptörlerinin ekspresyon düzenekleri sadece öz olmayan antijenlere yönelik reseptörler oluşturmaya yatkınlık göstermemesine karşılık muhafaza edilmektedir (Weigner, 2001). Tolerans,

immün sistemin kendi antijenine karşı yanıt eksikliğidir. Daha uygun bir şekilde tanımlayacak olursak; potansiyel olarak hasara yol açan immün yanıtın önlendiği, baskılandığı veya hasarın olmadığı yöne kaymanın sağlandığı bir mekanizmadır. Çeşitli çevresel ve patojenik olmayan antijenlere maruz kalan solunum yolları ve intestinal mukozaya giren antijenlere karşı oluşan immün yanıtta periferal tolerans büyük önem taşır. Bu antijenler de aktif immün sistemden daha çok yanıtızlık ve tolerans durumunu artırıcı etki göstermektedir (Abbas ve Lichtman, 2007). Timusta öz antijeni tanıyan bazı olgunlaşmamış T hücreleri düzenleyici (regülatör) hücre niteliği kazanarak periferik dokulara girerler. Öz antijenlere bağlanan olgunlaşmamış T hücresinin negatif seçim ile silinmesini veya regülatör T hücre olmasını neyin belirlediği henüz bilinmemektedir (Levings ve ark., 2002).

4.1.4.1 Astımda CD4⁺CD25⁺regülatör T hücreler (Treg)

Sakaguchi ve arkadaşları tarafından CD4⁺ T hücrelerinin küçük bir kısmını (yaklaşık %5-10) oluşturan, organ-spesifik otoimmünitede, allograft rejeksiyonun önlenmesinde ve self-toleransın sağlanmasında önemli rol oynayan hücreler olarak tarif edilmiştir (Roncarolo ve Levings, 2000).

Treg hücre popülasyonunda fonksiyon azalması ya da değişmesi, astımlı hastalarda gözlenen allerjenlere karşı uygunsuz immün yanıt için olası bir açıklama sağlamaktadır. Doğal olarak oluşan FoxP3⁺ (forkhead box P3) CD4⁺CD25⁺ hücreleri ve uyarılmış Treg hücreleri içeren çeşitli Treg alt grupları tanımlanmıştır (Lloyd ve Hawrylowicz, 2009).

Timusta üretilip, IL-2 reseptör zincirini (CD25) eksprese eden; CD4⁺ CD25⁺ T hücreleri IL-12 üretimini inhibe ederek, CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinin THR (T hücre reseptörü) uyarımlarında çoğalmasını baskılamaktadır (McHugh ve Shevach, 2002). CD25⁺ düzenleyici T hücreleri için spesifik olan transkripsiyon faktörü FoxP3 ve TNF reseptörü tanımlanmıştır. CD25⁺ hücrelerin azalması otoimmün hastalıkların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Itoh ve ark., 1999). CD4⁺CD25⁺ T hücrelerinin insanlarda da periferal kandan izole edilebileceği ve in-vitro olarak fonksiyonları kaybolmadan çalışabileceği gösterilmiştir (Levings ve ark., 2001). CD25⁺ hücreleri CTLA-4 sinyaline bağlı olarak, direkt olarak hücre-hücre ilişkisi ile ve sitokin bağımsız bir yol ile immün yanıtları baskılayabilmektedir (Zhang ve ark., 2001). Normal immün yanıtların oluşmasında ve spesifik immünoterapide mukozal allerjenlere karşı düzenleyici T hücre cevabında IL-10 ve TGF- β etki etmektedir. Allerjik olan bireylerde spesifik immünoterapinin CD4⁺ CD25⁺ T hücrelerinde antijen spesifik aktiviteyi arttırdığı gösterilmiştir (Thomton ve Shevach, 1998). Ancak bu fonksiyonu gerçekleştirirken diğer hücreleri (CD4⁺ CD25⁻) anerjik hale getirmeyip bu hücrelerin yüksek seviyede IL-10 salan hücreler haline dönüşmesine neden olmaktadır. IL-10

üreten anerjik T hücreleridaha sonra IL-10 bağımlı yol ile T hücre çoğalmasını baskılamaktadır (Diecmann ve ark., 2002). CD4⁺CD25⁻ hücre popülasyonunun IL-2 üretiminin artışını inhibe etmektedir. TGF- β , CD4⁺ CD25⁻ T hücrelerinin süpresor fonksiyonlarındaki rolleri hala tam olarak anlaşılammıştır (Umetsu ve ark., 2003).

4.2 Kök Hücre

4.2.1 Kök hücrenin tanımı ve özellikleri

Farklı hücre tiplerine dönüşebilme (in vivo ve in vitro ortamda) ve kendisini yenileyebilme özelliğine sahip olan hücelere kök hücreler adı verilir. Telomeraz ifadelerinin yüksek olmasından dolayı kendilerini yenileyebilme özelliklerini yaşam boyu sürdürebildikleri için in vitro koşullarda bol miktarda üretilebilirler (Herzog ve ark., 2003; Bouaziz ve ark., 2008).

Bir hücreyi kök hücre olarak tanımlayabilmek için 5 adet ölçüt vardır (Ural, 2006; Van Stekelenburg-Harmers ve ark., 1995; Verfaillie, 2002). Bunlar;

1- Kök hücreler, uzun süre bölünebilme ve kendi kendini yenileme yeteneğine sahiptirler. Hücrelerin uzun süre bölünebilmelerini belirleyen faktörlerden birisi, kromozomların ucunda bulunan telomer adı verilen ve binlerce kez tekrarlanan kısa DNA tekrar dizileridir (TTAGGG). Telomerler kromozom uçlarının parçalanmasını, diğer kromozomlarla kaynaşmasını engelleyerek kromozomların yapısal bütünlüğünün korunmasını sağlar.

2- Kök hücreler özelleşmemişlerdir. Özelleşmiş hücelere dönüşmek üzere kaynak oluşturabilir.

3- Kök hücreler, özelleşmemiş hücelere kaynaklık edebilirler ve birden fazla hücre tipine farklılaşabilirler. Bunun en iyi örneğini döllenmiş yumurta hücresinde görebiliriz.

4- Kök hücreler, hasar gören alıcıya nakil sonrasında kaynak dokuyu işlevsel olarak tekrar çoğaltabilirler. Buna en iyi örnek, olarak hematopoetik kök hücrelerde, karaciğer öncüllerinde ve sinir kök hücrelerinde gösterilmiştir.

5- Kök hücreler, *in vivo* şartlarda doku hasarının olmadığı durumlarda bile farklılaşmamış kuşaklara katkı sağlayabilirler. Buna en iyi örnek, embriyonik veya erişkin kök hücrelerinin (nöral, mezankimal) blastosiste enjekte edildiklerinde farklı hücre tiplerine kaynaklık edebilmeleridir (Ural, 2006; Van Stekelenburg-Harmers ve ark., 1995; Verfaillie, 2002).

4.2.2 Kök hücrenin tarihçesi

İlk girişimleri 1878 yılında memeli yumurtalarını vücut dışında dölemek için yapılmış olmasına rağmen, insan kök hücre alanında araştırma 1960'larda Kanadalı bilim adamları Ernest A., McCulloch ve James E. Till'in bulgularıyla ortaya çıkmıştır (Becker, McCulloch ve Till, 1963). Daha sonra bu alanda yapılan çalışmalar, elde edilen olumlu sonuçlar neticesinde günümüze kadar gelişerek devam etmiştir (Térèse, 2002).

1967 yılında tanımlanan embriyonal karsinoma hücrelerinin kültür ortamında çoğaltılması kök hücre çalışmalarında ileri doğru atılmış önemli bir adım olmuştur. O tarihten itibaren günümüze kadar insan ve fare teratokarsinomlarından çok sayıda hücre serisi tanımlanmıştır (Şahin ve ark., 2005).

Edwards ve Bavister 1968'de ilk insan ovumunu *in vitro* olarak fertilize etmişlerdir. Kültüre edilen embriyonal karsinom hücreleri 1970'lerde farelerde embriyonik gelişim modeli olarak incelenmiştir. 1995-96 yıllarında insan olmayan primat embriyonik kök hücreler (EKH) Rhesus maymunlarının iç hücre kitlesinden *in vitro* olarak elde edilmiştir. Bu hücreler pluripotent özelliktedir ve üç ana germ tabakasına normal olarak farklılaşmıştır (Avasthi ve ark., 2008).

İnsan blastosist iç hücre kitlesinden elde edilen insan embriyonik kök hücreler (i-EKH) 1998 yılında birçok pasaj için kültür ve muhafaza edilmiştir. 2000 yılında, bilim adamları blastosist iç hücre kitlesinden i-EKH'leri elde etmişlerdir.

i-EKH'lerin türetildiği ilk rapordan bu yana, spontan ve uyarılmış *in vitro* farklılaşma sistemlerinin kullanılması ile, bu hücrelerin kalp, nöron, hematopoetik öncüler, keratinositler, endotel hücreleri gibi doku tiplerine dönüşümü gösterilmiştir (Thomson ve ark., 1998).

4.2.3 Kök hücrenin çeşitleri

Kök hücreler farklılaşma özelliklerine ve elde edildikleri kaynaklara göre iki başlıkta incelenir.

4.2.3.1 Farklılaşma özelliklerine göre kök hücreler

Kök hücreler farklılaşabilme yetilerine göre birbirlerinden ayrılırlar. Farklılaşma özelliklerine göre üç tip kök hücreden söz edilir: Totipotent kök hücre, pluripotent kök hücre ve multipotent kök hücre.

Vücuttaki tüm hücelere dönüşebilme yeteneğine sahip olan ilk hücreye (örn: zigot) **totipotent hücre** denir ve bu hücre yetişkin bir organizmanın meydana gelmesi için gereksinim duyulan bütün genleri taşır. Bundan sonra embriyo 16 blastomerli evrede blastokist adı verilen içi boşluklu hücre topluluklarına (blastula evresi) dönüşür. Blastokisti oluşturan hücre kitlesi içindeki bir grup hücre (embriyoblast) son derece önemli bir role sahip olup, 3 temel embriyonik tabaka olan; endoderm, ektoderm ve mezodermi oluştururlar. Bu hücelere **pluripotent hücreler** (embriyonik kök hücreler) denir. Bunlar bir canlıyı meydana getirmezler yani totipotent değildirler (Verfaillie ve ark., 2002). Kök hücreler, gelişimin ilerleyen dönemlerinde (fetusta, kordon kanında, kemik iliğinde ve yetişkin vücudunda) daha özel görevlere sahip olmaya başlarlar ve giderek daha sınırlı bir bölünme ve farklılaşma yeteneği taşıyan erişkin tip kök hücelere dönüşürler. Biraz daha özelleşmiş bu hücelere **multipotent hücreler** denir (örneğin; mezenkimal kök hücreler bu tür hücrelerdendir) (<https://www.nih.gov/> Erişim Tarihi: 18 Haziran 2016).

4.2.3.2 Elde edildikleri kaynaklara göre kök hücreler

Kök hücreler elde edildikleri kaynağa göre değerlendirildiğinde; embriyonik, fetus, kordon kanı ve erişkin dokularından elde edilen kök hücreler olmak üzere sınıflandırılmaktadır (Mimeault ve Batra, 2006).

Embriyonik kök hücreler: Blastositin iç hücre kitlesinden elde edilen, çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilen ve yüksek telomeraz ifadeleri nedeniyle sonsuz DNA sentez yeteneği olan hücrelerdir (Trounson, 2006).

Fetus kök hücreleri: Klinik kullanıma henüz girmese de araştırmalarda önemli bir kök hücre kaynağı olarak gösterilmiştir. Pluripotent olan bu hücreler; kendilerini yenileme ve sınırsız sayıda bölünme özelliğine sahiptirler (Counter ve ark., 1994).

Kordon kanı kök hücreleri: Kordon kanı; kanda bulunan tüm hücresel elemanları ve kemik iliği kök hücrelerini % 0.2-2 oranında içeren, plasentadan fetüse besin maddelerini taşıyan rezidüel bir kandır. Kordon kanı kök hücreleri doğum henüz tamamlanmadan ya da doğum bitince plasentanın ayrılmasından hemen sonra göbek kordonu toplardamarından elde edilirler (Ogur ve Sezer, 2008).

Yetişkin kök hücreleri: Uzun süre kendini yenileyebilme kapasitesine sahip olup, yetişkin dokulardaki öncü hücelere farklılaşma özelliği gösteren hücrelerdir. Öncü hücreler kısmen farklılaşmış hücreler olup, belirli hücre soylarına farklılaşabilirler. Ancak bu hücreler, kendilerini yenileme kapasitesine sahip değildirler. Yetişkin kök hücreler plasenta, göbek kordon kanı ve kemik iliğinin yanı sıra yetişkin kişilerin birçok dokularından da elde edilebilir. Kök hücre elde

edilen dokulardan bazıları; kalp, böbrek, beyin, deri, göz, gastro-intestinal sistem, karaciğer, pankreas, akciğer, meme, ovaryum, prostat ve testis gibi organlar olarak bildirilmiştir (Blau ve ark., 2001). Her geçen gün konu ile ilgili bilgi birikimimize daha yenileri eklenmektedir.

4.3 Mezenkimal Kök Hücre

Kemik iliğinde hematopoetik olmayan kök hücrelerin varlığı Alman patolog Cohnheim tarafından bulunmuş olmakla birlikte MKH' lar ilk olarak 1970' lerde Friedenstein ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Friedenstein, kemik iliği aspiratının fetal buzağı serumu içeren ortama yayılması sonucunda adezyon yeteneği olan, kemik, kırık ve yağ hücrelerine farklılaşabilen, morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen kolonilerin varlığını bildirmiş ve bu hücreleri fibroblast kolonisi yapan ünit (CFU-F) olarak tanımlamıştır (Friedenstein ve ark., 1976).

MKH' lar, fibroblast, adiposit, kondrosit, osteoblast, düz kas hücreleri ve muhtemelen iskelet kası uydu hücreleri gibi yeni somatik bağ dokusu hücrelerini oluşturur. MKH' lar konumlarına bağlı olarak birçok belirteç ile karakterize edilir. Bunlar arasında, kemik iliği MKH' larında CD146 varlığında ya da yokluğunda CD271 ve periton yağ MKH' larında CD29 ve CD105 belirteçleri tanımlanmıştır (Zapata, 2012).

Yapılan çalışmalarda ilk mezenkimal kök hücre kaynağı kemik iliğidir (Kern ve ark., 2006). Sonraki çalışmalarda kemik iliği dışında birçok dokudan mezenkimal kök hücre izolasyonları yapılmıştır. Bunlar sırasıyla diş pulpasından, kemikten, kas dokusundan ve maksillofasial dokulardan, karaciğerden, kordon kanından, kordon stromasından, plasentadan, amniyon sıvısından ve periferik kandan da mezenkimal kök hücre izolasyonları yapılmıştır. Yapılan çalışmalar ile kordon kanı mezenkimal kök hücrelerinin kemik iliği mezenkimal kök hücrelerine göre biyolojik olarak daha kararlı hücreler oldukları gösterilmiştir (Lu ve ark., 2006).

ISCT tarafından MKH' lar için 3 tanımlayıcı özellik bildirilmiştir:

1. Standart kültür ortamında plastik yüzeye yapışabilmeleri
2. CD105 (SH2), CD73 (SH3/SH4), CD90 gibi hücre yüzey belirteçlerini ifade etmeleri ancak CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79, CD19, HLA-DR gibi hematopoetik belirteçleri bulundurmamaları
3. İn vitro koşullarda kemik, yağ ve kırık hücrelerine farklılaşabilmeleri (Keating, 2006).

Farklılaşabilme yetenekleri ise;

Osteojenik; Von Kossa, Alizarin Red, Alkalen Fosfataz (+)

Adipojenik; Oil red (+)

Kondrojenik; Alcian blue (+) boya ile gösterilebilir (Dominici ve ark., 2006).

4.3.1 Dental folikül kaynaklı mezenkimal kök hücreler (DF-MKH)

Diş folikülü gelişen diş germini saran mezenkimal dokudur. Dişin kök gelişimi süresince dental folikül kök hücreleri tarafından, sement, periodontal ligament, alveolar kemiği hücreleri oluşturulur. Gömük yirmi yaş dişlerinin çekimi sırasında alınabilen diş foliküllerinin kolaylıkla izole edilmesi bu hücrelerin kolay ulaşılabilir bir kaynak olmasını sağlar (Yokoi ve ark., 2007).

İlk olarak Handa ve arkadaşları tarafından sığır diş germelerinden diş folikülü kaynaklı kök hücreler izole edilmiştir. Yapılan bir çalışmada bu hücrelerin farklılaşma yetenekleri, immün sistemi baskılanmış farelerde in vivo olarak incelenmiş ve bu hücrelerin sement benzeri matriks yapı oluşturduğu gözlenmiştir (Handa ve ark., 2002). Yokoi ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise diş folikülü kaynaklı kök hücrelerini in vivo olarak implante ettikten sonra bu hücrelerin periodontal ligament oluşturabildiğini gözlemlemişlerdir (Yokoi ve ark., 2007).

Morsczeck ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada diş folikülü kaynaklı kök hücrelerin, fibroblastlara benzediğini, koloni oluşturabildiğini, plastik yüzeylere yapışabildiklerini ve kök hücre yüzey belirteçleri olan Notch-1 ve Nestin' i yüzeylerinde eksprese ettiklerini göstermişlerdir. Aynı zamanda bu hücreleri hidroksiapatit/trikalsiyum fosfat toz ile karıştırıp immün deprese farelere verildikten 8 hafta sonra incelendiğinde, rijid veya fibroz bağ dokusunun oluştuğunu, osteoblastik antijen ekspresyonunun arttığını, fakat sement veya kemik formasyonunun oluşmadığını göstermişlerdir (Morsczeck ve ark., 2010).

Mori ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, diş folikülü kök hücreleri yüzeylerinde kök hücre yüzey belirteçleri olan CD73, CD90, CD146, CD44, CD105 ve HLA I eksprese ederler. CD45 ise eksprese etmezler. Ayrıca osteojenik farklılaştırılan hücrelerin real time PCR analizlerinde RUNX2 ve Col I eksprese ettiklerini ve 10-17 gün sonra bunun arttığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca bu çalışmada diş folikülü kök hücrelerinin kemik iliği kök hücrelerine göre yüksek proliferasyon oranlarına sahip olduklarını göstermişlerdir. Bu hücrelerin kolay ulaşılabilir bir kaynak olmaları, yüksek proliferasyon oranları, mezenkimal belirteçleri eksprese

etmeleri, birçok soya farklılaşabilmeleri, canlılıklarının yüksek olması ve güvenilir şekilde dondurulmalarından dolayı doku mühendisliğinde kullanılabilecekleri önerilmiştir (Mori ve ark., 2012).



5 GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Klinik Araştırma Etik Kurulu' nun 07.102014 tarih ve 09.2014.0226/ 70737436-050.06.04- sayılı raporu ile onaylandı. Kök hücre izolasyonu öncesinde diş foliküllerinin temini Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Çene Cerrahisi Bölümü' n de gerçekleştirildi, kök hücre izolasyonu ve çalışmanın diğer tüm aşamaları Marmara Üniversitesi Çocuk İmmünoloji Laboratuvarı ve Medipol Üniversitesi Esra Çağavi Laboratuvarı' nda gerçekleştirildi.

Biz çalışmamızda, dental folikül kökenli mezankimal kök hücrelerin; ev tozuna duyarlı astım hastalığında, immünolojik ve hücresel parametreler üzerine immünomodülatör etkisini araştırmayı amaçladık.

Bu araştırmada, diş folikülünden MKH' ların izolasyonu, karakterizasyonu ve farklılaştırma çalışmaları, izole edilen kök hücrelerin venöz kandan izole edilen lenfosit hücreleri ile ko kültür çalışmaları ve kültür sonucunda immünolojik çalışmalar gerçekleştirildi.

Tüm hücre kültürü çalışmalarında, test edilmiş steril ve tek kullanımlık hücre kültürü malzemeleri kullanıldı ve bu işlemler laminar akışlı steril kabinde steril koşullarda gerçekleştirildi.

5.1 Çalışmaya Dahil Edilen Bireylerin Temini

Bu tez çalışmasında, çalışmaya dahil edilen tüm bireylere ya da velilerine, hazırlanmış olan "Gönüllü Bilgilendirme Formu" okutuldu ve "Gönüllü Onam Formu" imzalatıldı. Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş Çene Cerrahi Anabilim Dalı polikliniklerinde basınç ağrısı, dişin pozisyonunun bozuk olması veya ortodontik sebepler ile diş çekim endikasyonu uygun görülen sağlam tam gömük yirmi yaş dişi çekimi sırasında dişi saran folikül dokusu yaşları 19-25 yaş arasındaki 6 bireyden alındı. Tam gömük yirmi yaş dişinin çekilmesi ve folikülün alınması etik ve asepsi kurallarına uygun şekilde gerçekleştirildi. Marmara Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.B.D. Çocuk Allerji ve İmmunoloji Polikliniğine başvuran astım tanısı almış ev tozu duyarlı 5-15 yaş 7 arasındaki bireyler ile Marmara Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.B.D. Sağlam Çocuk Polikliniğine başvuran 5-15 yaş arasındaki 7 bireyden venöz kan alındı. Çalışmadan çıkarılma kriteri aşağıdaki gibidir.

- 1) 1 yaş altındaki ve 15 yaş üstündeki hastalar.
- 2) Ağır astımlı, sistemik steroid alan hastalar.

- 3) Kronik hastalığının olması: Kistik fibrozis, diabet, immün yetersizlik, otoimmün hastalıklarının olması.
- 4) Takibe uyumsuz hastalar.

	Yaşı	Allerjen	Total IgE IU/ml	Cinsiyet
Kontrol 1	14	-	-	K
Kontrol 2	13	-	-	K
Kontrol 3	13	-	-	K
Kontrol 4	12	-	-	K
Kontrol 5	11	-	-	K
Kontrol 6	15	-	-	K
Kontrol 7	14	-	-	E
Derp 1 + Astım 1	14	Ev tozu akarı	339	K
Derp 1 + Astım 2	15	Ev tozu akarı	57	K
Derp 1 + Astım 3	13	Ev tozu akarı	593	K
Derp 1 + Astım 4	8	Ev tozu akarı	55	K
Derp 1 + Astım 5	12	Ev tozu akarı	214	K
Derp 1 + Astım 6	9	Ev tozu akarı	36	E
Derp 1 + Astım 7	8	Ev tozu akarı	120	E

Tablo 5-1 Çalışmaya dahil edilen sağlıklı (kontrol) ve Derp 1 + astımlı bireyler

5.2 Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler

- DPBS(Ca⁺⁺ Mg⁺⁺-free (Gibco, Grand Island, USA; 1419094)
- Penicillin/streptomycin (Gibco, Grand Island, USA; 15140122)
- DMEM(Gibco, Grand Island, USA;31885023)
- RPMI (Gibco, Grand Island, USA; 21875034)
- Fötal sığır serumu (FBS; Gibco, Grand Island, USA; 10500064)
- Tip I kollajenaz (Gibco, Grand Island, USA;17100017)
- %0,25 tripsin-EDTA solusyonu (Gibco, Grand Island, USA; 25200056)
- % 0,5 tripan mavisi solusyonu (Gibco, Grand Island, USA; 15250061)
- DMSO (WAK-Chemie Medical GmbH, Germany; USP090522A)
- CFSE Cell Proliferation Kit - For Flow Cytometry (İnvitrogen, Grand Island, USA; C34554)
- Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio- Sciences AB, Upsala; 17144003)
- Anti CD3 (LiseSpan Biosciences, USA; 50867)
- Anti CD28 (Millipore, California; LV1700707)

- IFN- γ (Millipore, California; 2309018)
- CD45 FITC/CD34 PE (BD Biosciences,United States; 344563)
- CD90 PE (BD Biosciences,United States; 562385)
- CD146FITC (BD Biosciences,United States; 560846)
- CD73 PE (BD Biosciences,United States; 550257)
- CD29 APC (BD Biosciences,United States; 559883)
- CD105 PE (BD Biosciences,United States; 560839)
- CD28PE (BD Biosciences,United States; 562323)
- CD14 PE (BD Biosciences,United States; 342408)
- Mouse IgG1 κ İzotip Kontrol (BD Biosciences,United States; 555749)
- Hücre yıkama solüsyonu (Cell Wash, BD Biosciences,United States; 349524)
- Osteojenik Situmulatory Kit (Human, Stemcell Technologies, North America; 05404)
 - MesenCult MSC Basal Medium (Human; 05401)
 - Osteogenic Stimulatory Supplements (Human; 05405)
 - β -Glycerophosphate (1M) (05406)
 - Dexamethasone (05407)
 - Ascorbic Acid (07157)
- Adipogenesis Differentiation Kit (Gibco, Grand Island, USA;A1007001)
 - Adipocyte Differentiation Basal Medium (A1041001)
 - Adipogenesis Supplement (A1006501)
- Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco, Grand Island, USA; A1007101)
 - Osteocyte/Chondrocyte Differentiation Basal Medium (A1006901)
 - Chondrogenesis Supplement (A1006401)
- Oil red O (Sigma-Aldrich, USA; O0625-100G)
- Alizarin Red (Sigma-Aldrich, USA; A5533-25G)
- Alcian Blue (Sigma-Aldrich, USA; A5268-10G)
- 10x Phosphate Buffered Saline (PBS) (BİO-RAD; 1610780)
- BD cytometric bead array (CBA) human Th1/Th2/Th17 Kit (BD Biosciences,United States; 560484)
- TriTEST CD4 FITC/CD8 PE/CD3 PerCP (BD Biosciences,United States; 342474)
- APC mouse anti-human CD25 (BD Biosciences,United States; 555434)
- FITC mouse anti-human CD4 (BD Biosciences,United States; 555346)
- Biotin mouse IgG1 κ isotype Control (BD Biosciences,United States; 555747)

- Annexin V: FITC Apoptosis Detection Kit (eBioscience Inc., San Diego, CA; BMS500FI/100)

5.3 Çalışmada Kullanılan Hücre Kültürü Malzemeleri

- Diş kırma seti
- Steril pensler ve bistüri uçları
- 0,22 µm filtre (Sartorius, Goettingen, Germany; 16534)
- Heparinli Tüp (Yeşil kapaklı) (Hongyu Medical, China; 131211)
- 15 ml konik kapaklı tüp (BD Biosciences Discovery Labware, CT, USA;352096)
- 50 ml konik kapaklı tüp (BD Biosciences Discovery Labware, CT, USA; 352098)
- 25cm²' lik hücre kültür flaskları (BD Biosciences Labware, Le Pont DeClaix, France; 353108)
- 75cm²' lik hücre kültür flaskları (BD Biosciences Labware, Le Pont DeClaix, France; 353110)
- 6 kuyucuklu plaklar (BD Biosciences Discovery Labware, USA;353046)
- 48 kuyucuklu plaklar (Nest Biotech, China, 20140010415A)
- 5 ml Polystyrene tube (BD Biosciences, United States; 352052)
- Tip I kollajen kaplı lameller (BD Biosciences Discovery Labware, USA; 354089)
- 3 ml' lik pastör pipeti (Citotest Labware Manufacturing, London; 31027003US)
- 3' er ml' lik vial (Kriyotüp) (Granier Bio-One GmbH; E090901J)
- Şarjlı pipet pompası (IsoLab, Germany)
- 2 µl- 20 µl' lik otomatik pipet (Axygen Scientific, USA)
- 20 µl-200 µl' lik otomatik pipet (Axygen Scientific, USA)
- 100 µl- 1000 µl' lik otomatik pipet (Axygen Scientific, USA)
- Hücre sayım kamarası (Thoma Lamı)
- Lamel (22x22mm)
- Buz kalıpları
- Boş beher (atık için)
- Laboratuvar kalemi
- %70 alkol
- Distile su
- Steril pudrasız cerrahi eldiveni
- FloraDish cam plağın

- % 0,1'lik Jelatin
- Poly L-lysin

5.4 Kullanılan Cihazlar

CİHAZ	MARKA	MODEL
CO ₂ İnkübatörü	Thermo	Series II Water Jacket
CO ₂ Tüpü	Habaş	
İnvert Mikroskop	EVOS	AMG
Binoküler Araştırma Mikroskobu	Olympus	BH2-RFCA
Steril Kabin	Biosafety Cabinet	Class II Tip
Buzdolabı (+4 °C)	Uğur	USS1000
Derin Dondurucu (-20 °C)	Regal	LF 2102 A+
Santrifüj	Beckman Coulter	Allegra X-22
Hassas Terazi	Chyo	JL-200
Mikropipet Seti	Thermo	
Vorteks	Yellow line	TTS 2
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Janke&Kunkelika	IKAMAG RH
Rotator	Miltenyi Biotec	MACSmix
Su Banyosu	Techne	TE-10A DIKLM
Akan Hücre Ölçer	BD	FACS Calibur
Cihaz	ACEA Bioscience	xCELLigence RTCA DP

Tablo 5-2 Çalışmada kullanılan cihazlar

5.5 Kullanılan Solüsyonlar

5.5.1 MKH' ların besiyeri ortamının hazırlanması

Tam gömük 20 yaş dış foliküllerinden izole edilen kök hücrelerin kültürlerinde, taze olarak %10 oranında FBS ve %1 oranında Penicillin/Streptomycin ilave edildi, DMEM besiyeri kullanıldı. FBS, besiyeri ortamına eklenmeden önce, partikül oluşumunun önlenmesi amacıyla 0,45 µm gözenek çaplı filtrelerden geçirildi.

5.5.2 Anti-CD3/Anti-CD28 (CDmix) uyarınının hazırlanması

Anti-CD3 vialinde 100 µg /100 µl bulunmaktaydı. Bu vialden her bir 500 µl kültür kuyusuna 1 µl eklendi (konsantrasyon 0,5 µg/ml). Anti-CD28 vialinde 100 µg /100 µl bulunmaktaydı. Bu vialden her bir 500 µl kültür kuyusuna 1 µl eklendi (konsantrasyon 0,5 µg/ml).

5.5.3 IFN-γ uyarınının hazırlanması

100 µg/100 µl (distile su) bulunan IFN-γ dan 5 µl çekildi ve 95 µl RPMI ile sulandırıldı. Toplamda 100 ml' lik stok solüsyon hazırlandı. Herbir 500 µl kültür kuyusuna 495 µl RPMI içinde hücre süspansiyonu ve stok solüsyondan 5 µl IFN-γ eklendi (konsantrasyon 0,5 µg/ml).

5.5.4 Dexametasone uyarınının hazırlanması

2 mg dexametasone 1000 µl etanolde çözündürüldü. Çözündürülen solüsyondan 10 µl çekildi. 990 µl steril PBS içeren vialde konuldu (10^{-4} M).

5.5.5 Derp 1 uyarınının hazırlanması

100 µg/100 µl bulunan Derp 1 direkt kullanıldı. 5 µl çekildi 995 µl RPMI ile dilüe edildi (5 µg/ml) stok solüsyon olarak -20C' de saklandı.

Kollajenaz solüsyonunun hazırlanması

Kollajenaz Tip I solüsyonunun hazırlanması için; 2 ml DPBS içine 0,006 gram kollajenaz Tip I eklendi ve inkübatör içerisinde 10 dakika bekletildikten sonra 0,22 µm' lik filtre ile filtre edilerek kullanıldı.

5.5.6 Alizarin red solüsyonunun hazırlanması

% 0,02 'lik alizarin red solüsyonunun hazırlanması için, 1 gram alizarin red 50 ml distile suda çözüldü ve 0,22 µm' lik filtreden geçirildi.

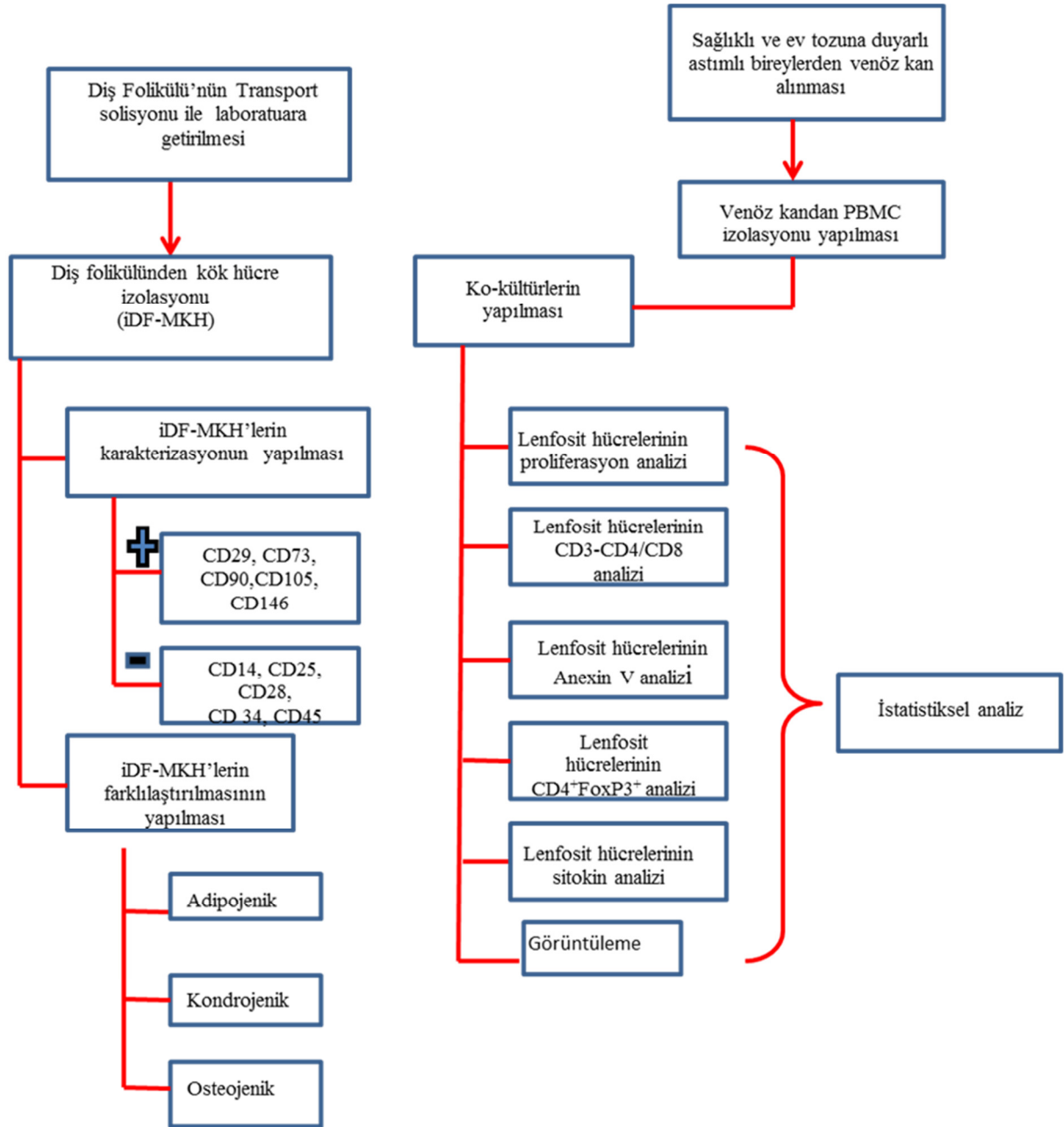
5.5.7 Oil red o solüsyonunun hazırlanması

%3' lük oil red o stok solüsyonunun hazırlaması için, 300 mg oil red o 100 ml %99' luk izopropanol içerisinde çözüldü. Çalışılacak olan solüsyon için, hazırlanmış olan stok solüsyon 3/2 oranında distile su ile seyreltildi ve 0,22 µm' lik filtreden geçirildi.

5.5.8 Alcian blue solüsyonunun hazırlanması

%0,1 alcian blue solüsyonunun hazırlanması için 10 mg alcian blue 60 ml ethanol ve 40 ml asetik asit içerisinde çözüldü ve 0,22 µm' lik filtreden geçirildi.

5.6 Çalışmanın Ana Basamakları



Şekil 5-1 Çalışmanın ana basamaklarının şematik gösterimi.

5.6.1 Diş folikülünün transport solüsyonu ile izolasyon yapılacak laboratuvara getirilmesi

Diş çekimi ve foliküllerin alınmasından sonra her bir örnek 15 ml'lik konik kapaklı tüpler içindeki %5 oranında Penicillin-Streptomycin içeren DMEM besiyeri içine alınarak, buz kalıpları içerisinde, çalışmanın gerçekleştirileceği Marmara Üniversitesi Çocuk İmmünoloji Laboratuvarı'na getirildi.

5.6.2 Diş folikülü kaynaklı mezenkimal kök hücre izolasyonu

Tam gömük yirmi yaş diş ameliyatı sırasında alınan diş saran folikül dokusu DPBS ile yıkanıp bistüri ile birkaç parçaya ayrıldı. Parçalanmış folikül dokusu hazırlanan kollajenaz solüsyonu içinde, inkübatörde 1 saat bekletildi ve aralıklarla kontrol edilip, vortekslendi. Folikül dokusu tek hücre süspansiyonu haline geldiğinde inkübatörden çıkartılıp pipetaj işlemi yapıldı. Folikül hücreleri DPBS ile yıkanıp 1200 rpm' de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler tekrar DPBS ile yıkanıp 1200 rpm' de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler 5 ml kültür medyumuyla T-25 cm² lik flakslara ekilip 37°C, %5 CO² inkübatöre konuldu. Hücrelerin her 2 günde bir kültür medyumunu değiştirildi ve hücrelerin çoğalması, flask yüzeyine yayılması takip edildi.

5.6.3 İzole edilen hücrelerin pasajlanması

T-25 cm² lik flakslar içerisinde inkübatöre konulan hücrelerin her 3 günde bir kültür medyumunu değiştirildi ve hücrelerin çoğalması, flask yüzeyine yayılması takip edildi. Yaklaşık 10-15 gün sonrasında hücreler flask yüzeyinde yaklaşık %70 yoğunluk gösterdiğinde pasaj işlemi yapıldı. Birinci kültür sıfırncı pasaj (P0) kabul edilerek, birinci kültürü takip eden her kültür işlemi sonrası pasaj sayıları P1, P2, P3 şeklinde belirtildi.

Steril kabin içerisinde flakslardaki hücre medyumunu uzaklaştırıldı ve flakslara 5 ml DPBS konulup hücreler DPBS ile yıkandı. DPBS hücrelerden uzaklaştırıldıktan sonra flakslara 500 µl Tripsin-EDTA eklendi ve inkübatörde 4 dakika bekletildi. 4 dakikanın sonunda flask içerisindeki tripsinin inaktivasyonu için 4 ml kültür medyumunu eklenip flask içerisindeki sıvı 15 ml' lik konik kapaklı tüplere aktarıldı. 1200 rpm' de 5 dk santrifüj yapıldı, santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler tekrar kültür medyumunu ile yıkanıp, santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve 1 ml kültür medyumunu eklenip pipetaj yapıp, homojenizasyon sağlandıktan sonra hücre sayımı yapıldı.

Hücre sayımı işlemi için, 1 ml kültür medyumunu içerisinde homojenize edilen hücrelerden 10 µl eppendorf tüpüne aktarıldı ve üzerine 10 µl tripan mavisi solüsyonu eklendi. Sayım için thoma lamı kullanıldı. Thoma lamı düz bir zemin üzerine alınarak sayım yapılacak alan üzerine lamel kapatıldı. Hazırlanıp eppendorfa konulan süspansiyondan 10 µl alınarak thoma lamında sayım yapılacak alanda lam ile lamelin birleştiği noktaya pipet ile yavaşça hücre süspansiyonu pipetlendi. Hücreler ışık mikroskopunda, 40X objektifte sayıldı.

Sayım sonucunda sayılan hücre sayısı, seyreltme oranı (2) ve sabit olan 10^4 ($0,1 \text{ mm}^3$ deki sayım) birbirleri ile çarpıldı ve elde edilen sonuç bize $1 \text{ ml}'$ deki hücre sayısını verdi.

Hücre sayımı yapıldıktan sonra uygun oranda (5×10^5 hücre) hücre 10 ml hücre kültür solüsyonu ile sulandırıldı homojenize edildi ve $T-75 \text{ cm}^2$ ' lik flasklara ekilip inkübatöre kaldırıldı. Her iki günde bir hücre medyumunu değiştirilerek kültür işlemine devam edildi.

5.6.4 İzole edilen kök hücrelerin karakterizasyonu ve farklılaştırılması

İzole edilen ve flasklara yapışan hücrelerin morfolojik özellikleri invert mikroskopta çalışma süresince incelendi. İmmünofenotipik özelliklerinin belirlenmesi için akım sitometri cihazında yüzey belirteçlerine bakıldı. Farklılaşma kapasitelerinin belirlenmesi için osteojenik adipojenik ve kondrojenik olarak hücreler farklılaştırıldı.

5.6.4.1 Osteojenik farklılaştırılması

Osteojenik farklılaşma için, P3'deki hücreler 6 kuyucuklu plaklarda her kuyuda 5×10^4 hücre olacak şekilde tip I kollajen kaplı lamellere ekildi. Hücrelerin üzerlerine 2 ml osteojenik farklılaştırma besiyeri eklendi (β -glycerophosphate içermeyen) ve inkübatöre kaldırılıp 2 gün arayla besiyerleri değiştirildi. Hücreler yaklaşık 5 gün sonra kofluent olunca osteojenik farklılaştırma besiyerine β -glycerophosphate eklenip ve kültüre devam edildi.

$50 \text{ ml}'$ lik osteojenik farklılaştırma besiyeri içerisine $7,5 \text{ ml}$ osteogenic supplements, $5 \mu\text{l}$ dexamethasone, $250 \mu\text{l}$ ascorbic acid, $175 \mu\text{l}$ 1M β -glycerophosphate ve $42,5 \text{ ml}$ complete mesencult osteogenic medyum eklendi. 6 kuyucuklu plaklara ekilen hücrelerin her 3 günde üzerlerindeki eski besiyeri alımpyeni osteojenik farklılaştırma besiyeri eklendi. Kültürün $4.$ haftasının sonrasında lameller hücre dışı kalsifikasyonun gösterilmesi amacıyla alizarin kırmızısı ile boyandı.

Alizarin kırmızısı boyaması için kuyucuklardaki besiyeri alındı ve kuyulara 2 ml DPBS eklenip 1 dakika kadar bekletildikten sonra DPBS uzaklaştırıldı. Sonrasında kuyulara 2 ml formalin eklendi ve 45 dakika boyunca karanlıkta oda ısısında bekletildi. 45 dakika sonrasında formalin uzaklaştırıldı ve distile su ile 2 kez yıkandı. Distile sudan sonra 2 ml alizarin kırmızısı solüsyonu eklendi ve 45 dakika boyunca oda ısısında bekletildi. 45 dakika sonrasında boya alındı ve distile su ile iki kez yıkandı. Lamel lam üzerine kapatılarak mikroskopta incelendi.

5.6.4.2 Adipojenik farklılaştırılması

Adipojenik farklılaşma için, P3' deki hücreler 6 kuyucuklu plaklarda her kuyuda 5×10^4 hücre olacak şekilde tip I kollajen kaplı lamellere ekildi. Hücrelerin üzerlerine 2 ml kültür medyumunu eklendi, inkübatöre kaldırıldı ve 2 gün arayla besiyerleri yenilendi. Yaklaşık 5 gün sonrasında hücreler kofluent olduklarında kuyucuklardaki kültür medyumunu alınıp adipojenik farklılaştırma besiyeri eklendi ve kültüre devam edildi.

50 ml' lik adipojenik farklılaştırma besiyeri içerisine 45 ml Adipocyte Differentiation Basal Medium, 5 ml Adipogenesis Supplement ve 25 µl Penicillin streptomycin eklendi. Adipojenik olarak farklılaştırmaya alınan hücrelerin her 3 günde eski besiyerleri alındı ve yeni adipojenik farklılaştırma besiyerleri eklendi. Kültürün 2. haftasının sonunda adipojenik farklılaşmayı gösteren intrasellüler yağ damlacıklarının varlığının belirlenmesi için oil red o boyaması gerçekleştirildi.

Oil red o boyaması için kuyucuklardaki besiyeri alındı ve kuyulara 2 ml DPBS eklenip 1 dakika kadar bekletildikten sonra DPBS uzaklaştırıldı. Kuyulara 2 ml formalin eklendi ve 45 dakika boyunca karanlıkta oda ısısında bekletildi. 45 dakika sonrasında formalin uzaklaştırıldı ve distile su ile 2 kez yıkandı. Sonrasında kuyulara 2 ml %60' lık izopropanol eklendi ve 5 dakika boyunca inkübe edildi. İzopropanol kuyulardan alındı ve kuyulara 2 ml oil red o solüsyonu eklendi. Karanlıkta oda ısısında 45 dakika boyunca inkübe edildikten sonra oil red o çekildi ve kuyular distile su ile 2 defa yıkandı. Kuyucuklara hemotoxyciline konuldu ve 1 dakika inkübe edildikten sonra kuyular 2 defa distile su ile yıkandı. Kuyulardaki lameller lamlar üzerine kapatılarak mikroskopta incelendi.

5.6.4.3 Kondrojenik farklılaştırılması

Kondrojenik farklılaşma için, P3' deki hücreler 6 kuyucuklu plaklarda her kuyuda 5×10^4 hücre olacak şekilde tip I kollajen kaplı lamellere ekildi. Hücrelerin üzerlerine 2 ml kültür besiyeri eklendi, inkübatöre kaldırıldı ve 2 gün arayla kuyulardaki besiyerleri yenilendi. Yaklaşık 5 gün sonrasında hücreler kofluent olduklarında kuyucuklardaki hücrekültür besiyeri alınıp kondrojenik farklılaştırma besiyeri eklendi ve kültüre devam edildi.

50 ml' lik kondrojenik farklılaştırma besiyeri içerisine 45 ml Osteocyte/Chondrocyte Differentiation Basal Medium, 5 ml Chondrogenesis Supplement ve 25 µl Penicillin streptomycin eklendi. Kondrojenik olarak farklılaştırmaya alınan hücrelerin her 3 günde eski besiyerleri alındı ve yeni kondrojenik farklılaştırma besiyerleri eklendi. Kültürün 2. haftasının sonunda kondrojenik

farklılaşmayı gösteren, kondrositler tarafından üretilen proteoglikanların varlığının belirlenmesi için alcian blue boyaması gerçekleştirildi.

Alcian blue boyaması için kuyucuklardaki besiyeri alındı ve kuyulara 2 ml DPBS eklenip 1 dakika kadar bekletildikten sonra DPBS uzaklaştırıldı. Kuyulara 2 ml formalin eklendi ve 45 dakika boyunca karanlıkta oda ısısında bekletildi. 45 dakika sonrasında formalin uzaklaştırıldı ve distile su ile 2 kez yıkandı. Kuyucuklara 3 ml alcian blue solüsyonu eklendi ve 45 dakika boyunca karanlıkta oda ısısında inkübe edildi ve 45 dakika sonrasında kuyulardaki boya alındı. Kuyulara 1,2 ml etil alkol, 800 µl asetik asit eklendi, 15 dakika boyunca bekletildi ve 15 dakikanın sonunda kuyular 2 defa DPBS ile yıkandı. Kuyulardaki lameller lamalar üzerine kapatılarak mikroskopta incelendi.

5.6.5 Akım sitometri analizi

İzole edilen hücrelerin immünofenotipik karakteristiklerinin belirlenmesi için akım sitometrik analizler gerçekleştirildi. Bu analizler, P3 sonrasında FACS Calibur akım sitometri cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

Hücreler P3 sonrasında tripsin ile kaldırılıp, hücre sayımı yapıldı. Hücre sayısı belirlendikten sonra yaklaşık 5×10^6 hücre DPBS içinde homojenize edildi. Homojenize edilen hücreler polystyrene tüplere aktarıldı. Sonrasında belirlenen hücre yüzey işaretleyicilerine özel fluoresan izotiyosiyonat (FITC)-, fikoeritrin (PE)-, allophycocyanin (APC)- konjuge monoklonal antikolar; CD73 PE, CD90 PE, CD105 PE, CD146 FITC, CD29 APC, CD45 FITC, CD34 PE, CD25 APC, CD28 PE, CD14 PE ve izotip kontrollerinden (Mouse IgG₁, κ) 10µl eklenerek 15 dakika boyunca oda ısısında, karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 2 ml DPBS eklendi ve 1200 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve 500 µl hücre yıkama solüsyonu eklenip resüspanse edildi. Hazırlanan hücre süspansiyonu FACS Calibur akım sitometri cihazında okutuldu.

5.6.6 iDF-MKH' ların kültür plaklarına ekilmesi, uyarıların ekilmesi ve görüntüleme

Mezenkimal kök hücrelerin lenfosit hücreleri üzerindeki immünolojik etkilerinin incelenmesi amacıyla kök hücreler ile lenfosit hücreleri kültüre edildi. Kök hücre ve lenfosit hücrelerinin ko-kültürünü ilk aşamasında lenfosit izolasyonundan 2 gün önce kök hücreler 48 kuyucuklu plaklara ekildi. Ayrıca kök hücrelerin lenfosit hücreleriyle ko-kültürleri görüntülendi.

5.6.6.1 iDF-MKH'ların 48 kuyucuklu kültür plaklarına ekilmesi

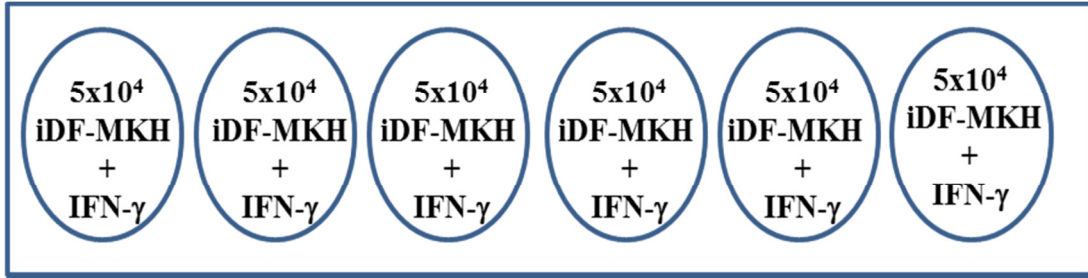
iDF-MKH'ların lenfosit hücreleri ile ko-kültürlerinin 48 saat öncesinde kök hücreler 48 kuyucuklu plaklara ekildi. Mezenkimal kök hücreler thoma lamında sayıldıktan sonra her bir kök hücre ayrı 48'lik plaklarda her kuyuda 5×10^4 hücre olacak şekilde ekildi. Üzerlerine 500 μ l hücre kültür besiyeri eklendi ve inkübatöre kaldırıldı.



Şekil 5-2. iDF-MKH'ların 48 kuyucuklu plaklara ekilmesinin şematik gösterimi

5.6.6.2 Kültürdeki iDF-MKH'ların 24. saatte IFN- γ ile uyarılması

48 kuyucuklu plağa ekilen inkübatördeki iDF-MKH'ların bir kısmı 24. saatte 5 μ l IFN- γ ile uyarım yapıldı.



Şekil 5-3. 48 kuyucuklu plaklardaki iDF-MKH'ların IFN- γ ile uyarımının şematik gösterimi

5.6.7 Sağlıklı ve ev tozuna duyarlı astımlı bireylerden alınan venöz kandan lenfosit izolasyonu yapılması

Bu tez çalışmasında, çalışmaya dahil edilen tüm bireylere, hazırlanmış olan "Gönüllü Bilgilendirme Formu" okutuldu ve "Gönüllü Onam Formu" imzalatıldı. Çalışmaya dahil edilen

7 sağlıklı ve 7 ev tozuna duyarlı astımlı bireylerin her birinden yeşil kapaklı heparinli tüplere 30 ml venöz kan alındı ve alınan kanlardan lenfosit izolasyonu yapıldı.

Lenfosit izolasyonu steril kabinde yapıldı. Sağlıklı ve ev tozuna duyarlı astımlı bireylerin her birinden alınan 30 ml kan 50 ml' lik konik kapaklı falkonlara konuldu. 50 ml' lik falkonlardaki bu kan örnekleri 1:1 oranında DPBS ile sulandırıldı. Aynı zamanda ayrı 15 ml' lik falkon tüpler alındı ve her tüpe 3,5 ml fikol eklendi. Sulandırılan kanlar falkon tüpünün cidarından fikol üzerine pastor pipeti ile yavaşça yayıldı. Fikol ile sulandırılmış kanın birbirine karışmamasına özellikle dikkat edildi. Kan fikol üzerine yayıldıktan sonra 20 dakika boyunca 2000 rpm devirde santrifüj edildi. 20 dakika sonrasında yoğunluklarına göre en altta eritrositler, üst tarafında fikol, onun üstünde bulutsu tabaka (buffy coat) halinde olan periferik kan mononükleer hücreler (PBMC) ve onunda üstünde plazma ve DPBS olacak şekilde ayrıldı. Orta kısımda bulunan bulutsu tabaka (buffy coat) pastor pipeti ile dikkatli bir şekilde alındı ve 50 ml' lik falkon tüplere aktarıldı. Üzerine 1:1 oranında DPBS eklendi ve 1500 rpm' de 5 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası hücrelere 5 ml hücre kültür solüsyonu eklenip pipetaj yapıp homojenize edildi ve 1500 rpm' de 5 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüjden sonra süpernatant atıldı, hücreler 1 ml hücre kültür solüsyonunda sulandırıldı ve pipetaj yapıp homojenize edildi. Homojenize edilen sıvıdan 10 µl eppendorfa alındı ve hücre sayımı yapıldı.

Yapılan hücre sayımı sonrasında bir grup lenfosit hücresi kök hücreler ile direkt kültüre alındı ve bu gruba 3 gün kültür süresi sonunda Anexin V, FoxP3, CD3/CD4/CD8 bakıldı. Bir diğer grup ise CFSE ile işaretlendikten sonra kök hücreler ile kültüre alındı, 3 gün kültür süresi sonunda ise bu hücrelerin proliferasyonlarına bakıldı.

5.6.8 Lenfositlerin CFSE ile işaretlenmesi

Karboksifloresan süksinimidil ester (CFSE) hücre zarından geçebilen floresan bir boyadır. Sitoplazmaya girince esteraz aktivitesinin gerçekleşmesi ile floresan grubun asetatları kesilip, floresan ışığa açığa çıkar ve hücre zarından geçme özelliğini yitirir. Böylece hücrelerin sitoplazmasının boyanması sağlanır.

Hücre sayımından sonra izole edilen lenfositlerin bir kısmı hücre proliferasyonu bakılması amacıyla CFSE işaretlendi. 15 ml' lik falkonlarda bulunan ve CFSE işaretlenmesi için ayrılan hücreler üzerine 3 ml DPBS eklendi, pipetaj yapıldı ve homojenize edildikten sonra 1500 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet üzerine 1 ml DPBS eklenip pipetaj yapıp homojenize edildi. Homojenize edildikten sonra falkon içerisine 1.5 µl

CFSE konuldu (bu işlem ve sonrası karanlık ortamda gerçekleştirildi) ve pipetaj yapıldı. CFSE konulduktan sonra 6 dakika +4 C° de bekletildi. 12 dakika sonrasında 6 ml DPBS eklendi, pipetaj yapıldı ve 1500 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı ve 6 ml hücre kültür solüsyonu eklenip tekrar 1200 rpm de 5 dakika santrifüj yapıldı. Son yıkama işleminden sonra 1 ml hücre kültür solüsyonu eklenip hücre sayımı yapıldı.

5.6.9 Kök hücre ve lenfositlerin ko-kültürünün yapılması

Hücre izolasyonları yapıldıktan ve hücreler sayıldıktan sonra bir grup lenfosit hücresi kök hücreler üzerine direkt ekildi. Bir grup lenfosit hücresi ise CFSE ile işaretlenip kök hücreler üzerine eklendi. Kök hücreler üzerine lenfosit hücreleri eklendikten sonra uyarılar eklendi ve inkübatöre kaldırıldı 72 saat boyunca kültüre alındı. 72 saatin sonrasında lenfosit hücrelerinde proliferasyon, CD4⁺FoxP3⁺, Anexin V ve CD3/CD4/CD8 bakıldı.

5.6.9.1 iDF-MKH hücreleri ile lenfositlerin ko-kültürlerinin yapılması

Lenfosit izolasyonundan 2 gün önce 48 kuyucuklu plaklara ekilen iDF-MKH hücreleri ile 24. saatte IFN- γ uyarımı yapılan kuyucukların üzerindeki eski hücre kültür solüsyonu alındı. iDF-MKH hücreleri ile 24. saatte IFN- γ uyarımı yapılan kuyucukların üzerine izole edilen lenfosit hücreleri her kuyuda 5×10^5 olacak şekilde 500 μ l hücre kültür solüsyonu ile birlikte eklendi.

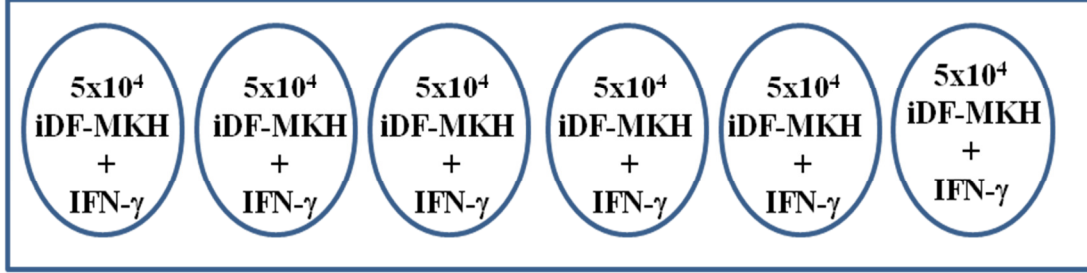
Lenfosit izole edildikten sonra CFSE işaretlenen hücreler iDF-MKH hücreleri üzerine her kuyuda 5×10^5 olacak şekilde 500 μ l hücre kültür solüsyonu ile birlikte eklendi.

iDF-MKH hücreleri üzerine lenfosit hücreleri eklendikten sonra bir kuyucuğa herhangi uyarı konulmadan (uyarısız); lenfosit hücrelerinin uyarılması diğer kuyucuklara ayrı ayrı 5 μ l CDmix, 2,5 μ l Derp 1, 5 μ l Dexametosome ve IFN- γ eklendi. 24. saatte IFN- γ uyarımı yapılan kuyuya herhangi bir uyarı konulmadan inkübe edildi.

iDF-MKH ve lenfosit hücrelerinin birlikte kültürlerinin yanında iDF-MKH yokluğunda da lenfosit hücrelerinin kültürleri yapıldı. CFSE' li ve CFSE' siz lenfosit hücreleri 48 kuyucuklu plaklara her kuyuda 5×10^5 hücre olacak şekilde 500 μ l hücre kültür solüsyonu ile ekildi, 5 μ l CDmix ile uyarı ve uyarısız kültürleri yapıldı.

5.6.9.2 Hücrelerin 48. saatte IFN- γ ile uyarılması

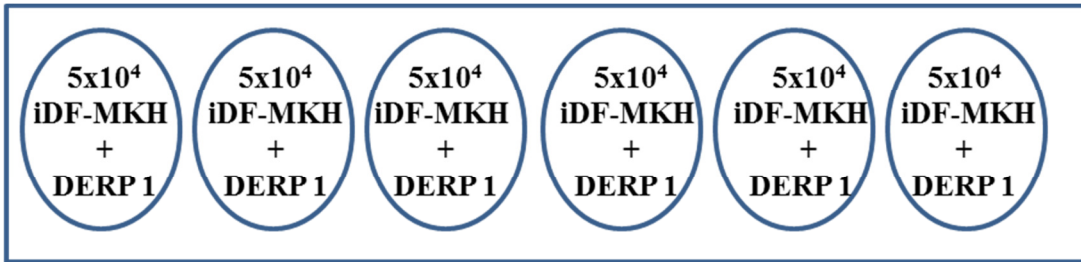
48 kuyucuklu plaklardaki iDF-MKH hücreleri üzerine CFSE' li ve CFSE' siz lenfosit hücreleri eklendi ve CDmix ile uyarımları yapıldı. CDmix' in dışında bir grup kuyuya IFN- γ stok solüsyonundan 5 μ l eklendi, bir grup kuyuya ise karşılaştırma amaçlı IFN- γ eklenmedi ve bu şekilde inkübatöre kaldırıldı. İnkübatörde 3 gün (72 saat) boyunca kültür edildi.



Şekil 5-4. Hücrelerin 48. saatte IFN- γ ile uyarılmasının gösterimi

5.6.9.3 Hücrelerin Derp1 ile uyarılması

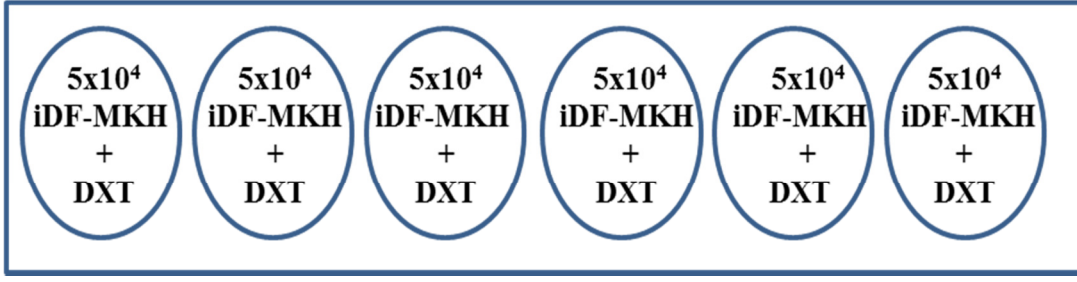
48 kuyucuklu plaklardaki iDF-MKH hücreleri üzerine CFSE' li ve CFSE' siz lenfosit hücreleri eklendi ve CDmix ile uyarımları yapıldı. CDmix' in dışında bir grup kuyuya Derp1 stok solüsyonundan 2,5 μ l eklendi, bir grup kuyuya ise karşılaştırma amaçlı IFN- γ eklenmedi ve bu şekilde inkübatöre kaldırıldı. İnkübatörde 3 gün (72 saat) boyunca kültür edildi.



Şekil 5-5. Hücrelerin Derp 1 ile uyarılmasının gösterimi

5.6.9.4 Hücrelerin Dexametasone ile uyarılması

48 kuyucuklu plaklardaki iDF-MKH hücreleri üzerine CFSE' li ve CFSE' siz lenfosit hücreleri eklendi ve dexametasone ile uyarımları yapıldı. CDmix' in dışında bir grup kuyuya dexametazone stok solüsyonundan 5 μ l eklendi, bir grup kuyuya ise karşılaştırma amaçlı IFN- γ eklenmedi ve bu şekilde inkübatöre kaldırıldı. İnkübatörde 3 gün (72 saat) boyunca kültür edildi.



Şekil 5-6. Hücrelerin Dexametasone ile uyarılmasının gösterimi

5.6.9.5 Görüntüleme ve Xcellinge cihazı ile hücre proliferasyonu ve ölümü

iDF-MKH hücreleri ile sağlıklı ve Derp 1 + astımlı bireylerin lenfosit hücrelerinin ko-kültür ortamında görüntüleme ve Xcellinge cihazı ile hücre proliferasyonu ve ölümünün kantitatif incelenmesi için deneyler Medipol Üniversite'si Esra Çağavi laboratuvarı'nda yapıldı.

5.6.9.5.1 FloraDish cam plağı % 0,1'lik jelatin ve poly L-lysin kaplama

FloraDish cam plağın üzerine 750 µl % 0,1'lik jelatin eklendi. Minimum 2 saat etüvde bekletildi. Daha sonra üzerindeki tabaka aspire edildi. Stok Poly L –lysin'i 1:10 dH₂O dilüe etmek için; 675 µl dH₂O üzerine 75 µl Poly L –lysin ekle2 saat oda ısısında kabinde bekletildi ve 2x dH₂O ile yıkama yapıldı.72 saat boyunca her 2 saatte bir spinning disk confocal mikroskobisi ile görüntüleri alındı.

5.6.9.5.2 DF-MKH'ların FloraDish cam plağa ekimi ve optimizasyonu

50 ml cDMEM hazırlandı. -80'den 1x10⁶ lık vial 1 vial DF-MKH'den alındı ve benmaride hızlıca çözündürüldü. 50 ml'lik falkona 2-3 ml cDMEM koyuldu ve üzerine çözünmüş hücreleri koyuldu. 10 ml'ye cRPMI ve cDMEM'le tamamlandı. 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edilirdi. Ekim için hücre sayımı yapılırdı ve Şekil 5.7'deki hücre konsantrasyonları iki kez tekrarlı yapıldı. iDF-MKH'lar 2 ml cDMEM'le süspanse edilirdi. FloraDish cam plağa ekim yapıldı ve 2 gün etüvde hücrelerin yapışıp confluent olması beklendi. Yapmış olduğumuz deneyler sonucunda 2x10⁵ hücre konsantrasyonunun ve cDMEM besiyerinin en uygun olduğuna karar verildi.

Şekil 5-7. DF-MKH'ların FloraDish cam plağa ekimi için hücre konsantrasyonları

cDMEM 5x10 ³	cRPMI 5x10 ³	cDMEM 1x10 ⁴	cRPMI 1x10 ⁴	cDMEM 2x10 ⁵	cRPMI 2x10 ⁵	cDMEM 3x10 ³	cRPMI 3x10 ⁴
cDMEM 5x10 ³	cRPMI 5x10 ³	cDMEM 1x10 ⁴	cRPMI 1x10 ⁴	cDMEM 2x10 ⁵	cRPMI 2x10 ⁵	cDMEM 3x10 ³	cRPMI 3x10 ⁴

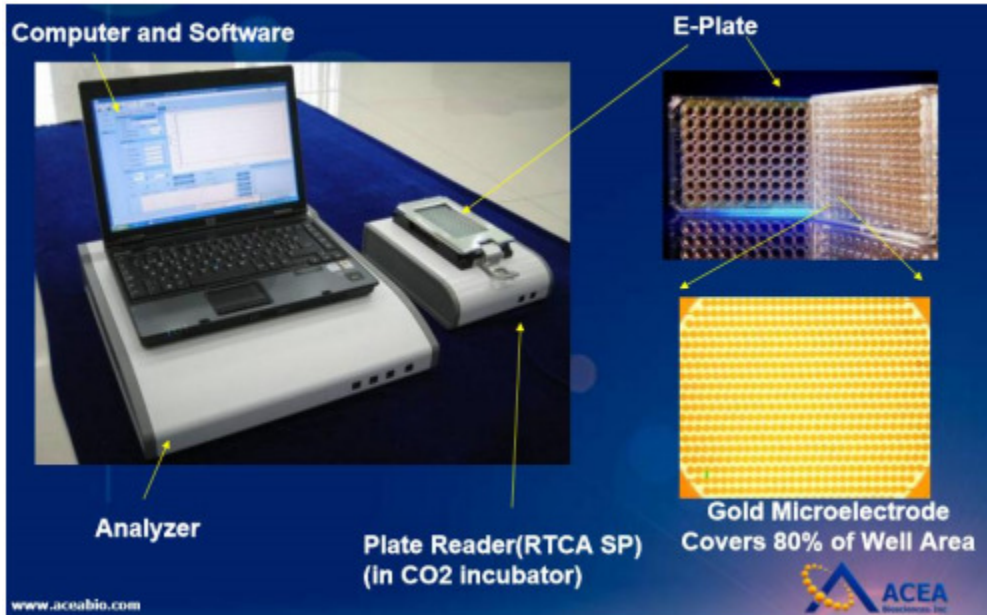
5.6.9.5.3 iDF-MKH'ların lenfosit hücreleriyle ko-kültürü hazırlama ve Xcellinge cihazı ile hücre proliferasyonu ve ölümü

Pediyatrik İmmunoloji/Allerji polikliniğinden doktor kontrolünde tanı almış Derp 1 + astımlı hastadan (n:2) ve sağlıklı bireylerden (n:2) 4 cc heparinli kan alındı. PBMC izolasyonu yapıldı. 16 kuyucuklu plağa 3x10⁴ iDF-MKH ile 3x10⁵ sağlıklı ve Derp 1 + astımlı bireylerin PBMC total hacim 200 µL olacak şekilde cDMEM eklendi. Tablo 5.3'de gösterilen şekilde gruplara 1 µL IFN γ , 1 µL CDmix eklendi ve gruplar ikişer kez çalışıldı.

Kültür Ortamı	PBMC için Bireyler
iDF-MKH+PBMC+CDmix	Der p 1 + Astım
iDF-MKH+PBMC+CDmix	Sağlıklı
iDF-MKH+PBMC+CDmix+IFN-γ	Der p 1 + Astım
iDF-MKH+PBMC+CDmix+IFN-γ	Sağlıklı

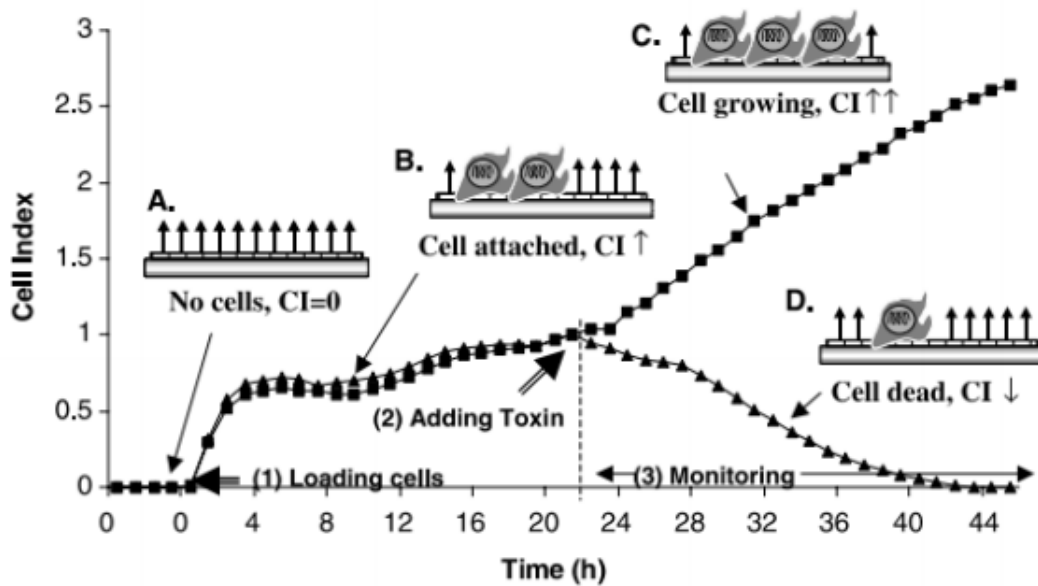
Tablo 5-3 iDF-MKH'ların lenfosit hücreleriyle ko-kültürü görüntüleme gruplarının tabloda gösterimi

xCELLigence sistemi, hücre çoğalmasını gerçek zamanlı olarak analiz edebilen bir hücre sayım cihazı olup e-plakalarının zeminine yerleştirilmiş mikro-elektrodlar 50 sayesinde elektriksel empedans ölçme tekniğine dayanmaktadır. Empedans ölçümü, hücre kalitesi, proliferasyonu, adezyonu, canlılığı, sitotoksitesi, morfolojisi ve hareketi dahil olmak üzere hücrelerin biyolojik durumu hakkında kantitatif bilgiler verir. Bilindiği üzere hücre membranı birçok protein içeren çift tabakalı lipit yapısındadır ve lipit moleküllerinin polar grupları akuatik çevreye bakarken, hidrofobik hidrokarbon zincirleri membranın iç kısmına bakmaktadır. Hücrenin iç kısmı kompleks bir yapıya sahip olup pekçok membranla çevrili partikül içermektedir (mitokondri, vakuol, nükleus v.b.) Bu sebeple hücre membranı yüksek olarak yalıtıkan hücrenin iç kısmı iletkenidir. Hücreler büyüme esnasında, ortamdaki yüksüz veya zayıf yüklü maddeleri yüksek yüklü maddelere dönüştürerek iletkenliği artırır ve bu iletkenlik ortamla ilişkili olan elektrodlarla ölçülerek empedans hesaplanır.



Şekil 5-8 Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA)

Mikro-elektronik sensör üzerindeki hücre deteksiyonu prensibi: (A) Hücrelerin ekimi yapılmadan önce hücre indeksi (CI) değeri sıfırdır; (B) Hücrelerin varlığı elektrot veya ara-yüzey empedansındaki lokal iyonik ortamı etkiler, böylelikle elektrot empedansında ve hücre indeksinde artışa yol açar; (C) Kontrol hücreleri [■] devamlı olarak çoğalır ve elektrotlara daha fazla hücre tutunursa elektrot empedansında daha çok artış olur ve daha büyük hücre indeksi değerine neden olur; (D) Hücreler, toksik ajana maruz kalması sonucu öldükleri zaman hücre indeksi değeri azalır (Erişim tarihi:10.01.2016, <https://aceabio.com/product/rtca-dp/>)..



Şekil 5-9 Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi Uygulamasının 3 Adımda Şematik Gösterimi (1) Hücrelerin Ekimi, (2) Toksik Ajanın Eklenmesi, (3) Otomatik Görüntüleme

Çalışmada kullanılacak olan hücrelerin hazırlanan grupların hücre proliferasyonunu incelemek için gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA SP instrument, Roche, Almanya) kullanılmıştır. Bu amaçla altın kaplı 16 kuyucuklu e-plakanın her bir kuyucuğuna 200 µL c-DMEM konur ve e-plaka etüv içerisinde bulunan RTCA cihazına yerleştirilir. Plaka ile cihazın aynı sıcaklığa gelmesi için 10 dakika beklenir. Daha sonra e-plaka cihazdan çıkarılarak kuyucuklara 3×10^4 iDF-MKH,. E-plaka tekrar etüve yerleştirilerek 10 dakika bekletilir ve 10 dakika sonunda okuma başlatılır. Hücrelerin e-plaka'ya tutunması ve çoğalması için yaklaşık 24 saat bekletilir. 24 saat sonunda hücreler büyüme fazına geçtiği esnada Tablo 5.4.'deki gruplara göre 1 µL IFN γ hücrelerin üzerine ilave edilir. Plaka etüve yerleştirilir; 24 saatin sonrasında kuyucukların hepsine 3×10^5 PBMC konuldu ve Tablo 5.4'de ki gibi uyarınları eklendi 1 µL CDmix eklendi. Sistem, 10 dakika ara ile gerçek zamanlı empedans ölçümü alınacak şekilde ayarlanıp 72 saat süre boyunca kültürü yapılmak üzere bırakılır. Sonuç olarak hücrelerin zamana bağlı proliferasyonunu gösteren bir grafik elde edilir.

Kültür Ortamı	Gruplar
iDF-MKH	-
iDF-MKH+PBMC+CDmix	Der p 1 + Astım
iDF-MKH+ PBMC+CDmix	Sağlıklı
iDF-MKH+PBMC+IFN- γ +CDmix	Der p 1 + Astım
iDF-MKH+ PBMC+IFN- γ +CDmix	Sağlıklı

Tablo 5-4 Xcellinge cihazı hücre proliferasyonu ve ölümü için kullanılan gruplar

5.6.10 Lenfositlerin proliferasyon analizi

CFSE hücre zarından geçebilen floresan bir boyadır. Sitoplazmaya girince esteraz aktivitesinin gerçekleşmesi ile floresan grubun asetatları kesilip, floresan ışığa açığa çıkar ve hücre zarından geçme özelliğini yitirir. Böylece CFSE ile hücrelerin sitoplazmasının boyanması sağlanır. Sitoplazma boyandıktan sonra hücreler her ikiye bölündüğünde, floresanın miktarı da, yoğunluğu da hücreler arasında bölünür. Bu şekilde hücre proliferasyonu akım sitometri cihazı ile değerlendirilir. Kök hücrelerin hücre proliferasyonu üzerindeki etkisinin gösterilmesi amacıyla proliferasyon takibi yapıldı.

İzole edilen lenfosit hücreleri proliferasyonun takibi için CFSE işaretlendi. Kök hücrelerin varlığında ve yokluğunda kültürleri yapılan ve 3 gün (72 saat) boyunca 37°C, %5 CO² inkübatörde bekletilen hücelere proliferasyon analizi yapıldı.

Kuyulara pipetaj yapılarak dipte kalan ve hücre kültür solüsyonu içindeki hücrelerin homojenize edilmesi sağlandı. Kuyulardaki besiyerleri alındı ve flow tüplerine konuldu. Tüpler 1200 rpm' de 5 dakika santrifüj yapıldı ve santrifüj sonrasında süpernatantlar sitokin tayini için eppendorflara alınıp -20 C° ye kaldırıldı. Tüpteki pellet üzerine 2 ml hücre yıkama solüsyonu eklendi ve 1200 rpm' de 5 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı ve tekrar 2 ml hücre yıkama solüsyonu eklenip 1200 devirde santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı ve 500 µl hücre yıkama solüsyonu eklenip vortex yapıldı. Tüpler akım sitometri cihazında okutuldu ve değerlendirildi.

5.6.10.1 Lenfositlerin CD3/CD4/CD8 hücre analizi

İzolasyonundan sonra kök hücreler ile direk kültürü yapılan lenfosit hücrelerinin 3 gün kültür sonrasında CD3/CD4, CD3/CD8 hücre miktarlarına bakıldı. CD3/CD4, CD3/CD8 hücrelerin kök hücre varlığında ve yokluğundaki miktar değişimlerinin incelenmesi için akım sitometri cihazında CD3/CD4/CD8 bakıldı.

Kuyulara pipetaj yapılarak hücrelerin homojenize bir şekilde dağılması sağlandı ve bu homojenize sıvıdan 150 µl alınıp flow tüplerine konuldu. Sonrasında flow tüplerine 2 ml DPBS eklendi ve 1200 rpm' de 5 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı ve 100 µl DPBS eklendi vortex yapıldı. Tüplere 10 µl CD4 FITC/CD8 PE/CD3 PerCP (TriTest) eklendi vortex yapıldı ve 15 dakika boyunca oda ısısında karanlıkta bekletildi. 15 dakika sonrasında tüplere 2 ml hücre yıkama solüsyonu eklendi ve 1200 rpm' de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı ve 500 µl hücre yıkama solüsyonu eklenip vortex yapıldı. Tüpler akım sitometri cihazında okutuldu ve değerlendirildi.

5.6.10.2 Lenfositlerin CD4⁺FoxP3⁺ hücre analizi

İzolasyonundan sonra kök hücreler ile direkt kültürü yapılan lenfosit hücrelerinin 3 gün kültür sonrasında CD4⁺FoxP3⁺ hücre miktarlarına bakıldı. CD4⁺FoxP3⁺ hücrelerin kök hücre varlığında ve yokluğundaki miktar değişimlerinin incelenmesi için akım sitometri cihazında CD4⁺FoxP3⁺ bakıldı.

Hücreler FoxP3 buffer kitindeki protokole göre hazırlandı. Kuyulara pipetaj yapılarak hücrelerin homojenize bir şekilde dağılması sağlandı ve bu homojenize sıvıdan 150 µl alınıp flow tüplerine konuldu. Sonrasında flow tüplerine 2 ml DPBS eklendi ve 1200 rpm' de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırıldı ve tüplere 100 µl stain buffer (1:50 oranında, 1 ml FBS, 49 ml hücre yıkama solüsyonu) eklendi. Sonrasında 10 µl CD4 ve 10 µl CD25 eklenip vortex yapıldı ve 20 dakika boyunca oda ısısında karanlıkta bekletildi. 20 dakika sonrasında 2 ml stain buffer eklendi ve 250 g' de 10 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve 2 ml FoxP3 buffer A (1:10 oranında, 1 ml buffer A, 9 ml distile su) eklendi, vortex yapıldı ve 10 dakika oda ısısında karanlıkta bekletildi. 10 dakika sonrasında 500 g' de 5 dakika santrifüj yapıldı ve santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı. 2 ml stain buffer eklendi, vortex yapıldı ve 500 g' de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırıldı ve 0,5 ml FoxP3 buffer C (1:50 oranında, 1 ml buffer C, 49 ml buffer A) eklenip vortex yapıldı ve 30 dakika oda ısısında karanlıkta bekletildi. 30 dakika sonrasında 2 ml stain buffer eklendi ve 500 g' de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı ve bu işlem tekrarlandı. Sonrasında 10 µl FoxP3 antikor eklenip vortex yapıldı ve yavaşça vortexlendi. 30 dakika oda ısısında karanlıkta bekletildi ve sonrasında 2 ml stain buffer eklenip 500 g de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı ve 500 µl stain buffer eklenip akım sitometri cihazında okutuldu.

5.6.10.3 Lenfositlerin Annexin V analizi

İzolasyonundan sonra kök hücreler ile direkt kültürü yapılan lenfosit hücrelerinin 3 gün kültür sonrasında Annexin V bakıldı ve Annexin V kök hücre varlığında ve yokluğundaki miktar değişimlerinin incelenmesi için akım sitometri cihazında Annexin V bakıldı.

Apoptoz, embriyonik gelişim ve doku homeostazının devamında oluşan normal bir fizyolojik işlemdir. Apoptotik program birçok morfolojik değişimle karakterize edilir. Plazma membranının bozulması en erken özelliğidir. Apoptotik hücrelerde, sağlıklı hücrelerde plazma membranının sitozolik kısmında bulunan fosfatidilserin, hücre dışına çıkar ve bu durum florasan işaretli Annexin V ile tayin edilir. Annexin V, Ca^{++} bağımlı fosfolipid-bağlayan proteindir ve yüksek afinite ile fosfatidilserine bağlanır. Apoptoz ya da nekroza giden hücre ölümünün geçiş aşamasında ise membran bütünlüğü kaybı meydana gelir. Bu nedenle, Annexin V propidium iyodid (PI) gibi canlılık boyası ile kullanılır. PI, nükleik asitlere bağlanan bir ajan ve florasan moleküldür. PI genellikle canlı hücreleri boyamaz ve yaygın olarak ölü hücrelerin belirlenmesinde kullanılır. Bu sayede akan hücre ölçeği analizi ile; canlı hücreleri Annexin V ve PI negatif hücrelerin yüzdesi, erken apoptotik hücreleri Annexin V pozitif -PI negatif hücrelerin yüzdesi, geç apoptotik ve

ölühücreleri ise Annexin V ve PI pozitif hücrelerin yüzdesi vermektedir.Sağlıklı ve ev tozuna duyarlı astımlı bireylerin PKMH' ından izole edilen lenfositlerin apoptoz analizi için Annexin V: FITC Apoptosis Detection Kit (eBioscience Inc., San Diego, CA, kat no: BMS500FI/100) kullanıldı.

Kuyulara pipetaj yapılarak hücrelerin homojenize bir şekilde dağılması sağlandı ve bu homojenize sıvıdan 150 µl alınıp ve flow tüplerine konuldu. Sonrasında flow tüplerine 2 ml DPBS eklendi ve 1200 rpm' de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırılıp tüplere 100 µl binding buffer konuldu. Tüplere 5 µl Annexin V (FITC), 5 µl, anti-human CD4 (PE) 5 µl ve CD8 (APC) 5 µl konuldu. İzotip kontrol olan tüpe ise 5 µl biotin mouse IgG1 κ isotype control ve ve 2,5 µl PE streptavidin konuldu. Tüpler yavaşça vortexlendi ve 15 dakika oda ısısında karanlıkta bekletildi. 15 dakika sonrasında 2 ml hücre yıkama solüsyonu eklendi ve 1200 rpm' de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı 100 µl binding buffer PI 10µl konuldu ve 10 dakika oda ısısında karanlıkta bekletildi.10 dakika sonrasında 200 µl binding buffer eklendi ve 1200 rpm' de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı 500 µl hücre yıkama solüsyonu konulup vortex yapıp akım sitometri cihazında okutuldu.

5.6.10.4 Hücre kültür süpernatantlarında sitokin tayini

Kültür süpernatantları -20 C°' den alındı ve sitokin analizi Cytometric Bead Array (CBA) Th1/Th2/Th17 sitokin kiti kullanılarak yapıldı. Kit protokolüne göre öncelikle standart dilüsyonlar hazırlandı. Bu işlem için standartlar 15 ml' lik falkon tüpüne boşaltıldı ve 2 ml seyreltici solüsyon içerisinde çözüldü. 15 dakika oda ısısında karanlıkta bekletilen standart tüpü pipetleme ile yavaşça karıştırılıp belirli oranlarda dilüsyonları yapıldı (negatif kontrol, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024). Sonrasında boncukların hazırlanmasında, kit içeriğindeki boncuklar yavaşça vortexlendi ve pipetlendi. Tüp sayısı belirlendikten sonra her bir boncuktan her bir tüpe 5 µl eklenecek şekilde hazırlandı. Hazırlanan standart tüplerine 25 µl standartlardan, örnek tüplerine ise 25 µl örneklerden konuldu. Boncuk karışımı kısa bir süre vortexlendi ve her bir tüpe 25 µl boncuk konuldu. Tüpler vortexlendikten sonra her bir tüpe 25 µl detection reagent konuldu. Tüpler iyice karıştırıldı ve 2 saat oda ısısında karanlıkta bekletildi. 2 saat sonrasında 1 ml yıkama solüsyonu eklendi ve tüpler 200 g' de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında 300 µl yıkama solüsyonu eklendi ve vortexlendi. Örnekler akım sitometri cihazında okutuldu. Analizlerde sitokinler için hazırlanan standartlar çerçevesinde grafik eğrisi oluşturuldu ve her bir örnekteki sitokin miktarı ede edilen denkleme göre belirlendi.

5.6.10.5 İstatistiksel analiz

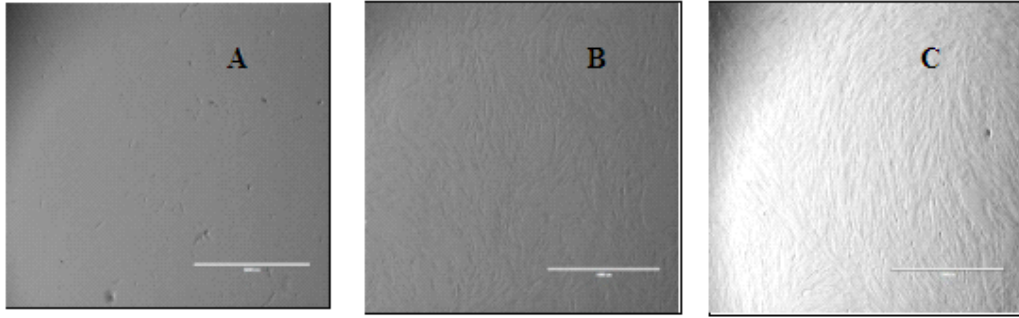
Gruplar arasındaki farklılık GraphPad Prism 5 programı (GraphPad Software, Inc., CA, USA) kullanılarak analiz edildi. Veriler her grupta ortalama (Ort) \pm standart deviasyon (SD) (minimum-maksimum) değerleri olarak verildi. İki grup arasındaki karşılaştırma için unpaired ANOVA testi (tek yönlü varyans analizi) ile yapıldı. İki grup arasındaki karşılaştırma için unpaired Student *t* testi kullanıldı. *P*-değeri 0.05'den küçük değerler anlamlı olarak kabul edildi.



6 BULGULAR

6.1 Diş Folikülü Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu

Diş folikülünden izole edildikten sonra T-25 cm' lik flasklara ekilen hücrelerin morfolojik özellikleri invert mikroskop ile incelendi. Birinci kültürde hücrelerin hızla çoğaldıkları ve flask yüzeyini kapladıkları görüldü (Şekil 6.1.A.). Hücreler yaklaşık %70 yoğunluk gösterdikten sonra birinci pasaja alınarak T-75 cm' lik flasklara aktarıldı (Şekil 6.1.B.). Pasajlama işleminden sonra hücreler yaklaşık 6-7 gün içerisinde flask yüzeyini kapladı ve tekrar pasajlama işlemleri yapıldı (Şekil 6.1.C.).



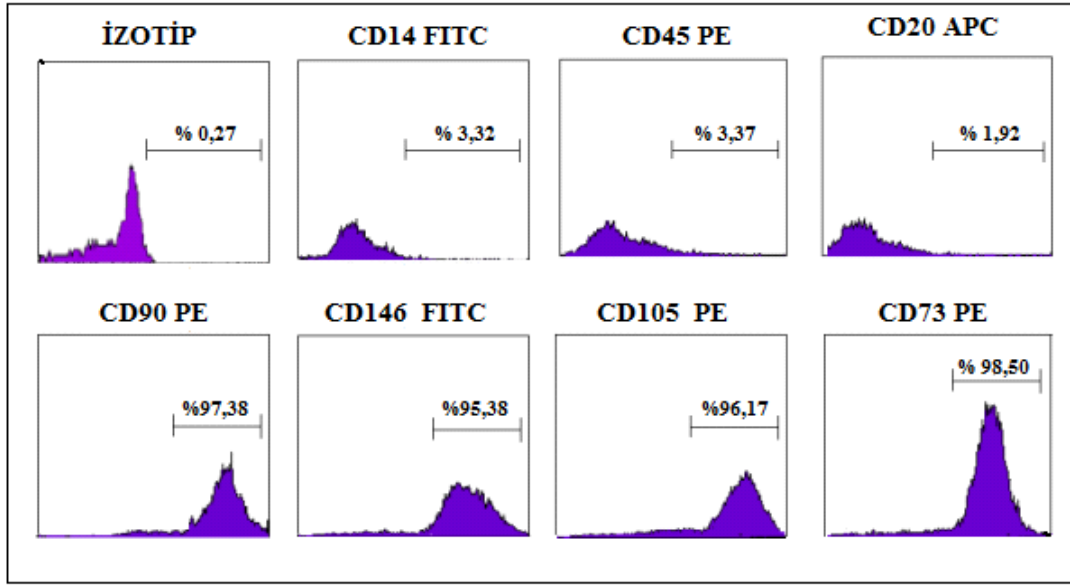
Şekil 6-1. iDF-MKH hücrelerinin morfolojik görünümü

iDF-MKH hücrelerinin birinci kültür (A: P0, 3. gün), birinci pasaja alındıktan sonra (B: P1, 3. gün) ve sonraki alt kültürlerinin (C: P2, 3. gün) invert mikroskobu görüntülerinde, kök hücrelerin fibroblast benzeri iğsi morfolojiye sahip oldukları görülmektedir (Büyütme: A-B-C X10).

6.2 Diş Folikülü Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

6.2.1 iDF-MKH hücrelerin akım sitometri analizi

iDF-MKH hücreleri üçüncü pasaja alındıktan yaklaşık 5 gün sonrasında flask yüzeyinde kofluent oldu ve hücrelerin karakterizasyon analizleri yapıldı. Bu hücrelerin akım sitometrik analizleri sonucunda hematopoetik kök hücre belirteci olan CD14, CD45, CD20 belirteçlerini yüzeylerinde eksprese etmedikleri gösterildi. Aynı zamanda bu hücrelerin kök hücre belirteci olan CD90, CD146, CD105 ve CD73' ü yüzeylerinde eksprese ettikleri gösterildi.



Şekil 6-2. iDF-MKH hücrelerinin immunofenotipik özelliklerinin akım sitometri sonuçları

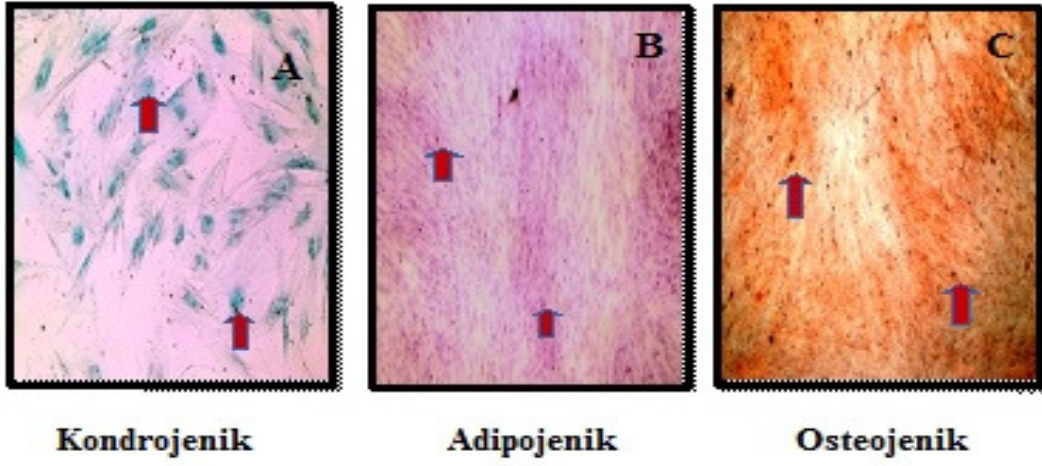
İzotip (%0,27), CD14 (%3.32), CD45 (%3,37), CD20 (%1.92) negatif ekspresyon gösterirken, MKH' lara özgü CD90 (%97,38), CD146 (%95,38), CD105 (%96,17), CD73 (%98,50) pozitif olduğu gösterildi (Şekil 6.2.).

6.2.2 iDF-MKH hücrelerin kondrojenik, adipojenik ve osteojenik farklılaştırılması

Kondrojenik olarak farklılaştırmak için iDF-MKH' larının 2 hafta kondrojenik besiyeri ile kültürleri yapılmıştır. 2 hafta sonrasında Alcian blue ile boyanan hücrelerde Kondrositler tarafından üretilen proteoglikanların mavi renkte boyandığı görüldü (Şekil 6.3.A.).

Adipojenik olarak farklılaştırmak için adipojenik besiyerinde 2 hafta kültürü yapılan iDF-MKH' larının adiposit benzeri farklılaştıkları gösterildi. Kültürün ikinci haftasında Oil red O ile yapılan boyama sonrasında kırmızı renkte hücre içi yağ damlacıkları görüldü. Buradaki yağ damlacıklarının diğer hücre gruplarına oranla daha fazla sayıda ve belirgin oldukları görüldü (Şekil 6.3.B.).

Osteojenik farklılaştırma için uyarılan iDF-MKH hücrelerinin osteoblast benzeri hücrelere farklılaştıkları gözlemlendi. Osteojenik farklılaştırma besiyerine alınan iDF-MKH' leri kültürün 4. haftasının sonunda alizarin kırmızısı ile boyandı ve mineralize kemik nodülleri görüldü (Şekil 6.3.C.).



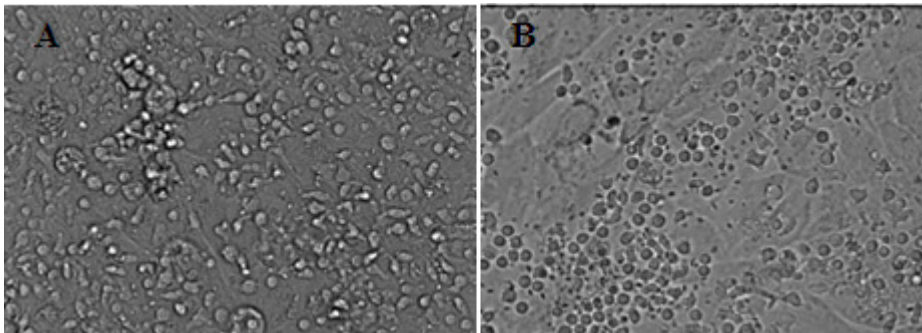
Şekil 6-3. iDF-MKH hücrelerinin farklılaşma özellikleri

Kondrojenik farklılaştırma besiyeri ile kültürü yapılan ve sonrasında Alcian blue ile boyanan iDF-MKH' larda mavi renkli boyanan proteoglikanlar görüldü (A). Adipojenik farklılaştırma besiyeri ile kültürü yapılan ve sonrasında Oil red o ile boyanan iDF-MKH' larda kırmızı renkte yağ damlacıkları görüldü (B). Osteojenik farklılaştırma besiyeri ile kültürü yapılan ve sonrasında alizarin kırmızısı ile boyanan iDF-MKH' larda parlak kırmızı renkte boyanmış osteoblast nodülleri görülmektedir (C).

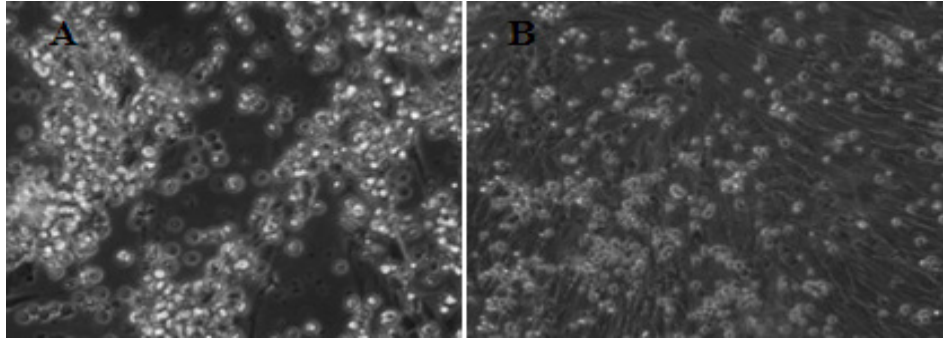
6.3 Görüntüleme

6.3.1 Ko-kültürlerin görüntülenmesi

Tablo 5.3.'de gösterilen gruplar x20 büyütmeyle her 2 saatte bir spinning disk confokal mikroskop ile 72 saat görüntüleme yapıldı. Mikroskop görüntülerinde, kök hücrelerin fibroblast benzeri iğsi, sağlıklı ve Derp 1+ astımlı hastaların lenfosit hücreleri normalden farklı çoğunlukta bir lökosit grubumorfolojiye sahip oldukları görülmektedir.



Şekil 6-4 A)Sağlıklı bireylerin lenfosit hücreleriyle iDF-MKH+CDmix hücrelerinin, B) iDF-MKH+CDmix+IFN- γ hücrelerinin karşılaştırmalı mikroskop görüntüsü (1. gün aynı anda alındı görüntüler, Büyütme: X20)



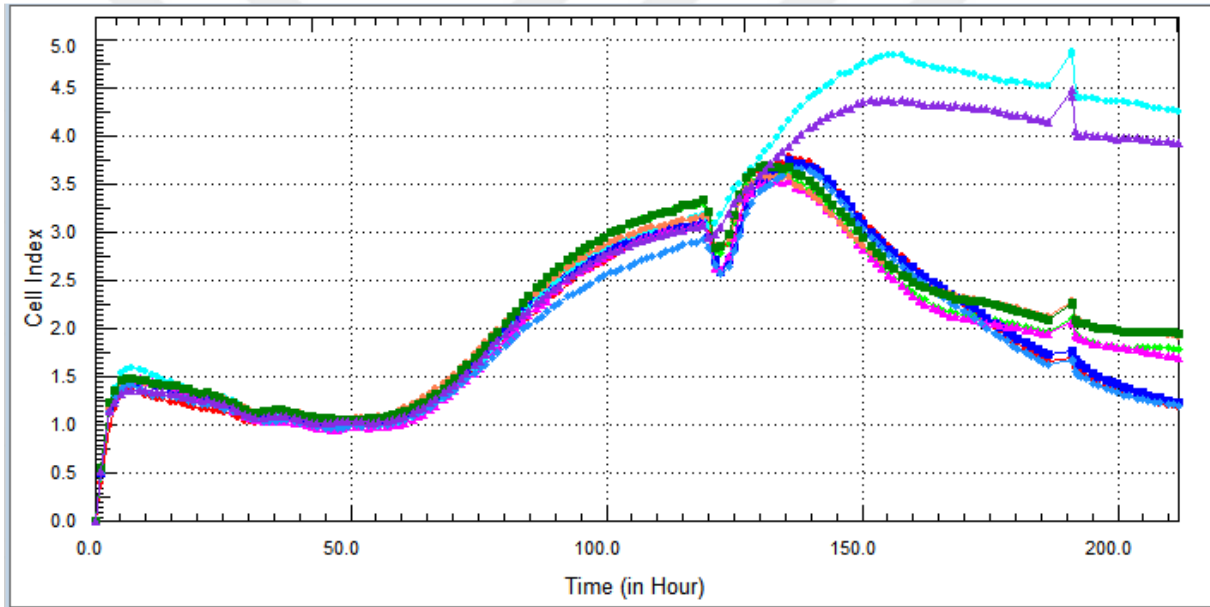
Şekil 6-5 A)Derp 1 + astımlı bireylerin lenfosit hücreleriyle iDF-MKH+CDmix hücrelerinin, B)iDF-MKH+CDmix+IFN- γ hücrelerinin karşılaştırmalı mikroskop görüntüsü (1.gün aynı anda alındı görüntüler, Büyütme: X20)

6.3.2 Hücre proliferasyonunun XCELLigence RTCA ile belirlenmesi

Hücrelerin zamana bağlı olarak çoğalmalarını gözlemlemek amacıyla xCELLigence RTCA sisteminden yararlanılmıştır; sistemin işleyişi Şekil 5.9. ve Şekil 5.10.'da gösterilmiştir. Bunun için hücreler altın kaplı 16 kuyucuklu e-plakanın her bir kuyucuğuna 3×10^4 iDF-MKH hücre/kuyucuk olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır. Eplaka etüve yerleştirilerek 10 dakika bekletilmiş ve 10 dakika sonunda okuma başlatılmıştır. Hücrelerin e-plaka'ya tutunması ve çoğalması için yaklaşık 24 saat bekletilmiştir. 24 saat sonunda hücreler büyüme fazına geçtiği esnada hücrelerin üzerine Tablo 5.4'deki gruplara uygun $1 \mu\text{l}$ IFN γ ilave edilmiş ve plaka etüve yerleştirilmiştir. 24 saat süre sonunda hücrelerin üzerine Tablo 5.4'deki gruplara uygun $1 \mu\text{l}$ CDmix ve Derp 1 + astımlı ve sağlıklı bireylerin 3×10^5 PBMC hücreleri konur. Sistem, 10 dakika ara ile gerçek zamanlı empedans ölçümü alınacak şekilde ayarlanıp 120 saat süre boyunca kültürü yapılmak üzere bırakılmıştır. Sonuç olarak hücrelerin zamana bağlı proliferasyonunu gösteren grafik elde edilmiştir.

Kültür Ortamı	Gruplar
iDF-MKH	-
iDF-MKH+PBMC+CDmix	Der p 1 + Astım
iDF-MKH+PBMC+CDmix	Der p 1 + Astım
iDF-MKH+ PBMC+CDmix	Sağlıklı
iDF-MKH+ PBMC+CDmix	Sağlıklı
iDF-MKH+PBMC+IFN- γ +CDmix	Der p 1 + Astım
iDF-MKH+PBMC+IFN- γ +CDmix	Der p 1 + Astım
iDF-MKH+ PBMC+IFN- γ +CDmix	Sağlıklı
iDF-MKH+ PBMC+IFN- γ +CDmix	Sağlıklı

Şekil 6-6 Hücre proliferasyonunun XCELLigence RTCA ile belirlenmesinde kullanılan gruplar ve grafikteki renkleri (her grup ikişerli çalışıldı)



Şekil 6-7 iDF-MKH'ların 16 kuyucuklu e-plate'lere üzerine Derp 1 + astımlı ve sağlıklı bireylerin PBMC hücreleri ve uyarılar konduktan sonra 72 saatte ki hücrelerin proliferasyonu grafiği

Şekil 6.7.'de iDF-MKH'ların e-plate'lere ilk 5 saatte yüzeye yapışmaya başladıkları görülmektedir. Şekil 6.7.'de iDF-MKH hücreleri üzerindeki proliferatif etkisine bakıldığında, hücreler kontrolle paralel büyüme eğrisi göstermekte ve hücre canlılığı indeksinde kayda değer bir şekilde canlılığı azaltıcı yönde etki görülmektedir. Tüm gruplar ilk 50 saatte ortama adapte olmuş bir miktar büyüme göstermeye başlamışlardır. Deney başlangıcından itibaren 24 ve 48. saatlerde Tablo 6.6'da verilen gruplara uygun olarak CDmix ve IFN- γ uyarılarını kültür ortamına eklenmiştir. İlk 50 saatte uyarıların ilave edilmesiyle beraber gözle görülür bir fark görülmemekle beraber 48. saatte Derp 1 + astımlı ve sağlıklı bireylerden izole edilen PBMC'ler kültür ortamına eklenmiştir.

Buna bağılı gruplarda farklılıklar meydana gelmiştir. Genel uyarıcı CDmix ortama eklendikten sonra ilk 120 saat hücrelerin proliferasyonu sağlamıştır. Bu süreden sonra kültür ortamlarının farklılığına bağılı gruplarda değişiklikler gözlemlenmiştir. Bu değişikliklerden en önemlisi Sağlıklı bireylerin PBMC'lerinin olduğu kültürler canlılığını deney sonlanana kadar devam ettirmişlerdir, aynı şekilde proliferasyonu olmuşlardır. Astımlı bireylerin olduğu grup sağlıklı bireylerin olduğu gruba göre anlamlı bir şekilde hücre canlılığı ve proliferasyonu oranı azalmaya başlamıştır. Astımlı bireylerin olduğu gruplarda kök hücrelerin daha önce IFN- γ uyarılan grup diğer gruba oranla hücre canlılığı ve proliferasyonu daha düşüktür. Genel grafik yorumlandığı zaman kök hücrelerin Derp 1 + astımlı bireylerin PBMC'lerinin olduğu gruplarda sağlıklı bireylerin olduğu gruplara oranla hücre canlılığında ve proliferasyonunda düşüşler gözlenmiştir.

6.4 iDF-MKH' lar Lenfosit Proliferasyonunu İn Vitro Ortamda Baskıladı

iDF-MKH' ların immün baskılayıcı özelliklerini belirlemek amacıyla bu kök hücrelerin, sağlıklı (kontrol, n=7) ve ev tozuna duyarlı (Derp 1+) astımlı bireylerin (n=7) lenfosit hücrelerinin proliferasyonları üzerine etkisi incelendi. Bu amaçla lenfositlerin hem iDF-MKH' larla birlikte hem de iDF-MKH' sız kültürde sırayla uyarımsız (Us), anti-CD3 anti-CD28 (CDmix), Derp1, Dexametasone, 24. saat IFN- γ ve 48.saat IFN- γ uyarımlı koşullarda 72 saat kültürleri yapıldı. Çeşitli uyarıcıların varlığında kök hücrelerin lenfosit proliferasyonu üzerine etkisi incelendi. T testi ile değerlendirilmiştir (Tablo 6.2.)

SAĞLIKLI (KONTROL) GRUP		DERP 1+ ASTIMLI GRUP	
Örnek Adı	%Proliferasyon	Örnek Adı	%Proliferasyon
Us	4,51±0,2	Us	16,95±1,0
Us + iDF-MKH	7,36±0,23	Us + iDF-MKH	13,75±0,4
Mix	30,72±3,1	Mix	40,15±6,6
Mix+ iDF-MKH	15,67±1,5	Mix+ iDF-MKH	8,5±2,3
Derp 1	2,49±1,1	Derp 1	11,20±2,1
Derp 1+iDF-MKH	4,16±1,1	Derp 1+iDF-MKH	4,7±2,0
Dexametasone	3,72±1,2	Dexametasone	9,8±2,5
Dexametasone+iDFMKH	2,9±0,9	Dexametasone +iDF-MKH	5,69±1,8
24. Saat IFN- γ +iDF-MKH	2,4±0,8	24. Saat IFN- γ +iDF-MKH	4,0±1,4
48. Saat IFN - γ	2,5±0,9	48. Saat IFN - γ	8,4±2,3

48. Saat IFN-γ+iDF-MKH	2,85 \pm 1,05	48. Saat IFN-γ+ iDF-MKH	4,4 \pm 1,2
---	-----------------	--	---------------

Tablo 6-1. iDF-MKH hücrelerinin sağlıklı (kontrol) ve ev tozuna duyarlı (Derp 1 +) bireylerin lenfosit hücrelerinin proliferasyonu gösterimi

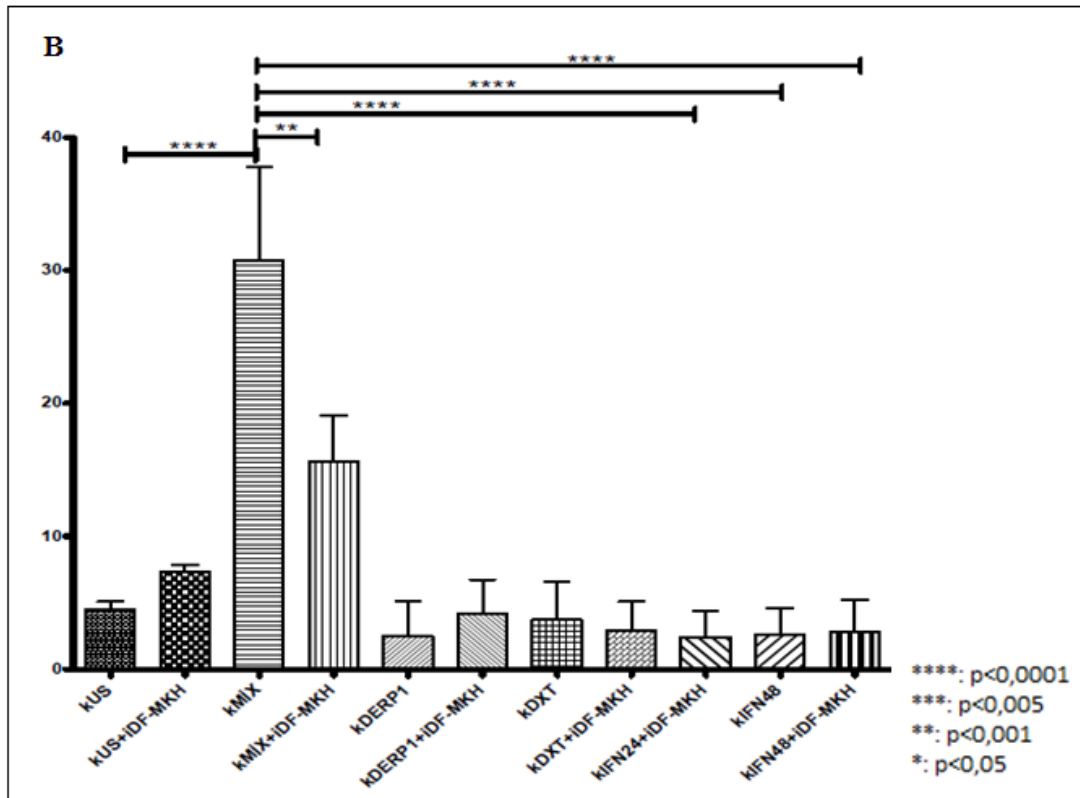
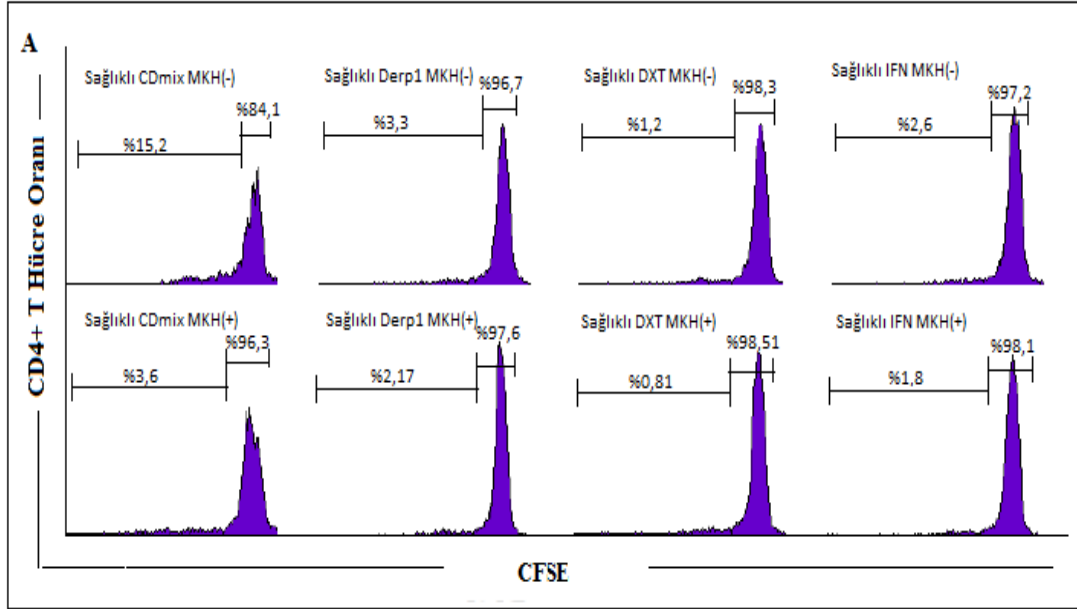
iDF-MKH hücrelerinin olduğu gruplarda diğer gruplara oranla proliferasyonu baskıladıkları görüldü. iDF-MKH hücrelerinin sağlıklı (kontrol) (n=7) ve ev tozuna duyarlı (Derp 1 +) bireylerin (n=7) lenfosit hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki immün baskılayıcı etkisi istatistiksel olarak gösterildi.

Kontrol grubunda elde edilen veriler;

- ✓ **kMix** (30,72 \pm 3,1) grubunda **kUs** (4,51 \pm 0,2) grubuna oranla lenfosit proliferasyonunun anlamlı derecede arttığını gösterdi (P<0,0001).
- ✓ **kMix+iDF-MKH** (15,67 \pm 1,5) grubunda **kMix** (30,72 \pm 3,1) grubuna oranla lenfosit proliferasyonunun anlamlı derecede baskıladığını gösterdi (P<0,002).
- ✓ **kDerp 1** (2,49 \pm 1,1) grubunda **kDerp 1+iDF-MKH** grubuna (4,16 \pm 1,1) oranını baskılandığı fakat anlamlı bir fark olmadığını gösterdi (P<0,3352).
- ✓ **kDxt** (3,72 \pm 1,2) grubunda **kDxt + iDF-MKH** grubuna (2,9 \pm 0,9) oranla anlamlı bir fark olmadığını gösterdi (P<0,6313).
- ✓ **k24. Saat IFN- γ +iDF-MKH** (2,4 \pm 0,8) grubunda **k48. Saat IFN- γ** grubuna (2,5 \pm 0,9) oranla anlamlı bir fark olmadığını gösterdi (P<0,9012).
- ✓ **k24. Saat IFN- γ +iDF-MKH** (2,4 \pm 0,8) grubunda **k48. Saat IFN- γ + iDFMKH** grubuna (2,85 \pm 1,05) oranla anlamlı bir fark olmadığını gösterdi (P<0,7561).
- ✓ **k48. Saat IFN- γ +iDF-MKH**(2,85 \pm 1,05) grubunda **k48. Saat IFN- γ** grubuna (2,5 \pm 0,9) oranla anlamlı bir fark olmadığını gösterdi (P<0,8448).
- ✓ **k24. Saat IFN- γ +iDF-MKH** (2,4 \pm 0,8) grubunda **kMix** (30,72 \pm 3,1) grubuna oranla lenfosit proliferasyonunun anlamlı derecede baskıladığını gösterdi (P<0,0001).

✓ **k48. Saat IFN- γ +iDFMKH** ($2,85\pm 1,05$) grubunda **kMix** ($30,72\pm 3,1$) grubuna oranla lenfosit proliferasyonunun anlamlı derecede baskılandığını gösterdi ($P<0,0001$).

✓ **k48. Saat IFN- γ** ($2,5\pm 0,9$) grubunda **kMix** ($30,72\pm 3,1$) grubuna oranla lenfosit proliferasyonunun anlamlı derecede baskılandığını gösterdi ($P<0,0001$).



Şekil 6-8 iDF-MKH hücrelerinin Sağlıklı (kontrol) bireylerin lenfosit hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki immün baskılayıcı etkisi

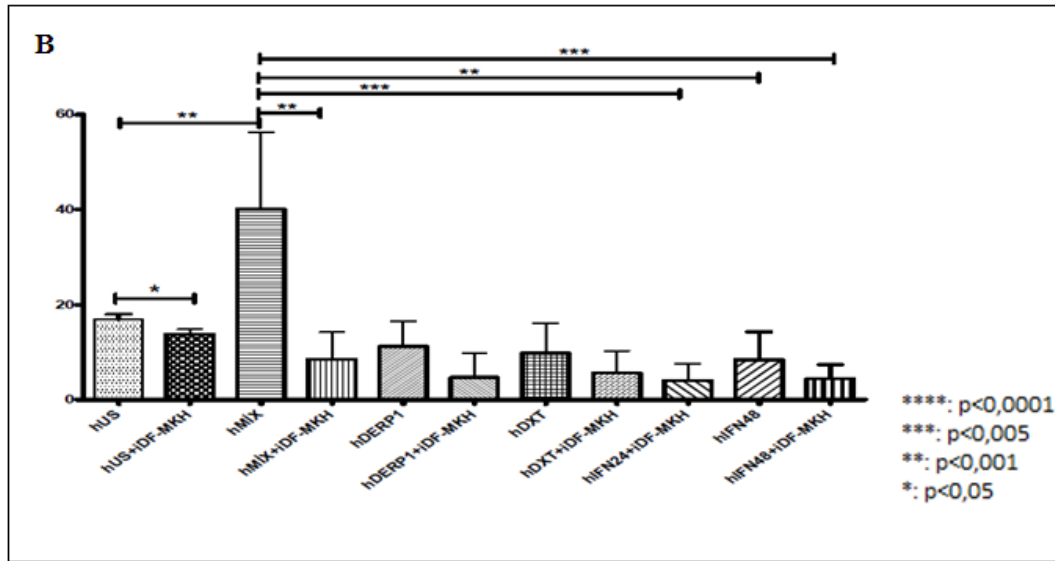
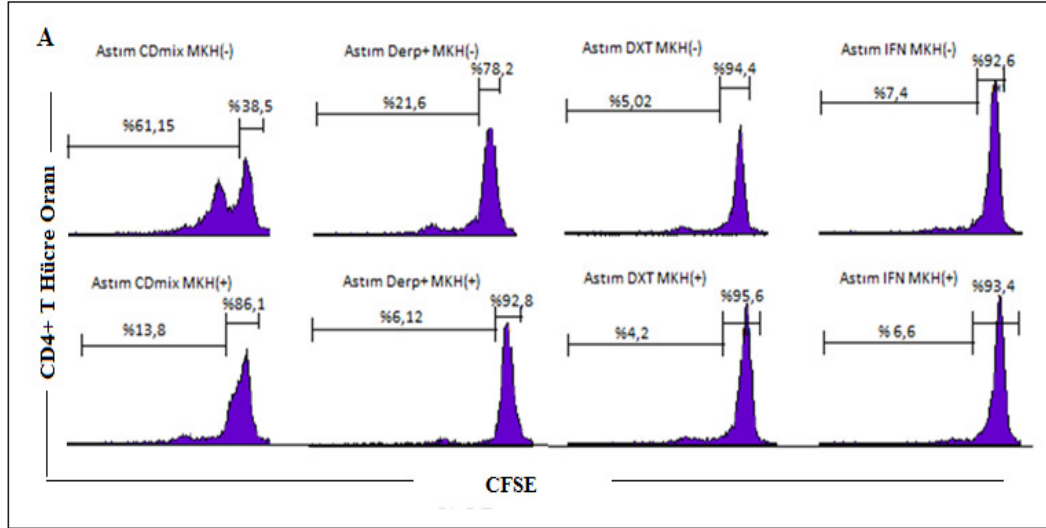
A) iDF-MKH' lı grupların lenfosit proliferasyonunu baskıladığı istatistiksel olarak görüldü B) İki grup arasındaki karşılaştırma için unpaired Student t testi kullanıldı. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001****P<0,0001

Ev tozuna duyarlı (Derp 1 +) astımlı bireylerden elde edilen verilere göre;

- ✓ **hUs+iDF-MKH**(13,75±0,4) grubunda **hUs** (16,95±1,0) grubuna oranla lenfosit proliferasyonunun anlamlı derecede baskılandığını gösterdi (P<0,0189).
- ✓ **hMix** (40,15±6,6) grubunda **hUs**(16,95±1,0) grubuna oranla lenfosit proliferasyonunun anlamlı derecede arttığını gösterdi (P<0,0061).
- ✓ **hMix+ iDF-MKH** (8,5±2,3) grubunda **hMix** (40,15±6,6) grubuna oranla lenfosit proliferasyonunun anlamlı derecede baskılandığını gösterdi (P<0,0011).
- ✓ **hDerp 1** (11,20±2,1) grubunda **hDerp 1+iDF-MKH** grubuna (4,7±2,0) oranını baskılandığı fakat anlamlı bir fark olmadığını gösterdi(P<0,0574).
- ✓ **hDxt** (9,8±2,5) grubunda **hDxt+iDF-MKH** grubuna (5,69±1,8) oranını baskılandığı anlamlı bir fark olmadığını gösterdi (P<0,6313).
- ✓ **h24. Saat IFN-γ+iDF-MKH**(4,0±1,4) grubunda **h48. Saat IFN-γ** grubuna (8,4±2,3) oranını baskılandığı anlamlı bir fark olmadığını gösterdi (P<0,1522).
- ✓ **h24. Saat IFN-γ+iDF-MKH**(4,0±1,4) grubunda **h48. Saat IFN-γ + iDFMKH** grubuna (4,4±1,2) oranla anlamlı bir fark olmadığını gösterdi (P<0,8553).
- ✓ **h48. Saat IFN-γ+iDFMKH** (4,4±1,2) grubunda **h48. Saat IFN-γ** grubuna (8,4±2,3) oranını baskılandığı fakat anlamlı bir fark olmadığını gösterdi (P<0,1681).
- ✓ **h24. Saat IFN-γ+iDF-MKH** (4,0±1,4) grubunda **hMix** (40,15±6,6) grubuna oranla baskılandığı oranla lenfosit proliferasyonunun anlamlı derecede baskılandığı gösterdi (P<0,0003).

✓ **h48. Saat IFN-γ+iDFMKH** (4,4±1,2) grubundah**Mix** (40,15±6,6) grubuna oranla lenfosit proliferasyonunun anlamlı derecede baskıladığını gösterdi (P<0,0003).

✓ **hMix** (40,15±6,6) grubunda **h48. Saat IFN-γ** (8,4±2,3) grubuna oranla lenfosit proliferasyonunun anlamlı derecede baskıladığını gösterdi (P<0,0011).

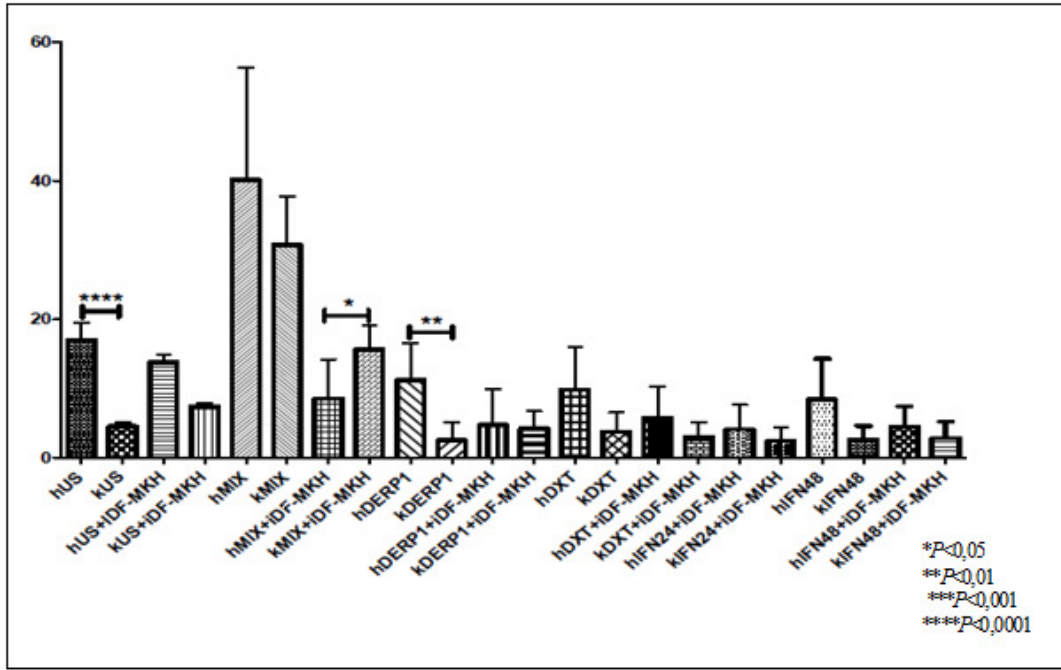


Şekil 6-9 iDF-MKH hücrelerinin ev tozuna duyarlı (Derp1 +) astımlı bireylerin lenfosit hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki immün baskılayıcı etkisi

A) Akım sitometri cihazı ile h1'in (ev tozuna duyarlı astımlı) proliferasyon sonucu, ev tozuna duyarlı (Derp1 +) astımlı bireylerin istatistiksel gösterimi B)iDF-MKH'lı grupların lenfosit proliferasyonunu baskıladığı görüldü. İki grup arasındaki karşılaştırma için unpaired Student T testi kullanıldı. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001

Ev tozuna duyarlı (Derp1 +) astımlı bireyler ile sağlıklı (kontrol) bireyler arasındaki karşılaştırmalarda elde edilen verilere göre;

- ✓ **hUs** (16,95±1,0) grubunda **kUs** (4,51±0,2) grubuna oranla lenfosit proliferasyonunun anlamlı derecede arttığını gösterdi (P<0,0001).
- ✓ **hMix** (40,15±6,6) grubunda **kMix** (30,72±3,1) grubuna oranla anlamlı bir fark olmadığını gösterdi (P<0,0061).
- ✓ **hMix+iDF-MKH** (8,5±2,3) grubunda **kMix+iDF-MKH** (15,67±1,5) grubuna oranla lenfosit proliferasyonunun anlamlı derecede arttığını gösterdi (P<0,0365).
- ✓ **hDerp 1** (11,20±2,1) grubunda **kDerp 1** grubuna (2,49±1,1) oranla lenfosit proliferasyonunun anlamlı derecede arttığını gösterdi (P<0,0089).
- ✓ **hDerp 1+iDF-MKH** (4,7±2,0) grubunda **kDerp 1+iDF-MKH** grubuna (4,16±1,1) oranla anlamlı bir fark olmadığını gösterdi (P<0,8354).
- ✓ **hDxt** (9,8±2,5) grubunda **kDxt** grubuna (3,72±1,2) oranla anlamlı bir fark olmadığını gösterdi (P<0,0727).
- ✓ **hDxt+iDF-MKH** (5,69±1,8) grubunda **kDxt+iDF-MKH** grubuna (2,9±0,9) oranla anlamlı bir fark olmadığını gösterdi (P<0,2480).
- ✓ **h24. Saat IFN-γ+iDF-MKH** (4,0±1,4) grubunda **k24. Saat IFN-γ+iDF-MKH** grubuna (2,4±0,8) oranla anlamlı bir fark olmadığını gösterdi (P<0,3723).
- ✓ **h48. Saat IFN-γ** (8,4±2,3) grubunda **k48. Saat IFN-γ** grubuna (2,5±0,9) oranını baskılandığı fakat anlamlı bir fark olmadığını gösterdi (P<0,0640).
- ✓ **h48. Saat IFN-γ+iDFMKH** (4,4±1,2) grubunda **k48. Saat IFN-γ+iDFMKH** (2,85±1,05) oranla anlamlı bir fark olmadığını gösterdi (P<0,3576).



Şekil 6-10 iDF-MKH hücrelerinin ev tozuna duyarlı (Derp 1 +) bireyler ile sağlıklı (kontrol) bireylerin lenfosit hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki immün baskılayıcı etkisinin karşılaştırmalı istatistiksel olarak gösterimi

iDF-MKH'lı gruplarda lenfosit hücrelerinin baskılandığı (Derp 1 +) bireylerde, sağlıklı bireylere oranla daha anlamlı baskılandığı görüldü. İki grup arasındaki karşılaştırma için unpaired Student *t* testi kullanıldı. * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$; **** $P<0,0001$

6.5 iDF-MKH Hücrelerinin CD4⁺FoxP3⁺ Regülatör T Hücrelerinin Analizi

iDF-MKH hücrelerinin hücrelerinin CD4⁺FoxP3⁺lenfosit hücreleri üzerine etkisi akım sitometri cihazında analiz edildi. Bu amaçla lenfositlerin hem iDF-MKH' lerle birlikte hem de iDF-MKH' sız kültürde sırayla uyarımsız (Us), anti-CD3 anti-CD28 (CDmix), Derp 1, dexametasone, 24. saat IFN- γ ve 48.saat IFN- γ uyarımlı koşullarda 72 saat kültürleri yapıldı. Çeşitli uyanların varlığında kök hücrelerin lenfosit proliferasyonu üzerine etkisi incelendi ve T testi ile değerlendirildi (Tablo 6.3.).

SAĞLIKLI (KONTROL) GRUP		DERP 1+ ASTIMLI GRUP	
Örnek Adı	%CD4 ⁺ FOXP3 ⁺	Örnek Adı	%CD4 ⁺ FOXP3 ⁺
Us	1,78±0,06	Us	1,58±0,11
Us + iDF-MKH	4,4±0,1	Us + iDF-MKH	5,19±0,8
Mix	2,43±0,20	Mix	1,75±0,22
Mix+ iDF-MKH	4,11±0,52	Mix+ iDF-MKH	5,60±0,63
Derp 1	4,10±0,52	Derp 1	3,34±0,54
Derp 1+iDF-MKH	3,93±0,10	Derp 1+iDF-MKH	4,18±0,18
Dexametasone	1,62±0,14	Dexametasone	2,54±0,09
Dexametasone +iDF-MKH	1,13±0,02	Dexametasone +iDF-MKH	2,24±0,06
24. Saat IFN - γ + iDF-MKH	3,63±0,36	24. Saat IFN - γ + iDF-MKH	5,51±1,15
48. Saat IFN - γ	3,68±1,1	48. Saat IFN - γ	3,57±0,31
48. Saat IFN - γ + iDF-MKH	4,73±0,95	48. Saat IFN - γ + iDF-MKH	4,96±1,01

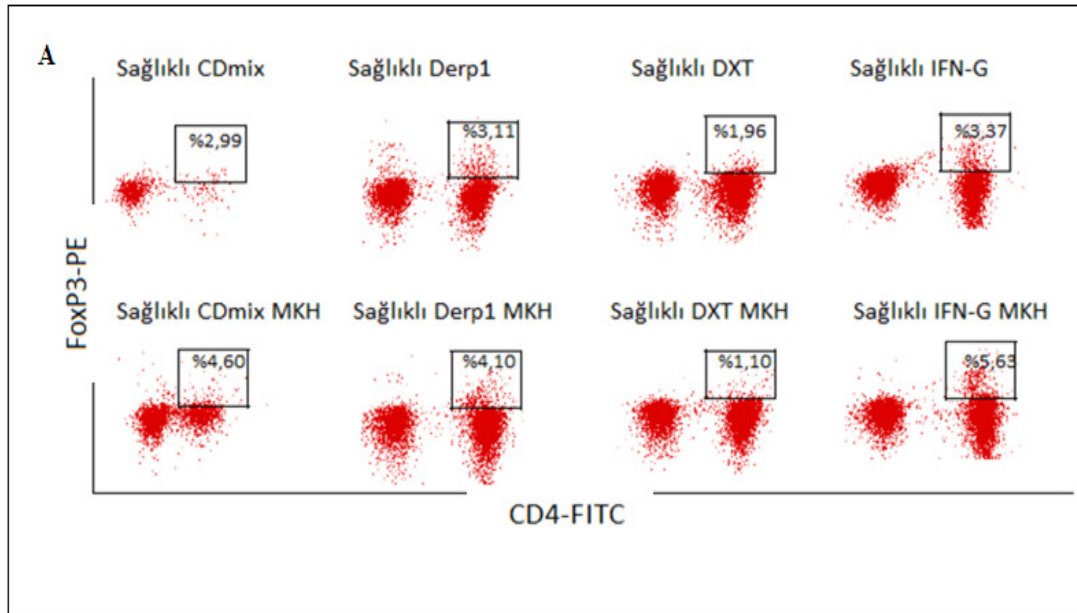
Tablo 6-2. iDF-MKH hücrelerinin; sağlıklı (kontrol) ve ev tozuna duyarlı (Derp 1 +) astımlı bireylerin CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücreleri üzerine etkisi

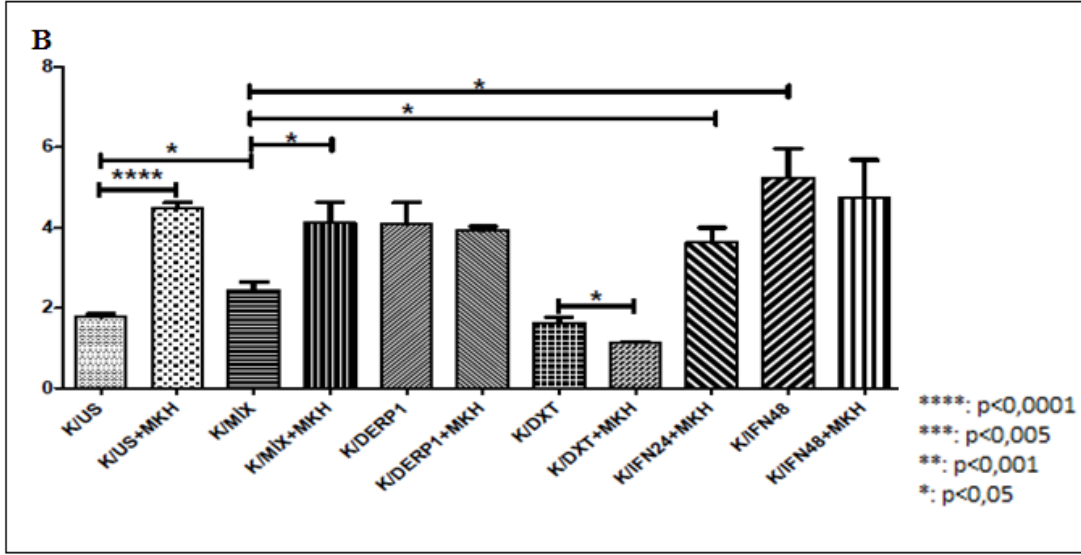
iDF-MKH hücrelerinin CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücrelerinin oranı üzerindeki arttırıcı etkisi istatistiksel olarak gösterilmiştir.

Elde edilen verilere göre;

- ✓ **kUs+iDF-MKH** (4,4±0,1) **kUs** grubuna (1,78±0,06) oranla CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücrelerindeki oranının anlamlı derecede arttığını gösterdi (P<0,0001).
- ✓ **kMix** grubunda (2,43±0,20) **kUs** (1,78±0,06) grubuna oranla CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücre oranını anlamlı derecede arttırdığı gösterdi (P<0,0234).
- ✓ **kMix** grubunda (2,43±0,20) **kMix+iDF-MKH**(4,11±0,52) grubuna oranla CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücre oranını anlamlı derecede arttırdığı gösterdi (P<0,0246).
- ✓ **kDerp 1** grubunda (4,10±0,52) **kDerp 1+iDF-MKH** (3,93±0,10) grubuna oranla CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücre oranını anlamlı bir fark olmadığı görüldü (P<0,1784).
- ✓ **kDxt** grubunda (1,62±0,14) **kDxt+iDF-MKH** (1,13±0,02) grubuna oranla CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücre oranını anlamlı bir fark olmadığı görüldü (P<0,0138).

- ✓ **k24. Saat IFN- γ +iDF-MKH** grubunda ($3,63\pm 0,36$) **k48. Saat IFN- γ** ($3,68\pm 1,1$) grubuna oranla $CD4^+FoxP3^+$ lenfosit hücre oranını anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($P<0,969$).
- ✓ **k24. Saat IFN- γ +iDF-MKH** grubunda ($3,63\pm 0,36$) **k48. Saat IFN- γ +iDF-MKH** ($4,73\pm 0,95$) grubuna oranla $CD4^+FoxP3^+$ lenfosit hücre oranını anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($P<0,3266$).
- ✓ **k48. Saat IFN- γ +iDF-MKH** grubunda ($4,73\pm 0,95$) **k48. Saat IFN- γ** ($3,68\pm 1,1$) grubuna oranla $CD4^+FoxP3^+$ lenfosit hücre oranını anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($P<0,6862$).
- ✓ **kMix** grubunda ($2,43\pm 0,20$) **k24. Saat IFN- γ +iDF-MKH** ($3,63\pm 0,36$) grubuna oranla $CD4^+FoxP3^+$ lenfosit hücre oranını anlamlı derecede arttırdığı gösterdi ($P<0,0299$).
- ✓ **kMix** grubunda ($2,43\pm 0,20$) **k48. Saat IFN- γ** ($3,68\pm 1,1$) grubuna oranla $CD4^+FoxP3^+$ lenfosit hücre oranını anlamlı derecede arttırdığı gösterdi ($P<0,0101$).
- ✓ **kMix** grubunda ($2,43\pm 0,20$) **k48. Saat IFN- γ +iDF-MKH** ($4,73\pm 0,95$) grubuna oranla $CD4^+FoxP3^+$ lenfosit hücre oranını arttırdığı fakat anlamlı bir fark olmadığını gösterdi ($P<0,0577$).





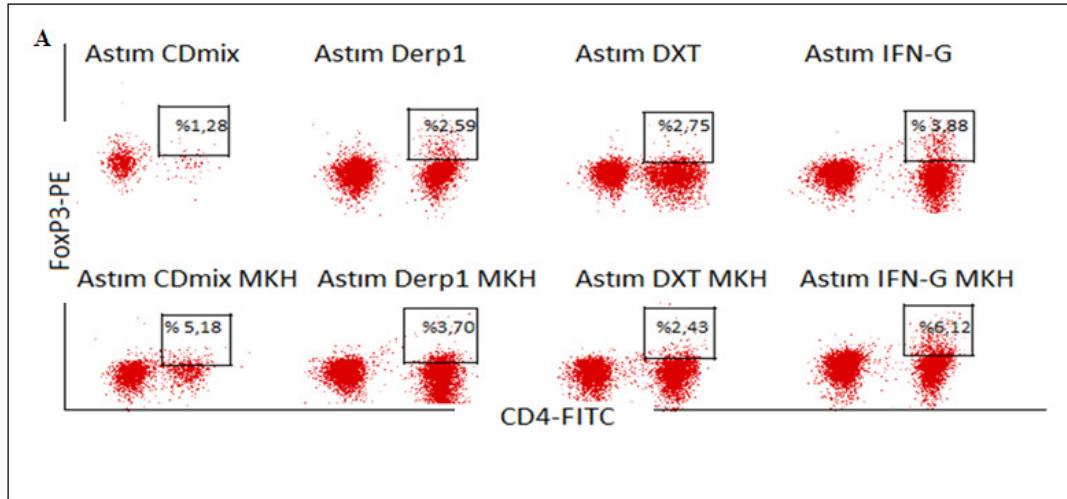
Şekil 6-11 iDF-MKH hücrelerinin; sağlıklı (kontrol) bireylerin CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücreleri üzerine etkisi

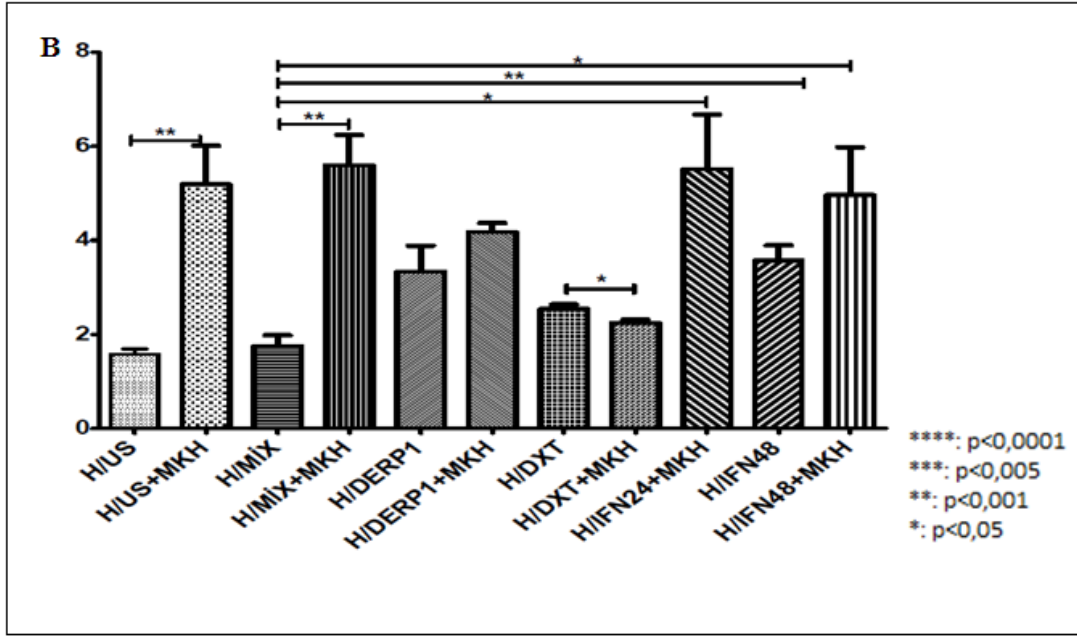
A) Akım sitometri cihazı ile K1'in in vitro olarak iDF-MKH hücrelerinin CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücre oranını arttırdığı gösterildi. Sağlıklı (kontrol) bireylerin CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücre oranı istatistiksel gösterimi. B) iDF-MKH hücrelerinin olduğu gruplarda CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücrelerinin oranı üzerindeki arttırıcı etkisi gösterildi. İki grup arasındaki karşılaştırma için unpaired Student t testi kullanıldı. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001

Ev tozuna duyarlı (Derp 1) astımlı bireylerden elde edilen verilere göre;

- ✓ **hUs+iDF-MKH** grubunda (5,19±0,8) **hUs** grubuna (1,58±0,11) oranla CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücrelerindeki oranının anlamlı derecede arttığını gösterdi (P<0,0047).
- ✓ **hMix** grubunda (1,75±0,22) **hUs** (1,58±0,11) grubuna oranla CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücre oranını anlamlı bir fark olmadığı görüldü (P<0,5253).
- ✓ **hMix** grubunda (1,75±0,22) **hMix+iDF-MKH** (5,60±0,63) grubuna oranla CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücre oranının anlamlı derecede arttığını gösterdi (P<0,0013).
- ✓ **hDerp 1** grubunda (3,34±0,54) **hDerp 1+iDF-MKH** (4,18±0,18) grubuna oranla CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücre oranını anlamlı bir fark olmadığı görüldü (P<0,1965).
- ✓ **hDxt** grubunda (2,54±0,09) **hDxt+iDF-MKH** (2,24±0,06) grubuna oranla CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücre oranını anlamlı derecede arttığını gösterdi (P<0,0438).

- ✓ **h24. Saat IFN- γ +iDF-MKH** grubunda ($5,51\pm 1,15$) **h48. Saat IFN- γ** ($3,57\pm 0,31$) grubuna oranla CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücre oranını anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($P<0,1579$).
- ✓ **h24. Saat IFN- γ +iDF-MKH** grubunda ($5,51\pm 1,15$) **h48. Saat IFN- γ +iDF-MKH** ($4,96\pm 1,01$) grubuna oranla CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücre oranını anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($P<0,0741$).
- ✓ **h48. Saat IFN- γ +iDF-MKH** grubunda ($4,96\pm 1,01$) **h48. Saat IFN- γ** ($3,57\pm 0,31$) grubuna oranla CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücre oranını anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($P<0,2380$).
- ✓ **hMix** grubunda ($1,75\pm 0,22$) **h24. Saat IFN- γ +iDF-MKH** ($5,51\pm 1,15$) grubuna oranla CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücre oranını anlamlı derecede arttırdığı gösterdi ($P<0,0190$).
- ✓ **hMix** grubunda ($1,75\pm 0,22$) **h48. Saat IFN- γ** ($3,57\pm 0,31$) grubuna oranla CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücre oranını anlamlı derecede arttırdığı gösterdi ($P<0,0035$).
- ✓ **hMix** grubunda ($1,75\pm 0,22$) **h48. Saat IFN- γ +iDF-MKH** ($4,96\pm 1,01$) grubuna oranla CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücre oranını anlamlı derecede arttırdığı gösterdi ($P<0,0577$).





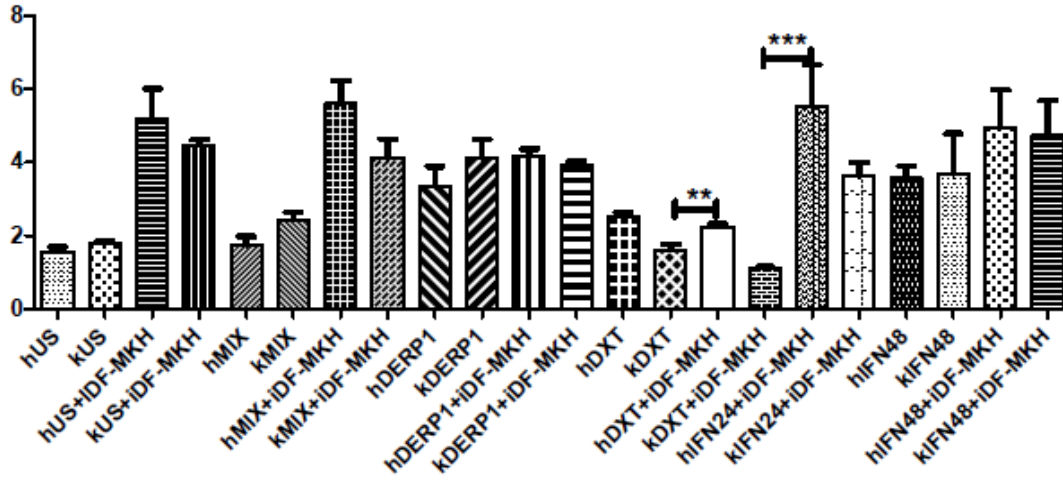
Şekil 6-12. iDF-MKH hücrelerinin; astımlı ev tozuna duyarlı (Derp 1 +) bireylerin CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücreleri üzerine etkisi

A) Akım sitometri cihazı ile H1'in in vitro olarak iDF-MKH hücrelerinin CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücre oranını arttırdığı gösterildi. Ev tozuna duyarlı (Derp 1 +) astımlı bireylerin CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücre oranı istatistiksel gösterimi. B) iDF-MKH hücrelerinin bulunduğu gruplar da CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücrelerinin oranı üzerindeki arttırıcı etkisi istatistiksel olarak görüldü. İki grup arasındaki karşılaştırma için unpaired Student T testi kullanıldı *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001

Ev tozuna duyarlı (Derp 1 +) astımlı bireyler ile sağlıklı (kontrol) bireylerin CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücre oranlarının karşılaştırmalarından elde verilere göre;

- ✓ **hUs** (1,58±0,11) grubunda **kUs** (1,78±0,06) grubuna oranla CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücre oranını anlamlı bir fark olmadığı görüldü (P<0,1827).
- ✓ **hMix** (1,75±0,22) grubunda **kMix** (2,43±0,20) grubuna oranla CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücre oranını anlamlı bir fark olmadığı görüldü (P<0,0683).
- ✓ **hMix+iDF-MKH** (5,60±0,63) grubunda **kMix+iDF-MKH** (4,11±0,52) grubuna oranla CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücre oranını anlamlı bir fark olmadığı görüldü (P<0,1211).

- ✓ **hDerp 1** (3,34±0,54) grubunda **kDerp 1** grubuna (4,10±0,52) grubuna oranla CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücre oranını anlamlı bir fark olmadığı görüldü (P<0,3537).
- ✓ **hDerp1+iDF-MKH** (4,8±0,18) grubunda **kDerp1+iDF-MKH** (3,93±0,10) grubuna oranla CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücre oranını anlamlı bir fark olmadığı görüldü (P<0,2865).
- ✓ **hDxt** (2,54±0,09) grubunda **kDxt** grubuna (1,62±0,14) oranla CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücre oranının anlamlı derecede arttığını gösterdi (P<0,0017).
- ✓ **hDxt+iDF-MKH** (2,24±0,06) grubunda **kDxt+iDF-MKH** grubuna (1,13±0,02) oranla CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücre oranının anlamlı derecede arttığını gösterdi (P<0,0001).
- ✓ **h24. Saat IFN-γ+iDF-MKH** (5,51±1,15) grubunda **k24. Saat IFN-γ+iDF-MKH** grubuna (3,63±0,36) oranla CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücre oranını anlamlı bir fark olmadığı görüldü (P<0,1735).
- ✓ **h48. Saat IFN-γ** (3,57±0,31) grubunda **k48. Saat IFN-γ** grubuna (3,68±1,1) oranla CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücre oranını anlamlı bir fark olmadığı görüldü (P<0,9253).
- ✓ **h48. Saat IFN-γ+iDFMKH** (4,96±1,01) grubunda **k48. Saat IFN-γ+iDFMKH** (4,73±0,95) grubuna oranla CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücre oranını anlamlı bir fark olmadığı görüldü (P<0,8715).



Şekil 6-13. iDF-MKH hücrelerinin; sağlıklı (kontrol) bireylerin ve ev tozuna duyarlı (Derp 1 +) astımlı bireylerin CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücreleri üzerine etkisi

Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. İki grup arasındaki karşılaştırma için unpaired Student T testi kullanıldı. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001

Yapılan analizler sonucunda iDF-MKH grubu ve iDF-MKH+IFN- γ grubu hücrelerinin diğer hücre gruplarına oranla CD4⁺FoxP3⁺lenfosit hücre oranını daha fazla arttırdığı görüldü.

6.6 iDF-MKH Hücreleri Lenfosit Hücrelerindeki Annexin V canlı hücre Gösteriminin Arttırımı

iDF-MKH hücrelerinin lenfosit hücrelerinin apoptozu üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla Annexin-V canlı hücre oranına bakıldı. Bu amaçla lenfositlerin hem iDF-MKH' lerle birlikte hem de iDF-MKH'sız kültürde sırayla uyarımsız (US), anti-CD2, anti-CD3 anti-CD28 (CDmix), derp1, dexametasone, 24. saat IFN- γ ve 48.saat IFN- γ uyarımlı koşullarda 72 saat kültürleri yapıldı. Akım sitometri cihazında Annexin-V analizleri yapıldı ve ve T testi ile değerlendirildi (Tablo 6.4.).

SAĞLIKLI (KONTROL) GRUP		DERP 1+ ASTIMLI GRUP	
Örnek Adı	Canlılık	Örnek Adı	Canlılık
Us	54,99±1,64	Us	62,75±1,59
Us +iDF-MKH	61,88±2,0	Us +iDF-MKH	62,70±1,3
Mix	63,32±6,60	Mix	24,82±0,82
Mix+ iDF-MKH	64,36±7,68	Mix+ iDF-MKH	72,67±1,35
Derp 1	67,92±2,48	Derp 1	57,50±2,10
Derp 1+iDF-MKH	76,01±2,55	Derp 1+iDF-MKH	92,33±1,2
Dexamethasone	75,10±4,21	Dexamethasone	74,02±7,0
Dexamethasone +iDF-MKH	86,04±4,03	Dexamethasone +iDMKH	75,58±8,9
24. Saat IFN - γ + iDF-MKH	83,54±3,79	24. Saat IFN - γ +iDMKH	95,50±088
48. Saat IFN - γ	75,01 ± 6,395	48. Saat IFN - γ	74,0±1,46
48. Saat IFN-γ+ iDF-MKH	88,29±3,28	48. Saat IFN- γ+ iDFMKH	76,21±7,6

Tablo 6-3. iDF-MKH hücrelerinin; sağlıklı (kontrol) ve ev tozuna duyarlı (Derp 1 +) bireylerin lenfosit hücrelerindeki Annexin V canlı hücre gösterimi üzerine etkisinin istatistiksel verileri

Elde edilen veriler;

- ✓ **kUs+iDF-MKH** (61,88±2,0) **kUs** grubuna (54,99±1,64) oranla Annexin V canlı hücre oranının anlamlı derecede arttığını gösterdi (P<0,0242).
- ✓ **kMix** grubunda (63,32±6,60) **kUs** (54,99±1,64) grubuna oranla Annexin V canlı hücre oranını anlamlı bir fark olmadığı görüldü(P<0,2493).
- ✓ **kMix** grubunda (63,32±6,60) **kMix+iDF-MKH** (64,36±7,68) grubuna oranla Annexin V canlı hücre oranını anlamlı bir fark olmadığı görüldü(P<0,9203).
- ✓ **kDerp 1** grubunda (67,92±2,48) **kDerp 1+iDF-MKH** (76,01±2,55) grubuna oranla Annexin V canlı hücre oranını anlamlı derecede arttırdığı gösterdi (P<0,0446).
- ✓ **kDxt** grubunda (75,10±4,21) **kDxt+iDF-MKH** (86,04±4,03) grubuna oranla Annexin V canlı hücre oranını anlamlı bir fark olmadığı görüldü (P<0,0901).
- ✓ **k24. Saat IFN-γ+iDF-MKH** grubunda (83,54±3,79) **k48. Saat IFN-γ+iDF-MKH** (88,29±3,28) grubuna oranla Annexin V canlı hücre oranını anlamlı bir fark olmadığı görüldü (P<0,3672).

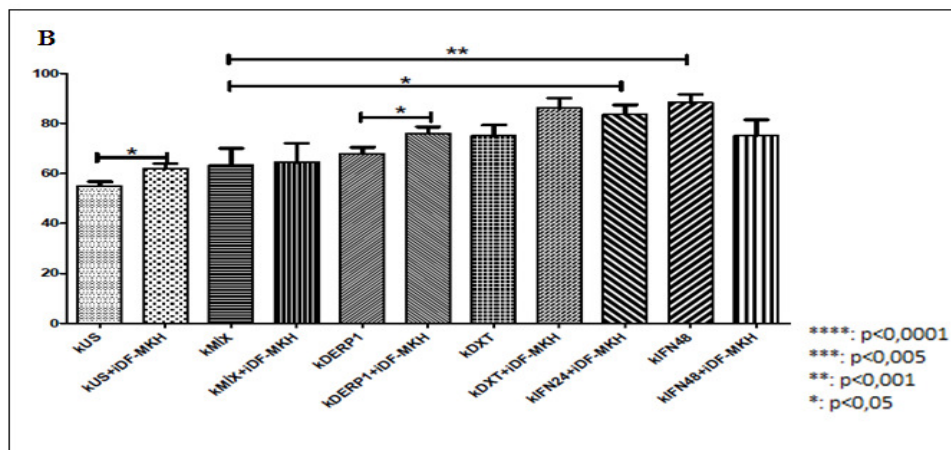
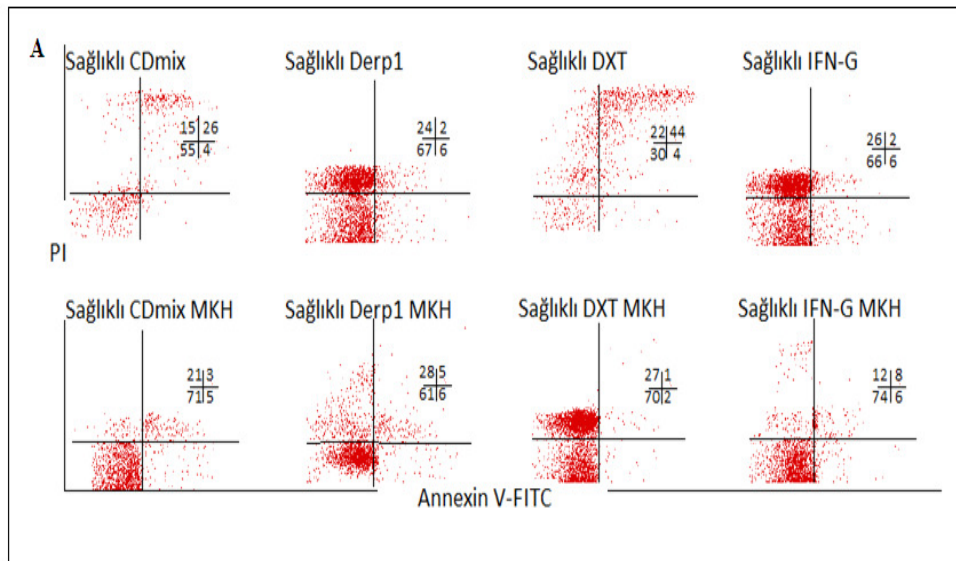
✓ **k24. Saat IFN-y+iDF-MKH** grubunda ($83,54 \pm 3,79$) **k48. Saat IFN-y** ($75,01 \pm 6,39$) grubuna oranla Annexin V canlı hücre oranını anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($P < 0,2779$).

✓ **k48. Saat IFN-y** grubunda ($75,01 \pm 6,39$) **k48. Saat IFN-y+iDF-MKH** ($88,29 \pm 3,28$) grubuna oranla Annexin V canlı hücre oranını anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($P < 0,0947$).

✓ **kMix** grubunda ($63,32 \pm 6,60$) **k24. Saat IFN-y+iDF-MKH** ($83,54 \pm 3,79$) grubuna oranla Annexin V canlı hücre oranını anlamlı derecede arttırdığı gösterdi ($P < 0,0241$).

✓ **kMix** grubunda ($63,32 \pm 6,60$) **k48. Saat IFN-y+iDF-MKH** ($88,29 \pm 3,28$) grubuna oranla Annexin V canlı hücre oranını anlamlı derecede arttırdığı gösterdi ($P < 0,0070$).

✓ **kMix** grubunda ($63,32 \pm 6,60$) **k48. Saat IFN-y** ($75,01 \pm 6,39$) grubuna oranla Annexin V canlı hücre oranını arttırdığı fakat anlamlı bir fark olmadığını gösterdi ($P < 0,2321$).



Şekil 6-14. iDF-MKH hücrelerinin sağlıklı (kontrol) bireylerin lenfosit hücrelerindeki Annexin V canlı hücre oranı üzerindeki arttırıcı etkisi istatistiksel olarak gösterimi

A) iDF-MKH+IFN- γ 'lı gruplarda Annexin V canlı hücre oranı anlamlı derecede arttığı görüldü.

B) Akım sitometri cihazı ile K1'in Annexin V gösterimi. İn vitro olarak iDF-MKH hücrelerinin; sağlıklı (kontrol) bireylerin lenfosit hücrelerindeki Annexin V canlı hücre gösterimi üzerine etkisi istatistiksel olarak gösterildi. İki grup arasındaki karşılaştırma için unpaired Student *t* testi kullanıldı. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$

Ev tozuna duyarlı (Derp 1 +) astımlı bireylerden elde edilen verilere göre;

✓ **hUs+iDF-MKH** grubunda (62,70±1,3) **hUs** grubuna (62,75±1,59) oranla Annexin V canlı hücre oranının anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($P < 0,9813$).

✓ **hMix** grubunda (24,82±0,82) **hUs** (62,75±1,59) grubuna oranla Annexin V canlı hücre oranını anlamlı derecede arttırdığı gösterdi ($P < 0,0001$).

✓ **hMix** grubunda (24,82±0,82) **hMix+iDF-MKH** (72,67±1,35) grubuna oranla Annexin V canlı hücre oranının anlamlı derecede arttığını gösterdi ($P < 0,0001$).

✓ **hDerp 1** grubunda (57,50±2,10) **hDerp 1+iDF-MKH** (92,33±1,2) grubuna oranla Annexin V canlı hücre oranını anlamlı derecede arttırdığı gösterdi ($P < 0,0001$).

✓ **hDxt** grubunda (74,02±7,0) **hDxt+iDF-MKH** (75,58±8,9) grubuna oranla Annexin V canlı hücre oranını anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($P < 0,8940$).

✓ **h24. Saat IFN- γ +iDF-MKH** grubunda (95,50±088) **h48. Saat IFN- γ** (74,0±1,46) grubuna oranla Annexin V canlı hücre oranını anlamlı derecede arttırdığı gösterdi ($P < 0,0001$).

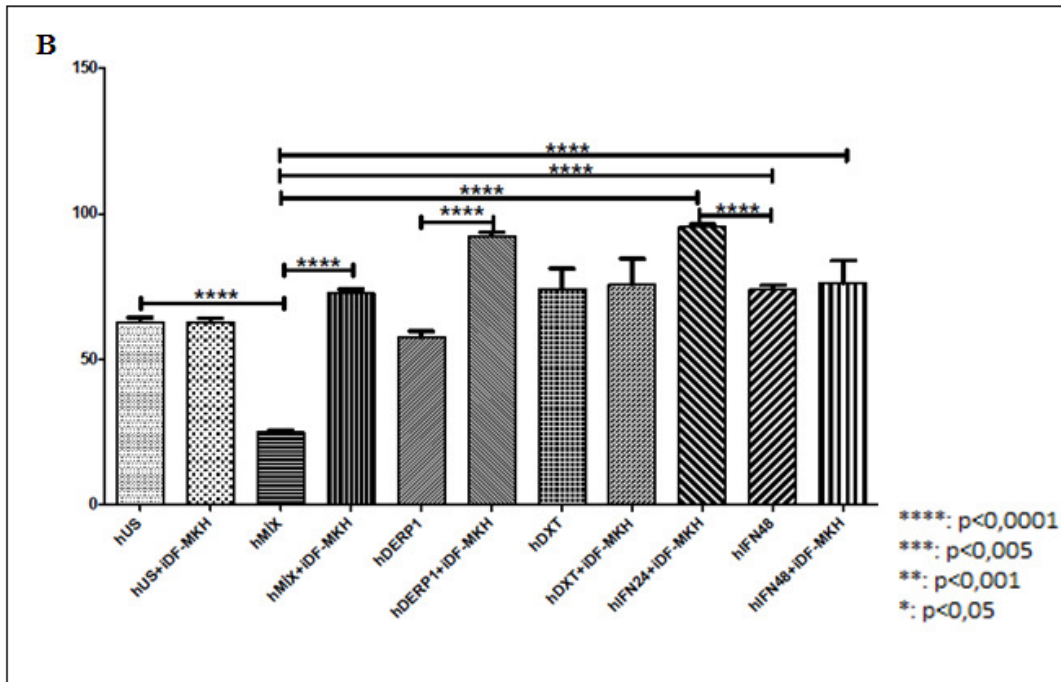
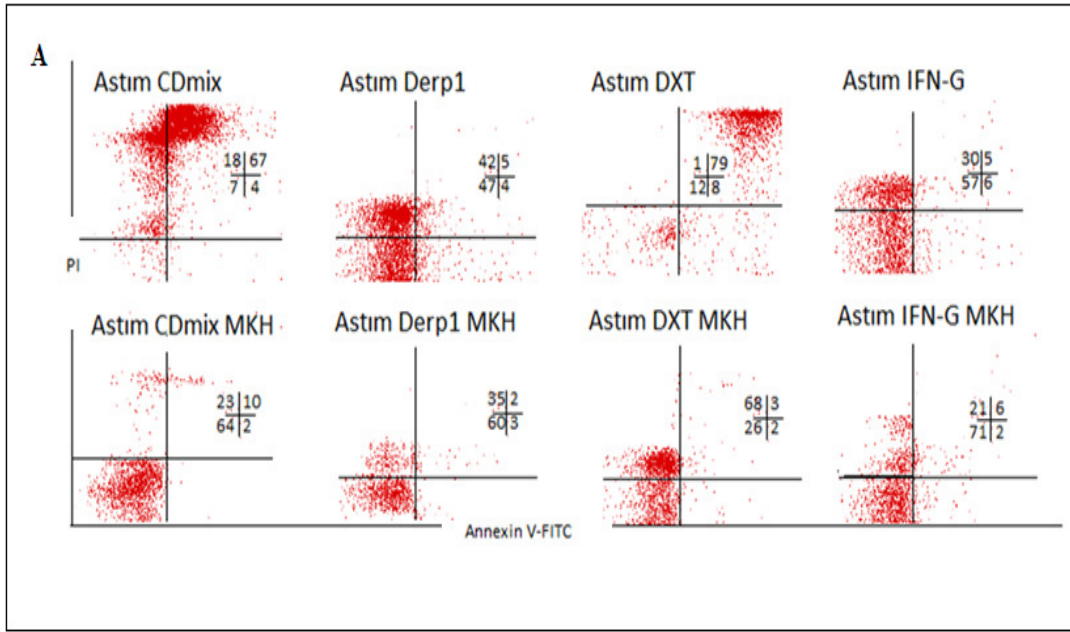
✓ **h24. Saat IFN- γ +iDF-MKH** grubunda (95,50±088) **h48. Saat IFN- γ +iDF-MKH** (76,21±7,6) grubuna oranla Annexin V canlı hücre oranını anlamlı derecede arttırdığı gösterdi ($P < 0,0312$).

✓ **h48. Saat IFN- γ +iDF-MKH** grubunda (76,21±7,6) **h48. Saat IFN- γ** (74,0±1,46) grubuna oranla Annexin V canlı hücre oranını anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($P < 0,7824$).

✓ **hMix** grubunda (24,82±0,82) **h24. Saat IFN-γ+iDF-MKH** (95,50±088) grubuna oranla Annexin V canlı hücre anlamlı derecede arttırdığı gösterdi (P<0,0001).

✓ **hMix** grubunda (24,82±0,82) **h48. Saat IFN-γ** (74,0±1,46) grubuna oranla Annexin V canlı hücre anlamlı derecede arttırdığı gösterdi (P<0,0001).

✓ **hMix** grubunda (24,82±0,82) **h48. Saat IFN-γ+iDF-MKH** (76,21±7,6) grubuna oranla Annexin V canlı hücre oranını anlamlı derecede arttırdığı gösterdi (P<0,0001).



Şekil 6-15. iDF-MKH hücrelerinin; ev tozuna duyarlı (Derp 1 +) astımlı bireylerin lenfosit hücrelerindeki Annexin V canlı hücre gösterimi üzerine etkisi

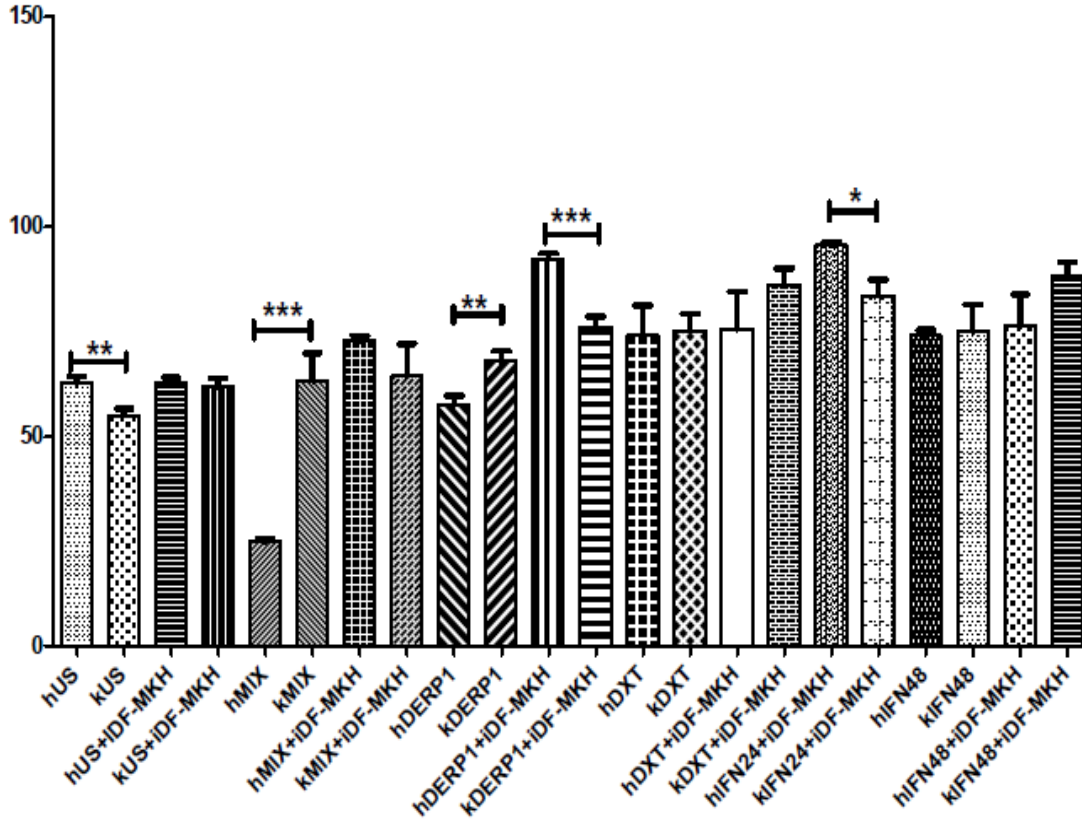
A)iDF-MKH+IFN- γ 'lı gruplarda Annexin V canlı hücre oranı anlamlı derecede arttığı görüldü. Akım sitometri cihazı ile H1'in Annexin V gösterimi. B) İn vitro olarak iDF-MKH hücrelerinin; Derp 1 (+) astımlı bireylerin lenfosit hücrelerindeki Annexin V canlı hücre gösterimi üzerine etkisi istatistiksel olarak gösterildi. İki grup arasındaki karşılaştırma için unpaired Student *t* testi kullanıldı. * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$; **** $P<0,0001$

Ev tozuna duyarlı (Derp 1 +) astımlı bireyler ile sağlıklı bireylerin karşılaştırılmasından elde edilen verilere göre;

- ✓ **hUs** (76,21 \pm 7,6) grubunda **kUs** (54,99 \pm 1,64) grubuna oranla Annexin V canlı hücre oranını anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($P<0,1827$).
- ✓ **hMix** (24,82 \pm 0,82) grubunda **kMix** (63,32 \pm 6,60) grubuna oranla Annexin V canlı hücre oranını anlamlı derecede arttığını gösterdi ($P<0,0002$).
- ✓ **hMix+iDF-MKH** (72,67 \pm 1,35) grubunda **kMix+iDF-MKH** (64,36 \pm 7,68) grubuna oranla Annexin V canlı hücre oranını anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($P<0,3120$).
- ✓ **hDerp 1** (57,50 \pm 2,10) grubunda **kDerp 1** (67,92 \pm 2,48) grubuna oranla Annexin V canlı hücre oranını anlamlı derecede arttığını gösterdi ($P<0,0096$).
- ✓ **hDerp 1+iDF-MKH** (92,33 \pm 1,2) grubunda **kDerp 1+iDF-MKH** grubuna (76,01 \pm 2,55) oranla Annexin V canlı hücre oranını anlamlı derecede arttığını gösterdi ($P<0,0002$).
- ✓ **hDxt**(74,02 \pm 7,0) grubunda **kDxt** grubuna (75,10 \pm 4,21) oranla Annexin V canlı hücre oranının anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($P<0,8981$)
- ✓ **hDxt+iDF-MKH**(75,58 \pm 8,9) grubunda **kDxt+iDF-MKH** grubuna (86,04 \pm 4,03) oranla Annexin V canlı hücre oranının anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($P<0,3107$).
- ✓ **h24. Saat IFN- γ +iDF-MKH**(95,50 \pm 088) grubunda **k24. Saat IFN- γ +iDF-MKH** grubuna (83,54 \pm 3,79) oranla Annexin V canlı hücre oranını anlamlı derecede arttığını gösterdi ($P<0,0119$).

✓ **h48. Saat IFN- γ** (74,0 \pm 1,46) grubunda **k48.Saat IFN- γ** grubuna (75,01 \pm 6,395) oranla Annexin V canlı hücre oranını anlamlı bir fark olmadığı görüldü (P<0,8805).

✓ **h48. Saat IFN- γ +iDFMKH** (76,21 \pm 7,6) grubunda **k48. Saat IFN- γ +iDFMKH** (88,29 \pm 3,28) grubuna oranla Annexin V canlı hücre oranını anlamlı bir fark olmadığı görüldü (P<0,1777).



Şekil 6-16. iDF-MKH hücrelerinin; sağlıklı (kontrol) bireylerin ve ev tozuna duyarlı (Derp 1 +) lenfosit hücrelerindeki Annexin V canlı hücre gösterimi üzerine etkisi

iDF-MKH hücrelerinin lenfosit hücrelerindeki Annexin V canlı hücre oranı üzerindeki arttırıcı etkisi istatistiksel olarak gösterilmi. İki grup arasındaki karşılaştırma için unpaired Student *T* testi kullanıldı.*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001

Yapılan analizler ile iDF-MKH hücrelerinin varlığında lenfosit hücrelerindeki Annexin V canlı hücre oranı üzerindeki arttırıcı etkisi olduğu gösterildi. Aynı zamanda iDF-MKH hücrelerinde ve IFN- γ varlığında arttırıcı etkisi olduğu görüldü.

6.7 iDF-MKH Hücrelerinin Lenfosit Hücrelerinden Salgılanan IL-4 ve IFN- γ Sitokin Miktarını Azaltırken IL-10 Sitokin Miktarını Arttırdı

SAĞLIKLI (KONTROL) GRUP		DERP 1 ⁺ ASTIMLI GRUP	
Örnek Adı	IL-4 pg/ml	Örnek Adı	IL-4 pg/ml
Mix	5,43±0,20	Mix	10,50±1,08
Mix+ iDF-MKH	2,11±0,52	Mix+ iDF-MKH	21,55±3,01
Derp 1	10,10±0,52	Derp 1	13,92±0,92
Derp 1+iDF-MKH	6,93±0,10	Derp 1+iDF-MKH	29,20±3,89
Dexametasone	1,82±0,14	Dexametasone	4,72±0,56
Dexametasone +iDF-MKH	1,23±0,02	Dexametasone +iDF-MKH	4,85±1,1
IFN - γ	3,68±1,1	IFN - γ	8,9±1,015
IFN - γ + iDF-MKH	1,73±0,95	IFN - γ +iDF-MKH	19,93±0,70

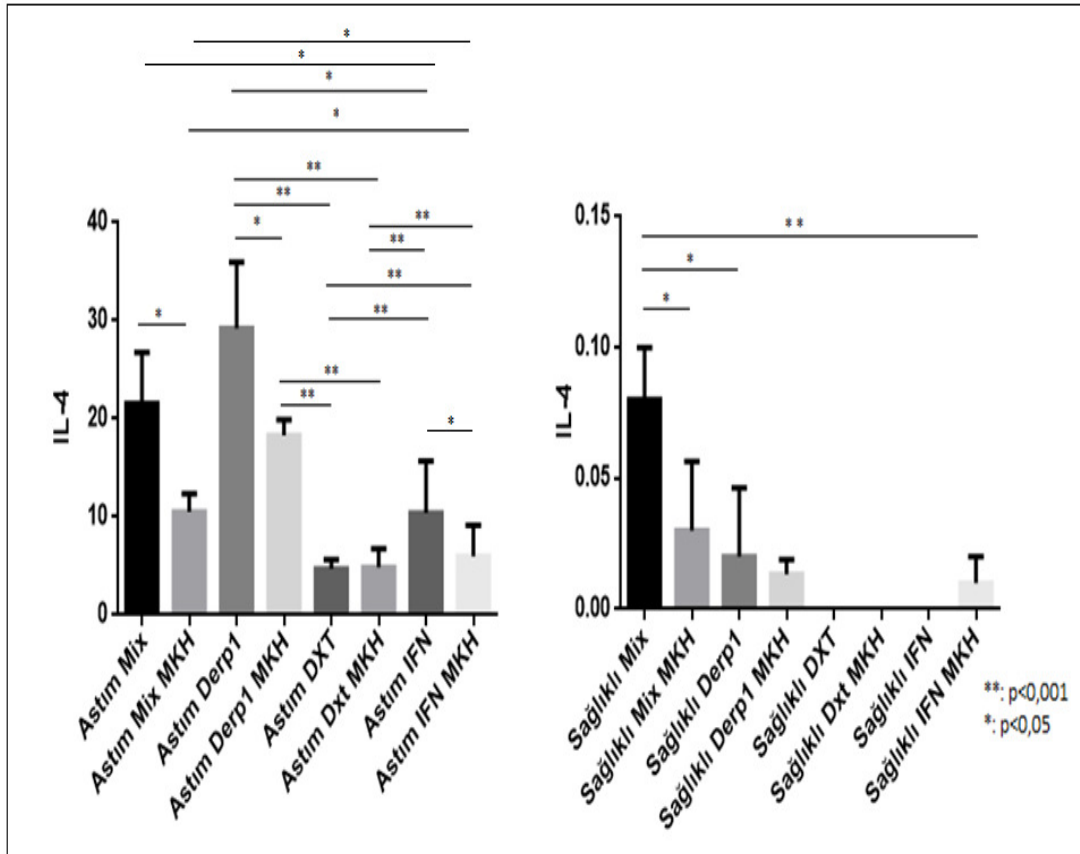
Tablo 6-4. iDF-MKH hücrelerinin; sağlıklı (kontrol) ve ev tozuna duyarlı (Derp 1 +) bireylerin lenfosit hücrelerinden salgılanan IL-4 miktarının gösterimi

- ✓ **AstımMix+iDF-MKH** grubunda (21,55±3,01) **AstımMix** (10,50±1,08) grubuna oranla IL-4 miktarını anlamlı derecede düşürdüğünü gösterdi (P<0,0001).
- ✓ **AstımDerp 1+iDF-MKH** grubunda (29,20±3,89) **AstımDerp 1** (13,92±0,92) grubuna oranla IL-4 miktarını anlamlı derecede düşürdüğünü gösterdi (P<0,0001)
- ✓ **AstımDxt+iDF-MKH** grubunda (4,85±1,1) **AstımDxt** (4,72±0,56) grubuna oranla IL-4 miktarında anlamlı bir fark olmadığı görüldü (P<0,8940).
- ✓ **AstımIFN- γ +iDF-MKH** grubunda (19,93±0,70) **AstımIFN- γ** (8,9±1,015) grubuna oranla IL-4 miktarını anlamlı derecede düşürdüğünü gösterdi (P<0,0001).
- ✓ **SağlıklıMix** grubunda (5,43±0,20) **SağlıklıMix+iDF-MKH** (2,11±0,52) grubuna oranla IL-4 miktarının anlamlı derecede arttığını gösterdi (P<0,0001).

✓ **SağlıklıDerp1** grubunda (10,10±0,52) **SağlıklıDerp1+iDF-MKH**(6,93±0,10) grubuna oranla IL-4 miktarını anlamlı derecede düşürdüğünü gösterdi (P<0,0001).

✓ **SağlıklıDxt** grubunda (1,82±0,14) **SağlıklıDxt+iDF-MKH** (1,23±0,02) grubuna oranla IL-4 miktarında anlamlı bir fark olmadığı görüldü (P<0,8940).

✓ **SağlıklıIFN-γ+iDF-MKH** grubunda (3,68±1,1) **SağlıklıIFN-γ**(1,73±0,95) grubuna oranla IL-4 miktarını anlamlı derecede arttırdığı gösterdi (P<0,0001).



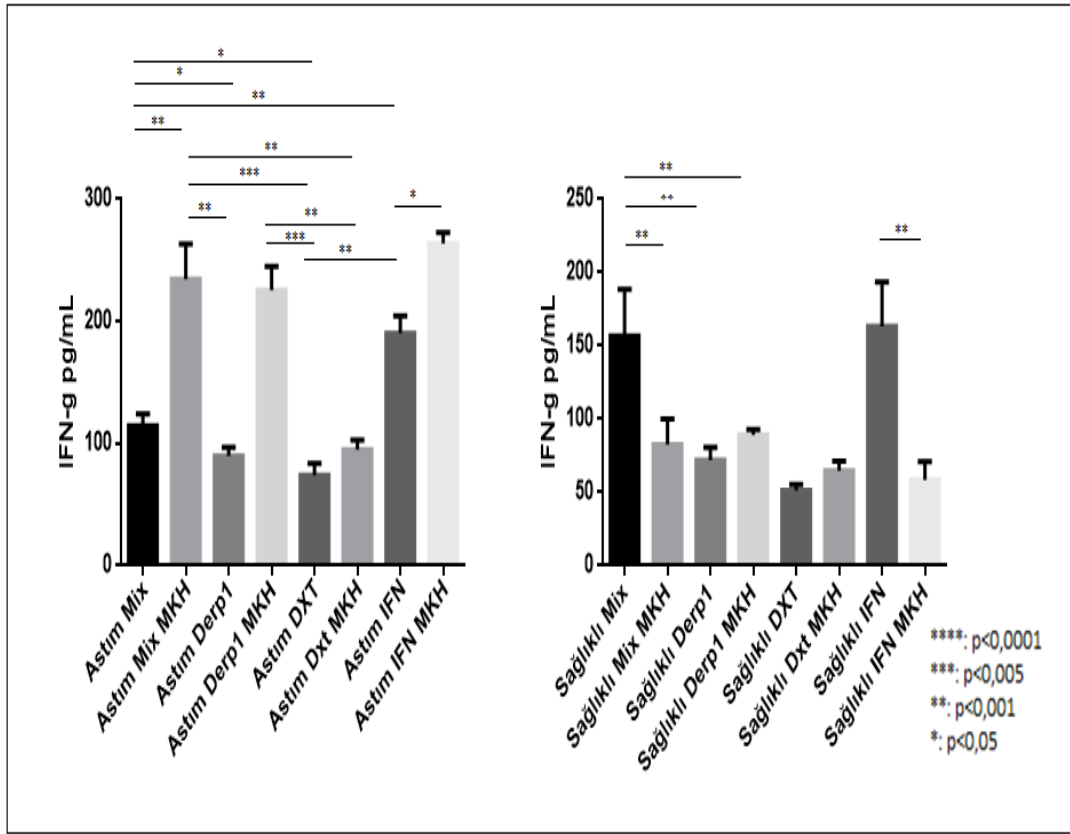
Şekil 6-17. iDF-MKH hücrelerinin; sağlıklı (kontrol) bireylerin ve ev tozuna duyarlı (Derp 1 +) lenfosit hücrelerinden IL-4 sitokin salgılanması üzerine etkisi

Lenfosit hücrelerinden IFN-γ sitokin salgılanması üzerine etkisi. iDF-MKH+IFN-γ ve iDF-MKH +IFN-γ hücrelerinin IFN-γ sitokin düzeyini diğer gruplara oranla daha fazla ve anlamlı olarak baskıladığı görüldü. *P<0,05, **P<0,001

SAĞLIKLI (KONTROL) GRUP		DERP 1 ⁺ ASTIMLI GRUP	
Örnek Adı	IFN_γpg/ml	Örnek Adı	IFN_γpg/ml
Mix	156,7±18,48	Mix	225,3±15,17
Mix+ iDF-MKH	82,67±10,04	Mix+ iDF-MKH	101,07±19,79
Derp 1	72,0±5,03	Derp 1	144,0±22,45
Derp 1+iDF-MKH	89,33±2,02	Derp 1+iDF-MKH	199,7±6,74
Dexametasone	51,33±2,4	Dexametasone	59,33±18,22
Dexametasone+iDF-MKH	64,67±3,84	Dexametasone+iDF-MKH	95,0±4,36
IFN - γ	163,3±17,46	IFN - γ	96,00±21,28
IFN - γ + iDF-MKH	58,67±7,05	IFN - γ +iDF-MKH	265,3±11,32

Tablo 6-5. iDF-MKH hücrelerinin; sağlıklı (kontrol) ve ev tozuna duyarlı (Derp 1 +) bireylerin lenfosit hücrelerinden salgılanan IFN-γ miktarının gösterimi

- ✓ **AstımDerp1**(144,0±22,45) grubunda **AstımDerp1+iDF-MKH** (199,77±6,74) grubuna oranla IFN-γ miktarını anlamlı derecede düşürdüğünü gösterdi (P<0,0001). Ve **AstımMix** (225,3±15,17) grubunda (101,07±19,79) **AstımMix+iDF-MKH** grubuna oranla IFN-γ miktarını anlamlı derecede arttığını gösterdi (P<0,0001).
- ✓ **AstımDxt** (59,33±18,22) grubunda **AstımDxt+iDF-MKH** (95,0±4,36) grubuna oranla IFN-γ miktarında anlamlı bir fark olmadığı görüldü (P<0,8940).
- ✓ **Astım IFN-γ** (96,00±21,28) grubunda (265,3±11,32) **Astım IFN-γ+iDF-MKH** grubuna oranla IFN-γ miktarını anlamlı derecede düşürdüğünü gösterdi (P<0,0001).
- ✓ **SağlıklıMix** grubunda (156,7±18,48) **SağlıklıMix+iDF-MKH** (82,67±10,04) grubuna oranla IFN-γ miktarını anlamlı derecede düşürdüğünü gösterdi (P<0,0001).
- ✓ **SağlıklıDerp1** grubunda (72,0±5,03) **SağlıklıDerp1+iDF-MKH** (89,33±2,02) grubuna oranla IFN-γ miktarı anlamlı bir fark olmadığı görüldü (P<0,0001).
- ✓ **SağlıklıDxt** grubunda (51,33±2,4) **SağlıklıDxt+iDF-MKH** (64,67±3,84) grubuna oranla IFN-γ miktarı oranının anlamlı bir fark olmadığı görüldü (P<0,8940).
- ✓ **SağlıklıIFN-γ+iDF-MKH** grubunda (163,3±17,46) **SağlıklıIFN-γ** (58,67±7,05) grubuna oranla IFN-γ miktarı oranının anlamlı derecede arttırdığı gösterdi (P<0,0001).



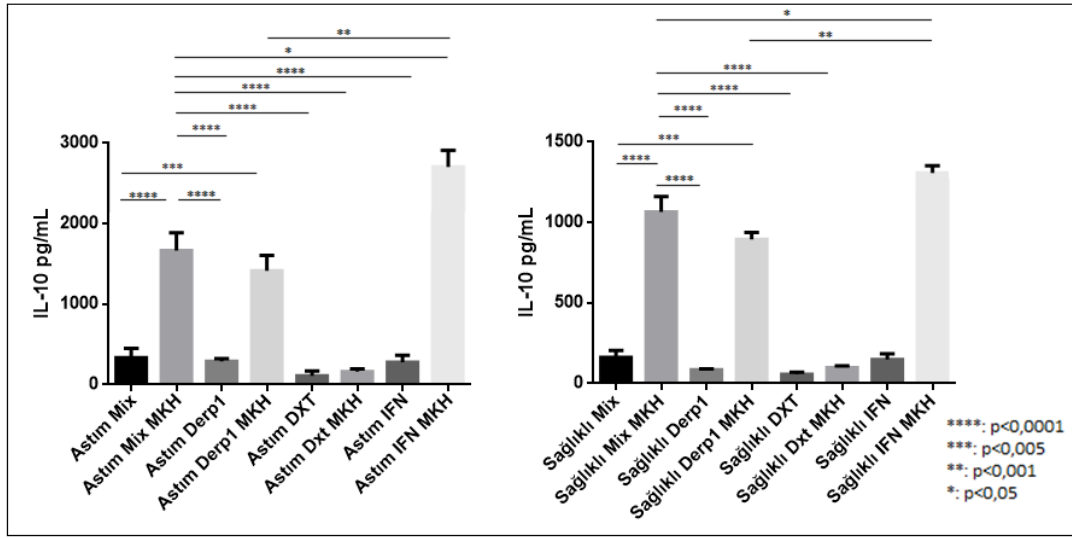
Şekil 6-18. iDF-MKH hücrelerinin; sağlıklı (kontrol) bireylerin ve ev tozuna duyarlı (Derp 1 +) lenfosit hücrelerinden IFN- γ sitokin salgılanması üzerine etkisi

iDF-MKH+IFN- γ ve iDF-MKH+IFN- γ hücrelerinin IFN- γ sitokin düzeyini diğer gruplara oranla daha fazla ve anlamlı olarak baskıladığı görüldü. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

SAĞLIKLI (KONTROL) GRUP		DERP 1 ⁺ ASTIMLI GRUP	
Örnek Adı	IL-10 pg/ml	Örnek Adı	IL-10 pg/ml
Mix	161,7±25,22	Mix	333,3±67,66
Mix+ iDF-MKH	1065±54,85	Mix+ iDF-MKH	1667±125,7
Derp 1	85,33±2,90	Derp 1	287,7±19,54
Derp 1+iDF-MKH	895,0±24,58	Derp 1+iDF-MKH	1415,5±109,8
Dexametasone	57,0±72,34	Dexametasone	112,0±34,02
Dexametasone +iDF-MKH	98,0±6,24	Dexametasone +iDF-MKH	160,3±20,42
IFN - γ	149,0±20,31	IFN - γ	279,3±50,09
IFN - γ + iDF-MKH	1262±36,68	IFN - γ +iDF-MKH	2645,2±119,8

Tablo 6-6. iDF-MKH hücrelerinin; sağlıklı (kontrol) ve ev tozuna duyarlı (Derp 1 +) bireylerin lenfosit hücrelerinden salgılanan IL-10 miktarının gösterimi

- ✓ **AstımDerp 1+iDF-MKH** grubunda (1415,5±109,8) **AstımDerp 1** (287,7±19,54) grubuna oranla IL-10 miktarının oranını anlamlı derecede arttırdığı gösterdi (P<0,0001) ve **AstımMix+iDF-MKH** grubunda (1667±125,7) **AstımMix** (333,3±67,66) grubuna oranla IL-10 miktarının oranının anlamlı derecede arttığını gösterdi (P<0,0001).
- ✓ **AstımDxt+iDF-MKH** grubunda (2160,3±20,42) **AstımDxt** (112,0±34,02) grubuna oranla IL-10 miktarının oranını anlamlı bir fark olmadığı görüldü (P<0,8940).
- ✓ **IFN- γ + iDF-MKH** grubunda (2645,2±119,8) **AstımIFN- γ** (279,3±50,09) grubuna oranla IL-10 miktarının oranını anlamlı derecede arttırdığı gösterdi (P<0,0001).
- ✓ **SağlıklıMix** grubunda (161,7±25,22) **SağlıklıMix+iDF-MKH** (1065±54,8) grubuna oranla IL-10 miktarının oranının anlamlı derecede arttığını gösterdi (P<0,0001).
- ✓ **SağlıklıDerp 1** grubunda (85,33±2,90) **SağlıklıDerp 1+iDF-MKH** (895,0±24,58) grubuna oranla IL-10 miktarının oranını anlamlı derecede arttırdığı gösterdi (P<0,0001).
- ✓ **SağlıklıDxt** grubunda (57,0±72,34) **SağlıklıDxt+iDF-MKH** (98,0±6,24) grubuna oranla IL-10 miktarının oranını anlamlı bir fark olmadığı görüldü (P<0,8940).
- ✓ **SağlıklıIFN- γ +iDF-MKH** grubunda (149,0±20,31) **SağlıklıIFN- γ** (1262±36,68) grubuna oranla IL-10 miktarının oranını anlamlı derecede arttırdığı gösterdi (P<0,0001).



Şekil 6-19. iDF-MKH hücrelerinin; sağlıklı (kontrol) bireylerin ve ev tozuna duyarlı (Derp 1 +) lenfosit hücrelerinden IL-10 sitokin düzeyini diğer gruplara oranla daha fazla ve anlamlı olarak arttırdığı görüldü

*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001 ****P<0,0001

7 TARTIŞMA

Bu çalışmamızda iDF-MKH hücrelerin immun sistem hücreleri üzerine etkisi incelendi. Bu amaçla dış folikülünden mezenkimal kök hücre izolasyonları yapıldı. İzole edilen kök hücrelerin sağlıklı bireylerin ve Derp1 + astımlı bireylerin venöz kanlarından izole edilen lenfosit hücreleri ile birlikte kültürleri yapıldı. 72 saat süresince kültürleri yapıldıktan sonra immünolojik analizler yapılarak değerlendirildi. İmmünolojik analizler olarak; kültür sonrasında akım sitometri cihazında lenfosit proliferasyonuna, lenfosit hücrelerinde apoptoza, CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücrelerine ve kültür sonrası süpernatantından sitokin düzeylerine bakıldı.

Astım hastalığı, Astım İçin Küresel Girişim (GINA) tanımına göre: Kronik inflamatuvar bir hastalıktır ve bu inflamasyon sonucunda gelişen havayolu hiperreaktivitesi, yaygın, değişken, spontan olarak veya tedavi ile düzgün bir seyir izler. Bunlara ek olarak ataklar halinde gelen öksürük, nefes darlığı, hırıltılı solunum ile kendini gösterir. Astımda bu şikayetler özellikle gece veya sabaha karşı ortaya çıkmaktadır ve çocukluk döneminde bu semptomlar farklı yaşlarda farklı ağırlıklarda seyredebilir. Genellikle astım semptomları geri dönüşümlü olur, spontan olarak veya tedavi ile geriler.

Allerjik astım bireyin çevresel ve hava yolu alerjenlerine karşı allerjik reaksiyon verdiği kronik bir akciğer hastalığıdır. Astım Th2 hücrelerinde salınan IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 ve granülosit makrofaj-koloni stimule edici faktör (GM-CSF) tarafından kontrol edilir. Ayrıca immün sistemde görevli olan hücrelerden mast hücreleri ve eozinofiller astım cevabında görevli hücrelerdendir (Van Rijt ve Lambrecht, 2005).

Özellikle batılı ülkelerde allerjik hastalıkların insidansının hızla arttığı klinik verilerle ortaya konmuştur. Allerjik hastalıklarda immün sistem Th2 yönüne doğru kaymakta ve bu hücrelerin salgıladığı IL-4, IL-5 ve IL-13 gibi mediatörlerle sırasıyla, IgE artışı, eosinofil öncü hücre aktivasyonu ve akciğerde mukus salgısının artışında rol oynamaktadır. Astım tedavisi için anti-inflamatuvar terapi ve kısa-sürelili bronkodilatörler olmak üzere iki temel tip medikasyon vardır. Fakat tedaviye karşı oluşan immün yanıt değişiklikleri astımın izlenmesini zor kılmaktadır. Ayrıca günümüz tedavileri, bireylerde inflamasyonu minimize etmesine rağmen astımda oluşan yeniden modellenme işlemini azaltma ya da tersine çevirme kapasitesine sahip değildir. Kronik ve akut astımı bulunan hastalarda meydana gelen patofizyolojik durumların düzelmesi için yeni tedavi opsiyonlarının bulunması gerekmektedir (Akkoc ve ark.,2008).

Günümüzde astım tedavisi hava yolu inflamasyonunu baskılamayı hedeflemektedir. İnhaler kortikosteroidler şu anda astım tedavisindeki en etkili kontrol edici ilaçlardır (Türk Toraks Derneği Astım Tanı ve Tedavi Rehberi, 2010, <http://www.toraks.org.tr>, Erişim tarihi: 05.01.2014). Her ne kadar günümüz tedavileri inflamasyonu azaltsa da hava yollarının yeniden yapılanmasını önleyen ya da tersine çeviren kanıtlanmış hiçbir kullanılabilir tedavi yoktur (Hirota ve Martin 2013). Bu nedenle hava yolu yeniden yapılanmasını da etkileyecek yeni stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır. Bizde çalışmamızda diş folikülünden mezenkimal kök hücrelerin sağlıklı bireylerin ve Derp1 + astımlı bireylerin venöz kanlarından izole edilen lenfosit hücrelerini kullandık. iDF-MKH hücrelerin immünolojik hastalıkların tedavisinde kullanılması ile ilgili fikir oluşturacaktır.

Miura ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptıkları çalışmada süt dişi pulpasından mezenkimal kök hücre izolasyonu yapıldı. Her bir dökülen diştten yaklaşık olarak 15, 20 hücre izole edildi. Bu hücrelerin plastik yüzeylere yapışabildikleri ve diğer stromal hücrelerin karakteristiğinde olduğu gösterildi. Suchanek ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada diş kök hücreleri izole edilmiş ve yüksek oranda CD44, CD73, CD90, CD117, CD166, HLA I orta oranda CD29, CD105 ve düşük oranda CD45, CD63, CD71 eksprese ettikleri gösterilmiştir. Ayrıca bu hücrelerin CD18, CD31, CD34, CD49d, CD49e, CD106, CD133, CD184, CD197, CD146 ve HLA II eksprese etmedikleri gösterilmiştir. Bu çalışmada yirmi yaş gömük dişinden dental folikül kök hücre izolasyonu yapıldı ve Suchanek ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya benzer bir şekilde izole edildi. Bu hücrelerin plastik yüzeylere yapışabildikleri ve yüksek proliferasyon yetenekleri olduğu gösterildi (Şekil 6.1.). İzole edildikten sonra yapılan karakterizasyon aşamalarında bu hücrelerin Suchanek ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya benzer yapıldı. Suchanek ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada olduğu gibi bu hücrelerin yüzeylerinde CD90, CD146, CD105 ve CD73 eksprese ettikleri ve CD14, CD45, CD20 eksprese etmedikleri gösterildi (Şekil 6.2.).Suchanek ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada hücreler osteojenik, adipojenik ve kondrojenik olarak farklılaştırılmış ve sonrasında sırasıyla alizarin red, oil red o ve von kossa ile boyanmıştır. Bizim çalışmamızda da iDF-MKH hücreleri izole edildikten sonra osteojenik, adipojenik ve kondrojenik olarak farklılaştırıldı ve sonrasında sırasıyla bu hücreler alizarin red, oil red o, alcian blue ile boyandı. Bu hücrelerin üç soyada farklılaşabildikleri gösterildi. Osteojenik olarak farklılaştırılarda osteoblast nodülleri (Şekil 6.3.C), adipojenik olarak farklılaştırılarda yağ damlacıkları (Şekil 6.3.B.) ve kondrojenik olarak farklılaştırılanlarda ise proteoglikanlar görüldü (Şekil 6.3.A.).

Diş folikülü gelişmekte olan diş yapısını çevreleyen mezenkimal dokudur. Diş folikülü, sement, periodontal ligament, alveolar kemik iliği hücreleri ile birlikte dişi oluştururlar (Yokoi ve ark.,

2007). Bu hücreler ortodontik sebepler ile çekilmesi gereken ve gelişim sürecinde olan yirmi yaş dışının çekilmesinden sonra alınıp kolaylıkla kök hücre izolasyonu yapılabilir, buda bu hücrelerin kolay ulaşılabilir bir kaynak olmasını sağlar. Diş folikülü kaynaklı kök hücrelerin izolasyonu ilk olarak Handa ve arkadaşları tarafından yapılmıştır ve yapılan çalışmada bu hücrelerin farklılaşma yetenekleri in vivo olarak incelendiğinde sement benzeri matrix bir yapı oluşturdukları görülmüştür. Kolay ulaşılabilir kaynak olmasından ve proliferasyon yetenekleri yüksek olduğundan biz bu çalışmamızda diş folikülü kökenli kök hücreler kullanıldı.

Son dönemde MKH' ların farklı etkileri üzerinde çalışılmaktadır. MKH' ların bağışıklık sistemindeki düzenleme etkisi ilk kez kez transplantasyonu sonrasında bağışıklık sistemi kontrolünden kaçınabilmesi özelliği ile keşfedilmiştir. MKH' lar farklı T-Lenfosit aktivitelerini in vitro ve in vivo baskılayabilmektedir. Naif ve bellek hücreleri T hücreleri MKH aracılığı ile baskılamaya maruz kalır ve kök hücrelerin inhibitör etkisi antijen sunan hücrelerin varlığını gerektirmez ve CD4⁺/CD25 regülatör T hücrelerini aracılığına ihtiyaç duymaz (Hiroshi Y. ve ark., 2010). Bu bilgiler ışığında ev tozuna duyarlı (Derp 1) astımlı bireylerin lenfosit hücreleri ile iDF-MKH hücreleri ile ko-kültürler yapıldı. İn vitro ortamda iDF-MKH ' ların lenfosit proliferasyonunu baskıladığı gösterildi (Tablo 6.2.).

Yakın zamanda yapılan araştırma ve raporlarda bileşik çözülebilir faktörler ve hücre-hücre kontakta MKH aracılığı ile immün baskılamının önemi vurgulanmıştır. MKH' ların sitokin, kemokin, T-hücre, NK-hücre gibi uyaranlara cevap veren pleiotrofik immunomodülatör etki sağlayabilmesi için, direkt ve çözülebilir mediyatörlere ihtiyaç duymaktadır. (Hiroshi Y. ve ark., 2010). Buna benzer çalışmalarda IFN- γ maruz kalmış MKH' ların T hücre proliferasyonunda bir azaltma etkisi görülmemiştir fakat Hepatosit Büyüme Faktör' ünün ekspresyonunun arttığı ve TGF- β 1' in konsantrasyonunda çoklu cevap özelliğini baskıladığı görülmüştür (Hiroshi Y. ve ark., 2010).

Yapılan çalışmalarda MKH' lar ile lenfosit hücrelerinin kültürlerinden sonuçlanan analizlerde MKH' lar tarafından baskılanan T hücrelerin canlı olarak kalmasında artış ve daha az apoptoz olduğu gösterilmiştir (Di Nicola ve ark., 2002). Bizim yaptığımız çalışmada kök hücre varlığında apoptozun baskılandığı gösterilmiştir. iDF-MKH hücrelerinin varlığında lenfosit hücrelerindeki Annexin V canlı hücre oranı üzerindeki artırıcı etkisi olduğu gösterildi. Aynı zamanda kültürde IFN- γ olan sonuçlarda baskılanmanın daha da fazla olduğu gösterildi (Tablo 6.14., Şekil 6.15., Şekil 6.16.).

Bizim yapmış olduğumuz çalışmada kök hücreler ile lenfositlerin ko kültürlerinin sonucunda yapılan akım sitometri analizlerinde CD4⁺FoxP3⁺ hücre miktarında kök hücre olmayan gruplara göre artış olduğu ve IFN- γ varlığında bu artışın daha da fazla olduğu görüldü. Ayrıca ortama IFN- γ eklenerek MKH' ler üzerindeki etkisi araştırıldı (Şekil 6.10., Şekil 6.12.).

Güncel başka bir çalışmada ise, CD4⁺FoxP3⁺ regülatör T hücrenin artışı ve Th17 farklılaşmasının normal PDLSC kullanımı ile görülmüştür. Bu durum inflamasyona uğramış PDLSC daha kısmi olarak görülmüştür. İnsan gingivasından elde edilen MKH' ların deneysel kolitlerde inflamasyonu, antiinflamator faktör ve Treg hücrelerin infiltrasyonu ile tedavi ettiği görülmüştür. Özet olarak dental kökenli MKH' ların immunmodülatör etkileri, farklı kaynaklardan elde edilen kök hücreler gibi arttırmaktadır (Racz G. ve ark., 2014). Bizde çalışmamızda benzer sonuçlar elde ederek iDF-MKH hücrelerinin CD4⁺FoxP3⁺ lenfosit hücre oranını arttırdığı gösterildi (Şekil 6.10.).

Demircan ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada diş pulpası kök hücreleri ve lenfosit hücrelerinin ko kültürleri sonucunda yapılan sitokin analizinde IFN- γ sitokin miktarında baskılanma olduğu görülmüştür (Demircan ve ark.). Bizim yaptığımız çalışmada IFN- γ sitokin miktarında baskılanma olduğu (Tablo 6.5.) ve bu çalışmadan farklı olarak IL-4 ve IL-10 sitokin düzeylerine de bakıldı. Kök hücreler ve lenfosit hücrelerinin kültürleri sonrası süpernatantından bakılan sitokin analizi sonucunda MKH' ların IL-4 sitokini ve IFN- γ sitokininin salgılanma miktarını baskımlarken IL-10 sitokininin salgılanmasını uyardığı görüldü (Şekil 6.17., Şekil 6.18., Şekil 6.19.). IL-4 bir inflamatuvar sitokindir bizim çalışmamızda IL-4 sitokininin baskımlandığı görüldü. IL-10 makrofajlar ve T hücreler tarafından salgılanır ve IL-12 üretimini engeller. Ayrıca IL-10 sitokini immün sistemi düzenleyen bir sitokindir, Th1 hücreleri tarafından IFN- γ salgılanmasını baskılar (Gesser ve ark., 1997; Moore ve ark., 2001). IL-10 monosit ve makrofaj fonksiyonunu inhibe eder, IL-12, TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinleri ise düşürerek düzenler (Malefeyt ve ar., 1997). Bizim yapmış olduğumuz çalışmada kök hücrelerin IL-10 sitokin miktarını arttırdığı (Şekil 6.19.) bununla bağlantılı olarak IFN- γ sitokin miktarını ise azalttığı gösterildi (Şekil 6.18.). Çalışmamızda iDF-MKH hücrelerinin IL-10 sitokin miktarını arttırdığı görüldü (Tablo 6.6.). IFN- γ sitokinini ise tüm hücrelerin benzer oranlarda baskıladığı görüldü.

MKH' nin ana fonksiyonları farklı tedavi edici özelliklere sahiptir. Bu özelliklere örnek olarak anti inflamatuvar ve immünomodülatör etkiler, doku onarımını tetikleyen ya da destekleyen farklı medyatorların üretimi gibi özellikler sıralanabilir. Yakın zamanda bu özellikler farklı hastalıkların prelinik ve klinik tedavilerinde kullanılmıştır (Lotfinejad P. ve ark., 2014).

MKH' ların kullanıldığı diğler bir alan olan doku mühendisliğinde yönlendirilmiş doku rejenerasyonu tekniğindeki limitli başarı ve zorluk, MKH' lar kullanılarak yeni bir rejenerasyon terapisi gereğini ortaya çıkarmıştır. Karaktersistik özelliklerinden dolayı (proliferasyon oranı, çoklu farklılaşma, kök hücre belirteçleri) Mezankimel kök hücreler doku mühendisliğinde önemli bir hedef çalışma alanı haline gelmiştir. Bu konuda daha somut bir çıktı alabilmek için periyodonti rejenerasyonuna uygun iskele yaratılması ve dental uygulamalar baz alınarak doku mühendisliğinde yeni yaklaşımların denenmesi gerekmektedir (Maxim A. ve ark., 2015).

Hücrelerin zamana bağlı proliferasyonlarını gözlemlemek amacıyla xCELLigence RTCA sisteminden yararlanılmıştır. Bu amaçla iDF-MKH hücrelerin E-plate üzerine ekimi yapıldıktan sonra üzerlerine Derp 1 + astımlı ve sağlıklı bireylerin lenfosit hücreleri eklendi, yaklaşık 120 saat boyunca kültüre alınmıştır. Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, Şekil 6.7.'de iDF-MKH' ların e-platelere ilk 5 saatte yüzeye yapışmaya başladıkları görülmektedir. Şekil 6.7.'de iDF-MKH hücreleri üzerindeki proliferatif etkisine bakıldığında, hücreler kontrolle paralel büyüme eğrisi göstermekte ve hücre canlılığı indeksinde kayda değer bir şekilde canlılığı azaltıcı yönde etki görülmektedir. Tüm gruplar ilk 50 saatte ortama adapte olmuş bir miktar büyüme göstermeye başlamışlardır. Deney başlangıcından itibaren 24 ve 48. saatlerde Tablo 6.6'da verilen gruplara uygun olarak CDmix ve IFN- γ uyarımları kültür ortamına eklenmiştir. İlk 50 saatte uyarımların ilave edilmesiyle beraber gözle görülür bir fark görülmemekle beraber 48. saatte Derp 1 + astımlı ve sağlıklı bireylerden izole edilen PBMC'ler kültür ortamına eklenmiştir. Buna bağlı gruplarda farklılıklar meydana gelmiştir.

Araştırmamızda literatür sonuçlarına paralel olarak iDF-MKH CD4⁺ T lenfosit proliferasyonunu anlamlı derecede baskıladı. IFN- γ varlığında iDF-MKH CD4⁺ T lenfosit proliferasyonu daha fazla baskılandığı görüldü. iDF-MKH T regülatör hücre oranını anlamlı artırdı IFN- γ uyarımlı iDF-MKH T regülatör hücre oranını anlamlı derecede daha fazla artırdığı görüldü. IFN- γ uyarımlı ve uyarımsız iDF-MKH lenfositlerde apoptozu anlamlı baskıladı. Bu çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre iDF-MKH hücrelerin Derp1 + astımlı hastalardan elde edilen lenfositlerin proliferasyonu baskılandığı gösterilmiştir.

Sonuç olarak, araştırmamızda elde ettiğimiz veriler doğrultusunda IFN- γ uyarımlı iDF-MKH immün sistemin, otoimmün, inflamatuvar ve allerjik hastalıkların tedavi yaklaşımlarında immünomodülatör fonksiyonlarındaki hücreler olarak kullanılmasının uygun olabileceği gözlemlenmiştir. Bu da literatürdeki örnek çalışmalara istinaden iDF-MKH' nin terapatik kullanımına ışık tutmuştur.

8 KAYNAKLAR

Abbas A.K., Lichtman A.H., İmmün Sistemin Fonksiyonları ve Bozuklukları, Temel İmmnoloji, s.1-143, 2007.

Abbas Abul K., Lichtman Andrew H. Textbook of Cellular and Molecular Immunology 1st Edition (161-163).

Agostinis F, Foglia C, Landi M, Cottini M, Lombardi C, Canonica GW, Passalacqua G. (2008). The safety of sublingual immunotherapy with one or multiple pollen allergens in children. *Allergy*, 63:1637-1639.

Akkoc ve ark, *Allergy Asthma Proc*, 2008 Jul-Aug; 29(4):411-6.

Avasthi S, Srivastava RN, Singh A, Srivastava M. (2008). Stem Cell: Past, Present and Future- A Review Article. *Internet Journal of Medical Update*, 3:22-30.

Beasley R, Crane J, Lai CK, Pearce N. Prevalence and etiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105(2 Pt 2):S466-72.

Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*, 197:452-454.

Bianchi G, Muraglia A, Daga A, Corte G, Cancedda R, Quarto R. Microenvironment and stem properties of bone marrow-derived mesenchymal cells. *Wound Repair Regen*. 2001, 9(6):460-6.

Blau HM., Brazelton TR., Weimann JM.; 2001. The evolving concept of a stem cell: Entity or function. *Cell*, 105, 829-841.

Bonfield TL, Koloze M, Lennon DP, Zuchowski B, Yang SE, Caplan AI. (2010). Human mesenchymal stem cells suppress chronic airway inflammation in the murine ovalbumin asthma model. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 299:L760-L770.

Bouaziz J-D., Yanaba K., Tedder T.F., Regulatory B cells as Inhibitors of Immune Responses and Inflammation, *Immunological Reviews*, 224, s.201–214, 2008.

Counter C.M, Hirte H.W, Bacchetti S, Harley C.B., Telomerase Activity in Human Ovarian Carcinoma, *Proc Natl Acad Sc.*, 91, s.2900-4, 1994.

de Kok IJ, Peter SJ, Archambault M, van den Bos C, Kadiyala S, Aukhil I, Cooper LF. Investigation of allogeneic mesenchymal stem cell-based alveolar bone formation: preliminary findings. *Clin Oral Implants Res.* 2003, 14(4):481-9.

Demircan PÇ, Sarıboyacı AE, Ünal ZS, Gacar G, Subaşı C, Karaöz E. Immunoregulatory effects of human dental pulp-derived stem cells on T cells: comparison of transwell co-culture and mixed lymphocyte reaction systems. *Cytotherapy.* 2011; 10.3109/14653249.2011.605351.

Dieckmann D, Bruett CH, Ploettner H, Lutz MB, Schuler G. Human CD4⁺ CD25⁺ regulatory, Contact-dependent T cell induce interleukin-1 producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells. *J Exp Med* 2002, 196 (2), 247-253.

Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; 99: 3838-3843 [PMID: 11986244 DOI: 10.1182/blood.V99.10.3838].

Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D.j, Horwitz E., Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells, The International Society for Cellular Therapy Position Statement, *Cytotherapy*, 8, s.315-7, 2006.

Doğan A, Yalvaç ME, Şahin F, Kabanov AV, Palotas A, Rizvanov AA. Differentiation of human stem cells is promoted by amphiphilic pluronic block copolymers. *International Journal of Nanomedicine.* 2012; 7 4849–4860.

Fahy JV. Remodelling of the airway epithelium in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:46-51.

Falliers, CJ Atopy and asthma: prevalence contrasts; [letter]. *Ann Allergy Immunol* Weiland, SK, Hüsing, A, Strachan, DP, et al Climate and the prevalence of symptom of asthma, allergic rhinitis, and atopic eczema in children. *Occup Environ Med* 2004;61,609-615.

Ferro F, Spelat R, D'Aurizio F, Puppato E, Pandolfi M, Beltrami AP, et al. Dental Pulp Stem Cells Differentiation Reveals New Insights in Oct4A Dynamics. *PLoS One.* 2012;7(7):e41774.

Friedenstein A.j, Gorskaja J.F, Kulagina N.N., Fibroblast Precursors in Normal and Irradiated Mouse Hematopoietic Organs, *Exp Hematol*, 4, s.267-74, 1976.

G.Z. Racz¹, K. Kadar¹, A. Foldes¹, K. Kallo¹, K. Perczel-Kovach^{1,2}, B. Kerem¹, A. Nagy³, G. Varga^{1*}, Immunomodulatory and Potential Therapeutic Role Of Mesenchymal Stem Cells In Periodontitis, *Journal Of Physiology And Pharmacology* 2014, 65, 3, 327-339.

Handa K, Saito M, Tsunoda A, Yamauchi M, Hattori S, Sato S, Toyoda M, Teranaka T, Narayanan As. Progenitor cells from dental follicle are able to form cementum matrix in vivo. *Connect Tissue Res.* 2002;43:406-408.

Herzog E.L, Cahi L., Krause D.S., Plasticity Of Marrow-Derived Stem Cells, *Blood*, 102, s.3483-3493, 2003.

Hiroshi Yagi, Alejandro Soto-Gutierrez, Biju Parekkadan, Yuko Kitagawa, Ronald G. Thompkins, Naoya Kobayashi, Martin L. Yarmush, MSC: Mechanisms of Immunomodulation and Homing, *Cell Transplant.* 2010; 19(6): 667-679.

Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res.* 2009 Sep;88(9):792-806.

Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, Sakaguchi S. Thymus and autoimmunity: Production of CD25⁺ CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cell as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 1999;162:5317.

İkinciogulları A, Tetikkurt C, Demir T, Tutluoğlu B. Tanımdan tedaviye astım. İçinde Gemicioğlu B, editör. *Yeni ilaçlar.* İstanbul. Turgut Yayıncılık. 2004. pp 399-409.

Keating A., Mesenchymal Stromal Cells. *Current Opinion in Hematology*, 13, s.419-25, 2006.

Kern S, Eichler H, Stoeve j, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood or adipose tissue. *Stem Cell.* 2006; 43:357-361.

Krause DS (2002) Plasticity of marrow-derived stem cells. *Gene Ther* 9: 754-758.

L. Wang^{1,2}, Y. Zhao^{1,3}, and S. Shi^{1*}, Interplay between Mesenchymal Stem Cells and Lymphocytes: Implications for Immunotherapy and Tissue Regeneration, *J Dent Res* 91(11):1003-1010, 2012.

Lakshmipathy U, Verfaillie C. Stem cell plasticity. *Blood Rev.* 2005 Jan;19(1): 29-38.

Levings M, Sangregorio R, Roncarolo MG. Human CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med* 2001;193(11):1295-1302.

Levings MK, Bacchetta R, Schulz U, Roncarolo MG. The role of IL-10 and TGF- β in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;129(4):263-76.

Lloyd CM, Hawrylowicz CM. (2009). Regulatory T cells in asthma. *Immunity*,31:438-449.

Lu L, Liu Y, Yang S, Zhao Q, Wang X, Gang W, Han Z, Xu Z, Lu Y, Liu D, Chen Z, Han Z. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cell with hematopoiesis supportive function and other potentials. *Haematologica*. 2006; 91:1017-1026.

Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.* 1991; 174: 1209–1220.

Massaro AF, Gaston B, Kita D, Fanta C, Stamler JS, Drazen JM. (1995). Expired nitric oxide levels during treatment of acute asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 152:800-803.

McHugh RS, Shevach EM. The role of suppressor T cells in regulation of immune response. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110(5):693-702.

Meirelles Lda S, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Haematol*. 2003, 123(4):702-11.

Meyer EH, DeKruyff RH, Umetsu DT. T cells and NKT cells in the pathogenesis of asthma. *Annu Rev Med* 2008;59:281-92.

Mimeault M, Batra S.K., Recent Advances on the Significance of Stem Cells in Tissue Regeneration and Cancer Therapies, *Stem Cell*, 24, s.2319-2345, 2006.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100:5807-12.

Monica Angela Maxim, Olga Soritau, Mihaela Baciut, Simion Bran3, Grigore Baciut, The Role Of Dental Stem Cells In Regeneration, *Clujul Medical* 2015 Vol. 88 No. 4: 479-482.

Mori G, Ballini A, Carbone C, Oranger A, Brunetti G, Benedetto AD, Rapone B, Cantore S, Comite MD, Colucci S, Grano M, Grassi FR. Osteogenic differentiation of dental follicle stem cells. *International Journal of Medical Science*. 2012; 9(6):480-487.

Morsczeck C, Gotz W, Schierholz J, Zeilhofer F, et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol*. 2005;24:155–65.

Morsczeck C, Schmalz G, Reichert TE, Vollner F, Galler K, Driemel O. Somatic Stem Cells for regenerative dentistry. *Clin Oral Investig*. 2008 Jun;12(2):113-8.

Morsczeck C, Völlner F, Saugspier M, Brandl C, Reichert TE, Driemel O, Schmalz G. Comparison of human dental follicle cells (DFCs) and stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) after neural differentiation in vitro. *Clin Oral Invest*. 2010; 14:433–440.

Mosmann TR, Coffman RL. Th1 and Th2 cells: Different pattern of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7:145-173.

Ogur G, Sezer O., İnsan Kök Hücreleri İçin Yeni Bir Kaynak: Fetal Kök Hücreler, *Türkiye Klinikleri J Hem Onc*, 1(2), s.29-35, 2008.

Parisa Lotfinejad¹, Karim Shamsasenjan^{2*}, Aliakbar Movassaghpour³, Jafar Majidi¹, Behzad Baradaran¹, Immunomodulatory Nature And Site Specific Affinity Of Mesenchymal Stem Cells: A Hope In Cell Therapy, *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2014, 4(1), 5-13.

Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C. et al. (1) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 Apr;284(5411):143-7.

Raz E, Tighe H, Sato Y, Corry M, Dudler JA, Roman R. Preferential induction of a Th1 immune response and inhibition of specific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996; 93:514-5.

Rodriguez-Lozano FJ, Bueno C, Insausti CL, Meseguer L, Ramirez MC, Blanquer M, et al. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues. *Int Endod J*. 2011 Sep; 44(9):800-6.

Roncarolo MG, Levings MK. The role of different subset T regulatory cells in controlling autoimmunity. *Cur Opin in Immunol* 2000; 12:676-683.

Saraclar Y, Kuyucu S, Tuncer A, Sekerel B, Saçkesen C, Kocabaş C. (2003). Prevalence of asthmatic phenotypes and bronchial hyperresponsiveness in Turkish schoolchildren: an International Study of Asthma and Allergies in Childhood Study (ISAAC) phase 2 study. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 91:477-484.

Sears, MR, Greene, JM, Willan, AR, et al A longitudinal, population-based, cohort study of childhood asthma followed to adulthood. *N Engl J Med* 2003;349,1414-1422.

Secrist H, Chelen CJ, wen Y, Marshall JD, Umetsu DT. Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4+ T cells from allergic individuals. *J Exp Med* 1993; 178:2123-30.

Stemcells Scientific Progress and Future Research Directions Report Prepared by the National Institutes of Health, June 2001, <http://stemcells.nih.gov/info/2001report/2001report.htm> (18 Haziran 2016).

Suchánek J, Víšek B, Soukup T, Mohamed SK, Ivančáková R, Mokřý J, Aboul-Ezz EHA, Omran A. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth-isolation, long term cultivation and phenotypical analysis. *Acta Medica (Hradec Králové)* 2010, 53(2):93-99.

Şahin F., Saydam G., Omay SB., 2005. Kök hücre plastisitesi ve klinik pratikte kök hücre tedavisi. *Turk. J. Hematol. Oncol.*, 15,48-56.

Terese M., 2002. History of hematopoietic stem-cell transplantation. *Nat. Rev. Cancer*, 2, 231-238.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282:1145-1147.

Thornton AM, Shevach EM. CD4+ CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 1998, 188 (2), 287-296.

Toraks Derneği Bronş Astımı Çalışma Grubu: Ulusal Astım Tanı ve Tedavi Rehberi. *Toraks Dergisi*. Cilt 1, Ek 1, Nisan 2000.

Tournoy KG, Kips JC, Pauwels RA. Is Th1 the solution for Th2 in asthma. *Clin Exp allergy* 2002; 31:17-29.

Trounson A., The Production and Directed Differentiation of Human Embryonic Stem Cells, *Endocr Rev*, 27, s.208-219, 2006.

Umetsu DT, Akbari O, DeKruyff RH. Regulatory T cell control the development of allergic disease and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112(3):480-7.

Umetsu DT, Akbari O, DeKruyff RH. Regulatory T cell control the development of allergic disease and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112(3):480-7.

Ural AU. Kök hücreler. *Türk Ortopedi ve Travmatoloji Derneği Dergisi*, 2006; 5(34):140-5.

Van Rijt L.C. and Lambrecht B.N. Dendritic cells in asthma: a function beyond sensitization. *Clin Exp. Allergy* 2005;35:1125-1134.

Van Stekelenburg-Harmers AE, Van Achterberg TA, Rebel HG, Flechon JE, Campbell KH, Weima SM, Mummery CI. Isolation and characterization of permanent cell lines from inner cell mass cells of bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev*, 1995; 40(4):444-54.

Verfaillie C.M, Pera M.F, Lansdorp P.M., Stem Cells Hype and Reality, *Hematology Am Soc., Hematol Educ. Program*, s.369-391, 2002.

Verfaillie CM, Pera MF, Landsrop PM. Stem Cells Hype and Reality. *Hematology Am Soc Hem Edu Program*, 2002; 369-91.

Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM. Stem cells: hype and reality. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*. 2002; 369-91.

Weigner H. Induction and mechanisms of action of transforming growth factor- β - secreting Th3 regulatory cells. *Microbes Infect* 2001;182:207-214.

Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 2000; 100: 157-168.

Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic barriers and opportunities. *Science* 2000; 287: 1442-1446.

Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: Barriers and opportunities. *Science* 287:1442-1446, 2000.

Wierenga EA, Snoek M, Jansen HM, Bos JD, Van Lier Raw, Kapsenberg ML. Human-atopen spesific types 1 and 2 T helper cell clones. *J Immunol* 1991; 147:2942-2947.

Yokoi T, Saito M, Kiyono T, Iseki S, Kosaka K, Nishida E, et al. Establishment of immortalized dental follicle cells for generating periodontal ligament in vivo. *Cell Tissue Res*, 2007 327(2): 301–311.

Yokoi T, Saito M, Kiyono T, Iseki S, Kosaka K, Nishida E. Establishment of immortalized dental follicle cells for generating periodontal ligament in vivo. *Cell Tissue Res*. 2007; 327(2): 301–311.

Zapata AG. (2012). Bone marrow stroma: a source of mesenchymal stem cells for cell therapy. In *Stem Cells in Human Reproduction: Basic Science and Therapeutic Potential*. 3rd ed, New York: Cambridge University Press.

Zhang QZ, Nguyen AL, Yu WH, Le AD. Human oral mucosa and gingiva: a unique reservoir for mesenchymal stem cells. *J Dent Res*. 2012 Nov;91(11):1011-8.

Zhang X, Izikson L, Liu L, Weiner HL. Activation of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells by oral antigen administration. *J Immunol* 2001;167(8):4245-53

9 ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	ÜLKÜ	Soyadı	ARIĞ
Doğum Yeri	KARS/MERKEZ	Doğum Tarihi	13.11.1989
Uyruğu	T.C.	Tel	05457327271
E-mail	ulku.arig@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Pedagojik Formasyon	2012
Lisans	Anadolu Üniversitesi, Kamu Yönetimi	2016
Önlisans	Marmara Üniversitesi S.H.M.Y.O. Tıbbi Laboratuvar	2009
Lise	Atatürk Sağlık Meslek Lisesi	2007

İş Deneyimi

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
	Laborant	Okmeydanı E.A.H.	2009-2015
	Biyolog	Bağcılar E.A.H.	2015-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	İyi	İyi

Yabancı Dil Sınav Notu#							

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	66.791	66.963	61.570

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok iyi
Graphpad	İyi

*Çokiyi, iyi, orta, zayıfolarakdeğerlendiriniz.

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan Sözlü Bildiriler

- 1- Hasret Çağan, Elif Karakoç Aydın, Ahmet Özen, Safa Barış, **Ülkü Arıç**, Aysın Tulunay, **Tunc Akkoç**, Işıl Barlan. “Akut Astım Atağında Nebül ve Oral Kortikosteroid Tedavisinin İmmünolojik Yanıt Etkisi”. “XX. Ulusal Allerji ve Klinik İmmünoloji Kongresi” (02-06 Kasım 2013 Belek, Antalya)
- 2- Deniz Genç, **Ülkü Arıç**, **Muazzez Gökalp**, Noushin Zibandeh, Ercan Nain, Mehmet Kamil Göker, Tunc Akkoç “Dental Folikül Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Ev Tozu Akarına Duyarlı Astım Hastalarının Lenfositleri Üzerinde İmmünomodülatör Etkisinin In Vitro Ortamda Araştırılması” XXIII. Ulusal Allerji Ve Klinik İmmünolojisi Kongresi 8-12 Ekim 2016

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Poster Bildirileri

1-Eren Cerman¹, **Ülkü Arıç**², Muhsin Eraslan¹, Fatih Mahmut Bulut², Özlem Şahin¹, Selvinaz Özkara³, Fügen Vardar Aker³, Erdal Karaöz⁴, Tunç Akkoç² “2nd International Molecular Immunology & Immunogenetics Congress” f 27-30 April 2014 in Antalya. “Intravitreal Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cell Therapy In Diabetic Retinopathy”

2-**Ülkü Arıç**¹, Deniz Genç¹, Noushin Zibandeh¹, Ercan Naim¹, Mehmet Kamil Göker², Tunç Akkoç¹.The Investigation Of Immunological Effects Of Dental Follicle Mesenchymal Stem Cells On House Dust Mites Sensitive Asthma Patients' Lymphocytes In Vitro.“3rd International Molecular Immunology & Immunogenetics Congress (MIMIC-III)” (27-30 April 2016, Antalya, Turkey)

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan Poster Bildirileri

Sertifikalar

İstanbul Bilim Üniversitesi “Psikiyatrik Bozuklukların Nörobiyolojisi” Katılım sertifikası- 10 Haziran 2015

“3rd International Molecular Immunology & Immunogenetics Congress (MIMIC-III)” (27-30 April 2016, Antalya, Turkey)

15-17 Mayıs 2014 “Türk İmmünoloji Derneği Bölgesel Sempozyumları IX” Katılım Sertifikası, İnönü Üniversitesi, Malatya

13 Mayıs 2014 “Endnote Kaynakça Programı Eğitimi” Katılım Sertifikası, Marmara Üniversitesi, İstanbul

20 Aralık 2013 “4. Kök Hücre Sempozyumu” Katılım Sertifikası, Marmara Üniversitesi, İstanbul

27-30 Nisan 2013 “22. Ulusal İmmünoloji Kongresi” Katılım Sertifikası, İzmir

8-19 Nisan 2013 “Araştırmacılar için Deney Hayvanları Kullanımına ait Eğitim” kursu sertifikası, Marmara Üniversitesi, İstanbul

22 Şubat 2013 “Endnote Kaynakça Programı Eğitimi” Katılım Sertifikası, Marmara Üniversitesi, İstanbul

30 Kasım- 1 Aralık 2013 “3. Kök Hücre Sempozyumu” Katılım Sertifikası, Marmara Üniversitesi,
İstanbul

13 Eylül 2012 “Klinik Araştırma Metotları Kursu” Katılım Sertifikası, Marmara Üniversitesi,
İstanbul

İstanbul Teknik Üniversitesi “Biyokimya Günleri” Katılım Sertifikası – 12-13 Mart 2011

İstanbul Üniversitesi “International 7. IÜGEN Molecular Biology and Genetics Student Winter
School” Katılım Sertifikası 19-21 Şubat 2010

