TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DENTAL FOLİKÜL KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN (DF-MKH) EV TOZUNA DUYARLI ASTIM HASTALARINDAN ELDE EDİLEN NAİVE T LENFOSİTLERİN IN VITRO TH1 VE TH2 FARKLILAŞMASI ÜZERİNE ETKİSİ

DENİZ GENÇ

DOKTORA TEZİ

ÇOCUK SAĞLIĞI ve HASTALIKLARI ANABİLİM DALI,

ÇOCUK ALLERJİ ve İMMÜNOLOJİ BİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. TUNÇ AKKOÇ

İSTANBUL, 2018

TEZ ONAYI

Kurum	: Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi	: Doktora
Anabilim Dalı	: Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Allerji ve İmmünoloji Bilim Dalı
Tez Sahibi	: Deniz GENÇ
Tez Başlığı	: Dental Folikül Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin (DF-MKH) Ev Tozuna Duyarlı Astım Hastalarından Elde Edilen Naive T Lenfositlerin in vitro Th1 ve Th2 Farklılaşması Üzerine Etkisi
Sınav Yeri	: Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Arş. Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı
Sınav Tarihi	: 21.02.2018

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

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)	**Kurumu**	**İmza**
Prof.Dr. Tunç Akkoç	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hast. AD, Allerji ve İmmünoloji BD	
Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)		
Prof.Dr. Tunç AKKOÇ	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hast. AD, Allerji ve İmmünoloji BD	
Doç.Dr. Ahmet Oğuzhan ÖZEN	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hast. AD, Allerji ve İmmünoloji BD	
Doç. Dr. Betül KARADEMİR	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD	
Doç. Dr. Ajda ÇOKER	İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik	
Doç.Dr. Esra ÇAĞAVİ	İstanbul Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD	

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 01./03./2018 tarih ve 84 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Göksel ŞENER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

-Sınav evrakları 3 iş günü içinde ıslak imzalı tek kopya halinde Enstitüye teslim edilmelidir.

-Bu form bilgisayar ortamında doldurulacaktır.

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.

Deniz GENÇ

(Doktora Öğrencisi)



ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No.

Şekil 1. IFN-γ'nın Th2 yanıtları üzerindeki düzenleyici etkisi……. 21
Şekil 2. MKH'lerin immün düzenleyici etkisi…….. 25
Şekil 3. Çalışma planının şematik gösterimi…… 37
Şekil 4. CFSE işaretli hücrelerin akım sitometri cihazında analizi…….. 50
Şekil 5. $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücrelerin akım sitometri analizi.. 51
Şekil 6. Hücre canlılığı ve apoptoz oranlarının akım sitometri cihazında analizi…….. 53
Şekil 7. Monosit ve dendritik hücrelerde kostimülasyon oranlarının akım sitometri cihazında analizi……..…… 54
Şekil 8. Naive, efektör, efektör bellek ve merkez bellek $CD4^+$ T lenfosit oranlarının akım sitometri cihazında analizi…….. 55
Şekil 9. Th1/Th2/Th17 sitokin kiti standart hazırlanması…… 56
Şekil 10. DF-MKH' lerin morfolojik görünümü……. 59
Şekil 11. DF-MKH hücrelerinin immunofenotipik özelliklerinin akım sitometri sonuçları…….……..... 60
Şekil 12. DF-MKH hücrelerinin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma özellikleri…….……. 61
Şekil 13. $CD4^+$ T lenfosit proliferasyonu…… 64
Şekil 14. $CD4^+$ T lenfosit apoptozu…… 67
Şekil 15. $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranları……... 69
Şekil 16. $CD14^+$ ve $CD11b^+$ hücrelerde kostimülasyon……. 73
Şekil 17. Naive, efektör, efektör bellek ve merkez bellek $CD4^+$ T lenfosit oranları…… 76
Şekil 18. Kültür süpernatantlarında sitokin miktarı…… 80
Şekil 19. GATA-3, Tbet ve FoxP3 ekspresyonu…… 83
Şekil 20. DF-MKH'lerin TGF-β nötralizasyonu ve IDO, PGE2 blokajı ile $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranları……... 85

KISALTMALAR

APC	: Antigen sunucu hücre
CFSE	: Karboksi floresan süksinimidil ester
DMEM	: Dulbescco’s modified eagle’s medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DF-MKH	: Dental folikül kaynaklı mezenkimal kök hücre
DPBS	: Dulbecco’s phosphate buffered saline
FBS	: Fötal sığır serumu
FoxP3	: Forkhead box p3
IFN	: İnterferon
MHC	: Majör histokompatibilite kompleks
HLA	: İnsan Lökosit Antijeni
MKH	: Mezenkimal kök hücre
NK	: Doğal öldürücü hücre
PBMC	: Periferal kan mononüklear hücre
RPMI	: Roswell park memorial institute
TCR	: T hücre reseptörü
Th	: Yardımcı T hücre
TNF	: Tümör nekroz faktör
Treg	: Regülatör T hücre

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim sırasında beni her zaman yüreklendiren, destek olan, kendimi geliştirmemde bana yol gösteren, öğrencisi olmaktan onur duyduğum değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Tunç AKKOÇ'a en içten duygularımla minnettarlığımı ifade ederim.

Çalışmalarımız süresince desteğini ve bilgisini esirgemeyen Doç. Dr. Ahmet Oğuzhan ÖZEN'e ve hasta seçimini itinayla yapan, bu çalışmada büyük emeği olan Dr. Ercan NAİN'e teşekkür ederim.

Bu yolda birlikte yürüdüğüm, her engeli birlikte aştığım, bilgisinden ve hayata bakışından ders aldığım, çalışmama destek veren çok değerli arkadaşım doktora öğrencisi Noushin ZİBANDEH'e, zamanını ve bilgisini esirgemeyen sevgili Dilek BAŞER'e, çalışmam süresince özenle destek veren sevgili Muazzez GÖKALP, Yazgül DURAN ve Gamze AKGÜN'e sonsuz teşekkür ederim.

Varlığı hayatımdaki en büyük ödül olan sevgili kızım Bade'ye, her adımımda koşulsuz destek olan anneme ve babama verdikleri emek ve gösterdikleri sabırdan dolayı minnettarım. Hayatımın her aşamasında desteğini esirgemeyen sevgili kardeşim Ali Umman DOĞAN'a emekleri için minnettarım. Her zaman güç aldığım sevgili eşim İbrahim GENÇ'e katkısından ve desteğinden dolayı çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: SAG-C-DRP-200716-0372) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

1. ÖZET……. 1
2. SUMMARY…… 2
3. GİRİŞ ve AMAÇ…… 3
4. GENEL BİLGİLER…….. 5
4.1. İmmün Sistem…….. 5
4.1.1. Doğal İmmün Sistem…… 6
4.1.1.1 Epitel Tabaka…….. 6
4.1.1.2 Fagosit Hücreler…….. 7
4.1.1.3 Sitokinler……. 8
4.1.2. Edinsel Bağışıklık……. 9
4.1.2.1 Hümoral ve Hücresel İmmünite…….. 11
4.1.2.2. $CD4^+$ T lenfositler…….. 12
4.1.2.3. $CD8^+$ T lenfositler…….. 13
4.1.2.4. $CD4^+/CD25^+$ Tregülatör Hücreler……. 13
4.1.2.5. Antijen Sunucu Hücreler…… 14
4.1.3. Apoptoz……. 16
4.1.4. Astım…… 18
4.1.5. Astım Patofizyolojisi…… 18
4.1.6. Ev Tozu Akarı…….. 19
4.1.7. Astım Tedavisi……. 20
4.1.8. IFN-γ'nın astım ve alerjik hastalıklarda rolü……. 20
4.2. Kök Hücreler……. 22
4.2.1. Mezenkimal Kök Hücreler……. 22
4.2.1.1. Diş Folikülü Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler (DF-MKH)…….. 23
4.2.2. Mezenkimal Kök Hücreler ve İmmünomodülasyon…….. 25
5. GEREÇ ve YÖNTEM…… 26
5.1. Çalışma Planının Özeti…….. 26
5.2. Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar…… 27
5.3. Çalışmada Kullanılan Hücre Kültürü Malzemeleri……. 30

5.4. Kullanılan Cihazlar…….. 31

5.5. Kullanılan solüsyonların hazırlanması……..32

5.5.1. DF-MKH' ler için besiyerinin hazırlanması……. 32

5.5.2. Lenfosit Kültürleri için besiyerinin hazırlanması…….. 32

5.5.3 Kök hücre dondurma solüsyonunun hazırlanması…….. 32

5.5.4. PBS solüsyonunun hazırlanması…… 32

5.5.5. CDmix uyarımı için anti-CD3 ve anti-CD28

stok solüsyonların hazırlanması…… 33

5.5.6. Der p1 uyaranının hazırlanması…….. 33

5.5.7. IFN- γ uyaranının hazırlanması……... 33

5.5.8. Kollajenaz solüsyonunun hazırlanması……33

5.5.9. RIPA protein izolasyon solüsyonunun hazırlanması……33

5.5.10. Protein miktarı ölçüm solüsyonunun ve standartların hazırlanması……...34

5.5.11. Osteojenik stimülasyon besiyerinin hazırlanması……...34

5.5.12. Kondrojenik stimülasyon besiyerinin hazırlanması……34

5.5.13. Adipojenik stimülasyon besiyerinin hazırlanması……..35

5.5.14. Lizat solüsyonunun hazırlanması……35

5.5.15. Alizarin red solüsyonunun hazırlanması…….35

5.5.16. Oil red O solüsyonunun hazırlanması…….35

5.5.17. Alcian blue solüsyonunun hazırlanması…….35

5.5.18. TBST solüsyonunun hazırlanması……..35

5.6. Çalışma Planı……....36

5.6.1. Diş folikülü kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu……..38

5.6.2. İzole edilen hücrelerin pasajlanması…….38

5.6.3. İzole edilen kök hücrelerin karakterizasyonu……....39

5.6.4. İzole edilen kök hücrelerin farklılaştırılması……40

5.6.4.1. İzole edilen kök hücrelerin osteojenik farklılaştırılması……41

5.6.4.2. İzole edilen kök hücrelerin adipojenik farklılaştırılması……41

5.6.4.3. İzole edilen kök hücrelerin kondrojenik farklılaştırılması……..42

5.6.5. Kök hücrelerin 48 kuyucuklu kültür plaklarına ekilmesi……...43

5.6.6. Mononükleer hücre kültürlerinin yapılması……...43

5.6.6.1. Astım hastası, İmmünoterapi almış astım hastası
ve sağlıklı bireylerin seçimi……..43

5.6.6.2. Astım hastası, İmmünoterapi almış astım hastaları ve sağlıklı
bireylerden alınan venöz kandan mononükleer hücre izolasyonu……44

5.6.6.3. Lenfositlerin proliferasyon analizi için CFSE ile işaretlenmesi……..47

5.6.6.4. Lenfosit kültürünün ve kök hücre ve lenfositlerin
ko-kültürünün yapılması……..48

5.6.7. Analizler……49

5.6.7.1. $CD4^+$ T Lenfositlerin proliferasyon analizi……49

5.6.7.2. Lenfositlerin $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Tregülatör hücre analizi……...50

5.6.7.3. Lenfositlerin Annexin V/7AAD ile apoptoz oranlarının analizi……51

5.6.7.4. Antijen sunucu hücrelerde kostimülatör molekül ekspresyonu analizi 53

5.6.7.5. Naive, Efektör ve Bellek $CD4^+$ T lenfosit oranlarının belirlenmesi…….54

5.6.7.6. Hücre kültür süpernatanlarında sitokin tayini……...55

5.6.7.7. Protein ekspresyon analizi (Western Blot yöntemi)…… 56

5.6.7.8. DF-MKH'lerin immün düzenleyici mediatörlerinin belirlenmesi için nötralizasyon deneyleri……58

5.6.8. İstatistiksel analiz…….58

6. BULGULAR…….59

6.1. Diş Folikülü Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu……...59

6.2. DF-MKH'lerin Karakterizasyonu ve Farklılaşma Potansiyelinin değerlendirilmesi…..……..60

6.2.1. DF-MKH hücrelerin akım sitometri analizi……60

6.2.2. DF-MKH hücrelerin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik yönde farklılaştırılması…..…….61

6.3. DF-MKH astım hastalarının CD4+ T lenfosit proliferasyonunu baskıladı…62

6.4. DF-MKH astım hastalarında $CD4^+$ T lenfosit apoptozunu azalttı……. 65

6.5. DF-MKH astım hastalarında $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ regülatör T hücre oranını arttırdı…….68

6.6. DF-MKH astım hastalarının monosit ve dendritik hücrelerde kostimülasyonu baskıladı……70

6.7. DF-MKH astım hastalarının efektör, efektör bellek ve merkez bellek $CD4^+$ T lenfosit oranlarını azaltırken, naive $CD4^+$ T lenfosit oranlarını artırdı……..74

6.8. DF-MKH astım hastalarında IL-4 düzeylerini azalttı, IFN-γ ve IL-10 düzeylerini artırdı……..77

6.9. DF-MKH astım hastalarında GATA-3 ekspresyonunu azalttı,

Tbet ve FoxP3 ekspresyonunu artırdı……81

6.10. DF-MKH astım hastalarının immün yanıtlarını

TGF-β ve IDO ile baskıladı……..84

7. TARTIŞMA ve SONUÇ……86

8. KAYNAKLAR……...101

Dental Folikül Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin (DF-MKH) Ev Tozuna Duyarlı Astım Hastalarından Elde Edilen Naive T Lenfositlerin in vitro Th1 ve Th2 Farklılaşması Üzerine Etkisi

Öğrencinin Adı: Deniz GENÇ
Danışmanı: Prof. Dr. Tunç AKKOÇ
Anabilim Dalı: Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı
Bilim Dalı: Çocuk Allerji ve İmmünoloji Bilim Dalı

1. ÖZET

Amaç: Bu çalışmada ağız bölgesinde diş folikül dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin (DF-MKH) astım hastalığında $CD4^+$ T hücreleri üzerindeki etkisinin immünoterapi almış astım hastalarıyla karşılaştırılarak tedavi edici etkinliğinin *in vitro* ortamda araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Diş folikülünden mezenkimal kök hücre izolasyonları, karakterizasyonları ve farklılaşma analizleri yapıldı. Ev tozu akarına duyarlı astım tanısı almış ve sağlıklı bireylerin venöz kanlarından periferal kan mononüklear hücreler izole edildi. Lenfositlerin MKH' lerle birlikte anti-CD3/anti-CD28, Der p1 ve IFN-γ uyarımlı ve uyarımsız koşullarda 3 gün kültürleri yapıldı. Kültür sonrasında lenfosit proliferasyonu, $CD4^+FoxP3^+$ T regülatör hücre, Annexin/7AAD ile lenfosit apoptozu, naive, efektör ve bellek $CD4^+$ T hücre oranları, antijen sunucu hücrelerde kostimülasyon oranları, kültür süpernatantlarında IL-4, IL-10 ve IFN-γ düzeyleri ve hücrelerde GATA3, Tbet ve FoxP3 protein ifadesi analiz edildi.

Bulgular ve Sonuçlar: DF-MKH'ler astım hastalarından elde edilen periferal kan mononükleer hücrelerde $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranlarını istatistiksel anlamlı arttırarak $CD4^+$ T hücrelerde proliferasyonu baskıladı, apoptozu baskılayarak hücre canlılığını arttırdı. DF-MKH'ler astım hastalarında efektör ve bellek $CD4^+$ T hücre oranlarını azaltırken naiv T hücre oranlarını rölatif olarak arttırdı. DF-MKH, Monosit ve dendritik hücrelerde kostimülasyonu baskıladı. Bunun yanı sıra DF-MKH'ler astım hastalarında IL-4 miktarı ve GATA3 protein ifadesini anlamlı azaltırken IFN-γ miktarı ve Tbet ifadesini, IL-10 miktarı ve FoxP3 ifadesini anlamlı arttırdı. DF-MKH'nin astım hastalarında $CD4^+$ T hücre üzerindeki immün modülatör etkisinin immünoterapi almış astım hastalarının $CD4^+$ T hücre yanıtlarına yakın olduğu gözlemlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: DF-MKH, Astım, T lenfosit, İmmünmodülasyon

Effects of Dental Follicle Derived Mesenchymal Stem Cells on Th1 and Th2 Differentiation of Naive T lymphocytes of House Dust Mite Sensitive Asthmatic Patients *in vitro*

Student's Name: Deniz GENÇ
Advisor: Prof. Dr. Tunç AKKOÇ
The Department: The Department of Pediatric Allergy- Immunology

2. SUMMARY

Objective: In this study, the immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells isolated from dental follicle tissue on CD4+ T lymphocytes of asthmatic patients was evaluated by comparing with immunotherapy subjects *in vitro*.

Material and Method: Isolation, characterization and differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) from dental follicle tissue was performed before coculture assays. Perpheral blood mononuclear cells were isolated from house dust mite sensitive asthmatic patients, immunotherapy subjects and healthy volunteers. Lymphocytes were cultured in the presence and absence of MSCs, by stimulating with anti-CD3/anti-CD28 or Der p1 or IFN-γ for 3 days. After culture period Lymphocyte proliferation, $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regulatory cell frequency, apoptosis by AnnexinV/7AAD, naive, effector, and memory $CD4^+$ T lymphocyte ratio, costimulation on antigen presenting cells, supernatant cytokine levels (IL-4, IFN-γ, IL-10), GATA-3, Tbet and FoxP3 expressions of cultures cells were analyzed.

Results and Conclusion: DF-MSCs suppressed lymphocyte proliferative responses by enhancing $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T reg frequency, and also reduced apoptotic ratio of $CD4^+$ T lymphocytes. DF-MSCs reduced ratio of effector and memory T cell subsets in favor of naive T lymphocytes. Costimulatory molecule expression was reduced on monocytes and dendritic cells in the presence of DF-MSCs. In addition, DF-MSCs decreased IL-4 levels and GATA-3 expression and increased IFN-γ, and IL-10 levels, Tbet and FoxP3 expressions in asthmatic patients cocultures. We observed that DF-MSCs modulate T lymphocyte responses close to immunotherapy subjects.

Anahtar Sözcükler: DF-MSCs, asthma, T lymphocytes, Immunomodulation

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Allerjik astım, dünyada yaklaşık olarak 300 milyon kişiyi etkileyen ve havayollarının kronik inflamatuar hastalığıdır. Günümüzde allerjik astım tedavisi allerjeni soluma ya da temasını önleme, kortikosteroidler, β2 agonistler ve alerjen spesifik immünoterapiyi içermektedir. Ancak farmakoterapinin özellikle kortikosteroidlerin zararlı etkileri veya ilaç tedavisinin kesilmesini takiben hastalığın tekrar etmesiyle hücresel tedavi yöntemlerine ihtiyaç doğmuştur.

Astımda duyarlaşmaya yol açan alerjenler içinde ev tozu akarları en başta yer almaktadır. Akara maruz kalma hava yollarında astım bulgularının ortaya çıkmasına ve akut inflamasyona sebep olmaktadır. Astımdan korunmak için hava filtresi, hayvandan kaçınmak, sigaradan kaçınmak ve akarı barındırabilecek kumaşları ortamdan uzaklaştırmak gibi koruyucu nitelikte çevresel kontrol uygulamaları önerilmektedir. Allerjik astımda kullanılan inhale steroidler sekonder enfeksiyonlara yatkınlığı veya metabolik yan etkileri bulunmaktadır. Diğer bir tedavi seçeneği olan immünoterapi ise etkili bir yöntemdir ancak beş yaşın altındaki çocuklarda ve gebelikte önerilmemektedir.

Mezenkimal kök hücreler (MKH), multipotent yetişkin kök hücreleridir. MKH'ler kendilerini yenileyebilen, yağ dokusu, kemik, kıkırdak ve sinir hücreleri gibi hücre soylarına farklılaşabilme yeteneğindedirler. MKH' ler yağ doku, kemik iliği, dental dokular gibi birçok dokudan izole edilebilmektedir. Uluslararası Hücresel Tedavi Birliği kriterlerine göre MKH' ler yüzeylerinde kendilerine CD73, CD90, ve CD105 proteinleri ifade ederken hematopoietik belirteçler olan CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79, HLA-DR proteinlerini ifade etmezler.

Son yıllarda, MKH'lerin akut ve kronik hastalıklarda terapötik ajanlar olarak kullanımı konusunda yapılan çalışmalar dikkat çekmektedir. Yapılan çalışmalarda bu hücrelerin, T ve B hücre, doğal öldürücü hücre (NK), monositler ve dentritik hücre (DH) gibi doğal ve edinsel bağışıklık hücreleri üzerinde immün düzenleyici etkilerinin olduğu gösterilmiştir. MKH' ler inflamatuar yanıtları baskılayıcı etki gösterdiği

literatürde yer almaktadır. Hücre-hücre temasının ve kök hücreler tarafından salgılanan çözünebilir faktörlerin birlikte immünbaskılamayı sağladıkları düşünülmektedir. MKH'ın IFN-γ, IL-1β, TNF-α veya IL-4 gibi inflamatuar sitokinlere yanıt olarak salgıladığı mediatörler (TGF-β, IDO ve PGE2), inflamasyonda rol oynayan $CD4^+$ T hücreleri Tregülatör hücre fenotipine dönüştürmektedir. Tregülatör hücreler IL-10 salgılayarak lenfositlerin proliferasyonunu ve dolayısıyla inflamasyonu baskılamaktadır.

Astım tedavisinde MKH'lerin inflamatuar yanıtı baskılayıcı özelliği hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalarla literatürde yer almaktadır. Ancak dental dokulardan izole edilen MKH'lerle ilgili literatürde bilgi bulunmamaktadır. Dental dokular ek bir cerrahi işleme gerek duyulmadan diş çekim işlemi esnasında kolay elde edilebilen ve immün baskılayıcı etkisi yüksek olan MKH kaynağıdır.

Biz bu çalışma ile dental folikül mezenkimal kök hücrelerin ev tozu akarlarına duyarlı astımlı hastaların venöz kanından izole edilen periferal mononüklear hücreler üzerindeki immünomodülasyon etkisini araştırmayı amaçladık.

Bu amaç doğrultusunda dental folikül kaynaklı MKH'lerin astım hastalığının tedavisinde yeni bir seçenek olup olmayacağı hakkında bize fikir vermiş olacaktır, böylece çalışmamızın sonuçları literatüre önemli katkıda bulunacaktır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. İmmün Sistem

Bağışıklık sistemi vücudu patojenlerin veya allerjenler gibi istilacı ajanlardan koruyan savunma sistemidir. Bu sistemde yabancı ajanların tanınması ve ortadan kaldırılması için gerekli çeşitli hücre ve moleküller bulunmaktadır. İmmün sistem, benzer özellikteki molekülleri birbirinden ayırabilir. Bu moleküller patojen bir organizmaların sahip olduğu karbohidrat veya protein yapılar olabilir. Birçok farklı çeşitlilikte ayırdedici yapılara sahip olan yabancı maddelere karşı immün sistemde farklı yanıtlar oluşturulur. Bu yanıtlarda patojenleri tanıyan ve onları etkisizleştiren bazı mekanizmalar gelişmiştir. İmmün sistem vücudun birçok bölümüne dağılmıştır. İmmün sistem içinde yer alan hücrelerin öncül hücreleri kemik iliğinde oluşur ve birçok prosesle işlenerek olgunlaşmaya kadar kemik iliğinde kalabilir veya vücudun farklı bölgelerine göç edip orada olgunlaşabilirler. İmmün sistem hücreleri, kendilerinin veya başka hücrelerin salgıladığı hormon benzeri çözünmüş moleküllerin etkisiyle gelişir, yanıt oluşturur veya baskılanır. Salgılanan peptid ya da protein yapıdaki bu moleküllere sitokin denir.

Myeloid hücreler; monositler gibi agranülositlerden ve nötrofil, bazofil, eozinofil gibi granülositlerden oluşur. Monositler kemik iliğinde oluşup dolaşımına katılır ve dokulara geçer. Çeşitli dokularda monositler makrofajlara dönüşür ve geçtiği dokuya özgü makrofajlar olarak orada kalır. Lenfoid hücreler ise T hücreleri, B hücreleri ve doğal öldürücü hücrelerden oluşur. T hücreleri kemik iliğinde oluştuktan sonra olgunlaşma sürecini tamamlamak üzere timüs adı verilen organa girer, B hücreleri ise kemik iliğinde olgunlaşır. Olgunlaşan hücreler kan dolaşımına katılarak dalak ve lenf nodları gibi sekonder lenfoid organlara yerleşirler. Dolaşıma çıkma olgunluğuna erişen bu hücreler vücutta spesifik etkiler gösterir.

İmmün sistem genel olarak doğal ve edinsel olarak ikiye ayrılır. Doğal immün yanıt; yabancı maddenin vücuda girmesiyle ilk bariyeri oluşturan, tanıyıp yıkıma uğratmak için organizmada hazır olarak bulunur. Edinsel immün yanıt ise doğal

immün yanıtı takip eden ve patojenle karşılaşma sonrasında patojene ait antijene spesifik olarak gelişen daha etkili yanıtlar oluşmaktadır. Doğal immün sistemi oluşturan hücreler fagositler olan nötrofiller ve makrofajlar, dendritik hücreler, doğal öldürücü hücrelerdir. Doğal immünitede yer alan diğer moleküller ise kan proteinleri ve kompleman sistemidir.

Edinsel immün yanıtta T ve B lenfositler rol oynamaktadır. T hücreleri hücresel immüniteye, B hücreleri ise hümoral immüniteye ait hücrelerdir. Hücresel immün yanıtın hedefi vücuda giren antijenlerin sebep olduğu enfeksiyonları, ya da tümör hücrelerini yok ederek organizmayı korumaktır. Hümoral immünitenin hücreleri B lenfositlerdir ve yabancı maddeye karşı plazma hücrelerine dönüşerek antikor üretirler. İmmünitenin bu tipi antijen antikor yanıtı üzerine kurulmuştur.

4.1.1. Doğal İmmün Sistem

Doğal immün sistem, vücuda giren yabancı maddelere karşı yanıt oluşturan erken savunma sistemidir. İnflamasyon esnasında enfekte dokuya birkaç saat içinde gelebilen hücrelerden oluşmaktadır. Doğal immünite hem mikroplara hem de hasar görmüş hücrelere karşı organizmayı savunur. Bu savunma sistemi birçok mikrobun veya yabancı maddenin ortak yapılarını tanımaktadır. Doğal immünite fiziksel ve kimyasal bariyerler ile doğal immüniteye ait hücrelerden oluşur. Doku ve organların yüzeyinde bulunan epitel doku fiziksel bir bariyer oluşturmaktadır. Epitel doku yüzeyinde üretilen antimikrobiyal maddeler ise kimyasal bariyer oluşturmaktadır. Doğal immünitenin hücreleri fagosit hücreler olan nötrofil, makrofaj, dendritik hücre ve doğal öldürücü hücrelerdir (Abbas ve ark., 2012).

4.1.1.1. Epitel Tabaka

Organizmanın dış çevresinde bulunan mikroorganizmalar sağlam epitel yüzeyi kolaylıkla aşamamaktadır. Epitel yüzeyi aşabilen mikroplar ise yine epitel doku

hücreleri tarafından üretilen antimikrobiyal maddelerle etkisiz hale getirilmektedir. Bu epitel yüzeyler; deri, sindirim, solunum ve ürogenital sistemlerinin mukozal yüzeyleri devamlı epitel hücreleri ile kaplıdır ve mikropların girişinin engellenmesi için bir bariyer oluşturmaktadır. Epitel yüzeyin bütünlüğünün bozulmasıyla vücut enfeksiyon girişine müsait hale gelir. Ayrıca solunum ve sindirim kanalı gibi mukus müsin olarak adlandırılan glikoprotein yapıda bir madde içerir. Bu madde kayganlaştırıcı özelliğiyle mikropların bu kanallardan atılmasını kolaylaştırır. Bazı lökositler antimikrobiyal özellikte peptidler üretirler. Defensin ve katelisidin olarak adlandırılan bu peptidler antimikrobiyal etki göstermektedir (Abbas ve ark., 2012).

4.1.1.2. Fagosit Hücreler

Nötrofiller ve makrofajlar doğal bağışıklık içinde yer alan ve enfeksiyon bölgesinde ilk savunmayı oluşturan hücrelerdir. Mikrobu fagosite ederek lizozom denilen enzim içerikli başka bir keseyle birleşmesiyle enzimle parçalayarak yok etme yeteneğindedirler. Periferde bulunan ve polimorf nüklear lökositler olarak adlandırılan nötrofiller inflamatuar evrenin erken fazını oluşturur. Nötrofiller kemik iliğinde oluşur ve her biri periferde yaklaşık 6 saat dolaşır. Mikropların girişinden sonra saatler içinde nötrofiller enfeksiyon bölgesine göç eden ilk hücre grubudur (Abbas ve ark., 2012).

Monositler; kanda dolaşım halinde olan ve nötrofillerden sonra enfeksiyon bölgesine göç eden fagositik hücrelerdir. Kandan dokuya geçişinin ardından makrofajlara dönüşür ve mikroba karşı daha uzun süreli savunma oluşturur. Bulundukları dokulara göre makrofajlar; kemik iliğinde osteoklast, karaciğerde kupffer hücreleri, merkezi sinir sisteminde mikroglialar, akciğerde alveolar makrofajlar olarak isimlendirilirler. Enfeksiyon bölgesinde mikrobu içine alan makrofajlar yine kendi içinde bulunan lizozom denilen enzim içerikli bir keseyle birleşerek fagolizozomu oluşturur. Fagolizozom mikrobu enzimatik ve yıkıcı moleküller aracılığıyla parçalayark yok eder. Makrofajlar T lenfositlere antijen sunumunun yanısıra, interlökin-1 (IL-1), interlökin (IL-6) ve tümör nekroz faktör-α (TNF-α) adı verilen sitokinler üretirler. Bu sitokinler proinflamatuar sitokinler olarak

adlandırılır ve hem doğal hem de edinsel immün aktiviteleri yönlendirirler (Zoroğlu ve ark., 2003). Makrofajlar antijen sunan hücreler olarak da adlandırılır. Bu hücreler yabancı maddeleri yakalar, parçalar ve ortaya çıkan mikrobiyal antijenleri T ve B lenfositlere sunar. Antijen sunumunu yüzeylerinde bulunan majör histokompatibilite kompleksi (MHC) ile gerçekleştirir. Bu, immün yanıtın başlaması için önemli bir ilk adımdır (Saroj ve ark., 2012). Hücresel ve hümoral immün yanıtta lenfositler ve makrofajlar koordineli çalışırlar. İmmün sistemin bileşenleri tarafından uyarılan makrofajlar, TNF-α, IL-6 ve IL-1 sitokinlerini salgılayarak fagositik hücrelerin aktivasyonunu, endotelde adezyonunun artışını ve bunların enfekte dokulara geçişini hızlandırır (Taylor ve ark., 2005). Makrofajlar immün yanıtın düzenlenmesinin yanısıra dokudaki ölü hücreleri yok etmede de önemli rol oynarlar. Bu makrofajlar genellikle süpürücü (scavenger) olarak adlandırılır.

Dendritik hücreler (DH) immün yanıtın düzenlemesinde önemli rol oynayan hücreler olup beyin, testis ve göz haricinde tüm dokularda bulunan antijen sunan hücrelerdir. DH'lerin birincil görevi antijen sunmak olduğundan profesyonel antijen sunan hücreler olarak da adlandırılmaktadır. DH'ler naif T lenfositlere antijen sunarak immün yanıtın oluşmasına yol açmaktadırlar. Bunun için antijeni yakalar, işler ve yüzeyinde bulunan eş uyaran moleküllerle yüzeyinde sunarlar. Dendritik hücreler doku içerisinde immatur (olgunlaşmamış) olarak bulunurken mikrobiyal ajanı işledikten sonra yüzeyinde eş uyaran (kostimülatör) moleküller olan CD80, CD86 gibi molekülleri ve lenfoid organa göç etmesini sağlayan kemokin reseptörünü (CCR7) ifade etmeye başlar ve matur (olgunlaşmış) olarak lenfoid organlara göç eder. Burada naif T hücreyle karşılaşmasıyla işlediği antijeni yüzeyinden sunar. Bu şekilde edinsel immün yanıtları başlatır.

4.1.1.3. Sitokinler

Doğal ve edinsel immünitede yer alan ve hücrelerin immün işlevini sağlayan çözünmüş moleküllere sitokin denir. Bu moleküller peptid yapıda olup lökositlerin

büyüme ve farklılaşmasında, antijenlerin eliminasyonunda ve hematopoietik hücrelerinin gelişiminde rol oynar.

Sitokinler, solunum yollarındaki birçok inflamatuar hücreyi inflamasyon alanına çağırıp, onları aktive ederek ve yaşamsallıklarını arttırarak astımdaki kronik inflamasyonun organizasyonunda anahtar rol alırlar. Sitokinler immün yanıtı düzenleme özelliklerine göre şu şekilde gruplandırılabilirler; 1-Proinflamatuvar sitokinler: İnflamasyonu arttıran ve sürekliliğini sağlayan sitokinlerdir, 2- Büyüme faktörleri: Hücrelerin hayatta kalmasını arttıran ve hava yollarında yapısal değişikliklere neden olan sitokinlerdir, 4- Kemokinler: inflamatuar hücreler için kemotaktik olan sitokinlerdir, 5- Antiinflamatuar sitokinler: inflamatuar yanıtı durduran ya da baskılayan sitokinlerdir. T yardımcı hücre 2 (Th2) lenfositler ve bu hücrelerden salgılanan sitokinlerinin astım patogenezinde anahtar rol oynadığı düşünülmektedir. Astım patogenezinde immünolojik rol oynayan hücre eozinofildir, ancak inflamasyonunun gerçekleşmesi Th2 hücreler tarafından gerçekleştirir. T lenfositleri salgıladıkları sitokinlere göre Th1, Th2, Th17 gibi alt gruplara farklılaşabilir. Th1 hücreleri ağırlıklı olarak interferon-gamma (IFN-γ) sekrete ederken, Th2 hücreleri IL-4, IL-5 ve IL-13 sekrete etmektedir. Astım dahil birçok alerjik hastalıkta Th 2 hücreleri baskın olup salgıladıkları sitokinlerle alerjik inflamasyonu gerçekleştirmektedir. Bu hücrelerden salgılanan IL-4 ve IL-13 insanlarda Ig E ve Ig G4 sentezini indükler; IL-5 ise eozinofil farklılaşma ve aktivasyonunu sağlar. Th2 hücrelerinden salınan sitokinler aynı zamanda hava yolu inflamasyonunun gelişmesine neden olan mekanizmaları harekete geçirirler (Failla ve ark., 2007).

4.1.2. Edinsel bağışıklık

İmmün sistemin kullandığı iki ana savunma sistemi vardır. Bunlardan birincisi ve yabancı maddenin vücuda girmesiyle başlayan doğal bağışıklıktır. Bunu takip eden ikinci savunma sistemi edinsel bağışıklıktır. Doğal immünitede yanıtlar kısa süreli ve non-spesifiktir. Edinsel immünitede ise yanıtlar daha uzun süreli, kalıcı (bellek

hücreleri ile) ve spesifiktir. Doğal immünitede mikroorganizma ya da yabancı maddelerin ortak yapılarına aynı yanıtlar verilirken, edinsel bağışıklıkta antijene özgü yanıtlar verilir. Edinsel bağışıklığın iki çeşidi vardır. Birincisi aktive olan T lenfositlerin antijeni yok etmesine yönelik bağışıklıktır, buna hücre aracılı bağışıklık denir. İkincisi B lenfositlerin antijene karşı spesifik antikor üreterek gerçekleştirdiği bağışıklıktır, buna hümoral bağışıklık denir (Alberts ve ark., 2008).

Edinsel bağışıklıkta yer alan T ve B lenfositlerin antijen yapısını tanımasında farklılıklar vardır. T lenfositler küçük peptid yapıdaki antijenleri tanırken, B lenfositler daha büyük yapıdaki protein, lipid, karbonhidrat ve nükleik asit yapısındaki antijenleri tanır. Antijen sunucu hücreler tarafından işlenen ve açığa çıkarılan antijen majör histokompatibilite kompleksi (MHC) ile hücre yüzeyinden T lenfositlere sunulur. T lenfositler MHC' ye bağlanmış olan antijeni yüzeyindeki t hücre reseptörü (TCR) ile tanır ve aktive olur. T lenfositler aktive olduğunda lenfoid organ içinde veya enfeksiyon bölgesine göç ederek etkili olmaktadır. Bundan farklı olarak, aktive olan B lenfositler bulundukları yerden uzak mesafelerde de etkili olabilen antikorları üretirler (Hall ve Guyton, 2007).

T lenfositlere peptid antijeni sunan iki MHC sınıfı vardır bunlar sınıf I ve sınıf II MHC molekülleridir. Sınıf I MHC molekülünde T hücre eş reseptörü CD8' in bağlanma bölgesi bulunmaktadır. $CD8^+$ T lenfositleri yalnızca CD8' in bağlanabileceği sınıf I MHC moleküllerinin gösterdiği peptid yapıdaki antijenlere yanıt verebilir. Sınıf II MHC moleküllerinde ise T hücre eş reseptörü CD4' e bağlanma bölgesi bulunur. CD4 sadece sınıf II MHC molekülerine bağlanabilir ve bu molekülle sunulan antijeni tanıyabilir. Sınıf I MHC molekülleri peptid yapıdaki antijenleri sitozolik yapıdaki proteinlerden edinirken, sınıf II MHC molekülleri peptid yapıdaki antijenleri hücre içi veziküllerde bulunan proteinlerden edinir (Yıldız ve Deniz, 2007).

4.1.2.1. Hümoral ve Hücresel İmmünite

Hümoral immünitede B lenfositler yer alır. Her bir B lenfosit antikorun bir türünü üretir ve antikor salgılayan hücrelere dönüşüp çoğalırlar. B lenfositlerin hareketiyle vücutta bir immünolojik bellek oluşur ve patojenlerle tekrarlayan karşılaşmalarında anında ve hızlı cevap verebilirler (Inman ve ark., 2014). Hümoral immün yanıtlar esnasında bellek hücreleri de oluşur ve bu hücreler kemik iliğine göç ederek orada bulunurlar ve aynı antijenle tekrarlayan karşılaşmalarında enfeksiyona karşı daha hızlı, erken ve etkili savunma sağlarlar (Yıldız ve Deniz, 2007).

Lenfositler antijenlerle ilk maruz kalmada çoğunlukla IgM yapısında antikor sentezlerler ve bu primer immün yanıttır. Ancak aynı antijenlere bir sonraki karşılamasında verilen yanıt sekonder immün yanıttır ve primer immün yanıttan daha güçlü ve etkilidir. T hücre bağımlı antijenlere karşı hümoral immün yanıtlarda yüksek afiniteli IgA, IgE, IgG gibi antikorlar da üretilir. Protein yapısındaki antijenlerle tekrarlayan karşılaşmaları sonucunda antikorun afinitesi artar (Karsunky ve ark., 2008).

B lenfosit yüzeyine bağlı antikorlar aynı zamanda antijenlerin tanınması için reseptör görevi de üstlenirler. Bir antikor molekülünde iki ağır (heavy-H) ve iki hafif (light-L) zincir bulunur, her bir hafif zincirde bir değişken (variable-V) ve bir sabit (constant-C) bölge bulunur, her bir ağır zincirde de bir V, üç ya da dört C bölge bulunur. C bölgesinde μ, δ, α, γ, ε olarak adlandırılan beş çeşit ağır zincir vardır. Antikor molekülünün isimlendirilmesi sahip olduğu ağır zincir tiplerine göre IgM, IgG, IgD, IgE, IgA şeklinde yapılır (Yıldız ve Deniz, 2007).

Hücresel immünitede rol oynayan hücre grubu T lenfositlerdir. T lenfositler kemik iliğinde oluşur ve timusta olgunlaşır. T lenfositler antijen ile ilk karşılaşmasından sonra aktive olurlar (Saroj ve ark., 2012). Efektör fonksiyonlarına göre T lenfositler kendi içinde alt gruplara ayrılırlar. Sitotoksik T lenfositler yüzeyinde CD8 molekülünü ifade ederler. CD8+ T lenfositin görevi hedef hücredeki ölüm yolaklarını aktive ederek yabancı antijen içeren bir hücreyi öldürmektir. Yardımcı T lenfositler yüzeylerinde

CD4 ifade ederler ve aktive olduklarında spesifik sitokinler salgılayarak $CD8^+$ T lenfositlerin, B lenfositlerin ve makrofajların aktivasyonuna yardımcı olurlar. Böylece hem doğal hem de edinsel immün yanıtlar arasında bir köprü görevi görür. $CD4^+$ T lenfositlerinin bir alt grubu olan Treg' ler otoimmün yanıttan vücudu korur (Inman ve ark., 2014).

T lenfositlerin yüzeyinde bulunan TCR' ler, Ig' lerle fonksiyonel ve yapısal olarak çok benzerdir. Ancak, TCR' leri sekrete edilmezler ve hedefleriyle uzak mesafelerde etkileşmezler (Kierszenbaum ve Tres, 2012). T lenfositler direkt hücre temasıyla etkilerini gösterirler. T hücreler peptid yapıdaki antijenleri tanırlar bu sebeple yabancı bir proteini tanıması için bu proteinin öncelikle peptidlerine ayrılması ve antijen sunucu hücrelerce (APC) sunulması gerekmektedir. CD4+ T lenfositlere antijen sunan hücreler yüzeyinde MHC-II molekülünü taşıyan hücreler olan; monositler, dendritik hücreler ve B lenfositlerdir. Tüm T lenfositler, yüzeylerinde CD2 ve CD3 belirteçlerini ifade ederler (Ross ve Pawlina, 2006).

4.1.2.2. $CD4^+$ T lenfositler

Yardımcı T lenfositler olarak da isimlendirilen $CD4^+$ T lenfositler peptid yapıdaki antijenlere yanıt oluşturan edinsel immün sistem hücreleridir. Antijen sunucu hücrenin taşıdığı antijeni bağladığı sınıf II MHC molekülünün $CD4^+$ T lenfositin TCR'si ile bağlanması sonucunda hücre aktivasyon sinyalleri başlatılır. $CD4^+$ T lenfositlerin aktivasyonu ile hücre içinde sitokin üretimi için transkripsiyon faktörleri sitokin üretimini gerçekleştirmek üzere aktive olur. Üretilen bu sitokinler diğer yardımcı T hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını uyarır (Ross ve Pawlina, 2006). Hücre içi mikroplarla oluşan enfeksiyonları yok eden $CD4^+$ T hücreleri, fagositleri aktive ederek bu fagositlerin veziküllerinde yaşayabilen mikropların yok edilmesini sağlar. Salgılanan sitokinler $CD4^+$ T lenfositlerin fenotipini belirler (Alberts ve ark., 2008).

Th1 sitokin profili hücre içi patojenlere karşı korunmada esastır. Makrofajlardan salgılanan IL-12, naif $CD4^+$ T hücrelerinin $CD4^+$ Th1 yönünde farklılaşmasını uyarır.

(Yıldız ve Deniz, 2007). IFN-γ, IL-2 ve TNF-β salgılayan Th1 hücreleri makrofaj ve NK hücrelerini aktive ederek fagositoz veya öldürme yeteneklerini arttırmaktadır (Nelson, 2004). IFN-γ, Th1 hücreleri tarafından üretilen en önemli sitokinlerden biridir, makrofajları aktive eder ve B hücrelerde antikor izotiplerinin üretimini uyararak fagositozu aktifleştirir (Yıldız ve Deniz, 2007).

Th2 sitokinleri B lenfositleri IgE üretimi için aktive eder. APC' den IL-12 salgılanmazsa, T lenfositler IL-4 salgılarlar ve $CD4^+$ T hücrelerinin $CD4^+$ Th2 yönüne doğru polarize olmasını sağlar. Th2 hücreleri IL-4 salgılayarak IgE antikorunun üretimini, IL-5 salgılayarak eozinofillerin oluşmasını ve IL-13 salgılayarak mukus sekresyonunu sağlar. Bu hücreler özellikle helmintik parazitlere karşı eozinofil aracılığıyla fagositozdan bağımsız immüniteyi aktifleştirir (Abbas ve ark., 2007). IL-4, IL-5, IL-13 salgılayan Th2 hücreleri hümoral immün yanıtlardan ve allerjik reaksiyonlardan sorumludur. Th2 yönünde polarizasyon Th1 oluşumunu baskılar (Nelson, 2004).

T hücre çoğalması; belli bir peptid antijene yanıt veren naif T hücre sayısı azdır, patojenle baş edebilmek için çoğalma gerekir. TCR-peptid MHC kompleksi birleşimi ve eş-uyaran reseptörü ile uyarım sonucunda klonal çoğalma gerçekleşir. TCR ve CD28 uyarımında ortaya çıkan ikincil sinyalle IL-2 üretimi gerçekleşir ve bu sitokin T hücre çoğalması için en önemli sitokindir. T hücre çoğalması esnasında salgılanan IL-2'nin yarattığı bir diğer sonuç ise bu sitokinin reseptörünün (IL-2R; CD25) T hücre yüzeyinde ifade edilmeye başlamasıdır. (Anderton ve Wraith, 2002).

4.1.2.3. $CD8^+$ T lenfositler

$CD8^+$ T lenfositler sitotoksik T hücreler (CTL) olarak da adlandırılır. $CD8^+$ T lenfositler patojenle enfekte veya malign dönüşüme uğramış konak hücrelerini öldürür. CTL hücre ile hedef hücre arasında immünolojik sinaps benzeri yapı oluşur. CTL özelleşmiş granüller içerir ve bu granüllerini doğrudan hücre teması ile ortama salar. Bu granüller perforin, granzim ve granulozin gibi efektör proteinler içerir.

Perforin hedef hücre membranında delikler açar ve granzimlerin geçişini kolaylaştırır. CTL IFN-γ, TNF−α ve IL-2 gibi sitokinleri üretir. IFN-γ, viral replikasyonu baskılar ve MHC sınıf I ekspresyonunu artırır. $CD8^+$ T lenfositler sınıf I MHC molekülü tarafından sunulan peptid yapıdaki antijenleri tanırlar (Hall ve Guyton, 2007).

4.1.2.4. $CD4^+/CD25^+$ Tregülatör Hücreler

Tregülatör (Treg) hücreler $CD4^+$ T hücrelerinin bir alt grubu olup peptid-MHC ile eşuyaran varlığında uyarılan TCR'ler aktif T hücrelerinin çoğalmasını ve sitokin üretimini baskılar. $CD4^+$ T hücrelerin %5-10' unu oluştururlar. Bu hücreler öz antijenlere veya yabancı antijenlere karşı T lenfositler ile ilişkili immün yanıtları baskılar. Treg hücreler otoimmün hastalıklara karşı immün yanıtı baskılamada önemli rol oynar. İntrinsik olarak işleyen anerjiden farklı olarak Treg, diğer hücrelerin yanıtını düzenleyerek engeller. Bu mekanizma ile inflamatuar yanıtlar baskılanır. Treg'ler iki şekilde ortaya çıkar. Timusta oluşanlara "doğal" Treg (nTreg) hücreleri denir, inflamatuar yanıtlar esnasında $CD4^+$ veya $CD8^+$ hücreler tarafından uyarım sonrası oluşan Treg hücrelere "indüklenmiş" Treg (iTreg) hücreler denir. Treg ve iTreg hücreleri CD4 ve CD25 ifadesinin yanısıra FoxP3 ekspresyonunu da gerçekleştirirler. İmmün sistemi baskılayıcı etkilerini IL-10 ve TGF-β salgılayarak gösterirler. Sekrete edilen bu sitokinler immün yanıtları baskılayıcı özelliktedir (Gallimore ve Godkin, 2008).

4.1.2.5. Antijen Sunucu Hücreler

Antijen sunucu hücreler; dendritik hücreler, B lenfositler ve makrofajlardır. Bütün çekirdekli hücreler sitozolde bulunan mikrobiyal antijenleri MHC-sınıf I molekülüyle sunarken, sadece dendritik hücre, B lenfositler ve makrofajlar fagositozla içine aldıkları mikrobiyal ya da mikrobiyal olmayan antijenleri MHC-sınıf II molekülüyle T lenfositlere sunarlar. Dendritik hücrelerin ana görevi antijen sunmak olduğundan bu hücrelere "profesyonel antijen sunucu hücre" de denilmektedir (Steinman, 2003).

Dendritik hücreler (DH) immün yanıtın düzenlemesinde önemli rol oynayan; beyin, testis ve göz haricinde tüm dokularda bulunurlar. DH'ler farklılaşmamış T lenfositleri uyararak primer immün yanıtın oluşması- na yol açmaktadır. Bu fonksiyonlarını gerçekleştirebilmek için antijeni yakalama, antijeni işleme ve ko-stimülan moleküllerle T hücreye sunma yeteneğine sahiptir. Aynı zamanda DH'ler B hücre fonksiyonlarının oluşumunda da etkili olduklarından hümoral immünitenin gelişiminde de önemli rol oynamaktadır (Browne ve ark., 1997).

DH'yi tanımlamak için çeşitli yüzey belirleyicilerinin varlığı veya yokluğunun birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir. Bunlar: a. CD11a (LFA-1), CD11c, CD50 (ICAM-3), CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2) ve CD58 (LFA-3)'yi içeren adezyon moleküllerinin varlığı b. Ko-stimülan moleküllerden aktivasyon belirleyici olarak CD40, CD80, CD83 ekspresyonu c. Reseptör aracılı antijen alımı için Fc reseptörleri (CD32, CD64), immün kompleks endositozu için C3bi kompleman reseptörleri, CD11b gibi reseptörleri içerirler. HLA-DR, CD80 veya CD83 pozitifliği matür DH için; HLA-DR, CD86 pozitifliğinin ise immatür DH tanımlamakta kullanılan temel yüzey molekülleridir (Hochrein ve O'Keeffe, 2008).

DH'ler CD4+ ve CD8+ T lenfositleri aktive etmek için antijeni yakalar ve işleyip T lenfositlere sunar. Matürasyon aşamasında DH'ler periferik dokudan sekonder lenfoid yapılara doğru harekete başlar ve orada T hücreleri uyaran matür DH'lere dönüşür. Matürasyon sürecinde MHC molekülleri endositik kompartmandan hücre yüzeyine doğru çıkmaya baş- lar; antijenlerin ve patojenlerin hücre içine alımında selektif bir azalma ve T hücreleri için DH hücre yüzeyindeki ko-stimülatör moleküllerde bir artış izlenir (Lipscomb ve ark., 2007).

Genelde, bir kez olgunlaşan ve lenf düğümüne giren DH, T hücreye 10 saate kadar antijen sunma yetene- ğine sahiptir. T hücre stimulasyonu gerçekleşince de DH'ler apoptotik ölüme uğrar ve böylece geliştirilen immün yanıt dengelenir.

DH'ler fazla miktarda ko-stimülan moleküller taşıdı- ğından 100-3000 kat kadar T lenfositi uyarabilir; bundan dolayı diğer ASH'lere göre 100 kat daha fazla antijen

sunumu sağlayabilmektedir. DH'lerin yüzeylerinde bulunan CD58 (LFA-3), CD54 (ICAM- 1), CD50 (ICAM-3), CD102 (ICAM-2), CD80 (B7- 1), CD86 (B7-2) gibi adezyon ve ko-stimülan moleküller ile T lenfositlerde bulunan CD2 ve CD28 gibi moleküller ilişkiye girerek primer immün yanıtın başlaması için gerekli sekonder sinyalleri oluşturur (Foti ve ark., 2006). DH'ler aynı zamanda IFN-α, IL-1, IL-6, IL-7, IL-12 ve IL-15 ifade ederek primer immün yanıtta etkili olur. DH'lerin IL-12 ile Th1; IL-10 ile Th2 sitokin yanıtını oluşturduğu gözlenmiştir. IL-12, IFN-γ ekspresyonunu artırıp T lenfositleri Th1 fenotipine yönlendirerek T ve doğal öldürücü (NK) hücrelerinin sitotoksik etkilerini artırır. IL-12 üretiminin IL-10, IFN-α, nitrik oksit, TGF-β gibi sitokinlerle inhibe olduğu görülmektedir. IL-10 ise ko-stimülan moleküllerin ekspresyonunu azaltıp IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α ve GM-CSF gibi inflamatuvar sitokinleri baskılayarak Th yanıtını Th2'ye yönlendirmekte, böylece DH matürasyonunu inhibe etmektedir (Yeşilyurt ve Fidan, 2011).

4.1.3. Apoptoz

Vücudumuzdaki her hücre belirli bir süre yaşar ve bu yaşam programlanmış hücre ölümüyle sonlanır. Hücre ölümüyle hücre çoğalması arasında kontrollü bir denge vardır. Hücre ölüm tiplerinden biri olan apoptoz hücrelerin kendilerini yok ettikleri, programlı, genlerle düzenlenen, enerjiye gereksinimi olan, homeostazın korunmasında görevli, bir olaydır. Apoptoz embriyonik dönemde, postnatal hayatta ve patolojik durumlarda gözlenebilir. Apoptoz hücrenin kendisini yok etmesi için metabolik ve fizyolojik işlevler ortaya koyduğu bir olaydır. Bir hücre apoptoz uyarısı aldıktan sonra ortamdan uzaklaşır, diğer hücreler ile bağlantısını koparır ve büzüşmeye başlar. Hücre organelleri yapılarını korur. Hücre çekirdeği küçülür ve parçalara ayrılır. Hücre küçük parçalar halinde membranlı olarak apoptotik cisimciklere ayrılır. Bu apoptotik cisimcikler makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir (Bellamy ve ark., 1995; Ellis ve ark., 1991).

Apoptozun hücre döngüsünde ve hücre sayısı dengesinde önemli rolleri vardır. Postnatal hayatta apoptoz görülen olaylar; menstruasyon sırasında endometriyumun

tabakasının dökülmesi, canlıyı dış etkenlerden koruyan deri tabakasının yenilenmesi sürecinde üst epitel hücrelerin apoptoza uğrayıp ölmesi, DNA hasarı olan hücrenin apoptozu hücre dengesinin korunması için gereklidir (Marti ve ark., 2001; Ford, 2001). Patolojik durumlarda da apoptoz diyabet, nörodejeneratif hastalıklar, bağışıklık hastalıkları, tümör oluşumu gibi olaylarda görülür (Kannan ve Jain, 2000).

Apoptozun düzenlenmesinde belirli moleküller, proteinler ve mitokondri rol oynar. Apoptoz sürecinde önemli rol oynayan Bcl-2 ailesi iki gruptan oluşur; anti-apoptotik ve pro-apoptotik üyeler. Anti-apoptotik üyeler, Bcl-2, Bcl-X_L ve Mcl-1' dir ve bunlar hücrede fazla ise hücre apoptoza daha az eğilimlidir (Adams ve Cory, 1991). Bunlar mitokondri membranında dış kısımda yer alırlar ve hücrenin hayatta kalması için çalışırlar. Pro-apoptotik üyeler, Bad, Bax, Bid, BclXs' dır. Bunlar mitokondrinin membranı ile ilişki kurarak ve apoptoz indükleyici faktör (AIF) ve sitokrom-C nin salınmasını arttırarak apoptozu indüklerler (Adrain ve Martin, 2001; Spierings ve ark., 2004).

Apoptozun indüklenmesinde P53 transkripsiyon faktörü görev alır. P53, hücrede DNA hasarı olduğunda hücre bölünmesini durdurup DNA' nın tamir edilmesi için zaman kazandırır. Hasar tamir edilemeyecek ise Bax ve Fas yapımını artırır Bcl-2 ve Bcl-xL'yi baskılayıp ve apoptozu indükler (Vousden ve Lu, 2002). İmmünsistemde hücre ölümünü Fas reseptörü kontrol eder. Bunlar sitotoksit T hücreler ve doğal öldürücü hücreler üzerinde bulunurlar. Bu protein hücre yüzeyinde kendi reseptörüne bağlanır ve uyarılmayla prokaspazlar uyarılıp apoptoz başlar (Spierings ve ark., 2004, Curtin ve Cotter, 2003).

Kaspazlar apoptozu indükleyen, sistein proteazlardır. Hücrede inaktifdirler fakat birbirlerini aktifleştirirler ve hücrenin keseciklere ayrılmasına sebep olurlar (Adrain ve Martin, 2001; Spierings ve ark., 2004).

Apoptoz ile nekroz birbirinden farklıdır. Nekroz; rastgele gelişen bir süreçtir ve genler tarafından kontrol edilemez. Nekroz şiddetli oksidatif stres, ağır metaller, hipertrofi gibi olaylarda görülür. Hücre membranının bütünlüğü kaybolur, Hücre iyon dengesini kaybeder ve sıvı almaya başlayıp şişer, büyük vakuoller oluşur ve hücre lizis olur. Nekrozda ATP gerekmez, DNA rastgele parçalanır, inflamasyona sebep olur ve ortama nötrofillerin ve makrofajların göçü gerçekleşir. Bu olaylar nekrozun ayırt edici özelliğidir (Golstein ve Kroemer, 2007; Nicotera ve ark., 2004).

4.1.4. Astım

Astım, dış ortamda bulunan alerjenlere, sigara dumanına, çeşitli kimyasallara maruz kalma gibi tetikleyici faktörlere karşı, havayollarının daralması ile ortaya çıkan ve ataklara sebep olan kronik inflamatuar bir akciğer hastalığıdır. Astım dünyada yaklaşık 300 milyon kişiyi etkilediği tahmin edilmekte, ülkemizde yaklaşık %5-7 erişkini, %13-15 çocuğu etkilemektedir. Kronik inflamasyon hışıltılı solunum, nefes darlığı, göğüste sıkışma hissi ve öksürük ataklarına neden olan havayolu aşırı duyarlılığı ile ilişkilidir. Astım için risk faktörler genellikle genetik ve çevresel faktörler olarak ikiye ayrılmaktadır. Genetik faktörler içinde ailede allerji varlığı, atopi ve bronş hiperreaktivitesi yer almaktadır. Çevresel faktörler çok çeşitlidir, ancak genellikle; sigara dumanına ve hava kirliliğine maruz kalma, viral enfeksiyonlar, ev tozu akarları, evcil hayvanlar, küfmantarı ve polenler sayılabilecek bazı tetikleyici etkenlerdir (Holgate, 2008).

4.1.5. Astım Patofizyolojisi

Astımda havayolu obstrüksiyonu sonucunda patofizyolojik değişiklikler oluşur ve klinik semptomlar ortaya çıkar. Havayolu düz kas kontraksiyonu, havayolu mukozal ödemi ve mukus hipersekresyonu obstrüksiyona katkıda bulunur. Astımda, Th2 hücreler baskındır ve inflamasyonu yönlendiren hücrelerdir. Astımda tip 1 aşırı duyarlılık reaksiyonu mevcuttur ve bu reaksiyonda antijen alerjendir. İnflamatuar yanıtlar esnasında B lenfositlerin ürettiği antikor Ig E'dir, hedef hücre ise dokudaki mast hücresidir. Allerjen önce antijen sunan hücreye (DH) sunulur. Antijen sunan hücre ve naif T hücreye antijen sunumunun ardından Th2 hücreye dönüştürür. Th2 hücredeb sekrete edilen IL-4 ve IL-13 sitokinleri B lenfositleri plazma hücresine dönüştürmesiyle spesifik Ig E üretimi başlar. Dolaşımdaki Ig E yüksek affiniteli Ig E reseptörü taşıyan hücrelere; doku mast hücresine, bazofile veya eozinofile bağlanır. Organizma aynı antijen ile tekrar karşılaştığında antijen kendine spesifik antikora bağlanır. Bu bağlanma mast hücresinde bulunan histamin, vazoaktifamin veya prostaglandin gibi maddeleri taşıyan keseciklerin hücre dışına salınarak degarnüle

olmasına sebep olur (Eder ve ark., 2006). Perifere salınan bu mediatörler birkaç dakikada meydana gelen erken faz reaksiyonuna yol açarlar. Salgılanan mediatörlerin ortak etkileri düz kas kasılması, damar geçirgenliği ve mukus sekresyonunun artışıdır. Geç faz reaksiyonunda ise Th2 hücresi ve mast hücresinden sekrete edilen IL-3, IL-5 ve GM-CSF, kemik iliğinde eozinofil üretimine ve dolaşıma geçmesine yol açarlar. Eozinofilde bulunan ve degranüle olan maddeler inflamasyon bölgesinde doku hasarına yol açar. Remodelling (yeniden yapılanma) olarak adlandırılan bu olaylar havayolunun geri dönüşümsüz değişimine neden olabilir (Barnes, 1996).

Astım tedavisinde hedeflenen hücre grubu Th2'dir. Tedavide amaç Th2'yi azaltıp, Th1'i arttırmaktır. Çünkü Th2'den salınan IL-4 ve IL-13 IgE sentezinin artmasında, IL-3, IL-5 ve GM-CSF ise eozinofilik inflamasyon oluşumunda rol oynarken Th1 hücrelerin artışı bu olayları tersine çevirmektedir. Th1 hücreler tarafından salgılanan IFN-γ, Th2 hücreler üzerinde inhibitör etkiye sahiptir ve bu hücrelerin oluşumunu engellemektedir. Th2 polarizasyonunun engellenmesiyle inflamasyon sürecinde meydana gelen eozinofil oluşumu, eozinofil ve mast hücresi aktivasyonu, B hücrelerin plazma hücresine dönüşerek IgE sentezleme prosesi gibi olaylar da baskılanmaktadır (Gajewski ve Fitch 1988)

4.1.6. Ev Tozu Akarı

Ev tozu akarları Arachnida sınıfının Acari alt sınıfında bulunan artropodlardır. Bu akarlara ait parçaların kuruyarak küçük partiküller şeklinde duyarlı kişiler tarafından alınması sonucunda astım, alerjik rinit, atopik dermatit gibi alerjik hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Ev tozu akarlarının en sık rastlanılanları Dermatophagoides pteronyssinus ve Dermatophagoides farinae türleridir (Ertabaklar ve ark., 2006). Ev tozu akarından korunmak için öncelikle akar kaynağı olan eşyaları ortamdan uzaklaştırmak ve sonrasında semptomatik yaklaşımlar ve immünoterapi uygulanmaktadır (Hart ve Whitehead, 1998)

4.1.7. Astım Tedavisi

Astım geri dönüşümsüz safhaya girmediği sürece kolaylıkla kontrol altına alınıp tedavi edilebilen bir hastalıktır. Astımda zamanında ve düzenli tedavi uygulandığı sürece hastalık yaşamı olumsuz yönde etkilemez. Ancak eksik ya da düzensiz tedavi veya bilinçsiz ilaç kullanımı, hastalığın giderek ilerlemesine, atak sayısının ve şiddetinin artmasına, sürekli nefes darlığı ve diğer şikayetlerle yaşamasına neden olabilir. Astım tedavisinde kullanılan ilaçlar temel olarak iki grupta ele alınabilir. Bunlardan birincisi semptom giderici ilaçlardır. Etkileri 1-2 dakika içerisinde başlar; hastanın nefes darlığı, hırıltılı solunumu ve öksürüğü azalması amaçlanmaktadır. Semptom giderici ilaçların genellikle hastalığı tedavi etme ya da kontrol altına alma gibi etkileri yoktur. Bu gruptaki ilaçlar arasında, salbutamol, terbutalin gibi sempatomimetikler bulunur.

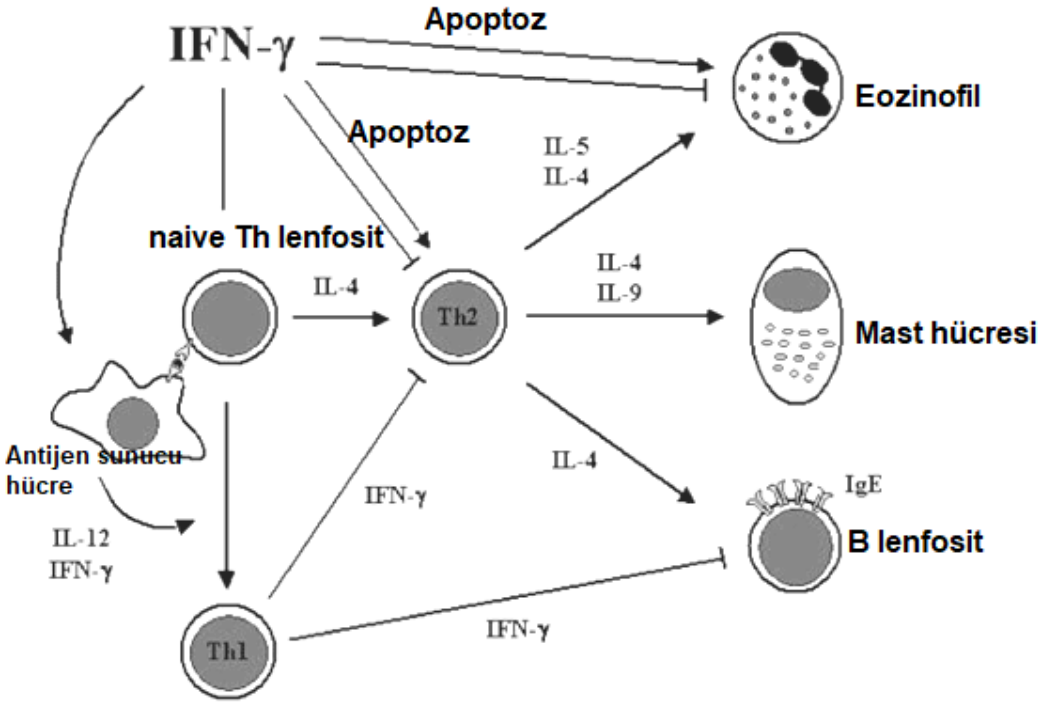
Astım tedavisinde kullanılan diğer bir ilaç grubu ise hastalığı tedavi eden ya da kontrol altına alan ilaçlardır. Bu ilaçlar hastalığın seyri dikkate alınarak belirlenmektedir. Bu gruptaki ilaçlar arasında kortikosteroidler, kromolin sodyum, nedokromil sodyum, teofilin ve lökotrien reseptör antagonistler bulunmaktadır (Stephen, 2008) Bu ilaçlar astım tedavisinde hayat kurtarıcıdır ancak istenmeyen yan etkileri de bulunmaktadır. Özellikle kortikosteroidlerin yan etkileri cild kuruluğu, kemik yıkımının hızlanması ve kas güçsüzlüğü sayılabilir. Bu ilaçların kullanımı esnasında metabolik ve diğer yan etkileri azaltmak için önlemler alınması gerekmektedir (Dahl, 2006).

4.1.8. IFN-γ'nın astım ve alerjik hastalıklarda rolü

Interferon gamma (IFN-γ) tip II interferon ailesine ait bir sitokindir. IFN-γ, birçok hücre tarafından salgılanabilir ancak majör olarak doğal immünitede NK (doğal öldürücü) hücreler, edinsel immünitede sitotoksik T lenfositler ve Th1 (T yardımcı 1) lenfositler tarafından sekrete edilir. Hücrelerde sinyal transdüksiyonu IFN-γ'nın reseptörüne bağlanmasının ardından inaktif Janus kinaz (JAK) transfosfosrilasyonla aktive olur, sitozolde STAT1'i aktive eder. Aktive olan STAT1 homodimeri

sitoplazmadan nükleusa hareket eder ve nükleusta IFN-γ'nın transkripsiyon faktörü Tbet'i aktive eder, bu olayların sonucunda IFN-γ sentezi gerçekleşir (Yosef ve ark., 2002).

Allerjik hastalıklarda naive T lenfositler Th2 yönünde farklılaşmaya eğilimlidir. Th2 hücreler eozinfil, bazofil, mast hücresi gibi alerjik yanıtlarda yer alan hücreleri aktive eden IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 sitokinlerini salgılar. IFN-γ alerjik hastalıklarda bu yanıtları iki şekilde düzenler; birincisi naive T lenfositlerin Th2 farklılaşmasını engelleyerek, ikincisi Th2 yönünde farklılaşmış lenfositlerin apoptozuna sebep olarak Th2 hücre yoğunluğunu azaltır. Th2 yanıtlarının baskılanmasıyla eozinofil, bazofil ve mast hücrelerinin aktivasyonu da engellenmiş olur (Teixeira ve ark., 2005). (Şekil 1)



Şekil 1. IFN-γ'nın Th2 yanıtları üzerindeki düzenleyici etkisi. IFN-γ, Th2 hücrelerin apoptozuna sebep olarak veya naive T lenfositlerin Th2 farklılaşmasını engelleyerek immün düzenleyici etki göstermektedir. Th2 hücre sayısının azalmasına bağlı olarak eozinofil, mast hücresi ve B lenfositlerden IgE sentezi gibi alerjik yanıtlar da baskılanır (Teixeira ve ark., 2005).

4.2. Kök Hücreler

Kök hücreler farklılaşmamış hücrelerdir ve bu hücrelerin her biri kendini yenileme, özelleşmiş hücrelere dönüşebilme yeteneğinde olan hücrelerdir. Bu hücreler, uygun koşullarda ve uyarımlarla bir veya birden çok farklı hücre tipine dönüşebilme yeteneğindedir (Spangrude, 2003). Farklılaşma potansiyeline göre kök hücreler; totipotent, pluripotent ve multipotent olarak sınıflandırılırlar. Totipotent kök hücreler bir organizmayı oluşturabilecek farklılaşma yeteneğindedir. Pluripotent kök hücreler, embriyonik dokuların dışında bir organizmanın her hücresinin oluşmasına neden olabilir ve embriyonik kök hücreler olarak da adlandırılır. Multipotent kök hücreler, yetişkin kök hücrelerdir ve köken aldığı hücrelerin belirli soylarını üretebilirler. Multipotent hücrelerin en önemli özelliği inflamasyon veya travma sonucunda hasarlanmış dokuya göç edip orada inflamasyonu baskılama veya doku onarımını sağlama yetenekleridir (Marta ve ark., 2015). Mezenkimal kök hücreler olarak da adlandırılan multipotent ya da yetişkin kök hücreleri günümüzde birçok inflamatuar hastalığın, nörodejeneratif hastalıkların ve doku hasarının tedavisinde kullanılmaktadır (Joyce ve ark., 2010). Kök hücreler Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (ISCT)'nin kriterlerine göre bir hücreyi, kök hücre olarak tanımlamak için şu özellikleri taşıması gerekir; 1) Kendini yenileyebilmeli, 2) Plastik yüzeylere yapışabilmeli, 3) Osteojenik, Kondrojenik ve Adipojenik soylara farklılaşabilmeli, 4) Yüzeyinde CD29, CD73, CD90, CD105 gibi adezyon moleküllerini ifade etmeli, CD14, CD34, CD45 ve HLA-DR'i ifade etmemelidir.

4.2.1. Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücreler yetişkin kök hücreleri olup gelişim sürecinin ileri evresinde görülür. Embriyonik kök hücrelere kıyasla daha az farklılaşma yeteneğindedirler (Fuchs ve ark., 2004). Mezenkimal kök hücreler organizmanın birçok dokusunda bulunur. Kemik iliği, adipoz doku, sinir doku, dental dokular, umblikal kord, kas dokusu, karaciğer ve deri zengin mezenkimal kök hücre

kaynaklarıdır. Kültür ortamında bu dokulardan mezenkimal kök hücreler izole edilebilir ve çoğaltılabilir (Prentice, 2004).

Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma yetenekleriyle bu hücrelerin çoğaltılması klinik uygulamalarda kullanılabilir olduğunu göstermektedir. Yapılan birçok çalışmada bu hücrelerin inflamatuar hastalıklarda anti-inflamatuar etkisinden ve doku dejenerasyonunda rejeneratif etkisinden dolayı tedavi edici etkileri gösterilmiştir (Wei ve ark., 2013). Mezenkimal kök hücreler inflamasyon bölgesine veya hasarlanmanın olduğu alanda salınan mediatörlere yanıt olarak yüzeyinde CXCR4 reseptör ifadesini artırarak göç eder ve yerleşir. Bu mekanizmayla sadece hasarlanmış dokuyu hedef alır, sağlıklı dokuya yerleşmez (Shi ve ark., 2007).

Mezenkimal kök hücreler yüzeyinde majör histokompatibilite kompleksi (MHC)-Sınıf I molekülünü ifade eder, ancak MHC-Sınıf II'yi ifade etmezler. Bu özelliğinden dolayı hipoimmünojenik olarak kabul edilirler ve otolog kullanımın yanı sıra allojenik kullanımı da mümkün olmaktadır (Tse ve ark., 2003).

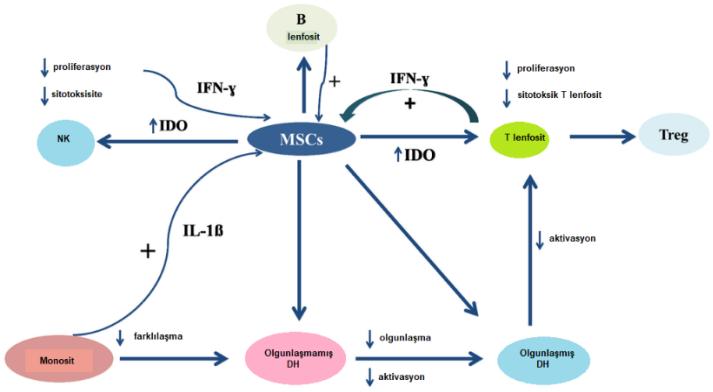
4.2.1.1. Diş Folikülü Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler (DF-MKH)

Diş folikülü gelişen dişi saran mezenkimal dokudur. Diş gelişimi süresince dental folikül kök hücreleri tarafından, sement, periodontal ligament, alveolar kemiği hücreleri oluşturulur. Dental dokular içinde en fazla mezenkimal kök hücre kaynağı olan dokular dental folikül ve periodontal ligamenttir. Kolay ulaşılabilir olması, ek bir cerrahi işleme gerek kalmadan diş çekim sürecinde elde edilebilir olması, telomeraz aktivitesinin ve kültürde çoğalma potansiyellerinin diğer hücre gruplarına göre yüksek olması bu hücreleri avantajlı kılmaktadır (Yokoi ve ark., 2007).

DF-MKH'ler yüzeylerinde kök hücre yüzey belirteçleri olan CD73, CD90, CD146, CD44, CD105 ifade ederler. Hematopoietik belirteçler olan CD14, CD34, CD45 ve HLA-DR'yi ifade etmezler. Farklılaşma potansiyelleri osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşmanın yanı sıra nöral farklılaşmayı da diğer birçok

kök hücre grubuna göre daha iyi gerçekleştirmektedir. DF-MKH; transkripsiyon faktörleri olan RUNX2, NANOG, Nestin gibi embriyonik belirteçleri de ifade etmektedir (Hakki ve ark., 2015). Bu özellikleriyle birçok soya farklılaşabilmeleri, canlılıklarının yüksek olması ve güvenilir şekilde dondurulmalarından dolayı doku rejenerasyonunda kullanılabilecekleri belirtilmiştir (Mori ve ark., 2012). Güncel çalışmalarda dental doku kaynaklı MKH'lerin inflamatuar yanıtlarda baskılama özelliğinin kemik iliği MKH'lerinden daha fazla olduğu belirtilmektedir (Li ve ark., 2014). Literatürde dental doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin lenfositlerle birlikte kültürüyle yapılan karşılaştırmalı analizlerinde insan süt dişi, dental pulpa ve dental folikül kaynaklı mezenkimal kök hücreler arasında DF-MKH'lerin immünomodülasyonu en iyi gerçekleştiren hücre grubu olduğu belirtilmiştir (Yildirim ve ark., 2016). (Şekil 2)

MKH'lerin IFN-γ ile ön aktivasyonu bu hücrelerden salgılanan mediatörleri daha fazla indükleyerek immün baskılayıcı etkisini artırmaktadır. Yapılan çalışmalarda, MKH'lerin IFN-γ ile önceden uyarımının T lenfosit proliferatif yanıtlarını uyarımsız MKH ile kıyaslandığında daha fazla baskıladığı gösterilmiştir (Krampera ve ark., 2006). Bunun yanı sıra, MKH'nin IFN-γ reseptörünün blokajının immün baskılayıcı etkisini ortadan kaldırdığı bildirilmiştir (Sivanathan ve ark., 2014). IFN-γ, MKH'lerde indolamine 2,3-dioksijenaz (IDO) ve transforme edici büyüme faktörü beta (TGF-β)'nın üretimini artırarak immün düzenleyici etkisine katkıda bulunmaktadır. IFN-γ'nın MKH üzerindeki immünosupresif etkisi allotransplantasyon çalışmalarında gösterilmiştir, ancak alerjik hastalıklarda IFN-γ'nın MKH ile birlikte etkisini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, DF-MKH'lerin IFN-γ ile birlikte sinerjik etkisi de incelenmiştir.



Şekil 2. MKH'lerin immün düzenleyici etkisi. MKH'ler immün sistem hücreleri üzerinde; aktive olmamış NK hücrelerin proliferasyon ve sitotoksisitesini azaltarak, B ve T lenfositlerin proliferasyonunu engelleyerek, T regülatör hücrelerin sayısını artırarak, monositlerin farklılaşmasını ve dendritik hücrelerin olgunlaşmasını ve antijen sunumunu engelleyerek immün düzenleyici etki göstermektedir (Al Jumah ve Abumaree, 2012).

4.2.2. Mezenkimal Kök Hücreler ve İmmünomodülasyon

Mezenkimal kök hücreler inflamatuar yanıtlar esnasında immün sistem hücreleri tarafından salgılanan sitokinlere (IL-1β, IL-6, TNF-α, IFN-γ gibi) yanıt olarak anti-inflamatuar mediatörler sekrete ederler. Bu mediatörlerin en önemlileri TGF-β, İndolamin 2,3-deiksijenaz (IDO), nitrik oksit (NO) ve prostaglandin E2 (PGE2)'dir. MKH' ler hücre döngüsünü G1 fazında durdurur bu şekilde T hücrelerin çoğalmasını inhibe eder. MKH' ler ve T hücrelerin birlikte kültüre edilmesiyle yapılan çalışmalarda MKH' lerin T lenfosit çoğalmasını baskıladığı gösterilmiştir (Simmons ve Torok, 1991). MKH' ler immün sistemde B lenfositlerin plazma hücresine dönüşmesini engellemektedir. Dendritik hücrelerin ve makrofajların kostimülatör molekül ifadesini engelleyerek antijen sunumunu ve immün yanıtları engellemektedir (Ma ve ark., 2014). Yapılan birçok çalışmada MKH'lerin graft versus host hastalığı (GvHD), sistemik lupus erythematosus (SLE), Crohn hastalığı, ülseratif kolit ve otoinflamatuar hastalıklarda MKH'lerin inflamasyonu baskılayıcı etkisi gösterilmiştir (Figueroa ve ark., 2012).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Klinik Araştırma Etik Kurulu' nun 04.03.2016 tarih ve 70737436-050.06.04 sayılı izni ile onaylandı. Kök hücre izolasyonu için diş foliküllerinin temini Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Çene Cerrahisi Bölümü' n de gerçekleştirildi, kök hücre izolasyonu, immünolojik çalışmalar ve analizler Marmara Üniversitesi Hastanesi Çocuk Allerji ve İmmünoloji Laboratuvarı' nda gerçekleştirildi.

5.1. Çalışma Planının Özeti

Bu tez çalışmasında, diş folikülü kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin astım hastalığında immün düzenleyici etkisinin araştırılması amaçlandı.

Bu amaçla;

1. Dental Folikül dokusundan mezenkimal kök hücre izolasyonu yapıldı,
2. İzole edilen DF-MKH varlığında ve yokluğunda astım hastaları, immünoterapi almış astım hastaları ve sağlıklı bireylerin venöz kanından elde edilen periferal kan mononükleer hücrelerinde $CD4^+$ T lenfositlerin Th1 ve Th2 yönünde farklılaşması üzerindeki etkisi protein ekspresyon analizi ve sitokin profilinin analiz edilmesiyle değerlendirildi.
3. İzole edilen DF-MKH varlığında ve yokluğunda astım hastaları, immünoterapi almış astım hastaları ve sağlıklı bireylerin venöz kanından elde edilen periferal kan mononükleer hücrelerinde $CD4^+$ T lenfositlerin proliferasyon, apoptoz ve Treg hücre oranları analiz edildi.
4. İzole edilen DF-MKH varlığında ve yokluğunda astım hastaları, immünoterapi almış astım hastaları ve sağlıklı bireylerin venöz kanından elde edilen periferal kan mononükleer hücrelerinde monositlerin kostimülatör molekül ekspresyonları değerlendirildi.

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

Bu tez çalışmasına dahil edilen tüm bireylere, hazırlanmış olan "Gönüllü Bilgilendirme Formu" okutuldu ve "Gönüllü Onam Formu" onayları alındı.

Astım hastaları, immünoterapi almış bireyler ve sağlıklı bireyler Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Pediatrik Allerji ve İmmünoloji Bilim Dalı'na başvuran poliklinik takipli hastalar arasından doktor kontrolünde seçilmiştir. Hastalardan venöz kan alımı için onam formları etik kurul gerekenlerine uygun şekilde açıklama yaparak onaylatıldı.

Diş folikül dokuları ise Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş Çene Cerrahi Anabilim Dalı polikliniklerinde basınç ağrısı, dişin pozisyonunun bozuk olması veya ortodontik sebepler ile başvuran 19-25 yaş arasında olan ve diş çekim endikasyonu uygun görülen 3 bireyden tam gömük yirmi yaş dişi çekimi sırasında alındı. Diş folikülü diş çekimi sonrasında 5 ml, steril %1 penisilin/streptomisin içeren fosfat tampon solüsyon (PBS) içinde 2 saat içerisinde laboratuvara ulaştırıldı.

5.2. Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar

- 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 solüsyonu (Gibco, Grand Island, USA; 25200056)
- % 0,5 tripan mavisi solüsyonu (Gibco, Grand Island, USA; 15250061)
- DMSO (WAK-Chemie Medical GmbH, Germany; USP090522A)
- CFSE Cell Proliferation Kit for Flow Cytometry (Invitrogen, Grand Island, USA; C34554)
- PE Annexin V/7AAD Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences, USA; 559763)
- Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio-Sciences UK; 17144003)

- Anti CD3 (LiseSpan Biosciences, USA; 50867)
- Anti CD28 (Millipore, California; LV1700707)
- Der p1 (rekombinant) (Prospec, ALR-003)
- IFN-γ (Millipore, California; 2309018)
- Anti-hTGF-β-IgA rekombinant nötralize edici antikor (Invivogen, USA; maba-htgfb-3)
- 1-Methyl-D-tryptophan (Santa Cruz Biotechnology, USA; 110117-83-4)
- SC-58125 (Cayman Chemical, USA; 162054-19-5) l
- CD45 FITC/CD34 PE (BD Biosciences, USA; 344563)
- CD90 PE (BD Biosciences, USA; 562385)
- CD146 FITC (BD Biosciences, USA; 560846)
- CD73 PE (BD Biosciences, USA; 550257)
- CD29 APC (BD Biosciences, USA; 559883)
- CD105 PE (BD Biosciences, USA; 560839)
- CD28 PE (BD Biosciences, USA; 562323)
- CD14 PE (BD Biosciences, USA; 342408)
- CD3/CD4/CD8 (BD Biosciences, USA; 342414)
- CD80/CD83/CD86 (BD Biosciences, USA; 334098)
- CD45RA (BD Biosciences, USA; 340571)
- 10x Phosphate Buffered Saline (PBS), 1L (Bio-Rad; 1610780)
- BD cytometric bead array (CBA) human Th1/Th2/Th17 Kit (BD Biosciences, USA; 560484)
- Human FoxP3 Buffer Set (BD Biosciences, USA; 560098)
- Human FoxP3 PE (BD Biosciences, USA; 560046)
- APC mouse anti-human CD25 (BD Biosciences, USA; 555434)
- FITC mouse anti-human CD4 (BD Biosciences, USA; 555346)
- Hücre yıkama solüsyonu (Cell Wash, BD Biosciences, USA; 349524)
- Osteojenik Farklılaşma Kiti (Mesencult Human Osteojenik Differentiation Kit) (Stemcell Technologies, USA; 05465)
- Adipojenik Farklılaşma Kiti (Mesencult Human Adipogenesis Differentiation Kit (Stemcell Technologies, USA; 05412)

- Kondrojenik Farklılaşma Kiti (Mesencult Human Chondrogenesis Differentiation Kit (Stemcell Technologies, USA; 05455)
- Oil red O (Sigma-Aldrich, USA; O0625-100G)
- Alizarin Red (Sigma-Aldrich, USA; A5533-25G)
- Alcian Blue (Sigma-Aldrich, USA; A5268-10G)
- RIPA Protein İzolasyon Kiti (Santa Cruz Biotechnology, USA; SC-24948)
- Anti-GATA3 antibody (Abcam, USA; ab106625)
- Anti-T-bet / Tbx21 antibody [4B10] (Abcam, USA; ab91109)
- Anti-FOXP3 antibody (Abcam, USA; ab54501)
- Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP) (Abcam, USA; ab6789)
- Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) (Abcam, USA; ab205718)
- Tris-Buffer Saline (10X) TBS
- Süt tozu (Blotting-Grade Blocker) (BioRad, USA; 1706404)
- Protein ölçüm kiti (Qubit® Protein Assay Kit, 100 Assays) (Thermofisher, USA; Q33211)
- Protein ölçüm tüpleri (Qubit® Assay Tubes) (Thermofisher, USA; Q32856)
- Elektroforez jeli (Bolt™ 4-12% Bis-Tris Plus Gels, 10-well) (Thermofisher, USA; NW04120BOX)
- Elektroforez yürütme tampon solüsyonu (20X Bolt® MES SDS Running Buffer) (Thermofisher, USA; B0002)
- Laemli tampon solüsyonu (4X Bolt® LDS Sample Buffer) (Thermofisher, USA; B0007)
- 10X Bolt® Sample Reducing Agent (Thermofisher, USA; B0009)
- Protein standart (MagicMark™ XP Western Protein Standard) (Thermofisher, USA; LC5602)
- Nitroselüloz transfer kâğıdı (iBlot® 2 Transfer Stacks, nitrocellulose) (Thermofisher, USA; IB23001)

- Kemoluminisan görüntüleme için solüsyon kiti (Novex® ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit) (Thermofisher, USA; WP20005)

5.3. Çalışmada Kullanılan Hücre Kültürü Malzemeleri

- Steril pensler ve bistüri uçları
- 0,22 µm filtre (Sartorius, Goettingen, Germany; 16534)
- Heparinli kan alma tüpü (Yeşil kapaklı) (Hongyu Medical, China; 131211)
- EDTA'lı kan alma tüpü (Mor kapaklı)
- 15 ml konik, kapaklı tüp (BD Biosciences Discovery Labware, CT, USA; 352096)
- 50 ml konik, kapaklı tüp (BD Biosciences Discovery Labware, CT, USA; 352098)
- 25cm^2' lik hücre kültür flaskları (BD Biosciences Labware, Le Pont De Claix, France; 353108)
- 75cm^2' lik hücre kültür flaskları (BD Biosciences Labware, Le Pont De Claix, France; 353110)
- 6 kuyucuklu plaklar (BD Biosciences Discovery Labware, USA; 353046)
- 48 kuyucuklu plaklar (Nest Biotech, China, 20140010415A)
- 5 ml Polystyrene tube (BD Biosciences, USA; 352052)
- Tip I kollajen kaplı lameller (BD Biosciences Discovery Labware, USA; 354089)
- 3 ml' lik steril pastör pipeti (Citotest Labware Manufacturıng, 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)
- Thoma lamı (Marienfeld, Germany; 06.407.10)
- Lamel (22x22mm)

- Buz kalıpları
- %70 alkol
- Steril distile su
- Steril pudrasız cerrahi eldiveni

5.4. Kullanılan Cihazlar

Cihaz	**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
Işık Mikroskobu	Olympus	BX53
Western Blot Cihazı	Thermofisher	iBlot IB21001
Protein konsantrasyon ölçer (Florometre)	Lifetechnologies	Qubit 2.0 Q32866

5.5. Kullanılan solüsyonların hazırlanması

5.5.1. DF-MKH' ler için besiyerinin hazırlanması

Diş foliküllerinden mezenkimal kök hücre izolasyonu için %10 oranında FBS ve %1 oranında Penicillin/ streptomisin ilave edilen DMEM besiyeri kullanıldı. Bu solüsyon cDMEM olarak isimlendirildi. Her alt kültür işleminde ve hücreleri çoğaltma sürecinde bu besiyeri taze olarak hazırlanarak kullanıldı.

5.5.2. Lenfosit Kültürleri için besiyerinin hazırlanması

Lenfosit kültürleri ve DF-MKH/Lenfosit ko-kültürleri için %10 oranında FBS ve %1 oranında Penicillin/ streptomisin ilave edilen RPMI besiyeri kullanıldı. Bu solüsyon komple RPMI (cRPMI) olarak isimlendirildi. Her kültür işleminde besiyeri taze olarak hazırlandı.

5.5.3 Kök hücre dondurma solüsyonunun hazırlanması

İzole edilen ve üçüncü pasaja kadar çoğaltılan kök hücreler deney gününe kadar hücre dondurma solüsyonu içinde -80°C'de muhafaza edildi. Bu amaçla DMSO içerikli hücre dondurma solüsyonu hazırlandı. Hücre dondurma solüsyonu; %5 DMSO, %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin içeren RPMI besiyeri ile hazırlandı.

5.5.4. PBS solüsyonunun hazırlanması

Konsantrasyonu 10 mM fosfat ve 150 mM sodyum klorür olacak şekilde 1 adet tablet 100 ml distile suda çözündürüldü. Elde edilen 1X PBS solüsyonunun pH değeri 7,2-7,4 olarak ölçüldü. Her kullanım öncesinde mikrobiyal yükünün azaltılması ve partikülden arındırmak için 0,22 μm'lik filtreden geçirilerek kullanıldı.

5.5.5. CDmix uyarımı için anti-CD3 ve anti-CD28 stok solüsyonların hazırlanması

Anti CD3 vial konsantrasyonu 100 µg /100 µl olarak bulunmaktadır. Bu viale 900 µl RPMI ilave edildi ve konsantrasyonu 100 µg/ml olan stok solüsyon hazırlandı. Stok solüsyon 100'er µl olarak ayrıldı. Anti CD3 vial konsantrasyonu 100 µg /100 µl bulunmaktadır. Bu viale 900 µl RPMI ilave edildi ve konsantrasyonu 100 µg/ml olan stok solüsyon hazırlandı. Stok solüsyon 100'er µl olarak ayrıldı. Kültürdeki hücrelerin uyarımı için her kültür öncesinde bu stok solüsyondan 2,5 µl alınarak 500 µl'lik kültür kuyularının içine eklendi.

5.5.6. Der p1 uyaranının hazırlanması

Der p1 epitoplarını içeren rekombinant protein vial hazır olarak 100 µg/ 100 µl olarak bulunmaktadır. Bu viale 900 µl RPMI ilave edildi ve konsantrasyonu 100 µg/ml olan stok solüsyon hazırlandı. Kültürdeki hücrelerin uyarımı için bu stok solüsyondan 10 µl alınıp 990 µl RPMI ile sulandırıldı (çalışma solüsyonu). Dilüe edilen çalışma solüsyonundan 5 µl alınarak 500 µl'lik kültür kuyularının içine eklendi (Kültür için Der p1 konsantrasyonu: 10 ng/ml).

5.5.7. IFN- γ uyaranının hazırlanması

100 µg/ 100 µl (distile su) bulunan IFN-γ dan 5 µl çekildi ve 995 µl RPMI ile dilüe edildi. Toplamda 1 ml' lik stok solüsyon hazırlandı (Stok Solüsyon Konsantrasyonu: 100 µg/ml). Kültürdeki hücrelerin uyarımı için her kültür öncesinde bu stok solüsyondan 2,5 µl alınarak 500 µl'lik kültür kuyularının içine eklendi (Kültür için IFN-γ konsantrasyonu: 0,5 µg/ml).

5.5.8. Kollajenaz solüsyonunun hazırlanması

Kollajenaz Tip I solüsyonu; 4 ml PBS içine 12 mg (3 mg/ml) kollajenaz Tip I tartılarak eklendi ve 0,22 µm' lik filtre ile filtreden geçirildikten sonra steril olarak

37°C inkübatörde 10 dakika bekletildikten sonra kullanıldı. Her 8 mg doku için 4 ml kollajenaz tip I solüsyonu kullanıldı ve enzimatik yıkım işlemleri için taze olarak hazırlandı.

5.5.9. RIPA protein izolasyon solüsyonunun hazırlanması

RIPA protein izolasyon kitinin içeriğindeki solüsyonlardan sırayla; 10 µL PMSF solüsyonu, 10 µL sodyum ortovadanat solüsyonu ve 20 µL proteaz inhibitörü 500-1000 µL'lik ependorf tüp içinde karıştırıldı ve RIPA tampon solüsyonuyla 1000 µL'ye tamamlandı.

5.5.10. Protein miktarı ölçüm solüsyonunun ve standartların hazırlanması

Protein miktar tayini için Qubit protein kiti kullanıldı. Örneklerin protein miktarı ölçülmeden önce kit içinde bulunan reaktif ve çalışma solüsyonu ile ölçüm solüsyonu hazırlandı. Her 1 mL ölçüm solüsyonu hazırlamak için 995 µL çalışma solüsyonuna 5 µL 200X reaktif eklenerek karıştırıldı. Hazırlanan çalışma solüsyonu ve standartlar ile Qubit florometri cihazında standart okutmaları için üç adet standart kullanıldı. Qubit protein kiti içindeki Standart 1 (STD1), Standart 2 (STD2) ve Standart 3 (STD3) herbirinden 10 µL çekilerek ayrı ependorf tüp içine aktarıldı ve üzerine 190 µL Qubit çalışma solüsyonu eklendi.

5.5.11. Osteojenik stimülasyon besiyerinin hazırlanması

Osteojenik stimülasyon kitinin üretici talimatına göre 200 mL bazal besiyeri ile 50 mL osteojenik farklılaşma solüsyonu karıştırıldı. Bu solüsyon +4ºC'de 1 ay süre içinde kullanılabilmektedir.

5.5.12. Kondrojenik stimülasyon besiyerinin hazırlanması

Kondrojenik stimülasyon kitinin üretici talimatına göre 200 mL bazal besiyeri ile 50 mL kondrojenik farklılaşma solüsyonu karıştırıldı. Bu solüsyon +4ºC'de 1 ay süre içinde kullanılabilmektedir.

5.5.13. Adipojenik stimülasyon besiyerinin hazırlanması

Adipojenik stimülasyon kitinin üretici talimatına göre 200 mL bazal besiyeri ile 50 mL adipojenik farklılaşma solüsyonu karıştırıldı. Bu solüsyon +4ºC'de 1 ay süre içinde kullanılabilmektedir.

5.5.14. Lizat solüsyonunun hazırlanması

10X Lizat solüsyonundan 5 mL alınarak 50 mL' lik falkon tüpe aktarıldı, üzeri distile su ile 50 mL'ye tamamlanarak 1X lizat solüsyonu hazırlandı.

5.5.15. Alizarin red solüsyonunun hazırlanması

%0,02'lik alizarin red solüsyonu hazırlanması; 1 gram alizarin red 50 ml distile suda çözüldü ve 0,22 μm' lik filtreden süzülerek kullanıldı.

5.5.16. Oil red O solüsyonunun hazırlanması

%3' lük oil red o stok solüsyonunun hazırlaması için, 300 mg oil red o 100 ml %99' luk izopropanol içinde çözüldü. Çalışma solüsyonu için, hazırlanmış olan stok solüsyon 3/2 oranında distile su ile dilüe edildi ve 0,22 μm' lik filtreden süzülerek kullanıldı.

5.5.17. Alcian blue solüsyonunun hazırlanması

%0,1 alcian blue solüsyonu; 10 mg alcian blue 60 ml ethanol ve 40 ml asetik asit içinde çözüldü ve 0,22 μm' lik filtreden süzülerek kullanıldı.

5.5.18. TBST solüsyonunun hazırlanması

%0,01 Tween 20 içeren tris-buffer salin solüsyonu (TBST) hazırlamak için 1 mL tween 20'nin üzerine 99 mL 10X TBS (tris-buffer salin) solüsyonu eklendi üzeri 1000 mL tamamlanıncaya kadar distile su eklendi. Bu solüsyon western blot için membran yıkama işlemlerinde kullanıldı.

Primer ve sekonder antikorların işaretlenmesi için %5 süt tozu içeren TBST kullanıldı. Bunun için 5 gr (analytic grade) süt tozu üzerine 1000 mL'ye tamamlanıncaya kadar 1X TBST solüsyonu eklendi, karıştırıcı ile homojenize edildi. Bu solüsyon 1 ay süreyle +4ºC'de saklanabilmektedir.

5.6. Çalışma Planı

5.6.1. Diş folikülü kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu

5.6.2. İzole edilen hücrelerin pasajlanması

5.6.3. İzole edilen kök hücrelerin karakterizasyonu

5.6.4. İzole edilen kök hücrelerin farklılaştırılması

5.6.4.1. İzole edilen kök hücrelerin osteojenik farklılaştırılması

5.6.4.2. İzole edilen kök hücrelerin adipojenik farklılaştırılması

5.6.4.3. İzole edilen kök hücrelerin kondrojenik farklılaştırılması

5.6.5. Kök hücrelerin 48 kuyucuklu kültür plaklarına ekilmesi

5.6.6. Mononükleer hücre kültürlerinin yapılması

5.6.6.1. Astım hastası, İmmünoterapi almış astım hastası ve sağlıklı bireylerin seçimi

5.6.6.2. Astım hastası, İmmünoterapi almış astım hastaları ve sağlıklı bireylerden alınan venöz kandan mononükleer hücre izolasyonu yapılması

5.6.6.3. Lenfositlerin proliferasyon analizi için CFSE ile işaretlenmesi

5.6.6.4. Lenfosit kültürünün ve kök hücre ve lenfositlerin ko-kültürünün yapılması

5.6.7. Analizler

5.6.7.1. Lenfositlerin proliferasyon analizi

5.6.7.2. Lenfositlerin $CD4^{+}CD25^{+}FoxP3^{+}$ Tregülatör hücre analizi

5.6.7.3. Lenfositlerin Annexin/7AAD ile apoptoz analizi

5.6.7.4. Th1/Th2 farklılaşmasının belirlenmesi için hücre kültür süpernatanlarında sitokin tayini

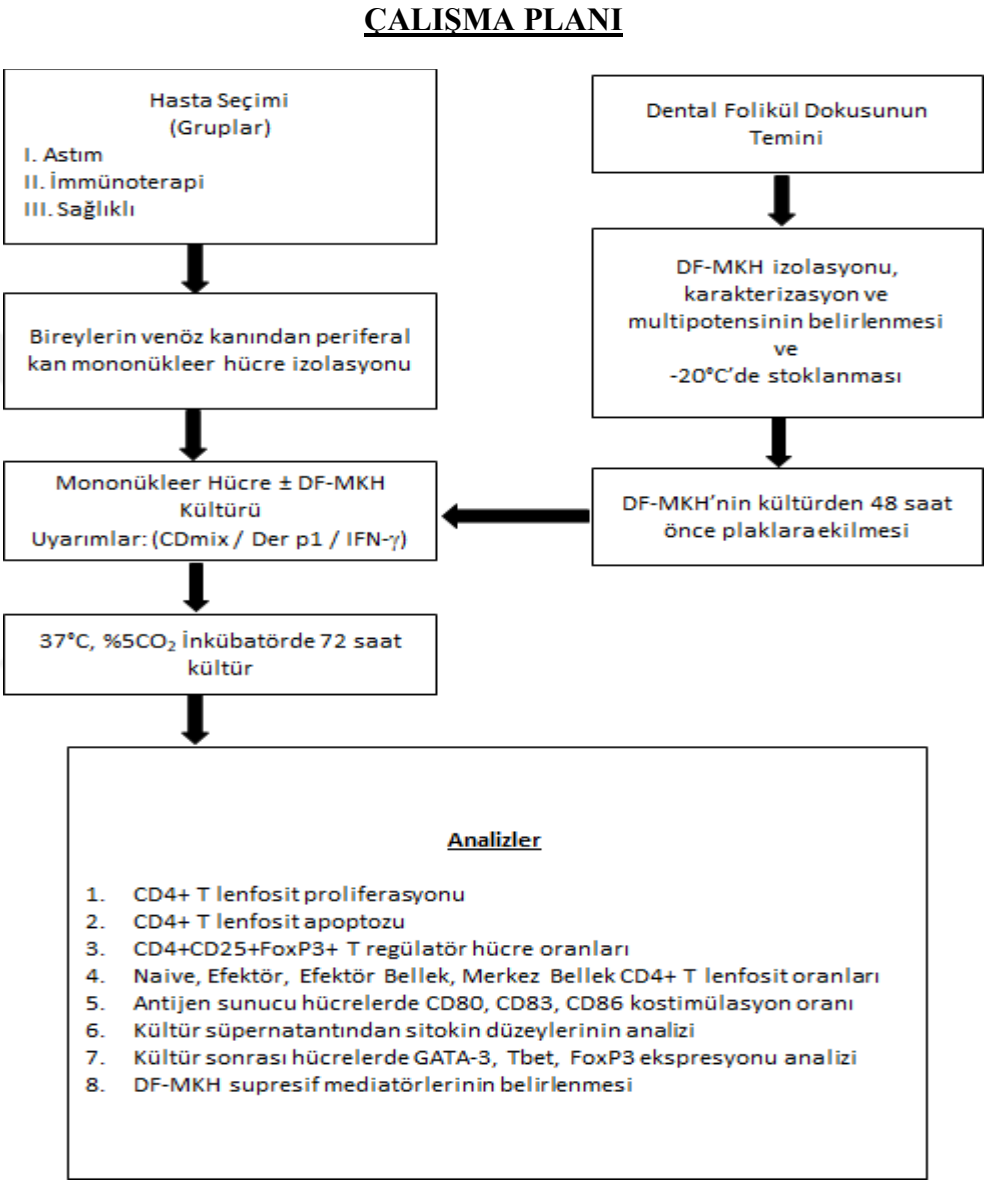
5.6.7.5. Th1/Th2 farklılaşmasının belirlenmesi için protein ekspresyon (Western blot) analizi

5.6.7.6. Naive, efektör ve bellek T hücre oranlarının analizi

5.6.7.7. Antijen sunucu hücrelerde kostimülatör molekül ekspresyonu analizi

5.6.7.8. DF-MKH immün düzenleyici moleküllerin nötralizasyon analizi

5.6.8. İstatistiksel analiz



Şekil 3. Çalışma planının şematik gösterimi.

5.6.1. Diş folikülü kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu

Diş çekimi sonrasında folikül dokusu %1 penisilin/streptomisin içeren PBS solüsyonuna aktarıldı. Transport solüsyonu içindeki doku örneği buz kalıpları içerisinde, çalışmanın gerçekleştirileceği Marmara Üniversitesi Çocuk İmmünoloji Laboratuvarı'na getirildi.

Tam gömük yirmi yaş dişi çekim işlemi ile alınan dişi saran folikül dokusu %1 penisilin/streptomisin içeren PBS ile yıkanıp doku üstündeki kan ve diş parçaları temizlendi. Folikül doku bistüri ile 0,5 mm ve daha küçük parçalara bölündü. Parçalanan folikül dokusu yaklaşık 80 mg doku için 15 ml falkon tüpte bulunan 37°C sıcaklığa ısıtılmış 4 ml'lik kollajenaz tip I solüsyonu içinde aktarıldı ve pastor pipetiyle homojenize edildi. Doku ve kollajenaz solüsyonunu içeren falkon tüp 37°C inkübatörde 45 dk bekletildi. Her 5-10 dk aralıkla tüp yavaşça çalkalanarak enzimatik yıkımın kolaylaşması sağlandı. Folikül dokusu enzimatik yıkımın ardından hücre süspansiyonu haline geldiğinde inkübatörden alınıp pipetaj işlemi yapıldı. Folikül hücreleri PBS ile yıkanıp 1200 rpm' de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler tekrar PBS ile yıkanıp 1200 rpm' de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler 5 ml cDMEM besiyeri ile tekrar süspanse edilip filtreli kapaklı 25 cm^2' lik flakslara (T-25) transfer edilip 37°C, %5 CO^2 inkübatörde kültür edildi.

Hücrelerin her 2-3 günde bir kültür medyumu taze hazırlanarak değiştirildi ve hücrelerin çoğalması, flask tabanına yayılması sağlandı.

5.6.2. İzole edilen hücrelerin pasajlanması

T-25 flasklar içerisinde ilk kültürü yapılan ve 37°C, %5 CO^2 inkübatörde bulunan hücreler her 2-3 günde bir invert mikroskopta hücre yayılımı için incelendi. Yaklaşık 7-10 gün sonrasında hücreler flask tabanında yaklaşık %70-80 yayılım gösterdiğinde pasaj işlemi yapıldı. Dokudan elde edilen ilk kültür sıfırıncı pasaj (P0) kabul edilerek, birinci kültürü takip eden her kültür işlemi sonrası pasaj sayıları P1, P2, P3 şeklinde belirtildi.

Pasaj işlemi; laminar hava akımlı aseptik kabin içerisinde flasklardaki hücre medyumu pipet yardımıyla uzaklaştırıldı ve flasklara 5 ml PBS konulup flask tabanı bu solüsyonla yıkandı. PBS pipetle flask tabanından çekilip atıldıktan sonra 500 µl %0,25 Tripsin-EDTA eklendi ve 37°C inkübatörde 4 dakika bekletildi. 4 dakikanın sonunda flask içindeki tripsinin inaktivasyonu için 5 ml cDMEM 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 cDMEM ile yıkanıp, santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve 1 ml cDMEM eklenip pipetajla hücre süspansiyonu haline getirildi. Hücre süspansiyonundan 10µl alınıp 0,5 ml'lik ependof tüpe aktarıldı ve üzerine 10µl tripan mavisi solüsyonu eklendi. Homojenizasyon sağlandıktan sonra hücre sayımı yapıldı.

Hücre sayımı 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 lamının sayım yapılacak alanına pipet ile yavaşça hücre süspansiyonu pipetlendi. Hücreler ışık mikroskobunda, 40X büyütmede sayıldı.

Sayım sonucunda thoma lamının sayım alanında sayılan hücre sayısı, seyreltme oranı (2) ve hacim sabiti 10^4 (0,1 mm3 deki sayım) ile çarpılarak 1 ml solüsyon içindeki toplam hücre miktarı hesaplandı.

Hücre sayımının ardından $5x10^5$ hücre 10 ml cDMEM ile süspanse edilerek 75 cm^2' lik flasklara (T-75) ekilip 37°C'de %5 CO_2 inkübatörde kültüre edildi. Her 2-3 günde bir hücre besiyeri taze hazırlanarak değiştirildi. Kültür flaskının tabanında %70-80 yayılım gösteren hücreler tekrar pasaj alınmak üzere yukarıda belirtilen işlemler sırasıyla gerçekleştirildi. Hücre kültürü üçüncü pasaja kadar devam edildi.

5.6.3. İzole edilen kök hücrelerin karakterizasyonu

İzole edilen ve pasajlanarak çoğaltılan hücrelerin morfolojisi invert mikroskopta incelendi. Fibroblast benzeri yapıda olan ve flask tabanına yapışan hücreler üçüncü pasaj sonunda flask tabanından cDMEM besiyeri tamamen çekilip atıldı. Flask

tabanına 5 ml PBS solüsyonu eklendi, yıkama işleminden sonra solüsyonun tamamı çekilip atıldı. Flask tabanına %0,25 tripsin-EDTA solüsyonu eklenip 37°C inkübatörde 4 dakika bekletildi. 4 dakikanın sonunda flask içindeki tripsinin inaktivasyonu için 5 ml cDMEM eklenip flask içerisindeki sıvı 15 ml'lik konik kapaklı tüplere aktarıldı. 1200 rpm' de 5 dk santrifüj yapıldı, santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler 1000 µl PBS ile süspanse edilip bu süspansiyondan 3 adet akım sitometri tüpünün herbirine 100 µl immünfenotipleme analizi için aktarıldı. Akım sitometri tüpünde bulunan PBS içindeki hücre süspansiyonu santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve dipte kalan hücreler 100 µl PBS ile süspanse edilip herbir tüpe belirlenen antikorlar eklendi. Birinci tüp Ig izotip antikorunun bulunduğu tüp olarak belirlendi, ikinci tüpteki hücre süspansiyonuna kök hücre pozitif belirteçlerin analizi için anti-CD73 (PE), anti-CD90 (FITC), anti-CD105 (PerCp) ve anti-CD146 (APC) antikorlarının herbirinden 10 µl eklendi, üçüncü tüpe kök hücreler için negatif belirteçlerin analizi için anti-CD45 (PerCp), anti-CD14 (FITC), anti-CD34 (PE) ve anti-HLA-DR (APC) antikorlarının herbirinden 10 µl eklenerek tüpler 15 dk oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda hücrelerin üzerine 1000 µl PBS eklenerek 1500 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Süpernatant atıldı, dipte kalan hücreler 500 µl PBS ile tekrar süspanse edilip immünofenotipik özelliklerinin belirlenmesi için akım sitometri cihazında yüzey belirteçleri analiz edildi. Hücre yüzeyinde kök hücre belirteçlerinin pozitiflik oranı %95'in üzerinde olan ve negatiflik oranı %5'in altında olan hücre gruplarından 1 milyon hücre ayırılarak farklılaşma kapasitelerinin belirlenmesi için osteojenik adipojenik ve kondrojenik olarak farklılaştırıldı.

5.6.4. İzole edilen kök hücrelerin farklılaştırılması

İzole edilen, üçüncü pasaja kadar çoğaltılan ve akım sitometri cihazında pozitif yüzey belirteçleri %95'in üzerinde olan hücrelerin kök hücre özelliğinin belirlenmesi için farklılaşma kültürleri yapıldı. Farklılaşma kültürleri her bir folikül dokusundan izole edilen üçüncü pasajdaki (P3) hücrelerden 1 milyon hücre kullanılarak yapıldı.

5.6.4.1. İzole edilen kök hücrelerin osteojenik farklılaştırılması

Osteojenik farklılaşma için 6 kuyucuklu plakların herbir kuyusuna tip I kollajen kaplı steril lameller yerleştirildi. Tip I kollajen kaplı lamellerin herbirinin üzerine üçüncü pasajdaki $2x10^5$ hücre ekildi. Hücrelerin üzerlerine ilk ekim yapılan gün cDMEM besiyeri eklendi ve 48 saat süreyle lamel yüzeyine yayılması sağlandı. 48 saat sonunda lamel yüzeyinde %90-100 yayılıma ulaşan hücrelerin üzerindeki kültür sıvısı çekilip atıldı ve üzerine 2 ml osteojenik farklılaştırma besiyeri eklendi ve 37°C %5 CO_2 inkübatörde 2 gün arayla besiyerleri değiştirilerek 21 gün süreyle kültüre edildi. 21 gün sonunda hücreler ve oluşturdukları kolonilerin osteojenik farklılaşmayı sağlayıp sağlamadıkları invert mikroskopta değerlendirildi. Osteojenik farklılaşmanın belirlenmesi için lamele yapışan hücreler Alizarin kırmızısı solüsyonuyla boyanarak mikroskopta incelendi. Bunun için önce lamele yapışan hücrelerin üzerinden kültür besiyeri çekilip üzerine PBS solüsyonu eklenerek yıkama işlemi yapıldı. PBS atıldı ve lamele yapışan hücrelerin üzerine 1000 µl %10 formaldehit solüsyonu eklendi. 30 dk %10 formaldehit ile fikse edilen hücreler süre sonunda önce 1000 µl distile suyla yıkandı, distile su atıldı ve üzerine 1000 µl PBS eklendi. PBS ile yıkama işleminin ardından PBS uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine 1000 µl Alizarin kırmızısı boyası eklendi ve 45 dk. oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi. 45 dakika sonra boya hücrelerin üzerinden üzaklaştırıldı ve distile su ile iki kez yıkandı. Lamel kültür kuyusundan alınarak lam üzerine kapatıldı ve ışık mikroskobunda 10X ve 20X büyütmede doku bütünlüğü, kalsiyum fosfat birikimlerinin varlığı incelendi.

5.6.4.2. İzole edilen kök hücrelerin adipojenik farklılaştırılması

Adipojenik farklılaşma için 6 kuyucuklu plakların herbir kuyusuna tip I kollajen kaplı steril lameller yerleştirildi. Tip I kollajen kaplı lamellerin herbirinin üzerine üçüncü pasajdaki $2x10^5$ hücre ekildi. Hücrelerin üzerlerine ilk ekim yapılan gün cDMEM besiyeri eklendi ve 48 saat süreyle lamel yüzeyine yayılması sağlandı. 48 saat sonunda lamel yüzeyinde %90-100 yayılıma ulaşan hücrelerin üzerindeki kültür sıvısı çekilip atıldı ve üzerine 2 ml adipojenik farklılaştırma besiyeri eklendi ve 37°C %5 CO_2 inkübatörde 2 gün arayla besiyerleri değiştirilerek 14-21 gün süreyle kültüre

edildi. Kültür süresinin sonunda hücrelerdeki adipositlerin ve kolonilerin oluşumu invert mikroskopta değerlendirildi. Adipojenik farklılaşmanın belirlenmesi için lamele yapışan hücrelerde yağ damlalarını boyayan Oil kırmızı solüsyonuyla boyanarak mikroskopta incelendi. Bunun için önce lamele yapışan hücrelerin üzerinden kültür besiyeri çekilip üzerine PBS solüsyonu eklenerek yıkama işlemi yapıldı. PBS atıldı ve lamele yapışan hücrelerin üzerine 1000 µl %10 formaldehit solüsyonu eklendi. 30 dk %10 formaldehit ile fikse edilen hücreler süre sonunda önce 1000 µl distile suyla yıkandı, distile su atıldı ve üzerine 1000 µl PBS eklendi. PBS ile yıkama işleminin ardından PBS uzaklaştırıldı. Kuyulara 1000 µl %60' lık izopropanol eklendi ve 5 dakika boyunca inkübe edildi. İzopropanol kuyulardan alındı ve kuyulara 1000 ml "Oil red O" solüsyonu eklendi. Karanlıkta oda sıcaklığında 45 dakika boyunca inkübe edildikten sonra Oil red O yüzeyden arındırıldı ve kuyular distile su ile 2 defa yıkandı. Kuyucuklara hemotoxcyline konuldu ve 1 dakika inkübe edildikten sonra kuyular 2 defa distile su ile yıkandı. Kuyulardaki lameller lamlar üzerine alınarak hücrelerde oluşan yağ damlaları ışık mikroskobunda incelendi. Yağ damlaları açık kırmızı renkte gözlemlendi.

5.6.4.3. İzole edilen kök hücrelerin kondrojenik farklılaştırılması

Kondrojenik farklılaşma için 6 kuyucuklu plakların herbir kuyusuna tip I kollajen kaplı steril lameller yerleştirildi. Tip I kollajen kaplı lamellerin herbirinin üzerine üçüncü pasajdaki $2x10^5$ hücre ekildi. Hücrelerin üzerlerine ilk ekim yapılan gün cDMEM besiyeri eklendi ve 48 saat süreyle lamel yüzeyine yayılması sağlandı. 48 saat sonunda lamel yüzeyinde %90-100 yayılıma ulaşan hücrelerin üzerindeki kültür sıvısı çekilip atıldı ve üzerine 2 ml kondrojenik farklılaştırma besiyeri eklendi ve 37°C %5 CO_2 inkübatörde 2 gün arayla besiyerleri değiştirilerek 21 gün süreyle kültüre edildi. Kültür süresinin sonunda hücrelerdeki kondrosit kolonilerinin oluşumu invert mikroskopta değerlendirildi. Kondrojenik farklılaşmanın belirlenmesi için lamele yapışan hücrelerde kondrositleri boyayan Alcian mavisi solüsyonuyla boyanarak mikroskopta incelendi. Bunun için önce lamele yapışan hücrelerin üzerinden kültür besiyeri çekilip üzerine PBS solüsyonu eklenerek yıkama işlemi yapıldı. PBS atıldı ve lamele yapışan hücrelerin üzerine 1000 µl %10 formaldehit solüsyonu eklendi. 30 dk

%10 formaldehit ile fikse edilen hücreler süre sonunda önce 1000 µl distile suyla yıkandı, distile su atıldı ve üzerine 1000 µl PBS eklendi. PBS ile yıkama işleminin ardından PBS uzaklaştırıldı. Kuyulara 1200 µl etil alkol ve 800 µl asetik asit karışımı eklendi, 15 dakika boyunca bekletildi ve 15 dakikanın sonunda kuyular 2 defa PBS solüsyonuyla yıkandı. Kuyulardaki lameller lamlar üzerine kapatılarak kondrositler ve hücrelerarasında proteoglikanların oluşumu ışık mikroskobunda incelendi. Kondrositlerin hücre çekirdeği ve proteoglikanlar koyu mavi renkte incelendi. Kartilaj oluşumu ise matriks şekillenmesi olarak gözlemlendi.

5.6.5. Kök hücrelerin 48 kuyucuklu kültür plaklarına ekilmesi

DF-MKH'lerin kan mononükleer hücreleri üzerindeki immünolojik etkilerinin incelenmesi amacıyla birlikte kültürleri (ko-kültür) yapıldı. Ko-kültür çalışması için mononükleer hücrelerin izolasyonundan 48 saat önce DF-MKH'ler kültür kuyularına ekilerek kuyu tabanına yapışması sağlandı.

5.6.6. Mononükleer hücre kültürlerinin yapılması

5.6.6.1 Astım hastası, İmmünoterapi almış astım hastaları ve sağlıklı bireylerin seçimi

Bu tez çalışmasında, çalışmaya dahil edilen tüm bireylere, "Gönüllü Bilgilendirme Formu" okutuldu ve "Gönüllü Onam Formu" ile onayları alındı. Bireyler Marmara Üniversitesi Hastanesi Pediatrik Allerji ve İmmünoloji Kliniğine başvuran hastalar arasından aşağıdaki kriterlere göre seçildi.

I. Astım hastalarının çalışmaya dahil edilme ve dışlanma kriterleri

- Çalışmaya dahil edilme kriterleri
  - Prick testinde ev tozu akarı antijenine 3 mm'nin üzerinde pozitif yanıt veren,
  - Daha önce immünoterapi almamış,
  - Son 6 ayda kortikosteroid, glikokortikoid veya immün baskılayıcı ilaç kullanmamış
  - Ev tozu akarı haricinde başka bir alerjene yanıt oluşturmayan
  - 8-13 yaş arasındaki hastalar seçilmiştir.

- Çalışmadan dışlanma kriterleri
    - Deri prick testinde ev tozu akarının yanısıra diğer aerosol veya gıda antijenlerine pozitif yanıt verenler,
    - İmmünoterapisi başlamış veya devam etmekte olan hastalar,
    - Diğer otoimmün hastalık hikayesi olanlar çalışmaya alınmamıştır.

II. İmmünoterapi almış astım hastalarının çalışmaya dahil edilme ve dışlanma kriterleri

- Çalışmaya dahil edilme kriterleri
    - Ev tozu akarına karşı tedavi gören ve en az 30 ay süreyle immünoterapi tedavisi almış,
    - Deri prick testinde ev tozu akarı antijenine ve diğer aerosol ve gıda antijenlerine negatif yanıt veren,
    - Başka bir otoimmün hastalığı olmayan,
    - Son 6 ayda kortikosteroid, glikokortikoid kullanmamış,
    - 8-13 yaş arasındaki bireyler çalışmaya dahil edilmiştir.
- Çalışmadan dışlanma kriterleri
    - İmmünoterapisi tamamlanmamış,
    - Prick testinde herhangi bir antijene pozitif yanıt veren,
    - Otoimmün başka bir hastalık hikayesi olan bireyler çalışmaya dahil edilmemiştir.

III. Sağlıklı bireylerin çalışmaya dahil edilme ve dışlanma kriterleri

- Çalışmaya dahil edilme kriterleri
    - Otoimmün veya alerjik hastalık hikayesi olmayan,
    - Son 6 ayda immün baskılayıcı veya steroid kullanmamış,
    - Deri prick testinde tüm antijenlere negatif yanıt veren bireyler çalışmaya dahil edilmiştir.
- Çalışmadan dışlanma kriterleri
    - Son 6 ayda immün baskılayıcı veya steroid kullanmış,
    - Prick testinde en az bir antijene pozitif yanıt veren bireyler çalışmaya dahil edilmemiştir.

5.6.6.2. Astım hastası, İmmünoterapi almış astım hastası ve sağlıklı bireylerden alınan venöz kandan mononükleer hücre izolasyonu

Çalışmaya dahil edilen bireylerin her birinden yeşil kapaklı heparinli tüplere 20 ml venöz kan alındı. Heparinli tüplere alınan kanlardan aşağıdaki protokole göre mononükleer hücre izolasyonu yapıldı.

PKMH izolasyonu laminar hava akımlı aseptik kabinde gerçekleştirildi. Sağlıklı bireylerin her birinden alınan 20 ml kan 50 ml'lik steril falkon tüpe aktarıldı ve üzerine 20 ml steril PBS solüsyonu eklenerek pastör pipetle yavaşça karıştırıldı. 15 ml' lik konik kapaklı falkon tüplere 4 ml fikol solüsyonu eklendi. 15 ml'lik falkon tüpte bulunan fikol solsüyonunun üzerine birbiriyle karışmayacak ve toplam hacim 12 ml olacak şekilde PBS ile homojenize edilmiş kan pastör pipetle yavaşça eklendi. Kan fikol üzerine yayıldıktan sonra 20 dakika 2000 rpm devirde santrifüj edildi. 20 dakika sonrasında yoğunluklarına göre en altta eritrositler, orta kısımda opak görünümlü mononükleer hücreler ve üst kısımda plazma elde edildi. Orta tabakada opak görünümlü olan (buffy coat) mononükleer hücrelerin bulunduğu kısım pastör pipeti ile alındı ve steril 15 ml'lik boş falkon tüpe aktarıldı. Üzerine eşit hacimde PBS eklendi ve pipetaj yapıldı. 1500 rpm devirde 5 dk santrifüjlendikten sonra supernatant atıldı dipte kalan hücre pelleti cRPMI besiyeriyle 5 ml'ye tamamlandı ve pipet yardımıyla hücreler süspanse edildi. Eritrosit içeren PKMH hücre süspansiyonu eritrositlerin lizizi için lizat solüsyonuyla süspanse edilerek 10 dk oda sıcaklığında bekletildi. Süre sonunda hücre süspansiyonu 1500 rpm devirde 5 dk santrifüjlendi ve santrifüj sonrasında supernatant atıldı dipte kalan hücreler 1 ml CRPMI ile süspanse edilip hücre sayısının belirlenmesi için içinden 10 µl alınıp 500 µl ependorf tüpe aktarıldı. Ependorf tüp içeriğine 10 µl tripan mavisi solüsyonu eklenip hücreler pipetaj yapılarak homojenize edildi. Bu içerikten pipetle 10 µl alınarak thoma lamına aktarıldı ve hücre sayısı belirlendi. 1 ml'deki toplam hücre sayısı aşağıdaki formüle göre belirlendi.

$$\text{Toplam hücre sayısı} = AxSFx10^4$$

A; 16 büyük karede sayılan hücre sayısı, SF; tripan mavisi ile seyreltme faktörüdür. 10^4 ise thoma lamının 0,1 mm^3 ' deki sayım sonucunu 1 ml' deki sayıya dönüştürmek için kullanılan sabittir.

Hücre Kültür Planı

Astım hastası, immünoterapi almış astım hastaları ve sağlıklı bireylerden elde edilen venöz kan mononükleer hücrelerinin DF-MKH varlığında ve yokluğunda

kültürleri yapıldı. Her birey için 48 kuyulu kültür plaklarında aşağıdaki kültür kuyuları hazırlandı.

I. Kültür grubu (lenfosit proliferasyonu)

Uyarımsız CFSE işaretli Mononükleer Hücreler	CDMix uyarımlı CFSE işaretli Mononükleer Hücreler	Der p1 uyarımlı CFSE işaretli Mononükleer Hücreler	IFN-γ uyarımlı CFSE işaretli Mononükleer Hücreler
Uyarımsız CFSE işaretli Mononükleer Hücreler + DF-MKH	CDMix uyarımlı CFSE işaretli Mononükleer Hücreler + DF-MKH	Der p1 uyarımlı CFSE işaretli Mononükleer Hücreler + DF-MKH	IFN-γ uyarımlı CFSE işaretli Mononükleer Hücreler + DF-MKH

II. Kültür grubu (Apoptoz, Tregülatör hücre oranı, naif, efektör ve bellek hücre oranları, kostimülatör molekül ekspresyonu, protein ekspresyonu, sitokin düzeyleri analizleri)

Uyarımsız Mononükleer Hücreler	CDMix uyarımlı Mononükleer Hücreler	Der p1 uyarımlı Mononükleer Hücreler	IFN-γ uyarımlı Mononükleer Hücreler
Uyarımsız Mononükleer Hücreler + DF-MKH	CDMix uyarımlı Mononükleer Hücreler + DF-MKH	Der p1 uyarımlı Mononükleer Hücreler + DF-MKH	IFN-γ uyarımlı Mononükleer Hücreler + DF-MKH

Hücre izolasyonları yapıldıktan ve hücreler sayıldıktan sonra bir grup mononükleer hücre DF-MKH varlığında ve yokluğunda 72 saat 37°C'de %5 CO_2 ortamda inkübe edildi. Bir grup mononükleer hücre ise CFSE ile işaretlenip DF-MKH varlığında ve yokluğunda 72 saat 37°C'de %5 CO_2 ortamda inkübe edildi. 72 saat sonunda CFSE ile işaretlenen mononükleer hücrelerde $CD4^+$ T lenfosit proliferasyonu, işaretlenmeyen mononükleer hücrelerde ise $CD4^+CD25^+FoxP3^+$, Annexin V/7AAD ile T lenfosit apoptozu, naif/efektör/bellek CD4+ T hücre oranları, antijen sunucu hücrelerde kostimülatör moleküllerin (CD80/CD83/CD86) ekspresyonları analiz edildi. $CD4^+$ T lenfositlerin Th1 ve Th2 farklılaşma analizleri iki şekilde yapıldı; 1)

kültür süpernatantında sitokin düzeylerinin belirlenmesi 2) kültür sonrası hücrelerde western blot yöntemiyle protein ekspresyonu analizi yapıldı.

5.6.6.3. Lenfositlerin proliferasyon analizi için CFSE ile işaretlenmesi

Karboksifloresan süksinimidil ester (CFSE) hücre zarından geçebilen floresan bir boyadır. Hücre membranına bağlandıktan sonra esteraz aktivitesinin gerçekleşmesi ile belirli bir dalga boyunda floresan ışıma açığa çıkar. Böylece hücrelerin sitoplazmasının boyanması sağlanır. Eğer kültür süresi boyunca hücre çoğalması olursa her bölünmede bu işaretleyici yeni oluşan hücrelere aktarılır. Oluşan her yeni hücre bölünen hücrenin taşıdığı işaretleyicinin bir kısmını aldığı için proliferasyon sonucunda oluşan yeni jenerasyon hücreler analiz sonucunda CFSE ışıma değeri azalarak gözlenir. Eğer proliferasyon olmadıysa hücre bölünmediği için CFSE ışıma değeri değişmez, analizde tüm hücreler aynı alanda görülür.

Lenfosit proliferasyonunu analiz etmek amacıyla hücre sayımından sonra izole edilen mononükleer hücrelerin bir kısmı CFSE ile işaretlenerek kültür edildi. CFSE boyası 25 mg'lık viallerde bulunmaktadır. Stok solüsyon hazırlamak için 25 mg CFSE viali 8.96 mL DMSO ile çözüldü ve 20 µl'lik kryoviallere bölündü. Bu stok solüsyon -20°C'de muhafaza edildi. 15 ml' lik falkonlarda bulunan ve CFSE işaretlenmesi için ayrılan hücrelerin üzerine 3 ml steril PBS eklendi, pipetaj yapıldı ve homojenize edildikten sonra 1500 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet üzerine 1ml steril PBS eklenip pipetaj yapılıp homojenize edildi. Homojenize edildikten sonra falkon içerisine 2 µL stok CFSE eklendi ve pipetaj yapıldı. CFSE konulduktan sonra 12 dakika +4 C˚ de bekletildi. 12 dakika sonunda 7 ml steril PBS eklendi, pipetaj yapıldı ve 2000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı ve 7 ml hücre kültür solüsyonu eklenip tekrar 1500 rpm de 5 dakika santrifüjlendi. Son yıkama işleminden sonra 1 ml CRPMI eklenip hücre sayımı yapıldı.

5.6.6.4. Lenfosit kültürünün ve kök hücre ve lenfositlerin ko-kültürünün yapılması

Kültür grupları ikiye bölündü. Bir grup hücre sadece periferal kan mononükleer hücreler, diğer grup ise DF-MKH'lerin üzerine periferal kan mononükleer hücreler olacak şekilde ekildi. Bunun için; bir grup mononükleer hücre izolasyondan sonra direkt olarak kültür plaklarına 5.6.6.2'de belirtilen hücre kültür planına göre her kuyuda 500 µl hücre kültür solüsyonu (cRPMI) ile $5x10^5$ hücre süspanse edilerek ekildi. Diğer grup için ise mononükleer hücre izolasyonundan 48 saat önce 48 kuyucuklu plaklara $5x10^4$ DF-MKH ekildi. 48 saat sonunda mononükleer hücreler ekilmeden önce tabana yapışan DF-MKH üzerindeki kültür besiyerinin tamamı pipetle çekilerek atıldı. Herbir hastanın venöz kanından izole edilen mononükleer hücreler her kuyuda $5x10^5$ mononükleer hücre olacak şekilde 500 µl hücre kültür solüsyonu ile süspanse edilerek DF-MKH üzerine eklendi. Hastaların venöz kanından izole edilen mononükleer hücrelerin eklenmesiyle (0.saat) kültür süresi başlatıldı. Herbir kuyudaki DF-MKH:Mononükleer hücre oranı 1:10 ($5x10^4$:$5x10^5$) olarak belirlendi.

Mononükleer hücrelerin DF-MKH varlığında ve yokluğunda kültürleri için 0. saatte aşağıdaki gibi uyarımları yapıldı.

- **US**: Uyarımsız kuyulara antikor eklenmedi.
- **CDmix uyarımlı**: T lenfosit uyarımı için CDmix uyarımı olan kuyulara karışım olarak hazırlanan anti-CD3/antiCD28 solüsyonundan 2,5 µl (1 µg/ml anti-CD3 antikoru ve 5 µg/ml anti-CD28 antikoru) eklendi.
- **Der p1 uyarımlı**: Antijen sunucu hücrelerin ev tozu akarının spesifik antijeni olan Der p1 ile uyarilmasi için; Der p1 uyarımlı kuyulara 10 ng/ml Der p1 antijeni eklendi.
- **IFN-γ uyarımlı**: IFN-γ uyarımlı kültürlere 0,5 µg/ml rekombinant insan IFN-γ proteini eklendi.

Hücre kültürleri 72 saat süreyle 37°C'de %5 CO_2 ortamda inkübe edildi.

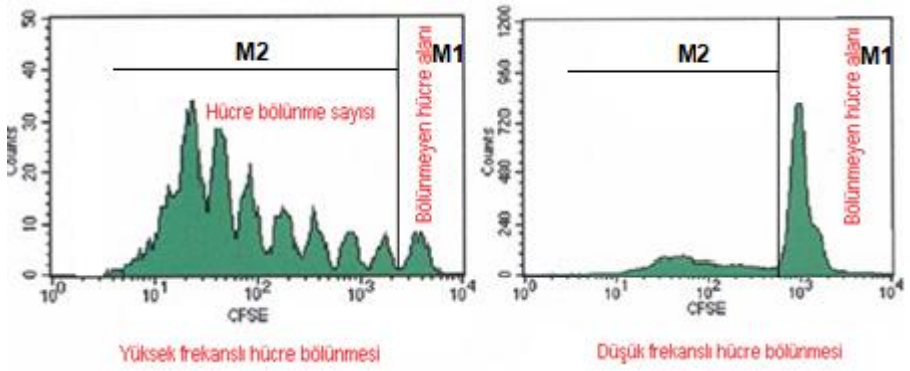
5.6.7. Analizler

5.6.7.1. $CD4^+$ T Lenfositlerin proliferasyon analizi

Mononükleer hücrelerin 72 saatlik kültür süresi sonunda $CD4^+$ T hücre proliferasyonu akım sitometri cihazı ile analiz edildi. Kök hücrelerin hücre proliferasyonu üzerindeki etkisininin gösterilmesi amacıyla proliferasyon analizi yapıldı.

İzole edilen ve kültür süresi tamamlanan mononükleer hücrelerin içindeki $CD4^+$ T lenfositlerin proliferasyonun takibi için kültürün 0. saatinde CFSE işaretlenerek 72 saat süreyle DF-MKH varlığında ve yokluğunda 37°C, %5 CO^2 inkübatörde kültürleri yapıldı.

Kuyulara pipetaj yapılarak dipte kalan ve hücre kültür solüsyonu içindeki hücrelerin homojenize edilmesi sağlandı. Kuyulardaki besiyerleri alındı ve akım sitometri tüplerine konuldu. 1500 rpm' de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı ve dipteki pellet üzerine 2 ml hücre yıkama solüsyonu (PBS) eklendi ve 1500 rpm' de 5 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı ve dipteki hücre pelletine 100 µl PBS eklenip bu hücre süspansiyonuna anti-CD3, anti-CD4 ve anti-CD8 antikorları eklenerek 15 dk karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda hücrelerin üzerine 2 ml PBS eklenerek 1500 rpm' de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı ve dipteki hücre pelletinin üzerine 500 µl hücre yıkama solüsyonu (akım sitometri cihazı için) eklenip pipetle süspanse edildikten sonra akım sitometri cihazında analiz edildi. (Şekil 4)



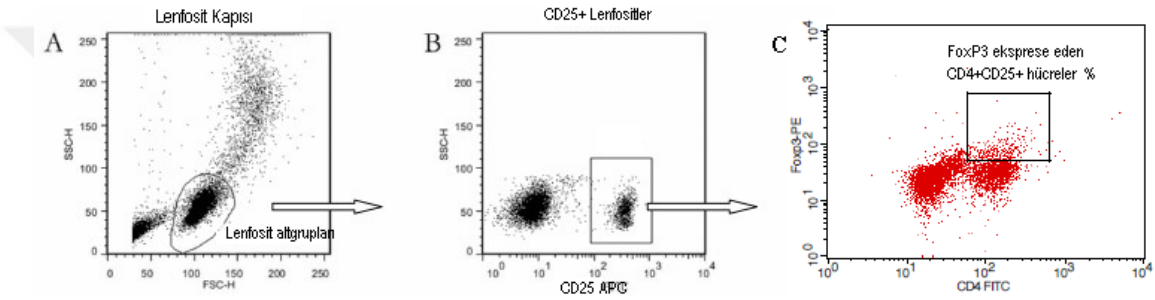
Şekil 4. CFSE işaretli hücrelerin akım sitometri cihazında analizi. CFSE alanında sağda bulunan hücre grubuna ait pik bölünmeyen hücreleri ifade eder (M1), her bölünen hücre sola doğru diğer nesillerin toplamı (M2) olarak analiz edilmektedir. Hücre her bölünmede bir önceki nesilden CFSE boyasının yarısını aldığı için prolifere olan (çoğalan) hücreler grafikte sola doğru ilerlemektedir.

5.6.7.2. Lenfositlerin $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre analizi

Mononükleer hücrelerin 0.gün ve 72 saatlik kültür sonrasında $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranları analiz edildi. $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücrelerin kök hücre varlığında ve yokluğundaki sayısal değişimlerinin incelenmesi için akım sitometri cihazında analiz edildi.

Hücreler insan FoxP3 kitindeki protokole göre hazırlandı. Protokole göre; 500 µl'lik kültür kuyularına pipetaj yapılarak hücrelerin homojenize bir şekilde dağılması sağlandı ve bu homojenize sıvıdan 250 µl alınıp akım sitometri tüplerine aktarıldı. Hücrelerin aktarıldığı akım sitometri tüplerine 2 ml PBS eklendi ve 1500 rpm' de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırıldı ve tüplere 100 µl boyama tampon solüsyonu (1:10 oranında, 1 ml 10X permeabilization buffer, 9 ml hücre yıkama solüsyonu) eklendi. 10 µl anti-CD4/anti-CD25 antikoru eklenip vorteksle karıştırıldı ve 20 dakika boyunca oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi. Süre sonunda 2 ml boyama tampon solüsyonu eklendi ve 1500 rpm devirde 5 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve 2 ml FoxP3 kiti tampon A solüsyonu (1:4 oranında, 1 ml tampon A, 3 ml distile su) eklendi, vorteks yapıldı ve 40 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi. 40 dakika sonra 2000 rpm devirde 5 dakika santrifüj yapıldı ve santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı. 2 ml boyama

tampon solüsyonu eklendi, vorteks yapıldı ve 2000 rpm devirde 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırıldı ve 100 µl boyama tampon solüsyonu boyama tampon solüsyonu eklendi. Tampon solüsyonu dipteki pelletle karıştırıldı ve üzerine 5 µl FoxP3 antikoru eklendi. 40 dk. oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi. Süre sonunda tüplere 2 ml hücre yıkama solüsyonu (cell wash) eklenip 2000 devirde 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atıldı dipte kalan pelletin üzerine 500 µl hücre yıkama solüsyonu eklenip vorteksle karıştırıldı ve akım sitometri cihazında analiz edildi. (Şekil 5)



Şekil 5. $CD4^{+}CD25^{+}FoxP3^{+}$ T regülatör hücrelerin akım sitometri analizi. A) Akım sitometri analizinde önce lenfosit kapısı alınmaktadır, B) Lenfosit altgruplarının içinde CD25 pozitif alandaki hücreler seçilerek kapılanmıştır, C) CD25 ifade eden hücrelerin içinde CD4 ve FoxP3 çift pozitif alandaki Tregülatör hücreler seçilerek % oranları analiz edilmiştir.

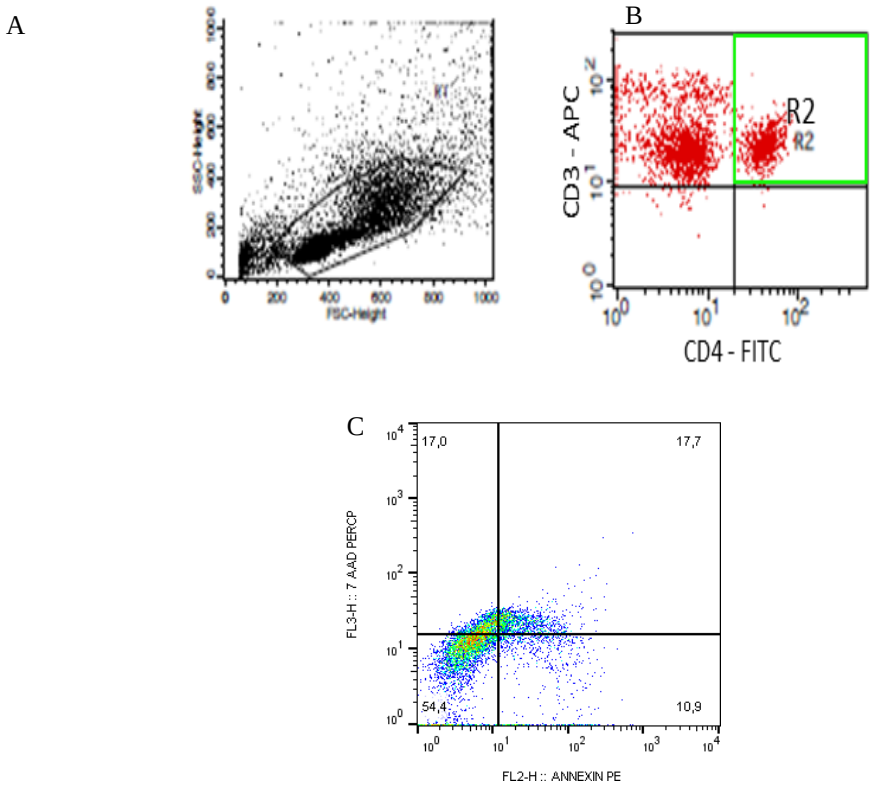
5.6.7.3. Lenfositlerin Annexin V/7AAD ile apoptoz oranlarının analizi

Mononükleer hücrelerin izolasyonundan sonra kültürü yapılan lenfositlerin 72 saatlik kültür sonrasında Annexin V/7AAD kiti ile hücrelerin canlılık ve apoptoz oranları analiz edildi. Kök hücre varlığında ve yokluğunda apoptotik hücrelerin oranlarındaki değişimlerin incelenmesi için akım sitometri cihazında Annexin V/7AAD ile işaretlenerek analizleri yapıldı.

Apoptoz, embriyonik gelişim sırasında ve aynı zamanda doku homeostazının devam ettirilmesi sırasında ortaya çıkan normal fizyolojik bir süreçtir. Apoptotik süreçte, plazma membran asimetrisi ve hücrenin diğer hücrelerle bağlantısının kaybı

da dahil olmak üzere bazı morfolojik değişiklikler gerçekleşmektedir. Bu değişiklikler sitoplazma ve çekirdeğin yoğunlaşması ve DNA'nın internükleozomal bölünmesi gibi olaylardır. Annexin V, 35-36 kDa ağırlığında ve Ca^{2+} bağımlı bir fosfolipid bağlayıcıdır. Apoptotik süreçte hücrenin iç kısmında bulunan membran fosfolipid fosfatidilserin (PS) dışa doğru hareket etmeye başlar. Annexin V; PS için yüksek afiniteye sahip olan ve PS maruziyetli hücrelere bağlanan bir proteindir. Annexin V, PS için yüksek afinitesini korur ve böylece, hücrelerin akım sitometrik analizi için hassas bir prob görevi görür.

Kültür kuyularından alınan hücreler 15 mL'lik falkon tüplere alınıp PBS solüsyonuyla 2 mL'ye tamamlandı ve 1500 rpm'de 5 dk. santrifüjlendi. Süpernatant atıldı, dipte kalan hücreler 100 µL PBS solüsyonuyla sulandırıldı. Hücreler akım sitometri cihazında okutulmadan önce $CD4^+$ T hücrelerin seçilmesi için anti-CD3 ve anti-CD4 antikoru kullanıldı. Erken veya geç apoptotik veya nekrotik hücreleri belirlemek için Annexin V ile birlikte 7AAD (7-amino-actinomycin) işaretleyici kullanıldı. Hücre eğer canlılığını koruyorsa 7AAD işaretleyici membrandan geçemez. Eğer hücre ölü veya hasar görmüşse bu hücrelerin zarı 7AAD işaretleyiciyi geçirir. Annexin V ve 7AAD ile analizlerin sonuçları şu şekilde değerlendirilir; 1) Canlı hücreler; annexin V ve 7AAD'nin her ikisinde de negatif alandadır, 2) Erken apoptoz; Annexin V pozitif alanda 7AAD negatif alandadır, 3) Geç apoptoz; Annexin V ve 7AAD her ikisi de pozitif alanda, 4) Nekroz; Annexin V negatif alanda 7AAD ise pozitif alandadır. Nekroz ve apoptoz birbirinden farklı süreçler içeren hücre ölüm olaylarıdır. Nekrotik hücrelerde plazma membranı tamamen dağıldığı için annexin V işaretleyici ile işaretlenmez, bu nedenle annexin V negatif alanda görülür. (Şekil 6)



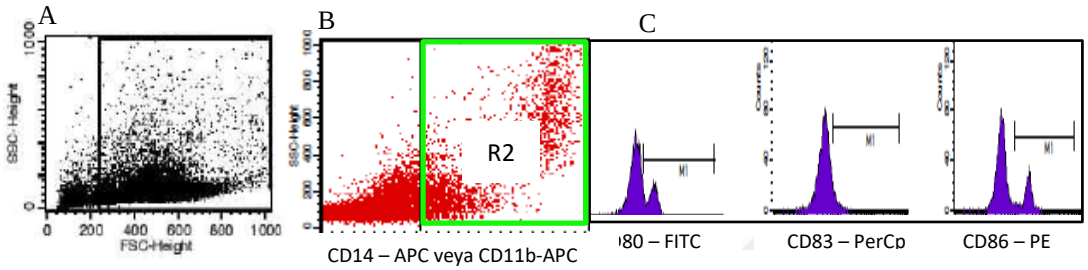
Şekil 6. Hücre canlılığı ve apoptoz oranlarının akım sitometri cihazında analizi. A) Kültürden alınan hücreler için akım sitometri cihazında önce lenfosit kapısı seçilir. B) Lenfositlerin içinden $CD3^+/CD4^+$ T hücreler seçilir. C) $CD3^+/CD4^+$ T hücrelerde Annexin V/7AAD analizi yapılır.

5.6.7.4. Antijen sunucu hücrelerde kostimülatör molekül ekspresyonu analizi

Mononükleer hücrelerin izolasyonundan sonra kültürü yapılan hücrelerin 72 saatlik kültür sonrasında monositler ve dendritik hücreler üzerinde CD80, CD83 ve CD86 kostimülatör molekül oranları analiz edildi. Kök hücre varlığında ve yokluğunda monositlerin kostimülatör molekül oranlarındaki değişimlerin incelenmesi için anti-CD80, anti-CD83 ve anti-CD86 antikorlarıyla işaretlenerek akım sitometri cihazında analizleri yapıldı.

Bu çalışmada T lenfosit uyarımını sağlayan kostimülatör moleküllerin DF-MKH varlığında ve yokluğunda monosit hücreler üzerindeki ifade değişimleri akım sitometri cihazında analiz edildi. Kültür kuyularından alınan hücreler 15 mL'lik falkon tüplere alınıp PBS solüsyonuyla 2 mL'ye tamamlandı ve 1500 rpm'de 5 dk. santrifüjlendi.

Süpernatant atıldı, dipte kalan hücreler ayrı deney tüplerinde olmak üzere her biri 100 µL PBS ile sulandırılıp, bir grup hücre monositlerin seçilmesi için anti-CD14 antikoruyla, diğer grup hücre dendritik hücrelerin seçilmesi için anti-CD11b antikoruyla işaretlendi. Her iki deney tüpüne de anti-CD80, anti-CD83 ve anti-CD86 antikorları eklenerek monositler ve dendritik hücrelerin yüzeyinde kostimülasyon oranı analiz edildi. (Şekil 7)

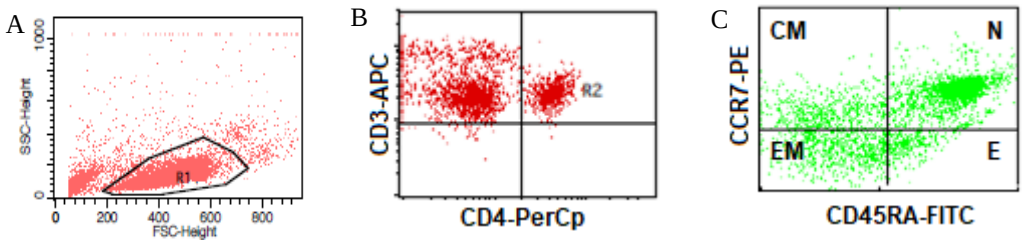


Şekil 7. Monosit ve dendritik hücrelerde kostimülasyon oranlarının akım sitometri cihazında analizi. A) Kültürden alınan hücreler için akım sitometri cihazında önce tüm hücreler seçilir. B) Hücrelerin içinden CD14 veya CD11b hücreler seçilir. C) CD14 veya CD11b hücrelerde CD80, CD83, CD86 oranları analiz edilir.

5.6.7.5. Naive, Efektör ve Bellek $CD4^+$ T lenfosit oranlarının belirlenmesi

Mononükleer hücrelerin izolasyonundan sonra DF-MKH varlığında ve yokluğunda kültürü yapılan hücrelerin 72 saatlik kültür süresinin sonunda naive, efektör ve bellek $CD4^+$ T lenfosit oranları analiz edildi.

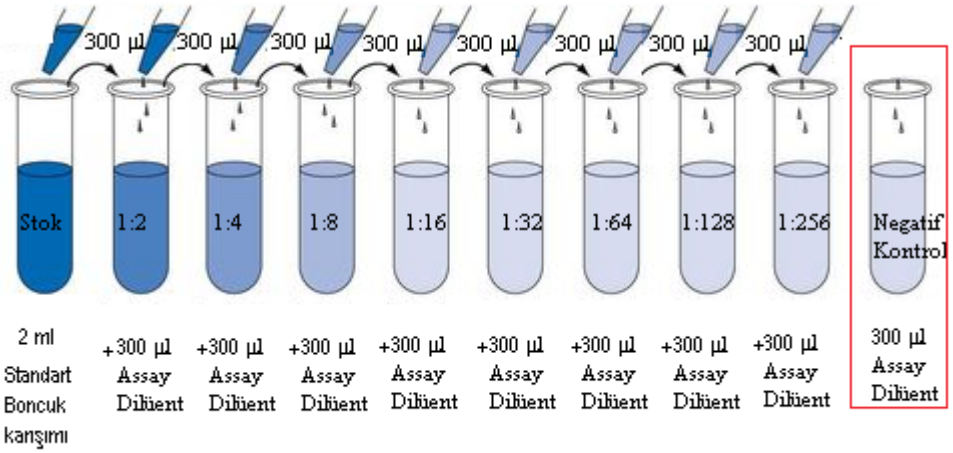
DF-MKH'lerin astım hastalığında naive, efektör ve bellek CD4+ T hücre fenotipleri üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla hastalardan izole edilen periferal kan mononükleer hücreler 72 saat kültür süresinin sonunda anti-CD3, anti-CD4, anti-CCR7 ve anti-CD45RA antikorlarıyla işaretlenip akım sitometri cihazında analiz edildi. (Şekil 8)



Şekil 8. Naive, efektör, efektör bellek ve merkez bellek $CD4^+$ T lenfosit oranlarının akım sitometri cihazında analizi. A) Kültürden alınan hücreler için akım sitometri cihazında önce tüm hücreler seçilir. B) Hücrelerin içinden CD4+ T lenfositler için $CD3^+/CD4^+$ alandaki hücreler R2 kapısı olarak seçilir. C) R2 kapısından seçilen hücreler şu şekilde analiz edilir; $CCR7^+/CD45RA^+$ hücreler naive (N), $CCR7^-/CD45RA^+$ hücreler efektör (E), $CCR7^-/CD45RA^-$ hücreler efektör bellek (EM), $CCR7^+/CD45RA^-$ hücreler merkez bellek (CM) $CD4^+$ T lenfositlerdir.

5.6.7.6. Hücre kültür süpernatanlarında sitokin tayini

Hastalardan elde edilen mononükleer hücrelerin 72 saatlik kültürü sonrasında kültür süpernatantları toplandı ve sitokin düzeylerinin belirlenmesi için sitokin analizi Cytometric Bead Array (CBA) Th1/Th2/Th17 kiti kullanılarak yapıldı. Kit protokolüne göre öncelikle standart dilüsyonlar hazırlandı. Bu işlem için standart boncukları (standard beads) 15 ml' lik falkon tüpe boşaltıldı ve 2 ml seyreltici solüsyon içerisinde yavaşça pipetaj yapılarak çözüldü. 15 dakika oda sıcaklığında 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). Negatif kontrol tüpüne sadece dilüe edici sıvı eklendi. Tüp sayısı belirlendikten sonra standart boncuk karışımı her bir tüpe 50 µl eklendi. Hazırlanan standart tüplerine 50 µl standartlardan, örnek tüplerine ise 50 µl örneklerden konuldu. Boncuk karışımı kısa bir süre vortekslendi ve her bir tüpe 25 µl boncuk konuldu. Tüpler vortekslendikten 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 vortekslendi. Örnekler akım sitometri cihazında okutuldu. Analizlerde sitokinler için hazırlanan standartlar çerçevesinde grafik eğrisi oluşturuldu ve her bir örnekteki sitokin miktari elde edilen denkleme göre belirlendi. (Şekil 9)



Şekil 9. Th1/Th2/Th17 sitokin kiti standart hazırlanması.

5.6.7.7. Protein ekspresyon analizi (Western Blot yöntemi)

Kültür edilen mononükleer hücreler 72 saat kültür süresinin sonunda protein ifadesinin analizi için kültür kuyularından alınarak 15 mL falkon tüplere aktarıldı. Hücre süspansiyonu önce PBS solüsyonuyla 2 mL'ye tamamlanarak 1500 rpm'de 5 dk. santrifüjlendi. Süpernatant atıldı, dipte kalan hücre pelleti sayım yapıldıktan sonra her 1-2x10^6 hücre için 100 µL RIPA protein izolasyon/ekstraksiyon kiti ile süspanse edilip 15 dk +4ºC'de bekletildi. İnkübasyon süresinin sonunda 800-1000 rpm'de 3 dk. santrifüjlenerek süpernatant toplandı ve 500 µL ependorf tüplerde analize kadar (maksimum 1 ay) -20C'de bekletildi.

Protein ifadesinin analizi western blot yöntemiyle gerçekleştirildi. Bunun için öncelikle -20C'de saklanan örnekler protein miktarının belirlenmesi için Qubit cihazında ölçümleri yapıldı. Her bir örnekten 2 µL örnek alınıp 500 µL ependorf tüplere aktarıldı ve üzerine 198 µL Qubit protein tampon solüsyonu ölçüm reaktifi ile birlikte eklendi.

Ölçüm sonrasında elde edilen protein miktarına göre elektroforez işleminde jele yüklemeden önce protein miktarını eşitlemek için şu hesaplama yapıldı;

Örnek konsantrasyonu (µg/mL) = QF değeri × (200/x)

QF değeri: Qubit florometrede okunan absorbans değeri

X: Eklenen örnek miktarı

Protein miktarı belirlendikten sonra herbir örnek için jele yüklenecek örnek hacmi µL olarak belirlendi. Protein elektroforez işlemi için 10 kuyulu jel kullanıldı. Her jel kuyusuna 20 µL'de 20 ng olacak şekilde örnekler dilüe edilerek yüklendi. Elektroforez işlemi için yürütme tampon solüsyonu (running buffer) kullanıldı. Yürütme tampon solüsyonu 20X konsantrasyonda hazır olarak alındı. Bu solüsyondan 50 mL alınıp üzeri 950 mL distile su ile tamamlandı ve konsantrasyon 1X değerine düşürüldü. Elektroforaz cihazı çalıştırılmadan önce 1X yürütme tampon solüsyonu dolum çizgisine kadar cihazın küvetine aktarıldı. Proteinin yükleneceği jeller cihaz küvetine yerleştirildikten sonra jel kuyularından ilkine protein standardı yüklendi, diğer kuyuların her birine laemli solüsyon içinde 20 ng/20 µL örnek yüklendi. Cihaz 500 mA 100 V ve 90 dakika olarak ayarlandı ve yürütme işlemi başlatıldı. Süre sonunda jeldeki proteinlerin ilerlemesi tamamlandıktan sonra jel cihaz küvetinden alınıp western blot transfer cihazına (iBlot) yerleştirmek için cihaz üreticisinin talimatına uygun olarak nitroselüloz membran üzerine aktarıldı. Nitroselüloz membran üzerine transfer edilen proteinler önce primer sonra sekonder antikorlarla işaretlendi. Antikorla işaretleme işlemi için süt tozu içeren TBST solüsyonu kullanıldı. Primer antikor 5 ml %5 süt tozu içeren TBST solüsyonu ile üretici firmanın önerdiği oranda sulandırıldı. Nitroselüloz membran primer antikorun bulunduğu %5 süt tozu içeren TBST solüsyonu ile çalkalayıcı küvet içinde içinde 24-36 saat +4 ºC'de inkübe edildi. İnkübasyon süresinden sonra membranın üzerindeki antikor solüsyonu atıldı, iki kere PBS ile yıkandı ve PBS atıldı. Sekonder antikor 5 ml %5 süt tozu içeren TBST solüsyonu ile üretici firmanın önerdiği oranda sulandırıldı. Nitroselüloz membran sekonder antikorun bulunduğu %5 süt tozu içeren TBST solüsyonu ile çalkalayıcı küvet içinde içinde 6 saat +4 ºC'de inkübe edildi. İnkübasyon süresinden sonra membranın üzerindeki antikor solüsyonu atıldı, iki kere PBS ile yıkandı ve PBS atıldı. Membran proteinin aktarıldığı yüzü üstte olacak şekilde küçük bir küvet içine alındı, üzerine ECL reaktif A ve 1 mL reaktif B eşit miktarda karıştırılarak eklendi. Karanlıkta oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildikten sonra görüntüleme cihazında analiz edildi.

5.6.7.8. DF-MKH'lerin immün düzenleyici mediatörlerinin belirlenmesi için nötralizasyon deneyleri

DF-MKH'lerin immün düzenleyici mediatörlerinin belirlenmesi için kokültürlerin besiyerine (cDMEM; DMEM + %10 FBS + %1 penisilin/streptomisin) ayrı kuyularda TGF-β nötralizasyonu için 0,5 µg/mL anti-TGF-β rekombinant antikoru, indolamin 2,3-dioksijenaz (IDO) yolağının blokajı için 1 mM 1-metil-D-triptofan (1-MDT) ve prostaglandin E2 (PGE2) yolağının blokajı için 50 µM sc-58125 eklendi. Astım hastalarından izole edilen periferal kan mononükleer hücreler (PKMH) ile DF-MKH kokültürleri CDmix uyarımlı, Der p1 uyarımlı ve IFN-γ uyarımlı olmak üzere üç gruba ayrıldı. Her bir grup ayrı kültür kuyularında olmak üzere nötralizasyon ajanı olmayan bir kültür kuyusu, anti- TGF-β nötralizasyonu yapılan kültür kuyusu, 1-MDT ile bloke edilen kültür kuyusu ve sc-58125 ile bloke edilen kültür kuyusu olmak üzere 4 kuyu kullanıldı. DF-MKH:PKMH 1:10 oranında 48 kuyucuklu kültür plaklarında 500 µL cDMEM besiyeri içinde kültür edildi. Ayrıca, her gruptan birer kuyu kök hücre içermeyen sadece PKMH olarak kültür edildi. Kültürler 72 saat süreyle 37ºC'de %5CO_2 inkübatörde yapıldı.

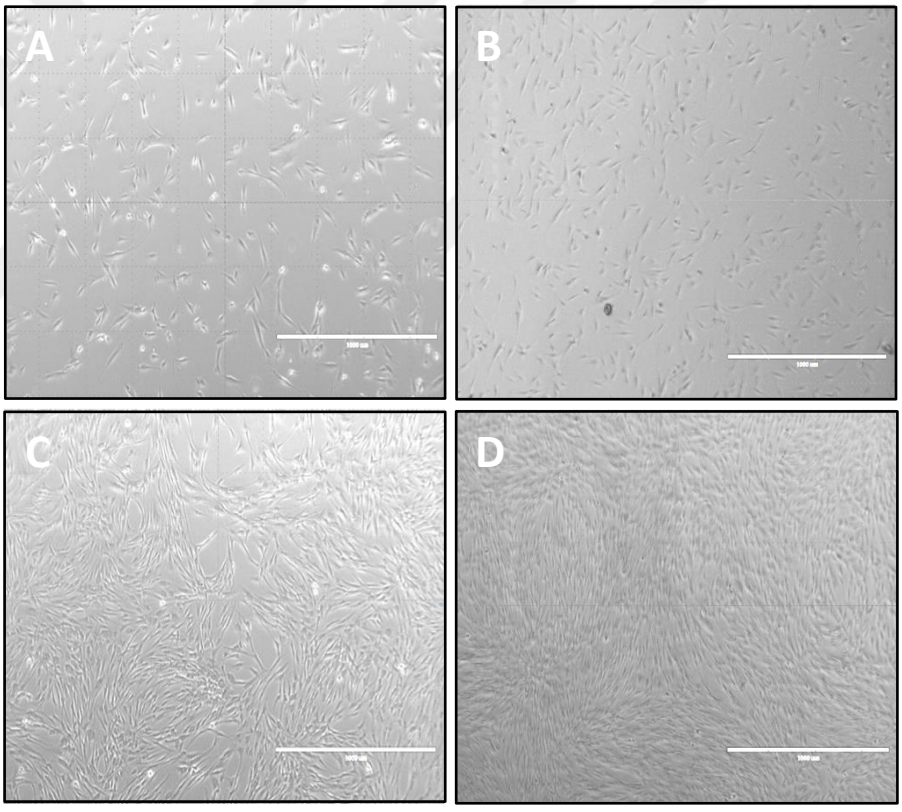
5.6.8. İstatistiksel analiz

Gruplar arasındaki farklılık GraphPad Prism 5 programı (GraphPad Software, Inc., CA, USA) kullanılarak analiz edildi. Veriler her grupta ortalama (Ort) ± standart deviasyon (SD) (minimum-maksimum) değerleri olarak verildi. İkiden fazla grup verilerinin bir arada karşılaştırılması ANOVA testi (tek yönlü varyans analizi) ile yapıldı. İki grup arasındaki karşılaştırma için unpaired Student *t* testi kullanıldı. *P*-değeri ≤ 0.05 değerler anlamlı olarak kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Diş Folikülü Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu

Diş folikülünden, kök hücreler izole edildikten sonra T-25 cm^2' lik flasklara ekildi ve hücrelerin morfolojik özellikleri invert mikroskop ile incelendi. Birinci kültürde hücrelerin hızla çoğaldıkları ve flask yüzeyini kapladıkları görüldü (Şekil 6.3.A). Hücreler yaklaşık %70-80 yayılım gösterdikten sonra birinci pasaja alınarak T-75 cm^2' lik flasklara aktarıldı. Pasajlama işleminden sonra hücreler 5-6 gün içerisinde flask yüzeyini kapladı ve bir sonraki pasaja alındı (Şekil 10).

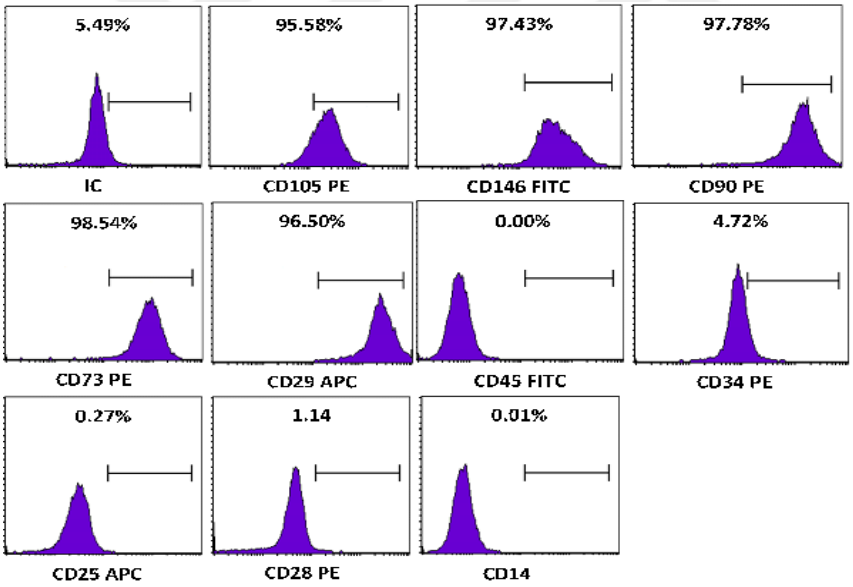


Şekil 10. DF-MKH' lerin morfolojik görünümü. A) DF-MKH hücrelerinin birinci kültür (P0, 3. gün), B) birinci pasaja alındıktan sonra (P1, 3. gün), C-D) sonraki alt kültürlerinin (C: P2, 3. gün; D: P3, 3. gün) invert mikroskobu görüntülerinde, kök hücrelerin fibroblast benzeri iğsi morfolojiye sahip oldukları görülmektedir (Büyütme: AX20, B-C-DX10).

6.2. DF-MKH'lerin Karakterizasyonu ve Farklılaşma Potansiyelinin Değerlendirilmesi

6.2.1. DF-MKH hücrelerin akım sitometri analizi

DF-MKH hücreleri üçüncü pasaja alındıktan yaklaşık 5 gün sonrasında kültür konflüent oldu ve hücrelerin karakterizasyon analizleri yapıldı. Bu hücrelerin akım sitometrik analizleri sonucunda hematopoetik kök hücre belirteci olan CD45, CD34, CD25, CD28 ve CD14 işaretlerini yüzeylerinde göstermedikleri görüldü. Aynı zamanda bu hücrelerin kök hücre işareti olan CD73, CD90, CD105, CD146 ve CD29' u yüzeylerinde gösterdikleri görüldü (Şekil 11).



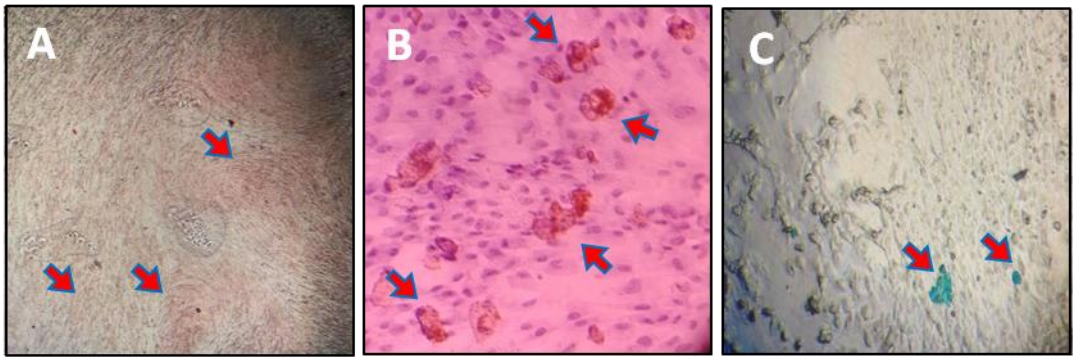
Şekil 11. DF-MKH hücrelerinin immunofenotipik özelliklerinin akım sitometri sonuçları. CD45 (%0,0), CD14 (%0,01), CD34 (%4,72), CD25 (%0,27) ve CD28 (%1,14) negatif ekspresyon gösterirken, MKH' lara özgü CD105 (%95,58), CD146 (%97,43), CD90 (%97,78), CD73 (%98,54) ve CD29 (%96,50) pozitif olduğu gösterildi. IC; İzotip kontrol.

6.2.2. DF-MKH hücrelerin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik yönde farklılaştırılması

Osteojenik farklılaştırma için uyarılan DF-MKH hücrelerinin osteoblast benzeri hücrelere farklılaştıkları gözlendi. Osteojenik farklılaştırma besiyerine alınan DF-MKH hücreleri kültürün 21. gününde alizarin kırmızısı ile boyandı ve mineralize kemik nodülleri görüldü (Şekil 12A).

Adipojenik olarak farklılaştırmak için adipojenik besiyerinde 14 gün süre ile kültürleri yapıldı ve DF-MKH hücrelerinin adiposit benzeri hücrelere 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 12B).

Kondrojenik olarak farklılaştırmak için DF-MKH hücrelerinin 21 gün kondrojenik besiyeri ile kültürleri yapıldı ve kondrosit benzeri hücrelere farklılaştıkları görüldü. Kültürün 21. gününde alcian blue ile boyanan hücrelerde kondrositler tarafından üretilen proteoglikanların mavi renkte boyandığı görüldü (Şekil 12C).



Şekil 12. DF-MKH hücrelerinin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma özellikleri. A) Osteojenik farklılaştırma besiyeri ile kültürü yapılan ve sonrasında alizarin kırmızısı ile boyanan DF-MKH hücrelerinde parlak kırmızı renkte boyanmış osteoblast nodülleri görülmektedir. B) Adipojenik farklılaştırma besiyeri ile kültürü yapılan ve sonrasında Oil red o ile boyanan DF-MKH hücrelerinde kırmızı renkte yağ damlacıkları görüldü. C) Kondrojenik farklılaştırma besiyeri ile kültürü yapılan ve sonrasında Alcian blue ile boyanan DF-MKH hücrelerinde mavi renkli boyanan proteoglikanlar görüldü.

6.3. DF-MKH astım hastalarının CD4+ T lenfosit proliferasyonunu baskıladı

DF-MKH' lerin immün baskılayıcı özelliklerini araştırmak amacıyla hastaların venöz kanından izole edilen mononükleer hücrelerle birlikte uyarımsız, T hücre uyarımı (CDmix; anti-CD3/anti-CD28), antijen spesifik uyarım (Der p1) veya IFN-γ uyarımı ile kültür edildi ve mononükleer hücrelerin içinde bulunan $CD4^+$ T lenfosit hücrelerinin proliferasyonları üzerine etkisi incelendi. Bu amaçla mononükleer hücrelerinin DF-MKH varlığında ve yokluğunda 3 gün (72 saat) boyunca kültürleri yapıldı.

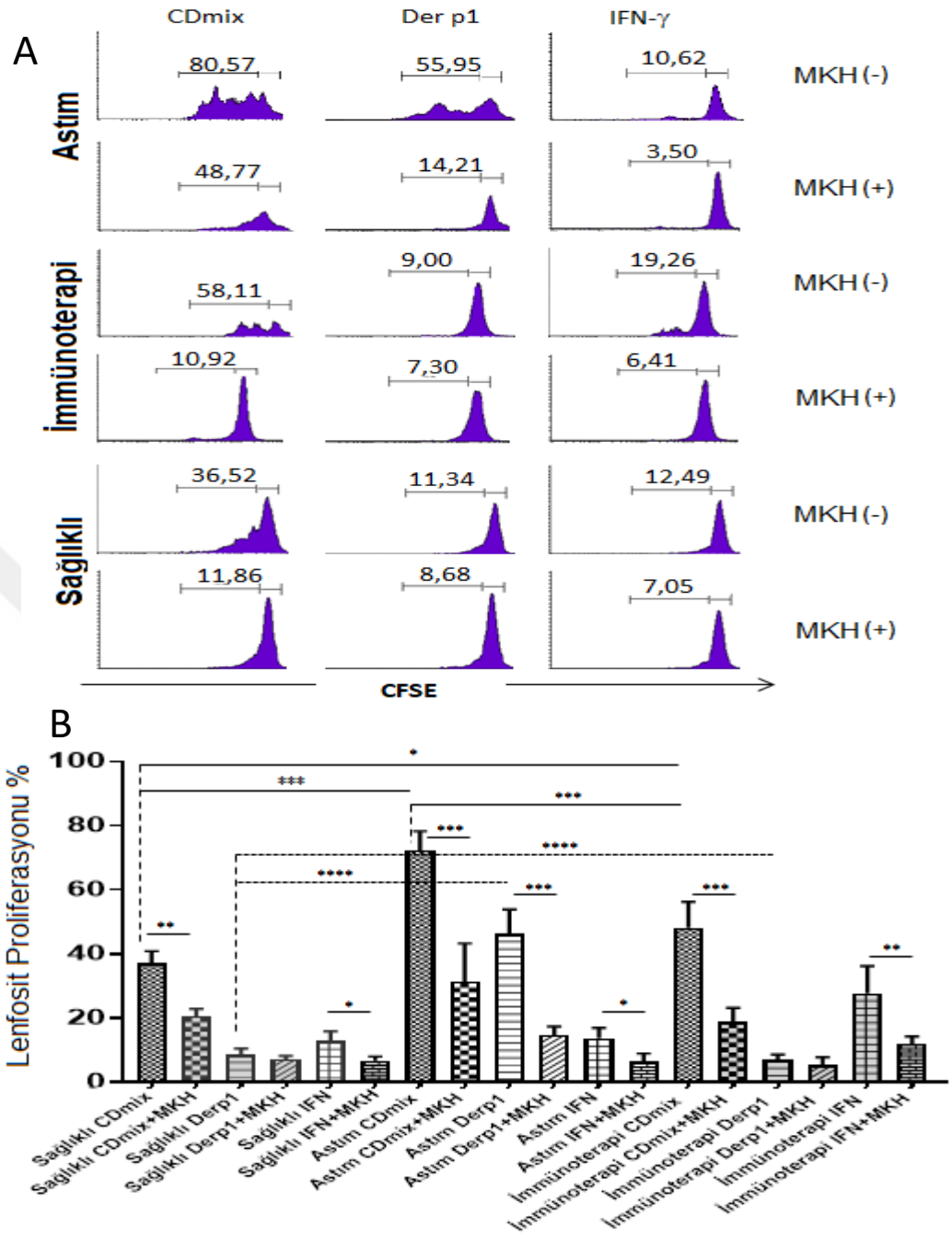
Elde edilen veriler; astım hastalarında $CD4^+$ T lenfosit proliferasyonunun CDmix ve Der p1 ile uyarılan (CDmix;78,2±6,1, Der p1; 53,8±5,4) mononükleer hücrelerde immünoterapi grubuna (CDmix;49,1±9,0, Der p1; 11,3±2,3) ve sağlıklı bireylere göre (CDmix; 32,8±5,2, Der p1; 9,4±2,6) istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığını gösterdi (CDmix; $p<0,005$ ve Der p1; $p<0,001$). Astım hastalarında IFN-γ uyarımlı mononükleer hücre kültürlerinde $CD4^+$ T lenfosit proliferasyonunun (9,2±1,8) CDmix (78,2±6,1) ve Der p1 (53,8±5,4) uyarımına göre anlamlı azaldığı gözlemlendi (CDmix; $p<0,001$ ve Der p1; $p<0,005$). İmmünoterapi almış bireylerde IFN-γ uyarımlı mononükleer hücre kültürlerinde $CD4^+$ T lenfosit proliferasyonunun sağlıklı bireylerin (11,2±1,4) ve astım hastalarının (9,2±1,8) aynı uyarımlı kültürlerine göre istatistiksel anlamlı yüksek olduğu görüldü ($p<0,05$ ve $p<0,05$).

Astım hastalarının CDmix uyarımlı mononükleer hücreler ile DF-MKH birlikte kültürlerinde $CD4^+$ T lenfosit proliferasyonu (43,7±6,8) kök hücresiz kültürlere göre (78,2±6,1) istatistiksel anlamlı baskılandı ($p<0,005$). Astım hastalarının Der p1 uyarımlı mononükleer hücreler ile DF-MKH birlikte kültürlerinde $CD4^+$ T lenfosit proliferasyonu (53,8±5,4) kök hücresiz kültürlere göre (13,2±2,4) istatistiksel anlamlı baskılandı ($p<0,005$). Astım hastalarında IFN-γ uyarımlı mononükleer hücrelerin DF-MKH ile birlikte kültürlerinde $CD4^+$ T lenfosit proliferasyonu (3,1±0,7) aynı uyarımlı kök hücresiz kültürlere göre (9,2±1,8) anlamlı baskılandı ($p<0,05$).

İmmünoterapi almış bireylerde ve sağlıklı bireylerde Der p1 uyarımlı DF-MKH ile birlikte kültürlerde mononükleer hücre kültürlerine göre $CD4^+$ T lenfosit proliferasyonunda anlamlı bir değişiklik olmadı ($p>0,05$). İmmünoterapi almış bireylerde CDmix uyarımlı DF-MKH ile birlikte kültürlerde $CD4^+$ T lenfosit proliferasyonu (8,6±3,5) mononükleer hücre kültürlerine göre (49,1±9,0) anlamlı baskılandı ($p<0,005$). İmmünoterapi almış bireylerde IFN-γ uyarımlı mononükleer hücrelerin DF-MKH ile birlikte kültürlerinde $CD4^+$ T lenfosit proliferasyonu (4,7±1,8) aynı uyarımlı kök hücresiz kültürlere göre (17,4±2,6) anlamlı baskılandı ($p<0,01$).

Sağlıklı bireylerde CDmix uyarımlı DF-MKH ile birlikte kültürlerde $CD4^+$ T lenfosit proliferasyonu (10,3±2,7) mononükleer hücre kültürlerine göre (32,8±5,2) anlamlı baskılandı ($p<0,01$). Sağlıklı bireylerde IFN-γ uyarımlı mononükleer hücrelerin DF-MKH ile birlikte kültürlerinde $CD4^+$ T lenfosit proliferasyonu (5,8±1,7) aynı uyarımlı kök hücresiz kültürlere göre (11,2±1,4) anlamlı baskılandı ($p<0,05$).

Elde edilen sonuçlara göre CDmix uyarımı DF-MKH'ler astım hastalarının $CD4^+$ T lenfosit proliferasyonunu immünoterapi almış bireylerin kök hücresiz CDmix uyarımlı kültürlerine göre daha fazla baskılarken, Der p1 uyarımlı DF-MKH'lerle birlikte astım hastalarının $CD4^+$ T lenfosit proliferasyonu immünoterapi grubunun kök hücresiz aynı uyarımlı kültürlerindeki lenfosit proliferasyon oranına yaklaştırdı, aralarında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$). (Şekil 13)



Şekil 13. CD4^{+} T lenfosit proliferasyonu. A) DF-MKH'in astım, immünoterapi almış bireyler ve sağlıklı bireylerde lenfosit hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki baskılayıcı etkisi akım sitometri analizi ile gösterilmiştir. CFSE ile işaretlenen lenfositler histogramda sola doğru prolifere olan hücrelerin oranını göstermektedir.
B) Astım hastalarında CDmix ve Der p1 uyarımlı kök hücresiz kültürlerde lenfosit proliferasyonu immünoterapi almış bireylere ($p<0,005$) ve sağlıklı bireylere ($p<0,001$) göre istatistiksel anlamlı yüksektir. DF-MKH'ler CDmix ve Der p1 uyarımlı mononükleer hücre kültürlerinde CD4+ T lenfosit proliferasyon oranlarını immünoterapi almış bireylerin kök hücresiz kültürlerindeki CD4+ T lenfosit proliferasyon oranına göre istatistiksel anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). **P<0,05; **P<0,01; ***P<0,005; ****P<0,001*

6.4. DF-MKH astım hastalarında $CD4^+$ T lenfosit apoptozunu azalttı

DF-MKH' lerin T lenfosit apoptozu üzerine etkisini araştırmak amacıyla hastaların venöz kanından izole edilen mononükleer hücrelerle birlikte uyarımsız, T hücre uyarımı (CDmix; anti-CD3/anti-CD28), antijen spesifik uyarım (Der p1) veya IFN-γ uyarımı ile kültür edildi ve mononükleer hücrelerin içinde bulunan $CD4^+$ T lenfosit apoptozu üzerine etkisi incelendi. Bu amaçla mononükleer hücrelerinin DF-MKH varlığında ve yokluğunda 3 gün (72 saat) boyunca kültürleri yapıldı.

Astım hastalarında $CD4^+$ T lenfosit apoptozu CDmix ve Der p1 ile uyarılan (CDmix; 25,6±4.1, Der p1; 20,2±3,3) mononükleer hücrelerde immünoterapi grubuna (CDmix; 11,1±2.8, Der p1; 6,2±1.9) (CDmix; $p<0,01$ ve Der p1; $p<0,001$) ve sağlıklı bireylere göre (CDmix; 5,7±0,8, Der p1; 4,4±0,6) istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu gözlemlendi (CDmix; $p<0,001$ ve Der p1; $p<0,001$). Astım hastalarında IFN-γ uyarımlı mononükleer hücre kültürlerinde $CD4^+$ T lenfosit apoptozunun (19,2±2,8) immünoterapi almış bireylere göre (17,1±2,4) anlamlı fark olmadığı ($p>0,05$), ancak sağlıklı bireylere göre (9,4±1,7) istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu görüldü ($p<0,01$).

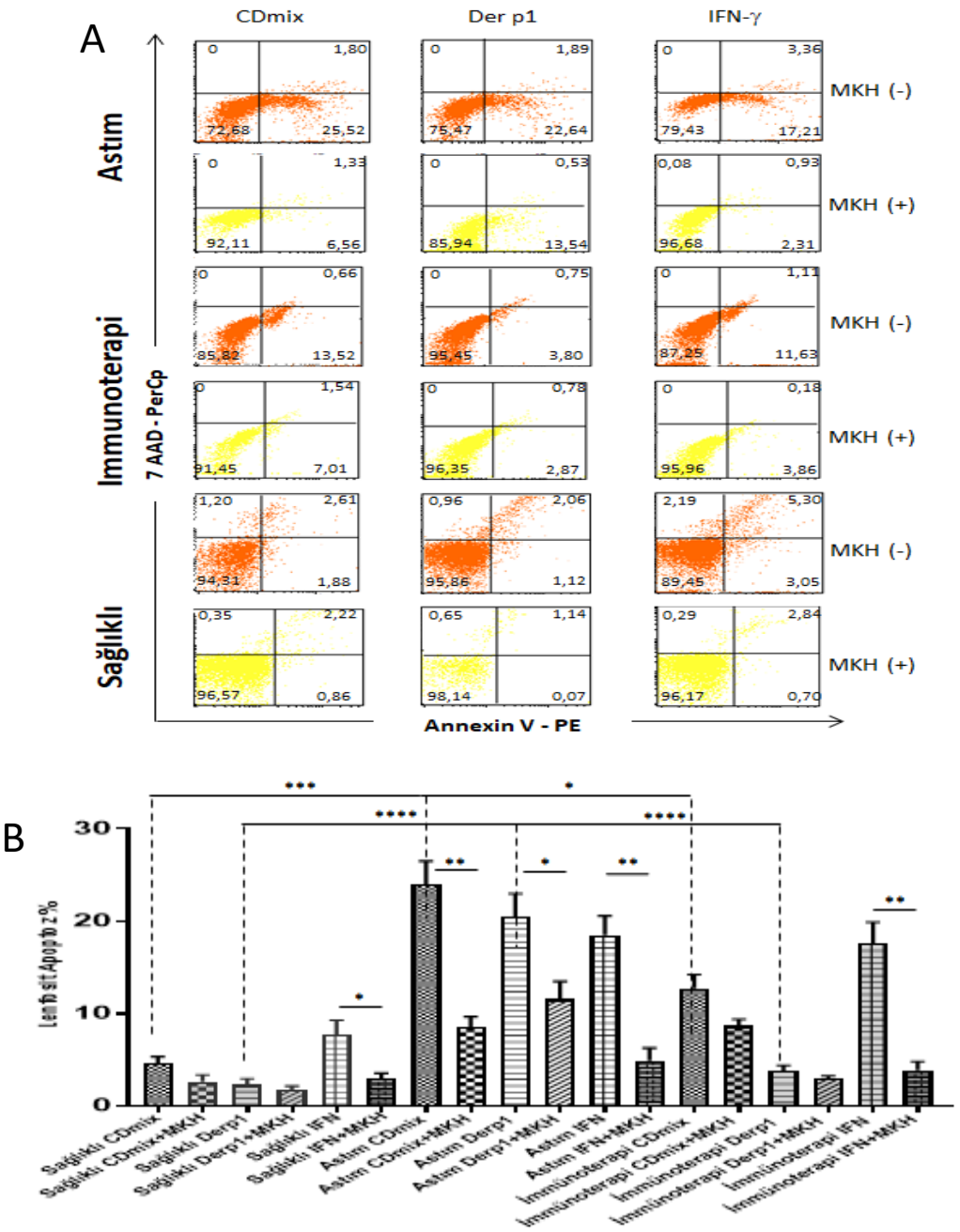
Astım hastalarının CDmix uyarımlı mononükleer hücreler ile DF-MKH birlikte kültürlerinde $CD4^+$ T lenfosit apoptozu (8,7±1,2) kök hücresiz kültürlere göre (25,6±4.1) istatistiksel anlamlı azaldı ($p<0,01$). Astım hastalarının Der p1 uyarımlı mononükleer hücreler ile DF-MKH birlikte kültürlerinde $CD4^+$ T lenfosit apoptozu (12,8±1,4) kök hücresiz kültürlere göre (20,2±3,3) istatistiksel anlamlı azaldı ($p<0,05$). Astım hastalarında IFN-γ uyarımlı mononükleer hücrelerin DF-MKH ile birlikte kültürlerinde $CD4^+$ T lenfosit apoptozu (3,3±0,4) aynı uyarımlı kök hücresiz kültürlere göre (19,2±2,8) anlamlı azaldı ($p<0,01$).

İmmünoterapi almış bireylerde Der p1 uyarımlı DF-MKH ile birlikte kültürlerde (4,5±1,4) mononükleer hücre kültürlerine göre $CD4^+$ T lenfosit apoptozunda (6,2±1.9) anlamlı bir değişiklik olmadı ($p>0,05$). İmmünoterapi almış bireylerde CDmix uyarımlı DF-MKH ile birlikte kültürlerde $CD4^+$ T lenfosit apoptozu (8,5±1,6)

mononükleer hücre kültürlerine göre (11,1±2.8) anlamlı fark görülmedi (p>0,05). İmmünoterapi almış bireylerde IFN-γ uyarımlı mononükleer hücrelerin DF-MKH ile birlikte kültürlerinde $CD4^+$ T lenfosit apoptozu (4,6±0,5) aynı uyarımlı kök hücresiz kültürlere göre (12,8±1,9) anlamlı azaldı (p<0,01).

Sağlıklı bireylerde CDmix uyarımlı DF-MKH ile birlikte kültürlerde $CD4^+$ T lenfosit apoptozu (3,6±0,4) mononükleer hücre kültürlerine göre (5,7±0,8) istatistiksel anlamlı fark görülmedi (p>0,05). Der p1 uyarımlı DF-MKH ile birlikte kültürlerde $CD4^+$ T lenfosit apoptozu (4,2±0,3) mononükleer hücre kültürlerine göre (4,4±0,6) istatistiksel anlamlı fark görülmedi (p>0,05). Sağlıklı bireylerde IFN-γ uyarımlı mononükleer hücrelerin DF-MKH ile birlikte kültürlerinde $CD4^+$ T lenfosit apoptozu (3,8±1,4) aynı uyarımlı kök hücresiz kültürlere göre (9,4±1,7) anlamlı azaldı (p<0,05).

Elde edilen sonuçlara göre CDmix uyarımı ve Der p1 uyarımı ile DF-MKH'ler astım hastalarının $CD4^+$ T lenfosit apoptoz oranını immünoterapi almış bireylerin ve sağlıklı bireylerin kök hücresiz CDmix uyarımlı ve Der p1 uyarımlı kültürlerine göre istatistiksel anlamlı fark olmayacak oranda yaklaştırdı (p>0,05). (Şekil 14)



Şekil 14. $CD4^+$ T lenfosit apoptozu. A) DF-MKH'in astım, immünoterapi almış bireyler ve sağlıklı bireylerde lenfosit hücrelerinin apoptozu ve canlılığı üzerindeki etkisi akım sitometri analizi ile gösterilmiştir. Annexin V/7AAD ile işaretlenen hücreler; Annexin $V^-/7AAD^-$ alan canlılık, Annexin $V^+/7AAD^-$ erken apoptoz, Annexin $V^+/7AAD^+$ geç apoptoz, Annexin $V^-/7AAD^-$ nekrozu göstermektedir.
B) Astım hastalarında CDmix ve Der p1 uyarımlı kök hücresiz kültürlerde lenfosit apoptozu immünoterapi almış bireylere ($p<0,05$) ve sağlıklı bireylere ($p<0,005$) göre istatistiksel anlamlı yüksektir. DF-MKH'ler CDmix ve Der p1 uyarımlı kök hücresiz kültürlerde $CD4^+$ T lenfosit apoptoz oranlarını immünoterapi almış bireylerin kök hücresiz kültürlerindeki $CD4^+$ T lenfosit apoptoz oranına göre istatistiksel anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). *$P<0,05$; **$P<0,01$; ***$P<0,005$; ****$P<0,001$*

6.5. DF-MKH astım hastalarında $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ regülatör T hücre oranını arttırdı

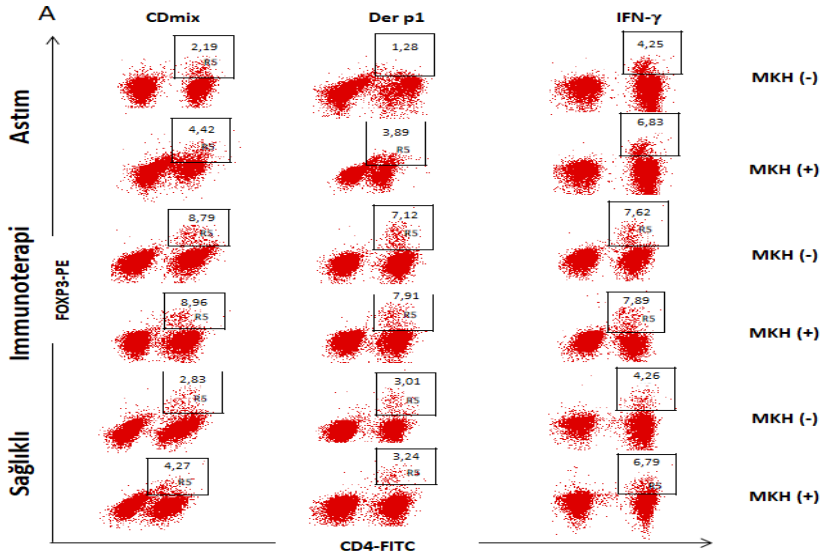
Bu çalışmada DF-MKH hücrelerinin $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücreleri üzerine etkisi araştırıldı. Astım hastalarında $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranları CDmix, Der p1 ve IFN-γ ile uyarılan mononükleer hücrelerde (CDmix; 2,2±0,3, Der p1; 1,3±0,4, IFN-γ; 3,9±0,4) immünoterapi grubuna (CDmix; 8,1±1.2, Der p1; 7,2±0.9, IFN-γ; 7,4±0,6) (CDmix; $p<0,001$, Der p1; $p<0,001$, IFN-γ; $p<0,001$) ve sağlıklı bireylerin CDmix (3,1±0,4) ve Der p1 (3,4±0,6) uyarımlı kültürlerine göre istatistiksel anlamlı düşük olduğu (CDmix; $p<0,05$, Der p1; $p<0,01$), sağlıklı bireylerin IFN-γ uyarımlı kültürlerine göre anlamlı fark olmadığı (4,0±0,3) görülmüştür (IFN-γ; $p>0,05$).

Astım hastalarının CDmix uyarımlı mononükleer hücreler ile DF-MKH birlikte kültürlerinde $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranları (4,6±0,3) kök hücresiz kültürlere göre (1,9±0,3) istatistiksel anlamlı arttı ($p<0,01$). Astım hastalarının Der p1 uyarımlı mononükleer hücreler ile DF-MKH birlikte kültürlerinde $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranları (4,0±0,4) kök hücresiz kültürlere göre (1,3±0,4) istatistiksel anlamlı arttı ($p<0,005$). Astım hastalarında IFN-γ uyarımlı mononükleer hücrelerin DF-MKH ile birlikte kültürlerinde $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranları (6,5±0,7) aynı uyarımlı kök hücresiz kültürlere göre (3,9±0,4) anlamlı arttı ($p<0,01$).

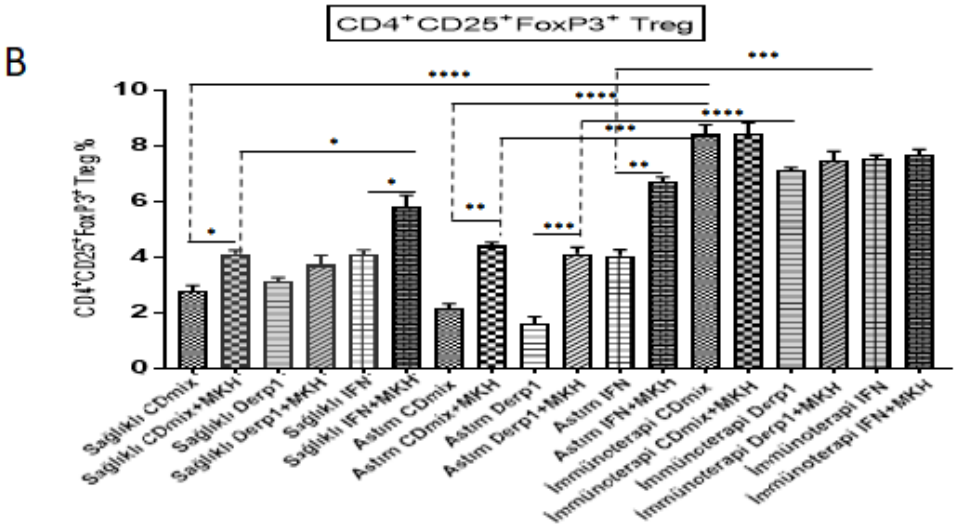
İmmünoterapi almış bireylerde Der p1 uyarımlı DF-MKH ile birlikte kültürlerde (6,9±0,4) mononükleer hücre kültürlerine göre $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranlarında (7,2±0.9) anlamlı bir değişiklik olmadı ($p>0,05$). İmmünoterapi almış bireylerde CDmix uyarımlı DF-MKH ile birlikte kültürlerde $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranlarında (8,5±0,6) mononükleer hücre kültürlerine göre (8,1±1.2) istatistiksel anlamlı fark görülmedi ($p>0,05$). İmmünoterapi almış bireylerde IFN-γ uyarımlı mononükleer hücrelerin DF-MKH ile birlikte kültürlerinde $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranlarında (7,2±0,7) aynı uyarımlı kök hücresiz kültürlere göre (7,4±0,6) anlamlı fark görülmedi ($p>0,05$).

Sağlıklı bireylerde CDmix uyarımlı DF-MKH ile birlikte kültürlerde $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranlarında (4,6±0,4) mononükleer hücre kültürlerine göre (3,1±0,4) istatistiksel anlamlı arttı ($p<0,05$). Der p1 uyarımlı DF-MKH ile birlikte kültürlerde $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranlarında (3,1±0,2) mononükleer hücre kültürlerine göre (3,4±0,6) istatistiksel anlamlı fark görülmedi ($p>0,05$). Sağlıklı bireylerde IFN-γ uyarımlı mononükleer hücrelerin DF-MKH ile birlikte kültürlerin $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranlarında (6,4±0,6) aynı uyarımlı kök hücresiz kültürlere göre (4,0±0,3) istatistiksel olarak anlamlı arttı ($p<0,05$).

Elde edilen sonuçlara göre CDmix uyarımı ve Der p1 uyarımı ile DF-MKH'ler astım hastalarının $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranlarını sağlıklı bireylerin kök hücresiz CDmix uyarımlı ve Der p1 uyarımlı kültürlerine göre istatistiksel anlamlı fark olmayacak oranda yaklaştırdı ($p>0,05$). DF-MKH'ler IFN-γ uyarımı ile mononükleer hücrelerin birlikte kültürlerinde $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranlarını immünoterapi almış bireylerin kök hücresiz kültürlerindeki T regülatör hücre oranlarına yaklaştırmıştır, aralarında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0,05$). (Şekil 15)



Şekil 15. $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranları.



Şekil 15 (Devam). $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranları. A) T regülatör hücrelerin akım sitometri analizi. CD25+ hücrelerin içinden kapılanan lenfositler seçilerek CD4+FoxP3+ hücreler analiz edilmiştir. B) İstatistiksel veriler astım hastalarının CDmix, Der p1 ve IFN-γ uyarımlı periferal kan mononükleer hücre kültürlerinde $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranlarının immünoterapi almış bireylere göre anlamlı düşük olduğu görülmektedir (CDmix; p<0,001, Der p1; p<0,001 ve IFN-γ; p<0,005). Astım hastalarının periferal kan mononükleer hücrelerinin DF-MKH ile birlikte kültürlerinde CDmix ve Der p1 uyarımlarında $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranları sağlıklı bireylerin aynı uyarımlı kök hücresiz kültürlerine göre anlamlı bir fark bulunmamaktadır (p>0,05). Astım hastalarının periferal kan mononükleer hücrelerinin IFN-γ uyarımlı DF-MKH ile birlikte kültürlerinin $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranlarında immünoterapi almış bireylerin aynı uyarımlı kök hücresiz kültürlerine göre anlamlı bir fark görülmemiştir (p>0,05). **P<0,05; **P<0,01; ***P<0,005; ****P<0,001*

6.6. DF-MKH astım hastalarının monosit ve dendritik hücrelerinde kostimülasyonu baskıladı

Bu çalışmada DF-MKH'lerin antijen sunucu hücreler olan monositler ($CD14^+$) ve dendritik hücrelerin ($CD11b^+$) kostimülasyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Astım hastalarında $CD14^+$ hücrelerde CD80, CD83 ve CD86 kostimülatör molekül ifadesi CDmix (CD80; 18,1±2,3, CD86; 16,6±2,7), Der p1 (CD80; 28,3±4,2, CD86; 21,6±2,2) ve IFN-γ (CD80; 26,1±3,2, CD86; 29,6±2,7) ile uyarılan kök hücresiz kültülerde, immünoterapi almış bireylere (CDmix: CD80; 11,2±1,3, CD86;

12,6±2,2, Der p1: CD80; 4,2±1,1, CD86; 1,0±0,2, IFN-γ: CD80; 11,2±1,1, CD86; 8,3±0,9) ve sağlıklı bireylere göre (CDmix: CD80; 6,1±0,5, CD86; 11,6±0,8, Der p1: CD80; 1,1±0,2, CD86; 3,0±0,7, IFN-γ: CD80; 3,2±0,4, CD86; 4,8±0,7) anlamlı derecede arttığı görülmüştür ($p<0,05$). Astım hastalarının kök hücresiz mononükleer hücre kültürlerinde CD83 ifadesinde CDmix (2,7±0,4), Der p1 (CD83; 1,6±0,3) ve IFN-γ (1,6±0,3) uyarımlı kültürlerde immünoterapi almış bireylere (CDmix; 1,2±0,3, Der p1; 1,4±0,3, IFN-γ; 1,0±0,2) ve sağlıklı bireylere göre (CDmix; 2,7±0,4, Der p1; 1,2±0,4, IFN-γ; 2,3±0,5) anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Astım hastalarında $CD11b^+$ hücrelerde CD80, CD83 ve CD86 kostimülatör molekül ifadesi CDmix (CD80; 27,1±3,6, CD83; 23,2±2,1, CD86; 22,6±2,7) ve Der p1 (CD80; 28,9±1,2, CD83; 23,4±2,6, CD86; 21,6±2,2) ile uyarılan kök hücresiz kültülerde, immünoterapi almış bireylere (CDmix: CD80; 6,2±1,3, CD83; 14,6±1,2, CD86; 13,7±1,4, Der p1: CD80; 3,6±0,4, CD83; 4,3±0,8, CD86; 3,7±0,6) ve sağlıklı bireylere göre (CDmix: CD80; 12,1±0,7, CD83; 11,2±0,5, CD86; 11,8±0,7, Der p1: CD80; 1,8±0,4, CD83; 2,6±0,6, CD86; 3,1±0,3) istatistiksel anlamlı arttığı görülmüştür ($p<0,05$).

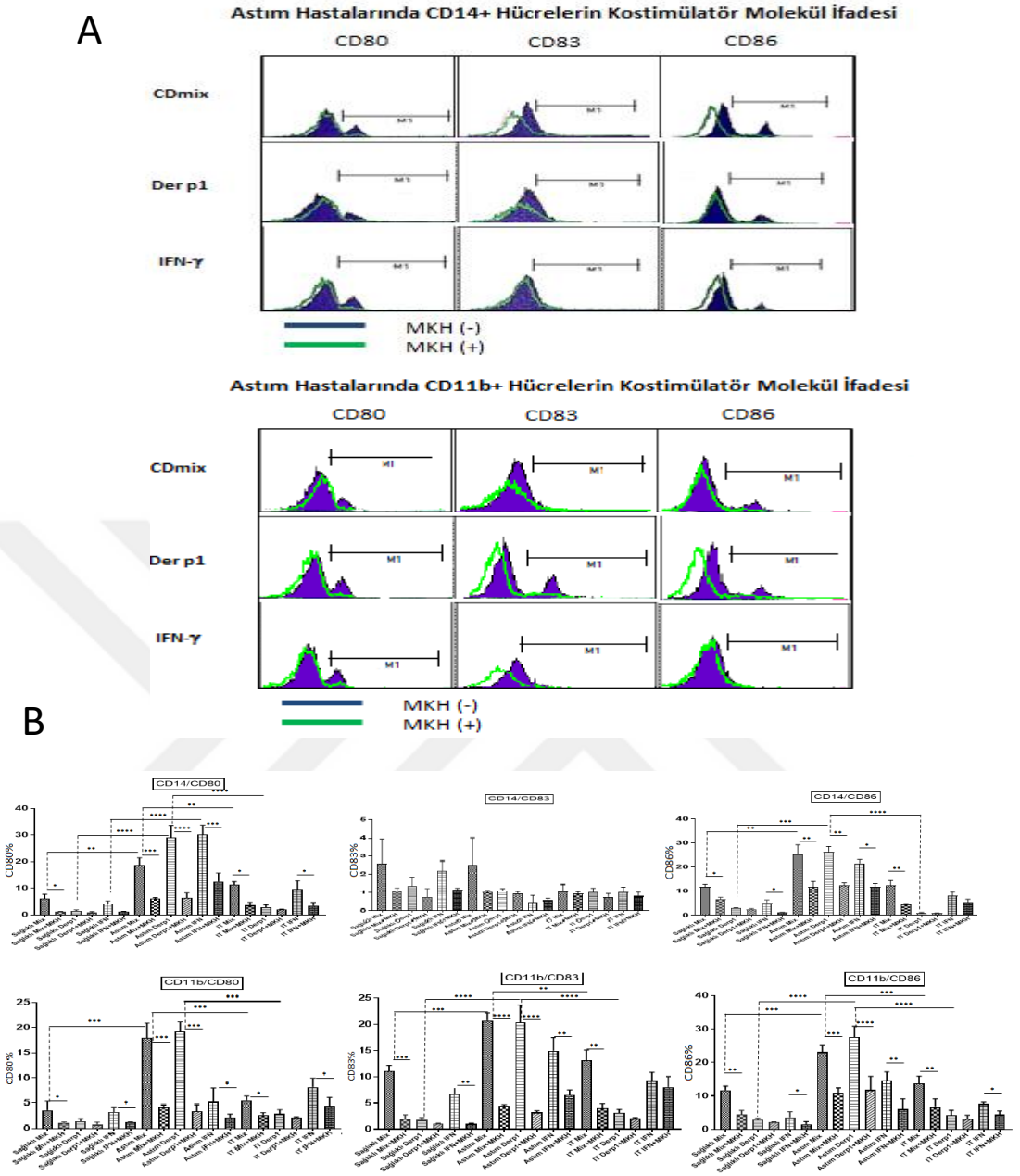
Astım hastalarının mononükleer hücreler ile DF-MKH birlikte kültürlerinde $CD14^+$ hücrelerde CD80 ve CD86 ifadesi oranları CDmix uyarımında (CD80; 7,3±0,5, CD86; 10,2±0,7), Der p1 uyarımında (CD80; 6,6±0,7, CD86; 9,8±0,6) ve IFN-γ uyarımında (CD80; 12,7±0,8, CD86; 10,9±0,5) kök hücresiz kültürlere göre istatistiksel anlamlı azaldı (CDmix; $p_{CD80}<0,005$ ve $p_{CD86}<0,01$, Der p1; $p_{CD80}<0,001$ ve $p_{CD86}<0,01$, IFN-γ; $p_{CD80}<0,005$ ve $p_{CD86}<0,05$). Astım hastalarının mononükleer hücreler ile DF-MKH birlikte kültürlerinde $CD14^+$ hücrelerde CD83 ifadesi oranlarında anlamlı bir değişiklik bulunmadı ($p>0,05$).

Astım hastalarının mononükleer hücreler ile DF-MKH birlikte kültürlerinde $CD11b^+$ hücrelerde CD80, CD83 ve CD86 ifadesi oranları CDmix uyarımında (CD80; 4,1±0,2, CD83; 4,8±0,3, CD86; 10,7±0,4), Der p1 uyarımında (CD80; 4,6±0,3, CD83; 3,3±0,7, CD86; 11,2±1,4) ve IFN-γ uyarımında (CD80; 3,6±0,2, CD83; 6,1±0,4, CD86; 5,9±0,3) kök hücresiz kültürlere göre istatistiksel anlamlı azaldı (CDmix;

p_{CD80}<0,005, p_{CD83}<0,001 ve p_{CD86}<0,005, Der p1; p_{CD80}<0,005, p_{CD83}<0,001 ve p_{CD86}<0,001, IFN-γ; p_{CD80}<0,05, p_{CD83}<0,01 ve p_{CD86}<0,01).

İmmünoterapi almış bireylerde Der p1 uyarımlı DF-MKH ile birlikte kültürlerde mononükleer hücre kültürlerine göre $CD14^+$ ve $CD11b^+$ hücrelerinin CD80, CD83 ve CD86 ifadesinde anlamlı bir fark görülmedi (p>0,05). İmmünoterapi almış bireylerde CDmix uyarımlı DF-MKH ile birlikte kültürlerde mononükleer hücre kültürlerine göre CD80 ifadesi (3,5±0,7) CD86 ifadesi (4,1±0,9) ve IFN-γ uyarımlı ko-kültürlerde CD80 ifadesi (3,8±0,4) kök hücresiz kültürlere göre istatistiksel anlamlı azaldı (sırasıyla; p<0,05, p<0,01 ve p<0,05). İmmünoterapialmış bireylerin mononükleer hücrelerle DF-MKH birlikte kültürlerde mononükleer hücre kültürlerine göre $CD11b^+$ hücrelerinde CD80 ifadesinde CDmix uyarımlı (3,1±0,3) ve IFN-γ uyarımlı (4,1±0,4) ko-kültürlerde, CD83 ifadesinde CDmix uyarımlı (4,6±0,5) ko-kültürlerde, CD86 ifadesinde CDmix uyarımlı (5,7±0,6) ve IFN-γ uyarımlı (3,4±0,4) ko-kültürlerde istatistiksel olarak anlamlı azaldığı gözlemlendi (CDmix; p_{CD80}<0,05, p_{CD83}<0,01, p_{CD86}<0,01, IFN-γ; p_{CD80}<0,05 ve p_{CD86}<0,05).

Sağlıklı bireylerde Der p1 uyarımlı DF-MKH ile birlikte kültürlerde mononükleer hücre kültürlerine göre $CD14^+$ ve $CD11b^+$ hücrelerinin CD80, CD83 ve CD86 ifadesinde anlamlı bir fark görülmedi (p>0,05). Sağlıklı bireylerde DF-MKH ile birlikte kültürlerde mononükleer hücre kültürlerine göre $CD14^+$ hücrelerinde CD83 ifadesinde anlamlı değişiklik gözlenmezken, CDmix uyarımlı ko-kültürlerde CD80 ifadesi (0,9±0,2) CD86 ifadesi (5,6±0,3) ve IFN-γ uyarımlı ko-kültürlerde CD86 ifadesi (4,8±0,3) kök hücresiz kültürlere göre istatistiksel anlamlı azaldı (sırasıyla; p<0,05, p<0,01 ve p<0,05). DF-MKH ile birlikte kültürlerde mononükleer hücre kültürlerine göre $CD11b^+$ hücrelerinde CD80 ifadesinde CDmix uyarımlı (1,4±0,1) ve IFN-γ uyarımlı (1,1±0,1) ko-kültürlerde, CD83 ifadesinde CDmix uyarımlı (3,6±0,3) ve IFN-γ uyarımlı (1,0±0,2) ko-kültürlerde, CD86 ifadesinde CDmix uyarımlı (4,0±0,3) ve IFN-γ uyarımlı (1,4±0,5) ko-kültürlerde istatistiksel olarak anlamlı azaldığı gözlemlendi (CDmix; p_{CD80}<0,05, p_{CD83}<0,005, p_{CD86}<0,01, IFN-γ; p_{CD80}<0,05, p_{CD83}<0,01, p_{CD86}<0,05). (Şekil 16)



Şekil 16. $CD14^+$ ve $CD11b^+$ hücrelerde kostimülasyon. A) DF-MKH varlığında ve yokluğunda mononükleer hücrelerden seçilen $CD14^+$ veya $CD11b^+$ hücrelerin CD80, CD83 ve CD86 ifadesinin akım sitometri cihazında histogram analizi. B) İstatistiksel verilere göre astım hastalarının $CD14^+$ hücrelerinde CD80 ve CD86 ifadesi ve $CD11b^+$ hücrelerde CD80, CD83 ve CD86 ifadesi CDmix, Der p1 ve IFN-γ uyarımlı kültürlerde immünoterapi ve sağlıklı bireylere göre anlamlı yüksektir ($p<0,05$). DF-MKH'ler astım hastalarının $CD14^+$ hücrelerinde CDmix uyarımıyla CD80 ve CD86 ifadesini ve immünoterapi almış bireylerin ve sağlıklı bireylerin kök hücresiz kültürlerine yaklaştırdığı ve $CD11b^+$ hücrelerinde CDmix ve Der p1 uyarımıyla CD80, CD83 ve CD86 ifadesinde immünoterapi almış bireylerin kök hücresiz kültürlerindeki oranlara yaklaştırdığı gösterilmiştir. *$P<0,05$; **$P<0,01$; ***$P<0,005$; ****$P<0,001$

6.7. DF-MKH astım hastalarının efektör, efektör bellek ve merkez bellek $CD4^+$ T lenfosit oranlarını azaltırken, naive $CD4^+$ T lenfosit oranlarını artırdı

Bu çalışmada, DF-MKH'lerin astım hastalarının $CD4^+$ T lenfositlerde naive, efektör ve bellek fenotiplerinin oranı üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Astım hastalarının naive $CD4^+$ T lenfosit oranları CDmix uyarımlı (35,3±4,6), Der p1 uyarımlı (22,8±3,2) mononükleer hücre kültürlerinde, immünoterapi almış bireylerin CDmix (40,7±2,3) ve Der p1 (53,4±3,1) uyarımlı kültürlerine ve sağlıklı bireylerin CDmix (53,1±2,7) ve Der p1 (43,8±2,3) uyarımlı kültürlerine göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuştur (A-IT: CDmix; $p<0,05$, Der p1; $p<0,05$, A-S: CDmix; $p<0,05$, Der p1; $p<0,01$). Astım hastalarının IFN-γ uyarımlı mononükleer hücre kültürlerinde naive $CD4^+$ T lenfosit oranları (39,2±3,7) ile immünoterapi grubu (37,4±2,7) ve sağlıklı grubunun naive $CD4^+$ T lenfosit oranları (35,9±2,8) arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). DF-MKH ile birlikte kültürlerde astım hastalarının $CD4^+$ T lenfosit oranları CDmix uyarımıyla (57,3±3,8), Der p1 uyarımıyla (61,7±2,5) ve IFN-γ uyarımıyla (59,6±2,1) istatistiksel olarak anlamlı arttı (CDmix; $p<0,01$, Der p1; $p<0,005$, IFN-γ; $p<0,01$). DF-MKH ile birlikte kültürlerde astım hastalarının naive $CD4^+$ T lenfosit oranları Der p1 uyarımında sağlıklı bireylerin kök hücresiz Der p1 uyarımlı naive $CD4^+$ T lenfosit oranlarına yaklaştırırken ($p>0,05$), immünoterapi almış bireylerin CDmix, Der p1 ve IFN-γ uyarımlı kök hücresiz naive $CD4^+$ T lenfosit oranlarından istatistiksel olarak anlamlı daha fazla artırdığı görülmüştür ($p<0,05$).

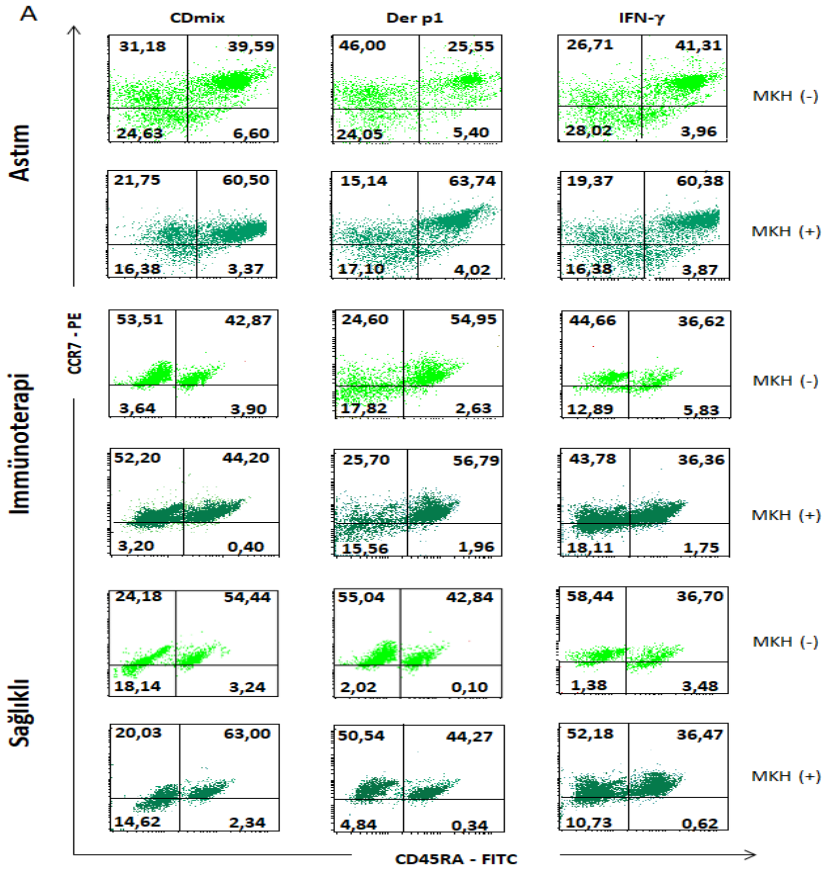
Astım hastalarının efektör $CD4^+$ T lenfosit oranları CDmix uyarımlı (5,7±0,4), Der p1 uyarımlı (4,2±0,5) mononükleer hücre kültürlerinde, immünoterapi almış bireylerin CDmix (3,2±0,3) ve Der p1 (2,4±0,4) uyarımlı kültürlerine ve sağlıklı bireylerin CDmix (3,1±0,4) ve Der p1 (0,8±0,3) uyarımlı kültürlerine göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur (A-IT: CDmix; $p<0,01$, Der p1; $p<0,05$, A-S: CDmix; $p<0,05$, Der p1; $p<0,005$). Astım hastalarının IFN-γ uyarımlı mononükleer

hücre kültürlerinde efektör $CD4^+$ T lenfosit oranları (3,6±0,4) ile immünoterapi grubunun efektör $CD4^+$ T lenfosit oranına göre (5,5±0,5) istatistiksel anlamlı düşük bulunmuştur (A-IT: IFN-γ; $p<0,05$). Astım hastalarının IFN-γ uyarımlı mononükleer hücre kültürlerinde efektör $CD4^+$ T lenfosit oranları ile sağlıklı grubunun efektör $CD4^+$ T lenfosit oranları (3,5±0,2) arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). DF-MKH ile birlikte kültürlerde astım hastalarının efektör $CD4^+$ T lenfosit oranları CDmix uyarımıyla (3,2±0,2) istatistiksel anlamlı azaltırken ($p<0,05$), Der p1 ve IFN-γ uyarımlı kokültürlerde kök hücresiz kültürlere göre efektör $CD4^+$ T lenfosit oranları azalma eğiliminde olup istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). DF-MKH'ler astım hastalarının efektör $CD4^+$ T lenfosit oranlarını CDmix uyarımında sağlıklı bireylerin ve immünoterapi almış bireylerin kök hücresiz CDmix uyarımlı efektör $CD4^+$ T lenfosit oranlarına yaklaştırdı, aralarında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$).

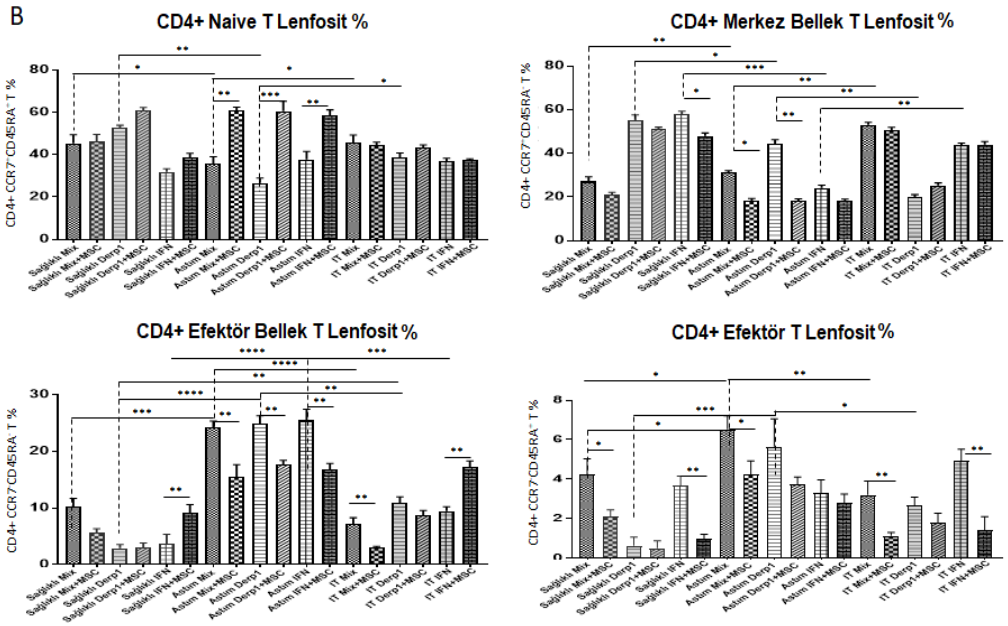
Astım hastalarının efektör bellek $CD4^+$ T lenfosit oranları CDmix uyarımlı (23,7±1,9), Der p1 uyarımlı (24,2±2,5) ve IFN-γ uyarımlı (27,1±3,4) mononükleer hücre kültürlerinde, immünoterapi almış bireylerin CDmix (3,5±0,3), Der p1 (16,4±1,7) ve IFN-γ uyarımlı (11,2±1,7) uyarımlı kültürlerine ve sağlıklı bireylerin CDmix (15,6±2,4), Der p1 (1,8±0,5) ve IFN-γ uyarımlı (1,2±0,3) uyarımlı kültürlerine göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur (A-IT: CDmix; $p<0,001$, Der p1; $p<0,01$, IFN-γ; $p<0,005$, A-S: CDmix; $p<0,005$, Der p1; $p<0,001$, IFN-γ; $p<0,001$). DF-MKH ile birlikte kültürlerde astım hastalarının efektör $CD4^+$ T lenfosit oranları CDmix uyarımıyla (3,2±0,2) istatistiksel anlamlı azaltırken ($p<0,05$), Der p1 ve IFN-γ uyarımlı kokültürlerde kök hücresiz kültürlere göre efektör $CD4^+$ T lenfosit oranları azalma eğiliminde olup istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Astım hastalarının merkez bellek $CD4^+$ T lenfosit oranları CDmix uyarımlı (29,7±1,9) ve IFN-γ uyarımlı (24,6±2,2) mononükleer hücre kültürleri immünoterapi almış bireylerin CDmix uyarımlı (51,8±3,9) ve IFN-γ uyarımlı (43,6±1,8) kültürlerine ve sağlıklı bireylerin IFN-γ uyarımlı (55,1±3,7) kültürlerine göre istatistiksel anlamlı

düşük bulunmuştur (A-IT: CDmix; p<0,01, IFN-γ; p<0,01, A-S: IFN-γ; p<0,005). Astım hastalarının merkez bellek $CD4^+$ T lenfosit oranları Der p1 uyarımlı (43,9±3,2) mononükleer hücre kültürleri immünoterapi almış bireylerin Der p1 uyarımlı (22,7±2,5) mononükleer hücre kültürlerine göre anlamlı yüksek (p<0,01) ve sağlıklı bireylerin Der p1 uyarımlı (51,8±4,1) kültürlerine göre anlamlı düşük bulunmuştur (p<0,05). DF-MKH ile birlikte kültürlerde astım hastalarının merkez bellek $CD4^+$ T lenfosit oranları CDmix uyarımıyla (18,6±3,2) ve Der p1 uyarımıyla (17,9±2,7) istatistiksel anlamlı azaltırken (CDmix; p<0,05 ve Der p1; p<0,01), IFN-γ uyarımlı kokültürlerde (19,4±2,8) kök hücresiz kültürlere göre efektör $CD4^+$ T lenfosit oranları azalma eğiliminde olup istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0,05). DF-MKH'ler astım hastalarının merkez bellek $CD4^+$ T lenfosit oranlarını Der p1 uyarımında immünoterapi almış bireylerin kök hücresiz Der p1 uyarımlı merkez bellek $CD4^+$ T lenfosit oranlarına yaklaştırdı, aralarında anlamlı bir fark bulunmadı (p>0,05). (Şekil 17)



Şekil 17. Naive, efektör, efektör bellek ve merkez bellek $CD4^+$ T lenfosit oranları.



Şekil 17. (Devam). Naive, efektör, efektör bellek ve merkez bellek $CD4^+$ T lenfosit oranları A) DF-MKH varlığında ve yokluğunda mononükleer hücrelerden seçilen $CD3^+CD4^+$ lenfositlerden seçilen hücrelerin CCR7 ve CD45RA akım sitometri analizi gösterilmiştir. $CCR7^+CD45RA^+$ alanda Naive, $CCR7^-CD45RA^+$ alanda efektör, $CCR7^-CD45RA^-$ alanda efektör bellek, $CCR7^+CD45RA^-$ alanda merkez bellek hücreler gösterilmiştir. B) İstatistiksel verilere göre astım hastalarının CDmix ve Der p1 uyarımlı mononükleer hücre kültürlerinde naive $CD4^+$ T lenfosit oranları immünoterapi almış bireylere göre istatistiksel anlamlı düşüktür ($p<0,05$). CDmix ve Der p1 uyarımlı mononükleer hücre kültürlerinde efektör ve efektör bellek $CD4^+$ T lenfosit oranları astım hastalarında immünoterapi almış bireylere göre istatistiksel anlamlı yüksektir ($p<0,05$). DF-MKH'ler astım hastalarının efektör ve efektör bellek $CD4^+$ T lenfosit oranlarını anlamlı azaltırken, naive $CD4^+$ T lenfosit oranlarını istatistiksel olarak anlamlı artırmıştır ($p<0,05$). **P<0,05; **P<0,01; ***P<0,005; ****P<0,001*

6.8. DF-MKH astım hastalarında IL-4 düzeylerini azalttı, IFN-γ ve IL-10 düzeylerini artırdı

Astım hastalığında inflamatuar yanıtlar esnasında Th2 hücreler tarafından salgılanan IL-4, IL-5 ve IL-13 sitokinleri astım patofizyolojisinde önemli rol oynar (Barnes, 2001). Allerjen spesifik immünoterapide T regülatör ve Th1 (T yardımcı hücre 1) fenotiplerini ön plana çıkarılarak IL-10 ve IFN-γ sekresyonunu arttırılması, böylece Th2 yönünde polarize olmuş inflamatuar yanıtların baskılanması amaçlanır (Akdis CA ve Akdis M, 2011). Bu çalışmada, DF-MKH'lerin astım hastalarında

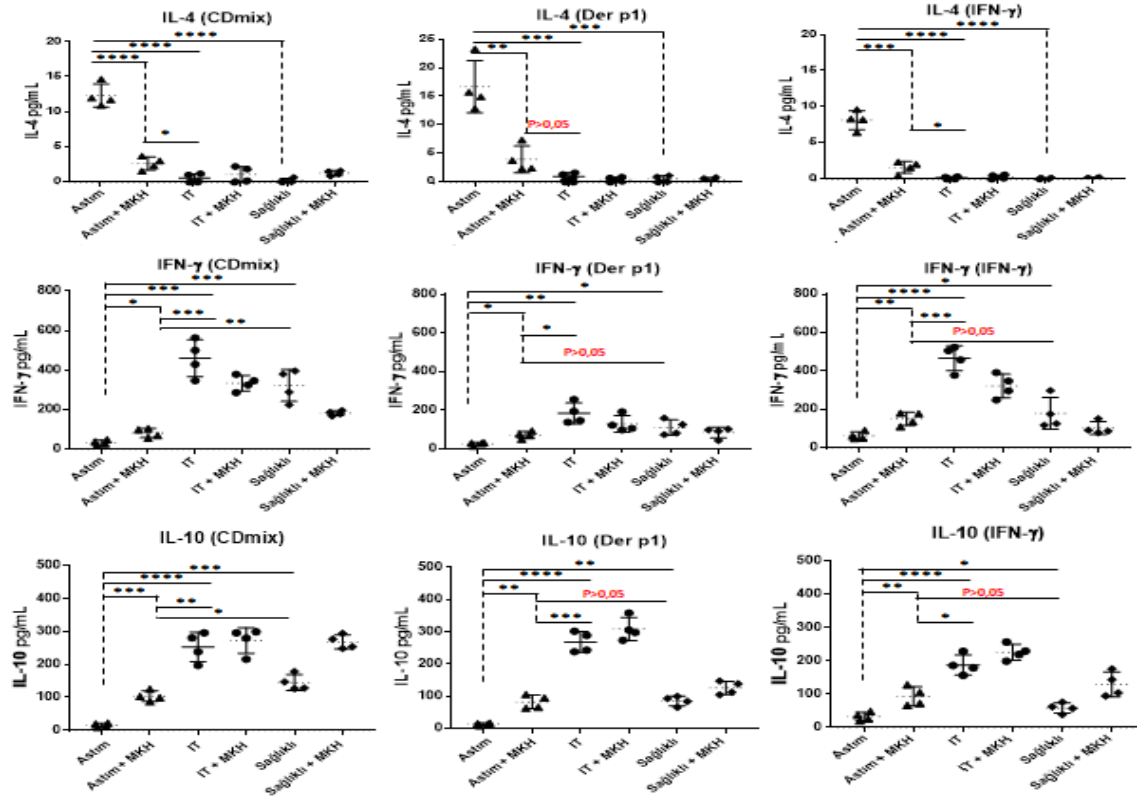
periferal kandan izole edilen mononükleer hücrelerin içinde Th1 ve Th2 farklılaşmasındaki etkisini ve immün düzenlemedeki etkisini araştırmak amacıyla IL-4, IL-10 ve IFN-γ sitokin miktarları incelendi. Sitokin miktarları 72 saat kültür süresinin sonunda toplanan kültür süpernatantlarından akım sitometri cihazı ile analiz edildi.

Astım hastalarının mononükleer hücre kültür süpernatantlarında IL-4 miktarı (pg/mL) CDmix uyarımı (14,1±2,2), Der p1 uyarımı (17,9±3,4) ve IFN-γ uyarımı (8,2±2,3) ile immünoterapi almış bireylerin CDmix uyarımı (0,9±0,2), Der p1 uyarımı (1,1±0,3) ve IFN-γ uyarımı (0,7±0,2) ve sağlıklı bireylerin CDmix uyarımı (0,6±0,2), Der p1 uyarımı (0,4±0,1) ve IFN-γ uyarımına (0,3±0,1) göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu (A-IT: CDmix; $p<0,001$, Der p1; $p<0,005$, IFN-γ; $p<0,001$, A-S: CDmix; $p<0,001$, Der p1; $p<0,005$, IFN-γ; $p<0,001$). Astım hastalarının mononükleer hücreleri ile DF-MKH birlikte kültürlerinde süpernatant sitokin miktarı CDmix uyarımında (3,6±0,8), Der p1 uyarımında (4,9±1,8) ve IFN-γ uyarımında (1,6±0,5) kök hücresiz kültürlere göre istatistiksel anlamlı azaldı (CDmix; $p<0,001$, Der p1; $p<0,01$, IFN-γ; $p<0,005$). Astım hastalarının Der p1 uyarımlı ko-kültürlerindeki IL-4 miktarı immünoterapi almış hastaların Der p1 uyarımlı kök hücresiz mononükleer hücre kültürlerindeki IL-4 miktarına yaklaştırdı, aralarında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$).

Astım hastalarının mononükleer hücre kültür süpernatantlarında IFN-γ miktarı (pg/mL) CDmix uyarımı (48,3±9,8), Der p1 uyarımı (27,9±6,1) ve IFN-γ uyarımı (62,2±7,6) ile immünoterapi almış bireylerin CDmix uyarımı (389,9±21,3), Der p1 uyarımı (196,8±11,6) ve IFN-γ uyarımı (417,6±16,4) ve sağlıklı bireylerin CDmix uyarımı (285,6±24,3), Der p1 uyarımı (138,4±11,2) ve IFN-γ uyarımına (181,7±23,9) göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu (A-IT: CDmix; $p<0,005$, Der p1; $p<0,01$, IFN-γ; $p<0,001$, A-S: CDmix; $p<0,005$, Der p1; $p<0,05$, IFN-γ; $p<0,05$). Astım hastalarının mononükleer hücreleri ile DF-MKH birlikte kültürlerinde IFN-γ miktarı CDmix uyarımında (96,4±10,3), Der p1 uyarımında (78,3±6,9) ve IFN-γ uyarımında (162,5±15,1) kök hücresiz kültürlere göre istatistiksel anlamlı arttı

(CDmix; p<0,05, Der p1; p<0,05, IFN-γ; p<0,01). Astım hastalarının Der p1 ve IFN-γ uyarımlı ko-kültürlerindeki IFN-γ miktarı sağlıklı bireylerin Der p1 ve IFN-γ uyarımlı kök hücresiz mononükleer hücre kültürlerindeki IFN-γ miktarına yaklaştırdı, aralarında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmadı (p>0,05).

Astım hastalarının mononükleer hücre kültür süpernatantlarında IL-10 miktarı (pg/mL) CDmix uyarımı (17,9±4,8), Der p1 uyarımı (12,6±3,1) ve IFN-γ uyarımı (32,5±5,1) ile immünoterapi almış bireylerin CDmix uyarımı (249,7±51,2), Der p1 uyarımı (286,4±19,5) ve IFN-γ uyarımı (187,2±16,1) ve sağlıklı bireylerin CDmix uyarımı (145,6±12,3), Der p1 uyarımı (96,3±10,7) ve IFN-γ uyarımına (76,7±11,2) göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu (A-IT: CDmix; p<0,001, Der p1; p<0,001, IFN-γ; p<0,001, A-S: CDmix; p<0,005, Der p1; p<0,01, IFN-γ; p<0,05). Astım hastalarının mononükleer hücreleri ile DF-MKH birlikte kültürlerinde IL-10 miktarı CDmix uyarımında (106,4±12,6), Der p1 uyarımında (81,2±14,7) ve IFN-γ uyarımında (97,4±12,7) kök hücresiz kültürlere göre istatistiksel anlamlı arttı (CDmix; p<0,005, Der p1; p<0,01, IFN-γ; p<0,01). Astım hastalarının Der p1 ve IFN-γ uyarımlı ko-kültürlerindeki IL-10 miktarı sağlıklı bireylerin Der p1 ve IFN-γ uyarımlı kök hücresiz mononükleer hücre kültürlerindeki IL-10 miktarına yaklaştırdı, aralarında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmadı (p>0,05). (Şekil 18)



Şekil 18. Kültür süpernatantlarında sitokin miktarı. Astım hastalarının periferal kan mononükleer hücre kültürlerinde IL-4 miktarı (pg/mL) CDmix, Der p1 ve IFN-γ uyarımında immünoterapi almış bireylere ve sağlıklı bireylere göre istatistiksel anlamlı yüksek bulundu (A-IT: CDmix; p<0,001, Der p1; p<0,005, IFN-γ; p<0,001, A-S: CDmix; p<0,001, Der p1; p<0,005, IFN-γ; p<0,001). DF-MKH birlikte kültürlerde astım hastalarının mononükleer hücrelerinden salgılanan IL-4 miktarı istatistiksel olarak anlamlı arttı (CDmix; p<0,001, Der p1; p<0,01, IFN-γ; p<0,005), immünoterapi almış bireylerin Der p1 uyarımlı kök hücresiz kültürleriyle arasında anlamlı bir fark bulunmadı (p>0,05). Astım hastalarının kök hücresiz kültürlerde IFN-γ miktarı (pg/mL) CDmix, Der p1 ve IFN-γ uyarımında immünoterapi almış bireylere ve sağlıklı bireylere göre istatistiksel anlamlı düşük bulundu (A-IT: CDmix; p<0,005, Der p1; p<0,01, IFN-γ; p<0,001, A-S: CDmix; p<0,005, Der p1; p<0,05, IFN-γ; p<0,05). DF-MKH astım hastalarının mononükleer hücre kültürlerinde IFN-γ miktarını kök hücresiz kültürlere göre istatistiksel anlamlı arttı (CDmix; p<0,05, Der p1; p<0,05, IFN-γ; p<0,01). Astım hastalarının Der p1 ve IFN-γ uyarımlı ko-kültürlerindeki IFN-γ miktarı sağlıklı bireylerin Der p1 ve IFN-γ uyarımlı kök hücresiz mononükleer hücre kültürlerindeki IFN-γ miktarına yaklaştırdı, aralarında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmadı (p>0,05). Astım hastalarının IL-10 miktarı immünoterapi almış bireylere ve sağlıklı bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu (A-IT: CDmix; p<0,001, Der p1; p<0,001, IFN-γ; p<0,001, A-S: CDmix; p<0,005, Der p1; p<0,01, IFN-γ; p<0,05). DF-MKH'ler astım hastalarının IL-10 miktarını kök hücresiz kültürlere göre istatistiksel anlamlı arttı (CDmix; p<0,005, Der p1; p<0,01, IFN-γ; p<0,01), sağlıklı bireylerin Der p1 ve IFN-γ uyarımlı kök hücresiz mononükleer hücre kültürlerindeki IL-10 miktarına yaklaştırdı, aralarında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmadı (p>0,05). **P<0,05; **P<0,01; ***P<0,005; ****P<0,001*

6.9. DF-MKH astım hastalarında GATA-3 ekspresyonunu azalttı, Tbet ve FoxP3 ekspresyonunu artırdı

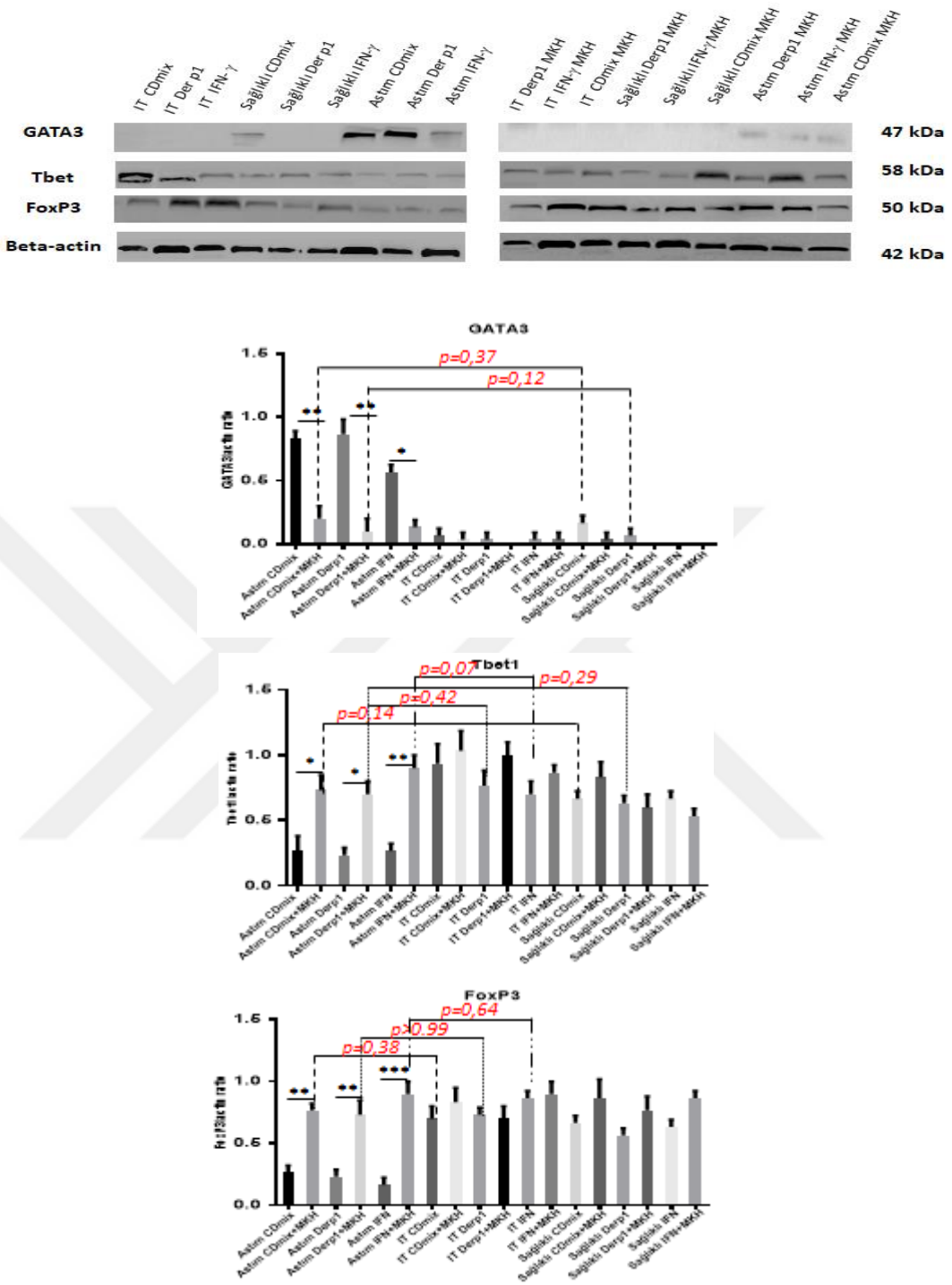
Çalışmamızda, DF-MKH'lerin astım hastalığında Th1 ve Th2 farklılaşmasındaki etkisini ve immün düzenlemedeki etkisini araştırmak amacıyla GATA-3, Tbet ve FoxP3 transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu incelendi. Transkripsiyon faktörleri için protein izolasyonu 72 saat kültür süresinin sonunda kültürdeki mononükleer hücrelerden yapıldı. Protein hatları β-aktin'e normalize edilerek analiz edildi.

Astım hastalarının mononükleer hücre kültürlerinde GATA-3 ekspresyonu CDmix uyarımı (0,82±0,09), Der p1 uyarımı (0,94±0,11) ve IFN-γ uyarımı (0,71±0,08) ile immünoterapi almış bireylerin CDmix uyarımı (0,16±0,12), Der p1 uyarımı (0,10±0,07) ve IFN-γ uyarımı (0,9±0,06) ve sağlıklı bireylerin CDmix uyarımı (0,23±0,09), Der p1 uyarımı (0,17±0,07) ve IFN-γ uyarımına (0,0±0,0) göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu (A-IT: CDmix; $p<0,005$, Der p1; $p<0,001$, IFN-γ; $p<0,01$, A-S: CDmix; $p<0,005$, Der p1; $p<0,001$, IFN-γ; $p<0,01$). Astım hastalarının mononükleer hücreleri ile DF-MKH birlikte kültürlerinde GATA-3 ekspresyonu CDmix uyarımında (0,29±0,08), Der p1 uyarımında (0,17±0,04) ve IFN-γ uyarımında (0,21±0,03) kök hücresiz kültürlere göre istatistiksel anlamlı azaldı (CDmix; $p<0,01$, Der p1; $p<0,01$, IFN-γ; $p<0,05$). DF-MKH ile astım hastalarının CDmix ve Der p1 uyarımlı mononükleer hücre ko-kültürlerindeki GATA-3 ekspresyonu ile sağlıklı bireylerin CDmix ve Der p1 uyarımlı kök hücresiz mononükleer hücre kültürlerindeki GATA-3 ekspresyonu düzeyine yaklaştırdı, aralarında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$).

Astım hastalarının mononükleer hücre kültürlerinde Tbet ekspresyonu CDmix uyarımı (0,47±0,8), Der p1 uyarımı (0,39±0,06) ve IFN-γ uyarımı (0,41±0,06) ile immünoterapi almış bireylerin CDmix uyarımı (0,96±0,12), Der p1 uyarımı (0,78±0,09) ve IFN-γ uyarımı (0,66±0,07) ve sağlıklı bireylerin CDmix uyarımı (0,63±0,05), Der p1 uyarımı (0,60±0,06) ve IFN-γ uyarımına (0,67±0,07) göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu (A-IT: CDmix; $p<0,01$, Der p1; $p<0,01$, IFN-γ; $p<0,05$, A-S: CDmix; $p<0,05$, Der p1; $p<0,05$, IFN-γ; $p<0,05$). Astım

hastalarının mononükleer hücreleri ile DF-MKH birlikte kültürlerinde Tbet ekspresyonu CDmix uyarımında (0,74±0,10), Der p1 uyarımında (0,70±0,09) ve IFN-γ uyarımında (0,91±0,08) kök hücresiz kültürlere göre istatistiksel anlamlı arttı (CDmix; $p<0,05$, Der p1; $p<0,05$, IFN-γ; $p<0,01$). DF-MKH astım hastalarının Der p1 ve IFN-γ uyarımlı mononükleer hücre ko-kültürlerindeki Tbet ekspresyonu ile immünoterapi almış bireylerin Der p1 ve IFN-γ uyarımlı ve sağlıklı bireylerin CDmix ve Der p1 uyarımlı kök hücresiz mononükleer hücre kültürlerindeki Tbet ekspresyonu düzeyine yaklaştırdı, aralarında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$), astım hastalarının DF-MKH ile birlikte IFN-γ uyarımlı ko-kültürlerinde ise sağlıklı bireylerin IFN-γ uyarımlı kök hücresiz kültürlerine göre Tbet ekspresyonu istatistiksel anlamlı daha fazla arttı ($p<0,05$).

Astım hastalarının mononükleer hücre kültürlerinde FoxP3 ekspresyonu CDmix uyarımı (0,36±0,07), Der p1 uyarımı (0,32±0,06) ve IFN-γ uyarımı (0,21±0,06) ile immünoterapi almış bireylerin CDmix uyarımı (0,93±0,10), Der p1 uyarımı (0,74±0,06) ve IFN-γ uyarımı (0,86±0,04) ve sağlıklı bireylerin CDmix uyarımı (0,62±0,05), Der p1 uyarımı (0,57±0,04) ve IFN-γ uyarımına (0,66±0,05) göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu (A-IT: CDmix; $p<0,01$, Der p1; $p<0,01$, IFN-γ; $p<0,005$, A-S: CDmix; $p<0,01$, Der p1; $p<0,05$, IFN-γ; $p<0,01$). Astım hastalarının mononükleer hücreleri ile DF-MKH birlikte kültürlerinde FoxP3 ekspresyonu CDmix uyarımında (0,77±0,05), Der p1 uyarımında (0,71±0,09) ve IFN-γ uyarımında (0,89±0,07) kök hücresiz kültürlere göre istatistiksel anlamlı arttı (CDmix; $p<0,01$, Der p1; $p<0,01$, IFN-γ; $p<0,005$). DF-MKH astım hastalarının CDmix, Der p1 ve IFN-γ uyarımlı mononükleer hücre ko-kültürlerindeki FoxP3 ekspresyonu ile immünoterapi almış bireylerin CDmix, Der p1 ve IFN-γ uyarımlı ve sağlıklı bireylerin CDmix uyarımlı kök hücresiz mononükleer hücre kültürlerindeki FoxP3 ekspresyonu düzeyine yaklaştırdı, aralarında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$), astım hastalarının DF-MKH ile birlikte Der p1 ve IFN-γ uyarımlı ko-kültürlerinde ise sağlıklı bireylerin Der p1 ve IFN-γ uyarımlı kök hücresiz kültürlerine göre FoxP3 ekspresyonu istatistiksel anlamlı daha fazla arttı ($p<0,05$). (Şekil 19)



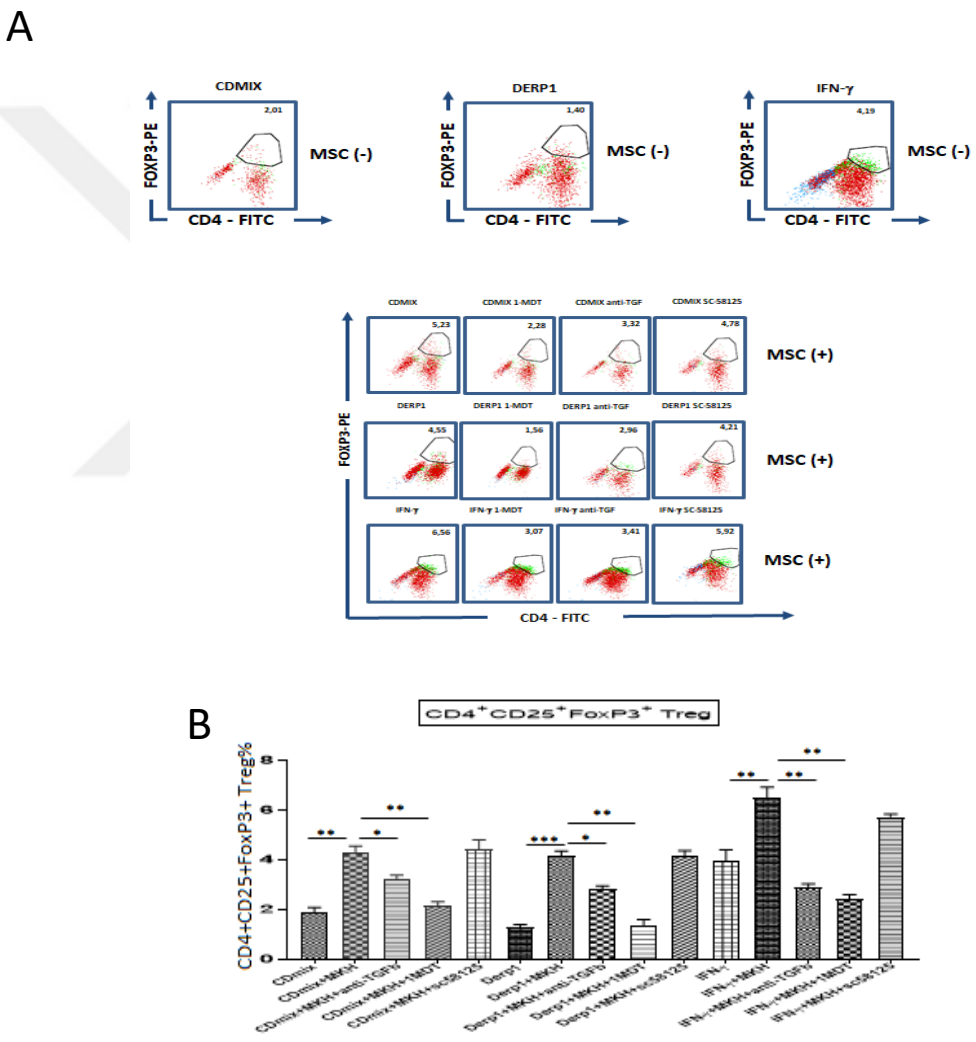
Şekil 19. GATA-3, Tbet ve FoxP3 ekspresyonu. Astım hastalarının mononükleer hücre kültürlerinde GATA-3 ekspresyonu immünoterapi almış bireylere ve sağlıklı bireylere göre yüksek, Tbet ve FoxP3 ekspresyonu düşüktür. DF-MKH'ler astım hastalarının mononükleer hücrelerle birlikte kültürlerinde GATA-3 ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı düşürdü (CDmix; p<0,01, Der p1; p<0,01, IFN-γ; p<0,05), Tbet ve FoxP3 ekspresyonunu anlamlı artırdı (Tbet: CDmix; p<0,05, Der p1; p<0,05, IFN-γ; p<0,01, FoxP3: CDmix; p<0,01, Der p1; p<0,01, IFN-γ; p<0,005). **P<0,05; **P<0,01; ***P<0,005; ****P<0,001*

6.10. DF-MKH astım hastalarının immün yanıtlarını TGF-β ve IDO ile baskıladı

Bu çalışmada, DF-MKH'lerin immün düzenleyici mediatörlerini belirlemek için kültür besiyerine anti-TGF-β eklenerek çözünmüş TGF-β nötralize edildi, 1-metil-D-triptofan (1-MDT) eklenerek IDO yolağı bloke edildi ve sc-58125 eklenerek PGE2 yolağı bloke edildi. 72 saat kültür süresinin sonunda mononükleer hücreler içindeki $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranları akım sitometri cihazında analiz edilerek T regülatör hücre indüksiyonu değerlendirildi.

Astım hastalarının periferal kan mononükleer hücreleri ile DF-MKH birlikte CDmix uyarımlı kültürlerinde $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranları (4,7±0,5) kök hücresiz mononükleer hücre kültürlerindeki $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranlarına göre (1,9±0,3) istatistiksel anlamlı arttı ($p<0,01$). Der p1 uyarımlı mononükleer hücreleri ile DF-MKH birlikte kültürlerinde $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranları (4,2±0,4) kök hücresiz mononükleer hücre kültürlerindeki $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranlarına göre (1,2±0,2) istatistiksel anlamlı arttı ($p<0,005$). IFN-γ uyarımlı mononükleer hücreleri ile DF-MKH birlikte kültürlerinde $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranları (6,3±0,5) kök hücresiz mononükleer hücre kültürlerindeki $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranlarına göre (3,8±0,6) istatistiksel anlamlı arttı ($p<0,01$). DF-MKH'lerin mononükleer hücrelerle birlikte kültürlerinde CDmix uyarımlı anti-TGF-β ile nötralizasyonu sonucunda $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranları (3,0±0,2) ve 1-MDT ile bloke edilmesi sonucunda (2,1±0,3) CDmix uyarımlı kokültürlere göre (4,7±0,5) istatistiksel olarak anlamlı azaldı (CDmix: anti-TGF-β; $p<0,05$, 1-MDT; $p<0,01$), sc-58125 ile bloke edilmesi sonucunda (4,5±0,4) CDmix uyarımlı kokültürlere göre (4,7±0,5) anlamlı bir fark bulunmadı (CDmix: sc-58125; $p>0,05$). DF-MKH'lerin mononükleer hücrelerle birlikte kültürlerinde Der p1 uyarımlı anti-TGF-β ile nötralizasyonu sonucunda $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranları (2,8±0,2) ve 1-MDT ile bloke edilmesi sonucunda (1,7±0,3) Der p1 uyarımlı kokültürlere göre (4,2±0,4) istatistiksel olarak anlamlı azaldı (Der p1: anti-TGF-β; $p<0,01$, 1-MDT; $p<0,005$), sc-58125 ile bloke edilmesi sonucunda (4,0±0,3) Der p1 uyarımlı kokültürlere göre (4,2±0,4) anlamlı bir fark bulunmadı (Der p1: sc-58125; $p>0,05$). DF-MKH'lerin mononükleer hücrelerle birlikte kültürlerinde IFN-γ uyarımlı

anti-TGF-β ile nötralizasyonu sonucunda $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranları (3,2±0,4) ve 1-MDT ile bloke edilmesi sonucunda (2,9±0,2) IFN-γ uyarımlı kokültürlere göre (6,3±0,5) istatistiksel olarak anlamlı azaldı (IFN-γ: anti-TGF-β; p<0,01, 1-MDT; p<0,01), sc-58125 ile bloke edilmesi sonucunda (5,9±0,4) IFN-γ uyarımlı kokültürlere göre (6,3±0,5) anlamlı bir fark bulunmadı (IFN-γ: sc-58125; p>0,05). (Şekil 20)



Şekil 20. DF-MKH'lerin TGF-β nötralizasyonu ve IDO, PGE2 blokajı ile $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranları. A) $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranlarının akım sitometri analizi. B) İstatistik analizlerine göre; astım hastalarının DF-MKH ve mononükleer hücre birlikte kültürlerinde TGF-β nötralizasyonu ve IDO blokajı sonucunda $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranları kokültürlere göre anlamlı azaldı.**P<0,05; **P<0,01; ***P<0,005; ****P<0,001*

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada DF-MKH'lerin ev tozu akarına duyarlı astım hastalığında Th1/Th2 farklılaşması ve mononükleer hücreler üzerindeki immün düzenleyici etkisi araştırılmıştır.

Astım hastalarından elde edilen peripheral kan mononükleer hücreler DF-MKH varlığında ve yokluğunda CDmix, Der p1 veya IFN-γ uyarımlı kültür koşullarında 72 saat süreyle inkübe edilip analizleri yapılmıştır. İmmünoterapi astım hastalığının tedavisinde günümüzde uygulanan etkili bir yöntemdir. Bu tedavi yöntemi ev tozu akarına duyarlı astım hastalarına subkutan veya sunlingual yolla Der p1 antijeninin düzenli aralıklarla verildiği uzun süren bir tedavi seçeneğidir. Çalışmamızda otuz aylık immünoterapi süresi tamamlanmış astım hastalarının dahil edilmesinde amaç; önermekte olduğumuz DF-MKH'lerin immünomodulatuar etkinliğinin günümüzde uygulanan etkili bir tedavi yönteminin sonuçlarıyla karşılaştırmalı olarak belirlemektir. Aynı zamanda çalışmaya sağlıklı bireyler de eklenerek, elde ettiğimiz sonuçlar hem tedavi hem de astım hastalarının sonuçlarıyla birlikte değerlendirilmiştir.

Astım, bronşiyal havayollarının duyarlanmasını ve pulmoner havayollarının inflamasyonunu içeren kronik inflamatuar bir hastalıktır (Fireman, 2003). Astımda, Th2 hücreler baskın olup inflamasyonu yönlendiren hücrelerdir ve alerjene karşı Tip 1 aşırı duyarlılık reaksiyonu görülür (Ishmael, 2011). Antijen sunan hücrelerden naive T hücreye antijen sunumu esnasında ortamdaki IL-4 sitokinin etkisiyle naive T hücre Th2 hücreye farklılaşır (Zhu ve ark, 2010). Th2 hücreler arttıkça IL-4 sekresyonuyla inflamatuar yanıtlar esnasında B lenfositler IgE sentezler ve dokuda mast hücre aktivasyonu artar (Larche ve ark., 2003). Astımla ilişkili çok sayıda mediatör ve immün sistem hücreleri dahil olur; T lenfositler, B lenfositler, dendritik hücreler, mast hücreleri, eozinofiller ve bu hücrelerden sekrete edilen sitokinler (IL4, IL5 ve IL13), histamin ve nitrik oksit gibi çözünmüş moleküller bronş mukozasında harabiyete yol açar (Chung, 2000). Akciğer hava yolları hücrelerinin hasarlanması; yeniden modellenmeye, düz kas kitlesinin artmasına ve epitel değişikliklere sebep olarak hava

yolunun daralmasına, bronşiyal hiper yanıtlamaya, hava yolu ödemine ve müköz aşırı salınıma yol açar (Bergeron ve ark., 2010).

Astım tedavisinde genel olarak kortikosteroidler, glukokortikoidler ve anti-inflamatuar ilaçlar kullanılmaktadır (Rhen ve Cidlowski, 2005; Kleiman ve Tuckermann, 2007). Ancak, steroid veya kortikosteroid ilaçlar cilt kuruluğu, kemik yıkımının hızlanması veya kas güçsüzlüğü gibi istenmeyen yan etkilere sahiptir (Wei ve ark., 2004). Alerjen spesifik immünoterapi ise tercih edilen diğer bir tedavi seçeneğidir. Bu tedavide amaç, alerjene yanıt oluşturan T lenfositlerde anerji oluşturmaktır, ancak tedavi uzun sürelidir (Akdiş C.A. ve Akdiş M., 2011). Bu nedenle, astım tedavisinde kalıcı, kısa sürede etki gösteren ve yan etkileri az olan seçenekler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Astım dahil olmak üzere birçok inflamatuar hastalıkta hücresel tedavilerin etkinliği araştırılmaktadır. Ancak, kolay ulaşılabilen ve immün sistemde regülatuar etkisi başarılı olan dental kaynaklı kök hücrelerin astım hastalığında immünomodülatuar ve rejeneratif etkisine ait bir çalışma literatürde mevcut değildir.

Astım hastalağının tedavi yaklaşımlarında Th2 (T yardımcı hücre 2) düzeyi baskılanarak immünomodülatuar T regülatör düzeylerinin arttırılması hedeflenmektedir (Chapoval ve ark., 2000). Th2'den salınan IL-4 ve IL-13 sitokinleri IgE sentezinin artmasında, IL-3, IL-5 ve GM-CSF ise eozinofilik inflamasyon oluşumunda rol oynarken Th1 hücrelerin artışı bu olayları tersine çevirmektedir. Th1 hücreler tarafından salgılanan IFN-γ, Th2 hücreler üzerinde inhibitör etkiye sahip olup ve bu hücrelerin oluşumunu engellemektedir (Barnes, 2001). Th2 polarizasyonunun engellenmesiyle inflamasyon sürecinde meydana gelen eozinofil oluşumu, eozinofil ve mast hücresi aktivasyonu, B hücrelerin plazma hücresine dönüşerek IgE sentezleme prosesi gibi olaylar da baskılanmaktadır (Murdoch ve Lloyd, 2010). Th2 hücrelerde IL-4 ifadesinde transkripsiyon faktörü GATA3, Th1 hücrelerde IFN-γ ifadesinde transkripsiyon faktörü Tbet, Th17 hücrelerde IL-17 ifadesinde transkripsiyon faktörü ROR-γ-T, T regülatör hücrede IL-10 ifadesinde ise transkripsiyon faktörü FoxP3'tür.

Astım hastalığında Th2 yönüne polarize olan $CD4^+$ T hücrelerden dolayı GATA3 ifadesi artmaktadır (Vale-Pereira ve ark., 2011).

Mezenkimal kök hücreler (MKH) kemik iliği, adipoz doku, kordon (wharton's jelly) ve dental dokular gibi birçok dokudan elde edilebilen multipotent hücrelerdir (Maleki ve ark., 2014). MKH'ler yüzeyinde CD29, CD73, CD90, CD146 gibi pozitif belirteçleri eksprese eder, CD14, CD34, CD45 veya HLA-DR gibi hematopoietik belirteçleri eksprese etmezler. Bu nedenle allojenik kullanımda doku reddi oluşturmayan hipoimmünojenik hücrelerdir (Szake ve ark., 2008). Günümüzde diş pulpası, dental folikül, insan süt dişi gibi dental dokulardan izole edilmiş MKH'ler tanımlanmıştır. Bu hücreler diğer dokulardaki mezenkimal kök hücrelere oranla katlanma sayısı yüksek ve kemik, kıkırdak, yağ, nöral hücreler gibi birçok hücre grubuna farklılaşma yeteneğindedir (Suchanek ve ark., 2007). Aynı zamanda dental kaynaklı MKH'lerin doku rejenerasyonu ve otoimmün hastalıklarda lenfosit yanıtlarını düzenleyici etkileri bildirilmiştir (Mareschi ve ark., 2016). Daha önce yaptığımız bir çalışmada dental doku kaynaklı kök hücrelerin (insan süt dişi pulpası, dental pulpa, dental folikül) içinde anti-proliferatif etkisi yüksek ve $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Tregülatör hücre sayısını en fazla arttıran hücre grubunun DF-MKH olduğu gösterilmiştir (Yıldırım ve ark., 2016).

Astımda antijen sunucu hücreler tarafından naïve T lenfositlere antijen sunumunun ardından aktive olan T lenfositler Th2 lenfositlere farklılaşır ve sonrasında antijene spesifik yanıt veren bu efektör hücrelerde klonal çoğalma gerçekleşir (Romagnani, 2000). Efektör T lenfositlerin ömrü kısadır ve immün yanıtların sonunda bu hücrelerin bir kısmı efektör bellek hücreler olarak yaşamaya devam eder, antijenle tekrar karşılaşma ile hızlı bir şekilde çoğalırlar. T lenfositlerin farklı alt grupları in vitro ortamda T hücrelere spesifik uyarımlarla aktive edilebilir (Larche ve ark., 2003). Bu çalışmada, DF-MKH'lerin T lenfosit proliferasyonu üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla astım hastalarının venöz kanından mononükleer hücreler izole edilip, DF-MKH varlığında ve yokluğunda anti-CD3/anti-CD28 (CDmix), Der p1 veya IFN-γ uyarımıyla kültür edildi. $CD3^+CD4^+$ T lenfositlerde CDmix uyarımında üç grupta farklı düzeylerde proliferasyon görülürken astım hastalarından izole edilen

mononükleer hücre kültürlerinde immünoterapi almış bireyler ve sağlıklı bireylere göre istatistiksel anlamlı yüksek bulundu. Astım hastalarında Der p1 uyarımıyla $CD3^+CD4^+$ T lenfositlerde proliferasyon yanıtı alınırken, immünoterapi almış bireyler ve sağlıklı bireyler Der p1 uyarımına yanıt oluşturmadı. Bu sonuç, ev tozu akarına duyarlı astım hastalarının mononükleer hücrelerinde spesifik antijenle aktive olan T lenfositlerin varlığını göstermektedir. IFN-γ uyarımı CDmix uyarımına göre astım hastalarında T lenfosit proliferasyonunu istatistiksel olarak anlamlı baskıladı. İmmünoterapi almış bireylerde IFN-γ uyarımlı kültürlerinde T lenfosit proliferasyonu astım hastalarının ve sağlıklı bireylerin aynı uyarımlı kültürlerine göre artma eğiliminde olduğu gözlemlendi. Bu veri, immünoterapi almış hastaların mononükleer hücrelerinde IFN-γ stimülasyonuyla astım hastaları ve sağlıklı bireylere göre daha fazla yanıt oluşturan T yardımcı hücrelerin bulunduğunu göstermektedir. DF-MKH astım hastalarında CDmix ve Der p1 uyarımlı kültürlerde $CD3^+CD4^+$ T lenfosit proliferasyonunu istatistiksel olarak anlamlı baskılarken, IFN-γ uyarımlı kokültürlerde proliferasyon daha fazla baskılandı. DF-MKH immünoterapi almış bireyler ve sağlıklı bireylerde CDmix uyarımlı kokültürlerde $CD3^+CD4^+$ T lenfosit proliferasyonunu istatistiksel olarak anlamlı baskıladı, ancak Der p1 uyarımlı kokültürlerde anlamlı bir değişiklik olmadı. Güncel bir çalışmada alerjik rinit olan hastaların peripheral kan mononükleer hücrelerinde indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin (iPSC) ve kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin $CD3^+$ T lenfositlerde proliferatif yanıtlarını T regülatör hücre sayısını artırarak baskılandığını gösterilmiştir (Fu ve ark., 2012). Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar Fu ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmanın sonuçlarına benzer olarak astım hastalarından izole edilen periferal kan mononükleer hücreleri ve DF-MKH'in birlikte kültürlerinde $CD3^+CD4^+$ T lenfosit proliferasyonunu hem T lenfositlerin spesifik uyarımıylı hem de antijen spesifik uyarımlı kokültürlerde baskıladı.

Periferal kanda bulunan $CD4^+$ T lenfositlerin %5-10'u IL-2R (CD25) reseptörü taşımaktadır ve regülatör T hücre olarak isimlendirilen bu hücreler öz antijenlere karşı toleransın devamlılığını sağlamaktadır. T regülatör hücreler yanıt oluşturan T ve B lenfositleri baskılamaktadır. İmmün baskılayıcı bir mediatör olan TGF-β naive T hücrelere Foxp3 (forkhead box P3) eksprese ettirmekte ve regülatör T hücrelerinin

indüksiyonunu sağlamakta ve bu hücreler indüklenmiş T regülatör (iTreg) hücreler olarak isimlendirilmektedir. (Abbas ve Lichtman, 2006). Mezenkimal kök hücrelerin inflamatuar yanıtlara karşı salgıladıkları çözünmüş mediatörlerle (TGF-β, IDO, PGE2) T regülatör hücre sayısını artırarak immün baskılayıcı etki gösterdiğine dair kanıtlar literatürde yer almaktadır (Duffy ve ark., 2011). Çalışmamızda, T lenfosit proliferasyonunun baskılanmasında destekleyici sonuçlar mononükleer hücre kültürleri ve DF-MKH kokültürlerindeki $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranlarında da gözlemlendi. Astım hastalarının CDmix, Der p1 ve IFN-γ uyarımlı mononükleer hücre kültürlerinde $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranları immünoterapi almış bireylere göre ve sağlıklı bireylerin Der p1 uyarımlı kültürlerine göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu. Elde edilen verilere göre astım hastalarının $CD4^+$ T lenfosit proliferasyonunun CDmix ve Der p1 uyarımlı kültürlerinde yüksek olmasının aynı kültürlerde T regülatör hücre sayısının düşük olmasına bağlı olduğunu düşündürmektedir. DF-MKH astım hastalarının CDmix, Der p1 ve IFN-γ uyarımlı mononükleer hücrelerle birlikte kokültürlerinde $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranlarını istatistiksel olarak anlamlı artırdı. Sağlıklı bireylerde ise DF-MKH $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranlarını CDmix ve IFN-γ uyarımlı kokültürlerde anlamlı artırırken Der p1 uyarımlı kokültürlerde anlamlı bir değişiklik görülmedi. İmmünoterapi almış bireylerin kök hücresiz mononükleer hücre kültürlerinde astım hastaları ve sağlıklı bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek olan T regülatör hücre düzeyleri ile DF-MKH CDmix, Der p1 ve IFN-γ uyarımlı kokültürlerinin arasında anlamlı bir değişiklik olmadığı gözlemlendi. Bu sonuçlar, Der p1 uyarımıyla aktivasyon görülmeyen immünoterapi almış hastalar ve sağlıklı bireylerin T lenfosit yanıtlarını değiştirmediğini ve inflamatuar yanıtların olmadığı ortamda DF-MKH'nin anti-inflamatuar yanıt oluşturmadığını göstermektedir.

Astım hastalığında T lenfositlerin yüksek aktivasyonu programlanmış ölüm yolaklarını (apoptoz) aktive etmektedir (Potapinska ve Demkow, 2009). İnflamatuar yanıtlar esnasında apoptoz homeostasis için önemli bir süreçtir (Schmidt ve Tuder, 2010). Bu çalışmada, DF-MKH'lerin astım hastalığında proliferatif yanıtları baskılamasının hangi mekanizma üzerinden gerçekleştiğini incelemek amacıyla T

lenfosit apoptozu üzerindeki etkileri de araştırıldı. Astım hastalarının CDmix ve Der p1 uyarımlı mononükleer hücre kültürlerinde $CD4^+$ T lenfosit apoptozunun immünoterapi almış bireyler ve sağlıklı bireylere oranla istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu. IFN-γ uyarımlı kültürlerde ise astım hastalarında $CD4^+$ T lenfosit apoptozu sağlıklı bireylere göre anlamlı yüksek olduğu, ancak immünoterapi almış bireylerle arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, IFN-γ'nın astım hastaları üzerinde T lenfosit apoptozunu artırıcı etkisi olduğunu ve proliferatif yanıtları lenfosit apoptozunu artırarak baskıladığını düşündürmektedir. Daha önce yapılmış çalışmalarda, IFN-γ'nın caspase-8'e bağlı programlanmış hücre ölüm yolaklarını aktive ettiği, bu şekilde T lenfositlerin çoğalmasını engellediği gösterilmiştir (Refaeli ve ark., 2002). Astım hastalarında CDmix, Der p1 ve IFN-γ uyarımlı mononükleer hücrelerinin DF-MKH ile birlikte kültürlerde $CD4^+$ T lenfosit apoptozunun istatistiksel olarak anlamlı baskılandığı gözlemlendi. Sağlıklı bireyler ve immünoterapi almış bireylerin IFN-γ uyarımlı mononükleer hücrelerinin DF-MKH ile birlikte kültürlerde $CD4^+$ T lenfosit apoptozu anlamlı baskılanırken, CDmix ve Der p1 uyarımlı kokültürlerde mononükleer hücre kültürlerine oranla azalma eğiliminde ancak anlamlı bir fark görülmedi. Elde edilen veriler T lenfosit proliferasyon sonuçlarıyla birlikte değerlendirildiğinde, DF-MKH'lerin aktive olan T lenfositler üzerinde apoptoz ile hücre ölümü gerçekleştirmediği, ancak T lenfosit proliferasyonunu T regülatör hücre sayısını artırarak baskıladığını göstermektedir. Bunun yanı sıra, DF-MKH aktive olmayan T lenfositler üzerinde apoptozu azaltıcı bir etki göstermemektedir.

Antijen sunucu hücreler (APC) periferde monositlerden köken alan hücrelerden (makrofajlar, dendritik hücreler) veya dendritik hücre öncüllerinden oluşmaktadır. T lenfositlere antijen sunumu monositlerden köken alan makrofajlar ve dendritik hücreler gibi antijen sunucu hücreler tarafından yapılmaktadır. Antijen sunumu insan lökosit antijen DR (HLA-DR) ile gerçekleşmektedir. Antijen sunumu birinci sinyal olan antijen ve ikinci sinyal olan eş stimülasyon (kostimülasyon) B7-1 ve B7-2 olarak isimlendirilen ve antijen sunucu hücre yüzeyinde ifade edilen CD80, CD83 ve CD86 kostimülatör moleküllerinin katılımıyla gerçekleşmektedir. Antijen işlenmesi esnasında antijen sunucu hücre yüzeyinde ifade edilmeye başlayan kostimülatör

moleküller T lenfosit yüzeyindeki CD28 molekülüne bağlanarak T lenfosit uyarımı için eş stimülasyon sağlamaktadır (Harris ve Ronchese, 1999).

Kandaki monositler monosit koloni stimüle edici faktör (M-CSF) ile dokuya göç ettikten sonra makrofajlara, granülosit monosit koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) ve IL-4 etkisiyle monositten köken alan olgunlaşmamış $CD1^+$ dendritik hücrelere dönüşmektedir. APC'de antijen işlenmesinin ardından makrofajlar CD80, CD86 ve dendritik hücreler CD80, CD83 ve CD86 kostimülatör molekülleri ifade ederek olgunlaşmış antijen sunucu hücrelere dönüşürler (Randolph ve ark., 2008). APC'in yüzeyinde ifade edilen CD80/CD83/CD86 kostimülatör moleküller alerjik immün yanıtlarda önemli rol oynar. APC tarafından T lenfosite antijen sunumu MHC-sınıf II (HLA-DR) ile gerçekleşir ve T lenfosit aktivasyonu için ilk sinyali oluşturur. İkinci sinyal ise B7 molekül ailesinden olan ve APC yüzeyinde gösterilen CD80, CD83 ve CD86 eş uyaranlarının T lenfosit yüzeyindeki CD28 molekülüne bağlanması ile gerçekleşir. Daha önce yapılan bir çalışmada kemik iliği kaynaklı MKH ile birlikte *in vitro* kültürlerinde periferdeki monositlerin CD80, CD86 ve dendritik hücrelerin CD80, CD83 ve CD86 ifadesini azaltarak kostimülasyonu engellediği ve bu yolla inflamatuar yanıtları baskıladığı gösterilmiştir (Jiang ve ark., 2005). Çalışmamızda DF-MKH'lerin astım hastalarının periferal kanından elde edilen monositlerin kostimülasyonu üzerindeki etkisi araştırıldı. Astım hastalarının mononükleer hücre kültürlerinde $CD14^+$ hücrelerin CD80 ve CD86 ifadesi CDmix, Der p1 ve IFN-γ immünoterapi almış bireyler ve sağlıklı bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu gözlemlendi. $CD14^+$ hücrelerin CD83 ifadesinde gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi. DF-MKH ile CDmix ve IFN-γ uyarımlı mononükleer hücre kokültürlerinde astım hastaları, immünoterapi almış bireyler ve sağlıklı bireylerde $CD14^+$ hücrelerin CD80 ve CD86 ifadesinde istatistiksel anlamlı azalma görülürken, Der p1 uyarımlı kokültürlerde sadece astım hastalarında CD80 ve CD86 ifadesi istatistiksel olarak anlamlı azaldı, immünoterapi almış bireyler ve sağlıklı bireylerde Der p1 uyarımlı kokültürlerde CD80 ve CD86 ifadesinde anlamlı bir fark gözlemlenmedi. DF-MKH ile birlikte mononükleer hücre kültürlerinde $CD14^+$ hücrelerin CD80 ifadesi CDmix uyarımında sağlıklı bireylerin CDmix uyarımlı kök hücresiz kültürlerine yaklaştırdığı, immünoterapi almış bireylerin CDmix uyarımlı kök

hücresiz kültürlerinden daha fazla azalttığı, CD86 ifadesini ise CDmix uyarımlı DF-MKH ile mononükleer hücre kokültürlerinde sağlıklı bireyler ve immünoterapi almış bireylerin kök hücresiz CDmix uyarımlı kültürlerine yaklaştırdığı, astım hastalarının IFN-γ uyarımlı DF-MKH ile mononükleer hücre kokültürlerinde CD86 ifadesinin immünoterapi almış bireylere yaklaştırdığı ve aralarında anlamlı bir fark olmadığı gösterildi. Bu sonuçlar, DF-MKH'nin astım hastalarında hem T lenfosit uyarımlarında hem de antijen spesifik uyarımlarda kostimülasyonu artmış olan $CD14^+$ hücreler üzerinde baskılayıcı etkisi olduğunu göstermektedir.

Astım hastalığında akciğer dokusunda inflamatuar süreçte artan IL-4 sitokinin etkisiyle naïve $CD4^+$ T lenfositler CD3 ve CD28 reseptör aktivasyonuyla T yardımcı hücre 2 (Th2) fenotipine farklılaşır (Mirchandani ve ark., 2014). Bu farklılaşmada ortaya çıkan T yardımcı hücreler efektör T lenfositlerdir. İnflamatuar yanıtların sonlanmasının ardından efektör T lenfositlerin yaklaşık %90'ı kontraksiyon fazında ölür ve geriye kalan %10'luk popülasyon efektör bellek hücreler olarak lenfoid olmayan organlarda ve periferde yaşamaya devam eder. Merkez bellek hücreler ise foliküler T yardımcı hücreler veya kendi öncül hücrelerinden oluşan, efektör sitokinleri üretmeyen hücreler olup lenf nodları veya mukozal lenfoid organlarda yaşamaya devam ederler (Pepper ve Jenkins, 2011). Efektör ve bellek T lenfositlerin astım patogenezinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Antijen sunumuyla birlikte aktive olan $CD4^+$ T efektör bellek lenfositler akciğer havayolları dokusunda salgıladıkları sitokinler aracılığıyla inflamatuar yanıt oluşturarak B lenfosit aktivasyonu, IgE sentezi, eozinofil ve mast hücre aktivasyonu gibi birçok süreci tetikler (Pastva ve ark., 2011). MKH'lerin IL-17 ve IFN-γ salgılayan efektör ve efektör bellek T lenfositler üzerinde baskılayıcı etkisinin olduğu literatürde yer almaktadır (Laranjeira ve ark., 2015). MKH'lerin naive, efektör ve bellek T lenfositler üzerindeki etkisini gösteren az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada DF-MKH'lerin astım hastalarının naive, efektör, efektör bellek ve merkez bellek T lenfosit oranları üzerindeki etkisi incelendi. Astım hastalarının CDmix ve Der p1 uyarımlı mononükleer hücre kültürlerinde naive $CD4^+$ T lenfosit oranları, immünoterapi almış bireyler ve sağlıklı bireylere oranla istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu, IFN-γ uyarımlı kültürlerde ise aralarında anlamlı bir fark bulunmadı. DF-MKH ile birlikte

kültürlerde astım hastalarının naive T hücre oranları CDmix ve Der p1 uyarımında kök hücresiz kültürlere oranla istatistiksel anlamlı artarken, immünoterapi almış bireyler ve sağlıklı bireylerin kokültürlerinde anlamlı bir fark bulunmadı. Astım hastalarının CDmix ve Der p1 uyarımlı mononükleer hücre kültürlerinde efektör $CD4^+$ T lenfosit oranları, immünoterapi almış bireyler ve sağlıklı bireylere oranla istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu. DF-MKH ile birlikte kültürlerde astım hastalarının efektör $CD4^+$ T lenfosit oranları CDmix ve Der p1 uyarımında kök hücresiz kültürlere oranla istatistiksel anlamlı azalırken, immünoterapi almış bireyler ve sağlıklı bireylerin CDmix ve IFN-γ uyarımlı kültürlerinde anlamlı azaldı ve Der p1 uyarımlı kokültürlerinde anlamlı bir fark bulunmadı. Astım hastalarının CDmix, Der p1 ve IFN-γ uyarımlı mononükleer hücre kültürlerinde efektör bellek $CD4^+$ T lenfosit oranları, immünoterapi almış bireyler ve sağlıklı bireylere oranla istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu. DF-MKH ile birlikte kültürlerde astım hastalarının efektör bellek $CD4^+$ T lenfosit oranları CDmix, Der p1 ve IFN-γ uyarımında kök hücresiz kültürlere oranla istatistiksel anlamlı azalırken, immünoterapi almış bireylerin ve sağlıklı bireylerin CDmix ve IFN-γ uyarımlı kokültürleri anlamlı azaldı ve Der p1 uyarımlı kokültürlerinde anlamlı bir fark bulunmadı. Astım hastalarının CDmix ve IFN-γ uyarımlı mononükleer hücre kültürlerinde merkez bellek $CD4^+$ T lenfosit oranları immünoterapi almış bireylere oranla istatistiksel olarak anlamlı düşük, ancak Der p1 uyarımlı kültürlerde immünoterapi almış bireylere oranla yüksek bulundu. DF-MKH ile birlikte kültürlerde astım hastalarının merkez bellek $CD4^+$ T lenfosit oranları CDmix ve Der p1 uyarımında kök hücresiz kültürlere oranla istatistiksel anlamlı azalırken, immünoterapi almış bireylerin CDmix, Der p1 ve IFN-γ uyarımlı kokültürlerinde ve sağlıklı bireylerin CDmix ve Der p1 uyarımlı kokültürlerinde anlamlı bir fark bulunmadı. Elde ettiğimiz sonuçlar, DF-MKH'lerin astım hastalarında efektör, efektör bellek ve merkez bellek $CD4^+$ T lenfositlerini azaltırken naive T lenfosit yönünde desteklediğini göstermektedir. Sonuçlar, CDmix ve Der p1 uyarımında DF-MKH'lerin astım hastalarının naive ve merkez bellek $CD4^+$ T lenfosit oranlarını immünoterapi almış bireylerin kök hücresiz mononükleer hücrelerindeki oranlara yaklaştırdığı, aralarında anlamlı fark olmasına rağmen efektör ve efektör bellek $CD4^+$ T lenfosit oranlarını anlamlı azalttığını göstermektedir.

Astım hastalığında inflamatuar yanıtlar esnasında Th2 hücreler tarafından salgılanan IL-4, IL-5 ve IL-13 sitokinleri astım patofizyolojisinde önemli rol oynar (Barnes, 2001). Allerjen spesifik immünoterapide T regülatör ve Th1 (T yardımcı hücre 1) fenotiplerini ön plana çıkarılarak IL-10 ve IFN-γ sekresyonunu arttırılması, böylece Th2 yönünde polarize olmuş inflamatuar yanıtların baskılanması amaçlanır (Akdis CA ve Akdis M. 2011). Çalışmamızda DF-MKH'lerin Th1 ve Th2 yanıtları üzerindeki etkisini incelemek amacıyla Th1 hücrelerin belirleyici sitokini olan IFN-γ ve Th2 hücrelerin belirleyici sitokini olan IL-4 miktarları araştırıldı. Aynı zamanda DF-MKH'lerin immün baskılayıcı özelliği olan T regülatör hücreler üzerindeki etkisini incelemek amacıyla IL-10 düzeyleri araştırıldı. Astım hastalarının CDmix, Der p1 ve IFN-γ uyarımlı mononükleer hücre kültürlerinde IL-4 düzeylerinin immünoterapi almış bireyler ve sağlıklı bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu, IFN-γ ve IL-10 düzeylerinin anlamlı düşük olduğu gözlemlendi. Buna karşılık immünoterapi almış bireylerin CDmix ve IFN-γ uyarımlı mononükleer hücre kültürlerinde IFN-γ ve IL-10 düzeylerinin sağlıklı bireylerden yüksek olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlar immünoterapinin Th1 yönünde desteklediği ve aynı zamanda T regülatör hücrelerin baskın olduğunu göstermektedir. DF-MKH'ler astım hastalarının CDmix, Der p1 ve IFN-γ uyarımlı kokültürlerinde IL-4 düzeylerini istatistiksel anlamlı düşürürken, IFN-γ ve IL-10 düzeylerini anlamlı artırdığı gözlemlendi. DF-MKH ile birlikte kültürlerde astım hastalarının IL-4 Der p1 uyarımında immünoterapi grubunun kök hücresiz kültürleri ile arasında anlamlı fark olmayacak düzeyde azalırken, IFN-γ ve IL-10 hem Der p1 hem de IFN-γ uyarımlarında sağlıklı bireylerin kök hücresiz mononükleer hücre kültürlerine yaklaştırdığı aralarında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi. DF-MKH'lerin immünoterapi almış bireyler ve sağlıklı bireylerin kokültürlerinde IL-4 düzeylerini anlamlı değiştirmediği, ancak IFN-γ düzeylerini azaltma eğiliminde olduğu, immünoterapi almış bireylerin IL-10 düzeylerini istatistiksel anlamlı değiştirmezken, sağlıklı bireylerde CDmix ve IFN-γ uyarımlı kokültürlerinde IL-10 düzeylerini artırdığı görüldü. Elde edilen sonuçlar, DF-MKH'lerin Th1 baskın olan lenfosit yanıtları ile Th2 baskın olan yanıtlar arasında farklı düzenleyici etkisi olduğunu

göstermektedir. DF-MKH, astım hastalarında Th2 yönünde baskın olan lenfosit yanıtlarını baskıladığını, Th1 ve T regülatör hücreler yönünde desteklediğini göstermektedir. Bu veriler DF-MKH'lerin astım hastalığı üzerindeki regülasyon mekanizmasının immünoterapi ile benzer olduğuna dair kanıt oluşturmaktadır.

Dental kaynaklı MKH'in T lenfositler üzerinde immün düzenleyici etkisine dair az sayıda çalışma bulunmaktadır. Çalışmamızda sağlıklı bireylerin sonuçlarına benzer olarak daha önce yapılmış olan bir çalışmada, Dental pulpa kaynaklı MKH'in sağlıklı bireylerden elde edilen CD4+ T lenfositler üzerinde IL-4 ve IFN-γ düzeylerini azalttığı, IL-10 düzeylerini artırdığı gösterilmiştir (Demircan ve ark., 2011). Dental pulpa MKH'in parakrin etkisini araştıran bir çalışmada ise dental pulpa MKH'in $CD3^+$ T lenfositlerin salgıladığı proinflamatuar sitokin düzeylerini (IFN-γ, IL-6, IL-17A) TGF-β sekresyonunu ve T regülatör hücrelerden salınan IL-10 düzeylerini artırarak immün modülasyon gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Özdemir ve ark., 2016). Bu veriler çalışmamızda DF-MKH'lerin sağlıklı bireylerin mononükleer hücrelerle kokültürlerinde elde ettiğimiz sonuçları desteklemektedir. MKH'lerin immün sistem hücreleri üzerindeki regülatör etkisi kök hücrenin kaynağına ve inflamatuar hücre yanıtlarına göre değişmektedir (De Miguel ve ark., 2012). Kemik iliği kaynaklı MKH'lerin intravenöz enjeksiyonuyla astım modeli oluşturulan farelerin splenositlerinde Th2 yanıtlarını azaltıp Th1 yönünde desteklediği, diğer bir çalışmada ise MKH'nin ortamdaki inflamatuar yanıtlara göre immün düzenleyici mediatörlerin üretimi için gen ekspresyonunu tekrar düzenleyerek gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Goodwin ve ark., 2011; Crop ve ark., 2010). Çalışmamızda DF-MKH'lerin astım hastalarının $CD4^+$ T lenfositlerinde Th2 baskın yanıtlarını ve immünoterapi almış bireyler ve sağlıklı bireylerdeki Th1 yanıtları baskılama etkisinin daha önce yapılmış çalışmalarda belirtilen MKH'lere benzer olduğu görüldü.

Edinsel immün yanıtlarda Th2 (T yardımcı 2) lenfositler salgıladıkları sitokinlerle (IL-4, IL-5 ve IL-13) naive T hücrelerde GATA-3 ekspresyonunu artırarak Th2 hücrelerin ilk farklılaşmasını ve astım oluşumuna öncülük eden immün yanıtların başlamasını sağlar. Th1 (T yardımcı 1) lenfositlerin temel sitokini ise IFN-γ olup

üretimi spesifik transkripsiyon faktörü olan Tbet ile gerçekleşir. T regülatör hücreler $CD4^+CD25^+$ hücrelerdir ve FoxP3 transkripsiyon faktörünün ekspresyonu ile karakterizedir. T regülatör hücrelerde eksprese edilen FoxP3 transkripsiyon faktörü hem IL-10 sekresyonunu sağlar hem de Th2 yanıtlarının baskılanmasında rol oynar (Messi ve ark., 2003). Çalışmamızda, DF-MKH'lerin astım hastalığında Th1 ve Th2 farklılaşmasındaki etkisini ve immün düzenlemedeki etkisini araştırmak amacıyla GATA-3, Tbet ve FoxP3 transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu incelendi. Astım hastalarının CDmix, Der p1 ve IFN-γ uyarımlı mononükleer hücre kültürlerinde GATA3 ekspresyonunun immünoterapi almış bireyler ve sağlıklı bireylerle kıyaslandığında istatistiksel anlamlı yüksek olduğu görüldü. DF-MKH'ler astım hastalarının CDmix, Der p1 ve IFN-γ uyarımlı kokültürlerinde GATA-3 ekspresyonunu anlamlı derecede baskıladı, sağlıklı bireylerin CDmix ve Der p1 uyarımlı kök hücresiz mononükleer hücre kültürlerindeki GATA-3 ekspresyonu ile arasında anlamlı fark olmayacak derecede yaklaştırdığı gözlemlendi. Astım hastalarının CDmix, Der p1 ve IFN-γ uyarımlı mononükleer hücre kültürlerinde Tbet ekspresyonunun immünoterapi almış bireyler ve sağlıklı bireylerle kıyaslandığında istatistiksel anlamlı düşük olduğu görüldü. DF-MKH'ler astım hastalarının CDmix, Der p1 ve IFN-γ uyarımlı kokültürlerinde Tbet ekspresyonunu anlamlı derecede artırdı, sağlıklı bireylerin CDmix ve Der p1 uyarımlı kök hücresiz mononükleer hücre kültürlerindeki Tbet ekspresyonu ve immünoterapi almış bireylerin IFN-γ uyarımlı kök hücresiz kültürleri ile arasında anlamlı fark olmayacak derecede yaklaştırdığı gözlemlendi. Astım hastalarının CDmix, Der p1 ve IFN-γ uyarımlı mononükleer hücre kültürlerinde FoxP3 ekspresyonunun immünoterapi almış bireyler ve sağlıklı bireylerle kıyaslandığında istatistiksel anlamlı düşük olduğu görüldü. DF-MKH'ler astım hastalarının CDmix, Der p1 ve IFN-γ uyarımlı kokültürlerinde FoxP3 ekspresyonunu anlamlı derecede artırdı, immünoterapi almış bireylerin Der p1 ve IFN-γ uyarımlı kök hücresiz mononükleer hücre kültürlerindeki FoxP3 ekspresyonu ile arasında anlamlı fark olmayacak derecede yaklaştırdığı gözlemlendi. Bunun yanı sıra, GATA-3, Tbet ve FoxP3 ekspresyonu immünoterapi almış bireyler ve sağlıklı bireylerde DF-MKH ile birlikte kültürlerde mononükleer hücre kültürlerine göre anlamlı bir fark görülmedi. Bu veriler, DF-MKH'lerin astım hastalarının Th2

yanıtlarını, T regülatör hücreleri artırarak ve Th1 yönünde destekleyerek baskıladığını göstermektedir.

IFN-γ, Th2 hücre yanıtlarının baskın olduğu astımı da içeren allerjik hastalıklarda Th2 hücrelerin efektör fonksiyonlarını inhibe ederek inflamatuar yanıtları baskılayabilmektedir (Mitchell ve ark., 2011). IFN-γ'nın MKH'ler üzerinde ise bu hücrelerden salgılanan immün baskılayıcı mediatörlerin (TGF-β, IDO, PGE2) ekspresyonunu artırdığı ve bu yolla immünosupresif etkisini artıdığı bilinmektedir (Krampera ve ark., 2006). Yapılan bir çalışmada, graft versus host hastalığında kemik iliği kaynaklı MKH'lerin IFN-γ ile ön uyarımının uyarımsız hücrelere oranla yaşam süresini artırdığı bildirilmiştir (Le Blanc ve ark., 2008.) Bu çalışmada, IFN-γ'nın astım hastalarının T lenfosit yanıtları üzerindeki hem tek başına hem de DF-MKH ile birlikte etkisi incelendi. Astım hastalarının IFN-γ uyarımı mononükleer hücre kültürlerinde proliferasyon oranı CDmix ve Der p1 uyarımına göre anlamlı baskıladı. DF-MKH CDmix ve Der p1 uyarımlı kokültürlerde proliferasyon oranını istatistiksel anlamlı baskılarken, IFN-γ uyarımı DF-MKH'nin $CD4^+$ T lenfositlerin proliferatif yanıtını daha fazla baskıladı. IFN-γ, astım hastalarının mononükleer hücre kültürlerinde CD4+ T lenfosit yanıtlarını CDmix ve Der p1 uyarımına göre anlamlı değiştirmedi, ancak IFN-γ uyarımı DF-MKH ile birlikte kültürlerde $CD4^+$ T lenfosit canlılık oranını CDmix ve Der p1 uyarımına göre daha fazla artırdı. IFN-γ, astım hastalarında $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranlarını CDmix ve Der p1 uyarımlı mononükleer hücre kültürlerine göre anlamlı artırdı. Astım hastalarının DF-MKH ile birlikte IFN-γ uyarımlı kokültürlerinde T regülatör hücre oranlarının immünoterapi almış bireylerin aynı uyarımlı kök hücresiz kültürlerine yaklaştırdığı aralarında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi. Bu sonuçlar, IFN-γ uyarımının astım hastalarının $CD4^+$ T lenfositleri üzerinde immün düzenleyici etkisinin olduğunu, birlikte uygulandığında ise $CD4^+$ T lenfositler üzerinde DF-MKH'in immünomodülatör ve anti-apoptotik etkisini artırdığını göstermektedir. Astım hastalarının IFN-γ uyarımlı mononükleer hücre kültürlerinde monositlerde CD80 ve CD86 ifadesinin CDmix ve Der p1 uyarımlı kültürlere oranla hem tek başına hem de DF-MKH ile birlikte uygulandığında anlamlı bir değişiklik olmadığı, istatistiksel

olarak CDmix ve Der p1 uyarımlı kokültürlerle benzer oranda baskıladığı gözlemlendi. Bu veriler IFN-γ'nın monositlerin kostimülasyonu üzerinde bir etkisi olmadığını göstermektedir. Ancak, IFN-γ astım hastalarının dendritik hücrelerinde CD80, CD83 ve CD86 ifadesini CDmix ve Der p1 uyarımlı kültürlere göre anlamlı baskıladı, DF-MKH ile birlikte uygulandığında ise dendritik hücrelerin kostimülasyonunu baskılama etkisini artırdığı gözlemlendi. IFN-γ uyarımı astım hastalarında CDmix ve Der p1 uyarımlı kültürlere göre efektör ve merkez bellek $CD4^+$ T lenfositlerin oranını azaltırken, naive T hücre oranını artırdı. Ancak DF-MKH ile birlikte IFN-γ uyarımında, CD mix ve Der p1 uyarımlı kokültürlere göre naive, efektör, efektör bellek ve merkez bellek $CD4^+$ T lenfosit oranlarında anlamlı bir değişiklik gözlemlenmedi. IFN-γ uyarımı astım hastalarında CDmix ve Der p1 uyarımlı kültürlere göre IL-4 düzeyini azaltma ve IL-10 düzeylerini artırma eğiliminde olmasına rağmen anlamlı değiştirmedi, ancak IFN-γ düzeyini Der p1 uyarımlı kültürlere göre anlamlı artırdı. Bunun yanı sıra, IFN-γ uyarımı astım hastalarında CDmix ve Der p1 uyarımlı kültürlere göre GATA-3 ekspresyonunu anlamlı baskıladı, DF-MKH ile birlikte IFN-γ uyarımı astım hastalarında FoxP3 ekspresyonunu daha fazla artırdı. Bu veriler IFN-γ'nın astım hastalarının efektör Th2 yanıtlarını baskılama eğiliminde olduğunu, DF-MKH ile birlikte IFN-γ'nın Th2 yanıtlarını hem Th1 lenfositleri artırarak hem de T regülatör hücreleri artırarak immünomodülatör etki gösterdiğine kanıt oluşturmaktadır.

Mezenkimal kök hücreler (MKH) inflamatuar yanıtlar esnasında sekrete ettikleri çözünmüş mediatörlerle $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ regülatör T hücrelerin oluşumunu indükleyerek, IL-10 üretiminin artmasıyla lenfosit proliferasyonunu baskılamaktadır. Anti-inflamatuar yanıtı oluşturan üç temel mediatör transforme edici büyüme faktörü (TGF-β), indolamin 2,3-dioksijenaz (IDO), prostaglandin E2 (PGE2)'dir (Yang ve ark., 2009). Çalışmamızda, DF-MKH'lerin astım hastalarının immün sistem hücreleri üzerindeki baskılayıcı mediatörlerini araştırmak amacıyla CDmix, Der p1 ve IFN-γ uyarımlı kültürlerde üç ana mediatörün (TGF-β, IDO ve PGE2) nötralizasyonu veya blokajı gerçekleştirilerek, $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranları analiz edildi. Astım hastalarının CDmix ve Der p1 uyarımlı DF-MKH ile birlikte kültürlerinde

$CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör oranlarının kök hücresiz mononükleer hücre kültürlerine göre anlamlı arttığı, IFN-γ uyarımında ise daha fazla arttığı görüldü. DF-MKH'in mononükleer hücrelerle birlikte kültürlerinin CDmix, Der p1 ve IFN-γ uyarımlarında anti-TGF-β ile nötralizasyonu veya 1-MDT ile blokajı sonucunda T regülatör hücre oranlarının istatistiksel olarak anlamlı azaldığı, sc-58125 ile bloke edilmesi sonucunda anlamlı bir değişiklik olmadığı gözlemlendi. Elde edilen sonuçlara göre DF-MKH'ler astım hastalarının T lenfosit yanıtlarını baskılarken TGF-β ve IDO yolağını kullanmaktadır.

Sonuç olarak, DF-MKH astım hastalarında Th2 yanıtlarının baskın olduğu astım hastalarının lenfosit yanıtlarını $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Tregülatör hücrelerin oranını arttırarak, efektör ve efektör bellek T hücre oranlarını azaltarak, naïve T hücre oranlarını arttırarak ve aynı zamanda lenfosit yanıtlarını Th1 yönünde destekleyerek modulatuar etki göstermiştir. DF-MKH'lerin bu etkisi immünoterapisi tamamlanmış astım hastaların kök hücresiz mononükleer hücre kültürlerindeki yanıtlara yaklaştırdığı gözlemlenmiştir. DF-MKH kolay elde edilebilirliği, immün düzenleyici etkisi değerlendirildiğinde astım hastalığında bir tedavi seçeneği olması yönünde ümit vaadetmekte ve bundan sonra yapılacak in vivo çalışmalara ışık tutmaktadır.

8. KAYNAKLAR

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular İmmunology 7th. 2012; P: 55-88.

Abbas AK, Lichtman AH. Basic immunology: functions and disorders of the immune system. 2nd ed. Phiadelphia, PA: W.B Saunders Co, Updated edition 2006-2007

Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochromeseas. Trends BiochemSci 2001; 26:390-7.

Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. J Allergy Clin Immunol. 2011 Jan;127(1):18-27; quiz 28-9. doi: 10.1016/j.jaci.2010.11.030.

Al Jumah MA and Abumaree MH. The Immunomodulatory and Neuroprotective Effects of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE): A Model of Multiple Sclerosis (MS). *Int. J. Mol. Sci.* 2012, *13*(7), 9298-9331

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Hücrenin Moleküler Biyolojisi. Dördüncü Baskı. Garland- Science. TUBA. 2008; 1363- 1420.

Anderton SM, Wraith DC: Selection and fine tuninig of the autoimmune T cell repertoire. Nat Rev Immunol 2002;2:487-98

Barnes PJ. Pathophysiology of asthma. Br J Clin Pharmacol. 1996 Jul; 42(1):3-10

Barnes PJ. Th2 cytokines and asthma: an introduction. Respir Res. 2001; 2(2): 64–65. doi: 10.1186/rr39

Bellamy COC, Malcomson RDG, Harrison DJ and Wyllie AH. Cell death in health and disease: the Biology and regulation of apoptosis. Seminar in CancerBiol. 1995; 6: 3-16.

Bergeron C, Tulic MK, and Hamid Q. Airway remodelling in asthma: From benchside to clinical practice. Can Respir J. 2010 Jul-Aug; 17(4): e85–e93

Browne VW, McClain KL, Talpaz M, Ordonez N, Estrov Z. Physiology and pathophysiology of dendritic cells. Hum Pathol 1997; 28:563-79. http://dx.doi.org/10.1016/S0046-8177(97)90079-4

Camcıoğlu Y ve Deniz G. Temel İmmünoloji İmmün Sistemin İşlev ve Bozuklukları. İstanbul, İstanbul Medikal Yayıncılık. 2007; 1: 1-21, 41-60, 83-103.

Chapoval S, Dasgupta P, Dorsey NJ, Keegan AD. Regulation of the T helper cell type 2 (Th2)/T regulatory cell (Treg) balance by IL-4 and STAT6. J Leukoc Biol. 2010 Jun;87(6):1011-8. doi: 10.1189/jlb.1209772.

Chung KF. Airway smooth muscle cells: contributing to and regulating airway mucosal inflammation? Eur Respir J 2000;15:961-8

Crop MJ, Baan CC, Korevaar SS, Ijzermans JN, Pescatori M, Stubbs AP, van Ijcken WF, Dahlke MH, Eggenhofer E, Weimar W, Hoogduijn MJ. Inflammatory conditions affect gene expression and function of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. Clin Exp Immunol 2010; 162: 474–486

Curtin JF, Cotter TG. Live and let die: regulatory mechanism in Fas mediated apoptosis. Cell Signal 2003; 15:983-92.

Dahl R. Systemic side effects of inhaled corticosteroids in patients with asthma. Respir Med. 2006 Aug;100(8):1307-17.

De Miguel MP, Fuentes-Julián S, Blázquez-Martínez A, Pascual CY, Aller MA, Arias J, Arnalich-Montiel F. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. Curr Mol Med. 2012 Jun;12(5):574-91

Demircan PC, Sariboyaci AE, Unal ZS, Gacar G, Subasi C, Karaoz 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 Nov;13(10):1205-20

Duffy MM, Ritter T, Ceredig R, Griffin MD. Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. Stem Cell Res Ther. 2011 Aug 11;2(4):34

Eder W, Ege MJ, von Mutius E. The asthma epidemic. N Engl J Med. 2006;355(21):2226–2235

Ellis, RE, Yuan, J and Horvitz, HR. Mechanisms and functions of cell death. Annu. Rev. CellBiol. 1991; 7: 663-698.

Ertabaklar H, Yaman S, Ertuğ S. Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi parazitoloji laboratuarına gönderilen ev tozlarında akar sıklığının arastırılması. Türkiye Parazitol Derg 2006; 30(1): 29-31

Failla M, Crimi N, Vancheri C. Exhaled bronchial cysteinyl leukotrienes in allergic patients. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2007;7:25–31.

Figueroa FE, Carrión F, Villanueva S, Khoury. Mesenchymal stem cell treatment for autoimmune diseases: a critical review. M.Biol Res. 2012;45(3):269-77. doi: 10.4067/S0716-97602012000300008

Fireman P. Understanding asthma pathophysiology. Allergy Asthma Proc. 2003 Mar-Apr;24(2):79-83

Ford WCL. Biological mechanisms of male infertility. The Lancet. 2001; 357:21.1223-1224.

Foti M, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cell interactions and cytokine production. In: Cytokines as Potential Therapeutic Targets for Inflammatory Skin Diseases. Ernst Schering Res Found Workshop 2006; 56:61-80. http://dx.doi.org/10.1007/3-540-37673-9_4

Fu QL, Chow YY, Sun SJ, Zeng QX, Li HB, Shi JB, Sun YQ, Wen W, Tse HF, Lian Q, Xu G. Mesenchymal stem cells derived from human induced pluripotent stem cells modulate T-cell phenotypes in allergic rhinitis. Allergy. 2012 Oct;67(10):1215-22

Fuchs E, Tumbar T, Guasch G. Socializing With the Neighbors: Stem cells and their niche. Cell. 2004; 116, s.769-778.

Gajewski TF, Fitch FW. Anti-proliferative effect of IFN-g in immune regulation I. IFN-g inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. J Immunol 1988;140: 4245-4252.

Gallimore A, Godkin A. Regulatory T cells and tumour immunity- observations in mice and men. Immunology. 2008; 123:157–163.

Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. Trends Biochem Sci 2007; 32:37-43.

Goodwin M, Sueblinvong V, Eisenhauer P, Ziats NP, LeClair L, Poynter ME, Steele C, Rincon M, Weiss DJ. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells inhibit Th2-mediated allergic airways inflammation in mice. Stem Cells. 2011 Jul; 29(7):1137-48.

Hakki SS, Kayis SA, Hakki EE, Bozkurt SB, Duruksu G, Unal ZS, Turaç G, Karaoz E. Comparison of mesenchymal stem cells isolated from pulp and periodontal ligament. J Periodontol. 2015 Feb;86(2):283-91. doi: 10.1902/jop.2014.140257

Hall JE, Guyton AC. Tıbbi Fizyoloji. 11. Basım. Nobel Tıp Kitabevleri. 2007; 419-439.

Harris NL, Ronchese F. The role of B7 costimulation in T-cell immunity. Immunol Cell Biol. 1999 Aug;77(4):304-11.

Harris NL and Ronchese F. The role of B7 costimulation in T-cell immunity. Immunology and Cell Biology 1999; 77, 304–311

Hart BJ, Whitehead L. Ecology of house dust mites in Oxfordshine. Clin Exp Allergy1998; 20: 203-209.

Hochrein H, O'Keeffe. Dendritic cell subsets and toll-like receptors. Handb Exp Pharmacol 2008; 183:153-79. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-72167-3_8

Holgate ST. Pathogenesis of asthma. Clin Exp Allergy. 2008 Jun;38(6):872-97. doi: 10.1111/j.1365-2222.2008.02971.x.

Inman KS, Francis AA, Murray NR. Complex role for the immune system in initiation and progression of pancreatic cancer. World J Gastroenterol. 2014; 20(32): 11160-11181.

Ishmael FT. The inflammatory response in the pathogenesis of asthma. J Am Osteopath Assoc. 2011 Nov;111(11 Suppl 7):S11-7.

Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, Mao N. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. Blood. 2005 May 15;105(10):4120-6

Joyce N, Annett G, Wirthlin L, Olson S, Bauer G, Nolta JA. Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. Regen Med. 2010 Nov; 5(6): 933–946. Doi: 10.2217/rme.10.72

Kannan K, Jain Sk. Oxidative stres and apoptosis. Pathophysiology. 2000; 7(27):153-163.

Karsunky H, Inlay MA, Serwold T, Bhattacharya D, Weissman IL. Flk2+ common lymphoid progenitors possess equivalent differentiation potential for the B and T lineages. Blood. 2008; 111(12), s.5562-70.

Kierszenbaum AL, Tres LL. Histology and cell biology an introduction to pathology. Philadelphia, PA, Elsevier Saunders. 2012; 291-323, 626-644.

Kleiman A, Tuckermann JP. Glucocorticoid receptor action in beneficial and side effects of steroid therapy: lessons from conditional knockout mice. Mol Cell Endocrinol. 2007 Sep 15; 275(1-2):98-108.

Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, Santarlasci V, Mazzinghi B, Pizzolo G, Vinante F, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. Stem Cells. 2006 Feb;24(2):386-98

Krampera, M., Cosmi, L., Angeli, R., et al.. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. Stem Cells, 2006; 24(2), 386–398

Laranjeira P, Pedrosa M, Pedreiro S, Gomes J, Martinho A, Antunes B, Ribeiro T, Santos F, Trindade H, Paiva A. Effect of human bone marrow mesenchymal stromal cells on cytokine production by peripheral blood naive, memory, and effector T cells. Stem Cell Res Ther. 2015 Jan 5;6:3

Larche M, Robinson DS, Kay AB. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. J Allergy Clin Immunol 2003;111:450-6

Larché M, Robinson DS, Kay AB. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. J Allergy Clin Immunol. 2003 Mar; 111(3):450-63; quiz 464

Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, Lanino E, Sundberg B, Bernardo ME, Remberger M, Dini G, Egeler RM, Bacigalupo A, Fibbe W, Ringdén O, Developmental Committee of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. Lancet. 2008 May 10; 371(9624):1579-86.

Li Z, Jiang CM, An S, Cheng Q, Huang YF, Wang YT, Gou YC, Xiao L, Yu WJ, Wang J. Immunomodulatory properties of dental tissue-derived mesenchymal stem cells. Oral Dis. 2014 Jan;20(1):25-34. doi: 10.1111/odi.12086

Lipscomb MF, Wilder JA, Masten BJ. Dendritic cells and their role in linking innate and adaptive immune responses. In: Gessani S, Belardelli F eds. The biology of dendritic cells and HIV infection. Springer 2007:45-84. http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-33785-2_2

Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, and Wang Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. Cell Death Differ. 2014 Feb; 21(2): 216–225. Doi: 10.1038/cdd.2013.158

Maleki M, Ghanbarvand F, Reza Behvarz M, Ejtemaei M, Ghadirkhomi E. Comparison of mesenchymal stem cell markers in multiple human adult stem cells. Int J Stem Cells. 2014 Nov;7(2):118-26. doi: 10.15283/ijsc.2014.7.2.118.

Mareschi K, Castiglia S, Sanavio F, Rustichelli D, Muraro M, Defedele D, Bergallo M, Fagioli F. Immunoregulatory effects on T lymphocytes by human mesenchymal stromal cells isolated from bone marrow, amniotic fluid, and placenta. Exp Hematol. 2016 Feb;44(2):138-150.e1. doi: 10.1016/j.exphem.2015.10.009.

Marta E. Castro-Manrreza, Juan J. Montesinos Immunoregulation by Mesenchymal Stem Cells: Biological Aspects and Clinical Applications. J Immunol Res. 2015; 2015: 394917

Marti A, Ritter PM, Jager R. Mouse mammary glandin volution is associated with cytochrome-c release and caspase activation. Mech Dev. 2001; 104(1-2):89-98.

Messi M, Giacchetto I, Nagata K, Lanzavecchia A, Natoli G, Sallusto F. Memory and flexibility of cytokine gene expression as separable properties of human Th1 and Th2 lymphocytes. Nat Immunol 2003; 4: 78-86

Mirchandani AS, Besnard AG, Yip E, Scott C, Bain CC, Cerovic V, Salmond RJ and Liew FY. Type 2 Innate Lymphoid Cells Drive $CD4^+$ Th2 Cell Responses. J Immunol March 1, 2014, 192 (5) 2442-2448

Mitchell C, Provost K, Niu N, Homer R, Cohn L. IFN-γ acts on the airway epithelium to inhibit local and systemic pathology in allergic airway disease. J Immunol. 2011 Oct 1;187(7):3815-20

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.

Murdoch JR, and Lloyd CM. Chronic inflammation and asthma. Mutat Res. 2010 Aug 7;690(1-2):24-39. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2009.09.005.

Nelson BH. IL-2, regulatory T cells, and tolerance. J. Immunol. 2004; 172 (7): 3983-3988.

Nicotera P, Bernassola F, Melino G. Regulation of the apoptosis-necrosis switch. Oncogene 2004; 23:2757-2765.

Özdemir AT, Özgül Özdemir RB, Kırmaz C, Sarıboyacı AE, Ünal Halbutoğlları ZS, Özel C, Karaöz E. The paracrine immunomodulatory interactions between the human dental pulp derived mesenchymal stem cells and CD4 T cell subsets. Cell Immunol. 2016;310:108-115

Pastva AM, Mukherjee S, Giamberardino C, Hsia B, Lo B, Sempowski GD, Wright JR. Lung effector memory and activated CD4+ T cells display enhanced proliferation in surfactant protein A-deficient mice during allergen-mediated inflammation. J Immunol. 2011 Mar 1;186(5):2842-9. doi: 10.4049/jimmunol.0904190

Pepper M and Jenkins MK. Origins of Cd4+ Effector and Central Memory T Cells. Nat Immunol. 2011 Jun; 12(6): 467–471

Potapinska O and Demkow U. T lymphocyte apoptosis in asthma. Eur J Med Res. 2009; 14(Suppl 4): 192–195

Prentice D. Adult stem cells in: Monitoring stem cell research: a report of the President's Council on Bioethics. Washington (DC), Government Printing Office. 2004;309–46.

Randolph GJ, Jakubzick C, Qu C. Antigen presentation by monocytes and monocyte-derived cells. Curr Opin Immunol. 2008 Feb;20(1):52-60

Refaeli Y, Van-Parijs L, Alexander SI, and Abbas AK. Interferon γ Is Required for Activation-induced Death of T Lymphocytes. J Exp Med. 2002 Oct 7; 196(7): 999–1005

Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids: new mechanisms for old drugs. N Engl J Med. 2005 Oct 20; 353(16):1711-23.

Romagnani S. The role of lymphocytes in allergic disease. J Allergy Clin Immunol. 2000 Mar; 105(3):399-408

Ross MH, Pawlina W. Histology. A Text and Atlas. With Correlated Cell and Molecular Biology, Lippincott Williams & Wilkins. 2006; 848-854, 441-453.

Saroj P, Verma M, Jha KK, Pal M. An overvıew on immunomodulatıon. J Adv Scient Res. 2012; 3(1): 07-12.

Schmidt EP and Tuder RM. Role of Apoptosis in Amplifying Inflammatory Responses in Lung Diseases. J Cell Death. 2010 Jul 20; 2010(3): 41–53

Shi M, Li J, Liao L, Chen B, Li B, Chen L, Jia H, Zhao RC. Regulation of CXCR4 expression in human mesenchymal stem cells by cytokine treatment: role in homing efficiency in NOD/SCID mice. Haematologica. 2007 Jul;92(7):897-904

Sivanathan KN, Gronthos S, Rojas-Canales D, Thierry B, Coates PT. Interferon-gamma modification of mesenchymal stem cells: implications of autologous and allogeneic mesenchymal stem cell therapy in allotransplantation. Stem Cell Rev. 2014 Jun;10(3):351-75

Spangrude GJ. When is a stem cell really a stem cell? Bone Marrow Transplantation, 2003; 32, S7-S11.

Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E. et al: Tissue distribution of the death ligand trail and it sreceptors. J Histochem Cytochem. 2004; 52(6): 821-831.

Steinman R. Some interfaces of dendritic cell biology. APMIS 2003; 111:675-97. http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0463.2003.11107802

Stephen T. Holgate and Riccardo Polosa. Treatment strategies for allergy and asthma. Nature Reviews Immunology March 2008. 8, 218-230. doi:10.1038/nri2262

Suchánek J, Soukup T, Ivancaková R, Karbanová J, Hubková V, Pytlík R, Kucerová L. Human dental pulp stem cells--isolation and long term cultivation. Acta Medica (Hradec Kralove). 2007;50(3):195-201.

Szade K, Zuba-Surma E, Rutkowski AJ, Jozkowicz A, Dulak J. CD45-CD14 +CD34 + murine bone marrow low-adherent mesenchymal primitive cells preserve multilineage differentiation potential in long-term in vitro culture. Mol Cells. 2011 Jun;31(6):497-507. doi: 10.1007/s10059-011-2176-y.

Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin HH, Brown GD. Macrophage receptors and immune recognition. Annu Rev Immunol. 2005; 23: 901-44.

Teixeira LK, Fonseca BP, Barboza BA, Viola JP. The role of interferon-gamma on immune and allergic responses. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005 Mar;100 Suppl 1:137-44

Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. Transplantation. 2003 Feb 15; 75(3):389-97

Vale-Pereira S, Todo-Bom A, Geraldes L, Schmidt-Weber C, Akdis CA, Mota-Pinto A. FoxP3, GATA-3 and T-bet expression in elderly asthma. Clin Exp Allergy. 2011 Apr;41(4):490-6. doi: 10.1111/j.1365-2222.2010.03640.x

Vousden KH, Lu X. Live orletdie: the cells respons eto p53. Nat Rev Cancer 2002; 2:594-604.

Wei L., MacDonald T.M., Walker B.R. Taking glucocorticoids by prescription is associated with subsequent cardiovascular disease. Ann. Intern. Med. 2004;141:764–770.

Wei X, Yang X, Han Z, Qu F, Shao L and Shi Y. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. Acta Pharmacologica Sinica (2013) 34: 747–754; doi: 10.1038/aps.2013.50

Yang SH, Park MJ, Yoon IH, Kim SY, Hong SH, Shin JY, Nam HY, Kim YH, Kim B, Park CG. Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. Exp Mol Med. 2009 May 31; 41(5): 315–324

Yeşilyurt E, Fidan I. Dendritik Hücreler ve Enfeksiyonlardaki Rolü. Türk Mikrobiyol Cem Derg 41(3):91-102, 2011. doi:10.5222/TMCD.2011.091

Yildirim S, Zibandeh N, Genc D, Ozcan EM, Goker K, Akkoc T. The Comparison of the Immunologic Properties of Stem Cells Isolated from Human Exfoliated Deciduous Teeth, Dental Pulp, and Dental Follicles. Stem Cells Int. 2016;2016:4682875. doi: 10.1155/2016/4682875.

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.

Yosef Refaeli, Luk Van Parijs, Stephen I. Alexander, and Abul K. Abbas. Interferon γ Is Required for Activation-induced Death of T Lymphocytes. J Exp Med. 2002 Oct 7; 196(7): 999–1005

Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations. Annu Rev Immunol. 2010;28:445-89. doi: 10.1146/annurev-immunol-030409-101212.

Zoroğlu SS, Yürekli M, Meram I, Sögüt S, Tutkun H, Yetkin O, Sivasli E, Savaş HA, Yanik M, Herken H, Akyol O. Pathophysiological role of nitric oxide and adrenomedullin in autism. Cell Biochem Funct. 2003; 21: 55-60.

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

BAŞVURU BİLGİLERİ	**PROTOKOL KODU**	09.2016.197	70737436-050.06.04-
	PROJE ADI	Dental Folikül Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin (DFSCs) Ev Tozuna Duyarlı Astım Hastalarından Elde Edilen Naive T Lenfositlerin in vitro Th1 ve Th2 Farklılaşması Üzerine Etkisi	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI/ADI	Prof. Dr. Tunç AKKOÇ	

KARAR BİLGİLERİ	Tarih : 04 /03/ 2016 Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için Kurulumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımcılar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir.

ÜYELER

Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu / EK Üyeliği	Onaylanan Proje ile İlişkisi	Toplantıya katılım	İmza
Prof.Dr. Haner DİRESKENELİ	Romatoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/ Başkan	▪ Var ▪ Yok	☐ Evet ▪ Hayır	
Prof.Dr. Tülin ERGUN	Dermatoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Başkan Yrd.	▪ Var ▪ Yok	☐ Evet ▪ Hayır	
Prof.Dr. Handan KAYA	Patoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	▪ Var ▪ Yok	☐ Evet ▪ Hayır	
Prof.Dr. M.Bahadır GÜLLÜOĞLU	Genel Cerrahi	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	▪ Var ▪ Yok	☐ Evet ▪ Hayır	
Prof.Dr. Atila KARAALP	Farmakoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	▪ Var ▪ Yok	☐ EVET ▪ HAYIR	
Prof.Dr. Semra SARDAŞ	Eczacı	M.Ü Eczacılık Fak./Üye	▪ Var ▪ Yok	☐ Evet ▪ Hayır	
Prof.Dr. Başak DOĞAN	Diş Hekimi	M.Ü Diş Hekimliği Fak./Üye	▪ Var ▪ Yok	☐ Evet ▪ Hayır	
Doç.Dr. Elif KARAKOÇ AYDINER	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	▪ Var ▪ Yok	☐ Evet ▪ Hayır	
Doç.Dr. Beste Melek ATASOY	Radyasyon Onkolojisi	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	▪ Var ▪ Yok	☐ Evet ▪ Hayır	
Doç.Dr. Meltem KORAY	Diş Hekimi	İstanbul Üniv. Diş Hekimliği Fak./Üye	▪ Var ▪ Yok	☐ Evet ▪ Hayır	
Doç.Dr. Tolga GÜVEN	Tıp Tarihi ve Etik	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	▪ Var ▪ Yok	☐ Evet ▪ Hayır	
Doç. Dr. Gürkan SERT	Hukukçu	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	▪ Var ▪ Yok	☐ Evet ▪ Hayır	
Yrd.Doç.Dr: Figen DEMİR	Halk Sağlığı	Acıbadem Üniv. Tıp Fak.	▪ Var ▪ Yok	☐ Evet ▪ Hayır	
Yrd.Doç.Dr. Pınar Mega TİBER	Biyofizik	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	▪ Var ▪ Yok	☐ Evet ▪ Hayır	
Av.Ümit ERDEM	Sağlık Mensubu olmayan kişi	Serbest	▪ Var ▪ Yok	☐ Evet ▪ Hayır	

Scanned by CamScanner

ÖZGEÇMİŞ

Adı	Deniz	**Soyadı**	Genç
Doğum Yeri	İstanbul	**Doğum Tarihi**	17.04.1975
Uyruğu	T.C.	**Tel**	05337495534
E-mail	denizdogan2000@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mezuniyet Yılı**
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans	Kadir Has Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı	2005
Lisans	Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	1999

İş Deneyimi

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**

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

Yabancı Dil Sınav Notu # 87,50 (YÖKDİL, 2017)

YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
ALES Puanı	66		
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
	Ms OFFİCE

***Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.