TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SÜT DİŞİ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER (SHED), TAM GÖMÜK YİRMİ YAŞ DİŞİ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER (DPSCs) VE DİŞ FOLİKÜLÜ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN (DFSCs) İMMÜNOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

SELİN YILDIRIM
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ALLERJİ VE İMMÜNOLOJİ BİLİM DALI

Prof. Dr. Tunç AKKOÇ

2015-İSTANBUL

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SÜT DİŞİ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER (SHED), TAM GÖMÜK YİRMİ YAŞ DİŞİ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER (DPSCs) VE DİŞ FOLİKÜLÜ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN (DFSCs) İMMÜNOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

SELİN YILDIRIM
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ALLERJİ VE İMMÜNOLOJİ BİLİM DALI

Prof. Dr. Tunç AKKOÇ

2015-İSTANBUL

TEZ ONAYI

Kurum	: Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi	: Yüksek Lisans
Anabilim Dalı	: Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları
Tez Sahibi	: Selin Yıldırım
Tez Başlığı	: Süt Dişi Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler (SHED), Tam Gömük Yirmi Yaş Dişi Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler (DPSCs) ve Diş Folikülü Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin (DFSCs) İmmünolojik Özelliklerinin Karşılaştırılması
Sınav Yeri	: Sağlık Bakanlığı Pendik Marmara Eğitim ve Araştırma Hast.
Sınav Tarihi	: 29.06.2015

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

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)	**Kurumu**	**İmza**
Prof. Dr. Tunç AKKOÇ	Marmara Üni. Tıp Fakültesi	
Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)		
Doç. Dr. Elif KARAKOÇ AYDINER	Marmara Üni. Tıp Fakültesi	
Yrd. Doç. Dr. Esra ÇAĞAVİ	Medipol Üni. Tıp Fakültesi	

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 06../07./2015 tarih ve 61. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

F. Arıcıoğlu.

Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

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

SELİN YILDIRIM

İmza

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğrenimimin ve tez çalışmamın tüm aşamalarında her türlü bilimsel desteği sağlayan, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan ve beni yönlendiren tez danışmanım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Tunç Akkoç' a, bilgi birikimi ve değerli görüşlerini özveriyle benimle paylaşan ve desteklerini esirgemeyen değerli hocam çok yakın zamanda aramızdan ayrılan rahmetli Prof. Dr. Işıl Berat Barlan' a,

Yüksek lisansım süresince, birikimleri ile yanımda olduklarını hissettiren hocalarım Sayın Doç. Dr. Elif Karakoç' a, Sayın Doç. Dr. Safa Barış' a

Tez çalışmamda kullandığım dişlerin elde edilmesinde emeği geçen Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı başkanı sayın Prof. Dr. Mehmet Kamil Göker' e ve doktora öğrencisi Elif Merve Özcan' a,

Çalışmamın her aşamasında yanımda olan, desteğini, bilgisini, deneyimini ve güler yüzünü hiç esirgemeyen canım dostum Noushin Zibandeh' e, yardımını ve bilgisini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili arkadaşım Deniz Genç' e, her zaman destekçim olan ve bu yola beraber başladığım kendisine has karakteri ile asla unutamayacağım arkadaşım Ülkü Arığ'a, bilgisini ve deneyimini daima benimle paylaşan sevgili arkadaşım İsmail Öğülür' e, bana herzaman destek oldukları için laboratuvardaki sevgili arkadaşlarım Dilek Çiçekkökü ve Özlem Karabidek'e,

Her zaman sabırla, sevgiyle bana destek veren, hep yanımda olan sevgili arkadaşım Hüseyin Eren Kılınç' a,

Tüm hayatım boyunca attığım her adımda yanımda olan, varlıkları ile bana güç veren, her şeyimi borçlu olduğum annem ve babama, bu süreçteki destek ve sabırları için sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu Başkanlığı tarafından SAG-C-YLP-050614-0225 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
TABLOLAR LİSTESİ ..... **viii**
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... **ix**
KISALTMALAR ..... **xi**
1. ÖZET **1**
2. SUMMARY **2**
3. GİRİŞ VE AMAÇ **3**
4. GENEL BİLGİLER **7**
4.1. İmmün Sistem 7
4.1.1. Doğal bağışıklık 8
4.1.1.1. Epitel tabakası 9
4.1.1.2. Fagositoz 9
4.1.1.3. Kompleman sistemi 11
4.1.1.4. Sitokinler 12
4.1.2. Edinsel bağışıklık 13
4.1.2.1. Hümoral immünite 15
4.1.2.2. Hücresel immünite 17
4.1.2.2.1. $CD4^+$ T lenfositler 18
4.1.2.2.2. $CD8^+$ T lenfositler 19
4.1.3. Apoptoz 20
4.1.4. Aşırı duyarlılık reaksiyonları 22
4.2. Kök Hücreler 23
4.2.1. Kök hücrelerin tarihçesi 24
4.2.2. Kök hücrelerin özellikleri 25
4.2.2.1. Totipotent 26

4.2.2.2. Pluripotent 26
4.2.2.3. Multipotent 27
4.2.3. Embriyonik kök hücreler 27
4.2.4. Yetişkin kök hücreler 28
4.2.4.1. Hematopoetik kök hücreler 29
4.2.4.2. Mezenkimal kök hücreler 30
4.2.4.2.1. Süt dişi kaynaklı mezenkimal kök hücreler (SHED) 33
4.2.4.2.2. Tam gömük yirmi yaş dişi kaynaklı mezenkimal kök hücreler (DPSCs) 35
4.2.4.2.3. Diş folikülü kaynaklı mezenkimal kök hücreler (DFSCs) 36
5. GEREÇ ve YÖNTEM 40
5.1. Süt Dişi, Tam Gömük Yirmi Yaş Dişi ve Diş Folikülünün Temini 40
5.2. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler 41
5.3. Çalışmada Kullanılan Hücre Kültürü Malzemeleri 43
5.4. Kullanılan Cihazlar 44
5.5. Kullanılan Solüsyonlar 45
5.5.1. MKH' lerin besiyeri ortamının hazırlanması 45
5.5.2. Anti CD2/ Anti CD3/ Anti CD28 (CDmix) uyaranının hazırlanması 45
5.5.3. IFN- γ uyaranının hazırlanması 46
5.5.4. Kollajenaz solüsyonunun hazırlanması 46
5.5.5. Alizarin red solüsyonunun hazırlanması 46
5.5.6. Oil red o solüsyonunun hazırlanması 46
5.5.7. Alcian blue solüsyonunun hazırlanması 46
5.6. Çalışmanın Ana Basamakları 47
5.6.1. Süt dişi, tam gömük yirmi yaş dişi ve diş folikülünün transport solüsyonu ile izolasyon yapılacak laboratuvara getirilmesi 50
5.6.2. Süt dişi pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu 50
5.6.3. Tam gömük yirmi yaş diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücre izolasyonu 50
5.6.4. Diş folikülü kaynaklı mezenkimal kök hücre izolasyonu 51

5.6.5. İzole edilen hücrelerin pasajlanması 51
5.6.6. İzole edilen kök hücrelerin karakterizasyonu 52
5.6.6.1. Akım sitometri analizi 53
5.6.6.2. Osteojenik farklılaştırılması 53
5.6.6.3. Adipojenik farklılaştırılması 54
5.6.6.4. Kondrojenik farklılaştırılması 55
5.6.7. Kök hücrelerin RealTime PCR ile gen ekspresyonlarına bakılması 55
5.6.8. Kök hücrelerin 48 kuyucuklu kültür plaklarına ekilmesi 57
5.6.8.1. SHED, DPSC ve DFSC hücrelerinin 48 kuyucuklu kültür plaklarına ekilmesi 57
5.6.9. Sağlıklı bireylerden alınan venöz kandan lenfosit izolasyonu yapılması . 58
5.6.10. Lenfositlerin CFSE ile işaretlenmesi 59
5.6.11. Kök hücre ve lenfositlerin ko-kültürünün yapılması 59
5.6.11.1. SHED hücreleri ile lenfositlerin ko-kültürlerinin yapılması 59
5.6.11.1.1. Hücrelerin IFN-γ ile uyarılması 60
5.6.11.2. DPSC hücreleri ile lenfositlerin ko-kültürlerinin yapılması 61
5.6.11.2.1. Hücrelerin IFN-γ ile uyarılması 61
5.6.11.3. DFSC hücreleri ile lenfositlerin ko-kültürlerinin yapılması 62
5.6.11.3.1. Hücrelerin IFN-γ ile uyarılması 62
5.6.12. Lenfositlerin proliferasyon analizi 63
5.6.13. Lenfositlerin $CD4^{+}FoxP3^{+}$ hücre analizi 64
5.6.14. Lenfositlerin Fas/Fas Ligand analizi 65
5.6.15. Hücre kültür süpernatanlarında sitokin tayini 65
5.6.16. İstatistiksel analiz 66
6. BULGULAR 67
6.1. Süt Dişi Pulpası Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu 67
6.2. Tam Gömük Yirmi Yaş Diş Pulpası Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu 68
6.3. Diş Folikülü Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu 69

6.4. Süt Dişi Pulpası Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu .. 70
6.4.1. SHED hücrelerin akım sitometri analizi 70
6.4.2. SHED hücrelerin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik yönde farklılaştırılması 71
6.5. Tam Gömük Yirmi Yaş Dişi Pulpası Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu 72
6.5.1. DPSC hücrelerin akım sitometri analizi 72
6.5.2. DPSC hücrelerin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik yönde farklılaştırılması 73
6.6. Diş Folikülü Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu 74
6.6.1. DFSC hücrelerin akım sitometri analizi 74
6.6.2. DFSC hücrelerin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik yönde farklılaştırılması 75
6.7. SHED, DPSC ve DFSC Hücrelerinin Katlanma Oranları 76
6.8. Kök hücrelerin RealTime PCR gen ekspresyon sonuçları 77
6.9. SHED, DPSC ve DFSC Hücreleri Lenfosit Proliferasyonunu İn Vitro Ortamda Baskıladı 79
6.10. SHED, DPSC ve DFSC Hücreleri Lenfosit Hücrelerindeki Fas/Fas Ligand Gösterimini Baskıladı 81
6.11. SHED, DPSC ve DFSC Hücreleri $CD4^{+}FoxP3^{+}$ Regülatör T Hücrelerini Arttırdı 85
6.12. SHED, DPSC ve DFSC Hücreleri Lenfosit Hücrelerinden Salgılanan IL-4 ve IFN-γ Sitokin Miktarını Azaltırken IL-10 Sitokin Miktarını Arttırdı 87
7. TARTIŞMA ve SONUÇ 90
8. KAYNAKLAR 100
9. ÖZGEÇMİŞ 119

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 6.1. SHED, DPSC ve DFSC hücrelerinin akım sitometrik analizlerinin karşılaştırılması 76

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 5.1. Çalışmanın ana basamaklarının şematik gösterimi..... 49
Şekil 5.2. DFSC hücrelerinin 48 kuyucuklu plaklara ekilmesinin şematik gösterimi. 57
Şekil 5.3. DPSC hücrelerinin 48 kuyucuklu plaklara ekilmesinin şematik gösterimi. 57
Şekil 5.4. SHED hücrelerinin 48 kuyucuklu plaklara ekilmesinin şematik gösterimi. 57
Şekil 5.5. SHED hücreleri üzerine CFSE' li ve CFSE' siz lenfosit hücrelerinin ve CDmix, IFN-γ uyaranlarının eklenmesinin şematik gösterimi. 60
Şekil 5.6. DPSC hücreleri üzerine CFSE' li ve CFSE' siz lenfosit hücrelerinin ve CDmix, IFN-γ uyaranlarının eklenmesinin şematik gösterimi. 62
Şekil 5.7. DFSC hücreleri üzerine CFSE' li ve CFSE' siz lenfosit hücrelerinin ve CDmix, IFN-γ uyaranlarının eklenmesinin şematik gösterimi. 63
Şekil 6.1. SHED hücrelerinin morfolojik görünümü. 67
Şekil 6.2. DPSC hücrelerinin morfolojik görünümü. 68
Şekil 6.3. DFSC hücrelerinin morfolojik görünümü. 69
Şekil 6.4. SHED hücrelerinin immunofenotipik özelliklerinin akım sitometri sonuçları. 70
Şekil 6.5. SHED hücrelerinin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma özellikleri..... 71
Şekil 6.6. DPSC hücrelerinin immunofenotipik özelliklerinin akım sitometri sonuçları. 72
Şekil 6.7. DPSC hücrelerinin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma özellikleri..... 73
Şekil 6.8. DFSC hücrelerinin immunofenotipik özelliklerinin akım sitometri sonuçları. 74
Şekil 6.9. DFSC hücrelerinin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma özellikleri..... 75
Şekil 6.10. SHED, DPSC, DFSC hücrelerinin katlanma oranları. 76

Şekil 6.11.SHED hücrelerinin eksprese ettiği genlerin GAPDH genine göre ifadesi 77
Şekil 6.12. DPSC hücrelerinin eksprese ettiği genlerin GAPDH genine göre ifadesi 78
Şekil 6.13. DFSC hücrelerinin eksprese ettiği genlerin GAPDH genine göre ifadesi 78
Şekil 6.14. SHED, DPSC ve DFSC hücrelerinin lenfosit hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki immün baskılayıcı etkisi..... 80
Şekil 6.15. SHED, DPSC ve DFSC hücrelerinin lenfosit hücrelerindeki Fas (CD95) gösterimi üzerine etkisi. 82
Şekil 6.16. SHED, DPSC ve DFSC hücrelerinin lenfosit hücrelerindeki Fas Ligand (CD178) gösterimi üzerine etkisi. 84
Şekil 6.17. SHED, DPSC ve DFSC hücrelerinin CD4+FoxP3+ T regülatör hücreleri üzerine etkisi. 86
Şekil 6.18. SHED, DPSC ve DFSC hücrelerinin lenfosit hücrelerinden IL-4 sitokin salgılanması üzerine etkisi. 87
Şekil 6.19. SHED, DPSC ve DFSC hücrelerinin lenfosit hücrelerinden IL-10 sitokin salgılanması üzerine etkisi. 88
Şekil 6.20. SHED, DPSC ve DFSC hücrelerinin lenfosit hücrelerinden IFN-γ sitokin salgılanması üzerine etkisi. 89

KISALTMALAR

APC	: Antigen sunucu hücre
CFSE	: Karboksi floresan süksinimidil ester
DMEM	: Dulbescco's modified eagle's medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DFSC	: Diş folikülü kaynaklı mezenkimal kök hücre
DPBS	: Dulbecco's phosphate buffered saline
DPSC	: Tam gömük yirmi yaş dişi kaynaklı mezenkimal kök hücre
FBS	: Fötal sığır serumu
FoxP3	: Forkhead box p3
HKH	: Hematopoetik kök hücre
IFN	:İnterferon
MHC	: Majör histokompatibilite kompleks
MKH	:Mezenkimal kök hücre
NK	: Doğal öldürücü hücre
PBMC	: Periferal kan mononüklear hücre
PDLSC	: Periodontal ligament kaynaklı mezenkimal kök hücre
RPMI	: Roswell park memorial institute
SHED	: Süt dişi kaynaklı mezenkimal kök hücre
TCR	: T hücre reseptörü
Th	: Yardımcı T hücre
TNF	: Tümör nekroz faktör
Treg	: Regülatör T hücre

1. ÖZET

Süt Dişi Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler (SHED), Tam Gömük Yirmi Yaş Dişi Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler (DPSCs) ve Diş Folikülü Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin (DFSCs) İmmünolojik Özelliklerinin Karşılaştırılması

Öğrencinin Adı: Selin YILDIRIM
Danışmanı: Prof. Dr. Tunç AKKOÇ
Anabilim Dalı: Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

Amaç: Bu çalışmada ağız bölgesinde üç ayrı kaynaktan izole edilen mezenkimal kök hücrelerin immün sistem hücreleri üzerindeki etkilerinin karşılaştırmalı olarak araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Süt dişi, gömük yirmi yaş dişi ve diş folikülünden mezenkimal kök hücre izolasyonları, karakterizasyonları ve RealTime PCR analizleri yapıldı. Sağlıklı bireylerin venöz kanlarından periferal kan mononüklear hücreler izole edildi. Lenfositlerin MKH' lerle birlikteIFN-γ uyarımlı ve uyarımsız koşullardaanti CD2- anti CD3- anti CD28 uyarımı ile 3 gün kültürleri yapıldı. Kültür sonrasında lenfosit proliferasyonu, $CD4^{+}FoxP3^{+}$ T regülatör hücre, Fas/FasLigand, kültür süpernatantlarında IL-4, IL-10 ve IFN-γ düzeylerine bakıldı.

Bulgular ve Sonuçlar: Sonuç olarak bu araştırmada SHED, DPSCs ve DFSCs' nin hem karakterizasyon özellikleri hem de immün sistem hücreleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Elde edilen bulgular ile DFSCs' nin kolay izole edilebildiğini, hızla çoğalabildiğini ve farklışma yeteneklerinin diğer hücrelere oranla daha belirgin olduğunu göstermektedir. DFSC, SHED ve DPSC' lerinin, lenfositlerin proliferasyonunu baskıladığı, regülatör hücre oluşumuna destek verdiği, apoptozu baskıladığı ve IL-4, IFN-γ sitokin düzeylerini baskılayıp, IL-10 sitokin düzeyini arttırdığı görüldü. Bununla birlikte DFSC' lerin immünmodülasyonu diğer hücrelere göre daha etkili ve anlamlı yaptığı görüldü. Bu sonuçlar doğrultusunda IFN-γ uyarımlı DFSC' lerin immün sistemin, otoimmün, inflamatuar ve allerjik hastalıkların tedavi yaklaşımlarında immünomodülatör fonksiyonlarındaki hücreler olarak kullanılmasının uygun olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: DFSC, DPSC, İmmünmodülasyon, İmmün Sistem, SHED

2. SUMMARY

The Comparision of Immunologic Properties of Stem Cells Isolated from Human Exfoliated Deciduous Teeth, Dental Pulp and Dental Follicle

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

Aim: The aim of this study is to investigate the comparative effect of mesenchymal stem cells that were isolated from human exfoliated deciduous teeth, dental pulp and dental follicle on lymphocytes.

Method: Mesenchymal stem cells were isolated of three different sources from orofacial region and, characterizated, RealTime PCR analysis performed. PBMC isolation was done from healthy individual's venous blood. Lymphocytes were co-cultured with stem cells in the presence and absence of IFN-γ and stimulated with anti CD2- anti CD3- anti CD28 for 3 days. At the end of this time, lymphocyte proliferation, CD4 + FoxP3 + T regulatory cells, Fas / Fas ligand, IL-4, IL-10 and IFN-γ levels in culture supernatant were measured.

Results and Conclusions: As a result of our research, both characterization properties of SHED, DPSCs, DFSCs and their effects on immun system were investigated. The results are shown that isolation, proliferation and differentiation of DFSC's are most effective than the other cells. SHED, DPSCs, DFSCs suppress lymphocytes proliferation and apoptosis, support the formation of $CD4^{+}FoxP3^{+}$ lymphocytes, suppress IL-4, IFN-γ cytokine levels and increase the levels of the IL-10 cytokine in culture. In accordance with these results, we suggest that IFN-γ stimulated DFSCs could be appropriate to use as immunomodulatory cells in inflammatory autoimmune and allergic diseases treatment.

Keywords:DFSC, DPSC,Immunomodulation, Immune System,SHED

3. GİRİŞ VE AMAÇ

İmmün sistem yabancı maddelere karşı koruyan önemli bir savunma sistemidir. Bu sistem çeşitli hücre ve moleküller üretir, bunlar yabancı ve istenmeyen maddelerin sınırsız çeşitlerini tanıyabilme ve ortadan kaldırabilme yeteneğine sahiptirler. İmmün sistemin düzenlenmesi, immün yanıtta herhangi bir değişikliği ifade edebilir. İmmün yanıtın herhangi bir bölümünün veya fazının baskılanması veya büyütülmesi, anlatılması ve uyarılmasını kapsayabilir. Böylece immün sistem üzerindeki etkilerine göre alt gruplara ayrılır. İki tür immünomodülatör vardır; immünosüpresanlar ve immünostimülatörler. Bunlar tümör veya patojenlere karşı savunma veya immün yanıt verebilme yeteneğine sahiptirler. İmmün sistem birbirine bağımlı birçok hücre tipinden oluşmaktadır ve bunlar konağı bakterilerden, parazitlerden, mantarlardan, tümör hücrelerinin büyümesinden ve virüs enfeksiyonlarından korurlar. Bu hücre tiplerinin birçoğu özel fonksiyonlara sahiptir. Bu hücreler bakterileri yutabilir, parazitleri, tümör hücrelerini veya virüs enfekte hücreleri öldürebilirler.

İmmün sistem, bireyin çevresindeki milyonlarca mikroorganizmaya karşı konağı iki şekilde korur. Yabancı maddenin vücuda girmesiyle ilk koruyucu engel, doğal (innate) immün cevap ve daha sonra patojene özgül olarak gelişen edinsel (adaptive) immün cevaptır. Doğal immün cevap doğuştan kazanılmış bağışıklıktır. Patojen yada hasarlara karşı oluşan ilk yanıtta immün sistemin hücreleri (doğal öldürücü hücreler, fagositler, sitokinler (TNF, IL-1, IL-12, IFNγ), komplemanlar) bariyer görevi görür ve konak savunmasını sağlar. Edinsel immün yanıta benzemez, yanıtlar benzerdir ve bellek hücreleri oluşmaz.Edinsel immün cevap doğal immün cevaptan farklıdır, organizmaya özgüdür ve bellek hücreleri bulunur. İki tür edinsel immün cevap vardır: 1) Hümoral immünite, burada antijenler ile B lenfositlerin uyarımı ve antikor üreten plazma hücrelerine dönüşümü gerçekleşir. 2) Hücresel immünite burada T lenfosit hücreleri görev alır, yardımcı T hücreleri ve sitotoksik T hücreleri baskın rol oynar (Saroj ve ark., 2012).

T ve B lenfositleri edinsel immün yanıtı kapsarlar. T lenfositleri farklı efektör fonksiyonları bulunan hücre yüzey proteinlerine göre gruplandırılır. Sitotoksit T

hücreleri CD8 eksprese ederler ve hücre ölümüne yol açan, yabancı bir antijen salgılayan hücreleri, apoptoz programını aktive ederek öldürmekten sorumludurlar. Yardımcı T hücreleri yüzeyleri üzerinde CD4 eksprese ederler ve spesifik sitokinlerin salgılanması ile $CD8^+$ T lenfositlerin, B lenfositlerin ve makrofajlarınaktivasyonlarına yardım ederler. $CD4^+$ T hücrelerinin alt grubu olan T regülatör (Treg) hücreleri vücudu otoimmün yanıttan korur. Treg hücreleri sitokinden bağımsız hücre temaslı T hücre aktivasyonunu baskılar.B lenfositler antikor sentezleyen plazma hücrelerine farklılaşarak yabancı antijenlere karşı antikor üretirler. Antikorun tek türünü üretir ve bu antikorlar bir kez aktive olur, antijene özgül immün yanıt gerçekleşir. B hücreler T hücrelerine antijen sunarlar ve salgıladıkları sitokinler ile immün düzenleme yaparlar (Inman ve ark., 2014).

T hücre immün yanıtında normal T hücreler ve regülatör T hücreler dengeli bir şekilde görev almaktadır. Birkaç T regülatör hücre populasyonu tanımlanmıştır ve bunların tümü kendi öz antijenlerini savunmada anahtar rol oynar. Tregülatörhücreleri oluşum sürecine göre ikiye ayrılır. Timus kökenli olanlara doğal Tregülatörhücreleri (tTreg veya nTreg) denir ve bu hücreler timus bezinde gelişir, $CD4^+$ veya $CD8^+$ hücrelerden bir antijene temas sonucu gelişenlere ise uyarı kökenli ya da indüklenmiş Tregülatör hücreler (iTreg) denir (Jethwa ve ark., 2014). tTreg hücreleri FoxP3 transkripsiyon faktörünü eksprese ederler ve bu hücrelerin başlıca görevi inflamasyona göçü sağlamak ve çeşitli efektör lenfositleri özellikle T yardımcı hücre alt gruplarını (Th1, Th2, Th17) baskılamak (Ohkura ve ark., 2013).

Naif T yardımcı hücreler gelen sinyal molekülleri ile farklı efektör fonksiyonları olan alt gruplara farklılaşırlar, bu konak immün sistemi için önemli bir işlemdir. T yardımcı (T helper) hücreleriTh1, Th2 hücreleri, Th17 hücreleri ve diğer T yadımcı hücre alt grupları olan Th22 ve Th9 olarak alt gruba ayrılır. Bunlardan Th1 hücreleri IFN-γ üretirler, Th2 hücreleri IL-4, Th17 hücreleri IL-17 sitokinini Th22 hücreleri IL-22, Th9 hücreleri IL-9 sitokinini üretirler (Eyerich ve ark., 2014). Naif T hücresi mikroplar tarafından aktive edilmiş makrofaj ve dendritik hücrelerden salınan IL-12 varlığında Th1 hücresine dönüşür ve mikropları öldürmesi için fagositik aracılı sindirimi aktive eden IFN-γ salgılar. Th1 hücreleri tarafından üretilen karakteristik sitokin IFN-γ'dır. Bu hücreler tümör nekroz faktör (TNF) de üretirler. Th1 hücrelerinin inflamasyon bölgesine makrofajların toplanması ve B hücreleri

tarafından üretilen immünoglobülin G2a nın uyarılması gibi efektör görevleri vardır. Naif T hücresi aktif T hücreleri veya başka hücresel kaynaklardan salgılanan IL-4 varlığında Th2 hücresine farklılaşırlar ve bu hücreler IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 sitokinlerini salgılarlar. Th2 hücreleri edinsel immünitede, hücre dışı parazitlere karşı konak savunmasında, B hücrelerinde IgE ve IgG1'e dönüşümde ve eozinofillerin güçlendirilmesinde rol alırlar. Düzensiz Th2 hücre yanıtları allerjik hastalıklar ile bağlantılıdır örneğin allerjik astım. Th2 hücre yanıtı baskın immün aracılı hastalıklar üzerine mezenkimal kök hücrelerin etkisi ile ilgili az sayıda çalışmalar yapılmıştır (Duffy ve ark., 2011). 2011 yılında yapılmış olan bir çalışmada mezenkimal kök hücrelerin IgE uyarımını baskıladığı, IL-13 ve IL-4 üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir (Kavanagh ve Mahon, 2011).

Kök hücreler, özelleşmiş hücrelerdir, iki özellik ile karakterize edilir; kendilerini yenileyebilme ve birçok soya farklılaşabilme özellikleri. Kök hücreler bu özellikleri ile hücresel tedavi ve rejeneratif tıp için ideal bir kaynaktır (Neuss ve ark., 2004).Kök hücreler, embriyonik kök hücreler ve yetişkin kök hücreler olmak üzere iki geniş kategoriye ayrılırlar.Embriyonik kök hücreler pluripotent hücrelerdir ve hemen hemen bir çok hücre tipine farklılaşabilme yeteneğindedir ve ayrıca farklılaşmadan da sınırsız olarak çoğalabilirler.Embriyonik kök hücrelerin kullanımıyla ilgili etik sorunlar nedeniyle, son olarak yetişkin dokulardan türetilen kök hücreler üzerine odaklanılmıştır. Yetişkin kök hücreler, embriyonik kök hücreler ile kıyaslandığında farklılaşma potansiyellerinin daha sınırlı olduğu düşünülmektedir (Suchanek ve ark., 2010).

Mezenkimal kök hücreler (MKH), yetişkin multipotent kök hücrelerdir.Bu hücreler kendilerini yenileyebilme, mezenkimal ve mezenkimal olmayan olgun hücre soylarına farklılaşabilme yeteneğindedirler örneğin, yağ dokusu, kemik, kıkırdak ve sinir hücreleri. MKH' ler farklı hücrelerden izole edilebilmektedir. Bu hücreler arasında kemik iliği, diş ve adipoz dokusu sayılabilir. MKH' ler yüzeylerinde kendilerine özgü olan CD73, CD90, ve CD105 proteinleri eksprese ederler, CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79, HLA-DR proteinlerini eksprese etmezler (Neuss ve ark., 2004).

Dişden 4 farklı yerden MKH izole edilebilmektedir. Bunlar, tam gömük yirmi yaş dişi pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücreler (DPSCs) (Gronthos ve ark.,

2000), insan süt dişi kaynaklı mezenkimal kök hücreler (SHEDs) (Miura ve ark., 2003), periodontal ligament kaynaklı mezenkimal kök hücreler (PDLSCs) (Tarle ve ark., 2011), dental folikül kaynaklı mezenkimal kök hücreler (DFSCs) (Mori ve ark., 2012). DPSCs yetişkin insan diş pulpasından izole edilir ve bunların odontoblast/osteoblastlara, adipositlere ve nöral hücrelere farklılaşabildiği gösterilmiştir. Bu hücreler CD73, CD90 ve CD105 olan mezenkimal kök hücre belirteçlerini yüzeylerinde eksprese ederler (Gronthos ve ark., 2000). SHED insan süt dişi pulpasından izole edilir ve bu hücreler osteojenik/ odontojenik hücrelere, adipositlere ve nöral hücrelere farklılaşma kapasitesine sahiptir (Miura ve ark., 2003). PDLSCs insan periodontal ligamentinden izole edilir ve mezenkimal kök hücre belirteçlerini eksprese ederler (Tarle ve ark., 2011). DFSCs dişlerde odontoblast, sementoblast, osteoblast ve diğer hücrelere farklılaşabilme kapasitesine, yüksek proliferasyon potansiyeline ve immünmodülasyon özelliklerine sahip multipotent kök hücreler olan mezenkimal dokulardan elde edilirler (Mori ve ark., 2012).

Son yıllarda, mezenkimal kök hücrelerin akut ve kronik hastalıklarda terapötik ajanlar olarak potansiyel kullanımı dikkat çekmektedir.Yapılan çalışmalarda bu hücrelerin, T ve B hücre, doğal öldürücü hücre (NK) ve dentritik hücre (DH) gibi doğal ve edinsel bağışıklık hücreleri üzerinde immünmodulasyon etkilerinin olduğu gösterilmiştir.MKH'ler aracılığıyla oluşan inhibisyon etkisinin altında yatan mekanizması henüz tamamen anlaşılamamıştır. Hücre-hücre temasının ve çözünebilir faktörlerin birlikte immünbaskılamayı sağladıkları düşünülmektedir (Kapoor ve ark., 2011).

Biz bu çalışmamızda SHED, DPSCs ve DFSCs' in immün sistem hücreleri üzerine etkisini araştırmayı amaçladık. Böylece, SHED, DPSCs ve DFSCs' in ko-kültür uygulamalarıyla sağlıklı bireylerden alınan venöz kandan PKMH izolasyonu sonucu elde edilen hücrelere uygulanarak hücreler üzerindeki immünolojik etkilerinin ve immün sistem mekanizması üzerinde nasıl rol aldığının karşılaştırmalı olarak araştırılması planlanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda kök hücrelerin immünolojik hastalıkların tedavisinde yeni opsiyon olup olmayacağı hakkında bize fikir vermiş olacaktır, böylece çalışmamızın sonuçları da literatüre önemli katkıda bulunacaktır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. İmmün Sistem

Bağışıklık sistemi karmaşık bir savunma sistemidir vevücudu istilacı ajanlardan korur. Bu sistem yabancı ve istenmeyen ajanların tanınması ve ortadan kaldırılması yeteneğine sahip çeşitli hücre ve moleküller üretebilirler. İmmün sistemin düzenlenmesi, immün yanıtta herhangi bir değişikliği ifade edebilir, bu immün yanıtın herhangi bir bölümünün veya fazının baskılanması veya büyütülmesi, anlatılması ve uyarılmasını kapsayabilir. İmmünmodülasyon, immün sistem üzerindeki etkilerine göre iki gruba ayrılır; immün sistemi baskılayanlar ve immün sistemi uyaranlar. Bunlar immün yanıtda veya tümör ve patojenlere karşı savunmada görev alır. İmmünofarmakoloji farmakolojinin nispeten yeni ve gelişmekte olan bir branşıdır. Klinik tıpta immünomodülatörlerin potansiyel olarak kullanımı mevcuttur, örneğin AİDS tedavisinde, aşı reddinde otoimmün hastalıkların tedavisinde.Spesifik immünomodülatörler, immünolojik adjuvanlar olarak bilinen antijenler ile birlikte aşı bileşenlerine karşı immün yanıtı arttırmada kullanılırlar. Örneğin mantarda üretilen cyclosporine T lenfositlerin fonksiyonlarını baskılamada ve aşı yanıtını engellemede kullanılır (Bomford, 2010).

İmmünite potansiyel olarak zararlı mikroorganizmaların tanınması ve onlara karşı vücudun direnebilme yeteneğidir. Bu yetenek vücutta organ ve doku hasarını engeller, bulaşıcı hastalığı önler veya onunla savaşır. İmmün sistem vücudun herhangi bir bölümü ile sınırlı değildir. İmmün kök hücreleri kemik iliğinde oluşur, olgunlaşmaya kadar kemik iliğinde kalabilir veya vücudun farklı bölgelerine göç edip orada olgunlaşabilirler. Olgunlaşmadan sonra çoğu immün hücreleri vücutta dolaşıp spesifik etkiler gösterir (Sharma ve ark., 2011).

İmmün sistem hücreleri kemik iliğinde bulunan hematopoetik kök hücrelerden gelişir. Bu hücreler, sitokin ve hormon gibi uyarıcı moleküllerin etkisiyle myeloid veya lenfoid hücrelere farklılaşırlar. Myeloid hücreler; monositler gibi agranülositlerden ve nötrofil, bazofil, eozinofil gibi granülositlerden oluşur. Monositler kemik iliğinde oluştuktan sonra kan dolaşımına girerler ve buradanda

dokulara geçerler, dokularda monositler makrofajlara dönüşür ve her tür dokunun kendine özgü makrofajları vardır. Lenfoid hücreler; T hücreleri, B hücreleri ve doğal öldürücü hücrelerden (natural killer-NK) oluşur. T hücreleri kemik iliğinde oluştuktan sonra timus adlı organda olgunlaşır, B hücreleri ise kemik iliğinde olgunlaşır. Olgunlaşan hücreler kan dolaşımına katılarak dalak ve lenf nodları gibi sekonder lenfoid organlara yerleşirler.

İmmün sistemin savunma mekanizması iki şekilde gerçekleşmektedir. Birincisi, yabancı maddenin vücuda girmesiyle ilk koruyucu engeli oluşturan, tanıyıp yıkıma uğratmak için organizmada hazır olarak bulunandoğal immün cevaptır. İkincisi, herhangi bir patojenle karşılaştıktan sonra patojene özgül olarak gelişen doğal immün cevabı takiben ortaya çıkan ve daha etkili savunma sağlayan edinsel immün cevaptır.

Doğal immün cevabınyapı taşları fagositik hücreler (nötrofiller, makrofajlar), dendritik hücreler, doğal öldürücü hücreler, kan proteinleri, kompleman sistemi ve sitokinlerdir.

Edinsel immün cevabın yapı taşları T ve B lenfositleridir. T hücreleri hücresel immüniteden, B hücreleri ise hümoral immüniteden sorumlu hücrelerdir (Alagbe ve ark., 2008).İmmün sistemde istilacı organizmalarla savaşmaya yardımcı ve birbiriyle örtüşen iki ayrı mekanizma vardır; hücre aracılı savunma (hücresel immünite), antikor aracılı savunma (hümoral immünite). Hücresel immünite, birçok lökositin etkileşimlerinden, faaliyetlerinden ve yaptıklarından oluşur. Hücre aracılı immünite T hücre bağımlıdır ve edinsel immün yanıttan sorumludur. T hücreler spesifik bir antijen ile ilk temasından sonra duyarlı hale gelirler. Hümoral immünitede B lenfositler görevlidir ve yabancı maddeye karşı dolaşımda antikor üretirler. İmmünitenin bu tipi antijen antikor yanıtı üzerine dayalıdır (Susan ve Sally, 2009).

4.1.1. Doğal bağışıklık

Doğal bağışıklık sistemi,erken savunma sistemidir.İnflamasyon sürecinde enfeksiyonun olduğu bölgeye hemen gelebilen ve vücutta daima sunulan immün hücrelerinden oluşmaktadır (Cassatella, 1999).Doğal bağışıklıkta hücresel ve biyokimyasal savunma mekanizmaları bulunur. Bu mekanizmalar mikroplara ve

hasarlı hücrelerin ürünlerine karşı savunur ve bunlar tekrarlayan enfeksiyonlara aynı şekilde cevap verirler.Doğal bağışıklığın yapıtaşları 1) fizyolojik ve kimyasal bariyerler örneğin; epitel ve epitel doku yüzeyinden üretilen antimikrobiyal kimyasallar, 2) fagositik hücreler (nötrofiller, makrofajlar), dendritik hücreler ve doğal öldürücü hücreler, 3) kompleman sistemi, 4) sitokinlerdir. Doğal bağışıklığın mekanizmaları mikroplar üzerindeki ortak yapıları tanırlar, mikroplar arasındaki ince farklılıkları ayırt edemeyebilirler (Abbas ve ark., 2012).

4.1.1.1. Epitel tabakası

Dış ortamdaki mikroplar ve sağlam epitel yüzey fiziksel bariyer arasında konak dokudan ve epitel hücrelerden antimikrobiyal kimyasallar üretirler ve bu şekilde daha fazlamikrobun içeri girişini engellerler. Deri ve sindirim, solunum ve ürogenital sistemlerinin mukozal yüzeyleridevamlı epitel hücreleri ile kaplıdır ve mikropların girişinin engellenmesi gibi birçok fizyolojik görevi vardır. Travma veya diğer nedenler ile bu epitel bütünlüğünün kaybı olması durumunda vücut enfeksiyon girişine uygun hale gelir. Deri yüzeyindeki keratinositler ölerek birikir ve mikropların epidermis katmanının daha derinine girmesine engel olur. Mukus yoğun olarak salgılanır ve müsin olarak adlandırılan glikoprotein içerir. Mukus solunum, sindirim ve ürogenital sistemler tarafından üretilir ve fiziksel olarak mikrop saldırısını azaltır. Epitel hücrelerininyanı sıra bazı lökositler antimikrobiyal özelliklere sahip peptidler üretirler. 2 tane yapısal olarak farklı olan antimikrobial peptid vardır bunlar defensins ve cathelicidins. Defensins, mukozal yüzeydeki epitel hücreleri tarafından, doğal öldürücü hücreler, sitotoksik T lenfositler ve nötrofiller tarafından üretilirler. Cathelicidins, nötrofiller ve deri, sindirim sistemi, solunum sistemindeki epitel bariyerlerden üretilir (Abbas ve ark., 2012).

4.1.1.2. Fagositoz

Fagositik hücrelerden nötrofiller ve makrofajlar, mikroplara karşı savunmadaenfeksiyon bölgesine ilk olarak giderek orada mikroorganizmaları tanırlar ve içlerine alırlar ve öldürerekfagositik fonksiyonlarını gerçekleştirirler.Dolaşımda

polimorf nüklear lökositler olarak adlandırılan nötrofiller beyaz kan hücre popülasyonunun çoğunu oluşturur ve inflamatuar reaksiyonların erken fazını oluşturur. Nötrofiller kemik iliğindeüretilir ve her yetişkin insan günde $1x10^{11}$ den fazla nötrofil üretir, bunların her biri kanda yaklaşık 6 saat dolaşır.Mikropların girişinden sonra saatler içinde nötrofiller enfeksiyon bölgesine göç ederler, eğer inflamasyonbölgesine göç etmezlerse apoptoza uğrarlar, karaciğer ve dalaktaki sabit makrofajlar tarafından fagosite edilirler (Abbas ve ark., 2012).

Mononüklear fagosit sistemi hücrelerinin asıl görevi fagositozdur, doğal veedinsel immünitede merkezi rol oynarlar. Bu hücreler kemik iliğinde üretilirler, sonrasında dolaşıma geçerler ve orada olgunlaşıp çeşitli dokularda aktive olurlar**.**Monositler; fagositoz yetenekleri,T lenfositlerine antijen sunumu, interlökin-1 (IL-1), interlökin(IL-6) ve tümör nekrozfaktör-α (TNF-α) üretirler ve bu sebeple immün yanıtın önemli bir hücre alt grubudur (Zoroğlu ve ark., 2003). Monositler vücuttan bakterilerin ve parazitlerin uzaklaştırılması için oldukça önemlidir (Saroj ve ark., 2012). Monositler dokulara girdikten sonra olgunlaşırlar ve makrofajlara dönüşürler. Farklı dokulardaki makrofajlara belirli yerlerini belirlenmesi için özel isimler verilmiştir.Örneğin; merkezi sinir sisteminde makrofajlar mikrogliyal hücreler olarak adlandırılır, karaciğerde kupffer hücreleri, pulmoner solunum yolunda alveolar makrofajlar olarak, kemikte çok çekirdekli fagositler osteoklast olarak adlandırılırlar (Abbas ve ark., 2012). Makrofajlarimmün yanıtın düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. Bunlar genellikle süpürücü veya antijen sunan hücreler olarak adlandırılır çünkü bunlar yabancı maddeleri yakalarlar ve yutarlar bu antijenleri T ve B lenfositleri gibi immün sistemin hücrelerine sunarlar.Bu immün yanıtın başlaması için önemli bir ilk adımdır (Saroj ve ark., 2012). Hücresel ve hümoral immün yanıtta lenfositler ve makrofajlar sıkı iletişim halindedirler. T hücreleri devreye girmeden önce makrofajlar hızlı bir koruyucu mekanizma sağlarlar (Ross ve Pawlina, 2006). İmmün sistemin bileşenleri tarafından uyarılan makrofajlar, TNF-α ve IL-1 gibi sitokinler salgılayarak fagositik hücrelerin sistemik aktivasyonunu, endotel adezyonununartışını ve bunların iltihaplı dokulara geçişini hızlandırır (Taylor ve ark., 2005).

Dendritik hücreler kemik iliği kaynaklı ve antijen sunan hücrelerdir. Aslında dendritik hücreler makrofajlardan daha etkili antijen sunan hücrelerdir. Bu hücreler

genellikle timüs, lenf nodu ve dalak gibi lenfoid organların yapısal bölümlerinde bulunur. Aynı zamanda vücudun diğer organlarında ve kan dolaşımında da bulunur.Dendritik hücreler antijenleri yakalarlar ve lenfoid organlara getirirler. Doğal bağışıklığın anahtar hücresel bileşeni dendritik hücrelerdir (DH). Derideki Langerhans hücrelerini de içeren bu hücreler, hücre dışı antijenleri yavaşça bir fagosite eder ve antijen sunucu hücre gibi davranıp antijeni T lenfositlere sunarlar (Saroj ve ark., 2012).

Kemik iliğinde, T ve B lenfositler ile ortak bir kök hücre grubundan kaynaklanan doğal öldürücü hücreler, büyük granüllü vehücreleri öldürmeye programlanmışhücrelerdir. Hedef hücreleri tanımaları ile birlikteürettikleri perforin ve fragmentinlersayesinde hedef hücre membranında kanallar açarak apoptozla hücreninölümüne neden olurlar (Abbas ve ark., 2007). Antikor veya antijenik bir uyarıma gerek duymaksızın hedef hücreyi öldürebilme yeteneğindedirler. Virüs ile enfekte hücrelerin öldürülmesinde ilk olarak NK hücreleri devreye girerler. NK hücreleri yüzeylerinde iki tip reseptör eksprese ederler; CD16, CD56. Bu yüzey molekülleri ile NK hücreleri akım sitometri cihazında gösterilebilinir (Deniz, 2007).

4.1.1.3. Kompleman sistemi

Doğal bağışıklık sisteminin ve hümoral immünitenin önemli bir parçası olan kompleman sistemi, herhangi bir uyarım sonrasında aktive olan ve uyaranın ölümüne yol açacak inflamatuar yanıtı harekete geçiren plazma proteinlerinden oluşur (Walport, 2001). Efektör moleküllerin yanı sırabir dizi düzenleyici proteini de içeren sistemin yapıtaşları üç ana yolaktan (klasik, alternatif ve lektin yolakları) aktifleştiğinde, aktive olan her komponent, bir sonraki yapıtaşını uyarıp, biri enzimatik, diğeri biyolojik etkinliğe sahip iki alt gruba parçalanmasına yol açar. Böylece bir şelale gibi, sıralı olarak aktifleşen sistemin işleyişinde her üç yolağın farklı ve benzer işleyiş aşamaları bulunur. Kompleman sistemi, doğal immün cevap kapsamında ele alınsa da, edinsel immün cevabın düzenlenmesinde de rol oynar (Ricklin ve ark., 2010). Klasik yolak antikorların mikroorganizmalara ya da başka antijenlere bağlanmaları sonucu uyarılır. Bu mekanizma edinsel bağışıklıkda hümoral immün yanıtta değerlendirilir. Alternatif yolak doğal bağışıklıkta

değerlendirilir. Bazı kompleman proteinleri mikroorganizmaların yüzeylerinde aktive olur. Lektin yolak bir plazma proteinin mikroorganizmaların belirli bir bölgesine bağlanması sonucunda aktive olur ve bu yolak içerisinde antikor bulundurmadığı için doğal bağışıklıkta değerlendirilir. Kompleman sistemi aktive olduktan sonra hücre membranında polimerik bir protein kompleksi oluşur. Bu kompleks ile membranda hücre içerisine su ve iyon giriş çıkışını sağlayan bir delik oluşur ve böylece mikroorganizmanın ölümü gerçekleşmiş olur (Abbas ve ark., 2007).

4.1.1.4. Sitokinler

Mikroorganizmalar tarafından uyarılan makrofajlar ve diğer hücreler tarafından salgılanan hücresel reaksiyonları yönlendiren proteinlere sitokin denir. Sitokinler ağırlıklı olarak lökositler tarafından sentezlendikleri ve lökositlere etki ettikleri için sitokinlerin büyük bir bölümüne interlökin denilmektedir. Doğal immün cevap kapsamında değerlendirilen sitokinlerin büyük bir kısmı mikroorganizmalar tarafından uyarılmış makrofajlar tarafından sentezlenir. Edinsel immün cevapta ise sitokinler genellikle yardımcı T lenfositler tarafından üretilir (Abbas ve ark., 2007).

Sitokinler, immünomodülatör moleküller ve bağışıklık sinyal faktörü olarak tanımlanan, lenfositlerin klonal çoğalmalarında, efektör hücrelerin görevlerini yapmalarında, doğal ve edinsel bağışıklığın en etkili biçimde yapılanmasında rol oynayan moleküllerdir. Başlıca sitokinlerin ortak özellikleri; aynı sitokin farklı hücreler tarafından üretilip, farklı tip hücreler üzerine etki gösterebilecekleri gibi (pleiotropizm), tek bir hücrenin farklı etkilere sahip değişik sitokinleri sentezlemesi de söz konusudur. Sitokinler arasında direkt anti-viral aktiviteye sahip IFN'lerin ayrı bir önemi vardır. Üç gruba ayrılan IFN'ler (tip 1, 2 ve 3) dendritik hücreler, T lenfositleri ve NK hücreleri gibi immün sistem hücrelerinin uyarılmaları sonucu sentezlenirler. IFN'lerin anti-viral etkileri dışında makrofajları ve NK hücrelerini uyarmak gibi önemli görevleri de bulunur (Akira ve ark., 2006).

TNF; Makrofajlar ve T hücreleri tarafından salgılanır, bazı hücrelerde apoptozu uyarır, inflamasyonu uyarır, karaciğerde akut faz proteinlerinin sentezinde ve nötrofillerin aktivasyonunu uyarır. IL-1; makrofajlar, endotelyal ve epitelyal hücreler tarafından salgılanır, inflamasyonun uyarılması ve karaciğerde akut faz proteinlerinin

sentezinde görev alır. IL-12; makrofajlar ve dendritik hücreler tarafından salgılanır, NK hücreleri ve T hücrelerinden IFN-γ salgılanmasını sağlar, T hücrelerin Th1 hücrelerine farklılaşmasını uyarır. IFN-γ; NK hücreler ve T hücreler tarafından salgılanır, makrofajların aktivasyonunu ve antikor yanıtlarını uyarır. Tip 1 interferonlar; IFN-α makrofajlar, IFN-β fibroblastlar tarafından sentezlenir, NK hücrelerin aktivasyonunu uyarır. IL-10; makrofajlar ve T hücreler (Th2) tarafından sentezlenir, IL-12 salgılanmasını baskılar. IL-6; makrofajlar, T hücreler ve endotelyal hücreler tarafından salgılanır, B hücrelerinde antikor yapan hücrelerin çoğalmasını uyarır, karaciğerde akut faz proteinlerin sentezini sağlar. IL-15; makrofajlar tarafından salgılanır, NK hücrelerin ve T hücrelerin çoğalmasını uyarır. IL-18; makrofajlar tarafından salgılanır, NK hücreleri ve T hücrelerinden IFN-γ sentezini uyarır (Abbas ve ark., 2007).

4.1.2. Edinsel bağışıklık

Yabancı maddenin vücuda girmesiyle ilk koruyucu engel, doğal bağışıklık ve daha sonra patojene özgül olarak gelişen edinsel (adaptive) bağışıklıktır. Antijenin yakalanması ve lenfoid organlara transportu edinsel immün cevabı başlatan ilk aşamadır.İki tür edinsel bağışıklık sistemi vardır: Birincisi vücut, saldırgana karsı globulinyapısında dolaşan antijen ile reaksiyona giren antikorlar oluşturur.Bu antikorlar immunoglobulin (Ig) olarak adlandırılırlar. Bu tip bağışıklık hümoral bağışıklık adını alır. İkincisi aktif olan lenfositler yabancı saldırganı yok etmeye yöneliktir. Bu tip bağışıklık hücre aracılı bağışıklık adınıalır(Alberts ve ark., 2008).

Konağın immün sistemi kendisi enfeksiyonu geçirerek ya da aşılama ile (aktif bağışıklık) veya daha önce enfeksiyonu geçirmiş ve bağışıklık kazanmış bireylerden alınan antikor ve lenfositler bireye verilerek (pasif bağışıklık) güçlendirilebilir. Bir mikrobun antijeni ile karşılaşan konak o mikroba karşı yanıt oluşturur ve aynı mikrop ile bir sonraki karşılaşması içindirenç geliştirir. Bu şekilde mikrop ile karşılaşmış olan konak direnç oluşturmuşken, mikrop ile hiç karşılaşmamış birey naif kalır. Aktif bağışıklık uzun sürelidir fakat pasif bağışıklık kısa sürelidir. Pasif bağışıklıkta naif birey mikroba karşı direnç oluşturmuş bireyin hücrelerini taşıdığı sürece enfeksiyona karşı savaşabilir. Bu nedenle pasif bağışıklık birey yanıt

oluşturana kadar oldukça etkilidir ancak uzun süreli direnç sağlamaz (Abbas ve ark., 2007).

T hücre cevapları ile B hücre cevaplarıarasında iki önemli fark vardır. Birincisi; Thücreleri çevresel lenfoid organlarda, ancak antijen sunan hücreler tarafından antijen sergilenirse çoğalır ve etkili hücrelere farklılaşmak üzere uyarılır. T hücrelerininbu şekilde bir yanıt geliştirmelerinin sebebi, tanıyabildikleri antijenlerin Bhücrelerinden farklı olmasıdır. B hücreleri bütün halindeki protein, lipid, karbonhidrat ve nükleik asit yapısındaki antijenleri tanırken, T hücreleri antijen sunan hücreler tarafından içinde kısmen parçalanmış olan, peptid yapıdaki antijen parçalarınıtanır. Antijene ait peptid parçaları T hücrelerinedoğrudan majör histokompatibilite kompleksi(MHC) proteinleri ile sunulur. İkinci farklılık ise, bir kereetkinleştiğinde T hücrelerinin ya ikincil lenfoid organ içinde ya da göç etmiş olduğuenfeksiyon merkezinde, ancak kısa mesafelerde etkili olabilmeleridir. Buna karşın, aktifleşmişB hücreleri kendi bulundukları yerdenuzak mesafelerde de etkili olabilen antikorları üretirler (Hall ve Guyton, 2007).

MHC molekülleri protein yapıdaki antijenlerin peptidleriniT lenfositlerine tanımaları için gösteren membran proteinleridir. T lenfositlere peptid yapısındaki antijeni sunan iki MHC sınıfı vardır bunlar sınıf I ve sınıf II MHC molekülleri. Sınıf I MHC molekülünde T hücre eş reseptörü CD8’ in bağlanma bölgesi bulunur. T lenfosit aktivasyonu T hücre reseptörünün(TCR) MHC ile gösterilen peptid yapıdaki antijeni tanımasını ve aynı zamanda T hücre eş reseptörünün MHC ile bağlanması gerektirir. Bu sebeple $CD8^+$ T lenfositleri yalnızca CD8’ in bağlanabileceği sınıf I MHC moleküllerinin gösterdiği peptid yapıdaki antijenlere yanıt verebilir.Sınıf II MHC moleküllerinde T hücre eş reseptörü CD4’ ün bağlanma bölgesi bulunur. CD4 yalnızca sınıf II MHC molekülerini bağladığı için $CD4^+$ T hücreleri yalnızca sınıf II MHC moleküllerince sunuluna peptid yapıdaki antijenlere yanıt verebilir. Sınıf I MHC molekülleri peptid yapıdaki antijenleri sitozolik yapıdaki proteinlerden edinirken, sınıf II MHC molekülleri peptid yapıdaki antijenleri hücre içi veziküllerde bulunan proteinlerden edinir (Abbas ve ark., 2007).

4.1.2.1. Hümoral immünite

İmmün sistemde mikroplarla savaşmaya yardımcı ve birbiriyle örtüşen iki sistem vardır. Bunlardan birincisi hümoral immünite, ikincisi hücresel immünite. Hümoral immünitede görevli spesifik lenfosit B lenfosittir. B lenfositler yabancı bir maddeye karşı dolaşımda antikor üretirler. B lenfositlerinin temel fonksiyonu bakteri, virüs ve tümör hücrelerinin yabancı proteinlerine karşı yanıtta antikor üretmektir (Saroj ve ark., 2012).Her bir B lenfosit antikorun bir türünü üretir ve bir kez aktive olur, 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 dalak, lenfoid foliküller, lenf düğümleri ve mukozal lenfoid dokularda bulunan antijene özgün B lenfositlerin antijeni tanıyıp çoğalmasıile başlar, antikor salgılayan effektör hücrelere dönüşmesi ve bellek hücrelerini oluşturması ile de sonuçlanır. Plazma hücreleri ve bellek hücreleri kemik iliğine göç ederek orada bulunurlar ve aynı antijenle tekrarlayan karşılaşmalarda enfeksiyona karşı daha hızlı, erken ve etkili savunma sağlarlar.

Hümoral immünite deB lenfositleri, protein yapılı antijenler dışında çok çeşitli molekülleri tanıdığı ve onlara özgül antikorlar ürettiği için polisakkarid yapılı ve kapsüllü mikroorganizmalara karşı hücresel immüniteden daha önemli bir savunma gerçekleştirir (Abbas ve ark., 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 farklıdır. T hücre bağımsız antijenlere karşı bellek hücresi oluşmadığı için sekonder immün yanıt primer immün yanıta benzer şekilde oluşur ve IgM yapısında antikor üretilir. Fakat T hücre bağımlı antijenlere karşı primer immün yanıt sırasında bellek hücreleri oluştuğu için, aynı antijenle bir sonraki karşılaşmada gelişen sekonder immün yanıt, primer immün yanıttan daha güçlüdür ve yüksek afiniteli IgG yapısında antikor üretilir. Protein yapısındaki antijenlerle tekrarlayan karşılaşmaları sonucunda antikorun afinitesi artar (Karsunky ve ark., 2008).

Edinsel immün sistemin önemli bir üyesi olan B lenfositler, kemik iliğinde hematopoetik kök hücrelerden ve sonra lenfoid progenitör hücreden gelişirler (Jefferis ve ark., 2006).

Kemik iliğinde işlevselliğini kazanamayan hücreler apoptozis (programlanmış hücre ölümü) ile ölürken işlevselliğini kazanan hücreler ise olgunlaşarak kan yoluyla lenf düğümleri, dalak, mide-bağırsak sistemi, solunum yolları gibi sekonder lenfoid organlara göç ederler. Bu organların başlıca görevleri lenfosit ve yabancı antijenlerin karşılaşmalarını sağlamaktır. Periferik kandaki lenfositlerin %15- %20' si B lenfositlerdir. Dolaşıma salınan B lenfositler dinlenme halindedirler ve uyarılmadıkları sürece işlev göstermezler ve bölünmezler. B lenfositleri antikor sentezleyen plazma hücrelerine farklılaşarak yabancı antijenlere karşı özgül immün yanıt oluştururlar, T hücrelerine antijen sunarlar ve salgıladıkları sitokinlerle immün sistemi düzenlerler (Muşabak, 2011). Aynı zamanda salgıladıkları antikorlarla, mikropların ve tümör hücrelerinin opsonizasyonunu sağlarlar ve bu şekilde, kompleman sisteminin aktivasyonunda ve toksin nötralizasyonunda görev yaparlar. Böylece doğal immün cevabın güçlendirilmesine ve sitotoksik hücrelerin etkilerini göstermesine yardımcı olurlar (Karsunky ve ark., 2008).B lenfosit yüzeyine bağlı antikorlar aynı zamanda antijenlerin tanınması için reseptör görevide yaparlar. Bir antikor molekülünde birbirine eş iki ağır (heavy-H) ve iki hafif (light-L) zincir bulunur,her bir hafif zincir de bir değişken (variable-V) ve bir sabit (constant-C) bölge bulunur, her bir ağır zincirde de bir V, üç ya dadört C bölge bulunur. Aralarındaki farkları C bölgesinde olan ve işlevleri farklı olmayan κ ve λ diye adlandırılan iki çeşit hafif zincir, yine farklılıkları C bölgesinden kaynaklanan ve μ, δ, α, γ, ε diye adlandırılan beş çeşit ağır zincir vardır. Antikor molekülünde her iki tip hafif zincirden biri, beş tip ağır zincirden biriyle kompleks oluşturur ve bir antikor molekülünü oluşturur, bu antikor molekülünün adlandırılması hafif zincirlerden bağımsız oluşur ve ağır zincir tiplerine göre sırasıyla IgM, IgG, IgD, IgE, IgA şeklinde yapılır (Abbas ve ark., 2007).

4.1.2.2. Hücresel immünite

Bu bağışıklık tipi hücre içi mikroplara karşı savaşta rol oynayan edinsel immün yanıtın bir parçasıdır (Abbas ve ark., 2007). İmmünitenin bu tipi T lenfositler ile gerçekleşir. Hücresel immünitenin yapıtaşı olan T lenfositleri kemik iliğinde oluşur ve timusta olgunlaşır.T lenfositleri belirli bir bölgede yerleşmezler doku ve kan arasında dolaşırlar. T lenfositler belirli bir antijen ile ilk karşılaşmasından sonra duyarlı hale gelirler (Saroj ve ark., 2012). T lenfositleri farklı efektör fonksiyonları ile bağlantılı, hücre yüzey proteinlerine göre gruplara ayrılır. Sitotoksik T lenfositler CD8 eksprese ederler ve hedef hücrenin apoptoz programını aktive ederek yabancı antijen eksprese eden hücrelerin ölümüne yol açarlar. Yardımcı T lenfositler yüzeylerinde CD4 eksprese ederler vespesifik sitokinlerin salgılanması yolu ile $CD8^+$ T lenfositlerin, B lenfositlerin ve makrofajların aktivasyonuna yardımcı olurlar. Böylece hem doğal hemde edinsel immün yanıtın ikisinde de görev alırlar. $CD4^+$ T lenfositlerinin bir alt grubu olan Treg' ler otoimmün yanıttan vücudu korur. Treg' ler sitokinlerden bağımsız, hücre teması bağımlılığı ile T lenfosit aktivasyonunu baskılar (Inman ve ark., 2014).

T lenfositler periferik kandaki tüm lenfositlerin % 70-80' ini oluştururlar ve immün bağışıklığı başlatan antijene spesifik cevap oluştururlar. Lökositlerin aktivitelerini düzenlerler. Genel olarak hücresel immün bağışıklığın oluşmasından sorumludurlar (Abbas ve ark., 2007).T lenfositler, yabancı antijenleri, TCR olarak adlandırılan yüzey proteinleri ile tanırlar. TCR' leri, Ig' lerle fonksiyonel ve yapısal olarak oldukça benzerdirler. TCR' leri hiçbir zaman sekrete edilmezler ve hedefleriyle uzakmesafelerde etkileşmezler (Kierszenbaum ve Tres, 2012). T lenfositler bunun yerine etkilerini direkt hücre temasıyla yada diğer immün sistem hücrelerininhareketlerini etkileyerek gösterirler. T hücreleri peptid yapıdaki antijenleri tanırlar bu sebeple yabancı bir proteini tanıması için bu proteinin öncelikle peptidlerine ayrılması ve antijen sunucu hücrelerce (APC) sunulması gerekmektedir.Bütün konak hücreler gerektiğinde antijen sunabilirler fakat bazı hücreler antijen sunumu için adapte olmuşlardır ve T hücrelerin aktivitelerinin kontrolünde önemli rol oynarlar. Monositler, dendritik hücreler ve B lenfositler antijen sunucu hücrelerdir (Ross ve Pawlina, 2006).

Periferik kanda ve sekonder lenfoid organlarda bulunan tüm T lenfositler, yüzeylerinde CD2 ve CD3 markerlarını eksprese ederler. Bütün $CD2^+CD3^+$ T lenfositler, fenotipik işaretleyicileri ve fonksiyonlarına göre altgruplarına ayrılır. Yüzeylerinde eksprese ettikleriCD4 ve CD8 adıverilen proteinler ile önemli iki T hücre alt grubu belirlenir. Fonksiyonel olan T lenfositler bunlardan yalnızca birini taşırlar ve bu hücre fonksiyonu ileyakından ilişkilidir (Ross ve Pawlina, 2006).

4.1.2.2.1. $CD4^+$ T lenfositler

$CD4^+$ T lenfositler yardımcı T lenfositler olarak da adlandırılır. T lenfositlerin antijenlere karşı yanıt oluşturmasında önemli rolleri vardır. TCR' ye sınıf II MHC molekülünün bağlanması T yardımcı hücrelerden sitokinlerin salgılanmasını uyarır. Bu sitokinlerde diğer yardımcı T hücrelerinin 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 sağlarlar. İki farklı T lenfosit alt grubu bulunur bunlar Th1 ve Th2 hücrelerine göre iki gruba ayrılır. Th1 ve Th2 hücrelerinin gelişimi naif $CD4^+$ T hücrelerinin mikrobiyal antijenlerle karşılaştığı zaman aldığı uyarı tarafından düzenlenir. Th1 hücreleri makrofajlar, sitotoksik T lenfositler ve B hücrelerini aktifleştirirken, Th2 hücreleri ise B hücrelerini aktifleştirir. Regülatör T hücreler $CD4^+$ T hücrelerin %5- %10' unu oluştururlar. Bu hücreler öz antijenlere veya yabancı antijenlere karşı T lenfositler ile ilişkili konak immün yanıtları baskılar (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. (Abbas ve ark., 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, viral enfeksiyonları inhibe eder, makrofajları aktive eder ayrıca antikor izotiplerinin üretimini uyararak fagositozu aktifleştirir. Th1 hücreleri fagositoz aracılığıyla sindirimi ve mikropların öldürülmesini aktifleştirmiş olur (Abbas ve ark., 2007).

Th2 profili IgE içeren antikorların fazla üretimi ile karakterize hastalıklarla ilgilidir. APC' den IL-12 salgılanmaz ise, T lenfositler IL-4 salgılarlar ve $CD4^+$ T hücrelerinin $CD4^+$ Th2 yönüne doğru farklılaşmasını uyarırlar. Th2 hücreleri IL-4 ve IL-13 salgılayarak IgE antikorunun üretimini, IL-5 salgılayarak ise eozinofilleri uyarır. Bu hücreler özellikle helmintik parazitlere karşı eozinofil aracılığıyla fagositozdan bağımsız immüniteyi aktifleştirir (Abbas ve ark., 2007). IL-4, IL-5, IL-6 salgılayan Th2 hücreleri B hücrelerini IgM, IgE sentezine yöneltir ve hümoral immün cevap ve allerjik reaksiyonlardan sorumludur ayrıca salgıladıkları IL-10 ile Th1 tip ile oluşan aşırı inflamasyonu baskılar (Nelson, 2004).

Regülatör T hücreler insan periferal kanında bulunan $CD4^+$ T hücrelerin %5-%10' unu oluştururlar. Bu hücreler öz antijenlere veya yabancı antijenlere karşı T lenfositler ile ilişkili konak immün yanıtları baskılar. Treg hücreleri kanser hücrelerine ve otoimmün hastalıklara karşı immün yanıtı baskılamada önemli rol oynar.Düzenleyici T hücreler oluşum şekillerine göre ikiye ayrılır. Direkt olarak timus kökenli olanlara doğal Treg hücreleri denir, $CD4^+$ veya $CD8^+$ hücreler tarafından uyarım sonrası salgılananlara ise iTreg denir. $CD4^+$ Treg hücreler 5 ayrı gruba ayrılır. Treg ve iTreg hücreleri $CD4^+$ $CD25^+$ $FoxP3^+$ fenotipine sahiptirler. İmmün sistemi baskılayıcı etkilerini IL-10 ve TGF-β salgılayarak gösterirler. İmmün sistemi baskılayan bir sitokin olan TGF-β' ya maruz kalan naif T hücreleri Foxp3 eksprese ederler ve regülatör T hücrelerinin indüksiyonunu sağlarlar. IL-6 ise TGF-β aracılı $Foxp3^+$ regülatör hücre indüksiyonunu inhibe eder (Gallimore ve Godkin, 2008).

4.1.2.2.2. $CD8^+$ T lenfositler

$CD8^+$ T lenfositler sitotoksik T hücreler olarakda adlandırılır. Sitotoksik T hücreler mikroorganizmaları ve bazen de vücudun kendi hücrelerini öldürebilen hücrelerdir. Bu sebeple bu hücrelere öldürücü hücreler denir. Sitotoksik T hücreler üzerinde bulunan reseptör proteinleri, özgül oldukları antijeni taşıyan hücreye bağlanmalarını sağlayarak, bağlandıkları hücreyi öldürmektedir. Bağlanmadan sonra sitotoksik T hücreleriperforin adı verilen delik açıcı proteinleri salgılarlar. Bu proteinler ile saldırılan hücrelerin zarında büyük yuvarlak delikler oluştururlar. Bu

delik ile birlikte hücre içerisine hücreler arası sıvı hızla dolar. Aynı zamanda sitotoksik T hücreleri saldırdığı hücre içine sitotoksik maddeler salgılar. Hemen ardından saldırılan hücre şişip hızla erir. Sitotoksik T hücreler kanserli hücrelerin yok edilmesinde önemli rol oynar (Hall ve Guyton, 2007). $CD8^+$ T lenfositler sınıf I MHC molekülü tarafından sunulan peptid yapıdaki antijenleri tanırlar (Fitch ve ark., 1993).

$CD8^+$ Treg hücreleri iki gruba ayrılır; T süpresör hücreler (Ts) ve IL-10 üreten $CD8^+$ T hücreler. Ts hücreler $CD8^+$ $CD28^-$ fenotipine sahiptirler ve immün sistemi baskılayıcı etkisini hücre-hücre kontağı yoluyla gerçekleştirirler. IL-10 üreten $CD8^+$ T hücreleri ise $CD8^+$ $IL\text{-}10^+$ fenotipine sahip olup immün sistemi baskılayıcı etkisini IL-10 eksprese ederek sitokin aracılı olarak gerçekleştirirler (Gallimore ve Godkin, 2008).

Baskılayıcı T hücreleri hem sitotoksik hem de yardımcı T hücrelerinibaskılayabilmektedir. Bu hücreler bağışıklık sisteminin aşırı reaksiyon vermesiniengellemektir. Çoğalmaya başlayıp faaliyete geçtikten sonra yardımcı hücrelerin sayısı belirli bir düzeye ulaşınca baskılayıcı T lenfositleri devreye girer ve göreviniyapar (Keeton ve ark., 2000).

4.1.3. Apoptoz

Vücudumuzdaki her hücre belirli sürelerde yaşar zamanı geldiğinde de ölür. Hücre ölümüyle hücre çoğalması arasında kontrollü bir denge vardır. Apoptoz terimi ilk kez 1972'de Avustralyalı bir patolog tarafından tanımlanmıştır (Kerr ve ark., 1978). 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.

Embriyonik dönemde memelilerde el ve ayak parmak arasındaki ara dokunun kalkmasında, kan damarı sayısının azalmasında ve merkezi sinir sisteminde apoptoz görülür. Kurbağalar da metamorfozda kuyrukları apoptoz ile kaybolur (Vaux ve ark., 1999; Franz ve ark., 1997). Postnatal hayatta apoptoz görülen olaylar; menstruasyon sırasında endometriyumun tabakasının dökülmesi, deri hücreleri bazal tabakada

oluşup üst tabakaya doğru göç ederler ve son olarak canlıyı dış etkenlerden koruyan deri tabakası için apoptoza uğrayıp ölmesi, dişilerin sütten kesildikten sonra meme bezlerinde apoptoz olması (Marti ve ark., 2001; Ford 2001). Patolojik durumlarda da apoptoz diyabet, parkinson hastalığı, alzaymır hastalığı, bağışıklık hastalıkları, tümör oluşumu, AIDS, organ transplantasyonların da görülür (Blanch ve ark., 1999; Hughes ve Gorospe, 1991;Kannan ve Jain, 2000).

Ölüm tipi olan 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 zar ile sarılı olarak apoptotik cisimciklere ayrılır. Bu apoptotik cisimcikler makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir (Bellamy ve ark., 1995; Ellis ve ark., 1991).

Apoptozun düzenlenmesinde birkaç molekül, proteinler ve mitokondriyonlar rol oynar. Apoptoz süresince hücre içerisine kalsiyum girişi olur. Hücre ölümünde 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 hücre yaşamını devam ettirmek 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; Smaili ve Su, 2000).

Apoptozun indüklenmesinde görevli bir diğer faktör P53 transkripsiyon faktörüdür. 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. 3 tip kaspaz vardır; Başlatıcı kaspaz, efektörkaspaz, inflamatuar kaspaz. Kaspazlar hücrenin keseciklere ayrılmasına sebep olurlar (Adams ve Cory, 1991; Adrain ve Martin, 2001; Spierings ve ark., 2004).

Apoptozun iki mekanizması vardır; mitokondrial yol ve ekstrinsik yol. Apoptoz hücre içerisinde PH azalması, Ca düzeyinin artması, hücre döngü bozukluklar ve DNA hasarı gibi hücre içi olaylar ile uyarılabilir. Hücre dışında ise, büyüme ve üreme faktörlerinin azlığı, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ve dış etkenler apoptozu uyarır (Smaili ve Su, 2000).

Apoptoz ile nekroz birbirinden ayrı olaylardır. 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 buda nekrozun ayırt edici bir özelliğidir (Golstein ve Kroemer, 2007; Nicotera ve ark., 2004).

4.1.4. Aşırı duyarlılık reaksiyonları

İmmün yanıtın asıl amacı organizmanın korunmasıdır. Bazen immün yanıt patojen veya antijene göre vücuda daha çok zarar verir. Bu şekilde gelişen reaksiyonlar aşırı duyarlılık reaksiyonları olarak adlandırılır. 4 tip aşırı duyarlılık reaksiyonu vardır. Tip I anafilaktik (Ani aşırı duyarlılık), Tip II antikor bağımlı sitotoksik, Tip III immün kompleksler ile oluşan, Tip IV geç reaksiyonlar (Kılıçturgay, 1997).

Tip I ani aşırı duyarlılık reaksiyonu saman nezlesi, besin allerjisi, astım ani aşırı duyarlılık reaksiyonlarının en sık görülenlerdir (Abbas ve ark., 2007). Bu bağışıklıkta antijene karşı IgE antikoru üretilir ve bu antikor mast hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanır. Antijen ile ikinci karşılamada reseptörlerdeki IgE antikoru ve antijen arasında çapraz bağ oluşması ile mast hücreleri ve bazofillerin degranülasyonu gerçekleşir (Saroj ve ark., 2012).

Tip II aşırı duyarlılık reaksiyonu bireyin kendi antijenleri ile antikorlarının bağlanması sonucu oluşur. Bu aynı zamanda antikor bağımlı aşırı duyarlılık olarak da adlandırılır ve IgG, IgM antikorları ile bağlantılıdır. Kompleman sistemi aktivasyonu gerçekleşir. Bu tip reaksiyonlar uyuşmayan kan gruplarından kan transferi gibi durumlarda ve Rh (Rhesus) uyuşmazlığında ortaya çıkar. Bu durumda annenin antikorları plasenta ile bebeğe geçer ve bebeğin alyuvarlarını yok eder.

Tip III aşırı duyarlılık reaksiyonu kan dolaşımı sırasında bulunan mikroorganizma ve antikorlar arasında kompleksler oluşmasıyla gelişir. Oluşan kompleksler vücutta değişik dokularda toplanırlar. Nötrofiller komplekslerin toplandığı bölgeye giderler. Fagositoz ile nötrofillerin ölümü sonrasında dokuları parçalayan lizozom enzimleri salınmış olur. Bu aşırı duyarlılık reaksiyonları SLE (systemic lupus erythematosus) gibi otoimmün hastalıklarda görülür.

Tip IV aşırı duyarlılık reaksiyonları, gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonudur ve 2 yada 3 gün arasında gelişir, antikor tepkisinden çok hücre merkezli bir tepkidir. Bu aşırı duyarlılık reaksiyonu monositler, T hücreler ve makrofajlarla bağlantılıdır. Bu aşırı duyarlılık reaksiyonuna en güzel örnek graves hastalığıdır (Saroj ve ark., 2012).

4.2. Kök Hücreler

Kök hücreler özelleşmemiş hücrelerdir ve bu hücrelerin her biri yeni spesifikhücre fonksiyonları ile özelleşmiş hücrelere dönüşebilirler. Bu hücreler, uygun şartlarda farklılaşmadan sınırsız sayıdabölünebilme, kendilerini yenileyebilme ve doku onarımında ve homeostazda çok önemli rol oynayan en az bir farklı hücre tipine dönüşebilme yeteneğindedirler (Spangrude, 2003).Kök hücreler farklılaşabilme yeteneklerine göre totipotent, pluripotent yada multipotent olarak sınıflandırılırlar. Totipotent kök hücreler, canlı bir hayvanın uterusuna implante edildiğinde tam bir organizmayı oluşturabilir. Pluripotent kök hücreler, ekstra embriyonik dokular (örneğin plasenta) dışında bir organizmanın her hücresinin oluşmasına nedenolabilir. Multipotent kök hücreler,yetişkin kök hücrelerdir ve sadece hücrelerin belirli soylarını üretebilirler. Bu hücreler harsalı bir bölgeye çağırıldığında kendilerini yenilerler, hücre bölünmesine uğrarlar bir öncü ve bir

progenitör hücre oluşur (Nadig, 2009).Doku rejenerasyonunun anlaşılması ilekök hücre biyolojisi önemli bir alan haline gelmiştir, travmatik yaralanmaların ve yaşamı tehdit eden patolojik durumların (kalp iskemisi, spinal kord yaralanması, Parkinson hastalığı) tedavisinde çok güçlü bir kaynaktır (Choi ve ark., 2012).Kök hücrelerin iki ana tipi belirtilmiştir, embriyonik kök hücreler ve postnatal veya yetişkin kök hücreler. Embriyonik kök hücreler blastosistten oluşurlar. Yetişkin kök hücreler dokularda bulunan kendini yenileyebilen multipotent hücrelerdir. Kök hücreleri diğer vücut hücrelerinden ayıran özellikler vardır, birincisi normal vücut hücreleri sınırlı sayıda çoğalabilirlerken veya hiç çoğalamazlarken kök hücreler sınırsız sayıda çoğalabilirler. İkincisi vücut hücreleri bir işi yapmak için özelleşmişlerdir fakat kök hücreler özelleşmemiş hücrelerdir. Üçüncüsü vücut hücreleri bir başka hücre tipine farklılaşamazlar fakat kök hücreler belirli sinyaller ile farklı hücre tiplerine farklılaşabilirler, özelleşebilirler (Nadig, 2009).

4.2.1. Kök hücrelerin tarihçesi

Alman bilim adamı Carl Rudolph Wirchow 1800’ lü yılların başında “Omnis cellula e cellula” (Tüm hücreler başka hücrelerden gelişir) yaklaşımında bulunmuştur (Pittenger ve ark., 1999). Henüz 1868 yılında ünlü alman biyolog Ernest Haeckel’ nin bilimsel çalışmalarında kök hücre terimi görülmüştür (Haeckel, 1868).1909 yılında rus histolojist Alexander Maksimov tarafından kök hücreterimi bilimsel kullanım için önerilmiştir.Alexander Maksimov bir lenfositin morfolojik görünümü ile hematopoietik kök hücrelerin varlığını önermiştir. 1960’ lı yıllarda Kanadalı bilim adamları tarafından kök hücre üzerinde araştırmalar yapılırken kök hücre ile ilgili bilgiler ortaya çıkmıştır (Becker ve ark., 1963). O yıllarda kemik iliğimizde bulunan bir grup hücrenin kan sistemini oluşturan hücreleri yaptığının belirlenmesi ile kök hücre terimi ortaya çıkmıştır(Santos ve Willenbring, 2007). Ülkemizde ilk hücre kültürü çalışması Ord. Prof. Dr. SüreyyaTahsin Aygün'e aittir. Aygün 1971 yılında yaptığı bir çalışma ile hücrenin gücünden bahsetmiştir. İnsan ömrünü uzatmanınyolunun doğum sonrasında atılan plasentalarda, kordon hücrelerinde olduğunu söylemiştir (Çetiner, 2006).1998 yılında Thomson ve arkadaşları insan embriyonik kök hücrelerinitüp bebekyöntemiyle laboratuar koşullarında elde edilen

embriyonlardan araştırma amaçlı bağışlanmış olanlarından ayrıştırdılar. Bu hücreleri uzun süre boyuncalaboratuarda çoğalttılar ve farklı uyaranlarla in vitro olarak ektoderm, endoderm, mezoderm kökenli değişik vücuthücrelerine dönüşmelerini sağladılar. Sonrasında yapılan birçok çalışmada, bu hücrelerin vücudumuzdaki neredeyse tüm hücre çeşitlerine dönüştürülebilecekleri bulundu(Thomson ve ark., 1998). MKH tanımı ise 1999 yılında Pittenger ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Onlara göre kök hücreler, kemik iliği kaynaklı osteoblastlara, adipositlere ve kondrositlere farklılaşabilen fibroblastik hücrelerdir (Pittenger ve ark., 1999).

4.2.2. Kök hücrelerin özellikleri

Kök hücreler farklı hücre tiplerine dönüşebilirler ve kendilerini yenileyebilirler. Kök hücreler; özelleşmemiş hücrelerdir ancak sinyallere göre özelleşmiş hücrelere dönüştürülebilirler, hasarlı dokuyu yeniden işlev görecek şekilde düzeltebilirler, çok fazla sayıda farklılaşmamış hücreler oluşturabilirler, uygun olan ortama yerleşebilirler (Herzog ve ark., 2003). 2001 yılında Leipzig' de buluşan Doku Kök Hücreleri Çalışma Grubu kök hücrelerebir dokuya aitfakat işlevsel olarak farklılaşmamış ve potansiyel olarak heterojen hücrelerdirdemişlerdir. Bir hücreyi, kök hücre olarak tanımlamak için beş gerekli ölçüt vardır:

1. Kök hücreler uzun zaman boyunca kendilerini yenileyebilirler ve bölünebilirler. Hücrelerin bölünebilme yeteneklerini kromozomların uç kısmında yer alan telomer adını alan DNA zincirleri belirler. Telomerler kromozomların yapısal olarak bütünlüğünün korunmasını sağlarlar. Fakat her bölünme sırasında telomerik uçlardan bir miktar DNA kaybedilir. Telomeraz enzimi telomer tekrar dizilerini kromozomun 3' ucuna takarak kısalmayı önler. Somatik hücreler birçok bölünmeden sonra telomerde kısalmalar gerçekleşince bölünme aktivitelerini kaybederler. Embriyonik kök hücrelerin ve germ tümörü hücrelerinin telomeraz aktivitesinin, bu hücrelerin sınırsız bir şekilde kendilerini yenileyebilme özelliklerinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. MKH' larda, telomerlerin boyunun aynı kalmasına yetecek kadar telomeraz üretilmektedir (Bayık, 2004)

2. Kök hücreler her hangi bir dokuya özgün olarak özelleşmemiş hücrelerdir. Bu hücrelere belirli sinyaller verilerek özelleştirilebilirler.

3. Kök hücreler farklılaşabilme yeteneğindedirler. Kök hücreler somatik 3 germ tabakasına farklılaşabildiklerinden; totipotent, pluripotent ve multipotent olarak sınıflandırılırlar (Morst, 2006).

4. Kök hücreler hasarlı dokulara nakledildiklerinde çevre dokuların tekrar çoğalabilmesini sağlamaktadır.

5. Kök hücreler in vivo olarak doku hasarının olmadığı durumda bile nakledildikleri dokularda farklılaşmamış diğer hücrelere yardımcı olabilirler. (Loeffler veRoeder, 2002).

4.2.2.1. Totipotent

Sperm ve yumurta hücresi birleştiğinde yani döllenme gerçekleştiğinde oluşan zigot tek başına tüm organizmayı meydana getirebilecek genetik bilgiye sahiptir. Bu hücrelere her şeyi yapabilen yani totipotent hücreler denir. Bu hücreler zigot evresinde 8 hücreli blastomerde bulunan sınırsız olarak farklılaşabilen hücrelerdir. Embriyo ve embriyo dışı membran ve organların kaynağını oluştururlar. Memeli canlılarının gelişiminde döllenen yumurta hücresi erişkin bir vücutta yer alan tüm hücre tiplerine dönüşebilmektedir. Üstün farklılaşabilme ve çoğalabilme yetenekleri sayesinde bir organizmayı oluşturabilme yeteneğindedirler. Totipotent özellikteki embriyonik kök hücrelerin bu yetenekleri döllenmeden sonraki 5. günekadardır (Blau ve ark., 2001).

4.2.2.2. Pluripotent

Döllenmeden sonraki 5. günde hücreler blastosist denilen küresel şekil alır. Bu küre içindeki hücreler vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilme kapasitesine sahip olsalarda tek başlarına tüm organizmayı oluşturamazlar. Bu hücrelere pluripotent hücreler denir ve vücuttaki 200 kadar hücre çeşidine farklılaşabilirler.Pluripotent hücreler, mezodermal (kemik, kas, kan, kıkırdak gibi), ektodermal (nöron, deri, saç gibi) ve endodermal (hepatositler, pankreatik beta hücreleri, sindirim sistemi hücreleri gibi) hücrelere farklılaşabilirler. Pluripotent kök hücrelerin vücuttaki tüm hücreleri oluşturabilme potansiyelinden dolayı gerçek kök hücreler olduğu düşünülmektedir. Fare embriyolarında 3,5 günde pluripotent özellikteki

hücreleryaklaşık 32 hücredenoluşmaktadır. Fakat bu hücrelerin pluripotent olma özellikleri çok kısa sürede kaybolmaktadır. Yaklaşık olarak 4. günde blastosel sıvı ile dolar ve iç hücre yığınındabulunan hücreler farklılaşıp endodermi oluştururlar bu hücrelere hipoblast denir. İlk farklılaşmadansonra hala pluripotent olmaözelliğini koruyan yaklaşık 20 hücreye epiblast hücreleri denir.Beşinci günde 20-25 tane iç hücre yığını epitelyal kılıfı oluştururlarken, hipoblasttanviseral endoderm oluşmaktadır. Embriyonun 6,5. gününde ise arka bölgede gastrulasyonbaşlayarak mezoderm, endoderm ve ektoderm katmanları oluşmaktadır. Epiblasthücrelerinin yaklaşık 5,5 günlük döneme kadar pluripotent özelliklerini koruduğubilinmektedir (Sağsöz ve Ketani, 2008).

4.2.2.3. Multipotent

Anne karnında sonraki gelişim aşamalarında hücrelerin daha özel görevleri olur ve erişkin kök hücrelere dönüşürler. Bu hücreler tek bir germ tabakasına ait hücrelere farklılaşabilirler. Erişkin bireylerin dokularında bulunan multipotent hücreler in vitro olarak çok fazla miktarda çoğaltılabilirler ve organizmadaoluşan doku hasarlarında çevre dokuların hücrelerine farklılaşarak hasarın düzeltilmesini sağlayabilirler. Bu hücreler embriyonik kök hücreler ile kıyaslandığında farklılaşma yeteneklerinin sınırlı olduğu gösterilmiştir (Freshney ve ark.,2007)

4.2.3. Embriyonik kök hücreler

20 yıl öncesinde embriyonik kök hücrelerin izolasyonu ve laboratuvar ortamında farklılaşmadan çoğalabildiği gösterilmiştir. İlk çalışmalar 1981 yılında Dr. Martin Evans ve Dr. Kaufman tarafından fareler ile yapılan deneyde 5 günlük blastosistlerin iç hücre kitlesinden sınırsız çoğalabilen embriyonik kök hücreler izole edilmiştir. (Evans ve Kaufman, 1981). Sonrasında yapılan çalışmalarda ise insan embriyonik kök hücreleri izole edilmiştir. Fare embriyonik kök hücrelerinin izole edilmesi ile edinilen tecrübeler sayesinde Thomson ve arkadaşları 1988 yılında insan embriyolarının iç hücre kitlesinden embriyonik kök hücreleri izole etmişlerdir (Thomson ve ark., 1998).

Blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilen hücreler, çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilirler ve yüksek telomeraz aktivitelerinden dolayı sonsuz DNA sentezleme kapasitesine sahiptirler (Trounson, 2005). Embriyonik kök hücreler organizmanın tüm doku tiplerini oluşturabilme yeteneğindeki pluripotent hücrelerdir (Pera ve ark., 2000). Bu hücreler klinik olarak in vitro fertilizasyon (IVF) programına ihtiyaç duyan bireylerden fazla olan implantasyon öncesi alınan embriyoların iç hücre kitlesinden geliştirilir. Pluripotent insan embriyonik kök hücreleri 5 veya 6 günlük blastokistin iç hücre kitlesinden geliştirilir. Embriyonik gelişim sırasında iç hücre kitlesi 2 ayrı katmanı oluşturur; epiblast ve hipoblast. Hipoblast sonrasında yumurta kesesini oluşturur. Epiblast ise 3 germ tabakasına farklılaşır; ektoderm, endoderm, mezoderm (Bongso ve ark., 2005).

İn vivo ortama nakledilen embriyonik kök hücreler normal olarak gelişimlerini devam ettirir ve tüm dokuların oluşumuna katılırlar.Blastosistteki iç hücre kitlesini oluşturan embriyoblastlar pluripotent hücrelerdir. Bu hücreler gerekli sinyaller verildiğinde ve ortam oluşturulduğunda yaklaşık 200 çeşit farklı hücreye dönüşebilirler (deri, kan, pankreas, sinir, karaciğer hücresi gibi). Bu yeteneklerinden faydalanılarak embriyonik kökhücrelerin hastalıkların tedavisinde kullanılması fikri düşünülmektedir (Hatoya ve ark., 2006).

4.2.4. Yetişkin kök hücreler

Yetişkin kök hücreler gelişim sürecinin ileri evresinde görülür ve kendilerini yenileyebilen, özelleşmiş hücrelere farklılaşabilen, doku ve organlarda bulunan farklılaşmamış hücrelerdir. Yüksek telomeraz aktivitesine sahiptirler fakat embriyonik kök hücreler ile kıyaslandıklarında farklılaşma potansiyelleri daha azdır (Fuchs ve ark., 2004). Bu hücrelerin insan vücudunda çok az sayıda olduğu, aynı zamanda kültür ortamında çoğaltılmalarının zor olduğu düşünülmekteydi. Son zamanlarda yapılan çalışmalar ile bu hücrelerin plastik yüzeylere yapışabilme oranlarının yüksek olduğu gösterilmiştir(Prentice, 2004).

Yetişkin kök hücreler insan vücudunda birçok yerde bulunabilir; kemik iliği, diş pulpası, kas, sinir, karaciğer, deri. Bu hücrelerin en fazla bulunduğu bölge ise kemik iliğidir. Bu bölgelerden izole edilen hücrelerin farklılaşabildikleri birçok çalışmada

gösterilmiştir. Farklılaşma yeteneklerinin korunarak bu hücrelerin çoğaltılması klinik uygulamalarda kullanılabilir olduğunu göstermektedir. Yapılan deneysel hayvan modellerinde bu hücrelerin tedavi edici etkileri gösterilmiştir(Shyu ve ark., 2004).

Bazı çalışmalar ile yetişkin kök hücrelerin hasarlı dokuyu buldukları ve oraya yerleştikleri gösterilmiştir, bu özellikleriyle kök hücreler hasarlı hücreyi hedef almaktadırlar. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve stromal hücre kaynaklı faktör-1 (Stro-1) hasarlı bölgelerde arttığı düşünülüp, bulundukları bölgede kök hücrelerin çağırılması için gereken sinyalleri oluşturdukları düşünülmektedir(Özcan ve ark., 2007).

4.2.4.1. Hematopoetik kök hücreler

Kanın hücre elemanlarını ve immün sistem hücrelerini oluşturup şekillendiren hücrelere hematopoetik kök hücreler (HKH) denir. HKH' ler kendilerini yenileyebilme özelliğine sahiptirler ve miyeloid ve lenfoid soyların her ikisinden de tüm kan hücrelerine farklılaşabilirler (Ratajczak, 2008). HKH' ler kendilerini yenileyebilmelerini ve farklılaşabilmelerini kontrol altında tutabilirler. Bu sebeple hücre sayıları azalmadan devam eder ve kan hücreleri yaşam boyu üretilir. Aynı zamanda bu hücreler nadir olarak bölünürler bu şekilde dokuların homeostazını sağlarken onkojenik olayların oluşumunu da engellerler (Martinez ve ark., 2007). HKH' ler farklılaştıklarında ilk olarak kendilerini yenileyebilme özelliklerini kaybederler (Lai ve Kondo, 2008).

Bu hücreler embriyogenesis süresince bir bölgeden başka bir bölgeye göç ederler. Vücuttaki hemen hemen tüm hücreler belirli bir iş için özelleşmişlerdir fakat HKH' ler belirli bir iş için şartlandırılmamıştır. Bu hücreler bir uyarı aldıktan sonra özel bir hücreye dönüşürler. HKH' ler kemik iliğinden, periferik kandan ve kordon kanından izole edilebilirler (Koçyiğit ve ark., 2008).İnsanlarda yapılan in vivo çalışmalar sınırlı olduğunda HKH' lerin izolasyonunun ve karakterizasyonunun yapılması zordur. Fakat bu hücrelerin yüzeylerinde CD34, CD133, CD150 eksprese ettikleri ve CD38 eksprese etmedikleri bilinmektedir (Ratajczak, 2008).

HKH' lerin izolasyonunda ilk kullanılan kaynak kemik ilikleridir. Dünya üzerinde yapılan verilere bakıldığında kemik iliği kaynaklı bu kök hücreler %23

oranında kullanılmıştır. Periferik kanda kemik iliğine oranla daha az HKH bulunmaktadır. Dünya üzerinde yapılan çalışmalarda bu kök hücrelerin kullanımı için %70 oranında periferik kan kullanılmıştır. Kordon kanı kök hücreleri periferik kandaki hücrelere göre daha hızlı prolifere olurlar. Yapılan çalışmaların %7 sinde kordon kanı kök hücreleri kullanılmıştır.

4.2.4.2. Mezenkimal kök hücreler

Alman patolog Cohnheim tarafından yapılan çalışmalarda kemik iliğinde hematopoetik olmayan kök hücrelerin olduğu bulunmuştur. İlk olarak 1970 yıllarında Friedenstein ve arkadaşları tarafından MKH' ler tanımlanmıştır. Friedenstein yaptığı çalışmalarda kemik iliği aspiratını fetal buzağı serumu içeren ortama yaymıştır ve morfolojik olarak fibroblastlar benzeyen hücrelerin var olduğunu gözlemlemiştir. Aynı zamanda bu hücrelerin yüzeye yapışabilme, kemik, kıkırdak ve yağ hücrelerine farklılaşabilme yeteneğinde olduğunu gözlemlemiştir(Friedenstein ve ark., 1976). Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda bu kök hücrelerin üç germ tabakasından gelişen hücre ve dokulara farklılaşabilen, hematopoetik olmayan, multipotent hücreler olduğu belirlenmiştir. Bu hücreler mezodermal kökenli hücrelere farklılaşabildiklerinden dolayı mezenkimal kök hücreler olarak adlandırılırmışlardır (Jiang ve ark, 2002).

Yağ, kemik, kas, kıkırdak gibi hücrelere farklılaşabilirler, morfolojik olarak fibroblastlara benzerler, kültürlerde plastik yüzeylere yapışabilirler, stromal hücrelerin kökeni oluştururlar, bağ dokunun ana hücreleridirler. Mezenkimal kök hücreler tanımlanırken yaygın olarak bu hücrelerin plastik yüzeylere yapışması, stromal karakterde yüzey antijenlerini eksprese etmeleri, multipotent farklılaşabilmeleri belirtilir. Mezenkimal kök hücreler yüzeylerindeCD105, CD73 CD90, CD146, CD29 eksprese ederler, fakat CD28, CD25, CD34, CD45, CD14eksprese etmezler (Dominici et al 2007).

CD73; Glikozil fosfotidilinositol' e bağlı, membrana bağlı bir proteindir (Zimmerman, 1992). Bu antijen birçok hücre tipinde bulunur bunlar; mezenkimal kök hücreler (Barry ve ark., 2001), B ve T lenfositler (Thompson ve ark., 1987; Arias ve ark., 1997) ve endotelyal hücrelerdir (Arias ve ark., 1997; Kas-Deelen ve ark.,

2001). Bu molekül birkaç dokudan köken alan MKH' leri tanımlamak içinde kullanılır (Mafi ve ark., 2011). Hücre dışı nükleotid bozulmasında anahtar düzenleyicidir. CD73' ün damar geçirgenliğini ve iltihaplı beyin de dahil olmak üzere birçok organda inflamatuar dengeyi düzenlediği gösterilmiştir (Niemela ve ark., 2008). Lenfosit vasküler adezyon molekülü-2 CD73 olarak tanımlanmıştır. CD73 molekülü bunun dışında ekto-nükleotidaz olarak da bilinir. Olgun lenfosit belirtecidir bu hücre içi sinyaller, lenfosit proliferasyonu ve aktivasyonunda görevlidir (Laura ve Sirpa, 1996).

CD90; İmmünoglobolin süper ailesi üyesidir Thy-1 olarakda bilinir. Birçok kök hücrelerde, nöronlarda, tüm timositlerde ve periferal T hücrelerde eksprese edilir fakat B hücrelerde eksprese edilmez.Bu molekül sinyal iletimiyle ilgilidir ve glikozil fosfotidil inositol bağlı glikoproteindir. Hematopoetik kök hücrelerin farklılaşmasında, lenfositlerin aktivasyonu ve proliferasyonunun kostimülasyonunda görevlidir. CD90' nın CD45 ile etkileşimde olduğu gösterilmiştir (Mayani ve Lansdorp, 1994).

CD105; Membran glikoproteinidir ve TGF-β reseptör kompleksinin bir parçasıdır, endoglin olarakda bilinir. Endotelyal hücrelerde, aktive monosit ve makrofajlarda, kemik iliği stromal hücrelerinde hematopoetik kök hücrelerde veya progenitör hücrelerde eksprese edilirler. Ayrıca bu molekül stromal fibroblastlarda zayıf eksprese edilir (Pierelli ve ark., 2001). Anjiyogenik endotelyal hücrelerde eksprese edilirler.Anjiyogenezde önemli rol oynarlar. Homodimerik transmembran proteinidir (Duff ve ark., 2003). CD105 yüksek afiniteli TGF-β1 ve TGF-β3 reseptörüdür. TGF-β2' ye bağlanmazlar.Tümör ve derma linflamasyon gibi anjiyogenez oluşan dokularda aktive endotelyal hücrelerin CD105 ekspresyonu arttığı gösterilmiştir (Pierelli ve ark., 2001).

CD146; Melanoma (Cilde rengini veren melanositlerden kaynaklanan bir cilt tümörüdür) hücre adezyon molekülü olarakda bilinir (MCAM). İmmünglobülin süper ailesine ait olan bir integral membran glikoproteindir. CD146 murine vasküler endotelyal hücrelerde güçlü olarak eksprese edilir. Yaklaşık olarak nötrofillerin %30'unda NK' ların %60'ında eksprese edilir. İnsanların aksine farelerde monositlerde, dendritik hücrelerde, T hücrelerde, T hücrelerde, NK T hücrelerinde, B hücrelerde veya düz kas hücrelerinde görünmez. CD146 ekspresyonunun artışı NK

hücre olgunlaşmasıyla bağlantılı. NK hücre fonksiyonunda, anjiyogenezde, endotelyal hücre adezyonunda fonksiyonel olarak görevlidir (Bardin ve ark., 2009).

CD29; CD29 lenfosit ve monositler üzerinde eksprese edilir, granülositler üzerinde zayıf olarak eksprese edilir. İntegrin-1 β olarak da bilinir.Hematopoetik ve non-hematopoetik hücreler üzerinde eksprese edilir. Lökositlerde (granülositlerde düşük seviyede), plateletlerde, fibroblastlarda, endotelyal, epitelyal hücrelerde ve mast hücrelerinde eksprese edilir. CD29 integrin ailesinin bir üyesidir. Hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşiminde görevlidir (Hynes, 1992).

CD14; Glikozil fosfatidil inositol bağlı membran glikoproteinidir. Ayrıca LPS reseptörü olarakda bilinir. Makrofajlarda, dendritik hücrelerde, kupffer hücrelerinde, hepatositlerde ve granülositlerde eksprese edilirler. LPS bağlı protein kompleksi için yüksek afinitedeki reseptördür. CD14, gram negatif bakterilerin temizlenmesinde görevli toll like reseptör-4 (TLR4) veya TLR2 ile bağlantılıdır (Liu ve ark., 1992).

CD28; Disülfit bağlı homodimerik tip-1 glikoproteindir. İmmünoglobülin süper ailesinin bir üyesidir. Ayrıca T44 ve Tp44 olarakda bilinir. Birçok T hücrede, NK hücrelerinin alt birimlerinde ve plazma hücrelerinde eksprese edilir. CD28 önemli ko-stimulatör moleküldür, T lenfosit aktivasyonunun uyarımı, IL-2 sentezinde ve hücre ölümünün önlenmesinde görevlidir. Ayrıca bu molekül CD80 ve CD86 ligand reseptörüdür (Linsley ve Ledbetter, 1993).

CD25; 25 kD bir glikoproteindir ayrıca düşük afiniteli IL-2Rα olarakda bilinir. Aktive T ve B hücrelerinde, timosit alt birimlerinde, pre-B hücrelerinde ve regülatör T hücrelerde eksprese edilir. CD122 ve CD132 ile bağlantılıdır. CD25 IL-2 için yüksek afiniteli reseptör oluşturur (Lowenthal ve ark., 1985).

CD45; Transmembran glikoproteini olarakda adlandırılır. Hematopoetik hücrelerde eksprese edilir. CD45'in birçok izoformu immün sistemde hücre tipine bağlı olarak dağınıklık gösterir. 180-240 kD bir glikoproteindir, ayrıca lökosit ortak antijen (LCA) olarakda bilinir. Tüm hematopoetik hücreler üzerinde eksprese edilir, sadece olgun eritrositler ve plateletlerde eksprese edilmezler. CD45 T hücre reseptörü ve B hücre reseptörü sinyal transdüksiyonunda anahtar rol oynar. CD45 izoformları çok spesifiktir, CD45, T ve B hücre aktivasyonunda ve fosfatazda görevlidir (Pulido ve ark., 1988).

CD34; Yüksek glikolize hematopoetik progenitör antijendir. CD34' ün iki tane izoformu vardır. Hematopoetik hücreler üzerinde eksprese edilir, endotelyal hücreler üzerinde, beyinde ve testiste eksprese edilir. Timusta, dalakta ve kemik iliğinde düşük eksprese edilirler. Hücre adezyonunda görevlidirler (Bhatwadekar ve ark., 2010).

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

MKH'ler sınıf I MHC molekülünü eksprese ederler, sınıf II MHC molekülünü, CD40, CD70, CD86 gibi molekülleri eksprese etmezler. Sonuçta MKH' lar MHC I molekülünü eksprese etmelerinden dolayı T hücrelerini aktive etselerde diğer aktive edici molekülleri eksprese etmedikleri için T hücrelerinin aktivasyonu tamamlanamaz. MKH' ler hücre döngüsünü G1 fazında durdurur bu şekilde T hücrelerin çoğalmasını bloke ederler. MKH' ler ve T hücrelerin kültürü ile ilgili yapılan çalışmalarda MKH' ler bir süre sonra kültürden alınsa bile T hücreler çoğalamadıkları gösterilmiştir (Simmons ve Torok, 1991). MKH' ler immün sistemde rol oynayan B lenfositleri ve dendritik hücreleri de etkiler. Monositlerin dendritik hücrelere farklılaşmasını engelleyen MKH' ler IL-10 üretip daha güçlü bir yanıt oluştururlar. MKH' lerin immün sistemi baskılamalarından dolayı tedavi edici olarak kullanılabilir olukları düşünülmüştür (Pountos ve Giannoudis, 2005).

4.2.4.2.1. Süt dişi kaynaklı mezenkimal kök hücreler (SHED)

Klinik çalışmalarda kullanılacak olan kök hücrelerin kolay ulaşılabilir bir kaynaktan izole edilmesi gerekmektedir. Süt dişi pulpası kök hücreleri ilk olarak Miura ve arkadaşları tarafından izole edilmiştir ve bu hücrelerin multipotent kök hücreler oldukları belirtilmiştir. Bu hücreler SHED (Stem Cells from Human

Exfoliated Deciduous teeth) olarak adlandırılırlar. İnsan süt dişlerinin pulpasından izole edilen mezenkimal kök hücrelerin nöronlara, adipositlere, osteoblastlara ve odontoblastlara farklılaşabildiği gösterilmiştir. İn vivo olarak yapılan deneylerde süt dişlerindeki kök hücrelerin, kemik ve dentin formasyonunu uyardığı gösterilmiştir fakat aynı zamanda bu hücrelerin dentin-pulpa kompleksini de oluşturamadığı gösterilmiştir. Süt dişi pulpası kaynaklı kök hücreler, gömük yirmi yaş dişi pulpası kök hücreleri ile karşılaştırıldığında daha yüksek proliferasyon oranı göstermişlerdir ve bu nedenle gömük yirmi yaş dişi pulpası kök hücrelerinden ayrı olarak değerlendirilmektedirler (Bluteau ve ark., 2008; Miura ve ark., 2003).

Suchanek ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada bu hücrelerin yüzeylerinde CD44, CD90, CD73, CD105, CD117, CD166, CD29, HLA I belirteçlerini eksprese ettiklerini ve CD18, CD31, CD34, CD49d, CD49e, CD106, CD133, CD146, CD184, CD197, HLA II belirteçlerini ise eksprese etmediklerini göstermişlerdir (Suchanek ve ark., 2010).

SHED hücreleri ve gömük yirmi yaş dişi kök hücreleri karşılaştırıldığında, SHED hücrelerin vitro ortamda yirmi yaş dişi kök hücrelerine göre yüksek orandaprolifere olduğunu ve yüksek farklılaşma yeteneği gösterdiği görülmüştür. SHED hücreleri in vivo transplantasyon sonrasında ise yüksek mineralizasyon kapasitesi göstermiştir.Morfolojik olarak SHED ve DPSCs çok benzer olduğu gösterilmiştir, yapılan çalışmalarda büyüme oranları ve farklılaşma karakteristikleri kıyaslandığında SHED hücrelerin yüksek oranda eksprese oldukları ve farklılaşabildikleri gösterilmiştir (Wang ve ark., 2012).

SHED hücreleri insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerle (BMMSCs) karakterizasyon özellikleri kıyaslandığında in vitro ortamda Th17 hücreleri üzerinde belirgin inhibe edici etkileri gözlemlenmiştir. Kemik iliği kök hücrelerinin immünomodulatör fonksiyonları olduğu ve immün hastalıkların tedavisinde başarı sağladığı görülmüştür. SHED hücrelerin immünomodülatör etkisi kemik iliği kök hücreleri ile karşılaştırıldığında ise SHED hücrelerin Th17 hücre inhibisyonunda anlamlı etkisi olduğu görülmüştür. SHED transplantasyonunun Treg oranını Th17 yoluyla yükselttiği görülmüştür (Yamaza ve ark., 2010).

4.2.4.2.2. Tam gömük yirmi yaş dişi kaynaklı mezenkimal kök hücreler (DPSCs)

Embriyonik gelişim sırasında diş tabakası ektoderm tabakasından gelişmektedir. Ektoderm dişin germ tabakasını oluştururken, nöral kabartı ise dişin organını, papillasını ve folikülünü oluşturur.Diş pulpası gevşek bağ dokusudur, embriyonik dental papilladan (ektomezenkimal doku) meydana gelir ve dişin pulpa odasında bulunur. Diş pulpası bu sebeple mezenkimal kök hücreleri içermektedir (Mauth ve ark., 2007).Diş pulpası kök hücreleri, plastik yüzeylere yapışabilen, prolifere olabilen multipotent hücrelerdir. Yirmi yaşdiş pulpalarından kök hücrelerin izolasyonu ilk olarak Gronthos ve arkadaşları tarafından yapılmıştır sonrasında bu hücrelerin adipojenik, osteojenik ve kondrojenik olarak farklılaştıkları gösterilmiştir (Gronthos ve ark., 2000). Diş pulpası kaynaklı kök hücrelerin kemik iliği kaynaklı kök hücrelere kıyasla daha hızlı prolifere olduğu gözlenmiştir. Ayrıca bu hücrelerin izolasyonlarının daha kolay olmasından dolayı kemik iliğine göre daha çok izole edilebilmektedir (Morsczeck ve ark., 2007).

Diş pulpası kaynaklı kök hücreler tedavi amaçlı olarak gerekli olan bütün özellikleri karşılamaktadır. Bu hücrelerin izole edilmesi çok kolaydır. Bu hücrelerin farklılaşabilme potansiyelleri çok yüksektir. Pasaj sayıları çok yüksektir. Dondurma ve çözülmeleri sonrasında problem olmamaktadır (Todorevic ve ark., 2008).

Diş pulpası kök hücreleri yüzeylerinde CD10, CD13, CD44, CD71, CD146, CD29, CD73, CD90, CD105 ve CD166 belirteçlerini eksprese ederler. CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11b, CD14, CD15, CD33, CD34, CD45 CD106, CD117, CD123, CD133, CD138, HLA-G ve HLA-DR yüzey belirteçlerini ise eksprese etmezler (Doğan ve ark., 2012; Demircan ve ark., 2011).

Diş pulpası kök hücrelerinin gen ekspresyonlarının belirlenmesi ile bu hücrelerin alkalin fosfataz, dentinmatriks proteini-1, dentin siyalofosfoprotein' leri eksprese ettikleri gösterilmiştir. Genekspresyon analizleri ile bu hücrelerin eksprese ettiği genlerin nerdeyse tümünün hücre dışı matriks bileşenleri, hücre adezyon molekülleri ve büyüme faktörlerini kodladığını ortayakoymustur (Krebsbach ve Robey,2002).Diş pulpası ve kemik iliği kök hücrelerinin gen ekspresyonları karşılaştırıldığında aralarında çok az farklılık olduğu gözlemlenmiştir. Diş pulpası kök hücrelerinde

hücre döngüsü aktivatörünü yüksek oranda eksprese ettiği gözlemlenmiştir ve buda neden yüksek proliferasyona sahip olduğunu açıklamaktadır (Todorović et al., 2008).

Diş kök hücreleri dondurulduktan sonra çözüldüğünde bu hücrelerin yüksek canlılık oranı gösterdiği görülmüştür bu sebeple bu hücrelerin çeşitli çalışmalarda kullanabilir olduğunu gerektiğinde çözülüp kullanılabileceğini göstermektedir(Daquino et al., 2008). Bu hücrelerin aynı zamanda anti inflamatuar ve immün sistemi düzenleyici özellikleri vardır. Diş dokularının enfeksiyonlarında, bağışıklık sisteminin yanıt oluşturmasında rol oynamaktadırlar. Diş kök hücreleri allojenik dokulara implante edildiklerinde immunolojik tolerans gelişimini uyardıkları gösterilmiştir. Aynı zamanda bu hücrelerin bağışıklık sistemini baskılayıcı etkisi, T lenfositleri ile kültürlerinde gösterilmiştir. Bu hücreler T hücrelerinin proliferasyonunu baskılamışlardır(Graziano et al., 2008).

4.2.4.2.3. Diş folikülü kaynaklı mezenkimal kök hücreler (DFSCs)

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

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

Morsczeck ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada diş folikülü kaynaklı kök hücrelerin, fibroblastlara benzediğini, koloni oluşturabildiğini, plastik yüzeylere yapışabildiklerini ve kök hücre yüzey belirteçleri olan Notch-1 ve Nestin' i yüzeylerinde eksprese ettiklerini göstermişlerdir. Aynı zamanda bu hücreleri hidroksiapatit/trikalsiyum fosfat toz ile karıştırıp immun deprese farelere verildikten8

hafta sonra incelendiğinde, rijid veya fibroz bağ dokusunun oluştuğunu, osteoblastik antijen ekpresyonunun arttığını, fakat sement veya kemik formasyonunun oluşmadığını göstermişlerdir (Morsczeck ve ark., 2005).

Mori ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, diş folikülü kök hücreleri yüzeylerinde kök hücre yüzey belirteçleri olan CD73, CD90, CD146, CD44, CD105 ve HLA I eksprese ederler. CD45 ise eksprese etmezler. Ayrıca osteojenik farklılaştırılan hücrelerin real time PCR analizlerinde RUNX2 ve Col I eksprese ettiklerini ve 10- 17 gün sonra bunun arttığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca bu çalışmada diş folikülü kök hücrelerinin kemik iliği kök hücrelerine göre yüksek proliferasyon oranlarına sahip olduklarını göstermişlerdir. Bu hücrelerin kolay ulaşılabilir bir kaynak olmaları, yüksek proliferasyon oranları, mezenkimal belirteçleri eksprese etmeleri, birçok soya farklılaşabilmeleri, canlılıklarının yüksek olması ve güvenilir şekilde dondurulmalarından dolayı doku mühendisliğinde kullanılabilecekleri önerilmiştir (Mori ve ark., 2012).

ALP; Alkalin fosfataz, 4 ayrı alkalin fosfataz vardır; bağırsak, plasenta, plasenta gibi, karaciğer/böbrek/kemik (dokuya özel değil). İlk üçü birlikte kromozom 2 üzerinde yer alır. Dokuya özel olmayan formu ise kromozom 1 üzerinde bulunur. Alkalin fosfatazların kesin işlevi bilinmemektedir. Bu gen diş ve kemik gelişiminde ve büyümesinde önemli rol oynar. Ayrıca diğer dokularda da aktifdir özellikle karaciğer ve böbrekte. Alkalin fosfataz minerilizasyonun ilerlemesi için gerekli, bu minerilizasyon diş ve kemik gelişiminde depolanır. Minerilizasyon kemik formasyonu için kritiktir. Güçlü ve sert dişler çiğnemeye ve öğütmeye dayanabilir (Sharma ve ark., 2014).

GAPDH; Bu gen gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz protein ailesinin bir üyesi olarak kodlanır. Kodlanan bu protein aynı zamanda mekaniksel olarak başka bir görev üstlenme yeteneğiyle tanımlanmaktadır. Bu gen ürünü, karbonhidrat metabolizmasında önemli enerji veren aşamayı katalizler, inorganik fosfat ve nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) varlığında gliseraldehid-3-fosfat' ın oksidatif fosforilasyonu geri alınabilir. Bu kodlanan protein ayrıca nükleusta urasil DNA glikosilaz aktivitesine sahiptir (Ercolani ve ark., 1988).

RUNX2; Runt-related transcription factor; osteoblastik farklılaşma ile bağlantılı anahtar transkripsiyon faktörüdür. Osteojenik farklılaşma ve iskelet morfogenezinde önemli rol oynar. Endokondral ossifikasyon ve her intra membranın ve osteoblastların olgunlaşması için önemlidir. Runx2 geni Runx gen ailesinden Run-related transcription factor tarafından kodlanır. Bu gen önemli rol oynar kartilajın hipertrofisinde, hücre göçünde ana rol oynar (Cohen, 2009).

NESTİN; Göz ve beyin gelişimde tanımlanır. Hücre gelişimi süresince birçok hücrede eksprese edilir. Nestin özellikle merkezi sinir sisteminde, miyojenik ve bazı doku gelişimlerinde erken dönemde bölünebilen hücrelerde görülür. Nestin erişkinlerde merkezi sinir sistemi hasarında, hasarlı kas doku rejenerasyonu gibi patolojik durumlarda tekrar uyarıldığı görülmüştür (Michalczyk ve Ziman, 2005). Yapılan bir çalışmada odontogenezde ve diş çıktıktan sonra odontoblastlarda nestin ekspresyonu olduğu gösterilmiştir Nestin erken ve geç gelisim aşamalarında eksprese olduğu için, odontoblastlar için spesifik bir belirteç olabileceği düşünülmüştür (Terling ve ark. 1995).

NOTCH1; Tip-1 transmembran protein ailesinin bir üyesidir. Notch aile üyeleri hücrenin gelişimsel sürecinin belirlenmesinde anahtar rol oynar. Notc1 doğumdan önce radialglia farklılaşmasını uyarır ama postnatal gelişimde atrositlere farklılaşmasını uyarır (Gaiano ve ark., 2000). Memelilerde 4 adet NOTCH geni vardır; NOTCH 1, NOTCH 2, NOTCH 3, NOTCH 4 (Bray, 2006). Farelerde yapılan deneylerde Notch 1 ve Notch 2 mutasyonlarında gelişimsel bozuklular olduğu birçok organda yaşamsal hasar olduğu görülmüştür (Kraman ve
McCright, 2005). NOTCH 1 en çok T hücre gelişiminde bulunur (Hasserjian ve ark., 1996).

NANOG; İç hücre kitlesi ile alakalı, embriyonik kök hücre proliferasyonu ve kendini yenileyebilmesinde görevlidir. Embriyonik kök hücreler üzerinde pluripotensiyi uygular ve ekstra embriyonik endoderm ve trofoektoderm soylarına doğru olan farklılaşmayı önler (Chambers ve ark., 2003). NANOG Sox2 ve Oct3/4 ün ekspresyonunu aktive eder (PanandThomson, 2007). NANOG' un farklılaşmanın baskılanmasında önemli bir role sahip olduğu ispatlanmıştır (Nettersheim ve ark., 2011).

DSPP; Bu gen dişin dentin ekstraselüler matriksinin iki ana proteinini kodlar. Preprotein odontobastlar tarafından salgılanır ve dentin sialoprotein ve dentin fosfoproteine farklılaşır. Bu proteinler dentinin bileşenleridirler (MacDougall ve ark., 1997).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Klinik Araştırma Etik Kurulu' nun 04.04.2014 tarih ve 09.2014.0015/ 70737436-050.06.04- 1400076973 sayılı raporu ile onaylandı. Kök hücre izolasyonu öncesinde süt dişlerinin, tam gömük yirmi yaş dişlerinin ve diş foliküllerinin temini Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Çene Cerrahisi Bölümü' nde gerçekleştirildi, kök hücre izolasyonu ve çalışmanın diğer tüm aşamaları Marmara Üniversitesi Çocuk İmmünoloji Laboratuvarı' nda gerçekleştirildi.

Bu tez çalışmasında, süt dişi pulpası, tam gömük yirmi yaş dişi pulpası ve diş folikülü kaynaklı kök hücrelerin immünolojik özelliklerinin karşılaştırılması amaçlandı.

Bu araştırmada, süt dişi pulpasından, tam gömük yirmi yaş dişi pulpasından ve diş folikülünden MKH'lerin izolasyonu, karakterizasyonu ve farklılaştırma çalışmaları, izole edilen kök hücrelerin venöz kandan izole edilen lenfosit hücreleri ile ko kültür çalışmaları ve kültür sonucunda immünolojik çalışmalar gerçekleştirildi.

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

5.1.Süt Dişi, Tam Gömük Yirmi Yaş Dişi ve Diş Folikülünün Temini

Bu tez çalışmasında, çalışmaya dahil edilen tüm bireylere, hazırlanmış olan "Gönüllü Bilgilendirme Formu" okutuldu ve "Gönüllü Onam Formu" imzalattırıldı. Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş Çene Cerrahi Anabilim Dalı polikliniklerinde basınç ağrısı, dişin pozisyonunun bozuk olması veya ortodontik sebepler ile diş çekim endikasyonu uygun görülen sağlam süt dişleri yaşları 8-15 yaş arasında olan 3 çocuktan alındı. Aynı zamanda tam gömük yirmi yaş dişleri ve tam gömük yirmi yaş dişi çekimi sırasında dişi saran folikül dokusu yaşları 20-25 yaş arasındaki 3 bireyden alındı. Süt dişi, tam gömük yirmi yaş dişinin çekilmesi ve folikülün alınması etik ve asepsi kurallarına uygun şekilde gerçekleştirildi.

5.2. ÇalışmadaKullanılan Sarf Malzemeler

- DPBS(Ca++ Mg++-free- Gibco, Grand Island, USA; 1419094)
- Penicillin/streptomycin (Gibco, Grand Island, USA; 15140122)
- DMEM(Gibco, Grand Island, USA;31885023)
- RPMI (Gibco, Grand Island, USA; 21875034)
- Fötal sığır serumu (FBS; Gibco, Grand Island, USA; 10500064)
- Tip I kollajenaz (Gibco, Grand Island, USA;17100017)
- %0,25 tripsin-EDTA solusyonu (Gibco, Grand Island, USA; 25200056)
- % 0,5 tripan mavisi solusyonu (Gibco, Grand Island, USA; 15250061)
- DMSO (WAK-Chemie Medical GmbH, Germany; USP090522A)
- CFSE Cell Proliferation Kit - For Flow Cytometry (İnvitrogen, Grand Island, USA; C34554)
- Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio- Sciences AB, Upsala; 17144003)
- Anti CD2 (eBioscience, San Diego CA; E034351632)
- Anti CD3 (LiseSpan Biosciences, USA; 50867)
- Anti CD28 (Millipore, California; LV1700707)
- IFN-γ (Millipore, California; 2309018)
- CD45 FITC/CD34 PE (BD Biosciences,United States; 344563)
- CD90 PE (BD Biosciences,United States; 562385)
- CD146FITC (BD Biosciences,United States; 560846)
- CD73 PE (BD Biosciences,United States; 550257)
- CD29 APC (BD Biosciences,United States; 559883)
- CD105 PE (BD Biosciences,United States; 560839)
- CD28PE (BD Biosciences,United States; 562323)
- CD14 PE (BD Biosciences,United States; 342408)
- Mouse IgG1 κ İzotip Kontrol (BD Biosciences,United States; 555749)
- Hücre yıkama solüsyonu (Cell Wash, BD Biosciences,United States; 349524)
- Osteojenik Situmulatory Kit (Human, Stemcell Technologies, North America; 05404)
    - MesenCult MSC Basal Medium (Human; 05401)

    - Osteogenic Stimulatory Supplements (Human; 05405)
    - β-Glycerophosphate (1M) (05406)
    - Dexamethasone (05407)
    - Ascorbic Acid (07157)
- Adipogenesis Differentiation Kit (Gibco, Grand Island, USA;A1007001)
    - Adipocyte Differentiation Basal Medium (A1041001)
    - Adipogenesis Supplement (A1006501)
- Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco, Grand Island, USA; A1007101)
    - Osteocyte/Chondrocyte Differentiation Basal Medium (A1006901)
    - Chondrogenesis Supplement (A1006401)
- Oil red O (Sigma-Aldrich, USA; O0625-100G)
- Alizarin Red (Sigma-Aldrich, USA; A5533-25G)
- Alcian Blue (Sigma-Aldrich, USA; A5268-10G)
- High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Mamheim, Germany;11828665001)
- Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche,Mamheim, Germany;04379012001)
- 10x Phosphate Buffered Saline (PBS), 1L (Bio-Rad; 1610780)
- RealTime ready Designer Assays, 300 reactions (Roche,Mamheim, Germany; 05532957001)
- LightCycler 480 Probes Master,5 x 1 ml (Roche,Mamheim, Germany; 04707494001)
- LightCycler 480 Multiwell Plate 96 white,5 x 10 plates (Roche,Mamheim, Germany; 04729692001)
- GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (Roche,Mamheim, Germany; 141139)
- NANOG(Roche,Mamheim, Germany; 143702)
- DSPP (dentin sialophosphoprotein) (Roche,Mamheim, Germany; 139816)
- RUNX2 (runt-related transcription factor 2) (Roche,Mamheim, Germany; 113380)
- NESTİN (Roche,Mamheim, Germany; 140436)
- ALP (alkaline phosphatase)(Roche,Mamheim, Germany; 103448)
- NOTCH (Roche,Mamheim, Germany; 111246)

- BD cytometric bead array (CBA) human Th1/Th2/Th17 Kit (BD Biosciences,United States; 560484)
- Human FoxP3 Buffer Set (BD Biosciences,United States; 560098)
- Human FoxP3 PE (BD Biosciences,United States; 560046)
- APC mouse anti-human CD25 (BD Biosciences,United States; 555434)
- FITC mouse anti-human CD4 (BD Biosciences,United States; 555346)
- FITC mouse anti-human CD95 (BD Biosciences,United States; 555673)
- Biotin mouse anti-human CD178 (BD Biosciences,United States; 556374)
- Biotin mouse IgG1 κ ısotype Control (BD Biosciences,United States; 555747)
- PE Streptavidin (BD Biosciences,United States; 554061)

5.3. Çalışmada Kullanılan Hücre Kültürü Malzemeleri

- Diş kırma seti
- Steril pensler ve bistüri uçları
- 0,22 μm filtre (Sartorius, Goettingen, Germany; 16534)
- Heparinli Tüp (Yeşil kapaklı) (Hongyu Medical, China; 131211)
- 15 ml konik kapaklı tüp (BD Biosciences Discovery Labware, CT, USA;352096)
- 50 ml konik kapaklı tüp (BD Biosciences Discovery Labware, CT, USA; 352098)
- 25cm^{2}' lik hücre kültür flaskları (BD Biosciences Labware, Le Pont DeClaix, France; 353108)
- 75cm^{2}' lik hücre kültür flaskları (BD Biosciences Labware, Le Pont DeClaix, France; 353110)
- 6 kuyucuklu plaklar (BD Biosciences Discovery Labware, USA;353046)
- 48 kuyucuklu plaklar (Nest Biotech, China, 20140010415A)
- 5 ml Polystyrene tube (BD Biosciences,United States; 352052)
- Tip I kollajen kaplı lameller (BD Biosciences Discovery Labware,USA; 354089)

- 3 ml' lik pastör pipeti (Citotest Labware 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)
- Hücre sayım kamarası (Thoma Lamı)
- Lamel (22x22mm)
- Buz kalıpları
- Boş beher (atık icin)
- Laboratuvar kalemi
- %70 alkol
- 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
RealTime PCR	Roche	LightCycler 480 System
RNA Konsantrasyonunu Ölçen Spektrofotometre	Thermo	NanoDrop 2000

5.5. Kullanılan Solüsyonlar

5.5.1.MKH'lerin besiyeri ortamının hazırlanması

Süt dişi, tam gömük yirmi yaş dişi ve diş foliküllerinden izole edilen kök hücrelerin kültürlerinde, taze olarak %10 oranında FBS ve %1 oranında Penicillin/streptomycinilave edildi,DMEM besiyeri kullanıldı. FBS, besiyeri ortamına eklenmeden önce, partikül oluşumunun önlenmesi amacıyla 0,45 µm gözenek çaplı filtrelerden geçirildi.

5.5.2. Anti CD2/ Anti CD3/Anti CD28 (CDmix) uyaranının hazırlanması

Anti CD2 vialinde 100 µg /200 µl bulunmaktaydı. 100 µl RPMI ilave edildi ve konsantrasyon 100 µg/300 µl oldu. Bu 300 µl' den 30 µl çekildi ve 170 µl RPMI ile sulandırıldı. Toplamda 200 µl oldu ve konsantrasyon 1,5 µg/ml oldu. Bu karışımdan 30 µl çekildi veCDmix vial' ine konuldu.

Anti CD3 vialinde 100 µg /100 µl bulunmaktaydı. 100 µl RPMI ilave edildi ve konsantrasyon 100 µg/ 200 µl oldu. Bu 200 µl' den 20 µl çekildi ve 180 µl RPMI ile sulandırıldı. Toplamda 200 µl oldu ve konsantrasyon 1,5 µg/ml oldu. Bu karışımdan 30 µl çekilmiş CDmix vial' ine konuldu.

Anti CD28 vialinde 100 µg / 300 µl bulunmaktaydı. 100 µl RPMI ilave edilddi ve konsantrasyon 100 µg/ 400 µl oldu. Bu 400 µl' den 40 µl çekildi ve 160 µl RPMI ile sulandırıldı. Toplamda 200 µl oldu ve konsantrasyon 1,5 µg/ml oldu. Bu karışımdan 30 µl çekildi CDmix vial' ine konuldu.

CD mix vialine eklenen anti CD2, anti CD3 ve anti CD28 ve toplam 90µl olan karışımın üzeri 2910 µl RPMI ile tamamlanarak toplamda 3 ml' lik CDmix hazırlandı. Bu CD mix içindeki anti CD2 konsantrasyonu 0,5µg, anti CD3 konsantrasyonu 0,5µg ve anti CD28 konsantrasyonu 0,5µg oldu. 3 ml'lik CD mix 30 ayrı viale her vialde 100 ul olacak şekilde -20 C° de stoklandı.

5.5.3. IFN- γ uyaranının hazırlanması

100 µg/ 100 µl (distile su) bulunan IFN-γ dan 5 µl çekildi ve 995 µl distile su ile sulandırıldı. Toplamda 1 ml' lik stok hazırlandı.

5.5.4. Kollajenaz solüsyonunun hazırlanması

Kollajenaz Tip I solüsyonunun hazırlanması icin; 2 ml DPBS içine0,006 gram kollajenaz Tip I eklendi ve inkübatör içerisinde10 dakikabekletildikten sonra 0,22 µm'lik filtre ile filtre edilerek kullanıldı.

5.5.5. Alizarin red solüsyonunun hazırlanması

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

5.5.6. Oil red o solüsyonunun hazırlanması

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

5.5.7. Alcian blue solüsyonunun hazırlanması

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

5.6. Çalışmanın Ana Basamakları

5.6.1. Süt dişi, tam gömük yirmi yaş dişi ve diş folikülünün transport solüsyonu ile izolasyon yapılacak laboratuvara getirilmesi

5.6.2. Süt dişi pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu

5.6.3. Tam gömük yirmi yaş diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücre izolasyonu

5.6.4. Diş folikülü kaynaklı mezenkimal kök hücre izolasyonu

5.6.5. İzole edilen hücrelerin pasajlanması

5.6.6. İzole edilen kök hücrelerin karakterizasyonu

5.6.6.1. Akım sitometri analizi

5.6.6.2. Osteojenik farklılaştırılması

5.6.6.3. Adipojenik farklılaştırılması

5.6.6.4. Kondrojenik farklılaştırılması

5.6.7. Kök hücrelerin RealTime PCR ile gen ekspresyonlarına bakılması

5.6.8. Kök hücrelerin 48 kuyucuklu kültür plaklarına ekilmesi

5.6.8.1. SHED, DPSC ve DFSChücrelerinin 48 kuyucuklu kültür plaklarına ekilmesi

5.6.9. Sağlıklı bireylerden alınan venöz kandan lenfosit izolasyonu yapılması

5.6.10. Lenfositlerin CFSE ile işaretlenmesi

5.6.11. Kök hücre ve lenfositlerin ko-kültürünün yapılması

5.6.11.1. SHED hücreleri ile lenfositlerin ko-kültürlerinin yapılması

5.6.11.1.1. HücrelerinIFN-γ ile uyarılması

5.6.11.2. DPSC hücreleri ile lenfositlerin ko-kültürlerinin yapılması

5.6.11.2.1. HücrelerinIFN-γ ile uyarılması

5.6.11.3. DFSC hücreleri ilelenfositlerin ko-kültürlerinin yapılması

5.6.11.3.1. HücrelerinIFN-γ ile uyarılması

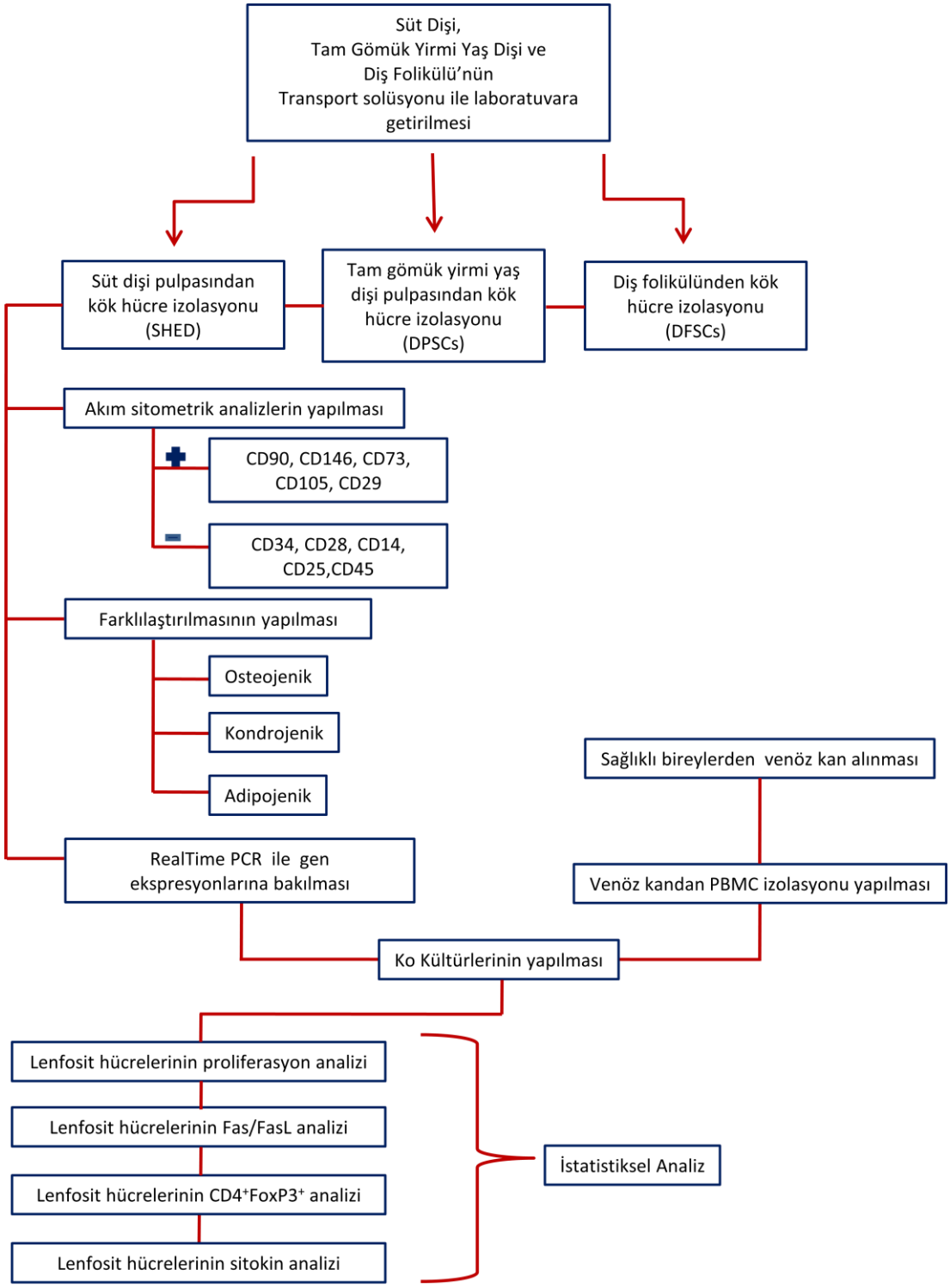
5.6.12. Lenfositlerin proliferasyon analizi

5.6.13. Lenfositlerin $CD4^{+}FoxP3^{+}$ hücre analizi

5.6.14. Lenfositlerin Fas/FasLigand analizi

5.6.15. Hücre kültür süpernatanlarında sitokin tayini

5.6.16. İstatistiksel analiz



Şekil 5.1. Çalışmanın ana basamaklarının şematik gösterimi.

5.6.1. Süt dişi, tam gömük yirmi yaş dişi ve diş folikülünün transport solüsyonu ile izolasyon yapılacak laboratuvara getirilmesi

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

5.6.2. Süt dişi pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu

Dişin doğal sürecine uygun olarak alınan süt dişleri, sterilizasyon amacıyla alkollü peçete ile temizlendi. Dişsteril bir şekilde kırılıp içerisindeki pulpa pens yardımı ile alındı ve bistüri ile birkaç parçaya ayrıldı. Parçalanan pulpa hazırlanan kollajenaz solüsyonu içinde, inkübatörde 1 saat bekletildi ve aralıklarla kontrol edilip, vortekslendi.Pulpahücrelerinin doku parcacıklarından ayrılıp, tek hücre süspansiyonu haline gelmesi sağlandı ve 1 saat sonrasında inkübatörden çıkartılıp pipetaj işlemi yapıldı.Hücreler DPBS ile yıkanıp 1200 rpm' de 5 dk santrifüj edildi.Santrifüj sonrasında süpernatan uzaklaştırıldı ve hücreler tekrar DPBS ile yıkanıp 1200 rpm' de 5 dk santrifüj edildi.Santrifüj sonrasında süpernatan uzaklaştırıldı ve hücreler 5 ml kültür medyumuyla T-25 cm^2' lik flakslara ekilip 37°C, %5 CO^2inkübatöre konuldu.

Hücrelerin her 2 günde bir kültür medyumu değiştirildi ve hücrelerin çoğalması, flask yüzeyine yayılması takip edildi.

5.6.3. Tam gömük yirmi yaş diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücre izolasyonu

Tam gömük yirmi yaş dişleri, sterilizasyon amacıylaalkollü peçete ile temizlendi. Dişsteril bir şekilde kırılarak içerisindeki pulpa pens yardımı ile alındı ve bistüri ile birkaç parçaya ayrıldı. Parçalanan pulpa hazırlanan kollajenaz solüsyonu içinde, inkübatörde 1 saat bekletildi ve aralıklarla kontrol edilip, vortekslendi.Pulpahücrelerinin doku parcacıklarından ayrılıp, tek hücre süspansiyonu

haline gelmesi sağlandı ve 1 saat sonrasında inkübatörden çıkartılıp pipetaj işlemi yapıldı.Hücreler DPBS ile yıkanıp 1200 rpm' de 5 dk santrifüj edildi.Santrifüj sonrasında süpernatan uzaklaştırıldı ve hücreler tekrar DPBS ile yıkanıp 1200 rpm' de 5 dk santrifüj edildi.Santrifüj sonrasında süpernatan uzaklaştırılmış ve hücreler 5 ml kültür medyumuyla T-25cm^{2}' lik flakslara ekilip37°C, %5 CO^{2} inkübatöre konuldu.

Hücrelerin her 2 günde bir kültür medyumu değiştirildi ve hücrelerin çoğalması, flask yüzeyine yayılması takip edildi.

5.6.4. Diş folikülü kaynaklı mezenkimal kök hücre izolasyonu

Tam gömük yirmi yaş dişi ameliyatı sırasında alınan dişi saran folikül dokusu DPBS ile yıkanıp bistüri ile birkaç parçaya ayrıldı.Parçalanan folikül dokusu hazırlanan kollajenaz solüsyonu içinde, inkübatörde 1 saat bekletildi ve aralıklarla kontrol edilip, vortekslendi.Folikül dokusu tek hücre süspansiyonu haline geldiğinde inkübatörden çıkartılıp pipetaj işlemi yapıldı.Folikül hücreleri DPBS ile yıkanıp 1200 rpm' de 5 dk santrifüj edildi.Santrifüj sonrasında süpernatan uzaklaştırıldı ve hücreler tekrar DPBS ile yıkanıp 1200 rpm' de 5 dk santrifüj edildi.Santrifüj sonrasında süpernatan uzaklaştırıldı ve hücreler 5 ml kültür medyumuyla T-25cm^{2}' lik flakslara ekilip37°C, %5 CO^{2} inkübatöre konuldu.

Hücrelerin her 2 günde bir kültür medyumu değiştirildi ve hücrelerin çoğalması, flask yüzeyine yayılması takip edildi.

5.6.5. İzole edilen hücrelerin pasajlanması

T-25cm^{2}'lik flasklar içerisinde inkübatöre konulan hücrelerin her 3 günde bir kültür medyumu değiştirildi ve hücrelerin çoğalması, flask yüzeyine yayılması takip edildi.Yaklaşık 10-15 gün sonrasında hücreler flask yüzeyinde yaklaşık %70 yoğunluk gösterdiğinde pasaj işlemi yapıldı.Birinci kültür sıfırıncı pasaj (P0) kabul edilerek, birinci kültürü takipeden her kültür işlemi sonrası pasaj sayıları P1, P2, P3 şeklindebelirtildi.

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

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

Sayım sonucunda sayılan hücre sayısı, seyreltme oranı (2) ve sabit olan 10^4 (0,1 mm3 deki sayım) birbirleri ile çarpıldı ve elde edilen sonuç bize 1 ml' deki hücre sayısını verdi.

Hücre sayımı yapıldıktan sonra uygun oranda ($5x10^5$ hücre) hücre 10 ml hücre kültür solüsyonu ile sulandırıldı homojenize edildi ve T-75 cm^2' lik flasklara ekilip inkübatöre kaldırıldı.Her iki günde bir hücre medyumu değiştirilerek kültür işlemine devam edildi.

5.6.6. İzole edilen kök hücrelerin karakterizasyonu

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

5.6.6.1. Akım sitometri analizi

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

Hücreler P3 sonrasında tripsin ile kaldırılıp, hücre sayımı yapıldı. Hücre sayısı belirlendikten sonra yaklaşık $5x10^6$ hücreDPBS içinde homojenize edildi. Homojenize edilen hücreler polystyrene tüplere aktarıldı. Sonrasında belirlenenhücre yüzey işaretleyicilerine özel fluoresan izotiyosiyonat (FITC)-, fikoeritrin(PE)-, allophycocyanin (APC)- konjuge monoklonal antikorlar; CD73 PE, CD90 PE, CD105 PE, CD146 FITC, CD29 APC, CD45 FITC, CD34 PE, CD25 APC, CD28 PE, CD14 PE ve izotip kontrollerinden(Mouse IgG_1, κ) 10µl eklenerek 15 dakika boyunca oda ısısında, karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 2 ml DPBS eklendi ve 1200 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatan uzaklaştırıldı ve 500 µl hücre yıkama solüsyonu eklenip resüspanse edildi. Hazırlanan hücre süspansiyonu FACS Calibur akım sitometri cihazında okutuldu.

5.6.6.2. Osteojenik farklılaştırılması

Osteojenik farklılaşma için, P3'deki hücreler 6 kuyucuklu plaklarda her kuyuda $5x10^4$ hücre olacak şekilde tip I kollajen kaplı lamellere ekildi. Hücrelerin üzerlerine 2 ml osteojenik farklılaştırma besiyeri eklendi(β-glycerophosphate içermeyen) ve inkübatöre kaldırılıp 2 gün arayla besiyerleri değiştirildi. Hücreler yaklaşık 5 gün sonra kofluent olunca osteojenik farklılaştırma besiyerine β-glycerophosphate eklenip ve kültüre devam edildi.

50 ml' lik osteojenik farklılaştırma besiyeri içerisine 7,5 ml osteogenic supplements, 5 µl dexamethasone, 250 µl ascorbic acid, 175 µl 1M β-glycerophosphate ve 42,5 ml complete mesencult osteogenic medyum eklendi. 6 kuyucuklu plaklara ekilen hücrelerin her 3 günde üzerlerindeki eski besiyeri alınıpyeni osteojenik farklılaştırma besiyeri eklendi. Kültürün 4. haftasının

sonrasında lameller hücre dışı kalsifikasyonun gösterilmesi amacıyla alizarin kırmızısı ile boyandı.

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

5.6.6.3. Adipojenik farklılaştırılması

Adipojenik farklılaşma için, P3'deki hücreler 6 kuyucuklu plaklarda her kuyuda $5x10^4$ hücre olacak şekilde tip I kollajen kaplı lamellere ekildi. Hücrelerin üzerlerine 2 ml kültür medyumu eklendi, inkübatöre kaldırıldı ve 2 gün arayla besiyerleri yenilendi. Yaklaşık 5 gün sonrasında hücreler kofluent olduklarında kuyucuklardaki kültür medyumu alınıp adipojenik farklılaştırma besiyeri eklendi ve kültüre devam edildi.

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

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

edildikten sonra kuyular 2 defa distile su ile yıkandı. Kuyulardakilameller lamlar üzerine kapatılarak mikroskopta incelendi.

5.6.6.4. Kondrojenik farklılaştırılması

Kondrojenik farklılaşma için, P3'deki hücreler 6 kuyucuklu plaklarda her kuyuda $5x10^4$ hücre olacak şekilde tip I kollajen kaplı lamellere ekildi. Hücrelerin üzerlerine 2 ml kültür besiyeri eklendi, inkübatöre kaldırıldı ve 2 gün arayla kuyulardaki besiyerleri yenilendi. Yaklaşık 5 gün sonrasında hücreler kofluent olduklarında kuyucuklardaki hücrekültür besiyeri alınıp kondrojenikfarklılaştırma besiyeri eklendi ve kültüre devam edildi.

50 ml' lik kondrojenik farklılaştırma besiyeri içerisine 45 ml Osteocyte/ChondrocyteDifferentiation Basal Medium, 5 ml Chondrogenesis Supplement ve 25 µl Penicillin streptomycin eklendi. Kondrojenik olarak farklılaştırmaya alınan hücrelerin her 3 günde eski besiyerleri alındı ve yeni kondrojenik farklılaştırma besiyerleri eklendi. Kültürün 2. haftasının sonunda kondrojenik farklılaşmayı gösteren,kondrositler tarafından üretilen proteoglikanların varlığının belirlenmesi için alcian blue boyaması gerçekleştirildi.

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

5.6.7. Kök hücrelerin RealTime PCR ile gen ekspresyonlarına bakılması

İzole edilen kök hücrelerin Realtime PCR ile gene ekspresyonlarına bakıldı. İlk olarak RNA izolasyonu yapıldı, RNA' dan cDNA izolasyonu yapıldı ve sonrasında

GADPH, ALPL, RUNX2, NANOG, NESTİN, NOTCH, DSPP genlerinin ekspresyonlarına RealTime ile bakıldı.

İzole edilen kök hücrelerin her birinden ilk olarak High Pure RNA Isolatıon Kitinin protokolüne göre RNA izolasyonu yapıldı. $1x10^6$ hücre alındı ve 200 µl PBS ile sulandırıldı. 400µl liziz solüsyonu eklendi, 15 saniye vorteks yapıldı, filtreli tüpe aktarıldı ve toplama tüpünün üzerine konuldu. 8000 g de 1 dakika santrifüj yapıldı ve toplama tüpü atılıp filtreli tüp yeni toplama tüpünekonuldu. Üzerine 90 µl DNase incubation buffer ve 10 µl DNase 1 eklendi 15 dakika beklendi. 500µl yıkama solüsyonu 1 eklendi ve 8000 g' de 15 saniye santrifüj yapıldı. Toplama tüpü boşaltıldı ve 500µl yıkama solüsyonu 2 eklenip 13000 g' de 2 dakika santrifüj yapıldı. 100 µl elution solüsyonu eklendi 8000 g' de 5 dakika santrifüj yapıldı ve toplama tüpündeki sıvı yeni tüpe aktarıldı. İzole edilen RNA' ların RNA konstantrasyonları spektrofotometre ile ölçüldü.

İzole edilen RNA' lardan cDNA izolasyonu yapıldı. cDNA izolasyonu Transcriptor first strand cDNA synthesis kitin protokolüne göre yapıldı. İlk olarak konsantrasyonları ölçülen RNA' ların nanogram (ng) değerleri eşitlendi hepsi 50 ng olacak şekilde ayarlandı. Her hücre için tüpler alındı ve kitin içeriğindeki sudan tüplere konuldu, üzerine kit içeriğinde bulunan iki adet primerin her ikisindende 1 µl konuldu ve üzerine izole edilen RNA' lar konuldu toplamda 13 µl' lik bir sıvı oldu. 65˚C' de 10 dk boyunca bekletildi. 10 dk' lık bekleme sürecinde yeni tüpe 4 µl transkriptör reverse transcriptase reaction solüsyonudan eklendi, 2 µl deoxynucleotide eklendi, 0,5µl transkriptör reverse transcriptase eklendi ve 0,5µl Protectör RNase inhibitör eklendi. 10 dakika sonrasında hazırlanan yeni tüplere aktarıldı. 55˚C' de 30 dakika, 85˚C'de 15 dakika bekletildi.

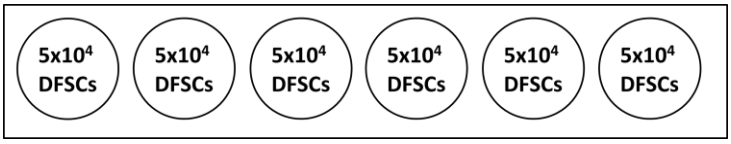
cDNA izolasyonundan sonra RealTime ile gen ekspresyonlarına bakıldı. LightCycler 480 probes master kitindeki protokole göre hazırlandı. Kit içeriğindeki sudan 4 µl eklendi, 10µl LightCycler eklendi ve 1µl RealTime ready assay konuldu üzerine her bir genden (GADPH, ALPL, RUNX2, NANOG, NESTİN, NOTCH, DSPP) 1 µl olacak şekilde eklendi. LightCycler 480 multiwell plate' e eklendi ve üzerine cDNA konuldu. 2 dakika 1500 g' de santrifüj yapıldı ve plate LightCycler 480 RealTime PCR cihazına konuldu ve 1.5 saat kadar sonra sonuçlar alındı ve analiz yapıldı.

5.6.8. Kök hücrelerin 48 kuyucuklu kültür plaklarına ekilmesi

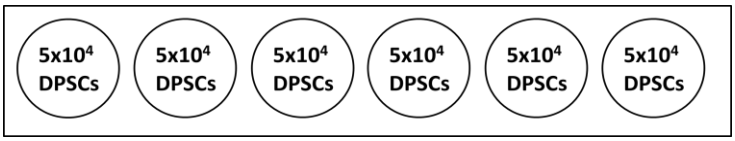
Mezenkimal kök hücrelerin lenfosit hücreleri üzerindeki immünolojik etkilerinin incelenmesi amacıyla kök hücreler ile lenfosit hücreleri kültüre edildi.Kök hücre ve lenfosit hücrelerinin ko kültürünü ilk aşamasında lenfosit izolasyonundan 2 gün önce kök hücreler 48 kuyucuklu plaklara ekildi.

5.6.8.1. SHED, DPSC ve DFSC hücrelerinin 48 kuyucuklu kültür plaklarına ekilmesi

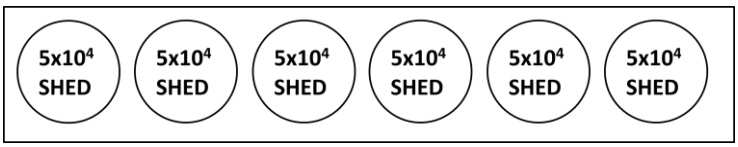
SHED, DPSC ve DFSC hücrelerinin lenfosit hücreleri ile ko kültürlerinin 2 gün öncesinde kök hücreler 48 kuyucuklu plaklara ekildi. Mezenkimal kök hücreler thoma lamında sayıldıktan sonra her bir kök hücre ayrı 48' lik plaklarda her kuyuda $5x10^4$ hücre olacak şekilde ekildi. Üzerlerine 500 µl hücre kültür besiyeri eklendi ve inkübatöre kaldırıldı. 2 gün sonrasında lenfosit izolasyonları yapıldı ve kök hücreler üzerine ekimleri yapıldı.



Şekil 5.2. DFSC hücrelerinin 48 kuyucuklu plaklara ekilmesinin şematik gösterimi.



Şekil 5.3. DPSC hücrelerinin 48 kuyucuklu plaklara ekilmesinin şematik gösterimi.



Şekil 5.4. SHED hücrelerinin 48 kuyucuklu plaklara ekilmesinin şematik gösterimi.

5.6.9. Sağlıklı bireylerden alınan venöz kandan lenfosit izolasyonu yapılması

Bu tez çalışmasında, çalışmaya dahil edilen tüm bireylere, hazırlanmış olan "Gönüllü Bilgilendirme Formu" okutuldu ve "Gönüllü Onam Formu" imzalattırıldı. Çalışmaya dahil edilen 10 sağlıklı bireyin her birinden yeşil kapaklı heparinli tüplere 28 ml venöz kan alındı ve alınan kanlardan lenfosit izolasyonu yapıldı.

Lenfosit izolasyonu steril kabinde yapıldı. Sağlıklı bireylerin her birinden alınan 28 mlkan15 ml' lik konik kapaklı falkonlara bölündü.15 ml'lik falkonlardaki bu kan örnekleri birebir oranında DPBS ile sulandırıldı.Aynı zamanda ayrı 15 ml'lik falkon tüpler alındıve her tüpe 3 ml fikol eklendi.Sulandırılan kanlar falkon tüpünün cidarından fikol üzerine pastor pipeti ile yavaşça yayıldı. Fikol ile sulandırılmış kanın birbirine karışmamasına özellikle dikkat edildi.Kan fikol üzerine yayıldıktan sonra 20 dakika boyunca 2000 rpm devirde santrifüj edildi. 20 dakika sonrasında yoğunluklarına göre en altta eritrositler, üst tarafında fikol, onun üstünde bulutsu tabaka (buffy coat) halinde olan periferal kan mononüklear hücreler (PBMC) ve onunda üstünde plazma ve DPBS olacak şekilde ayrıldı.Orta kısımda bulunan bulutsu tabaka (buffy coat) pastor pipetiile dikkatli bir şekilde alındı ve 15 ml' lik falkon tüplere aktarıldı.Üzerine 4 ml DPBS eklendi ve 1200 rpm' de 5 dakika santrifüj yapıldı.Santrifüj sonrası hücrelere 5 ml hücre kültür solüsyonu eklenip pipetaj yapılıp homojenize edildi ve 1200 rpm' de 5 dakika santrifüj yapıldı.Santrifüjden sonra süpernatan atıldı, hücreler 1 ml hücre kültür solüsyonunda sulandırıldı ve pipetaj yapılıp homojenize edildi.Homojenize edilen sıvıdan 10 µl eppendorfa alındı ve hücre sayımı yapıldı.

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

5.6.10. Lenfositlerin CFSE ile işaretlenmesi

Karboksifloresan süksinimidil ester (CFSE) hücre zarından geçebilen floresan birboyadır. Sitoplazmaya girince esteraz aktivitesinin gerçekleşmesi ile floresan grubun asetatlarıkesilip, floresan ışıma açığa çıkarve hücre zarından geçme özelliğini yitirir. Böylece hücrelerin sitoplazmasının boyanması sağlanır.

Hücre sayımından sonra izole edilen lenfositlerin bir kısmı hücre proliferasyonu bakılması amacıyla CFSE işaretlendi. 15 ml' lik falkonlarda bulunan ve CFSE işaretlenmesi için ayrılan hücreler üzerine 3 ml DPBS eklendi, pipetaj yapıldı ve homojenize edildikten sonra 1200 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatan uzaklaştırıldı ve pellet üzerine 1ml DPBS eklenip pipetaj yapılıp homojenize edildi. Homojenize edildikten sonra falkon içerisine2 µl CFSE konuldu(bu işlem ve sonrası karanlık ortamda gerçekleştirildi) ve pipetaj yapıldı.CFSE konulduktan sonra 12 dakika +4 C° de bekletildi. 12 dakika sonrasında 7 ml DPBS eklendi, pipetaj yapıldı ve 2000 rpmde 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatan atıldı ve 7 ml hücre kültür solüsyonu eklenip tekrar 1200 rpm de 5 dakika santrifüj yapıldı. Son yıkama işleminden sonra 1 ml hücre kültür solüsyonu eklenip hücre sayımı yapıldı.

5.6.11. Kök hücre ve lenfositlerin ko-kültürünün yapılması

Hücre izolasyonları yapıldıktan ve hücreler sayıldıktan sonra bir grup lenfosit hücresi kök hücreler üzerine direkt ekildi. Bir grup lenfosit hücresi ise CFSE ile işaretlenip kök hücreler üzerine eklendi. Kök hücreler üzerine lenfosit hücreleri eklendikten sonra uyaranlar eklendi ve inkübatöre kaldırıldı 3 gün boyunca kültüre alındı. 3 günün sonrasında lenfosit hücrelerinde proliferasyon, $CD4^{+}FoxP3^{+}$, Fas/Fas Ligand ve CD3/CD4/CD8 bakıldı.

5.6.11.1. SHED hücreleri ile lenfositlerin ko-kültürlerinin yapılması

Lenfosit izolasyonundan 2 gün önce 48 kuyucuklu plaklara ekilen SHED hücreleri üzerindeki eski hücre kültür solüsyonu alındı. SHED hücreleri üzerine

izole edilen lenfosit hücreleri her kuyuda $5x10^5$ olacak şekilde 500 µl hücre kültür solüsyonu ile birlikte eklendi.

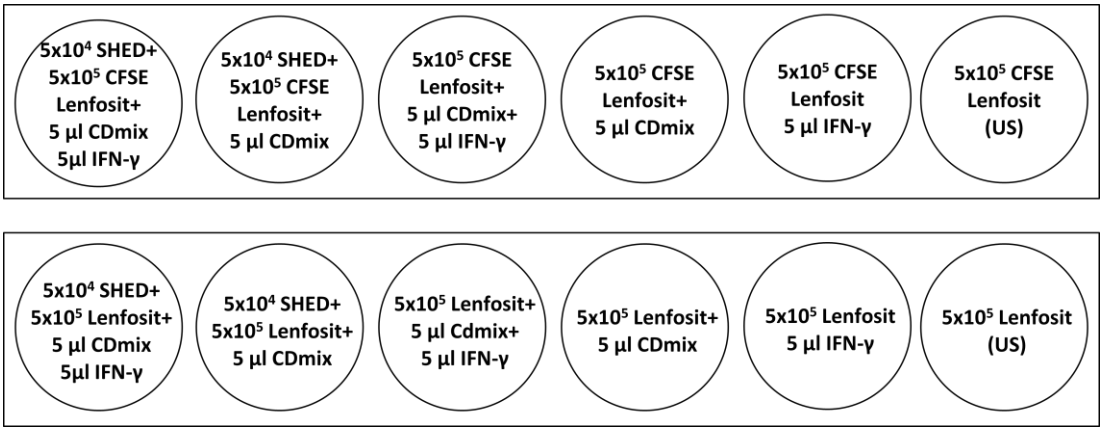
Lenfosit izole edildikten sonra CFSE işaretlenen hücreler de SHED hücreleri üzerine her kuyuda $5x10^5$ olacak şekilde 500 µl hücre kültür solüsyonu ile birlikte eklendi.

SHED hücreleri üzerine lenfosit hücreleri eklendikten sonra lenfosit hücrelerinin uyarılması için 5 µl CDmix eklendi.

SHED ve lenfosit hücrelerinin birlikte kültürlerinin yanında SHED yokluğunda da lenfosit hücrelerinin kültürleri yapıldı. CFSE' li ve CFSE' siz lenfosit hücreleri 48 kuyucuklu plaklara her kuyuda $5x10^5$ hücre olacak şekilde 500 µl hücre kültür solüsyonu ile ekildi, 5 µl CDmix ile uyaranlı ve uyaransız kültürleri yapıldı.

5.6.11.1.1. Hücrelerin IFN-γ ile uyarılması

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



Şekil 5.5. SHED hücreleri üzerine CFSE' li ve CFSE' siz lenfosit hücrelerinin ve CDmix, IFN-γ uyaranlarının eklenmesinin şematik gösterimi.

5.6.11.2. DPSC hücreleri ile lenfositlerin ko-kültürlerinin yapılması

Lenfosit izolasyonundan 2 gün önce 48 kuyucuklu plaklara ekilen DPSC hücreleri üzerindeki eski hücre kültür solüsyonu alınmıştır. DPSC hücreleri üzerine izole edilen lenfosit hücreleri her kuyuda $5x10^5$ olacak şekilde 500 µl hücre kültür solüsyonu ile birlikte eklendi.

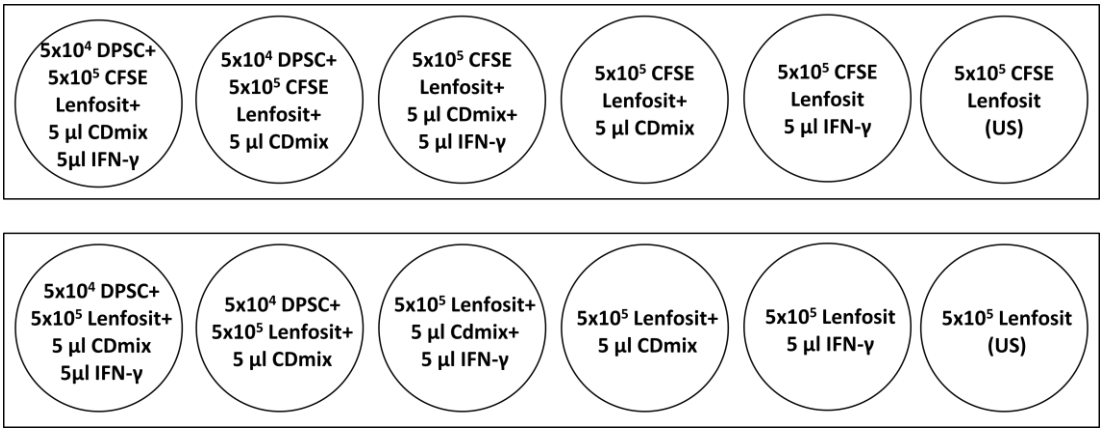
Lenfosit izole edildikten sonra CFSE işaretlenen hücreler DPSC hücreleri üzerine her kuyuda $5x10^5$ olacak şekilde 500 µl hücre kültür solüsyonu ile birlikte eklendi.

DPSC hücreleri üzerine lenfosit hücreleri eklendikten sonra lenfosit hücrelerinin uyarılması için 5 µl CDmix eklendi.

DPSC ve lenfosit hücrelerinin birlikte kültürlerinin yanında DPSC yokluğunda da lenfosit hücrelerinin kültürleri yapıldı. CFSE' li ve CFSE' siz lenfosit hücreleri 48 kuyucuklu plaklara her kuyuda $5x10^5$ hücre olacak şekilde 500 µl hücre kültür solüsyonu ile ekildi, 5 µl CDmix ile uyaranlı ve uyaransız kültürleri yapıldı.

5.6.11.2.1. Hücrelerin IFN-γ ile uyarılması

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



Şekil 5.6. DPSC hücreleri üzerine CFSE' li ve CFSE' siz lenfosit hücrelerinin ve CDmix, IFN-γ uyaranlarının eklenmesinin şematik gösterimi.

5.6.11.3. DFSC hücreleri ile lenfositlerin ko-kültürlerinin yapılması

Lenfosit izolasyonundan 2 gün önce 48 kuyucuklu plaklara ekilen DFSC hücreleri üzerindeki eski hücre kültür solüsyonu alındı. DFSC hücreleri üzerine izole edilen lenfosit hücreleri her kuyuda $5x10^5$ olacak şekilde 500 µl hücre kültür solüsyonu ile birlikte eklendi.

Lenfosit izole edildikten sonra CFSE işaretlenen hücreler DFSC hücreleri üzerine her kuyuda $5x10^5$ olacak şekilde 500 µl hücre kültür solüsyonu ile birlikte eklendi.

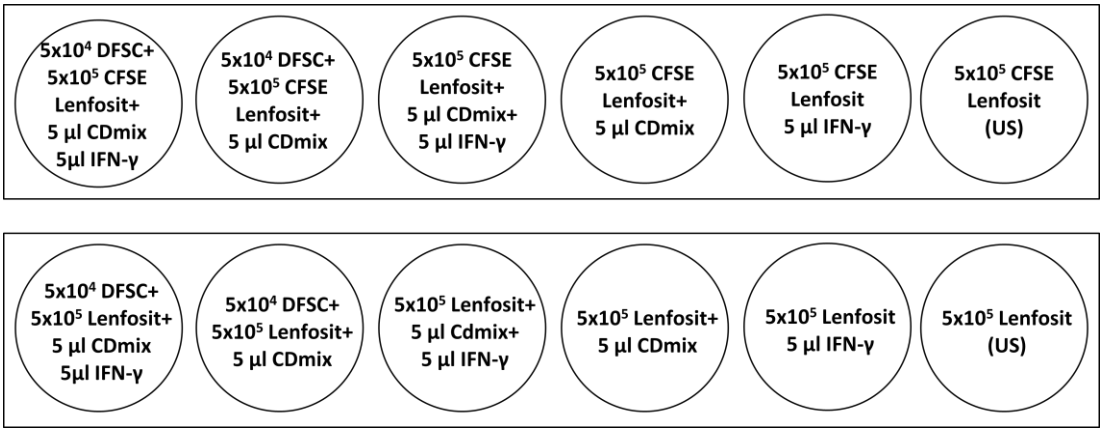
DFSC hücreleri üzerine lenfosit hücreleri eklendikten sonra lenfosit hücrelerinin uyarılması için 5 µl CDmix eklendi.

DFSC ve lenfosit hücrelerinin birlikte kültürlerinin yanında DFSC yokluğunda da lenfosit hücrelerinin kültürleri yapıldı. CFSE' li ve CFSE' siz lenfosit hücreleri 48 kuyucuklu plaklara her kuyuda $5x10^5$ hücre olacak şekilde 500 µl hücre kültür solüsyonu ile ekildi, 5 µl CDmix ile uyaranlı ve uyaransız kültürleri yapıldı.

5.6.11.3.1. Hücrelerin IFN-γ ile uyarılması

48 kuyucuklu plaklardaki DFSC hücreleri üzerine CFSE' li ve CFSE' siz lenfosit hücreleri eklendi ve CDmix ile uyarımları yapıldı. CDmix ile aynı zamanda bir grup kuyuya IFN-γ stok solüsyonundan 5 µl eklendi, bir grup kuyuya ise

karşılaştırma amaçlı IFN-γ eklenmedi ve bu şekilde inkübatöre kaldırıldı. İnkübatörde 3 gün (72 saat) boyunca kültür edildi.



Şekil 5.7. DFSC hücreleri üzerine CFSE' li ve CFSE' siz lenfosit hücrelerinin ve CDmix, IFN-γ uyaranlarının eklenmesinin şematik gösterimi.

5.6.12. Lenfositlerin proliferasyon analizi

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

İzole edilen lenfosit hücreleri proliferasyonun takibi için CFSE işaretlendi.Kök hücrelerin varlığında ve yokluğunda kültürleri yapılan ve 3 gün (72 saat) boyunca 37°C, %5 CO^2 inkübatörde bekletilen hücrelere proliferasyon analizi yapıldı.

Kuyulara pipetaj yapılarakdipte kalan ve hücre kültür solüsyonu içindeki hücrelerin homojenize edilmesi sağlandı. Kuyulardaki besiyerleri alındı ve flow tüplerine konuldu.Tüpler 1200 rpm' de 5 dakika santrifüj yapıldı ve santrifüj sonrasında süpernatanlar sitokin tayini için eppendorflara alınıp -20 C° ye kaldırıldı.Tüpteki pellet üzerine 2 ml hücre yıkama solüsyonu eklendi ve 1200 rpm'

de 5 dakika santrifüj yapıldı.Santrifüj sonrasında süpernatan atıldı ve tekrar 2 ml hücre yıkama solüsyonu eklenip 1200 devirde santrifüj yapıldı.Santrifüj sonrasında süpernatan atıldı ve 500 µl hücre yıkama solüsyonu eklenip vorteks yapıldı.Tüpler akım sitometri cihazında okutuldu ve değerlendirildi.

5.6.13. Lenfositlerin $CD4^+FoxP3^+$ hücre analizi

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

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

5.6.14. Lenfositlerin Fas/FasLigand analizi

İzolasyonundan sonra kök hücreler ile direk kültürü yapılan lenfosit hücrelerinin 3 gün kültür sonrasında Fas/FasLbakıldı veFas/FasL kök hücre varlığında ve yokluğundaki miktar değişimlerinin incelenmesi için akım sitometri cihazında Fas/FasLbakıldı.

Fas CD-95 olarak da adlandırılır. Bu reseptörhücre yüzeyinde bulunur ve hedef hücrelerde apoptozu tetikleyebilir. Ayrıca yine bu reseptör apoptoz belirleyen moleküllerin bir üyesidir. Fas ligand (CD178) ya plazma zarında bulunan ve biyolojik olarak aktif bir proteindir ya da hücre dışında çözülmüş Fas ligand olarak bulunur. Fas liganda spesifik bağlanmanın sonucu apoptozun uyarılmasını koordine eden ve substratların proteolizini gerçekleştiren sistein proteaz akışının aktivasyonudur. Fas ligand Fas' a bağlandığında hedef hücrenin ölüm olgusunu başlatır. Fas/ Fas ligand sistemi immün yanıtın sonlandırılmasında da önemli bir rol oynar.

Kuyulara pipetaj yapılarak hücrelerin homojenize bir şekilde dağılması sağlandı ve bu homojenize sıvıdan 150 µl alınıp ve flow tüplerine konuldu. Sonrasında flow tüplerine 2 ml DPBS eklendi ve 1200 rpm' de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatan uzaklaştırılıp tüplere 100 µl DPBS konuldu. Tüplere 5 µl Fas (CD95 FITC), 5 µlbiotin mouse anti-human CD178 ve 2,5 µlPE streptavidin konuldu. İzotip kontrol olan tüpe ise 5 µl biotin mouse IgG1 κ ısotype control ve ve 2,5 µlPE streptavidin konuldu. Tüpler yavaşça vortekslendi ve 15 dakika oda ısısında karanlıkta bekletildi. 15 dakika sonrasında 2 ml hücre yıkama solüsyonu eklendi ve 1200 rpm' de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatan atıldı ve 500 µl hücre yıkama solüsyonu konulup vorteks yapılıp akım sitometri cihazında okutuldu.

5.6.15. Hücre kültür süpernatanlarında sitokin tayini

Kültür süpernatantları -20 C°' den alındı ve sitokin analizi Cytometric Bead Array (CBA) Th1/Th2/Th17 sitokin kiti kullanılarak yapıldı. Kit protokolüne göre öncelikle standart dilüsyonlar hazırlandı. Bu işlem için standartlar 15 ml' lik falkon tüpüne boşaltıldı ve 2 ml seyreltici solüsyon içerisinde çözüldü. 15 dakika oda

ısısında karanlıkta bekletilen standart tüpü pipetleme ile yavaşça karıştırılıp belirli oranlarda dilüsyonları yapıldı (negatif kontrol, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1;64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024). Sonrasında boncukların hazırlanmasında, kit içeriğindeki boncuklar yavaşça vortekslendi ve pipetlendi. Tüp sayısı belirlendikten sonra her bir boncuktan her bir tüpe 5 µl eklenecek şekilde hazırlandı. Hazırlanan standart tüplerine 25 µl standartlardan, örnek tüplerine ise 25 µl örneklerden konuldu. Boncuk karışımı kısa bir süre 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 ede edilen denkleme göre belirlendi.

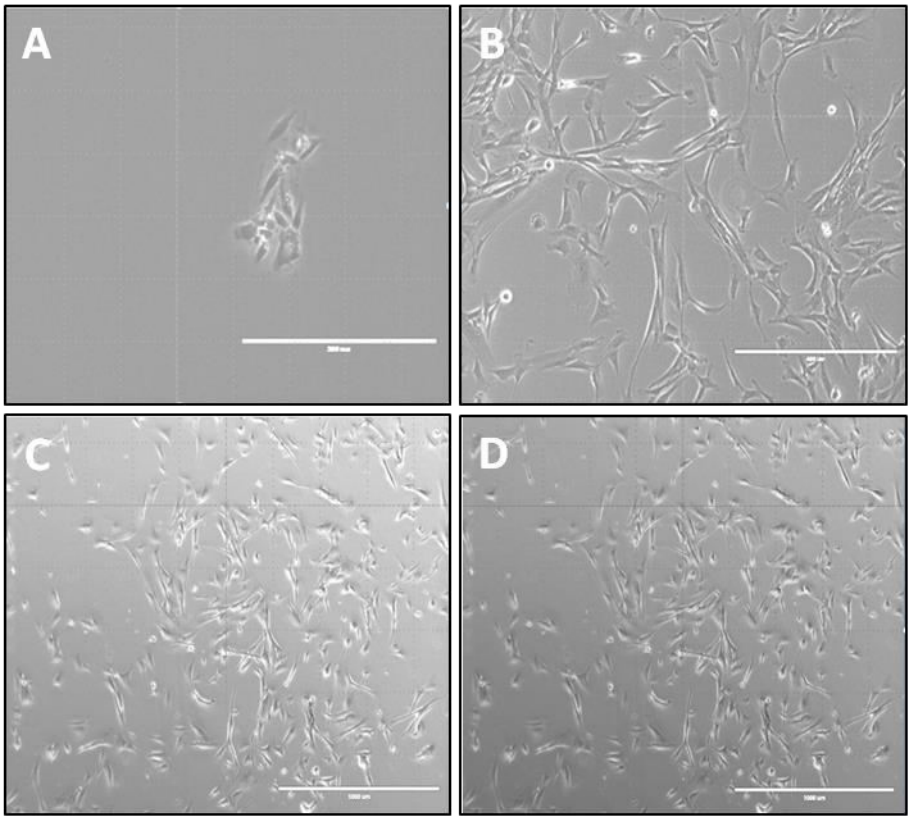
5.6.16. İstatistiksel analiz

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'den küçük değerler anlamlı olarak kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Süt Dişi Pulpası Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu

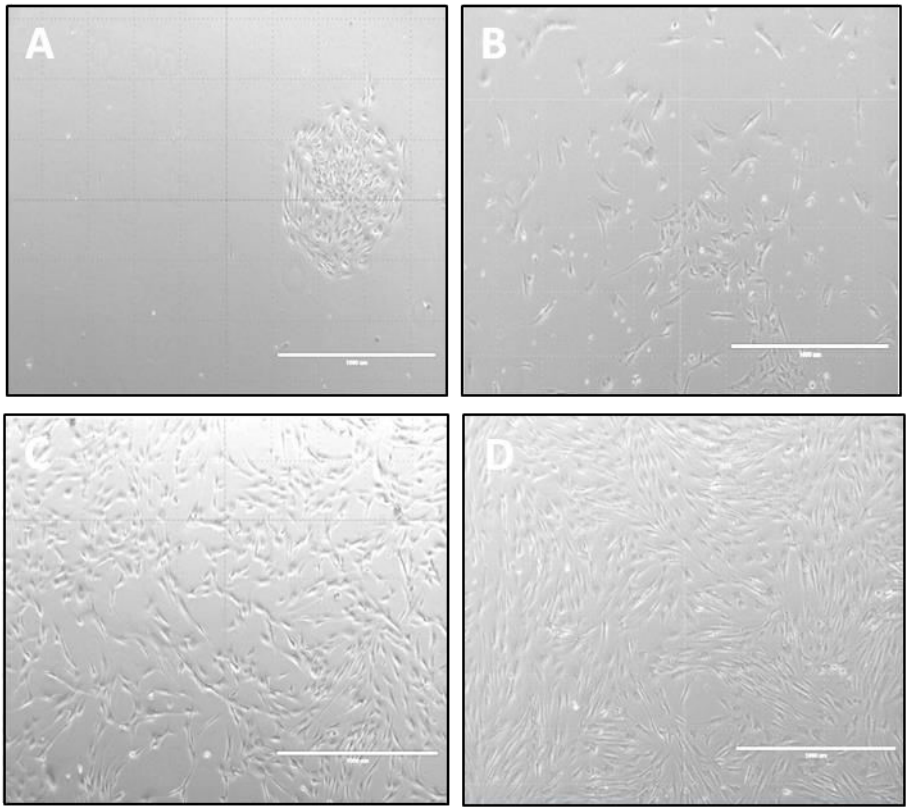
Süt dişi pulpasından, kök hücreler izole edildikten sonra T-25 $cm^{2,}$ lik flasklara ekildi ve hücrelerin morfolojik özellikleriinvert mikroskop ile incelendi. Birinci kültürde tek tek görülen hücrelerin sonraki günlerde koloni oluşturup çoğaldıkları görüldü (Şekil 6.1.A). Hücreler yaklaşık %70 yoğunluk gösterdikten sonra birinci pasaja alınarak (P1) T-75 $cm^{2,}$ lik flasklara aktarıldı ($5x10^5$ hücre).Pasajlama işlemlerinden sonra hücreler 7 gün içerisinde flask yüzeyinde %70 yoğunluk gösterdi ve kültürler bir sonraki pasaja alındı (Şekil 6.1.).



Şekil 6.1. SHED hücrelerinin morfolojik görünümü.A) SHED 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: A-BX20, C-DX10).

6.2. Tam Gömük Yirmi Yaş Diş Pulpası Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu

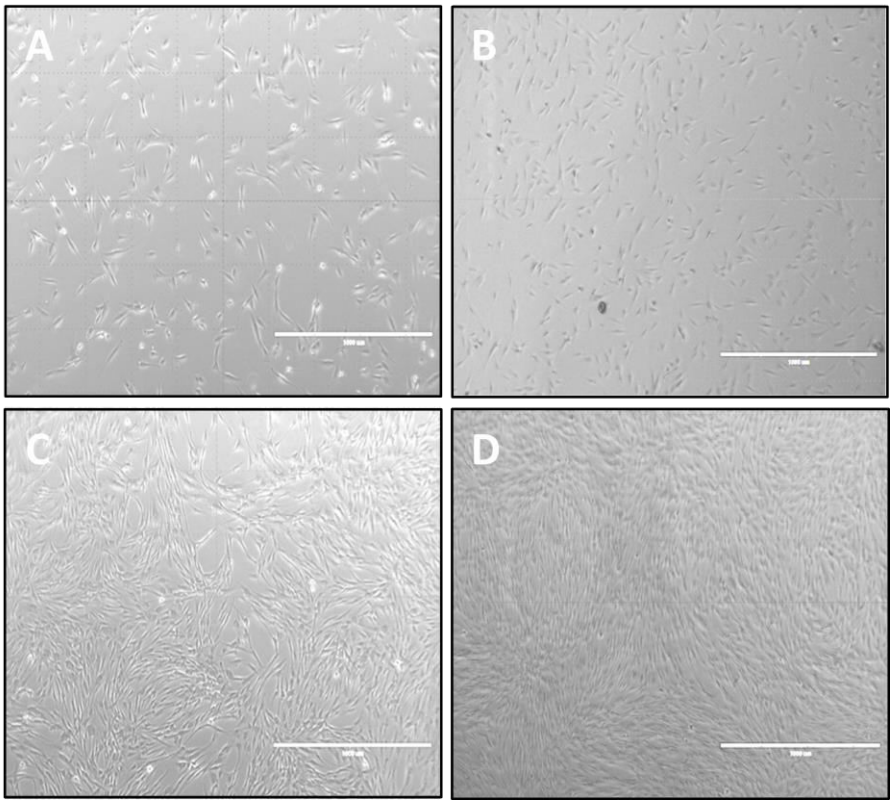
Tam gömük yirmi yaş dişi pulpasından, kök hücreler izole edildikten sonra T-25 $cm^{2,}$ lik flasklara ekildi ve hücrelerin morfolojik özellikleri invert mikroskop ile incelendi. Birinci kültürde hücrelerin hızla çoğalıp koloni oluşturdukları görüldü (Şekil 6.2.A). Hücreler yaklaşık %70 yoğunluk gösterdikten sonra birinci pasaja alınarak T-75 $cm^{2,}$ lik flasklara aktarıldı. Pasajlama işleminden sonra hücreler yaklaşık 9 gün içerisinde flask yüzeyini kapladı ve bir sonraki pasaja alındı (Şekil 6.2.).



Şekil 6.2. DPSC hücrelerinin morfolojik görünümü.A) DPSC 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: X10).

6.3. 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 yoğunluk 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 6. 3.).

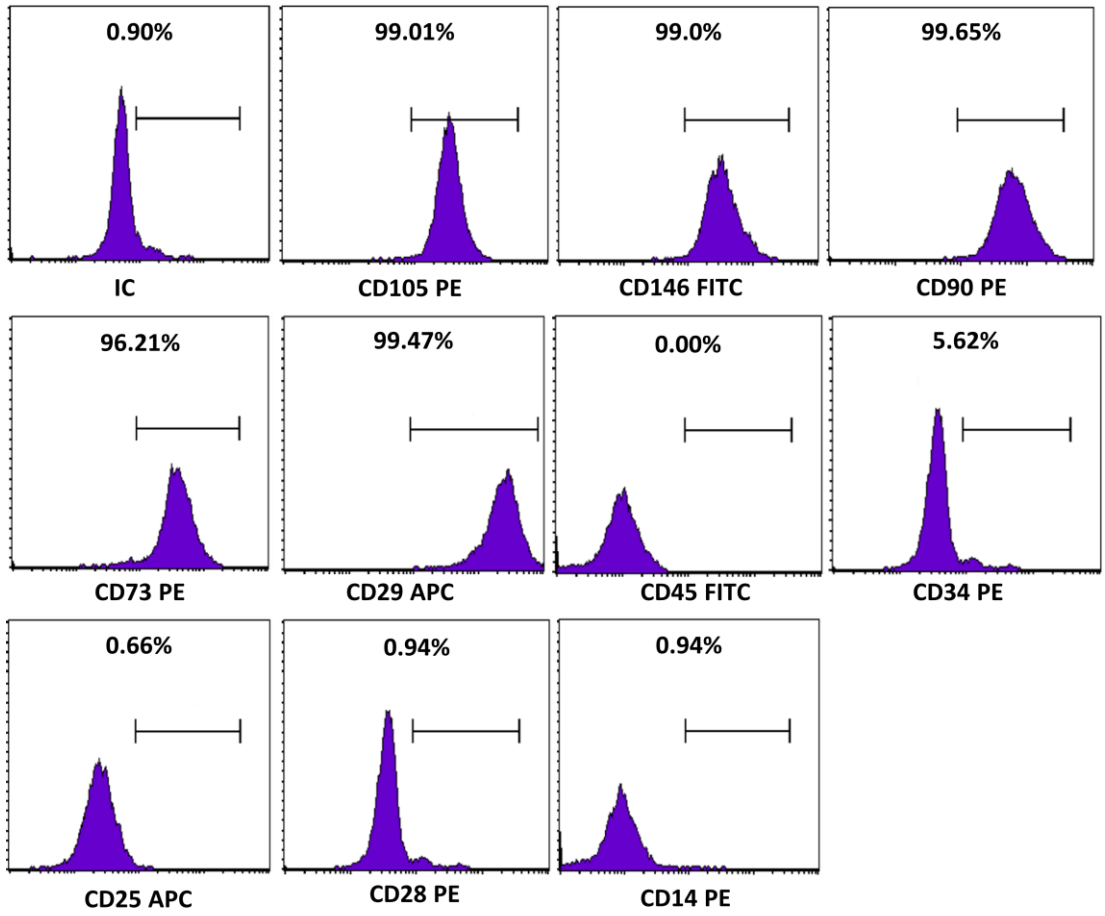


Şekil 6.3. DFSC hücrelerinin morfolojik görünümü.A) DFSC hücrelerinin birinci kültür (P0, 3. gün), B) birinci pasaja alındıktan sonra (P1, 3. gün), C-D) sonraki alt kültürlerinin (C: P2, 3. gün; D: P3, 3. gün) invert mikroskobu görüntülerinde, kök hücrelerin fibroblast benzeri iğsi morfolojiye sahip oldukları görülmektedir (Büyütme:AX20, B-C-DX10).

6.4. Süt Dişi Pulpası Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

6.4.1. SHED hücrelerin akım sitometri analizi

SHED hücreleri üçüncü pasaja alındıktan yaklaşık 7 gün sonrasında kültür konflüent oldu ve hücrelerin karakterizasyon analizleri yapıldı. Bu hücrelerin akım sitometri cihazında hematopoetik kök hücre belirteci olanCD45, CD34, CD25, CD28 ve CD14 işaretlerini yüzeylerinde göstermedikleri görüldü. Aynı zamanda bu hücrelerin kök hücre işaretleri olanCD73, CD90, CD105, CD146 ve CD29' u yüzeylerinde gösterdikleri görüldü (Şekil 6.4.).



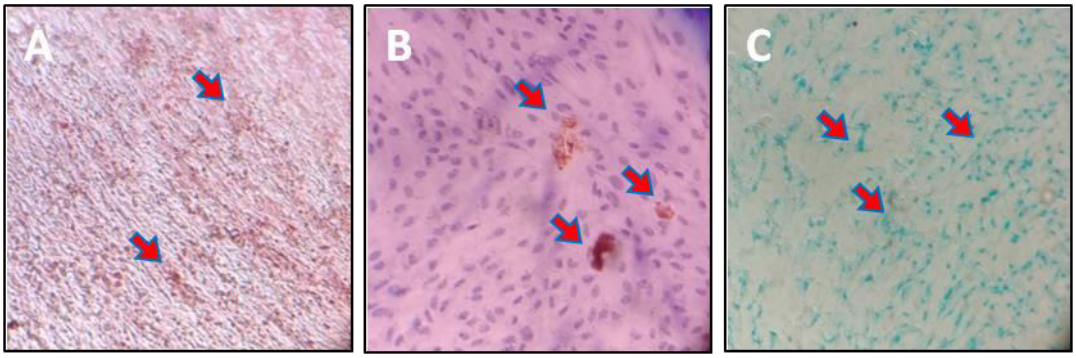
Şekil 6.4.SHED hücrelerinin immunofenotipik özelliklerinin akım sitometri sonuçları.CD45 (%0,0), CD14 (%0,94), CD34 (%5,62), CD25 (%0,66) ve CD28 (%0,94) negatif ekspresyon gösterirken, MKH' lara özgü CD105 (%99,01), CD146 (%99), CD90 (%99,65), CD73 (%96,21) ve CD29 (%99,47) pozitif olduğu gösterildi.

6.4.2. SHED hücrelerin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik yönde farklılaştırılması

Osteojenik farklılaştırma için uyarılan SHED hücrelerinin osteoblast benzeri hücrelere farklılaştıkları gözlendi. Osteojenik farklılaştırma besiyerine alınan SHED hücreleri kültürün 4. haftasında alizarin kırmızısı ile boyandı ve mineralize kemik nodülleri görüldü (Şekil 6.5.A).

Adipojenik olarak farklılaştırmak için adipojenik besiyerinde 2 hafta süre ile kültürleri yapıldı ve SHED hücrelerinin adiposit benzeri hücrelere farklılaştıkları gösterildi.Kültürün ikinci haftasında Oil red O ile yapılan boyama sonrasında kırmızı renkte hücre içiyağ damlacıkları görüldü (Şekil 6.5.B).

Kondrojenik olarak farklılaştırmak için SHED hücrelerinin 2 hafta kondrojenik besiyeri ile kültürleri yapıldı ve hücrelerin kondrosit benzeri hücrelere farklılaştıkları görüldü. Kültürün 2. Haftasında alcian blue ile boyanan hücrelerde kondrositler tarafından üretilen proteoglikanların mavi renkte boyandığı görüldü (Şekil 6.5.C).

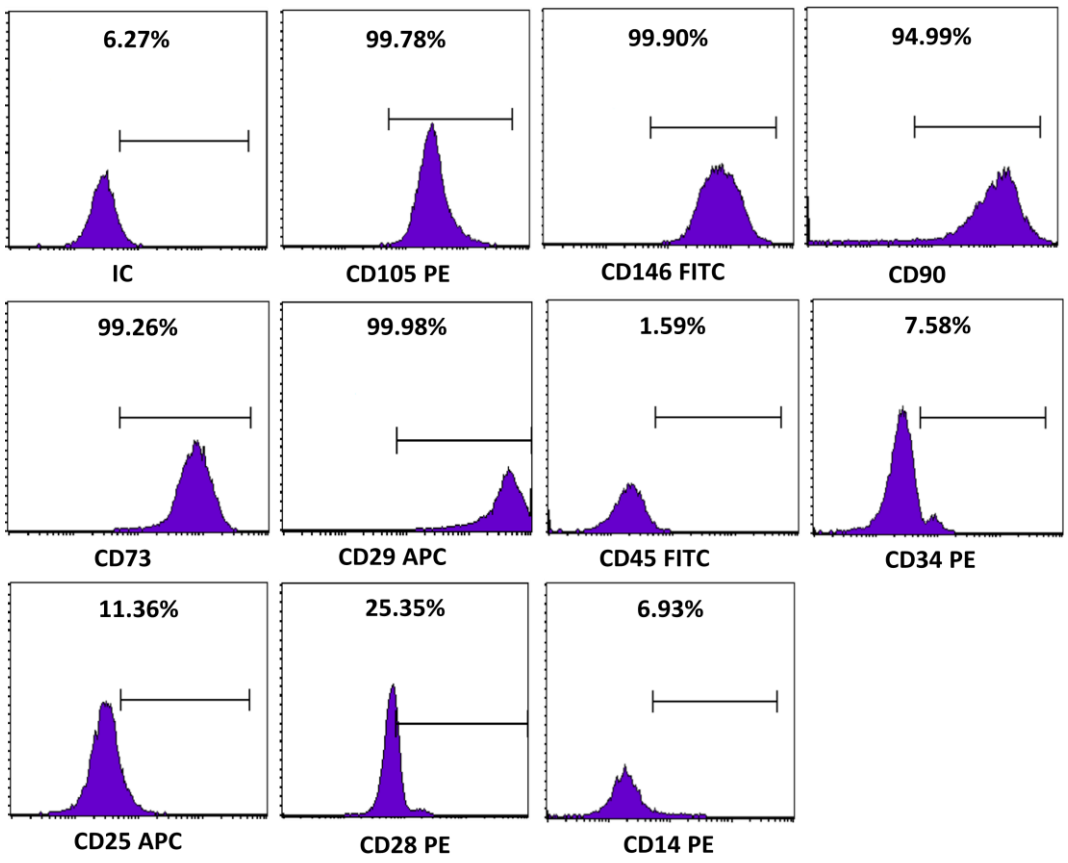


Şekil 6.5. SHED hücrelerinin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma özellikleri.A) Osteojenik farklılaştırma besiyeri ile kültürü yapılan ve sonrasında alizarin kırmızısı ile boyanan SHED hücrelerinde parlak kırmızı renkte boyanmış osteoblast nodülleri görülmektedir.B) Adipojenik farklılaştırma besiyeri ile kültürü yapılan ve sonrasında Oil red o ile boyanan SHED hücrelerinde kırmızı renkte yağ damlacıkları görüldü.C) Kondrojenik farklılaştırma besiyeri ile kültürü yapılan ve sonrasında Alcian blue ile boyanan SHED hücrelerinde mavi renkli boyanan proteoglikanlar görüldü.

6.5. Tam Gömük Yirmi Yaş Dişi Pulpası Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

6.5.1. DPSC hücrelerin akım sitometri analizi

DPSC hücreleri üçüncü pasaja alındıktan yaklaşık 9 gün sonrasında kültür konflüent oldu ve hücrelerin karakterizasyon analizleri yapıldı. Bu hücrelerin akım sitometrik analizleri sonucunda hematopoetik kök hücre belirteci olanCD45, 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 6.6.).



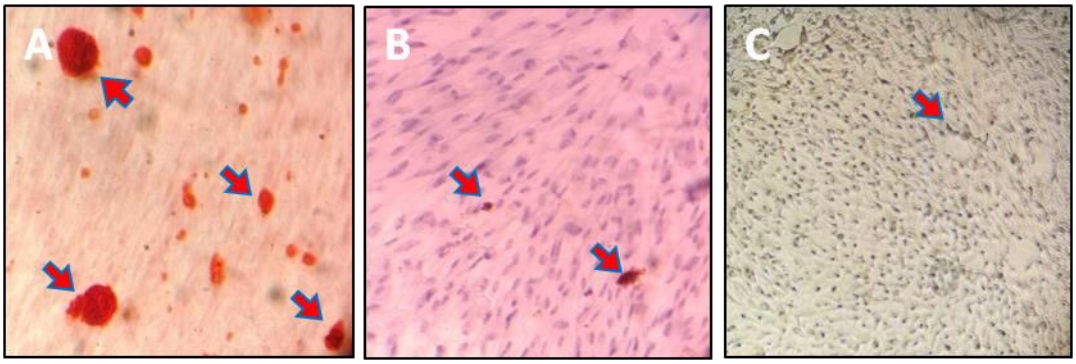
Şekil 6.6. DPSC hücrelerinin immunofenotipik özelliklerinin akım sitometri sonuçları.CD45 (%1,59), CD14 (%6,93), CD34 (%7,58), CD25 (%11,36) ve CD28 (%25,35) negatif ekspresyon gösterirken, MKH' lara özgü CD105 (%99,78), CD146 (%99,90), CD90 (%94,99), CD73 (%99,26) ve CD29 (%99,98) pozitif olduğu gösterildi.

6.5.2. DPSC hücrelerin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik yönde farklılaştırılması

Osteojenik farklılaştırma için uyarılan DPSC hücrelerinin osteoblast benzeri hücrelere farklılaştıkları gözlendi. Osteojenik farklılaştırma besiyerine alınan DPSC hücreleri kültürün 4. haftasında alizarin kırmızısı ile boyandı ve mineralize kemik nodülleri görüldü. Buradaki osteoblast nodüllerinin diğer hücre gruplarına oranla çok belirgin ve fazla sayıda oldukları görüldü (Şekil 6.7.A).

Adipojenik olarak farklılaştırmak için adipojenik besiyerinde 2 hafta süre ile kültürleri yapıldı veDPSC hücrelerinin adiposit benzeri hücrelere farklılaştıkları gösterildi.Kültürün ikinci haftasında Oil red O ile yapılan boyama sonrasında kırmızı renkte hücre içi yağ damlacıkları görüldü (Şekil 6.7.B).

Kondrojenik olarak farklılaştırmak için DPSC hücrelerinin 2 hafta kondrojenik besiyeri ile kültürleri yapıldı ve hücrelerin kondrojenik benzeri hücrelere farklılaştıkları görüldü. Kültürün 2. haftasında alcian blue ile boyanan hücrelerde kondrositler tarafından üretilen proteoglikanların mavi renkte boyandığı görüldü (Şekil 6.7.C).

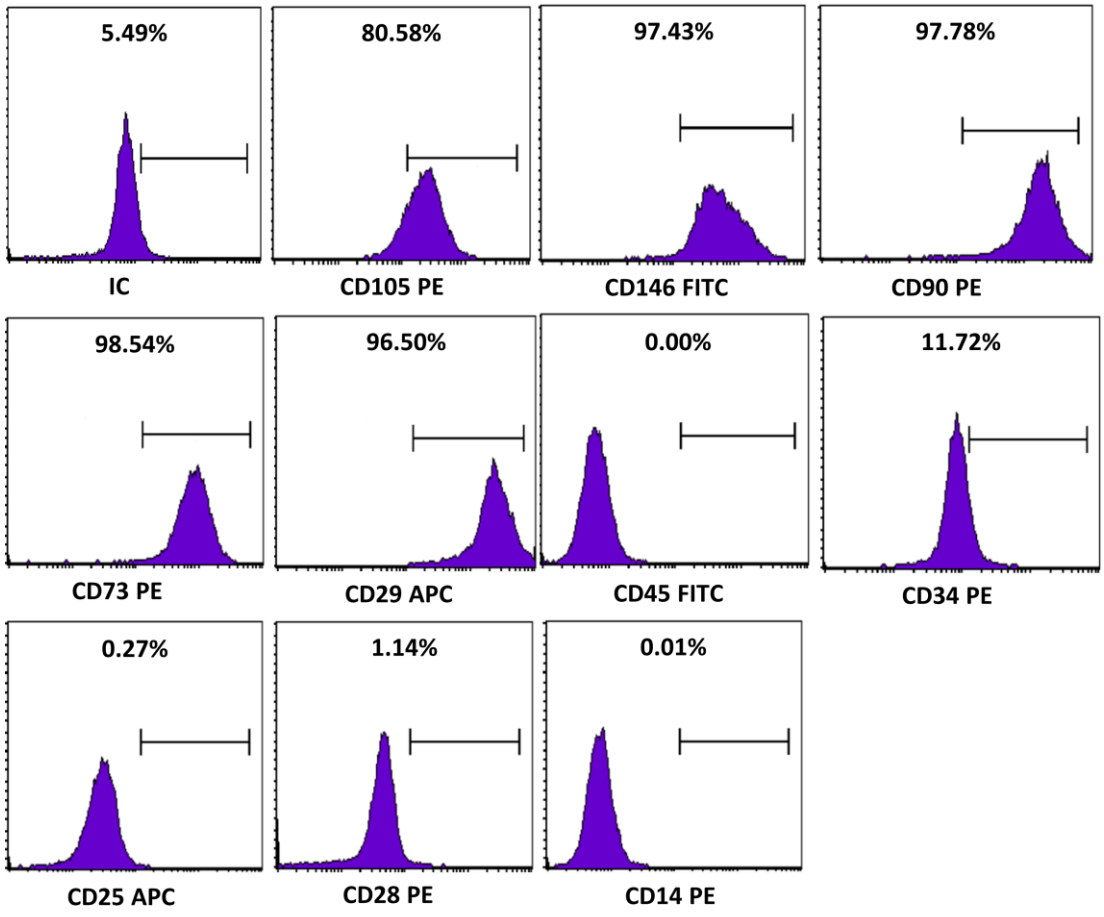


Şekil 6.7. DPSC hücrelerinin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma özellikleri. A) Osteojenik farklılaştırma besiyeri ile kültürü yapılan ve sonrasında alizarin kırmızısı ile boyanan DPSC hücrelerinde parlak kırmızı renkte boyanmış osteoblast nodülleri görülmektedir. B) Adipojenik farklılaştırma besiyeri ile kültürü yapılan ve sonrasında Oil red o ile boyanan DPSC hücrelerinde kırmızı renkte yağ damlacıkları görüldü. C) Kondrojenik farklılaştırma besiyeri ile kültürü yapılan ve sonrasında Alcian blue ile boyanan DPSC hücrelerinde mavi renkli boyanan proteoglikanlar görüldü.

6.6. Diş Folikülü Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

6.6.1. DFSC hücrelerin akım sitometri analizi

DFSC 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 olanCD45, 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 6.8).



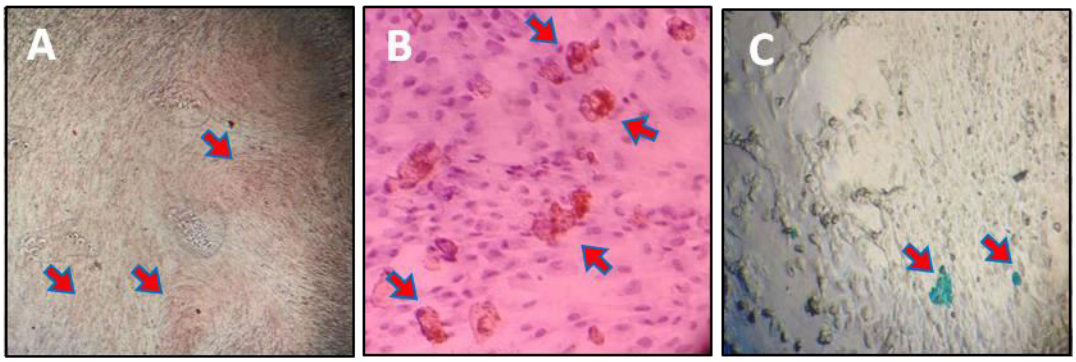
Şekil 6.8. DFSC hücrelerinin immunofenotipik özelliklerinin akım sitometri sonuçları.CD45 (%0,0), CD14 (%0,01), CD34 (%11,72), CD25 (%0,27) ve CD28 (%1,14) negatif ekspresyon gösterirken, MKH' lara özgü CD105 (%80,58), CD146 (%97,43), CD90 (%97,78), CD73 (%98,54) ve CD29 (%96,50) pozitif olduğu gösterildi.

6.6.2. DFSC hücrelerin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik yönde farklılaştırılması

Osteojenik farklılaştırma için uyarılan DFSC hücrelerinin osteoblast benzeri hücrelere farklılaştıkları gözlendi. Osteojenik farklılaştırma besiyerine alınan DFSC hücreleri kültürün 4. haftasında alizarin kırmızısı ile boyandı ve mineralize kemik nodülleri görüldü(Şekil 6.9.A).

Adipojenik olarak farklılaştırmak için adipojenik besiyerinde 2 hafta süre ile kültürleri yapıldı ve DFSC 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 6.9.B).

Kondrojenik olarak farklılaştırmak için DFSC hücrelerinin 2 hafta kondrojenik besiyeri ile kültürleri yapıldı ve kondrosit benzeri hücrelere farklılaştıkları görüldü. Kültürün 2. haftasında alcian blue ile boyanan hücrelerde kondrositler tarafından üretilen proteoglikanların mavi renkte boyandığı görüldü (Şekil 6.9.C).



Şekil 6.9. DFSC hücrelerinin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma özellikleri. A) Osteojenik farklılaştırma besiyeri ile kültürü yapılan ve sonrasında alizarin kırmızısı ile boyanan DFSC hücrelerinde parlak kırmızı renkte boyanmış osteoblast nodülleri görülmektedir. B) Adipojenik farklılaştırma besiyeri ile kültürü yapılan ve sonrasında Oil red o ile boyanan DFSC hücrelerinde kırmızı renkte yağ damlacıkları görüldü. C) Kondrojenik farklılaştırma besiyeri ile kültürü yapılan ve sonrasında Alcian blue ile boyanan DFSC hücrelerinde mavi renkli boyanan proteoglikanlar görüldü.

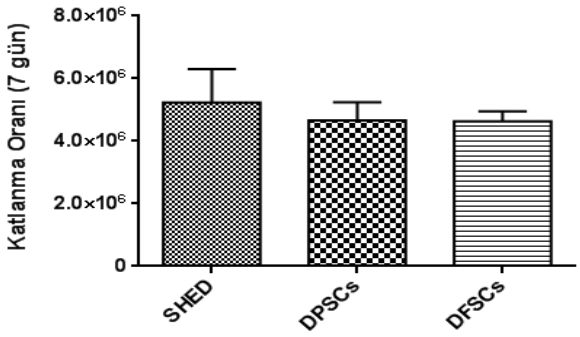
SHED, DPSC ve DFSC hücrelerinin izolasyonu sonrasında bu hücrelerin akım sitometri cihazında kök hücre yüzey belirteçlerini eksprese edip etmedikleri gösterildi. Bu hücrelerin mezenkimal kök hücre belirteçleri olan CD105, CD73, CD90, CD29, CD146 işaretlerini yüzeylerinde gösterdikleri görüldü. SHED hücrelerinin diğer kök hücre gruplarına kıyasla hematopoetik kök hücre işaretlerini daha az oranda eksprese ettikleri görüldü.

Tablo 6.1. SHED, DPSC ve DFSC hücrelerinin akım sitometrik analizlerinin karşılaştırılması

%	CD105	CD146	CD90	CD73	CD29	CD45	CD34	CD25	CD28	CD14
SHED	99,01	99	99,65	96,21	99,47	0	5,62	0,66	0,94	0,94
DPSCs	99,78	99,9	94,99	99,26	99,98	1,59	7,58	11,36	25,35	6,93
DFSCs	80,58	97,43	97,78	98,54	96,50	0	11,72	0,27	1,14	0,01

6.7. SHED, DPSC ve DFSC Hücrelerinin Katlanma Oranları

SHED, DPSC ve DFSC hücreleri T-75 cm^{2}' lik flasklara $5x10^{5}$ hücre olacak şekildeekildi ve kültürleri yapıldı. Yaklaşık 7 gün sonra hücreler kültür yüzeyinde %70 konflüent gösterdiğinde bu hücreler flask yüzeyinden kaldırıldı (pasajlandı) ve tekrar T-75 cm^{2}' lik flasklara ekildi. Bu şekilde hücrelerin 3.pasaja kadar her pasaj sonrası flask yüzeyindeki hücre miktarları not alındı. Her bir hücrenin 3 pasaj boyunca çoğaldıkları hücre miktarlarının ortalamasına göre SHED hücrelerinin diğer hücre gruplarına kıyasla katlanma oranlarının daha yüksek olduğu görüldü.



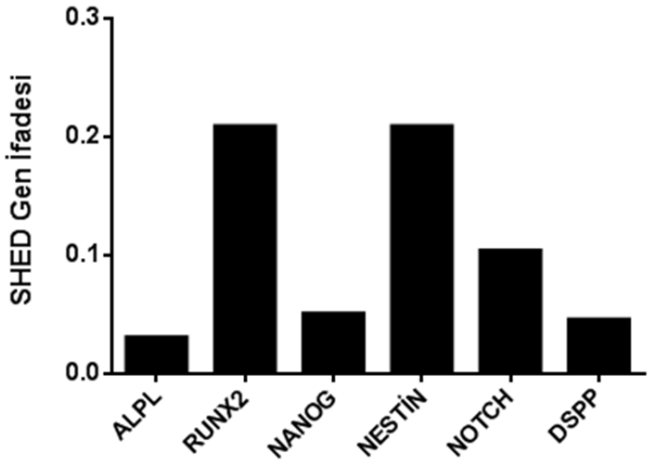
Şekil 6.10. SHED, DPSC, DFSC hücrelerinin katlanma oranları. SHED hücrelerinin diğer hücrelere oranla katlanma oranlarının daha yüksek oldukları görüldü.

6.8. Kök hücrelerin RealTime PCR gen ekspresyon sonuçları

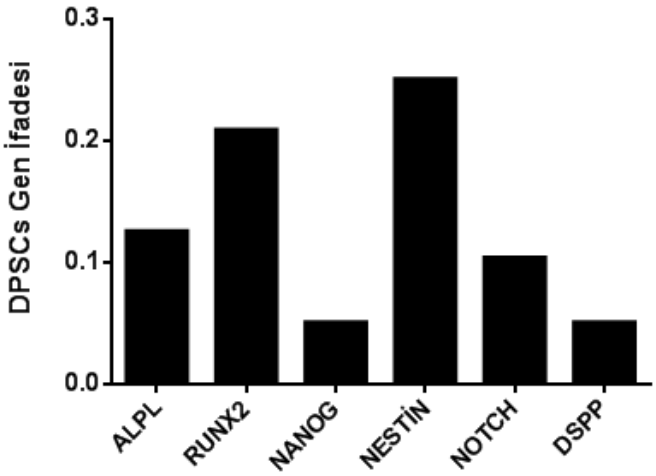
SHED, DPSC ve DFSC' lerinin GADPH, ALPL, RUNX2, NANOG, NESTİN, NOTCH, DSPP gen ekspresyonları incelendi. Bu amaçla kök hücrelerin RealTime PCR analizleri yapıldı ve gen ekspresyonları karşılaştırıldı. RealTime PCR analizleri sonucunda her gen için GAPDH genine göre gen ifade düzeyleri gözlendi.

Bu deney süresince yapılan tüm ölçümler ve değerlendirmeler RealTime PCR sonuçları LightCycler480 System ile yapıldı. ALPL, RUNX2, NANOG, NESTİN, NOTCH, DSPP gibi genlerinin verileri GADPH geniyle normalize edildi. SHED hücrelerinin ifade ettiği genleringrafikte de görüldüğü gibi bu hücrelerin bakılan tüm genleri eksprese ettiği görüldü. Bu hücrelerin gen ifadesinin diğer hücre gruplarına göre daha az olduğu görüldü (Şekil 6.11.).DPSC' lerinin ifade ettiği genlerin grafikte degörüldüğü gibi bu hücrelerin hepsini ifade edildiği görüldü. Tüm genlerin ifadesinin SHED hücrelerine oranla daha iyi olduğu görüldü. NESTİN geninin ifadesinin DFSC' lere oranla daha iyi olduğu görüldü (Şekil 6.12).DFSC' lerinin ifade ettiği genlerin amplifikasyon eğrisindede görüldüğü gibi ALPL, RUNX2, NANOG, NOTCH, DSPP genlerin ifadesinin diğer hücrelere oranla daha iyi olduğu görüldü (Şekil 6.13).

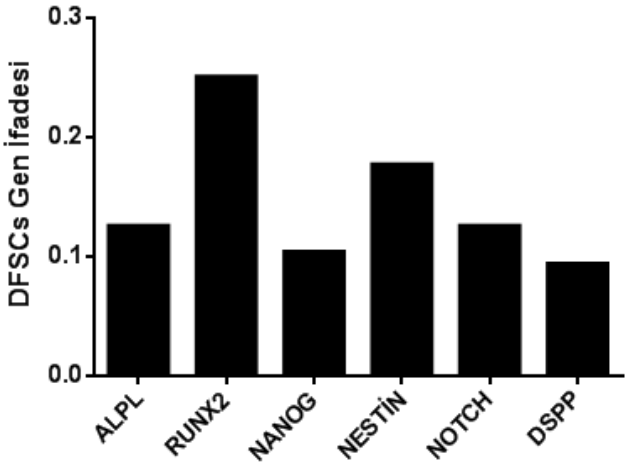
Elde edilen veriler ile DFSCs' in tüm genleri diğer hücrelere oranla en iyi eksprese eden hücreler olduğu görüldü.



Şekil 6.11. SHED hücrelerinin eksprese ettiği genlerin GAPDH genine göre ifadesi.



Şekil 6.12.DPSChücrelerinin eksprese ettiği genlerin GAPDH genine göre ifadesi.



Şekil 6.13. DFSC hücrelerinin eksprese ettiği genlerin GAPDH genine göre ifadesi.

6.9. SHED, DPSC ve DFSC HücreleriLenfosit Proliferasyonunu İn Vitro Ortamda Baskıladı

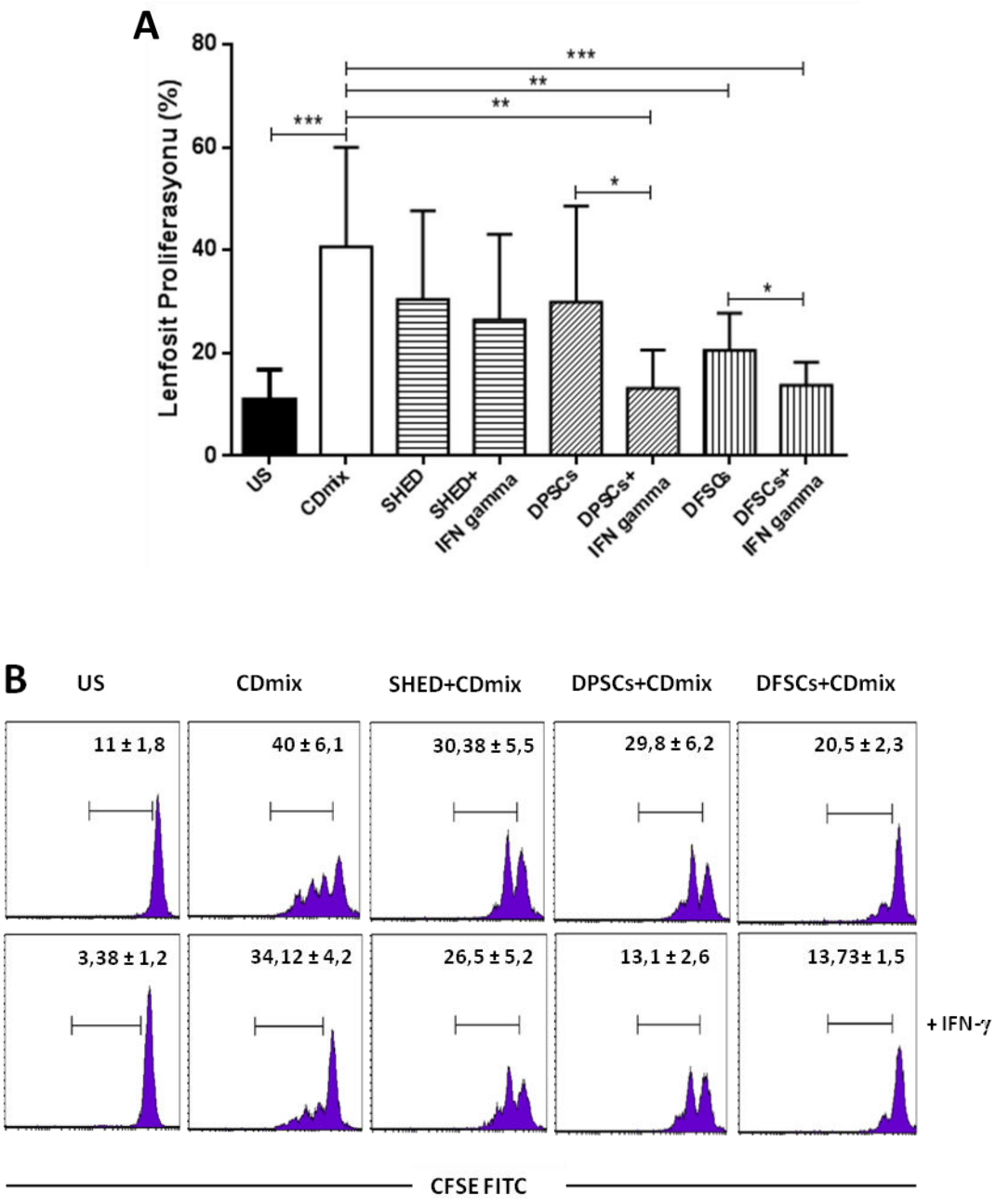
SHED, DPSC ve DFSC hücrelerinin immün baskılayıcı özelliklerini araştırmak amacıyla bu kök hücrelerin, lenfosit hücrelerinin proliferasyonları üzerine etkisi incelendi. Bu amaçlalenfosit hücrelerinin CDmix uyarımlı ve uyarımsız ortamda 3 gün boyunca, SHED, DPSC ve DFSC hücreleri ile ayrı kültürleri yapıldı. Aynı zamanda CDmix ile uyarılmış olan kuyulara IFN-γ eklenerek IFN-γ varlığında kök hücrelerin lenfosit proliferasyonu üzerine etkisi incelendi.

Elde edilen veriler; lenfosit proliferasyonunun CDmix ile uyarılan(40±6,1) grubununuyarım olmayan grubuna (11±1,8) göreistatistiksel olarak anlamlı derecede arttığını gösterdi (P<0,001). SHED grubunda (30,38±5,5) CDmix ile uyarılan (40±6,1) gruba oranla lenfosit proliferasyonunun baskılandığını fakat anlamlı bir fark olmadığını gösterdi (P>0,05). Aynı zamanda SHED+IFN-γ grubunda (26,5±5,2) SHED ve CDmix grubuna oranla lenfosit proliferasyonunun baskılandığını fakat anlamlı bir fark olmadığını gösterdi (P>0,05).

DPSCs+IFN-γgrubunda (13,1±2,6), DPSCs (29,8±6,2) ve CDmix grubuna (40±6,1) oranla lenfosit proliferasyonunun istatistiksel olarak anlamlı derecede baskılanmış olduğunu gösterildi (P<0,05; P<0,01).

DFSCs grubunda (20,5±2,3) CDmix ile uyarılan gruba (40±6,1) oranla lenfosit proliferasyonunun istatistiksel olarak anlamlı derecede baskılandığını gösterdi(P<0,01). Aynı zamandaDFSCs+IFN-γ grubunda (13,73± 1,5) DFSCs ve CDmix grubuna oranla lenfosit proliferasyonunun istatistiksel olarak anlamlı derecede baskılanmış olduğunu gösterdi (P<0,05; P<0,001).

Yapılan analizler ile SHED hücrelerinin varlığında baskılanma olduğu fakat anlamlı bir baskılanma olmadığı gösterildi. Aynı zamandaDFSC hücrelerinde DPSC hücrelerine oranla baskılanmanın daha anlamlı olduğu görüldü (Şekil 6.14.).



Şekil 6.14. SHED, DPSC ve DFSC hücrelerinin lenfosit hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki immün baskılayıcı etkisi.A) SHED, DPSC ve DFSC hücrelerinin lenfosit hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki baskılayıcı etkisi istatistiksel olarak gösterildi.B) Akım sitometri cihazı ile belirlendiği gibi in vitro olarak SHED, DPSC ve DFSC hücrelerinin lenfosit proliferasyonunu baskıladığı gösterildi (B). **P*<0,05; ***P*<0,01; ****P*<0,001

6.10. SHED, DPSC ve DFSC HücreleriLenfosit Hücrelerindeki Fas/FasLigandGösterimini Baskıladı

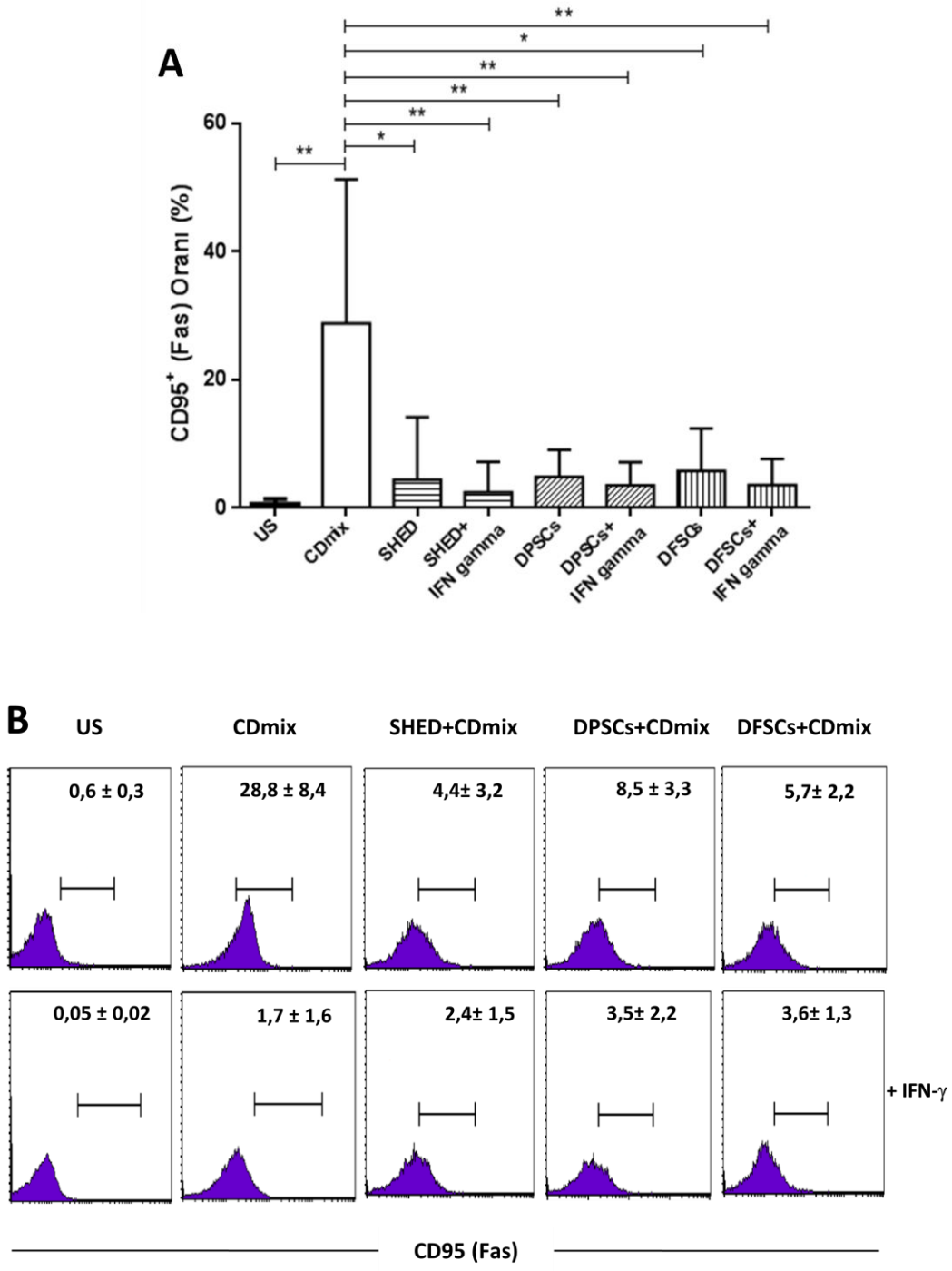
SHED, DPSC ve DFSC hücrelerinin lenfosit hücrelerinin apoptozu üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla akım sitometri cihazında Fas (CD95)/Fas Ligand (CD178) analizleri yapıldı. Bu amaçla lenfosit hücrelerinin CDmix uyarımlı ve uyarımsız ortamda 3 gün boyunca, SHED, DPSC ve DFSC hücreleri ile ayrı ayrı kültürleri yapıldı. Aynı zamanda CDmix ile uyarılmış olan kuyulara IFN-γ eklenerek IFN-γ varlığında kök hücrelerin lenfosit apoptozu üzerine etkisi incelendi.

Elde edilen veriler; CDmix ile uyarılangrubda (28,8±8,4)uyarım olmayan gruba (0,6±0,3) göreFas (CD95)gösteriminin istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı görüldü (P<0,01).SHED grubunda (4,4±3,2) CDmix ile uyarılan (28,8±8,4)gruba göreFas (CD95) gösteriminiistatistiksel olarak anlamlı derecede baskıladığı görüldü (P<0,05). SHED+IFN-γ grubunda (2,4±1,5) CDmix ile uyarılan gruba oranla Fas (CD95) gösterimini istatistiksel olarakanlamlı derecedebaskıladığı görüldü (P<0,01). Aynı zamanda SHED+IFN-γ grubunda, SHED grubuna oranla baskılanma olduğu fakat anlamlı bir fark olmadığı görüldü (P>0,05).

DPSCs grubunda (8,5±3,3) CDmix ile uyarılan (28,8±8,4) gruba göre Fas (CD95) gösterimini istatistiksel olarak anlamlı derecede baskıladığı görüldü (P<0,01). DPSC+IFN-γ grubunda (3,5±2,2) CDmix ile uyarılan gruba oranla Fas (CD95) gösterimini istatistiksel olarak anlamlı derecede baskıladığı görüldü (P<0,01). Aynı zamanda DPSC+IFN-γ grubunda, DPSC grubuna oranla baskılanma olduğu fakat anlamlı bir fark olmadığı görüldü (P>0,05)

DFSCs grubunda (5,7±2,2) CDmix ile uyarılan (28,8±8,4) gruba göre Fas (CD95) gösterimini istatistiksel olarak anlamlı derecede baskıladığı görüldü (P<0,05). DPSC+IFN-γ grubunda (3,6±1,3) CDmix ile uyarılan gruba oranla Fas (CD95) gösterimini istatistiksel olarak anlamlı derecede baskıladığı görüldü (P<0,01). Aynı zamanda DPSC+IFN-γ grubunda, DPSC grubuna oranla baskılanma olduğu fakat anlamlı bir fark olmadığı görüldü (P>0,05)

Yapılan analizler sonucundaIFN-γ ile uyarılan her üç grupta ve IFN-γ ile uyarım olmayan DPSC grubunda Fas (CD95) gösteriminin baskılanmasının diğer gruplara oranla istatistiksel olarak daha anlamlı olduğu görüldü. (Şekil 6. 15.).



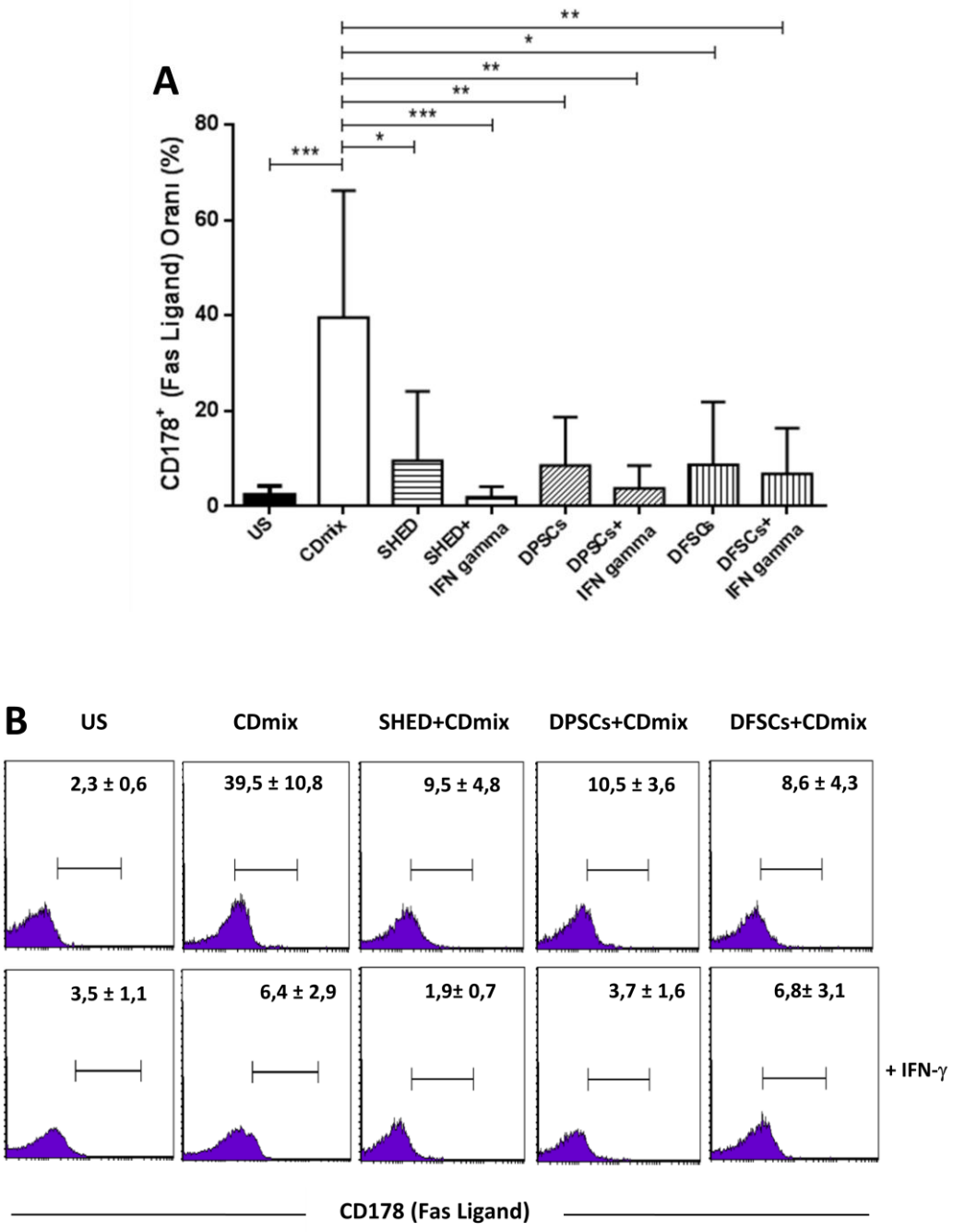
Şekil 6.15. SHED, DPSC ve DFSC hücrelerinin lenfosit hücrelerindeki Fas (CD95) gösterimi üzerine etkisi.A) SHED, DPSC ve DFSC hücrelerinin lenfosit hücrelerindeki Fas (CD95) gösterimi üzerindeki baskılayıcı etkisi istatistiksel olarak gösterildi. IFN-γ ile uyarılan her üç grupta ve IFN-γ ile uyarım olmayan DPSC grubunda Fas (CD95) gösteriminin baskılanmasının diğer gruplara oranla istatistiksel olarak daha anlamlı olduğu görüldü. B) Akım sitometri cihazı ile belirlendiği gibi in vitro olarak SHED, DPSC ve DFSC hücrelerinin lenfosit hücrelerindeki Fas (CD95) gösterimini baskıladığı gösterildi. **P*<0,05; ***P*<0,01; ****P*<0,001

Elde edilen veriler; CDmix ile uyarılangrubun (39,5±10,8)uyarım olmayan gruba (2,3±0,6) oranla lenfosit hücrelerindeki Fas Ligand (CD178) gösteriminin istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı görüldü (P<0,001).SHED grubunda (9,5±4,8) CDmix ile uyarılan (39,5±10,8) gruba oranla lenfosit hücrelerindeki Fas Ligand (CD178) gösteriminin istatistiksel olarak anlamlı derecede baskılandığı görüldü (P<0,05).SHED+IFN-γ grubunda (1,9±0,7) CDmix ile uyarılan gruba oranla Fas Ligand (CD178) gösterimini istatistiksel olarak anlamlı derecede baskıladığı görüldü (P<0,001). Aynı zamanda SHED+IFN-γ grubunda, SHED grubuna oranla baskılanma olduğu fakat anlamlı bir fark olmadığı görüldü (P>0,05).

DPSC grubunda (10,5±3,6) CDmix ile uyarılan (39,5±10,8) gruba oranla lenfosit hücrelerindeki Fas Ligand (CD178) gösteriminin istatistiksel olarak anlamlı derecede baskılandığı görüldü (P<0,01). DPSC+IFN-γ grubunda (3,7±1,6) CDmix ile uyarılan gruba oranla Fas Ligand (CD178) gösterimini istatistiksel olarak anlamlı derecede baskıladığı görüldü (P<0,01). Aynı zamanda DPSC+IFN-γ grubunda, DPSC grubuna oranla baskılanma olduğu fakat anlamlı bir fark olmadığı görüldü (P>0,05).

DFSC grubunda (8,6±4,3) CDmix ile uyarılan (39,5±10,8) gruba oranla lenfosit hücrelerindeki Fas Ligand (CD178) gösteriminin istatistiksel olarak anlamlı derecede baskılandığı görüldü (P<0,05). DPSC+IFN-γ grubunda (6,8±3,1) CDmix ile uyarılan gruba oranla Fas Ligand (CD178) gösterimini istatistiksel olarak anlamlı derecede baskıladığı görüldü (P<0,01). Aynı zamanda DPSC+IFN-γ grubunda, DPSC grubuna oranla baskılanma olduğu fakat anlamlı bir fark olmadığı görüldü (P>0,05).

Yapılan analizler sonucundaIFN-γ ile uyarılan SHED grubu diğer tüm gruplara oranlaFas Ligand (CD178) gösterimini daha anlamlı oranda baskıladığı görüldü(Şekil 6.16.).



Şekil 6.16. SHED, DPSC ve DFSC hücrelerinin lenfosit hücrelerindeki Fas Ligand (CD178) gösterimi üzerine etkisi.A)SHED, DPSC ve DFSC hücrelerinin lenfosit hücrelerindeki Fas Ligand (CD178)gösterimi üzerindeki baskılayıcı etkisi istatistiksel olarak gösterildi. IFN-γ ile uyarılan SHED grubu diğer tüm gruplara oranlaFas Ligand (CD178) gösterimini daha anlamlı oranda baskıladığı görüldü. B) Akım sitometri cihazı ile belirlendiği gibi in vitro olarak SHED, DPSC ve DFSC hücrelerinin lenfosit hücrelerindeki Fas Ligand (CD178) oranını baskıladığı gösterildi. **P*<0,05; ***P*<0,01; ****P*<0,001

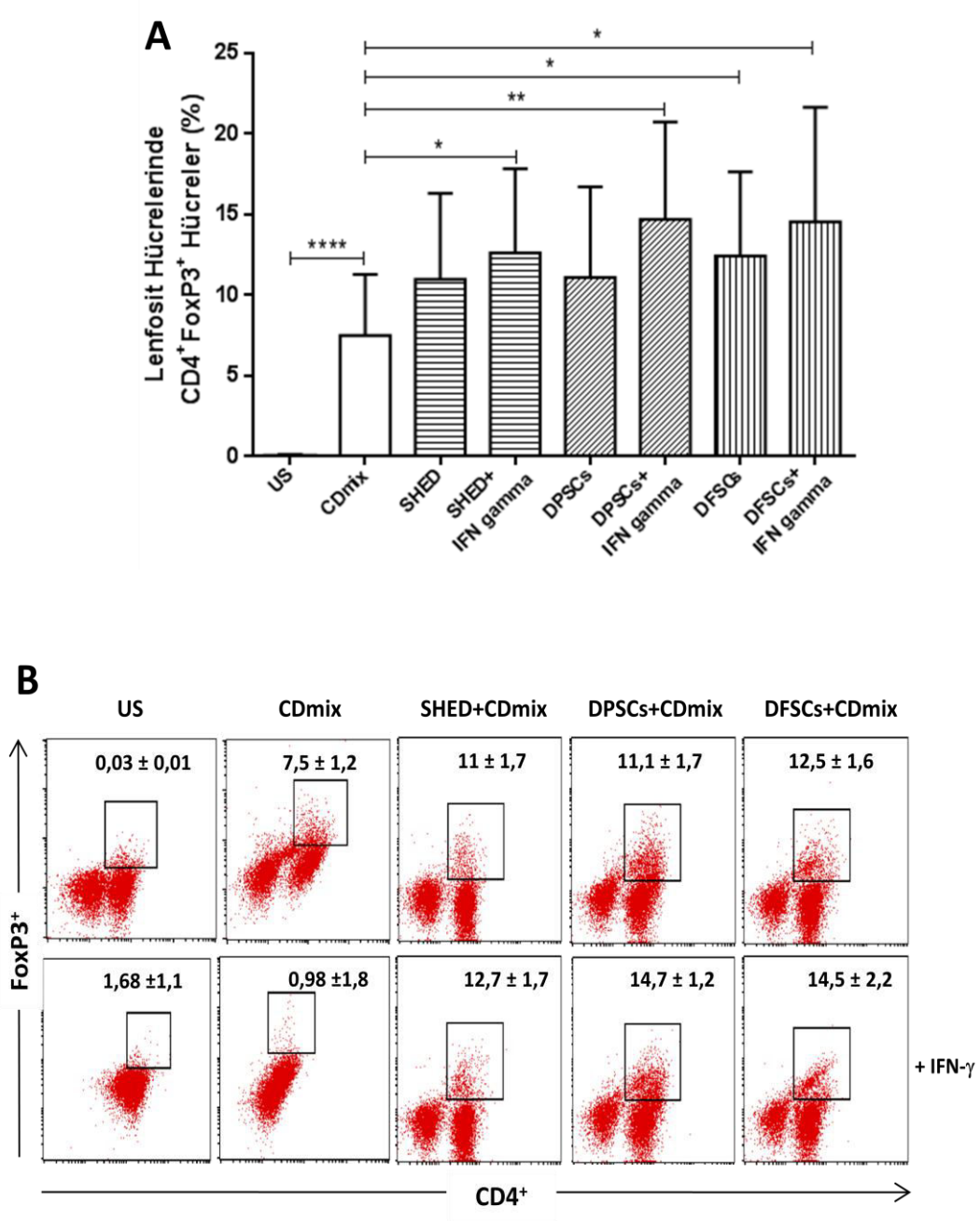
6.11. SHED, DPSC ve DFSC Hücreleri $CD4^+FoxP3^+$Regülatör THücrelerini Arttırdı

SHED, DPSC ve DFSC hücrelerinin $CD4^+FoxP3^+$lenfosit hücreleri üzerine etkisi akım sitometri cihazında analiz edildi.Elde edilen verilere göre; CDmix ile uyarılan grubun (7,5±1,2)uyarım olmayan gruba (0,03±0,01) oranla$CD4^+FoxP3^+$ T regülatörhücrelerindeki oranının istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığını gösterdi (P<0,0001).SHED grubunda (11±1,7) CDmix (7,5±1,2) grubuna oranla$CD4^+FoxP3^+$T regülatörhücre oranını arttırdığı fakat anlamlı bir fark olmadığı görüldü (P>0,05). SHED+IFN-γ grubunda (12,7±1,7) CDmix grubuna oranla$CD4^+FoxP3^+$T regülatör hücre oranı istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırdığı görüldü (P<0,05). Aynı zamanda SHED+IFN-γ grubunda, SHED grubuna oranla$CD4^+FoxP3^+$T regülatör hücre oranındaartış olduğu fakat anlamlı bir fark olmadığı görüldü (P>0,05).

DPSCs grubunda (11±1,7) CDmix ile uyarılan gruba (7,5±1,2) oranla$CD4^+FoxP3^+$T regülatör hücre oranının arttığı fakat anlamlı bir fark olmadığı görüldü (P>0,05). DPSCs+IFN-γ grubunda (14,7±1,2) CDmix grubuna oranla$CD4^+FoxP3^+$T regülatör hücre oranı istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırdığı görüldü (P<0,01). Aynı zamanda DPSCs+IFN-γ grubunda, DPSCs grubuna oranla$CD4^+FoxP3^+$T regülatör hücre oranında artış olduğu fakat anlamlı bir fark olmadığı görüldü (P>0,05).

DFSCs grubunda (12,5±1,6) CDmix (7,5±1,2) grubuna oranla $CD4^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranının istatistiksel olarakanlamlı derecede arttırdığı görüldü (P<0,05). DFSCs+IFN-γ grubunda (14,5±2,2) CDmix grubuna oranla $CD4^+FoxP3^+$T regülatör hücre oranının istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı görüldü (P<0,05). Aynı zamanda DPSCs+IFN-γ grubunda, DFSCs grubuna oranla $CD4^+FoxP3^+$T regülatör hücre oranında artış olduğu fakat anlamlı bir fark olmadığı görüldü (P>0,05).

Yapılan analizler sonucunda DFSCs grubu ve DFSCs+IFN-γ grubu hücrelerinin diğer hücre gruplarına oranla $CD4^+FoxP3^+$T regülatörhücre oranını daha fazla arttırdığı görüldü (Şekil 6.17.).



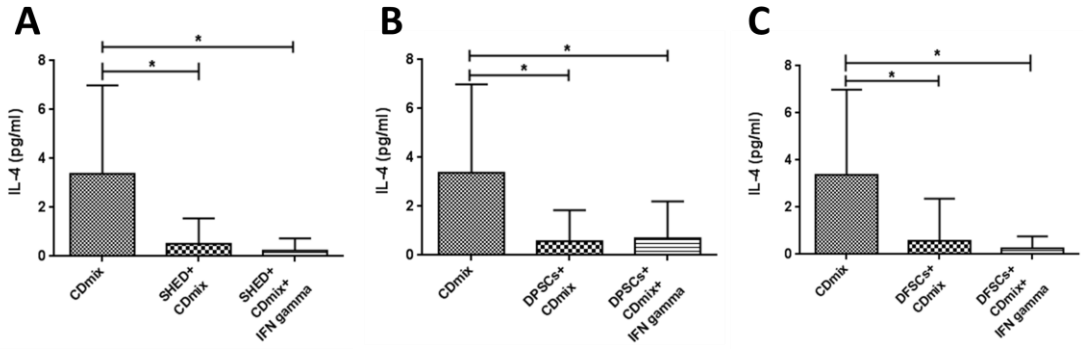
Şekil 6.17. SHED, DPSC ve DFSC hücrelerinin CD4+FoxP3+ T regülatör hücreleri üzerine etkisi.A) SHED, DPSC ve DFSC hücrelerinin $CD4^{+}FoxP3^{+}$T regülatör hücrelerinin oranı üzerindeki arttırıcı etkisi istatistiksel olarak gösterildi.Tüm hücre gruplarında diğer gruplara oranla $CD4^{+}FoxP3^{+}$T regülatör hücre oranında artış görüldü. B) Akım sitometri cihazı ile belirlendiği gibi in vitro olarak SHED, DPSC ve DFSC hücrelerinin $CD4^{+}FoxP3^{+}$T regülatör hücre oranını arttırdığı gösterildi. **P*<0,05; ***P*<0,01; ****P*<0,001; *****P*<0,0001

6.12. SHED, DPSC ve DFSC Hücreleri Lenfosit Hücrelerinden SalgılananIL-4 ve IFN-γSitokin Miktarını Azaltırken IL-10 Sitokin Miktarını Arttırdı

Kültür sonrası süpernatanttan bakılan sitokin analizi sonuçlarına göre; SHED grubunda (0,5±0,3), CDmix ile uyarılan gruba (3,3±1,14) oranla IL-4 sitokin düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı derecede baskılandığı görüldü (P<0,05). SHED+IFN-γ grubunda (0,2±0,16 CDmix grubuna oranla IL-4 sitokin düzeyinde anlamlı derecede baskılandığı görüldü (P<0,05). Aynı zamanda SHED+IFN-γ grubunda SHED grubuna oranla baskılanma olduğu fakat istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü (P>0,05) (Şekil 6.18. A).

DPSCs grubunda (0,5±0,4), CDmix grubuna (3,3±1,14) oranla IL-4 sitokin düzeyinin anlamlı derecede baskılandığı görüldü (P<0,05). DPSCs+IFN-γ grubunda (0,6±0,4) CDmix grubuna oranla IL-4 sitokin düzeyinde anlamlı derecede baskılandığı görüldü (P<0,05). Aynı zamanda DPSCs+IFN-γ grubunda DPSCs grubuna oranla baskılanma olduğu fakat istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü (P>0,05) (Şekil 6.18. B).

DFSCs grubunda (0,5±0,5), CDmix grubuna (3,3±1,14) oranla IL-4 sitokin düzeyinin anlamlı derecede baskılandığı görüldü (P<0,05). DFSCs+IFN-γ grubunda (0,24±0,17) CDmix grubuna oranla IL-4 sitokin düzeyinde anlamlı derecede baskılandığı görüldü (P<0,05). Aynı zamanda DFSCs+IFN-γ grubunda DFSCs grubuna oranla baskılanma olduğu fakat istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü (P>0,05) (Şekil 6.18. C).



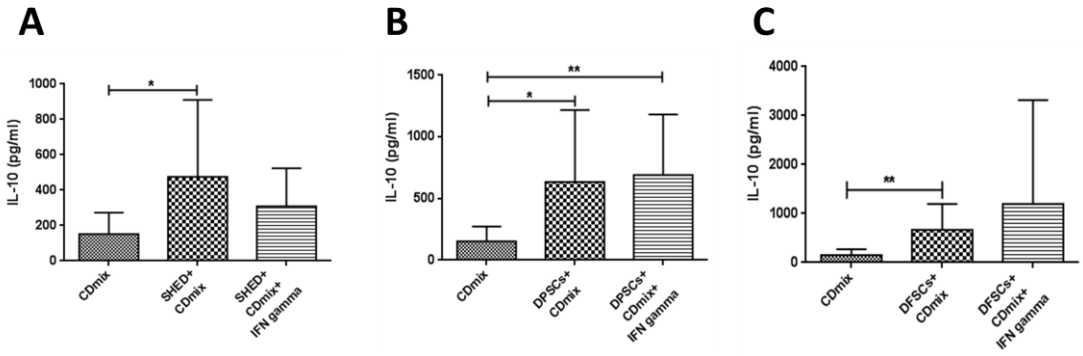
Şekil6.18.SHED, DPSC ve DFSC hücrelerinin lenfosit hücrelerinden IL-4 sitokin salgılanması üzerine etkisi. Tüm hücre gruplarında aynı oranlarda IL-4 sitokin düzeyinde baskılanma olduğu görüldü.*P<0,05

SHED grubunda (475 ± 137,8), CDmix grubuna (151,4 ± 38,4) oranla IL-10 sitokin düzeyinin anlamlı derecede arttığı görüldü (P<0,05). Aynı zamandaSHED+IFN-γ grubunda (309,2 ± 67,81) CDmixgrubunaoranla IL-10 sitokin düzeyinde artışolduğu fakat istatistiksel olarak anlamlıbir fark olmadığı görüldü (P>0,05) (Şekil 6.19.A).

DPSCs grubunda (634,5 ± 184,6), CDmix grubuna (151,4 ± 38,40) oranla IL-10 sitokin düzeyinin anlamlı derecede arttırdığı görüldü (P<0,05). DPSCs+IFN-γ grubunda (690,3 ± 155,5) CDmix grubuna oranla IL-10 sitokin düzeyinde anlamlı derecede arttırdığı görüldü (P<0,01). Aynı zamanda DPSCs+IFN-γ grubunda DPSCs grubuna oranla artış olduğu fakat istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü (Şekil 6.19.B).

DFSCs grubunda (665 ± 177), CDmix grubuna (151,4 ± 38,4) oranla IL-10 sitokin düzeyinin anlamlı derecede arttırdığı görüldü (P<0,01). Aynı zamandaDFSCs+IFN-γ grubunda (1194 ± 671,0) CDmix ve DFSCs gruplarına oranla IL-10 sitokin düzeyinde artış olduğu fakat istatistiksel olarak anlamlıbir fark olmadığı görüldü (P>0,05)(Şekil 6.19.C).

DPSC hücrelerinin IL-10 sitokin düzeyini diğer gruplara oranla daha fazla ve anlamlı olarak arttırdığı görüldü.



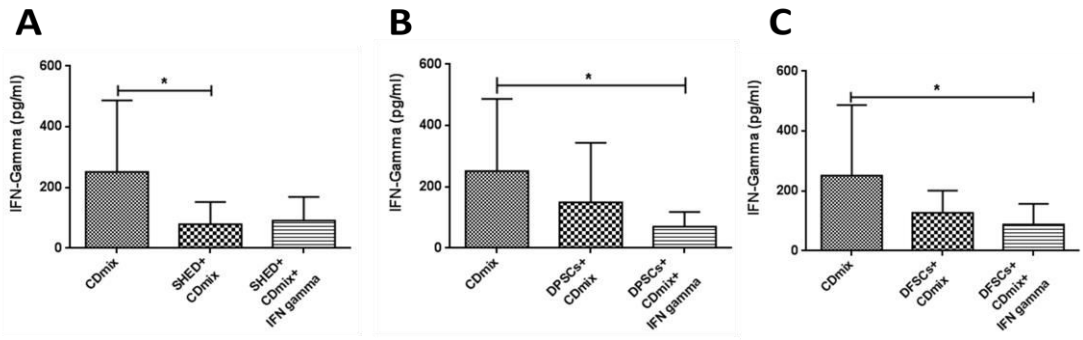
Şekil 6.19. SHED, DPSC ve DFSC hücrelerinin lenfosit hücrelerinden IL-10 sitokin salgılanması üzerine etkisi.DPSC hücrelerinin IL-10 sitokin düzeyini diğer gruplara oranla daha fazla ve anlamlı olarak arttırdığı görüldü.**P*<0,05; ***P*<0,01

SHED grubunda (78,97 ± 23,11), CDmix grubuna (251,9 ± 74,33) oranla IFN-γ sitokin düzeyinin anlamlı derecede baskılandığı görüldü (P<0,05). Aynı zamanda SHED+IFN-γ grubunda (91,27 ± 24,59) CDmixgrubuna oranla IFN-γ sitokin düzeyinde baskılanmaolduğu fakat istatistiksel olarak anlamlıbir fark olmadığı görüldü (P>0,05) (Şekil 6.20.A).

DPSCs grubunda (149,1 ± 61,49), CDmix grubuna (251,9 ± 74,33) oranla IFN-γ sitokin düzeyinde baskılanma olduğu fakat anlamlı bir fak olmadığı görüldü (P>0,05). DPSCs+IFN-γ grubunda (70,29 ± 16,02) CDmix grubuna oranla IFN-γ sitokin düzeyinde anlamlı derecede baskılanma görüldü (P<0,05). Aynı zamanda DPSCs+IFN-γ grubunda DPSCs grubuna oranla baskılanma olduğu fakat istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü (Şekil 6.20.B).

DFSCs grubunda (127,0 ± 23,50), CDmix grubuna (251,9 ± 74,33) oranla IFN-γ sitokin düzeyinde baskılanma olduğu fakat anlamlı bir fark olmadığı görüldü (P>0,05). DFSCs+IFN-γ grubunda (88,01 ± 21,93) CDmix grubuna oranlaIFN-γ sitokin düzeyinde anlamlı bir baskılanma olduğu görüldü (P<0,05).Aynı zamandaDFSCs+IFN-γ grubunda,DFSCs grubunaoranla IFN-γ sitokin düzeyinde baskılanma olduğu fakat anlamlı bir fark olmadığı görüldü (P>0,05)(Şekil 6.20.C).

SHED grubu hücrelerinin IFN-γ sitokin düzeyini diğer gruplara oranladaha fazla ve anlamlı olarak baskıladığı görüldü. DPSCs+IFN-γ ve DFSCs+IFN-γ grupların ise IFN-γ sitokin düzeyini diğer gruplara oranla daha fazla ve anlamlı olarak baskıladığı görüldü.



Şekil 6.20. SHED, DPSC ve DFSC hücrelerinin lenfosit hücrelerinden IFN-γ sitokin salgılanması üzerine etkisi.DPSCs+IFN-γ ve DFSCs+IFN-γ hücrelerinin IFN-γsitokin düzeyini diğer gruplara oranla daha fazla ve anlamlı olarak baskıladığı görüldü.*P<0,05

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada orofasial bölgeden izole edilen üç ayrı kaynaklı mezenkimal kök hücrenin immün sistem hücreleri üzerine etkisi karşılaştırmalı olarak araştırıldı. Bu amaçlasüt dişi pulpasından, tam gömük yirmi yaş dişi pulpasından ve diş folikülünden mezenkimal kök hücre izolasyonları yapıldı. Sağlıklı bireylerin venöz kanlarından periferal kan mononüklear hücreler izole edildi.Lenfositler MKH' ler IFN-γ uyarımlı ve uyarımsız koşullarda anti-CD2, anti-CD3, anti-CD28 uyarımı ile 3 gün kültürleri yapıldı. Kültür sonrasında lenfosit proliferasyonu, $CD4^{+}FoxP3^{+}$ T regülatör hücre, Fas/FasLigand, kültür süpernatantlarında IL-4, IL-10 ve IFN-γ düzeylerine bakıldı.

Hücre esaslı tedavi yaklaşımlarında hasar gören bir doku veya organın biyolojik olarak işlevinin devam etmesi veya tedavi edilmesi amaçlanır. Bu amaçla kök hücreler, hücre esaslı tedavilerde kullanılabilecek önemli hücrelerdir (Goodarzi ve ark., 2004). Bu alanda yapılan birçok çalışmada, farklı kaynaklardan izole edilen kök hücreler (Örneğin; embriyonik kök hücreler, kemik iliği kaynaklı kök hücreler vb.) in vitro ve in vivo olarak deneysel modellerde kullanılmıştır. İnsan kaynaklı embriyonik kök hücrelerin tedaviye yönelik kullanımındaki potansiyel etik tartışmalar arasında bu hücrelerin teratom oluşturma riskleri tedavi edici kullanımını kısıtlamaktadır (Hotta, 2008). Bu sebeple kök hücre çalışmaları çeşitli dokulardan (kas, kıkırdak, diş pulpası, yağ dokusu, böbrek, sinir, kemik) izole edilebilen mezenkimal kök hücreler üzerine yoğunlaşmıştır (Prentice, 2006).

Mezenkimal kök hücre (MKH) tedavisi, pek çok hastalığın iyileştirilmesinde gelecek vaat eden tedavi yöntemidir. MKH' lerin kolay elde edilebilmesi, kültür ortamında çoğaltılabilmesi, birçok potansiyel özelliklerinin bulunması ve farklı dokulara farklılaşabilme özellikleri uygulama potansiyellerini arttırmıştır (Horwitz ve ark., 2005; Brooke ve ark., 2007). Aynı zamanda bu hücreler ile yapılan birçok çalışmadaMKH'lerin, immün sistemi düzenleyici etkileri, tümör oluşturmapotansiyellerinin az olduğu gösterilmiştir (Prentice, 2006). Bu projede MKH'lerin immün sistem hücreleri üzerine etkisi, sağlıklı bireylerden izole edilen periferal kan mononüklear hücreleri ile kültürlerinde araştırıldı.

Orafasial bölgedeki dokular mezenkimal kök hücre açısından önemli bir kaynaktır. Buradaki mezenkimal kök hücreler birçok dokuya farklılaşabilme özelliğindedirler. Diş dokusundan süt dişi pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücreler (SHED), tam gömük yirmi yaş dişi pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücreler (DPSCs), diş folikülü kaynaklı mezenkimal kök hücreler (DFSCs), apikal papilla kaynaklı mezenkimal kök hücreler (APSCs), periodontal ligament kaynaklı mezenkimal kök hücreler (PDLSCs) (Estrela ve ark., 2011; Aydın ve Berbercan 2010) izole edilebilmektedir. Diş kaynaklı MKH' lar, kolay ulaşılabilir kaynak olmaları ve multipotent özellikte olmaları sebebiyle tedavide kullanılabilecek potansiyele sahiptirler.Bu çalışmada diş kaynaklı mezenkimal kök hücreler kullanılmıştır ve SHED, DPSC ve DFSC hücrelerinin immün sistem hücreleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Süt dişlerinin kendiliğinden düşmesi, tam gömük yirmi yaş dişinin birçok ortodontik sebep yüzündenameliyat ile alınabilir olmaları, diş foliküllerinin de gömük dişleri sarıyor olması ve ameliyat sonrası atılması bu dokuları kolay ulaşılabilir kök hücre kaynağı yapmaktadır.

Miura ve arkadaşları 2003 yılında yaptıkları çalışmada süt dişi pulpasından mezenkimal kök hücre izole etmişlerdir. Hücrelerin plastik yüzeylere yapışabildikleri ve diğer stromal hücrelerin karakteristiğinde olduğu gösterilmiştir. Süt dişi mezenkimal kök hücreleri kemik iliği mezenkimal kök hücreleri ve yetişkin diş pulpası mezenkimal kök hücreleri ile karşılaştırdıklarında yüksek proliferasyon kapasitesinde ve yüksek katlanma oranında olduğu görülmüştür. Aynı zamanda bu hücrelerin yüzeylerinde STRO-1 ve CD146 işaretlerini eksprese ettikleri gösterilmiştir (Miura ve ark., 2003). Suchanek ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada SHED hücreleri izole edilmiş ve yüksek orandaCD44, CD73, CD90, CD117, CD166, HLA I orta oranda CD29, CD105 ve düşük oranda CD45, CD63, CD71 işaretlerini eksprese ettikleri gösterilmiştir. Ayrıca bu hücrelerin CD18, CD31, CD34, CD49d, CD49e, CD106, CD133, CD184, CD197, CD146 ve HLA II işaretlerini eksprese etmedikleri gösterilmiştir. Suchanek ve arkadaşları Miura ve arkadaşlarının söylediğinin aksine SHED hücrelerinin CD146 işaretini eksprese etmediklerini göstermişlerdir (Suchanek ve ark., 2010). AraştırmamızdaMiura ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya benzer bir şekilde süt dişi pulpasından mezenkimal kök hücre izolasyonu yapıldı. Bu hücrelerin plastik yüzeylere yapışabildikleri ve

yüksek proliferasyon kapasiteleri olduğu gösterildi (Şekil 6.1.). İzole edildikten sonra yapılan karakterizasyon aşamalarında bu hücrelerin Miura ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya benzer fakat Suchanek ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın aksine yüzeylerinde CD146 eksprese ettikleri gösterildi. Aynı zamanda Suchanek ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada olduğu gibi bu hücrelerin yüzeylerinde CD73, CD90, CD105, CD29 işaretlerinigösterdikleri ve CD14, CD45, CD34, CD25, CD28 işaretlerni göstermedikleri görüldü (Şekil 6.4.).

Tarle ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptığı çalışmada SHED hücreleri ve PDLSC hücreleri karşılaştırılmıştır. Bu hücrelerin proliferasyon kapasiteleri, farklılaşma kapasiteri, gen ekspresyonları kıyaslanmıştır. Yapılan bu çalışmada hücreler osteojenik, adipojenik ve kondrojenik olarak farklılaştırılmış ve sonrasında sırasıyla alizarin red, oil red o ve von kossa ile boyanmıştır. Bizim çalışmamızda da SHED hücreleri izole edildikten sonra osteojenik, adipojenik ve kondrojenik olarak farklılaştırıldı ve sonrasında sırasıyla bu hücreler alizarin red, oil red o, alcian blue ile boyandı. Bu hücrelerin üç soyada farklılaşabildikleri gösterildi. Osteojenik olarak farklılaştırılanda osteoblast nodülleri, adipojenik olarak farklılaştırılanda yağ damlacıkları ve kondrojenik olarak farklılaştırılanlarda ise proteoglikanlar görüldü (Şekil 6.5.).

Gronthos ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada diş pulpasından mezenkimal kök hücre izolasyonu yapılmıştır. Diş pulpa mezenkimal kök hücrelerinin, mineralize matriks içinde, kan damarları içeren ve fibröz dokudan oluşan insan dişindeki pulpa kompleksine benzer bir yapıyı oluşturduğunu bulmuşlardır. İzole edilen mezenkimal kök hücre kolonilerindeki her bir hücrenin fibroblast benzeri morfolojisi olduğu görülmüştür.Bu hücreler kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler ile kıyaslanmış ve bu hücrelerin proliferasyon oranlarının kemik iliği kök hücrelerinden yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca bu çalışmada DPSC hücrelerinin hematopoetik kök hücre işareti olan CD14, CD34, CD45' i yüzeylerinde eksprese etmedikleri gösterilmiştir(Gronthos ve ark., 2000). Bir başka çalışmada izole edilen DPSC hücrelerinin 10 gün içerisinde kofluent olduğu ve fibroblast benzeri morfolojileri olduğu gösterilmiştir. DPSC hücrelerinin hematopoetik kök hücre işareti olan CD11b, CD34, CD31, CD33, CD49b ve CD45' i yüzeylerinde eksprese etmedikleri, CD44, CD73 ve CD90' ı ise yüzeylerinde eksprese ettiklerini göstermişlerdir

(Baghaban Eslaminejad ve ark., 2010).Doğan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada da DPSC hücrelerinin hematopoetik kök hücre işareti olan CD34, CD45, CD133 yüzeylerinde eksprese etmedikleri, CD29, CD73, CD90, CD105 ve CD166 yüzeylerinde eksprese ettikleri gösterilmiştir (Doğan ve ark., 2012). Bizim çalışmamızda tam gömük yirmi yaş dişlerinden mezenkimal kök hücre izolasyonları Baghaban Eslaminejad ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadaki izolasyona benzer bir şekilde yapıldı ve kültür sonrası hücrelerin 9 gün içerisinde flask yüzeyinde kofluent oldukları görüldü (Şekil 6.2.). İzole edilen hücrelerin fibroblast benzeri morfolojileri olduğu görüldü. İzolasyon sonrası yapılan karakterizasyon aşamasında bu hücrelerin diğer çalışmalardaki sonuçlara benzer şekilde yüzeylerinde CD73, CD90, CD105, CD29, CD146 eksprese ettikleri ve hematopoetik kök hücre işareti olan CD14, CD45, CD34, CD25, CD28 eksprese etmedikleri gösterildi (Şekil 6.6.).

Doğan ve arkadaşları yaptıkları çalışmada DPSC hücreleri izole edilip, immünositokimyasal analizlerini, Real time PCR analizlerini, osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşmasına bakmışlardır. Farklılaştırması yapılan hücrelerin sırasıyla von Kossa, oil red o ve alcian blue ile boyamaları yapılmıştır (Doğan ve ark., 2012). Baghaban Eslaminejad ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda da bu hücreler izole edilmiş ve akım sitometrik analizler,real time PCR analizleri, katlanma oranları, odontojenik, kondrojenik, adipojenik ve osteojenik farklılaştırmaları yapılmıştır (Baghaban Eslaminejad ve ark., 2010).Bizim çalışmamızdada yaılan bu çalışmalara benzer olarak izole edilen DPSC hücrelerinin farklılaştırma çalışmaları yapıldı. Bu hücrelerin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaştırmaları yapıldı. Hücrelerin farklılaşmalarından sonra sırasıyla alizarin red, oil red o, alcian blue ile boyamaları yapıldı. Boyama sonrasında osteojenik olarak farklılaştırılan hücrelerde osteoblast nodülleri, adipojenik olarak farklılaştırılanda yağ damlacıkları ve kondrojenik olarak farklılaştırılanlarda ise proteoglikanlar görüldü (Şekil 6.7.).

Diş folikülü gelişmekte olan diş yapısını çevreleyen mezenkimal dokudur. Diş folikülü, sement, periodontal ligament, alveolar kemik iliği hücreleri ile birlikte dişi oluştururlar(Yokoi ve ark., 2007). Diş folikülü kolay ulaşılabilir bir kaynaktır. Bu hücreler ortodontik sebepler ile çekilmesi gerekilen ve gelişim sürecinde olan yirmi yaş dişinin çekilmesinden sonra alınıp kolaylıkla kök hücre izolasyonu yapılabilir, buda hücrelerin kolay ulaşılabilir bir kaynak olmasını sağlar. Diş folikülü kaynaklı

mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu ilk olarak Handa ve arkadaşları tarafından yapılmıştır ve yapılan çalışmada bu hücrelerin farklılaşma yetenekleri in vivo olarak incelendiğinde sement benzeri matrix bir yapı oluşturdukları görülmüştür. Ayrıca bu hücrelerin koloniler oluşturdukları ve plastik yüzeye yapışabildiklerini göstermişlerdir (Handa ve ark.,2002). Yokoi ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada diş folikülümezenkimal kök hücrelerinin in vivo olarak periodontal ligament oluşturabilme yeteneğinde olduklarını söylemişlerdir (Yokoi ve ark., 2007). Yapılan son çalışmalar ile bu hücrelerin üstün proliferasyon kapasiteleri ve osteojenik, adipojenik olarak farklılaşabildikleri gösterilmiştir (Jo ve ark., 2007). Bizim çalışmamızda diş folikülü kaynaklı mezenkimal kök hücreler izole edildi, hücreler izolasyon sonrasında yaklaşık 5 gün sonrasında flask yüzeyinde kofluent olduğu gösterildi. Handa ve arkadaşlarının çalışmasında olduğu gibi plastik yüzeylere yapışabilen ve koloniler oluşturabilen hücreler oldukları gösterildi (Şekil 6.3.).

Mori ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptıkları çalışmada DFSC hücrelerini izole etmiş, immünofenotipik analizler yapmışlardır. Bu hücrelerin yüzeylerinde CD73, CD146, CD90, CD44, CD105, HLA I eksprese ettiklerini ve CD45 eksprese etmediklerini göstermişlerdir. Ayrıca bu hücreleri kemik iliği kök hücreleri ile kıyasladıklarında proliferasyon oranının önemli derecede kemik iliğinden yüksek olduğunu göstermişlerdir (Mori ve ark., 2012). Bizim yapmış olduğumuz çalışmada Mori ve arkadaşlarından farklı olarak DFSC hücrelerinin birçok hematopotik kök hücre yüzey işaretlerini eksprese etmediği gösterildi(CD14, CD45, CD34, CD25, CD28).Aynı zamanda kök hücre yüzey işaretlerinden CD73, CD90, CD105, CD29, CD146 yüzeylerinde eksprese ettikleri gösterildi (Şekil 6.8.).

Mori ve arkadaşları DFSC hücrelerinin osteojenik olarak farklılaşabildiklerini göstermişlerdi. Bizim çalışmamızda bu hücrelerin osteojenik adipojenik ve kondrojenik olarak farklılaşabildikleri gösterildi.Hücrelerin farklılaşmalarından sonra alizarin red, oil red o, alcian blue ile boyamaları yapıldı. Boyama sonrasında osteojenik olarak farklılaştırılan hücrelerde osteoblast nodülleri, adipojenik olarak farklılaştırılanda yoğun yağ damlacıkları ve kondrojenik olarak farklılaştırılanlarda ise proteoglikanların mavi renk ile boyandığı görüldü (Şekil 6.9.).

Tarle ve arkadaşları SHED hücreleri ile PDLSC hücrelerinin proliferasyon oranlarını, farklılaşabilme özelliklerini ve real time PCR analizlerini yapmış ve

karşılaştırmışlardır. Bu her iki mezenkimal kök hücrelerin benzer özelliklere sahip oldukları gösterilmiştir (Tarle ve ark., 2011). Yamaza ve arkadaşları SHED hücreleri ile kemik iliği kök hücrelerinin immünomodülatör özellikleri karşılaştırılmıştır (Yamaza ve ark., 2010).Suchanek ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise SHED hücreleri ile DPSC hücrelerinin katlanma zamanları, immünofenotipik özellikleri, pasaj sayıları karşılaştırılmıştır (Suchanek ve ark., 2010). Gronthos ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada DPSC hücreleri ile kemik iliği hücrelerinin proliferasyon kapasiteleri ve farklılaşabilme kapasiteleri karşılaştırılmıştır ve sonucunda diş pulpası kök hücrelerinin yüksek proliferasyon kapasitesi olduğu, klonojenik olduğu gösterilmiştir (Gronthos ve ark., 2000). DFSC ile kemik iliği kök hücreleri proliferasyon yetenekleri ile karşılaştırılmışlardır ve çalışmanın sonucunda DFSC hücreleri ile kemik iliği kök hücrelerinin benzer oldukları fakat aynı olmadıkları gösterilmiştir (Mori ve ark., 2012). Navabazam ve arkadaşları tarafndan 2013 yılında yapılan çalışmada DPSC, DFSC ve PDLSC hücrelerinin karakterizasyon özellikleri karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda DSC hücrelerinin diğer hücrelere göre yğksek proliferasyon yetenekleri olduğu gösterilmiştir (Navabazam ve ark., 2013). DFSC ve SHED hücrelerinin nöral farklılaşmaları karşılaştırılmış ve benzer olmadıkları gösterilmiştir (Morsczeck ve ark., 2010).

Bizim çalışmamız tüm bu yapılan çalışmalardan farklı olarak SHED, DPSC ve DFSC hücreleri karşılaştırılmıştır. Her üç mezenkimal kök hücre kaynağı da kolay ulaşılabilir kaynaklardır. Bu hücrelerin izolasyon ve kültür aşamaları kıyaslandığında,koloni oluşturabilme ve hızla çoğalabilme yeteneklerinin sırasıylaDFSC hücrelerinde sonrasında SHED hücrelerinde ve sonrasında DPSC hücrelerinde daha yüksek olduğu görüldü(DFSC > SHED > DPSC). Aynı zamanda bu hücrelerin akım sitometrik analizler sonucunda, DPSC' ininmezenkimal kök hücre vehematopoetik kök hücre işaretlerini diğer hücrelere göre daha yüksek oranlardagösterdikleri görüldü. SHED hücreleri ise hematopoetik kök hücre işaretleriniDPSC ve DFSC' lerine göre daha az oranlarda gösterirken mezenkimal kök hücre işaretlerini de yüksek eksprese ettikleri gösterildi (SHED> DPSC > DFSC) (Tablo 6.1.). Bu hücrelerin farklılaşma kapasiteli kıyaslandığında DPSC hücrelerinin diğer hücrelere oranla osteojenik olarak farklılaşmasının daha yüksek olduğu görüldü. DFSC hücrelerinin ise adipojenik ve kondrojenik olarak

farklılaşmasının diğer hücrelere oranla daha yüksek olduğu görüldü. Bu üç ayrı mezenkimal kök hücrenin katlanma oranları kıyaslandığında ise SHED hücrelerinde diğer hücrelere oranla daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 6.10.). Yapılan analizler sonucunda çok daha fazla miktarda çoğalabilmesi, koloni oluşturabilmesi ve farklılaşabilme yeteneklerinin daha fazla olması sebebi ile DFSC hücrelerinin diğer hücrelere oranla daha kullanılabilir bir kaynak olduğu düşünülmektedir.Daha fazla miktarlarda çoğalabilmesi ve hematopoetik kök hücre belirteçlerini daha az miktarlarda eksprese etmesi sebebi ile de SHED hücrelerinin de kullanılabilir hücreler oldukları düşünülmektedir.

Miura ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada SHED hücrelerinin stromal ve vasküler sistem ile ilgili belirteç olan ALP genini eksprese ettiği gösterilmiştir. (Miura ve ark., 2003). ALP belirli hücreler için özel bir belirteçtir. Farklılaşmamış pluripotent kök hücreler ile bağlantılıdır ve bu hücreler ALP eksprese ederler. Uyarılmış pluripotet kök hücreler güçlü olarak ALP eksprese ederler (Yu ve ark., 2007). Yapılan bir çalışmada hipoksik bir ortamda DFSC' lerin ALP ifadelerinin arttığı gösterilmiştir (Yuntao ve ark., 2012). Mori ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada üç farklı DFSC' leri kullanılmış tüm grupların ALP genini yüksek derecede eksprese ettiği görülmüştür fakat osteojenik olarak farklılaştırılan DFSC' lerin ALP genini daha yüksek oranda eksprese ettiği görülmüştür (Mori ve ark., 2012). Bizim yaptığımız çalışmada da SHED, DPSC ve DFSC' lerinin ALP genini ifade ettiği DFSC' lerin bu geni diğer hücrelere oranla daha iyi ifade ettiği görüldü. Makino ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada SHED hücrelerinin ALP, DSPP ve RUNX2 genlerini ifade ettiği gösterilmiştir. Aynı zamanda bu çalışmada SHED hücreleri tarafından üretilen embriyonik kök hücre ve nöral hücre belirteçleri olan NANOG, NOTCH, NESTİN, Oct-4 genlerinin de eksprese olduğu gösterilmiştir (Makino ve ark.,2013). Bizim yapmış olduğumuz çalışmada her üçmezenkimal kök hücre grubununda DSPP, RUNX2, NOTCH ve NESTİN genlerini eksprese ettiği gösterildi. DFSC' lerininDSPP, RUNX2, NOTCH genlerini diğer hücre gruplarına oranla en iyi ifade eden hücreler olduğu görüldü fakat DPSC' lerinin NESTİN genini diğer hücrelere oranla en iyi ifade eden hücreler olduğu görüldü. Yapılan bir çalışmada diş pulpası mezenkimal kök hücrelerinin gelişim süresince embriyonik kök hücre pluripotent belirteçleri olan Oct-4, NANOG ve SSEA-4 genlerini eksprese

ettiği gösterilmiştir (Kerkis ve ark., 2006). Bizim yaptığımız çalışmada ise DFSC' lerin embriyonik pluripotent kök hücre belirteci olan NANOG genini diş pulpalarına oranla daha iyiifade ettiği gösterildi.

MKH' ler immünsüpresif ve immünomodülatör etkileri sebebiyle otoimmün hastalıkların tedavisi için ümit vaadetmektedir (Ishida ve ark., 1994; Marinova ve ark., 2002). Bu konu ile ilgili kısıtlı sayıda deneysel araştırma mevcuttur. Klinik uygulama ise yok denecek kadar azdır. Multiplskleroz (MS), amyotrofik lateral skleroz (ALS) gibi hastalıklarda MKH' ler denenmeye ve kullanılmaya başlanmıştır ve sonucundada hastalık belirtilerinde yavaşlama olabileceği söylenmiştir (Castro, 2015). MKH' ların klinik kullanım icin en avantajlı özellikleri bu hücrelerin immünojenitesi çok düşüktür ve immünosüpresif özellikleri vardır. Bu hücreler HLA-DR ve ko-stimulatör eksprese etmezler. Bu hücreler T lenfositlerin aktivasyonunu önler. T lenfositlerinin aktivasyonunun engellemesi ile B hücrelerini de inhibe eder, regülatör T hücrelerin uyarılmasını sağlar. Bu hücreler yapılan çalışmalar ile immünsüpresif etkilerini lenfosit proliferasyonunu baskılayarak göstermişlerdir. Bizim çalışmamızdada üç ayrı mezenkimal kök hücrenin periferal kan mononüklear hücreleri üzerine etkisi araştırıldı.

MKH' lerin mitojenler tarafından uyarılan bellek ve naif T hücrelerinin yanıtını baskıladığı gösterilmiştir (Tse ve ark.,2003). Demircan ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmadada diş pulpasımezenkimal kök hücrelerinin T hücre proliferasyonu üzerinde baskılayıcı etkileri olduğu gösterilmiştir (Demircan ve ark., 2011). Bizim yapmış olduğumuz çalışmada da ilk olarak mezenkimal kök hücrelerin lenfosit proliferasyonu üzerine etkisine bakıldı. Tüm mezenkimal kök hücrelerin lenfosit proliferasyonu baskıladığı gösterildi. Ayrıca kültürde farklı kuyulara eklenen IFN-γ varlığında proliferasyonun daha fazla baskılandığı gösterildi. Hem direk kültürde hem IFN-γ varlığında proliferasyonu en iyi baskılayan mezenkimal kök hücrenin DFSC hücreleri olduğu görüldü (Şekil 6.14). Bu şekilde birçok çalışmada da olduğu gibi mezenkimal kök hücrelerin T lenfosilerin proliferasyonu üzerine baskılayıcı etkileri olduğu gösterildi. Fakat bizim çalışmamızda diğer çalışmalardan farklı olarak kültüre IFN-γ eklenip, IFN-γ varlığında baskılanmanın dahada fazla olduğu gösterildi. Bu sonuçlar bize MKH'lerin IFN-γ varlığında immünsüpresif özelliklerini arttırdığını göstermektedir. Belirli otoimmün hastalıklarda (örneğin: romatoit artrit),

Th1 immün yanıtın yüksek olduğu IFN-γ'nın yüksek salgılandığı hastalıklarda IFN-γ MKH'leri uyararak immünsüpresif özelliklerini arttırdığı düşüncesindeyiz.

Di Nicola ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmadaMKH'lerin lenfosit hücreleri ile kültürlerinde lenfosit apoptozunu baskıladığı gösterilmiştir (Di Nicola ve ark., 2002).Diğer çalışmalardan farklı olarak araştırmamızda hücrelerin apoptoz analizleriFas/ Fas Ligand yüzey işaretlerinin akım sitometrisinde gösterilmesi ile yapıldı. Her üç mezenkimal kök hücrenin lenfosit apoptozunu baskıladığı ve DPSC'lerinin diğer iki mezenkimal kök hücre kaynağına göre istatistiksel olarak daha anlamlı baskıladığı gösterildi. IFN-γ ile uyarılan her üç mezenkimal kök hücre grubundaIFN-γ ile uyarım olmayan gruplara oranlaFas (CD95) gösteriminin baskılanmasınınistatistiksel olarak daha anlamlı olduğu görüldü. IFN-γ ile uyarılan SHED grubu DPSC ve DFSC' lerine oranlaFas Ligand (CD178) gösterimini istatistiksel olarak daha anlamlı oranda baskıladığı görüldü (Şekil 6.15.; Şekil 6.16.).

Demircan ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada diş pulpası mezenkimal kök hücreleri ve lenfosit hücrelerinin ko kültürleri sonucundamezenkimal kök hücrelerin $CD4^+$ ve $FoxP3^+$regülatör T hücre düzeyini arttırdığı gösterilmiştir (Demircan ve ark.,). Bizim çalışmamızdasüt dişi, tam gömük yirmi yaş dişi ve diş folikülü kaynaklı mezenkimal kök hücreler kullanıldı. Mezenkimal kök hücrelerin$CD4^+FoxP3^+$ T regülatör hücre miktarının istatistiksel olarak anlamlı arttığı gösterildi. Aynı zamanda IFN-γ varlığında bu artışın IFN-γ olmayan gruba göre istatistiksel olarak daha anlamlı olduğu görüldü. Her üç mezenkimal kök hücre birbirleriyle kıyaslandıklarında DFSC' lerin IFN-γ varlığında ve IFN-γ yokluğunda$CD4^+FoxP3^+$ T regülatör hücre artışını diğer iki mezenkimal kök hücre kaynaklarına göre istatistiksel olarak anlamlı arttırdığı görüldü (Şekil 6.17.).

Demircan ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada diş pulpası kök hücreleri ve lenfosit hücrelerinin ko kültürleri sonucunda yapılan sitokin analizinde IFN-γ sitokin miktarında baskılanma olduğu görülmüştür (Demircan ve ark.,). Bizim yaptığımız çalışmada bu çalışmadan farklı olarak IL-4 ve IL-10 düzeylerine de bakıldı. Mezenkimal kök hücreler ve lenfosit hücrelerinin kültürleri sonrası süpernatantından bakılan sitokin analizi sonucunda MKH' ların IL-4 ve IFN-γ düzeylerini baskılarken IL-10 düzeyini arttırdığı görüldü. IL-4 Th2 tip allerjik hastalıklarda, helmint enfeksiyonlarında artan, IgE regülasyonunda rol oynayan Th2

tip bir sitokindir. Üç ayrı mezenkimal kök hücreninde IFN-γ varlığında ve yokluğunda IL-4 düzeyini benzer oranlarda baskıladığı görüldü (Şekil 6.18.).

IL-10 immün sistemde Th1 ve Th2 tip immün yanıtı baskılayan immünsüpresif ve immünregülatör özelliği olan ve düzenleyici T hücreleri tarafından salınan bir sitokindir. makrofajlar ve T hücreler tarafından salgılanır ve IL-12 üretimini engeller, Th1 hücreleri tarafından IFN-γ salgılanmasını baskılar (Gesser ve ark., 1997; Moore ve ark., 2001).Bizim yapmış olduğumuz çalışmadamezenkimal kök hücrelerin IL-10 düzeyini istatistiksel olarak arttırdığı (Şekil 6.19.) bununla bağlantılı olarak IFN-γ düzeyini ise azalttığı gösterildi (Şekil 6.20.). Çalışmamızda DFSC hücrelerininIFN-γ yokluğunda IL-10 sitokin miktarını diğer hücrelere oranla istatistiksel olarak daha anlamlı arttırdığı görüldü. IFN-γ varlığında ise DPSC' lerinindiğer hücrelere oranla istatistiksel olarak daha anlamlı arttırdığı görüldü. IFN-γ sitokinini ise IFN-γ varlığında DPSC ve DFSC' lerinin SHED'e göre istatistiksel olarak anlamlı oranlarda baskıladığı görüldü.

Sonuç olarak araştırmamızda SHED, DPSCs ve DFSCs' nin hem karakterizasyon özellikleri hem de sağlıklı bireylerden elde edilen periferal kan mononüklear hücreleri üzerindeki etkileri IFN-γ varlığında ve yokluğunda araştırılmıştır. Elde edilen bulgular ile DFSC'lerinde, SHED ve DPSC' lerinegöre daha kısa zamanda, daha fazla sayıdamezenkimal kök hücre izole elde edilmiştir, aynı zamanda farklılaşma yeteneklerinin diğer hücrelere oranla daha belirgin ve fazla oldukları görülmüştür. DFSC, SHED ve DPSC' lerinin, lenfositlerin proliferasyonunu baskıladığı, regülatör hücre oluşumuna destek verdiği, apoptozu baskıladığı ve IL-4, IFN-γ düzeylerini baskılayıp, IL-10 sitokin düzeyini arttırdığı görüldü.Bununla birlikte DFSC' lerin IFN-γ varlığında diğer hücrelere göre lenfositlerin proliferasyonunu daha anlamlı olarak baskıladığı, regülatör hücre oluşumuna anlamlı oranda destek verdiği görüldü. Aynı zamada DFSC' lerin IFN-γ varlığında apoptozudaha etkili ve anlamlı olarak baskıladığı görüldü.Bu sonuçlar doğrultusunda IFN-γ uyarımlı DFSC' lerin immün sistemin, otoimmün, inflamatuar ve allerjik hastalıkların tedavi yaklaşımlarında immünomodülatör fonksiyonlarındaki hücreler olarak kullanılmasının uygun olabileceğini düşündürmektedir.

8. KAYNAKLAR

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

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

Adams JM, Cory S. Life or Death decions by the Bcl-2 family. Trends. Biochem Sci. 2001;26: 61-6.

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

Airas L, J Niemela, M Salmi, T Puurunen, DJ Smith and S Jalkanen. Differential regulation and function of CD73, a glycosyl-phosphatidyl inositol-linked 70-kD adhesion molecule, on lymphocytes and endothelial cells. J Cell Biol. 1997; 136: 421–431.

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. Cell. 2006; 124(4): 783-801.

Alagbe OO, Evans DL, Miller AH. Nervous, endocrine, and immune system interactions in psychiatry. In S.C. Yudofsky & R.E. Hales (Eds.), Neuropsychiatry and the Behavioral Neurosciences. 5th ed. Washington, DC: American Psychiatric Publishing. 2008; 93-133.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Hücrenin Moleküler Biyolojisi. 4. baskı. Garland- Science. Tuba yayınları, Ankara. 2008; 1363- 1420.

Aydın AK, Berbercan P. Biyomühendislik esasları ile diş oluşturulmasına yönelik yaklaşımlar. SÜ Dişhek Fak Derg. 2010; 19: 99-114.

Baghaban Eslaminejad MR, Vahabi S, Shariati M, Nazarian H. In vitro Growth and Characterization of Stem Cells from Human Dental Pulp of Deciduous Versus Permanent Teeth. Journal of Dentistry. 2010; 7(4): 185-95

Bardin N, Blot-Chabaud M, Despoix N, Kebir A, Harhouri K, Arsanto JP, Espinosa L, Perrin P, Robert S, Vely F, Sabatier F, Le Bivic A, Kaplanski G, SampolJ, Dignat-George F. CD146 and its soluble form regulate monocyte trans endothelial migration. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009; 29(5):746-53

Barry F, R Boynton, M Murphy, S Haynes worthand J Zaia. The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells. Biochem Biophys Res Commun. 2001; 289:519–524.

Bayık, M. Kök Hücre: Yaşamın Kaynağı. I.Ulusal Klinik Pratikte Kök Hücre ve Gen Tedavisi Kongre Kitabı. 2004; 13-23.

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

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

Blanch A, Liu H, Goodyer C. Caspase-6 role in apoptosis of human neurons, amyloid ogenesis and Alzheimer's disease. J Biol Chem. 1999; 274(33): 23426-23436.

Bhatwadekar AD, Guerin EP, Jarajapu YP, Caballero S, Sheridan C, Kent D, Kennedy L, Lansang MC, Ruscetti FW, Pepine CJ, Higgins PJ, Bartelmez SH,Grant MB. Transient inhibition of transforming growth factor-beta1 in human diabetic CD34+ cells enhances vascular reparative functions. Diabetes. 2010; 59(8): 2010-9.

Blau HM, Brazelton TR, Weimman JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function?. Cell. 2001; 106:829-841.

Bluteau G, Luder HU, Bari C. Mitsiadis TA. Stem cells for tooth engineering. European Cells and Materials. 2008; 16:1-9.

Bomford R. Ethnomedicine: a source of complementary therapeutics, 2010; 159(2): 227-244.

Bongso A, Lee EH. Stem Cells: Their definition, Classification and Sources, in Stem cells from bench to bedside. World Scientific Publishing Co. Singapore. 2005; 1-13.

Bray S.J.,Notch signalling: a simple pathway becomes complex. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006; 7 (9): 678-89.

Brooke G, Cook M, Blair C, Han R, Heazlewood C, Jones B, Kambouris M, Kollar K, McTaggart S, Rice A, Rossetti T, Atkinson K. Therapeutic application of mesenchymal stromal cells. Seminars in Cell & Developmental Biology. 2007;18: 846–858.

Cassatella MA. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. Adv Immunol. 1999; 73: 369-509.

Castro ME, Montesinos JJ. Immunoregulation by mesenchymal stem cells: biological aspects and clinical applications. Journal of Immunology Research. 2015; 2015: 20.

Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. Cell. 2003; 30;113(5):643-55.

Choi SH, Jung SY, Kwon SM, Baek SH. Perspectives on stem cell therapy for cardiac regeneration. Advances and challenges. Circ J. 2012; 76: 1307-1312.

Cohen, M. M.,Jr. Perspectives on RUNX genes: an update. Am J Med Genet. 2009; 149: 2629-2646.

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

Çetiner M: Hücresel Tedaviler Tarihi ve Süreyya Tahsin Aygün. 2. Ulusal Kök Hücre Kongresi Program ve Özet Kitabı, Trabzon, 2006; 29-34.

D'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, Pirozzi G, De RosaA, Papaccio G. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. Cell Death Differ. 2007; 14(6):1162-71.

Deniz G. T, B, NK hücrelerin değerlendirilmesinde pratik yaklaşımlar. Güncel Pediatri Dergisi 2007; 5: 103-105.

Demircan PÇ, Sarıboyacı AE, Ünal ZS, Gacar G, Subaşı C, Karaöz E. Immunoregulatory effects of human dental pulp-derived stem cells on T cells: comparison of transwell co-culture and mixed lymphocyte reaction systems. Cytotherapy. 2011; 13(10): 1205-20.

Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. Blood 2002; 99: 3838-3843.

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

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, ProckopDj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. Cytotherapy. 2006;8(4):315-7.

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

Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. FASEB J. 2003;17(9):984-92.

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

Ercolani L, Florence B, Denaro M, Alexander M. Isolation and complete sequence of a functional human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. J BiolChem. 1988; 25;263(30):15335-41.

Estrela C, Alencar AHG, Kitten GT, Vencio EF. Mesenchy mal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regen eration. Braz Dent J. 2011; 22(2):91-98.

Evans MJ, Kaufman MH. Establishmend in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature. 1981; 292 (5819): 154-6.

Eyerich S, Zielinski EC. Defining Th-cell subsets in a classical and tissue-specific manner: examples from the skin. Europen Journal of Immunology. 2014; 44: 3475-3483.

Fitch FW, McKisic MD, Lancki DW, Gajewski TF. Differential regulation of murine T lymphocyte subsets. Annu. Rev. Immunol. 1993; 11: 29-48

Ford WCL. Biological mechanisms of male infertility. The Lancet. 2001; 357:21: 1223-1224.

Franz TA, Kidson SH. Mapping of inter digital apoptosis in the chick and duck hind limb. Embryology. 1997; 93(2):85-94.

Freshney IA, Stacey G, Auerbach JM. Culture of Human Stem Cells. Yale J Biol Med. 2007; 81(3): 154-155.

Friedenstein Aj, Gorskaja JF, Kulagina NN, Fibroblast precursors in normal and grradiated mouse hematopoietic organs. Exp Hematol. 1976; 4:267-74.

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

Gaiano N, Nye JS, Fishell G. Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. Neuron. 2000; 26(2): 395-404.

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

Gesser B, Leffers H, Jinquan T, Vestergaard C, Kirstein N, Sindet Pedersen S, Jensen SL. Identification of functional domains onhuman interleukin 10. Proc Natl Acad Sci. 1997; 94: 14620–14625.

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

Goodarzi P, Aghayan HR, Larijani B, Soleimani M, Dehpour AR, Sahebjam M, Ghaderi F, Arjmand B. Stem cell-based approach for the treatment of parkinson's disease. Medical Journal Islam Repub. 2008; 29: 168-188.

Graziano A, d'Aquino R, Laino G, Papaccio G. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. Stem Cell Rev. 2008; 4(1):21-6.

Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey GP, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. PNAS. 2000; (97) 25: 13625–13630.

Haeckel, E. Naturliche Schopfungsgeschichte. (Berlin: Georg Reimer) 1868; 3:282-283.

Hall JE, Guyton AC. Textbook of Medical Physiology. Çeviren: Çavuşoğlu H, Çağlayan B. Tıbbi Fizyoloji. 9. basım, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. 2007; 419-439.

Handa K, Saıto M, Tsunoda A, Yamauchı M, Hattorı S, Sato S, Toyoda M, Teranaka T, Narayanan As. Progenitor cells from dent al follicle are able to form cementum matrix in vivo. Connect Tissue Res. 2002; 43: 406-408.

Hasserjian RP,Aster JC, Davi F, Weinberg DS, Sklar J. Modulated expression of notch1 during thymocyte development. Blood. 1996; 88 (3): 970-6.

Hatoya S, Torii R, Kondo Y, Okuno T, Kobayashi K, Wıjewardana V, Kawae N, Tamada H, Sawada T, Kumagaı D, Sugıura K, Inaba T. Isolation and characterization of embryonic stem-like cells from canine blastocysts. Mol reprod dev. 2006; 73(3): 298-305.

Herzog EL, Cahi L, Krause DS. Plasticity of marrow- derived stem cells. Blood. 2003; 102: 3483-3493.

Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2005; 7: 393-395.

Hotta Y. Ethical issues of the research on human embriyonic stem cells. Journal International de Bioethique. 2008; 19(3): 77-85.

Hughes Fm, Gorospe WC. Biochemical identification of apoptosis in granulosa cells: evidence for a potential Mechanism underlying follicul aratresia. Endocrinology. 1991; 129(5): 2415-2422.

Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, andsignaling in cell adhesion. Cell. 1992; Apr 3;69(1):11-25.

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.

Ishida T, Inaba M, Hisha H, Sugiura K, Adachi Y, Nagata N. Requirement of donor-derived stromal cells in the bone marrow for successful allogeneic bone marrow transplantation. Complete prevention of recurrence of autoimmune diseases in MRL/MP-Ipr/Ipr mice by transplantation of bone marrow plus bones (stromal cells) from the same donor. J Immunol. 1994; 15;152(6): 3119–3127.

Jefferis R, Male D, Brostoff J, Roth DB, Roitt I. Antibodies in immunology. Mosby Elsevier, Canada. 2006; 59-86.

Jethwa H, Adami AA, Maher J. Use of gene-modified regulatory T-cells to control autoimmune and alloimmune pathology: Is now the right time?. Clinical Immunology. 2014; 150:51-63.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature. 2002; 418: 41-49.

Jo YY, Lee HJ, Kook SY, Choung HW, Park JY, Chung JH, Choung YH, Kim ES, Yang HC, Choung PH. Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. Tissue Eng. 2007; 13, 767-773.

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

Kapoor S, Patel SA, Kartan S, Axelrod D, Capitle E, Rameshwar P. Tolerance-like mediated suppression by mesenchymal stem cells in patients with dust mite allergy–induced asthma. J Allergy Clın Immunol. 2011; 129(4): 1094:101.

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): 5562-70.

Kas-Deelen AM, WW Bakker, P Olinga, J Visser, EF de Maar, WJ van Son, TH The and MC Harmsen. Cytomegalo virus infection increases the expression and activity of ecto-ATPase (CD39) and ecto-5¢nucleotidase (CD73) on endothelial cells. FEBS Lett. 2001; 491: 21-25.

Kavanagh H, Mahon BP. Allogeneic mesenchymal stem cells prevent allergic airway inflammation by inducing murine regulatory T cells. Allergy. 2011; 66: 523-531.

Keeton WT, Gould JL, Gould CG. Genel Biyoloji. Çeviren: Demirsoy A, Türkan İ, Gündüz E. 5. Baskı. Palme Yayıncılık, Ankara. 2000; 378-395.

Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, GomesMassironi SM, Pereira LV, Caplan AI, Cerruti HF. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. Cell Tissue Org. 2006; 184(3-4): 105-16.

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

Kerr JF, Wylie AH, Currie AR. Apoptosis: a Basic Biological phenomen on with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972; 26: 239-257.

Kılıçturgay K. Hipersensitivite (Aşırı duyarlılık). İmmünoloji. 3. Baskı. İstanbul Güneş ve Nobel yayın evi. 1997; p: 209.

Kierszenbaum AL, Tres LL. Histology and cell biology an introduction to pathology. 3th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders. 2012; 291-323, 626-644.

Koçyiğit I, Kaynar L, Çetin M. Hematopoietic stem cell Biology. Türkiye Klinikleri J Hem Onc-Special Topics. 2008; 1(2): 16-22.

Kraman M. And Mc Cright B. Functional conservation of Notch1 and Notch2 intracellular domains. FASEB J. 2005; 19(10): 1311-3.

Krebsbach PH, Robey PG. Dental and Skeletal Stem Cells: Potential Cellular Regeneration. Journal Of Dental Education. 2002; 66: 6, 766-773.

Lai AY, Kondo M. T and B lymphocyte differentiation from hematopoietic stem cell. Semin Immunol. 2008; 20 (4): 207-212.

Laura Airasand Sirpa Jalkanen. CD73 Mediates Adhesion of B Cells to Follicular Dendritic Cells. Blood. 1996; 88: 1755-1764.

Linsley PS, Ledbetter JA. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. Annu Rev Immunol. 1993; 11: 191-212.

Liu S, Khemlani LS, Shapiro RA, Johnson ML, Liu K, Geller DA, Watkins SC, Goyert SM, Billiar TR. Expression of CD14 by hepatocytes: upregulation by cytokines during endotoxemia. Infect Immun. 1998; 66(11): 5089-98.

Loeffler M, Roeder I. Tissue Stem Cells: Definition, Plasticity,Heterogeneity, Self-Organization and Models- A Conceptual Approach. Cells Tissues Organs. 2002; 171: 8-26.

Lowenthal JW, Corthésy P, Tougne C, Lees R, MacDonald HR, Nabholz M. High and low affinity IL 2 receptors: Analysis by IL 2 dissociation rate and reactivity with monoclonal anti-receptor antibody PC61. J Immunol. 1985; 135(6): 3988-94.

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

MacDougall M, Simmons D, Luan X, Nydegger J, Feng J, Gu TT. Dentin phospho protein and dentin sialoprotein are cleavage product sex pressed from a single transcript code dby a gene on human chromosome 4 Dentin phosphoprotein DNA sequence determination. J BiolChem. 1997; 10: 272(2): 835-42.

Mafi R, S Hindocha, P Mafi, M Griffinand WS Khan. Sources of adult mesenchymal stem cells applicable for musculo skeletal applications - a systematic review of the literature. Open Orthop J. 2011; 2: 242–248.

Makino Y, Yamaza H, Akiyama K, Ma L, Hoshino Y, Nonaka K, Terada Y, Kukita T, Shi S, Yamaza T. Immune Therapeutic Potential of Stem Cells from Human Supernumerary Teeth. J Dent Res. 2013; 92(7): 609-15.

Marinova-Mutafchieva L, Willimas RO, Funa K, Maini RN, Zwaifler NJ. Inflammation is preceded by tumor necrosis factor-dependent infiltration of mesenchymal cells in experimental arthritis. Arthritis Rheum 46. 2002; 46(2): 507-513.

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.

Martinez-Agosto JA, Mikkola HK, Hartenstein V, Banerjee U. The hematopoietic stem cell and its niche: a comparative view. Genes Dev. 2007; 21(23): 3044-3060.

Mauth C, Huwig A, Graf-Hausner U, Roulet JF. Restorative Applications for Dental Pulp Therapy. Topics in Tissue Engineering. 2007; 3: 1-32

Mayani H, Lansdorp PM. Thy-1 expression is linked to functional properties of primitive hematopoietic progenitor cells from human umbilical cord blood. Blood. 1994; 1;83(9): 2410-7.

Michalczyk K, Ziman M. Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. Histol Histopathol. 2005; 20 (2): 665–71.

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

Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annu Rev Immunol. 2001; 19: 683–765.

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

Morsczeck C, Reichert TE, Vollner F, Gerlach T, Driemel O. The state of the art in human dental stem cell research. Mund Kiefer Gesichtschir. 2007; 11(5): 259-66.

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

Morst (Ministry of Research Science and Tecnology). Stem Cell Research in New Zealand; Challenges and Opportunities for the Research Sector. New Zealand 2006; 13-16

Muşabak U, B hücre gelişimi ve tolerans mekanizmaları. Türkiye Klinikleri J Immunol Rheumatol-Special Topics. 2011; 4(2):16-24.

Nadig RR. Stem cell therapy - Hype or hope? A review. J Conserv Dent. 2009; 12: 131-8.

Navabazam AR, Nodoshan FS, Sheikhha MH, Miresmaeili SM, Soleimani M, Fesahat F. Characterization of mesenchymal stem cells from human dental pulp,

preapical follicle and periodontal ligament. Iranian Journal of Reproductive Medicine. 2013; 3: 235-242.

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

Nettersheim D, Gillis AJ, Looijenga LH, Schorle H.TGF-b1, EGF and FGF4 synergistically induce differentiation of the seminoma cell line TCam-2 into a cell type resembling mixed non-seminoma. Int J Androl. 2011; 34(4):189-203.

Neuss S, Becher E, Wöltje M, Tıetze L, Dechenta WJ. Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing. Stem Cells. 2004; 22: 405-414.

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

Niemela J, Ifergan I, Yegutkin G, Jalkanen S, Prat A, et al. Interferon-B regulates CD73 and adenosine expression at the blood-brain-barrier. Eur J Immunol. 2008; 38: 2718–2726.

Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S. Development and maintenance of regulatory T cells. Immunity. 2013; 21;38(3): 414-23.

Özcan T, Seyis S, Akçay B. Hücresel Kardiyomiyoblasti ve Kök Hücre Tedavisi, Türkiye Klinikleri. J Cardiovasc Sci. 2007; 19: 68-76.

Pan G, Thomson JA. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. Cell Res. 2007;17(1): 42-9.

Pera MF, Reubinoff B, Trounson A. Human embryonic stem cells. J Cell Sci. 2000; 113(1): 5–10.

Pierelli L, Bonanno G, Rutella S, Marone M, Scambia G, Leone G. CD105 (endoglin) expression on hematopoietic stem/ progenitor cells. Leuk Lymphoma. 2001;42(6): 1195-206.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 1999; 284(5411):143-147.

Pountos I, Giannoudis PV. Biology of mesenchymal stem cells. Injury. 2005; 36(3): 8- 12.

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.

Prentice D. Current Science of Regenerative Medicine with Stem Cells. Journal of Investigative Medicine. 2006; 54 (1): 33-37.

Pulido R, Cebrián M, Acevedo A, de Landázuri MO, Sánchez-Madrid F. Comparative biochemical and tissue distribution study of four distinct CD45 antigen specificities. J Immunol. 1988;1;140(11): 3851-7.

Ratajczak MZ. Phenotypic and functional characterization of hematopoietic stem cells. Curr Opin Hematol. 2008; 15 (4), 293-300.

Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system forimmune surveillance and homeostasis. Nature Immunol. 2010; 11: 785-97.

Ross MH, Pawlina W. Histology A Text and Atlas, with Correlated Cell and Molecular Biology. 6th ed. Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins. 2006; 848-854, 441-453.

Ramalho-Santos M, Willenbring H. On the origin of the term “stem cell”. Cell Stem Cell. 2007; 1: 35-8.

Sağsöz H, Ketani MA. Kök Hücreler. Dicle Üniversitesi,Veterinerlik Fakülte Dergisi. 2008; 1 (2): 29 - 33.

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

Sharma R, Rohilla A, Arya V. International journal of pharmaceutical. Sciences review and research. 2011; 9(2): 20-21.

Sharma U, Pal D, Singh SK, Kakkar N, Prasad R. Reduced L/B/K alkaline phosphatase gene expression in renal cell carcinoma: plausible role in tumori genesis. Bio chimie. 2014; 104: 27-35.

Shyu WC, Lin SZ, Yang HI, Tzeng YS, Pang CY, Yen PS, Li H. Functional recovery of stroke rats induced by granulocyte colonystimulating factor-stimulated stem cells. Circulation. 2004; 110:1847–54.

Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. Blood. 1991; 78(1): 55-62.

Smaili S, Su Y. Et al. Mitochondria in Ca_2^+ Signal lingand Apoptosis. J Bioener and Biomem. 2000; 32(1): 35-46.

Spangrude GJ. When is a stem cell really a stem cell?. Bone Marrow Transplantation. 2003; 32: 7-11.

Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E, van den Heuvel FA, Koornstra JJ, Wesseling J, Hollema H, de Jong S. Tissue distribution of the death ligand trail and it sreceptors. J Histochem Cytochem. 2004; 52(6): 821-831.

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

Susan FM, Sally RS. Introductory clinical pharmacology. Lippincott Williams and Wilkins USA. 2009; 27, 567-568.

Tarle SA, Shı S, Kaıgler D. Development of a serum-free system to expand dental-derived stem cells: PDLSCs and SHEDs. Journal Of Cellular Physıology. 2011; 226(1): 66-73.

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

Terling C, Rass A, Mıtsıadıs T.A, Frıed K, Wroblewskı J. Expression of the intermediate filament netsin during roden ttooth development. Int. J. Dn. BioI. 1995; 39: 947-956.

Thompson LF, JM Ruedi, MG Lowand LT Clement. Distribution of ecto-5¢-nucleotidase on subsets of human T and B lymphocytes as detected by indirect immuno fluorescence using go at antibodies. J Immunol. 1987; 139: 4042–4048.

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

Todorovic V, Markovic D, Milosevic-Jovcic N, Petakov M, Balint B, Colic M, Milenkovic A, Colak I, Jokanovic V, Nikolic N. Dental pulp stem cells - potential significance in regenerative medicine. Stom Glas S. 2008;55: 170-8.

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; 75: 389–97.

Trounson A. The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. Endocr Rev. 2006; 27: 208-219.

Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. Cell. 1999; 96: 245-254.

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

Walport MJ. Complement. The New England Journal of medicine. 2001; 344: 1058-1066.

Wang X, Sha XJ, Li GH. Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells. Archives of Oral Biology. 2012; 57(9): 1231-40.

Yamaza T, Kentaro A, Chen C, Liu Y, Shi Y, Gronthos S, Wang S, Shi S. Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Stem Cell Research & Therapy. 2010; 1(1):5

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

Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science. 2007; 318:1917–1920.

Yuntao D, Hongzhi H, Gary EW, Shaomian Y. Hypoxia promotes growth of stem cells in dental follicle cell populations. Biomed Sci Eng. 2011; 4(6): 454–461.

Zimmermann H. 5¢-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. Biochem J. 1992;285 (Pt 2):345–365.

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.

9. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	SELİN	**Soyadı**	YILDIRIM
Doğum Yeri	İSTANBUL/ÜSKÜDAR	**Doğum Tarihi**	26.10.1989
Uyruğu	T.C.	**Tel**	0554 318 25 43
E-mail	selinyildirim1@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	MezunOlduğuKurumunAdı	**MezuniyetYılı**
Lisans	Marmara Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2012
Lise	Ümraniye Mevlana Lisesi	2006

İş Deneyimi

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

YabancıDilleri	**OkuduğunuAnlama***	**Konuşma***	**Yazma***
İngilizce	İyi	Orta	Orta

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

	Sayısal	**EşitAğırlık**	**Sözel**
ALES Puanı	71,547	70,725	62,865

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanmabecerisi**
Microsoft Office	Çok iyi
Graphpad	İyi

*****Çokiyi, iyi, orta, zayıfolarakdeğerlendiriniz.

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan Sözlü Bildiriler

1- **Selin Yıldırım**, Noushin Zibandeh, Deniz Genç,Işıl Barlan, Elif Merve Özcan, Kamil Göker, Tunç Akkoç. IFN-γ, Dental Folikül Kaynaklı Mezenkimal Kök Hürelerin (DFSC) $CD4^{+}FoxP3^{+}$ T Hücrelerini İndükler. "23. Ulusal İmmünoloji Kongresi". (26-30 Nisan 2015, Antalya)

2- Perran Boran, **Selin Yıldırım**, Elif Karakoç- Aydıner, İsmai Öğülür, Ahmet Özen, Goncagül Haklar, Ahmet Koç, Tunç Akkoç, Işıl Barlan. Asemptomatik Bebeklerde Vitamin B12 Eksikliği: İmmün Sistem Üzerine Etkisi."III. Ulusal Sosyal Pediatri Kongresi". (17-20 Aralık 2014, Ankara) (En iyi sözlü bildiri)

3- **Selin Yıldırım**, Noushin Zibandeh, Ahmet Özen, Elif Merve Özcan, Kamil Göker, Işıl Barlan, Tunç Akkoç. Süt Dişi Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Astımlı Hastaların Periferik Kan Lenfosit Proliferasyonuna Etkisi. "XXI. Ulusal Allerji ve Klinik İmmünoloji Kongresi". (27-30 Nisan 2014, Antalya)

4- Hatice Ezgi Aksu, Safa Barış, Elif Karakoç Aydıner, Ahmet Özen, İbrahim Gökçe, Nurdan Yıldız, **Selin Yıldırım**, Tunç Akkoç, Harika Alpay, Işıl Barlan.Sistemik Steroid Kullanımının Doğal ve Edinsel İmmün Yanıt Üzerine Etkisi. "1. Marmara Pediatri Kongresi". (17-19 Ocak 2014, İstanbul) (En iyi sözlü bildiri)

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Poster Bildirileri

1- **Selin Yıldırım**, Ahmet Oguzhan Ozen, Elif Merve Ozcan, Mehmet Kamil Goker, Işıl Barlan, Tunc Akkoc. Stem Cells From Human Exfoliated Deciduous Teeth suppress in vitro Proliferation of Lymphocyte Cells from Asthma Patients. "2nd International Molecular Immunology & Immunogenetics Congress (MIMIC-II)" (27-30 April 2014, Antalya, Turkey)

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan Poster Bildirileri

1- Noushin Zibandeh, **Selin Yıldırım**, Sakina Sokwala, Wendy Mugaisi, Damla Yağmur, Kamil Gmker, Hakan Akın, Neşe İmeryüz, Munkhtsetseg Banzraghc, Tunç Akkoç. "Süt Dişi Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İn Vitro Ortamda Crohn Tanısı Almış Hasta Biyopsi ve Periferal Kan Lenfosit Proliferasyonu Üzerine Etkisi""XXI. Ulusal Allerji ve Klinik İmmünoloji Kongresi". (27-30 Nisan 2014, Antalya)

Sertifikalar

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

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

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

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

8-19 Nisan 2013 "Araştırıcılar için Deney Hayvanları Kullanımına ait Eğitim" kursu sertifikası, Marmara Üniversitesi, İstanbul

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

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

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

16 Aralık 2010 “Biyomalzemeler ve Tıpta Uygulanması Sempozyumu” Acıbadem Üniversitesi, İstanbul

5 Mart 2010 “1. Kök Hücre Sempozyumu” Katılım Sertifikası, Marmara Üniversitesi, İstanbul

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	09.2014.0015	70737436-050.06.04- 14000769 73
	PROJE ADI	Süt Dişi Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler (Shed), Tam Gömük Yirmi Yaş Dişi Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler (Dpscs) Ve Diş Folikülü Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin (Dfscs) İmmünolojik Özelliklerinin Karşılaştırılması	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI/ADI	Doç.Dr. Tunç AKKOÇ	

KARAR BİLGİLERİ	Tarih 04.04.2014 **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. Faysal DANE	Tıbbi Onkoloji	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	
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	
Öğr.Gör.Dr. Gürkan SERT	Avukat	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Av.Ümit ERDEM	Sağlık Mensubu olmayan kişi	Serbest	Var Yok	Evet Hayır	