



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ATOPIK DERMATİT'Lİ HASTALARDA DENTAL FOLİKÜL
KÖK HÜCRELERİN NAİVE T LENFOSİTLERİN TH1 VE TH2
YÖNÜNDE FARKLILAŞMASI ÜZERİNE ETKİSİ**

NOUSHIN ZIBANDEH

DOKTORA TEZİ

ÇOCUK SAĞLIĞI ve HASTALIKLARI ANABİLİM DALI,

ÇOCUK ALLERJİ ve İMMÜNOLOJİ BİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. TUNÇ AKKOÇ

İSTANBUL, 2018

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Doktora
Anabilim Dalı : Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD
Tez Sahibi : Noushin ZIBANDEH
Tez Başlığı : Atopik Dermatit'li Hastalarda Dental Folikül Kök Hücrelerin Naive T Lenfositlerin Th1 ve Th2 Yönünde Farklılaşması Üzerine Etkisi
Sınav Yeri : Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD
Sınav Tarihi : 30.05.2018

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

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof. Dr. Tunç AKKOÇ

Kurumu

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD,
Alerji ve İmmünoloji Bilim Dalı

İmza



Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof. Dr. Ahmet Oğuzhan ÖZEN

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD,
Alerji ve İmmünoloji Bilim Dalı



Doç. Dr. Betül KARADEMİR

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyokimya AD,



Doç. Dr. Umut Can KÜÇÜKSEZER

İstanbul Üniversitesi, Deneysel
Araştırma Tıp Enstitüsü



Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA

İstanbul Kültür Üniversitesi, Moleküler
Biyoloji ve Genetik Bölümü



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 21.../06.../2018 tarih ve .k.1 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Göksel ŞENER

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



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

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 haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Noushin Zibandeh
(Doktora Öğrencisi)

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimimin ve tez çalışmamın tüm aşamalarında her türlü bilimsel desteği sağlayan, deneyimlerini benimle paylaşan ve beni yönlendiren tez danışmanım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Tunç Akkoç' a

Doktora eğitim süresince, birikimleri ile yanımda olduğunu hissettiren Çocuk Alerji-İmmünoloji Bilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Ahmet Özen'e,

Tez çalışmalarımı yaparken büyük bir titizlikle hasta gruplarını seçmede ve elde ettiğim sonuçları değerlendirmede bana yardımcı olan kıymetli hocalarım, Prof. Dr. Tülin Ergün'e, Doç. Dr. Safa Barış'a ve Yrd. Doç. Dr. Züleyha Özgen'e,

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 sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Bu uzun yolu birlikte başlayıp birlikte bitirdiğim, en zor zamanımda yanımda olan ve hayata dair kendisinden çok şey öğrendiğim ablam Dr. Deniz Genç'e,

Tez deneylerim yapılırken biran olsun beni yalnız bırakmayan çok sevdiğim kardeşim Yazgül Duran'a,

Doktora eğitim süresince birlikte çok şey paylaştığım kalbi güzel arkadaşım, Dilek Başer'e,

Her sabah laboratuvara geldiğimde müthiş enerjileriyle beni karşılayan ve hep yanımda olan değerli arkadaşım Gamze Akgün'e, fiziksel olarak yanımda olmasa da telefonun diğer ucunda " sen yaparsın" diyen o ses Selin Kılinc'a en içten duygularıyla teşekkür eder ve şükranlarımı sunarım.

Güler yüzleri ve güzel kalpleriyle hep yanmada olan ve "bilgi paylaşıldıkça çoğalır" sözünün ne kadar doğru olduğunu bana hatırlatan, Hematoloji ve

İmmünoloji bölümünün çok değerli hocaları Dr. Aysin Tulunay ve Dr. Filiz Özdemir'e en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Aramızda kilometrelerce mesafe olmasına rağmen bana hep destek olan ve beni motive eden arkadaşım Shiva Yahyapoura'a çok teşekkür ederim.

Hayattaki en büyük şansım, beni ben yapan, koşulsuz arkamda durup kararlarımı destekleyen, her yere düştüğümde daha güçlü kalkmamı sağlayan, tanrının yarattığı tüm canlılara koşulsuz saygı ve sevgi duymam gerektiğini bana öğreten biricik annem; Farah Bagheri'e, Babam; Biyouk Zibandeh'e ve Ablam; Shirin Zibandeh'e teşekkürü borç bilirim.

Çok özlediğim, her zaman rahmetle andığım, yolun başında genç bir bilim kadını olarak örnek aldığım Hocam Sayın Prof. Dr. Işıl Berat Barlan'ı büyük bir özlemle anıyorum. Mekânınız cennet olsun.

Bu çalışma Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: SAG-C-DRP-200716-0373) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	v
ÇİZELGE LİSTESİ.....	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
KISALTMALAR	xv
1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. İmmün Sistem.....	5
4.1.1. Doğal İmmün Sistem	6
4.1.1.1. Epitel Tabaka	6
4.1.1.2. Fagosit Hücreler	7
4.1.1.3. Sitokinler	8
4.1.2. Edinsel bağışıklık.....	9
4.1.2.1. Hümorale ve Hücreli İmmünite	10
4.1.2.2. CD4 ⁺ T lenfositler	12
4.1.2.3. CD8 ⁺ T lenfositler	13
4.1.2.4. CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ T Regulator Hücreler	13
4.1.2.5. Antijen Sunucu Hücreler.....	14
4.1.3. Apoptoz.....	15
4.1.4. Atopik Dermatit	17
4.1.5. Psoriasis	18
4.1.6. Atopik Dermatit ve Psoriasis Patogenezi.....	18

4.1.7. Atopik Dermatit ve Psoriasis Hastalıklarında Güncel Tedavi Yaklaşımları	20
4.2. Kök Hücreler	21
4.2.1. Mezenkimal Kök Hücreler.....	21
4.2.1.1. Diş Folikülü Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler (DF-MKH).....	22
4.2.2. Mezenkimal Kök Hücreler ve İmmünomodülasyon.....	24
5. GEREÇ ve YÖNTEM.....	25
5.1. Çalışma Planının Özeti	25
5.2. Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar	26
5.3. Çalışmada Kullanılan Hücre Kültürü Malzemeleri.....	29
5.4. Kullanılan Cihazlar.....	31
5.5. Kullanılan solüsyonların hazırlanması	31
5.5.1. DF-MKH' ler için besiyerinin hazırlanması.....	31
5.5.2. Lenfosit Kültürleri için besiyerinin hazırlanması	32
5.5.3. Kök hücre dondurma solüsyonunun hazırlanması.....	32
5.5.4. PBS solüsyonunun hazırlanması.....	32
5.5.5. CDmix uyarımı için anti-CD3 ve anti-CD28 stok solüsyonların hazırlanması.....	32
5.5.6. Kollajenaz solüsyonunun hazırlanması	33
5.5.7. RIPA protein izolasyon solüsyonunun hazırlanması	33
5.5.8. Protein miktarı ölçüm solüsyonunun ve standartların hazırlanması.....	33
5.5.9. Osteojenik stimülasyon besiyerinin hazırlanması.....	33
5.5.10. Kondrojenik stimülasyon besiyerinin hazırlanması.....	34
5.5.11. Adipojenik stimülasyon besiyerinin hazırlanması.....	34
5.5.12. Lizat solüsyonunun hazırlanması.....	34
5.5.13. Alizarin red solüsyonunun hazırlanması.....	34
5.5.16. Oil red O solüsyonunun hazırlanması.....	34
5.5.14. Alcian blue solüsyonunun hazırlanması	34
5.5.15. TBST solüsyonunun hazırlanması	35
5.6. Çalışma Planı.....	35

5.6.1. Diş folikülü kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu	37
5.6.2. İzole edilen hücrelerin pasajlanması	38
5.6.3. İzole edilen kök hücrelerin karakterizasyonu	39
5.6.4. İzole edilen kök hücrelerin farklılaştırılması	40
5.6.4.1. İzole edilen kök hücrelerin osteojenik farklılaştırılması	40
5.6.4.2. İzole edilen kök hücrelerin adipojenik farklılaştırılması	41
5.6.4.3. İzole edilen kök hücrelerin kondrojenik farklılaştırılması	42
5.6.5. Kök hücrelerin 48 kuyucuklu kültür plaklarına ekilmesi	42
5.6.6. Mononükleer hücre kültürlerinin yapılması	43
5.6.6.1. AD hastası, Psoriasis hastası ve sağlıklı bireylerin seçimi	43
5.6.6.2. AD hastası, Psoriasis hastası ve sağlıklı bireylerden alınan venöz kandan mononükleer hücre izolasyonu	45
5.6.6.3. Lenfositlerin proliferasyon analizi için CFSE ile işaretlenmesi	47
5.6.6.4. Lenfosit kültürünün ve kök hücre ve lenfositlerin ko-kültürünün yapılması	48
5.6.7. Analizler	49
5.6.7.1. T Lenfositlerin proliferasyon analizi	49
5.6.7.2. Lenfositlerin CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ T regülatör hücre analizi	50
5.6.7.3. Lenfositlerin Annexin V/7AAD ile apoptoz oranlarının analizi	51
5.6.7.4. Lenfositlerin Fas/Fas Ligand analizi	52
5.6.7.5. Lenfositlerin TNFR1 ve TNFR2 analizi	53
5.6.7.6. Naive ve Bellek T lenfosit oranlarının belirlenmesi	54
5.6.7.7. Hücre kültür süpernatantlarında sitokin tayini	55
5.6.7.8. Protein ekspresyon analizi (Western Blot yöntemi)	56
5.6.7.9. DF-MKH'lerin immün düzenleyici moleküllerin nötralizasyon analizi	57
5.6.8. İstatistiksel analiz	58

6. BULGULAR	59
6.1. Diş Folikülü Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu	59
6.2. DF-MKH'lerin Karakterizasyonu ve Farklılaşma Potansiyelinin Değerlendirilmesi	60
6.2.1. DF-MKH hücrelerin akım sitometri analizi.....	60
6.2.2. DF-MKH hücrelerin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik yönde farklılaştırılması	61
6.3. AD, Psöriasis ve Sağlıklı Kontrol Gruplarında Demografik Veriler	62
6.4. AD Hastalarında 0.Gün T Alt Grupları, B Alt Grupları ve NK Hücre Oranlarında Anlamlı Bir Fark Görülmedi.	64
6.5. DF-MKH'ler AD hastalarında CD4 ⁺ ve CD8 ⁺ Lenfosit Proliferasyonunu in vitro Ortamda Baskıladı.	65
6.6. DF-MKH'ler AD Hastalarında Lenfositlerin Canlılığını (Annexin-/7AAD) in vitro Ortamda Arttırdı.	67
6.7. DF-MKH'ler AD hastalarında CD4 ⁺ ve CD8 ⁺ Lenfositler Üzrindeki Fas ve Fas-L ifadesini in vitro Ortamda Baskıladı.	68
6.8. DF-MKH'ler AD hastalarında CD4 ⁺ ve CD8 ⁺ Lenfositler Üzrindeki TNFR II ifadesini in Vitro Ortamda Baskıladı.....	72
6.9. DF-MKH'ler AD Hastalarında CD4 ⁺ CD45RA ⁺ ve CD8 ⁺ CD45RA ⁺ Naive T Hücre Oranını Arttırırken CD4 ⁺ CD45RO ⁺ ve CD8 ⁺ CD45RO ⁺ bellek Hücre Oranını Düşürdü.	75
6.10. DF-MKH'ler AD Hastalarında CD4 ⁺ CD45RA ⁺ ve CD8 ⁺ CD45RA ⁺ Naive T Hücre Üzerindeki Fas oranını Düşürdü.....	76
6.11. DF-MKH'ler AD Hastalarında CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ Regülatör T Hücre Oranını Arttırdı. DF-MKH AD İmmün Yanıtlarını TGF-β ve PGE-2 ile Baskıladı.	79
6.12. DF-MKH AD Hastalarında IL-4 Düzeylerini Azalttı, IFN-γ ve IL-10 Düzeylerini Arttırdı.	82

6.13. DF-MKH AD Hastalarında GATA-3 Ekspresyonunu Azalttı, Tbet ve FoxP3 Ekspresyonunu Artırdı.	87
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	89
8. KAYNAKLAR	97
9. ÖZGEÇMİŞ.....	108

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 1. AD, Psöriasis ve Sağlıklı hasta grupların demografik verileri..... 63

Çizelge 2. AD, Psöriasis ve Sağlıklı hasta grupların lenfosit alt grupların dağılımı 64

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1.** Erişkin ve çocuklarda Atopik Dermatit hastalığında immün yanıtların şematik gösterimi ve Psoriasis hastalığında immün yanıtlardan farkının gösterimi 4
- Şekil 2.** MKH'lerin immün düzenleyici etkisi. MKH'ler immün sistem hücreleri üzerinde; aktive olmamış NK hücrelerin proliferasyon ve sitotoksitesini azaltarak, B ve T lenfositlerin proliferasyonunu engelleyerek, T regülatör hücrelerin sayısını artırarak, monositlerin farklılaşmasını ve dendritik hücrelerin olgunlaşmasını ve antijen sunumunu engelleyerek immün düzenleyici etki göstermektedir (Al Jumah ve Abumaree, 2012). 24
- Şekil 3.** Çalışma planının şematik gösterimi 37
- Şekil 4.** CFSE işaretli hücrelerin akım sitometri cihazında analizi. CFSE alanında sağda bulunan hücre grubuna ait pik bölünmeyen (ilk popülasyon) hücreleri ifade eder (IP), her bölünen hücre sola doğru diğer nesilleri (1,2,3,...) göstermektedir. Hücre her bölünmede bir önceki nesilden CFSE boyasının yarısını aldığı için proliferasyon alan (çoğalan) hücreler grafikte sola doğru ilerlemektedir. 49
- Şekil 5.** CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regülatör hücrelerin akım sitometri analizi. A) Akım sitometri analizinde önce lenfosit kapısı alınmaktadır, B) Lenfosit altgruplarının içinde CD4 ve CD25 çift pozitif alandaki hücreler seçilerek kapılanmıştır, C) CD4⁺CD25⁺ ifade eden hücrelerin içinde FoxP3 pozitif alandaki Tregülatör hücreler seçilerek % oranları analiz edilmiştir..... 51
- Şekil 6.** Hücre canlılığı ve apoptoz oranlarının akım sitometri cihazında analizi. A) Kültürden alınan hücreler için akım sitometri cihazında önce lenfosit kapısı seçilir. B) Lenfositlerin içinden CD3⁺/CD4⁺ T hücreler seçilir. C) CD3⁺/CD4⁺ T hücrelerde Annexin V/7AAD analizi yapılır. 52
- Şekil 7.** Fas (CD95) ve Fas-L (CD178) analizi. SSC-FSC alandaki lenfosit kapısı alındıktan sonra CD4⁺ veya CD8⁺ lenfositler kapılanır. CD4⁺ veya CD8⁺ lenfositlerin içinden Fas veya Fas-L oranları histogramda M2 alanından belirlenir..... 53
- Şekil 8.** TNFR1 ve TNFR2 analizi. SSC-FSC alandaki lenfosit kapısı alındıktan sonra CD4⁺ veya CD8⁺ lenfositler kapılanır. CD4⁺ veya CD8⁺ lenfositlerin içinden TNFR1 veya TNFR2 oranları histogramda M2 alanından belirlenir. 54

- Şekil 9.** Naive ve Bellek T lenfosit oranları. SSC-FSC alanından seçilen lenfositlerden CD4⁺ veya CD8⁺/CD45RA⁺ (naive), CD4⁺ veya CD8⁺/CD45RO⁺ (bellek) hücre oranları belirlendi. 54
- Şekil 10.** Th1/Th2/Th17 sitokin kiti standart hazırlanması. 55
- Şekil 11.** DF-MKH' lerin morfolojik görünümü. A) DF-MKH hücrelerinin birinci kültür (P0, 3. gün), B) birinci pasaja sonrası (P1, 3. gün), C-D) sonraki alt kültürlerinin (C: P2, 3. gün; D: P3, 3. gün) invert mikroskobu görüntülerinde, kök hücrelerin fibroblast benzeri morfolojiye sahip oldukları görülmektedir (Büyütme: AX20, B-C-DX10). 59
- Şekil 12.** DF-MKH hücrelerinin immunofenotipik özelliklerinin akım sitometri sonuçları. CD45 (%0,0), CD14 (%0,01), CD34 (%4,72), CD25 (%0,27) ve CD28 (%1,14) negatif ekspresyon gösterirken, MKH' lara özgü CD105 (%95,58), CD146 (%97,43), CD90 (%97,78), CD73 (%98,54) ve CD29 (%96,50) pozitif olduğu gösterildi. IC; İzotip kontrol..... 60
- Şekil 13.** DF-MKH hücrelerinin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma özellikleri. A) Osteojenik farklılaştırma besiyeri ile kültürü yapılan ve sonrasında alizarin kırmızısı ile boyanan DF-MKH hücrelerinde parlak kırmızı renkte boyanmış osteoblast nodülleri görülmektedir. B) Adipojenik farklılaştırma besiyeri ile kültürü yapılan ve sonrasında Oil red o ile boyanan DF-MKH hücrelerinde kırmızı renkte yağ damlacıkları görüldü. C) Kondrojenik farklılaştırma besiyeri ile kültürü yapılan ve sonrasında Alcian blue ile boyanan DF-MKH hücrelerinde mavi renkli boyanan proteoglikanlar görüldü. 61
- Şekil 14.** CD4⁺ T lenfosit ve CD8⁺ T lenfosit proliferasyonu. A) DF-MKH'in AD, Psöriasis hastalar ve sağlıklı bireylerde lenfosit hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki baskılayıcı etkisi akım sitometri analiz gösterimi. CFSE boyasıyla işaretlenen lenfositler histogramda sola doğru proliferasyon göstermektedir. B) DF-MKH'ler AD ve Psöriasis hastalarında CD4⁺ ve CD8⁺ hücreleri anlamlı olarak baskıladı. Sağlıklı bireylerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,005..... 66
- Şekil 15.** T lenfosit Canlılığı. A) DF-MKH'in AD, Psöriasis hastalar ve sağlıklı bireylerde lenfosit hücrelerinin canlılığı üzerindeki baskılayıcı etkisi akım sitometri analiz gösterimi. Annexin/7AAD ile işaretlenen lenfositler dot blot olarak gösterildi. B) DF-MKH'ler AD ve Psöriasis hastalarında lenfosit hücrelerinin canlılığını anlamlı olarak arttırdı. Sağlıklı bireylerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. *P<0,05; **P<0,01..... 68

- Şekil 16.** CD4⁺ T lenfosit ve CD8⁺ T lenfosit üzerindeki Fas ve FasL ifadesi. A) AD, Psöriasis hastalar ve sağlıklı bireylerde DF-MKH varlığında ve yokluğunda CD4⁺ ve CD8⁺ lenfositler üzerindeki Fas ve FasL ifadesinin akım sitometri ile gösterimi. Fas ve FasL ile işaretlenen Lenfositler overlay olarak gösterildi B) DF-MKH'ler AD ve Psöriasis hastalarında CD4⁺ ve CD8⁺ hücreleri üzerindeki Fas ve FasL ekspresyonunu anlamlı olarak baskıladı. DF-MKH varlığında ve yokluğunda sağlıklı bireylerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. *P<0,05; **P<0,01, ***P<0,001, ****P<0,0001. 71
- Şekil 17.** CD4⁺ T lenfosit ve CD8⁺ T lenfosit üzerindeki TNFR I ve II ifadesi. A) AD, Psöriasis hastalar ve sağlıklı bireylerde DF-MKH varlığında ve yokluğunda CD4⁺ ve CD8⁺ lenfositler üzerindeki TNFR I ve TNFR II ifadesinin akım sitometri ile gösterimi. TNFR I ve TNFR II ile işaretlenen Lenfositler overlay olarak gösterildi B) DF-MKH'ler AD ve Psöriasis hastalarında CD4⁺ ve CD8⁺ hücreleri üzerindeki TNFR II ekspresyonunu anlamlı olarak baskıladı. DF-MKH varlığında ve yokluğunda sağlıklı bireylerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. *P<0,05; **P<0,01, ***P<0,001, ****P<0,0001..... 74
- Şekil 18.** DF-MKH varlığında ve yokluğunda CD4⁺ CD45RA⁺ naive T, CD8⁺ CD45RA⁺ naive T, CD4⁺ CD45RO⁺ bellek T ve CD8⁺ CD45RO⁺ bellek T lenfositlerin oranı. AD hastalarında DF-MKH varlığında CD4⁺ CD45RA⁺ naive T ve CD8⁺ CD45RA⁺ naive T lenfositler oranı artarken CD4⁺ CD45RO⁺ bellek T ve CD8⁺ CD45RO⁺ bellek T lenfositlerin oranı azaldı. *P<0,05; **P<0,01. 76
- Şekil 19.** DF-MKH varlığında ve yokluğunda CD4⁺ CD45RA⁺ naive T, CD8⁺ CD45RA⁺ naive T, CD4⁺ CD45RO⁺ bellek T ve CD8⁺ CD45RO⁺ bellek T lenfositlerin üzerindeki Fas oranı. A) AD hastalarında DF-MKH varlığında CD4⁺ CD45RA⁺ naive T ve CD8⁺ CD45RA⁺ naive T lenfositler üzerindeki Fas oranı azalırken CD4⁺ CD45RO⁺ bellek T ve CD8⁺ CD45RO⁺ bellek T lenfositlerin üzerindeki Fas oranı değişmedi. B) CD45RA⁺ naive lenfositlerin üzerindeki Fas oranı PGE-2 blokajı yapılan kültürlerde anlamlı olarak arttı. **P<0,01, ***P<0,001 78
- Şekil 20.** CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regülatör hücre oranları. A) AD, Psöriasis ve sağlıklı kontrol gruplarında CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regülatör hücre oranlarının akım sitometri görünümü. B) AD, Psöriasis ve sağlıklı bireylerde DF-MKH varlığında CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regülatör hücre oranları istatistiksel olarak anlamlı arttı. AD ve Psöriasis hastalarında DF-

MKH varlığında anti-TGF β ve Sc58125 ilave edilen kültürlerde CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regülatör hücre oranları istatistiksel olarak anlamlı düştü. Sağlıklı kontrol gruplarında DF-MKH varlığında anti-TGF β ilave edilen kültürlerde CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regülatör hücre oranları istatistiksel olarak anlamlı düştü. *P<0,05; **P<0,01, ***P<0,001..... 81

Şekil 21. AD, Psöriasis ve Sağlıklı Kontrollerde IL-17A, IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL- 10 ve IL-4 DF-MKH varlığında ve yokluğunda istatistiksel olarak gösterimi. AD hastalarında DF-MKH varlığında IL-17A (A), TNF- α (C), IL-6 (D) ve IL-4 (F) anlamlı olarak azalırken IFN- γ (B) ve IL-10 (E) seviyesi anlamlı olarak arttı. Psöriasis hastalarında IL-17A (A), IFN- γ (B), TNF- α (C), IL-6 (D) seviyesi anlamlı olarak azalırken IL-10 (E) seviyesi anlamlı olarak arttı. *P<0,05; **P<0,01, ***P<0,001, ****P<0,0001..... 86

Şekil 22. DF-MKH varlığında ve yokluğunda AD, Psöriasis ve sağlıklı kontrol gruplarında Tbet, GATA3 ve Foxp3 ekspresyonu. A) Hasta ve kontrol gruplarında Tbet, GATA3 ve Foxp3 bant görünümü. B) DF-MKH varlığında Tbet ekspresyonu AD hastalarında artarken Psöriasis hastalarında anlamlı olarak azaldı. C) DF-MKH varlığında GATA3 ekspresyonu AD hastalarında anlamlı olarak düştü. D) DF-MKH varlığında Foxp3 ekspresyonu AD ve Psöriasis hastalarında anlamlı olarak arttı. **P<0,01, ***P<0,001..... 88

KISALTMALAR

APC	: Antigen Sunucu Hücre
AD	: Atopic Dermatit
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
FBS	: Fötal sığıır serumu
FoxP3	: Forkhead box p3
HKH	: Hematopoetik Kök Hücre
IFN	: Interferon
MHC	: Majör Histokompatibilite Kompleks
MKH	: Mezenkimal Kök Hücre
NK	: Doğal öldürücü hücre
PKMH	: Periferel Kan Mononükleer Hücre
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
TCR	: T Hücre Reseptörü
Th	: Yardımcı T Hücre
Tc	: Sitotoksik T Hücre
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
Treg	: Regülatör T hücre

Atopik Dermatit'li Hastalarda Dental Folikül Kök Hücrelerin Naive T Lenfositlerin Th1 Ve Th2 Yönünde Farklılaşması Üzerine Etkisi

Öğrencinin Adı: Noushin Zibandeh

Danışmanı: Prof. Dr. Tunç AKKOÇ

Anabilim Dalı: Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı,

Bilim Dalı: Allerji ve İmmünoloji Bilim Dalı

1. ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, Dental Folikül Mezenkimal Kök Hücrelerin (DF-MKH) Th2 baskın Atopik Dermatit hastalarının periferik kanından izole edilen lenfositleri üzerindeki immünomodülatör etkisinin *in vitro* ortamda araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: AD tanısı almış hastalar (n=9), Psoriasis hastaları (n=6) ve sağlıklı bireyler (n=6) çalışmaya dâhil edilmiştir. Bireylerin 20 ml venöz kanından Periferik Kan Mononükleer Hücre (PKMH) izolasyonu yapıldı. PKMH'ler uyaransız ve uyaranlı ortamda DF-MKH varlığında ve yokluğunda 72 saat kültür edildi. Süre sonunda CD4⁺/CD8⁺T lenfosit proliferasyonu, hücre apoptoz belirteçleri, T regülatör hücre oranları, Naive/bellek T hücre oranları ve kültür süpernatantından sitokin düzeyleri flow sitometri cihazında, GATA3, Tbet1 ve FoxP3 protein ekspresyonları Western Blot yöntemiyle analiz edildi.

Bulgular: AD ve psoriasis hastalarında CD4⁺ ve CD8⁺T lenfositlerin DF-MKH varlığında, Fas(CD95), FasL (CD178) ve TNFR2 yüzdesi anlamlı derecede baskılandı (p <0,05). Her iki hasta grubunda bellek T hücre oranı DF-MKH varlığında anlamlı olarak azalırken, Naive T hücreleri anlamlı olarak arttı (p <0,05). DF-MKH varlığında CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ oranı AD grubunda arttı (p <0,05). IL-17A, IL-6 ve TNF- α düzeyleri her iki hasta grubunda anlamlı olarak baskılandı (p <0,05). IFN- γ ve IL-10 düzeyleri AD hastalarında DF-MKH varlığında anlamlı olarak arttı (p <0,05). **Sonuç:** DF-MKH'lerin Th2 baskın AD hastalıklarında immün yanıtı düzelttiği saptandı. Sonuçlarımız DF-MKH'lerin AD'de immünomodülatör etkisi olduğunu ve tedavi yaklaşımlarında kullanılmasının uygun olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Atopik Dermatit, Mezenkimal Kök Hücre, İmmünomodulasyon, Psoriasis, Salgılanan Faktörler.

Effect of Dental Follicle Mesenchymal Stem Cell on Th1 And Th2 Derived Naive T Cells In Atopic Dermatitis Patients

Student's Name: Noushin Zibandeh

Advisor: Prof. Dr. Tunç AKKOÇ

Department: Department of Pediatric Allergy- Immunology

2. SUMMARY

Objective: The purpose of our study is to investigate the immunomodulatory effects of Dental Follicle Mesenchymal Stem Cells (DF-MSCs) on lymphocytes isolated from peripheral blood of AD patients in vitro.

Material and Methods: Patients with the AD (n=9) and psoriasis (n=6) and healthy subjects (n=6) were included in the study. Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) were isolated from 20 ml of venous blood of all participants. Cells were cultured for 72 hours in the absence and presence of DF-MSCs with anti-CD3/anti-CD28 or without stimulation. At the end of this period, Lymphocyte proliferation, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regulatory cell frequency, apoptosis by AnnexinV/7AAD, naive and memory CD4⁺ and CD8⁺T lymphocyte ratio, supernatant cytokine levels, GATA-3, Tbet and FoxP3 expressions of cultures cells were analyzed.

Results: The percentage of Fas (CD95), FasL (CD178) and TNFRII was significantly suppressed in the presence of DF-MKH in CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in AD and psoriasis patients (p <0,05). While the memory T cell ratio in both groups of patients was significantly decreased in the presence of DF-MKH and the Naive T cells increased significantly (p <0.05). CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ ratio was increased in the presence of DF-MKH in all patients' group. IL-17A, IL-6 and TNF- α levels were significantly suppressed in both groups (p <0.05). IFN- γ and IL-10 levels were significantly increased in the presence of DF-MKH in AD patients (p <0.05). T-bet expression increased in AD patients with DF-MKH (p <0.05).

Conclusion: DF-MSCs regulated Th2 responses in AD patients. Our results support that DF-MSCs could have a beneficial therapeutic implication for AD.

Key Words: Atopic Dermatitis, Mesenchymal Stem Cells, Immunoregulation, Psoriasis, Soluble factors.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

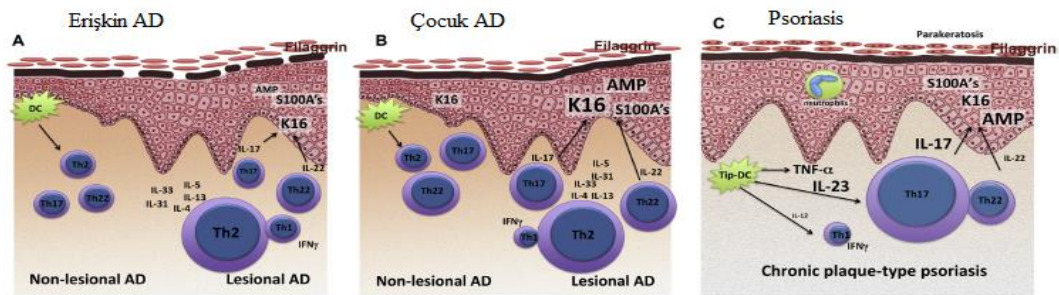
Atopik dermatit (AD) tekrarlayan, kronik inflamatuvar deri hastalığıdır ve solunum sistemi allerjileri ile ilişkilidir. AD’de astım ve alerjik rinitte olduğu gibi IL-4, IL-5, IL-13 ve IL-31 salgılayan lokal Th2 hücre infiltrasyonu olur. AD’li hastaların %50 sinden çoğu astım, %75’i alerjik rinit geliştirir (Hanifin ve Reed, 2007). AD’li hastalar alerjik tetikleyiciler kadar alerjik olmayan tetikleyiciler tarafından da aktive olur. AD’nin klinik olarak ortaya çıkışı yaşa göre üç şekilde görülür (Şekil 1). Bebeklik döneminde yanak ve saçlı deride başlar. Birkaç hafta sonra kaşıntı ve kabuklanma eklenir. Çocukluk süresince kıvrım yerlerinde, ensede ve ekstremitelerin dorsal kısımlarında oluşur. Adölesan ve erişkin yaşlarda boyun, baş ve fleksör kısımlarda likenifiye plaklar gelişir. Tüm evrelerde kaşıntı tüm gün boyunca geceleri artarak olur. Kaşıntı nedeniyle uyku kaybı ve bozuklukları ve buna bağlı olarak da yaşam kalitesi bozulur. AD okul ve iş kaybı, duygusal stres gibi morbidite sorunları yaratır (Bieber, 2010). AD, epidermal bariyer fonksiyonunun bozulması ile kuruyan deride, besin ve çevresel alerjenlere IgE aracılıklı duyarlılığın oluşmasıyla gelişen tekrarlayan kronik bir hastalıktır. Akut ekzamatöz plak ve yamaların histolojik özelliği epidermal hücreler arası ödem (spongiosis) ve dermiste perivasküler lenfosit, monosit, makrofaj, dendritik hücreler ve eozinofil infiltrasyonudur. Subakut ve kronik likenifikasyon ve ekskoriye plaklar epidermin kalınlaşması ve üst tabakanın hipertrofisi ile sonuçlanır (Czarnowicki ve ark., 2014; Brunner ve ark.; 2017).

Mezenkimal kök hücreler (MKH), multipotent yetişkin kök hücreleridir. MKH’ler kendilerini yenileyebilen, yağ dokusu, kemik, kıkırdak ve sinir hücreleri gibi hücre soylarına farklılaşabilme yeteneğindedirler. MKH’ ler yağ doku, kemik iliği, dental dokular gibi birçok dokudan izole edilebilmektedir. Uluslararası Hücresel Tedavi Birliği kriterlerine göre MKH’ ler yüzeylerinde kendilerine CD73, CD90, ve CD105 proteinleri ifade ederken hematopoietik belirteçler olan CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79, HLA-DR proteinlerini ifade etmezler (Machado ve ark., 2013)

Son yıllarda, MKH'lerin akut ve kronik hastalıklarda terapötik ajanlar olarak kullanımını konusunda yapılan çalışmalar dikkat çekmektedir. MKH'lerin inflamatuvar yanıtları baskılayıcı etki gösterdiği literatürde yer almaktadır. Hücre-hücre temasının ve kök hücreler tarafından salgılanan çözünabilir faktörlerin birlikte immün baskılamayı sağladıkları düşünülmektedir. MKH'ın IFN- γ , IL-1 β , TNF- α veya IL-4 gibi inflamatuvar sitokinlere yanıt olarak salgıladığı mediatörler (TGF- β ,IDO ve PGE2) ile inflamasyonda rol oynayan CD4⁺ T hücreleri Tregülatör hücre fenotipine dönüştürmektedir (Atoui ve Chiu, 2012).

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

Biz bu çalışma ile dental folikül mezenkimal kök hücrelerin ev tozu akarlarına duyarlı AD hastaların venöz kanından izole edilen periferik mononükleer hücreler üzerindeki immünomodülatör etkisini araştırmayı amaçladık. Bu amaç doğrultusunda dental folikül kaynaklı MKH'lerin AD hastalığının tedavisinde yeni bir seçenek olup olmayacağı hakkında bize fikir vermiş olacaktır, böylece çalışmamızın sonuçları literatüre önemli katkıda bulunacaktır.



Şekil 1. Erişkin ve çocuklarda Atopik Dermatit hastalığında immün yanıtların şematik gösterimi ve Psoriasis hastalığında immün yanıtlardan farkının gösterimi (Brunner ve ark., 2017)

4. GENEL BİLGİLER

4.1. İmmün Sistem

Bağıışıklık sistemi vücudu patojenler veya allerjenler gibi istilacı ajanlardan koruyan savunma sistemidir. Bu sistemde yabancı ajanların tanınması ve ortadan kaldırılması için gerekli çeşitli hücre ve moleküller bulunmaktadır. İmmün sistem, benzer özellikteki molekülleri birbirinden ayırabilir. Bu moleküller patojen organizmaların sahip olduğu karbohidrat veya protein yapılar olabilir. Birçok farklı çeşitlilikte ayırdedici yapılara sahip olan yabancı maddelere karşı immün sistemde farklı yanıtlar oluşturulur. Bu yanıtlarda patojenleri tanıyan ve onları etkisizleştiren bazı mekanizmalar gelişmiştir. İmmün sistem vücudun birçok bölümüne dağılmıştır. İmmün sistem içinde yer alan hücrelerin öncül hücreleri kemik iliğinde oluşur ve birçok prosesle işlenerek olgunlaşmaya kadar kemik iliğinde kalabilir veya vücudun farklı bölgelerine göç edip orada olgunlaşabilirler. İmmün sistem hücreleri, kendilerinin veya başka hücrelerin salgıladığı hormon benzeri çözünmüş moleküllerin etkisiyle gelişir, yanıt oluşturur veya baskılanır. Salgılanan peptid ya da protein yapıdaki bu moleküllere sitokin denir (Abbas ve ark., 2006).

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

İmmün sistem genel olarak doğal ve edinsel olarak ikiye ayrılır. Doğal immün yanıt; yabancı maddenin vücuda girmesiyle ilk bariyeri oluşturan, tanıyıp yıkıma uğratmak için organizmada hazır olarak bulunur. Edinsel immün yanıt ise doğal immün yanıtı takip eden ve patojenle karşılaşma sonrasında patojene ait antijene

spesifik olarak gelişen daha etkili yanıtlar oluşmaktadır. Doğal immün sistemi oluşturan hücreler fagositler olan nötrofiller ve makrofajlar, dendritik hücreler, doğal öldürücü hücrelerdir. Doğal immünitede yer alan diğer moleküller ise kan proteinleri ve kompleman sistemidir.

Edinsel immün yanıtta T ve B lenfositler rol oynamaktadır. T hücreleri hücre sel immüniteye, B hücreleri ise humoral immüniteye ait hücrelerdir. Hücre sel immün yanıtın hedefi vücuda giren antijenlerin sebep olduğu enfeksiyonları, ya da tümör hücrelerini yok ederek organizmayı korumaktır. Humoral immünitenin hücreleri B lenfositlerdir ve yabancı maddeye karşı plazma hücrelerine dönüşerek antikor üretirler. İmmünitenin bu tipi antijen antikor yanıtı üzerine kurulmuştur (Iwasaki ve Medzhitov, 2015).

4.1.1. Doğal İmmün Sistem

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

4.1.1.1. Epitel Tabaka

Organizmanın dış çevresinde bulunan mikroorganizmalar sağlam epitel yüzeyi kolaylıkla aşamamaktadır. Epitel yüzeyi aşabilen mikroplar ise yine epitel doku hücreleri tarafından üretilen antimikrobiyal maddelerle etkisiz hale getirilmektedir. Bu epitel yüzeyler; deri, sindirim, solunum ve ürogenital sistemlerinin mukozal yüzeyleri devamlı epitel hücreleri ile kaplıdır ve mikropların girişinin engellenmesi için bir bariyer oluşturmaktadır. Epitel yüzeyin bütünlüğünün bozulmasıyla vücut

enfeksiyon girişine müsait hale gelir. Ayrıca solunum ve sindirim kanalı gibi mukus mürin olarak adlandırılan glikoprotein yapıda bir madde içerir. Bu madde kayganlaştırıcı özelliğiyle mikropların bu kanallardan atılmasını kolaylaştırır. Bazı lökositler antimikrobiyal özellikte peptidler üretirler. Defensin ve katelisin olarak adlandırılan bu peptidler antimikrobiyal etki göstermektedir (Abbas ve ark., 2012).

4.1.1.2. Fagosit Hücreler

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

Monositler; kanda dolaşım halinde olan ve nötrofillerden sonra enfeksiyon bölgesine göç eden fagositik hücrelerdir. Kandan dokuya geçişinin ardından makrofajlara dönüşür ve mikroba karşı daha uzun süreli savunma oluşturur. Buldukları dokulara göre makrofajlar; kemik iliğinde osteoklast, karaciğerde kupffer hücreleri, merkezi sinir sisteminde mikroglialar, akciğerde alveolar makrofajlar olarak isimlendirilirler. Enfeksiyon bölgesinde mikrobu içine alan makrofajlar yine kendi içinde bulunan lizozom denilen enzim içerikli bir keseye birleşerek fagolizozomu oluşturur. Fagolizozom mikrobu enzimatik ve yıkıcı moleküller aracılığıyla parçalayarak yok eder. Makrofajlar T lenfositlere antijen sunumunun yanısıra, interlökin-1 (IL-1), interlökin (IL-6) ve tümör nekroz faktör- α (TNF- α) adı verilen sitokinler üretirler. Bu sitokinler proinflamatuvar sitokinler olarak adlandırılır ve hem doğal hem de edinsel immün aktiviteleri yönlendirirler (Zoroğlu ve ark., 2003). Makrofajlar antijen sunan hücreler olarak da adlandırılır. Bu hücreler yabancı maddeleri yakalar, parçalar ve ortaya çıkan mikrobiyal antijenleri T ve B lenfositlere sunar. Antijen sunumunu yüzeylerinde bulunan majör histokompatibilite kompleksi (MHC) ile gerçekleştirir. Bu, immün yanıtın başlaması için önemli bir ilk

adıdır (Saroj ve ark., 2012). Hücresel ve hümoral immün yanıtta lenfositler ve makrofajlar koordineli çalışırlar. İmmün sistemin bileşenleri tarafından uyarılan makrofajlar, IL-12, TNF- α , IL-6 ve IL-1 sitokinlerini salgılayarak fagositik hücrelerin aktivasyonunu, endotelde adezyonunun artışı ve bunların enfekte dokulara geçişini hızlandırır (Taylor ve ark., 2005). Makrofajlar immün yanıtın düzenlenmesinin yanısıra dokudaki ölü hücreleri yok etmede de önemli rol oynarlar. Bu makrofajlar genellikle süpürücü (scavenger) olarak adlandırılır.

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

4.1.1.3. Sitokinler

Doğal ve edinsel immünitede yer alan ve hücrelerin immün işlevini sağlayan çözünmüş moleküllere sitokin denir. Bu moleküller peptid yapıda olup lökositlerin büyüme ve farklılaşmasında, antijenlerin eliminasyonunda ve hematopoietik hücrelerinin gelişiminde rol oynar.

Sitokinler, solunum yollarındaki birçok inflamatuvar hücreyi inflamasyon alanına çağırıp, onları aktive ederek ve yaşamsallıklarını arttırarak AD'de ve Psoriasis'deki kronik inflamasyonun organizasyonunda anahtar rol alırlar. Sitokinler immün yanıtı düzenleme özelliklerine göre şu şekilde gruplandırılabilirler; 1-Proinflamatuvar sitokinler: İnflamasyonu arttıran ve sürekliliğini sağlayan sitokinlerdir, 2- Büyüme faktörleri: Hücrelerin hayatta kalmasını arttıran ve hava yollarında yapısal

değişikliklere neden olan sitokinlerdir, 3- Kemokinler: inflamatuvar hücreler için kemotaktik olan sitokinlerdir, 4- Antiinflamatuvar sitokinler: inflamatuvar yanıtı durduran ya da baskılayan sitokinlerdir. T yardımcı hücre 2 (Th2) lenfositler ve bu hücrelerden salgılanan sitokinlerinin AD patogenezinde anahtar rol oynadığı düşünülmektedir. AD patogenezinde immünolojik rol oynayan hücre eozinofildir, ancak inflamasyonunun gerçekleşmesi Th2 hücreler tarafından gerçekleştirir. T lenfositleri salgıladıkları sitokinlere göre Th1, Th2, Th17 gibi alt gruplara farklılaşabilir. Th1 hücreleri ağırlıklı olarak interferon-gamma (IFN- γ) sekrete ederken, Th2 hücreleri IL-4, IL-5 ve IL-13 sekrete etmektedir. AD dahil birçok alerjik hastalıkta Th 2 hücreleri baskın olup salgıladıkları sitokinlerle alerjik inflamasyonu gerçekleştirmektedir. Bu hücrelerden salgılanan IL-4 ve IL-13 insanlarda Ig E ve Ig G4 sentezini indükler; IL-5 ise eozinofil farklılaşma ve aktivasyonunu sağlar. Th2 hücrelerinden salınan sitokinler aynı zamanda hava yolu inflamasyonunun gelişmesine neden olan mekanizmaları harekete geçirirler (Failla ve ark., 2007).

4.1.2. Edinsel bağışıklık

İmmün sistemin kullandığı iki ana savunma sistemi vardır. Bunlardan birincisi ve yabancı maddenin vücuda girmesiyle başlayan doğal bağışıklıktır. Bunu takip eden ikinci savunma sistemi edinsel bağışıklıktır. Doğal immünitede yanıtlar kısa süreli ve non-spesifiktir. Edinsel immünitede ise yanıtlar daha uzun süreli, kalıcı (bellek hücreleri ile) ve spesifiktir. Doğal immünitede mikroorganizma ya da yabancı maddelerin ortak yapılarına aynı yanıtlar verilirken, edinsel bağışıklıkta antijene özgü yanıtlar verilir. Edinsel bağışıklığın iki çeşidi vardır. Birincisi aktive olan T lenfositlerin antijeni yok etmesine yönelik bağışıklıktır, buna hücre aracılı bağışıklık denir. İkincisi B lenfositlerin antijene karşı spesifik antikor üreterek gerçekleştirdiği bağışıklıktır, buna humoral bağışıklık denir (Alberts ve ark., 2008).

Edinsel bağışıklıkta yer alan T ve B lenfositlerin antijen yapısını tanınmasında farklılıklar vardır. T lenfositler küçük peptid yapıdaki antijenleri tanırken, B lenfositler daha büyük yapıdaki protein, lipid, karbonhidrat ve nükleik asit yapısındaki antijenleri tanır. Antijen sunucu hücreler tarafından işlenen ve açığa

çıkarılan antijen majör histokompatibilite kompleksi (MHC) ile hücre yüzeyinden T lenfositlere sunulur. T lenfositler MHC' ye bağlanmış olan antijeni yüzeyindeki t hücre reseptörü (TCR) ile tanır ve aktive olur. T lenfositler aktive olduğunda lenfoid organ içinde veya enfeksiyon bölgesine göç ederek etkili olmaktadır. Bundan farklı olarak, aktive olan B lenfositler buldukları yerden uzak mesafelerde de etkili olabilen antikoları üretirler (Hall ve Guyton, 2007).

T lenfositlere peptid antijeni sunan iki MHC sınıfı vardır bunlar sınıf I ve sınıf II MHC molekülleridir. Sınıf I MHC molekülünde T hücre eş reseptörü CD8' in bağlanma bölgesi bulunmaktadır. CD8⁺ T lenfositleri yalnızca CD8' in bağlanabileceği sınıf I MHC moleküllerinin gösterdiği peptid yapıdaki antijenlere yanıt verebilir. Sınıf II MHC moleküllerinde ise T hücre eş reseptörü CD4' e bağlanma bölgesi bulunur. CD4 sadece sınıf II MHC molekülerine bağlanabilir ve bu molekülle sunulan antijeni tanıyabilir. Sınıf I MHC molekülleri peptid yapıdaki antijenleri sitozolik yapıdaki proteinlerden edinirken, sınıf II MHC molekülleri peptid yapıdaki antijenleri hücre içi veziküllerde bulunan proteinlerden edinir (Yeşilyurt ve Fidan, 2011).

4.1.2.1. Hüморal ve Hücreyel İmmünite

Hüморal immünitede B lenfositler yer alır. Her bir B lenfosit antikorun bir türünü üretir ve antikor salgılayan hücrelere dönüşüp çoğalırlar. B lenfositlerin hareketiyle vücutta bir immünolojik bellek oluşur ve patojenlerle tekrarlayan karşılaşmalarında anında ve hızlı cevap verebilirler (Inman ve ark., 2014). Hüморal immün yanıtlar esnasında bellek hücreleri de oluşur ve bu hücreler kemik iliğine göç ederek orada bulunurlar ve aynı antijenle tekrarlayan karşılaşmalarında enfeksiyona karşı daha hızlı, erken ve etkili savunma sağlarlar (Abbas ve ark., 2012).

Lenfositler antijenlerle ilk maruz kalmada çoğunlukla IgM yapısında antikor sentezlerler ve bu primer immün yanıttır. Ancak aynı antijenlere bir sonraki karşılaşmasında verilen yanıt sekonder immün yanıttır ve primer immün yanıttan daha güçlü ve etkilidir. T hücre bağımlı antijenlere karşı hüморal immün yanıtlarda yüksek afiniteli IgA, IgE, IgG gibi antikolar da üretilir. Protein yapısındaki

antijenlerle tekrarlayan karşılaşmaları sonucunda antikorun afinitesi artar (Karsunky ve ark., 2008).

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

Hücrel immünitede rol oynayan hücre grubu T lenfositlerdir. T lenfositler kemik iliğinde oluşur ve timusta olgunlaşır. T lenfositler antijen ile ilk karşılaşmasından sonra aktive olurlar (Saroj ve ark., 2012). Efektör fonksiyonlarına göre T lenfositler kendi içinde alt gruplara ayrılırlar. Sitotoksik T lenfositler yüzeyinde CD8 molekülünü ifade ederler. CD8⁺ T lenfositin görevi hedef hücredeki ölüm yolaklarını aktive ederek yabancı antijen içeren bir hücreyi öldürmektir. Yardımcı T lenfositler yüzeylerinde CD4 ifade ederler ve aktive olduklarında spesifik sitokinler salgılayarak CD8⁺ T lenfositlerin, B lenfositlerin ve makrofajların aktivasyonuna yardımcı olurlar. Böylece hem doğal hem de edinsel immün yanıtlar arasında bir köprü görevi görür. CD4⁺ T lenfositlerinin bir alt grubu olan Treg' ler otoimmün yanıtı vücutu korur (Inman ve ark., 2014).

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

4.1.2.2. CD4⁺ T lenfositler

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

Th1 sitokin profili hücre içi patojenlere karşı korunmada esastır. Makrofajlardan salgılanan IL-12, naif CD4⁺ T hücrelerinin CD4⁺ Th1 yönünde farklılaşmasını uyarır. (Abbas ve ark., 2012). IFN- γ , IL-2 ve TNF- β salgılayan Th1 hücreleri makrofaj ve NK hücrelerini aktive ederek fagositoz veya öldürme yeteneklerini arttırmaktadır (Nelson, 2004). IFN- γ , Th1 hücreleri tarafından üretilen en önemli sitokinlerden biridir, makrofajları aktive eder ve B hücrelerde antikör izotiplerinin üretimini uyararak fagositozu aktifleştirir (Camcıoğlu ve Deniz, 2007).

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

T hücre çoğalması; belli bir peptid antijene yanıt veren naif T hücre sayısı azdır, patojenle baş edebilmek için çoğalma gerekir. TCR-peptid MHC kompleksi birleşimi

ve eş-uyaran reseptörü ile uyarım sonucunda klonal çoğalma gerçekleşir. TCR ve CD28 uyarımında ortaya çıkan ikincil sinyalle IL-2 üretimi gerçekleşir ve bu sitokin T hücre çoğalması için en önemli sitokindir. T hücre çoğalması esnasında salgılanan IL-2'nin yarattığı bir diğer sonuç ise bu sitokinin reseptörünün (IL-2R; CD25) T hücre yüzeyinde ifade edilmeye başlamasıdır. (Anderton ve Wraith, 2002).

4.1.2.3. CD8⁺ T lenfositler

CD8⁺ T lenfositler sitotoksik T hücreler (CTL) olarak da adlandırılır. CD8⁺ T lenfositler patojenle enfekte veya malign dönüşüme uğramış konak hücrelerini öldürür. CTL hücre ile hedef hücre arasında immünolojik sinaps benzeri yapı oluşur. CTL özelleşmiş granüller içerir ve bu granüllerini doğrudan hücre teması ile ortama salar. Bu granüller perforin, granzim ve granulozin gibi efektör proteinler içerir. Perforin hedef hücre membranında delikler açar ve granzimlerin geçişini kolaylaştırır. CTL IFN- γ , TNF- α ve IL-2 gibi sitokinleri üretir. IFN- α/β , viral replikasyonu baskılar ve MHC sınıf I ekspresyonunu artırır. CD8⁺ T lenfositler sınıf I MHC molekülü tarafından sunulan peptid yapıdaki antijenleri tanırlar (Hall ve Guyton, 2007).

4.1.2.4. CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regülatör Hücreler

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

gösterirler. Sekrete edilen bu sitokinler immün yanıtları baskılayıcı özelliindedir (Gallimore ve Godkin, 2008).

4.1.2.5. Antijen Sunucu Hücreler

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

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

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

DH’ler CD4⁺ ve CD8⁺ T lenfositleri aktive etmek için antijeni yakalar ve işleyip T lenfositlere sunar. Matürasyon aşamasında DH’ler periferik dokudan sekonder lenfoid yapılara doğru harekete başlar ve orada T hücreleri uyaran matür DH’lere

dönüşür. Matürasyon sürecinde MHC molekülleri endositik kompartmandan hücre yüzeyine doğru çıkmaya başlar; antijenlerin ve patojenlerin hücre içine alınımında selektif bir azalma ve T hücreleri için DH hücre yüzeyindeki ko-stimülatör moleküllerde bir artış izlenir (Lipscomb ve ark., 2007).

Genelde, bir kez olgunlaşan ve lenf düğümüne giren DH, T hücreye 10 saate kadar antijen sunma yeteneğine sahiptir. T hücre stimülasyonu gerçekleşince de DH'ler apoptotik ölüme uğrar ve böylece geliştirilen immün yanıt dengelenir. DH'ler fazla miktarda ko-stimülan moleküller taşıdığından 100-3000 kat kadar T lenfositini uyarabilir; bundan dolayı diğer ASH'lere göre 100 kat daha fazla antijen sunumu sağlayabilmektedir. DH'lerin yüzeylerinde bulunan CD58 (LFA-3), CD54 (ICAM-1), CD50 (ICAM-3), CD102 (ICAM-2), CD80 (B7- 1), CD86 (B7-2) gibi adezyon ve ko-stimülan moleküller ile T lenfositlerde bulunan CD2 ve CD28 gibi moleküller ilişkiye girerek primer immün yanıtın başlaması için gerekli sekonder sinyalleri oluşturur (Foti ve ark., 2006). DH'ler aynı zamanda IFN- α , IL-1, IL-6, IL-7, IL-12 ve IL-15 ifade ederek primer immün yanıtta etkili olur. DH'lerin IL-12 ile Th1; IL-10 ile Th2 sitokin yanıtını oluşturduğu gözlenmiştir. IL-12, IFN- γ ekspresyonunu artırıp T lenfositleri Th1 fenotipine yönlendirerek T ve doğal öldürücü (NK) hücrelerinin sitotoksik etkilerini artırır. IL-12 üretiminin IL-10, IFN- α , nitrik oksit, TGF- β gibi sitokinlerle inhibe olduğu görülmektedir. IL-10 ise ko-stimülan moleküllerin ekspresyonunu azaltıp IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α ve GM-CSF gibi inflamatuvar sitokinleri baskılayarak Th yanıtını Th2'ye yönlendirmekte, böylece DH matürasyonunu inhibe etmektedir (Yeşilyurt ve Fidan, 2011).

4.1.3. Apoptoz

Vücudumuzdaki her hücre belirli bir süre yaşar ve bu yaşam programlanmış hücre ölümüyle sonlanır. Hücre ölümüyle hücre çoğalması arasında kontrollü bir denge vardır. Hücre ölüm tiplerinden biri olan apoptoz hücrelerin kendilerini yok ettikleri, programlı, genlerle düzenlenen, enerjiye gereksinimi olan, homeostazın korunmasında görevli, bir olaydır. Apoptoz embriyonik dönemde, postnatal hayatta ve patolojik durumlarda gözlenebilir. Apoptoz hücrenin kendisini yok etmesi için metabolik ve fizyolojik işlevler ortaya koyduğu bir olaydır. Bir hücre apoptoz uyarısı

aldıktan sonra ortamdan uzaklaşır, diğer hücreler ile bağlantısını koparır ve büzüşmeye başlar. Hücre organelleri yapılarını korur. Hücre çekirdeği küçülür ve parçalara ayrılır. Hücre küçük parçalar halinde membranlı olarak apoptotik cisimciklere ayrılır. Bu apoptotik cisimcikler makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir (Bellamy ve ark., 1995; Ellis ve ark., 1991).

Apoptozun hücre döngüsünde ve hücre sayısı dengesinde önemli rolleri vardır. Postnatal hayatta apoptoz görülen olaylar; menstruasyon sırasında endometriyumun tabakasının dökülmesi, canlıyı dış etkenlerden koruyan deri tabakasının yenilenmesi sürecinde üst epitel hücrelerin apoptoza uğrayıp ölmesi, DNA hasarı olan hücrenin apoptozu hücre dengesinin korunması için gereklidir (Marti ve ark., 2001; Ford, 2001). Patolojik durumlarda da apoptoz diyabet, nörodejeneratif hastalıklar, bağışıklık hastalıkları, tümör oluşumu gibi olaylarda görülür (Kannan ve Jain, 2000).

Apoptozun düzenlenmesinde belirli moleküller, proteinler ve mitokondri rol oynar. Apoptoz sürecinde önemli rol oynayan Bcl-2 ailesi iki gruptan oluşur; anti-apoptotik ve pro-apoptotik üyeler. Anti-apoptotik üyeler, Bcl-2, Bcl-X_L ve Mcl-1' dir ve bunlar hücrede fazla ise hücre apoptoza daha az eğilimlidir (Bellamy ve ark., 1995). Bunlar mitokondri membranında dış kısımda yer alırlar ve hücrenin hayatta kalması için çalışırlar. Pro-apoptotik üyeler, Bad, Bax, Bid, BclXs' dir. Bunlar mitokondrinin membranı ile ilişki kurarak ve apoptoz indükleyici faktör (AIF) ve sitokrom-C nin salınmasını artırarak apoptozu indüklerler (Curtin ve Cotter, 2003).

Apoptozun indüklenmesinde P53 transkripsiyon faktörü görev alır. P53, hücrede DNA hasarı olduğunda hücre bölünmesini durdurup DNA' nın tamir edilmesi için zaman kazandırır. Hasar tamir edilemeyecek ise Bax ve Fas yapımını artırır Bcl-2 ve Bcl-xL'yi baskılayıp ve apoptozu indükler (Vousden ve Lu, 2002). İmmünsistemde hücre ölümünü Fas reseptörü kontrol eder. Bunlar sitotoksik 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 inaktif dirler fakat birbirlerini aktiveleştirirler ve hücrenin keseciklere ayrılmasına sebep olurlar (Adrain ve Martin, 2001; Spierings ve ark., 2004).

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

4.1.4. Atopik Dermatit

Atopik dermatit kronik, kaşıntılı inflamatuvar deri hastalığıdır. Atopik egzama atopik dermatitle ile eş anlamlıdır (Leung ve ark., 2007). AD yaşamın ilerleyen evrelerinde gelişecek olan diğer alerjik hastalıkların ilk belirtisi olabilir. AD'li hastaların %50'den fazlasında astım, yaklaşık %75'inde alerjik rinit gelişir (Spergel ve Paller, 2003). Lezyonlar yağlı deride, vücudun kıvrımlı yerlerinde, inguinal bez bölgesinde, aksillada, yüz ortasında olur ve saçlı deride yağlı skuamlı deriye yapışık iri plaklar halindedir (Hanifin ve Rajka, 1980). Kaşıntı AD'li hastanın yaşam kalitesini bozan en önemli semptomlardan biridir. Lezyonlar arttıkça kaşıntı artarak kısır bir döngü oluşur. Ayrıca, deride mekanik etki yaparak proinflamatuvar sitokinlerin salınımına yol açar. Nöropeptidler, proteazlar, kininler ve sitokinler kaşıntıyı tetikler. T hücrelerinden üretilen IL-31 adlı sitokin kaşıntı patogeneğinde ana faktör olduğu düşünülmektedir (Thomas, 2008)

AD'li hastaların duyarlaşmasında rol alan solunum yolu ile alınan alerjenler arasında ev tozu akarları, kedi köpek tüyü, hamam böceği, polenler ve küf mantarları yer almaktadır. AD'li hastaların doğal immunitelerinde defekt olduğu, bakteriyel, viral ve fungal infeksiyonlara duyarlılığın arttığı gösterilmiştir (Ong ve Boguniewicz, 2008).

AD prevalansı gelişmiş ülkelerde iki ya da üç kat artmıştır. Atopik hastalıklarda ki bu genel artış, batılı yaşam tarzı ve yaşamın erken dönemlerinde mikroorganizmalarla temasın az olması sonucu hijyen hipotezi ile büyük oranda açıklanabilmektedir. Hastaların %70-80'ini IgE aracılı duyarlılaşmanın olduğu ekstresek tip, %20-30'unu duyarlılaşmanın görülmediği intrensek tip oluşturur (Akdis ve ark., 2006). Atopik dermatit çocukluk döneminde %10-20, erişkin dönemde %1-3 oranında görülür. Erken başlangıçlı atopik dermatitte solunum alerjileri sık görülür (Boguniewicz ve Leung, 2009).

4.1.5. Psoriasis

Psoriasis derinin sık görülen, kronik, remisyon ve nükslerle seyreden inflamatuvar ve proliferatif bir hastalıktır. Psoriasis dünya nüfusunun %2-4'ünü etkileyen kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Hastalığın oluşumunda kalıtsal bir yatkınlık olduğu ve yaşam süresi içinde herhangi bir zamanda travma, infeksiyon, ilaç, stres gibi tetikleyici faktörlerle ortaya çıktığı düşünülmektedir. Patogenezi ise, üzerinde en çok çalışılan hastalıklardan biri olmasına rağmen henüz tam açıklık kazanmamıştır. Her ne kadar son 25 yılda hastalığın T hücre aracılı bir hastalık olduğu görüşü ağırlık kazanmışsa da günümüzdeki araştırmalar psoriasisin tek bir hücre grubu tarafından yönetilen bir hastalık olmadığını düşündürmektedir. Hastalığın, T hücreler, dentritik hücreler, makrofajlar, mast hücreleri, nötrofiller ve keratinositler arasındaki karmaşık ilişkiler sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir (Das ve ark., 2009).

4.1.6. Atopik Dermatit ve Psoriasis Patogenezi

AD gen ve çevre etkileşimlerinden kaynaklanan kompleks genetik bir hastalıktır. AD görülme sıklığı monozigot ikizlerde %77 iken, dizigot ikizlerde %15'tir. Patogenez de epidermal yapısal proteinler ve Th2 sitokin üretimine yol açan bağışıklık sistemin ana elemanlarında olmak üzere iki gen grubunda mutasyonlar vardır. Filaggrin derinin normal bariyer fonksiyonu için gerekli olan bir proteindir. Filaggrin gen kromozom 1q21'de lokalize olup, bu gendeki mutasyonlar erken başlangıçlı egzama ve egzama astımla ilişkilidir. Ayrıca, epidermis en üst katında bulunan farklı serin proteaz inhibitörü Kazal tip-5 genleri de aday genler olarak tanımlanmıştır (Boguniewicz ve Leung, 2009).

Akut AD lezyonlarında IL-4, IL-5, IL-13 artışının olduğu Th2 hücreler baskın olup, kronik lezyonlarda ise Th1 sitokin yanıtı baskın hale gelmektedir. AD'li hastalarda deride antimikrobial peptidlerin azalması S.aureus kolonizasyonunu artırır. Stafilokok kolonizasyonu, süperantijen gibi etki ederek sürekli T hücre aktivasyonuna ve proinflamatuvar sitokin salınımına yol açar. Bu da kortikosteroid direncine neden olarak inflamasyonun kronikleşmesine zemin hazırlamaktadır (Novak, 2009).

AD'li hastalarda yüksek serin proteaz aktivitesi gibi faktörler ile deride su kaybı artar ve hücre dışı boşlukta su tutan seramid düzeyi azalır ve sonuçta deri bariyer fonksiyonu bozulur. Böylece alerjen ve iritanların girişini kolaylaştıran hassas ve kuru bir derinin oluştuğu düşünülmektedir (Novak, 2009).

Psoriasis patogenezi üzerinde en çok durulan immün mekanizma T hücre aktivasyonudur. T hücreleri; tip 1 ve tip 2 sitokin üretme kapasitelerine göre iki ana grupta incelenebilir. Tip 1 sitokinler arasında interferon-gama (IFN- γ) ve tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α) yer alırken tip 2 sitokinler arasında ise interlökin (IL)-4 ve IL-5 yer alır. Tip 1 sitokin üreten T helper (Th) hücreleri temel olarak intraselüler mikrororganizmaların ve tümör hücrelerinin, tip 2 sitokin üreten Th hücreleri ise ekstraselüler mikroorganizmaların yok edilmesinde rol oynamaktadır. Psöriazis hastalarında lezyonlu deri bölgesinde ve periferik kanda tip 1 sitokin yapımının arttığı tespit edilmiştir (Mosmann ve Sad, 1996).

Psoriatik lezyonlarda bol miktarda dentritik hücre (DH) varlığı saptanmıştır. Bunlar Langerhans hücreleri, dermal dentrositler, plasmositoid ve myeloid dentritik hücrelerdir. Dentritik hücreler, hem psoriasisteki antijenin alınıp, işleminden geçirilip naif T-lenfositlerine sunumunu sağlar, hem de salgıladığı sitokinler aracılığıyla immün yanıtın ne yönde gelişeceğini yani T hücresinin hangi türe doğru polarize olacağını belirler. Bu nedenlerle DH'ler, immün yanıtın gerçekleşip gerçekleşmeyeceğini, gerçekleşecek ise de ne yönde gelişeceğini belirleyen anahtar rolündeki hücrelerdir (Türsen, 2010).

Psoriasis lezyonlarında stratum korneum altında nötrofil infiltrasyonu (Munro mikroapseleri) bulunmaktadır. Aktive keratinositlerden salınan IL8, Gro-a gibi

kemokinler ve alternatif kompleman yolağının aktivasyon ürünleri (C5a) psoriasisste nötrofil aktivasyonuna ve göçüne neden olan en önemli faktördür (Erkek, 2008).

Psoriasisste tutulan bölgelerdeki derinin karakteristik özelliklerinden biri hiperproliferasyondur. Proliferatif fazda olan hücre miktarı normalin iki katına çıkmıştır. Psoriasisli hastalarda lezyonlu bölgelerde daha yoğun olmak üzere hem lezyonlu hem de lezyonsuz deride kapillerlerde endotelial yarıklar gösterilmiştir. Psoriasisste üst dermal kapiller lupun vertikal uzantılarında anjiyogenez sonucu belirgin bir şekilde endotelial hücre proliferasyonu ve vasküler yatak genişlemeleri gözlenir (Das ve ark., 2009). Ayrıca endotel hücrelerinde inflamatuvar hücrelerin adezyonunda rol oynayan ICAM 1 ve E selektin ekspresyonu olduğu saptanmıştır. Endotel hücreler için güçlü mitojen olan VEGF'nün endotel hücrelerinde proliferasyona neden olduğu ve psoriasisste anjiyogenezin sürdürülmesinde rol oynadığı gösterilmiştir. Anjiyogenez ile kronik inflamasyonun birbirine bağımlı olduğu ve inflamasyonu kontrol edebilen ajanların anjiyogeneziside kontrol edebildiği bildirilmiştir (Barker, 1998).

4.1.7. Atopik Dermatit ve Psoriasis Hastalıklarında Güncel Tedavi Yaklaşımları

Topikal kortikosteroidler AD alevlenme dönemlerinde tedavide ilk seçenektir. Vazokonstriktör etkilerine göre en potent olanlar Sınıf 1, en zayıf etkililer Sınıf 7 olarak gruplandırılır. Losyon, merhem ve krem formları vardır. Yağ form preparatlar daha iyi absorbe olur ve krem formundan daha etkilidir. Saç ve kıllı bölgelere köpük veya losyonlar tercih edilmelidir. Orta potent olan topikal steroidlerin hastalığın aktif dönemlerinde günde bir ya da iki kez üç-yedi gün kadar kullanımı yeterlidir. Son çalışmalar aktif lezyonlu cilt bölgesine haftada iki kez topikal fluticason kullanımının alevlenmelerde etkili olduğunu desteklemektedir Topikal steroid ilaçların yan etkileri deri atrofisi, sitria, telenjiaktazi, akne, glokom, katarakt, hipofiz adrenal aks supresyonu, osteoporoz ve çocuklarda büyüme geriliğidir (Krakowski ve Eichenfield, 2008) Bunun yanı sıra nemlendirici, su tutucu preparatlar veya seramid içeren ürünler deri bariyerinin korunması ve tamirine yardımcı olmaktadır ve ılık banyo sonrası en azından günde iki kez uygulanır. Banyo ile cilt yüzeyindeki

alerjenlerde uzaklaştırılır ve deri bakteri kolonizasyonu azaltılır (Greer ve ark., 2008).

4.2. Kök Hücreler

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

4.2.1. Mezenkimal Kök Hücreler

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

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

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

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

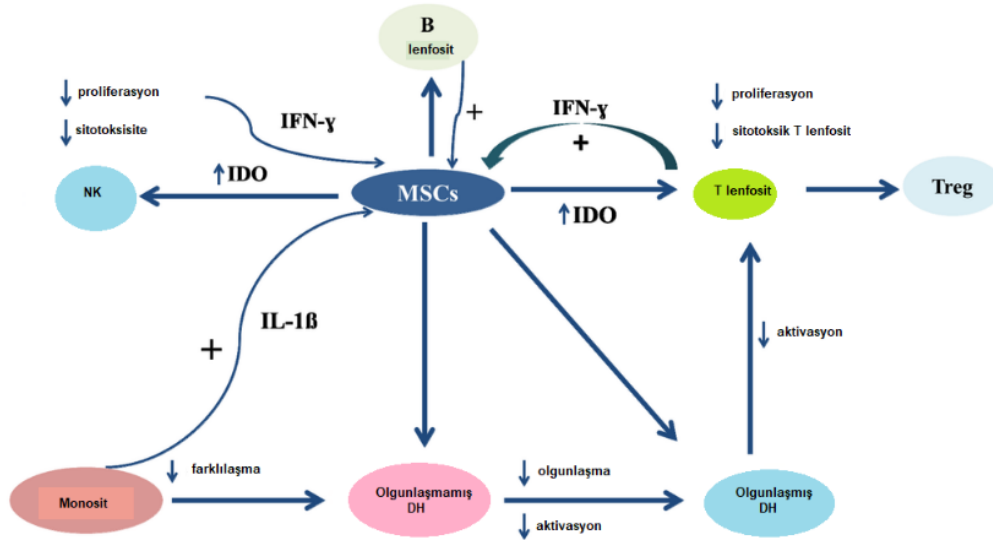
4.2.1.1. Diş Folikülü Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler (DF-MKH)

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

DF-MKH'ler yüzeylerinde kök hücre yüzey belirteçleri olan CD73, CD90, CD146, CD44, CD105 ifade ederler. Hematopoietik belirteçler olan CD14, CD34, CD45 ve HLA-DR'yi ifade etmezler. Farklılaşma potansiyelleri osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşmanın yanı sıra nöral farklılaşmayı da diğer birçok kök hücre grubuna göre daha iyi gerçekleştirmektedir. DF-MKH; transkripsiyon faktörleri olan RUNX2, NANOG, Nestin gibi embriyonik belirteçleri de ifade etmektedir (Hakki ve ark., 2015). Bu özellikleriyle birçok soya

farklılaşabilmeleri, canlılıklarının yüksek olması ve güvenilir şekilde dondurulmalarından dolayı doku rejenerasyonunda kullanılabilecekleri belirtilmiştir (Mori ve ark., 2012). Güncel çalışmalarda dental doku kaynaklı MKH'lerin inflamatuvar yanıtlarda baskılama özelliğinin kemik iliği MKH'lerinden daha fazla olduğu belirtilmektedir (Li ve ark., 2014). Literatürde dental doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin lenfositlerle birlikte kültürüyle yapılan karşılaştırmalı analizlerinde insan süt dişi, dental pulpa ve dental folikül kaynaklı mezenkimal kök hücreler arasında DF-MKH'lerin immünomodülasyonu en iyi gerçekleştiren hücre grubu olduğu belirtilmiştir (Yıldırım ve ark., 2016). (Şekil 2)

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



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

4.2.2. Mezenkimal Kök Hücreler ve İmmünomodülasyon

Mezenkimal kök hücreler inflamatuvar yanıtlar esnasında immün sistem hücreleri tarafından salgılanan sitokinlere (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ gibi) yanıt olarak anti-inflamatuvar mediatörler sekrete ederler. Bu mediatörlerin en önemlileri TGF- β , İndolamin 2,3-deoksijenaz (IDO), nitrik oksit (NO) ve prostaglandin E2 (PGE2)'dir. MKH' ler hücre döngüsünü G1 fazında durdurur bu şekilde T hücrelerin çoğalmasını inhibe eder. MKH' ler ve T hücrelerin birlikte kültüre edilmesiyle yapılan çalışmalarda MKH' lerin T lenfosit çoğalmasını baskıladığı gösterilmiştir (Tse ve ark., 2003). MKH' ler immün sistemde B lenfositlerin plazma hücresine dönüşmesini engellemektedir. Dendritik hücrelerin ve makrofajların kostimülasyon molekül ifadesini engelleyerek antijen sunumunu ve immün yanıtları engellemektedir (Ma ve ark., 2014). Yapılan birçok çalışmada MKH'lerin graft versus host hastalığı (GvHD), sistemik lupus erythematosus (SLE), Crohn hastalığı, ülseratif kolit ve otoinflamatuvar hastalıklarda MKH'lerin inflamasyonu baskılayıcı etkisi gösterilmiştir (Figuroa ve ark., 2012).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Klinik Araştırma Etik Kurulu' nun 04.03.2016 tarih ve 09.2016.196/70737436-050.06.04 sayılı izni ile onaylandı. Kök hücre izolasyonu için diş foliküllerinin temini Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Çene Cerrahisi Bölümü' nde gerçekleştirildi, kök hücre izolasyonu, immünolojik çalışmalar ve analizler Marmara Üniversitesi Hastanesi Çocuk Allerji ve İmmünoloji Laboratuvarı' nda gerçekleştirildi.

5.1. Çalışma Planının Özeti

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

Bu amaçla;

1. Dental Folikül dokusundan mezenkimal kök hücre izolasyonu yapıldı,
2. İzole edilen DF-MKH varlığında ve yokluğunda AD hastaları, Psoriasis hastaları ve sağlıklı bireylerin venöz kanından elde edilen periferik kan mononükleer hücrelerinde T lenfositlerin Th1 ve Th2 yönünde farklılaşması üzerindeki etkisi protein ekspresyon analizi western blot yöntemiyle ve sitokin profili akım sitometri yöntemiyle analiz edildi.
3. İzole edilen DF-MKH varlığında ve yokluğunda AD hastaları, Psoriasis hastaları ve sağlıklı bireylerin venöz kanından elde edilen periferik kan mononükleer hücrelerinde T lenfositlerin proliferasyon, Fas/Fas Ligand, TNFR1 ve Treg hücre oranları analiz edildi.
4. İzole edilen DF-MKH varlığında ve yokluğunda AD hastaları, Psoriasis hastaları ve sağlıklı bireylerin venöz kanından elde edilen periferik kan mononükleer hücrelerinde naive ve bellek T hücre oranları analiz edildi.

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

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

AD hastaları, Psoriasis hastaları ve sağlıklı bireyler Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Pediatrik Allerji ve İmmünoloji Kliniği ve Dermatoloji Kliniğine başvuran takipli hastalar arasından doktor kontrolünde seçilmiştir. Hastalardan venöz kan alımı için onam formları etik kurul gerekenlerine uygun şekilde açıklama yaparak onaylatıldı.

Diş folikül dokuları ise Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş Çene Cerrahi Anabilim Dalı polikliniklerinde basınç ağrısı, dişin pozisyonunun bozuk olması veya ortodontik sebepler ile başvuran 19-25 yaş arasında olan ve diş çekim endikasyonu uygun görülen 4 bireyden tam gömük yirmi yaş dişi çekimi sırasında alındı. Diş folikülü diş çekimi sonrasında 5 ml, steril %1 penisilin/streptomisin içeren fosfat tampon solüsyon (PBS) içinde 2 saat içerisinde laboratuvara ulaştırıldı.

5.2. Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar

- DPBS (Ca⁺⁺ Mg⁺⁺-free- Gibco, Grand Island, USA; 1419094)
- Penicillin/streptomycin (Gibco, Grand Island, USA; 15140122)
- DMEM (Gibco, Grand Island, USA; 31885023)
- RPMI (Gibco, Grand Island, USA; 21875034)
- Fötal sığır serumu (FBS; Gibco, Grand Island, USA; 10500064)
- Tip I kollajenaz (Gibco, Grand Island, USA; 17100017)
- %0,25 tripsin-EDTA solüsyonu (Gibco, Grand Island, USA; 25200056)
- %0,5 tripan mavisi solüsyonu (Gibco, Grand Island, USA; 15250061)

- DMSO (WAK-Chemie Medical GmbH, Germany; USP090522A)
- CFSE Cell Proliferation Kit for Flow Cytometry (Invitrogen, Grand Island, USA; C34554)
- PE Annexin V/7AAD Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences, USA; 559763)
- Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio-Sciences UK; 17144003)
- Anti CD3 (LiseSpan Biosciences, USA; 50867)
- Anti CD28 (Millipore, California; LV1700707)
- Fas antibody (Biolegend, Germany; 305605)
- Fas Ligand antibody (Biolegend, Germany; 306406)
- Anti-TNFR1 (Biolegend, Germany; 113005)
- Anti-TNFR2 (Biolegend, Germany; 358404)
- Anti-hTGF- β -IgA rekombinant nötralizirajući edici antikor (Invivogen, USA; maba-htgfb-3)
- 1-Methyl-D-tryptophan (Santa Cruz Biotechnology, USA; 110117-83-4)
- SC-58125 (Cayman Chemical, USA; 162054-19-5) 1
- CD45 FITC/CD34 PE (BD Biosciences, USA; 344563)
- CD90 PE (BD Biosciences, USA; 562385)
- CD146 FITC (BD Biosciences, USA; 560846)
- CD73 PE (BD Biosciences, USA; 550257)
- CD29 APC (BD Biosciences, USA; 559883)
- CD105 PE (BD Biosciences, USA; 560839)
- CD28 PE (BD Biosciences, USA; 562323)
- CD14 PE (BD Biosciences, USA; 342408)

- CD3/CD4/CD8 (BD Biosciences, USA; 342414)
- CD45RA (BD Biosciences, USA; 340571)
- 10x Phosphate Buffered Saline (PBS), 1L (Bio-Rad; 1610780)
- BD cytometric bead array (CBA) human Th1/Th2/Th17 Kit (BD Biosciences, USA; 560484)
- Human FoxP3 Buffer Set (BD Biosciences, USA; 560098)
- Human FoxP3 PE (BD Biosciences, USA; 560046)
- APC mouse anti-human CD25 (BD Biosciences, USA; 555434)
- FITC mouse anti-human CD4 (BD Biosciences, USA; 555346)
- Hücre yıkama solüsyonu (Cell Wash, BD Biosciences, USA; 349524)
- Osteojenik Farklılaşma Kiti (Mesencult Human Osteojenik Differentiation Kit) (Stemcell Technologies, USA; 05465)
- Adipojenik Farklılaşma Kiti (Mesencult Human Adipogenesis Differentiation Kit) (Stemcell Technologies, USA; 05412)
- Kondrojenik Farklılaşma Kiti (Mesencult Human Chondrogenesis Differentiation Kit) (Stemcell Technologies, USA; 05455)
- Oil red O (Sigma-Aldrich, USA; O0625-100G)
- Alizarin Red (Sigma-Aldrich, USA; A5533-25G)
- Alcian Blue (Sigma-Aldrich, USA; A5268-10G)
- RIPA Protein İzolasyon Kiti (Santa Cruz Biotechnology, USA; SC-24948)
- Anti-GATA3 antibody (Abcam, USA; ab106625)
- Anti-T-bet / Tbx21 antibody [4B10] (Abcam, USA; ab91109)
- Anti-FOXP3 antibody (Abcam, USA; ab54501)

- Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP) (Abcam, USA; ab6789)
- Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) (Abcam, USA; ab205718)
- Tris-Buffer Saline (10X) TBS
- Süt tozu (Blotting-Grade Blocker) (BioRad, USA; 1706404)
- Protein ölçüm kiti (Qubit® Protein Assay Kit, 100 Assays) (Thermofisher, USA; Q33211)
- Protein ölçüm tüpleri (Qubit® Assay Tubes) (Thermofisher, USA; Q32856)
- Elektroforez jeli (Bolt™ 4-12% Bis-Tris Plus Gels, 10-well) (Thermofisher, USA; NW04120BOX)
- Elektroforez yürütme tampon solüsyonu (20X Bolt® MES SDS Running Buffer) (Thermofisher, USA; B0002)
- Laemli tampon solüsyonu (4X Bolt® LDS Sample Buffer) (Thermofisher, USA; B0007)
- 10X Bolt® Sample Reducing Agent (Thermofisher, USA; B0009)
- Protein standart (MagicMark™ XP Western Protein Standard) (Thermofisher, USA; LC5602)
- Nitroselüloz transfer kâğıdı (iBlot® 2 Transfer Stacks, nitrocellulose) (Thermofisher, USA; IB23001)
- Kemoluminisan görüntüleme için solüsyon kiti (Novex® ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit) (Thermofisher, USA; WP20005)

5.3. Çalışmada Kullanılan Hücre Kültürü Malzemeleri

- Steril pensler ve bistüri uçları
- 0,22 µm filtre (Sartorius, Goettingen, Germany; 16534)
- Heparinli kan alma tüpü (Yeşil kapaklı) (Hongyu Medical, China; 131211)

- EDTA'lı kan alma tüpü (Mor kapaklı)
- 15 ml konik, kapaklı tüp (BD Biosciences Discovery Labware, CT, USA; 352096)
- 50 ml konik, kapaklı tüp (BD Biosciences Discovery Labware, CT, USA; 352098)
- 25cm²' lik hücre kültür flaskları (BD Biosciences Labware, Le Pont De Claix, France; 353108)
- 75cm²' lik hücre kültür flaskları (BD Biosciences Labware, Le Pont De Claix, France; 353110)
- 6 kuyucuklu plaklar (BD Biosciences Discovery Labware, USA; 353046)
- 48 kuyucuklu plaklar (Nest Biotech, China, 20140010415A)
- 5 ml Polystyrene tube (BD Biosciences, USA; 352052)
- Tip I kollajen kaplı lameller (BD Biosciences Discovery Labware, USA; 354089)
- 3 ml' lik steril pastör pipeti (Citotest Labware Manufacturing, London; 31027003US)
- 3' er ml' lik vial (Kriyotüp) (Granier Bio-One GmbH; E090901J)
- Şarjlı pipet pompası (IsoLab, Germany)
- 2 µl- 20 µl' lik otomatik pipet (Axygen Scientific, USA)
- 20 µl-200 µl' lik otomatik pipet (Axygen Scientific, USA)
- 100 µl- 1000 µl' lik otomatik pipet (Axygen Scientific, USA)
- Thoma lamı (Marienfeld, Germany; 06.407.10)
- Lamel (22x22mm)
- Buz kalıpları

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

5.4. Kullanılan Cihazlar

<u>Cihaz</u>	<u>Marka</u>	<u>Model</u>
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 Terazı	Chyo	JL-200
Mikropipet Seti	Thermo	
Vorteks	Yellow line	TTS 2
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Janke&Kunkelik	
Rotator	a	IKAMAG RH
Su Banyosu	Miltenyi Biotec	MACSmix
Akan Hücre Ölçer	Techne	TE-10A DIKLM
Işık Mikroskobu	BD	FACS Calibur
Western Blot Cihazı	Olympus	BX53
Protein konsantrasyon ölçer (Florometre)	Thermofisher	iBlot IB21001
	Lifetechnologies	Qubit 2.0 Q32866

5.5. Kullanılan solüsyonların hazırlanması

5.5.1. DF-MKH' ler için besiyerinin hazırlanması

Diş foliküllerinden mezenkimal kök hücre izolasyonu için %10 oranında FBS ve %1 oranında Penicillin/ streptomisin ilave edilen DMEM besiyeri kullanıldı. Bu

solüsyon cDMEM olarak isimlendirildi. Her alt kültür işleminde ve hücreleri çoğaltma sürecinde bu besiyeri taze olarak hazırlanarak kullanıldı.

5.5.2. Lenfosit Kültürleri için besiyerinin hazırlanması

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

5.5.3. Kök hücre dondurma solüsyonunun hazırlanması

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

5.5.4. PBS solüsyonunun hazırlanması

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

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

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

5.5.6. Kollajenaz solüsyonunun hazırlanması

Kollajenaz Tip I solüsyonu; 4 ml PBS içine 12 mg (3 mg/ml) kollajenaz Tip I tartılarak eklendi ve 0,22 µm' lik filtre ile filtreden geçirildikten sonra steril olarak 37°C inkübatörde 10 dakika bekletildikten sonra kullanıldı. Her 8 mg doku için 4 ml kollajenaz tip I solüsyonu kullanıldı ve enzimatik yıkım işlemleri için taze olarak hazırlandı.

5.5.7. RIPA protein izolasyon solüsyonunun hazırlanması

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

5.5.8. Protein miktarı ölçüm solüsyonunun ve standartların hazırlanması

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

5.5.9. Osteojenik stimülasyon besiyerinin hazırlanması

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

5.5.10. Kondrojenik stimölasyon besiyerinin hazırlanması

Kondrojenik stimölasyon kitinin üretici talimatına göre 200 mL bazal besiyeri ile 50 mL kondrojenik farklılaşma solüsyonu karıştırıldı. Bu solüsyon +4°C'de 1 ay süre içinde kullanılabilir.

5.5.11. Adipojenik stimölasyon besiyerinin hazırlanması

Adipojenik stimölasyon kitinin üretici talimatına göre 200 mL bazal besiyeri ile 50 mL adipojenik farklılaşma solüsyonu karıştırıldı. Bu solüsyon +4°C'de 1 ay süre içinde kullanılabilir.

5.5.12. Lizat solüsyonunun hazırlanması

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

5.5.13. Alizarin red solüsyonunun hazırlanması

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

5.5.16. Oil red O solüsyonunun hazırlanması

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

5.5.14. Alcian blue solüsyonunun hazırlanması

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

5.5.15. TBST solüsyonunun hazırlanması

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

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

5.6. Çalışma Planı

5.6.1. Diş folikülü kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu

5.6.2. İzole edilen hücrelerin pasajlanması

5.6.3. İzole edilen kök hücrelerin karakterizasyonu

5.6.4. İzole edilen kök hücrelerin farklılaştırılması

5.6.4.1. İzole edilen kök hücrelerin osteojenik farklılaştırılması

5.6.4.2. İzole edilen kök hücrelerin adipojenik farklılaştırılması

5.6.4.3. İzole edilen kök hücrelerin kondrojenik farklılaştırılması

5.6.5. Kök hücrelerin 48 kuyucuklu kültür plaklarına ekilmesi

5.6.6. Mononükleer hücre kültürlerinin yapılması

5.6.6.1. AD hastası, Psoriasis hastası ve sağlıklı bireylerin seçimi

5.6.6.2. AD hastası, Psoriasis hastası ve sağlıklı bireylerden alınan venöz kandan mononükleer hücre izolasyonu yapılması

5.6.6.3. Lenfositlerin proliferasyon analizi için CFSE ile işaretlenmesi

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

5.6.7. Analizler

5.6.7.1. Lenfositlerin proliferasyon analizi

5.6.7.2. Lenfositlerin CD4+CD25+FoxP3+ Tregülatör hücre analizi

5.6.7.3. Lenfositlerin Annexin/7AAD ile apoptoz analizi

5.6.7.4. Lenfositlerin Fas/Fas Ligand analizi

5.6.7.5. Lenfositlerin TNFR1 ve TNFR2 analizi

5.6.7.6. Naive ve bellek T hücre oranlarının analizi

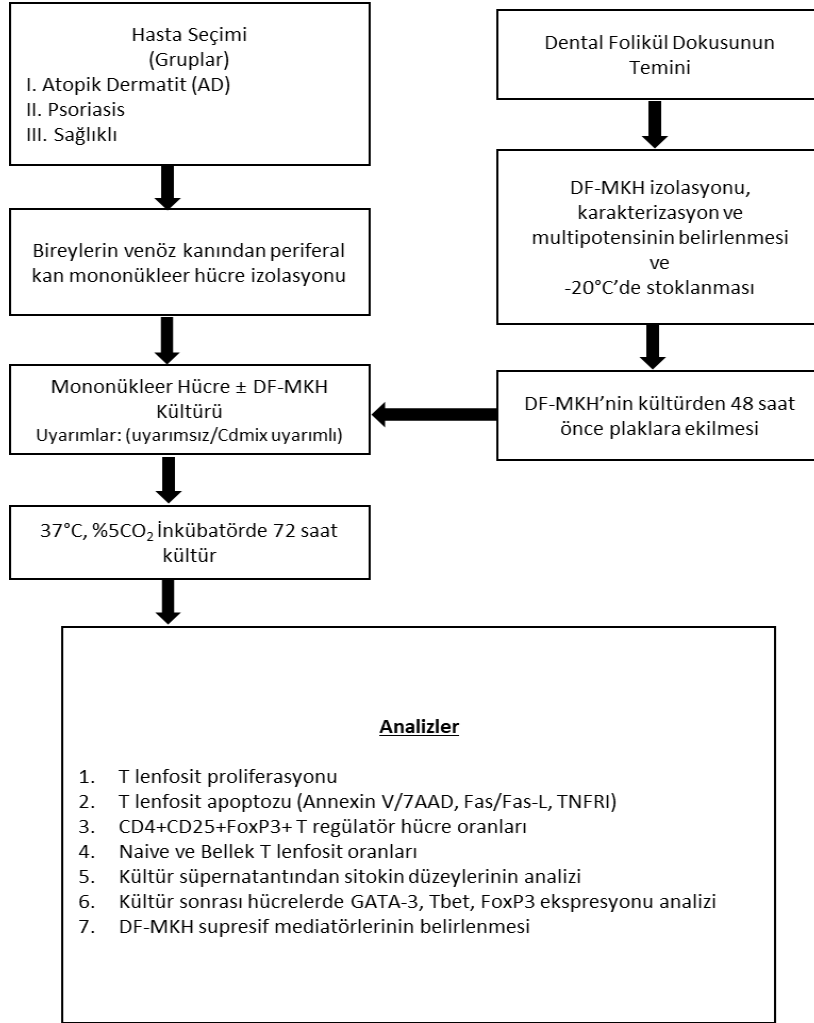
5.6.7.7. Hücre kültür süpernatantlarında sitokin tayini

5.6.7.8. Protein ekspresyon (Western blot) analizi

5.6.7.9. DF-MKH immün düzenleyici moleküllerin nötralizasyon analizi

5.6.8. İstatistiksel analiz

CALIŖMA PLANI



Ŗekil 3. Çalışma planının Ŗematik gösterimi

5.6.1. DiŖ folikülü kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu

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

Tam gömük yirmi yaŖ diŖi çekim işlemi ile alınan diŖi saran folikül dokusu %1 penisilin/streptomisin içeren PBS ile yıkanıp doku üstündeki kan ve diŖ parçaları temizlendi. Folikül doku bistüri ile 0,5 mm ve daha küçük parçalara bölündü. Parçalanan folikül dokusu yaklaşık 80 mg doku için 15 ml falkon tüpte bulunan 37°C

sıcaklığa ısıtılmış 4 ml'lik kollajenaz tip I solüsyonu içinde aktarıldı ve pastor pipetiyle homojenize edildi. Doku ve kollajenaz solüsyonunu içeren falkon tüp 37°C inkübatörde 45 dk bekletildi. Her 5-10 dk aralıkla tüp yavaşça çalkalanarak enzimatik yıkımın kolaylaşması sağlandı. Folikül dokusu enzimatik yıkımın ardından hücre süspansiyonu haline geldiğinde inkübatörden alınıp pipetaj işlemi yapıldı. Folikül hücreleri PBS ile yıkanıp 1200 rpm' de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler tekrar PBS ile yıkanıp 1200 rpm' de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler 5 ml cDMEM besiyeri ile tekrar süspansiyon edilip filtreli kapaklı 25 cm²' lik flakslara (T-25) transfer edilip 37°C, %5 CO² inkübatörde kültür edildi.

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

5.6.2. İzole edilen hücrelerin pasajlanması

T-25 flakslar içerisinde ilk kültürü yapılan ve 37°C, %5 CO² inkübatörde bulunan hücreler her 2-3 günde bir invert mikroskopta hücre yayılımı için incelendi. Yaklaşık 7-10 gün sonrasında hücreler flask tabanında yaklaşık %70-80 yayılım gösterdiğinde pasaj işlemi yapıldı. Dokudan elde edilen ilk kültür sıfıncı pasaj (P0) kabul edilerek, birinci kültürü takip eden her kültür işlemi sonrası pasaj sayıları P1, P2, P3 şeklinde belirtildi.

Pasaj işlemi; laminar hava akımlı aseptik kabin içerisinde flakslardaki hücre medyumunu pipet yardımıyla uzaklaştırıldı ve flakslara 5 ml PBS konulup flask tabanı bu solüsyonla yıkandı. PBS pipetle flask tabanından çekilip atıldıktan sonra 500 µl %0,25 Tripsin-EDTA eklendi ve 37°C inkübatörde 4 dakika bekletildi. 4 dakikanın sonunda flask içindeki tripsinin inaktivasyonu için 5 ml cDMEM eklenip flask içerisindeki sıvı 15 ml'lik konik kapaklı tüplere aktarıldı. 1200 rpm' de 5 dk santrifüj yapıldı, santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler tekrar cDMEM ile yıkanıp, santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve 1 ml cDMEM eklenip pipetajla hücre süspansiyonu haline getirildi. Hücre

süspansiyonundan 10µl alınıp 0,5 ml'lik ependof tüpe aktarıldı ve üzerine 10µl tripan mavisi solüsyonu eklendi. Homojenizasyon sağlandıktan sonra hücre sayımı yapıldı.

Hücre sayımı için thoma lamı kullanıldı. Thoma lamı düz bir zemin üzerine alınarak sayım yapılacak alan üzerine lamel kapatıldı. Hazırlanıp eppendorfa konulan süspansiyondan 10 µl alınarak thoma lamının sayım yapılacak alanına pipet ile yavaşça hücre süspansiyonu pipetlendi. Hücreler ışık mikroskobunda, 40X büyütmede sayıldı.

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

Hücre sayımının ardından 5×10^5 hücre 10 ml cDMEM ile süspanse edilerek 75 cm²' lik flaslara (T-75) ekilip 37°C'de %5 CO₂ inkübatörde kültüre edildi. Her 2-3 günde bir hücre besiyeri taze hazırlanarak değiştirildi. Kültür flaskının tabanında %70-80 yayılım gösteren hücreler tekrar pasaj alınmak üzere yukarıda belirtilen işlemler sırasıyla gerçekleştirildi. Hücre kültürü üçüncü pasaja kadar devam edildi.

5.6.3. İzole edilen kök hücrelerin karakterizasyonu

İzole edilen ve pasajlanarak çoğaltılan hücrelerin morfolojisi invert mikroskopta incelendi. Fibroblast benzeri yapıda olan ve flask tabanına yapışan hücreler üçüncü pasaj sonunda flask tabanından cDMEM besiyeri tamamen çekilip atıldı. Flask tabanına 5 ml PBS solüsyonu eklendi, yıkama işleminden sonra solüsyonun tamamı çekilip atıldı. Flask tabanına %0,25 tripsin-EDTA solüsyonu eklenip 37°C inkübatörde 4 dakika bekletildi. 4 dakikanın sonunda flask içindeki tripsinin inaktivasyonu için 5 ml cDMEM eklenip flask içerisindeki sıvı 15 ml'lik konik kapaklı tüplere aktarıldı. 1200 rpm' de 5 dk santrifüj yapıldı, santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler 1000 µl PBS ile süspanse edilip bu süspansiyondan 3 adet akım sitometri tüpünün herbirine 100 µl immünfenotipleme analizi için aktarıldı. Akım sitometri tüpünde bulunan PBS içindeki hücre süspansiyonu santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve dipte kalan hücreler 100 µl PBS ile süspanse edilip her bir tüpe belirlenen antikolar

eklendi. Birinci tüp Ig izotip antikorunun bulunduğu tüp olarak belirlendi, ikinci tüpteki hücre süspansiyonuna kök hücre pozitif belirteçlerin analizi için anti-CD73 (PE), anti-CD90 (FITC), anti-CD105 (PerCp) ve anti-CD146 (APC) antikorlarının herbirinden 10 µl eklendi, üçüncü tüpe kök hücreler için negatif belirteçlerin analizi için anti-CD45 (PerCp), anti-CD14 (FITC), anti-CD34 (PE) ve anti-HLA-DR (APC) antikorlarının herbirinden 10 µl eklenerek tüpler 15 dk oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda hücrelerin üzerine 1000 µl PBS eklenerek 1500 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Süpernatant atıldı, dipte kalan hücreler 500 µl PBS ile tekrar süspansiyon edilip immünofenotipik özelliklerinin belirlenmesi için akım sitometri cihazında yüzey belirteçleri analiz edildi. Hücre yüzeyinde kök hücre belirteçlerinin pozitiflik oranı %95'in üzerinde olan ve negatiflik oranı %5'in altında olan hücre gruplarından 1 milyon hücre ayrılarak farklılaşma kapasitelerinin belirlenmesi için osteojenik adipojenik ve kondrojenik olarak farklılaştırıldı.

5.6.4. İzole edilen kök hücrelerin farklılaştırılması

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

5.6.4.1. İzole edilen kök hücrelerin osteojenik farklılaştırılması

Osteojenik farklılaşma için 6 kuyucuklu plakların herbir kuyusuna tip I kollajen kaplı steril lameller yerleştirildi. Tip I kollajen kaplı lamellerin herbirinin üzerine üçüncü pasajdaki 2×10^5 hücre ekildi. Hücrelerin üzerlerine ilk ekim yapılan gün cDMEM besiyeri eklendi ve 48 saat süreyle lamel yüzeyine yayılması sağlandı. 48 saat sonunda lamel yüzeyinde %90-100 yayılıma ulaşan hücrelerin üzerindeki kültür sıvısı çekilip atıldı ve üzerine 2 ml osteojenik farklılaştırma besiyeri eklendi ve 37°C %5 CO₂ inkübatörde 2 gün arayla besiyerleri değiştirilerek 21 gün süreyle kültüre edildi. 21 gün sonunda hücreler ve oluşturdukları kolonilerin osteojenik farklılaşmayı sağlayıp sağlamadıkları invert mikroskopta değerlendirildi. Osteojenik farklılaşmanın belirlenmesi için lamele yapışan hücreler Alizarin kırmızısı

solüsyonuyla boyanarak mikroskopta incelendi. Bunun için önce lamele yapışan hücrelerin üzerinden kültür besiyeri çekilip üzerine PBS solüsyonu eklenerek yıkama işlemi yapıldı. PBS atıldı ve lamele yapışan hücrelerin üzerine 1000 µl %10 formaldehit solüsyonu eklendi. 30 dk %10 formaldehit ile fikse edilen hücreler süre sonunda önce 1000 µl distile suyla yıkandı, distile su atıldı ve üzerine 1000 µl PBS eklendi. PBS ile yıkama işleminin ardından PBS uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine 1000 µl Alizarin kırmızısı boyası eklendi ve 45 dk. oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi. 45 dakika sonra boya hücrelerin üzerinden uzaklaştırıldı ve distile su ile iki kez yıkandı. Lamel kültür kuyusundan alınarak lam üzerine kapatıldı ve ışık mikroskobunda 10X ve 20X büyütmede doku bütünlüğü, kalsiyum fosfat birikimlerinin varlığı incelendi.

5.6.4.2. İzole edilen kök hücrelerin adipojenik farklılaştırılması

Adipojenik farklılaşma için 6 kuyucuklu plakların herbir kuyusuna tip I kollajen kaplı steril lameller yerleştirildi. Tip I kollajen kaplı lamellerin herbirinin üzerine üçüncü pasajdaki 2×10^5 hücre ekildi. Hücrelerin üzerlerine ilk ekim yapılan gün cDMEM besiyeri eklendi ve 48 saat süreyle lamel yüzeyine yayılması sağlandı. 48 saat sonunda lamel yüzeyinde %90-100 yayılıma ulaşan hücrelerin üzerindeki kültür sıvısı çekilip atıldı ve üzerine 2 ml adipojenik farklılaştırma besiyeri eklendi ve 37°C %5 CO₂ inkübatörde 2 gün arayla besiyerleri değiştirilerek 14-21 gün süreyle kültüre edildi. Kültür süresinin sonunda hücrelerdeki adipositlerin ve kolonilerin oluşumu invert mikroskopta değerlendirildi. Adipojenik farklılaşmanın belirlenmesi için lamele yapışan hücrelerde yağ damlalarını boyayan Oil kırmızı solüsyonuyla boyanarak mikroskopta incelendi. Bunun için önce lamele yapışan hücrelerin üzerinden kültür besiyeri çekilip üzerine PBS solüsyonu eklenerek yıkama işlemi yapıldı. PBS atıldı ve lamele yapışan hücrelerin üzerine 1000 µl %10 formaldehit solüsyonu eklendi. 30 dk %10 formaldehit ile fikse edilen hücreler süre sonunda önce 1000 µl distile suyla yıkandı, distile su atıldı ve üzerine 1000 µl PBS eklendi. PBS ile yıkama işleminin ardından PBS uzaklaştırıldı. Kuyulara 1000 µl %60' lık izopropanol eklendi ve 5 dakika boyunca inkübe edildi. İzopropanol kuyulardan alındı ve kuyulara 1000 ml "Oil red O" solüsyonu eklendi. Karanlıkta oda sıcaklığında 45 dakika boyunca inkübe edildikten sonra Oil red O yüzeyden

arındırıldı ve kuyular distile su ile 2 defa yıkandı. Kuyucuklara hemotoxyciline konuldu ve 1 dakika inkübe edildikten sonra kuyular 2 defa distile su ile yıkandı. Kuyulardaki lameller lamlar üzerine alınarak hücrelerde oluşan yağ damlaları ışık mikroskobunda incelendi. Yağ damlaları açık kırmızı renkte gözlemlendi.

5.6.4.3. İzole edilen kök hücrelerin kondrojenik farklılaştırılması

Kondrojenik farklılaşma için 6 kuyucuklu plakların herbir kuyusuna tip I kollajen kaplı steril lameller yerleştirildi. Tip I kollajen kaplı lamellerin herbirinin üzerine üçüncü pasajdaki 2×10^5 hücre ekildi. Hücrelerin üzerlerine ilk ekim yapılan gün cDMEM besiyeri eklendi ve 48 saat süreyle lamel yüzeyine yayılması sağlandı. 48 saat sonunda lamel yüzeyinde %90-100 yayılıma ulaşan hücrelerin üzerindeki kültür sıvısı çekilip atıldı ve üzerine 2 ml kondrojenik farklılaştırma besiyeri eklendi ve 37°C %5 CO_2 inkübatörde 2 gün arayla besiyerleri değiştirilerek 21 gün süreyle kültüre edildi. Kültür süresinin sonunda hücrelerdeki kondrosit kolonilerinin oluşumu invert mikroskopta değerlendirildi. Kondrojenik farklılaşmanın belirlenmesi için lamele yapışan hücrelerde kondrositleri boyayan Alcian mavisi solüsyonuyla boyanarak mikroskopta incelendi. Bunun için önce lamele yapışan hücrelerin üzerinden kültür besiyeri çekilip üzerine PBS solüsyonu eklenerek yıkama işlemi yapıldı. PBS atıldı ve lamele yapışan hücrelerin üzerine 1000 μl %10 formaldehit solüsyonu eklendi. 30 dk %10 formaldehit ile fikse edilen hücreler süre sonunda önce 1000 μl distile suyla yıkandı, distile su atıldı ve üzerine 1000 μl PBS eklendi. PBS ile yıkama işleminin ardından PBS uzaklaştırıldı. Kuyulara 1200 μl etil alkol ve 800 μl asetik asit karışımı eklendi, 15 dakika boyunca bekletildi ve 15 dakikanın sonunda kuyular 2 defa PBS solüsyonuyla yıkandı. Kuyulardaki lameller lamlar üzerine kapatılarak kondrositler ve hücrelerarasında proteoglikanların oluşumu ışık mikroskobunda incelendi. Kondrositlerin hücre çekirdeği ve proteoglikanlar koyu mavi renkte incelendi. Kartilaj oluşumu ise matriks şekillenmesi olarak gözlemlendi.

5.6.5. Kök hücrelerin 48 kuyucuklu kültür plaklarına ekilmesi

DF-MKH'lerin AD hastalarının kan mononükleer hücreleri üzerindeki immünolojik etkilerinin incelenmesi amacıyla birlikte kültürleri (ko-kültür) yapıldı.

Ko-kültür çalışması için mononükleer hücrelerin izolasyonundan 48 saat önce DF-MKH'ler kültür kuyularına ekilerek kuyu tabanına yapışması sağlandı.

5.6.6. Mononükleer hücre kültürlerinin yapılması

5.6.6.1. AD hastası, Psoriasis hastası ve sağlıklı bireylerin seçimi

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

I. AD hastalarının çalışmaya dâhil edilme ve dışlanma kriterleri

Çalışmaya dâhil edilme kriterleri

- Atopik dermatit için Hanfifin-Rajka kriterlerine göre tanı almış, son 2 hafta içerisinde topikal, son 4 hafta içerisinde sistemik tedavi kullanmayan, Total IgE 2500 üzeri, ev tozu duyarlı ve kronik AD hastaları

Çalışmadan dışlanma kriterleri

- Otoimmün ve başka kronik inflamatuvar hastalığı olan (Lupus, MS, İBH...)
- Gebeler ve 2 yaş altı bebekler
- Sistemik steroid, immunsupresif, biyolojik ajanları son 1 ay içerisinde, topikal steroid ve kalsinörin inhibitörlerini son 15 gün içinde kullanmış olanlar
- Aktif veya kronik enfeksiyonu olan bireyler dahil edilmemiştir.

II. Psoriasis hastalarının çalışmaya dâhil edilme ve dışlanma kriterleri

Çalışmaya dahil edilme kriterleri

- Psöriasis tanı almış, son 2 hafta içerisinde topikal, son 4 hafta içerisinde sistemik tedavi kullanmayan
- Deri prick testinde tüm antijenlere negatif yanıt veren bireyler çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmadan dışlanma kriterleri

- Otoimmün ve başka kronik inflamatuvar hastalığı olan (Lupus, MS, İBH...)
- Gebeler ve 2 yaş altı bebekler
- Sistemik steroid, immunsupresif, biyolojik ajanları son 1 ay içerisinde, topikal steroid ve kalsinörin inhibitörlerini son 15 gün içinde kullanmış olanlar
- Aktif veya kronik enfeksiyonu olan bireyler dahil edilmemiştir.

III. Sağlıklı bireylerin çalışmaya dâhil edilme ve dışlanma kriterleri

Çalışmaya dahil edilme kriterleri

- Otoimmün veya alerjik hastalık hikayesi olmayan,
- Son 6 ayda immün baskılayıcı veya steroid kullanmamış,
- Deri prick testinde tüm antijenlere negatif yanıt veren bireyler çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmadan dışlanma kriterleri

- Son 6 ayda immün baskılayıcı veya steroid kullanmış,
- Prick testinde en az bir antijene pozitif yanıt veren bireyler çalışmaya dahil edilmemiştir.

5.6.6.2. AD hastası, Psoriasis hastası ve sağlıklı bireylerden alınan venöz kandan mononükleer hücre izolasyonu

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

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

$$\text{Toplam hücre sayısı} = A \times S \times F \times 10^4$$

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

Hücre Kültür Planı

AD hastası, Psoriasis hastası ve sağlıklı bireylerden elde edilen venöz kan mononükleer hücrelerinin DF-MKH varlığında ve yokluğunda kültürleri yapıldı. Her birey için 48 kuyulu kültür plaklarında aşağıdaki kültür kuyuları hazırlandı.

1. Kültür grubu (lenfosit proliferasyonu)

Uyarımsız CFSE işaretli Mononükleer Hücreler	CDMix uyarımlı (05 μ g/ml) CFSE işaretli Mononükleer Hücreler	Uyarımsız CFSE işaretli Mononükleer Hücreler + DF-MKH	CDMix uyarımlı CFSE işaretli Mononükleer Hücreler + DF-MKH
---	--	--	--

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

Uyarımsız Mononükleer Hücreler	CDMix uyarımlı Mononükleer Hücreler	Uyarımsız Mononükleer Hücreler + DF-MKH	CDMix uyarımlı Mononükleer Hücreler + DF-MKH
--------------------------------------	--	---	---

Hücre izolasyonları yapıldıktan ve hücreler sayıldıktan sonra bir grup mononükleer hücre DF-MKH varlığında ve yokluğunda 72 saat 37°C 'de %5 CO_2 ortamda inkübe edildi. Bir grup mononükleer hücre ise CFSE ile işaretlenip DF-MKH varlığında ve yokluğunda 72 saat 37°C 'de %5 CO_2 ortamda inkübe edildi. 72

saat sonunda CFSE ile işaretlenen mononükleer hücrelerde CD4⁺ T lenfosit proliferasyonu, işaretlenmeyen mononükleer hücrelerde ise CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, Annexin V/7AAD ile T lenfosit apoptozu, T lenfositlerde Fas/Fas-Ligand analizi, T lenfositlerde TNFR1 oranları, naif ve bellek T hücre oranları analiz edildi. T lenfositlerin Th1 ve Th2 farklılaşma analizleri iki şekilde yapıldı; 1) kültür süpernatantında sitokin düzeylerinin belirlenmesi 2) kültür sonrası hücrelerde western blot yöntemiyle transkripsiyon faktörlerinin protein ekspresyon analizi yapıldı.

5.6.6.3. Lenfositlerin proliferasyon analizi için CFSE ile işaretlenmesi

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

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

solüsyonu eklenip tekrar 1500 rpm de 5 dakika santrifüjlendi. Son yıkama işleminden sonra 1 ml CRPMI eklenip hücre sayımı yapıldı.

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

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

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

- **US:** Uyarımsız kuyulara antikor eklenmedi.
- **CDmix uyarımlı:** T lenfosit uyarımı için CDmix uyarımı olan kuyulara karışım olarak hazırlanan anti-CD3/antiCD28 solüsyonundan 2,5 µl (1 µg/ml anti-CD3 antikor ve 5 µg/ml anti-CD28 antikor) eklendi.

Hücre kültürleri 72 saat süreyle 37°C'de %5 CO₂ ortamda inkübe edildi.

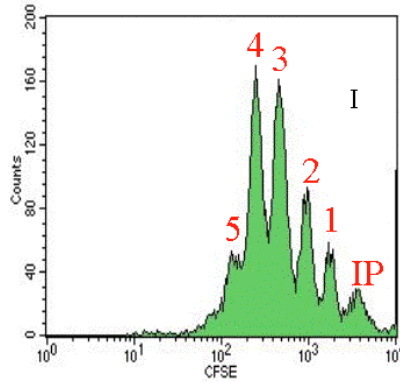
5.6.7. Analizler

5.6.7.1. T Lenfositlerin proliferasyon analizi

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

İzole edilen ve kültür süresi tamamlanan mononükleer hücrelerin içindeki T lenfositlerin proliferasyonun takibi için kültürün 0. saatinde CFSE işaretlenerek 72 saat süreyle DF-MKH varlığında ve yokluğunda 37°C, %5 CO² inkübatörde kültürleri yapıldı.

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



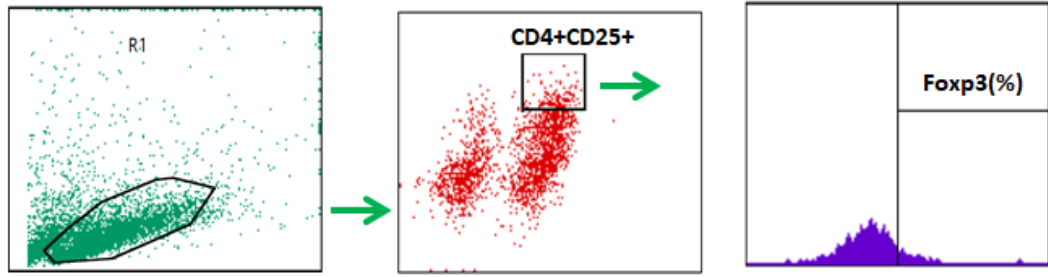
Şekil 4. CFSE işaretli hücrelerin akım sitometri cihazında analizi. CFSE alanında sağda bulunan hücre grubuna ait pik bölünmeyen (ilk popülasyon) hücreleri ifade

eder (IP), her bölünen hücre sola doğru diğer nesilleri (1,2, 3,...) göstermektedir. Hücre her bölünmede bir önceki nesilden CFSE boyasının yarısını aldığı için proliferen olan (çoğalan) hücreler grafikte sola doğru ilerlemektedir.

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

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

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



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

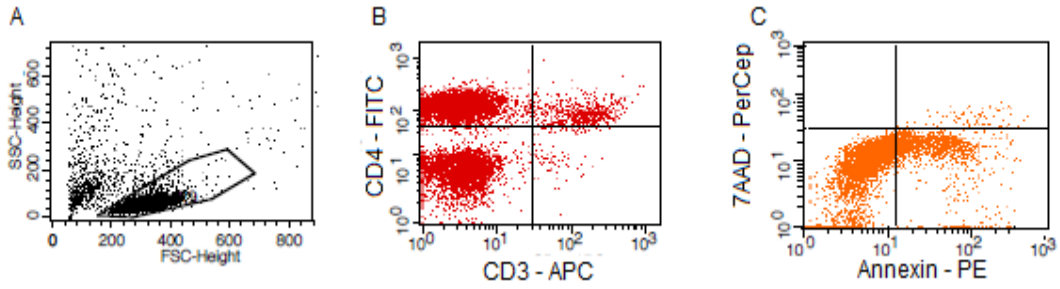
5.6.7.3. Lenfositlerin Annexin V/7AAD ile apoptoz oranlarının analizi

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

Apoptoz, embriyonik gelişim sırasında ve aynı zamanda doku homeostazının devam ettirilmesi sırasında ortaya çıkan normal fizyolojik bir süreçtir. Apoptotik süreçte, plazma membran asimetrisi ve hücrenin diğer hücrelerle bağlantısının kaybı da dahil olmak üzere bazı morfolojik değişiklikler gerçekleşmektedir. Bu değişiklikler sitoplazma ve çekirdeğin yoğunlaşması ve DNA'nın internükleozomal bölünmesi gibi olaylardır. Annexin V, 35-36 kDa ağırlığında ve Ca²⁺ bağımlı bir fosfolipid bağlayıcıdır. Apoptotik süreçte hücrenin iç kısmında bulunan membran fosfolipid fosfatidilserin (PS) dışa doğru hareket etmeye başlar. Annexin V; PS için yüksek afiniteye sahip olan ve PS maruziyetli hücrelere bağlanan bir proteindir. Annexin V, PS için yüksek afinitesini korur ve böylece, hücrelerin akım sitometrik analizi için hassas bir prob görevi görür.

Kültür kuyularından alınan hücreler 15 mL'lik falkon tüplere alınıp PBS solüsyonuyla 2 mL'ye tamamlandı ve 1500 rpm'de 5 dk. santrifüjlendi. Süpernatant atıldı, dipte kalan hücreler 100 µL PBS solüsyonuyla sulandırıldı. Hücreler akım

sitometri cihazında okutulmadan önce CD4⁺ T hücrelerin seçilmesi için anti-CD3 ve anti-CD4 antikorları kullanıldı. Erken veya geç apoptotik veya nekrotik hücreleri belirlemek için Annexin V ile birlikte 7AAD (7-amino-actinomycin) işaretleyici kullanıldı. Hücre eğer canlılığını koruyorsa 7AAD işaretleyici membrandan geçemez. Eğer hücre ölü veya hasar görmüşse bu hücrelerin zarı 7AAD işaretleyiciyi geçirir. Annexin V ve 7AAD ile analizlerin sonuçları şu şekilde değerlendirilir; 1) Canlı hücreler; annexin V ve 7AAD'nin her ikisinde de negatif alandadır, 2) Erken apoptoz; Annexin V pozitif alanda 7AAD negatif alandadır, 3) Geç apoptoz; Annexin V ve 7AAD her ikisi de pozitif alanda, 4) Nekroz; Annexin V negatif alanda 7AAD ise pozitif alandadır. Nekroz ve apoptoz birbirinden farklı süreçler içeren hücre ölüm olaylarıdır. Nekrotik hücrelerde plazma membranı tamamen dağıldığı için annexin V işaretleyici ile işaretlenmez, bu nedenle annexin V negatif alanda görülür. (Şekil 6)



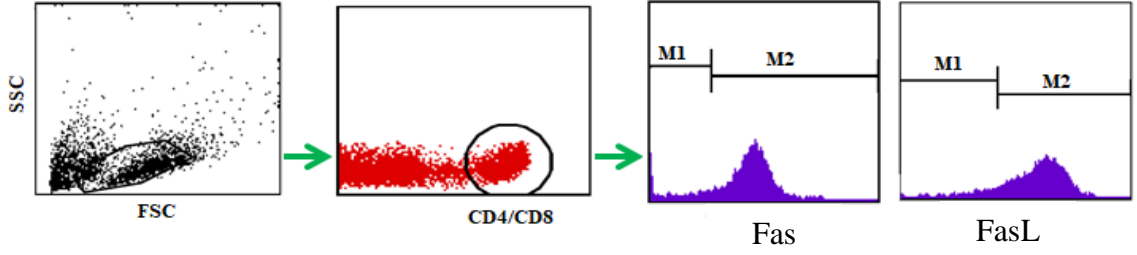
Şekil 6. Hücre canlılığı ve apoptoz oranlarının akım sitometri cihazında analizi. A) Kültürden alınan hücreler için akım sitometri cihazında önce lenfosit kapısı seçilir. B) Lenfositlerin içinden CD3⁺/CD4⁺ T hücreler seçilir. C) CD3⁺/CD4⁺ T hücrelerde Annexin V/7AAD analizi yapılır.

5.6.7.4. Lenfositlerin Fas/Fas Ligand analizi

Mononükleer hücrelerin izolasyonundan sonra DF-MKH varlığında ve yokluğunda kültürü yapılan hücrelerin 72 saatlik kültür süresinin sonunda lenfositlerde Fas ve Fas Ligand ifadesi oranları analiz edildi.

DF-MKH'lerin AD hastalığında lenfosit apoptozu üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla hastalardan izole edilen periferal kan mononükleer hücreler 72 saat kültür

süresinin sonunda lenfositler anti-CD4, anti-CD8, anti-CD95 (anti-Fas) ve anti-CD178 (anti-Fas-L) antikorlarıyla işaretlenip akım sitometri cihazında analiz edildi. (Şekil 7)

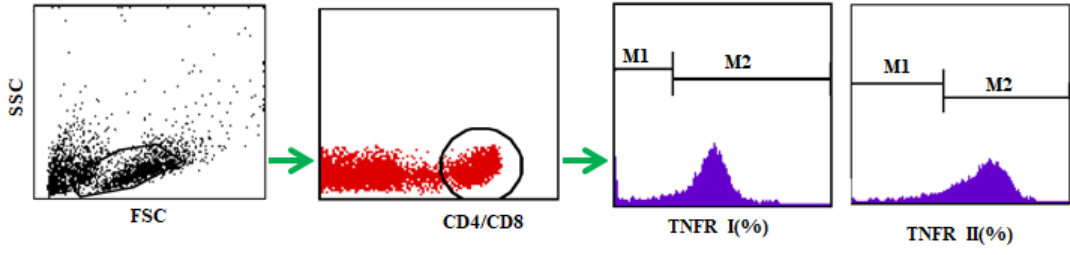


Şekil 7. Fas (CD95) ve FasL (CD178) analizi. SSC-FSC alandaki lenfosit kapısı alındıktan sonra CD4⁺ veya CD8⁺ lenfositler kapılır. CD4⁺ veya CD8⁺ lenfositlerin içinden Fas veya FasL oranları histogramda M2 alanından belirlenir.

5.6.7.5. Lenfositlerin TNFRI ve TNFRII analizi

Mononükleer hücrelerin izolasyonundan sonra DF-MKH varlığında ve yokluğunda kültürü yapılan hücrelerin 72 saatlik kültür süresinin sonunda lenfositlerde TNF reseptör I (TNFRI) ifadesi oranları analiz edildi.

DF-MKH'lerin AD hastalığında lenfosit apoptozu üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla hastalardan izole edilen periferal kan mononükleer hücreler 72 saat kültür süresinin sonunda anti-TNFRI antikoruna ile işaretlenip akım sitometri cihazında analiz edildi. (Şekil 8)



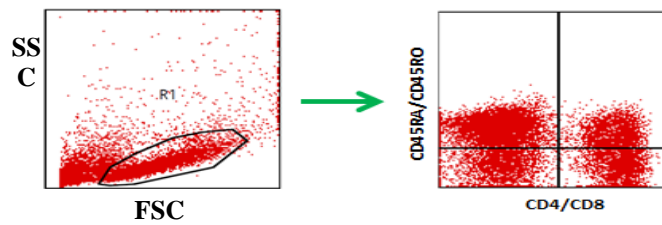
Şekil 8. TNFR I ve TNFR II analizi. SSC-FSC alandaki lenfosit kapısı alındıktan sonra CD4⁺ veya CD8⁺ lenfositler kapılanır. CD4⁺ veya CD8⁺ lenfositlerin içinden TNFR I veya TNFR II oranları histogramda M2 alanından belirlenir.

5.6.7.6. Naive ve Bellek T lenfosit oranlarının belirlenmesi

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

DF-MKH'lerin AD hastalığında naive, efektör ve bellek lenfositler üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla hastalardan izole edilen periferik kan mononükleer hücreler 72 saat kültür süresinin sonunda anti-CD4, anti-CD8, anti-CD45RA ve anti-CD45RO antikorlarıyla işaretlenip akım sitometri cihazında analiz edildi.

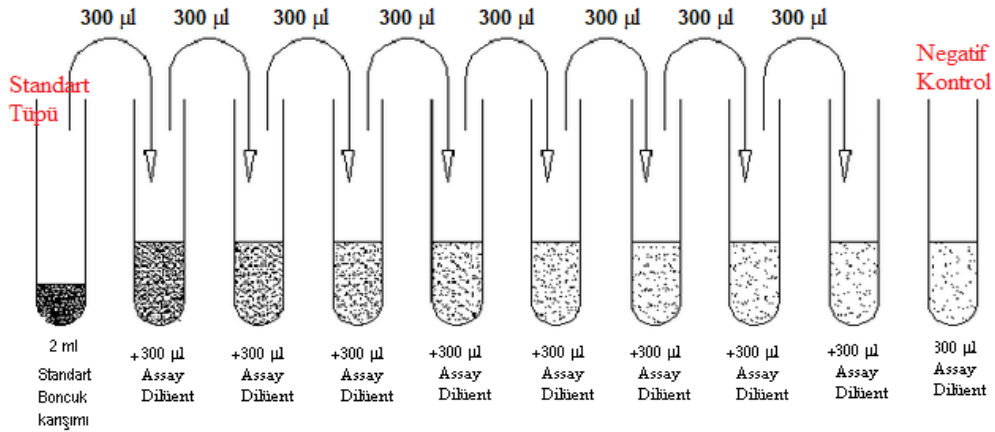
DF-MKH'lerin AD hastalığında naive, efektör ve bellek CD4⁺ T hücre fenotipleri üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla hastalardan izole edilen periferik kan mononükleer hücreler 72 saat kültür süresinin sonunda anti-CD4, anti-CD8, anti-CD45RA ve anti-CD45RO antikorlarıyla işaretlenip akım sitometri cihazında analiz edildi. (Şekil 9)



Şekil 9. Naive ve Bellek T lenfosit oranları. SSC-FSC alanından seçilen lenfositlerden CD4⁺ veya CD8⁺/CD45RA⁺ (naive), CD4⁺ veya CD8⁺/CD45RO⁺ (bellek) hücre oranları belirlendi.

5.6.7.7. Hücre kültür süpernatantlarında sitokin tayini

Hastalardan elde edilen mononükleer hücrelerin 72 saatlik kültürü sonrasında kültür süpernatantları toplandı ve sitokin düzeylerinin belirlenmesi için sitokin analizi Cytometric Bead Array (CBA) Th1/Th2/Th17 kiti kullanılarak yapıldı. Kit protokolüne göre öncelikle standart dilüsyonlar hazırlandı. Bu işlem için standart boncukları (standard beads) 15 ml' lik falkon tüpe boşaltıldı ve 2 ml seyreltici solüsyon içerisinde yavaşça pipetaj yapılarak çözüldü. 15 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletilen standart tüpü pipetleme ile yavaşça karıştırılıp belirli oranlarda dilüsyonları yapıldı (negatif kontrol, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256). Negatif kontrol tüpüne sadece dilüe edici sıvı eklendi. Tüp sayısı belirlendikten sonra standart boncuk karışımı her bir tüpe 50 µl eklendi. Hazırlanan standart tüplerine 50 µl standartlardan, örnek tüplerine ise 50 µl örneklerden konuldu. Boncuk karışımı kısa bir süre vorteksledi ve her bir tüpe 25 µl boncuk konuldu. Tüpler vorteksledikten 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 vorteksledi. Örnekler akım sitometri cihazında okutuldu. Analizlerde sitokinler için hazırlanan standartlar çerçevesinde grafik eğrisi oluşturuldu ve her bir örnekteki sitokin miktarı elde edilen denkleme göre belirlendi. (Şekil 10)



Şekil 10. Th1/Th2/Th17 sitokin kiti standart hazırlanması.

5.6.7.8. Protein ekspresyon analizi (Western Blot yöntemi)

Kültür edilen mononükleer hücreler 72 saat kültür süresinin sonunda protein ifadesinin analizi için kültür kuyularından alınarak 15 mL falkon tüplere aktarıldı. Hücre süspansiyonu önce PBS solüsyonuyla 2 mL'ye tamamlanarak 1500 rpm'de 5 dk. santrifüjlendi. Süpernatant atıldı, dipte kalan hücre pelleti sayım yapıldıktan sonra her $1-2 \times 10^6$ hücre için 100 µL RIPA protein izolasyon/ekstraksiyon kiti ile süspanse edilip 15 dk +4°C'de bekletildi. İnkübasyon süresinin sonunda 800-1000 rpm'de 3 dk. santrifüjlenerek süpernatant toplandı ve 500 µL ependorf tüplerde analize kadar (maksimum 1 ay) -20C'de bekletildi.

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

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

$$\text{Örnek konsantrasyonu } (\mu\text{g/mL}) = \text{QF değeri} \times (200/x)$$

QF değeri: Qubit florometrede okunan absorbanans değeri

X: Eklenen örnek miktarı

Protein miktarı belirlendikten sonra herbir örnek için jele yüklenecek örnek hacmi µL olarak belirlendi. Protein elektroforez işlemi için 10 kuyulu jel kullanıldı. Her jel kuyusuna 20 µL'de 20 ng olacak şekilde örnekler dilüe edilerek yüklendi. Elektroforez işlemi için yürütme tampon solüsyonu (running buffer) kullanıldı. Yürütme tampon solüsyonu 20X konsantrasyonda hazır olarak alındı. Bu solüsyondan 50 mL alınıp üzeri 950 mL distile su ile tamamlandı ve konsantrasyon 1X değerine düşürüldü. Elektroforaz cihazı çalıştırılmadan önce 1X yürütme tampon solüsyonu dolum çizgisine kadar cihazın kütetine aktarıldı. Proteinin yükleneceği jeller cihaz kütetine yerleştirildikten sonra jel kuyularından ilkine protein standardı

yüklendi, diğer kuyuların her birine laemli solüsyon içinde 20 ng/20 µL örnek yüklendi. Cihaz 500 mA 100 V ve 90 dakika olarak ayarlandı ve yürütme işlemi başlatıldı. Süre sonunda jeldeki proteinlerin ilerlemesi tamamlandıktan sonra jel cihaz kuvetinden alınıp western blot transfer cihazına (iBlot) yerleştirmek için cihaz üreticisinin talimatına uygun olarak nitroselüloz membran üzerine aktarıldı. Nitroselüloz membran üzerine transfer edilen proteinler önce primer sonra sekonder antikolarla işaretlendi. Antikolarla işaretleme işlemi için süt tozu içeren TBST solüsyonu kullanıldı. Primer antikor 5 ml %5 süt tozu içeren TBST solüsyonu ile üretici firmanın önerdiği oranda sulandırıldı. Nitroselüloz membran primer antikorun bulunduğu %5 süt tozu içeren TBST solüsyonu ile çalkalayıcı kuvet içinde içinde 24-36 saat +4 °C’de inkübe edildi. İnkübasyon süresinden sonra membranın üzerindeki antikor solüsyonu atıldı, iki kere PBS ile yıkandı ve PBS atıldı. Sekonder antikor 5 ml %5 süt tozu içeren TBST solüsyonu ile üretici firmanın önerdiği oranda sulandırıldı. Nitroselüloz membran sekonder antikorun bulunduğu %5 süt tozu içeren TBST solüsyonu ile çalkalayıcı kuvet içinde içinde 6 saat +4 °C’de inkübe edildi. İnkübasyon süresinden sonra membranın üzerindeki antikor solüsyonu atıldı, iki kere PBS ile yıkandı ve PBS atıldı. Membran proteinin aktarıldığı yüzü üstte olacak şekilde küçük bir kuvet içine alındı, üzerine ECL reaktif A ve 1 mL reaktif B eşit miktarda karıştırılarak eklendi. Karanlıkta oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildikten sonra görüntüleme cihazında analiz edildi.

5.6.7.9. DF-MKH’lerin immün düzenleyici moleküllerin nötralizasyon analizi

DF-MKH’lerin immün düzenleyici mediatörlerinin belirlenmesi için ko-kültürlerin besiyerine (cDMEM; DMEM + %10 FBS + %1 penisilin/streptomisin) ayrı kuyularda TGF-β nötralizasyonu için 0,5 µg/mL anti-TGF-β rekombinant antikorunu, indolamin 2,3-dioksijenaz (IDO) yolağının blokajı için 1 mM 1-metil-D-triptofan (1-MDT) ve prostaglandin E2 (PGE2) yolağının blokajı için 50 µM sc-58125 eklendi. AD hastalarından izole edilen periferal kan mononükleer hücreler (PKMH) ile DF-MKH kokültürleri uyarımsız ve CDmix uyarımlı olmak üzere iki gruba ayrıldı. Her bir grup ayrı kültür kuyularında olmak üzere nötralizasyon ajanı olmayan bir kültür kuyusu, anti- TGF-β nötralizasyonu yapılan kültür kuyusu, 1-MDT ile bloke edilen kültür kuyusu ve sc-58125 ile bloke edilen kültür kuyusu

olmak üzere 4 kuyu kullanıldı. DF-MKH: PKMH 1:10 oranında 48 kuyucuklu kültür plaklarında 500 µL cDMEM besiyeri içinde kültür edildi. Ayrıca, her gruptan birer kuyu kök hücre içermeyen sadece PKMH olarak kültür edildi. Kùltürler 72 saat süreyle 37°C’de %5CO₂ inkübatörde yapıldı.

5.6.8. İstatistiksel analiz

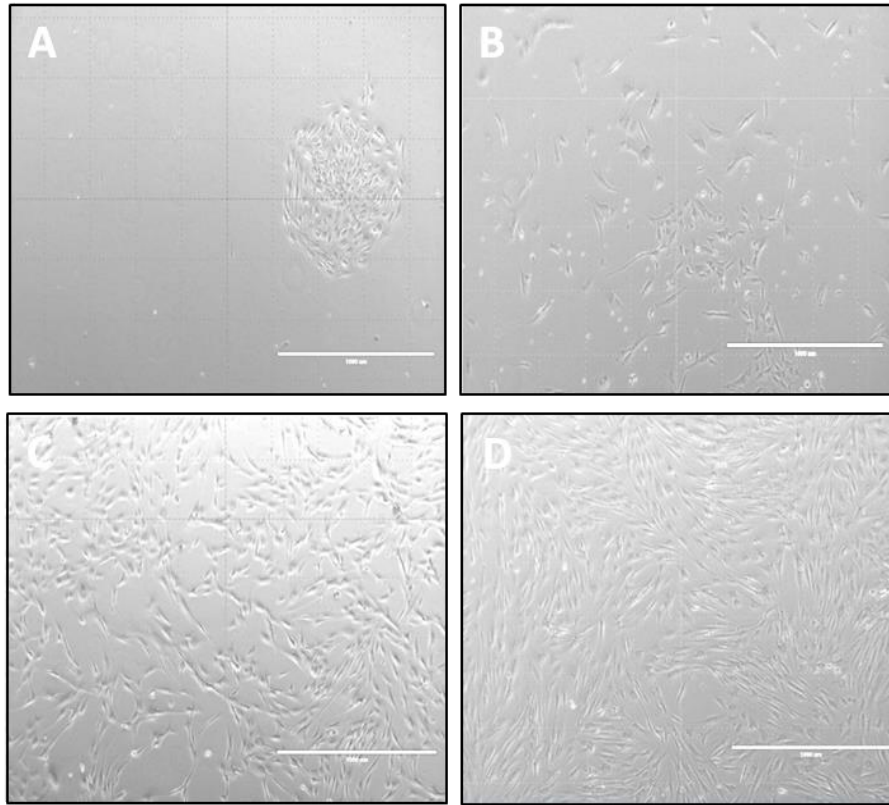
Gruplar arasındaki farklılık GraphPad Prism 5 programı (GraphPad Software,

Inc. CA, USA) kullanılarak analiz edildi. Veriler her grupta ortalama (Ort) ± standart deviasyon (SD) (minimum-maksimum) değeri olarak verildi. İki den 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 değeri anlamlı olarak kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Diş folikülü kaynaklı mezenkimal kök hücre izolasyonu

Diş folikülünden, kök hücreler izole edildikten sonra T-25 cm²' lik flaslara ekildi ve hücrelerin morfolojik özellikleri invert mikroskop ile incelendi. Birinci kültürde hücrelerin hızlıca çoğaldıkları ve flask yüzeyini kapladıkları görüldü (Şekil 6.3.A). Hücreler yaklaşık %70-80 yayılım gösterdikten sonra birinci pasaja alınarak T-75 cm²' lik flaslara aktarıldı. Pasajlama işleminden sonra hücreler 5-6 gün içerisinde flask yüzeyini kapladı ve bir sonraki pasaja alındı (Şekil 11).

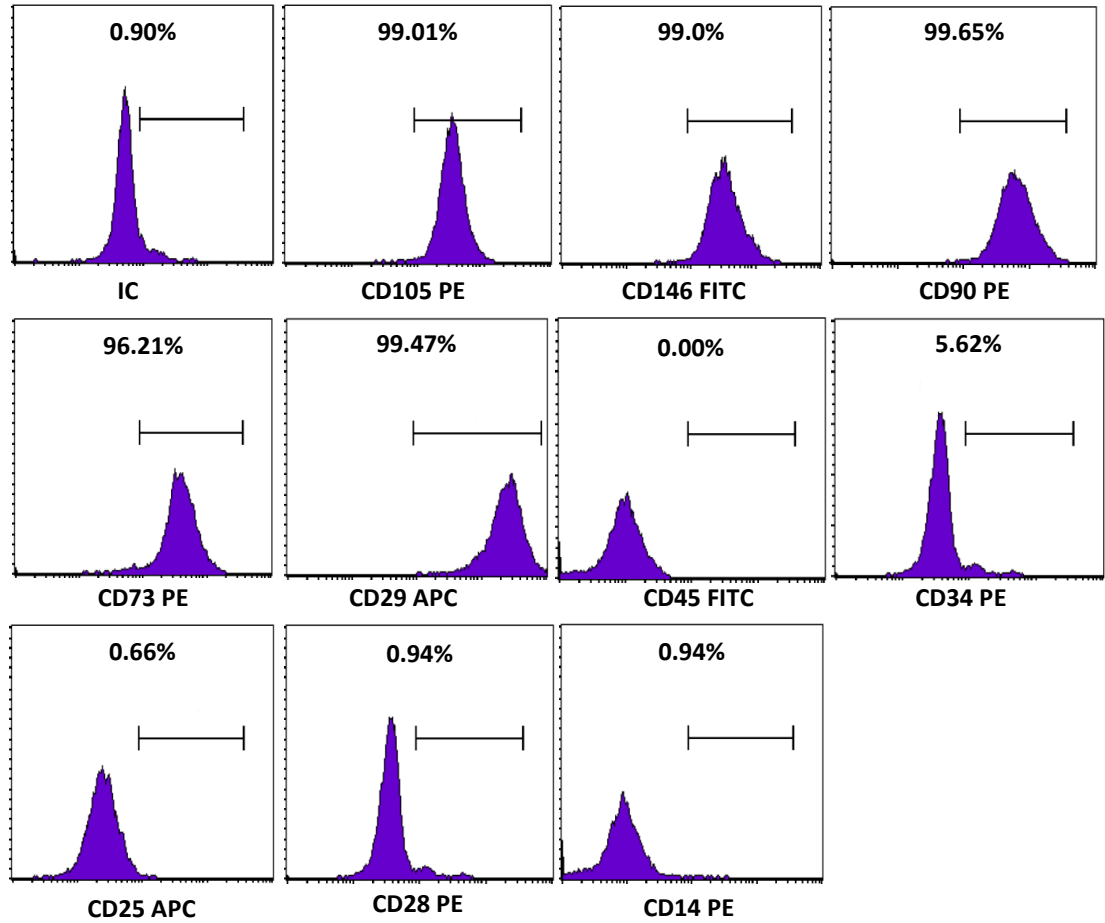


Şekil 11. DF-MKH' lerin morfolojik görünümü. A) DF-MKH hücrelerinin birinci kültür (P0, 3. gün), B) birinci pasaja sonrası (P1, 3. gün), C-D) sonraki alt kültürlerinin (C: P2, 3. gün; D: P3, 3. gün) invert mikroskobu görüntülerinde, kök hücrelerin fibroblast benzeri morfolojiye sahip oldukları görülmektedir (Büyütme: AX20, B-C-DX10).

6.2. DF-MKH'lerin karakterizasyonu ve farklılaşma potansiyelinin değerlendirilmesi.

6.2.1. DF-MKH hücrelerin akım sitometri analizi

DF-MKH hücreleri üçüncü pasaja alındıktan yaklaşık 5 gün sonrasında kültür konflüent oldu ve hücrelerin karakterizasyon analizleri yapıldı. Bu hücrelerin akım sitometrik analizleri sonucunda hematopoetik kök hücre belirteci olan CD45, CD34, CD25, CD28 ve CD14 işaretlerini yüzeylerinde göstermedikleri görüldü. Aynı zamanda bu hücrelerin kök hücre işareti olan CD73, CD90, CD105, CD146 ve CD29' u yüzeylerinde gösterdikleri görüldü (Şekil 12).



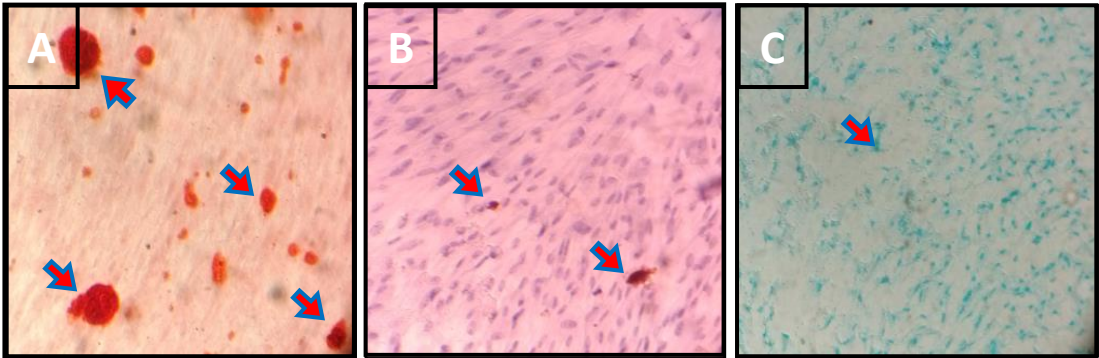
Şekil 12. DF-MKH hücrelerinin immunofenotipik özelliklerinin akım sitometri sonuçları. CD45 (%0,0), CD14 (%0,01), CD34 (%4,72), CD25 (%0,27) ve CD28 (%1,14) negatif ekspresyon gösterirken, MKH' lara özgü CD105 (%95,58), CD146 (%97,43), CD90 (%97,78), CD73 (%98,54) ve CD29 (%96,50) pozitif olduğu gösterildi. IC; İzotip kontrol.

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

Osteojenik farklılaştırma için uyarılan DF-MKH hücrelerinin osteoblast benzeri hücrelere farklılaştıkları gözlemlendi. Osteojenik farklılaştırma besiyerine alınan DF-MKH hücreleri kültürün 21. gününde alizarin kırmızısı ile boyandı ve mineralize kemik nodülleri görüldü (Şekil 13A).

Adipojenik olarak farklılaştırmak için adipojenik besiyerinde 14 gün süre ile kültürleri yapıldı ve DF-MKH hücrelerinin adiposit benzeri hücrelere farklılaştıkları gösterildi. Kültürün ikinci haftasında Oil red O ile yapılan boyama sonrasında kırmızı renkte hücre içi yağ damlacıkları görüldü. Buradaki yağ damlacıklarının diğer hücre gruplarına oranla daha fazla sayıda ve belirgin oldukları görüldü (Şekil 13B).

Kondrojenik olarak farklılaştırmak için DF-MKH hücrelerinin 21 gün kondrojenik besiyeri ile kültürleri yapıldı ve kondrosit benzeri hücrelere farklılaştıkları görüldü. Kültürün 21. gününde alcian blue ile boyanan hücrelerde kondrositler tarafından üretilen proteoglikanların mavi renkte boyandığı görüldü (Şekil 13C).



Şekil 13. DF-MKH hücrelerinin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma özellikleri. A) Osteojenik farklılaştırma besiyeri ile kültürü yapılan ve sonrasında alizarin kırmızısı ile boyanan DF-MKH hücrelerinde parlak kırmızı renkte boyanmış osteoblast nodülleri görülmektedir. B) Adipojenik farklılaştırma besiyeri ile kültürü yapılan ve sonrasında Oil red o ile boyanan DF-MKH hücrelerinde kırmızı renkte yağ damlacıkları görüldü. C) Kondrojenik farklılaştırma besiyeri ile kültürü yapılan ve sonrasında Alcian blue ile boyanan DF-MKH hücrelerinde mavi renkli boyanan proteoglikanlar görüldü.

6.3. AD, Psöriasis ve sağlıklı kontrol gruplarında demografik veriler.

Bu çalışmada hasta grubumuz, 9 AD'li olgudan oluşturuldu. AD'li hastalar Hanifin and Rajka kriterlerine göre tanı almışlardı. Tüm hastalar ev tozu akarlarına pozitif kutanöz reaksiyon gösterdi. AD hastaların Total IgE >400 IU/mL (Ortalama, 2650±506,99 IU/mL) olarak saptandı. Hiçbir hastada testten en az 2 ay önce hiçbir sistemik immünsüpresif tedavi uygulanmadı ve başka bir kronik hastalıkları yoktu. 6 psöriasis hastası (ortalama yaş, 22,33 ± 4,68 yıl) çalışmaya dahil edildi. Ortalama serum IgE seviyesi 19,5 ± 6,09 IU / mL idi. Hiçbir hastada testten en az 2 ay önce hiçbir sistemik immünsüpresif tedavi uygulanmadı. Çalışmaya atopi öyküsü olmayan altı sağlıklı kontrol (ortalama yaş, 24,5 ± 3,03 yıl) kontrol olarak dahil edildi. Ortalama serum IgE düzeyi 17 ± 1,2 IU / mL idi. (Çizelge 1)

Çizelge 1. AD, Psöriasis ve sağlıklı hasta gruplarının demografik verileri

Patients	Yaş	Cinsiyet	Total IgE U/ml	SPT(mm)	Topikal Tedavi
AD 1	18	E	2423	DF: 5*6, DP: 6*6	N
AD 2	14	E	2748	DF: 6*5, DP:6*6	N
AD 3	15	K	2105	DF: 3*3, DP:4*3	N
AD 4	14	E	2867	DF: 5*5, DP: 4*4	P
AD 5	14	E	2374	DF: 6*6, DP: 5*6	N
AD 6	13	K	3715	DF: 4*5, DP: 5*5	P
AD 7	22	E	2604	DF: 6*6, DP: 5*6	N
AD 8	17	E	2031	DF: 4*5, DP: 6*6	N
AD 9	18	K	2987	DF: 5*5, DP: 5*4	N
Psöriasis 1	28	K	28	N	N
Psöriasis 2	22	K	15	N	N
Psöriasis 3	17	E	11	N	N
Psöriasis 4	20	E	24	N	N
Psöriasis 5	19	E	20	N	N
Psöriasis 6	28	K	19	N	N
Sağlıklı Kontrol 1	22	K	25	N	N
Sağlıklı Kontrol 2	23	K	15	N	N
Sağlıklı Kontrol 3	25	E	23	N	N
Sağlıklı Kontrol 4	20	E	10	N	N
Sağlıklı Kontrol 5	27	E	28	N	N
Sağlıklı Kontrol 6	30	K	17	N	N

K: Kadın; E: Erkek; N: Negatif; P, Pozitif, DF: Dermatophagoides Farinae; DP: Dermatophagoïdes pteronyssinus.

6.4. AD hastalarında 0.gün T alt grupları, B alt grupları ve NK hücre oranlarında anlamlı bir fark görülmedi.

AD, Psöriasis ve sağlıklı bireylerde kök hücre deneyi yapılmadan önce 0.gün T alt grupları, B hücre alt grupları ve NK hücre oranları incelendi. Elde edilen sonuçlara göre, 0.gün AD ve Psöriasis hastalarında CD3⁺ hücre oranında (62,94±14,45; 63,21±10,71) sağlıklı gruba göre (74,4±9,6) anlamlı bir fark bulunmadı (P=0,07563; P=0,08402). AD ve Psöriasis hastalarında CD3⁺CD4⁺ Thelper hücre gruplarında (34,20±5,65; 42,41±8,66) sağlıklı kontrole göre (45,4±9,4) anlamlı bir fark görülmedi (P=0,06374; P=0,8617). AD ve Psöriasis hastalarında CD3⁺CD8⁺ Tsitotoksik hücre gruplarında (22,54±3,37; 25,49±5,87) sağlıklı kontrole göre (27,01±7,6) anlamlı bir fark görülmedi (P=0,1905; P=0,1341). AD ve Psöriasis hastalarında CD19⁺ B hücre gruplarında (13,78±6,75; 9,73±3,14) sağlıklı kontrole göre (9,40±4,63) anlamlı bir fark görülmedi (P=0,0705; P=0,2728). AD ve Psöriasis hastalarında CD20⁺ B hücre gruplarında (13,63±6,59; 9,72±2,34) sağlıklı kontrole göre (9,56±4,74) anlamlı bir fark görülmedi (P=0,0734; P=0,2711). AD ve Psöriasis hastalarında CD20⁺ B hücre gruplarında (10,65±7,25; 10,01±5,68) sağlıklı kontrole göre (11,01±7,30) anlamlı bir fark görülmedi (P=0,8041; P=0,8167).

Çizelge 2. AD, Psöriasis ve sağlıklı hasta gruplarının lenfosit alt gruplarının dağılımı

Belirteç	Hücre Alt Grupları	AD	Psöriasis	Sağlıklı Kontrol
CD3 ⁺	T	62,94±14,45	63,21±10,71	74,4±9,6
CD3 ⁺ CD4 ⁺	Th	34,20±5,65	42,41±8,66	45,4±9,4
CD3 ⁺ CD8 ⁺	Tc	22,54±3,37	25,49±5,87	27,01±7,6
CD19 ⁺	B	13,78±6,75	9,73±3,14	9,40±4,63
CD20 ⁺	B	13,63±6,59	9,72±2,34	9,56±4,74
CD16 ⁺ CD56 ⁺	NK	10,65±7,25	10,01±5,68	11,01±7,3
CD4 ⁺ CD45RA ⁺	Naiv Th	25,32±3,71	26,34±2,64	20,30±6,9
CD4 ⁺ CD45RO ⁺	Hafıza Th	29±8,45	30,12±3,98	27,15±1,2
CD8 ⁺ CD45RA ⁺	Naiv Tc	14,32±12,72	13,25±8,31	12,40±6,7
CD8 ⁺ CD45RO ⁺	Hafıza Tc	15,27±23,24	14,32±3,75	17,40±4,38

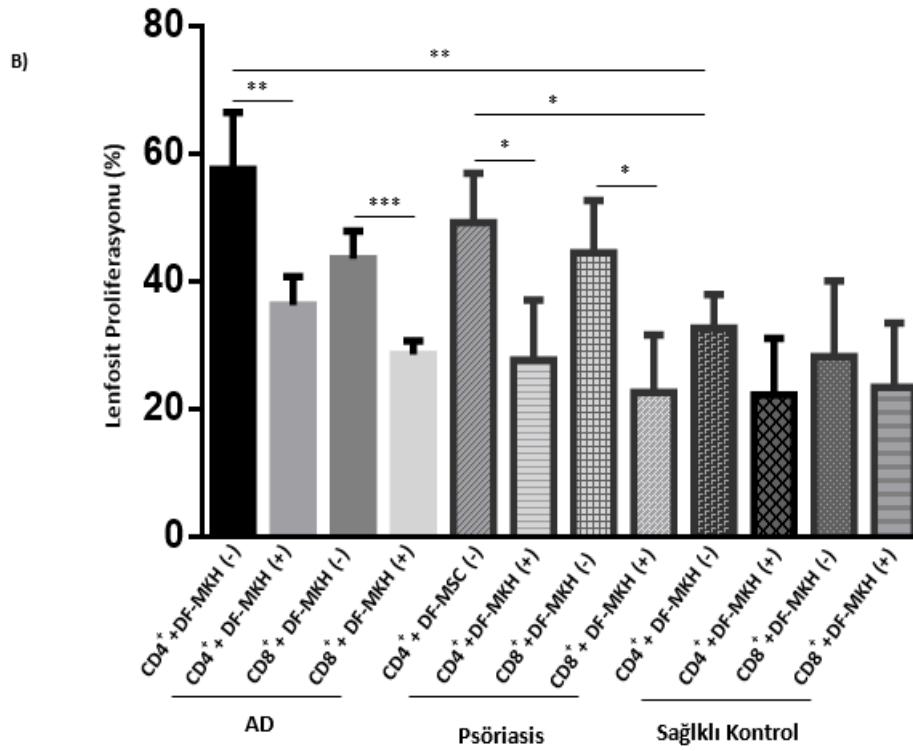
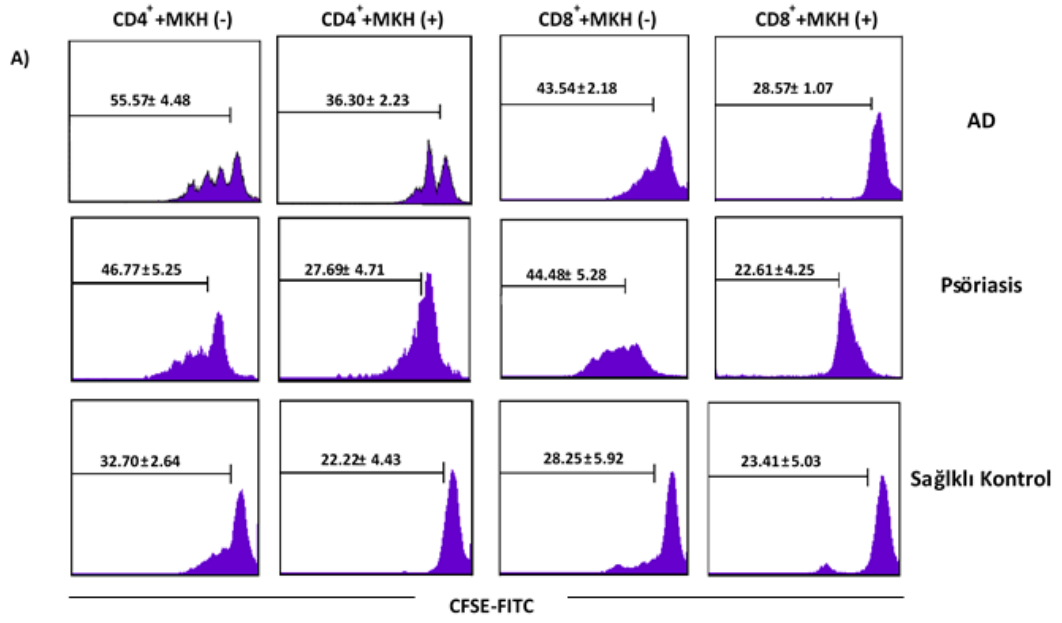
Th: T helper; Tc: T sitotoksik; NK: Doğal öldürücü hücre.

6.5. DF-MKH'ler AD hastalarında CD4⁺ ve CD8⁺ lenfosit proliferasyonunu in vitro ortamda baskıladı.

DF-MKH'ler immün baskılayıcı özelliklerini araştırmak amacıyla bu kök hücrelerin, lenfosit hücrelerinin proliferasyonları üzerine etkisi incelendi. Bu amaçla periferel kan mononükler hücreleri CDmix (anti-CD3/anti-CD28) uyarımlı ve uyarımsız ortamda 3 gün boyunca, DF-MKH'ler varlığında ve yokluğunda kültürleri yapıldı.

Elde edilen sonuçlara göre, AD ve Psöriasis hastalarında CD4⁺ T lenfositlerin proliferasyonu (AD; 55,57±4,48, Psöriasis; 46±5,25) sağlıklı bireylere göre (Kontrol; 32,70± 2,64) anlamlı olarak yüksek bulundu (AD; p<0,01, Psöriasis; p<0,05). AD hastalarında CD4⁺T hücrelerin proliferasyonu MKH varlığında (AD; 36,30±2,23), MKH olmayan (AD; 55,57±4,48) gruba göre anlamlı olarak baskılandı (p<0,01). Psöriasis hastalarında CD4⁺T hücrelerin proliferasyonu MKH varlığında (Psöriasis; 27,69±4,71), MKH olmayan (Psöriasis; 46±5,25) gruba göre anlamlı olarak baskılandı (p<0,05). Sağlıklı bireylerde MKH varlığında ve yokluğunda kültür edilen PKMH'lerin gruplar arası bir fark görülmedi (p>0,05).

AD ve psöriasis hastalarında CD8⁺ T lenfositlerin proliferasyonu (AD; 43,54±2,18, Psöriasis; 44,48±5,28) sağlıklı bireylere göre (Kontrol; 28,25± 5,92) anlamlı olarak baskılandı (AD; p>0,05, Ps; p>0,05). AD hastalarında CD8⁺T hücrelerin proliferasyonu MKH varlığında (AD; 28,57±1,07), MKH olmayan (AD; 43,54±2,18) gruba göre anlamlı olarak baskılandı (p<0,001). Psöriasis hastalarında CD8⁺T hücrelerin proliferasyonu MKH varlığında (Psöriasis; 22,61±4,25), MKH olmayan (Psöriasis; 44,48±5,28) gruba göre anlamlı olarak baskılandı (p<0,05). sağlıklı bireylerde CD8⁺T hücrelerin proliferasyonu MKH varlığında ve yokluğunda gruplar arası bir fark görülmedi (p>0,05). (Şekil 14)

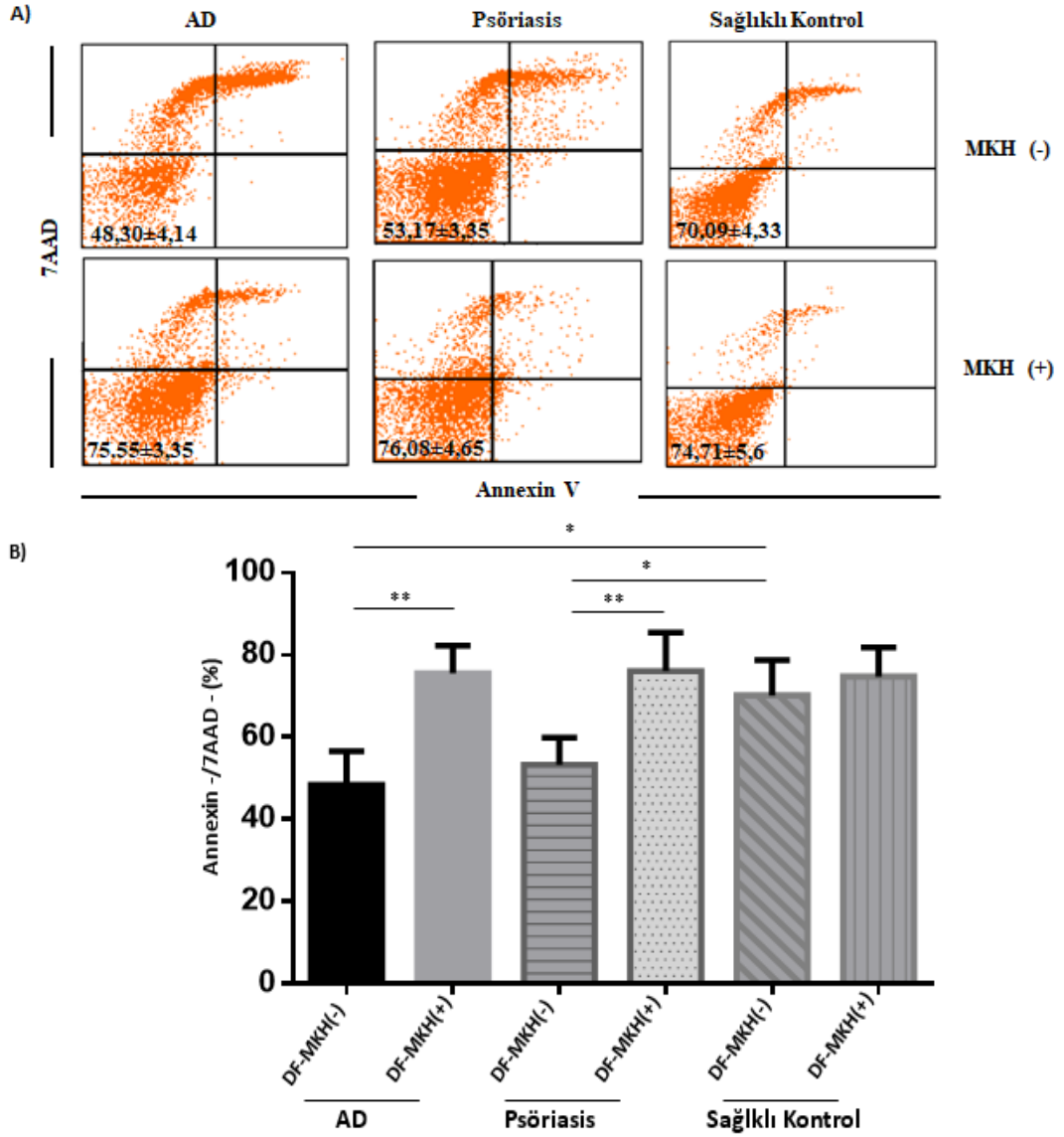


Şekil 14. CD4⁺ T lenfosit ve CD8⁺ T lenfosit proliferasyonu. A) DF-MKH'in AD, Psöriasis hastalar ve sağlıklı bireylerde lenfosit hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki baskılayıcı etkisi akım sitometri analiz gösterimi. CFSE boyasıyla işaretlenen lenfositler histogramda sola doğru proliferasyon göstermektedir. B) DF-MKH'ler AD ve Psöriasis hastalarında CD4⁺ ve CD8⁺ hücreleri anlamlı olarak baskıladı. Sağlıklı bireylerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,005.

6.6. DF-MKH'ler AD hastalarında lenfositlerin canlılığını (Annexin-/7AAD-) in vitro ortamda arttırdı.

DF-MKH'lerin T lenfosit apoptozu üzerine etkisini araştırmak amacıyla hastaların venöz kanından izole edilen PKMH'ler ile birlikte uyarımsız ve CDMix uyarımı ile kültür edildi ve DF-MKH'lerin, lenfositler canlılığı üzerindeki etkisi incelendi. Bu amaçla mononükleer hücrelerinin DF-MKH varlığında ve yokluğunda 3 gün boyunca kültürleri yapıldı.

Elde edilen sonuçlara göre, Lenfosit canlılığı AD ve psöriasis hastalarında ($48,30\pm4,14$; $53,17\pm3,36$) sağlıklı kontrollere göre ($70,09\pm4,33$) anlamlı olarak düşük bulundu ($P= 0,011$, $P= 0,021$). DF-MKH'ler AD hastalarında lenfosit canlılığını ($75,55\pm3,35$) (Annexin-/7AAD-) DF-MKH olmayan ($48,30\pm4,14$) gruba göre anlamlı olarak arttırdı ($P=0,002$). DF-MKH'ler Psöriasis hastalarında lenfosit canlılığını ($76,08\pm4,65$) (Annexin-/7AAD-) DF-MKH olmayan ($53,17\pm3,36$) gruba göre anlamlı olarak arttırdı ($P=0,002$). DF-MKH sağlıklı kontrollerde lenfosit canlılığını DF-MKH olmayan gruba göre değiştirmede ($p=0,44$). (şekil 15)



Şekil 15. T lenfosit Canlılığı. A) DF-MKH'in AD, Psöriasis hastalar ve sağlıklı bireylerde lenfosit hücrelerinin canlılığı üzerindeki baskılayıcı etkisi akım sitometri analiz gösterimi. Annexin/7AAD ile işaretlenen lenfositler dot blot olarak gösterildi. B) DF-MKH'ler AD ve Psöriasis hastalarında lenfosit hücrelerinin canlılığını anlamlı olarak arttırdı. Sağlıklı bireylerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. *P<0,05; **P<0,01.

6.7. DF-MKH'ler AD hastalarında CD4⁺ ve CD8⁺ lenfositler üzerindeki Fas ve FasL ifadesini in vitro ortamda baskıladı.

DF-MKH 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, DF-MKH hücreleri varlığında ve yokluğunda ayrı ayrı kültürleri yapıldı.

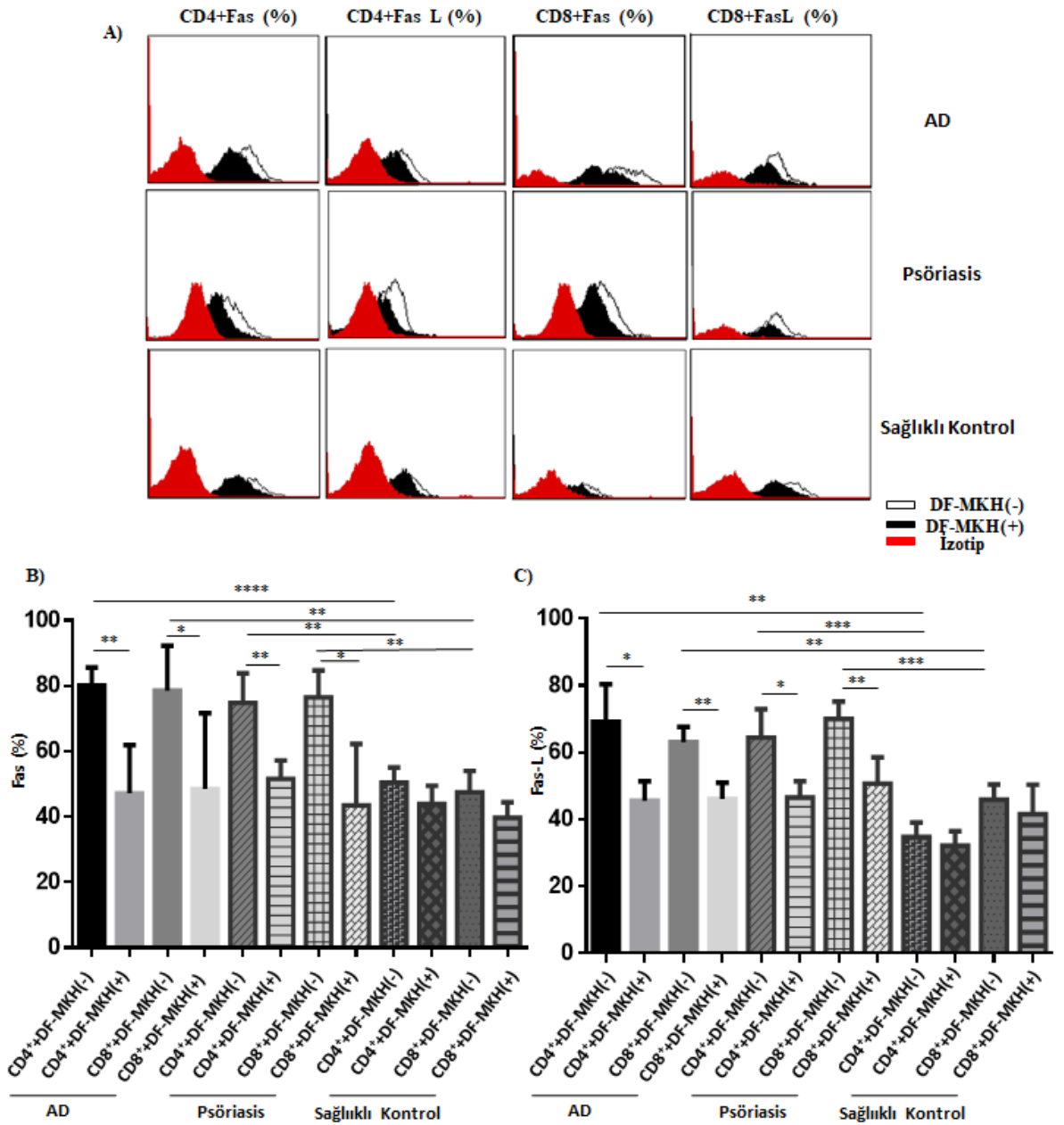
Elde edilen verilere göre; AD ve psöriasis hastalarında CD4⁺ hücreler üzerindeki Fas ifadesi (80,14±2,44; 74,86±4,49) sağlıklı kontrol grubuna göre (50,55±2,36) anlamlı olarak yüksek bulundu (P<0,001; P=0,003). AD hastalarında CD4⁺ hücreler üzerindeki Fas ifadesi DF MKH varlığında (47,21±6,58) DF-MKH olmayan gruba göre (80,14±2,44) anlamlı olarak baskılandı (P=0,016). Psöriasis hastalarında CD4⁺ hücreler üzerindeki Fas ifadesi DF MKH varlığında (51,59±2,86) DF-MKH olmayan gruba göre (74,86±4,49) anlamlı olarak baskılandı (P=0,0047). Sağlıklı kontrol grubunda CD4⁺ hücreler üzerindeki Fas ifadesi DF-MKH varlığında (50,55±2,30) ve yokluğunda (43,92±2,82) gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi (P=0,1194).

AD ve psöriasis hastalarında CD8⁺ hücreler üzerindeki Fas ifadesi (78,57±6,12; 76,56±4,18) sağlıklı kontrol grubuna göre (47,53±3,27) anlamlı olarak yüksek bulundu (P=0,0044; P=0,0015). AD hastalarında DF MKH varlığında CD8⁺ hücreler üzerindeki Fas ifadesi (48,56±10,34) DF-MKH olmayan gruba göre (78,57±6,12) anlamlı olarak baskılandı (P=0,037). Psöriasis hastalarında CD8⁺ hücreler üzerindeki Fas ifadesi DF MKH varlığında (43,54±9,37) DF-MKH olmayan gruba göre (76,56±4,18) anlamlı olarak baskılandı (P=0,018). Sağlıklı kontrol grubunda CD8⁺ hücreler üzerindeki Fas ifadesi DF-MKH varlığında (39,71±2,38) ve yokluğunda (47,53±2,27) gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi (P=0,1194).

Elde edilen verilere göre; AD ve psöriasis hastalarında CD4⁺ hücreler üzerindeki FasL ifadesi (69,11±5,69; 64,44±4,24) sağlıklı kontrol grubuna göre (34,68±2,18) anlamlı olarak yüksek bulundu (P=0,0013; P=0,008). AD hastalarında CD4⁺ hücreler üzerindeki FasL ifadesi DF MKH varlığında (45,58±2,92) DF-MKH olmayan gruba göre (69,11±5,69) anlamlı olarak baskılandı (P=0,0103). Psöriasis hastalarında CD4⁺ hücreler üzerindeki FasL ifadesi DF MKH varlığında (46,54±2,44) DF-MKH olmayan gruba göre (64,44±4,24) anlamlı olarak baskılandı (P=0,0106). Sağlıklı kontrol grubunda CD4⁺ hücreler üzerindeki FasL ifadesi DF-MKH varlığında

(32,12±2,19) ve yokluğunda (34,68±2,18) gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi (P=0,1194).

AD ve psöriasis hastalarında CD8⁺ hücreler üzerindeki FasL ifadesi (63,11±2,25; 70,03±2,57) sağlıklı kontrol grubuna göre (47,53±3,27) anlamlı olarak yüksek bulundu (P=0,0017; P=0,0004). AD hastalarında DF MKH varlığında CD8⁺ hücreler üzerindeki FasL ifadesi (46,11±2,42) DF-MKH olmayan gruba göre (63,11±2,25) anlamlı olarak baskılandı (P=0,0021). Psöriasis hastalarında CD8⁺ hücreler üzerindeki FasL ifadesi DF MKH varlığında (50,70±3,94) DF-MKH olmayan gruba göre (70,03±2,57) anlamlı olarak baskılandı (P=0,0063). Sağlıklı kontrol grubunda CD8⁺ hücreler üzerindeki FasL ifadesi DF-MKH varlığında (41,52±4,45) ve yokluğunda (45,84±2,29) gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi (P=0,4150). (Şekil 16)



Şekil 16. CD4⁺ T lenfosit ve CD8⁺ T lenfosit üzerindeki Fas ve FasL ifadesi. A) AD, Psöriasis hastalar ve sağlıklı bireylerde DF-MKH varlığında ve yokluğunda CD4⁺ ve CD8⁺ lenfositler üzerindeki Fas ve FasL ifadesinin akım sitometri ile gösterimi. Fas ve FasL ile işaretlenen Lenfositler overlay olarak gösterildi B) DF-MKH'ler AD ve Psöriasis hastalarında CD4⁺ ve CD8⁺ hücreleri üzerindeki Fas ve FasL ekspresyonunu anlamlı olarak baskıladı. DF-MKH varlığında ve yokluğunda sağlıklı bireylerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. *P<0,05; **P<0,01, ***P<0,001, ****P<0,0001.

6.8. DF-MKH'ler AD hastalarında CD4⁺ ve CD8⁺ lenfositler üzerindeki TNFR II ifadesini in vitro ortamda baskıladı.

DF-MKH hücrelerinin lenfosit hücrelerinin apoptozu üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla akım sitometri cihazında TNFR I (CD120a) ve TNFR II (120b) analizleri yapıldı. Bu amaçla lenfosit hücrelerinin CDmix uyarımlı ve uyarımsız ortamda 3 gün boyunca, DF-MKH hücreleri varlığında ve yokluğunda ayrı ayrı kültürleri yapıldı.

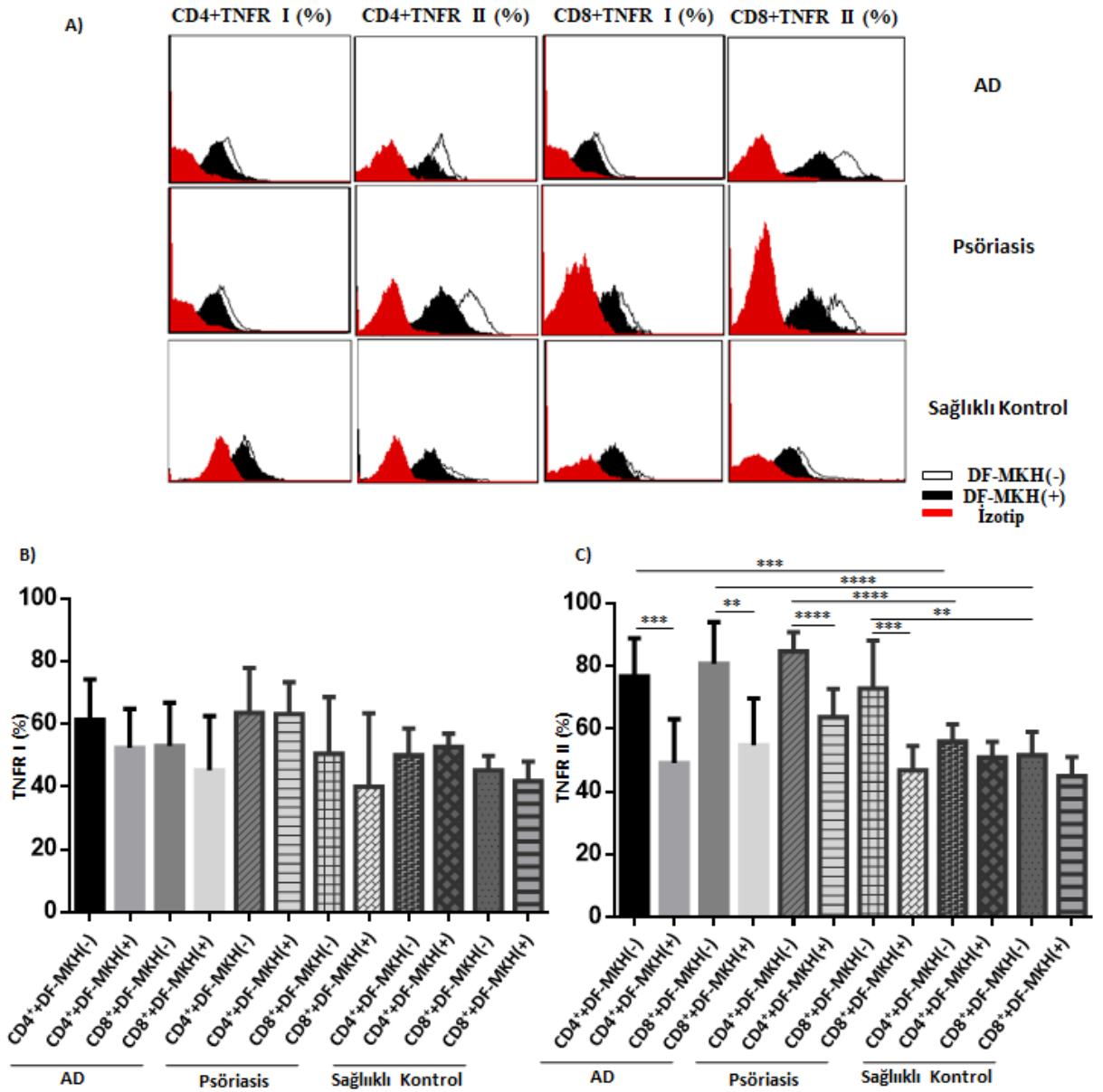
Elde edilen verilere göre; AD ve psöriasis hastalarında CD4⁺ hücreler üzerindeki TNFR I ifadesinde (61,41±5,27; 63,59±5,85) sağlıklı kontrol grubuna göre (50,58±7,35) istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (P=0,1027; P=0,752). AD hastalarında CD4⁺ hücreler üzerindeki TNFR I ifadesinde DF MKH varlığında (52,43±5,09) DF-MKH olmayan gruba göre (61,41±5,27) istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (P=0,2485). Psöriasis hastalarında CD4⁺ hücreler üzerindeki TNFR I ifadesinde DF MKH varlığında (63,22±4,14) DF-MKH olmayan gruba göre (63,59±5,85) istatistiksel bir fark görülmedi (P=0,9597). Sağlıklı kontrol grubunda CD4⁺ hücreler üzerindeki TNFR I ifadesinde DF-MKH varlığında (50,06±3,49) ve yokluğunda (52,73±1,73) gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (P=0,5084).

AD ve psöriasis hastalarında CD8⁺ hücreler üzerindeki TNFR I ifadesinde (53,08±5,61; 50,58±7,35) sağlıklı kontrol grubuna göre (45,32±1,84) istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (P=0,2182; P=0,5037). AD hastalarında DF MKH varlığında CD8⁺ hücreler üzerindeki TNFR I ifadesinde (45,32±7,04) DF-MKH olmayan gruba göre (53,08±5,61) istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (P=0,6089). Psöriasis hastalarında CD8⁺ hücreler üzerindeki TNFR I ifadesinde DF MKH varlığında (40,03±9,56) DF-MKH olmayan gruba göre (50,58±7,35) istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (P=0,4024). Sağlıklı kontrol grubunda CD8⁺ hücreler üzerindeki TNFR I ifadesinde DF-MKH varlığında (41,78±2,54) ve yokluğunda (45,32±1,84) gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi (P=0,2862).

Elde edilen verilere göre; AD ve psöriasis hastalarında CD4⁺ hücreler üzerindeki TNFR II ifadesi (76,75±4,29; 84,73±2,15) sağlıklı kontrol grubuna göre

(55,95±1,94) anlamlı olarak yüksek bulundu (P=,0006; P<0,0001). AD hastalarında CD4⁺ hücreler üzerindeki TNFR II ifadesi DF MKH varlığında (49,16±4,92) DF-MKH olmayan gruba göre (76,75±4,29) anlamlı olarak baskılandı (P=0,0009). Psöriasis hastalarında CD4⁺ hücreler üzerindeki TNFR II ifadesi DF MKH varlığında (63,73±3,19) DF-MKH olmayan gruba göre (80,68±4,72) anlamlı olarak baskılandı (P=0,0026). Sağlıklı kontrol grubunda CD4⁺ hücreler üzerindeki TNFR II ifadesi DF-MKH varlığında (50,87±1,76) ve yokluğunda (55,95±1,94) gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi (P=0,0726).

AD ve psöriasis hastalarında CD8⁺ hücreler üzerindeki TNFR II ifadesi (80,68±4,92; 72,88±5,27) sağlıklı kontrol grubuna göre (51,66±2,59) anlamlı olarak yüksek bulundu (P<0,0001; P=0,0032). AD hastalarında DF MKH varlığında CD8⁺ hücreler üzerindeki TNFR II ifadesi (49,16±4,92) DF-MKH olmayan gruba göre (80,68±4,92) anlamlı olarak baskılandı (P=0,0026). Psöriasis hastalarında CD8⁺ hücreler üzerindeki TNFR II ifadesi DF MKH varlığında (46,80±2,75) DF-MKH olmayan gruba göre (72,88±5,38) anlamlı olarak baskılandı (P=0,007). Sağlıklı kontrol grubunda CD8⁺ hücreler üzerindeki TNFR II ifadesi DF-MKH varlığında (44,93±2,15) ve yokluğunda (51,66±2,59) gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi (p=0,0661). (Şekil 17)



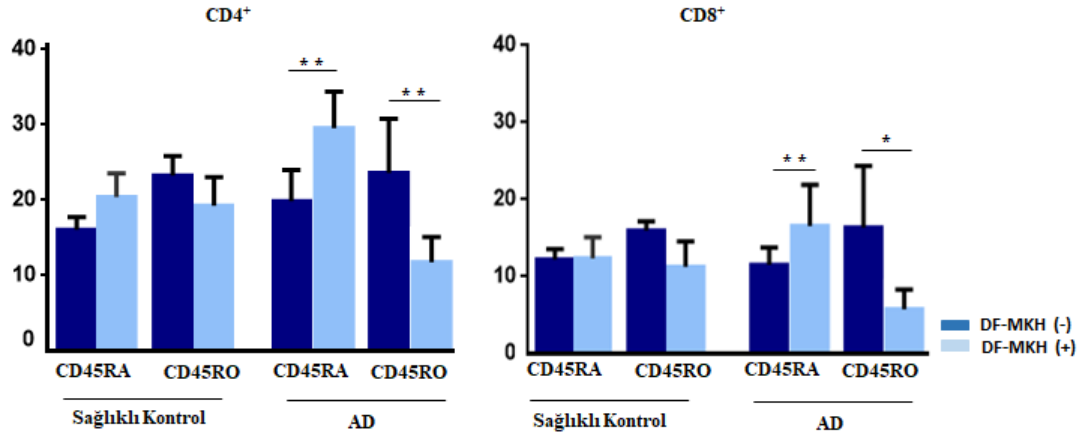
Şekil 17. CD4⁺ T lenfosit ve CD8⁺ T lenfosit üzerindeki TNFR I ve II ifadesi. A) AD, Psöriasis hastalar ve sağlıklı bireylerde DF-MKH varlığında ve yokluğunda CD4⁺ ve CD8⁺ lenfositler üzerindeki TNFR I ve TNFR II ifadesinin akım sitometri ile gösterimi. TNFR I ve TNFR II ile işaretlenen Lenfositler overlay olarak gösterildi B) DF-MKH'ler AD ve Psöriasis hastalarında CD4⁺ ve CD8⁺ hücreleri üzerindeki TNFR II ekspresyonunu anlamlı olarak baskıladı. DF-MKH varlığında ve yokluğunda sağlıklı bireylerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. *P<0,05; **P<0,01, ***P<0,001, ****P<0,0001.

6.9. DF-MKH'ler AD hastalarında CD4⁺CD45RA⁺ ve CD8⁺CD45RA⁺ naive T hücre oranını arttırırken CD4⁺CD45RO⁺ ve CD8⁺CD45RO⁺ bellek hücre oranını düşürdü.

Bu çalışmada, DF-MKH'lerin AD hastalarının CD4⁺ T ve CD8⁺ T lenfositlerde naive ve bellek fenotiplerinin oranı üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre; AD hastalarında DF-MKH varlığında CD4⁺CD45RA⁺ naive T hücre oranı (29,54±1,84) DF-MKH olmayan gruba göre (19,83±1,58) istatistiksel olarak anlamlı arttı (P=0,0018). Sağlıklı kontrol grubunda CD4⁺CD45RA⁺ naive T hücre oranında DF-MKH varlığında (20,42±1,57) DF-MKH olmayan gruba göre (16,09±0,85) anlamlı bir fark görülmedi (P=0,0513). AD hastalarında DF-MKH varlığında CD4⁺CD45RO⁺ bellek T hücre oranı (11,80±1,25) DF-MKH olmayan gruba göre (23,61±2,71) istatistiksel olarak anlamlı azaldı (P=0,0019). Sağlıklı kontrol grubunda CD4⁺CD45RO⁺ bellek T hücre oranında DF-MKH varlığında (19,30±1,87) DF-MKH olmayan gruba göre (23,29±1,29) anlamlı bir fark görülmedi (P=0,1302).

AD hastalarında DF-MKH varlığında CD8⁺CD45RA⁺ naive T hücre oranı (16,59±2,01) DF-MKH olmayan gruba göre (11,52±0,84) istatistiksel olarak anlamlı arttı (P=0,0382). Sağlıklı kontrol grubunda CD8⁺CD45RA⁺ naive T hücre oranında DF-MKH varlığında (12,39±1,35) DF-MKH olmayan gruba göre (12,21±0,69) anlamlı bir fark görülmedi (P=0,9071). AD hastalarında DF-MKH varlığında CD8⁺CD45RO⁺ bellek T hücre oranı (5,76±0,96) DF-MKH olmayan gruba göre (16,38±3,01) istatistiksel olarak anlamlı düştü (P=0,0057). Sağlıklı kontrol grubunda CD8⁺CD45RO⁺ naive T hücre oranında DF-MKH varlığında (11,27±1,64) DF-MKH olmayan gruba göre (15,97±0,1 anlamlı bir fark görülmedi (P=0,0568). (Şekil 18)



Şekil 18. DF-MKH varlığında ve yokluğunda CD4⁺ CD45RA⁺ naive T, CD8⁺ CD45RA⁺ naive T, CD4⁺ CD45RO⁺ bellek T ve CD8⁺ CD45RO⁺ bellek T lenfositlerin oranı. AD hastalarında DF-MKH varlığında CD4⁺ CD45RA⁺ naive T ve CD8⁺ CD45RA⁺ naive T lenfositler oranı artarken CD4⁺ CD45RO⁺ bellek T ve CD8⁺ CD45RO⁺ bellek T lenfositlerin oranı azaldı. *P<0,05; **P<0,01.

6.10. DF-MKH'ler AD hastalarında CD4⁺CD45RA⁺ ve CD8⁺CD45RA⁺ naive T hücre üzerindeki Fas oranını düşürdü.

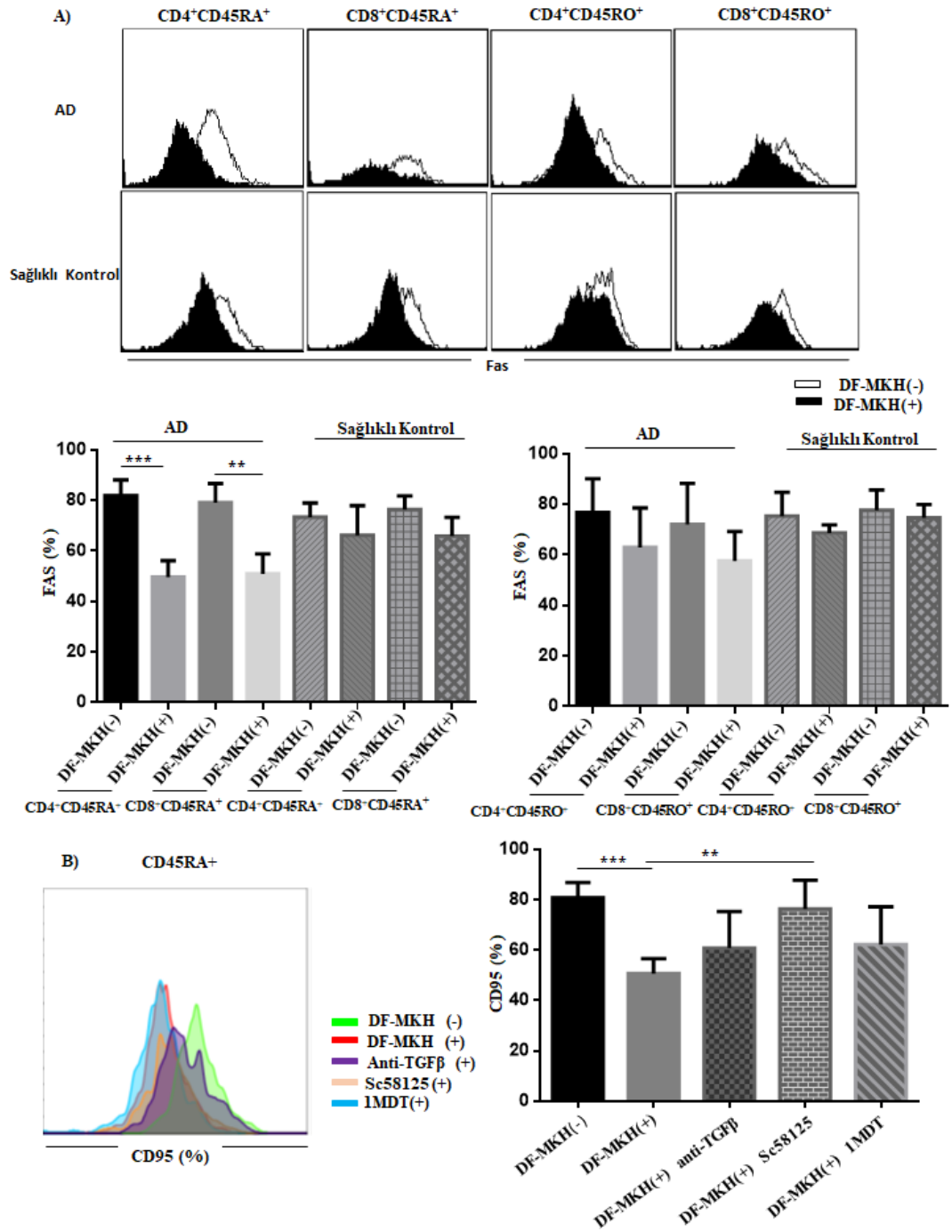
Bu çalışmada, DF-MKH'lerin AD hastalarının CD4⁺ T ve CD8⁺ T lenfositlerde naive ve bellek fenotiplerinin üzerindeki Fas ifadesini araştırılmıştır.

Elde edilen verilere göre, AD hastalarında DF-MKH varlığında CD4⁺CD45RA⁺ naive lenfositler üzerindeki Fas yüzdesi (49,88±3,22) DF-MKH olmayan gruba göre (81,88±1,14) anlamlı olarak düşük bulundu (P=0,0004). Bu hastalarda DF-MKH varlığında CD8⁺CD45RA⁺ lenfositler üzerindeki Fas yüzdesi (50,93±3,95) DF-MKH olmayan gruba göre (79,11±3,81) anlamlı olarak yüksek bulundu (P=0,0021). Sağlıklı kontrollerde DF-MKH varlığında CD4⁺CD45RA⁺ naive lenfositler üzerindeki Fas yüzdesi (66,23±5,87) DF-MKH olmayan gruba göre (73,40±2,79) anlamlı olarak düşük bulundu (P=0,3125). Bu hastalarda DF-MKH varlığında CD8⁺CD45RA⁺ lenfositler üzerindeki Fas yüzdesi (65,90±3,69) DF-MKH olmayan gruba göre (76,36±2,73) anlamlı olarak yüksek bulundu (P=0,0628).

Elde edilen verilere göre, AD hastalarında DF-MKH varlığında CD4⁺CD45RO⁺ naive lenfositler üzerindeki Fas yüzdesi (62,95±7,82) DF-MKH olmayan gruba göre (76,78±6,69) anlamlı olarak düşük bulundu (P=0,0004). Bu hastalarda DF-MKH

varlığında CD8⁺CD45RO⁺ lenfositler üzerindeki Fas yüzdesi (57,61±5,86) DF-MKH olmayan gruba göre (72,03±8,12) anlamlı olarak yüksek bulundu (P=0,2001). Sağlıklı kontrollerde DF-MKH varlığında CD4⁺CD45RO⁺ naive lenfositler üzerindeki Fas yüzdesi (68,70±1,60) DF-MKH olmayan gruba göre (75,37±4,71) anlamlı olarak düşük bulundu (P=0,2287). Bu hastalarda DF-MKH varlığında CD8⁺CD45RO⁺ lenfositler üzerindeki Fas yüzdesi (74,73±2,60) DF-MKH olmayan gruba göre (77,71±3,99) anlamlı olarak yüksek bulundu (P=0,5550).

CD45RA⁺ naive T lenfosit kültürlerinde Fas ifadesinin baskılanmasında rolü olan faktörü belirlemek için TGF β , PGE-2 ve IDO blokajı yapıldı. Elde edilen verilere göre, PGE-2 yolağının bloke edildiği (Sc58125) DF-MKH kültürlerinde CD45RA⁺ naive T lenfosit üzerindeki Fas ifadesi istatistiksel olarak anlamlı arttı (DF-MKH: 49,66±3,22; DF-MKH+Sc52125: 76,32±5,71; P=0,0066). DF-MKH'lerin TGF- β ile nütrolize ve IDO ile blokajı yapılan kültürlerde DF-MKH kültürlerine göre Fas ifadesinde anlamlı bir fark görülmedi (DF-MKH: 49,66±3,22; DF-MKH+anti-TGF β : 60,76±7,28; DF-MKH+Sc58125: 62,20±7,52) . (Şekil 19)



Şekil 19. DF-MKH varlığında ve yokluğunda $CD4^+$ $CD45RA^+$ naive T, $CD8^+$ $CD45RA^+$ naive T, $CD4^+$ $CD45RO^+$ bellek T ve $CD8^+$ $CD45RO^+$ bellek T lenfositlerin üzerindeki Fas oranı. **A)** AD hastalarında DF-MKH varlığında $CD4^+$ $CD45RA^+$ naive T ve $CD8^+$ $CD45RA^+$ naive T lenfositler üzerindeki Fas oranı azalırken $CD4^+$ $CD45RO^+$ bellek T ve $CD8^+$ $CD45RO^+$ bellek T lenfositlerin üzerindeki Fas oranı değişmedi. **B)** $CD45RA^+$ naive lenfositlerin üzerindeki Fas oranı PGE-2 blokajı yapılan kültürlerde anlamlı olarak arttı. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

6.11. DF-MKH'ler AD hastalarında CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regülatör T hücre oranını arttırdı. DF-MKH AD immün yanıtlarını TGF-β ve PGE-2 ile baskıladı.

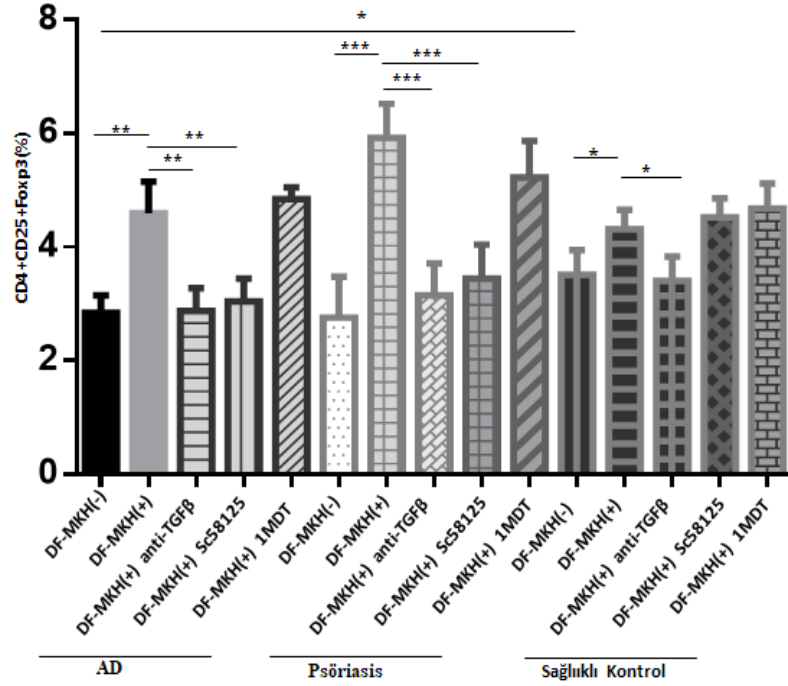
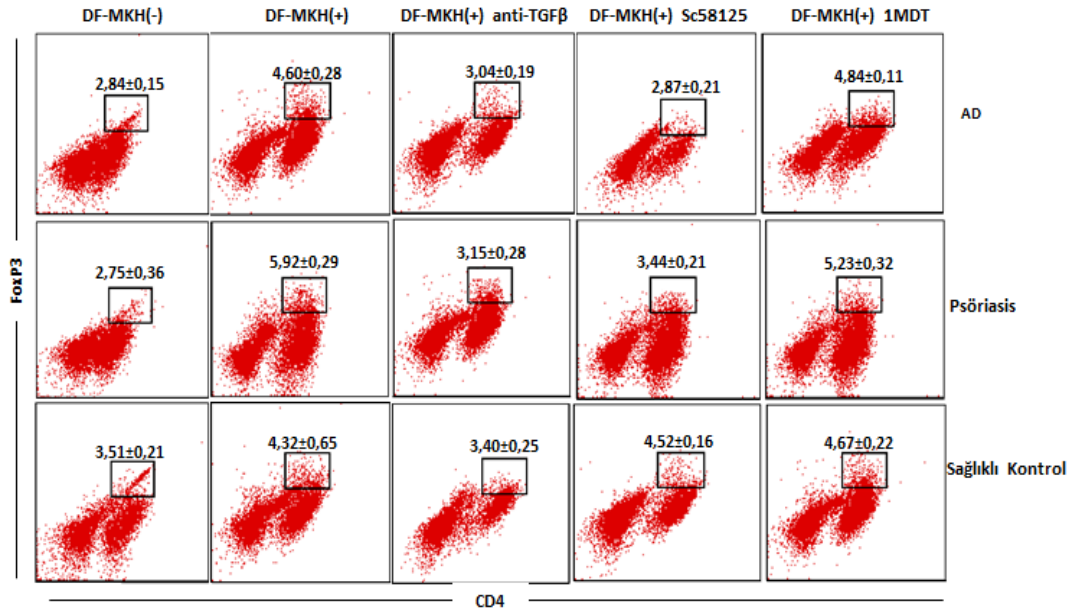
Bu çalışmada DF-MKH hücrelerinin CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regülatör hücreleri üzerine etkisi araştırıldı ayrıca DF-MKH'lerin immün düzenleyici mediatörlerini belirlemek için DF-MKH varlığında kültür besiyerine anti-TGF-β eklenerek çözülmüş TGF-β nötralize edildi, 1-metil-D-triptofan (1-MDT) eklenerekIDO yolağı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

Elde edilen verilere göre, AD hastalarında CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regülatör hücre oranı (2,84±0,15) sağlıklı kontrol grubuna göre (3,51±0,21) istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu (P=0,04). AD hastalarında, DF-MKH varlığında CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regülatör hücre oranı (4,6±0,28) DF-MKH olmayan gruba göre (2,84±0,15) anlamlı olarak arttı (P=0,0014). AD hastalarında DF-MKH varlığında anti-TGFβ ile nötrölyze edilen kültürlerde CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regülatör hücre oranı (3,04±0,19) nötrölyze edilmeyen DF-MKH kültüre göre (4,6±0,28) anlamlı olarak düştü (P=0,0037). AD hastalarında DF-MKH varlığında sc-58125 ile bloke edilen kültürlerde CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regülatör hücre oranı (2,87± 0,21) bloke edilmeyen DF-MKH kültüre göre (4,6±0,28) anlamlı olarak düştü (P=0,0023). AD hastalarında DF-MKH varlığında 1-MDT ile bloke edilen kültürlerde CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regülatör hücre oranında (4,84± 0,11) bloke edilmeyen DF-MKH kültüre göre (4,6±0,28) anlamlı bir fark görülmedi (P=0,4386).

Elde edilen verilere göre, Psöriasis hastalarında CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regülatör hücre oranında (2,75±0,36) sağlıklı kontrol grubuna göre (3,51±0,21) istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (P=0,1232). Psöriasis hastalarında, DF-MKH varlığında CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regülatör hücre oranı (5,92±0,29) DF-MKH olmayan gruba göre (2,75±0,36) anlamlı olarak arttı (P=0,005). AD hastalarında DF-MKH varlığında anti-TGFβ ile nötrölyze edilen kültürlerde CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T

regülatör hücre oranı ($3,15 \pm 0,28$) nötrölize edilmeyen DF-MKH kültüre göre ($5,92 \pm 0,29$) anlamlı olarak düştü ($P=0,0005$). Psöriasis hastalarında DF-MKH varlığında sc-58125 ile bloke edilen kültürlerde $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranı ($3,44 \pm 0,29$) bloke edilmeyen DF-MKH kültüre göre ($5,92 \pm 0,29$) anlamlı olarak düştü ($P=0,0011$). Psöriasis hastalarında DF-MKH varlığında 1-MDT ile bloke edilen kültürlerde $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranında ($5,23 \pm 0,32$) bloke edilmeyen DF-MKH kültüre göre ($5,92 \pm 0,29$) anlamlı bir fark görülmedi ($P=0,1621$).

Sağlıklı kontrol grubunda, DF-MKH varlığında $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranı ($4,32 \pm 0,02$) DF-MKH olmayan gruba göre ($3,51 \pm 0,21$) anlamlı olarak arttı ($P=0,0264$). Sağlıklı kontrol grubunda DF-MKH varlığında anti-TGF β ile nötrölize edilen kültürlerde $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranı ($3,4 \pm 0,25$) nötrölize edilmeyen DF-MKH kültüre göre ($4,32 \pm 0,02$) anlamlı olarak düştü ($P=0,0156$). Sağlıklı kontrol grubunda DF-MKH varlığında sc-58125 ile bloke edilen kültürlerde $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranında ($4,52 \pm 0,16$) bloke edilmeyen DF-MKH kültüre göre ($4,32 \pm 0,02$) anlamlı bir fark görülmedi ($P=0,4219$). Sağlıklı kontrol grubunda DF-MKH varlığında 1-MDT ile bloke edilen kültürlerde $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regülatör hücre oranında ($4,67 \pm 0,22$) bloke edilmeyen DF-MKH kültüre göre ($4,32 \pm 0,02$) anlamlı bir fark görülmedi ($P=0,1621$). (Şekil 20)



Şekil 20. CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regülasyon hücre oranları. A) AD, Psöriasis ve sağlıklı kontrol gruplarında CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regülasyon hücre oranlarının akım sitometri görünümü. B) AD, Psöriasis ve sağlıklı bireylerde DF-MKH varlığında CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regülasyon hücre oranları istatistiksel olarak anlamlı arttı. AD ve Psöriasis hastalarında DF-MKH varlığında anti-TGFβ ve Sc58125 ilave edilen kültürlerde CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regülasyon hücre oranları istatistiksel olarak anlamlı düştü. Sağlıklı kontrol gruplarında DF-MKH varlığında anti-TGFβ ilave edilen kültürlerde CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regülasyon hücre oranları istatistiksel olarak anlamlı düştü. *P<0,05; **P<0,01, ***P<0,001.

6.12. DF-MKH AD hastalarında IL-4 düzeylerini azalttı, IFN- γ ve IL-10 düzeylerini artırdı.

Bu çalışmada, DF-MKH'lerin AD ve Psöriasis hastalarında periferal kandan izole edilen mononükleer hücrelerin içinde Th1 ve Th2 farklılaşmasındaki etkisini ve immün düzenlemedeki etkisini araştırmak amacıyla L-6, TNF- α , IL-4, IL-17A, IL-10 ve IFN- γ sitokin miktarları incelendi. Sitokin miktarları 72 saat kültür süresinin sonunda toplanan kültür süpernatantlarından akım sitometri cihazı ile analiz edildi.

Elde edilen verilere göre; AD hastalarında IL17A seviyesinde ($443,7\pm 21,25$) sağlıklı bireylere göre ($523,5\pm 63,85$) anlamlı bir fark görülmedi ($P=0,4159$). AD hastalarında DF- MKH varlığında ($134,4\pm 23,34$) IL-17A seviyesi DF-MKH olmayan gruba göre ($443,7\pm 21,25$) anlamlı olarak baskıladı ($P<0001$). AD hastalarında DF-MKH varlığında anti-TGF β , Sc28125 ve 1 MDT ile nötrölize edilen kültürlerde IL-17A seviyesi ($142,7\pm 41,47$; $150,6\pm 32,49$; $153,5\pm 39,12$) DF-MKH olmayan gruba göre ($443,7\pm 21,25$) anlamlı bir azalma gösterdi ($P=0,007$; $P=0,003$; $P=0,006$). Psöriasis hastalarında IL-17A seviyesi ($922,81\pm 156,2$) sağlıklı bireylere göre ($523,5\pm 63,85$) anlamlı olarak yüksek bulundu ($P=0,0408$). Psöriasis hastalarında DF-MKH varlığında ($146,4\pm 34,81$) IL-17A seviyesi DF-MKH olmayan gruba göre ($922,81\pm 156,2$) anlamlı olarak baskıladı ($P=0,0013$). Psöriasis hastalarında DF-MKH varlığında anti-TGF β , Sc28125 ve 1 MDT ile nötrölize edilen kültürlerde IL-17A seviyesi ($169,1\pm 53,95$; $198,2\pm 68,07$; $173,1\pm 39,19$) DF-MKH olmayan gruba göre ($922,81\pm 156,2$) anlamlı olarak baskılandı ($P=0,002$; $P=0,003$; $P=0,002$). Sağlıklı bireylerde DF-MKH varlığında ($626\pm 98,39$) ve yokluğunda ($523,5\pm 63,85$) IL-17 A seviyesinde anlamlı bir fark görülmedi ($P=0,1916$).

Elde edilen verilere göre; AD hastalarında IFN- γ seviyesi ($1152\pm 185,4$) sağlıklı bireylere göre ($2905\pm 110,6$) anlamlı olarak düşük bulundu ($P=0,0002$). AD hastalarında DF- MKH varlığında ($2622\pm 272,7$) IFN- γ seviyesi DF-MKH olmayan gruba göre ($1152\pm 185,4$) anlamlı olarak yükseldi ($P=0,0043$). AD hastalarında DF-MKH varlığında anti-TGF β , Sc28125 ve 1 MDT ile nötrölize edilen kültürlerde IFN- γ seviyesi (2509 ± 230 ; $2538\pm 281,6$; $2704\pm 296,3$) DF-MKH olmayan kültüre ($1152\pm 185,4$) göre anlamlı olarak arttı ($P=0,0037$; $P=0,0063$; $P=0,0044$). Psöriasis

hastalarında IFN- γ seviyesi (4182 \pm 196,4) sağlıklı bireylere göre (2905 \pm 110,6) anlamlı olarak yüksek bulundu (P=0.0013). Psöriasis hastalarında DF- MKH varlığında (3338 \pm 153,4) IFN- γ seviyesinde DF-MKH olmayan gruba göre (4182 \pm 196,4) anlamlı olarak baskıladı (P=0,0148). Psöriasis hastalarında DF-MKH varlığında anti-TGF β , Sc28125 ve 1 MDT ile nötrölize edilen kültürlerde IFN- γ seviyesinde (3554 \pm 250; 3603 \pm 137,3; 3465 \pm 173,9) DF-MKH olmayan kültürlerle göre (4182 \pm 196,4) anlamlı bir fark göstermedi (P=0,5211; P=0,6418; P=0,3214). Sağlıklı bireylerde DF-MKH varlığında (3203 \pm 76,01) ve yokluğunda (2905 \pm 110,6) IFN- γ seviyesinde anlamlı bir fark görülmedi (P=0,0677).

Elde edilen verilere göre; AD hastalarında TNF- α seviyesi (617,7 \pm 156,6) sağlıklı bireylere göre (809,4 \pm 74,40) anlamlı bir fark göstermedi (P=0.3030). AD hastalarında DF- MKH varlığında (21,60 \pm 6,21) TNF- α seviyesi DF-MKH olmayan gruba göre (617,7 \pm 156,6) anlamlı olarak baskılandı (P=0,009). AD hastalarında DF- MKH varlığında anti-TGF β , Sc28125 ve 1 MDT ile nötrölize edilen kültürlerde TNF- α seviyesi (25,19 \pm 6,58; 23,41 \pm 6,32; 20,87 \pm 6,74) DF-MKH olmayan kültüre göre (617,7 \pm 156,6) anlamlı olarak baskılandı (P=0,2437; P=0,3263; P=0,2844). Psöriasis hastalarında TNF- α seviyesi (1261 \pm 97,09) sağlıklı bireylere göre (617,7 \pm 156,6) anlamlı olarak yüksek bulundu (P=0.0103). Psöriasis hastalarında DF- MKH varlığında (302,2 \pm 74,27) TNF- α seviyesi DF-MKH olmayan gruba göre (1261 \pm 97,09) anlamlı olarak baskıladı (P=0,0002). Psöriasis hastalarında DF-MKH varlığında anti-TGF β , Sc28125 ve 1 MDT ile nötrölize edilen kültürlerde TNF- α seviyesinde (249,6 \pm 63,92; 299,3 \pm 74,94; 241,9 \pm 84,16) DF-MKH olmayan kültüre göre (1261 \pm 97,09) anlamlı olarak baskılandı (P=0,6211; P=0,6478; P=0,5023). Sağlıklı bireylerde DF-MKH varlığında TNF- α seviyesi (515,2 \pm 60,71) DF-MKH olmayan gruba göre (515 \pm 60,71) anlamlı olarak baskıladı (P=0,0221).

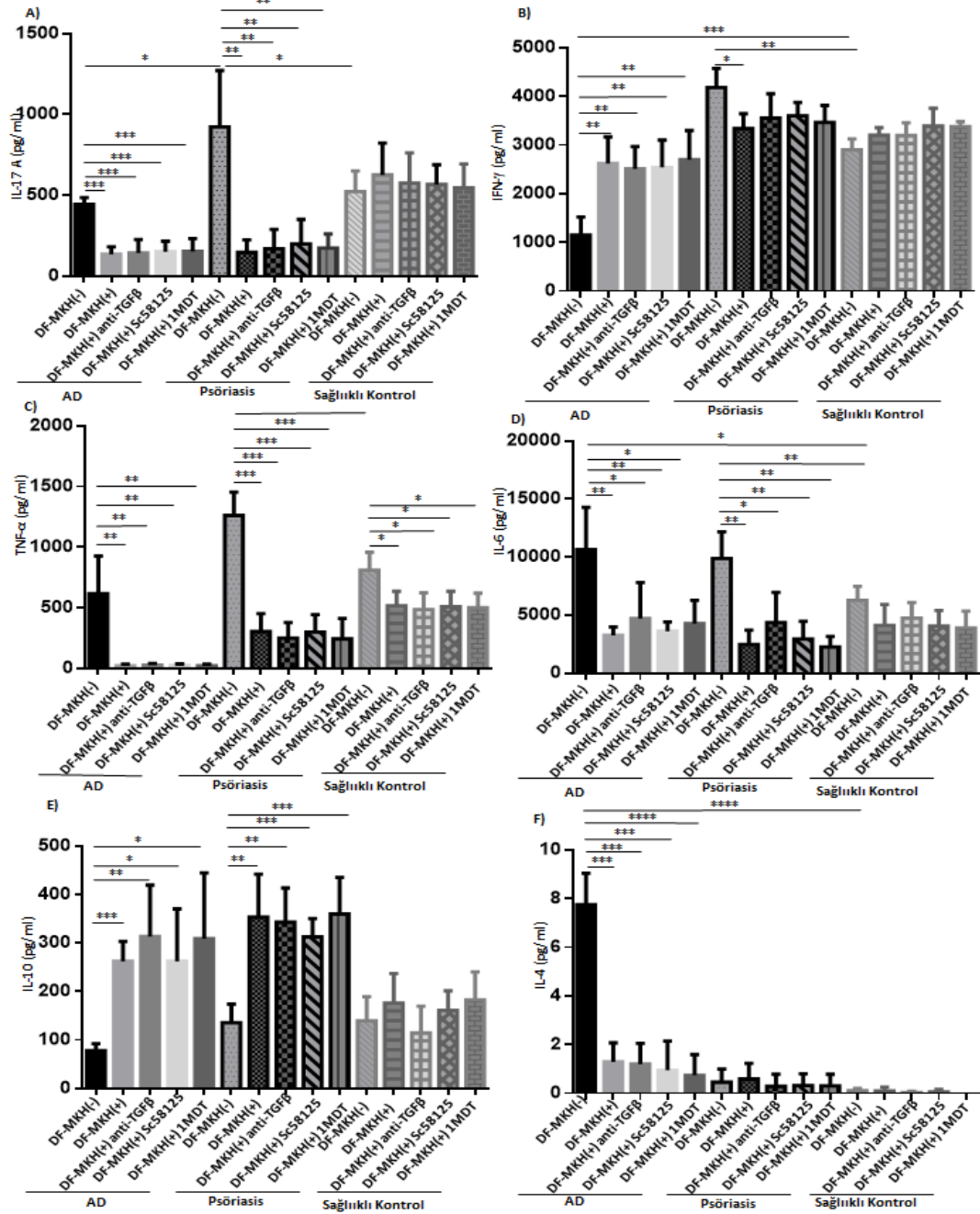
Elde edilen verilere göre; AD hastalarında IL-6 seviyesi (10654 \pm 1819) sağlıklı bireylere göre (6270 \pm 600) anlamlı olarak yüksek bulundu (P=0,0320). AD hastalarında DF- MKH varlığında (3254 \pm 363,3) IL-6 seviyesi DF-MKH olmayan gruba göre (10654 \pm 1819) anlamlı olarak baskılandı (P=0,0072). AD hastalarında DF- MKH varlığında anti-TGF β , Sc28125 ve 1 MDT ile nötrölize edilen kültürlerde IL-6 seviyesi (4706 \pm 1552; 3630 \pm 3630; 4278 \pm 1001) DF-MKH olmayan kültüre göre

(10654±1819) anlamlı olarak baskılandı (P=0,0473; P=0,0093; P=0,0219). Psöriasis hastalarında IL-6 seviyesi (9870±1161) sağlıklı bireylere göre (617,7±156,6) anlamlı olarak yüksek bulundu (P=0,0103). Psöriasis hastalarında DF- MKH varlığında (2480±613,8) IL-6 seviyesi DF-MKH olmayan gruba göre (9870±1161) anlamlı olarak baskıladı (P=0,0013). Psöriasis hastalarında DF-MKH varlığında anti-TGFβ, Sc28125 ve 1 MDT ile nötrölize edilen kültürlerde IL-6 seviyesi (4352±1299; 2941±770; 2263±454,9) DF-MKH olmayan kültüre göre (9870±1161) anlamlı olarak baskılandı (P=0,0194; P=0,0025; P=0,0009). Sağlıklı bireylerde DF-MKH varlığında IL-6 seviyesinde (4116±895,5) DF-MKH olmayan gruba göre (6270±600) anlamlı bir fark görülmedi (P=0,0926).

Elde edilen verilere göre; AD hastalarında IL-10 seviyesinde (78,08±7,21) sağlıklı bireylere göre (139,4±25,06) anlamlı bir fark bulunmadı (P=0,0569). AD hastalarında DF- MKH varlığında (262,4±20,43) IL-10 seviyesi DF-MKH olmayan gruba göre (78,08±7,21) anlamlı olarak arttı (P=0,0001). AD hastalarında DF-MKH varlığında anti-TGFβ, Sc28125 ve 1 MDT ile nötrölize edilen kültürlerde IL-10 seviyesi (313,5±52,87; 262,3±53,85; 309,2±67,67) DF-MKH olmayan kültüre göre (78,08±7,21) anlamlı olarak arttı (P=0,0045; P=0,0147; P=0,0146). Psöriasis hastalarında IL-10 seviyesinde (135,8±19,20) sağlıklı bireylere göre (139,4±25,06) anlamlı bir fark bulunmadı (P=0,9117). Psöriasis hastalarında DF- MKH varlığında (353±44,39) IL-10 seviyesi DF-MKH olmayan gruba göre (135,8±4,39) anlamlı olarak baskıladı (P=0,0013). Psöriasis hastalarında DF-MKH varlığında anti-TGFβ, Sc28125 ve 1 MDT ile nötrölize edilen kültürlerde IL-10 seviyesi (342,7±35,46; 312,5±18,92; 360±37,57) DF-MKH olmayan kültüre göre (135,4±19,20) anlamlı olarak arttı (P=0,0194; P=0,0025; P=0,0009). Sağlıklı bireylerde DF-MKH varlığında IL-10 seviyesinde (175,9±30,44) DF-MKH olmayan gruba göre (139,4±25,06) anlamlı bir fark görülmedi (P=0,0926).

Elde edilen verilere göre; AD hastalarında IL-4 seviyesi (7,75±0,15) sağlıklı bireylere göre (0,12±0,04) anlamlı olarak yüksek bulundu (P<0,0001). AD hastalarında DF- MKH varlığında (1,29±0,39) IL-4 seviyesi DF-MKH olmayan gruba göre (7,75±0,15) anlamlı olarak baskılandı (P=0,0001). AD hastalarında DF- MKH varlığında anti-TGFβ, Sc28125 ve 1 MDT ile nötrölize edilen kültürlerde IL-4

seviyesi ($1,21\pm0,42$; $0,95\pm0,39$; $0,76\pm0,64$) DF-MKH olmayan kültüre göre ($7,75\pm0,15$) anlamlı olarak baskılandı ($P=0,0001$; $P=0,0002$; $P<0,0001$). Psöriasis hastalarında IL-4 seviyesinde ($0,46\pm0,27$) sağlıklı bireylere göre ($0,12\pm0,04$) anlamlı bir fark bulunmadı ($P=0,9117$). Psöriasis hastalarında DF- MKH varlığında ($0,59\pm0,32$) IL-4 seviyesinde DF-MKH olmayan gruba göre ($0,46\pm0,27$) anlamlı bir fark görülmedi ($P=0,7721$). Psöriasis hastalarında DF-MKH varlığında anti-TGF β , Sc28125 ve 1 MDT ile nötrölize edilen kültürlerde IL-4 seviyesinde ($0,29\pm0,25$; $0,32\pm0,24$; $0,31\pm0,23$) DF-MKH olmayan kültüre göre ($0,46\pm0,27$) anlamlı bir fark görülmedi ($P=0,6585$; $P=0,07141$; $P=6898$). Sağlıklı bireylerde DF-MKH varlığında IL-4 seviyesinde ($0,05\pm0,08$) DF-MKH olmayan gruba göre ($0,12\pm0,04$) anlamlı bir fark görülmedi ($P=0,8246$). (Şekil 21)



Şekil 21. AD, Psöriasis ve Sağlıklı Kontrollerde IL-17A, IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-10 ve IL-4 DF-MKH varlığında ve yokluğunda istatistiksel olarak gösterimi. AD hastalarında DF-MKH varlığında IL-17A (A), TNF- α (C), IL-6 (D) ve IL-4 (F) anlamlı olarak azalırken IFN- γ (B) ve IL-10 (E) seviyesi anlamlı olarak arttı. Psöriasis hastalarında IL-17A (A), IFN- γ (B), TNF- α (C), IL-6 (D) seviyesi anlamlı olarak azalırken IL-10 (E) seviyesi anlamlı olarak arttı. *P<0,05; **P<0,01, ***P<0,001, ****P<0,0001.

6.13. DF-MKH AD hastalarında GATA-3 ekspresyonunu azalttı, Tbet ve FoxP3 ekspresyonunu artırdı.

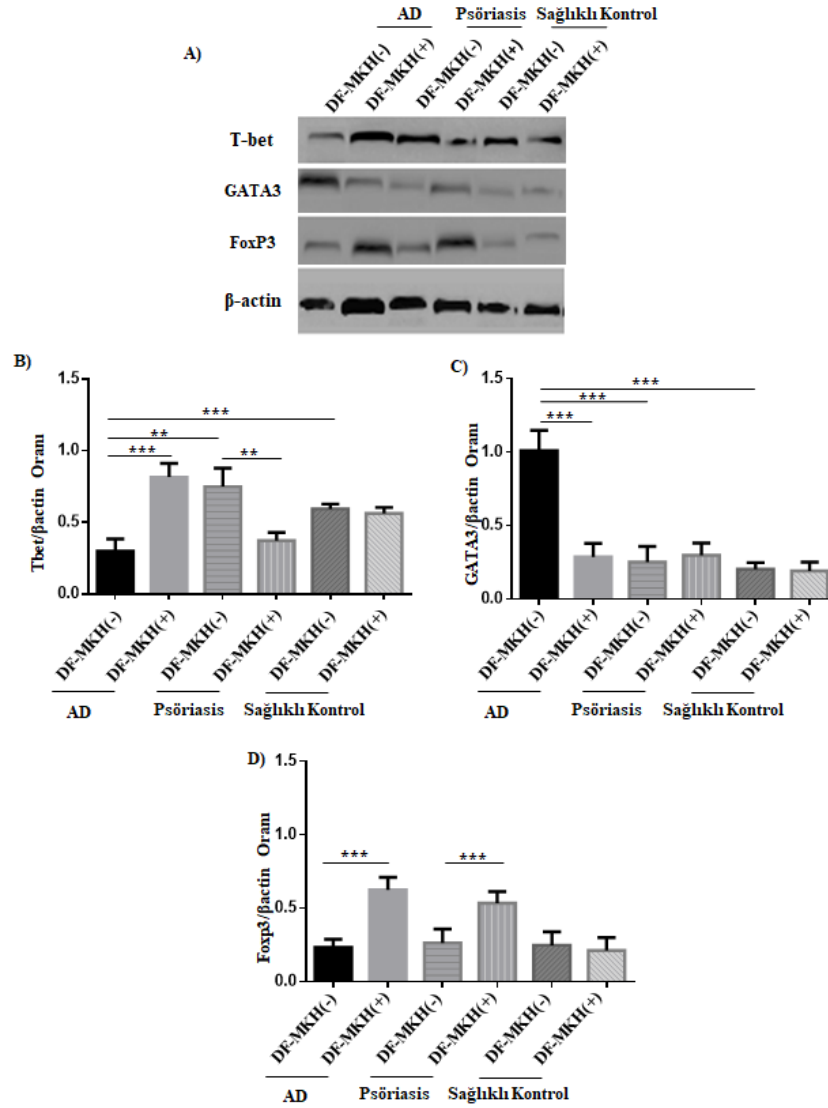
Çalışmamızda, DF-MKH'lerin AD hastalarında Th1 ve Th2 farklılaşması üzerine etkisini ve immün düzenlemedeki etkisini araştırmak amacıyla 3 farklı transkripsiyon faktörünün (GATA-3, Tbet ve FoxP3) ekspresyonu incelendi. Transkripsiyon faktörleri için PKMH kültürlerinden 72 saat sonra protein izolasyonu yapıldı. Protein hatları β -aktin'e normalize edilerek analiz edildi.

Elde edilen sonuçlara göre, Tbet ekspresyonu Th2 baskın AD hastalarında ($0,30\pm 0,04$) Th1/Th17 baskın Psöriasis hastaları ve sağlıklı kontrol grubuna göre ($0,75\pm 0,06$; $0,59\pm 0,02$) istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu ($P=0,0012$; $P=0,0007$). AD hastalarında DF-MKH varlığında Tbet ekspresyonu ($0,81\pm 0,05$) DF-MKH olmayan gruba göre ($0,3\pm 0,04$) istatistiksel olarak anlamlı arttı ($P=0,0002$). Psöriasis hastalarında DF-MKH varlığında Tbet ekspresyonu ($0,75\pm 0,06$) DF-MKH olmayan gruba göre ($0,37\pm 0,03$) istatistiksel olarak anlamlı arttı ($P=0,0018$). Sağlıklı kontrollerde Tbet ekspresyonu DF-MKH varlığında ve yokluğunda anlamlı bir fark göstermedi ($P=0,2796$).

GATA3 ekspresyonu Th2 baskın AD hastalarında ($0,98\pm 0,08$) Th1/Th17 baskın Psöriasis hastaları ve sağlıklı kontrol grubuna göre ($0,25\pm 0,05$; $0,20\pm 0,02$) istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($P=0,0003$; $P=0,0001$). AD hastalarında DF-MKH varlığında GATA3 ekspresyonu ($0,34\pm 0,08$) DF-MKH olmayan gruba göre ($0,98\pm 0,08$) istatistiksel olarak anlamlı arttı ($P=0,0003$). Psöriasis hastalarında DF-MKH varlığında GATA3 ekspresyonu ($0,29\pm 0,04$) DF-MKH olmayan gruba göre ($0,25\pm 0,05$) bir fark göstermedi ($P=0,0018$). Sağlıklı kontrollerde GATA3 ekspresyonu DF-MKH varlığında ve yokluğunda anlamlı bir fark göstermedi ($P=0,2796$).

Foxp3 ekspresyonu Th2 baskın AD hastalarında ($0,23\pm 0,03$) Th1/Th17 baskın Psöriasis hastaları ve sağlıklı kontrol grubuna göre ($0,26\pm 0,05$; $0,25\pm 0,05$) anlamlı bir fark göstermedi ($P=0,0012$; $P=0,0007$). AD hastalarında DF-MKH varlığında Foxp3 ekspresyonu ($0,62\pm 0,04$) DF-MKH olmayan gruba göre ($0,23\pm 0,03$)

istatistiksel olarak anlamlı arttı ($P = 0,0002$). Psöriasis hastalarında DF-MKH varlığında Foxp3 ekspresyonu ($0,53 \pm 0,04$) DF-MKH olmayan gruba göre ($0,26 \pm 0,05$) istatistiksel olarak anlamlı arttı ($P = 0,0042$). Sağlıklı kontrollerde Foxp3 ekspresyonu DF-MKH varlığında ve yokluğunda anlamlı bir fark göstermedi ($P = 0,5429$). (Şekil 22)



Şekil 22. DF-MKH varlığında ve yokluğunda AD, Psöriasis ve sağlıklı kontrol gruplarında Tbet, GATA3 ve Foxp3 ekspresyonu. **A)** Hasta ve kontrol gruplarında Tbet, GATA3 ve Foxp3 bant görünümü. **B)** DF-MKH varlığında Tbet ekspresyonu AD hastalarında artarken Psöriasis hastalarında anlamlı olarak azaldı. **C)** DF-MKH varlığında GATA3 ekspresyonu AD hastalarında anlamlı olarak düştü. **D)** DF-MKH varlığında Foxp3 ekspresyonu AD ve Psöriasis hastalarında anlamlı olarak arttı. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

AD en sık görülen kronik iltihaplı deri hastalığıdır. Bu hastalığın görülme sıklığı yetişkinlerde %7'ye kadar varmaktadır (Bieber, 2010; Weidinger ve Novak, 2016). AD zamanımızda T hücre aracılı bir deri inflamatuvar hastalığı olarak kabul edilmektedir. Hastalığı kontrol etme ve klinik semptomları azaltma amacıyla T hücrelerini hedefleyen; siklosporin, oral glukokortikosteroidler ve fototerapi (dar bant UVB) tedavisi gibi geniş terapötikler kullanılmaktadır (Hijnen ve ark., 2007; Tintle ve ark., 2011; Khattri ve ark., 2014). Ancak, siklosporin ve glukokortikosteroidlerin çoklu yan etkisi nedeniyle uzun süreli kullanımı uygun değildir. Fototerapi çok zaman alıcıdır ve birçok hasta için uygun değildir (Simon ve Bieber, 2014). Son yıllarda AD dahil olmak üzere birçok inflamatuvar hastalıkta hücresel tedavilerin etkinliği araştırılmaktadır. Ancak, kolay ulaşılabilen ve immün sistemde regülatuar etkisi başarılı olan dental kaynaklı kök hücrelerin AD hastalığında immünomodülatuar ve rejeneratif etkisine ait bir çalışma literatürde mevcut değildir.

Bu çalışmada DF-MKH'lerin AD hastalığında Th1/Th2 farklılaşması üzerine etkisi ve CD4⁺ T helper ve CD8⁺ T sitotoksik hücreler üzerindeki immün düzenleyici rolü ilk kez araştırılmıştır. AD hastalarından elde edilen PKMH'ler DF-MKH varlığında ve yokluğunda CDmix uyarımlı kültür koşullarında 3 gün süreyle inkübe edilerek immünolojik parametreler incelenmiştir. Çalışmamızda hasta kontrol grubu olarak Psöriasis hastaları dahil edilmiştir. Çalışmamızda Psöriasis hastalarının dahil edilme amacı; DF-MKH'lerin Th2 baskın AD hastalığından farklı olarak Th1/Th17 baskın profile sahip olan Psöriasis hastalığındaki immünomodülatuar etkisini karşılaştırmalı olarak araştırmaktır. Aynı zamanda çalışmaya sağlıklı bireyler de eklenerek, elde ettiğimiz sonuçlar hem AD hem de Psöriasis hastalarının sonuçlarıyla birlikte değerlendirilmiştir.

Klinikte hem etik uygunluğundan dolayı hem de teratoma oluşumu gerçekleştirmemesi sebebiyle MKH'ler, hücresel tedavi seçeneklerinde büyük ilgi görmüştür. Kemik iliği, adipoz doku, umbilikal kord ve farklı dental dokular gibi birçok dokudan elde edilebilen hücreler CD29, CD73, CD90, CD146 gibi pozitif belirteçleri eksprese ederken CD14, CD45, CD34, CD25, CD28 gibi belirteçleri ifade etmezler. (Pittenger ve ark., 1999). Günümüzde diş pulpası, dental folikül,

insan süt dişi gibi dental dokulardan izole edilmiş MKH'ler tanımlanmıştır. Bu hücreler diğer dokulardaki mezenkimal kök hücelere oranla katlanma sayısı yüksektir ve kemik, kıkırdak, yağ, nöral hüceler gibi birçok hücre grubuna farklılaşma yeteneğindedir (Suchanek ve ark., 2007). Aynı zamanda dental kaynaklı MKH'lerin doku rejenerasyonu ve otoimmün hastalıklarda immün yanıtlarını regüle etkileri bildirilmiştir (Mareschi ve ark., 2016). Daha önce yaptığımız bir çalışmada DF-MKH'lerin diğer dental kaynaklı kök hücelere göre daha fazla immünsupresif özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir (Yıldırım ve ark., 2016). Çalışmamızda ilk defa DF-MKH'lerin Th2 baskın AD hastalığında immünmodülatuar etkisi in vitro ortamda araştırılmıştır.

AD'nin arka planında karmaşık bir immünolojik düzensizlik vardır. Günümüzde T hücelerinin bu hastalarda immünolojik süreçlerin düzenlenmesinde anahtar rol oynadığı iyi bilinmektedir. Yapılan bir araştırmada, AD'nin allerjik formundaki deri lezyonları oluşumunda bilinenin aksine CD8⁺ T hücelerin CD4⁺ T hücelere göre daha etkili rolü olduğu bildirilmiştir (Hennino ve ark.,2007). Yapılan başka bir çalışmada, kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücelerin OVA-albumin ile uyarılmış AD fare modelinde, T lenfosit proliferasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (Na ve ark., 2014). Elde ettiğimiz sonuçlara göre, DF-MKH varlığında AD hastalarının CD4⁺ Th ve CD8⁺ Tc hücre proliferasyonu anlamlı olarak baskılandı. Başka bir deri inflamatuvar hastalığı olan Psöriasis hastalarında da CD4⁺ ve CD8⁺ lenfosit proliferasyonu anlamlı olarak baskılandı. Sağlıklı bireylerin DF-MKH varlığında CD4⁺ ve CD8⁺ lenfosit proliferasyonu PKMH költürlere göre anlamlı olarak değişmedi. Elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda, DF-MKH'ler inflamatuvar ortamda lenfosit proliferasyonunu etkili bir şekilde baskıladı

Apoptoz ile hücre ölümü, gereksiz, yaşlı veya hasarlı hücelerin eliminasyonunu sağlayan sıkı düzenlenmiş bir süreçtir (Green ve Scott, 1994). Bu olay, ligandları ile ölüm reseptörleri olarak adlandırılan spesifik reseptörlerin etkileşimini gerektirir. Özellikle Fas (CD95) ve Fas-ligand (CD178) etkileşimlerinin sonucunda aktive olan kaspaz 3 CD4⁺ T hücelerinin aktivasyonuna bağlı hücre ölümü (AICD) için ana mekanizma olduğu belirtilmiştir (Ju ve ark., 1998). Daha önce yapılan bir araştırmada, AD hastalarında CD4⁺ T hücelerinde Fas ve FasL ifadesinin sağlıklı

bireylere göre anlamlı olarak yüksek bulunduğu gösterilmiştir (Akkoç ve ark., 2008). Hennino ve ark. tarafından yapılan araştırmada ise efektör CD8⁺ T hücreleri inflamasyon ve AD benzeri lezyonların oluşumunda aracılık ettiği ve IFN- γ salgılayan CD8⁺ T hücreleri kısa bir süre içinde lezyonel bölgeye göç edip mononükleer hücrelerin ve eozinofillerin ortama çağırılması ve AD'nin tipik epidermal değişikliklerinin gelişmesine yol açtığı belirtilmiştir (Hennino ve ark.,2008.). Yapılan bir araştırmaya göre, fare kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrenin splenosit ko-kültür sonucu splenosit hücrelerin Fas-FasL aracılı hücre ölümünün arttığı gösterilmiştir (Akiyama ve ark., 2012). Bizim elde ettiğimiz sonuçlara göre AD hastalarında hem CD4⁺ hem de CD8⁺ hücreler yüzeyindeki Fas ve FasL ifadesi istatistiksel olarak sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Aynı zamanda Psöriasis hastalarında hem CD4⁺ hem de CD8⁺ hücreler yüzeyindeki Fas ve FasL ifadesi istatistiksel olarak sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak yüksek bulundu. DF-MKH varlığında her iki hasta grubunda CD4⁺ ve CD8⁺ üzerindeki Fas ve FasL ifadesi anlamlı olarak baskılandı. Sağlıklı kontrol grubunda DF-MKH varlığında anlamlı bir baskılanma görülmedi. Elde edilen veriler lenfosit canlılığı sonuçlarıyla birlikte değerlendirildiğinde, hasta gruplarında DF-MKH'lerin T lenfositlerin canlılığını artırırken, aktive T lenfositler üzerindeki ölüm reseptör ve ligandların ifadesini azalttığı gözlemlendi. Bunun sonucunda keratinositlerin de apoptozunu azaltabileceğini düşünmekteyiz.

Akkoç ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada AD hastalarından izole edilen CD4⁺ hücrelerin TNFR II ifadesinin sağlıklı bireylere göre anlamlı olarak yüksek olduğu gösterilmiştir (Akkoç ve ark., 2008). Elde ettiğimiz sonuçlara göre AD ve Psöriasis hastalarında CD4⁺ ve CD8⁺ T lenfositler yüzeyindeki TNFR II oranı sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Her iki hasta grubunda DF-MKH varlığında CD4⁺ ve CD8⁺ T lenfositler yüzeyindeki TNFR II ifadesinde azalma oranı istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Elde ettiğimiz sonuçları Fas ve FasL sonuçlarıyla değerlendirdiğimizde, inflamatuvar ortamda DF-MKH'lerin aktive CD4⁺ ve CD8⁺ T lenfositlerin apoptozunda rolü olan TNFR II oranını düşürerek lenfositlerin canlı kalmasında desteklediğini düşünmekteyiz.

AD hastalığında inflamatuvar süreçte artan IL-4 sitokininin etkisiyle naıve CD4⁺ T lenfositler CD3 ve CD28 reseptör aktivasyonu ile T yardımcı hücre 2 (Th2) fenotipine farklılaşır (Mirchandani ve ark., 2014). Bu farklılaşmada ortaya çıkan T yardımcı hücreler efektör T lenfositlerdir. İnflamatuvar yanıtların sonlanmasının ardından efektör T lenfositlerin yaklaşık %90'ı kontraksiyon fazında ölür ve geriye kalan %10'luk popülasyon efektör bellek hücreler olarak lenfoid olmayan organlarda ve periferde yaşamaya devam eder. Merkez bellek hücreler ise foliküler T yardımcı hücreler veya kendi öncül hücrelerinden oluşan, efektör sitokinleri üretmeyen hücreler olup lenf nodları veya mukozal lenfoid organlarda yaşamaya devam ederler (Pepper ve Jenkins, 2011). MKH'lerin davranışının, bu hücrelerin kaynağı, hücre kültüründe bulunan immün hücrelerin türü, T hücrelerinin aktivasyon ve farklılaşma durumu ve uyarının tipi gibi çeşitli faktörlere bağlı olduğu iyi bilinmektedir. Bu bilgilerin yanı sıra, MKH'lerin farklı aktivasyon ve farklılaşma aşamasında olan T hücreler üzerindeki etkisi hakkında literatürlerde çok az bilgi bulunmaktadır ve MKH'lerin naıve-efektör T hücresi farklılaşma süreci üzerindeki etkisi halen araştırılmaktadır. Daha önce yapılan bir çalışmada kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin sağlıklı donörlerle ko-kültürü sonucunda TNF- α , IL-2 ve IFN- γ salgılayan CD4⁺ ve CD8⁺ bellek T hücrelerin oranı anlamlı derecede düşerken IFN- γ salgılayan CD4⁺ ve CD8⁺ naıve T hücrelerinde anlamlı bir fark gösterilmemiştir (Laranjeirave ark.,2015). Yapılan başka bir çalışmada MKH'lerin doza bağlı olarak HY'ye özgü naıve ve bellek T hücrelerini inhibe ettiği ve hücre proliferasyonunu, sitotoksiteyi ve HY'ye özgü T hücre sayısını anlamlı olarak düşürdüğü gösterilmiştir (Krampera ve ark., 2003). Bizim elde ettiğimiz sonuçlara göre DF-MKH'lerin varlığında AD hastalarında CD4⁺CD45RA⁺naıve T ve CD8⁺CD45RA⁺ naıve T hücrelerin oranı istatistiksel olarak anlamlı arttı. DF-MKH varlığında CD4⁺CDRO⁺ bellek T ve CD8⁺CD45RO⁺ bellek T hücrelerin oranı istatistiksel olarak anlamlı azaldı. Çalışmamızda, anti-TGF β ile nötralize edilen ve sc-58125 ve 1-MDT ile bloke edilen ko-kültürlerde sadece SC58125 (PGE-2 blokajı) olan kültürlerde Naıve T hücrelerin Fas ifadesi istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi. Bunun yanı sıra, ko-kültürlerde CD4⁺CD45RA⁺ naıve T ve CD8⁺CD45RA⁺ naıve T hücrelerin üzerindeki Fas ifadesi anlamlı olarak azalırken CD4⁺CD45RO⁺ bellek T ve CD8⁺CD45RO⁺ bellek T hücreler üzerindeki

Fas ifadesinde anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. Naive ve bellek hücrelerin oranı ve Fas ifadesi sonuçları beraber değerlendirildiğinde, naive T hücre yüzeyindeki ölüm reseptör ifadesi azalırken bu hücrelerin canlı kalarak sağkalımını arttığını düşünmekteyiz.

T regülatör hücreleri (Treg) bağışıklık baskılanmasında önemli bir rol oynar ve alerjik yanıtların kontrolünün ayrılmaz bir parçasıdır. CD4⁺CD25⁺ T regülatör hücrelerin Foxp3 transkripsiyon faktörü ifade etmesi bu hücrelerin baskılayıcı fonksiyonu açısından çok önemlidir (Walker ve ark., 2003). MKH aracılı immüsupresyon, CD4⁺ FoxP3⁺ hücrelerinin çoğalması ile T hücre yanıtlarını baskıladığı bildirilmiştir (Cho ve ark., 2009). Daha önce yapılan araştırmalarda, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regülatör hücrelerin, antijene özğü inflamasyonun kontrolü için önemli olduğu ve bunların hava yollarına dahil edilmesi ile alerjik havayolu inflamasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (Tang ve Bluestone, 2008). Farklı kaynaklardan izole edilen kök hücrelerin çeşitli çözünmüş mediatörler salgılayarak (TGF- β , PGE-2,IDO) hem T regülatör hücre sayısını arttırdığı hem de diğer inflamatuvar parametreleri düşürdüğu literatürlerde mevcuttur (Duffy ve ark., 2009; English ve ark., 2009). Elde ettiğimiz sonuçlara göre; AD hastalarında CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ hücre oranı sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu. DF-MKH varlığında ise AD hastalarında CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ T regülatör hücre oranında istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı. AD hastalarında DF-MKH'ler tarafından salgılanan TGF- β , PGE-2 ve IDO nötrölize edilen kültürlerde sadece TGB- β nötrölizasyonu ve PGE-2 blokajı yapılması sonucunda CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ T regülatör hücre oranı istatistiksel olarak anlamlı düştü. Psöriasis hastalarında da DF-MKH'ler tarafından salgılanan TGF- β , PGE-2 ve IDO nötrölize edilen kültürlerde TGB- β nötrölizasyonu ve PGE-2 blokajı yapılan kültürlerde CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ T regülatör hücre oranı istatistiksel olarak anlamlı azaldı. Bu sonuçlara göre, AD ve Psöriasis hastalarında DF-MKH'ler CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ T regülatör hücre oranını arttırırken PGE-2 ve TGB- β yolağını kullandığını düşünmekteyiz.

Atopik dermatitli hastalar sıklıkla serum immünoglobulin IgE düzeylerinin yükselmesine, hücresele immüniteye, artmış kan eozinofili ve artmış IL-4 üretimine sahiptir. Ek olarak atopik dermatitli hastaların periferik kan mononükleer hücreleri,

kendiliğinden ve uyaranlara yanıt olarak düşük düzeyde IFN- γ üretir. Rekombinant IFN- γ atopik dermatitli hastalarda serum IgE seviyelerini ve IL-4 seviyelerini azaltarak, bağışıklık dengesini geri kazandırarak ve böylece klinik iyileşmeye yol açarak immünolojik dengesizlikleri düzeltebileceğini kabul etmiştir (Chang ve Steven, 2002). Daha önce yapılmış olan araştırmalarda AD hastalarının deri lezyonları sağlıklı kontrollerle kıyaslandığında proinflamatuvar sitokin düzeylerinin (TNF- α , IL-6) daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Bieber ve Leung, 2003). Yapılan başka bir çalışmada AD hastalarında CD4⁺T hücre üretilen IL-10 seviyesi sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur (Seneviratne ve ark.,2006). Mezenkimal kök hücrelerin inflamatuvar ve immün hastalıklarda TGF- β ve IL-10 seviyesini yükseltirken TNF- α , IL-6 ve L-17A seviyesini düşürdüğü birçok çalışmada bildirilmiştir (Sultani ve ark., 2012; Opal ve De paolo, 2000). Fu ve arkadaşları tarafında yapılan bir çalışmada Th2 baskın allerjik rinit hastalığında iki farklı kök hücre uygulama sonucu IFN- γ seviyesi anlamlı olarak düşerken başka bir çalışmada AD hayvan modelinde kemik iliği kaynaklı kök hücre verildiği zaman IFN- γ ve IL-4 seviyesinde anlamlı bir düşüş görülmektedir (FU ve ark., 2012; Na ve ark., 2014). Bizim elde ettiğimiz sonuçlara göre DF-MKH varlığında Th2 baskın AD ve Th1/Th17 baskın psöriasis hastalarında TNF- α ve IL-6 istatistiksel olarak anlamlı düştü. Elde ettiğimiz sonuçları değerlendirdiğimizde, kullandığımız kök hücrelerin proinflamatuvar sitokin düzeyin düşürerek diğer çalışmalardaki sonuçları desteklemektedir. DF-MKH varlığında her iki hasta grubunda IL-10 seviyeleri anlamlı olarak arttı. DF-MKH varlığında AD ve Psöriasis hastalarında artan IL-10 seviyesinin CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T regülatör hücre oranıyla birlikte değerlendirdiğimizde, kök hücrelerin ortamdaki inflamatuvar yanıtı baskılamak için immünregülasyon mekanizmalarını aktif ettiği düşünmekteyiz. IL-17A seviyesi her iki grupta anlamlı olarak düştü fakat Psöriasis hastalarında miktarı yüksek olan sitokin daha anlamlı düştü. Th17 baskın Psöriasis hastalığında IL-10 ve CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T regülatör hücre artışı inflamatuvar sitokin düzeyini azaltığını düşünmekteyiz. DF-MKH varlığında IFN- γ seviyesinin AD hastalarında anlamlı yükselirken IL-4 seviyesi anlamlı olarak azaldı. Elde ettiğimiz bu veriler AD hastalarında DF-MKH'lerin Th2 yanıtını baskılama eğiliminde olduğunu, IL-4

seviyesini düşürerek ve IFN- γ arttırarak immün yanıtın Th1 yönüne kaydırarak immünregülasyon oluşturduğunu düşünmekteyiz.

GATA-3, T yardımcı 2 (Th2) hücrelerinde spesifik olarak ifade edilen bir transkripsiyon faktörüdür ve CD4⁺ lenfositlerden Th2 hücrelerinin farklılaşmasında kritik bir rol oynar. Ayrıca, GATA-3, alerjik yanıtlara aracılık eden IL-4, IL-5 ve IL-13 sitokinlerinin gen ekspresyonu için gereklidir (Ray ve Cohn, 1999; Zhu ve ark., 2006). GATA-3, Th1 hücrelerinin ana düzenleyici transkripsiyon faktörü T-bet tarafından inhibe edilir. Th2 hücreleri GATA-3 tarafından düzenlenirken, Th1 hücre farklılaşması T-bet ve IL-12 tarafından kontrol edilir. Dolayısıyla, GATA3'ün işlevini engellemenin, alerjik hastalıkların tedavisi için yeni bir strateji olabileceği düşünülmektedir. Transkripsiyon faktörü FoxP3, T regülatör hücrelerinin baskılayıcı özelliklerinde kritik öneme sahiptir. Yapılan araştırmalara göre, rinit ve astım gibi alerjik hastalıklar için alerjen immünoterapisinden sonra görülen klinik iyileşme, IL-10 ve TGF- β üreten T regülatör hücrelerinin ve FoxP3 ekspresyonu yapan CD4⁺CD25⁺ T hücrelerinin indüksiyonu ile ilişkilendirilmiştir (Nouri-Aria. 2009). Daha önce yapılmış olan bir çalışmada, MKH'lerin astımlı hastaların PKMH'lerinde GATA-3 ekspresyonunu baskıladığı ve T-bet ekspresyonunu yükselttiği bildirilmiştir (Genç ve ark., 2018). Başka bir çalışmada, umbilikal kord MKH'lerin Psöriasis fare modelinde T-bet ve GATA-3 ekspresyonunu anlamlı olarak baskıladığı gösterilmiştir (Lee ve rak., 2017). Elde ettiğimiz verilere göre; DF-MKH'ler Th2 baskın olan AD hastalarında GATA-3 ekspresyonunu düşürürken Th1 farklılaşmasına neden olan T-bet ekspresyonunu arttırdı. DF-MKH'lerin Th1/Th17 baskın olan Psöriasis hastalarında T-bet ekspresyonunu düşürürken, GATA-3 ekspresyonunda anlamlı bir fark görülmedi. FoxP3 ekspresyonun DF-MKH varlığında her iki hasta grubunda artış gösterdi. Elde edilen sonuçlar sitokin sonuçlarıyla birlikte değerlendirildiğinde, AD hastalarında DF-MKH varlığında GATA-3 ekspresyonunun azalması kültür üst sıvısında IL-4 seviyesinin düşmesiyle uyumlu bulundu ve T-bet ekspresyonunun artış göstermesi IFN- γ seviyesinin artmasıyla uyumlu bulundu. Psöriasis hastalarında da T-bet'in azalması IFN- γ seviyesinin artışıyla uyumlu bulundu. FoxP3 sonuçlarımızı CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regülatör hücreler ve IL-10 seviyesiyle karşılaştırdığımızda, artan FoxP3 protein miktarı artan IL-10 seviyesiyle uyumlu bulundu. Çalışmamızda

elde ettiğimiz sonuçlar literatürdeki bilgileri desteklemektedir. AD hastalarında T-bet oranının artışı ve Psöriasis hastalarında azalması DF-MKH'lerin immünregülasyon gerçekleştirebileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, DF-MKH'lerin Th2 immün yanıtlarının baskın olduğu AD hastalarının CD4⁺ ve CD8⁺ T lenfosit proliferasyonunu, CD4⁺ ve CD8⁺ T lenfosit üzerindeki Fas, FasL ve TNFR2 gibi apoptozu tetikleyen ligand ve reseptör oranını düşürerek, Naïve T hücre oranını arttırarak, bellek T hücre oranını düşürerek, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Tregülatör hücrelerin oranını arttırarak, IFN- γ düzeyini arttırarak ve IL-4 düzeyini düşürerek Th1 yönünde regülatuar etki gösterdiği sonucuna varılmıştır. Elde ettiğimiz bu sonuçları Th1/Th17 baskın Psöriasis hastalarıyla karşılaştırdığımızda DF-MKH'lerin hastalığın inflamatuvar yanıtına göre ortamdaki immünmodulasyonu gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Günümüzde kullanılan ilaç tedavilerin yan etkisi göz önünde bulundurulduğunda, AD hastalığında DF-MKH'ler hücrel tedavilere yeni bir alternatif oluşturma potansiyelindedir.

8. KAYNAKLAR

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology 7th. 2012; P: 55-88.
- Abbas AK, Lichtman AH. Basic immunology: functions and disorders of the immune system. 2nd ed. Philadelphia, PA: W.B Saunders Co, Updated edition 2006-2007
- Akdis CA, Akdis M, Bieber T, Bindslev-Jensen C, Boguniewicz M, Eigenmann P, Hamid Q, Kapp A, Leung DY, Lipozencic J, Luger TA, Muraro A, Novak N, Platts-Mills TA, Rosenwasser L, Scheynius A, Simons FE, Spergel J, Turjanmaa K, Wahn U, Weidinger S, Werfel T, Zuberbier T; European Academy of Allergology and Clinical Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults: European Academy of Allergology and Clinical Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology/PRACTALL Consensus Report. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118:152-69.
- Akiyama K, Chen CH, Wang D, Xu X, Qu C, Yamaza T, Cai T, Chen W, Sun L and Shi S. Mesenchymal Stem Cell-Induced Immunoregulation Involves Fas Ligand/Fas-Mediated T Cell Apoptosis. *Cell Stem Cell*. 2012;10: 544-55.
- Al Jumah MA and Abumaree MH. The Immunomodulatory and Neuroprotective Effects of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE): A Model of Multiple Sclerosis (MS). *Int. J. Mol. Sci.* 2012, 13(7), 9298-9331
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Hücrenin Moleküler Biyolojisi. Dördüncü Baskı. Garland- Science. TUBA. 2008; 1363- 1420.
- Anderton SM, Wraith DC. Selection and fine tuning of the autoimmune T cell repertoire. *Nat Rev Immunol* 2002;2:487-98

- Atoui R and Chiu RCJ. Concise Review: Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stem Cells in Cellular Transplantation: Update, Controversies, and Unknowns. *Stem Cells Transl Med.* 2012; 1: 200–205.
- Barker JNWN. Pathogenesis of psoriasis. *J Dermatol* 1998; 25: 778-781.
- 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.
- Bieber T. Atopic dermatitis. *Ann Dermatol* 2010;22:125-37.
- Boguniewicz M, Leung DY. Atopic dermatitis. *Middleton's Allergy: Principles and Practice*; 7th Ed. China Elsevier 2009: 1083-9.
- Browne VW, McClain KL, Talpaz M, Ordonez N, Estrov Z. Physiology and pathophysiology of dendritic cells. *Hum Pathol* 1997; 28:563-79.
- Brunner PM, Guttman-Yassky E, Leung DY. The immunology of atopic dermatitis and its reversibility with broad-spectrum and targeted therapies. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;139:S65-S76.
- Camcıoğlu Y ve Deniz G. Temel İmmünoloji İmmün Sistemin İşlev ve Bozuklukları. İstanbul, İstanbul Medikal Yayıncılık. 2007; 1: 1-21, 41-60, 83-103.
- Chang TT, Stevens SR. Atopic dermatitis: the role of recombinant interferon-gamma therapy. *Lancet.* 2003;361:151–60.
- Cho KS, Park HK, Park HY, Jung JS, Jeon S-G, Kim Y-K. Immunomodulatory effects of adipose tissue-derived stem cells in an allergic rhinitis mouse model. *Stem Cells* 2009; 27: 259–265.
- Curtin JF, Cotter TG. Live and let die: regulatory mechanism in Fas mediated apoptosis. *Cell Signal* 2003; 15:983-92.
- Czarnowicki T, Krueger JG, Guttman-Yassky E. Skin barrier and immune dysregulation in atopic dermatitis: an evolving story with important clinical implications. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2014;2:371-9.
- Das RV, Jain AK, and Ramesh V. Current Concepts In The Pathogenesis Of Psoriasis. *Indian J Dermatol.* 2009; 54: 7–12.

- Duffy MM, Ritter T, Ceredig R, Griffin MD. Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. *Stem Cell Res Ther.* 2011; 11; 2:34.
- Ellis, RE, Yuan, J and Horvitz, HR. Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. CellBiol.* 1991; 7: 663-698.
- English K, Ryan J, Tobin L, Murphy MJ, Barry FP, Mahon BP. Cell contact, prostaglandin E2 and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25highforkhead box P3+ regulatory T cells. *Clin Exp Immunol.* 2009;156: 149–160.
- Erkek E. Psoriasis etyopatogenezi. *Turkiye Klin J Dermatol-Special Topics* 2008; 1: 1-14.
- Failla M, Crimi N, Vancheri C. Exhaled bronchial cysteinyl leukotrienes in allergic patients. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2007;7:25–31.
- Figuroa FE, Carrión F, Villanueva S, Khoury. Mesenchymal stem cell treatment for autoimmune diseases: a critical review. *M.Biol Res.* 2012;45(3):269-77.
- Ford WCL. Biological mechanisms of male infertility. *The Lancet.* 2001; 357:21.1223-1224.
- Foti M, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cell interactions and cytokine production. In: *Cytokines as Potential Therapeutic Targets for Inflammatory Skin Diseases.* Ernst Schering Res Found Workshop 2006; 56:61-80.
- Fu QL, Chow YY, Sun SJ, Zeng QX, Li HB, Shi JB, Sun YQ, Wen W, Tse HF, Lian Q and Xu G. Mesenchymal stem cells derived from human induced pluripotent stem cells modulate T-cellphenotypes in allergic rhinitis. *Allergy.* 2012: 1215-22.
- Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing With the Neighbors: Stem cells and their niche. *Cell.* 2004; 116, s.769-778.
- Gallimore A, Godkin A. Regulatory T cells and tumour immunity- observations in mice and men. *Immunology.* 2008; 123:157–163.
- Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* 2007; 32:37-43.

- Green DR, Scott DW. Activation-induced apoptosis in lymphocytes. *Curr Opin Immunol.* 1994; 6:476-87.
- Greer FR, Scott H, Sicherer A. Effects of early nutritional interventions on the development of atopic disease in infants and children: the role of maternal dietary restriction, breastfeeding, timing of introduction of complementary foods, and hydrolyzed formulas. *Pediatrics* 2008; 121:183-91.
- Gu YZ, Xue Q, Chen YJ, Yu GH, Quing MD, Shen Y, wang MY, Shi Q and Zhang XG. Different roles of PD-L1 and FasL in immunomodulation mediated by human placenta-derived mesenchymal stem cells. *Hum Immunol.* 2013;74:267-76.
- Hakki SS, Kayis SA, Hakki EE, Bozkurt SB, Duruksu G, Unal ZS, Turaç G, Karaoz E. Comparison of mesenchymal stem cells isolated from pulp and periodontal ligament. *J Periodontol.* 2015;86: 283-91.
- Hall JE, Guyton AC. *Tıbbi Fizyoloji.* 11. Basım. Nobel Tıp Kitabevleri. 2007; 419-439.
- Hanifin JM, Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 1980; 92(Suppl):44-7.
- Hanifin JM, Reed ML. Eczema prevalence impact Working Group. A population-based survey of eczema prevalence in the United States. *Dermatitis* 2007;18:82-91.
- He A, Jiang Y, Chun G, Sun Y, Li J, Wang J A. The antiapoptotic effect of mesenchymal stem cell transplantation on ischemic myocardium is enhanced by anoxic preconditioning. *Can J Cardiol.* 2009;25:353-8.
- Hennino A, Vocanson M, Toussaint Y, Rodet K, Benetie`re J, Schmitt AM, Areise MF M, Be`rard F, Rozie`res A and Nicolas JF. Skin-Infiltrating CD8+T Cells Initiate Atopic Dermatitis Lesions. *J Immunol.* 2007; 178:5571-7.
- Hijnen DJ, ten Berge O, Timmer-de Mik L, Bruijnzeel-Koomen CA and de Bruin-Weller MS. Efficacy and safety of long-term treatment with cyclosporin A for atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2007; 21:85-89.

- Hochrein H, O’Keeffe. Dendritic cell subsets and toll-like receptors. *Handb Exp Pharmacol* 2008; 183:153-79.
- 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.
- Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol*. 2015 Apr;16(4):343-53.
- Joyce N, Annett G, Wirthlin L, Olson S, Bauer G, Nolte JA. Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. *Regen Med*. 2010 Nov; 5(6): 933–946.
- Ju ST, Panka DJ, Cui H, Ettinger R, el-Khatib M, Sherr DH, et al. Fas (CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature*. 1995; 373: 444-8.
- Kannan K, Jain Sk. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*. 2000; 7(27):153-163.
- Karsunky H, Inlay MA, Serwold T, Bhattacharya D, Weissman IL. Flk2+ common lymphoid progenitors possess equivalent differentiation potential for the B and T lineages. *Blood*. 2008; 111(12), s.5562-70.
- Khatti S, Shemer A, Rozenblit M, Dhingra N, Czarnowicki T, Finney R, et al. Cyclosporine in patients with atopic dermatitis modulates activated inflammatory pathways and reverses epidermal pathology. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133:1626-1634.
- Kierszenbaum AL, Tres LL. *Histology and cell biology an introduction to pathology*. Philadelphia, PA, Elsevier Saunders. 2012; 291-323, 626-644.
- Krakowski AC, Eichenfield LF. Management of atopic dermatitis in the pediatric population. *Pediatrics* 2008; 122:812- 24.

- Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*. 2003; 101:3722-3729.
- Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, Santarlasci V, Mazzinghi B, Pizzolo G, Vinante F, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006;24:386-98.
- Laranjeira P, Pedrosa M, Pedreiro S, Gomes J, Martinho A, Antunes B, Ribeiro T, Santos F, Trindade H, Paiva A. *Stem Cell Research & Therapy*. 2015; 6:3.
- Leung AK, Hon KL, Robson WL. Atopic dermatitis. *Adv Pediatr* 2007; 54:241-73.
- Leung DY, Bieber T. Atopic dermatitis. *Lancet*. 2003;361:151–60.
- Li X, Bai J, Yang Sh, Zhao Sh, Zhang Y, Chen X, and Wang Y. Umbilical Cord Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Induce T Lymphocyte Apoptosis and Cell Cycle Arrest by Expression of Indoleamine 2, 3-Dioxygenase Xiuying Li,1 Zhuo. *Stem Cells Int*. 2016; 7495135.
- Li Z, Jiang CM, An S, Cheng Q, Huang YF, Wang YT, Gou YC, Xiao L, Yu WJ, Wang J. Immunomodulatory properties of dental tissue-derived mesenchymal stem cells. *Oral Dis*. 2014;20: 25-34.
- Lipscomb MF, Wilder JA, Masten BJ. Dendritic cells and their role in linking innate and adaptive immune responses. In: Gessani S, Belardelli F eds. *The biology of dendritic cells and HIV infection*. Springer 2007:45-84.
- Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, and Wang Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ*. 2014 Feb; 21(2): 216–225.
- Machado Cde V, Telles PD, Nascimento IL. Immunological characteristics of mesenchymal stem cells. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2013;35(1):62-7.
- Marta E. Castro-Manrreza, Juan J. Montesinos Immunoregulation by Mesenchymal Stem Cells: Biological Aspects and Clinical Applications. *J Immunol Res*. 2015; 2015: 394917.

- Marti A, Ritter PM, Jager R. Mouse mammary gland involution is associated with cytochrome-c release and caspase activation. *Mech Dev.* 2001; 104:89-98.
- Mirchandani AS, Besnard AG, Yip E, Scott C, Bain CC, Cerovic V, Salmond RJ and Liew FY. Type 2 Innate Lymphoid Cells Drive CD4⁺ Th2 Cell Responses. *J Immunol.* 2014; 192: 2442-2448.
- 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.
- Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; 17: 138-146.
- Na K, Yoo HS, Zhang YZ, Choi MS, Lee K, Yi TG, Song SU and M-S Jeon. Bone marrow-derived clonal mesenchymal stem cells inhibit ovalbumin-induced atopic dermatitis. *Cell Death & Disease.* 2014;5:e1345.
- Nelson BH. IL-2, regulatory T cells, and tolerance. *J. Immunol.* 2004; 172 (7): 3983-3988.
- Nicotera P, Bernassola F, Melino G. Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene* 2004; 23:2757-2765.
- Nouri-Aria KT. Foxp3 expressing regulatory T-cells in allergic disease. *Am J Clin Dermatol.* 2002;3:175-83.
- Novak N. New insights into the mechanism and management of allergic diseases: atopic dermatitis. *Allergy* 2009; 64:265- 75.
- Ong PY, Boguniewicz M. Atopic dermatitis. *Prim Care* 2008; 35:105-17.
- Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest.* 2000; 117: 1162–1172.
- Pepper M and Jenkins MK. Origins of CD4⁺ Effector and Central Memory T Cells. *Nat Immunol.* 2011; 12: 467–471.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284:143–147.

- 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; 309–346.
- Ray A, and Cohn, L. Th2 cells and GATA-3 in asthma: new insights into the regulation of airway inflammation. *J Clin Invest*. 1999; 104: 985-993.
- Ross MH, Pawlina W. Histology. A Text and Atlas. With Correlated Cell and Molecular Biology, Lippincott Williams & Wilkins. 2006; 848-854, 441-453.
- Saroj P, Verma M, Jha KK, Pal M. An overview on immunomodulation. *J Adv Scient Res*. 2012; 3(1): 07-12.
- Seneviratne SL, Jones L, Bailey AS, Black AP and Ogg GS. Severe atopic dermatitis is associated with a reduced frequency of IL-10 producing allergen-specific CD4+ T cells. *Clin Exp Dermatol*. 2006; 31:689-94.
- Shi M, Li J, Liao L, Chen B, Li B, Chen L, Jia H, Zhao RC. Regulation of CXCR4 expression in human mesenchymal stem cells by cytokine treatment: role in homing efficiency in NOD/SCID mice. *Haematologica*. 2007 Jul;92(7):897-904.
- Simon D, Bieber T. Systemic therapy for atopic dermatitis. *Allergy* 2014;69: 46-55.
- Sivanathan KN, Gronthos S, Rojas-Canales D, Thierry B, Coates PT. Interferon-gamma modification of mesenchymal stem cells: implications of autologous and allogeneic mesenchymal stem cell therapy in allotransplantation. *Stem Cell Rev*. 2014 Jun;10(3):351-75.
- Spangrude GJ. When is a stem cell really a stem cell? *Bone Marrow Transplantation*, 2003; 32, S7-S11.
- Spergel JM, Paller AS. Atopic dermatitis and the atopic march. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:118-27.
- 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 its receptors. *J Histochem Cytochem*. 2004; 52(6): 821-831.
- Steinman R. Some interfaces of dendritic cell biology. *APMIS* 2003; 111:675-97.

- Sultani M, Stringer AM, Bowen JM, Gibson RJ. Anti-inflammatory cytokines: important immunoregulatory factors contributing to chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis. *Chemother Res Pract.* 2012; 2012: 490804.
- Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin HH, Brown GD. Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2005; 23: 901-44.
- Thomas B. Atopic dermatitis. *N Engl J Med* 2008; 358:1483-94.
- Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-1462.
- Tintle S, Shemer A, Suarez-Farinas M, Fujita H, Gilleaudeau P, Sullivan-Whalen M, et al. Reversal of atopic dermatitis with narrow-band UVB phototherapy and biomarkers for therapeutic response. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128:583-593.
- Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation.* 2003 Feb 15; 75(3):389-97
- Türsen Ü. Psoriasis etyolojisi. *Dermatose* 2010; 1: 91-108.
- Vousden KH, Lu X. Live orletdie: the cells respons eto p53. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:594-604.
- Walker MR, Kasprowicz DJ, Gersuk VH, Van Landeghen M, Buckner JH and Ziegler SF. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+ CD25- T cells. *J Clin Invest.* 2003;112:1437-43.
- Wei X, Yang X, Han Z, Qu F, Shao L and Shi Y. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacologica Sinica.* 2013; 34: 747–754.
- Weidinger S, Novak N. Atopic dermatitis. *Lancet.* 2016; 387:1109-1122.
- Yeşilyurt E, Fidan I. Dendritik Hücreler ve Enfeksiyonlardaki Rolü. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2011; 41:91-102.

- Yildirim S, Zibandeh N, Genc D, Ozcan EM, Goker K, Akkoc T. The Comparison of the Immunologic Properties of Stem Cells Isolated from Human Exfoliated Deciduous Teeth, Dental Pulp, and Dental Follicles. *Stem Cells Int.* 2016; 2016:4682875.
- Yokoi T, Saito M, Kiyono T, Iseki S, Kosaka K, Nishida E. Establishment of immortalized dental follicle cells for generating periodontal ligament in vivo. *Cell Tissue Res.* 2007; 327: 301–311.
- Zhu J, Yamane H, Cote-Sierra J, Guo L, Paul W.E. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res.* 2006;16: 3-10.
- Zoroğlu SS, Yürekli M, Meram I, Söğüt S, Tutkun H, Yetkin O, Sivasli E, Savaş HA, Yanik M, Herken H, Akyol O. Pathophysiological role of nitric oxide and adrenomedullin in autism. *Cell Biochem Funct.* 2003; 21: 55-60.



Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	09.2016.196	70737436-050.06.04-
	PROJE ADI	Atopik Dermatit'li Hastalarda Dental Folikül Kök Hücrelerin Naive T Lenfositlerin Th1 ve Th2 Yönünde Farklaşması Üzerine Etkisi	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI/ADI	Prof. Dr. Tunç AKKOÇ	

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

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

9. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	NOUSHIN	Soyadı	ZIBANDEH
Doğum Yeri	TABRIZ	Doğum Tarihi	16.06.1987
Uyruğu	IRAN	Tel	05396127255
E-mail	nooshin.zibandeh@yahoo.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Ankara Üniversitesi	2013
Lisans	Tabriz Üniversitesi	2010
Lise	Mobtakera Koleji	2006

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)

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

Yabancı Dil Sınav Notu#								
YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	67, 5		83					

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
GRE Puanı		163	

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok iyi
Graphpad	İyi

*Çokiyi, iyi, orta, zayıfolarak değerlendiriniz.

Yayınlar

Deniz Genc, Noushin Zibandeh, Ercan Nain, Muazzez Gokalp, Ahmet Oguzhan ozen, Kamil Goker, Tunç Akkoc. (2018). Clin Exp Allergy. Dental Follicle Mesenchymal Stem Cells Downregulate Th2 Mediated Immune Response in Asthmatic Patients. Doi: 10.1111/cea.13126.

Ulusoy C, **Zibandeh N**, Yildirim S, Trakas N, Zisimopoulou P, Kuçukerden M, Taslı H, Tzartos S, Goker K, Tuzun E, Akkoc T. 2015. J Neuroinflammation. Dental follicle mesenchymal stem cell administration ameliorates muscle weakness in MuSK-immunized mice. Doi: 10.1186/s12974-015-0451-0.

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

Budanur D, **Zibandeh D**, Genc D, Gokalp M, Kasali K, Akkoc T, Sepet E. Ectoine containing CDMEM media promotes cell survival and differentiation of human periodontal ligament mesenchymal stem cells. (**Dental Traumatology, Accepted Article** Manuscript ID DT-05-17-OA-3550.R2).

Aktop S, Cevreli B, Genc D, Serdaroglu Kasikci E, Comunoglu Ustundag N, **Zibandeh N**, Ozcan EM, Gocmen G, Goker MK, Uzbay IT, Akkoc T. Effects of Ankaferd Blood Stopper on dermal healing in diabetic rats. Doi:10.3906

Hazırlık Aşamasında Olan Yayınlar

The Effect of Dental Follicle Stem Cells on Th1 and Th2 Differentiation of Naive T Lymphocytes in Patients with Atopic Dermatitis. (**PhD Thesis**) **Zibandeh N**, Genc D, Ergun T, Ozgen Z, Barış S, Duran Y, Goker K, Akkoc T.

Dental Follicle Mesenchymal Stem Cells Suppress CD4+IL22BP in Inflammation Tissue of Crohn Disease in Vitro. **Noushin Zibandeh**, Deniz Genc, Kamil Goker, Tunç Akkoc.

Duman D, **Zibandeh N**, Ugurlu MU, Akkoc T, Banzragch M, Genc D, Celkel C, Akkoc T. Mesenchymal stem cells are emerging curative option in hepatic fibrosis model of rats.

Role of Lymphocyte Subsets and T-cell Profiles in the Immune Dysfunction of Schizophrenia. Cigdem Sahbaz, **Noushin Zibandeh**, Ayse Kurtulmus, Gamze Avaroglu, Ismet Kırpınar, Fikretin Sahin, Tunc Akkoc.

Kongre Sunumları

Oral Sunum

- 1- **Zibandeh N**, Yildirim S, Ozen A, Barlan I, Goker K, Akkoc T. Effects of Human Exfoliated Deciduous Teeth On Lymphocyte Proliferation in Asthma Patients'' XXI. National Allergy-Immunology Congress'' (25-29 October 2014, Bodrum). Books of Abstracts P,017.
- 2- Yildirim S, **Zibandeh N**, Genc D, Barlan I, Ozcan EM, Goker K, Akkoc T.'' IFN- γ Stimulated Dental Follicle Mesenchymal Stem Cells Induce CD4+Foxp3 T Cells. 23. National Immunology Congress (26-30 April 2015, Antalya). Books of Abstracts P,011.
- 3- Sarica L, **Zibandeh N**, Genc D, Gul F, Akkoc T, Kombak E, Cinel L, Akkoc T, Cinel I. Effect of Stem Cells Application on Immune Response and Organ Dysfunction in Experimental Sepsis Model? "Turkish anesthesiology and reanimatology congress" (2-6 December 2015, Antalya). Books of Abstracts P.687.

Konuşmalar

National Molecular Medicine Symposium. Mesenchymal Stem Cell Isolation Techniques and Immunological Parameters. 1-3 June 2016. Marmara University Sultan Ahmet Rectorate Building.

Posters

- 1- **Zibandeh N**, Duman T, Baglan O, Genc Y, Aksoy R, Olmez U, Tutkak H. Can We Define Original. Staining -Pattern with ANA IFA Method Against Topoisomerase I antibody In Systemic Sclerosis? "National Immunology Congress" (27-30 April 2013, Cesme). Books of Abstracts P.116.
- 2- Yıldırım S, **Zibandeh N**, Banzragch M, Barlan I, Akkoc T. Effects of Human Exfoliated Deciduous Teeth On Lymphocyte Proliferation in Crohn Patients" XXI. National Allergy-Immunology Congress" (25-29 October 2014, Bodrum). Books of Abstracts P,143.
- 3- Gul F, Arslantaş MK, Topcu L, Genc D, **Zibandeh N**, Akkoc T, Cinel I. "Turkish Anesthesiology and Reanimatology congress" (2-6 December 2015, Antalya). Books of Abstracts P.687.
- 4- **Zibandeh N**, Genc D, Ergun T, Ozgen Z, Baris S, Duran Y, Goker K, Akkoc T. The Effect of Dental Follicle Stem Cells on Th1 and Th2 Differentiation of Naive T Lymphocytes in Patients with Atopic Dermatitis. XXIV. National Allergy-Immunology Congress" (25-29 October 2017, Bodrum). Books of Abstracts P,143.

Laboratuar Teknikleri

Flow cytometry (FACS CALIBUR), Primary Cell Culture, PBMC Isolation, Intracellular staining, CBA Cytokine Assay, Mesenchymal Stem Cell Isolation (Dental Stem cells, Bone Marrow Stem Cells), Naıve T Cell Drive to Th1 and Th2 PCR, Western blot, ELISA, ANA IIF, Lymphocyte Cross Match.

Ödüller

2015 **Honors Distinction**
High Honor Student Marmara University

Zibandeh N, Genc D, Ergun T, Ozgen Z, Baris S, Duran Y, Goker K, Akkoc T. The Effect of Dental Follicle Stem Cells on Th1 and Th2 Differentiation of Naive T Lymphocytes in Patients with Atopic Dermatitis. XXIV. National Allergy-Immunology Congress" (25-29 October 2017, Bodrum). (**First Poster Prize**)

Duman D, **Zibandeh N**, Ugurlu MU, Akkoc T, Banzragch M, Genc D, Celikel C, Akkoc T. Mesenchymal stem cells are emerging curative option in hepatic fibrosis model of rats. "14. National Hepatogastroenterology Congress. (2-6 April 2015, Antalya). (**First Poster Prize**)

Sarıca L, **Zibandeh N**, Genc D, Gul F, Akkoc T, Kombak E, Cinel L, Akkoc T, Cinel I. Effect of Stem Cells Application on Immune Response and Organ Dysfunction in Experimental Sepsis Model? "Turkish anesthesiology and reanimatology congress" (2-6 December 2015, Antalya). Books of Abstracts P.687. (**First Oral Presentation Prize**)

Referanslar

Prof. Dr. Tunc Akkoc. Ph. D. Marmara University Pendik Training & Research Hospital, Department of Pediatric Allergy-Immunology. Istanbul/Turkey Tel: +90 (216) 6254545 / 3536.

Email: tuncakkoc@gmail.com

Asso. Prof. Safa Baris. Marmara University Pendik Training & Research Hospital, Department of Pediatric Allergy-Immunology. Istanbul/Turkey Tel: +90 (216) 6254545 / 4637.

Email: safabaris@hotmail.com