



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AKUT ASTIM FARE MODELİ ÜZERİNDE
PLURİPOTENT KÖK HÜCRELERİN ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

İSMAİL ÖĞÜLÜR
DOKTORA TEZİ

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ALLERJİ VE İMMÜNOLOJİ BİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. Tunç AKKOÇ

İSTANBUL-2014



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AKUT ASTIM FARE MODELİ ÜZERİNDE
PLURİPOTENT KÖK HÜCRELERİN ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

İSMAİL ÖĞÜLÜR
DOKTORA TEZİ

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ALLERJİ VE İMMÜNOLOJİ BİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. Tunç AKKOÇ

İSTANBUL-2014

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Doktora
Anabilim Dalı : Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları
Tez Sahibi : İsmail Öğülür
Tez Başlığı : Akut Astım Fare Modeli Üzerinde Pluripotent Kök Hücrelerin Etkisinin Araştırılması
Sınav Yeri : Sağlık Bakanlığı Pendik Marmara Eğitim ve Araştırma Hast.
Sınav Tarihi : 25.02.2014

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

Danışman	Kurumu	İmza
Doç. Dr. Tunç Akkoç	Marmara Üni. Tıp Fakültesi	
Sınav Jüri Üyeleri		
Prof. Dr. Işıl Barlan	Marmara Üni. Tıp Fakültesi	
Prof. Dr. Günnür Deniz	İstanbul Üniversitesi DETAE	
Doç. Dr. Tamer Önder	Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi	
Yar. Doç. Dr. Esra Çağavi	Medipol Üni. Tıp Fakültesi	

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun **12./03./2014** tarih ve **6.5** sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda 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.

07.03.2014

İSMAİL ÖĞÜLÜR

İTHAF

“Babaannem Habibe Öğülür ve aziz anısına ithaf ediyorum.”

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın tüm aşamalarında her türlü bilimsel desteği sağlayan, deneyimleriyle bana yol gösteren ve beni yönlendiren, akademik gelişimim için özveriyle bana yardımcı olan değerli hocam Doç. Dr. Tunç Akkoç'a, bilgi birikimi ve değerli görüşlerini özveriyle benimle paylaşan ve sonsuz desteklerini benden esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Işıl Barlan'a,

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

Tez çalışmamda önemli bir yeri olan kök hücreleri sağlayan Doç. Dr. Tamer Önder'e, hücre kültürlerini yapan öğrencisi Ayyub Ebrahimi'ye ve bu konuda desteklerinden dolayı sevgili dostum Ahmet Cingöz'e,

Histopatoloji analizlerinde göstermiş oldukları yardımdan dolayı Yar. Doç. Dr. Deniz Filinte ve Dr. Erdem Kombak'a,

Tezimin birçok aşamasında yardımlarını aldığım ve bilgi birikimini benimle paylaşan Yar. Doç. Dr. Aysın Tulunay'a, mikroskop çalışmalarında vermiş olduğu destekten dolayı Nebiye Sofu Eyüpoğlu'na, çalışmalarım sırasında yakın ilgi ve önerileri ile destek olan ve yardımlarını esirgemeyen Yar. Doç. Dr. Ayla Eker Sarıboyacı'ya,

Tez çalışmamın bir kısmını Genetik ve Metabolik Hastalıklar Araştırma ve Uygulama Merkezi (GEMHAM)'nde yapmama izin veren Prof. Dr. Nesrin Kartal Özer'e, bu konuda hiçbir zaman desteğini esirgemeyen sevgili arkadaşım Doç. Dr. Betül Karademir'e, ihtiyacım olduğunda sabah-akşam demeden her zaman yanımda olan sevgili arkadaşlarım Ceyda Çörek, Ayşe Mine Yılmaz ve Ergül Mutlu Altundağ'a,

Çalışmalarında bizzat bulunarak yardımını hiçbir zaman esirgemeyen sevgili dostum Gülben Gürhan'a, laboratuvar çalışmalarına destek vererek, yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Selin Yıldırım, Noushin Zibandeh, Ülkü Arığ ve Dilek Çiçekkökü'ne,

Tez süresince burs desteği sağlayan TÜBİTAK-Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB) na,

Marmara Üniversitesi'ne geçmemde birinci derecede rol oynayan ve iyi-kötü günlerimde hep yanımda olarak desteğini hiç bir zaman esirgemeyen sevgili dostum Hande Bardak'a, ayrıca her dönemde bir telefon kadar yakınımda olan ve beni uzun uzun dinleyerek moral ve destek kaynağım olan sevgili dostlarım Banu Gökçay, Derya Kançağı ve Didem Şahin'e,

Ayrıca bugünlere gelmemde en büyük paya sahip, tez çalışmam sırasında maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen canım aileme,

Teşekkür eder ve en içten şükranlarımı sunarım.

Bu tez Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Başkanlığı tarafından SAG-C-DRP-141112-0333 proje numarası ve TÜBİTAK-SBAG tarafından 110S368 proje numarası ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
BEYAN	ii
İTHAF	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
RESİMLER LİSTESİ	xii
KISALTMALAR	xiii
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. Kök Hücreler	6
4.1.1. Kök hücrelerin tarihçesi	6
4.1.2. Kök hücre tanımı	7
4.1.3. Kök hücre mikroçevresi	8
4.1.4. Kök hücre tipleri	9
4.1.4.1. Kanser kök hücreleri	10
4.1.4.2. Erişkin kök hücreler	11
4.1.4.3. Embriyonik kök hücreler	15
4.1.4.4. Uyarılmış pluripotent kök hücreler	17
4.1.5. EKH ve uPKH'lerin akciğer biyolojisi ve hastalıklarında kullanımı	22
4.2. Astım	23
4.2.1. Astımın tanımı ve tarihçesi	23
4.2.2. Astımın epidemiyolojisi	23
4.2.3. Risk faktörleri	24

4.2.4. Astım patogenezi	25
4.2.4.1. Allerjik enflamasyonda efektör CD4+ T hücreleri	25
4.2.4.2. Astımda CD8+ T hücreleri	27
4.2.4.3. Astımda regülatör T (Treg) hücreler	28
4.2.5. Efektör hücrelerin inflamatuvar cevabı	29
4.2.6. Hava yollarındaki yeniden yapılanma	31
4.2.7. Allerjik astım fare modelleri	34
5. GEREÇ VE YÖNTEM	36
5.1. Kullanılan Hücre Hatları	36
5.2. Deney Hayvanlarının Temini ve Yaşam Koşulları	36
5.3. Çalışma Grupları	36
5.4. Çalışmanın Ana Basamakları	37
5.4.1. EKH ve uPKH kültürü ve karakterizasyonu	39
5.4.1.1. Besleyici hücre tabakalarının hazırlanması	39
5.4.1.2. Besleyici tabakalar üzerinde EKH ve uPKH kültürü	39
5.4.1.3. Alkalin fosfataz boyaması	40
5.4.1.4. Akan hücre ölçer analizi	40
5.4.2. Akut astım fare modeli geliştirilmesi	41
5.4.3. Pluripotent kök hücrelerin i.n. uygulanması	43
5.4.4. Farelerin sakrifikasyonu ve kan, akciğer örneklerinin toplanması	43
5.4.5. Akciğer hücre süspansiyonlarından YFP ⁺ hücre tayini	43
5.4.6. Akciğer hava yollarının histopatolojik olarak incelenmesi	44
5.4.7. BAL sıvısının toplanması ve hücre sayılarının belirlenmesi	44
5.4.8. Kan serumundan spesifik IgE tayini	45
5.4.9. Akciğer hücre süspansiyonu süpernatantlarında sitokin tayini	45
5.4.10. Akciğer lenfosit hücrelerinden Treg hücre analizi	46
5.4.11. Akciğer lenfosit izolasyonu	46
5.4.12. Akciğer lenfositlerinin proliferasyon analizi	47
5.4.12.1. Akciğer lenfositlerinin CFSE ile işaretlenmesi	47
5.4.12.2. Proliferasyon analizlerinde yapılan hücre kültürü ve CFSE tayini	48
5.4.13. Akciğer lenfositlerinin apoptoz analizi	48

5.4.14. İstatistiksel analiz	49
5.5. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	49
6. BULGULAR	51
6.1. Farelerde Akut Astım Modeli Geliştirilmesi	51
6.2. Fare EKH ve uPKH'lerin Karakterizasyonu ve Akut Astım Modeli Oluşturulmuş Farelere Uygulanması	53
6.2.1. Alkalen fosfataz aktivitesi	55
6.2.2. Akan hücre ölçer analizi	56
6.3. İ.n. Uygulanan EKH ve uPKH'lerin Akut Astım Fare Modeli Üzerine Etkisi	57
6.3.1. YFP ⁺ PKH'ler hasarlı akciğer dokusunda daha fazla toplandı	57
6.3.2. PKH'ler akciğer proksimal hava yollarında yeniden yapılanmayı baskıladı	58
6.3.3. PKH'ler akciğer distal hava yollarında yeniden yapılanmayı baskıladı	62
6.3.4. PKH'ler astım modelinde artmış olan eozinofil sayısını azalttı	66
6.3.5. PKH'ler spesifik antikor yanıtını azalttı	68
6.3.6. PKH'ler homojenize akciğer hücre süspansiyonunda IL-4 sitokin miktarını azaltırken, IL-10 miktarını artırdı	68
6.3.7. PKH'ler akciğer lenfositlerinde Treg hücre yüzdesini artırdı	70
6.3.8. PKH'ler akciğer lenfosit hücrelerinin proliferasyonunu baskıladı	73
6.3.9. PKH'ler akciğer lenfosit hücrelerinin apoptozunu azalttı	75
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	77
8. KAYNAKLAR	85
9. ÖZGEÇMİŞ	101

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 6.1. PBS ve OVA gruplarında proksimal (A) ve distal (B) hava yollarının histolojik verileri ve istatistik sonuçları	51
Tablo 6.2. OVA, OVA+EKH ve OVA+uPKH gruplarında proksimal hava yollarının histolojik verileri ve istatistik sonuçları	61
Tablo 6.3. PBS, PBS+EKH ve PBS+uPKH gruplarında proksimal hava yollarının histolojik verileri ve istatistik sonuçları	61
Tablo 6.4. OVA, OVA+EKH ve OVA+uPKH gruplarında distal hava yollarının histolojik verileri ve istatistik sonuçları	65
Tablo 6.5. PBS, PBS+EKH ve PBS+uPKH gruplarında distal hava yollarının histolojik verileri ve istatistik sonuçları	65
Tablo 6.6. Tüm grupların BAL sıvılarında nötrofil, eozinofil, lenfosit, monosit sayıları (%)	67

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1. Hematopoez hiyerarşisi.	13
Şekil 5.1. Çalışmanın ana basamaklarının şematik gösterimi.	38
Şekil 5.2. BALB/c farelerde akut astım modeli geliştirilmesi.	41
Şekil 6.1. OVA ve PBS gruplarının ışık mikroskop görüntüleri.	52
Şekil 6.2. 1. gün besleyici hücre tabakalarının invert mikroskop görüntüsü.	53
Şekil 6.3. Besleyici tabaka olmayan kültür koşullarında inkübe edilen EKH'lerin faz-kontrast ve florasan mikroskobundaki görünüşleri.	54
Şekil 6.4. Besleyici tabaka olmayan kültür koşullarında inkübe edilen fare uPKH'lerin faz-kontrast ve florasan mikroskobundaki görünüşleri.	54
Şekil 6.5. Besleyici tabaka üzerindeki fare EKH kolonilerinin alkalen fosfataz aktivitesi (A). Kolonilerin boyanmadan önceki mikroskop görüntüsü (B).	55
Şekil 6.6. Besleyici tabaka üzerindeki fare uPKH kolonilerinin alkalen fosfataz aktivitesi (A). Kolonilerin boyanmadan önceki mikroskop görüntüsü (B).	55
Şekil 6.7. EKH'lerde ifade edilen Oct3/4 transkripsiyon faktörü ve SSEA-1 yüzey belirtecinin yüzdesi.	56
Şekil 6.8. uPKH'lerde ifade edilen Oct3/4 transkripsiyon faktörü ve SSEA-1 yüzey belirtecinin yüzdesi.	57
Şekil 6.9. Pluripotent kök hücre uygulanmış gruplardan elde edilen akciğer dokularındaki YFP ⁺ hücre miktarı.	58
Şekil 6.10. Proksimal hava yollarının (>1000µm) ışık mikroskobu görüntüleri.	60
Şekil 6.11. PBS, OVA, OVA+EKH ve OVA+uPKH gruplarında proksimal hava yolları düz kas, epitel, bazal membran kalınlığı ve goblet hücre sayısı.	62
Şekil 6.12. Distal hava yollarının (<500µm) ışık mikroskobu görüntüleri.	64
Şekil 6.13. PBS, OVA, OVA+EKH ve OVA+uPKH gruplarında distal hava yolları düz kas, epitel, bazal membran kalınlığı ve goblet hücre sayısı.	66
Şekil 6.14. BAL sıvısında PBS, OVA, OVA+EKH ve OVA+uPKH gruplarının eozinofil hücre sayısı (%).	67
Şekil 6.15. Pluripotent kök hücrelerin serumda OVA-spesifik IgE yanıtı üzerine etkisi.	68
Şekil 6.16. Pluripotent kök hücrelerin IL-4 sitokin salgısı üzerine etkisi.	69

Şekil 6.17. Pluripotent kök hücrelerin IL-10 sitokin salgısı üzerine etkisi.	69
Şekil 6.18. Pluripotent kök hücrelerin CD4 ⁺ -Foxp3 ⁺ T hücre miktarına etkisi.	71
Şekil 6.19. Pluripotent kök hücrelerin CD4 ⁺ -CD25 ⁺ T hücre miktarına etkisi.	72
Şekil 6.20. Pluripotent kök hücrelerin CD4 ⁺ -CD25 ⁺ -FoxP3 ⁺ Treg hücre miktarı üzerine etkisi.	73
Şekil 6.21. Pluripotent kök hücrelerin anti-CD3-CD28 uyarımlı akciğer lenfosit hücreleri proliferasyonu üzerindeki immün baskılayıcı etkisi.	74
Şekil 6.22. Pluripotent kök hücrelerin anti-CD3-CD28 uyarımlı akciğer lenfosit hücreleri apoptozu üzerindeki engelleyici etkisi.	76

RESİMLER LİSTESİ

- Resim 5.1.** BALB/c farelere intraperitoneal yolla OVA uygulaması. 42
- Resim 5.2.** BALB/c farelere ultrasonik nebulizatör ile OVA provokasyonu. 42

KISALTMALAR

AHR	: Hava yolu aşırı duyarlılığı
BAL	: Bronko alveolar lavaj
CFSE	: Karboksi floresan süksinimidil ester
DH	: Dentririk hücre
DMEM	: Dulbescco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
EKH	: Embriyonik kök hücre
FBS	: Fötal sığır serumu
FEF	: Fare embriyonik fibroblast
Foxp3	: Forkhead box p3
H&E	: Hematoksilen & eosin
HKH	: Hematopoetik kök hücre
IFN	: İnterferon
IgE	: İmmünoglobulin E
IL-2	: İnterlökin-2
KKH	: Kanser kök hücreleri
KOAH	: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
LIF	: Lösemi inhibe edici faktör
MHC	: Majör histokompatibilite kompleks
miRNA	: mikro RNA
MKH	: Mezenkimal kök hücre
NK	: Doğal öldürücü hücre
OVA	: Ovalbumin
PAS	: Periyodik asit-Schiff
PBS	: Fosfat tamponu
PI	: Propidyum iyodür
PKH	: Pluripotent kök hücre
ROR	: Retinoik asit reseptör bağımlı orphan reseptör
SSEA	: Stage spesifik embriyonik antijen

TGF	: Transforme edici büyüme faktörü
Th	: Yardımcı T hücre
TNF	: Tümör nekroz faktör
Treg	: Regülatör T hücre
uPKH	: Uyarılmış pluripotent kök hücre
VGEF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü
YFP	: Yeşil floresan protein

1. ÖZET

Astımda hava yolu inflamasyonunu baskılayacak ve hava yolu yeniden yapılanmasını önleyecek veya tersine çevirebilecek yeni stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır. Yeniden programlanmış uyarılmış pluripotent kök hücreler (uPKH), embriyonik kök hücre (EKH) potansiyeline sahiptir ve kök hücre bazlı kullanım için kaynak sağlamaktadır. Bu çalışmada, allojenik olarak uygulanan EKH ve uPKH'lerin akut astım modeli oluşturulmuş fareler üzerinde histopatolojik ve immünomodülatuar etkilerinin araştırılması amaçlandı. Bu amaçla, akut astım fare modeli, BALB/c farelerin i.p. olarak OVA proteini ile duyarlılaştırılması ve %1 OVA'nın nebulize yolla verilmesi sonucu oluşturuldu. Son nebulizasyon günü, EKH ve uPKH'ler intranazal (i.n.) yolla 5×10^5 hücre olacak şekilde uygulandı. Fareler 24 saat sonra sakrifiye edilerek, serum spesifik antikor miktarı, hava yolu yeniden yapılanması, sitokin miktarları, BAL sıvısındaki hücre miktarı, lenfositlerin proliferasyon ve apoptoz tayini yapıldı. Kontrol grubuna (PBS) göre, astım grubunda (OVA) daha fazla EKH ve uPKH'nin akciğerde toplandığı belirlendi. Hava yolu yeniden yapılanmasında meydana gelen epitel, düz kas ve bazal membranda artışın ve aynı zamanda goblet hücre hiperplazisinin distal ve proksimal hava yollarında pluripotent kök hücrelerin uygulanması sonucu anlamlı derecede baskılandığı gözlemlendi. BAL sıvısında eozinofil yüzdesinin anlamlı derecede azaldığı saptandı. Serumda allerjen-spesifik IgE'nin baskılandığı ve IL-4'ün akciğer süpernatantında azaldığı, aynı zamanda, regülatör sitokin olan IL-10'un arttığı tesbit edildi. Özellikle EKH'nin uygulanması ile, akciğerde Treg hücre alt grupları yüzdesinin anlamlı şekilde arttığı ve akciğer lenfosit hücre proliferasyonunun ve apoptozunun anlamlı olarak baskılandığı gözlemlendi. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, i.n. olarak uygulanan EKH ve uPKH'lerin akut astım fare modeli ile ilişkili hava yolu inflamasyonu üzerine iyileştirici etkiler sağladığını ve ayrıca, bu hücrelerin farelerde *in vivo* immünomodülasyon etkinliğinin benzer olduğunu göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Astım, BALB/c, EKH, İmmünomodülasyon, uPKH

2. SUMMARY

Investigation on the Effect of Pluripotent Stem Cells on Murine Model of Acute Asthma

New strategies are needed to suppress airway inflammation and prevent or reverse airway remodeling in asthma. Reprogramming induced pluripotent stem cells (iPSCs) has the potential of embryonic stem cells (ESCs) and provide a resource for stem cell-based utility. The aim of this study was to evaluate the histopathologic and immunomodulatory effects of ESCs and iPSCs for potential allogenic application in a murine model of acute asthma. For this aim, BALB/c mice were sensitized with alum-adsorbed ovalbumin (OVA) and then challenged with aerosolized 1% OVA. 5×10^5 ESCs and iPSCs were administered intranasally on the last day of nebulization. Mice were sacrificed after 24 hours, and serum allergen specific antibody level, airway remodeling, cytokine levels in lung supernatants, cellular distribution in BAL fluid, lymphocyte proliferation and apoptosis assays were then examined. More ESC and iPSCs integrated into the lungs of mice OVA groups than those of the control mice. Epithelial, smooth muscle and basal membrane thicknesses as well as goblet cell hyperplasia occurring in airway remodeling were suppressed significantly by pluripotent stem cells in both distal and proximal airways. Percentage of eosinophils decreased significantly in BAL fluid. Reduction in serum allergen-specific IgE level as well as IL-4 level in lung supernatants was observed. Meanwhile, regulatory cytokine, IL-10, was enhanced. Application of especially ESCs significantly increased percentage of Treg subsets and suppressed proliferation and apoptosis of lung lymphocyte cells. Our results showed that i.n. delivery of ESCs and iPSCs provide a beneficial effect to attenuate airway inflammation related with acute asthma murine model, and these cells also have similar immunomodulatory effectiveness in mice.

Key Words: Asthma, BALB/c, ESCs, Immunomodulation, iPSCs

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Astım, gelişmekte olan ülkelerde büyük bir sosyo-ekonomik etkisi olan önemli zayıflatıcı inflamatuvar akciğer hastalığıdır. Kontrolsüz astım, sadece okul ve iş yerlerinde aşırı devamsızlığa yol açmakla kalmayıp, aynı zamanda sağlık maliyetleri üzerinde önemli bir katkı sağlamakta ve ölümlere neden olabilmektedir. Bronşiyal astım, zamanla hava yolu yapısında sitolojik ve histolojik değişiklikler oluşturan kronik ve allerjik hava yolu inflamasyonu ile karakterize edilmektedir (Cohn, Elias ve Chupp 2004). Allerjik astımın patojenik özellikleri; hava yolu inflamasyonu ve mast hücrelerin, basofillerin, monositlerin, ve izotip-spesifik IgE üretimi ile birlikte Th2 tip lenfositlerin toplanması (infiltrasyonu) ile ilgilidir. Astımın kronik aşamalarında, akciğer dokusu ve hava yollarında morfolojik tahribe yol açan önemli bir morbidite oluşmaktadır (Lynch, Little, Wilson, Center ve Cruikshank 2003, Bonfield ve ark 2010).

Astım patogenezi akut veya kronik olarak sınıflandırılmaktadır. Akut astım; histamin salınımı, hava yolu reaktivitesi ve bronkospazm ile karakterize edilen erken faz reaksiyonları içermektedir. Kronik astım ise, akut astım bileşenlerini içermekte, buna ek olarak sürekli inflamasyon ve kontrolsüz akciğer yeniden yapılanması ile karakterize edilmektedir (Massaro ve ark 1995, Karagiannidis ve ark 2006). Akciğer yeniden yapılanmasında doku fibrozu, kollajen birikimi, düz kas hipertrofisi, bazal akciğer fonksiyonunda değişim, goblet hücre hiperplazisi, epitel kalınlaşması ve deskuamasyon ve anjiogenez meydana gelmektedir (Cohn ve ark 2004).

Yeni T hücre alt tiplerinin ve Th2-tip yanıtı uyarmak için alternatif yolların keşfedilmesi ve bunlarla birlikte akciğer mikroçevesinin derin bir şekilde anlaşılması, astım patolojisi ile ilgili yeni anlayışlar getirmekte ve böylece tedavide yenilik için fırsatlar sağlamaktadır. Yeni tedavi yöntemlerinden bazıları; IL-5-özgül antikolar gibi sitokin hedefleri, Treg hücre yanıtının artırılması, ve günümüzde klinik öncesi aşamada olan IL-25, IL-33 antikör yaklaşımları ve mikroRNA'lar gibi T hücre yanıtlarının direkt olmayan şekilde hedeflenmesidir (Lloyd ve Hessel 2010). Astımda karşılanmamış ihtiyaçlardan bir tanesi hafif-orta astımlı hastalarda, çoğu

hastanın uzun yıllar üst üste alması gereken semptomatik tedavinin yerine gelebilecek, küratif tedavidir. Diğer bir ihtiyaç ise, ağır astımı olan kişilerde astım kontrolünün sağlanmasıdır (Barnes 2010). Günümüzde astımın mevcut tedavisinde uzun-etkili β -antagonistler varlığında ya da yokluğunda inhale kortikosteroidler kullanılmaktadır. Steroidler nispeten güvenli, üretimi ucuz ve klinikte son derece etkili olmasına rağmen, bu tedavi ile önemli sayıda astım hastasının semptomları kontrol edilememektedir. Buna ek olarak, tedavi için immün uyarım ve yanıtta değişkenlik astımı izlemek ve üstesinden gelmekte zor bir hastalık yapmaktadır (Bonfield ve ark 2010). Bu nedenle yeni strateji arayışları sürdürülmektedir.

Embriyonik kök hücreler (EKH) blastosist aşamasındaki embriyoların iç hücre kitlesinden elde edilen farklılaşmamış, *in vitro* olarak çok geniş aralıkta farklı hücre tiplerine farklılaşabilen pluripotent hücrelerdir (Wobus 2001, Odorico, Kaufman ve Thomson 2001). EKH'lerin hasarlı dokuları yenilemek veya onarmak için potansiyel klinik kullanımı son yıllarda büyük bir ilgi alanı olmaktadır ve bu hücrelerin spesifik hücre soylarına farklılaşmasını sağlayacak yöntemleri geliştirmek üzere araştırmalar devam etmektedir. Uyarılmış pluripotent kök hücreler (uPKH) ise, embriyonik kaynaklı olmayan hücrelerden (örneğin yetişkin somatik hücreleri) ektopik ekspresyon gibi dışsal etkilerle elde edilen pluripotent hücrelerdir (Takahashi ve Yamanaka 2006). uPKH'ler, EKH'lere göre; embriyonik kaynaklı olmama, teorik olarak sınırsız kaynaktan elde edilme, otolog olarak ve kişiye özel tedavide kullanılma gibi birçok avantaja sahiptir. İnsan uPKH'lerin insan EKH'ler kadar güçlü ve pluripotent olmadığı gibi bazı endişeler olmasına rağmen, bu hücreler morfolojik olarak insan EKH'ye benzerlik göstermekte ve *in vitro* olarak her üç germ tabakasına farklılaşabilmektedir. Ayrıca, bu hücrelerin *in vivo* olarak immün yetmezliğe sahip farelerde teratom oluşturabildikleri de gösterilmiştir (Osafune ve ark 2008, Lengner 2010). Pluripotent hücrelerin sürekli hücre hatları ve terapötik potansiyeli için herhangi hücre tipine farklılaştırılma yetenekleri gelecekte rejeneratif tıp için çok büyük umut vaat etmektedir. EKH'ler pluripotens için altın standart kabul edilirken, uPKH'ler mükemmel histokompatibilite eşlenme ile hücre veya doku greftler kullanarak yıkıcı dejeneratif hastalıklara tedavi olasılığı sunmaktadır (Puri ve Nagy 2012).

Akciğer hasarı oluşturulmuş deneysel hayvan modellerinde, mezenkimal kök hücre (MKH), EKH ve uPKH uygulamalarının yararlı etkide olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir ve bu çalışmalar dikkatleri inflamatuvar akciğer hastalıklarında multipotent ve pluripotent kök hücrelerin tedavi edici rolleri üzerine çekmiştir. Farklı gruplar, multipotent özellikteki MKH'lerin allerjik hava yolu inflamasyonu oluşturulan farelerde hava yolu aşırı duyarlılığını ve akciğer inflamasyonunu iyileştirdiğini göstermiştir (Cho ve ark 2009, Park ve ark 2010, Nemeth ve ark 2010, Bonfield ve ark 2010, Goodwin ve ark 2011, Jang, Cho, Park ve Roh 2011). Bizim de yapmış olduğumuz çalışmalarımızda, fare ve sıçan kemik iliği kaynaklı MKH'lerin ve dental pulpa kaynaklı MKH'lerin akut astım modeli geliştirilmiş farelere uygulanmasından bir gün sonra immünmodülatör etki gösterdiği ve akciğer inflamasyonunu baskıladığı gözlemlendi (Gülben Gürhan, yayınlanmamış veri). 2011 yılında Yang ve ark, farklılaşmamış uPKH'lerin farelerde endotoksin ile oluşturulmuş akut akciğer hasarı üzerine olumlu etkisini rapor etmiştir. Wang ve ark ise c-Myc geni içermeyen uPKH'lerin OVA uyarımlı farelerde hava yolu duyarlılığını ve allerjik reaksiyonu azalttığını ve bu hücrelerin transplantasyonunun allerjik reaksiyon tedavisinde potansiyel olabileceğini göstermiştir (2013).

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda, pluripotent kök hücre tipleri olan EKH ve uPKH'lerin akut astım modeli geliştirilmiş fareler üzerinde histopatolojik etkilerini ve immünmodülasyon mekanizmalarını incelemeyi amaçladık. Bu amaç doğrultusunda, pluripotent kök hücrelerin akciğer yeniden yapılanmasında ve inflamasyonda baskılayıcı etkileri gösterilmiş, immünmodülasyon özelliklerinde Treg hücrelerindeki artışın çok önemli olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, i.n. olarak uygulanan EKH ve uPKH'lerin akciğer lenfositlerinde proliferasyon ve apoptoz üzerine *in vivo* etkileri incelenmiştir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Kök Hücreler

Kök hücreler, kendilerini yenileme ve farklı hücre tiplerine farklılaşabilme yeteneğine sahip olan, bu özelliklerini kendilerine özgü olan içsel sinyaller ve dış mikroçevre vasıtasıyla gerçekleştiren hücrelerdir (Watt ve Hogan 2000). Özelleşme yeteneğinin olması ile birlikte çoğalma kapasitesi kök hücreleri benzersiz kılmaktadır. Bir kök hücre, genellikle organizmanın hayatı boyunca bölünebilme yeteneği olan hücredir. Uygun koşullar altında, ya da uygun sinyaller verildiğinde, kök hücreler kalp hücreleri, deri hücreleri ya da sinir hücreleri gibi karakteristik şekil ve özelleşmiş fonksiyonlardaki olgunlaşmış hücrelere dönüşme potansiyeline sahiptir (Chandross ve Mezey 2001, Slack 2000, Kumar ve Singh 2006).

4.1.1. Kök hücrelerin tarihçesi

İlk girişimleri 1878 yılında memeli yumurtalarını vücut dışında dölemek için yapılmış olmasına rağmen, insan kök hücre alanında araştırma 1960'larda Kanadalı bilim adamları Ernest A., McCulloch ve James E. Till'in bulgularıyla ortaya çıkmıştır (Becker, McCulloch ve Till 1963). Kök hücre transplantasyonu kapsamında kemik iliği nakli Schretzenmyr tarafından 1937 yılında yapılmıştır (Nair, 2004). 1959 yılında *in vitro* fertilizasyon (IVF) yöntemi ile üretilen ilk hayvan (tavşan) da kök hücre tedavisine doğru bir adım olmuştur. 1960'ların sonlarında, farelerde teratokarsinomların embriyonik germ hücrelerinden köken aldığı ve embriyonal karsinom hücrelerinin kök hücre türü olduğu tespit edilmiştir. Edwards ve Bavister 1968'de ilk insan ovumunu *in vitro* olarak fertilize etmişlerdir. Kültüre edilen embriyonal karsinom hücreleri 1970'lerde farelerde embriyonik gelişim modeli olarak incelenmiştir. 1981 yılında, fare embriyonik kök hücrelerinin (f-EKH) blastosistlerin iç hücre kitlesinden türedildiği kanıtlanmıştır. f-EKH'leri *in vitro* olarak üretilmiş ve farelere enjekte edildiğinde teratomlar oluşturmuştur. 1984-1988 yılları arasında embriyonal karsinom hücreleri olarak adlandırılan pluripotent klonal hücreler geliştirilmiştir. Bu hücreler retinoik asite maruz kaldıklarında, nöron benzeri

hücrelere ve diğer hücre türlerine farklılaşmışlardır. 1994 yılında, kültür üzerinde insan blastosistleri üretilmiş ve iç hücre kitlesi muhafaza edilmiştir. Kültür merkezinde EKH benzeri hücreler oluşmuş ve kök kücre benzeri morfoloji korunmuştur. 1995-96 yıllarında insan olmayan primat EKH'ler Rhesus maymunlarının iç hücre kitlesinden *in vitro* olarak elde edilmiştir. Bu hücreler pluripotent özelliktedir ve üç ana germ tabakasına normal olarak farklılaşmıştır (Nair 2004, Avasthi, Srivastava, Signh ve Srivastava 2008).

İnsan blastosist iç hücre kitlesinden elde edilen EKH'ler (i-EKH) 1998 yılında bir çok pasaj için kültür ve muhafaza edilmiştir (Thomson ve ark 1998). 2000 yılında, bilim adamları blastosist iç hücre kitlesinden i-EKH'leri elde etmişlerdir. Bu hücreler uzun bir süre için *in vitro* olarak çoğaltılmış ve immün yetersizliği olan farelere enjekte edildiğinde her üç germ tabakasının ve teratomların oluştuğu gözlenmiştir (Avasthi ve ark 2008). i-EKH'lerin türetildiği ilk rapordan bu yana, spontan ve uyarılmış *in vitro* farklılaşma sistemlerinin kullanılması ile, bu hücrelerin kalp, nöron, hematopoetik öncüler, keratinositler, endotel hücreleri gibi doku tiplerine dönüşümü gösterilmiştir (Kaur ve Kartha 2009).

4.1.2. Kök hücre tanımı

2001 yılında Leipzig'de toplanan doku kök hücreleri çalışma grubunun yapmış olduğu tanıma göre, bir dokuya ait kök hücre, fonksiyonel olarak farklılaşmamış ve potansiyel olarak heterojen hücrelerdir. Başka bir tanıma göre ise kök hücre, “bölünerek kendini yenileyen, sayılarını devamlı sabit tutan, kan, karaciğer ve kas gibi özelleşmiş, görev yapan organları oluşturan ve farklılaşma yeteğinde olan primitif nitelikteki hücredir” (Karaşahin 2012).

Bir hücreyi kök hücre olarak tanımlamak için 5 tane gerekli ölçüt vardır (Verfaillie, Pera ve Landsrop 2002, Ural 2006):

1. Kök hücreler, uzun süre bölünebilme ve kendi kendini yenileme yeteneğine sahiptirler. Hücrelerin uzun süre bölünebilmelerini belirleyen faktörlerden birisi, kromozomların ucunda bulunan telomer adı verilen ve binlerce kez tekrarlanan kısa DNA tekrar dizileridir (TTAGGG). Telomerler kromozom

uçlarının parçalanmasını, diğer kromozomlarla kaynaşmasını engelleyerek kromozomların yapısal bütünlüğünün korunmasını sağlar.

2. Kök hücreler özelleşmemişlerdir. Özelleşmiş hücelere dönüşmek üzere kaynak oluşturabilir.
3. Kök hücreler, özelleşmemiş hücelere kaynaklık edebilirler ve birden fazla hücre tipine farklılaşabilirler. Bunun en iyi örneği döllenmiş yumurta hücresinde görülmektedir.
4. Kök hücreler, hasar gören alıcıya nakil sonrasında kaynak dokuyu işlevsel olarak tekrar çoğaltabilirler. Buna en iyi örnek, olarak hematopoetik kök hücrelerde, karaciğer öncüllerinde ve sinir kök hücrelerinde gösterilmiştir.
5. Kök hücreler, *in vivo* şartlarda doku hasarının olmadığı durumlarda bile farklılaşmamış kuşaklara katkı sağlayabilirler. Buna en iyi örnek, embriyonik veya erişkin kök hücrelerinin (nöral, mezankimal) blastosiste enjekte edildiklerinde farklı hücre tiplerine kaynaklık edebilmeleridir (Verfaillie ve ark 2002, Ural 2006).

4.1.3. Kök hücre mikroçevresi

Mikroçevre (niş); sinyal moleküllerini, hücreler arası ilişkileri ve kök hücreler ile komşu hücrelerin dış matrisleri arasındaki etkileşimi içerir. Bu üç boyutlu mikroçevrenin genleri ve kendi kendini yenileme ve kararlı hücelere gelişme gibi köklülük (stemness) özelliklerini kontrol ettiği düşünülmektedir (Watt ve Hogan 2000). Niş üzerine yapılan daha ileri çalışmalar, kök hücre farklılaşması hakkında daha iyi bilgi verebilir. Kök hücreler ana nişe bağlı olarak, farklı hücre tiplerine uygun şekilde farklılaşabilir. Ayrıca, tamamen farklı bir niş içerisine implante edilen kök hücreler potansiyel olarak yeni çevre hücre tiplerine farklılaşabilir (Wu ve ark 2002). Örneğin, insan nöron kök hücreleri iskelet kası içerisine implante edildiğinde kas hücrelerine, kemik iliği hücreleri bir sinir ortama implante edildiğinde nöron hücrelerine farklılaşmışlardır (Galli ve ark 2000, Zhao ve ark 2002). Bu bulgular mümkün olan niş etkisini ve diğer soy hücrelerinden farklılaşma yeteğini gösteren erişkin hücre plastisitesini göstermektedir (Bajada, Mazakova, Ashton, Richardson ve Ashammakhi 2008). Bu durum klinik etkiye sahip olabilir, örneğin karaciğer ve pankreas aynı embriyolojik hattan geliştiği için, spesifik büyüme faktörleri ve kültür

teknikleri ile adacık hücreleri, karaciğer hücrelerinin transdiferansiasyonu ile elde edilebilir (Alam ve Sollinger 2002).

4.1.4. Kök hücre tipleri

Rejeneratif potansiyellerine bağlı olarak, kök hücreler totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent veya unipotent olarak sınıflandırılır (Kaur ve Kartha 2009). Erken embriyonik dönemdeki kök hücrelerinin bölünme kapasiteleri çok yüksektir. Bu hücreler aynı bölünme potansiyelini kendinden sonra gelen hücrelere aktarırlar ve onlarında bölünme kapasiteleri oldukça yüksektir. Gelişimin daha geç dönemindeki hücrelerde ise bölünme potansiyelleri azalmaya başlar. Bu hücrelerde ise çoğalma asimetric olarak gerçekleşir, kendinden sonra gelen hücrelerin çoğalma kapasiteleri iyice zorlaşır (Karaşahin 2012).

Totipotent: Vücudun her hücre tipini oluşturabilen, tam olarak fonksiyonel bir organizmanın gelişimini sağlayabilen hücrelerdir (Chapman, Frankel ve Garfinkel 1999). Ayrıca memelilerde bir totipotent kök hücre, yani fertilize olmuş bir oosit, yaklaşık 200 özelleşmiş somatik hücre tipini içeren kompleks bir organizmayı oluşturabilme yeteneğine sahiptir (Wobus 2001).

Pluripotent: Bu hücreler, vücudun herhangi bir hücre tipini oluşturabilme potansiyeline sahip olan hücrelerdir (Whittaker 2005). Embriyoda blastosistin iç hücre kitlesindeki hücreler (embriyoblastlar), endoderm, ektoderm ve mezodermden köken alan çok farklı hücre çeşidine farklılaşabilir. Embriyonel kök hücreleri blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilir ve pluripotenttir (Graves and Moreadith 1993).

Multipotent: Multipotansiyel kök hücre ve bu hücrelerin bölünmesi sonucu oluşan ve tek bir yönde farklılaşmak üzere programlanmış bulunan hücrelerdir. Gelişimin ilerleyen dönemlerinde (fetal hayat), hücreler biraz daha özel görevlere sahip olur ve erişkin kök hücrelere dönüşür. Bu erişkin kök hücreleri tipik olarak yer aldıkları dokunun hücre tiplerini üretir. Kemik iliği kök hücreleri en iyi örnektir. Biraz daha özelleşmiş bu hücrelere multipotent hücreler denir (Karaşahin 2012).

Oligopotent: Oligopotent kök hücreler, lenfoid veya miyeloid kök hücreler gibi sadece birkaç hücreye farklılaşabilen hücrelerdir. Kornea epiteli sürekli yenilenen ve oligopotent olan skuamoz epiteldir (Majo, Rochat, Nicolas, Jaoude ve Barrandon, 2008).

Unipotent: Unipotent hücreler sadece bir hücre tipini üretebilir, ancak onları kök hücre olmayan hücrelerden ayıran kendini yenileme özelliğine sahiptir. Bu unipotent hücreleri kas kök hücrelerini içerir. Çoğu epitel dokular, unipotent öncül hücrelerin varlığı nedeniyle erişkin hayatı boyunca kendini yenileyebilir (Hima Bindu ve Srilatha, 2011).

Kök hücrelerin tanımlanmış dört tipi bulunmaktadır (Alvarez ve ark 2012):

- kanserlerde bulunan ve bazı kök özelliklere sahip patolojik kanser kök hücreleri (KKH)
- gelişimin farklı aşamalarında elde edilen erişkin kök hücreler ve embriyonik kök hücreler (EKH)
- mühendislik ile ya da uyarılarak üretilen uyarılmış pluripotent kök hücreler (uPKH)

4.1.4.1. Kanser kök hücreleri

Solid kanserler ve lösemilerdeki geniş hücre spektrumu arasında, fonksiyonel özellikleri ve belirteçleri fizyolojik kök hücrelere benzer hücreler bulunur. Bu tür hücreler, küçük boyutlarından, yavaş hızda bölünmelerinden, ABC (ATP-bağlayıcı kaset) taşıyıcılarını yüksek şekilde ifade etmelerinden, telomeraz ve anahtar kök hücre genlerini ifade edip, farklılaşma belirteçlerini edememelerinden dolayı birçok tedaviye dayanıklıdır. Bu özelliklere sahip hücreler gerçek KKH olarak kabul edilir (Alvarez ve ark 2012). KKH, “kanseri başlatan hücre” olarak da adlandırılmaktadır. Kan, meme, beyin, dalak, baş ve boyun, kolon, deri ve over kanserlerinde KKH’lerin olduğu bildirilmiştir (Tuna 2009).

Son zamanlarda KKH hipotezi ile kanserin, tümör dokusunda oluşan kök veya öncü hücrelerden oluştuğu öne sürülmektedir. KKH’leri veya kanseri başlatan hücreler olarak da adlandırılan kanser öncü hücrelerinin, kanserin başlaması,

ilerlemesi ve klasik tedavi şekillerine direnç göstermesinden sorumludurlar. Kanser hücrelerinde sayısız büyüme faktörünün, ABC taşıyıcılarının, antiapoptotik faktörlerin (Myc, Bcl2, NF-kB ve survivin) aktivasyonunun değişmesi ve/veya aşırı sentezlenmesi kadar tümör baskılayıcı genlerin (Tp53, Pten) aktivasyonunun veya ifadesinin azalması ilaca dirençlilik ile ilgisi olabilir (Mimeault, Hauke, Mehta ve Batra 2007, Tuna 2009).

4.1.4.2. Erişkin kök hücreler

Geçmişte pek çok dokunun, endojen bir kök hücreye sahip olmadığı için, zarar gördüğünde kendini yenileme yeteğinin olmadığı kabul edilirdi. Ancak yapılan son çalışmalarla birçok erişkin dokunun (deri, hematopoetik sistem, kemik ve karaciğer gibi) rejeneratif onarım ya da yenilenme kapasitesine sahip olduğunun gösterilmesi, kök veya progenitor hücrelerin varlığını işaret etmektedir (Vats, Bielby, Tolley, Nerem ve Polak 2005).

Erişkin kök hücreler gelişimin sonraki basamaklarında görülen ve bir doku ya da organda farklılaşmış hücreler arasında bulunan farklılaşmamış hücrelerdir. Bu hücreler organizmanın yaşamı boyunca embriyonik hücrelere göre daha sınırlı olmakla birlikte kendilerini yenileyebilme özelliğini korur ve erişkin dokulardaki özelleşmiş hücrelere farklılaşır. Bir canlı organizmada yetişkin kök hücrelerin primer görevi buldukları dokuyu korumak ve onarmaktır (Kumar ve Singh, 2006). Buna ek olarak, erişkin kök hücreler retina, akciğer, kalp kası, iskelet, kas, bağırsaklar, böbrek, dalak, kemik iliği, kan ve deri gibi dokuların oluşumuna katkıda bulunabilmektedir (Grove, Bruscia ve Krause 2004). Erişkin kök hücreler, buldukları organlarda kendilerine ait bir mikroçevre içerisinde kısa veya uzun bir süre dinlenmede kalabilir. Bu hücreler mikroçevrelerindeki değişiklikleri takiben proliferasyon olabilir veya daha olgun ve dokuya özel hücre tiplerine farklılaşabilir (Fuchs, Tumber ve Guasch 2004).

4.1.4.2.A. Hematopoetik kök hücreler

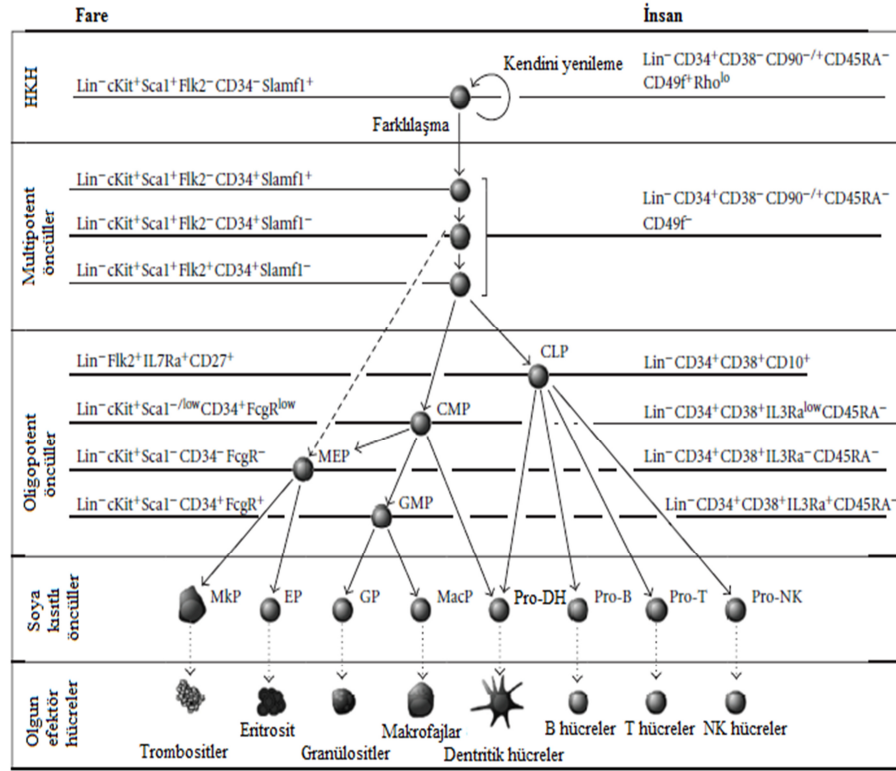
HKH'ler, kendilerini yenileme ve homeostaz denge kontrolü, immün fonksiyon, inflamasyon ve mikroorganizmalara yanıt gibi bazı biyolojik aktiviteleri sağlayan

özelleşmiş kan hücrelerine farklılaşma potansiyeline sahip erişkin kök hücrelerdir. HKH'ler ayrıca adipositler, kardiyomyositler, endotel hücreler, fibroblastlar/miyofibroblastlar, karaciğer hücreleri, osteokondrositler ve pankreatik hücreler gibi diğer özelleşmiş hücrelere farklılaşabilir. Çoğu HKH'ler, HKH havuzunu koruyan nişler içerisinde istirahat halindedir ve içsel veya dışsal uyarılara karşı kan hücre dengesinin ya da HKH havuzunun bozulmasından sonra oluşan sinyallere yanıt verebilir (Chotinantakul ve Leeanansaksiri 2012).

Kemik iliği, stroma ve hematopoetik hücrelerden oluşan çok organize bir dokudur. Stromada bulunan osteoblastlar granulosit koloni stimüle edici faktör, interlökin-6, Notch ligandı jagged 1 gibi çeşitli faktörleri ifade ederek HKH'lerin proliferasyon ve farklılaşmasını etkileyebilirler. Doğum sonrası, HKH'ler kemik iliği, kordon kanı ve mobilize edilmiş periferik kan gibi dokularda bulunurlar. HKH'lerin en önemli belirteçlerinden birisi CD34'dür. Erken öncüllerde bulunurken daha olgun hücrelerde bulunmaz. CD14, CD45 ve CD133 diğer önemli yüzey belirteçleridir (Ural 2012, <http://www.thd.org.tr>, Erişim tarihi: 05.01.2014).

Hematopoez, erişkin memelilerin kemik iliği boşluğunda yerleşmiş HKH'lerin küçük bir popülasyonundan hiyerarşik bir şekilde üretilen kan sistemi hücreleri ile yaşam boyu devam eden bir süreçtir (Orkin ve Zon 2008). HKH'ler, giderek soya sınırlı olan ve sonunda olgun kan hücrelerinin tüm soylarına farklılaşan öncül hücreleri oluştururlar. Akan hücre ölçeği analizi ile moleküler belirteç ifade çalışmaları, tüm kan hücre alt gruplarının biyoloji ve potansiyel açısından belirlenmesine yol açmıştır (Şekil 4.1). Hematopoetik sistemdeki bütün kan hücrelerinin kökeni, kendini yenileme kapasitesine sahip, ve kendini yenileme kapasitesini kaybetmiş, fakat çoklu soylara farklılaşabilen multipotent öncülleri oluşturan HKH'lerden gelmektedir. Multipotent öncüller daha sonra oligopotent öncüller olan ortak lenfoid öncülleri (CLPs) ve myeloid öncülleri (CMPs) oluşturur. Tüm bu oligopotent öncüller kısıtlanmış soylara farklılaşırlar: (1) Ortak myeloid öncüller, megakaryosit/eritrosit öncüllerini, granulosit/makrofaj öncüllerini ve dentritik hücre (DH) öncüllerini, (2) Ortak lenfoid hücreler T hücre öncüllerini, B hücre öncüllerini, doğal öldürücü (NK) hücre öncüllerini ve DH öncüllerini oluşturur. Özellikle, DH öncülleri ($CD8\alpha^+$ DC, $CD8\alpha^-$ DC ve plazmasitoid DH) hem

ortak miyeloid öncüllerden hem de ortak lenfoid öncüllerden farklılaşabilir (Manz, Traver, Miyamoto, Weissman ve Akashi 2001, Chotinantakul ve Leraanaksiri 2012).



Şekil 4.1. Hematopoez hiyerarşisi. Fare ve insan kan sisteminin her bir populasyonunun fenotipik hücre yüzey belirteci gösterilmektedir. CLP: ortak lenfoid öncülü; CMP: ortak miyeloid öncülü; EP: eritrosit öncülü; GMP: granülosit/makrofaj öncülü; GP: granülosit öncülü; MacP: makrofaj öncülü; MEP: megakaryosit/eritrosit öncülü; MkP: megakaryosit öncülü; Lin: soy belirteci

HKH'ler kemoterapi ve/veya radyoterapi ile miyeloablasyon sağlanan hastalara verildiğinde adezyon molekülleri sayesinde kemik iliğinde yerleşir ve yeni kan hücrelerini oluşturur, yani engraftment özelliği gösterir. Allojeneik kemik iliği transplantasyonu ile lösemiler, kemik iliği yetmezlikleri, prelösemik sendromlar tedavi edilirken, yüksek dozda kemoterapi uygulanmasına imkan sağlayacak otolog nakil ile çoğu solid tümörlerin tedavisi mümkün olmaktadır (Ural 2012, <http://www.thd.org.tr>, Erişim tarihi: 05.01.2014).

4.1.4.2.B. Mezenkimal kök hücreler

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

MKH'ler kendini yenileme yeteneğine ve çoklu hücre soylarına farklılaşma yeteneğine sahiptir. Bu hücreler multipotent özelliktedir ve yağ, deri, diş, kemik iliği dahil olmak üzere çok çeşitli dokulardan elde edilir. Standart kültür teknikleri ile *in vitro* koşullarda çoğaltılabilirler, kültür ortamında plastik yüzeylere yapışırlar ve morfolojik olarak fibroblastları andırırlar. MKH'ler yüzeylerinde kendilerine özgü olan CD73, CD90, ve CD105 proteinlerini ifade ederler, fakat CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79 α , HLA-DR proteinlerini ifade etmezler (Barry ve Murphy 2004, Dominici ve ark 2006). MSC'ler özellikle hücre bağlanması ve homing özelliklerinden sorumlu olmak üzere integrinlerden yüksek oranda α 1, α 5, β 1 ve düşük oranda α 2, α 3, α 6, α V, β 2 ve β 4 eksprese ederken, α 4, α L, β 2 ekspresyonu yoktur (Ural 2006).

İnsan MKH'leri, düşük düzeyde majör histokompatibilite kompleks (MHC) sınıf I ifade ederken, MHC sınıf II ve eş uyaran moleküller (B7, CD40 ligand) ifade etmezler. Allojenik nakil olarak MKH'lerin toleransı, hücre-hücre teması ve nitrikoksit, indolamin 2,3 dioksijenaz, heme oksijenaz-1 gibi çözümlü faktörlerin salgılanması yoluyla oluşan güçlü immünbaskılayıcı aktivite ve kendine özgü immünofenotip ile gerçekleşir. MKH'ler doğal ve edinsel immün hücreler ile etkileşerek immünmodulasyon sağlar (Williams ve Hare 2011).

Doğal immün hücreleri (nötrofiller, DH, NK hücreleri, eosinofiller, mast hücreleri ve makrofajlar) enfeksiyona karşı spesifik olmayan savunma oluşturur ve MKH'lerin bu inflamatuvar hücreleri baskıladıkları gösterilmiştir. Nötrofiller bir enfeksiyon karşısında yanıt oluşturan ilk hücrelerdendir, ve inflamasyon aracılarna

yanıtta önemli bir süreç, büyük miktarda oksijen tüketimi ve reaktif oksijen ara ürünlerinin üretimi ile karakterize olan solunumsal patlamadır. MKH'lerin IL-6 salgılayarak solunumsal patlamayı engellediği gösterilmiştir. DH'ler, naif T hücrelerine antijen sunumunda önemlidir ve MKH'lerin olgunlaşmamış monositlerden DH'lerin farklılaşmasını engellediği gösterilmiştir. Ayrıca, MKH-DH ko-kültürleri güçlü bir inflamatuvar molekül olan tümör nekroz faktör- α (TNF- α)'yı inhibe etmektedir. NK hücreler, viral organizmalara karşı savunmada ve sitokin salgılayarak tümör savunmasında önemli doğal immünite hücreleridir. NK hücreler ile kültüre edilen MKH'lerin proliferasyonu uyaran IL-2'yi inhibe ettiği ve interferon- γ (IFN- γ) salgılanmasını %80 oranında azalttığı gösterilmiştir (Jiang ve ark 2005, Aggarwal ve Pittenger 2005, Uccelli, Moretta ve Pistoia 2008, Raffaghello ve ark 2008).

T ve B hücrelerinden oluşan edinsel immün sistem, bellek hücrelerin üretimi ile patojenlere karşı spesifik immün yanıtı oluşturma kapasitesine sahiptir. T hücre, yabancı bir antijenin spesifik T hücre reseptörüne bağlanması ile aktive edilmekte, proliferasyon ve sitokinler salgılamaktadır. Sitotoksik ve yardımcı T hücrelerin proliferasyonu, MKH'ler tarafından salgılanan hepatosit büyüme faktörü (HGF) ve transforme edici büyüme faktörü-1 (TGF-1) gibi çözümlü faktörlerle baskılanmaktadır. Naif T hücrelerin CD4 yardımcı T hücrelere farklılaşması sırasında ortamda MKH'ler olduğu zaman, IFN- γ üretiminde belirgin bir azalma ve IL-4 üretiminde artış olmaktadır. Bu durum, MKH'lerin naif T hücreleri proinflamatuvar durumdan anti-inflamatuvar duruma değiştirdiklerini göstermektedir (Williams ve Hare 2011).

4.1.4.3. Embriyonik kök hücreler

Emriyodaki birinci hücrel farklılaşma olaylarından bir tanesi morula hücrelerinin blastosist hücrelerine dönüşümüdür. Morula iç hücreleri, blastosistin iç hücre kitlesi hücrelerine dönüşür. Bu iç hücre kitlesi hücreleri pluripotenttir ve embriyonun tüm dokularını oluşturur. Bu hücreler, öncül hücreleri olan morula kadar totipotent değildir, çünkü morula hücreleri trofoblasta ve kendi plasental türevlerine farklılaşabilir (Robson, Zhou, Schultz ve Baldwin 2001).

EKH'ler memeli blastosistlerinin iç hücre kitlesinden elde edilir ve sadece birkaç istisna dışında somatik ve germ hücrelerin her tipine farklılaşma yeteneğine sahiptir. EKH hatları, iç hücre kitlesinin enzimatik dispersiyonu ile elde edilir ve özel koşullar altında kültüre edilir. Elde edilen EKH'leri sonsuz olarak kendini yenileme ve gerekli kök hücre karakteri doğasında belirli özellikleri korumak için stabil olma kapasitesi gösterir (Koestenbauer ve ark 2006, Alvarez ve ark 2012).

EKH hatları immünocerrahi izolasyon tekniği kullanılarak 1981 yılında fare EKH'lerinden geliştirilmiş, ve yaygın olarak genetiği değiştirilmiş farelerin üretimi ve erken memeli gelişimi çalışmaları için kullanılmıştır (Evans ve Kaufman 1981). İnsan EKH hattı ise ilk defa 1998'de elde edilmiş ve temel bilim açısından insan gelişimini incelemek için önemli modeller olmasının yanı sıra, hücre nakil tedavisi için kaynak olabileceği üzerinde durulmuştur (Thomson ve ark 1998, Tokuzawa ve ark 2003).

Hemen hemen sınırsız kendilerini yenileme ve öncül hücreler tarafından somatik hücrelere farklılaşma yeteneklerinin yanı sıra, insan ve fare orijinli EKH'leri karakterize eden ortak özellikler bulunmaktadır. Bu hücreler, yüksek alkalen fosfataz aktivitesi, yüksek telomeraz aktivitesi ve yüksek çekirdek-sitoplazma oranı göstermektedir. İnsanlarda alkalen fosfataz, TRA-2-49 ve TRA-2-54 antikoru ile tespit edilebilir. Farelerde ise, enzimatik tabanlı bir reaksiyon ile tipik olarak görüntülenir. Yüksek telomeraz aktivitesi, hücre hatlarındaki ölümsüzlük ile ilişkilidir ve bazı diploid somatik hücre hatlarında telomeraz aktivitesinin yeniden oluşturulması onların ömrünün uzamasını sağlar. Pluripotent hücreler her zaman yüksek düzeyde telomeraz aktivitesine sahiptir (Wobus 2001, Draper ve Fox 2003).

Kök hücre karakteri için gerekli olan genler yüksek verimlilik teknolojileri ve *in vivo-in vitro* fonksiyonel sistem çalışmaları ile belirlenmiş ve dört birinci düzey transkripsiyon faktörü tanımlanmıştır. Bu transkripsiyon faktörleri (Oct4, Sox2, Klf4 ve Nanog); ikinci düzey transkripsiyon faktörlerin (Dpp3 ya da Stella, Rex1 ya da Znf42 ve Gbx2), hücre yüzey belirteçlerin (insanlarda SSEA4 ya da farelerde SSEA1), ABC taşıyıcıların ve bazı enzimlerin (alkalen fosfataz ve telomeraz) ifadesini koordine etmektedir (Pera ve Tam 2010).

4.1.4.3.A. Pluripotans için anahtar mekanizmalar

Birlikte-bağımlılık (codependence): EKH'ler tarafından ifade edilen genlerin regülatör bölgeleri, gen ifadesini koordine eden dört transkripsiyon faktörün yakın bağlayıcı bölgelerini içermektedir. Bu dört transkripsiyon faktörü arasındaki denge değiştiği zaman, EKH kararlı duruma geçmeye başlar. Örneğin, EKH'lerde Oct4 aşırı ifadesi ve/veya Nanog baskılanması endoderm ve mesoderm farklılaşmayı uyarırken; Sox2 aşırı ifadesi nöroektoderm farklılaşmayı uyarır (Alvarez ve ark 2012).

Hetero-dimerizasyon: Regülasyon ayrıca gen ifadelerini modüle eden transkripsiyon faktörleri arasındaki fiziksel protein etkileşimlerini içerir. Bu etkileşim açık bir şekilde Oct4 ve Sox2 için tarif edilmiştir. Oct4 iki adet DNA bağlama bölümlü içerir ve tek başına iken her iki bölümlü ya da tek bölümlü ile DNA'ya bağlanabilir. Fakat, Sox2 Oct4/Sox2 DNA bağlama bölgesine bağlandığında, bu iki bölümlü ile etkileşime girerek, sadece her iki bölümlü ile DNA'ya bağlanır. Bu durum kök hücre genlerinin regülasyonunda, transkripsiyon faktörleri kombinasyonlarının stabilite ve süresini etkilemektedir (Alvarez ve ark 2012).

Epigenetik: EKH'lerde DNA'da %3 olan metillenme durumu, farklılaşmış hücrelerde %60'lara kadar çıkmaktadır. Bu da farklılaşmış hücrelerle karşılaştırıldığında, EKH'lerde bazı genlerin (CDKN1B, RASSF1, HLA lokus genleri gibi) karakteristik olarak baskılandığını göstermektedir. Alternatif ekleme ya da mikroRNA'lar gibi diğer epigenetik mekanizmalar da pluripotans regülasyonu için önemlidir (Ng ve Surani 2011).

4.1.4.4. Uyarılmış pluripotent kök hücreler

Uyarılmış pluripotent kök hücreler (uPKH), embriyonik kaynaklı olmayan hücrelerden (örneğin yetişkin somatik hücreleri) ektopik ekspresyon gibi dışsal etkililerle elde edilen pluripotent hücrelerdir. İlk olarak 2006 yılında Yamanaka grubu tarafından, fare fibroblast hücrelerinden, Klf4, Sox2, Oct4 ve c-Myc genlerinin retroviral transdüksiyonu ile elde edilmiştir (Takahashi ve Yamanaka 2006).

2007'de, c-Myc onkogenik transkripsiyon faktörü dışında aynı kombinasyon ve faktörlerin farklı kombinasyonları kullanarak insan hücrelerinden pluripotent kök hücreler oluşturulmuştur (Takahashi ve ark 2007, Yu ve ark 2007).

EKH'ler, bilimsel çalışmalar için istenilen hücre tipinin elde edilmesi ve geri dönüşümsüz hücre hasarların olduğu hastalıklarda hücre tedavisi için kaynak olarak kullanılmaları açısından oldukça önemlidir. Ancak EKH'ler elde edilirken döllenen yumurta kullanımı, insan kaynaklı çalışmalar yapılmasında etik sorunlar ortaya çıkarmaktadır. Ülkemizde 2006 yılı itibariyle Sağlık Bakanlığı tarafından alınan kararla EKH'ler ile yapılacak olan çalışmalar durdurulmuştur (Sevim ve Gürpınar 2011). uPKH'ler somatik hücrelerden oluşturulabildiği için etik sorunları önleyebilmekte ve bu hücrelerin hücre tedavide uygulanması beklenmektedir (Takahashi ve ark 2007).

EKH'lerin birçok karakteristik özelliği uPKH'lerde de bulunmaktadır. uPKH'ler, alkalen fosfataz pozitif hücrelerdir, morfolojileri EKH'lere benzemekte ve her üç germ tabakasına da (ektoderm, endoderm, mezoderm) farklılaşabilmektedir. Bunlara ek olarak, gen ifade profili, DNA metilasyon modeli, limitsiz proliferasyon aktivitesi, teratom oluşturma yeteneği ve kimerik canlılar oluşturabilme potansiyeli bakımından her iki hücre tipi birbirine benzemektedir (Puri ve Nagi 2012). Fakat, son zamanlarda yapılan çalışmalarda uPKH'ler ve EKH'lerin epigenetik modifikasyon, heterojenlik ve farklılaşma potansiyelleri açısından farklılık gösterdiği belirtilmiştir. Örneğin, uPKH'leri sadece EKH'lerden ayrı epigenetik farklılıklar göstermemekte, bunun yanında somatik doku kökeninin karakteristiği olan "epigenetik bellek" olarak adlandırılan DNA metilasyon işaretleri taşımaktadır (Kim ve ark 2010). Ayrıca, uPKH'lerin immün tolerans bakımından da EKH'lerden farklı olduğuna dair çalışmalar bulunmasına rağmen (Zhao, Zhang, Rong ve Xu 2011), günümüzde bu konu üzerinde tartışmalar devam etmektedir.

uPKH'ler; otolog hücre tedavisinde, monogenik ve multigenik hastalıkların modellenmesinde, kompleks genetik özelliklerin ve alel varyasyonun çalışılmasında, ve ilaç, toksisite, farklılaşma ve tedavi için substrat olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla, son yıllarda uPKH üretimi için çok sayıda protokol geliştirilmiştir. Yapılan

çalışmalarda, farklı fare ve insan hücre popülasyonları kullanılmış veya yeniden programlama faktörlerinin sayısı, çeşitleri ve hücrelere aktarım yöntemleri değiştirilmiştir (Gonzalez, Boue ve Izpisua Belmonte 2011).

4.1.4.4.A. uPKH oluşturulmasında kullanılan hücre tipleri ve genler

Yeniden programlama, spesifik bir hücre tipine belirli faktörlerin verilmesini ve bunların tanımlanmış kültür koşullarında uygun olarak ifadelerini gerektirmektedir. Fareler üzerine yapılan çalışmalarda, erişkin fare karaciğer ve mide hücrelerinden (Aoi ve ark 2008), dermal papilla hücrelerinden (Tsai ve ark 2010), pankreatik β hücrelerinden (Stadtfeld, Brennand ve Hochedlinger 2008a), B lenfositlerden (Hanna ve ark 2008), kemik iliğ kök hücrelerinden (Kunisato ve ark 2010), nöral kök hücrelerden (Kim ve ark 2008), hematopoetik ve miyogenik hücrelerden (Sancho-Bru ve ark 2011) ve yayınlanmış çalışmaların %80'inden fazlasında fare embriyonik fibroblast hücrelerinden iPS hücreler elde edilmiştir (Gonzalez ve ark 2011). İnsan çalışmalarında, dermal fibroblastlar (Takahashi ve ark 2007), amniyotik sıvıdan elde edilen hücreler (Li ve ark 2009), embriyo kökenli fibroblastlar , hematopoetik oldukları tesbit edilmiş CD34 pozitif kan hücreleri (Loh ve ark 2009), mezenkimal kök hücreler (Yan ve ark 2010), yağ doku kök hücreleri (Sun ve ark 2009) ve oral mukoza hücrelerinden (Miyoshi ve ark 2010) uPKH'ler üretilmiştir.

Kullanılan hücre tipine bağlı olarak, yeniden programlama farklı verim ve kinetik ile elde edilmektedir. Örneğin, fare embriyonik fibroblastların (FEF) retrovirüsler kullanılarak yeniden programlanması 8-12 gün sürerken, insan sünet derisi fibroblastların 20-25 gün sürmektedir. Çeşitli çalışmalarda, alternatif hücre tiplerinin yeniden programlanmasının kolaylığı, kullanılabilirliği ya da terapötik uygunluğu analiz edilmiştir. Fibroblastlar ile kıyaslandığında, dört genin transdüksiyonu ile yeniden programlanan insan primer keratinositleri 100 kat daha etkili bir şekilde ve iki kat daha hızlı oluşmaktadır (Gonzalez ve ark 2011).

Kullanılan hücre tipinin farklılaşma durumu da yeniden programlama verimliliğini etkilemektedir. Örneğin, hematopoetik kök ve öncül hücreler, farklılaşmış B ve T hücrelerine göre 300 kat daha fazla uPKH kolonisi üretmektedir (Eminli ve ark 2009). Hücre tipleri arasındaki yeniden programlamadaki farklar

yalnızca verim ile sınırlı değildir ve aynı zamanda uPKH'lerin kalitesini de etkilemektedir. Örneğin, fare kuyruk ucu fibroblast kaynaklı uPKH'ler, FEF ya da hepatosit kaynaklı uPKH'lara göre teratom oluşturmak için daha yüksek bir eğilime sahiptir (Miura ve ark 2009). Bu nedenle, yapılacak çalışmalarda hücre tipinin seçimi göz önünde bulundurulması gereken önemli bir durumdur.

Takahashi ve Yamanaka tarafından yapılan öncü çalışmalarda, pluripotent özelliği sağlayan 24 farklı gen seçilmiş ve bu faktörler; a) EKH'lerde spesifik olarak ifade edilen Nanog, Oct3/4, Sox2, UTF1, Sall4, Sox15 ve Rex1 transkripsiyon faktörlerini, b) EKH'lerde anahtar rol oynayan tümör ve büyüme-bağımlı c-Myc, Stat3, β -catenin, Grb2, Klf4, Eras ve TCL1 gen ürünlerini, c) spesifik olarak EKH'lerde ifade edilen fakat henüz fonksiyonları tam olarak karakterize edilmeyen ESG1, ECAT1, Fbx15, ECAT8, DNMT3L, GDF3, ECAT15-1, Fthl17 ve Stella faktörlerini içeren 3 gruba ayrılmıştır. Yapılan analizlerle dört genin (*Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc* ve *Klf4*) pluripotent özelliklerin kazanılmasında yeterli olduğu gösterilmiştir (Takahashi ve Yamanaka 2006). *Oct4* ve *Sox2* ana pluripotans genleridir. Oct3/4, oktomer bağlanma transkripsiyon faktörüdür, erken embriyonik gelişimde ve embriyonik kök hücre pluripotansının devamında önemlidir. Sox2, embriyonik gelişimin regülasyonunda ve hücre kaderinin belirlenmesinde önemlidir. Ayrıca, farklılaşmamış embriyonal ve nöral kök hücrelerin kendi kendini yenileme özelliği için gereklidir (Gonzalez ve ark 2011). *Klf4* ve *c-Myc* ise farklı nedenlerden dolayı seçilmiştir. Transkripsiyon faktör olan c-Myc'in başarılı bir yeniden programlama için gerekli olan proliferasyon hızını artırdığı bilinmektedir. Buna ek olarak, bu genin aşırı derecede ifadesi p53 protein miktarında artışa neden olmaktadır. Birçok çalışmada Klf4'ün ifadesinin, bir yandan proliferasyonun baskılanmasına neden olan siklin-bağımlı kinaz inhibitörü olan p21 protein miktarında artışa yol açtığı, diğer yandan ise apoptoz riskinin azalması üzerine pozitif etki gösteren p53'ün hücresel miktarını azalttığı gösterilmiştir. Yani *c-Myc* ve *Klf4* birbirlerini tamamlayıcı genlerdir ve başarılı bir yeniden programlama için bu iki genin ifadeleri arasındaki denge önemlidir (Muchkaeva, Dashinimaev, Terskikh, Sukhanov ve Vasiliev 2012).

4.1.4.4.B. uPKH'lerin elde edilmesinde kullanılan yöntemler

uPKH'lerin elde edilmesinde, ilk olarak retrovirüs ve lentivirüs vektör sistemleri kullanılmıştır. Virüsler kullanılarak yapılan gen aktarımında, viral vektörün genetik materyaline aktarılmak istenen gen bölgesi yerleştirilmekte ve seçilimi sağlayan antibiyotik direnç özelliği gösteren özel bölgeler eklenmektedir (Takahashi ve Yamanaka 2006). Virüs sistemleri etkili ve tekrarlanabilir olmasına rağmen, bu sistemler kullanılarak yapılan yeniden programlama güçlü onkogenlerin ifadesini sağlayan potansiyel olarak zararlı viral partiküllerin üretimine yol açmaktadır. Ayrıca, virüsler insersiyonel mutageneze neden olabilmekte ve belkide gen terapide gözlenen yan etkilere yol açmaktadır. Retrovirüs kaynaklı uPKH'lerden türetilen farelerin normal görünüşte olduğu belirtilmiştir. Ancak, insan uPKH'lerinin uzun süreli güvenliği sadece fare çalışmaları ile garanti edilememekte ve virüs sistemleri uPKH'leri immünojenik yapabilmektedir. Bu nedenle, hücre transplantasyon tedavisinde, alıcı hücre genomuna entegre olabilecek vektör sistemlerinin indüksiyonundan kaçınılmalıdır (Yamanaka 2012).

Entegre olmayan yöntemlerle oluşturulan uPKH'ler için bir çok yol rapor edilmiştir. Bunlar arasında, plazmid (Okita ve ark 2011), Sendai virüs (Fusaki, Ban, Nishiyama, Saeki ve Hasegawa 2009), adenovirüs (Stadtfeld, Nagaya, Utikal, Weir ve Hochedlinger 2008b), sentezlenmiş RNA'lar (Warren ve ark 2010) ve proteinler (Kim ve ark 2009) bulunmaktadır. Plazmidler, lipozom ya da elektroporasyon kullanılarak transfeksiyon edilebilen uygun alternatif bir yoldur. Ancak, virüsler ile karşılaştırıldığında, etkinliği oldukça düşüktür ve daha az uPKH elde edilmektedir. Adenovirüsler genoma entegre olmayan virüslerdir, fakat yavaş bir yöntemdir ve etkinliği oldukça azdır. Sendai virüsler ise, güvenli iPKH üretimi sağlamaktadır ve etkinliği (yaklaşık %1) oldukça yüksektir. Fakat bu virüslerin en önemli dezavantajı, uPKH oluştuktan sonra hücreden tamamen temizlenmesinin zor olmasıdır. Sentezlenmiş RNA'lar, retrovirüsler kadar etkin şekilde uPKH oluşturmaktadır, fakat bunların çoklu transfeksiyonu gerekmektedir. Proteinlerin kullanıldığı yöntemin ise oldukça yavaş ve etkisiz olduğu gösterilmiştir (Gonzales ve ark 2011).

4.1.5. EKH ve uPKH'lerin akciğer biyolojisi ve hastalıklarında kullanımı

Akciğer hastalıkları dünyada morbidite ve mortalitenin önemli nedenleri arasındadır. Diğer önemli hastalıkların tersine akciğer hastalıklarının, özellikle astım ve amfizem dahil olmak üzere kronik obstrüktif akciğer hastalıklarının (KOA), prevalansı artmaktadır ve KOAH'ın 2020 yılına kadar dünya çapında hastalık ölümlerinin üçüncü önde gelen nedeni olması beklenmektedir. Akciğer biyolojisi ve hastalıklarında hızla artan sayıdaki kök hücre ve hücre tedavileri çalışmaları, akciğer biyolojisinin bilinmesinde ve potansiyel tedavi yaklaşımları sağlanmasında heyecan verici yollar sunmaktadır.

İlk çalışmalar eksojen uygulanan kök hücrelerin akciğerde uyum sağlayıp etkili olduğunu (engraftment) işaret etse de, şimdilerde bunun kesin olmayan fizyolojik öneme sahip nadir bir durum olduğu düşünülmektedir. Fakat güncel çalışmalar uygulanan hücrelerin anjiyogenezi uyarma ve lokal enflamatuvar ve bağışıklık yanıtını düzenleme gibi parakrin etkilerini göstermektedir. Bu çalışmalar ve erişkin kök hücreler diğer hastalıklarda güvenlikleri ve ilk etkinlikleri üzerine yapılan araştırmalar temel alınarak, KOAH için hücre bazlı tedavi üzerine bir çok çığır açan klinik araştırma başlatılmıştır. Endojen akciğer progenitör hücrelerin fonksiyonunun daha iyi anlaşılması ve EKH ve uPKH'lerden fonksiyonel akciğer hücrelerinin gelişimini uyarmak için sofistike tekniklerin artması gelecek için umut vermektedir.

Çeşitli laboratuvarlarda elde edilen ilk bulgular, fare ve insan EKH'lerin kültür ortamında surfaktan proteinleri ve lameller organları ifade eden ve hatta tip 2 alveoler epitel hücre fenotipi gösteren psödoglandüler yapılara farklılaşabildiğini göstermiştir. Diğer yapılan ilk çalışmalarda ise, hava-sıvı arayüzü koşullarında EKH'lerin kültürü ile hava yolu epitel hücrelerin fenotipik belirteçlerini ifade eden hücrelerin gelişimi raporlanmıştır. Fakat bu çalışmalar, bir ya da iki immüno-fenotipik belirteçler üzerine odaklanma ile sınırlıdır ve elde edilen hücrelerin hava yolu veya alveol hücrelerinin fonksiyonlarını kazandığı net değildir.

Son protokoller, embriyolojik akciğer ve endorderm gelişimine rehberlik eden hücre sinyal yollarının uygulamasını ve anlaşılmasını sağlamıştır. Bu sayede, *in vitro* koşullarda fare ve insan EKH ve sistik fibroz hastalarından elde edilen

uPKH'lerden fenotipik karakteristikleri daha güçlü hava yolu hücreleri ve daha verimli tip 2 ve tip 1 alveolar epitel hücreleri elde edilmektedir. Ayrıca, akciğer hasarı ve onarım sürecini anlamak için EKH ve uPKH'lerin kullanımında daha hızlı gelişmelerin olması beklenmektedir. Fakat, mevcut bilgiler henüz akciğer hastalıklarının tedavisi için EKH veya uPKH'lerin klinik kullanımını desteklememektedir.

4.2. Astım

4.2.1. Astımın tanımı ve tarihçesi

Astım, solunum yolu inflamasyonu içeren kronik obstrüktif hava yolu hastalığıdır. Astım İçin Küresel Girişim (GINA) tanımına göre: “Astım, bir çok hücrenin veya hücresel elemanın rol oynadığı hava yollarının kronik inflamatuvar hastalığıdır; kronik inflamasyon hırıltı, nefes darlığı, göğüste sıkışma hissi ve özellikle gece veya sabah gözlenen öksürük ataklarına yol açan hava yolu aşırı duyarlılığı (AHR) ile ilişkilidir; bu nöbetler genelde yaygındır, ancak kendiliğinden ya da tedavi ile genellikle geri dönüşümlüdür”. Astım Eski Mısır'da tanınmış ve “kyphi” olarak bilinen bir tütsü ile tedavi edilmiştir. Yaklaşık olarak M.Ö. 450'de ilk olarak Hipokrat tarafından astım olarak isimlendirilmiş ve spesifik bir solunum problemi olarak kabul edilmiştir. 1930-50'li yıllarda, astım psikosomatik bozukluk olarak dikkate alınmış ve etyolojisi, psikanalize dayalı tedavi ile, psikolojik olarak kabul edilmiştir. 1980'lerde, astımlı hastalarda uyarılmış balgam ve bronkoskopik biyopsi çalışmaları gibi tıbbi araştırma yöntemleri ile astımın hava yollarında kronik inflamatuvar hastalık ile karakterize olduğu gösterilmiştir (Louis ve ark 2000, Opolski ve Wilson 2005, Agostinis 2008, Kim, Kim, Jeon ve Kim 2013).

4.2.2. Astımın epidemiyolojisi

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre dünya çapında 300 milyon astımlı bulunmaktadır. Buna ek olarak, astım çocukluk çağında en sık görülen kronik hastalıktır ve yılda yaklaşık 250.000 ölüme neden olmaktadır. Astım prevalansı dünya çapında %7-10 arasında olmasına rağmen, görülme sıklığı ülkeden ülkeye hatta aynı ülkede bir bölgeden diğerine göre farklılık göstermektedir. Astım gelişmiş

ve batılılaşmış ülkelerde gelişmekte olan ülkelere göre daha sık görülmektedir. En yüksek prevalans ile en düşük prevalansın görüldüğü ülkeler arasında 20-60 kat olduğu bildirilmektedir (Kim ve ark 2013). Dünyada astımın en sık görüldüğü ülkeler İngiltere, Avustralya, Yeni Zelanda ve İrlanda; düşük oranda rastlanılan ülkeler ise Doğu Avrupa, Uzak Doğu ve Orta Aysa ülkeleridir (Reisli ve Köksal 202). Ülkemizde astım prevalansı %2.8-%14.5 arasında değişmektedir (Saraclar ve ark 2003, Demir, Karakaya, Bozkurt, Sekerel ve Kalyoncu 2004).

4.2.3. Risk faktörleri

Astımda risk faktörleri kişisel faktörler (genetik, obezite, cinsiyet) ve çevresel faktörler (allerjenler, enfeksiyonlar, mesleki duyarlaştırıcılar, sigara, ev içi ve ev dışı hava kirliliği) olarak 2 grupta toplanmaktadır. Astımın ortaya çıkmasında kişisel faktörlerin başında genetik yatkınlık gelmektedir. Astım alevlenmesine yol açan faktörler ise genellikle çevresel olanlardır. Genlerin hem kendi aralarında, hem de çevresel faktörler ile etkileşerek bireyin astıma eğilimini artırdıkları düşünülmektedir (Ober 2005, Holgate 1999).

Anne ya da babadan birisinin astımlı olması durumunda çocukta astım görülme riski %20-30'a yükselmekte, anne ve babanın her ikisinin de astımlı olması durumunda bu risk %60-70'e ulaşmaktadır. Obezite, astım için risk faktörü olarak düşünülmekte ve leptin gibi belli mediatörlerin hava yolu fonksiyonunu etkilemesi ve astıma eğilimi artırması söz konusu olabilmektedir. Çocukluk çağında erkeklerde iki kat fazla olan astım, puberteden sonra her iki cinsten eşit oranda görülmektedir. Yetişkin dönemde ise astım kadınlarda daha sık görülür hale gelmektedir (Guler ve ark 2004, Ulusal Astım Tanı ve Tedavi Rehberi 2000).

Allerjene maruziyet duyarlılık gelişmesi için çok önemli bir risk faktörü oluşturmaktadır. Kişinin duyarlı olduğu allerjenle karşılaşması astım semptomlarının ortaya çıkmasına ve semptomların kalıcı hale gelmesine yol açmaktadır. İç ortam allerjenlerinden ev tozu akarları, hayvansal allerjenler (kedi, köpek), hamam böceği, mantarlar, dış ortam allerjenlerinden polenler ve mantarlar astım için risk faktörü olarak bilinmektedir. Aktif ve pasif sigara dumanı maruziyeti astım için risk faktörleri arasında sayılmaktadır (Ulusal Astım Tanı ve Tedavi Rehberi 2000).

4.2.4. Astım patogenezi

Yapılan ilk çalışmalar astımın, aktive yardımcı T (Th) lenfositleri, özellikle CD4⁺ Th2 hücreleri, içeren hava yollarının atopik bozukluğu olduğunu göstermiştir. Astımlı hastaların bronş biyopsi ve bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvı analizleri ile Th2 lenfositlerin, eozinofillerin ve degranüle mast hücrelerinin infiltrasyonu belirtilmiştir. Bu sonuçlar, allerjene maruz kalmanın Th2 hücrelerini aktive ettiğini, Th2 sitokinlerinin eozinofilik hava yolu enflamasyonunu ayarladığını ve allerjen-spesifik IgE antikorunu oluşturmak için B hücrelerini uyardığını göstermiştir (Azzawi ve ark 1990, Robinson ve ark 1992, Cohn ve ark 2004, Wills-Karp 1999).

Son gelişmeler, astımın sadece edinsel immün sistemin bir hastalığı olmadığını, doğal ve edinsel immün sistem arasındaki etkileşimin allerjik immün yanıtın başlaması ve yayılması için çok önemli olduğunu göstermektedir. Astımın tipik klinik heterojenitesini, allerjik akciğerde stromal hücrelerin, epitel hücrelerin ve lökositlerin farklı populasyonları arasında meydana gelen olaylar zinciri ve T hücre alt tiplerinin (Th1, Th2, Th9, Th17, regülatör T (Treg) hücreler) katılımı sağlamaktadır (Lloyd ve Hessel 2010).

4.2.4.1. Allerjik enflamasyonda efektör CD4⁺ T hücreleri

4.2.4.1.A. Th1 ve Th2 hücreleri

İnsan ve hayvan modelleri ile yapılan çalışmalar, Th2 hücrelerinin IL-4, IL-5 ve IL-13 sitokinlerinin üretimi ile astımın anahtar patofizyolojik özelliklerini başlattığını ve devam ettirdiğini kanıtlamıştır (Cohn ve ark 2004). IL-4 sitokini allerjik duyarlılaşma ve IgE üretiminde, IL-5 sitokini eozinofilik hava yolu enflamasyonunda önemli iken, IL-13 AHR gelişimi ve doku yeniden yapılanmasını içeren akciğerde pleiotropik etkilere sahiptir (Finkelman, Hogan, Hershey, Rothenberg ve Wills-Karp 2010).

IL-4 Th2 hücrelerin gelişiminde önemli bir sitokin olarak bilinmesine rağmen, son gelişmeler de IL-25, IL-33 ve timik stromal lenfopoetinin allerjen ve helmint ile uyarılan Th2 yanıtında, eozinofili ve IL-4, IL-5, IL-13, IgE antikoru üretimi gibi,

birçok anahtar özelliği uyarabildiğini belirtmektedir. Son raporlar, bu Th2-tip sitokinlerin hücrel kaynaklarının herhangi bir lökosit soy için yüzey belirteci ifade etmeyen doğal lenfoid hücreler içerdiğini ve 'doğal yardımcı' hücreler olarak adlandırıldığını göstermektedir (Neill ve ark 2010, Lloyd ve Hessel 2010).

Astımlı hastalarda allerjen maruziyeti, solunum yollarında aktive Th2 hücrelerinin akınına yol açmakta ve buna Th2 sitokin düzeylerinde artış ve eozinofillerin toplanması eşlik etmektedir. Özellikle, hava yolu içerisindeki Th2 hücre sayısı hastalığın şiddeti ile ilişkilidir (Larche, Robinson ve Kay 2003). Astım atağı sırasında, Th2 ve Th1 hücrelerin sayıları hem kan hem de uyarılmış balgam içerisinde artmaktadır. Doğrudan Th2 hücre gelişimini inhibe eden Th1 hücrelerinin, astımı önleyici bir role sahip olması beklenmektedir. Bu durumu desteklemek için, farede Th1 hücrelerin transkripsiyon faktörü olan T-bet delesyona uğratılmış ve spontan AHR, IL-13-bağımlı eozinofili gelişimi ve IgE üretimi gözlenmiştir (Finotto ve ark 2004). Ancak, Th1 sitokini olan IFN astım hastalarının hava yollarına uygulandığında, hastalık semptomlarında herhangi bir gelişme gözlenmemiştir (Boguniewicz ve ark 1995). Th2 hücre sayıları ve hastalık şiddeti arasındaki korelasyon astımda Th2 hücrelerin önemli bir rolü olduğunu düşündürmekte, fakat eozinofilik ve eozinofilik olmayan alt tiplerin varlığı bazı hastalarda Th2 hücrelerden farklı mekanizmaların olduğunu göstermektedir (Halder ve Pavord 2007).

4.2.4.1.B. Th17 hücreler

Th17 hücreler CD4⁺ efektör T hücrelerin ayrı bir soyudur, ve IL-17 ve retinoik asit reseptör-bağımlı orphan reseptör- γ t (ROR- γ t) ve ROR- α eksprese etmektedir (Harrington ve ark 2005). IL-17A, IL-17F, IL-22 ve daha az oranda tümör nekrozis faktör (TNF) ve IL-6 üretimi Th-17 hücre gelişimi için önemlidir (Bettelli, Korn, Oukka ve Kuchroo 2008). Astım hastalarının akciğerinde IL-17A regülasyonu artmaktadır ve IL-17 düzeyi özellikle nötrofilik ve steroid dirençli olan hastalarda, hastalık şiddeti ile ilişkilidir. Ayrıca, dokuya nüfuz eden CD4⁺ ve IL-17⁺ T hücreleri astımlı hastaların akciğerlerinde gösterilmiştir (Pene ve ark 2008, Lloyd ve Hessel 2010).

CD4⁺ IL-17⁺ T hücreler üzerine yapılan çalışmalar, Th17 hücrelerin allerjik inflamasyonda önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. Allerjen ile epikutan ya da hava yolu sensitizasyonu, mütevazi şekilde Th2 hücre yanıtını uyarırken, aynı zamanda hava yolu nötrofilisi ve akut AHR oluşturan güçlü Th17 hücre yanıtını da indüklemektedir. Th17 hücreler ayrıca Th2 hücre aracılı eozinofilik hava yolu inflamasyonunu artırmaktadır (Lloyd ve Hessel 2010).

4.2.4.1.C. Th9 hücreler

Th9 hücreler, yeni tanımlanan, IL-9 salgılayan ve gelişimleri TGF- β sitokinine bağımlı CD4⁺ T hücre popoölasyonudur. Th9 hücrelerinin oluşumu PU.1 transkripsiyon faktörü ifadesi gerektirmekte ve IL-25 sitokini ile bu hücrelerden IL-9 salgılanması artmaktadır (Chang ve ark 2010, Angkasekwina, Chang, Thapa, Watarai ve Dong 2010). Th9 hücrelerin, allerjik inflamasyonun gelişiminde akciğerde arttığı gözlenmiş, ve aşırı IL-9 salgısı, mukus sekresyonu ve bronşiyal hiperreaktivite ile ilişkili bulunmuştur. Mast hücreleri ve eozinofiller dahil, IL-9 sitokininin diğer hücre kaynakları olmasına rağmen, astımlı hastalardan alınan biyopsilerde belirlenen IL-9'un CD4⁺ T hücrelerine lokalize olduğu gözlenmiştir (Pejman ve Taylor, 2009).

Allerjik hastaların örneklerinin analizi T hücrelerinin önemli bir IL-9 kaynağı olduğunu ortaya koymuş, fare modelleri ise, IL-9'un allerjik inflamasyon ve hava yolu yeniden düzenlenmesinde çoklu etkisi olduğunu göstermiştir. Ancak, IL-9 salgılayan T hücrelerinin Th2 hücrelerinden farklı olup-olmadığı ya da Th2 hücrelerinin Th9 hücreleri oluşturmak için yeniden programlanıp-programlanmadığı bilinmemektedir (Durrant ve Metzger 2010).

4.2.4.2. Astımda CD8⁺ T hücreleri

Astımlı hastaların solunum yollarında CD8⁺ T hücrelerinin varlığı yapılan çalışmalarla belgelenmiştir; atopik ve atopik-olmayan astımlı hastalardan alınan bronş biyopsilerinde IL-4 ve IL-5 üreten CD8⁺ T hücrelerin varlığı gösterilmiş, ve balgam kaynaklı spontan IL-4, IL-5 ve IFN γ üreten CD8⁺ T hücrelerin sağlıklı insanlardan daha fazla olduğu bulunmuştur. Özellikle astımlı hastalarda, periferal

kandan alınan CD8⁺ T hücrelerinin, hava yolu CD8⁺ T hücrelerine benzemedikleri açıktır. Bu da, tercihli yerleşimi veya yerel hava yolu çevresi tarafından uyarılan artan veya değişmiş aktivasyon durumunu yansıtır olabilmektedir. CD8⁺ αβ T hücreler özellikle epitel içi T hücreleri arasında bulunur ve astımlı hastalarda oranlarında artış mevcuttur (Lloyd ve Hessel 2010).

4.2.4.3. Astımda regülatör T (Treg) hücreler

Treg hücre popülasyonunda fonksiyon azalması ya da değişmesi, astımlı hastalarda gözlenen allerjenlere karşı uygunsuz immun yanıt için olası bir açıklama sağlamaktadır. Doğal olarak oluşan FoxP3⁺(forkhead box P3)CD4⁺CD25⁺ hücreleri ve uyarılmış Treg hücreleri içeren çeşitli Treg alt grupları tanımlanmıştır (Lloyd ve Hawrylowicz 2009). CD4⁺CD25⁺ Treg hücrelerin transferi, hava yolu inflamasyonu ve AHR gelişimini düzeltmekte ve hava yollarında DH'lerin allerjene bağlı aktivasyonunu önlemektedir. Treg hücreler doğrudan ve dolaylı mekanizmalar yoluyla inhibe edici etki göstermektedir: IL-10 ve TGF-β gibi inhibe anti inflamatuvar sitokinleri üretmekte, sitotoksik T lenfosit antijen 4 (CTLA4) gibi inhibitör moleküller ifade etmekte ve antijen sunan hücreler üzerinde bulunan MHC sınıf II ve CD80, CD86 eş uyarımlarının regülasyonlarının azalmasını uyarılmaktadır (Kearley, Barker, Robinson ve Lloyd 2005, Cederbom, Hall ve Ivars 2000). IL-10 ve TGF-β, IgE yapımını inhibe ederken blokan antikor yapımını indüklemektedir. IgG₄ ve IgA tipi bu antikorlar, allerjene bağlanmada, IgE ile yarışarak bazofil ve mast hücre aktivasyonunu engellemektedir. Böylece proinflamatuvar mediatörlerin salınması önlenirken eozinofillerin aktivasyonu ve yaşam süreleri kısaltılmaktadır (Gloude-mans, Lambrecht ve Smits 2013).

Treg hücreleri astım fare modellerinde allerjik yanıtların baskılanması ile ilişkili bulunmuştur. Örneğin, Kearley, Robinson ve Lloyd (2008) allerjik hava yolu inflamasyonunu takiben Treg hücre transferinin, oluşturulan inflamasyonu azalttığını ve hava yolu yeniden düzenlenmesini engellediğini göstermiştir.

Yapılan çalışmalar, antijen spesifik Treg hücrelerin baskılayıcı yeteneğinin IL-10 bağımlı olduğunu göstermektedir. Transfer edilen Treg hücreler sadece IL-10 üretmekle kalmamakta, aynı zamanda CD4⁺ T hücrelerden IL-10 salınımını

uyarmaktadır (Kearley, Barker, Robinson ve Lloyd 2005). Bu bulgulara uyumlu olarak, allerjen sensitizasyonundan önce Treg hücrelerin yok edilmesi ile hava yolu inflamasyonu ve AHR şiddetinde artış gözlenmiştir (Lewkowich ve ark 2005). İnsanlarda, Treg hücrelerin Th2 hücre yanıtını baskıladığına dair güçlü kanıtlar bulunmakta ve bu durum atopinin Th2 ve Treg hücreler arasındaki dengesizlik sonucu olabileceğini göstermektedir (Larche 2007). İlginç bir şekilde, allerjik bireylerin sağlıklı ve atopik olmayan kişilerle karşılaştırıldığında allerjen spesifik IL-10 üreten Treg hücrelerin frekanslarında azalma, IL-4 üreten T hücrelerde ise artma gözlenmiştir (Akdiş ve ark 2004).

4.2.5. Efektör hücrelerin inflamatuvar cevabı

T hücreleri ve epitel hücrelerin uyarılması, diğer efektör lökositlerin aktivasyonuna ve hava yollarında toplanmasına neden olmakta ve bu hücreler tarafından üretilen ara ürünler kronik inflamasyona, doku hasarına ve yeniden yapılanmaya yol açmaktadır. Mast hücreleri allerjik hastalıklarda merkez efektör hücredir ve astımlı hastaların hava yollarında sayıca artmaktadır. Mast hücre yüzeyinde bulunan IgE antikoruna allerjenin bağlanması, mediatörlerin salınımını sağlayan sinyal iletim yollarını uyarılmaktadır. Histamin ve prostaglandin D2 salınımı bronkokonstriksiyon ile sonuçlanmaktadır (Brightling ve ark 2002, Galli ve ark 2005, Ishmael 2011).

Mast hücreleri, sistenil lökotrienler ve arşidonik asit kaynaklı lipid mediatörlerinin primer üreticisidir. Lökotrienler hava yolu hücrelerinin hücre yüzeylerinde bulunan G protein-bağlı reseptörlere bağlanmakta ve düz kas kasılmasına, küçük kan damarlarında vasküler geçirgenliğin artmasına, mukus salgısının artmasına ve hava yoluna lökositlerin toplanmasına neden olmaktadır (Montuschi ve Peters-Golden 2010).

Mast hücreleri ayrıca hava yolu inflamasyonuna katkıda bulunan inflamatuvar sitokinlerin, kemokinlerin ve proteazların salınımını sağlamaktadır. Bu araçlar, epitelde inflamatuvar yanıtı uyarmakta, direkt olarak hava yolu hasarına yol açmakta ve hava yolunda daha fazla lökositin toplanmasını sağlamaktadır (Boyce 2004).

Çoğu astımlı hastanın hava yollarında artmış sayıda eozinofil bulunmaktadır. Eozinofillerin toplanma, büyüme ve hayatta kalması hava yolu epitel hücrelerinin, Th2 hücrelerin ve mast hücrelerin salgıladıkları faktörler ile sağlanmaktadır. Th2 sitokini olan IL-5, epitel ve mast hücreleri kaynaklı granulosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) gibi, eozinofillerin hayatta kalması için gereklidir (Blanchard ve Rothenberg 2009). Özellikle CCL5 ve CCL11 gibi kemokinler eozinofillerin hava yoluna toplanmasını sağlamaktadır. Eozinofiller, çeşitli proinflamatuvar sitokinler, Th2 sitokinleri, ve mast hücreleri ve aktive eden ve epiteli uyaran kemokinleri ifade etmektedir. Buna ek olarak, eozinofiller T hücelere antijen sunabilmekte ve TGF- β gibi büyüme faktörleri salgılayabilmektedir. Astımda eozinofillerin rolü farklı fenotipler ile değişebilmekte ve ağır astımı olan hastalarda yüksek sayıda eozinofil bulunmaktadır (Barnes 2008, Blanchard ve Rothenberg 2009).

Rolleri iyi tanımlanmış olmasa da, fagositler astımlı hava yollarında bulunan bulunan diğer bir efektör hücre tipidir. Bazı fenotiplerde diğer hücelere göre daha fazla prevelansta bulunabilmektedir. Makrofajlar, hava yollarında yüksek sayıda bulunmakta ve birçok inflamatuvar sitokin ve kemokin sentezlemektedir. Nötrofiller, ağır astımlı, özellikle sigara içen, hastaların hava yollarında artan sayıda ortaya çıkabilen hücelerdir (Ishmael 2011).

Th2 hücrelerinden üretilen IL-13, terapötik hedef olarak birçok araştırmanın odak noktası olmaktadır (Lloyd ve Hessel 2010). IL-13, hava yolu aşırı duyarlılığını (AHR) artırır ve subepitelyal fibrozis, hava yolu düz kas proliferasyonu, goblet hücre hiperplazisi gibi yapılar üzerinde çok sayıda etkileri mevcuttur. IL-13 öncelikle hava yolu epiteli üzerine etki ederek inflamasyonu oluşturmakta ve CCL11 gibi kemokinlerin salgılanmasını regüle ederek eozinofil sayısının artmasını sağlamaktadır. Fareler üzerine yapılan çalışmalarla, CCL2, CCL3 ve CCL6 gibi kemokinlerin bloklanması ile akciğer yeniden düzenlenmesinin ortadan kaldırıldığı gösterilmiştir, ve bu durum kemokinlerin uyarılmasının akciğer fibrozunda önemli olabileceğini göstermektedir (Rael ve Lockey 2011).

4.2.6. Hava yollarındaki yeniden yapılanma

Hava yolu inflamasyonu, doku hasarı ve sonraki anormal onarım astımlı hastaların hava yolu duvarlarında hava yolu yeniden yapılanması olarak adlandırılan yapısal değişikliklere neden olmaktadır. Bu değişiklikler, epitel hücre değişikliklerini, subepitelyal fibrozu, submukozal bezi hiperplazisini, artmış hava yolu düz kas kitlesini ve hava yolundaki vaskülarizasyon artışını içermektedir. Hava yolu yeniden yapılanması, geri dönüşü olmayan ya da kısmen geri dönüşümlü hava yolu obstrüksiyonu ve akciğer fonksiyonunda hızlandırılmış düşüş ile sonuçlanmaktadır (Homer ve Elias 2005, Shifren, Witt, Christie ve Castro 2012).

(a) Epitel hücre değişiklikleri ve goblet hücre hiperplazisi: Hava yolu epiteli, sadece dış ortamdan bariyer olarak değil aynı zamanda hava yollarında metabolik ve immünolojik fonksiyonların düzenleyicisi olarak da önemli bir role sahiptir. Epitel hücrelerinin, astımlı hastaların balgamlarında artmış olarak bulunduğu ve çeşitli atım modellerinde bazal membrandan ayrılmış olarak gözlemlendiği bildirilmiştir. Hava yolu epitel hücreleri tarafından üretilen bir çok inflamatuvar faktörler bulunmaktadır ve epitel hasarı astımlı hastalarda sitokinler, büyüme faktörleri ve mediatörler aracılığıyla proinflamatuvar süreçlere katılmaktadır. Yeniden yapılanmaya direkt olarak katkıda bulunan bu faktörler, transforme edici büyüme faktörü (TGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), temel fibroblast büyüme faktörü (b-FGF), insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), endotelin-1 (ET-1) ve heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü (HB-EGF) dür (Tagaya ve Tamaoki 2007).

Hava yolu mukusu, epitel yüzeyini yaralanmalardan korumakta ve akciğerden bakteriyel, hücresel ve partiküler kalıntıların uzaklaştırılmasını kolaylaştırmaktadır. Mukus üretimi astımın önemli bir özelliğidir ve özellikle daha şiddetli hastalıklarda morbidite ve mortaliteye önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır. Goblet hücreleri ve submukoza bezleri mukus salgılamaktadır, ve goblet hücrelerindeki artış ve submukoza bezlerindeki genişleme mukusun hipersekresyonuna neden olarak, hava yolu lümenlerinde daralma ve böylece hava yolu obstrüksiyonunun şiddetlenmesine

neden olabilmektedir. Goblet hücre hiperplazisi sürekli, hafif, orta ve ağır astımda gösterilmiştir (Tagaya ve Tamaoki 2007).

Goblet hücreleri müsin glikoproteinleri (MUC) üretmektedir ve bunların 13 tanesi insan hava yollarında tespit edilmiştir. İnsanlarda baskın olan müsin MUC5A olup, normal kişilerin hava yollarında ifade edilmekte ve astımlı bireylerde regülasyonu artmaktadır. Ovalbumin ile uyarılmış farelerde, Th2 hücrelerinin transferi sonrası goblet hücre hiperplazisi gösterilmiştir. Bu, büyük ihtimalle Th2 kaynaklı interlökin ifadesinin bir sonucudur. Yapılan çalışmalar, IL-13'ün salgı yapan hücrelerin oranında artış oluşturduğunu, aynı hücrelerde MUC5A'nın aşırı ifadesine neden olduğunu ve sonuç olarak hava yolu epitel hücrelerin primer kültüründe epitel hücre morfolojisini değiştirdiğini göstermektedir (Laoukili ve ark 2001, Christie ve Castro 2012).

(b) Subepitelyal fibrozis: Hava yolu epitelinin retiküler bazal membran kalınlaşması astımın karakteristik bir özelliğidir. Subepitelyal alanın kalınlaşması; kollajen I, III,V, fibronektin, laminin, tenaskinin bazal membran altında toplanması ile oluşmaktadır. Artmış hücre dışı matriks depolanması; yapısal ve inflamatuvar hücreler tarafından üretilen tümör büyüme faktörü β (TGF- β), IL-11 gibi sitokinler ve büyüme faktörlerinin reseptörlerindeki artma sonucu gelişen fibroblast aktivasyonuna bağlıdır (Roche, Beasley, Williams ve Holgate 1989).

Miyofibroblastlar, fibroblastlar ve miyositlerin fenotipik özelliklerine sahip özelleşmiş hücrelerdir ve subepitelyal fibrozisin anahtar efektörlerindedir. Bu hücreler, α -düz kas aktin ifade etmekte, inflamatuvar mediatörleri, ve doku tamiri ve yeniden yapılanma için gerekli olan hücre dışı matriks proteinlerini üretmektedirler (Christie ve Castro 2012).

TGF- β , epitel hücreleri, makrofajlar, fibroblastlar, lenfositler ve eozinofilleri içeren bir çok akciğer hücreleri tarafından üretilmekte, farede IL-13 aşırı ifadesini artırmakta ve fibroblastları α -düz kas aktin ifade etmek için uyarmaktadır (Batra ve ark 2004). Astımlı hava yollarında ve BAL sıvısında kontrollere göre TGF- β ifadesi artmaktadır. Buna ek olarak, TGF- β düzeyleri subepitelyal fibrozis, hava yolu

fibroblast sayıları ve hastalığın şiddeti ile ilişkilidir. Bu nedenle, aşırı TGF- β üretimi subepitelyal fibrozun gelişimi için önemli olabilmektedir (Christie ve Castro 2012).

(c) Düz kas kitlesinde artış: Düz kas kitlesinde artış, astımda hava yolu yeniden yapılanmasının en belirgin özelliğidir. Düz kas proliferasyonu; hipertrofi (hava yolu düz kas boyutunda artış), hiperplazi (hava yolu düz kas sayısında artış) ve mezenkimal hücrelerin hava yolu düz kas kümelerine göçü sonucu meydana gelmektedir (Bergeron, Al-Ramli ve Hamid 2009).

Mitojenler, hücre bölünmesini uyaran ve mitozu tetikleyen kimyasal bileşiklerdir. Bu bileşikler astım hava yollarında artan hava yolu düz kas kitle gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Mitojenler reseptör tirozin kinazlara, G protein-bağlı reseptörlere ve sitokin reseptörlerine bağlanmaktadır. Bu reseptör sistemleri, hücre kültür modellerinde hava yolu düz kas kitlesi artışı üretme yeteneğine sahiptir (Tagaya ve Tamaoki 2007). Mitojenlerin listesi oldukça kapsamlıdır ve TGF- β , IL-1 β , IL-6, tromboksanlar, lökotrienler, histamin, triptaz ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) içermektedir (Hirst ve ark 2004, Howarth ve ark 2004). Bu mitojenlerin neredeyse tamamı, astımlı hastaların hava yolu biyopsilerinde ve BAL sıvılarında tespit edilmiştir veya astımlı hava yolu hücre kültürlerinde belirlenmiştir (Pascual ve Peters 2005).

(d) Hava yolu duvarında vasküler değişiklik: Anjiyogenez ve mikrovasküler yeniden yapılanma, kronik şiddetli astım hava yollarında görülebilmektedir. Bu değişiklikler birçok faktör tarafından oluşturulmakta ve artan damarlanma, özellikle VEGF gibi proanjiyojenik moleküllerin sayısına göre üretilmektedir. VEGF hava yolu epitel hücrelerine, mononükleer hücrelere ve T lenfositlerine lokalizedir (Tanaka ve ark 2003). Önceki klinik çalışmalar, VEGF'in hava yolu yeniden yapılanmasında mediatör olarak ve astımda vasküler geçirgenliği artırmada önemli olduğunu göstermiştir. Daha sonra VEGF, epitel hücre proliferasyonu, kan damarı oluşumu ve endotel hücre sağkalımını uyaran çok fonksiyonlu anjiyojenik düzenleyici olarak değerlendirilmiştir (Clauss 2000). Astımlı hastalarda VEGF düzeyleri balgam ve BAL sıvısında artmaktadır ve bu düzeyler hastalık aktivitesi ile doğrudan ilişkilidir. Astımlı kişilerden alınan bronş biyopsi örneklerinde hava yolu

vaskülitinde, VEGF ve VEGF reseptör ifadelerinde artış gözlenmiştir (Hoshino, Nakamura ve Hamid 2001). Astım hayvan modellerinde, VEGF reseptör bloklayıcılarının hava yolu inflamasyonunu ve hava yolu aşırı duyarlılığını inhibe ettiği gösterilmiştir (Lee, Kwak ve Song 2002).

VEGF ayrıca Th2 sitokin düzeylerini yükselterek, inflamasyonda artışa neden olmaktadır. VEGF özellikle IL-13 sitokin düzeyini artırmakta, tersine IL-13 de VEGF üretiminde artışı sağlamaktadır. IL-13 aşırı ifade eden farelerde, allerjen uyarımından sonra BAL sıvılarında VEGF düzeylerinin belirgin olarak arttığı gösterilmiştir. VEGF reseptör antagonisti *in vivo* olarak kullanıldığında, hava yolu aşırı duyarlılığında azalma gözlenmiş, buna IL-13 ve IL-4 üretiminde azalma eşlik etmiştir (Lee ve ark 2004).

4.2.7. Allerjik astım fare modelleri

Hayvan modelleri astım patofizyolojisini aydınlatmak ve yeni terapötik hedefleri belirlemek ve değerlendirmek için kullanılmaktadır. Allerjen uyarım modelleri, klinik astımın birçok özelliğini göstermekte ve araştırmacılar tarafından yaygın bir biçimde kullanılmaktadır; ancak çoğu model akut allerjen uyarım işlemlerini içermektedir (Nials ve Uddin 2008).

İnhale allerjenlere karşı akut allerjik yanıt fare modelleri, astımda immünolojik ve inflamatuvar yanıtların altında yatan mekanizmaları aydınlatmak için, ve allerjik enflamasyonda kontrolü sağlamak için yeni hedefleri belirlemede ve incelemede kullanılmaktadır. Akut fare modelleri; yüksek IgE düzeyi, hava yolu inflamasyonu, goblet hücre hiperplazisi, epitel hipertrofisi, spesifik uyarana karşı AHR, bazı modellerde allerjen uyarımına erken ve geç faz bronkokonstriksiyon yanıtı gibi birçok temel klinik astım özelliğini göstermektedir. Ancak, bazı önemli farklılıklar da bulunmaktadır. Akut uyarım modellerinde, akciğer inflamasyonunun şekil ve dağılımı astımlı kişilerde gözlenenden farklıdır (Kumar ve Foster 2002). Akut modellerin kısa dönem niteliğinden dolayı, hava yollarının kronik inflamasyonu gibi kronik astımlı hastada oluşan birçok lezyon ve hava yolu yeniden yapılanma değişiklikleri gözlenmemektedir. Ayrıca, temel özelliklerin birçoğu kısa dönemlidir

ve bazı modellerde hava yolu inflamasyonu ve AHR'nın son allerjen uyarımdan sonra birkaç hafta içerisinde düzeldiği gösterilmiştir (McMillan ve Lloyd 2004).

Akut uyarım ile oluşturulan modeller ile ilgili bazı sorunları çözmek için, çeşitli araştırma grupları farelerde kronik allerjen uyarımı modeli geliştirmektedir. Kronik astım fare modellerinin temel amacı, klinik astımın hava yolu yeniden yapılanması ve kalıcı AHR gibi birçok özelliğini oluşturmak ve yeni tedavilerin terapötik ortamda değerlendirilmesini sağlamaktır (Kumar, Herbert ve Foster 2008).

Farelerde kronik allerjen maruziyeti ile, allerjene bağımlı hassasiyet, hava yolu mukozasına eozinofilik akın ile karakterize Th2-bağımlı allerjik inflamasyon ve AHR gibi insan astım işaretlerinin birçoğunun olduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak, bazı modellerde, hava yolu yeniden yapılanması ile goblet hücre hiperplazisi, epitel hipertrofisi ve subepitelyal fibroz geliştiği belirtilmiştir. Önemli olarak, kronik allerjen maruziyeti modellerinde bazı temel özelliklerin son uyarımdan sonra devam ettiği ve allerjen uyarımının kesilmesinden sonra hava yolu yeniden yapılanmasının bazı modellerde kalıcı olduğu gösterilmiştir. Bu modellerde, AHR ve akciğer inflamasyonunun kalıcılığı uygulanan allerjen maruziyet protokollerine bağlı olarak değişmektedir (Johnson ve ark 2004, McMillan ve Lloyd 2004, Lloyd 2007).

Kronik modelleri ile ilgili sınırlamalar mevcuttur. Bazı durumlarda, astımlı insanlarda gözlenmeyen fareye özgü özellikler belirtilmiştir. Örneğin, farede inflamasyon hava yolu geçirgenliği ile sınırlı değildir, fakat insanlarda sınırlıdır ve akciğer parankimal ve vasküler inflamasyon/yeniden yapılanma gözlenmektedir. Ayrıca, hava yolunda ya da epitelde mast hücrelerin az olması ya da olmaması, farelerin hava yolunda mast hücrelerin yetersizliğini göstermektedir (Wenzel ve Holgate 2006, Kumar ve Foster 2002).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 24.12.2012 tarih ve 71.2012.mar sayılı raporu ile onaylandı. Uygulama öncesinde kök hücrelerin hazırlanması Marmara Üniversitesi GEMHAM'da gerçekleştirildi, farelerle yapılan *in vivo* çalışmalar Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi'nde yapıldı, farelerin sakrifikasyonları sonrasında numuneler Marmara Üniversitesi Çocuk İmmünoloji Laboratuvarı'na götürülerek çalışmanın diğer aşamaları burada gerçekleştirildi.

5.1. Kullanılan Hücre Hatları

Araştırmada kullanılan fare EKH ve uPKH'leri, Koç Üniversitesi öğretim üyesi Doç. Dr. Tamer Önder tarafından sağlandı. Fare EKH'leri; 129 suşundan elde edilmiş, YFP işaretli, Oct4, SSEA-1 ve Nanog belirteçlerinin ifadesi ve üç germ tabakasına farklılaşma ile karakterize edilmiş hücrelerdir (Gibco, Invitrogen, Paisley, UK, kat no:S1514-100). uPKH'ler ise Oct4-YFP transgenik farelerin embriyonik fibroblastlarından (FEF), miRNA bazlı yeniden programlama lentivirüs vektörü (pLOVE-miR302/367) kullanılarak üretilmiş hücrelerdir.

5.2. Deney Hayvanlarının Temini ve Yaşam Koşulları

Deneylerde kullanılan 6-7 haftalık BALB/c fareler (n=24) Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi'nden temin edildi. Çalışmada kullanılan tüm fareler, 23°C kontrollü sıcaklıkta ve 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ışık siklusunda barındırıldı ve standart pelet fare yemi ve şehir şebeke suyu ile beslendi.

5.3. Çalışma Grupları

Çalışmaya dahil edilen 24 fare her grupta 4 fare olacak şekilde 6 gruba ayrıldı.

Grup 1 (OVA grubu, n=4): OVA uygulanan akut astım modeli oluşturulan grup

Grup 2 (OVA+EKH grubu, n=4): Akut astım modeli üzerine EKH (5×10^5 hücre) uygulanan grup

Grup 3 (OVA+uPKH grubu, n=4): Akut astım modeli üzerine uPKH (5×10^5 hücre) uygulanan grup

Grup 4 (PBS grubu, n=4): OVA uygulanmayan kontrol grubu

Grup 5 (PBS+EKH grubu, n=4): Kontrol grubu üzerine EKH (5×10^5 hücre) uygulanan grup

Grup 6 (PBS+uPKH grubu, n=4): Kontrol grubu üzerine uPKH (5×10^5 hücre) uygulanan grup

5.4. Çalışmanın Ana Basamakları

5.4.1. EKH ve uPKH kültürü ve karakterizasyonu

5.4.1.1. Besleyici hücre tabakalarının hazırlanması

5.4.1.2. Besleyici tabakalar üzerinde EKH ve uPKH kültürü

5.4.1.3. Alkalen fosfataz boyaması

5.4.1.4. Akım sitometri analizi

5.4.2. Akut astım fare modeli geliştirilmesi

5.4.3. Pluripotent kök hücrelerin intranasal uygulanması

5.4.4. Farelerin sakrifikasyonu ve kan, akciğer örneklerinin toplanması

5.4.5. Akciğer hücre süspansiyonlarından YFP⁺ hücre tayini

5.4.6. Akciğer hava yollarının histopatolojik olarak incelenmesi

5.4.7. BAL sıvısının toplanması ve hücre sayılarının belirlenmesi

5.4.8. Kan serumundan spesifik IgE tayini

5.4.9. Akciğer hücre süspansiyon süpernatantlarında sitokin tayini

5.4.10. Akciğer lenfosit hücrelerinden Treg hücre analizi

5.4.11. Akciğer lenfosit izolasyonu

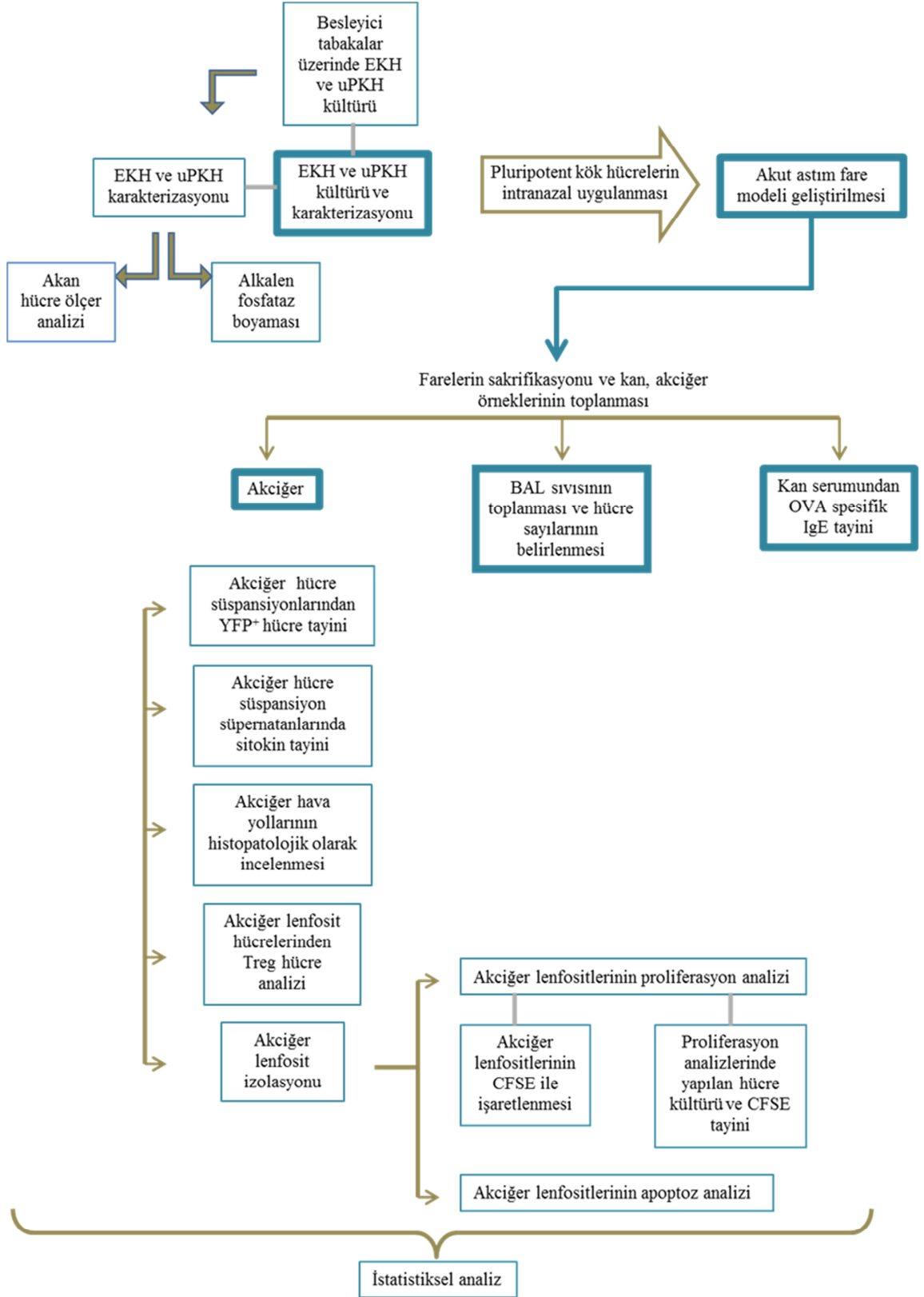
5.4.12. Akciğer lenfositlerinin proliferasyon analizi

5.4.12.1. Akciğer lenfositlerinin CFSE ile işaretlenmesi

5.4.12.2. Proliferasyon analizlerinde yapılan hücre kültürü ve CFSE tayini

5.4.13. Akciğer lenfositlerinin apoptoz analizi

5.4.14. İstatistiksel analiz



Şekil 5.1. Çalışmanın ana basamaklarının şematik gösterimi.

5.4.1. EKH ve uPKH kültürü ve karakterizasyonu

5.4.1.1. Besleyici hücre tabakalarının hazırlanması

Dondurulmuş olan ve 5. pasajda bulunan fare embriyonik fibroblast (FEF) hücreleri 37°C su banyosunda çözüldü ve 2 mM L-glutamin, 1 mM non essansiyel amino asit, 100 U/ml penisilin-streptomisin ve %10 FBS içeren 10 ml DMEM FEF hücre kültürü besiyeri içerisinde T-75'lik kültür kaplarına 5×10^5 hücre olacak şekilde ekildi ve 37°C'de inkübe edildi. Fibroblastların kültür kabını %90 kaplamasının ardından hücrelerin mitotik aktivitelerinin durdurulması için besiyeri uzaklaştırılıp 10 µg/ml mitomisin-c (ATCC SCRR-3020, VA, USA) içeren 10 ml DMEM FEF hücre kültürü besiyeri ile 2 saat 45 dak inkübe edildi. Hücrelerin mitotik aktiviteleri durdurulduktan sonra, kültür kapları 2 kez Ca^{2+} - Mg^{2+} içermeyen PBS içerisinde yıkandı ve 3 ml %0.25 Tripsin/EDTA (Invitrogen, Paisley, UK, kat no:25200) eklenerek 4 dak 37°C, %5 CO₂ içeren ortamda beklemeye bırakıldı. Hücrelerin üzerine 5 ml DMEM FEF hücre kültürü besiyeri eklendi ve tek hücre süspansiyonu elde edildi. Tek hücre süspansiyonu 15 ml'lik falkon tüplere alındı. 1200 rpm'de 5 dak santrifüj edildi. Elde edilen hücre peleti 1 ml DMEM FEF hücre kültürü besiyeri içerisinde sulandırıldı ve hücrelerin canlılığı belirlendi. Bu işlemten sonra hücreler %0,1 jelatinle kaplanmış 6 kuyulu kültür kaplarına 5×10^5 hücre/3 ml olacak şekilde ekilerek 37°C, %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. Hazırlanan besleyici tabaka hücreleri bir hafta içerisinde kullanıldı. Bir haftadan sonra yeni besleyici tabakalar oluşturuldu.

5.4.1.2. Besleyici tabakalar üzerinde EKH ve uPKH kültürü

Altı kuyucuklu kültür kabında hazırlanmış olan besleyici tabakalar üzerine, %0,05 Tripsin/EDTA ile kaldırılmış ve 2 mM L-glutamin, 1 mM non essansiyel amino-asit, 0,1 mM 2-merkaptetanol, 100 U/ml penisilin-streptomisin, 1000 U/ml lösemi inhibe edici faktör (LIF, 10^7 U) (ESGRO, Merck Millipore, Darmstadt, Almanya, kat no: ESG1107) ve embriyonik kök hücre kalite fetal sığır serumu (Hyclone, Thermo Scientific, Surrey, UK, kat no: SH30070.03E) içeren knock out DMEM (Gibco, Invitrogen, Paisley, UK, kat no:10829-018) besiyeri içerisinde 5×10^4

hücre/2 ml olacak şekilde EKH ve uPKH ekildi. EKH ve uPKH'ler 5 gün boyunca 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi ve besiyerleri her gün değiştirildi.

5.4.1.3. Alkalen fosfataz boyaması

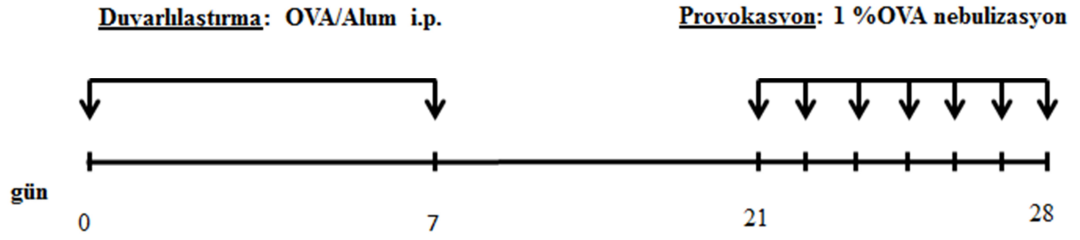
Fare EKH ve uPKH'lerde alkalen fosfataz aktivitesinin belirlenmesi için Alkalın Fosfataz deteksiyon kiti (Merck Millipore, Darmstadt, Almanya, kat no: SCR004) kullanıldı. 5 günlük EKH ve uPKH'lerden besiyerleri alınarak, hücreler %4 paraformaldehid içeren fiksasyon solüsyonu içerisinde 1-2 dak fikse edildi. Daha sonra solüsyon hücrelerden uzaklaştırıldı ve 1X durulama tamponu ile yıkandı. Hücreler üzerine yeteri kadar, 2:1:1 oranında fast red violet, naphthol ve distile su ile hazırlanmış boya solüsyonu eklendi ve karanlıkta oda ısısında 15 dakika inkübe edildi. Boya solüsyonu alınarak, hücreler 1X durulama tamponu ile yıkandı. Daha sonra hücreler Hematoksilen ve Eosin (H&E) ile boyanarak mikroskop görüntüleri alındı.

5.4.1.4. Akan hücre ölçer analizi

Pluripotent kök hücrelerine spesifik hücre yüzeyi belirteçleri ve hücre içi transkripsiyon faktörlerini karakterize etmek amacıyla BD Stemflow insan ve fare pluripotent kök hücre analiz kiti (BD Biosciences, San Diego, CA, USA, katalog no: 560477) kullanıldı. Knock out-DMEM kültür besiyeri içerisinde tek hücre süspansiyonu haline getirilen EKH ve uPKH'ler, 300 x g'de 5 dak santrifüj edildi ve süpernatant döküldü. Hücreler üzerine %4 paraformaldehit içeren BD sitofiks fiksasyon tamponu eklendi (1x10⁷ hücre için 1 ml olacak şekilde) ve 20 dak oda ısısında inkübe edildi. Daha sonra hücreler +4°C'de 24 saat saklandı. Bir gün sonra, hücreler 2 kez 1 ml 1X BD perm/yıkama tamponu içerisinde yıkandı ve 500 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Hücreler, üzerlerine 1X BD perm/yıkama tamponu eklenerek 10 dakika oda ısısında bekletildi. Daha sonra üzerlerine 50 şer µl Oct3/4-PerCP, SSEA-1-PE, SSEA-4-APC antikoları eklenen hücreler 30 dakika oda ısısında inkübe edildi. İki kez 1X BD perm/yıkama tamponu ile yıkanan hücreler 400 µl hücre yıkama solüsyonu (BD Biosciences, San Diego, CA, USA, kat no: 349524) içerisinde çözüldü ve akan hücre ölçer cihazında (BD FACS Canto) analiz yapıldı.

5.4.2. Akut astım fare modeli geliştirilmesi

Akut astım fare modeli geliştirmek için gruba 6-7 haftalık 12 adet BALB/c fare alındı. BALB/c farelerde akut astım modeli duyarlılaştırma ve allerjen provokasyonu olmak üzere iki aşamada oluşturuldu (Şekil 5.2):



Şekil 5.2. BALB/c farelerde akut astım modeli geliştirilmesi

1. Duyarlılaştırma (Sensitizasyon): İntraperitoneal yolla 10 µg ovalbumin (OVA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, kat no: A5503) + 1,5 g alum (Thermo Scientific, Surrey, UK, kat no: 77161) / 100 µl serum fizyolojik (SF, %0,9 luk NaCl) içerisinde 0. ve 7. günlerde uygulandı (Resim 5.1).
2. Allerjen Provokasyonu: 21-28. günlerde BALB/c farelere ultrasonik nebulizatör ile PBS solüsyonu içerisinde %1 OVA 7 gün arka arkaya 20 şer dakika verildi (Resim 5.2).



Resim 5.1. BALB/c farelere intraperitoneal yolla OVA uygulaması



Resim 5.2. BALB/c farelere ultrasonik nebulizatör ile OVA provokasyonu

5.4.3. Pluripotent kök hücrelerin intranasal uygulanması

Akut astım modeli oluşturma protokolünü takiben, 28. günde astım ve kontrol grubu farelere YFP⁺ EKH ve uPKH uygulaması yapıldı. Hücreler 100 µl besiyeri içerisinde 5x10⁵ hücre olacak şekilde, intranasal yolla farelere uygulandı. Bu uygulamada, pipet yardımıyla farenin burnuna EKH ve uPKH solüsyonları küçük damlalar halinde bırakıldı ve farenin nefes alıp verirken bu damlaları burnuna çekmesi beklendi. Uygulamadan 24 saat sonra fareler sakrifiye edildi.

5.4.4. Farelerin sakrifikasyonu ve kan, akciğer örneklerinin toplanması

Deney grubu fareler Rompun/ketalar anestezi maddelerinin (1:9) oranında karışımıyla intraperitoneal yolla, her fare için oran 10:90 mg/kg olacak şekilde uygulandı. Fareler anestezi altında kalplerinden insülin şırıngası yardımıyla kan alınarak öldürüldü. Toplanan kan örnekleri oda ısısında 4000 rpm'de 10 dak santrifüj edildi ve kan serumları alınarak spesifik IgE analizi için -20°C'de saklandı.

Fareler sakrifiye edildikten sonra sağ akciğer alt lobları patoloji çalışmaları için %10'luk formaldehit içerisine alındı. Kalan akciğer örnekleri %1 antibiyotik içeren besiyeri içerisine alındı ve hücre kültürü laboratuvarına transferi gerçekleştirildi.

5.4.5. Akciğer hücre süspansiyonlarından YFP⁺ hücre tayini

Laboratuvara getirilen akciğerler steril PBS içerisinde yıkanarak, 100U/ml penisilin-streptomisin ve 0.005 g kollajenaz tip IV içeren DMEM besiyeri içerisinde AutoMACS C tüp içerisine konuldu ve *M-lung-01* programı ile ilk homojenizasyon yapıldı. C tüp 45 dakika rotatör yardımıyla 37°C inkübatör içerisinde inkübe edildi. Tüp içerisindeki akciğer, *M-lung-02* programı ile ikinci kez homojenize edildi ve 40 mikronluk filtreden geçirildi. Elde edilen hücre süspansiyonu içerisinde 100 µl'lik örnekler toplanarak, 2 ml hücre yıkama solüsyonu ile 2 kez 1300 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve hücreler 500 µl hücre yıkama solüsyonu içerisinde çözüldü. Bu işlem sonunda hücreler, YFP⁺ hücre tayini için akan hücre ölçer cihazının (BD FACS Calibur) FL1 panelinde okutuldu. Ayrıca, homojenizasyon sonrası hücreler 1200

rpm'de 5 dak santrifüj edildi ve 200'er µl süpernatant örnekleri sitokin analizi yapılmak için -20°C'de saklandı.

5.4.6. Akciğer hava yollarının histopatolojik olarak incelenmesi

Sakrifikasyon sonrası tüm farelerin sağ akciğer alt lobu örnekleri, tedavi gruplarını bilmeyen iki histolog tarafından yapısal değişiklikler açısından incelendi.

Işık mikroskobu ile değerlendirme için örnekler %10'luk formalinde fikse edildi. Fiksasyon sonrası doku örnekleri rutin histolojik işlemler ile alınarak parafine gömüldü. Parafine gömülü olan akciğer dokularından 5 µm kesitler alınarak boyama işlemi gerçekleştirildi.

Işık mikroskobu ile değerlendirme için tüm örnekler 2 farklı boyama işlemi uygulandı. H&E ile boyanan kesitler, akciğer epitel ve düz kas hücre kalınlıklarının belirlenmesi; Periyodik Asit-Schiff (PAS) ile boyanan kesitler ise bazal membran kalınlıklarının ve 500 hücre içerisinde hiperplazik goblet hücre sayısının belirlenmesi için kullanıldı. Hava yolları çevrelerine göre distal (küçük) (<500µm) ve proksimal (büyük) (>1000µm) hava yolları olmak üzere sınıflandırıldı. Ölçümler her iki hava yolunda epitel, subepitelyal düz kas ve bazal membran kalınlığı 2-3 farklı havayolunun 7 farklı noktasından kalibre edilmiş mikrometrik ölçüm cihazı ile ölçüldü (Olympus BX53, Japonya) ve mikroskop görüntüleri alındı.

5.4.7. BAL sıvısının toplanması ve hücre sayılarının belirlenmesi

Sakrifikasyon sonrasında trakeadan intraket yardımıyla, 1 ml Ca^{+2} - Mg^{+2} içermeyen PBS ile BAL yapıldı. Toplam 1 ml PBS üç defa, her seferinde 300-350 µl verilip derhal aspire edilmesi şeklinde uygulandı. BAL sıvıları 1500 rpm'de 3 dakika sitosantrifüj edildi ve lam üzerinde örnekler hazırlandı. Havada kurutularak tesbit edilen örnekler Giemsa boyası (Merck, Darmstadt, Almanya, kat no: HX249389) ile boyandı. Işık mikroskopunda 100X büyütme ile 100 hücre sayıldı ve nötrofil, eozinofil, lenfosit ve monosit hücrelerinin yüzde oranları hesaplandı.

5.4.8. Kan serumundan spesifik IgE tayini

Kan serumları -20 °C'den alınarak 1:10 oranında dilüe edildi ve spesifik IgE tayini için Fare anti-OVA-IgE Eliza kiti (Shibayagi Co., Ltd., Ishihara, Japonya, kat no:AKRIE-030) kullanıldı. Kit protokolüne uygun olarak öncelikle standartlar hazırlandı. OVA-yüklü plak 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı. Vakum pompası ile kurutulan plak kuyularına 50 µl biotin-bağlı anti-fare IgE antikoru eklendi. 600 rpm'de 3 kez 10 sn olacak şekilde çalkalama sonrası, kuyular üzerine dilüe edilen örnekler ve standartlardan 10'ar µl eklenerek, plağın üzeri parafilm ile kaplandı ve oda ısısında 1 saat inkübe edildi. Reaksiyon karışımı dökülerek, 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı ve plak vakum pompası ile kurutuldu. Tüm kuyulara 100 µl HRP-bağlı avidin solüsyonu eklendi. 600 rpm'de 3 kez 10 sn olacak şekilde çalkalama sonrası, plağın üzeri parafilm ile kaplandı ve oda ısısında 30 dak inkübe edildi. Tekrar reaksiyon karışımı döküldü, 3 kez yıkama yapıldı ve vakum pompası ile plak kurutuldu. Kuyulara 100 µl TMB eklenerek, parafilm sarılı olarak 20 dakika oda ısısında bekletildi. İnkübasyon sonrası, tüm kuyulara 100 µl reaksiyon durdurucu eklendi ve 30 dak içerisinde Eliza okuyucu yardımıyla 450 nm ve 620 nm'de örnekler okutuldu. Standart örneklerine göre grafik eğrisi oluşturuldu ve her bir örnekteki spesifik IgE miktarı elde edilen denkleme göre belirlendi.

5.4.9. Akciğer hücre süspansiyonu süpernatantlarında sitokin tayini

Akciğer hücre süspansiyonu süpernatantları -20 °C'den alındı ve sitokin analizi BD Cytometric Bead Array (CBA) fare Th1/Th2/Th17 sitokin kiti (BD Biosciences, San Diego, CA, USA, kat no: 560485) kullanılarak akan hücre ölçer cihazında yapıldı. Kit protokolüne göre öncelikle standart dilüsyonlar hazırlandı. Bu işlem için standartlar 15 ml'lik falkon tüpüne boşaltılarak, 2 ml seyreltici solüsyon içerisinde çözüldü. 15 dak oda sıcaklığında inkübe edilen standart örneği pipetleme ile yavaşça karıştırıldı ve belirli oranlarda dilüsyonları yapıldı (negatif kontrol, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512 ve 1:1024). Daha sonra boncukların hazırlanması işlemine geçildi. Kit içeriğindeki boncuklar pipetleme işleminden önce kısaca vorteks ile karıştırıldı. Tüp sayısı belirlendikten sonra her bir boncuktan her bir tüpe 5 µl eklenecek şekilde karışım hazırlandı.

Hazırlanan standart tüplerine 25 µl standartlardan, örnek tüplerine ise 25 µl örneklerden konuldu. Boncuk karışımı 5 sn vorteksledi ve her bir tüpe 25 µl boncuk karışımından eklendi. Tüpler iyice karıştırıldıktan sonra tüplere 25 µl deteksiyon reaktifinden konuldu. Tüpler iyice karıştırılıp 2 saat inkübasyona alındı. İki saatin bitiminde 1 ml yıkama solüsyonu eklenerek tüpler 200 x g'de 5 dak santrifüj edildi. Yıkama sonrası hücelere 300 µl yıkama solüsyonu eklenip tekrar süspansiyon haline getirildi. Örnekler sırasıyla akan hücre ölçer cihazında okutuldu. Analizler sırasında, sitokinlere uygun hazırlanan standartlar çerçevesinde grafik eğrisi oluşturuldu ve her bir örnekteki sitokin miktarları elde edilen denkleme göre belirlendi.

5.4.10. Akciğer lenfosit hücrelerinden Treg hücre analizi

Tüm gruplarda elde edilen akciğer hücre süspansiyonları 40 mikronluk hücre süzgecinden geçirildi ve içerisinden 200 µl örnek toplandı. Santrifüj işleminden sonra hücreler Fare Regülatör T Hücre boyama kiti (eBioscience, CA, USA, kat no: 88-8111) protokolüne uygun şekilde hazırlandı. Santrifüj sonrası hücreler üzerine 100 µl Ca^{+2} - Mg^{+2} içermeyen PBS solüsyonu eklendi. Tüplere 0.5 er µl anti-CD25 ve anti-CD4 antikoları eklenerek 30 dakika karanlık ortamda oda ısısında bekletildi. İnkübasyon sonrasında, tüpler üzerine 2 ml soğuk akan hücre ölçer boyama tamponu eklenerek 1500 rpm'de 10 dak santrifüj edildi. Süpernatant dökülerek, hücreler üzerine 1 ml fiksasyon/permeabilizasyon tamponu eklenerek, vorteks yardımıyla iyice karıştırıldı. 45 dak karanlık ortamda +4 C°'de inkübasyona bırakıldı. Tüpler üzerine 2 ml permeabilizasyon tamponu eklenerek 1500 rpm'de 10 dak santrifüj edildi. Hücreler 100 µl permeabilizasyon tamponu içerisinde çözüldü ve 0.5 µl anti-Foxp3 eklendi. +4 C°'de 30 dak inkübasyon sonrası, tüplere 2 ml permeabilizasyon tamponu eklenerek 1500 rpm'de 10 dak santrifüj edildi. Süpernatantlar dökülerek, hücreler üzerine 200 µl akan hücre ölçer boyama tamponu eklendi ve tüpler cihazda okutuldu.

5.4.11. Akciğer lenfosit izolasyonu

Akciğer hücreleri 40 mikronluk hücre süzgecinden geçirildi ve 10 dakika 200 x g de santrifüj edildi. Süpernatant döküldü ve ortamdan eritrositleri uzaklaştırmak için 1 lt distile su içerisinde 8,29 g NH_4Cl (Riedel-de Haen, Darmstadt, Almanya, kat no:

11209), 1 g KHCO_3 (Merck, Darmstadt, Almanya, kat no: A708154), 37 mg EDTA (AppliChem, Darmstadt, Almanya, kat no: A1103) içeren lizat solüsyonu kullanıldı. Eritrosit lizatu, 0.22 μm 'lik mikrobiyolojik filtre ile sterile edildi ve 15 ml'lik steril falkon tüpü içerisinde süspanse edilmiş lenfositler üzerine 6-7 ml'ye kadar eritrosit lizatu eklendi. 5 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 800 x g'de falkon tüpleri santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatantlar dökülerek dipte kalan lenfositler 3 kere PBS solüsyonu ile 1200 rpm'de 5 dak yıkandı. Son yıkamadan sonra, hücreler % 10 FBS, 100 U/ml penisilin-streptomisin içeren DMEM hücre kültürü besiyeri ile 1 ml'ye tamamlandı. 1 ml'deki canlı lenfosit sayısı tayini için lenfosit süspanسیونunundan 10 μl alınarak 10 μl Tripan mavisi ile (1:1 oranında) karıştırıldı ve karışım 4-5 dakika bekletildikten sonra boyayı içine almamış ve şişmemiş lenfositler canlı olarak nitelendirilerek, Thoma lamında 16 büyük kare 20 x'lik büyütme altında sayıldı. Çıkan sayı 2×10^4 ile çarpılarak 1 ml'deki lenfosit sayısı belirlendi.

5.4.12. Akciğer lenfositlerinin proliferasyon analizi

Karboksifloresan süksinimidil ester (CFSE) hücre zarından geçebilen floresan boyadır. Sitoplazmaya girince esteraz aktivitesi ile floresan grubun asetatları kesilerek, floresan ışığa açığa çıkar ve hücre zarından geçme özelliğini yitirir. Bu şekilde hücrelerin sitoplazmasının boyanması sağlanır. Hücreler ikiye bölündükçe, floresan yoğunluğu hücreler arasında paylaşılır. Bu şekilde hücre proliferasyonu akan hücre ölçer cihazı ile değerlendirilir.

5.4.12.1. Akciğer lenfositlerinin CFSE ile işaretlenmesi

Akciğer dokularından izole edilen lenfositler, proliferasyon takibi için CFSE (Invitrogen, Paisley, UK, kat no: C1157) ile işaretlendi. Bu işlem için, 1-20 milyon lenfosit 1 ml DMEM hücre kültürü besiyerinde çözüldü, hücrelere 1 μl CFSE (5 $\mu\text{mol/l}$) eklendi ve pipetleme ile iyice karıştırıldı. Hücreler 12 dak $+4^\circ\text{C}$ ' de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüplere 2 kez 12 ml Ca^{+2} - Mg^{+2} içermeyen PBS eklendi ve 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant döküldü ve hücreler 1 ml DMEM

kültür besiyeri içerisinde çözüldü. 1 ml'deki canlı lenfosit sayısı, lenfosit süspansiyonu 1:1 oranında Tripan mavisi ile karıştırılarak belirlendi.

5.4.12.2. Proliferasyon analizlerinde yapılan hücre kültürü ve CFSE tayini

CFSE ile işaretlenen lenfosit hücreleri %10 FBS, 100 U/ml penisilin-streptomisin içeren DMEM hücre kültürü besiyeri içerisine 5×10^5 hücre/ml olacak şekilde alındı. 72 saat (1 µg/ml) anti CD3-anti CD28 ile 37°C, %5 CO₂ inkübatörüne konuldu. Negatif kontrol olarak hücelere anti CD3-anti CD28 eklenmeden kültür yapıldı. Kültür sonrası hücreler 2 kez 2 ml yıkama solüsyonu ile yıkandı. Bu işlemden sonra 500 µl yıkama solüsyonunda çözülerek, akan hücre ölçer cihazında proliferasyon FL1 filtresi kullanılarak belirlendi.

5.4.13. Akciğer lenfositlerinin apoptoz analizi

Apoptoz, embriyonik gelişim ve doku homeostazının devamında oluşan normal bir fizyolojik işlemdir. Apoptotik program birçok morfolojik değişimle karakterize edilir. Plazma membranının bozulması en erken özelliğidir. Apoptotik hücrelerde, sağlıklı hücrelerde plazma membranının sitozolik kısmında bulunan fosfatidilserin, hücre dışına çıkar ve bu durum florasan işaretli Annexin-V ile tayin edilir. Annexin-V, Ca⁺² bağımlı fosfolipid-bağlayan proteindir ve yüksek afinite ile fosfatidilserine bağlanır. Apoptoz ya da nekroza giden hücre ölümünün geç aşamasında ise membran bütünlüğü kaybı meydana gelir. Bu nedenle, Annexin V propidium iyodid (PI) gibi canlılık boyası ile kullanılır. PI, nükleik asitlere bağlanan bir ajan ve florasan moleküldür. PI genellikle canlı hücreleri boyamaz ve yaygın olarak ölü hücrelerin belirlenmesinde kullanılır. Bu sayede akan hücre ölçer analizi ile; canlı hücreleri Annexin V ve PI negatif hücrelerin yüzdesi, erken apoptotik hücreleri Annexin V pozitif -PI negatif hücrelerin yüzdesi, geç geç apoptotik ve ölü hücreleri ise Annexin V ve PI pozitif hücrelerin yüzdesi vermektedir.

Akciğer dokularından izole edilen lenfositlerin apoptoz analizi için Annexin V: FITC Apoptosis Detection Kit II (BD Biosciences, San Diego, CA, USA, katalog no: 556547) kullanıldı. Lenfosit hücreleri %10 FBS, 100 U/ml penisilin-streptomisin içeren DMEM hücre kültürü besiyeri içerisine 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde alındı.

72 saat (1 µg/ml) anti CD3 (eBioscience Inc., San Diego, CA, kat no: E06295)-anti CD28 (eBioscience Inc., San Diego, CA, kat no: E06392) ile 37°C, %5 CO₂ inkübatörüne konuldu. Negatif kontrol olarak hücelere anti CD3-anti CD28 eklenmeden kültür yapıldı.

Kültür sonrası örneklerin süpernatantları toplanarak sitokin tayini için -20°C’de saklandı ve hücreler kit protokolüne uygun şekilde hazırlandı. Hücreler 2 kez 100 µl Ca⁺²-Mg⁺² içermeyen PBS ile yıkandı ve bu işlemde sonra 100 µl bağlanma tamponu içerisinde çözüldü. Üzerlerine 1,5 µl Annexin V ve 1,5 ul PI eklendi. Tüpler karanlıkta 15 dak oda ısısında inkübe edildi. Her bir tüpe 400’er µl bağlanma tamponu ilave edildi ve akan hücre ölçer cihazında Annexin-V için FL1 ve PI için FL2 filtreleri kullanılarak okuma gerçekleştirildi. Negatif kontrol hücreleri, akan hücre ölçer analizinde hücre kapılarının belirlenmesinde kullanıldı.

5.4.14. 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) (minimu-maksimum) değerleri 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’den küçük değerler anlamlı olarak kabul edildi.

5.5. 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
Mikrosantrifüj	Spectrafuge	16M
Hassas Terazı	Chyo	JL-200
Mikropıpet Setı	Thermo	--
Vorteks	Yellow line	TTS 2
Isıtmalđ Manyetik Karıřtırıcđ	Janke&Kunkelika	İKAMAG RH
Homojenizatör	MACS Miltenyi Biotec	Gentle MACS Dissociator
Rotator	MACS Miltenyi Biotec	MACSmix
Su Banyosu	Techne	TE-10A DIKLM
Akan Hücre Ölçer	BD	FACS Calibur
Akan Hücre Ölçer	BD	Canto
Işık Mikroskopu	Olympus	BX53

6. BULGULAR

6.1. Farelerde Akut Astım Modeli Geliştirilmesi

Çalışma süresince herhangi bir nedenle çalışma dışında bırakılan veya ölen fare olmadı. Çalışma her grupta 4'er fare olacak şekilde tamamlandı.

PBS (kontrol grubu) ve OVA (astım grubu) gruplarında; proksimal ve distal hava yollarının epitel kalınlığı, düz kas kalınlığı, bazal membran kalınlığı ve 500 hücre içerisindeki goblet hücre sayısı belirlendi. Tablo 6.1'de PBS ve OVA gruplarının histolojik verileri ve istatistik sonuçları gösterildi. Her iki grubun akciğer ışık mikroskop görüntüleri Şekil 6.1'de verildi. Bu sonuçlar akut astım modelinin iyi bir şekilde oluştuğunu göstermekte idi.

Tablo 6.1. PBS ve OVA gruplarında proksimal (A) ve distal (B) hava yollarının histolojik verileri ve istatistik sonuçları

A

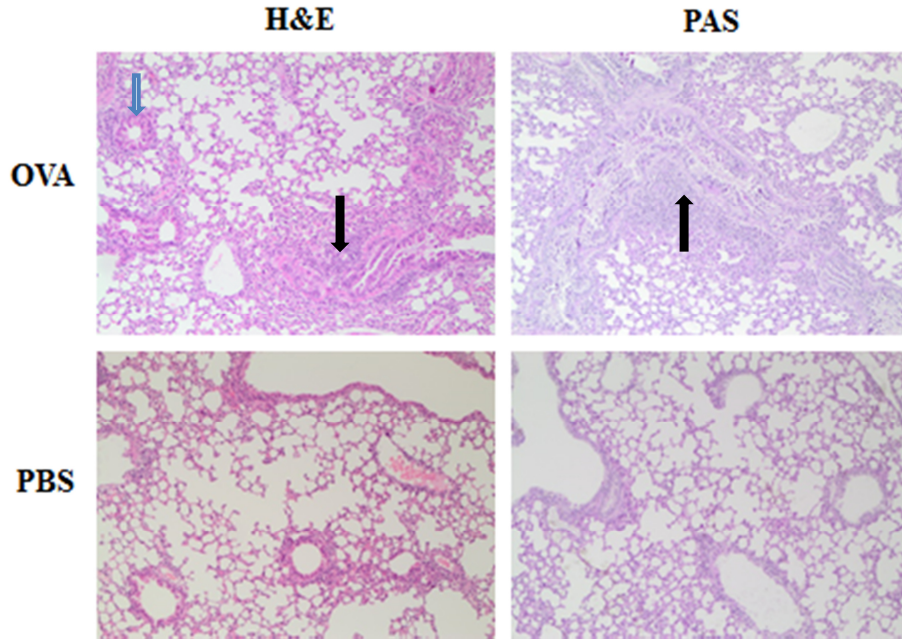
Proksimal hava yolu	PBS	OVA	<i>P</i>
Epitel kalınlığı (µm)	7,1±0,24	14,9±2,2	0.0035**
Düz kas kalınlığı (µm)	1,4±0,1	5,2±0,7	0.0006***
Bazal membran kalınlığı (µm)	1,07±0,1	1,6±0,02	0.0019**
500 hücredeki Goblet hücre sayısı (n/500)	0	40±10,5	<0.001***

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ istatistiksel olarak anlamlı

B

Distal hava yolu	PBS	OVA	<i>P</i>
Epitel kalınlığı (µm)	6,05±0,5	10,67±0,9	0.0019**
Düz kas kalınlığı (µm)	1,46±0,1	3,38±0,5	0.003**
Bazal membran kalınlığı (µm)	0,97±0,07	1,39±0,01	0.0009***
500 hücredeki Goblet hücre sayısı (n/500)	0	14±2	<0.001***

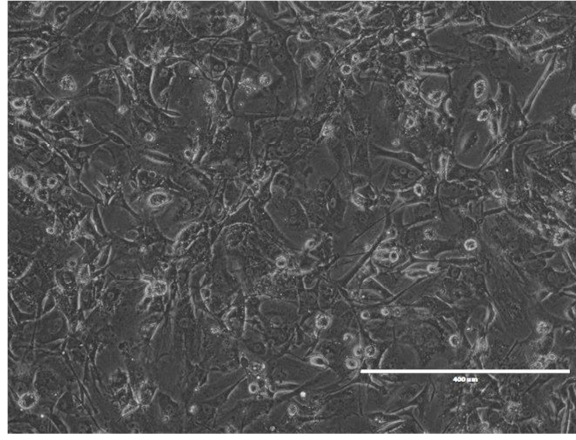
** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ istatistiksel olarak anlamlı



Şekil 6.1. OVA ve PBS gruplarının ışık mikroskop görüntüleri. Özgün büyütmeler: 10X. (⇒) Perivasküler infiltrasyon, (⇨) Peribronşial infiltrasyon

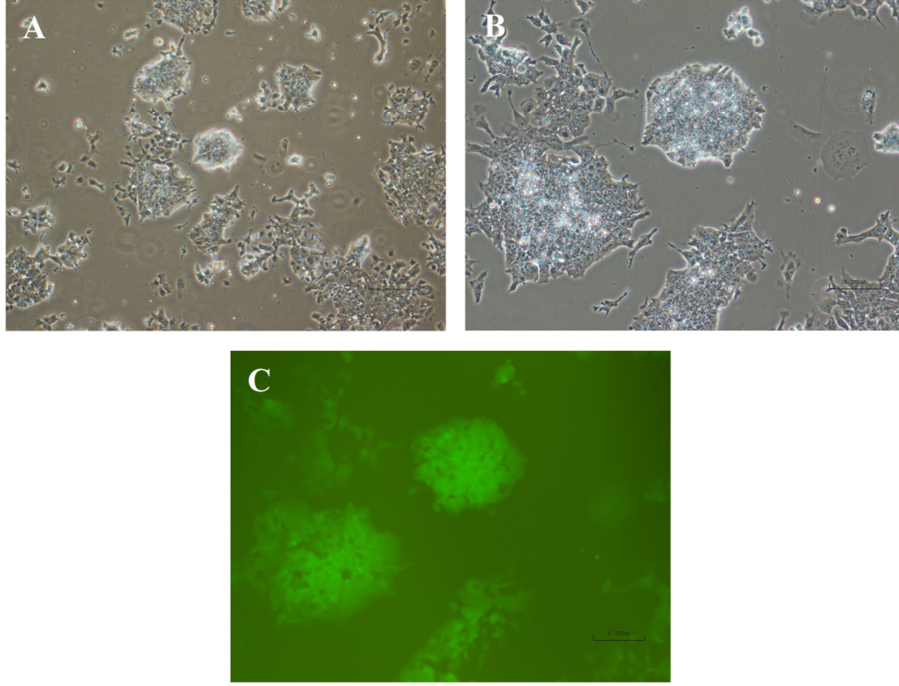
6.2. Fare EKH ve uPKH'lerin Karakterizasyonu ve Akut Astım Modeli Geliştirilmiş Farelere Uygulanması

Fare EKH ve uPKH'lerine besleme ve destek amacıyla kullanılmak üzere, 5. pasajda bulunan FEF hücrelerinin mitotik aktiviteleri durduruldu ve bu hücreler EKH ve uPKH'lerin eldesinden bir gün önce 6 kuyulu kültür kabına 5×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi (Şekil 6.2).

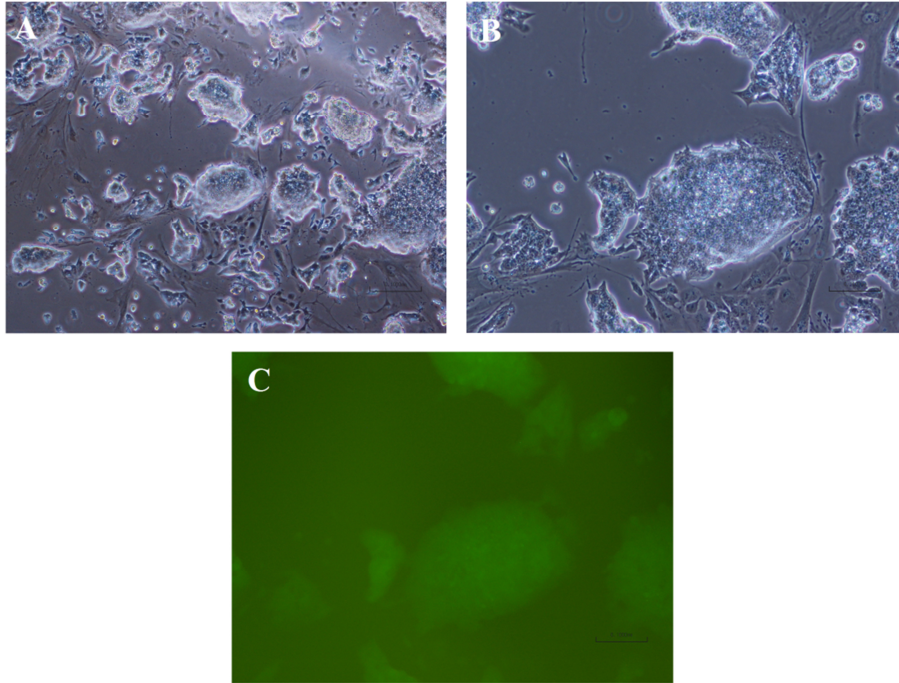


Şekil 6.2. 1. gün besleyici hücre tabakalarının invert mikroskop görüntüsü. Özgün büyütme: 10X

Çalışmamızda, Koç Üniversitesi öğretim üyesi Doç. Dr. Tamer Önder tarafından sağlanan YFP işaretli fare EKH ve uPKH'ler kullanıldı. Besleyici tabaka olmayan kültür koşullarında inkübe edilen ve T-25'lik kültür kabında bulunan EKH (Şekil 6.3) ve uPKH'lerin (Şekil 6.4) mikroskop görüntüleri alındı. Elde edilen hücreler, tripsinizasyon işlemi ile tek hücre süspansiyonu haline getirildi ve süspansiyonlarda bulunan hücre sayıları belirlenerek, karakterizasyon işlemlerinde kullanıldı. Ayrıca, süspansiyon hücreler OVA grubu ve kontrol grubundan 4'er fareye 5×10^5 hücre olacak şekilde intranasal (i.n.) yolla uygulandı.



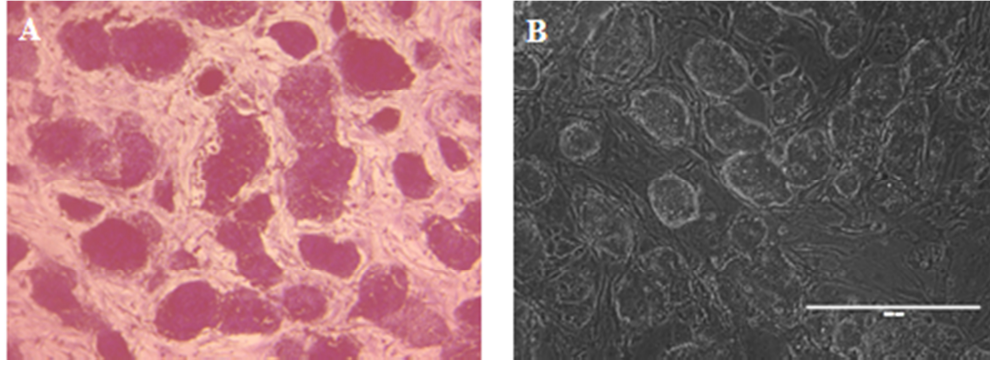
Şekil 6.3. Besleyici tabaka olmayan kültür koşullarında inkübe edilen fare EKH'lerin faz-kontrast ve florasın mikroskopundaki görünüşleri. Özgün büyütmeler: (A) 4X, (B) ve (C) 10X



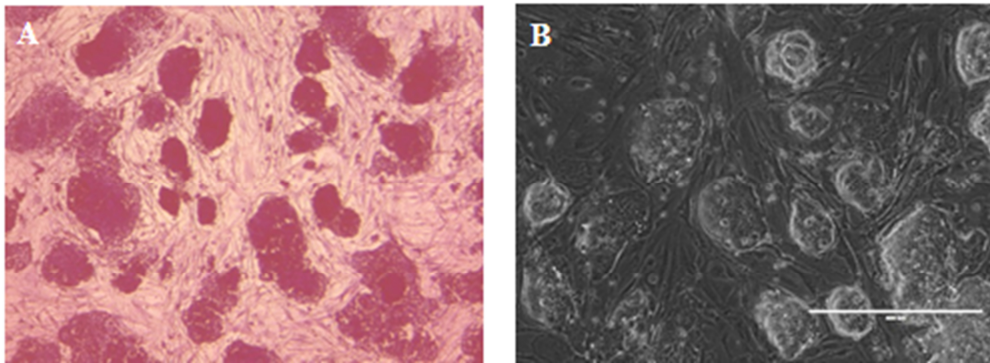
Şekil 6.4. Besleyici tabaka olmayan kültür koşullarında inkübe edilen fare uPKH'lerin faz-kontrast ve florasın mikroskopundaki görünüşleri. Özgün büyütmeler: (A) 4X, (B) ve (C) 10X

6.2.1. Alkalen fosfataz aktivitesi

Alkalen fosfataz pluripotent kök hücrelerin tüm tipleri için evrensel bir belirteçtir, fakat pluripotansa özgül değildir. Bu nedenle, alkalen fosfataz boyaması pluripotent durum için destekleyici bir kanıt olarak kullanılmaktadır (Hackett ve Fortier 2011). Alkalen fosfataz aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla, 5×10^4 hücre olacak şekilde bir gün önce hazırlanan besleyici tabaka hücrelerin üzerine elde edilen tek hücre süspansiyonları ekildi ve 5 gün inkübe edildi. 5 gün sonunda yapılan alkalen fosfataz boyaması sonucu, kültüre edilen EKH ve uPKH kolonilerinin tamamının alkalen fosfataz aktivitesi gösterdiği gözlemlendi (Şekil 6.5 ve 6.6).



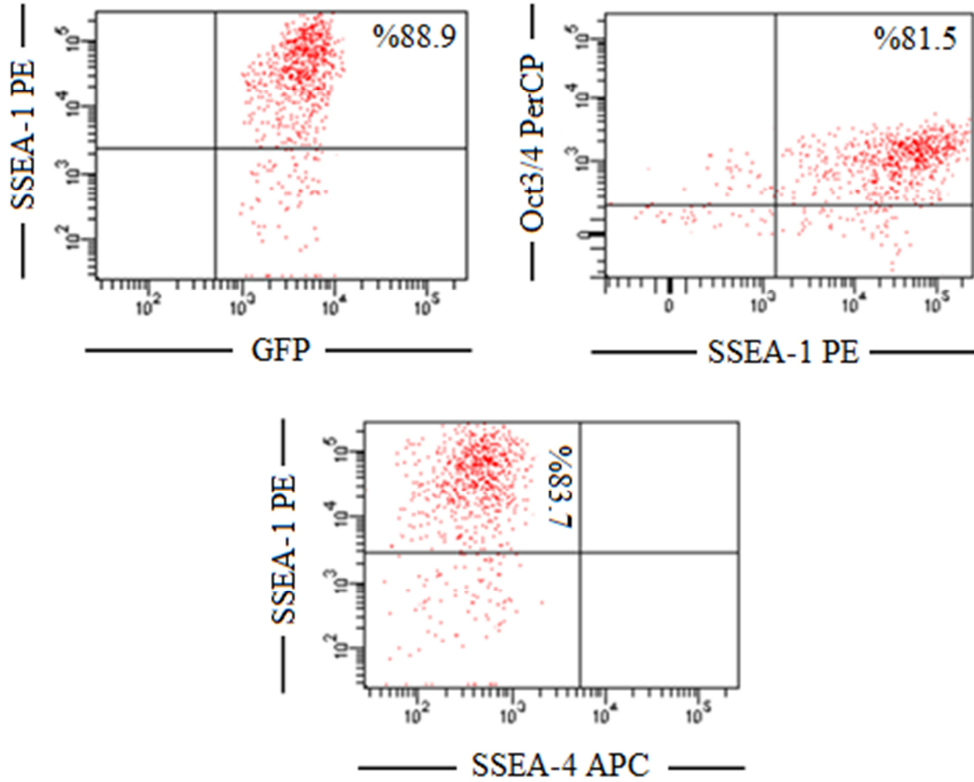
Şekil 6.5. Besleyici tabaka üzerindeki fare EKH kolonilerinin alkalen fosfataz aktivitesi (A). Kolonilerin boyanmadan önceki mikroskop görüntüsü (B). Özgün büyütmeler: (A) 10X, (B) 10X



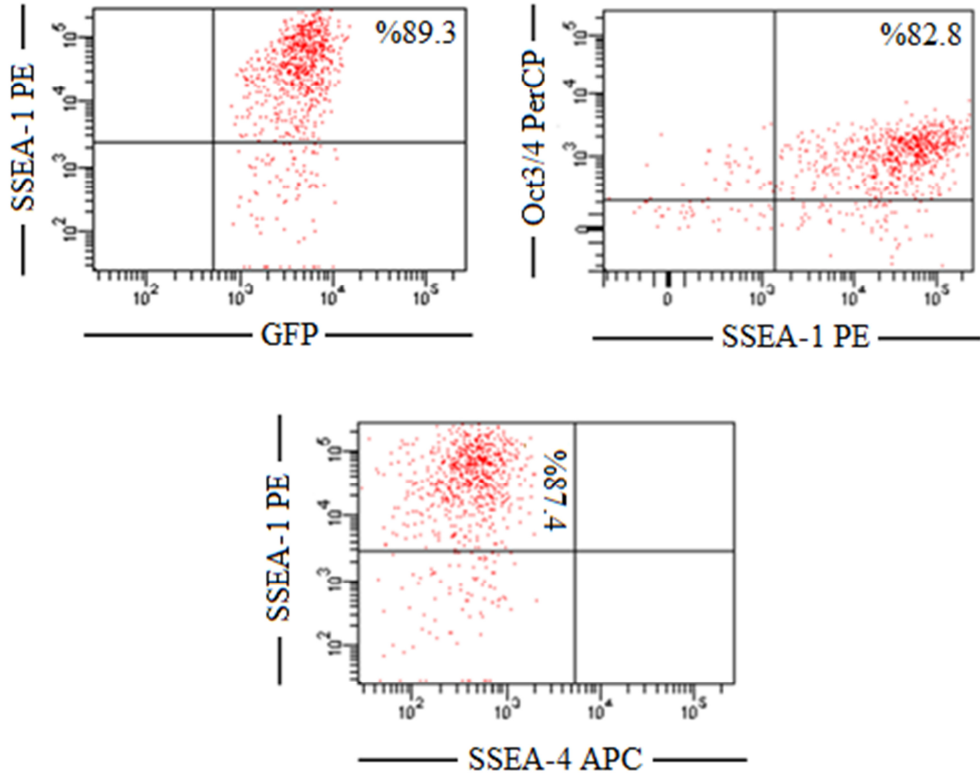
Şekil 6.6. Besleyici tabaka üzerindeki fare uPKH kolonilerinin alkalen fosfataz aktivitesi (A). Kolonilerin boyanmadan önceki mikroskop görüntüsü (B). Özgün büyütmeler: (A) 10X, (B) 10X

6.2.2. Akan hücre ölçer analizi

İnsan ve fare pluripotent kök hücreler için diğer bir karakterizasyon yöntemi, özgül hücre yüzey belirteçlerinin ve hücre içi transkripsiyon faktörlerinin ifade analizidir (Ginis ve ark 2004, Xu 2006). Oct3/4 transkripsiyon faktörüdür ve hem insan hem de fare pluripotent kök hücrelerinde ifade edilir (Okamoto ve ark 1990, Reubinoff, Pera, Fong, Trounson ve Bongso 2000). SSEA-1 ise, fare hücreleri için pluripotans belirteci, insan hücreleri için farklılaşma belirtecidir (Ginis ve ark 2004). Çalışmamızda EKH ve uPKH'lerde ifade edilen yüzey belirteçleri ve hücre içi transkripsiyon faktörü akan hücre ölçer cihazı ile belirlendi. Her iki pluripotent hücrede, hem insan hem de fare pluripotent hücrelerinde ifade edilen Oct3/4 transkripsiyon faktörünün ve fare pluripotans belirteci olan SSEA-1'in ifade edildiği ve aynı zamanda farelerde farklılaşma belirteci olan SSEA-4'ün ifade edilmediği gözlemlendi (Şekil 6.7, 6.8).



Şekil 6.7. EKH'lerde ifade edilen Oct3/4 transkripsiyon faktörü ve SSEA-1 yüzey belirtecinin yüzdesi.

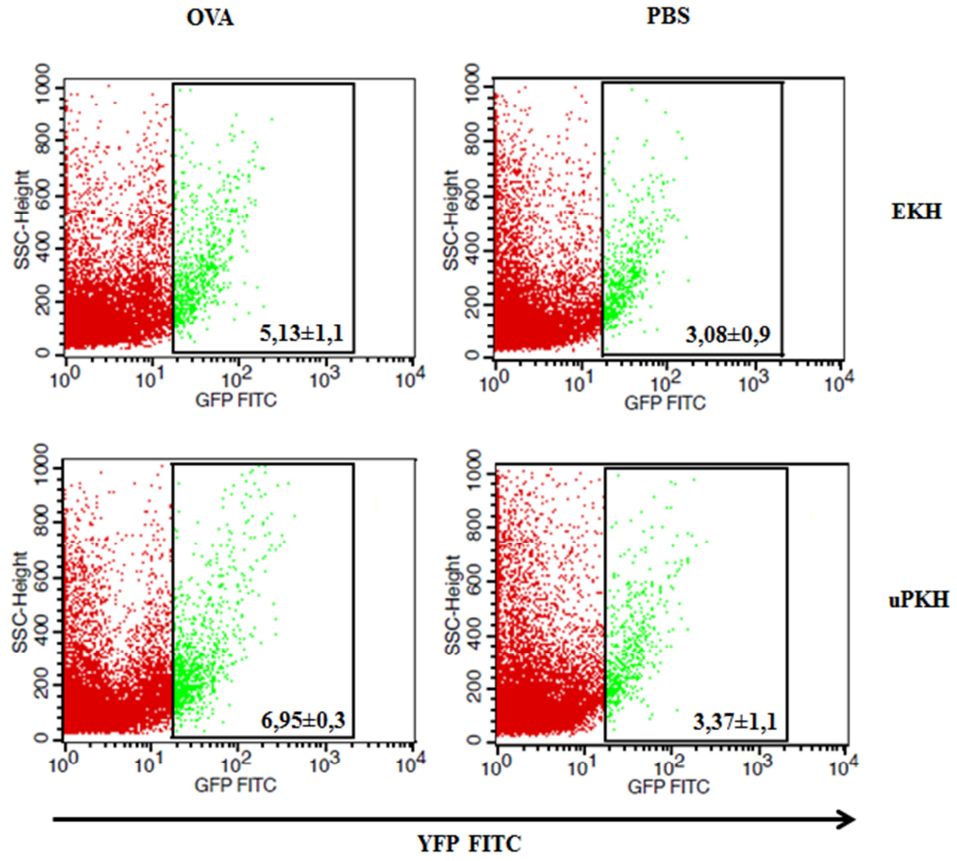


Şekil 6.8. uPKH'lerde ifade edilen Oct3/4 transkripsiyon faktörü ve SSEA-1 yüzey belirtecinin yüzdesi.

6.3. İ.n. Uygulanan EKH ve uPKH'lerin Akut Astım Fare Modeli Üzerine Etkisi

6.3.1. YFP⁺ pluripotent kök hücreler hasarlı akciğer dokusunda daha fazla toplandı

Pluripotent kök hücrelerin uygulanmasından 24 saat sonra deney gruplarında bulunan fareler sakrifiye edilerek, homojenizasyonla elde edilen akciğer tam hücre süspansiyonlarında YFP⁺ hücre analizi akan hücre ölçer cihazı kullanılarak yapıldı. OVA+EKH grubunda (%5,13±1,1) PBS+EKH grubuna (%3,8±0,9) göre daha fazla YFP⁺ hücre gözlenirken, aynı şekilde OVA+uPKH grubunda (%6,95±0,3) PBS+uPKH grubuna (%3,37±1,1) göre daha yüksek bulundu. Sonuçlar, uPKH'lerin EKH'lere göre astım modeli oluşturulmuş farelerin akciğer dokusunda daha fazla toplandığını gösterdi (Şekil 6.9).

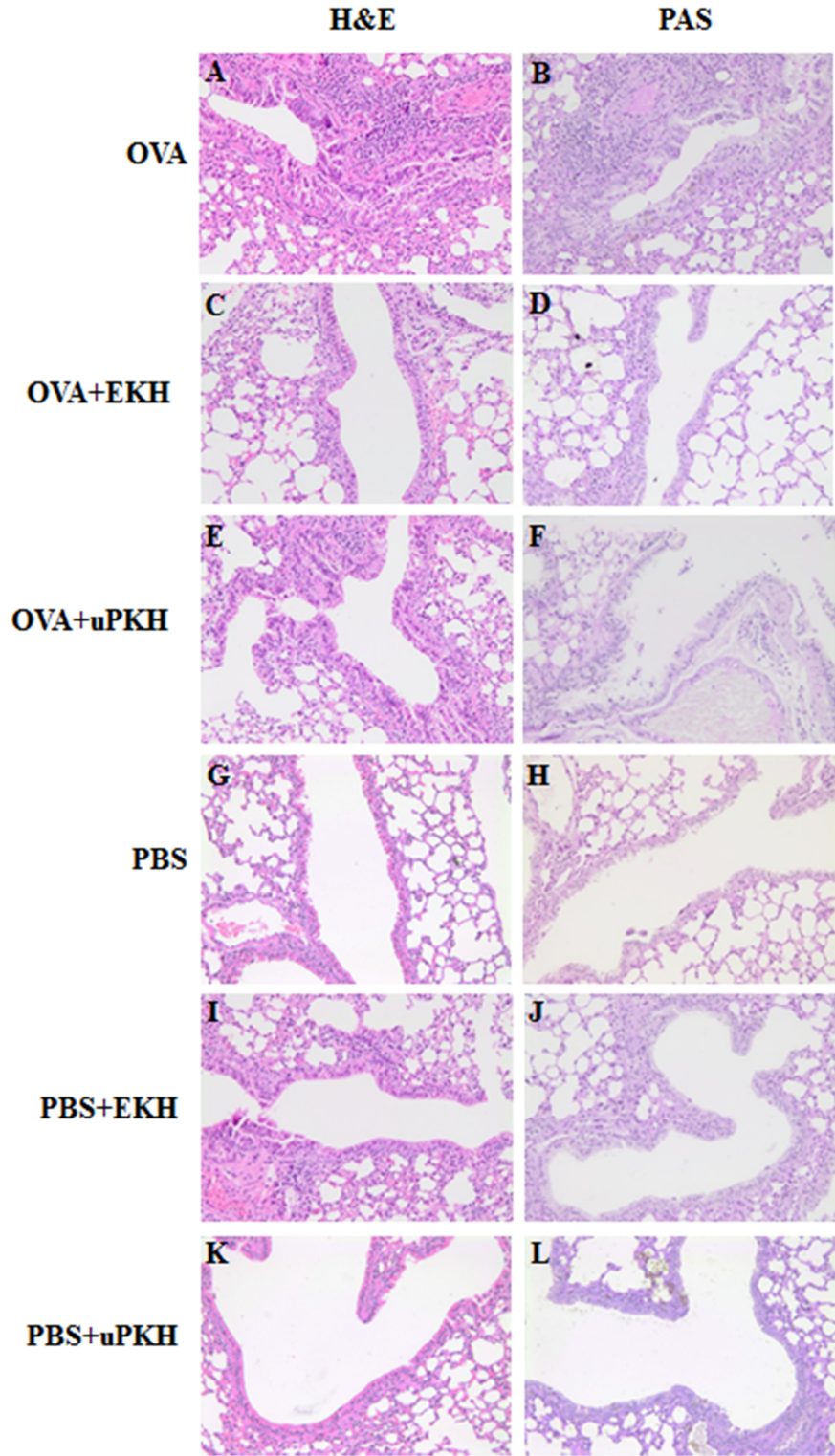


Şekil 6.9. Pluripotent kök hücre uygulanmış gruplardan elde edilen akciğer dokularındaki YFP⁺ hücre miktarı

6.3.2. Pluripotent kök hücreler akciğer proksimal hava yollarında yeniden yapılanmayı baskıladı

Yapılan histopatolojik analizlerle; mikroskop görüntülerine göre akciğer proksimal hava yollarında bir baskılanma olduğu saptandı (Şekil 6.10). H&E ile boyanan kesitlerde, OVA grubuna göre epitel ($14,9 \pm 2,2$) ve düz kas ($5,2 \pm 0,7$) kalınlıkları OVA+EKH (sırasıyla $7,48 \pm 0,6$ ve $2,19 \pm 0,4$) ve OVA+uPKH (sırasıyla $7,7 \pm 0,9$ ve $2,38 \pm 0,2$) gruplarında anlamlı derecede düşüktü ($P < 0.001$). Aynı şekilde, PAS ile boyanan akciğer kesitlerinde, hiperplazik goblet hücre sayısında (OVA: $40 \pm 10,5$, OVA+EKH: 0, OVA+uPKH: 0; $P < 0.001$) ve bazal membran kalınlığında (OVA: $1,6 \pm 0,02$, OVA+EKH: $1,14 \pm 0,1$, OVA+uPKH: $1,28 \pm 0,01$; OVA ve OVA+EKH için $P < 0.001$, OVA ve OVA+uPKH için $P < 0.01$) önemli derecede

azalma gözlemlendi (Tablo 6.2, Şekil 6.11). PBS grubu ile PBS+EKH ve PBS+uPKH grupları arasında epitel kalınlığı (sırasıyla $7,1\pm0,2$, $7,49\pm0,9$ ve $7,35\pm0,7$), düz kas kalınlığı (sırasıyla $1,4\pm0,1$, $1,69\pm0,3$ ve $1,9\pm0,3$), bazal membran kalınlığı (sırasıyla $1,07\pm0,1$, $1,12\pm0,1$ ve $1,06\pm0,2$) ve goblet hücre sayısı (sırasıyla 0, 3 ve 2) açısından farklılık saptanmadı ($P > 0.05$) (Tablo 6.3).



Şekil 6.10. Proksimal hava yollarının (>1000µm) ışık mikroskobu görüntüleri. OVA, OVA+EKH, OVA+uPKH, PBS, PBS+EKH ve PBS+uPKH gruplarından elde edilen akciğer doku kesitleri H&E ve PAS ile boyandı. EKH ve uPKH uygulaması, OVA grubunda proksimal hava yollarında akut hava yolu inflamasyonunu önemli derecede baskımlarken (A-F), PBS grubunda bir değişiklik oluşturmadı (G-L). Özgün büyütme: 40X.

Tablo 6.2. OVA, OVA+EKH ve OVA+uPKH gruplarında proksimal hava yollarının histolojik verileri ve istatistik sonuçları

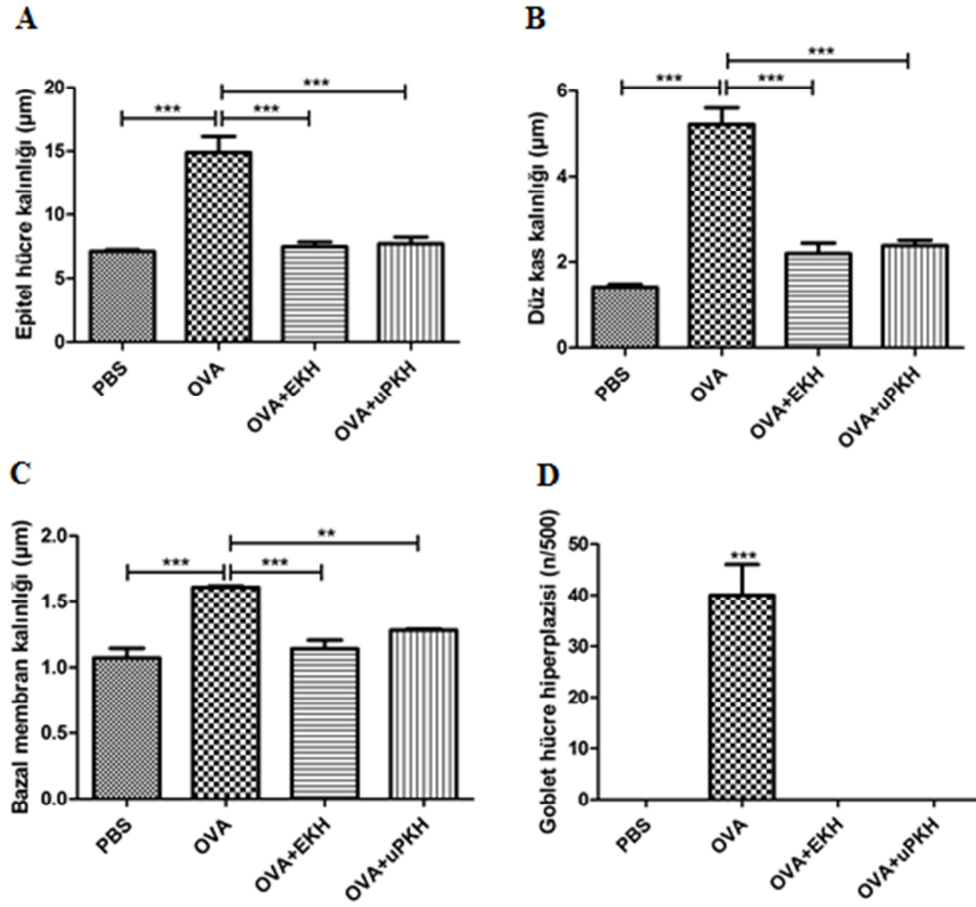
Proksimal hava yolu	OVA	OVA+EKH	OVA+uPKH	P
Epitel kalınlığı (µm)	14,9±2,2	7,48±0,6	7,7±0,9	< 0.01**
Düz kas kalınlığı (µm)	5,2±0,7	2,19±0,4	2,38±0,2	< 0.001***
Bazal membran kalınlığı (µm)	1,6±0,02	1,14±0,1	1,28±0,01	< 0.001*** < 0.01**
500 hücredeki Goblet hücre sayısı (n/500)	40±10,5	0	0	< 0.001***

** P < 0.01, *** P < 0.001

Tablo 6.3. PBS, PBS+EKH ve PBS+uPKH gruplarında proksimal hava yollarının histolojik verileri ve istatistik sonuçları

Distal hava yolu	PBS	PBS+EKH	PBS+uPKH	P
Epitel kalınlığı (µm)	7,1±0,2	7,49±0,9	7,35±0,7	ns
Düz kas kalınlığı (µm)	1,4±0,1	1,69±0,3	1,9±0,3	ns
Bazal membran kalınlığı (µm)	1,07±0,1	1,12±0,1	1,06±0,2	ns
500 hücredeki Goblet hücre sayısı (n/500)	0	3	2	ns

ns: istatistiksel olarak anlamlı değil

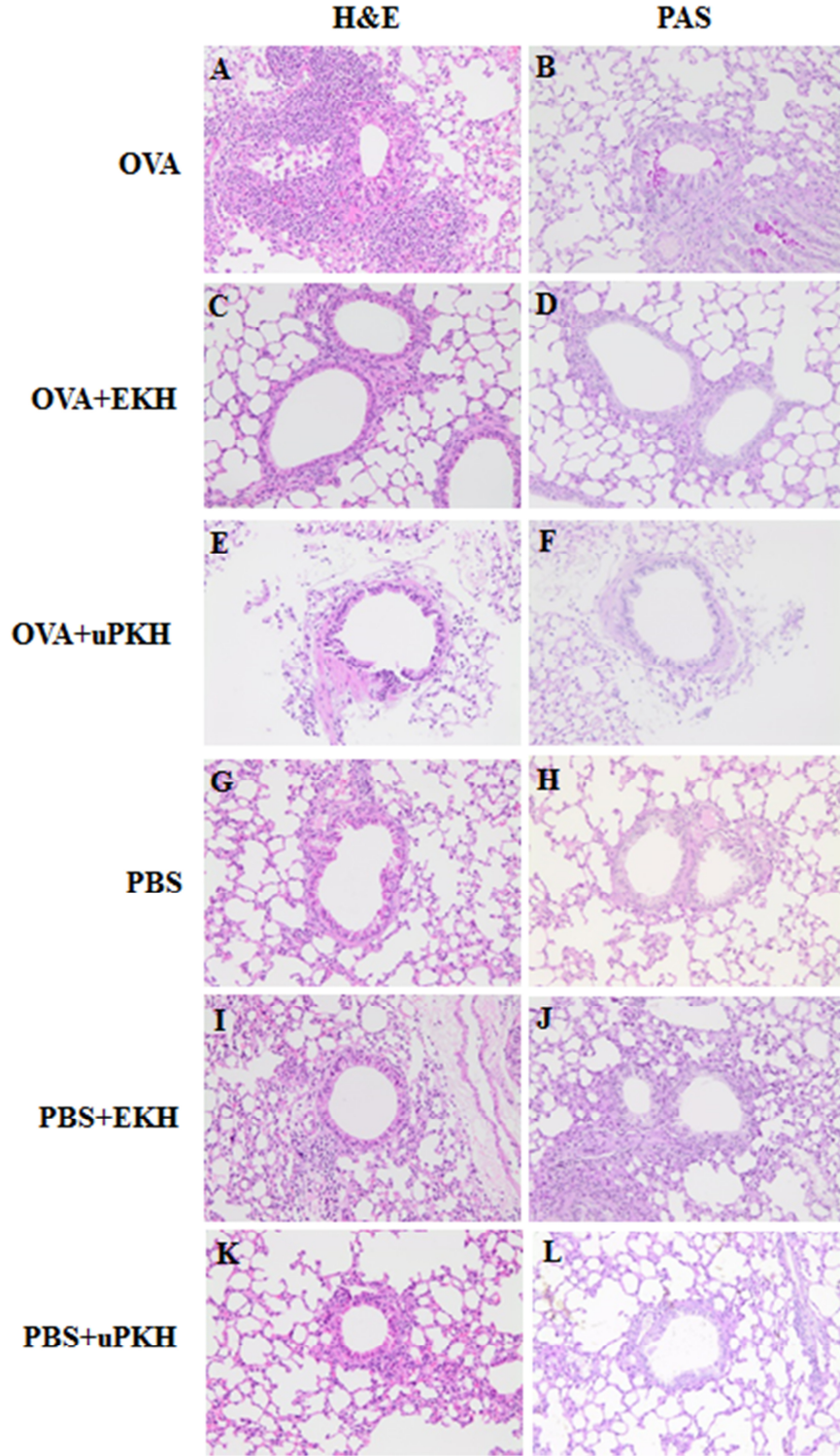


Şekil 6.11. PBS, OVA, OVA+EKH ve OVA+uPKH gruplarında proksimal hava yolları düz kas, epitel, bazal membran kalınlığı ve goblet hücre sayısı. OVA grubunda PBS grubuna göre anlamlı derecede artmış olan epitel hücre kalınlığı (A), düz kas kalınlığı (B), bazal membran kalınlığı (C) ve goblet hücre sayısı (D), EKH ve uPKH uygulaması sonucu anlamlı derecede baskılandı. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$

6.3.3. Pluripotent kök hücreler akciğer distal hava yollarında yeniden yapılanmayı baskıladı

Yapılan histopatolojik analizlerle; mikroskop görüntülerine göre akciğer distal hava yollarında bir baskılanma olduğu saptandı (Şekil 6.12). H&E ile boyanan kesitlerde, OVA grubuna göre epitel ($10,67 \pm 0,9$) ve düz kas ($3,38 \pm 0,5$) kalınlıkları OVA+EKH (sırasıyla $7,09 \pm 1$ ve $1,84 \pm 0,07$) ve OVA+uPKH (sırasıyla $6,66 \pm 1$ ve $1,75 \pm 0,3$) gruplarında anlamlı derecede düşüktü ($P < 0.01$). Aynı şekilde, PAS ile boyanan akciğer kesitlerinde, hiperplazik goblet hücre sayısında (OVA: 14 ± 2 , OVA+EKH: 0, OVA+uPKH: 0; $P < 0.001$) ve bazal membran kalınlığında (OVA:

1,39±0,01, OVA+EKH: 1,12±0,01, OVA+uPKH: 1,07±0,01; OVA ve OVA+EKH için $P < 0.01$, OVA ve OVA+uPKH için $P < 0.001$) önemli derecede azalma gözlemlendi (Tablo 6.4, Şekil 6.13). PBS grubu ile PBS+EKH ve PBS+uPKH grupları arasında epitel kalınlığı (sırasıyla 6,05±0,5, 6,76±0,7 ve 6,59±0,7), düz kas kalınlığı (sırasıyla 1,46±0,1, 1,5±0,3 ve 1,76±0,3), bazal membran kalınlığı (sırasıyla 0,97±0,07, 1±0,1 ve 0,98±0,08) ve goblet hücre sayısı (sırasıyla 0, 1 ve 0) açısından farklılık saptanmadı ($P > 0.05$) (Tablo 6.5).



Şekil 6.12. Distal hava yollarının (<500µm) ışık mikroskobu görüntüleri. OVA, OVA+EKH, OVA+uPKH, PBS, PBS+EKH ve PBS+uPKH gruplarından elde edilen akciğer doku kesitleri H&E ve PAS ile boyandı. EKH ve uPKH uygulaması, OVA grubunda proksimal hava yollarında akut hava yolu inflamasyonunu önemli derecede baskımlarken (A-F), PBS grubunda bir değişiklik oluşturmadı (G-L). Özgün büyütme: 40X.

Tablo 6.4. OVA, OVA+EKH ve OVA+uPKH gruplarında distal hava yollarının histolojik verileri ve istatistik sonuçları

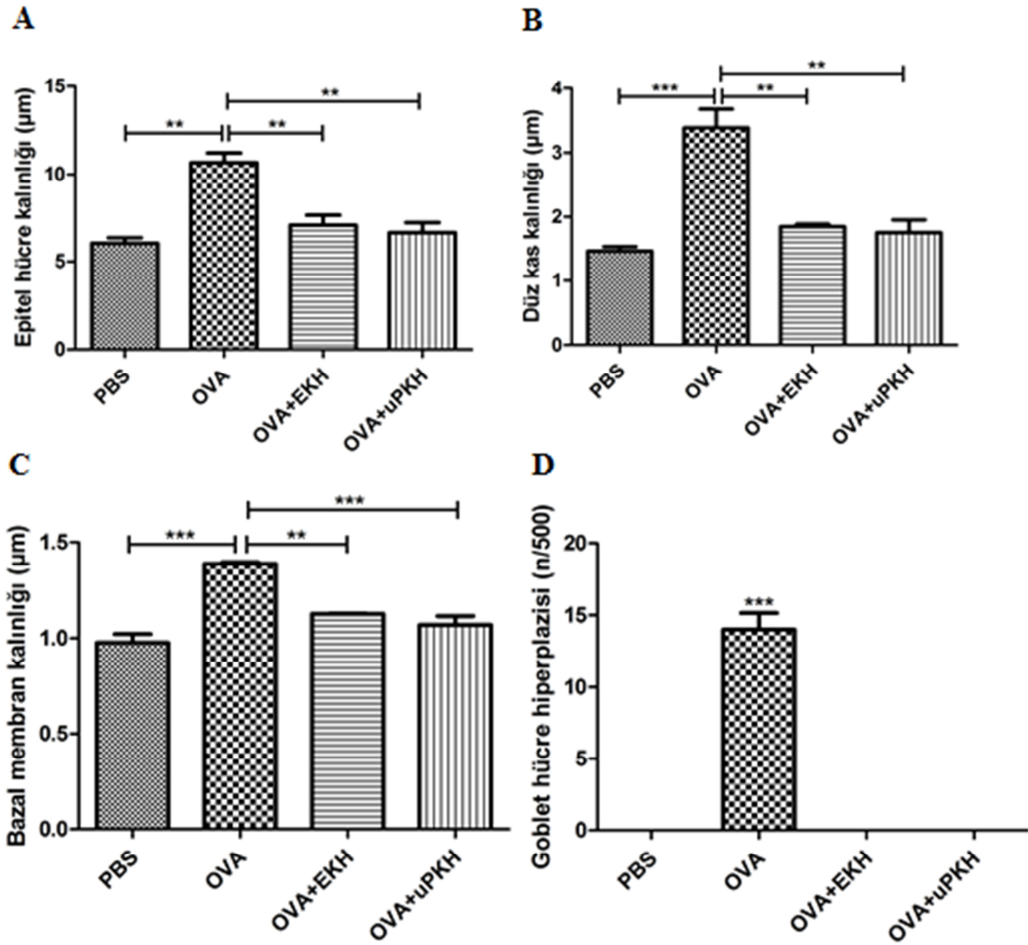
Distal hava yolu	OVA	OVA+EKH	OVA+uPKH	<i>P</i>
Epitel kalınlığı (µm)	10,67±0,9	7,09±1	6,66±1	< 0.01**
Düz kas kalınlığı (µm)	3,38±0,5	1,84±0,07	1,75±0,3	< 0.01**
Bazal membran kalınlığı (µm)	1,39±0,01	1,12±0,01	1,07±0,07	< 0.01** < 0.001***
500 hücredeki Goblet hücre sayısı (n/500)	14±2	0	0	< 0.001***

** *P* < 0.01, *** *P* < 0.001

Tablo 6.5. PBS, PBS+EKH ve PBS+uPKH gruplarında distal hava yollarının histolojik verileri ve istatistik sonuçları

Distal hava yolu	PBS	PBS+EKH	PBS+uPKH	<i>P</i>
Epitel kalınlığı (µm)	6,05±0,5	6,76±0,7	6,59±0,7	ns
Düz kas kalınlığı (µm)	1,46±0,1	1,5±0,3	1,76±0,3	ns
Bazal membran kalınlığı (µm)	0,97±0,07	1±0,1	0,98±0,08	ns
500 hücredeki Goblet hücre sayısı (n/500)	0	1	0	ns

ns: istatistiksel olarak anlamlı değil



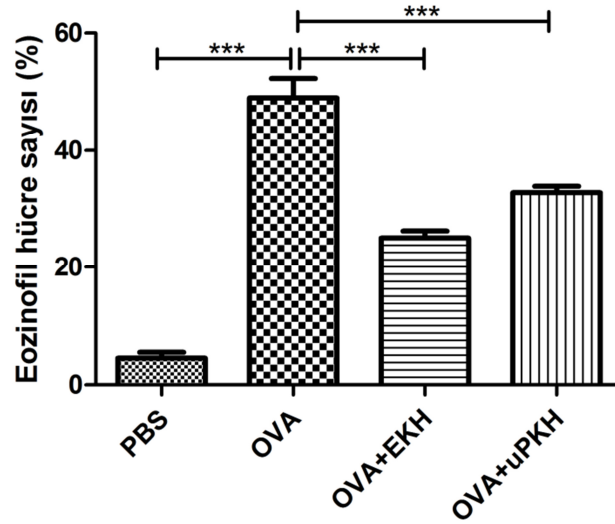
Şekil 6.13. PBS, OVA, OVA+EKH ve OVA+uPKH gruplarında distal hava yolları düz kas, epitel, bazal membran kalınlığı ve goblet hücre sayısı. OVA grubunda PBS grubuna göre anlamlı derecede artmış olan epitel hücre kalınlığı (A), düz kas kalınlığı (B), bazal membran kalınlığı (C) ve goblet hücre sayısı (D), EKH ve uPKH uygulaması sonucu anlamlı derecede baskılandı. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$

6.3.4. Pluripotent kök hücreler astım modelinde artmış olan eozinofil hücre sayısını azalttı

Histopatolojik analizlere ek olarak, BAL sıvısında OVA-uyarımlı inflamatuvar hücre profili üzerine EKH ve uPKH'lerin etkisi araştırıldı. Tüm gruplarda 100 hücre içerisinde belirlenmiş olan nötrofil, eozinofil, lenfosit ve monosit hücre sayıları Tablo 6.6'da verildi. PBS grubuna EKH ve uPKH uygulandığında eozinofil hücre yüzdesinde farklılık saptanmadı (Tablo 6.6). OVA grubunda artmış olan eosinofil hücre sayısının, OVA+EKH ve OVA+uPKH gruplarında anlamlı derecede azalmış olduğu belirlendi (Tablo 6.6, Şekil 6.14).

Tablo 6.6. Tüm grupların BAL sıvılarında nötrofil, eozinofil, lenfosit, monosit hücre sayıları (%)

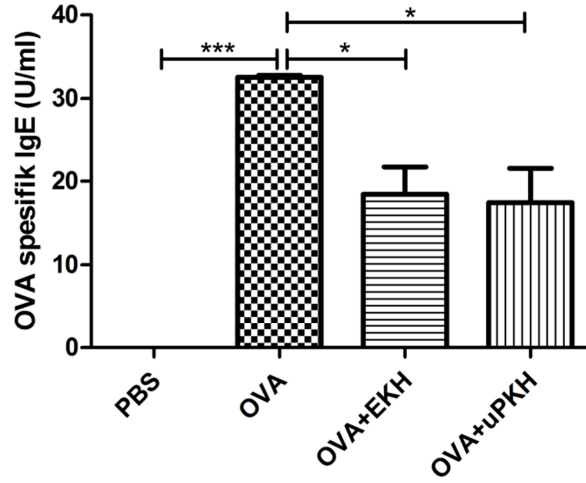
BAL sıvısı hücre sayıları (%)	Nötrofil	Eozinofil	Lenfosit	Monosit
OVA	8,75±2	49±6,6	39,8±7	2,75±1
OVA+EKH	15±3	25±2,5	56±5	3,75±1
OVA+uPKH	16,6±3	32,8±2	47,8±5	3,25±2
PBS	26±5	4,5±2	63,2±2	6,2±1
PBS+EKH	26,5±6	6,5±1	62,2±6	6±1,8
PBS+uPKH	26,3±6	6,8±3,5	62±5	5±1,4



Şekil 6.14. BAL sıvısında PBS, OVA, OVA+EKH ve OVA+uPKH gruplarının eozinofil hücre sayısı (%). OVA grubunda PBS grubuna göre anlamlı derecede artmış olan eozinofil hücre sayısının, EKH ve uPKH uygulaması sonucu anlamlı derecede azaldığı saptandı. *** $P < 0.001$

6.3.5. Pluripotent kök hücreler spesifik antikor yanıtını azalttı

IgE indüksiyonu allerjen kaynaklı patolojilerin bir özelliğidir ve OVA sensitizasyonu, IgE ve allerjen-spesifik Th2 yanıtını indüklemektedir (Hamelmann, Tadede, Oshiba ve Gelfand 1999). Çalışmamızda, pluripotent kök hücrelerin IgE indüksiyonu üzerine etki kapasitesini belirlemek amacıyla serumda OVA-spesifik IgE yanıtı incelendi. EKH ($18,5 \pm 5,6$ U/ml) ve uPKH ($17,4 \pm 7,1$ U/ml) uygulanması sonucu, OVA grubunda ($32,6 \pm 0,4$ U/ml) indüklenmiş olan allerjen-spesifik IgE yanıtının anlamlı derecede baskılandığı gözlemlendi ($P > 0.05$) (Şekil 6.15).

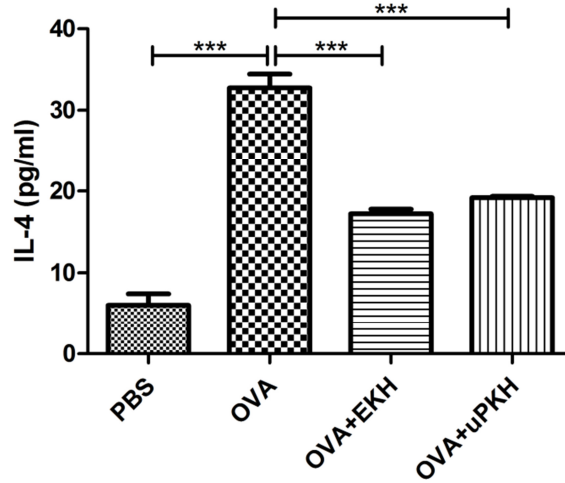


Şekil 6.15. Pluripotent kök hücrelerin serumda OVA-spesifik IgE yanıtı üzerine etkisi. Sakrifikasyon sonrası tüm gruplardan serum toplandı ve OVA-spesifik IgE miktarı ELİZA yöntemiyle ölçüldü. OVA grubunda artmış olan antikorun, EKH ve uPKH uygulaması sonucu anlamlı derecede azaldığı saptandı. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

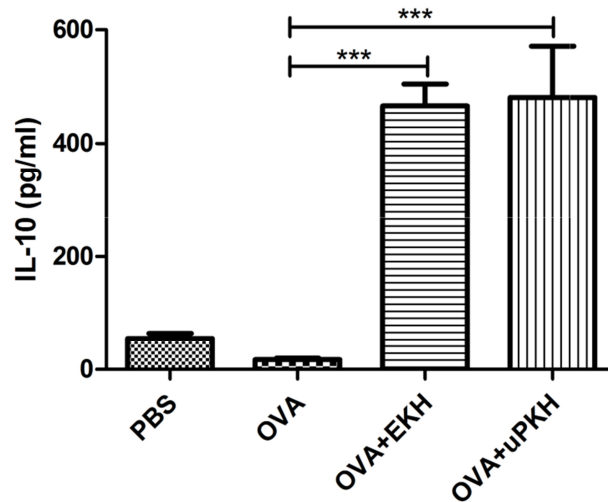
6.3.6. Pluripotent kök hücreler homojenize akciğer hücre süspansiyonunda IL-4 sitokin miktarını azaltırken, IL-10 miktarını artırdı

Homojenize akciğer hücre süspansiyonunda, OVA grubunda ($32,8 \pm 2,9$ pg/ml) PBS grubuna ($6,05 \pm 2,4$ pg/ml) göre anlamlı derecede artmış olan IL-4 sitokin düzeyinin ($P < 0.001$), pluripotent kök hücrelerin i.v. uygulaması sonucu OVA+EKH ($17,2 \pm 0,9$ pg/ml) ve OVA+uPKH ($19,2 \pm 0,3$ pg/ml) gruplarında istatistiksel olarak

anlamli derecede düşük olduğu saptandı ($P < 0.001$) (Şekil 6.16). Tersine, PBS ($55,9 \pm 15,7$ pg/ml) ve OVA ($17,03 \pm 5$ pg/ml) grupları ile karşılaştırıldığında OVA+EKH ($466,33 \pm 66,4$ pg/ml) ve OVA+uPKH ($488 \pm 163,9$ pg/ml) gruplarında IL-10 sitokin düzeyinin anlamli derecede arttığı belirlendi ($P < 0.001$) (Şekil 6.17). PBS grubuna EKH ve uPKH uygulanması sonucu istatistiksel olarak anlamli bir fark tespit edilmedi ($P > 0.05$).



Şekil 6.16. Pluripotent kök hücrelerin IL-4 sitokin salgısı üzerine etkisi. OVA grubunda PBS grubuna göre artmış olan sitokin düzeyinin, EKH ve uPKH uygulaması sonucu anlamli derecede azaldığı saptandı. *** $P < 0.001$

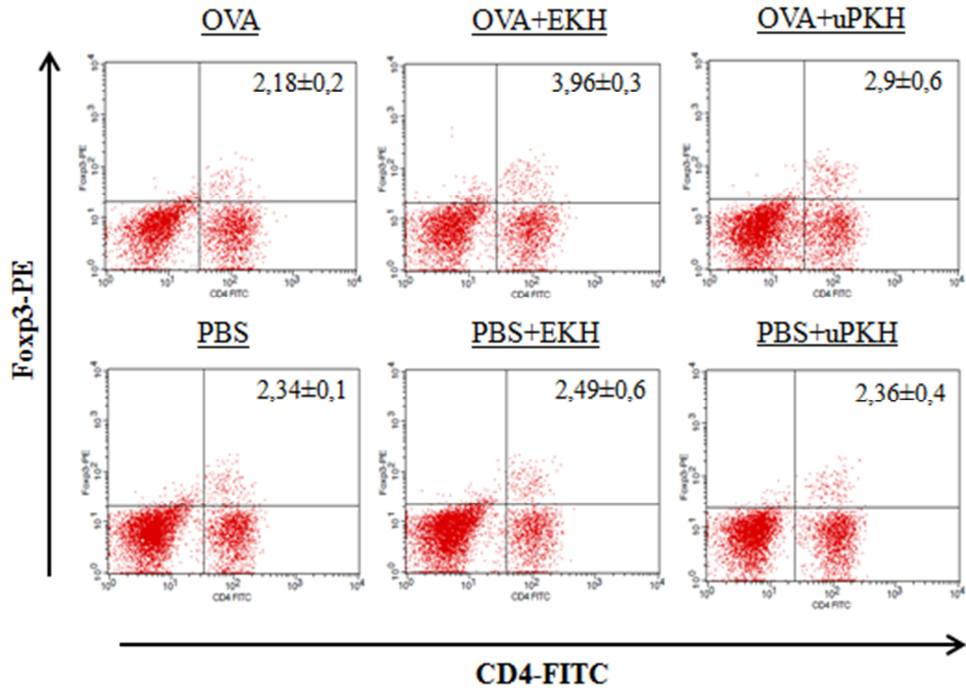


Şekil 6.17. Pluripotent kök hücrelerin IL-10 sitokin salgısı üzerine etkisi. Akciğer hücre süspansiyonunda IL-10 sitokin düzeyinin OVA grubuna EKH ve uPKH uygulaması sonucu anlamli derecede arttığı saptandı. *** $P < 0.001$

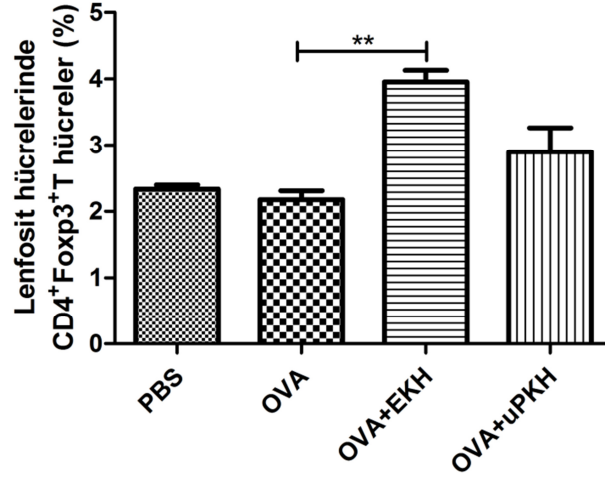
6.3.7. Pluripotent kök hücreler akciğer lenfositlerinde Treg hücre yüzdesini artırdı

Akciğerde IL-10 sitokininin artması, pluripotent hücrelerin Treg hücre popülasyonunu indüklediğini düşündürdü. Bu amaçla, pluripotent kök hücrelerin Treg hücre frekansı üzerine etkisi akan hücre ölçer cihazı ile analiz edildi. Tüm gruplarda akciğer dokusundan izole edilen lenfosit hücreleri kapılarak yapılan analiz sonucunda, CD4⁺Foxp3⁺ T hücre miktarının OVA+EKH grubunda (%3,96±0,3) OVA grubuna (%2,18±0,2) göre anlamlı derecede arttığı ($P < 0.01$), fakat OVA+uPKH grubunda (%2,9±0,6) gözlenen artışın anlamlı olmadığı saptandı ($P > 0.05$) (Şekil 6.18A-B). PBS grubuna (%2,34±0,1) her iki pluripotent kök hücrenin uygulanması sonucu, CD4⁺Foxp3⁺ T hücre miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişme olmadı ($P > 0.05$) (Şekil 6.18A).

A



B

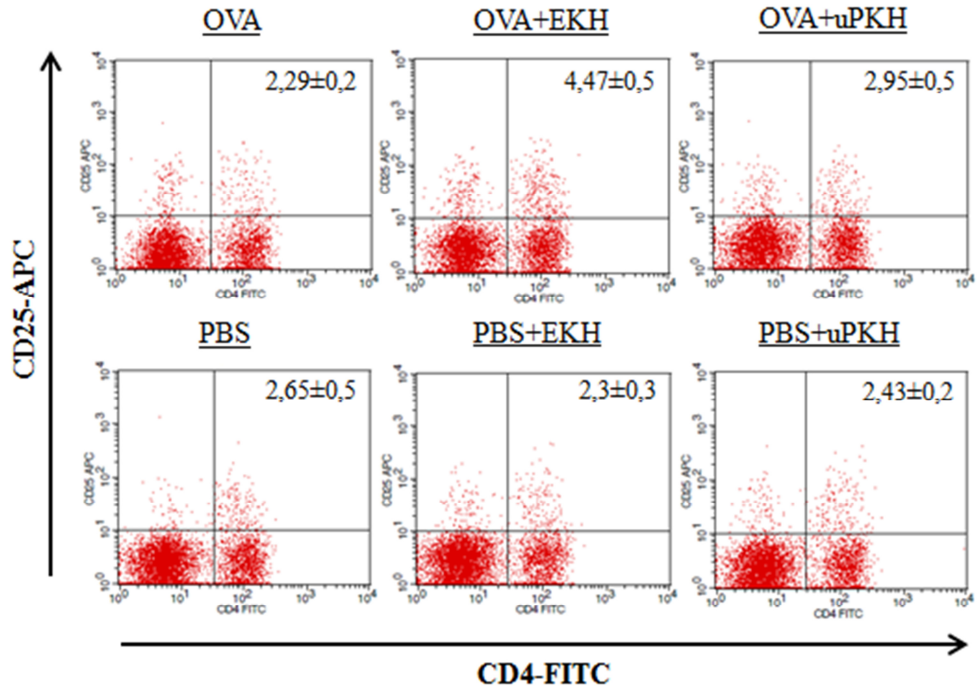


Şekil 6.18. Pluripotent kök hücrelerin CD4⁺Foxp3⁺ T hücre miktarı üzerine etkisi. Sonuçlar akan hücre ölçer verilerine (A) ve istatistiksel analizlere (B) göre verildi. OVA grubuna *in vivo* uygulanan EKH'ler CD4⁺Foxp3⁺ T hücre miktarını anlamlı derecede artırırken, uPKH'lerin uygulanması sonucu meydana gelen artış anlamlı değildi. PBS grubuna göre, PBS+EKH ve PBS+uPKH grupları arasında bir fark saptanmadı. ** $P < 0.01$

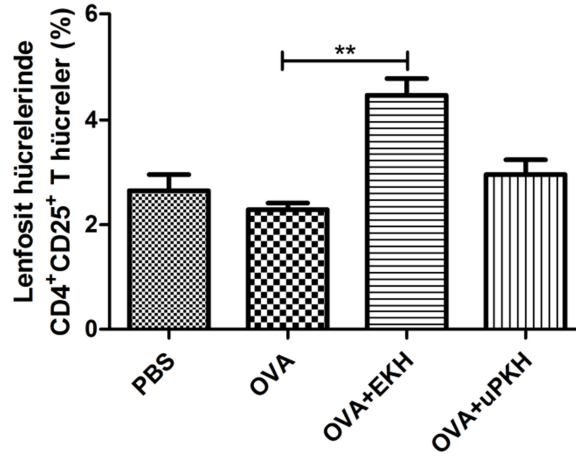
Aynı şekilde akan hücre ölçer cihazında lenfosit hücreleri kapılanarak yapılan analiz sonucu, EKH'lerin OVA grubuna (%2,29±0,2) *in vivo* uygulanması ile (%4,47±0,5) CD4⁺CD25⁺ T hücre miktarında anlamlı derecede artış gözlenirken ($P < 0.01$), uPKH'lerin uygulanması ile (%2,95±0,5) meydana gelen artış anlamlı değildi ($P > 0.05$) (Şekil 6.19A-B). PBS grubuna (%2,65±0,5), EKH (%2,3±0,3) ve uPKH (%2,43±0,2) uygulanması sonucu, CD4⁺CD25⁺ T hücre miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişme saptanmadı ($P > 0.05$) (Şekil 6.19A).

Buna ek olarak, tüm grupların lenfosit hücrelerinde CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg hücrelerin yüzdesindeki değişim miktarı, CD4⁺CD25⁺ T hücrelerde Foxp3⁺ hücrelerin yüzdesinin belirlenmesi ile analiz edildi. EKH ve uPKH'lerin *in vivo* uygulanması sonucu, OVA grubuna (%1,96±0,3) göre Treg hücre yüzdesinin OVA+EKH grubunda (%3,63±0,4) anlamlı olarak arttığı ($P < 0.01$), fakat OVA+uPKH grubundaki (%2,6±0,5) artışın anlamlı olmadığı saptandı ($P > 0.05$) (Şekil 6.20). Ayrıca, PBS grubuna (%2,35±0,5) her iki pluripotent kök hücrenin uygulanması sonucu, PBS+EKH (%1,8±0,3) ve PBS+uPKH (%1,95±0,2) gruplarında CD4⁺CD25⁺ T hücre miktarında bir fark gözlenmedi ($P > 0.05$).

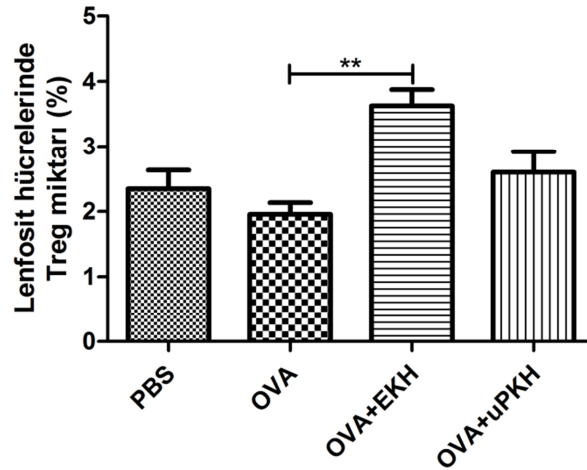
A



B



Şekil 6.19. Pluripotent kök hücrelerin CD4⁺CD25⁺ T hücre miktarı üzerine etkisi. Sonuçlar akan hücre ölçer verilerine (A) ve istatistiksel analizlere (B) göre verildi. OVA grubuna *in vivo* uygulanan EKH'ler CD4⁺CD25⁺ T hücre miktarını anlamlı derecede artırırken, uPKH'lerin uygulanması sonucu meydana gelen artış anlamlı değildi. PBS grubuna göre, PBS+EKH ve PBS+uPKH grupları arasında bir fark saptanmadı. ** $P < 0.01$

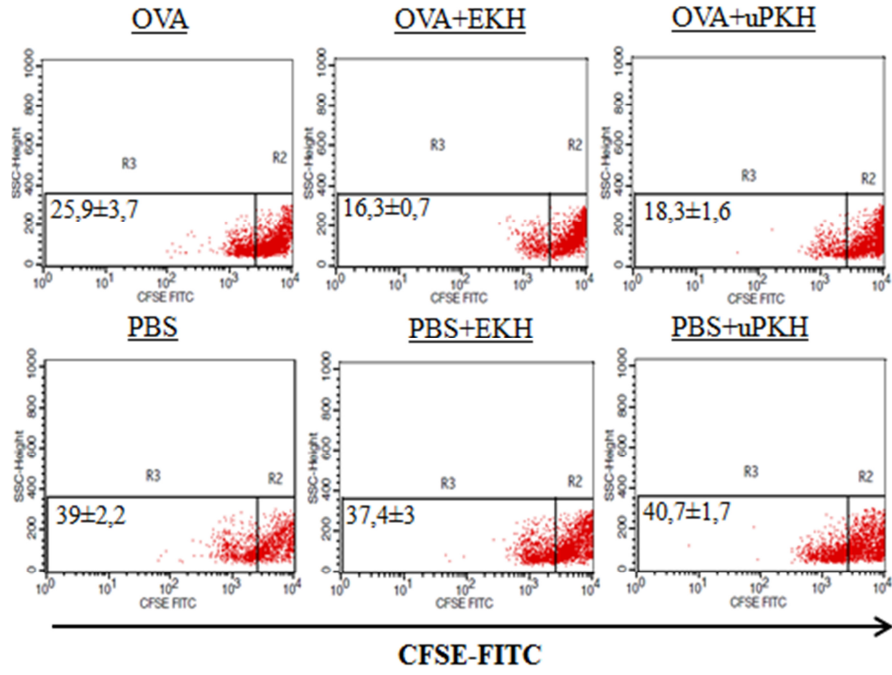


Şekil 6.20. Pluripotent kök hücrelerin $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Treg hücre miktarı üzerine etkisi. OVA grubuna EKH uygulaması Treg hücre yüzdesini istatistiksel olarak anlamlı derecede artırırken, uPKH uygulaması sonucu belirlenen artış anlamlı değildi. PBS grubuna göre, PBS+EKH ve PBS+uPKH grupları arasında bir fark saptanmadı. ** $P < 0.01$

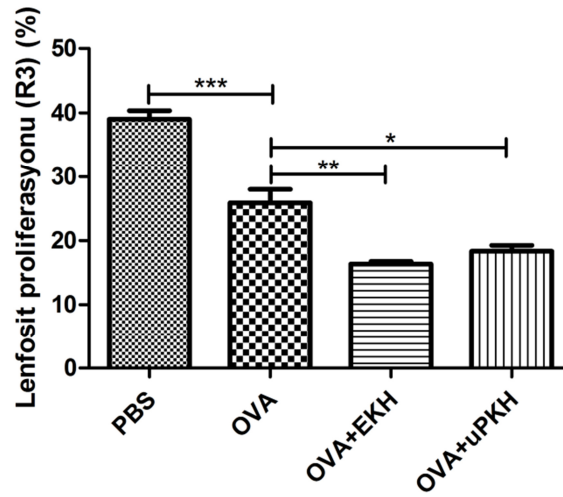
6.3.8. Pluripotent kök hücreler akciğer lenfosit hücrelerinin proliferasyonunu baskıladı

Pluripotent hücrelerin immün baskılayıcı özelliklerini belirlemek amacıyla, bu hücrelerin lenfosit hücrelerin proliferasyonu üzerine etkisi incelendi. Bu amaçla, farelerin akciğerinden elde edilen lenfosit hücrelerinin, anti-CD3-anti-CD28 uyarımlı ve uyarımsız ortamda 3 günlük kültürü yapıldı. Elde edilen veriler, OVA (%25,9±3,7) grubunda PBS (%39±2,2) grubuna göre anlamlı derecede azalmış olan lenfosit proliferasyonunun ($P < 0.001$), OVA+EKH grubunda (16,3±0,7) ve OVA+uPKH grubunda (18,3±1,6) anlamlı derecede baskılanmış olduğunu gösterdi (sırasıyla $P < 0.01$ ve $P < 0.05$). Ayrıca, PBS grubuna (%39±2,2) her iki pluripotent kök hücrenin uygulanması sonucu, PBS+EKH (%37,4±3) ve PBS+uPKH (%40,7±1,7) gruplarındaki lenfosit proliferasyonunda bir fark gözlenmedi ($P > 0.05$) (Şekil 6.21).

A



B

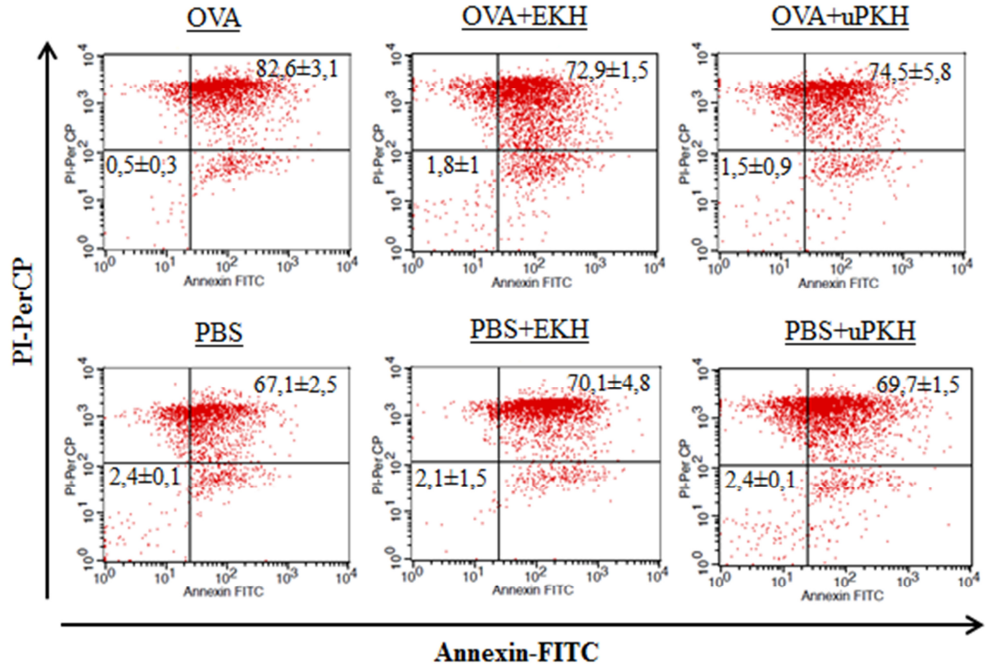


Şekil 6.21. Pluripotent kök hücrelerin anti-CD3-anti-CD28 uyarımlı akciğer lenfosit hücreleri proliferasyonu üzerindeki immün baskılayıcı etkisi. Akan hücre ölçer analizi ile belirlendiği gibi, *in vivo* uygulanan EKH ve uPKH'ler akciğer lenfosit proliferasyonunu baskıladı (A). Astım modeli geliştirilmiş farelere EKH ve uPKH uygulaması, lenfosit hücrelerin proliferasyon yüzdesini istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttı (B). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

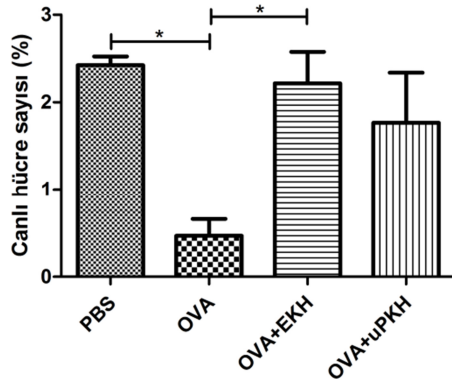
6.3.9. Pluripotent kök hücreler akciğer lenfosit hücrelerinin apoptozunu azalttı

Pluripotent hücrelerin akciğer lenfositlerinin apoptozu üzerine etkisini belirlemek amacıyla, Annexin-V ile akan hücre ölçer analizi yapıldı. Bu amaçla, farelerin akciğerinden elde edilen lenfosit hücrelerinin, anti-CD3-anti-CD28 uyarımlı ve uyarımsız ortamda 3 günlük kültürü yapıldı. OVA (%0,5±0,3) grubunda PBS (%2,4±0,1) grubuna göre anlamlı derecede azalmış olan canlı hücre sayısının ($P < 0.05$), *in vivo* EKH (%1,8±1) uygulanması ile anlamlı derecede arttığı gözlemlendi ($P < 0.05$). OVA+uPKH (%1,5±0,9) grubunda oluşan canlı hücre sayısındaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($P > 0.05$). Aynı şekilde, *in vivo* uygulanan EKH ve uPKH'lerin OVA gruplarında geç apoptotik hücre sayısında azalışa neden olduğu bulundu, fakat bu azalmanın sadece OVA+EKH (%72,9±1,5) grubunda istatistiksel olarak anlamlı idi ($P < 0.05$). PBS grubuna, EKH ve uPKH uygulanması sonucu, canlı hücre sayısında ve geç apoptotik hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir değişme saptanmadı ($P > 0.05$) (Şekil 6.22).

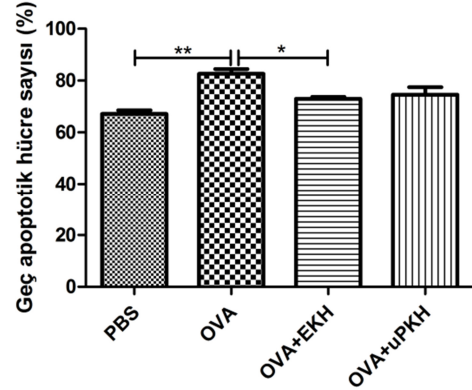
A



B



C



Şekil 6.22. Pluripotent kök hücrelerin anti-CD3-antiCD28 uyarımlı akciğer lenfosit hücreleri apoptozu üzerindeki engelleyici etkisi. Akan hücre ölçer analizi ile belirlendiği gibi, *in vivo* uygulanan EKH ve uPKH'ler akciğer lenfosit apoptozunu azalttı (A). Akut astım modeli geliştirilmiş farelere EKH uygulaması, 3 günlük kültürü sonrası lenfosit hücrelerinde gözlenen canlı hücre yüzdesini istatistiksel olarak anlamlı derecede artırırken, uPKH uygulaması sonucu anlamlı bir artış gözlenmedi (B). OVA+EKH grubunda, OVA grubuna göre geç apoptotik hücrelerin yüzdesi üzerinde belirlenen azalma anlamlı olarak saptandı (C). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kronik hastalıklar, dünyada ve ülkemizde büyük önem taşımakta ve önemli derecede morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır. Solunum sistemi hastalıklarının oluşum nedenleri arasında genetik etmenler, yaş, cinsiyet, ırk, enfeksiyonlar gibi faktörlerin yanı sıra hava kirliliği, sigara içme veya dumanına maruz kalma, mevsimsel faktörler, coğrafik koşullar, mesleki faktörler gibi çevresel faktörler de yer almaktadır. Solunum yolu hastalıkları, akciğerlerin küçük ve büyük hava yollarının kronik hastalıklarıdır ve bu hastalıkların %65'ini kronik hava yolu hastalıkları oluşturmaktadır. Kronik hava yolu hastalıkları hemen her ülke gibi ülkemizde de morbidite ve mortalitenin en önemli nedenleri arasında yer almakta ve ciddi toplumsal ve ekonomik yüke neden olmaktadır (SB, TSHGM, 2009-2013, <http://www.saglik.gov.tr>, Erişim tarihi: 05.01.2014). Kronik hava yolu hastalıklarından bir tanesi, tam olarak geri dönüşümlü olmayan hava akımı kısıtlanması ile karakterize, önlenemez ve tedavi edilebilir kronik obstrüktif akciğer hastalığıdır (KOA). Diğer kronik hava yolu hastalığı ise çoğunlukla çocukluk çağında görülen astımdır.

Astım geri dönüşümlü hava yolu obstrüksiyonu, hava yolu inflamasyonu ve yeniden yapılanma ile karakterize kronik bir hastalıktır. Yeniden yapılanma, hava yolu duvarındaki hücresel ve moleküler yapıların kompozisyon, organizasyon ve içeriğindeki yapısal değişikliklerdir (Sumi ve Hamid 2007). Astımda hava yollarının yeniden yapılanması olarak adlandırılan yapısal değişiklikler; epiteldeki goblet hücre hiperplazisini, retiküler bazal membran kalınlaşmasını, mukozadaki artmış damarlanmayı ve düz kas tabakasındaki kalınlaşmayı içermektedir (Bousquet, Jeffery, Busse, Johnson ve Vignola 2000). İnsanlardaki astımda tanımlanan hava yolu yeniden yapılanmasının çok sayıda bileşeni çeşitli hayvan modellerinde başarılı bir şekilde oluşturulmuştur (Ramos-Barbon, Ludwig ve Martin 2004). Çekici ve sık kullanılan laboratuvar türleri olan fareler, allerjik solunum yolu hastalığı modelleri için bir çok avantaj sunmaktadır (Gelfand 2002). Deneysel olarak kullanılan BALB/c fareler ovalbumine yüksek IgE yanıtı olan hayvanlardır (Temelkovski, Hogan, Shepherd, Foster ve Kumar 1998). Çalışmamızda akut astım modeli oluşturulan

grubun (OVA grubu) bazal membran kalınlığı, düz kas kalınlığı, epitel kalınlığı ve goblet hücre sayısının; astım modeli oluşturulmayan kontrol grubun (PBS grubu) bazal membran kalınlığı, düz kas kalınlığı, epitel kalınlığı ve goblet hücre sayısına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı gözlemlendi. Ayrıca, insanlarda olduğu gibi, serumda antijen-spesifik IgE miktarı OVA ile duyarlı grupta kontrol grubuna göre yüksek bulundu. Bu sonuçlar çalışmamızda akut astım modelinin iyi bir şekilde oluştuğunu göstermekte idi.

Günümüzde astım tedavisi hava yolu inflamasyonunu baskılamayı hedeflemektedir. İnhaler kortikosteroidler şu anda astım tedavisindeki en etkili kontrol edici ilaçlardır (Türk Toraks Derneği Astım Tanı ve Tedavi Rehberi, 2010, <http://www.toraks.org.tr>, Erişim tarihi: 05.01.2014). Her ne kadar günümüz tedavileri inflamasyonu azaltsa da hava yollarının yeniden yapılanmasını önleyen ya da tersine çeviren kanıtlanmış hiçbir kullanılabilir tedavi yoktur (Hirota ve Martin 2013). Bu nedenle hava yolu yeniden yapılanmasını da etkileyecek yeni stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır.

Uyarılmış pluripotent kök hücreler (uPKH), embriyonik kök hücrelerin (EKH) potansiyeline sahiptir ve farklı hastalıkların tedavisinde restoratif hücre terapisi için gelecek vaat eden bir kaynak olarak kabul edilmektedir (Wang ve ark 2013). Yakın zamanda, farklılaşmamış (Yang ve ark 2011, Wang ve ark 2013) ve farklılaşmış (Sun ve ark 2012) uPKH'ler akciğer hasarı oluşturulmuş ve allerjen uyarımlı fare modellerine uygulanmış ve hava yolu inflamasyonunda bu hücrelerin iyileştirici etkileri gösterilmiştir. Buna ek olarak, Fu ve ark. (2012) insan uPKH'leri kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (MKH) allerjik rinitli hastalarda T hücre fenotipini modüle ettiğini rapor etmişlerdir.

EKH ve uPKH'lerin karakterizasyonu için bir çok yöntem kullanılmaktadır. Bunlar arasında; embriyoid cisim oluşumu, *in vitro* farklılaştırma çalışmaları, pluripotans belirteçlerinin tayini, histolojik analiz, teratom oluşumu, kimerik canlı geliştirme ve DNA/kromatin metilasyon paternlerinin belirlenmesi sayılabilir (Hackett ve Fortier 2011). Çalışmamızda, aldığımız EKH ve uPKH'lerin karakterizasyonu amacıyla histolojik analiz olan alkalen fosfataz boyaması ve

pluripotans belirteçlerin ifade analizi gerçekleştirildi. Analizler sonrasında, her iki hücrenin de alkalen fosfataz pozitif olduğu, ve bu hücrelerde Oct3/4 ve SSEA-1'in ifade edildiği gözlemlendi.

Kök hücre uygulamalarında, ideal hücre hazırlığı, depolanması, uygulanan tampon çözeltisi, doz ve uygulama yolu henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Weiss 2014). Optimal rejenerasyon potansiyeli elde etmek için kök hücre uygulama yolu, kullanılan hücre popülasyonlarının karakterine ve hedeflenen dokulara özgü olarak seçilmelidir. Yapılan bir çalışmada, adipoz doku kaynaklı kök hücreler multipl skleroz modeli oluşturulmuş fare modeline intravenöz (i.v.) ve intraperitoneal (i.p.) yolla uygulanmış ve i.p. uygulamanın daha belirgin bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Yousefi, Ebtekar, Soleimani, Soudi ve Hashemi 2013). Astım modeli geliştirilmiş fareler üzerine yapılan bir çok çalışmada ise MKH ve uPKH'ler i.v. yol kullanılarak uygulanmıştır (Nemeth ve ark 2010, Bonfield ve ark 2010, Yang ve ark 2011, Firinci ve ark 2011, Sun ve ark 2012, Wang ve ark 2013). Daha önceki çalışmalarımızda, fare, sıçan ve diş kaynaklı MKH'ler akut ve kronik astım modeli geliştirilmiş farelere i.v., i.p., intratrakeal (i.t.) ve intranazal (i.n.) olmak üzere 4 farklı yol ile uygulandı (Ogurlur ve ark basımda, Gülben Gürhan-yayınlanmamış veri). Elde edilen sonuçlar, i.n. uygulamanın histopatolojik değişiklikler ve immün modülasyon üzerine daha belirgin bir etkiye sahip olduğunu gösterdi. Bu nedenle çalışmada EKH ve uPKH'ler oluşturulan akut astım modeli farelere i.n. olarak uygulandı.

Kök hücrelerin uygulanması için ideal bir doz da bulunmamaktadır ve yapılan çalışmalarda 1×10^5 hücre (Lee ve ark 2011) ile 2×10^6 hücre (Yang ve ark 2011) arasında uygulama yapılarak, bu dozların allerjik reaksiyonlarda ve havayolu yeniden yapılanmasında baskılayıcı etkileri araştırılmıştır. Araştırmamızda kronik astım fare modeline $2,5 \times 10^5$ ve 5×10^5 hücre olacak şekilde i.v. uygulanan kompakt kemik kaynaklı MKH'lerin, az dozda histopatolojik değişiklikleri daha iyi derecede baskıladığı gösterildi (Ogurlur ve ark basımda). Literatürde uygulanmış olan dozlar ve etkilerinin incelenmesi sonucu, çalışmamızda farelere 5×10^5 hücre uygulanması tercih edildi.

Kök hücreler, lokal ya da sistemik olarak uygulanmaları sonucu hasarlı olan hedef dokuya seçici olarak göç etmektedir. Bu durum, kök hücrelerin en önemli özelliklerinden bir tanesidir. Bu göçte, ifade edilen hücre yüzey reseptörleri (kemokin ve büyüme hormonu reseptörleri gibi) ve adezyon molekülleri ile parakrin faktörlerin önemli olduğu bilinmektedir (Sohni ve Verfaillie 2013). Yapılan çalışmalar sistemik ve lokal uygulanan kök hücrelerin astım modeli oluşturulmuş farelerde de inflamasyon bölgesine göç ettiğini göstermektedir (Nemeth ve ark 2010, Firinci ve ark 2011, Yang ve ark 2011, yayınlanmamış veri). Nemeth ve ark lusiferaz-ifade eden ya da Q-dot işaretli kemik iliği kaynaklı MKH'leri deneylerinde kullanarak, i.v. uygulama sonrası bu hücrelerin primer bölge olarak akciğerde toplandığını ve toplanan hücrelerin astım grubunda daha yoğun olduğunu göstermiştir. Aynı grup, uyguladıkları hücrelerin, kontrol grubunda 96 saate kadar akciğerde lokalize olarak kaldıklarını da raporlamışlardır (Nemeth ve ark 2010). Firinci ve ark, YFP işaretli kemik iliği kaynaklı MKH'lerin göçünü astım modeli oluşturulan grupta konfokal mikroskop ile göstermiştir (2010). Yang ve ark ise, uPKH'lerin hasarlı dokuda toplanma potansiyelini belirlemek için, I-IdURD-işaretli hücreleri sistemik olarak uygulamış ve akut akciğer hasarı oluşturdukları farelerde kontrol grubuna göre daha fazla hücre toplandığını raporlamıştır (2011). Ayrıca, daha önce yapmış olduğumuz çalışmalarımızda, YFP işaretli MKH'lerin akut astım modeli oluşturulmuş farelere i.n. uygulanması sonucu, inflamasyonlu akciğer dokusuna kontrol grubuna göre daha fazla göç ettiği akan hücre ölçer cihazı ve immünohistokimya boyama ile gösterildi (Gülben Gürhan yayınlanmamış veri). Aynı şekilde bu çalışmada, i.n. olarak uygulanan EKH'lerin ve uPKH'lerin astım grubunda kontrol grubuna göre akciğerde daha fazla toplandığı belirlendi. Sonuçlar, gelişmekte olan allerjik çevrenin hem EKH'leri hem de uPKH'leri çekme ve tutma kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir.

Allerjik astımın patolojisi, havayolu inflamasyonuna eşlik eden mast hücre, basofil, eozinofil, monosit ve Th-2 lenfosit infiltrasyonu ile birlikte izotip spesifik IgE üretimiyle karakterize edilmektedir (Barnes 2001). Bronşiyal astım, hem sitolojik hem de histolojik hava yolu yapı değişiklikleri ile karakterizedir (Cataldo ve ark 2003). Bu değişiklikler hava yolu yeniden yapılanması olarak adlandırılmakta ve goblet hücre hiperplazisi, subepitelial bazal membranın kalınlaşması ve fibrozisi, ve

havayolu düz kas hücre hipertrofisini içermektedir (Cataldo ve ark 2002). Son çalışmalar, uPKH'lerin ve bu hücrelerin farklılaştırılmasından elde edilen MKH'lerin akciğer hasarı oluşturulmuş farelerde hava yolu inflamasyonunu baskıladığını göstermiştir (Yang ve ark 2011, Sun ve ark 2012). Yang ve ark (2011), sistemik uygulanan farklılaşmamış uPKH'lerin farelerde akut akciğer hasarını iyileştirici yönde yararlı etki gösterdiğini rapor etmiştir. Sun ve ark ise, sistemik uygulanan insan uPKH kaynaklı MKH'lerin OVA-uyarımli allerjik inflamasyonu engellediğini belirtmiştir. Aynı grup, bu koruyucu etkinin, akciğerde inflamatuvar hücre infiltrasyonunda ve mukus oluşumunda baskılanma ve eozinofil infiltrasyonunda azalma ile oluştuğunu bildirmiştir. Ayrıca, kök hücre uygulaması ile serum IgE düzeyinde ve BAL sıvısında Th-2 sitokinleri olan IL-4, IL-5 ve IL-13 seviyesinde anlamlı derecede azalma göstermiştir (Sun ve ark 2012). Bu çalışmalara ek olarak, Wang ve ark (2013) c-Myc geni bulunmayan uPKH'leri sistemik olarak uygulamış ve bu hücrelerin serumda Th1 ve Th2 antikor yanıtını, BAL sıvısında ise IL-5 ve IFN- γ düzeyini baskıladığını, OVA-sensitize farelerde hava yolu aşırı duyarlılığını ve allerjik reaksiyonları önemli derecede zayıflattığını rapor etmiştir. Araştırmamızda hem EKH'lerin hem de uPKH'lerin i.n. uygulama sonrasında, distal ve proksimal hava yollarının yeniden yapılanması sonucu meydana gelen epitel, subepitelyal düz kas ve bazal membran kalınlıklarındaki artışı ve goblet hücre hiperplazisini kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede baskıladığı gösterildi. Ayrıca, astım modeli için kullandığımız kontrol grubuna bu hücrelerin uygulanması sonucu akciğerde bulunan hücre miktarı ve akciğer patolojisinde bir değişiklik gözlenmedi. Bu durum, EKH ve uPKH'lerin spesifik immünmodülatuar etkilerinin sadece immün uyarım ya da bozulma koşulları altında olduğunu vurgulayan önemli bir gözlemdir. Çalışmada akciğer histopatolojisinde meydana gelen düzelmelerin yanısıra, OVA grubunda artmış olan BAL sıvısındaki eozinofil hücre sayısının, akciğer süpernatantında Th2 sitokini olan IL-4 düzeyinin ve serumda OVA-spesifik IgE seviyesinin EKH ve uPKH uygulanması sonucu anlamlı derecede azaldığı belirlendi. Tüm sonuçlar, EKH ve uPKH'lerin astımda meydana gelen hava yolu yeniden yapılanmasını ve akciğer inflamasyonunu baskıladığını göstermektedir.

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg hücreler antijen spesifik inflamasyonun kontrolünde önemlidir (Maccario ve ark 2005) ve hava yolunda bu hücrelerin toplanması allerjik

hava yolu inflamasyonunu baskılayabilmektedir (Tang ve Bluestone 2008). Treg hücreler tarafından üretilen IL-10'un, akciğerde immün yanıtları kontrol etmek için gerekli olduğu gösterilmiştir (Strickland ve ark 2006). Kavanagh ve Mahon (2011), sistemik olarak OVA-sensitize farelere uygulanan allojenik kemik iliği kaynaklı MKH'lerin, lokal ve sistemik olarak CD4⁺Foxp3⁺ T hücreleri ve IL-10 düzeyini arttırdığını göstermiş ve kullandıkları modelde MKH'lerin immünmodülasyon için anahtar mekanizmasının Treg indüksiyonu olduğunu belirtmiştir. Fu ve ark (2012) yapmış oldukları çalışmada aynı şekilde, insan uPKH kaynaklı MKH'lerin allerjik rinit hastalarının periferik kan mononükleer hücrelerinde (PKMH) Th2 sitokinlerini önemli derecede azalttığını, fakat IL-10 miktarını anlamlı derecede artırdığını göstermiştir. Aynı grup, CD4⁺ alt popülasyon içerisinde Treg hücre oranının anlamlı derecede arttığını rapor etmiştir. Araştırmamızda, akut astım modeli oluşturulmuş farelere EKH ve uPKH uygulanması sonucu, akciğer süpernatantında Th2 sitokini olan IL-4'ün anlamlı derecede azaldığı ve IL-10 düzeylerinin anlamlı derecede yükseldiği belirlendi. Ayrıca, EKH uygulanması sonucu akciğer lenfosit hücrelerinde Treg hücre alt grubu yüzdelerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı gözlemlendi. Treg hücre alt gruplarındaki bu artış yüzde olarak düşük seviyede olmasına rağmen, sayısal olarak patolojik düzelme ile sonuçlanan son çalışmaların yüzde seviyelerine benzer değerler bulundu (Kavanagh ve Mahon 2011, Fu ve ark 2012). Astım modeline uPKH'lerin uygulanması sonucu ise akciğer lenfositlerinde oluşan Treg alt grubu yüzdesel olarak artış eğilimi göstermesine rağmen bu artış anlamlı bulunmadı, fakat elde edilen diğer sonuçlar çok az miktardaki artışın bile önemli olabileceğini düşündürdü. Literatürdeki diğer raporların sonuçları ile karşılaştırdığımız zaman, elde ettiğimiz veriler Treg hücre miktarındaki artışın EKH ve uPKH'lerin immünmodülasyon özelliklerinde merkezi rol oynadığını göstermektedir.

Çalışmamızda ayrıca EKH ve uPKH'lerin, akciğer lenfosit hücrelerinin proliferasyonu ve apoptozu üzerine immünodülatör etkileri araştırıldı. Ekibimizin daha önce yapmış olduğu çalışmada, *in vitro* koşullarda fare kemik iliği kaynaklı MKH'lerin akciğer lenfosit hücreleri ile yapılan ko-kültürleri sonucu, bu hücrelerin proliferasyonunu baskıladığı gösterildi. Aynı şekilde, yine 3 günlük kültür sonrasında, MKH'lerin lenfosit hücrelerin apoptozu üzerine inhibe edici rolü

raporlandı (Gülben Gürhan yayınlanmamış veri). Fu ve ark ise, yapmış oldukları çalışma ile uPKH kaynaklı MKH'lerin allerjik rinit hastalarından elde edilen PMKH'larda CD3⁺ T hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir. Fakat, aynı grup, bu hücrelerin PMKH apoptozu üzerinde anlamlı bir fark oluşturmadığını belirtmiştir (Fu ve ark 2012). Bu araştırmamızda ise, daha önceki çalışmalarımızdan ve literatür bulgularımızdan farklı olarak, EKH'lerin ve uPKH'lerin proliferasyon ve apoptoz üzerine *in vivo* etkileri araştırıldı. Pluripotent kök hücrelerin uygulandığı ve uygulanmadığı astım ve kontrol fare gruplarından izole edilen akciğer lenfosit hücreleri, pluripotent hücreler kültür ortamında bulunmaksızın CDmix ile uyarılarak 3 gün inkübe edildikten sonra analizler gerçekleştirildi. Elde edilen veriler, akciğer lenfosit hücrelerinin proliferasyonunun *in vivo* EKH ve uPKH uygulanması sonucu anlamlı olarak baskılandığını ve apoptozunun ise EKH uygulanması ile azaldığını gösterdi. Literatürde *in vivo* etkiler ile ilgili çalışmalar olsa da, bu hücrelerin *in vivo* etkileri hakkında bilgi bulunmamaktadır. Özellikle EKH'lerin lenfosit hücreleri üzerindeki apoptozu azaltma etkisi yüzde olarak düşük seviyede olmasına rağmen, bulgularımız *in vivo* etkileri gösterdiğinden dolayı bu düşük seviyedeki farklılıkların önemli olduğu düşünülmektedir.

Yeni pluripotent kök hücre tipi olan uPKH'lerin, altın pluripotans olarak nitelendirilen EKH'lere göre benzerlikleri ve farklılıkları günümüzde araştırma konularını oluşturmaktadır. uPKH'lerin EKH'ler kadar güçlü ve pluripotent olmadığı gibi bazı endişeler olmasına rağmen, bir çok benzerliklerinin gösterilmesi ilerisi için umut vermektedir. Bu araştırmada elde edilen sonuçlar, allojenik olarak uygulanan iki farklı pluripotent kök hücrenin akut astım fare modelinde histopatolojik ve immünmodülatör etkileri açısından karşılaştırılmasını sağladı. Akut astım modelinde oluşan, akciğer hava yolu yeniden yapılanması ve inflamasyonu üzerinde uPKH'lerin, EKH'ler kadar baskılayıcı etki gösterdiği ve OVA-spesifik IgE düzeyinde EKH'ler gibi istatistiksel derecede anlamlı azalma oluşturduğu belirlendi. EKH uygulanması sonucu Th2 sitokini olan IL-4'ün azalmasında ve anti-inflamatuar sitokin olan IL-10 düzeyinin artmasındaki anlamlı değişimlerin aynı zamanda uPKH'ler uygulanması sonucu da olduğu gözlemlendi. Ancak EKH uygulaması sonrası Treg hücre alt gruplarındaki anlamlı artış uPKH uygulanması ile anlamlılığa ulaşmadı. Bu durumda, uPKH'lerde Treg hücre mekanizmasının EKH kadar etkili

olmasa da önemli olduğu düşünölmektedir. Buna ek olarak, akciğer lenfosit hücrelerinin proliferasyonu üzerine *in vivo* etkilere bakıldığında, hem EKH'ler hem de uPKH'lerin proliferasyonu anlamlı derecede baskıladığı gözlemlendi. Fakat, akciğer lenfosit hücrelerinin apoptozu üzerinde uPKH'lerin baskılama etkisinin anlamlı derecede olmadığı bulundu.

Sonuç olarak, araştırmada elde edilen bulgular akut astım fare modelinde i.n. olarak uygulanan EKH ve uPKH'lerin; *in vivo* güçlü bir immünomodölatör etki oluşturduğunu, bu immünomodölatör etkinin EKH ve uPKH'lerde benzer olduğunu ve immünomodölasyon sonucu akut astım ilişkili proksimal ve distal hava yollarında histopatolojik değişimi ve inflamasyonu baskıladıklarını göstermektedir.

8. KAYNAKLAR

- Aggarwal S, Pittenger MF. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 105:1815-1822.
- Agostinis F, Foglia C, Landi M, Cottini M, Lombardi C, Canonica GW, Passalacqua G. (2008). The safety of sublingual immunotherapy with one or multiple pollen allergens in children. *Allergy*, 63:1637-1639.
- Akdis M, Verhagen J, Taylor A, Karamloo F, Karagiannidis C, Cramer R, Thunberg S, Deniz G, Valenta R, Fiebig H, Kegel C, Disch R, Schmidt-Weber CB, Blaser K, Akdis CA. (2004). Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med*, 199:1567-1575.
- Alam T, Sollinger HW. (2002). Glucose-regulated insulin production in hepatocytes. *Transplantation*, 74:1781-1787.
- Alvarez CV, Garcia-Lavandeira M, Garcia-Rendeles ME, Diaz-Rodriguez E, Garcia-Rendueles AR, Perez-Romero S, Vila TV, Rodrigues JS, Lear PV, Bravo SB. (2012). Defining stem cell types: understanding the therapeutic potential of ESCs, ASCs, and iPS cells. *J Mol Endocrinol*, 49:R89-R111.
- Angkasekwina P, Chang SH, Thapa M, Watarai H, Dong C. (2010). Regulation of IL-9 expression by IL-25 signaling. *Nature Immunol*, 11:250-256.
- Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, Chiba T, Yamanaka S. (2008). Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science*, 321:699-702.
- Avasthi S, Srivastava RN, Singh A, Srivastava M. (2008). Stem Cell: Past, Present and Future- A Review Article. *Internet Journal of Medical Update*, 3:22-30.
- Azzawi M, Bradley B, Jeffery PK, Frew AJ, Wardlaw AJ, Knowles G, Assoufi B, Collins JV, Durham S, Kay AB. (1990). Identification of activated T lymphocytes and eosinophils in bronchial biopsies in stable atopic asthma. *Am Rev Respir Dis*, 142:1407-1413.

- Bajada S, Mazakova I, Ashton BA, Richardson JB, Ashammakhi N. (2008). Stem cells in regenerative medicine. *Topics in Tissue Engineering*, Vol. 4. Eds. N Ashammakhi, R Reis, F Chiellini.
- Barnes PJ. (2001). Cytokine modulators for allergic diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 1:555-560.
- Barnes PJ. (2008). The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest*, 118(11):3546-3556.
- Barnes PJ. (2010). New therapies for asthma: is there any progress? *Trends Pharmacol Sci*, 31:335-343.
- Barry FP, Murphy JM. (2004). Mesenchymal stromal cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*, 36:568-584.
- Batra V, Musani AI, Hastie AT, Khurana S, Carpenter KA, Zangrilli JG, Peters SP. (2004). Brochoalveolar lavage fluid concentrations of TGF- β 1, TGF- β 2, IL-4 and IL-13 after segmental allergen challenge and their effects on alpha-smooth muscle actin and collagen III synthesis by primary human lung fibroblasts. *Clin Exp Allergy*, 34:437-444.
- Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*, 197:452-454.
- Bergeron C, Al-Ramli W, Hamid Q. (2009). Remodeling in asthma. *Proc Am Thorac Soc*, 6:301-305.
- Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. (2008). Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature*, 453:1051-1057.
- Blanchard C, Rothenberg ME. (2009). Biology of the eosinophil. *Adv Immunol*, 101:81-121.
- Boguniewicz M, Martin RJ, Martin D, Gibson U, Celniker A, Williams M, Leung DY. (1995). The effects of nebulized recombinant interferon-gamma in asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol*, 95:133-135.
- Bonfield TL, Koloze M, Lennon DP, Zuchowski B, Yang SE, Caplan AI. (2010). Human mesenchymal stem cells suppress chronic airway inflammation in the murine ovalbumin asthma model. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 299:L760-L770.

- Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. (2000). Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*, 161:1720-45.
- Boyce JA. (2004). The biology of the mast cell. *Allergy Asthma Proc*, 25:27-30.
- Brightling CE, Bradding P, Symon FA, Holgate ST, Wardlaw AJ, Pavord ID. (2002). Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med*, 346:1699-1705.
- Cataldo DD, Tournoy KG, Vermaelen K, Munaut C, Foidart JM, Louis R, Noel A, Pauwels RA. (2002). Matrix metalloproteinase-9 deficiency impairs cellular infiltration and bronchial hyperresponsiveness during allergen-induced airway inflammation. *Am J Pathol*, 161:491-498.
- Cataldo DD, Guaders MM, Rocks N, Sounni NE, Evrard B, Bartsch P, Louis R, Noel A, Foidart JM. (2003). Pathogenic role of matrix metalloproteases and their inhibitors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease and therapeutic relevance of matrix metalloproteases inhibitors. *Cell Mol Biol*, 49:875-884.
- Cederbom L, Hall H, Ivars F. (2000). CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol*, 30:1538-1543.
- Chandross KJ, Mezey E. (2001). Plasticity of adult bone marrow stem cells. Mattson MP ve Van Zant G editörleri. JAI Press: Greenwich, CT.
- Chang HC, Sehra S, Goswami R, Yao W, Yu Q, Stritesky GL, Jabeen R, McKinley C, Ahyi AN, Han L, Nguyen ET, Robertson MJ, Perumal NB, Tepper RS, Nutt SL, Kaplan MH. (2010). The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nature Immunol*, 11:527-534.
- Chapman R, Frankel MS, Garfinkel MS. (1999). Stem cell research and applications: Monitoring the frontiers of biomedical research. *Am Assoc Adv Sci Inst Civil Soc*, 34:405-416.
- Cho KS, Park HK, Park HY, Jung JS, Jeon SG, Kim YK, Roh HJ. (2009). IFATS collection: Immunomodulatory effects of adipose tissue-derived stem cells in allergic rhinitis mouse model. *Stem Cells*, 27:259-265.

- Chotinantakul K, Leraanansaksiri W. (2012). Hematopoietic stem cell development, niches, and signaling pathways. *Bone Marrow Res*, 2012:270425.
- Clauss M. (2000). Molecular biology of the VEGF and the VEGF receptor family. *Semin Thromb Hemost*, 26:561-569.
- Cohn L, Elias JA, Chupp GL. (2004). Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol*, 22:789-815.
- Demir AU, Karakaya G, Bozkurt B, Sekerel BE, Kalyoncu AF. (2004). Asthma and allergic diseases in schoolchildren: third cross-sectional survey in the same primary school in Ankara, Turkey. *Pediatr Allergy Immunol*, 15:531-538.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells: the International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8:315-317.
- Durrant DM, Metzger DW. (2010). Emerging roles of T helper subsets in the pathogenesis of asthma. *Immunol Invest*, 39:526-549.
- Draper JS, Fox V. (2003). Human embryonic stem cells: multilineage differentiation and mechanisms of self-renewal. *Arch Med Res*, 34:558-564.
- Eminli S, Foudi A, Stadtfeld M, Maherali N, Ahfeldt T, Mostoslavsky G, Hock H, Hochedlinger K. (2009). Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Nature Genet*, 41:968-976.
- Evans MJ, Kauman MH. (1981). Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature*, 292:154-156.
- Finkelman FD, Hogan SP, Hershey GKK, Rothenberg ME, Wills-Karp M. (2010). Importance of cytokines in murine allergic airway disease and human asthma. *J Immunol*, 184:1663-1674.
- Finotto S, Neurath MF, Glickman JN, Qin S, Lehr HA, Green FH, Ackerman K, Haley K, Galle PR, Szabo SJ, Drazen JM, De Sanctis GT, Glimcher LH. (2002). Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science*, 295:336-338.

- Firinci F, Karaman M, Baran Y, Bagriyanik A, Ayyildiz ZA, Kiray M, Kozanoglu I, Yilmaz O, Uzuner N, Karaman O. (2011). Mesenchymal stem cells ameliorate the histopathological changes in a murine model of chronic asthma. *Int Immunopharmacol*, 11:1120-1126.
- Fu QL, Chow YY, Sun SJ, Zeng QX, Li HB, Shi JB, Sun YQ, Wen W, Tse HF, Lian Q, Xu G. (2012). Mesenchymal stem cells derived from human induced pluripotent stem cells modulate T-cell phenotypes in allergic rhinitis. *Allergy*, 67:1215-1222.
- Fuchs E, Tumber T, Guasch G. (2004). Socializing with the Neighbors: Stem Cells and Their Niche. *Cell*, 116:769-778.
- Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad, Ser B*, 85:348-362.
- Galli R, Borello U, Gritti A, Minasi MG, Bjornson C, Coletta M, Mora M, De Angelis MG, Fiocco R, Cossu G, Vescovi AL. (2000). Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat Neurol*, 3:986-991.
- Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimbaldston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M. (2005). Mast cells as “tunable” effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol*, 23:749-786.
- Gelfand EW. Pro: mice are a good model of human airway disease. (2002). *Am J Respir Crit Care Med*, 166:5-8.
- Ginis I, Luo Y, Miura T, Thies S, Brandenberger R, Gerecht-Nir S, Amit M, Hoke A, Carpenter MK, Itskovitz-Eldor J, Rao MS. (2004). Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Dev Biol*, 269:360-380.
- Gludemans AK, Lambrecht BN, Smits HH. (2013). Potential of immunoglobulin A to prevent allergic asthma. *Clin Dev Immunol*, 2013:542091.
- Gonzalez F, Boue S, Izpisua Belmonte JC. (2011). Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming a la carte. *Nat Rev Genet*, 12:231-242.
- Goodwin M, Sueblinvong V, Eisenhauer P, Ziats NP, LeClair L, Poynter ME, Steele C, Rincon M, Weiss DJ. (2011). Bone-marrow derived mesenchymal stromal

- cells inhibit Th2-mediated allergic airways inflammation in mice. *Stem Cells*, 29:1137-1148.
- Grove JE, Bruscia E, Krause DS. (2004). Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cell*, 22:487-500.
- Guler N, Kirerleri E, Ones U, Tamay Z, Salmanyenli N, Darendeliler F. (2004). Leptin: does it have any role in childhood asthma? *J Allergy Clin Immunol*, 114(2):254-259.
- Hackett CH, Fortier LA. (2011). Embryonic stem cells and iPS cells: Sources and characteristics. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 27:233-242.
- Haldar P, Pavord ID. (2007). Noneosinophilic asthma: a distinct clinical and pathologic phenotype. *J Allergy Clin Immunol*, 119:1043-1052.
- Hamelmann E, Tateda K, Oshiba A, Gelfand EW. (1999). Role of IgE in the development of allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness--a murine model. *Allergy*, 54:297-305.
- Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, Carey BW, Beard C, Wernig M, Creighton MP, Steine EJ, Cassady JP, Foreman R, Lengner CJ, Dausman JA, Jaenisch R. (2008). Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell*, 133:250-264.
- Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunol*, 6:1123-1132.
- Hima Bindu A, Srilatha B. (2011). Potency of various types of stem cells and their transplantation. *J Stem Cell Res Ther*, 1:115. Doi: 10.4172/2157-7633.1000115
- Hirota N, Martin JG. (2013). Mechanisms of airway remodeling. *Chest*, 144:1026-1032.
- Hirst SJ, Martin JG, Bonacci JV, Chan V, Fixman ED, Hamid QA, Herszberg B, Lavoie JP, McVicker CG, Moir LM, Nguyen TT, Peng Q, Ramos-Barbon D, Stewart AG. (2004). Proliferative aspects of airway smooth muscle. *J Allergy Clin Immunol*, 114:S2-S17.
- Holgate ST. (1999). Genetic and environmental interaction in allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 104:1139-1146.

- Homer RJ, Elias JA. (2005). Airway remodeling in asthma: therapeutic implications of mechanisms. *Physiology*, 20:28-35.
- Hoshino M, Nakamura Y, Hamid QA. (2001). Gene expression of vascular endothelial growth factor and receptors and angiogenesis in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 107:1034-1038.
- Howarth PH, Knox AJ, Amrani Y, Tliba O, Panettieri RA Jr, Johnson M. (2004). Synthetic responses in airway smooth muscle. *J Allergy Clin Immunol*, 114:S32-S50.
- Jang HJ, Cho KS, Park HY, Roh HJ. (2011). Adipose tissue-derived stem cells for cell therapy of airway allergic diseases in mouse . *Acta Histochemica*, 113:501-507.
- Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, Mao N. (2005). Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, 105:4120-4126.
- Ishmael FT. (2011). The inflammatory response in the pathogenesis of asthma. *J Am Osteopath Assoc*, 111:S11-S17.
- Karagiannidis C, Hense G, Martin C, Epstein M, Ruckert B, Mantel PY, Menz G, Uhlig S, Blaser K, Schmidt-Weber CB. (2006). Activin A is an acute allergen-responsive cytokine and provides a link to TGF-beta mediated airway remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 117:111-118.
- Karaşahin T. (2012). Embriyonik kök hücreler. *Erciyes Univ Vet Fak Derg*, 9:65-71.
- Kearley J, Barker JE, Robinson DS, Lloyd CM. (2005). Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *J Exp Med*, 202:1539-1547.
- Kim JB, Zaehres H, Wu G, Gentile L, Ko K, Sebastiano V, Arauzo-Bravo MJ, Ruau D, Han DW, Zenke M, Schöler HR. (2008). Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature*, 454:646-650.
- Kim D, Kim C, Moon JI, Chun YG, Chang MY, Han BS, Ko S, Yang E, Cha KY, Lanza R, Kim KS. (2009). Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell*, 4:472-476.

- Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, Kim J, Aryee MJ, Ji H, Erlich LI, Yabuuchi A, Takeuchi A, Cunniff KC, Hongguang H, McKinney-Freeman S, Naveiras O, Yoon TJ, Irizarry RA, Jung N, Seita J, Hanna J, Murakami P, Jaenisch R, Weissleder R, Orkin SH, Weissman IL, Feinberg AP, Daley GQ. (2010). Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*, 467:285-290.
- Kim YM, Kim YS, Jeon SG, Kim YK. (2013). Immunopathogenesis of allergic asthma: more than the th2 hypothesis. *Allerji Asthma Immunol Res*, 5(4):189-196.
- Koestenbauer S, Zech NH, Juch H, Vanderzwalmen P, Schoonjans L, Dohr G. (2006). Embryonic stem cells: similarities and differences between human and murine embryonic stem cells. *Am J Reprod Immunol*, 55:169-180.
- Kumar RK, Foster PS. (2002). Modeling allergic asthma in mice: pitfalls and opportunities. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 27:267-272.
- Kumar S, Singh NP. (2006). Stem cells: A new paradigm. *Indian J Hum Genet*, 12:4-10.
- Kumar RK, Herbert C, Foster PS. (2008). The 'classical' ovalbumin challenge model of asthma in mice. *Curr Drug Targets*, 9:485-494.
- Kunisato A, Wakatsuki M, Kodama Y, Shinba H, Ishida I, Nagao K. (2010). Generation of induced pluripotent stem cells by efficient reprogramming of adult bone marrow cells. *Stem Cells Dev*, 19:229-238.
- Laoukili J, Perret E, Willems T, Minty A, Parthoens E, Houcine O, Coste A, Jorissen M, Marano F, Caput D, Tournier F. (2001). IL-13 alters mucociliary differentiation and ciliary beating of human respiratory epithelial cells. *J Clin Invest*, 108:1817-1824.
- Larche M, Robinson DS, Kay AB. (2003). The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 111:450-463.
- Larche M. (2007). Regulatory T cells in allergy and asthma. *Chest*, 132:1007-1014.
- Lee YC, Kwak YG, Song CH. (2002). Contribution of vascular endothelial growth factor to airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma. *J Immunol*, 168:3595-3600.

- Lee CG, Link H, Baluk P, Homer RJ, Chapoval S, Bhandari V, Kang MJ, Cohn L, Kim YK, McDonald DM, Elias JA. (2004). Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces remodeling and enhances TH2-mediated sensitization and inflammation in the lung. *Nat Med*, 10:1095-1103.
- Lengner, CJ. (2010) iPS cell technology in regenerative medicine. *Ann NY Acad Sci*, 1192:38-44.
- Lewkowich IP, Herman NS, Schleifer KW, Dance MP, Chen BL, Dienger KM, Sproles AA, Shah JS, Kohl J, Belkaid Y, Wills-Karp M. (2005). CD4⁺CD25⁺ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. *J Exp Med*, 202:1549-1561.
- Li C, Zhou J, Shi G, Ma Y, Yang Y, Gu J, Yu H, Jin S, Wei Z, Chen F, Jin Y. (2009). Pluripotency can be rapidly and efficiently induced in human amniotic fluid-derived cells. *Hum Mol Genet*, 18:4340-4349.
- Lloyd CM. (2007). Building better mouse models of asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*, 7:231-236.
- Lloyd CM, Hawrylowicz CM. (2009). Regulatory T cells in asthma. *Immunity*, 31:438-449.
- Lloyd CM, Hessel EM. (2010). Functions of T cells in asthma: more than just Th2 cells. *Nat Rev Immunol*, 10:838-848.
- Loh YH, Agarwal S, Park IH, Urbach A, Huo H, Heffner GC, Kim K, Miller JD, Ng K, Daley GQ. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood*, 113:5476-5479.
- Louis R, Lau LC, Bron AO, Roldaan AC, Radermecker M, Djukanovic R. (2000). The relationship between airways inflammation and asthma severity. *Am J Respir Crit Care Med*, 161:9-16.
- Lynch EL, Little FF, Wilson KC, Center DM, Cruikshank WW. (2003). Immunomodulatory cytokines in asthmatic inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev*, 14:489-502.
- Maccario R, Podesta M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, Daudt L, Ibatucci A, Piaggio G, Pozzi S, Frassoni F, Locatelli F. (2005). Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific

- immune response favors the differentiation of CD4⁺ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica*, 90:516-525.
- Majo F, Rochat A, Nicolas M, Jaoude GA, Barrandon Y. (2008). Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface. *Nature*, 456:250-254.
- Manz MG, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K. (2001). Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood*, 97:3333-3341.
- Massaro AF, Gaston B, Kita D, Fanta C, Stamler JS, Drazen JM. (1995). Expired nitric oxide levels during treatment of acute asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 152:800-803.
- McMillan SJ, Lloyd CM. (2004). Prolonged allergen challenge in mice leads to persistent airway remodeling. *Clin Exp Allergy*, 34:497-507.
- Mimeault M, Hauke R, Mehta PP, Batra SK. (2007). Recent advances in cancer stem/progenitor cell research: therapeutic implications for overcoming resistance to the most aggressive cancers. *J Cell Mol Med*, 11:981-1011.
- Miyoshi K, Tsuji D, Kudoh K, Satomura K, Muto T, Itoh K, Noma T. (2010). Generation of human induced pluripotent stem cells from oral mucosa. *J Biosci Bioeng*, 110:345-350.
- Miura K, Okada Y, Aoi T, Okada A, Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Ohnuki M, Ogawa D, Ikeda E, Okano H, Yamanaka S. (2009). Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nature Biotech*, 27:743-745.
- Montuschi P, Peters-Golden ML. (2010). Leukotriene modifiers for asthma treatment. *Clin Exp Allergy*, 40:1732-1741.
- Muchkaeva IA, Dashinimaev EB, Terskikh VV, Sukhanov YV, Vasiliev AV. (2012). Molecular mechanisms of induced pluripotency. *Acta Naturae*, 4:12-22.
- Neill DR, Wong SH, Bellosi A, Flynn RJ, Daly M, Langford TK, Bucks C, Kane CM, Fallon PG, Pannell R, Jolin HE, McKenzie AN. (2010). Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature*, 464:1367-1370.

- Nemeth K, Keane-Myers A, Brown JM, Metcalfe DD, Gorham JD, Bundoc VG, Hodges MG, Jelinek I, Madala S, Karpati S, Mezey E. (2010). Bone marrow stromal cells use TGF-beta to suppress allergic responses in a mouse model of ragweed-induced asthma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107:5652-5657.
- Ng HH, Surani MA. (2011). The transcriptional and signaling networks of pluripotency. *Nat Cell Biol*, 13:490-496.
- Nials AT, Uddin S. (2008). Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. *Dis Model Mech*, 1:213-220.
- Ober C. (2005). Perspectives on the past decade of asthma genetics. *J Allergy Clin Immunol*, 116:274-278.
- Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. (2001). Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells*, 19:193-204.
- Okamoto K, Okazawa H, Okuda A, Sakai M, Muramatsu M, Hamada H. (1990). A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell*, 60:461-472.
- Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, Hong H, Nakagawa M, Tanabe K, Tezuka K, Shibata T, Kunisada T, Takahashi M, Takahashi J, Saji H, Yamanaka S. (2011). A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods*, 8:409-412.
- Opolski M, Wilson I. (2005). Asthma and depression: a pragmatic review of the literature and recommendations for future research. *Clin Pract Epidemiol Ment Health*, 1:18.
- Orkin SH, Zon LI. (2008). Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*, 132:631-644.
- Osafune K, Caron L, Borowiak M, Martinez RJ, Fitz-Gerald CS, Sato Y, Cowan CA, Chien KR, Melton DA. (2008). Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nat Biotechnol*, 26:313-15.
- Park HK, Cho KS, Park HY, Shin DH, Kim YK, Jung JS, Park SK, Roh HJ. (2010). Adipose-derived stromal cells inhibit allergic airway inflammation in mice. *Stem Cells Dev*, 19: 1811-1818.

- Pascual RM, Peters SP. (2005). Airway remodeling contributes to the progressive loss of lung function in asthma: an overview. *J Allergy Clin Immunol*, 116:477-486.
- Pera MF, Tam PP. (2010). Extrinsic regulation of pluripotent stem cells. *Nature*, 465:713-720.
- Pejman S, Taylor AD. (2009). Th9 and allergic disease. *Immunology*, 127:450-458.
- Pene J, Chevalier S, Preisser L, Venereau E, Guilleux MH, Ghannam S, Moles JP, Danger Y, Ravon E, Lesaux S, Yssel H, Gascan H. (2008). Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes. *J Immunol*, 180:7423-7430.
- Puri MC, Nagi A. (2012). Concise review: Embryonic stem cells versus induced pluripotent stem cells: The game is on. *Stem Cells*, 30:10-14.
- Rael EL, Lockey RF. (2011). Interleukin-13 signaling and its role in asthma. *World Allergy Org J*, 4:54-64.
- Raffaghello L, Bianchi G, Bertolotto M, Montecucco F, Busca A, Dallegri F, Ottonello L, Pistoia V. (2008). Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells*, 26:151-162.
- Ramos-Barbon D, Ludwig MS, Martin JG. (2004). Airway remodeling: lessons from animal models. *Clin Rev Allergy Immunol*, 27:3-21.
- Reisli I, Koksali Y. (2002). Astım patogenezi. *S.Ü. Tıp Fak Derg*, 18:267-273.
- Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol*, 18:399-404.
- Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Brkanski J, Bentley AM, Corrigan C, Durham SR, Kay AB. (1992). Predominant Th-2 like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med*, 326:298-304.
- Robson P, Stein P, Zhou B, Schultz RM, Baldwin HS. (2001). Inner cell mass-specific expression of a cell adhesion molecule (PECAM-1/CD31) in the mouse blastocyst. *Dev Biol*, 243:317-329.
- Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST. (1989). Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet*, 1:520-524.

- Sancho-Bru P, Roelandt P, Narain N, Pauwelyn K, Notelaers T, Shimizu T, Ott M, Verfaillie C. (2011). Directed differentiation of murine-induced pluripotent stem cells to functional hepatocyte-like cells. *J Hepatol*, 54:98-107.
- Saraclar Y, Kuyucu S, Tuncer A, Sekerel B, Saçkesen C, Kocabaş C. (2003). Prevalence of asthmatic phenotypes and bronchial hyperresponsiveness in Turkish schoolchildren: an International Study of Asthma and Allergies in Childhood Study (ISAAC) phase 2 study. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 91:477-484.
- Sevim H, Gürpınar ÖA. (2012). Induced pluripotent stem cells and their applications. *Marmara Medical Journal*, 25:5-9.
- Shifren A, Witt C, Christie C, Castro M. (2012). Mechanisms of remodeling in asthmatic airways. *J Allergy (Cairo)*, 2012:316049.
- Slack JM. (2000). Stem cells in epithelial tissues. *Science*, 287:1431-1433.
- Sohni A, Verfaillie CM. (2013). Mesenchymal stem cells migration homing and tracking. *Stem Cells Int*, 2013:130763.
- Stadtfeld M, Brennand K, Hochedlinger K. (2008a). Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. *Curr Biol*, 18:890-894.
- Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. (2008b). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*, 322:945-949.
- Strickland DH, Stumbles PA, Zosky GR, Subrata LS, Thomas JA, Turner DJ, Sly PD, Holt PG. (2006). Reversal of airway hyperresponsiveness by induction of airway mucosal CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med*, 203:2649-2660.
- Sun N, Panetta NJ, Gupta DM, Wilson KD, Lee A, Jia F, Hu S, Cherry AM, Robbins RC, Longaker MT, Wu JC. (2009). Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106:15720-15725.
- Sun YQ, Deng MX, He J, Zeng QX, Wen W, Wong DS, Tse HF, Xu G, Lian Q, Shi J, Fu QL. (2012). Human pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells prevent allergic airway inflammation in mice. *Stem Cells*, 30:2692-2699.
- Tagaya E, Tamaoki J. (2007). Mechanisms of airway remodeling in asthma. *Allergol Int*, 56:331-340.

- Takahashi K, Yamanaka S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126:663-676.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131:861-872.
- Tanaka H, Yamada G, Saikai T, Hashimoto M, Tanaka S, Suzuki K, Fujii M, Takahashi H, Abe S. (2003). Increased airway vascularity in newly diagnosed asthma using a high-magnification bronchovideoscope. *Am J Respir Crit Care Med*, 168:1495-1499.
- Tang Q, Bluestone JA. (2008). The FoxP3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol*, 9:239-244.
- Temelkovski J, Hogan SP, Shepherd DP, Foster PS, Kumar RK. (1998). An improved murine model of asthma: selective airway inflammation, epithelial lesions and increased methacholine responsiveness following chronic exposure to aerosolised allergen. *Thorax*, 3:849-56.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282:1145-1147.
- Tokuzawa Y, Kaiho E, Maruyama M, Takahashi K, Mitsui K, Maeda M, Niwa H, Yamanaka S. (2003). Fbx15 is a novel target of Oct3/4 but is dispensable for embryonic stem cell self-renewal and mouse development. *Mol Cell Biol*, 23:2699-2708.
- Tsai SY, Clavel C, Kim S, Ang YS, Grisanti L, Lee DF, Kelley K, Rendl M. (2010). Oct4 and klf4 reprogram dermal papilla cells into induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, 28:221-228.
- Tuna M. (2009). Solid tümörlerde ve lösemilerde kanser kök hücreleri. *Türk Onkoloji Dergisi*, 24:42-47.
- Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 8:726-736.
- Ulusal Astım Tanı ve Tedavi Rehberi. (2000). *Toraks Dergisi*, 1: ek 1.

- Ural AU. (2006). Kök hücreler. *Türk Ortopedi ve Travmatoloji Derneği Dergisi*, 5:140-145.
- Vats A, Bielby RC, Tolley NS, Nerem R, Polak JM. (2005). Stem cells. *Lancet*, 366:592-602.
- Velu N. (2004). Stem cell transplantation. *API medical update*, 14:366-377.
- Verfaillie CM, Pera MF, Landsrop PM. (2002). Stem cells hype and reality. *Hematology Am Soc Hem Edu Program*, 369-391.
- Wang CY, Chiou GY, Chien Y, Wu CC, Wu TC, Lo WT, Chen SJ, Chiou SH, Peng HJ, Huang CF. (2013). Induced pluripotent stem cells without c-Myc reduce airway responsiveness and allergic reaction in sensitized mice. *Transplantation*, 96:958-965.
- Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, Ebina W, Mandal PK, Smith ZD, Meissner A, Daley GQ, Brack AS, Collins JJ, Cowan C, Schlaeger TM, Rossi DJ. (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*, 7:618-630.
- Watt FM, Hogan BL. (2000). Out of Eden: Stem cells and their niches. *Science*, 287:1427-1430.
- Weiss DJ. (2014). Concise review: current status of stem cells and regenerative medicine in lung biology and diseases. *Stem Cells*, 32:16-25.
- Wenzel S, Holgate ST. (2006). The mouse trap: It still yields few answers in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 174:1173-1176.
- Whittaker PA. (2005). Therapeutic cloning: The ethical limits. *Toxic Appl Pharmacol*, 270:689-691.
- Williams AR, Hare JM. (2011). Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circ Res*, 109:923-940.
- Wills-Karp M. (1999). Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu Rev Immunol*, 17:255-281.
- Wobus AM. (2001). Potential of embryonic stem cells. *Mol Aspec Med*, 22:149-164.

- Wu P, Tarasenko YI, Gu Y, Huang LY, Coggeshall RE, Yu Y. (2002). Region specific generation of cholinergic neurons from fetal human neural stem cells grafted in adult rat. *Nat Neurosci*, 5:1271-1278.
- Xu C. (2006). Characterization and evaluation of human embryonic stem cells. *Methods Enzymol*, 420:18-37.
- Yamanaka S. (2012). Induced pluripotent stem cells: past, present, and future. *Cell Stem Cell*, 10:678-684.
- Yan X, Qin H, Qu C, Tuan RS, Shi S, Huang GT. (2010). iPS cells reprogrammed from human mesenchymal-like stem/progenitor cells of dental tissue origin. *Stem Cells Dev*, 19:469-480.
- Yang KY, Shih HC, How CK, Chen CY, Hsu HS, Yang CW, Lee YC, Perng RP, Peng CH, Li HY, Chang CM, Mou CY, Chiou SH. (2011). IV delivery of induced pluripotent stem cells attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. *Chest*, 140:1243-1253.
- Yousefi F, Ebtekar M, Soleimani M, Soudi S, Hashemi SM. (2013). Comparison of *in vivo* immunomodulatory effects of intravenous and intraperitoneal administration of adipose-tissue mesenchymal stem cells in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Int Immunopharmacol*, 17:608-616.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318:1917-1920.
- Zapata AG. (2012). Bone marrow stroma: a source of mesenchymal stem cells for cell therapy. In *Stem Cells in Human Reproduction: Basic Science and Therapeutic Potential*. 3rd ed, New York: Cambridge University Press.
- Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC. (2002). Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol*, 174:11-20.
- Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, Xu Y. (2011). Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*, 474:212-215.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	İSMAİL	Soyadı	ÖĞÜLÜR
Doğum Yeri	ANKARA	Doğum Tarihi	28.04.1982
Uyruğu	T.C.	TC Kimlik No	10978153622
E-mail	İsmail.ogulur@gmail.com	Tel	05548682241

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	ODTÜ Biyoteknoloji Bölümü	2008
Lisans	İTÜ Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2005
Lise	Ankara Bahçelievler Deneme Lisesi	1999

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			

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

* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Yabancı Dil Sınav Notu #								
KPDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	82.50							

Başarılmış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır

KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; ÜDS: Üniversitelerarası Kurul Yabancı Dil Sınavı; IELTS:

International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English; CAE: Certificate in Advanced English; CPE: Certificate of Proficiency in English

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	82.828	83.656	70.137
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok iyi
GraphPad	İyi
SPSS	İyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1- **Ismail Ogulur**, Gulben Gurhan, Ayca Aksoy, Gokhan Duruksu, Cigdem Inci, Deniz Filinte, Faruk Erdem Kombak, Erdal Karaöz, Tunc Akkoc. Suppressive effect of compact bone-derived mesenchymal stem cells on chronic airway remodeling in a murine model of asthma. *Immunological Investigations*, basımda.

2- Türkan Ebru Köroğlu*, **İsmail Ögülür***, Seval Mutlu, Ayten Yazgan-Karataş, Gülay Özcengiz. 2011. Global Regulatory Systems Operating in Bacilysin Biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J Mol Microbial Biotechnol* 20:144-55. (*ortak yazar)

Ulusal Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1- Tunç Akkoç, Ayzer Tevetoğlu, **İsmail Ögülür**, Ayşegül İzgi, Elif Karakoç Aydıner, Safa Barış, Nerin Bahçeciler, Işıl Barlan. 2011. IgE yüksekliği ve/veya otoimmünite ile seyreden immün yetmezliklerde Th17 hücre farklılaşmasının araştırılması. *MÜSBED* 1(2):96-102.

2- Ayşegül İzgi, Tunç Akkoç, **İsmail Ögülür**, Ayzer Tevetoğlu, Elif Karakoç Aydıner, Safa Barış, Nerin Bahçeciler, Işıl Barlan. 2011. Sık değişken immün yetmezlik hastalarında Carboxyfluorescein sccinimidylester (CFSE) yöntemi ile lenfosit proliferasyonu. *MÜSBED* 1(3): 171-177.

3- Tunç Akkoç, **İsmail Ögülür**, Ayzer Tevetoğlu, Ayşegül İzgi, Özden Hatırnaz-Ng, Yuk Yin-Ng, Safa Barış, Elif Karakoç-Aydın. 2013. Th17 differentiation in hyper IgE syndrome; IL-17 secretion and ROR δ -t expression. *MÜSBED* 3(1):S17-S22.

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Sözlü Bildiriler

1- **Ogulur Ismail**, Gurhan Gulben, Aksoy Ayca, Duruksu Gokhan, Filinte Deniz, Kombak Erdem, Barlan Isil, Karaöz Erdal, Akkoc Tunc. Mouse compact bone derived mesenchymal stem cells suppress airway inflammation in both chronic and

acute murine asthma model. “Termis-eu 2013”. (17-20 Haziran 2013, İstanbul). Özet Kitabı s.749.

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan Sözlü Bildiriler

1- **İsmail Ögülür**, Gülben Gürhan, Ayça Aksoy, Gökhan Duruksu, Deniz Filinte, Işıl Barlan, Erdal Karaöz, Tunç Akkoç. İ.v. ve i.p. uygulanan mezenkimal kök hücrelerin akut astım fare modeli üzerine etkisi. “3. Kök Hücre Sempozyumu” (30 Kasım-1 Aralık 2012, İstanbul) Bildiri Kitapçığı s.2. (En İyi Sözlü Bildiri 3. sü).

2- **İsmail Ögülür**, Gülben Gürhan, Ayça Aksoy, Gökhan Duruksu, Deniz Filinte, Işıl Barlan, Erdal Karaöz, Tunç Akkoç. Mezenkimal kök hücrelerin dentritik hücreler üzerine immune modulator etkisi. “22. Ulusal İmmünoloji Kongresi”. (27-30 Nisan 2013, Çeşme, Türkiye). Özet kitabı s.82.

3- **Gülben Gürhan**, **İsmail Ögülür**, Gökhan Duruksu, Işıl Barlan, Çiğdem İnci, Erdal Karaöz, Tunç Akkoç. İntranasal yolla uygulanan sıçan kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin akut astım fare modeli üzerine etkisi. “XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi”. (27-30 Ekim 2013, Kuşadası, Aydın). (En İyi Sözlü Bildiri 2. si).

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Poster Bildirileri

1- **Ogulus Ismail**, Gurhan Gulben, Aksoy Ayca, Duruksu Gokhan, Filinte Deniz, Barlan Isil, Karaoz Erdal, **Akkoc Tunc**. The effect of intravenously, intraperitoneally and intratrekeal applied mesenchymal stem cells on mouse model of acute asthma. “World Immune Regulation Meeting VII” (13-16 Mart 2013, Davos, İsviçre). Özet Kitabı s.153-154.

2- Tunc Akkoc, **İsmail Ogulus**, Ayzer Tevetoğlu, Aysegul Izgi, Elif Karakoc-Aydiner, Safa Baris, Nerin Bahceciler, Isil Barlan. Th17 Cell Differentiation in HIES and CVID: IL-17 Secretion and Rory Expression. “Molecular Immunology & Immunogenetics Congress 2012” (27-29 Nisan 2012, Antalya). Özet Kitabı s.142.

3- Ayça Aksoy, Tunç Akkoç, Gülay Erman, Cansu Subaşı, Alparslan Okçu, **İsmail Ögülür**, Gülben Gürhan, Işıl Barlan, Erdal Karaöz. A Comparison of Isolation Methods for Mouse Mesenchymal Stem Cells From Bone Marrow. "Molecular Immunology & Immunogenetics Congress 2012" (27-29 Nisan 2012, Antalya). Özet Kitabı s.182.

4- **İsmail Ögülür**, Ayten Yazgan Karataş ve G. Ozcengiz. The effects of Phr peptides on the expression of *bacABCDE* operon in *B. subtilis*. "IUMS XII. International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology" (5-9 Ağustos 2008, İstanbul). Özet Kitabı s.113.

5- **Oğulur, I.**, Koroglu, TE., Karatas, AY. ve Ozcengiz, G. 2006. The effects of *spo0A*, *abrB* and *codY* genes on the expression of *bacABCDE* operon in *B. subtilis*. "2nd FEMS Congress of European Microbiologists" (4-8 Haziran 2006, Madrid). Özet Kitabı s. 246.

6- Koroglu, TE., **Oğulur, I.**, Ozcengiz G. ve Karatas, AY. 2006. The effects of *spo0H* and *oppA* genes on the expression of *bacABCDE* operon in *B. subtilis*. "2nd FEMS Congress of European Microbiologists" (4-8 Haziran 2006, Madrid). Özet Kitabı. p. 242.

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan Poster Bildirileri

1- **İsmail Ögülür**, Gülben Gürhan, Ayça Aksoy, Gökhan Duruksu, Deniz Filinte, Erdem Kombak, Işıl Berat Barlan, Erdal Karaöz, Tunç Akkoç. Fare kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin akut astım fare modelinde dentritik hücrelerin aktivasyonu üzerine etkisi. "20. Ulusal Allerji ve Klinik İmmünoloji Kongresi" (2-6 Kasım 2013, Antalya, Türkiye). Özet Kitabı s.104 ve "4. Kök Hücre Sempozyumu" (20 Aralık 2013, İstanbul, Türkiye) P-08.

2- **İsmail Ögülür**, Gülben Gürhan, Ayça Aksoy, Cansu Subaşı, Işıl Berat Barlan, Erdal Karaöz, Tunç Akkoç. Kompakt kemik kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kronik astım modeli geliştirilmiş BALB/c farelerde akciğer histopatolojisi ve sitokin düzeyi üzerine etkisi. "20. Ulusal Allerji ve Klinik İmmünoloji Kongresi"

(2-6 Kasım 2013, Antalya, Türkiye). Özet Kitabı s.104 ve “4. Kök Hücre Sempozyumu” (20 Aralık 2013, İstanbul, Türkiye) P-07.

3- Gülben Gürhan, **İsmail Ögölür**, Gökhan Duruksu, Deniz Filinte, Erdem Kombak, Işıl Barlan, Erdal Karaöz, Tunç Akkoç. İntranasal yolla uygulanan sıçan kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin akut astım fare modeli üzerine etkisi. “4. Kök Hücre Sempozyumu” (20 Aralık 2013, İstanbul, Türkiye) P-09.

4- Gülben Gürhan, **İsmail Ögölür**, Gökhan Duruksu, Çiğdem İnci, Deniz Filinte, Erdem Kombak, Işıl Berat Barlan, Erdal Karaöz, Tunç Akkoç. Sıçan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin akut astım fare modelinde histopatoloji ve sitokin düzeyi üzerine etkisi. “20. Ulusal Allerji ve Klinik İmmünoloji Kongresi” (2-6 Kasım 2013, Antalya, Türkiye). Özet Kitabı s.104-105.

5- **İsmail Ögölür**, Gülben Gürhan, Ayça Aksoy, Gökhan Duruksu, Deniz Filinte, Işıl Barlan, Erdal Karaöz, Tunç Akkoç. İ.v. ve i.p. uygulanan mezenkimal kök hücrelerin akut astım fare modeli üzerine etkisi. “19. Ulusal Allerji ve Klinik İmmünoloji Kongresi” (7-11 Ekim 2012, Antalya). Özet Kitabı s.107.

6- **İsmail Ögölür**, Gülben Gürhan, Ayça Aksoy, Cansu Subaşı, Deniz Filinte, Işıl Barlan, Erdal Karaöz, Tunç Akkoç. Mezenkimak kök hücrelerin kronik astım fare modeli üzerine etkisi. “19. Ulusal Allerji ve Klinik İmmünoloji Kongresi” (7-11 Ekim 2012, Antalya). Özet Kitabı s.107 ve “3. Kök Hücre Sempozyumu” (30 Kasım-1 Aralık 2012, İstanbul) Bildiri Kitapçığı s.13.

7- Gülben Gürhan, **İsmail Ögölür**, Ayça Aksoy, Cansu Subaşı, Deniz Filinte, Işıl Barlan, Erdal Karaöz, Tunç Akkoç. Fare Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin (fKİ-MKH) İntranasal (İ.N.) Yolla Uygulanmasının Akut Astım Fare Modeli Üzerine Etkisi. “3. Kök Hücre Sempozyumu” (30 Kasım-1 Aralık 2012, İstanbul) Bildiri Kitapçığı s.14.

8- **İsmail Ögölür**, Ayça Çırcır, Erkan Özcengiz ve Gülay Özcengiz. Recombinant Subunit Vaccine Development against Mannheimia haemolytica and

Pasteurella multocida. "METU Biology Research Day" (26 Mayıs 2011, Ankara).
Özet Kitabı s.20.

9- Aslı Aras Taşkın, Ayten Yazgan, **Ismail Oğülür** ve Gülay Özcengiz.
Proteome-wide Analysis of Functional Roles of Bacilysin Biosynthesis in *Bacillus subtilis*. "Biotech METU 2009" (27-30 Eylül, Ankara, Turkey). Özet Kitabı s.98.

10- **İ. Öğülür**, A.Y. Karataş ve G. Özcengiz. *comA*, *comP* ve *comQ* gen ürünlerinin *B. subtilis*'de *bacABCDE* operon üzerine etkisi. "15. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi" (28-31 Ekim 2007, Antalya). Özet Kitabı s.47-48

Yazılan Ulusal Kitaplar veya Kitaplarda Bölümler

Moleküler Biyoloji, 15. Bölüm: Nükleik Asitler: İzolasyonu, Saflaştırılması, tayini ve Hibridizasyonu, Sayfa: 261-274, Nobel Akademik Yayıncılık, Haziran 2012, Ankara.

Onur ve Ödüller

2008-2013 TÜBİTAK-BİDEB Yurt İçi Doktora Bursu

2006-2007 Akademik Yılı ODTÜ Lisans Üstü Dersleri Performans Ödülü

Sertifikalar

21 Kasım- 2 Aralık 2011 VII. Bilimsel Araştırmalarda Hayvan Kullanım Kursu Sertifikası, GATA, Ankara

26 Kasım 2011 IV. Temel Hücre Kültürü ve Kök Hücre Kursu Sertifikası, GATA, Ankara

27 Kasım 2011 IV. Temel Biyoistatistik Kursu Sertifikası, GATA, Ankara