



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENTAL FOLİKÜL MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN
PEMPHIGUS VULGARISLI HASTALARIN DENTRİTİK HÜCRE
VE LENFOSİTLERİ ÜZERİNDEKİ İMMÜNREGÜLATÖR
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YAZGÜL DURAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI,
ÇOCUK ALERJİ VE İMMÜNOLOJİ BİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. TUNÇ AKKOÇ

2019-İSTANBUL



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENTAL FOLİKÜL MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN
PEMPHIGUS VULGARISLI HASTALARIN DENTRİTİK HÜCRE
VE LENFOSİTLERİ ÜZERİNDEKİ İMMÜNREGÜLATÖR
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YAZGÜL DURAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI,
ÇOCUK ALERJİ VE İMMÜNOLOJİ BİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. TUNÇ AKKOÇ

2019-İSTANBUL

TEZ ONAY FORMU

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Program türü : Yüksek Lisans

Anabilim Dalı : Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

Tez Sahibi : Yazgül DURAN

Sınav Tarihi ve Saati : 27.12.2019 – 10:00

Tez Başlığı : Dental Folikül Mezenkimal Kök Hücrelerin Pemphigus Vulgarisli Hastaların Dentritik Hücre ve Lenfositleri Üzerindeki İmmünregülatör Etkilerinin Araştırılması

Bu çalışma, içerik ve kalite bakımından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Ünvan, Adı-Soyadı (Kurum adı)	İmza
Danışman	Prof. Dr. Tunç AKKOÇ (Marmara Üniversitesi)	
Üye	Prof. Dr. Safa BARIŞ (Marmara Üniversitesi)	
Üye	Doç Dr. Elif Damla ARISAN (İstanbul Kültür Üniversitesi)	

ONAY

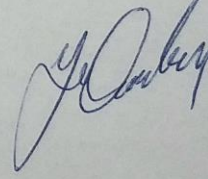
Bu tez, yukarıda isimleri bulunan jüri üyeleri tarafından "Marmara Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği" nin ilgili maddeleri uyarınca kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun 24.01.2020 tarih ve 96 sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

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

Yazgöl DURAN



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. PV hastalarında immün yanıtların gösterimi	16
Şekil 2. MKH'lerin immün düzenleyici etkilerinin gösterimi	20
Şekil 3. CFSE işaretli hücrelerin akım sitometri cihazında analizi	37
Şekil 4. CD4+CD25+FoxP3+ T regülatör hücrelerin akım sitometri analizi.	38
Şekil 5. Hücre canlılığı ve apoptoz oranlarının akım sitometri cihazında analizi	39
Şekil 6. Naif, efektör bellek ve merkez bellek CD4+ T lenfosit oranları	40
Şekil 7. Dendritik hücrelerde kostimülasyon oranlarının akım sitometri cihazında analizi	41
Şekil 8. DF-MKH'lerin morfolojik görünümü	42
Şekil 9. DF-MKH'lerin akım sitometrik analizi	43
Şekil 10. DF-MKH'lerin farklılaşma potansiyelleri.....	44
Şekil 11. CD4+ T lenfosit proliferasyonu	47
Şekil 12. CD4+ T lenfosit apoptoz ve canlılık oranları	48
Şekil 13. CD4+CD25+FoxP3+ T regülatör hücre oranları.....	49
Şekil 14. CD11c+ hücrelerinde kostimülasyon	51
Şekil 15. Naif, efektör bellek ve merkez bellek CD4 ⁺ T lenfosit oranları	53
Şekil 16. Kültür süpernatantlarında sitokin miktarı tayini	55
Şekil 17. Kültür süpernatantlarında otoantikor miktarı tayini	56

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. PV hasta gruplarının demografik verileri	45
Tablo 2. PV ve sağlıklı kontrol gruplarının lenfosit alt grupları dağılımı	46

KISALTMALAR

APC	Antigen sunucu hücre
CFSE	Karboksi floresan süksinimidil ester
DMEM	Dulbescco's modified eagle's medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DF-MKH	Dental folikül kaynaklı mezenkimal kök hücre
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
DSG1	Desmoglein 1
DSG3	Desmoglein 3
FBS	Fötal sığır serumu
FoxP3	Forkhead box p3
HLA	İnsan Lökosit Antijeni
IFN	İnterferon
MHC	Majör histokompatibilite kompleks
MKH	Mezenkimal kök hücre
NK	Doğal öldürücü hücre
PBMC	Periferal kan mononükleer hücre
PV	Pemphigus Vulgaris
RPMI	Roswell park memorial institute
TCR	T hücre reseptörü
Th	Yardımcı T hücre
TNF	Tümör nekroz faktör
Treg	T regülatör hücre

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğrenimimin ve tez çalışmamın tüm aşamalarında her türlü bilimsel desteği sağlayan, deneyimlerini paylaşıp, yönlendiren tez danışmanım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Tunç Akkoç' a,

Çalışmalarım sırasında hasta seçimi ve elde ettiğim sonuçları değerlendirmemde bana yardımcı olan, çalışma dışında da desteğini, bilgi birikimini ve en içten iyi niyetini sonuna kadar hissettirdiğim sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. Züleyha Özgen' e,

Yüksek Lisans eğitimine başladığım dönemden itibaren her konuda bana yardımcı olan, akademik anlamda bilgi birikimini aktarmaktan asla çekinmeyen ve her durumda yanımda olduğunu gösteren sevgili ablam Noushin Zibandeh' e,

Yola başladığımda birlikte olduğumuz, mezun olmasına rağmen geri çevirmeden her ihtiyaç anında telefonun ucunda olan sevgili ablam Deniz Genç' e

Çalışmalarım sırasında güzel enerjisiyle motivasyonumu her zaman yüksek tutmamda yardımcı olan, bilgi birikimiyle destek olan, laboratuvarında birlikte olmaktan ve çalışmaktan sonuna kadar keyif aldığım sevgili dostlarım Dilek Başer, Gamze Akgün ve Bengü Akçam' a,

Eğitim kelimesinin ne kadar anlamlı ve önemli olduğunu bilerek lisans ve yüksek lisans sürecinde her türlü talebimi karşılayan çok sevgili 112 Acil Sağlık Merkezi çalışma arkadaşlarıma en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Hayata bakış açımın kaynağı varlığımın sebebi olan, her durumda kararlarımı destekleyen ve beni ben yapan çok sevgili annem ve kardeşime, ışıyla her zaman yolumu aydınlatan sevgili babama ve hayattaki en büyük şansım dediğim çok kıymetli sevgili eşime, yürüdüğüm yola inandıkları ve beni destekledikleri için çok teşekkür ederim.

Bu çalışma Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: SAG-C-YLP-110718-0436) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	4
4.1. İmmün Sistem	4
4.1.1. Doğal İmmün Sistem	5
4.1.1.1 Epitel Tabaka	5
4.1.1.2 Fagosit Hücreler.....	5
4.1.1.3 Sitokinler.....	7
4.1.2. Edinsel Bağışıklık.....	7
4.1.2.1 Hümorale ve Hücre İmmünite.....	8
4.1.2.2 CD4 ⁺ T lenfositler	10
4.1.2.3 CD8 ⁺ T lenfositler	11
4.1.2.4 CD4 ⁺ /CD25 ⁺ Tregülatör Hücreler	11
4.1.2.5 Antijen Sunucu Hücreler	12
4.1.3. Apoptoz.....	13
4.1.4. Pemphigus Vulgaris	15
4.1.5. Pemphigus Vulgaris Patogenezi	15
4.1.6. Pemphigus Vulgaris Mevcut Tedavi Seçenekleri	16
4.2. Kök Hücreler.....	16
4.2.1. Mezenkimal Kök Hücreler.....	17
4.2.1.1. Diş Folikülü Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler (DF-MKH)	18
4.2.2. Mezenkimal Kök Hücreler ve İmmünomodülasyon.....	18

5. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
5.1. Çalışma Planının Özeti	20
5.2. Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar.....	21
5.3. Çalışmada Kullanılan Hücre Kültürü Malzemeleri	23
5.4. Kullanılan Cihazlar	24
5.5. Kullanılan solüsyonların hazırlanması.....	25
5.5.1. DF-MKH' ler için besiyerinin hazırlanması.....	25
5.5.2. Lenfosit Kültürleri için besiyerinin hazırlanması.....	25
5.5.3 Kök hücre dondurma solüsyonunun hazırlanması.....	25
5.5.4. PBS solüsyonunun hazırlanması.....	25
5.5.5. CDmix uyarımı için anti-CD3 ve anti-CD28 stok solüsyonların hazırlanması.....	26
5.5.6. Kollajenaz solüsyonunun hazırlanması	26
5.5.7. Osteojenik stimülasyon besiyerinin hazırlanması	26
5.5.8. Kondrojenik stimülasyon besiyerinin hazırlanması	26
5.5.9. Adipojenik stimülasyon besiyerinin hazırlanması.....	26
5.5.10. Lizat solüsyonunun hazırlanması	27
5.5.11. Alizarin red solüsyonunun hazırlanması	27
5.5.12. Oil red O solüsyonunun hazırlanması.....	27

5.5.13. Alcian blue solüsyonunun hazırlanması	27
5.6. Çalışma Planı	27
5.6.1. Diş folikülü kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu	28
5.6.2. İzole edilen hücrelerin pasajlanması.....	28
5.6.3. İzole edilen kök hücrelerin karakterizasyonu	29
5.6.4. İzole edilen kök hücrelerin farklılaştırılması	30
5.6.4.1. İzole edilen kök hücrelerin osteojenik farklılaştırılması	30
5.6.4.2. İzole edilen kök hücrelerin adipojenik farklılaştırılması	31
5.6.4.3. İzole edilen kök hücrelerin kondrojenik farklılaştırılması.....	32
5.6.5. Kök hücrelerin 48 kuyucuklu kültür plaklarına ekilmesi	32
5.6.6. Mononükleer hücre kültürlerinin yapılması	33
5.6.6.1. PV hastası ve sağlıklı bireylerin seçimi	33
5.6.6.2. PV hastası ve sağlıklı bireylerden alınan venöz kandan mononükleer hücre izolasyonu	34
5.6.6.3. Lenfositlerin proliferasyon analizi için CFSE ile işaretlenmesi	34
5.6.6.4. Kök Hücre Varlığında ve Yokluğunda Lenfosit Kültürünün Yapılması ...	35
5.6.7. Analizler	36
5.6.7.1. CD4+ T Lenfositlerin proliferasyon analizi.....	36
5.6.7.2. Lenfositlerin CD4+CD25+FoxP3+ Tregülatör hücre analizi	37

5.6.7.3. CD4+ T Lenfositlerin Annexin V/PI ile apoptoz ve canlılık oranlarının analizi.....	38
5.6.7.4. CD4+ Naif, Efektör Bellek ve Merkez Bellek T hücre Oranlarının Analizi	39
5.6.7.5. Antijen sunucu hücrelerde kostimülatör molekül ekspresyonu analizi...	40
5.6.7.6. Hücre kültür süpernatanlarında sitokin tayini.....	41
5.6.7.7. Hücre kültür süpernatanlarında otoantikor miktarının tayini	41
5.6.8. İstatistiksel analiz.....	42
6. BULGULAR.....	42
6.1. Diş Folikülü Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu	42
6.2. DF-MKH'lerin Karakterizasyonu ve Farklılaşma Potansiyelinin değerlendirilmesi	43
6.2.1. DF-MKH hücrelerin akım sitometri analizi.....	43
6.2.2. DF-MKH hücrelerin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik yönde farklılaştırılması	43
6.3. PV ve sağlıklı kontrol gruplarında demografik veriler	44
6.4. PV Hastalarında 0.Gün T Alt Grupları, B Alt Grupları ve NK Hücre Oranlarında Anlamlı Bir Fark Görülmedi	45
6.5. DF-MKH PV hastalarında CD4+ lenfosit proliferasyonunu baskıladı	46
6.6. DF-MKH PV Hastalarında CD4+ T Lenfosit Apoptozunu Azaltırken Canlılığını Arttırdı	47
6.7. DF-MKH PV Hastalarında CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ (Tregülatör) Hücre Oranını Arttırdı	49

6.8. DF-MKH PV Hastalarının Dendritik Hücrelerinde Kostimülasyonu	
Baskıladı	50
6.9. DF-MKH PV Hastalarında Naif CD4+ T Lenfosit Oranlarını Artırdı,	
Efektör Bellek ve Merkez Bellek CD4+ T Lenfosit Oranlarını Azalttı	51
6.10. DF-MKH PV hastalarında TNF- α , IL-4 miktarını azalttı, IL10 ve	
IFN- γ miktarını artırdı	53
6.11. DF-MKH PV Hastalarında DSG1 ve DSG3 Otoantikor Miktarını	
Azalttı	55
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	56
8. KAYNAKLAR	62

Dental Folikül Mezenkimal Kök Hücrelerin Pemphigus Vulgarisli Hastaların Dendritik Hücre Ve Lenfositleri Üzerindeki İmmünregülatör Etkilerinin Araştırılması

Öğrencinin Adı: Yazgül DURAN

Danışmanı: Prof. Dr. Tunç AKKOÇ

Anabilim Dalı: Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

Bilim Dalı: Çocuk Alerji ve İmmünoloji Bilim Dalı

1. ÖZET

Amaç: Antikor aracılı otoimmün ve kronik bir hastalık olan Pemfigus Vulgaris (PV) hastalarında, Dental Folikül-Mezenkimal Kök Hücrelerin (DF-MKH) immünregülatör etkilerinden yola çıkarak bu hastalardaki lenfosit ve dendritik hücreler üzerindeki immünregülatör etkilerini araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Diş çekimi endikasyonu bulunan sağlıklı bireylerden tam gömük yirmi yaş dişleri alındı. Mezenkimal Kök Hücrelerin izolasyonu, karakterizasyonu ve farklılaşma çalışmaları yapıldı. PV tanısı almış hastalar (n=9) ve sağlıklı bireylerden alınan 10 ml venöz kan örneklerinden PKMH izolasyonu yapıldı. Kültürler CDmix ile 72 saat uyarıldı. Kültür süresinin ardından DF-MKH' ların CD4+ T lenfositler üzerindeki proliferasyon ve canlılık oranına, T regülatör hücre, antijen sunucu hücredeki ko-stimülasyon, bellek ve naif CD4+ T lenfosit düzeyine ve hücre kültür süpernatantındaki sitokin miktarına etkisi araştırıldı.

Bulgular ve Sonuçlar: PV ve sağlıklı bireylerde DF-MKH varlığında CD4+ T lenfositlerin canlılık düzeyini anlamlı olarak arttırdı, proliferasyon oranını anlamlı olarak düşürdü. T regülatör hücre düzeyi ve naif CD4+ T lenfosit miktarı DF-MKH varlığında anlamlı olarak artarken dendritik hücrelerdeki ko-stimülasyon ve bellek CD4+ T lenfosit miktarları azaldı. DF-MKH varlığında IL-4 ve TNFα düzeyi istatistiksel olarak anlamlı azalırken IL-10 ve IFNγ düzeyi anlamlı olarak arttı. Sonuç olarak DF-MKH PV' de düzenleyici etkilerinin olduğu ve hücresel tedavide veya kür olarak kullanıma uygun olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Pemfigus Vulgaris, Mezenkimal Kök Hücre, İmmünregülasyon.

Investigation of Immunoregulatory Effects of Dental Follicle Mesenchymal Stem Cells on Dendritic Cells and Lymphocytes of Patients with Pemphigus Vulgaris

Student's Name: Yazg l DURAN

Advisor: Dr. Tunç AKKOÇ

Department: Child Health and Diseases Department-Department of Pediatric Allergy and Immunology

2. SUMMARY

Objective: We aimed to investigate the immunoregulatory effects of Lymphocyte and Dendritic cells in patients with Pemphigus Vulgaris (PV), an antibody-mediated autoimmune and chronic disease, based on the immunoregulatory effects of Dental Follicle-Mesenchymal Stem Cells (DF-MSC).

Materials and Methods: Fully embedded wisdom teeth were extracted from healthy subjects with dental indications. Isolation, characterization and differentiation of mesenchymal stem cells were performed. PBMC isolation was performed from 10 ml venous blood samples taken from patients with PV (n = 9) and healthy individuals. Cultures were stimulated with CDmix for 72 hours. After culture time, the effect of DF-MSCs on proliferation and viability of CD4 + T lymphocytes, co-stimulation, T regulator cell, antigen presenting cell, memory and naïve CD4 + T lymphocyte level and cytokine amount in cell culture supernatant were investigated.

Results and Conclusion: In the presence of DF-MSC in PV and healthy individuals, the level of viability of CD4 + T lymphocytes was significantly increased and proliferation rate was significantly decreased. T-regulator cell level and the amount of naïve CD4 + T lymphocytes increased significantly in the presence of DF-MSC, while co-stimulation and memory CD4 + T lymphocytes in the dendritic cells decreased. In the presence of DF-MSC, IL-4 and TNF  levels decreased significantly while IL-10 and IFN  levels increased significantly. In conclusion, it is thought that DF-MSC PV has regulatory effects and may be suitable for use in cellular therapy or as a cure.

Key words: Pemphigus Vulgaris, Mesenchymal Stem Cell, Immunoregulation.

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Pemphigus Vulgaris (PV) hayatı tehdit eden dezmozomal kaderin proteinleri (dezmozoglein-1, dezmozoglein-3) hedef alan antikor aracılı, bül oluşumu gösteren otoimmün bir hastalıktır. Hastalık patogenezi başlıca IgG tipi otoantikorların dezmozomal proteinlere bağlanarak keratinosit-keratinosit bağlantısını bozması ve sonucunda intraepitelyal ayrışma oluşması ile karakterizedir. İn vitro deri ve in vivo fare modellerinde; PV hastalarından izole edilmiş IgG otoantikorlarının hastalığı oluşturmada yeterli olduğu gösterilmiştir. Ana tedavi seçeneği steroid ve immünsüpresif ajanlardır. Uzun süreli steroid kullanımı ve immünsüpresif ajanların kullanımı hastalığın mortalitesini azaltmakla birlikte oluşturdıkları yan etki sebebiyle daha güvenli ve etkili tedaviye ihtiyaç duyulmaktadır.

Mezenkimal Kök Hücreler (MKH) multipotent erişkin kök hücreler arasında yer alır. Uluslararası Kök Hücre Kriterlerine göre MKH' ler; plastik yüzeye yapışabilen, Osteojenik, Kondrojenik ve Adipojenik farklılaşabilen, yüzeyinde CD73, CD90, CD146, CD105, CD146'ı %95'in üzerinde ifade eden, CD45, HLA-DR, CD34, CD14 ifade etmeyen hücreler olarak tanımlanır. Göbek kordonu kanı, kemik iliği, plasenta, diş ve yağ dokusu gibi birçok farklı erişkin somatik hücreden mezenkimal kök hücre elde edilmektedir.

MKH' lerin akut ve kronik hastalıklarda terapötik ajan olarak kullanımı ile ilgili son yıllarda birçok çalışma bulunmaktadır. Ayrıca Mezenkimal kök hücrelerin inflamatuvar hastalıklarda modülatuar etkileri olduğu bilinmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar ağız boşluğundaki çeşitli kaynaktan kolaylıkla elde edilebilen süt dişi, dental pulpa, dental folikül, periodental ligament kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin birçok otoimmün, alerjik, inflamatuvar hastalık, yara iyileşmesi ve rejeneratif tıp tedavi yaklaşımlarında başarı ile kullanılabildiği gösterilmiştir.

PV tedavisinde MKH' lerin immün yanıtı düzenleme özelliği ile ilgili literatürde *in-vitro* veya *in-vivo* bir çalışma bulunmamaktadır. Biz bu çalışmada MKH'lerin immünomodülatuar özelliğinden yola çıkarak PV' li hastaların lenfositleri ve dendritik hücreleri üzerindeki etkilerini incelemeyi amaçladık. Bu amaç doğrultusunda dental folikül kaynaklı MKH' lerin, PV hastalığının tedavisinde yeni bir seçenek olup olamayacağı konusunda fikir verecektir. Çalışmanın sonuçları PV ile ilgili literatüre önemli katkıda bulunacaktır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. İmmün Sistem

Bağıışıklık sistemi vücudu yabancı ve istilacı ajanlardan koruyan savunma sistemidir. Bağıışıklık sistemi içerisinde çeşitli hücre ve moleküller bulunmaktadır. Bu yapıların temel görevi yabancı ajanların tanınması ve ortadan kaldırılmasıdır. Tanıma işlevi yabancı ajan üzerindeki çeşitli moleküller sayesinde gerçekleşir. Bu moleküller patojen organizmaların sahip olduğu karbonhidrat veya protein yapıları olabilir. Farklı çeşitlilikte ayırt edici yapılara sahip olan yabancı maddelere karşı immün sistemde farklı yanıtlar oluşturulur. Bu yanıtlarda yabancı organizmaları tanıyan ve onları etkisiz hale getiren çeşitli mekanizmalar gelişmiştir. Vücudun birçok bölümüne immün sistem dağılmış durumdadır. Öncül hücreleri kemik iliğinde oluşan immün sistem hücreleri olgunlaşana kadar kemik iliğinde kalabilir veya vücudun farklı bölgelerine göç edip orada olgunlaşabilirler. İmmün sistem hücreleri, kendilerinin veya başka hücrelerin salgıladığı hormon benzeri çözünmüş moleküllerin etkisiyle gelişir, yanıt oluşturur veya baskılanırlar. Salgılanan peptit ya da protein yapıdaki bu moleküllere sitokin denir.

Myeloid hücreler; granülositler ve agranülositler olarak iki grup hücreden oluşur. Nötrofil, bazofil, eozinofil hücreleri granülositleri oluştururken; monositler agranülositleri oluşturur. Monositler de kemik iliğinde oluşup dolaşıma katılır ve çeşitli dokulara geçer. Bu dokularda monositler makrofajlara dönüşür ve geçtiği dokuya özgü makrofajlar olarak orada kalır. Lenfoid hücreler ise T hücreleri, B hücreleri ve doğal öldürücü hücrelerden oluşur. T hücreleri kemik iliğinde oluştuktan sonra olgunlaşma sürecini tamamlamak üzere timüsa girer, B hücreleri ise kemik iliğinde olgunlaşır. Olgunlaşan hücreler kan dolaşımına katılarak dalak ve lenf nodları gibi sekonder lenfoid organlara geçerler. İmmün sistem yanıtlarında bu hücrelerin vücutta çok çeşitli etkileri vardır.

İmmün sistem doğal ve edinsel immün sistem olarak ikiye ayrılır. Doğal immün yanıt; vücuda giren yabancı maddeler için ilk bariyeri oluşturan, onları tanıyıp yıkıma uğratmak için organizmada hazır olarak bulunur. Edinsel immün yanıt ise doğal immün yanıtın ardından patojenle karşılaşma sonrasında patojene ait antijene özgü olarak gelişen daha etkili yanıtlar oluşturmaktadır. Doğal immün sistemi oluşturan hücreler; fagositoz görevi yapan nötrofiller ve makrofajlar, dendritik hücreler, doğal öldürücü hücrelerdir. Doğal immünitede yer alan diğer moleküller ise kan proteinleri ve kompleman sistemidir.

Edinsel immün yanıtta T ve B lenfositleri önemli rol oynamaktadır. T hücreleri

hücrel immüniteye, B hücreleri ise hümorale immüniteye ait hücrelerdir. Hücrel immün yanıtın görevi vücuda giren yabancı organizmaların sebep olduğu enfeksiyonları ya da tümör hücrelerini yok ederek vücudu korumaktır. Hümorale immünitenin hücreleri B lenfositlerdir ve yabancı antijenlere karşı plazma hücrelerine dönüşerek antikor üretirler. İmmünitenin bu kısmı antijen antikor ilişkisi üzerine kurulmuştur.

4.1.1. Doğal İmmün Sistem

Doğal immün sistem, vücuda giren yabancı maddelerin girişini engelleyen ilk savunma sistemidir. Bu sistemin hücreleri enfekte dokuya birkaç saat içinde ulaşabilir. Doğal immünite hem mikroplara hem de hasar görmüş hücrelere yanıt oluşturabilir. Bu sistemde mikropların veya yabancı maddenin ortak yapıları tanınmaktadır. Doğal immün sistem elemanları şöyle sıralanabilir; fagosit hücreleri olan nötrofil, makrofaj, dendritik hücreler ve doğal öldürücü hücreler ile fiziksel ve kimyasal bariyerlerdir. Fiziksel bariyer epitel doku tarafından sağlanmaktadır. Epitel doku yüzeyinde üretilen antimikrobiyal maddeler ise kimyasal bariyer oluşturmaktadır. (Abbas ve ark., 2012).

4.1.1.1. Epitel Tabaka

Mikroorganizmalara karşı var olan ilk savunma hattı organizmanın dış çevresinde bulunan epitel yüzeydir. Bir şekilde epitel yüzeyi geçebilen mikroplar ise yine epitel doku hücreleri tarafından üretilen antimikrobiyal maddelerle etkisiz hale getirilmektedir. Bu epitel yüzeyler; Vücudumuzda birçok organ devamlı epitel hücreler ile kaplıdır. Deri, sindirim, solunum ve ürogenital sistemlerinin mukozal yüzeyleri devamlı epitel hücreleri ile kaplıdır ve mikropların girişinin engellenmesi için bir bariyer oluşturmaktadır. Epitel yüzeyin bütünlüğünün bozulmasıyla vücut enfeksiyon girişine açık hale gelir. Ayrıca solunum ve sindirim kanalı gibi mukus müsin olarak adlandırılan glikoprotein yapıda bir madde içerir. Kayganlaştırıcı özelliğe sahip bu madde mikropların bu kanallardan atılmasını kolaylaştırır. Ayrıca bazı lökositler de antimikrobiyal özellikte peptidler (defensin ve katelisin) üretirler (Abbas ve ark., 2012).

4.1.1.2. Fagosit Hücreler

Dolaşımdaki fagositik hücrelerden nötrofiller ve makrofajlar doğal bağışıklık içinde yer alan ve enfeksiyon bölgesinde hasarlı dokuda ilk savunmayı oluşturan hücrelerdir. Bu

hücrelerde mikroorganizmaların tanınmasını fagositoz aşaması izler ve fagositik hücrelerin aktivasyonu mikroorganizmaların yıkımı ile sonlanır. Nötrofiller ve makrofajlar tarafından tanınır ve fagosit ederek lizozom denilen enzim içerikli başka bir keseye birleşmesiyle enzimle parçalayarak yok etme yeteneğindedirler. Fagosit mekanizmasında, fagositik hücre plazma membranı aracılığı ile tanıdığı mikroorganizmayı çevreler ve mikroorganizma iki ucun birleşmesi sonucu oluşan fagozom adlı membranı kesesinin içinde kalır. Fagozomlar lizozomlar ile birleşerek fagolizozomları oluşturur. Mikroorganizmaların tanınmasını ve bağlanmasını sağlayan bazı reseptörler fagolizozomlar içerisindeki enzimleri uyarılmasına yol açarlar. Uyarılan enzimler ve lizozomal proteazlar, mikrobiyal proteinlerin parçalanmasına yol açar. Tüm bu enzimler fagositik hücreye zarar vermeksizin keselerin içine alınmış mikroorganizmaları sindirirler (Abbas ve ark., 2012).

Periferde bulunan ve polimorf nükleer lökositler olarak adlandırılan nötrofiller inflamatuvar evrenin erken fazını oluşturur. Nötrofiller kemik iliğinde oluşur ve her biri periferde yaklaşık 6 saat dolaşır. Mikropların girişinden sonra saatler içinde nötrofiller enfeksiyon bölgesine göç eden ilk hücre grubudur (Abbas ve ark., 2012).

Monositler; kanda dolaşım halinde olan ve nötrofillerden sonra enfeksiyon bölgesine göç eden fagositik hücrelerdir. Kandan dokuya geçişinin ardından makrofajlara dönüşür ve mikroba karşı daha uzun süreli savunma oluşturur. Bulundukları dokulara göre makrofajlar; kemik iliğinde osteoklast, karaciğerde kupffer hücreleri, merkezi sinir sisteminde mikrogialar, akciğerde alveolar makrofajlar olarak isimlendirilirler.

Makrofajlar T lenfositlere antijen sunumunun yanı sıra, interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktör- α (TNF- α) adı verilen sitokinler üretirler. Bu sitokinler proinflamatuvar sitokinler olarak adlandırılır ve hem doğal hem de edinsel immün aktiviteleri yönlendirirler (Zoroğlu ve ark., 2003). Makrofajlar aynı zamanda antijen sunan hücrelerdir. Bu hücreler yabancı maddeleri yakalar, parçalar ve ortaya çıkan mikrobiyal antijenleri T ve B lenfositlere sunar. Antijen sunumunu yüzeylerinde bulunan majör histokompatibilite kompleksi (MHC) ile gerçekleştirir. Bu, immün yanıtın başlaması için önemli bir ilk adımdır (Saroj ve ark., 2012). Hücresel ve humoral immün yanıtta lenfositler ve makrofajlar koordineli çalışırlar. İmmün sistemin bileşenleri tarafından uyarılan makrofajlar, TNF- α , IL-6 ve IL-1 sitokinlerini salgılayarak fagositik hücrelerin aktivasyonunu, endotelde adezyonunun artışı ve bunların enfekte dokulara geçişini hızlandırır (Taylor ve ark., 2005). Makrofajlar immün yanıtın düzenlenmesi ile birlikte dokudaki ölü hücreleri yok etmede de önemli rol

oyunlar. Bu makrofajlar genellikle süpürücü (scavenger) olarak adlandırılır.

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

4.1.1.3. Sitokinler

Doğal ve edinsel immünitede yer alan ve hücrelerin immün işlevini sağlayan çözünmüş moleküllere sitokin denir. Bu moleküller peptid yapıda olup lökositlerin, büyüme ve farklılaşmasında, antijenlerin eliminasyonunda ve hematopoietik hücrelerinin gelişiminde rol oynar. Sitokinler immün yanıtı düzenleme özelliklerine göre şu şekilde gruplandırılabilirler; 1-Proinflamatuvar sitokinler: İnflamasyonu arttıran ve sürekliliğini sağlayan sitokinlerdir, 2- Büyüme faktörleri: Hücrelerin hayatta kalmasını arttıran ve yapısal değişikliklere neden olan sitokinlerdir, 4- Kemokinler: inflamatuvar hücreler için kemotaktik olan sitokinlerdir, 5- Antiinflamatuvar sitokinler: inflamatuvar yanıtı durduran ya da baskılayan sitokinlerdir. T lenfositleri salgıladıkları sitokinlere göre Th1, Th2, Th17 gibi alt gruplara farklılaşabilir. Th1 hücreleri ağırlıklı olarak interferon-gamma (IFN- γ) sekrete ederken, Th2 hücreleri IL-4, IL-5 ve IL-13 sekrete etmektedir. T yardımcı hücre 2 (Th2) lenfositler ve bu hücrelerden salgılanan sitokinlerinin PV patogeneğinde anahtar rol oynadığı düşünülmektedir. (Masjedi ve ark., 2017).

4.1.2. Edinsel Bağışıklık

İmmün sistemde iki temel savunma sistemi vardır. Bunlardan birincisi yabancı maddelerin vücuda girmesiyle başlayan ilk savunma sistemi yani doğal bağışıklıktır. Takip eden ikinci savunma sistemi ise edinsel bağışıklıktır. Doğal immünitede yanıtlar kısa süreli ve

spesifik değildir. Edinsel immünitede ise yanıtlar daha uzun süreli, kalıcı (bellek hücreleri sayesinde) ve spesifiktir. Doğal immünitede mikroorganizma ya da yabancı maddelerin ortak yapılarına aynı yanıtlar verilirken, edinsel bağışıklıkta antijene özgü yanıtlar verilir. Edinsel bağışıklık da kendi içinde iki grupta incelenir. Birincisi hücre aracılı bağışıklıktır ve aktive olan T lenfositlerin antijeni yok etmesine yönelik gelişir. İkincisi hümorale bağışıklıktır ve B lenfositlerin antijene karşı spesifik antikor üreterek gerçekleştirdiği bağışıklıktır (Alberts ve ark., 2008).

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

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

4.1.2.1. Hümorale ve Hücrele İmmünite

Değişik hücre ve moleküllerin oluşturduğu, hücre içi ve dışı mikroplara karşı savunma sağlayan iki tür edinsel immünite vardır. Bunlardan biri hümorale immünite diğeri hücrele immünitedir.

Hümorale immünitede B lenfositler yer alır. Her bir B lenfosit antikorun bir türünü üretir

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

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

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

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

T lenfositlerin yüzeyinde bulunan TCR' ler, Ig' lerle fonksiyonel ve yapısal olarak çok

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

4.1.2.2. CD4+ T Lenfositler

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

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

Th2 sitokinleri B lenfositleri IgE üretimi için aktive eder. APC' den IL-12 salgılanmazsa, T lenfositler IL-4 salgırlar ve CD4+ T hücrelerinin CD4+ Th2 yönüne doğru polarize olmasını sağlar. Th2 hücreleri IL-4 salgılayarak IgE antikorunun üretimini, IL-5 salgılayarak eozinofillerin oluşmasını ve IL-13 salgılayarak mukus sekresyonunu sağlar. Bu hücreler özellikle helmintik parazitlere karşı eozinofil aracılığıyla fagositozdan bağımsız immüniteyi aktifleştirir (Abbas ve ark., 2007). IL- 4, IL-5, IL-13 salgılayan Th2 hücreleri

hümmoral immün yanıtlardan ve allerjik reaksiyonlardan sorumludur. Th2 yönünde polarizasyon Th1 oluşumunu baskılar (Nelson, 2004).

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

4.1.2.3. CD8⁺ T Lenfositler

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

4.1.2.4. CD4⁺CD25⁺ Tregülatör Hücreler

Tregülatör (Treg) hücreler CD4⁺ T hücrelerinin bir alt grubu olup peptid-MHC ile eş uyaran varlığında uyarılan TCR' ler aktif T hücrelerinin çoğalmasını ve sitokin üretimini baskılar. CD4⁺ T hücrelerin %5-10' unu oluştururlar. Bu hücreler öz antijenlere veya yabancı antijenlere karşı T lenfositler ile ilişkili immün yanıtları baskılar. Treg hücreler otoimmün hastalıklara karşı immün yanıtı baskılamada önemli rol oynar. Bu görevini Treg hücreleri diğer hücrelerin immün yanıtını düzenleyerek gerçekleştirir. Bu mekanizma ile inflamatuvar yanıtlar baskılanır. Treg' ler iki şekilde ortaya çıkar. Timusta oluşanlara "doğal Treg" (nTreg) hücreleri denir, inflamatuvar yanıtlar esnasında CD4⁺ veya CD8⁺ hücreler tarafından uyarım sonrası oluşan Treg hücrelere "indüklenmiş" Treg (iTreg) hücreler denir. nTreg ve iTreg hücreleri CD4 ve CD25 ifadesinin yanı sıra FoxP3 ekspresyonunu da gerçekleştirirler. İmmün sistemi

baskılayıcı etkilerini IL-10 ve TGF- β salgılayarak gösterirler. Sekrete edilen bu sitokinler immün yanıtları baskılayıcı özelliktedir (Gallimore ve Godkin, 2008).

4.1.2.5. Antijen Sunucu Hücreler

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

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

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

DH’ ler CD4+ ve CD8+ T lenfositleri aktive etmek için antijeni yakalar ve işleyip T lenfositlere sunar. Matürasyon aşamasında DH’ ler periferik dokudan sekonder lenfoid yapılara doğru harekete başlar ve orada T hücreleri uyaran matür DH’ lere dönüşür. Matürasyon sürecinde MHC molekülleri endositik kompartmandan hücre yüzeyine doğru çıkmaya başlar; antijenlerin ve patojenlerin hücre içine alımında selektif bir azalma ve T

hücreleri için DH hücre yüzeyindeki ko-stimülatör moleküllerde bir artış izlenir (Lipscomb ve ark., 2007).

Genelde, bir kez olgunlaşan ve lenf düğümüne giren DH, T hücreye 10 saate kadar antijen sunma yeteneğine sahiptir. T hücre stimülasyonu gerçekleşince de DH'ler apoptotik ölüme uğrar ve böylece geliştirilen immün yanıt dengelenir. DH'ler fazla miktarda ko-stimülan moleküller taşıdığından 100-3000 kat kadar T lenfositleri uyarabilir; bundan dolayı diğer ASH'lere göre 100 kat daha fazla antijen sunumu sağlayabilmektedir. DH'lerin yüzeylerinde bulunan CD58 (LFA-3), CD54 (ICAM- 1), CD50 (ICAM-3), CD102 (ICAM-2), CD80 (B7- 1), CD86 (B7-2) gibi adezyon ve ko-stimülan moleküller ile T lenfositlerde bulunan CD2 ve CD28 gibi moleküller ilişkiye girerek primer immün yanıtın başlaması için gerekli sekonder sinyalleri oluşturur (Foti ve ark., 2006).

DH' ler aynı zamanda IFN- α , IL-1, IL-6, IL-7, IL-12 ve IL-15 ifade ederek primer immün yanıtta etkili olur. DH' lerin IL-12 ile Th1; IL-10 ile Th2 sitokin yanıtını oluşturduğu gözlenmiştir. IL-12, IFN- γ ekspresyonunu artırıp T lenfositleri Th1 fenotipine yönlendirerek T ve doğal öldürücü (NK) hücrelerinin sitotoksik etkilerini artırır. IL-12 üretiminin IL-10, IFN- α , nitrik oksit, TGF- β gibi sitokinlerle inhibe olduğu görülmektedir. IL-10 ise ko-stimülan moleküllerin ekspresyonunu azaltıp IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α ve GM-CSF gibi inflamatuvar sitokinleri baskılayarak Th yanıtını Th2'ye yönlendirmekte, böylece DH matürasyonunu inhibe etmektedir (Yeşilyurt ve Fidan, 2011).

4.1.3. Apoptoz

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

fagosit edilir (Bellamy ve ark., 1995; Ellis ve ark., 1991).

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

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

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

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

Apoptoz ile nekroz birbirinden farklıdır. Nekroz; rastgele gelişen bir süreçtir ve genler tarafından kontrol edilemez. Nekroz şiddetli oksidatif stres, ağır metaller, hipertrofi gibi olaylarda görülür. Hücre membranının bütünlüğü kaybolur, Hücre iyon dengesini kaybeder ve sıvı almaya başlayıp şişer, büyük vakuoller oluşur ve hücre lizis olur. Nekrozda ATP

gerekmez, DNA rastgele parçalanır, inflamasyona sebep olur ve ortama nötrofillerin ve makrofajların göçü gerçekleşir. Bu olaylar nekrozun ayırt edici özelliğidir (Golstein ve Kroemer, 2007; Nicotera ve ark., 2004).

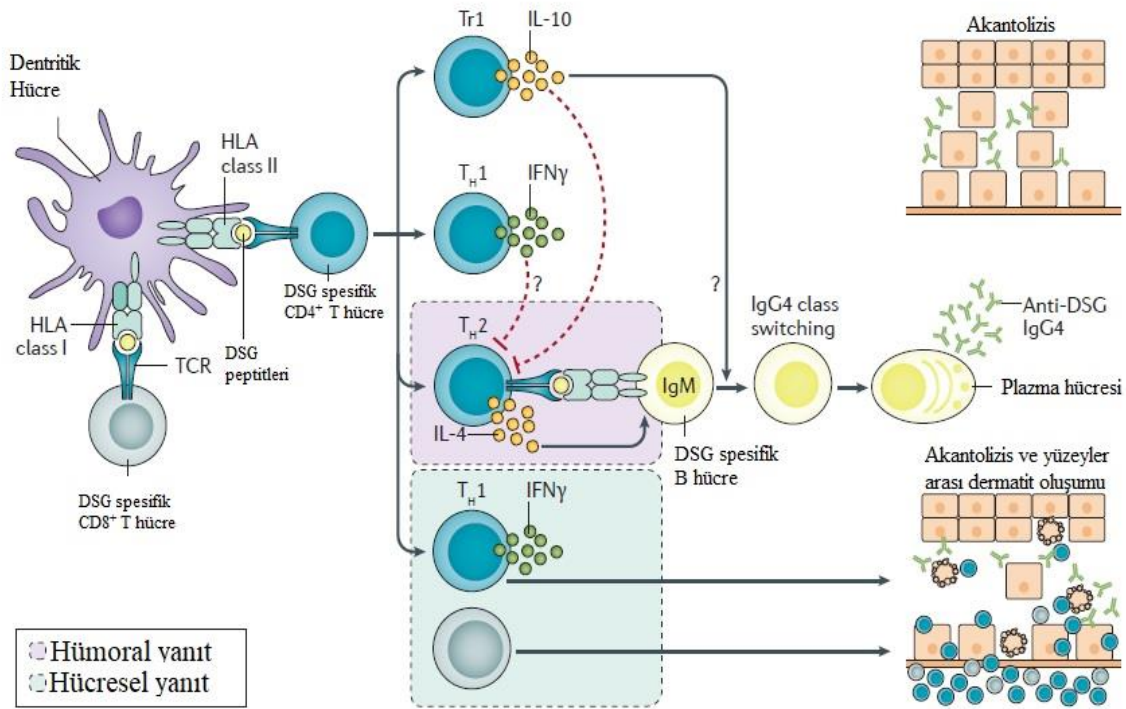
4.1.4. Pemphigus Vulgaris

Pemphigus Vulgaris (PV) cilt ve mukoza zarlarında intraepitelyal kabarcık oluşumu ile karakterize hayatı tehdit eden kronik otoimmün bir hastalıktır. Cilt ve oral mukoza gibi epitel tabakada bulunan ve hücre içi yapışmayı korumaktan sorumlu desmozom adı verilen yapılar bulunur. Pemfigusta bu desmozomlarda cadherin ailesinin bir parçası olan (hücre-hücre adezyon molekülleri) desmogleinlere (desmoglein 1 ve desmoglein3) yönelik IgG otoantikorları bulunur (Amagai M,1991). Hastalığın kesin olarak nedeni bilinmemektedir. Genetik çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre PV hastalarında genetik faktörlerin önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Sinha AA, 2011). Pemfigus poligenik bir hastalıktır ve Pemfiguslu hastaların sağlıklı birinci derece akrabalarında düşük miktarda hastalıkla ilişkili otoantikor prevalansının arttığı bildirilmiştir (Torzecka JD ve ark, 2007). Ayrıca çevresel faktörlerin de önemli rol oynadığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Vaka kontrol çalışması olmasa da bazı ilaçların, özellikle penisilinamin (metal şelatlama maddesi) ve kaptopril (anjyotensin dönüştüren enzim inhibitörü) gibi tiyol grubu içerenler, keratinosit zarının biyokimyasını veya bağışıklık dengesini engelleyebildiği ve bu nedenle akantolizi teşvik edebildiği gösterilmiştir. Araştırılan diğer çevresel faktörler arasında virüsler (herpes simpleks virüsü gibi), diyet faktörleri, fizyolojik ve psikolojik stres etkenler yer almaktadır (Ruocco V ve ark, 2013).

4.1.5. Pemphigus Vulgaris Patogenezi

Profesyonel antijen sunucu hücreler olarak tanımlanan dendritik hücreler, desmoglein peptit yapılarını antijen olarak tanır, yakalar ve lenfoid dokularda naif T hücrelerine sunmak üzere göç eder. Desmogleine özgü gelişen CD4⁺ T hücreler Th2 yönünde gelişim göstererek humoral immün yanıt oluşumuna sebep olurlar. Desmogleine özgü CD4⁺ T hücreleri IL-10 ve IFN- γ üretebilirler. IFN- γ , Th2 hücre gelişimini baskılama potansiyeline sahip bir sitokindir. Aynı şekilde IL-10 da Th2 hücre aktivitesini baskılamada önemli bir aracı sitokindir. Özellikle IL-4 sitokini aracılığıyla desmogleine özgü B hücrelerin gelişimi desteklenir ve plazma hücrelerine dönüşen bu B hücrelerden IgG tipi otoantikorlar sentezlenir. Oluşan bu otoantikorlar akantolizize (hücresel olarak ayrışma) neden olur (Kasperkiewicz M.

Ve ark.,2017). Cilt ve mukozada meydana gelen bu ayrışma sonucunda kabarcıklı ve lezyonlu doku oluşumu gözlenir.



Şekil 1. PV hastalarında immün yanıtların gösterimi (Kasperkiewicz M. Ve ark.,2017)

4.1.6. Pemphigus Vulgaris Mevcut Tedavi Seçenekleri

PV terapilerin çoğu, doğrudan veya genelleştirilmiş immün baskılama yoluyla serum otoantikorlarının azaltılmasını ve semptomların iyileştirmesini amaçlar. Tedavi için sistemik kortikosteroidler, çeşitli immün baskılayıcı yardımcı ilaçlar (Mycophenolate mofetil ve azathioprine vb.), Rituximab (CD20 + B hücrelerini hedef alan monoklonal bir antiCD20 antikoru) veya başka bir yardımcı tedavi olan intravenöz immünglobulin uygulaması gibi seçenekler uygulanır (Kasperkiewicz M. Ve ark, 2017).

4.2. Kök Hücreler

Kök hücreler kendini yenileme ve özelleşmiş hücrelere dönüşebilme yeteneğinde olan farklılaşmamış hücrelerdir. Uygun koşullar altında uyarılarak bir veya birden farklı hücre tipine dönüşebilme yeteneğindedir (Spangrude, 2003). Kök hücreler farklılaşma potansiyeline göre; totipotent, pluripotent ve multipotent olarak üç grupta sınıflandırılırlar. Totipotent kök

hücreler bir organizmayı oluşturabilecek kadar farklılaşma yeteneğindeki hücrelerdir. Pluripotent kök hücreler, embriyonik dokuların dışında bir organizmanın tüm germ tabakalarında her hücresinin oluşmasına neden olabilir. Multipotent kök hücreler, yetişkin kök hücrelerdir ve kısıtlı sayıda hücre tipine farklılaşabilir. Multipotent hücreler inflamasyon veya travma sonucunda hasarlanmış dokuya göç edip orada inflamasyonu baskılama veya doku onarımını sağlama yetenekleri ile çok önemli özelliklere sahiptir (Marta ve ark., 2015). Multipotent kök hücreler aynı zamanda mezenkimal kök hücreler veya yetişkin kök hücreler olarak adlandırılır.

Birçok inflamatuvar hastalığın, nörodejeneratif hastalıkların ve doku hasarının tedavisinde multipotent kök hücreler kullanılmaktadır (Joyce ve ark., 2010). Uluslararası Hücrel Tedavi Derneği (ISCT)'nin kriterlerine göre bir hücreyi, kök hücre olarak tanımlamak için şu özellikleri taşıması gerekir; 1) Kendini yenileyebilmeli, 2) Plastik yüzeylere yapışabilmeli, 3) Osteojenik, Kondrojenik ve Adipojenik soylara farklılaşabilmeli, 4) Yüzeyinde CD29, CD73, CD90, CD105 gibi adezyon moleküllerini ifade etmeli, CD14, CD34, CD45 ve HLA-DR'i ifade etmemelidir.

4.2.1. Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücreler (MKH) embriyonik kök hücrelere göre daha az farklılaşma yeteneğindedirler (Fuchs ve ark., 2004). Mezenkimal kök hücreler kemik iliği, adipoz doku, kordon (wharton's jelly), kas dokusu, karaciğer, sinir doku, deri ve dental dokular gibi birçok dokudan elde edilebilen multipotent hücrelerdir (Maleki ve ark., 2014). Bu dokulardan mezenkimal kök hücreler izole edilebilir ve çoğaltılabilir (Prentice, 2004). Mezenkimal kök hücrelerin çoğalma ve farklılaşma yetenekleri klinik uygulamalarda kullanılabilir olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmalarda bu hücrelerin inflamatuvar hastalıklarda anti-inflamatuvar etkisinden ve doku rejenerasyonu yeteneğinden dolayı tedavi edici etkileri gösterilmiştir (Wei ve ark., 2013). Yapılan bir çalışmada MKH'lerin yüzeyindeki CXCR4 reseptör ifadesini artırarak, inflamasyon bölgesine veya hasarlanmanın olduğu alana göç eder ve yerleşir. Bu mekanizmayla sadece hasarlanmış dokuyu hedef aldığı, sağlıklı dokuya yerleşmediği gösterilmiştir (Shi ve ark., 2007). Mezenkimal kök hücreler yüzeyinde majör histokompatibilite kompleksi (MHC)- Sınıf I molekülünü ifade eder, ancak MHC-Sınıf II'yi ifade etmezler (Tse ve ark., 2003). Bu nedenle otolog kullanımın yanı sıra allojenik kullanımda doku reddi oluşturmeyen hipoiimmünojenik hücrelerdir (Szade K., ve ark., 2011).

4.2.2. Diş Folikülü Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler

Gelişmekte olan diş saran Mezenkimal doku diş folikülü olarak adlandırılır. Diş gelişimi süresince, sement, periodontal ligament, alveolar kemik hücreleri dental folikül kök hücreleri tarafından oluşturulur. Dental kaynaklı MKH'lerin doku rejenerasyonu ve otoimmün hastalıklarda lenfosit yanıtlarını düzenleyici etkileri bildirilmiştir (Mareschi ve ark., 2016). Dental dokular içinde en fazla mezenkimal kök hücre kaynağı olan dokular dental folikül ve periodontal ligamenttir.

Dental folikül hücreleri diğer dokulardaki mezenkimal kök hücrelere oranla çoğalma sayısı yüksek ve kemik, kıkırdak, yağ, nöral hücreler gibi birçok hücre grubuna farklılaşma yeteneğindedir (Suchánek J. ve ark., 2007). Ayrıca dental doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin lenfositlerle birlikte kültürüyle yapılan karşılaştırmalı analizlerinde insan süt dişi, dental pulpa ve dental folikül kaynaklı mezenkimal kök hücreler arasında DF-MKH'lerin immünomodülasyonu en iyi gerçekleştiren hücre grubu olduğu belirtilmiştir (Yildirim ve ark., 2016). Kolay ulaşılabilir olması, ek bir cerrahi işleme gerek kalmadan diş çekim sürecinde elde edilebilir olması, telomeraz aktivitesinin ve kültürde çoğalma potansiyellerinin diğer hücre gruplarına göre yüksek olması bu hücreleri avantajlı kılmaktadır (Yokoi ve ark., 2007).

DF-MKH'ler yüzeylerinde kök hücre yüzey belirteçleri olan CD73, CD90, CD146, CD44, CD105 ifade ederler. Hematopoietik belirteçler olan CD14, CD34, CD45 ve HLA-DR'yi ifade etmezler. Osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşmanın yanı sıra nöral farklılaşmayı da gerçekleştirebilmektedir. DF-MKH; transkripsiyon faktörleri olan RUNX2, NANOG, Nestin gibi embriyonik belirteçleri de ifade etmektedir (Hakki ve ark., 2015). Bu özellikleriyle birçok soya farklılaşabilmeleri, canlılıklarının yüksek olması ve güvenilir şekilde dondurulmalarından dolayı doku rejenerasyonunda kullanılabilecekleri belirtilmiştir (Mori ve ark., 2012).

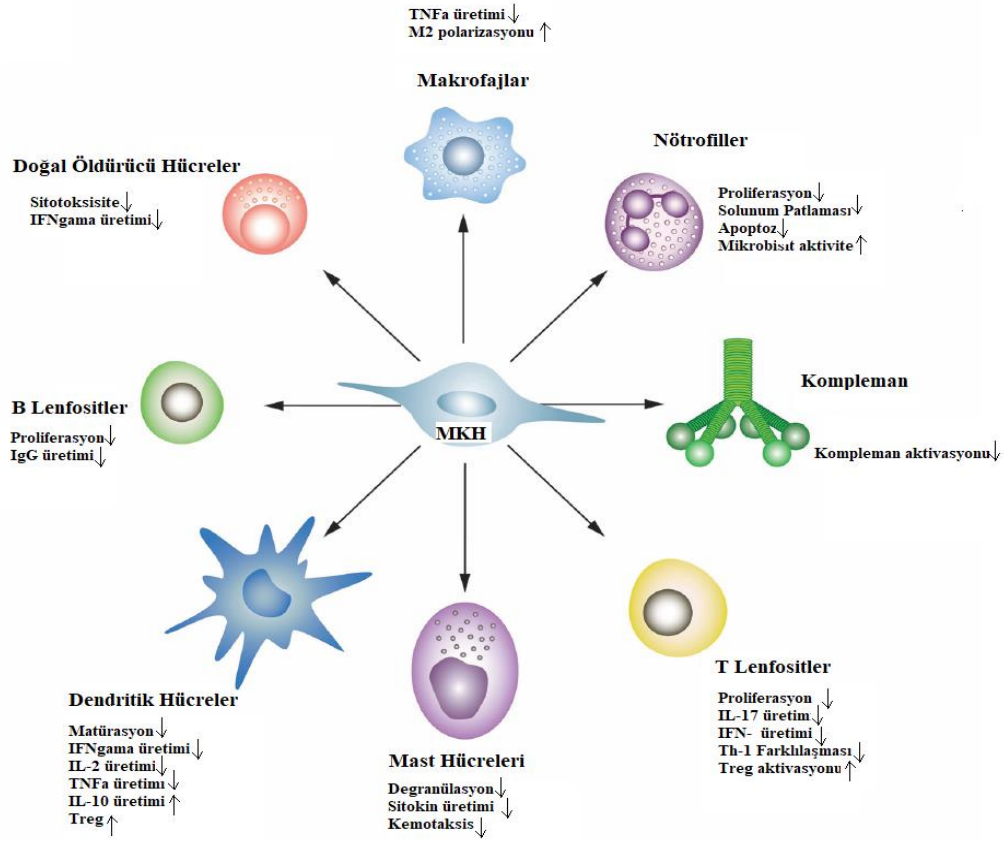
4.2.3. Mezenkimal Kök Hücreler ve İmmünomodülasyon

Son yıllarda yapılan çalışmalarda mezenkimal kök hücrelerin doku rejenerasyonu için önemli bir araç olarak kabul edilir. Neredeyse tüm diş dokularında, MKH benzeri hücre popülasyonu bulunmaktadır. Farklı hücre tiplerine farklılaşma yeteneklerinin yanı sıra, dental MKH'ler ayrıca güçlü immünomodülatör özelliklere sahiptir. Dental MKH'ler hem doğal

hem de edinsel immün yanıtı modüle eder ve immün sistemin hemen hemen tüm bileşenlerinin aktivitesini etkiler. Dental MKH' ler ve immün sistem arasındaki etkileşim kar ılıklıdır. MKH' lerin immünomodülatör aktivitesi, immün hücreler tarafından üretilen sitokinler tarafından güçlü bir şekilde düzenlenir Mezenkimal kök hücreler inflamatuvar yanıtlar esnasında immün sistem hücreleri tarafından salgılanan sitokinlere (IL-1 , IL-6, TNF- , IFN-  gibi) yanıt olarak anti-inflamatuvar mediatörler sekrete ederler.

MKH' lerin, T hücrelerinin aracılık ettiği immün yanıtı modüle ederek T hücrelerinin aktivasyonunu, çoğalmasını ve farklılaşmasını etkilediği zaten bilinmektedir. MKH' ler, CD4⁺ T yardımcı ve CD8⁺ sitotoksik T hücreleri de dahil olmak üzere T hücresi proliferasyonunun güçlü baskılayıcılarıdır. MKH' ler bu baskılayıcı etkisini, IFN-  sekrete ederek arttırır. Ayrıca MKH' ler CD4⁺ T yardımcı hücre farklılaşmasını, sitokin üretimini ve farklı CD4⁺ T yardımcı alt tipleri arasındaki dengeyi modüle eder. Dental pulpa kaynaklı MKH' lerde yapılan bir çalışmada T hücresi apoptozunun ind klendi i gösterilmiştir (Andrukhov O ve ark, 2018).

Son zamanlarda yapılan  alı malar, MKH' lerin immünomodülatör özelliklerinin doku rejeneratif kapasitelerinde de önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir. MKH' lerin immünomodülatör kapasiteleri dahil olmak üzere terapötik etkileri, immünomodülatör proteinlerin üretilmesi ve büyüme faktörleri dahil olmak üzere tropik aktiviteleri ile büyük ölçüde açıklanmaktadır. Özetle, dental MSC'ler sağlıklı ve hastalıklı koşullar altında doku homeostazında önemli bir rol oynar.



Şekil 2. MKH' lerin immün düzenleyici etkilerinin gösterimi (Andrukhov O ve ark, 2018)

5. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Klinik Araştırma Etik Kurulu' nun 06.04.2018 tarih ve 09.2018.330 sayılı protokol kodu ile çalışma izni onaylandı. Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü' nün 14.05.2018 tarih ve 15342631-302.14.04-E.1800135339 sayılı yazısı ile tez uygunluğu onaylandı. Kök hücre izolasyonu için diş foliküllerinin temini Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Çene Cerrahisi Bölümü' nde gerçekleştirildi, kök hücre izolasyonu, immünolojik çalışmalar ve analizler Marmara Üniversitesi Hastanesi Çocuk Allerji ve İmmünoloji Laboratuvarı' nda gerçekleştirildi.

5.1. Çalışma Planının Özeti

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

1. Dental Folikül dokusundan mezenkimal kök hücre izolasyonu, karakterizasyonu ve

farklılaştırma çalışmaları yapıldı,

2. DF-MKH varlığında ve yokluğunda PV hastaları ve sağlıklı bireylerin venöz kanından elde edilen periferik kan mononükleer hücrelerinin 72 saatlik kültürleri sonrasında; T lenfositlerin proliferasyon, Apoptoz (Annexin/PI), Treg hücre oranları ve dentritik hücrelerin kositümülasyon molekül ekspresyonları analiz edildi.

3. DF-MKH varlığında ve yokluğunda PV hastaları ve sağlıklı bireylerin venöz kanından elde edilen periferik kan mononükleer hücre kültür süpernatantlarından Desmoglein-1 ve Desmoglein-3 antikor düzeyleri ve sitokin profili analiz edildi.

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

PV hastaları ve sağlıklı bireyler Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Dermatoloji polikliniğine başvuran takipli hastalar arasından doktor kontrolünde seçilmiştir. Hastalardan venöz kan alımı için onam formları etik kurul gerekenlerine uygun şekilde açıklama yaparak onaylatıldı.

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

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

5.2. Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar

- DPBS (Ca⁺⁺ Mg⁺⁺-free- Gibco, Grand Island, USA; 1419094)
- Penicillin/streptomycin (Gibco, Grand Island, USA; 15140122)
- DMEM (Gibco, Grand Island, USA; 31885023)
- RPMI (Gibco, Grand Island, USA; 21875034)

- Fötal sığır serumu (FBS; Gibco, Grand Island, USA; 10500064)
- Tip I kollajenaz (Gibco, Grand Island, USA; 17100017)
- %0,25 tripsin-EDTA solüsyonu (Gibco, Grand Island, USA; 25200056)
- %0,5 tripan mavisi solüsyonu (Gibco, Grand Island, USA; 15250061)
- DMSO (WAK-Chemie Medical GmbH, Germany; USP090522A)
- CFSE Cell Proliferation Kit for Flow Cytometry (Invitrogen, Grand Island, USA; C34554)
- Annexin-PI Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences, USA; 556547)
- Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio-Sciences UK; 17144003)
- Anti CD3 (Thermo Fisher; Lot:1650287B)
- Anti CD28 (Thermo Fisher; Lot:1682263B)
- CD90 PE (BD Biosciences, USA; 562385)
- CD146 FITC (BD Biosciences, USA; 560846)
- CD73 PE (BD Biosciences, USA; 550257)
- CD29 APC (BD Biosciences, USA; 559883)
- CD105 PE (BD Biosciences, USA; 560839)
- CD28 PE (BD Biosciences, USA; 562323)
- CD14 PE (BD Biosciences, USA; 342408)
- CD45 KrO (Beckman Coulter, Fr; B36294)
- CD3 FITC (Beckman Coulter, Fr; A07746)
- CD4 APC Alexa Flour A700 (Beckman Coulter, Fr; B10824)
- CD8 PC7 (Beckman Coulter, Fr; 737918-AB)
- CD19 APC Alexa Flour A750 (Beckman Coulter, Fr; A94681)
- CD20 PB (Beckman Coulter, Fr; A74777)
- CD16 PE (Beckman Coulter, Fr; A07766)
- CD56 PC5.5 (Beckman Coulter, Fr; A79388)
- CD80 APC Alexa Flour A750 (Beckman Coulter, Fr; B30643)
- CD83 FITC (Beckman Coulter, Fr; IM2410U)
- CD86 PE (Beckman Coulter, Fr; IM2729U)
- CD11c PC7 (Beckman Coulter, Fr; A80249)
- HLA-DR APC (Beckman Coulter, Fr; IM3635)
- CD45RA FITC (BD Biosciences, USA; 5554888)
- CD197 PE (CCR7) (BD Biosciences, USA; 580765)

- 10x Phosphate Buffered Saline (PBS), 1L (Bio-Rad; 1610780)
- Human FoxP3 Buffer Set (BD Biosciences, USA; 560098)
- Human FoxP3 PE (BD Biosciences, USA; 560046)
- APC mouse anti-human CD25 (BD Biosciences, USA; 555434)
- FITC mouse anti-human CD4 (BD Biosciences, USA; 555346)
- Human IL-10 ELISA Kit (BT-LAB, China, E0102Hu)
- Human IL-4 ELISA Kit (BT-LAB, China, E0092Hu)
- Human IFN- γ ELISA Kit (BT-LAB, China, E0105Hu)
- Human TNF- α ELISA Kit (BT-LAB, China, E0082Hu)
- Human Desmogleins 1 ELISA Kit (BT-LAB, China, E0729Hu)
- Human Desmogleins 3 ELISA Kit (BT-LAB, China, E4590Hu)
- Osteojenik Farklılaşma Kiti (Mesencult Human Osteojenik Differentiation Kit) (Stemcell Technologies, USA; 05465)
- Adipojenik Farklılaşma Kiti (Mesencult Human Adipogenesis Differentiation Kit) (Stemcell Technologies, USA; 05412)
- Kondrojenik Farklılaşma Kiti (Mesencult Human Chondrogenesis Differentiation Kit) (Stemcell Technologies, USA; 05455)
- Oil red O (Sigma-Aldrich, USA; O0625-100G)
- Alizarin Red (Sigma-Aldrich, USA; A5533-25G)
- Alcian Blue (Sigma-Aldrich, USA; A5268-10G)

5.3. Çalışmada Kullanılan Hücre Kültürü Malzemeleri

- Steril pensler ve bistüri uçları
- 0,22 μ m filtre (Sartorius, Goettingen, Germany; 16534)
- Heparinli kan alma tüpü (Yeşil kapaklı) (Hongyu Medical, China; 131211)
- EDTA'lı kan alma tüpü (Mor kapaklı)
- 15 ml konik, kapaklı tüp (BD Biosciences Discovery Labware, CT, USA; 352096)
- 50 ml konik, kapaklı tüp (BD Biosciences Discovery Labware, CT, USA; 352098)
- 25cm²' lik flask (BD Biosciences Labware, Le Pont De Claix, France; 353108)
- 75cm²' lik flask (BD Biosciences Labware, Le Pont De Claix, France; 353110)
- 6 kuyucuklu plaklar (BD Biosciences Discovery Labware, USA; 353046)
- 48 kuyucuklu plaklar (Nest Biotech, China, 20140010415A)

- 5 ml Polystyrene tube (BD Biosciences, USA; 352052)
- Tip I kollajen kaplı lameller (BD Biosciences Discovery Labware, USA; 354089)
- 3 ml' lik steril pastör pipeti (Citotest Labware Manufacturing, London; 31027003US)
- 3' er ml' lik vial (Kriyotüp) (Granier Bio-One GmbH; E090901J)
- Şarjlı pipet pompası (IsoLab, Germany)
- 2 µl- 20 µl' lik otomatik pipet (Axygen Scientific, USA)
- 20 µl-200 µl' lik otomatik pipet (Axygen Scientific, USA)
- 100 µl- 1000 µl' lik otomatik pipet (Axygen Scientific, USA)
- Thoma lamı (Marienfeld, Germany; 06.407.10)
- Lamel (22x22mm)
- Buz kalıpları
- %70 alkol
- Steril distile su
- Steril pudrasız cerrahi eldiveni

5.4. Kullanılan Cihazlar

- CO₂ İnkübatörü (Thermo Series II Water Jacket)
- CO₂ Tüpü (Habaş)
- İnvrt Mikroskop (EVOS AMG)
- Binoküler Araştırma Mikroskobu (Olympus BH2-RFCA)
- Steril Kabin (Biosafety Cabinet Class II Tip)
- Buzdolabı (+4 °C Uğur USS1000)
- Derin Dondurucu (-20 °C Regal LF 2102 A+)
- Santrifüj (Beckman Coulter Allegra X-22)
- Hassas Terazı (Chyo JL-200)
- Mikropipet Seti (Thermo)
- Vorteks (DLAB,MX-F)
- Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı (Janke&Kunkelika IKAMAG RH)
- Rotator (Miltenyi Biotec MACSmix)
- Su Banyosu (Techne TE-10A DIKLM)
- Akan Hücre Ölçer (Beckman Coulter – Naviox EX)
- Işık Mikroskobu (Olympus BX53)

5.5. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

5.5.1. DF-MKH' ler İçin Besiyerinin Hazırlanması

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

5.5.2. Lenfosit Kültürleri için Besiyerinin Hazırlanması

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

5.5.3 Kök Hücre Dondurma Solüsyonunun Hazırlanması

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

5.5.4. PBS Solüsyonunun Hazırlanması

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

5.5.5. CDmix Uyarımı İçin antiCD3 ve antiCD28 Stok Solüsyonların Hazırlanması

Anti CD3 vial konsantrasyonu 100 µg /100 µl olarak bulunmaktadır. Bu vial 900 µl RPMI ilave edildi ve konsantrasyonu 100 µg/ml olan stok solüsyon hazırlandı. Stok solüsyon

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

5.5.6. Kollajenaz Solüsyonunun Hazırlanması

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

5.5.7. Osteojenik Stimülasyon Besiyerinin Hazırlanması

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

5.5.8. Kondrojenik Stimülasyon Besiyerinin Hazırlanması

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

5.5.9. Adipojenik Stimülasyon Besiyerinin Hazırlanması

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

5.5.10. Lizat Solüsyonunun Hazırlanması

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

5.5.11. Alizarin Red Solüsyonunun Hazırlanması

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

5.5.12. Oil Red Solüsyonunun Hazırlanması

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

5.5.13. Alcian Blue Solüsyonunun Hazırlanması

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

5.6. Çalışma Planı

5.6.1. Dış folikülü kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu

5.6.2. İzole edilen hücrelerin pasajlanması

5.6.3. İzole edilen kök hücrelerin karakterizasyonu

5.6.4. İzole edilen kök hücrelerin farklılaştırılması

5.6.4.1. İzole edilen kök hücrelerin osteojenik farklılaştırılması

5.6.4.2. İzole edilen kök hücrelerin adipojenik farklılaştırılması

5.6.4.3. İzole edilen kök hücrelerin kondrojenik farklılaştırılması

5.6.5. Kök hücrelerin 48 kuyucuklu kültür plaklarına ekilmesi

5.6.6. Mononükleer hücre kültürlerinin yapılması

5.6.6.1. PV hastası ve sağlıklı bireylerin seçimi

5.6.6.2. PV hastası ve sağlıklı bireylerden alınan venöz kandan mononükleer hücre izolasyonu

5.6.6.3. Lenfositlerin proliferasyon analizi için CFSE ile işaretlenmesi

5.6.6.4. Kök hücre varlığında ve yokluğunda lenfosit kültürünün yapılması

5.6.7. Analizler

5.6.7.1. CD4+ T Lenfositlerin proliferasyon analizi

- 5.6.7.2. CD4+CD25+FoxP3+ Tregülatör hücre analizi
- 5.6.7.3. CD4+ T Lenfositlerin Annexin/PI ile apoptoz oranlarının analizi
- 5.6.7.4. CD4+ Naif, Efektör Bellek ve Merkez Bellek T hücre Oranlarının Analizi
- 5.6.7.5. Antijen sunucu hücrelerde kostimülatör molekül ekspresyonu analizi
- 5.6.7.6. Hücre kültür süpernatantlarında sitokin tayini
- 5.6.7.7. Hücre Kültür Süpernatantlarında Otoantikor Miktarının Tayini
- 5.6.8. İstatistiksel analiz

5.6.1. Diş Folikülü Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu

Diş çekimi sonrasında folikül dokusu %1 penisilin/streptomisin içeren PBS solüsyonuna aktarıldı. Transport solüsyonu içindeki doku örneği buz kalıpları içerisinde, çalışmanın gerçekleştirileceği Marmara Üniversitesi Çocuk İmmünoloji Laboratuvarı'na getirildi. Tam gömük yirmi yaş dişi çekim işlemi ile alınan dişi saran folikül dokusu %1 penisilin/streptomisin içeren PBS ile yıkanıp doku üstündeki kan ve diş parçaları temizlendi. Folikül doku bistüri ile 0,5 mm ve daha küçük parçalara bölündü. Parçalanmış folikül dokusu yaklaşık 80 mg doku için 15 ml falkon tüpte bulunan 37°C sıcaklığa ısıtılmış 4 ml'lik kollajenaz tip I solüsyonu içinde aktarıldı ve pastör pipetiyle homojenize edildi. Doku ve kollajenaz solüsyonunu içeren falkon tüp 37°C inkübatörde 45 dk bekletildi. Her 5-10 dk aralıkla tüp yavaşça çalkalanarak enzimatik yıkımın kolaylaşması sağlandı. Folikül dokusu enzimatik yıkımın ardından hücre süspansiyonu haline geldiğinde inkübatörden alınıp pipetaj işlemi yapıldı. Folikül hücreleri PBS ile yıkanıp 1200 rpm' de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler tekrar PBS ile yıkanıp 1200 rpm' de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler 5 ml cDMEM besiyeri ile tekrar süspanse edilip filtreli kapaklı 25 cm²' lik flakslara (T-25) transfer edilip 37°C, %5 CO₂ inkübatörde kültür edildi. Hücrelerin her 2-3 günde bir kültür medyumunu taze hazırlanarak değiştirildi ve hücrelerin çoğalması, flask tabanına yayılması sağlandı.

5.6.2. İzole Edilen Hücrelerin Pasajlanması

T-25 flakslar içerisinde ilk kültürü yapılan ve 37°C, %5 CO₂ inkübatörde bulunan hücreler her 2-3 günde bir invert mikroskopta hücre yayılımı için incelendi. Yaklaşık 7-10 gün sonrasında hücreler flask tabanında yaklaşık %70-80 yayılım gösterdiğinde pasaj işlemi

yapıldı. Dokudan elde edilen ilk kültür sıfırıncı pasaj (P0) kabul edilerek, birinci kültürü takip eden her kültür işlemi sonrası pasaj sayıları P1, P2, P3 şeklinde belirtildi. Pasaj işlemi; laminar hava akımlı aseptik kabin içerisinde flasklardaki hücre medyumunu pipet yardımıyla uzaklaştırıldı ve flasklara 5 ml PBS konulup flask tabanı bu solüsyonla yıkandı. PBS pipetle flask tabanından çekilip atıldıktan sonra 500 µl %0,25 Trypsin-EDTA eklendi ve 37°C inkübatörde 4 dakika bekletildi. 4 dakikanın sonunda flask içindeki tripsinin inaktivasyonu için 5 ml cDMEM eklenip flask içerisindeki sıvı 15 ml'lik konik kapaklı tüplere aktarıldı. 1200 rpm' de 5 dk santrifüj yapıldı, santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler tekrar cDMEM ile yıkanıp, santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve 1 ml cDMEM eklenip pipetajla hücre süspansiyonu haline getirildi. Hücre süspansiyonundan 10µl alınıp 0,5 ml'lik ependof tüpe aktarıldı ve üzerine 10µl tripan mavisi solüsyonu eklendi. Homojenizasyon sağlandıktan sonra hücre sayımı yapıldı. Hücre sayımı için thoma lamı kullanıldı. Thoma lamı düz bir zemin üzerine alınarak sayım yapılacak alan üzerine lamel kapatıldı. Hazırlanıp eppendorfa konulan süspansiyondan 10 µl alınarak thoma lamının sayım yapılacak alanına pipet ile yavaşça hücre süspansiyonu pipetlendi. Hücreler ışık mikroskopunda, 40X büyütmede sayıldı. Sayım sonucunda thoma lamının sayım alanında sayılan hücre sayısı, seyreltme oranı (2) ve hacim sabiti 104 (0,1 mm³ deki sayım) ile çarpılarak 1 ml solüsyon içindeki toplam hücre miktarı hesaplandı. Hücre sayımının ardından 5x10⁵ hücre 10 ml cDMEM ile süspanse edilerek 75 cm²' lik flasklara (T-75) ekilip 37°C'de %5 CO₂ inkübatörde kültüre edildi. Her 2-3 günde bir hücre besiyeri taze hazırlanarak değiştirildi. Kültür flasksının tabanında %70-80 yayılım gösteren hücreler tekrar pasaj alınmak üzere yukarıda belirtilen işlemler sırasıyla gerçekleştirildi. Hücre kültürü üçüncü pasaja kadar devam edildi.

5.6.3. İzole Edilen Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

İzole edilen ve pasajlanarak çoğaltılan hücrelerin morfolojisi invert mikroskopta incelendi. Fibroblast benzeri yapıda olan ve flask tabanına yapışan hücreler üçüncü pasaj sonunda flask tabanından cDMEM besiyeri tamamen çekilip atıldı. Flask tabanına 5 ml PBS solüsyonu eklendi, yıkama işleminden sonra solüsyonun tamamı çekilip atıldı. Flask tabanına %0,25 tripsin-EDTA solüsyonu eklenip 37°C inkübatörde 4 dakika bekletildi. 4 dakikanın sonunda flask içindeki tripsinin inaktivasyonu için 5 ml cDMEM eklenip flask içerisindeki sıvı 15 ml'lik konik kapaklı tüplere aktarıldı. 1200 rpm' de 5 dk santrifüj yapıldı, santrifüj

sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler 1000 µl PBS ile süspansiyon edilip bu süspansiyondan 3 adet akım sitometri tüpünün her birine 100 µl immünojenotipleme analizi için aktarıldı. Akım sitometri tüpünde bulunan PBS içindeki hücre süspansiyonu santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve dipte kalan hücreler 100 µl PBS ile süspansiyon edilip her bir tüpe belirlenen antikorlar eklendi. Birinci tüp Ig izotip antikorunun bulunduğu tüp olarak belirlendi, ikinci tüpteki hücre süspansiyonuna kök hücre pozitif belirteçlerin analizi için antiCD73 (PE), antiCD90 (FITC), antiCD105 (PerCp) ve antiCD146 (APC) antikorlarının her birinden 10 µl eklendi, üçüncü tüpe kök hücreler için negatif belirteçlerin analizi için antiCD45 (PerCp), antiCD14 (FITC), antiCD34 (PE) ve antiHLA-DR (APC) antikorlarının her birinden 10 µl eklenerek tüpler 15 dk oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda hücrelerin üzerine 1000 µl PBS eklenerek 1500 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Süpernatant atıldı, dipte kalan hücreler 500 µl PBS ile tekrar süspansiyon edilip immünojenotipik özelliklerinin belirlenmesi için akım sitometri cihazında yüzey belirteçleri analiz edildi. Hücre yüzeyinde kök hücre belirteçlerinin pozitiflik oranı %95'in üzerinde olan ve negatiflik oranı %5'in altında olan hücre gruplarından 1 milyon hücre ayrılarak farklılaşma kapasitelerinin belirlenmesi için osteojenik adipojenik ve kondrojenik olarak farklılaştırıldı.

5.6.4. İzole Edilen Kök Hücrelerin Farklılaştırılması

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

5.6.4.1. İzole Edilen Kök Hücrelerin Osteojenik Farklılaştırılması

Osteojenik farklılaşma için 6 kuyucuklu plakların her bir kuyusuna tip I kollajen kaplı steril lameller yerleştirildi. Tip I kollajen kaplı lamellerin her birinin üzerine üçüncü pasajdaki 2x10⁵ hücre ekildi. Hücrelerin üzerlerine ilk ekim yapılan gün cDMEM besiyeri eklendi ve 48 saat süreyle lamel yüzeyine yayılması sağlandı. 48 saat sonunda lamel yüzeyinde %90-100 yayılıma ulaşan hücrelerin üzerindeki kültür sıvısı çekilip atıldı ve üzerine 2 ml osteojenik farklılaştırma besiyeri eklendi ve 37°C %5 CO₂ inkübatörde 2 gün arayla besiyerleri

değiştirilerek 21 gün süreyle kültüre edildi. 21 gün sonunda hücreler ve oluşturdıkları kolonilerin osteojenik farklılaşmayı sağlayıp sağlamadıkları invert mikroskopta değerlendirildi. Osteojenik farklılaşmanın belirlenmesi için lamele yapışan hücreler Alizarin kırmızısı solüsyonuyla boyanarak mikroskopta incelendi. Bunun için önce lamele yapışan hücrelerin üzerinden kültür besiyeri çekilip üzerine PBS solüsyonu eklenerek yıkama işlemi yapıldı. PBS atıldı ve lamele yapışan hücrelerin üzerine 1000 µl %10 formaldehit solüsyonu eklendi. 30 dk %10 formaldehit ile fikse edilen hücreler süre sonunda önce 1000 µl distile suyla yıkandı, distile su atıldı ve üzerine 1000 µl PBS eklendi. PBS ile yıkama işleminin ardından PBS uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine 1000 µl Alizarin kırmızısı boyası eklendi ve 45 dk. oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi. 45 dakika sonra boya hücrelerin üzerinden uzaklaştırıldı ve distile su ile iki kez yıkandı. Lamel kültür kuyusundan alınarak lam üzerine kapatıldı ve ışık mikroskobunda 10X ve 20X büyütmede doku bütünlüğü, kalsiyum fosfat birikimlerinin varlığı incelendi.

5.6.4.2. İzole Edilen Kök Hücrelerin Adipojenik Farklılaştırılması

Adipojenik farklılaşma için 6 kuyucuklu plakların her bir kuyusuna tip I kollajen kaplı steril lameller yerleştirildi. Tip I kollajen kaplı lamellerin her birinin üzerine üçüncü pasajdaki 2x10⁵ hücre ekildi. Hücrelerin üzerlerine ilk ekim yapılan gün cDMEM besiyeri eklendi ve 48 saat süreyle lamel yüzeyine yayılması sağlandı. 48 saat sonunda lamel yüzeyinde %90-100 yayılıma ulaşan hücrelerin üzerindeki kültür sıvısı çekilip atıldı ve üzerine 2 ml adipojenik farklılaştırma besiyeri eklendi ve 37°C %5 CO₂ inkübatörde 2 gün arayla besiyerleri değiştirilerek 14-21 gün süreyle kültüre edildi. Kültür süresinin sonunda hücrelerdeki adipositlerin ve kolonilerin oluşumu invert mikroskopta değerlendirildi. Adipojenik farklılaşmanın belirlenmesi için lamele yapışan hücrelerde yağ damlalarını boyayan Oil kırmızı solüsyonuyla boyanarak mikroskopta incelendi. Bunun için önce lamele yapışan hücrelerin üzerinden kültür besiyeri çekilip üzerine PBS solüsyonu eklenerek yıkama işlemi yapıldı. PBS atıldı ve lamele yapışan hücrelerin üzerine 1000 µl %10 formaldehit solüsyonu eklendi. 30 dk %10 formaldehit ile fikse edilen hücreler süre sonunda önce 1000 µl distile suyla yıkandı, distile su atıldı ve üzerine 1000 µl PBS eklendi. PBS ile yıkama işleminin ardından PBS uzaklaştırıldı. Kuyulara 1000 µl %60' lık izopropanol eklendi ve 5 dakika boyunca inkübe edildi. İzopropanol kuyulardan alındı ve kuyulara 1000 ml "Oil red O" solüsyonu eklendi. Karanlıkta oda sıcaklığında 45 dakika boyunca inkübe edildikten sonra Oil

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

5.6.4.3. İzole Edilen Kök Hücrelerin Kondrojenik Farklılaştırılması

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

5.6.5. Kök Hücrelerin 48 Kuyucuklu Kültür Plaklarına Ekilmesi

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

kuyu tabanına yapışması sağlandı.

5.6.6. Mononükleer Hücre Kültürlerinin Yapılması

5.6.6.1 PV Hastası ve Sağlıklı Bireylerin Seçimi

Bu tez çalışmasında, çalışmaya dahil edilen tüm bireylere, “Gönüllü Bilgilendirme Formu” okutuldu ve “Gönüllü Onam Formu” ile onayları alındı. PV hastaları Marmara Üniversitesi Hastanesi Dermatoloji polikliniğine başvuran gönüllüler arasından seçilmiştir.

PV hastalarının çalışmaya dahil edilme kriterleri:

- 18 yaş üstü gönüllü olmak
- Aktif lezyonu olması
- Ek otoimmün veya dermatolojik hastalığı olmayan

PV hastalarının çalışmaya dahil edilmeme kriterleri:

- 18 yaş altı olmak
- Aktif lezyonu olmaması
- Ek otoimmün veya dermatolojik hastalığa sahip olmak

Sağlıklı bireylerin çalışmaya dahil edilme kriterleri:

- Herhangi bir otoimmün veya dermatolojik hastalık hikayesi olmayan,
- Yaş ve cinsiyet uyumlu 18 yaş üstü olmak

Sağlıklı bireylerin çalışmaya dahil edilme kriterleri:

- Herhangi bir otoimmün veya dermatolojik hastalığa sahip olmak
- Yaş ve cinsiyet uyumlu olmamak.

5.6.6.2. PV Hastası ve Sağlıklı Bireylerden Alınan Venöz Kandan Mononükleer Hücre İzolasyonu

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

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

A; 16 büyük karede sayılan hücre sayısı, SF; tripan mavisi ile seyreltme faktörüdür. 10^4 ise thoma lamının 0,1 mm³ 'deki sayım sonucunu 1 ml' deki sayıya dönüştürmek için kullanılan sabittir.

5.6.6.3. Lenfositlerin Proliferasyon Analizi İçin CFSE ile İşaretlenmesi

Karboksifloresan süksinimidil ester (CFSE) hücre zarından geçebilen floresan bir

boyadır. Hücre membranına bağlandıktan sonra esteraz aktivitesinin gerçekleşmesi ile belirli bir dalga boyunda floresan ışığa çıkar. Böylece hücrelerin sitoplazmasının boyanması sağlanır. Eğer kültür süresi boyunca hücre çoğalması olursa her bölünmede bu işaretleyici yeni oluşan hücrelere aktarılır. Oluşan her yeni hücre bölünen hücrenin taşıdığı işaretleyicinin bir kısmını aldığı için proliferasyon sonucunda oluşan yeni jenerasyon hücreler analiz sonucunda CFSE ışımaya değeri azalarak gözlenir. Eğer proliferasyon olmadıysa hücre bölünmediği için CFSE ışımaya değeri değişmez, analizde tüm hücreler aynı alanda görülür. Lenfosit proliferasyonunu analiz etmek amacıyla hücre sayımından sonra izole edilen mononükleer hücrelerin bir kısmı CFSE ile işaretlenerek kültür edildi. CFSE boyası 25 mg'lık viallerde bulunmaktadır. Stok solüsyon hazırlamak için 25 mg CFSE vial 8.96 mL DMSO ile çözüldü ve 20 µl'lik karyoviallere bölündü. Bu stok solüsyon -20°C'de muhafaza edildi. 15 ml'lik falkonlarda bulunan ve CFSE işaretlenmesi için ayrılan hücrelerin üzerine 3 ml steril PBS eklendi, pipetaj yapıldı ve homojenize edildikten sonra 1500 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet üzerine 1ml steril PBS eklenip pipetaj yapıp homojenize edildi. Homojenize edildikten sonra falkon içerisine 2 µL stok CFSE eklendi ve pipetaj yapıldı. CFSE konulduktan sonra 12 dakika +4 C° de bekletildi. 12 dakika sonunda 7 ml steril PBS eklendi, pipetaj yapıldı ve 2000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı ve 7 ml hücre kültür solüsyonu eklenip tekrar 1500 rpm de 5 dakika santrifüjlendi. Son yıkama işleminden sonra 1 ml CRPMI eklenip hücre sayımı yapıldı.

5.6.6.4. Kök Hücre Varlığında ve Yokluğunda Lenfosit Kültürünün Yapılması

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

izole edilen mononükleer hücrelerin eklenmesiyle (0.saat) kültür süresi başlatıldı. Her bir kuyudaki DF-MKH:Mononükleer hücre oranı 1:10 (5x10⁴:5x10⁵) olarak belirlendi.

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

- **US:** Uyarımsız kuyulara antikor eklenmedi.

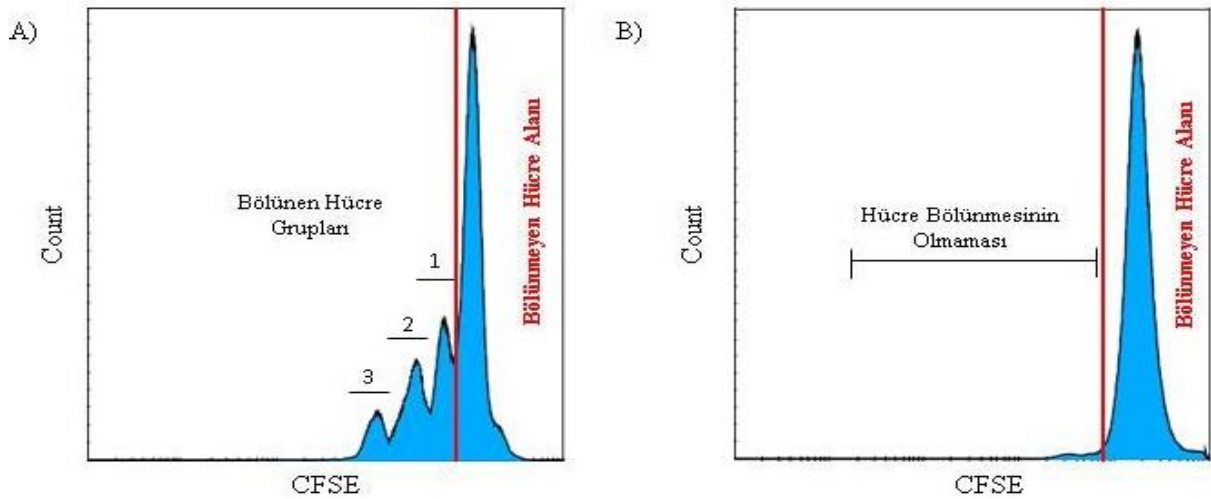
- **CDmix uyarımlı:** T lenfosit uyarımı için CDMix uyarımı olan kuyulara karışım olarak hazırlanan antiCD3/antiCD28 solüsyonundan 2,5 µl (1 µg/ml antiCD3 antikor ve 5 µg/ml antiCD28 antikor) eklendi.

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

5.6.7. Analizler

5.6.7.1. CD4 + T Lenfositlerin proliferasyon analizi

Mononükleer hücrelerin 72 saatlik kültür süresi sonunda CD4+ T hücre proliferasyonu akım sitometri cihazı ile analiz edildi. Kök hücrelerin hücre proliferasyonu üzerindeki etkisinin gösterilmesi amacıyla proliferasyon analizi yapıldı. İzole edilen ve kültür süresi tamamlanan mononükleer hücrelerin içindeki T lenfositlerin proliferasyonun takibi için kültürün 0. saatinde CFSE işaretlenerek 72 saat süreyle DF-MKH varlığında ve yokluğunda 37°C, %5 CO₂ inkübatörde kültürleri yapıldı. Kuyulara pipetaj yapılarak dipte kalan ve hücre kültür solüsyonu içindeki hücrelerin homojenize edilmesi sağlandı. Kuyulardaki besiyerleri alındı ve akım sitometri tüplerine konuldu. 1500 rpm' de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı ve dipteki pellet üzerine 2 ml hücre yıkama solüsyonu (PBS) eklendi ve 1500 rpm' de 5 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı ve dipteki hücre pelletine 100 µl PBS eklenip bu hücre süspansiyonuna antiCD3 ve antiCD4 antikorları eklenerek 15 dk karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda hücrelerin üzerine 2 ml PBS eklenerek 1500 rpm' de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı ve dipteki hücre pelletinin üzerine 500 µl hücre yıkama solüsyonu (akım sitometri cihazı için) eklenip pipetle süspanse edildikten sonra akım sitometri cihazında analiz edildi.

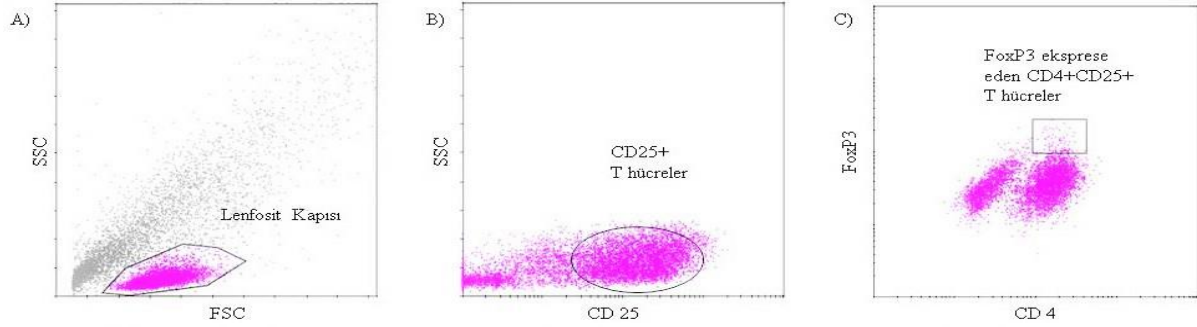


Şekil 3. CFSE işaretli hücrelerin akım sitometri cihazında analizi. A) her bölünen hücre sola doğru diğer nesillerin toplamı olarak analiz edilmektedir. Hücre her bölünmede bir önceki nesilden CFSE boyasının yarısını aldığı için proliferen (çoğalan) hücreler grafikte sola doğru ilerlemektedir. B) CFSE alanında sağda bulunan hücre grubuna ait pik bölünmeyen hücreleri ifade eder.

5.6.7.2. CD4+CD25+Foxp3+ T Regulator Hücre Analizi

Mononükleer hücrelerin 0.gün ve 72 saatlik kültür sonrasında CD4+CD25+FoxP3+ T regülatör hücre oranları analiz edildi. CD4+CD25+FoxP3+ T regülatör hücrelerin kök hücre varlığında ve yokluğundaki sayısal değişimlerinin incelenmesi için akım sitometri cihazında analiz edildi. Hücreler insan FoxP3 kitindeki protokole göre hazırlandı. Protokole göre; 500 µl'lik kültür kuyularına pipetaj yapılarak hücrelerin homojenize bir şekilde dağılması sağlandı ve bu homojenize sıvıdan 250 µl alınıp akım sitometri tüplerine aktarıldı. Hücrelerin aktarıldığı akım sitometri tüplerine 2 ml PBS eklendi ve 1500 rpm' de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırıldı ve tüplere 100 µl boyama tampon solüsyonu (1:10 oranında, 1 ml 10X permeabilization buffer, 9 ml hücre yıkama solüsyonu) eklendi. 10 µl antiCD4/antiCD25 antikoru eklenip vorteksle karıştırıldı ve 20 dakika boyunca oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi. Süre sonunda 2 ml boyama tampon solüsyonu eklendi ve 1500 rpm devirde 5 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve 2 ml FoxP3 kiti tampon A solüsyonu (1:4 oranında, 1 ml tampon A, 3 ml distile su) eklendi, vorteks yapıldı ve 40 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi. 40 dakika sonra 2000 rpm devirde 5 dakika santrifüj yapıldı ve santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı. 2 ml boyama tampon solüsyonu eklendi, vorteks yapıldı ve 2000 rpm devirde 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırıldı ve 100 µl boyama tampon solüsyonu boyama tampon

solüsyonu eklendi. Tampon solüsyonu dipteki pelletle karıştırıldı ve üzerine 5 µl FoxP3 antikoru eklendi. 40 dk. oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi. Süre sonunda tüplere 2 ml PBS eklenip 2000 devirde 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atıldı dipte kalan pelletin üzerine 500 µl hücre yıkama solüsyonu eklenip vorteksle karıştırıldı ve akım sitometri cihazında analiz edildi.



Şekil 4: CD4+CD25+FoxP3+ T regülatör hücrelerin akım sitometri analizi. A) Akım sitometri analizinde önce lenfosit kapısı alınmaktadır, B) Lenfosit altgruplarının içinde CD25 pozitif alandaki hücreler seçilerek kapılanmıştır, C) CD25 ifade eden hücrelerin içinde CD4 ve FoxP3 çift pozitif alandaki Tregülatör hücreler seçilerek % oranları analiz edilmiştir.

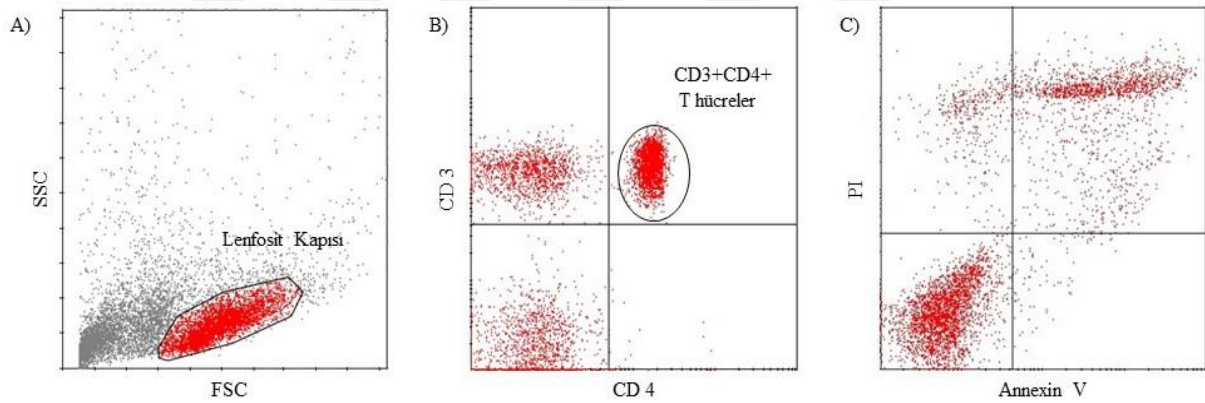
5.6.7.3. CD4+ T Lenfositlerin Annexin V/PI ile Apoptoz ve Canlılık Oranlarının Analizi

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

Apoptoz, doku homeostazını sağlamak amacıyla bilinen fizyolojik bir süreçtir. Sadece homeostaziyi değil aynı zamanda organizmada hasar görmüş veya organizma için tehlikeli olabilecek hücrelerin yok edilmesinde de görev alır. Apoptoz sürecinde, hücrede bazı morfolojik değişiklikler gerçekleşmektedir. Bu değişiklikler sitoplazma ve çekirdeğin yoğunlaşması ve DNA'nın internükleozomal bölünmesi gibi olaylardır. Annexin V, 35-36 kDa ağırlığında ve Ca^{2+} bağımlı bir fosfolipid bağlayıcıdır. Apoptotik süreçte hücrenin iç kısmında bulunan membran fosfolipid fosfatidilserin (PS) dışa doğru hareket etmeye başlar. Annexin V; PS için yüksek afiniteye sahip olan ve PS maruziyetli hücrelere bağlanan bir proteindir. Annexin V, PS için yüksek afinitesini korur ve böylece, hücrelerin akım sitometrik analizi için hassas bir prob görevi görür.

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

hücreler 100 µL PBS solüsyonuyla sulandırıldı. Hücreler akım sitometri cihazında okutulmadan önce CD4+ T hücrelerin seçilmesi için antiCD3 ve antiCD4 antikorları kullanıldı. Erken veya geç apoptotik veya nekrotik hücreleri belirlemek için Annexin V ile birlikte PI (Propodyum Iyodat) işaretleyici kullanıldı. Hücre eğer canlılığını koruyorsa PI işaretleyici membrandan geçemez. Eğer hücre ölü veya hasar görmüşse bu hücrelerin zarı PI işaretleyiciyi geçirir. Annexin V ve PI ile analizlerin sonuçları şu şekilde değerlendirilir; 1) Canlı hücreler; annexin V ve PI her ikisinde de negatif alandadır, 2) Erken apoptoz; Annexin V pozitif alanda PI negatif alandadır, 3) Geç apoptoz; Annexin V ve PI her ikisi de pozitif alanda, 4) Nekroz; Annexin V negatif alanda PI ise pozitif alandadır. Nekroz ve apoptoz birbirinden farklı süreçler içeren hücre ölüm olaylarıdır. Nekrotik hücrelerde plazma membranı tamamen dağıldığı için annexin V işaretleyici ile işaretlenmez, bu nedenle annexin V negatif alanda görülür.



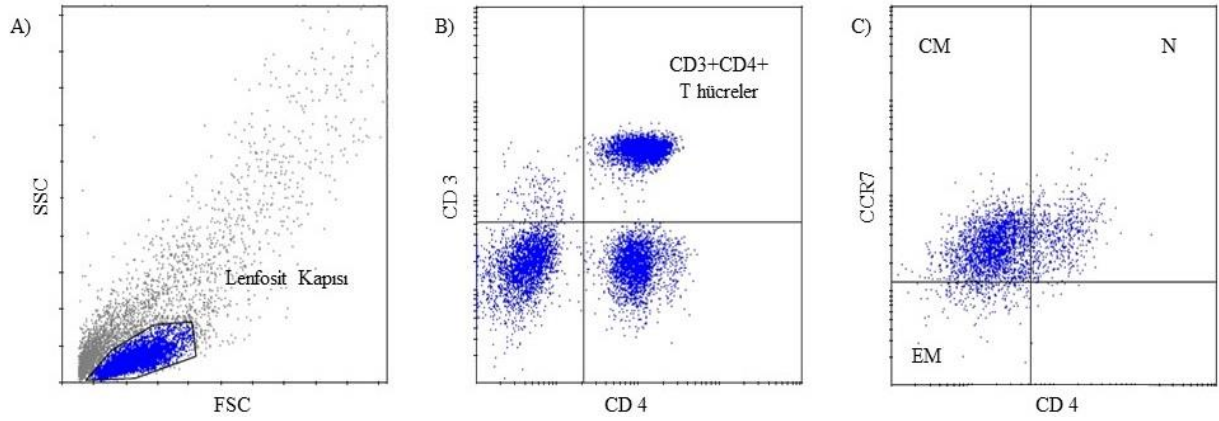
Şekil 5. Hücre canlılığı ve apoptoz oranlarının akım sitometri cihazında analizi. A) Kültür sonrası hücreler için akım sitometri cihazında önce lenfosit kapısı seçilir. B) Lenfositlerin içinden CD3+CD4+ T hücreler seçilir. C) CD3+CD4+ T hücrelerde Annexin V/PI analizi yapılır.

5.6.7.4. CD4+ Naif, Efektör Bellek ve Merkez Bellek T hücre Oranlarının Analizi

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

DF-MKH'lerin PV hastalığında naif, efektör bellek ve merkez bellek CD4+ T hücreler üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla hastalardan izole edilen periferik kan mononükleer hücreler 72 saat kültür süresi sonunda anti-CD3, anti-CD4, anti-CCR7 ve anti-

CD45RA antikorlarıyla işaretlenip akım sitometri cihazında analiz edildi.



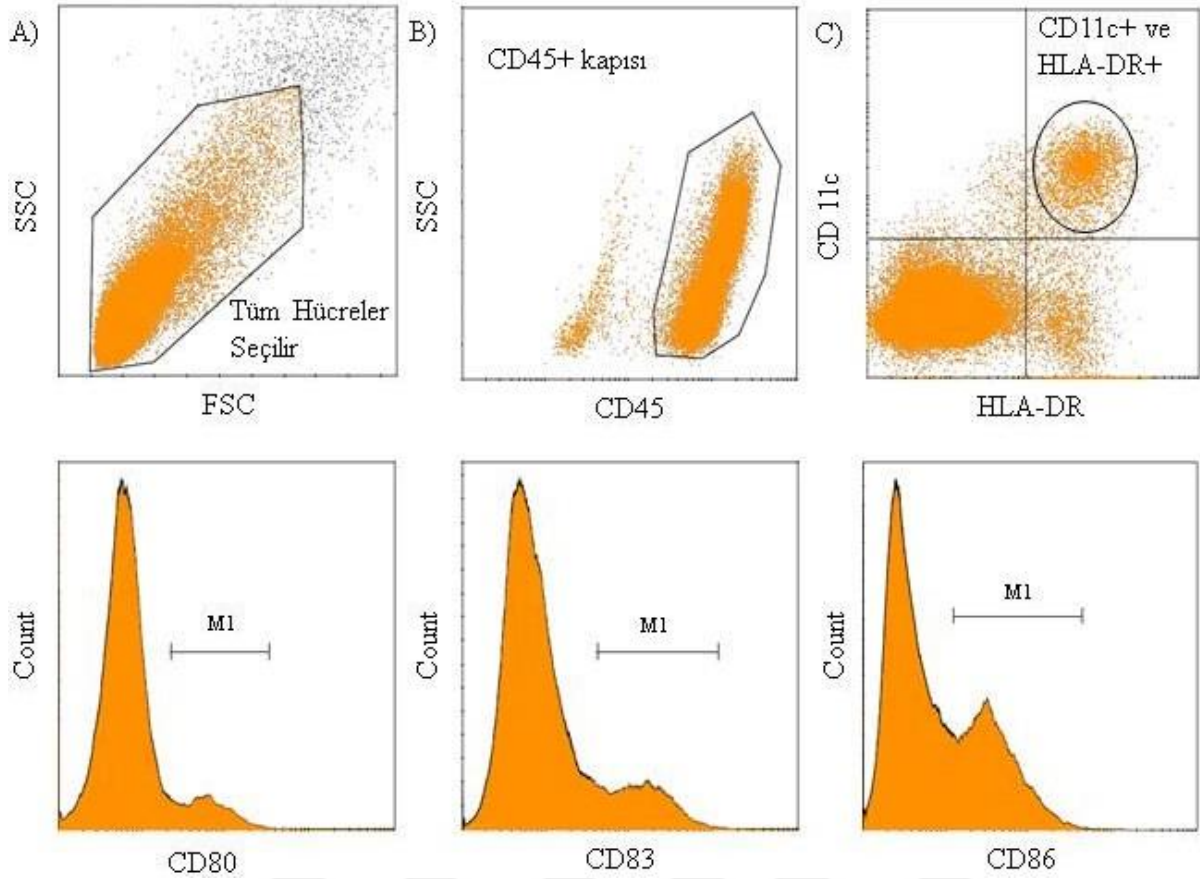
Şekil 6. Naif, efektör bellek ve merkez bellek CD4⁺ T lenfosit oranlarının akım sitometri cihazında analizi.

5.6.7.5. Antijen Sunucu Hücrelerde Kostimülatör Molekül Ekspresyonu Analizi

Mononükleer hücrelerin izolasyonundan sonra kültürü yapılan hücrelerin 72 saatlik kültür sonrasında dendritik hücreler üzerinde CD80, CD83 ve CD86 kostimülatör molekül oranları analiz edildi.

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

Süpernatant atıldı, dipte kalan hücreler 100µL PBS ile sulandırılıp dendritik hücrelerin seçilmesi için antiHLA-DR, antiCD11c, antiCD45, antiCD80, antiCD83 ve antiCD86 antikorlarıyla işaretlendi. Dendritik hücrelerin yüzeyinde ko-stimülasyonu oranı analiz edildi.



Şekil 7. Dendritik hücrelerde kostimülasyon oranlarının akım sitometri cihazında analizi. A) Kültürden alınan hücreler için akım sitometri cihazında önce tüm hücreler seçilir. B) Hücrelerin içinden CD45+ hücreler seçilir. C) HLA-DR ve CD11c hücrelerde CD80, CD83, CD86 oranları analiz edilir.

5.6.7.6. Hücre Kültür Süpernatantlarında Sitokin Tayini

Mononükleer hücrelerin izolasyonundan sonra kültürü yapılan hücrelerin 72 saatlik kültür sonrasında kültür süpernatantları toplandı. Sitokin tayini için ELISA yöntemi kullandı. Üreticinin kit içerisinde belirtmiş olduğu adımlar doğrultusunda IL-4, IL-10, IFN γ ve TNF α düzeyleri analiz edildi.

5.6.7.7. Hücre Kültür Süpernatantlarında Otoantikor Miktarının Tayini

Mononükleer hücrelerin izolasyonundan sonra kültürü yapılan hücrelerin 72 saatlik kültür sonrasında kültür süpernatantları toplandı. Otoantikor miktarının tayini için ELISA yöntemi kullandı. Üreticinin kit içerisinde belirtmiş olduğu adımlar doğrultusunda antidezmoglein-1 ve antidezmoglein-3 düzeyleri analiz edildi.

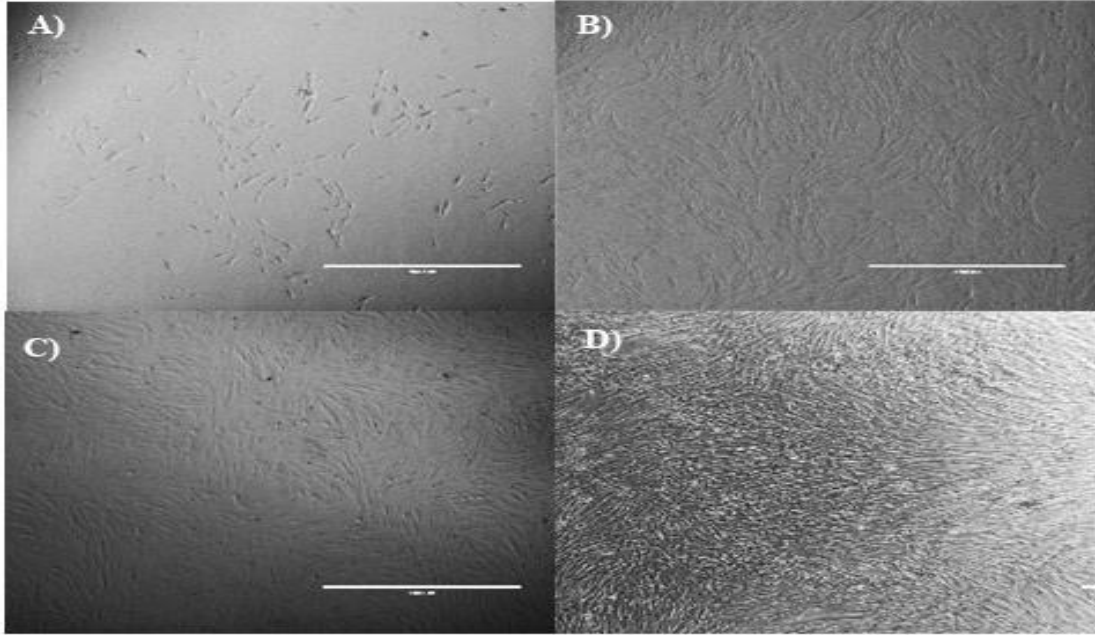
5.6.8. İstatistiksel analiz

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

6. BULGULAR

6.1. Diş Folikülü Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu

Diş folikülü dokusundan elde edilen kök hücreler T-25 cm²' lik flasklara ekildi ve hücrelerin morfolojik özellikleri invert mikroskop ile takip edildi. İlk kültürde hücrelerin hızla çoğaldıkları ve flask yüzeyini kapladıkları görüldü (Şekil 9). Hücreler yaklaşık %70-80 yayılım gösterdikten sonra birinci pasaja alınarak T-75 cm²' lik flasklara aktarıldı. Pasajlama işleminden sonra hücreler 5-6 gün içerisinde flask yüzeyini kapladı ve bir sonraki pasaja alındı.

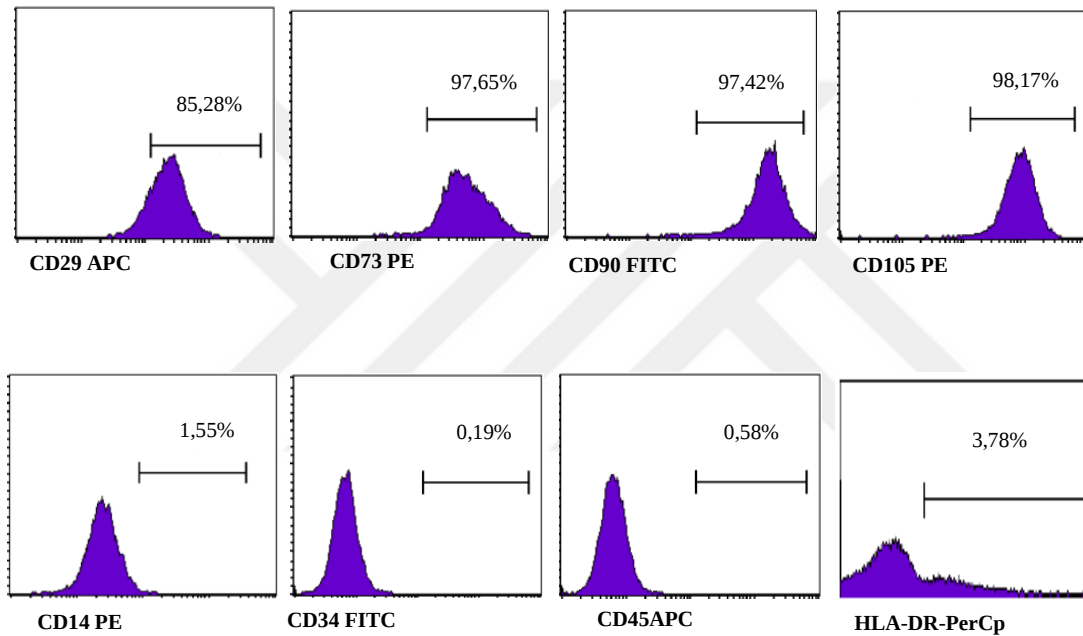


Şekil 8. DF-MKH' lerin morfolojik görünümü. A) DF-MKH hücrelerinin birinci kültür (P0, 3. gün), B) birinci pasaj ve sonrası (P1, 3. gün), C-D) sonraki alt kültürlerinin (C: P2, 3. gün; D: P3, 3. gün) invert mikroskobu görüntüleri.

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

6.2.1. DF-MKH Hücrelerin Akım Sitometri Analizi

DF-MKH hücreleri üçüncü pasaja alınıp kültür konflüent olduktan sonra hücrelerin karakterizasyon analizleri yapıldı. Bu hücrelerin akım sitometrik analizleri sonucunda hematopoietik kök hücre belirteci olan CD45, CD34, CD25, CD28 ve CD14 işaretlerini yüzeylerinde göstermedikleri görüldü. Aynı zamanda bu hücrelerin kök hücre işareti olan CD73, CD90, CD105, CD146 ve CD29' u yüzeylerinde gösterdikleri görüldü.



Şekil 9. DF-MKH'lerin akım sitometrik analizi. DF-MKH'lerin pozitif belirteçleri (CD29, CD73, CD90 ve CD105) %85'in üzerinde ifade ettiği, negatif belirteçleri %5'in altında ifade ettiği gösterilmiştir.

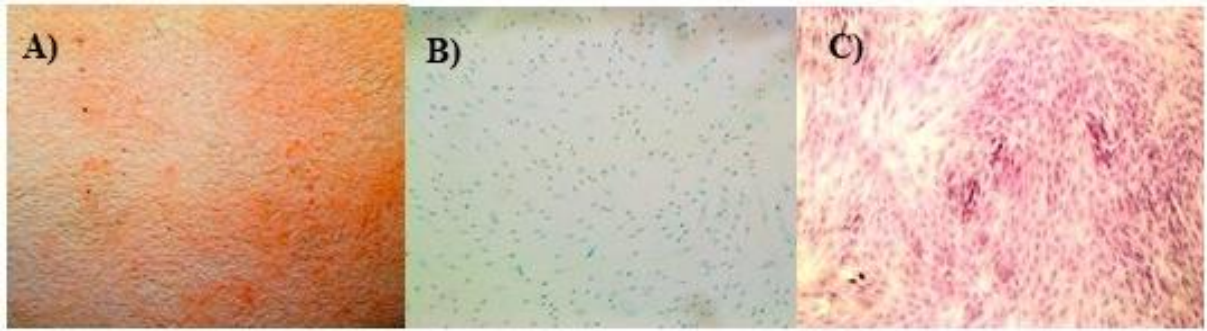
6.2.2. DF-MKH Hücrelerin Osteojenik, Adipojenik ve Kondrojenik Olarak Farklılaştırılması

Osteojenik farklılaştırma için uyarılan DF-MKH hücrelerinin osteoblast benzeri hücrelere farklılaştıkları gözlemlendi. Osteojenik farklılaştırma besiyerine alınan DF-MKH hücreleri kültürün 21. gününde alizarin kırmızısı ile boyandı ve mineralize kemik nodülleri görüldü (Şekil 10A).

Adipojenik olarak farklılaştırmak için adipojenik besiyerinde 14 gün süre ile kültürleri

yapıldı ve DF-MKH hücrelerinin adiposit benzeri hücrelere farklılaştıkları gösterildi. Kültürün ikinci haftasında Oil red O ile yapılan boyama sonrasında kırmızı renkte hücre içi yağ damlacıkları görüldü. Buradaki yağ damlacıklarının diğer hücre gruplarına oranla daha fazla sayıda ve belirgin oldukları görüldü (Şekil 10B).

Kondrojenik olarak farklılaştırmak için DF-MKH hücrelerinin 21 gün kondrojenik besiyeri ile kültürleri yapıldı ve kondrosit benzeri hücrelere farklılaştıkları görüldü. Kültürün 21. gününde alcian blue ile boyanan hücrelerde kondrositler tarafından üretilen proteoglikanların mavi renkte boyandığı görüldü (Şekil 10C).



Şekil 10. DF-MKH'lerin farklılaşma potansiyelleri. Osteojenik stimülasyon sonrasında Alizarin Red ile boyanan hücrelerin osteositlere farklılaştığı ve hücre arası matrikste kalsiyum yığılımlarının Alizarin Red ile boyandığı görülmektedir (A). Kondrojenik stimülasyon sonrası Alcian Blue boyası ile boyanan kondrositlerin ve matrikste yer alan proteoglikanların mavi renkte boyandığı görülmektedir (B). Adipojenik stimülasyon ile adipositlerin ve yağ damlalarının (koyu kırmızı, mor renkli) oluştuğu görülmektedir (C).

6.3. PV ve Sağlıklı Kontrol Gruplarında Demografik Veriler

Marmara Üniversitesi Pendik EAH, Dermatoloji polikliniğine başvuran dokuz PV tanısı almış gönüllü (ortalama yaş; $45,67 \pm 15,55$) kişi çalışmaya dahil edilmiştir. Hastaların hepsi histopatolojik ve direkt immün floresan ile tanı verifiye edildi. Histopatolojik incelemelerinde subrabazal seviyede ayrışma izlenirken direkt immün floresan incelemelerinde hücreler arası IgG ve/veya c3 birikimi tüm hastalarda saptanmıştır. Anti-DSG1 düzeyi 0 olan PV4 ve PV6 hastalarında mukozal tutulum olup direkt immünfloresan yöntemi ile tanı kesinleşmiştir. Hastalık mortalitesinin yüksek olması ve nadir görülmesi sebebiyle çalışmaya dahil edilen hastalar tedavi almakta olan hastalardır. DF-MKH birlikte kültürlerinin öncesinde ve sonrasında hastalar kendi içlerinde karşılaştırılmıştır.

Çalışmaya otoimmün hastalık öyküsü olmayan dokuz sağlıklı kişi (ortalama yaş; 42,33 $\pm$ 8,64 yıl, cinsiyet; 5E,4K) kontrol olarak dahil edildi.

Hasta	Yaş	Cinsiyet	Anti-DSG3	Anti-DSG1	Hastalık Şiddeti
PV1	59	E	200	116	Orta Şiddetli
PV2	59	E	200	78	Orta Şiddetli
PV3	45	E	156	200	Şiddetli
PV4	36	E	36	0	Hafif Şiddetli
PV5	38	K	45	103	Orta Şiddetli
PV6	28	E	45	0	Hafif Şiddetli
PV7	21	K	200	200	Şiddetli
PV8	53	K	200	200	Şiddetli
PV9	72	K	200	24	Şiddetli

Tablo 1. PV hasta gruplarının demografik verileri K: Kadın; E: Erkek.

6.4. PV Hastalarında 0.Gün T Alt Grupları, B Alt Grupları ve NK Hücre Oranlarında Anlamlı Bir Fark Görülmedi

PV ve sağlıklı bireylerde kültür çalışması yapılmadan önce 0. gün T alt grupları, B hücre alt grupları ve NK hücre oranları incelendi. Elde edilen sonuçlara göre, 0.gün PV hastalarında CD3⁺ hücre oranında (67,24 $\pm$ 7,14) sağlıklı gruba göre (70,02 $\pm$ 7,85) istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (P=0,4697). PV hastalarında CD3⁺CD4⁺ yardımcı T hücre gruplarında (40,93 $\pm$ 8,54) sağlıklı kontrole göre (46,71 $\pm$ 5,04) anlamlı bir fark görülmedi (P=0,1186). PV hastalarında CD3⁺CD8⁺ sitotoksik T hücre gruplarında (23,74 $\pm$ 6,24) sağlıklı kontrole göre (24,34 $\pm$ 6,19) anlamlı bir fark görülmedi (P=0,8480). PV hastalarında CD19⁺ B hücre gruplarında (12,63 $\pm$ 6,32) sağlıklı kontrole göre (10,94 $\pm$ 2,53) anlamlı bir fark görülmedi (P=0,4928). PV hastalarında CD20⁺ B hücre gruplarında (12,73 $\pm$ 6,31) sağlıklı kontrole göre (11,13 $\pm$ 2,58) anlamlı bir fark görülmedi (P=0,5157). PV hastalarında CD16/56⁺ NK hücre gruplarında (8,34 $\pm$ 4,69) sağlıklı kontrole göre (10,29 $\pm$ 2,04) anlamlı bir fark görülmedi (P=0,3094).

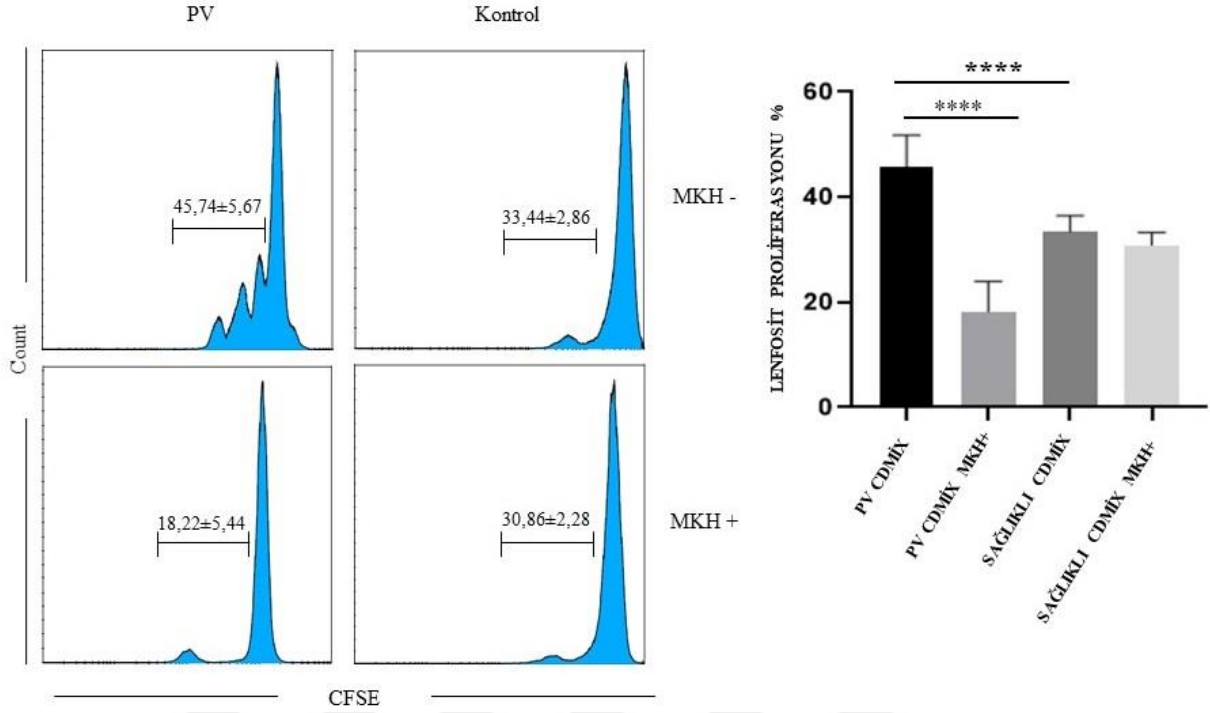
Yüzey Belirteci	Hücre Alt Grupları	PV	Sağlıklı Kontrol
CD3 ⁺	T	67,24±7,14	68,57±7,81
CD3 ⁺ CD4 ⁺	Th	40,93±8,54	46,74±5,04
CD3 ⁺ CD8 ⁺	Tc	23,74±6,24	24,34±6,19
CD19 ⁺	B	12,63±6,32	10,94±2,53
CD20 ⁺	B	12,73±6,31	11,13±2,58
CD16/56 ⁺	NK	8,34±4,69	10,29±2,04
CD4 ⁺ CD45RA ⁺	Naif Th	25,06±2,58	20,02±7,79
CD4 ⁺ CD45RO ⁺	Hafıza Th	28,50±4,95	27,62±4,42
CD8 ⁺ CD45RA ⁺	Naif Tc	15,13±6,07	12,85±4,30
CD8 ⁺ CD45RO ⁺	Hafıza Tc	16,58±8,66	17,88±5,61

Tablo 2. PV ve sağlıklı kontrol gruplarının lenfosit alt grupları dağılımı. Th: yardımcı T lenfositler, Tc: sitotoksit T lenfositler, NK: doğal öldürücü hücreler.

6.5. DF-MKH PV Hastalarında CD4⁺ Lenfosit Proliferasyonunu Baskıladı

Hücre proliferasyon çalışmaları PV hastaları ve sağlıklı bireylerin periferik venöz kanlarından izole edilen PKMH (periferik kan mononükleer hücreler) ile yapıldı. İzole edilen hücreler CFSE ile işaretlenerek, *in-vitro* ortamda DF-MKH varlığında ve yokluğunda CDmix ile uyarıldı. DF-MKH varlığında ve yokluğunda kültürleri yapıldı. PKMH içerisinde yer alan CD4⁺ T hücrelerinin kültür sonrası 3. gününde DF-MKH'lerin immün baskılayıcı özelliğini araştırmak amacıyla akım sitometri cihazında hücre proliferasyonu analiz edildi.

PV hastalarında CDmix uyarımlı kültürlerde lenfosit proliferasyon oranı (45,74±5,67), sağlıklı gruba göre (33,44±2,86) istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur (p<0,0001). PV hastalarında CDmix uyarımlı DF-MKH birlikte kültürlerde lenfosit proliferasyon oranı (18,22±5,44), DF-MKH olmayan kültürlerle (45,74±5,67) göre istatistiksel olarak anlamlı azaldı (p<0,0001). Sağlıklı bireylerde CDmix DF-MKH birlikte kültürlerde lenfosit proliferasyon oranı (30,86±2,28) ile kök hücreli kültürler (33,44±2,86) arasında anlamlı bir fark görülmedi (P=0,0633).



Şekil 11. CD4⁺ T lenfosit proliferasyonu. DF-MKH' lerin PV ve sağlıklı bireylerde lenfosit hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki baskılayıcı etkisi akım sitometri analizi ile gösterilmiştir. CFSE ile işaretlenen lenfositler histogramda sola doğru proliferen hücrelerin oranını göstermektedir. DF-MKH' ler PV hastalarında CD4⁺ T lenfosit proliferasyonu anlamlı olarak baskıladı. **** $P < 0,0001$.

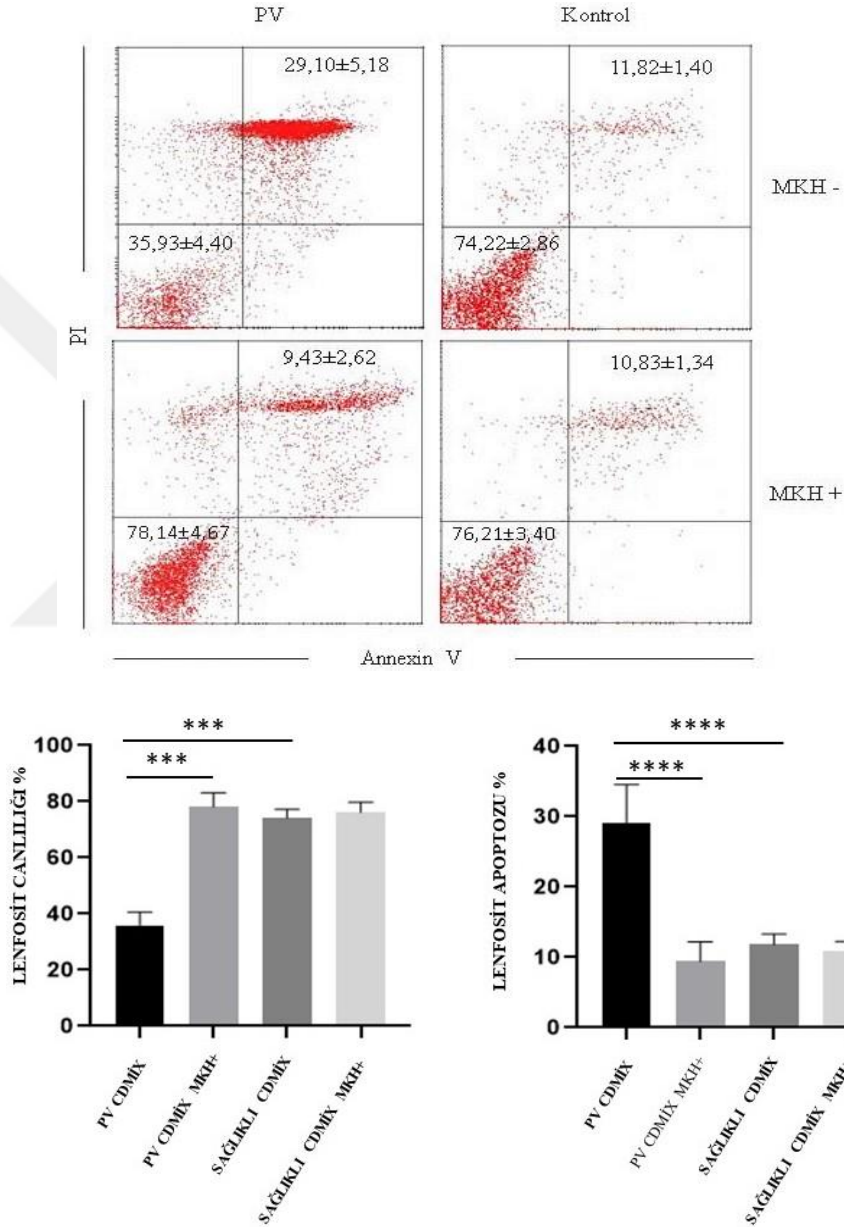
6.6. DF-MKH PV Hastalarında CD4⁺ T Lenfosit Apoptozunu Azaltırken Canlılığını Arttırdı

DF-MKH' lerin lenfosit apoptozu üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla hücre apoptoz oranları analiz edildi. DF-MKH varlığında ve yokluğunda lenfositlerle birlikte 72 saat (3 gün) kültürleri yapıldı. Kültür süresi sonunda lenfositler Annexin V ve PI ile işaretlenerek akım sitometride analiz edildi.

PV hastalarında CDMix uyarımlı kültürlerde lenfosit apoptoz oranı ($29,10 \pm 5,18$) sağlıklı gruba göre ($11,82 \pm 1,40$) istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ($p < 0,0001$). PV hastalarında CDMix uyarımlı DF-MKH birlikte kültürlerde lenfosit apoptoz oranı ($9,43 \pm 2,62$) DF-MKH olmayan kültürlerde ($29,10 \pm 5,18$) göre istatistiksel olarak anlamlı azaldı ($p < 0,0001$). Sağlıklı bireylerde CDMix DF-MKH birlikte kültürlerde lenfosit apoptoz oranı ($10,83 \pm 1,34$) ile kök hücresiz kültürler ($11,82 \pm 1,40$) arasında anlamlı bir fark görülmedi ($P = 0,1681$).

PV hastalarında CDMix uyarımlı kültürlerde lenfosit canlılık oranı ($35,93 \pm 4,40$),

sağlıklı gruba göre ($74,22 \pm 2,86$) istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuştur ($p < 0,0001$). PV hastalarında CDmix uyarımlı DF-MKH birlikte kültürlerde lenfosit canlılık oranı ($78,14 \pm 4,67$) DF-MKH olmayan kültürlerle ($35,93 \pm 4,40$) göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ($p < 0,0001$). Sağlıklı bireylerde CDmix DF-MKH birlikte kültürlerde lenfosit canlılık oranı ($76,21 \pm 3,40$) ile kök hücresiz kültürler ($74,22 \pm 2,86$) arasında anlamlı bir fark görülmedi ($P = 0,2241$).

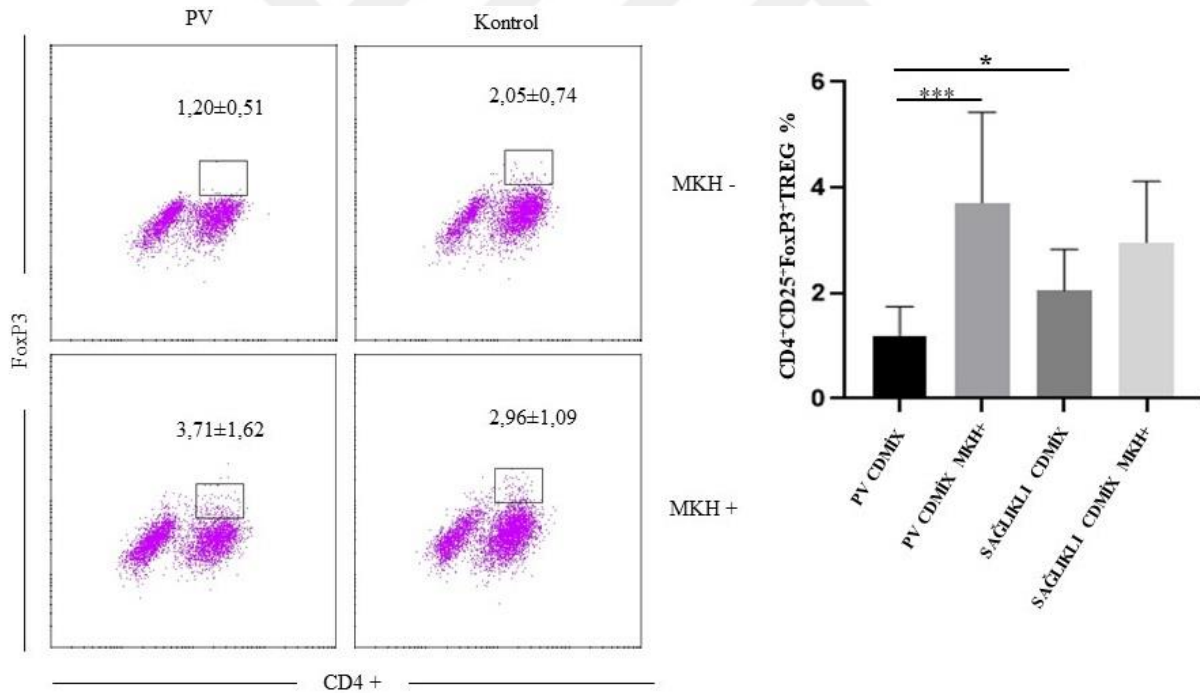


Şekil 12. DF-MKH'lerin PV hastaları ve sağlıklı bireylerde Annexin/PI ile işaretlenen T lenfosit hücrelerinin canlılık ve apoptoz üzerindeki etkisinin akım sitometri analizi ile gösterimi. DF-MKH' ler PV hastalarında lenfosit hücrelerinin canlılığını anlamlı olarak arttırdı ve T lenfosit apoptozunu anlamlı olarak baskıladı. *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

6.7. DF-MKH PV Hastalarında CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Tregülatör) Hücre Oranını Arttırdı

DF-MKH' lerin CD4⁺CD25⁺ ve Foxp3 eksprese eden T regülatör (Treg) hücreler üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla lenfositler DF-MKH varlığında ve yokluğunda 72 saat kültürleri yapıldı. Kültür süresi sonunda lenfositlerin antiCD4 ve antiCD25 ile yüzey boyaması, Foxp3 ekspresyonu için de hücre içi boyama yapılarak akım sitometride analiz edildi.

PV hastalarında CDmix uyarımlı kültürlerde T regülatör hücre oranı ($1,20 \pm 0,51$), sağlıklı gruba göre ($2,05 \pm 0,74$) istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuştur ($p < 0,05$). PV hastalarında CDmix uyarımlı DF-MKH birlikte kültürlerde T regülatör hücre oranı ($3,71 \pm 1,62$) DF-MKH olmayan kültürlerde ($1,22 \pm 0,58$) göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ($P = 0,0007$). Sağlıklı bireylerde CDmix DF-MKH birlikte kültürlerde T regülatör hücre oranı ($2,96 \pm 1,09$) ile kök hücresiz kültürler ($2,05 \pm 0,74$) arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p > 0,05$).



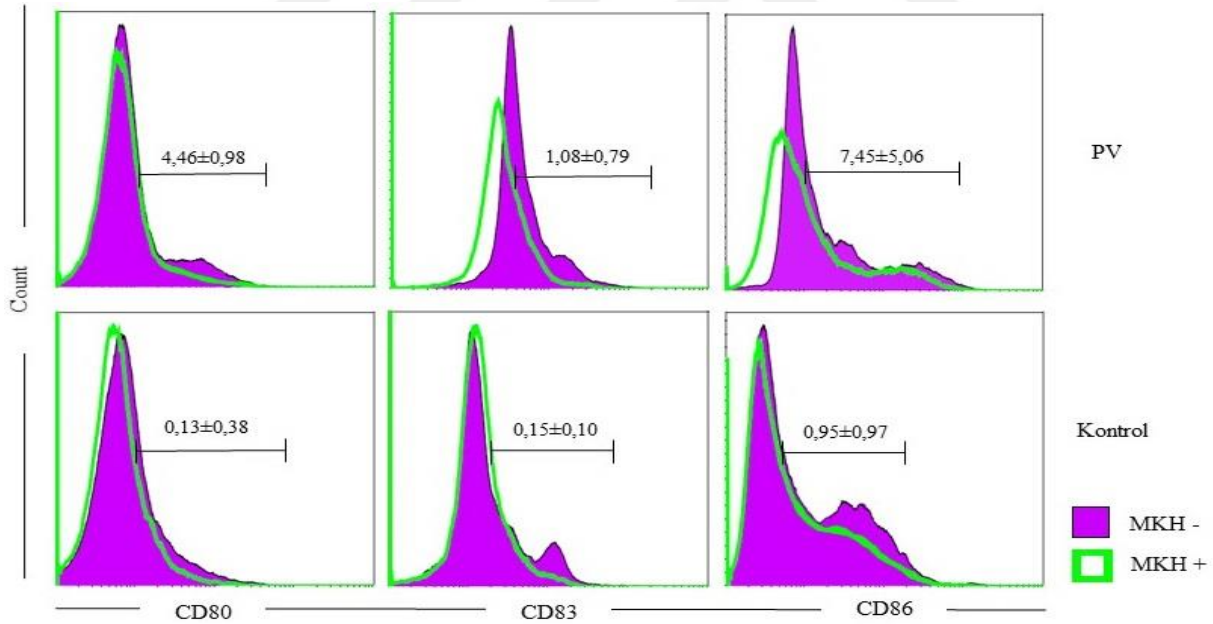
Şekil 13. PV ve sağlıklı kontrol gruplarında CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regülatör hücre oranlarının akım sitometri görünümü. DF-MKH' ler PV hastalarında CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regülatör hücre oranları istatistiksel olarak anlamlı arttırdı. **** $P < 0,0001$; * $P = 0,0162$.

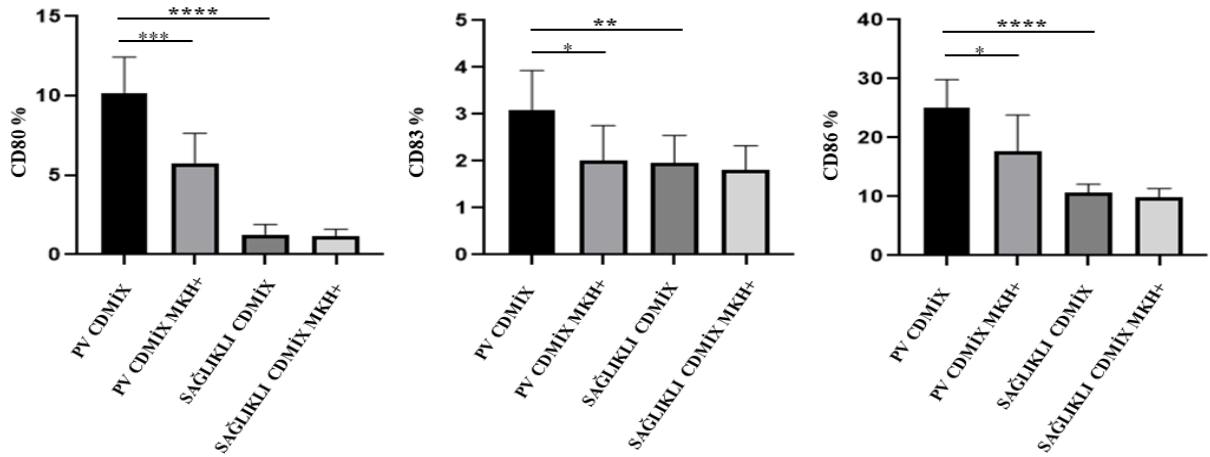
6.8. DF-MKH PV Hastalarının Dendritik Hücrelerinde Kostimülasyonu Baskıladı

DF-MKH'lerin antijen sunucu hücreler olan dendritik hücrelerin (CD11c+HLA-DR+) kostimülasyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

PV hastalarında CDmix uyarımlı kültürlerde CD80, CD83 ve CD86 kostimülatör molekül ifadesi (CD80; $27,1 \pm 3,6$, CD83; $23,2 \pm 2,1$, CD86; $22,6 \pm 2,7$) sağlıklı gruba göre (CDmix: CD80; $1,27 \pm 0,60$, CD83; $1,95 \pm 0,56$, CD86; $10,76 \pm 1,29$) istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur (sırasıyla; $p < 0,0001$, $p < 0,05$, $p < 0,0001$). PV hastalarında CDmix uyarımlı DF-MKH birlikte kültürlerde CD80, CD83 ve CD86 kostimülatör molekül ifadesi (CD80; $5,73 \pm 1,79$, CD83; $2,01 \pm 0,71$, CD86; $17,62 \pm 5,89$) DF-MKH olmayan kültürlerle (CD80; $27,1 \pm 3,6$, CD83; $23,2 \pm 2,1$, CD86; $22,6 \pm 2,7$) göre istatistiksel olarak anlamlı azaldı (sırasıyla; $p < 0,0003$; $p < 0,0112$; $p < 0,0121$).

Sağlıklı bireylerde CDmix DF-MKH birlikte kültürlerde CD80, CD83 ve CD86 kostimülatör molekül ifadesi ile kök hücre kültürleri arasında anlamlı bir fark görülmedi ($P = 0,1681$).





Şekil 14. CD11c+ hücrelerde kostimülasyonu görünümü. DF-MKH' ler PV hastalarında mononükleer hücrelerden seçilen CD11c+ hücrelerin CD80, CD83 ve CD86 ifadesini anlamlı olarak baskıladı. * $P=0,0121$; ** $P=0,0047$ *** $P=0,0003$; **** $P<0,0001$.

6.9. DF-MKH PV Hastalarında Naif CD4+ T Lenfosit Oranlarını Artırdı, Efektör Bellek ve Merkez Bellek CD4+ T Lenfosit Oranlarını Azalttı

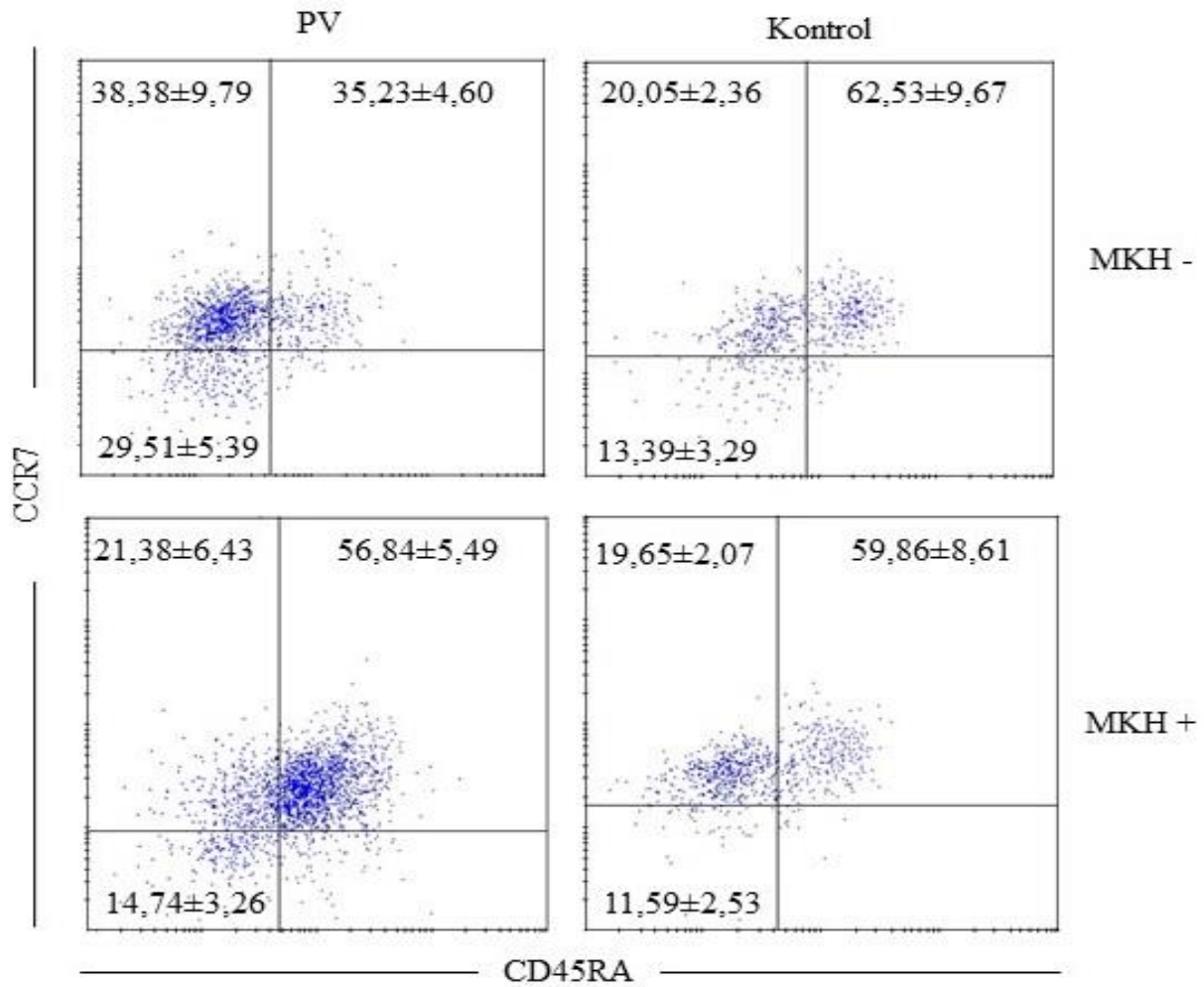
DF-MKH' lerin efektör (CD45RA+CCR7-) , efektör bellek (CD45RA-CCR7-), merkez bellek (CD45RA-CCR7+) ve naif (CD45RA+CCR7+) CD4+ T lenfositler üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla lenfositler DF-MKH varlığında ve yokluğunda 72 saat kültürleri yapıldı.

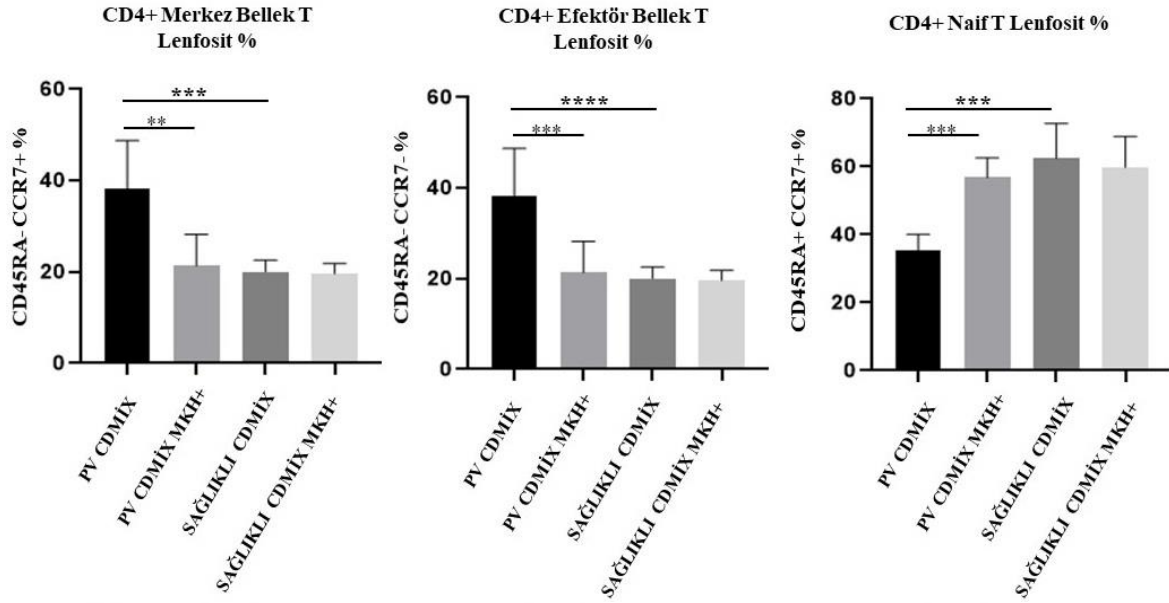
PV hastalarında CDmix uyarımlı kültürlerde naif CD4+ T lenfosit oranı ($35,23 \pm 4,60$), sağlıklı gruba göre ($62,53 \pm 9,67$) istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuştur ($p<0,05$). PV hastalarında CDmix uyarımlı DF-MKH birlikte kültürlerde naif CD4+ T lenfosit oranı ($56,84 \pm 5,49$) DF-MKH olmayan kültürlerle ($35,23 \pm 4,60$) göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0,0001$). Sağlıklı bireylerde CDmix DF-MKH birlikte kültürlerde naif CD4+ T lenfosit oranı ($59,86 \pm 8,61$) ile kök hücreli kültürler ($62,53 \pm 9,67$) arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,5681$).

PV hastalarında CDmix uyarımlı kültürlerde efektör bellek CD4+ T lenfosit oranı ($29,51 \pm 5,39$) sağlıklı gruba göre ($13,39 \pm 3,29$) istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0,0001$). PV hastalarında CDmix uyarımlı DF-MKH birlikte kültürlerde efektör bellek CD4+ T lenfosit oranı ($14,74 \pm 3,26$) DF-MKH olmayan kültürlerle ($29,51 \pm 5,39$) göre istatistiksel olarak anlamlı azaldı ($p<0,001$). Sağlıklı bireylerde CDmix DF-MKH birlikte kültürlerde efektör bellek CD4+ T lenfosit oranı ($11,59 \pm 2,53$) ile kök hücreli kültürler

(13,39±3,29) arasında anlamlı bir fark görülmedi (P=0,2384).

PV hastalarında CDmix uyarımlı kültürlerde merkez bellek CD4+ T lenfosit oranı (38,38±9,79) sağlıklı gruba göre (20,05±2,36) istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur (p<0,0001). PV hastalarında CDmix uyarımlı DF-MKH birlikte kültürlerde merkez bellek CD4+ T oranı (21,38±6,43) DF-MKH olmayan kültürlerde (38,38±9,79) göre istatistiksel olarak anlamlı azaldı (p<0,001). Sağlıklı bireylerde CDmix DF-MKH birlikte kültürlerde merkez bellek CD4+ T oranı () ile kök hücre kültürler (20,05±2,36) arasında anlamlı bir fark görülmedi (P=0,7192).





Şekil 15. PV ve sağlıklı kontrol gruplarında CD4+ naif, efektör bellek ve merkez bellek T hücre oranlarının akım sitometri görünümü. DF-MKH' ler PV hastalarında CD4+ naif T hücre oranını istatistiksel olarak anlamlı arttırdı. CD4+ efektör bellek ve merkez bellek T hücre oranların istatistiksel olarak anlamlı azalttı. * $P=0,0121$; ** $P=0,0047$ *** $P=0,0003$; **** $P<0,0001$.

6.10. DF-MKH PV Hastalarında TNF- α , IL-4 Miktarını Azalttı, IL-10 ve IFN- γ Miktarını Arttırdı

DF-MKH'lerin PV hastalarında periferik kandan izole edilen mononükleer hücrelerin immün düzenlemedeki etkisini araştırmak amacıyla TNF- α , IL-4, IL-10 ve IFN- γ sitokin miktarları incelendi. Sitokin miktarları 72 saat kültür süresinin sonunda toplanan kültür süpernatantlarından ELISA yöntemi ile analiz edildi.

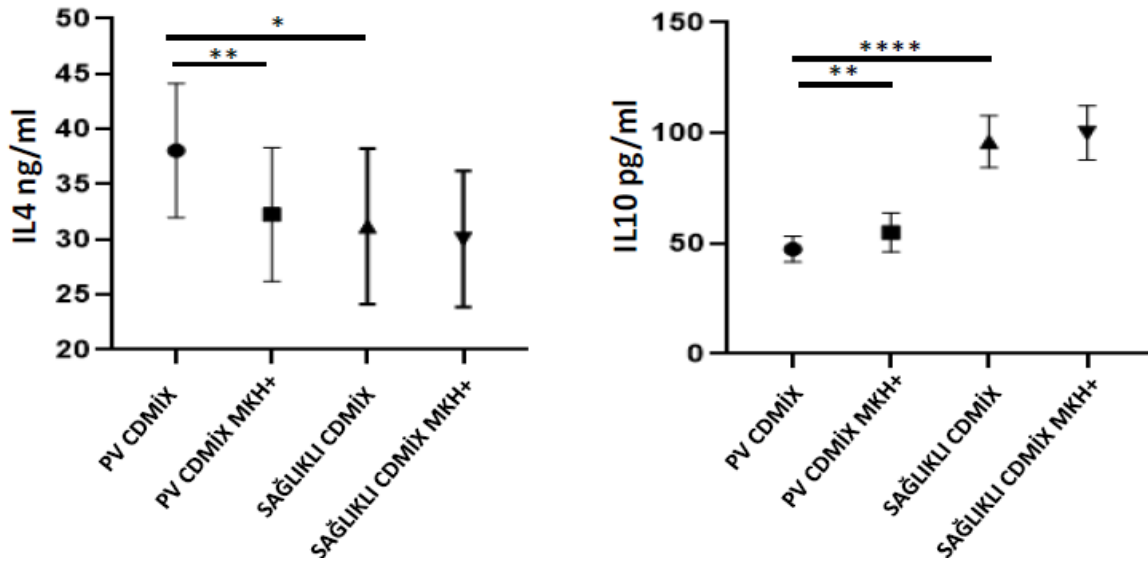
PV hastalarında CDMix uyarımlı kültürlerde IL-4 (ng/L) miktarı ($38,06 \pm 5,91$) sağlıklı kişilere göre ($31,20 \pm 6,69$) istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p=0,0108$). PV hastalarında DF-MKH birlikte kültürlerde IL-4 miktarı ($32,26 \pm 5,89$) kök hücre kültürlerine göre ($38,06 \pm 5,91$) istatistiksel olarak anlamlı azaldı ($p=0,0057$). Sağlıklı bireylerde DF-MKH varlığında ($30,04 \pm 5,84$) ve yokluğunda ($31,20 \pm 6,69$) IL-4 miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0,7003$).

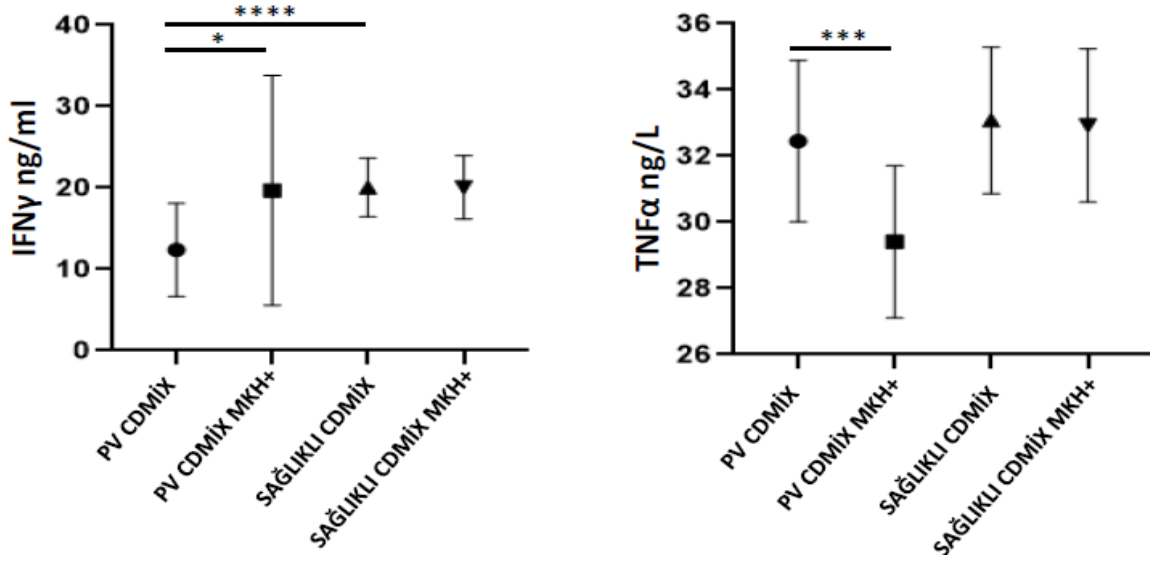
PV hastalarında CDMix uyarımlı kültürlerde IL-10 (pg/ml) miktarı ($47,46 \pm 5,64$) sağlıklı kişilere göre ($96,08 \pm 11,13$) istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu ($p<0,0001$). PV hastalarında DF-MKH birlikte kültürlerde IL-10 miktarı ($54,94 \pm 8,60$) kök hücre kültürlerine göre ($47,46 \pm 5,64$) istatistiksel olarak anlamlı arttı ($p=0,0038$). Sağlıklı bireylerde DF-MKH

varlığında ($100,04 \pm 11,68$) ve yokluğunda ($96,08 \pm 11,13$) IL-10 miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0,4463$).

PV hastalarında CDMix uyarımlı kültürlerde IFN- γ (ng/ml) miktarı ($12,39 \pm 5,59$) sağlıklı kişilere göre ($20,07 \pm 3,43$) istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu ($p=0,0007$). PV hastalarında DF-MKH birlikte kültürlerde IFN- γ miktarı ($19,70 \pm 13,74$) kök hücresiz kültürlerle göre ($12,39 \pm 5,59$) istatistiksel olarak anlamlı arttı ($p=0,0437$). Sağlıklı bireylerde DF-MKH varlığında ($20,07 \pm 3,43$) ve yokluğunda ($20,6 \pm 3,69$) IFN- γ miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0,9934$).

PV hastalarında CDMix uyarımlı kültürlerde TNF α (ng/L) miktarı ($32,45 \pm 2,38$) sağlıklı kişilere göre ($33,08 \pm 2,11$) istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,4808$). PV hastalarında DF-MKH birlikte kültürlerde TNF α miktarı ($29,41 \pm 2,24$) kök hücresiz kültürlerle göre ($32,45 \pm 2,38$) istatistiksel olarak anlamlı azaldı ($p=0,0002$). Sağlıklı bireylerde DF-MKH varlığında ($33,08 \pm 2,11$) ve yokluğunda ($32,93 \pm 2,21$) TNF α miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0,8730$).





Şekil 16. PV hastaları ve sağlıklı kişilerde 72 saat kültür sonrası IL4, IL10, IFN γ ve TNF α düzeylerinin gösterimi. PV ve sağlıklı bireylerde DF-MKH varlığında IL4 (**P=0,0057; *P=0,0108) ve TNF α (**P=0,0002) düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı azaldı, IL10 (****P<0,0001; **P=0,0038) ve IFN γ (****P=0,0007; *P=0,0437) düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı arttı.

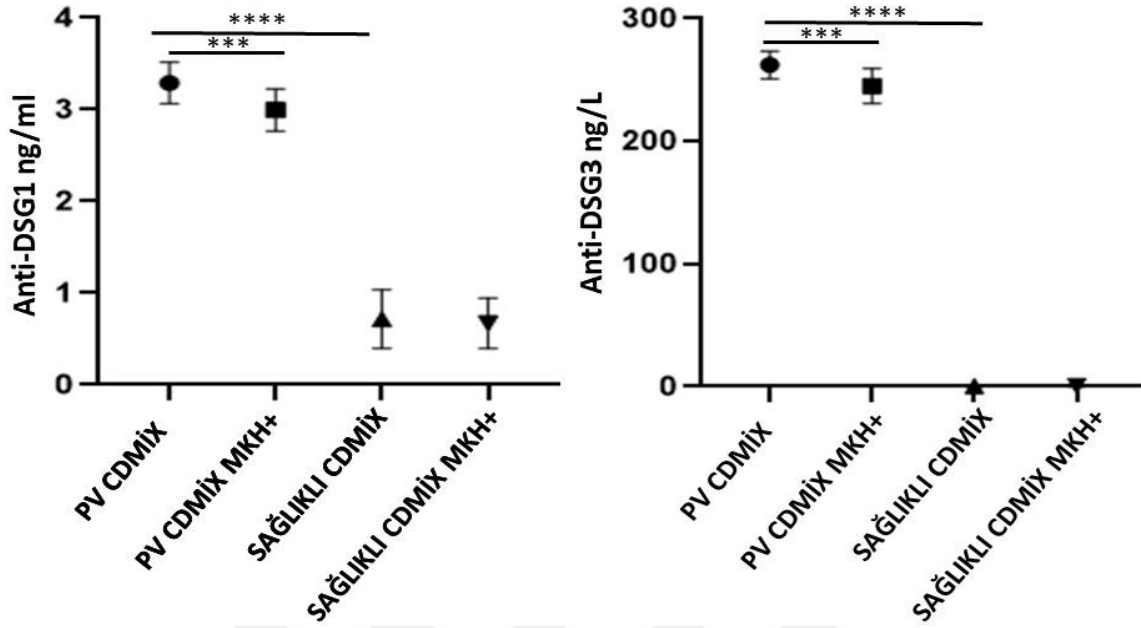
6.11. DF-MKH PV Hastalarında DSG1 ve DSG3 Otoantikor Miktarını Azalttı

PV hastalarında bulunan antiDSG1 ve antiDSG3' e karşı üretilen IgG yapısındaki otoantikorunun DF-MKH varlığında ve yokluğunda düzeylerini araştırmak amacıyla 72 saat kültür süresinin sonunda toplanan kültür süpernatantlarından ELISA yöntemi ile anti-DSG1 ve anti-DSG3 miktarları analiz edildi.

PV hastalarında CDMix uyarımlı kültürlerde anti-DSG1 (ng/ml) miktarı ($3,29 \pm 0,22$) sağlıklı kişilere göre ($0,72 \pm 0,30$) istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p < 0,0001$). PV hastalarında DF-MKH birlikte kültürlerde anti-DSG1 miktarı ($3,00 \pm 0,22$) kök hücre-siz kültürlerde göre ($3,29 \pm 0,22$) istatistiksel olarak anlamlı azaldı ($p = 0,0005$). Sağlıklı bireylerde DF-MKH varlığında ($0,67 \pm 0,26$) ve yokluğunda ($0,72 \pm 0,30$) anti-DSG1 miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p = 0,7245$).

PV hastalarında CDMix uyarımlı kültürlerde anti-DSG3 (ng/L) miktarı ($262,40 \pm 10,97$) sağlıklı kişilere göre ($0,54 \pm 0,23$) istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p < 0,0001$). PV hastalarında DF-MKH birlikte kültürlerde anti-DSG3 miktarı ($245,08 \pm 13,18$) kök hücre-siz kültürlerde göre ($0,54 \pm 0,23$) istatistiksel olarak anlamlı azaldı ($p = 0,0003$). Sağlıklı bireylerde

DF-MKH varlığında ($0,52 \pm 12$) ve yokluğunda ($0,54 \pm 0,23$) anti-DSG3 miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0,8448$).



Şekil 17. PV hastaları ve sağlıklı kişilerde 72 saat kültür sonrası anti-DSG1 ve anti-DSG3 düzeylerinin gösterimi. PV ve sağlıklı bireylerde DF-MKH varlığında anti-DSG1 ve anti-DSG3 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı azaldı. **** $P < 0,0001$; *** $P = 0,0072$; *** $P = 0,0003$; **** $P < 0,0001$.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Pemfigus Vulgaris epidermis içinde kabarcık oluşumu ile karakterize hayatı tehdit eden kronik otoimmün bir hastalıktır. Deri ve mukoza epidermisinde yer alan keratinosit-keratinosit bağlantısını sağlayan dezmozomların yapıtaşı olan dezmogleinlere (dezmoglein 1 ve dezmoglein3) yönelik IgG yapısında otoantikorlar oluşumu sonucu meydana gelir. (Amagai M,1991). Hastalığın kesin olarak nedeni bilinmemektedir. Genetik çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre PV hastalarında genetik faktörlerin önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Sinha AA, 2011). Pemfigus poligenik bir hastalıktır ve Pemfiguslu hastaların sağlıklı birinci derece akrabalarında düşük miktarda hastalıkla ilişkili otoantikor prevalansının arttığı bildirilmiştir (Torzecka JD ve ark, 2007). Ayrıca çevresel faktörlerin de önemli rol oynadığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Vaka kontrol çalışması olmasa da bazı ilaçların, özellikle penisilamin (metal şelatlama maddesi) ve kaptopril (anjyotensin dönüştüren enzim inhibitörü) gibi tiyol grubu içerenler, keratinosit zarının biyokimyasını veya

başıklık dengesini engelleyebildiği ve bu nedenle akantolizi (keratinosit bağlantısının bozulması) teşvik edebildiği gösterilmiştir. Araştırılan diğer çevresel faktörler arasında virüsler (herpes simpleks virüsü gibi), diyet faktörleri, fizyolojik ve psikolojik stres etkenler yer almaktadır (Ruocco V ve ark, 2013).

PV terapilerin çoğu, doğrudan veya genelleştirilmiş immün baskılama yoluyla serum otoantikörlerinin azaltılmasını ve semptomların iyileştirmesini amaçlar. Tedavi için sistemik kortikosteroidler, çeşitli immün baskılayıcı yardımcı ilaçlar (Mikofenolat ve azatiopürin vb.), Rituksimab (CD20 + B hücrelerini hedef alan monoklonal bir anti-CD20 antikoru) veya başka bir yardımcı tedavi olan intravenöz immünglobulin uygulaması gibi seçenekler uygulanır (Kasperkiewicz M. Ve ark, 2017) Bu tip ilaçların yan etkileri göz önüne alındığında yeni bir tedavi seçeneğine ihtiyaç duyulduğu görülmektedir.

Mezenkimal kök hücreler (MKH) kemik iliği, adipoz doku, kordon (wharton's jelly) ve dental dokular gibi birçok dokudan elde edilebilen multipotent hücrelerdir (Maleki ve ark., 2014). Klinikte hem etik uygunluğundan dolayı hem de teratoma oluşumu gerçekleştirmemesi sebebiyle MKH' ler, hücresel tedavi seçeneklerinde büyük ilgi görmüştür. MKH' ler yüzeyinde CD29, CD73, CD90, CD146 gibi pozitif belirteçleri eksprese eder, CD14, CD34, CD45 veya HLA-DR gibi Hematopoietik belirteçleri eksprese etmezler (Pittenger MF ve ark, 1999). Bu nedenle allojenik kullanımda doku reddi oluşturmayan hipoimmünojenik hücrelerdir (Szade K., ve ark., 2011). Günümüzde diş pulpası, dental folikül, insan süt dişi gibi dental dokulardan izole edilmiş MKH' ler tanımlanmıştır. Bu hücreler diğer dokulardaki mezenkimal kök hücrelere oranla atlanma sayısı yüksek ve kemik, kıkırdak, yağ, nöral hücreler gibi birçok hücre grubuna farklılaşma yeteneğindedir (Suchánek J. ve ark., 2007). Aynı zamanda dental kaynaklı MKH'lerin doku rejenerasyonu ve otoimmün hastalıklarda lenfosit yanıtlarını düzenleyici etkileri bildirilmiştir (Mareschi ve ark., 2016). Daha önce yapılmış bir çalışmada dental doku kaynaklı kök hücrelerin (insan süt dişi pulpası, dental pulpa, dental folikül) içinde anti-proliferatif etkisi yüksek ve CD4+CD25+FoxP3+ T regülatör hücre sayısını en fazla arttıran hücre grubunun DF-MKH olduğu gösterilmiştir (Yıldırım S. ve ark., 2016). Çalışmamızda ilk defa DF-MKH' lerin Th2 baskın ve otoimmün PV hastalığında immünmodülatuar etkisi *in vitro* ortamda araştırılmıştır.

DSG antijenlerini sunan dentritik hücreler, CD4+ ve CD8+ T hücrelerini aktive ederler. Aktive olan T hücreleri Th2 yönünde farklılaşarak çoğalır. Literatürde PV hastalarında CD4+ lenfosit proliferasyonu ile ilgili çalışma bulunmamaktadır. Ekibimizin

daha önce yapmış olduğu astım hastalarındaki bir çalışmada DF-MKH' ların, CD4+ lenfosit proliferasyonunun anlamlı olarak baskılandığı görülmüştür (Genç D ve ark, 2018). Başka bir çalışmada ise MuSK ile immünize farelerin dalaklarından elde edilen lenfositlerle, DF-MKH kaynaklı kök hücrelerin birlikte kültürleri yapılmış ve DF-MKH' ların lenfosit proliferasyonunu anlamlı olarak baskıladığı gösterilmiştir (Ulusoy C. Ve ark, 2015). DF-MKH'lerin Lenfosit proliferasyonu üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla PV hastalarının venöz kanından PKMH izole edilip, DF-MKH varlığında ve yokluğunda CDmix ile uyarılarak kültür edildi. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, DF-MKH varlığında PV hastalarında lenfosit proliferasyonu anlamlı olarak baskılandı.

CD4+CD25+ T regülatör hücreler bağışıklık baskılanmasında önemli görevler alır. Baskılama işlevini eksprese ettiği FoxP3 transkripsiyon faktörü sayesinde gerçekleştirir (Walker MR. Ve ark, 2003). Ekibimizin daha önce yapmış olduğu astım hastalarında DF-MKH birlikte lenfosit kültürlerinde de sonuçlarımıza benzer olarak CD4+CD25+ T regülatör hücre düzeyi artmıştır (Genç D ve ark, 2018). PV hastalarında yapılmış bir çalışmada CD4+CD25+ T regülatör hücre oranı sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur (Sugiyama H. ve ark, 2007). Sugiyama H. ve ark. Sonucuna benzer olarak CD4+CD25+ T regülatör hücre düzeyi sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuştur. DF-MKH varlığında CDmix uyarımlı kültürlerde CD4+CD25+ ve FoxP3 eksprese edebilen T regülatör hücre düzeyi anlamlı olarak arttığı görülmüştür.

Apoptoz; organizmanın gelişimi, yaşlanma veya hücre popülasyonlarını korumak için homeostatik bir mekanizma olarak ortaya çıkar. Apoptoz ayrıca immün reaksiyonlarda bir çeşit savunma mekanizması olarak veya patojenler tarafından zarar görmüş hücrelerin yok edilmesi gereken durumlarda gerçekleşir (Elmore S., 2007). Çalışmamızda DF-MKH varlığında CDmix uyarımlı kültürlerde lenfosit apoptoz miktarı sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük, canlılık oranı ise anlamlı yüksek bulunmuştur. DF-MKH varlığında T regülatör hücre ve naif CD4+ T lenfosit düzeyinin arttığı sonucu göz önünde bulundurulduğunda; canlılık miktarı artışının T regülatör hücre ve naif CD4+ T lenfosit miktarının artmasına bağlı olduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte DF-MKH varlığında apoptoz miktarının azalması, lenfosit proliferasyonunun baskılanması ve canlılığı artışına bağlı olarak sonuçlandığını düşünmekteyiz. Literatürde daha önce yapılmış çalışma olmaması ve hasta grubunun tedavisi devam etmekte olan (immün sistem baskılayıcı ve koruyucu diğer ilaçlar) bireylerden oluşması nedeniyle deneyin bu bölümü ileri çalışmalara ihtiyaç

duymaktadır.

Antijen alımı PAMP reseptörüyle veya fagositoz yoluyla antijen tanınması, olgunlaşmamış DC'leri olgun DC'lere dönüştürür. Olgun DC' ler, CD40, CD80, CD83 ve MHC-II gibi T hücrelerini ortak uyarıcı molekülleri ifade eder. Bu olgunlaşma süreci, periferden T hücrelerine antijen sunumunun meydana gelip lenfoid organlara DC göçünü indükler (Itano AA. ve Jenkins MK, 2003). DC'ler sadece olgunlaşma aşaması açısından değil aynı zamanda köken, morfoloji, fenotip ve fonksiyon açısından da heterojendir. İki farklı DC alt popülasyonu orijinal olarak CD11c ekspresyonuna bağlı olarak insan kanında tanımlandı ve daha sonra miyeloid veya lenfoid soyuna ait olmaları ile karakterize edildiler ve miyeloid (M-DC'ler) ve plazmasitoid (P-DC'ler) olarak tanımlandılar (Colonna, Trinchieri ve ark, 2004). Antijen işlenmesinin ardından dendritik hücreler CD80, CD83 ve CD86 kostimülatör molekülleri ifade ederek olgunlaşmış antijen sunucu hücrelere dönüşürler (Randolph ve ark., 2008). APC'in yüzeyinde ifade edilen CD80/CD83/CD86 kostimülatör moleküller immün yanıtlarda önemli rol oynar. APC tarafından T lenfosit antijen sunumu MHC-sınıf II (HLA-DR) ile gerçekleşir. T lenfosit aktivasyonu için ilk sinyal bu şekilde oluşmuş olur. İkinci sinyal ise B7 molekül ailesinden olan ve APC yüzeyinde gösterilen CD80, CD83 ve CD86 eş uyarımlarının T lenfosit yüzeyindeki CD28 molekülüne bağlanması ile gerçekleşir. PV patogenezinin önemli bir aşaması olan antijen sunumu sırasında, kostimulasyon moleküllerinin düzeyi ile ilgili literatürde çalışma bulunmamaktadır. Ancak Jiang ve arkadaşlarının 2005 yılında yapmış olduğu bir çalışmada kemik iliği kaynaklı MKH ile birlikte *in vitro* kültürlerinde dendritik hücrelerin CD80, CD83 ve CD86 ifadesini azaltarak kostimülasyonu engellediği ve bu yolla inflamatuvar yanıtları baskıladığı gösterilmiştir (Jiang ve ark., 2005). Ayrıca ekibimizin daha önce astım hastalarında yapmış olduğu çalışmada, DF-MKH varlığında CD80, CD83 ve CD86 kostimulasyon molekül ifadesi anlamlı olarak azaldı (Genç D ve ark, 2018). DF-MKH varlığında CD80, CD83 ve CD86 kostimulasyon molekül ifadesini tayin etmek amacıyla yaptığımız çalışmada; DF-MKH varlığında PV hastalarında CD80, CD83 ve CD86 kostimulasyon molekül ifadesi anlamlı olarak baskılandı.

PV immünpatogenezinde önemli rol oynayan IL-4 sitokininin etkisiyle naif CD4⁺ T lenfositler CD3 ve CD28 reseptör aktivasyonu ile T yardımcı hücre 2 (Th2) fenotipine farklılaşır. Bu farklılaşmada ortaya çıkan T yardımcı hücreler efektör T lenfositlerdir. İnflamatuvar yanıtların sonlanmasının ardından efektör T lenfositlerin yaklaşık %90'ı kontraksiyon fazında ölür ve geriye kalan %10'luk popülasyon efektör bellek hücreler olarak

lenfoid olmayan organlarda ve periferde yaşamaya devam eder. Merkez bellek hücreler ise foliküler T yardımcı hücreler veya kendi öncül hücrelerinden oluşan, efektör sitokinleri üretmeyen hücreler olup lenf nodları veya mukozal lenfoid organlarda yaşamaya devam ederler (Pepper ve Jenkins, 2011). MKH'lerin IL-17 ve IFN- γ salgılayan efektör ve efektör bellek T lenfositler üzerinde baskılayıcı etkisinin olduğu literatürde yer almaktadır (Laranjeira ve ark., 2015). PV hastalarında naif (CD45RA+CCR7+), efektör bellek (CD45RA-CCR7-) ve merkez bellek (CD45RA-CCR7+) lenfositler düzeyini gösteren çalışma bulunmamaktadır. DF-MKH'lerin PV hastalarının naive, efektör, efektör bellek ve merkez bellek T lenfosit oranları üzerindeki etkisi incelendiğinde; CDmix uyarımlı hücre kültürlerinde naif CD4+ T lenfosit oranlarının anlamlı olarak arttığı, efektör ve merkez bellek hücrelerinin anlamlı olarak azaldığı görülmüştür.

PV hastalarında antijen sunumu ardından, antijene özgü T hücreler, IL-10 ve IFN γ üretir. IFN γ , DSG' e özgü yardımcı T (Th2) hücre gelişimini bastırma potansiyeline sahiptir. IL-10, patojenik TH2 hücrelerinin aktivitesini baskılayan periferik tolerans mekanizmasının önemli bir aracıdır (Kasperkiewicz M, 2017). Lee SH ve ark., 2017 yılında yapmış olduğu çalışmada IFN γ düzeyi ELISA yöntemiyle çalışılmış ve PV hastalarında sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuştur. Çalışmamızda Lee SH. ve ark. sonucuna benzer olarak IFN γ düzeyi sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuştur. Hennerici T. Ve ark. 2016 yılında yaptığı bir çalışmada ise IL-10 düzeyi ELISA yöntemiyle çalışılmış ve PV hastalarında sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuştur. Çalışmamızda Hennerici T. Ve ark. sonucuna benzer olarak IL-10 düzeyi sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuştur. Literatürde daha önce DF-MKH kullanılarak *in-vitro* ortamda IL-10 veya IFN γ miktarının araştırılması ile ilgili çalışma bulunmamaktadır. Sonuç olarak Th2 yönelimini baskılayacak sitokin miktarlarının, DF-MKH varlığında CDmix uyarımlı kültürlerde anlamlı olarak arttığını göstermektedir.

PV, Th2 baskın bir hastalık olarak kabul edilir. IL-4, dezmoglein kaybından sorumlu olan immünglobülin (Ig) G1 ve IgG4'e izotip geçişi sağlayan önemli bir sitokindir. Ek olarak Th2 aşırı ekspresyonunu şiddetlendirebilen anahtar bir sitokindir (Tavakolpour S., 2015). Satyam A, ve ark. 2009 yılında yapmış olduğu çalışmada IL-4 düzeyi sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda Satyam A, ve ark. sonucuna benzer olarak IL-4 düzeyi sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı

yüksek bulunmuştur. Hennerici T. Ve ark. 2016 yılında yaptığı bir çalışmada da TNF α düzeyi ELISA yöntemiyle çalışılmış ve PV hastalarında sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda Hennerici T. Ve ark. sonucuna benzer olarak TNF α düzeyi sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur. Literatürde daha önce DF-MKH kullanılarak *in-vitro* ortamda IL-4 veya TNF α miktarının araştırılması ile ilgili çalışma bulunmamaktadır. Sonuç olarak hastalığın şiddetini baskılamak üzere azalmasını beklediğimiz IL-4 sitokin miktarlarının, DF-MKH varlığında CDmix uyarımlı kültürlerde anlamlı olarak azaldığını gösterilmiştir.

DSG1 ve DSG3' ün oral mukozada ve ciltte bulunma düzeyleri ve bulunduğu epitelyal tabaka farklıdır. Deride, DSG1 epiderm boyunca ifade edilir, ancak yüzeysel tabakalarda daha fazla bulunur, DSG3 ise neredeyse sadece bazal ve parabasal hücre tabakalarında ifade edilir. Mukoza zarlarında hem DSG1 hem de DSG3, skuamöz katman boyunca ifade edilir, ancak DSG1 seviyeleri, DSG3' ün seviyelerinden çok daha düşüktür (Stanley JR ve ark, 2006), (Amagai M., 2003). Mukozada baskın PV tipi olan hastalar çoğunlukla anti-DSG3 otoantikorları olmasa da mukokutanöz PV tipi hastaların hem anti-DSG3 hem de anti-DSG1 otoantikorları vardır. Çalışmamızda venöz kandan izole edilen PKMH hücreleri kullanılarak DF-MKH varlığında CDmix uyarımlı kültürlerde anti-DSG1 ve anti-DSG3 miktarının anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Periferde meydana gelen bu azalmanın aktif lezyonlu bölgelerdeki etkisi bilinmemektedir. Literatürde yapılmış çalışma olmaması ve etik açıdan hastalarda uygulanamaması nedeniyle çalışmanın bu bölümünde hayvan deneylerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Sonuç olarak, DF-MKH'lerin Th2 immün yanıtın baskın olduğu PV hastalarında çeşitli düzenleyici etkiler göstermiştir. Otoreaktif olmayan CD4⁺ naif T lenfosit ve CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Tregülatör hücre düzeyinin artması ile birlikte otoreaktif olan CD4⁺ T lenfosit proliferasyonunu azaldığı sonucu açık bir şekilde ifade edilmiştir. Ayrıca IFN- γ , IL-10 düzeyini arttırarak ve IL-4, TNF α düzeyini düşürerek düzenleyici etkisinin destekleyici sonuçlar almış bulunmaktayız. Mevcut ilaç tedavilerin yan etkisi göz önünde bulundurulduğunda, PV hastalığında DF-MKH' ler hücresel tedavilere yeni bir alternatif oluşturma veya immün sistem düzenleyici sonuçlarına bağlı olarak kür tedavi olarak kullanımı gündeme gelmektedir. Çalışmamız hastalığın patogenezi immünolojik düzeyde aydınlatma ve ileride yapılacak olan *in-vivo* çalışmalara öncülük etme potansiyelindedir.

8. KAYNAKLAR

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

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

Adams JM, Cory S. Transgenic models of tumor development. Science. 1991; 22;254(5035):1161-7.

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

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

Amagai M, Klaus-Kovtun V, Stanley JR. Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion, Cell. 1991; 29;67(5):869-77.

Amagai M. Desmoglein as a target in autoimmunity and infection., J Am Acad Dermatol. 2003; 48(2):244-52.

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

Andrukhov O, Behm C, Blufstein A, Rausch-Fan X. Periodontology and Dental Implantology. 1th. 2018; P: 21-49.

Bellamy COC, Malcomson RDG, Harrison DJ and Wyllie AH. Cell death in health and

disease: the Biology and regulation of apoptosis. Seminar in CancerBiol. 1995; 6: 3-16.

Browne VW, McClain KL, Talpaz M, Ordonez N, Estrov Z. Physiology and pathophysiology of dendritic cells. Hum Pathol 1997; 28:563-79.

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

Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. Nat Immunol. 2004; 5(12):1219-26.

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

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

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death, Toxicol Pathol. 2007; 35(4):495-516.

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

Foti M, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cell interactions and cytokine production. In: Cytokines as Potential Therapeutic Targets for Inflammatory Skin Diseases. Ernst Schering Res Found Workshop 2006; 56:61-80.

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

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

Genç D, Zibandeh N, Nain E, Gökalp M, Özen AO, Göker MK, Akkoç T. Dental Follicle Mesenchymal Stem Cells Downregulate Th2 Mediated Immune Response in Asthmatic Patients Mononuclear Cells. *Clin Exp Allergy*. 2018 Jun;48(6):663-678.

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

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

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

Hennerici T, Pollmann R, Schmidt T, Seipelt M, Tackenberg B, Möbs C, Ghoreschi K, Hertl M, Eming R. Increased Frequency of T Follicular Helper Cells and Elevated Interleukin-27 Plasma Levels in Patients with Pemphigus. *PLoS One*. 2016; 12;11(2): e0148919.

Hochrein H, O’Keeffe. Dendritic cell subsets and toll-like receptors. *Handb Exp Pharmacol* 2008; 183:153-79.

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

Itano AA, Jenkins MK. Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. *Nat Immunol*. 2003; 4(8):733-9.

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

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

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

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

Kasperkiewicz M, Ellebrecht CT, Takahashi H, Yamagami J, Zillikens D, Payne AS, Amagai M. Pemphigus. *Nat Rev Dis Primers*, 2017; 11;3:17026.

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

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

Lee SH, Hong WJ, Kim SC. Analysis of Serum Cytokine Profile in Pemphigus, *Ann Dermatol*, 2017; 9(4):438-445.

Lipscomb MF, Wilder JA, Masten BJ. Dendritic cells and their role in linking innate and adaptive immune responses. In: Gessani S, Belardelli F eds. The biology of dendritic cells and HIV infection. Springer 2007; 45-84.

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

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

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

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

Masjedi M, Esmaeil N, Saffaei A, Abtahi-Naeini B, Pourazizi M, Haghjooy Javanmard S, Asilian A. Cytokine Indexes in Pemphigus Vulgaris: Perception of Its Immunopathogenesis and Hopes for Non-Steroidal Treatment. *Iran J Pharm Res*. 2017; 16 (3):1223-1229.

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

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

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

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999; 284:143–147.

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

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

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

Ruocco V, Ruocco E, Lo Schiavo A, Brunetti G, Guerrera LP, Wolf R. Pemphigus: Etiology, pathogenesis, and inducing or triggering factors: Facts and controversies, *Clin Dermatol*, 2013; 31(4):374-381.

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

Satyam A, Khandpur S, Sharma VK, Sharma A. Involvement of T(H)1/T(H)2 cytokines in the pathogenesis of autoimmune skin disease-Pemphigus vulgaris, *Immunol Invest.* 2009; 38(6):498-509.

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

Sinha AA. The genetics of pemphigus, *Front Med (Lausanne)*. 2011; 14; 5:226.

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

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

Stanley JR, Amagai M. Pemphigus, bullous impetigo, and the staphylococcal scalded-skin syndrome, N Engl J Med. 2006; 26;355(17):1800-10.

Steinman R. Some interfaces of dendritic cell biology. APMIS 2003; 111:675-97.

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

Sugiyama H, Matsue H, Nagasaka A, Nakamura Y, Tsukamoto K, Shibagaki N, Kawamura T, Kitamura R, Ando N, Shimada S. CD4+CD25^{high} Regulatory T Cells Are Markedly Decreased in Blood of Patients with Pemphigus Vulgaris, Dermatology, 2007; 214(3):210-20.

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

Tavakolpour S, Tavakolpour V, Interleukin 4 inhibition as potential therapeutic in pemphigus, Elsevier – Cytokine, 2015; 77:189-95.

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

Torzecka JD, Woźniak K, Kowalewski C, Waszczykowska E, Sysa-Jedrzejowska A, Pas HH, Narbutt J. Circulating pemphigus autoantibodies in healthy relatives of pemphigus patients: coincidental phenomenon with a risk of disease development. *Arch Dermatol Res,* 2007; 299(5-6):239-43.

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

Ulusoy C, Zibandeh N, Yıldırım S, Trakas N, Zisimopoulou P, Küçükerden M, Taşlı H, Tzartos S, Göker K, Tüzün E, Akkoç T. Dental follicle mesenchymal stem cell administration ameliorates muscle weakness in MuSK-immunized mice. *J Neuroinflammation.* 2015 Dec 9;12:231.

Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cells response to p53. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:594-604.

Walker MR, Kasprovicz DJ, Gersuk VH, Van Landeghen M, Buckner JH and Ziegler SF. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4⁺ CD25⁺ T cells, *J Clin Invest.* 2003; 112:1437-43.

Wei X, Yang X, Han Z, Qu F, Shao L and Shi Y. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacologica Sinica.* 2013, 34: 747–754.

Yeşilyurt E, Fidan I. Dendritik Hücreler ve Enfeksiyonlardaki Rolü. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2011; 41(3):91-102.

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

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

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



Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	09.2018.330
	PROJE ADI	DF-MKH' lerin PV' li Hastaların Dendritik Hücre ve Lenfositleri Üzerindeki İmmünregülatör Etkilerinin Araştırılması
	SORUMLU ARAŞTIRICI UNVANI/ADI	Prof. Dr. Tunç AKKOÇ

KARAR BİLGİLERİ	Tarih 06.04.2018 Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için Kurulumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımcılar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir.
-----------------	--

ÜYELER					
Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu / EK Üyeliliği	Onaylanan Proje ile İlişkisi	Toplantıya Katılım	İmza
Prof.Dr. Haner DİRESKENELİ	Romatoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/ Başkan	☐ Var ☐ Yok	☐ Evet ☐ Hayır	
Prof.Dr. Tülin ERGUN	Dermatoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Başkan Yrd.	☐ Var ☐ Yok	☐ Evet ☐ Hayır	
Prof. Dr. Şefik GÖRKEY	Tıp Tarihi ve Etik	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	☐ Var ☐ Yok	☐ Evet ☐ Hayır	
Prof.Dr. Handan KAYA	Patoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	☐ Var ☐ Yok	☐ Evet ☐ Hayır	
Prof.Dr. M.Bahadır GÜLLÜOĞLU	Genel Cerrahi	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	☐ Var ☐ Yok	☐ Evet ☐ Hayır	
Prof.Dr. Atilla KARAALP	Farmakoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	☐ Var ☐ Yok	☐ Evet ☐ HAYIR	
Prof.Dr. Semra SARDAŞ	Eczacı	M.Ü Eczacılık Fak./Üye	☐ Var ☐ Yok	☐ Evet ☐ Hayır	
Prof.Dr. Başak DOĞAN	Diş Hekimi	M.Ü Diş Hekimliği Fak./Üye	☐ Var ☐ Yok	☐ Evet ☐ Hayır	
Prof. Dr. Beste Melek ATASOY	Radasyon Onkolojisi	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	☐ Var ☐ Yok	☐ Evet ☐ Hayır	
Doç. Dr. Elif KARAKOÇ AYDINER	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	☐ Var ☐ Yok	☐ Evet ☐ Hayır	
Doç.Dr. Meltem KORAY	Diş Hekimi	İstanbul Üniv. Diş Hekimliği Fak./Üye	☐ Var ☐ Yok	☐ Evet ☐ Hayır	
Doç. Dr. Gürkan SERT	Hukukçu	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	☐ Var ☐ Yok	☐ Evet ☐ Hayır	
Doç.Dr. Figen DEMİR	Halk Sağlığı	Acibadem Üniv. Tıp Fak.	☐ Var ☐ Yok	☐ Evet ☐ Hayır	
Doç.Dr. Pınar Mega TİBER	Biyofizik	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	☐ Var ☐ Yok	☐ Evet ☐ Hayır	
Gözde Aynur MİRZA	Sağlık Mensubu olmayan kişi	Serbest	☐ Var ☐ Yok	☐ Evet ☐ Hayır	

ÖZGEÇMİŞ

Adı	YAZGÜL	Soyadı	DURAN
Doğum Yeri	ELAZIĞ	Doğum Tarihi	01.11.1993
Uyruğu	TC	Tel	05321643445
E-mail	yazgul.duran@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans		
Lisans	Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2015
Lise	Zeynep Kamil Anadolu Sağlık Meslek Lisesi	2011

İş Deneyimi

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
	Sağlık Memuru	İstanbul İl Sağlık Müdürlüğü	(2011-2013)
	Sağlık Memuru	İstanbul 112 Anadolu KKM	(2013-.....)

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

Yabancı Dil Sınav Notu #								
YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
41,7								

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	75		
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok İyi
Graph Pad	İyi

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

EK : Diğer Bilimsel faaliyetler (yayın, kongre bildirisi vs.)