Melis ÇELİK

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

TOLERANS İNDÜKLEYİCİ ANTİJEN SUNAN HÜCRELERİN OLUŞTURULMASI İÇİN FARKLI YAKLAŞIMLARIN KARŞILAŞTIRILMASI

Melis ÇELİK

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

BURSA-2023

İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ

2023

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

TOLERANS İNDÜKLEYİCİ ANTİJEN SUNAN HÜCRELERİN OLUŞTURULMASI İÇİN FARKLI YAKLAŞIMLARIN KARŞILAŞTIRILMASI

Melis ÇELİK

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

DANIŞMAN:
Prof. Dr. H. Barbaros ORAL

1381- Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi

BURSA-2023

T.C.

BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum "**Tolerans İndükleyici Antijen Sunan Hücrelerin Oluşturulması İçin Farklı Yaklaşımların Kararlaştırılması**" adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasınakadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Melis ÇELİK

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

Adı Soyadı: Melis ÇELİK
Anabilim Dalı: İmmünoloji
Tez Konusu: Tolerans İndükleyici Antijen Sunan Hücrelerin Oluşturulması İçin Farklı Yaklaşımların Kararlaştırılması''

ÖZELLİKLER	UYGUNDUR	UYGUN DEĞİLDİR	AÇIKLAMA
Tezin Boyutları	■	❑	
Dış Kapak Sayfası	■	❑	
İç Kapak Sayfası	■	❑	
Kabul Onay Sayfası	■	❑	
Sayfa Düzeni	■	❑	
İçindekiler Sayfası	■	❑	
Yazı Karakteri	■	❑	
Satır Aralıkları	■	❑	
Başlıklar	■	❑	
Sayfa Numaraları	■	❑	
Eklerin Yerleştirilmesi	■	❑	
Tabloların Yerleştirilmesi	■	❑	
Kaynaklar	■	❑	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. H. Barbaros ORAL

İmza:

İÇİNDEKİLER

DIŞ KAPAK
İÇ KAPAK
ETİK BEYANI II
KABUL ONAY SAYFASI III
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU IV
İÇİNDEKİLER V
TÜRKÇE ÖZET VII
İNGİLİZCE ÖZET VIII
1.**GİRİŞ 1**
2.GENEL BİLGİLER 2
2.1. Antijen Sunan Hücreler 3
2.1.1. Dendritik Hücre 3
2.1.1.1. Klasik DH'ler (Konvensiyonel DH'ler) 4
2.1.2. B Hücre 6
2.1.3. Makrofajlar 7
2.2. İmmün Tolerans 8
2.2.2. Anerji 11
2.2.3. Treg'ler Tarafından Baskılanma 12
2.2.4. Apoptotik Hücre Ölümü ile T Hücrelerinin Silinmesi 12
2.2.5. B Lenfosit Toleransı 13
2.3. Otoimmünite 14
2.3.1. Patogenez 14
2.3.2. Genetik Faktörler 15
2.3.3. Enfeksiyonlar ve Diğer Çevresel Faktörlerin Etkisi 15
2.4. Tolerojenik Dendritik Hücreler 17
2.4.1. Tolerojenik Geri Bildirim Döngüleri 21
2.4.2. DH'lerde Tolerogeneze Giden Yol: Transkripsiyonel Belirleyiciler 22
2.5. D Vitamini Metabolizmasına Genel Bakış 23
2.5.1. DH'ler Olgunlaşma – Eş uyarım 24
2.5.2. DH Sitokin Üretimi 25
2.5.3.D3 Vitamini Kaynaklı Tolerojenik Dendritik Hücreler (VITD3-tolDH) 26
2.6. Glukokortikoidler 27
2.6.1 Deksametazonun İmmün Düzenleyici Etkileri-Sitokinler 28
2.6.2 .Dex-DH'nin İn Vivo Kullanımı 28

2.6.3 Deksametazon/VitaminD3-Tolerojenik Dendritik Hücreler (DEX/VITD3-tolDH) 29
2.7. A151 ODN (Oligonükleotid) ile İndüklenen Dendritik Hücreler 29
3.GEREÇ VE YÖNTEM……..32
3.1. Çalışmada Kullanılan Maddeler 32
3.2 Hazırlanan Tampon ve Çözeltiler 32
3.3 Dendritik Hücre İzolasyonu 33
3.4 Hücre Sayımı 35
3.5 Dendritik Hücre, Makrofaj ve RAW.264.7 Hücrelerinin Canlılık Analizi 36
3.6. Dendritik Hücre / Makrofaj/ RAW.264.7 Hücre Hattı Karakterizasyonu 36
3.7 .Dendritik Hücrelerin Üzerine Farmakolojik Ajanların Eklenmesi 37
3.8. Kemik İliği Türevli Makrofajların İzolasyonu ve Kültürü 38
3.9. Hücre Hatları ile İn-vitro Çalışmalarının Planlanması 39
3.9.1 Hücre Hattının Kültürü 39
4.BULGULAR 41
4.1 .Makrofaj CD80 ve CD86 Ekspresyon Sonuçları 41
4.2 .RAW 264.7 Hücre Hattı CD80 ve CD86 Ekspresyon Sonuçları 50
4.3. Dendritik Hücre CD80 ve CD86 Ekspresyon Sonuçları 52
5.TARTIŞMA VE SONUÇ……...56
6.KAYNAKLAR 59
7.SİMGELER VE KISALTMALAR 66
8.EKLER 67
9.TEŞEKKÜR 69
10.ÖZGEÇMİŞ 70

TÜRKÇE ÖZET

Otoimmün hastalıkların tedavisi için birçok ilaç ve biyolojik ajan kullanılmaktadır. Bunların hedef organ veya dokularda terapötik düzeylere ulaşabilmesi için yüksek dozlarda uygulanması gerekir. Bu ise ciddi yan etkilere sebep olabilmektedir. Bu durumda alternatif yaklaşımlardan biri tolerans indükleyici özellik kazandırılmış dendritik hücre ve makrofajların sistemik ve/veya lokal uygulanması olabilir.

Çalışmamızda TolDH'ler ve M2 fenotipli makrofaj oluşturulması için farklı yaklaşımların karşılaştırılması amaçlanmaktadır. C57BL/6 ve BALB/c farelerinden kemik iliğinden elde ettiğimiz dendritik hücrelere belirli konsantrasyonlarda vitamin D3, deksametazon ve A151 ODN uygulanmıştır ve CD80, CD86 yüzey ifadelerine bakılmıştır. Fare kemik iliğinden elde edilen makrofaj ve RAW.264.7 hücre hattına ise belirli konsantrayonlarda A151 ODN eklenerek CD80 ve CD86 düzeylerine bakılmıştır.

Sonuç olarak kemik iliğinden türevlenen makrofajlarda A151 ODN CD80 ve CD86 düzeylerinin belirgin şekilde düşmesine neden olmaktadır. Bu sonuçlar istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur. Dendritik hücrelerde ise vitamin D3+deksametazon kombinasyonlarında ve A151 ODN eklenen koşullarda CD80 ve CD86 ekspresyonlarında azalma gözlenmiştir.

Bu sonuçlara göre A151 ODN ile indüklenen kemik iliğinden türevlenen makrofajların ve tolerojenik hale getirilen dendritik hücrelerin otoimmün hastalıklarda terapötik tedavi yöntemi olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Vitamin D3, Deksametazon, A151, TolDH, Makrofaj

İNGİLİZCE ÖZET

Comparison of Different Approaches for Generation of Tolerance Inducing Antigen Presenting Cells

Many drugs and biological agents are used for the treatment of autoimmune diseases. To achieve therapeutic levels in target organs or tissues, they need to be administered in high doses, which can lead to serious side effects. In such cases, one alternative approach could be the systemic and/or local administration of dendritic cells and macrophages with induced tolerance-inducing properties.

In our study, we aim to compare different approaches for the generation of TolDHs (tolerogenic dendritic cells) and M2 phenotype macrophages. Dendritic cells derived from the bone marrow of C57BL/6 and BALB/c mice were treated with specific concentrations of vitamin D3, dexamethasone, and A151 ODN, and the expression of CD80, CD86, and CD11c markers was examined. Macrophages and the RAW.264.7 cell line were treated with specific concentrations of A151 ODN, and the levels of CD80 and CD86 were assessed.

As a result, A151 ODN treatment significantly reduced the levels of CD80 and CD86 in bone marrow-derived macrophages. These results were found to be statistically significant. In dendritic cells, a decrease in CD80 and CD86 expressions was observed with vitamin D3+dexamethasone combinations and under conditions where A151 ODN was added.

Based on these results, it is may be suggested that A151 ODN-induced bone marrow-derived macrophages and tolerogenic dendritic cells could be used as a therapeutic treatment approach in autoimmune diseases.

Keywords: Vitamin D3, Dexamethasone, A151, TolDH, Macrophage

1. GİRİŞ

Otoimmün hastalıklar, immün homeostazın bozulması ve spesifik endojen veya eksojen antijenler tarafından tetiklenen uzun süreli veya tekrarlayan inflamatuar yanıtlarla karakterize edilir. Bu hastalıkların bazıları için onaylanmış tedaviler, metotreksat (inhibitör) gibi küçük moleküllerden çeşitli immünomodülatörlerin ve immünosüpresanların uygulanmasını içerebilir. Bu ajanlar, belirli otoimmün ve inflamatuar hastalıkların sonuçlarını büyük ölçüde iyileştirebilse de bunların çoğu, yaşam boyu uygulama gerektiren spesifik olmayan ilaçlardır; bu nedenle, sıklıkla önemli toksisiteler ve ikincil enfeksiyon veya kanser gelişimi riski ile ilişkilidirler. Bu toksisiteler/riskler, faydalı immün düzenleyici ağların baskılanmasını içerebilen genelleştirilmiş ve kalıcı bir immünosüpresif durumun indüklenmesinden kaynaklanabilir. Bu nedenle TolDH bazlı tedavi umut verici bir tedavi alternatifini temsil eder. "Bulaşıcı tolerans" hipotezine göre, TolDH' ler kendi kendini güçlendiren tolerojenik devreleri tetikleyebilir ve bu tür bir terapinin potansiyel olarak uzun süreli faydalı etkiler sağlayabileceği ve hatta iyileştirici olabileceği yönündeki spekülasyonları davet edebilir. 'Bulaşıcı tolerans' kavramı, bir kez düzenleyici bir popülasyon tarafından oluşturulan bir tolerojenik sinyalin, diğer hücre popülasyonlarını, yine toleransı teşvik edebilen bir tolerojenik fenotipe doğru yeniden güçlendirdiği bir süreci ifade eder. Bununla birlikte, insan TolDH' leri, immünosüpresif pleiotropik üretimini uyararak Treg ve Breg indükleyebilir ve yeniden programlayabilir.

Çalışmamızda C57BL/6 ve BALB/c farelerinden elde ettiğimiz dendritik hücreleri farmakolojik ajanlarla (vitamin D3, deksametazon) ve A151 ODN isimli immünosüpresif bir oligonükleotid ile tolerojenik hale getirmeyi hedefledik. İn vitro ortamda çoğaltılan bu hücreler ile güçlü enflamatuvar bir çevre varlığında dahi stabil tolerojenik hücreler olması ve immün düzenleyici moleküller üretmesi ile Treg gelişimini ve çoğalmasını desteklemesi hedeflenmekte olup,ileriki çalışmalarda bu TolDH' lerin adaptif hücre transferi sonucu in vivo ortamda periferal toleransı indüklenmesi amaçlanmaktadır.

Çalışmamızda olan diğer hücre grubuda makrofajlardır. Makrofajlar, bulundukları mikroçevresel koşullardaki değişikliklere göre M1 ve M2 makrofajlarına polarize

edilebilirler. M1 makrofajları inflamasyonun gelişimini teşvik eder, hücre dışı matris bozulmasını ve apoptozu hızlandırır ve Th1 tipi bağışıklık tepkisini düzenler ve teşvik eder. M2 makrofajları ise T hücrelerinin çoğalmasını ve aktivasyonunu engeller, Th2 bağışıklık tepkisini düzenler ve doku yeniden şekillenmesine yardımcı olur. Makrofaj polarizasyonu, otoimmün hastalıklarda önemli bir rol oynar, makrofajlar çoğunlukla hastalık onarımının erken evresinde proinflamatuar M1 olarak ortaya çıkar ve iyileşmeyi destekleyen M2 tipi, hastalık onarımının geç evresinde yaygındır. M1/M2 polarizasyonundaki dengesizlik, otoimmün hastalıklarda hayati bir rol oynar. Bu nedenle, makrofaj polarizasyonunun yönünü düzenlemek, otoimmün hastalık patogenezini iyileştirebilir. Şu anda, makrofaj polarizasyonunu düzenlemeye odaklanan otoimmün hastalıklar için terapötik hedefler bulmaya yönelik terapötik strateji önemli ilerleme kaydetmiştir. Çalışmamızda C57BL/6 ve BALB/c farelerinden elde ettiğimiz kemik iliğinden türevlenen makrofajları belirli konsantrasyonlarda immünsüpresif bir oligonükleotid olan A151 ODN ekleyerek M2 fenotipinine dönüştürmeyi hedefledik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Antijen Sunan Hücreler

Majör histokompatibilite kompleksi (MHC) moleküllerinin yapımını, peptit yüklemesini ve MHC/peptit kompleksinin aynı türevden geçen veya alınan T hücreleri ile etkileşime girebileceği hücre yüzeyine lokalizasyonunu kapsayıp, birden fazla moleküle yarar sağlayan biyolojik prosese, Antijen Sunumu adı verilmektedir. (Lees, 2019) Bu olay, mikrobiyal patojenlere ve tümörlere karşı etkin bir immün tepki oluşturmada önemli bir durumdur. Dokuları neo-antijenler dahil olmak üzere farklı antijenler için tarayan dendritik hücreler (DH'ler) Profesyonel Antijen Sunan Hücreler (APC'ler)' dir. DH'ler ekzojen antijenin alınması ve patojen veya tehlike/hasarla ilişkili moleküler patern reseptörleri aracılığıyla eş zamanlı bir aktivasyon üzerine, olgun DH'lere farklılaşır ve lenf düğümlerine göç eder. (Banchereau ve ark. 2000) Sonra, orada T hücrelerini hazırlayıp bir immün tepki başlatırlar. T hücresi fonksiyonu üzerindeki bu durum, DH tarafından sağlanan ortak uyarıcı sinyaller (örn. CD80/86) ve ortak inhibe edici sinyalleri (örn. PD-L1) kapsayan sinyallerin çeşidine bağlıdır. Eğer ortamda yeteri kadar yardımcı uyarıcı sinyaller yok ise, anerjinin indüklenmesine sebep olur. Böylece immünolojik toleransı destekler, güçlü yardımcı uyarıcı sinyaller T hücrelerinin aktifleşmesine izin verir. (Maldonado, & Andrian,2010)

Yapısal olarak MHC sınıf II moleküllerini eksprese eden hücreler; Dendritik hücreler (DH'ler), B hücreleri ve makrofajlardır. Bu hücreler, immün sistemin profesyonel antijen sunan hücreleri (APC'ler) olarak tarif edilmektedir. (Kambayashi, & Laufer, 2014)

2.1.1. Dendritik Hücre

İmmün cevapların başlatılması ve kontrol edilmesi kanda, dokularda ve lenfoid organlarda bulunan dendritik hücreler (DH) tarafından yapılmaktadır. DH'nin önemli bir fonksiyonel özelliği doğal ve edinsel bağışıklık sistemleri arasında köprü görevi görmesidir.

DH, doğal bağışıklık hücrelerinden biri olarak kabul edilir. Çünkü, patojenle ilişkili ve tehlikeyle ilişkili sinyalleri tanıyıp bunları cevaplayarak akut enflamatuvar yanıtı biçimlendirirler. Edinilmiş bağışıklıktaki önemli görevi, hücre dışı ve hücre içi proteinleri işleyip T hücrelerine sunmaktır. (Collin, & Bigley, 2018) Çeşitli DH alt tipleri, bazı organlarda yara iyileşmesine, proinflamasyona, antitümör atağına aracılık eden farklı fenotipik ve fonksiyonel özelliklere göre tarif edilmiştir. Doğal ve edinilmiş bağışıklık hücrelerinin yanıtlarını düzenleyen başlıca dendritik hücreler; plazmasitoid veya tolerojenik DH'ler'dir. Bunlar otoimmün reaksiyonların önüne geçilmesine fayda sağlamaktadır. (Vesper, & Schmetzer, 2020)

2.1.1.1. Klasik DH'ler (Konvensiyonel DH'ler)

Şekil 1'de gösterildiği gibi klasik dendritik hücre (kDH)'ler, yüzey moleküllerinin ifadesine göre, $CD8\alpha^+$ ve $CD103^+$ veya CD11b içeren olarak iki alt tipe ayrılabilir. Her iki alt tipin ortak özelliği; hem dalak, lenf düğümleri ve kemik iliği gibi lenfoid dokularda bulunurken aynı zamanda lenfoid olmayan dokuların çoğunda da yer alabilmesidir. (Zanna ve ark., 2021) Hem fenotip hem de gen ekspresyon imzası bakımından en iyi karakterize edilmiş kDH alt tipi; $CD8\alpha^+$ ve $CD103^+$ kDH'lerdir. Timus dışında, lenfoid organlarda en fazla yer alan kDH tipi ise $CD11b^+$ 'dir. Bunlar aynı zamanda, lenfoid olmayan dokularda da tanımlanmıştır. (Zanna ve ark., 2021)

2.1.1.2. Klasik olmayan DH'ler (Konvensiyonel olmayan DH'ler)

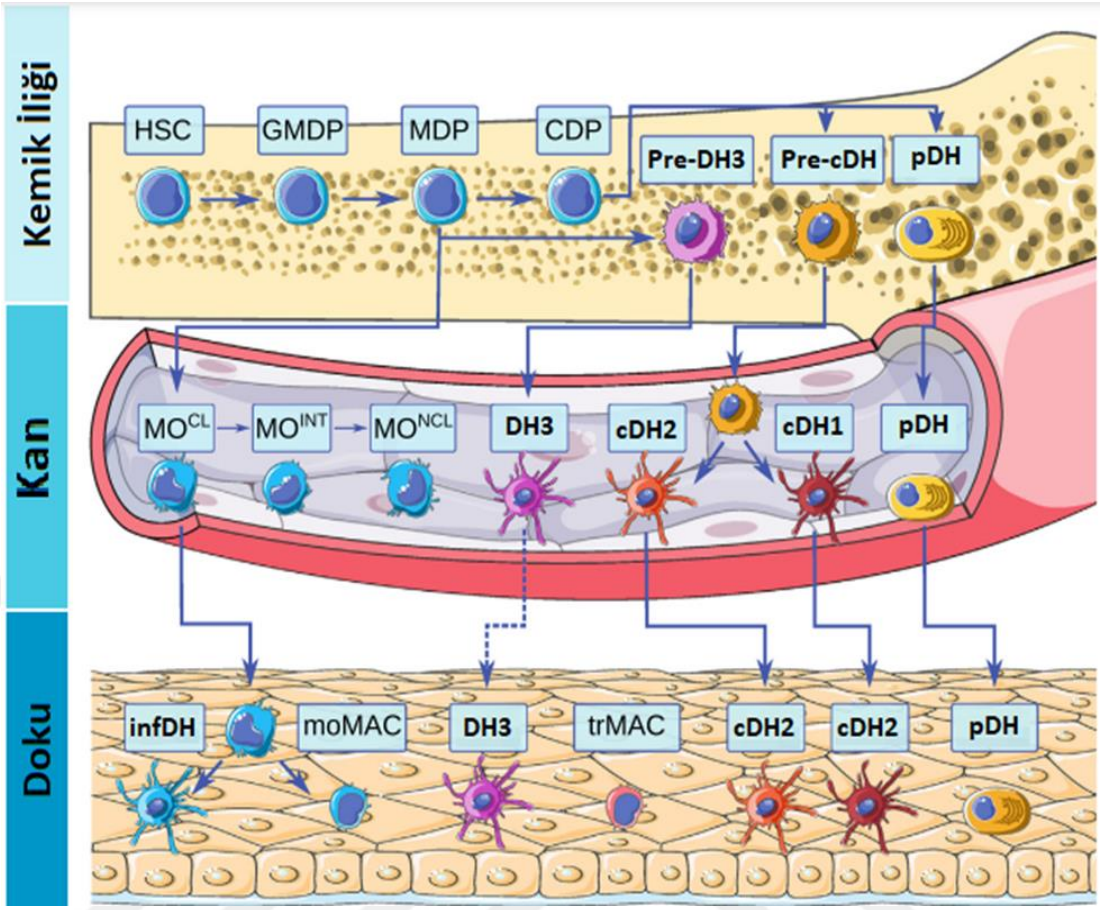
Monosit türevli Dendritik Hücreler (mo-DH) Dokulara alınan monositlerden doğan ve enflamasyon esnasında en baskın DH popülasyonu haline gelen, klasik olmayan dendritik hücre tipi monosit türevli DH'lerdir(mo-DH). Antijenleri doğrudan periferik dokularda $CD8^+$ T hücrelerine çapraz sunma konusunda önemli kabiliyete sahip DH alt tipi mo-DH'lerdir. mo-DH'leri kDH'lerden fenotipik olarak ayırt etmek zordur. Çünkü her ikisi de benzer MHCII, CD11b ve CD11c gibi fenotiplerle karakterizedir. (Maud Plantinga ve ark., 2013)

Plazmasitoid dendritik hücreler hem myeloid hem de lenfoid öncüleri aracılığıyla kemik iliğindeki (BM) hematopoietik kök hücrelerden üretilen klasik olmayan dendritik hücre tipi, insan plazmasitoid dendritik hücreleri (pDHler)'dir. (Ye, Gaugler, Mohty, & Malard, 2020) İnsan pDH'leri ile ilişkili fenotipler; (Lin) CD3, CD19, CD14, CD16 ve CD11c'yi ifade etmeyen, ancak seçici olarak CD303 (BDCA2), CD304 (BDCA4) ve immünoglobulin benzeri transkript 7'yi (ILT7) ifade eden olarak tanımlanmıştır. (Cao ve ark., 2006)

Langerhans veya epidermal dendritik Hücreler epidermiste bulunan olgunlaşmamış DH'lerin bir alt kümesi de Langerhans hücreleri (LH'ler)'dir. LH'ler, DH'lerden Birbeck granülleri aracılığıyla ayırt edilir. (Fukunaga, Khaskhely, Sreevidya, Byrne, & Ullrich, 2008) LH'ler, transmembran tip II $Ca2^{+}$'ya bağlı lektin, langerin/CD207'nin ifadesi ile tanımlanmıştır. LH'lerin özel konumları sebebiyle, patojenlere karşı ilk immün defansı oluşturduğu akla gelmektedir. (Fukunaga ve ark. ,2008)

Diğer dendritik hücreler B hücresi foliküllerinde bulunan immün sistemin hücrelerinden biri de foliküler dendritik hücreleri (FDH)'dir. (Hughes, Benson, Bedaj, & Maffia, 2016) FDH'lerin, antijenin edinildiği ilk enfeksiyon veya yaralanmanın temizlenmesinin yanısıra B hücreleri tarafından erişilebilen eşsiz bir şekilde uzun ömürlü bir antijen deposu sağladığı varsayılmaktadır. FDH'lerin, B hücre göçünün hayatta kalması ve çoğalmasıyla foliküler yardımcı T (Tfh) hücrelerinin CXCL13, BAFF, IL-15 ve IL-6 gibi B hücre alanlarına alınmasında yer alan birçok sitokinler, kemokinler üretir. (Hughes ve ark., 2016)

Daha az uyarıcı moleküller ve pro-enflamatuvar sitokinler ifade eden ve inhibitör moleküllerin (PD-L1 ve CTLA-4 gibi) ekspresyonunu düzenleyen dendritik hücre tipi tolerojenik dendritik hücre (tol-DH)'dir. Bu hücre tipi, IL-10 gibi anti-enflamatuvar sitokinler salgılar ve sağlıklı dokulara karşı reaksiyonları engellemek için önem arz eder. (Patente ve ark., 2019)



Yüzey Belirteçleri	pDH	cDH1	cDH2	DH3	infDH
İnsan	CD123⁺CD303⁺ CD304⁺	CD141⁺XCR1⁺ CLEC9A⁺IRF8⁺	CD88⁻CD1c⁺ CD2⁺CD163⁻	CD88⁻CD1c⁺ CD2⁺CD163⁺	CD88⁺CD1c⁺ S100A8/A9⁺ CD163⁻
Fare	CD45R⁺ CD45RA⁺ BST2⁺	XCR1⁺ CLEC9A⁺	CD11b⁺ CD172a⁺	???	Ly6C⁺F4/80⁺ CD11b/c⁺ CD206⁺

Şekil 1. Dokulardaki İnsan Dendritik Hücrelerinin (DC'ler) Ontojeni ve Farklılaşması

2.1.2. B Hücre

B hücreleri, insan vücudunda antikor fabrikası olarak nitelenmektedir ve hümoral bağışıklığa faydalarıyla tanımlanmıştır. B hücreleri, yüzeylerinde bir B hücresi reseptörünün (BCR) varlığıyla betimlenmiştir. B hücreleri aynı zamanda hem

MHC I hem de MHC II' yi ifade eder. Bu hücrenin fonksiyonları arasında; antijen alımı, işlenmesi ve sunumu için gerekli tüm mekanizmalar bulunmaktadır. (Rastogi ve ark., 2022) B hücreleri, ikincil lenfoid organlarda bulunur. Subkapsüler sinüsten foliküllere geçen lenfatik sıvıda küçük çözünür antijenlerle rastlaşabilirler. (Carrasco, & Batista, 2007) Foliküler B hücreleri aynı zamanda, makrofaj bakımından zengin subkapsüler sinüsteki büyük antijenler ve immün komplekslerle etkileşime girebilir. (Carrasco, & Batista, 2007) Lenf düğümlerinden göç eden bazı B hücreleri, parakortekste yer alan yerleşik DH'lerin veya yeni göç etmiş DH'lerin yüzeyinde sunulan antijenle rastlaşabilirler. B hücreleri, DH'lerle karşılaştırıldığında nispeten daha zayıf olmasına rağmen, bazı yapılan çalışmalar B hücrelerinin belirli uyaranlara maruz kaldığında antijen sunma kapasitelerinin önemli ölçüde artabileceğini belirtmiştir. (Rastogi ve ark., 2022) T hücreleri ile B hücresi etkileşimi çift yönlü olduğu bilinmektedir. IL-4, IL-2, IL-5 (BCGF-II) ve interferon gama gibi T hücresi kaynaklı sitokin, B hücresi aktivasyonunda önem arz etmektedir. (Hamilos, 1989)

2.1.3. Makrofajlar

Makrofajlar, periferik kandaki kemik iliği öncüllerinden ve ana monositlerden türetilir. Doku yaralanması veya enfeksiyonundan sonra konak dokularının homeostazisinde görev alan doğal immün sisteminin fonksiyonel hücreleridir. (Verschoor, Puchta, & Bowdish, 2012) Monositler (Mo) ve makrofajlar (Mϕ), immün düzenleme, enflamatuvar ve doku onarım gibi özel fonksiyonlara sahip olup birçok otoimmün hastalığın gelişmesine katkıda bulunur. Bu hücreler aynı zamanda, hastalıklı dokuya immün hücreleri stimüle eden ve toplayan çeşitli sitokinler ve kemokinler sekrete edebilir. (Ma, Gao, Gu, & Chen, 2019) Makrofajlar farklı dokularda bulunur. Bulundukları yerlerdeki değişikliklere bağlı ve polarize edilerek M1 makrofajları ve M2 makrofajları gibi farklı makrofaj alt tipleri meydana getirir. Akut enfeksiyonlar veya tümörler esnasında virüslere ve hücre içi bakterilere karşı konak koruması için önemli bir duruma M1 makrofajları sahiptir. M1 makrofajları; nitrik oksit (NO) veya reaktif oksijen ara ürünleri (ROI) gibi mikrobisidal ve tümörisidal reaktifler meydana getirme gibi önemli fonksiyonlara sahiptir. (Sica ve ark., 2008; Martinez, & Gordon, 2014) Makrofajların M1 tipine polarizasyonunu;

IFN-γ, lipopolisakarit (LPS) ve granülosit-makrofaj koloni stimülasyon faktörü (GM-CSF) gibi önem arz eden yapılar indükler. Anti-enflamatuvar cevaplar verebilen ve hasarlı dokuları onarma özelliği gösteren makrofaj tipi, M2 makrofajlarıdır. Enfekte olmuş dokularda, makrofajlar ilk olarak konağın patojenlere karşı mücadelesine yardım etmek adına pro-enflamatuvar M1 fenotipine polarize edilme yönelimindedir. (Yunna, Mengru, Lei, & Weidong, 2020) Uygulanan uyaranlara ve transkripsiyonel değişikliklere tabi olarak M2 makrofajları, M2a, M2b, M2c ve M2d olmak üzere dört alt tipe ayrılır. (Lee, 2019) IL-4, IL-13, mantar ve helmint enfeksiyonları esnasında stimüle edilen ve Th2 immün tepkisi ile korele olan M2 makrofaj tipi M2a'dır. İmmün reaksiyonları regüle eden TLR veya IL-1 reseptörü ligandları ile immün kompleksi aracılığıyla aktifleşen M2 makrofaj tipi M2b'dir. IL-10 ve Dönüştürücü Büyüme Faktörü-β (TGF-β) aracılığıyla stimüle edilen ve doku yeniden modellenmesine ve hücre dışı matris üretimine fayda sağlayan M2 makrofaj tipi M2c'dir. Son olarak; IL-6 ve adenosin aracılığıyla aktifleşen makrofaj tipi ise M2d'dir. M1/M2 makrofaj polarizasyonu, karmaşık bir aktivasyon mekanizmasını kolaya indirgeyebilir. Bazı otoimmün hastalık durumlarında hem M1 hem de M2 makrofajları aynı anda tespit edebilir ve bu makrofajların stimüle edici sitokinleri de mevcuttur. (Ma, Gao, Gu, & Chen, 2019) Makrofaj polarizasyonunun faydalı bir durumu, hücre yüzeyi işaretleyici ifadesinin değişiklik göstermesidir. CD80, CD86 ve CD16/32'yi yüksek şekilde eksprese eden ve pro-enflamatuvar sitokinleri sekrete eden makrofaj tipi, M1 makrofajıdır. M2 makrofajlarında önemli faktörler; Arjinaz-1 (Arg-1), mannoz reseptörü (CD206), anti-enflamatuvar faktör (IL-10) ve kemokinler CCL17 ve CCL22'nin ekspresyonudur. Aynı zamanda bu makrofaj tipi; doku onarımı, yeniden damar oluşumu ve metabolizmada kritik görevler alır.

2.2. İmmün Tolerans

Antijenlere maruz kalındığında, antijene özgü lenfositlerin inaktivasyonu veya ölümünün bir sonucu olarak, adaptif bağışıklık sisteminin antijenlere yanıt vermemesine immün tolerans denir. (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2022) Kendi antijenlerine karşı tolerans, edinilmiş bağışıklık sisteminin normal bir özelliğidir, ancak yabancı antijenlere karşı tolerans, belirli antijen maruziyeti koşulları altında

indüklenebilir. (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2022) Toleransı indükleyen antijenlere, onları bağışıklık oluşturan immünojenlerden ayırmak için tolerojenler veya tolerojenik antijenler denir. Bir antijen, spesifik lenfositler tarafından nasıl tanındığına bağlı olarak bir immünojen veya bir tolerojen olabilir. (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2007) Tolerans, spesifik olmayan immün baskılama ve immün yetmezlikten farklı olup antijene özgül bir süreçtir. (Owen, Punt, Stranford, Jones, & Kuby, 2013) Self-tolerans olarak da adlandırılan kendi antijenlerine tolerans, normal bağışıklık sisteminin temel bir özelliğidir ve self-toleransın başarısızlığı, kendi (otolog) antijenlere karşı bağışıklık reaksiyonlarına neden olur. Bu tür reaksiyonlara otoimmünite, neden oldukları hastalıklara da otoimmün hastalıklar denir. (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2022) İmmün yanıt gibi, tolerans da spesifiktir ve immünolojik hafıza gibi, T hücrelerinde, B hücrelerinde veya her ikisinde de bulunabilir. (Owen, Punt, Stranford, Jones, & Kuby, 2013)

2.2.1. T Lenfosit Toleransı

Transplantlara ve otoantijenlere karşı tolerans oluşturmak için geliştirilen terapötik stratejilerin çoğu, T hücrelerini etkisiz hale getirmeyi veya ortadan kaldırmayı amaçlar. Bunun nedeni, patolojik enflamatuar reaksiyonlara tipik olarak T hücrelerinin aracılık etmesi ve CD4+ yardımcı T hücrelerinin de B hücreleri tarafından potansiyel olarak zararlı antikorların üretimini teşvik etmesidir. (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2022)

Merkezi tolerans, kendi kendine reaktif T lenfositlerinin klonal olarak elimine edildiği timusta T lenfosit gelişimi sırasında ortaya çıkar. Merkezi tolerans, en kapsamlı olarak, gelişmekte olan T lenfositlerinin, olgun efektör hücrelere dönüşmeleri için gerekli olan ve gelişen lenfositlerin MHC molekülleri ile birlikte kendi peptitlerini tanıma yeteneğine dayanan iki seçim sürecinden geçtiği timusta incelenmiştir. (Snyder, 2017) Timusta bulunan antijen sunan hücreler (APC'ler) tarafından farklılaşan T hücrelerine sunulan öz-MHC molekülleri ile birlikte öz-peptitlerin tanınması, T hücrelerinin timik seçilimi ile sonuçlanır. Timik seçilim, timusta (α ve β zincir genlerinin ifade edildiği zaman) çift pozitif (DP; CD4+ CD8+) aşamasında ve sonrasında başlar. Bu sürecin iki önemli sonucu vardır: MHC

kısıtlaması (pozitif seçim) ve merkezi tolerans (negatif seçim). Timik kortikal epitel hücreleri, pozitif seçim olarak bilinen bir süreçte efektör hücreler olarak işlev görür. (Singh, Dubey, & Pinkhasov, 2013) Pozitif seçimde, kendi kendine MHC'yi bağlayabilen bir TCR taşıyan T hücreleri, hayatta kalmak ve çoğalmak için seçilir. Pozitif olarak seçilmeyen T hücreleri, apoptoz geçirmeleri için tetiklenir. Pozitif olarak seçilen timositler, negatif seçim olarak bilinen ikinci bir seçim aşamasından geçmelidir. Negatif seçim sırasında, timus içinde MHC'ye bağlı antijenik peptit ile sunulan herhangi bir T hücresi, eğer TCR ile MHC/kendi kendine peptit arasındaki avidite çok güçlüyse, apoptoz geçirmesi için tetiklenir. (Singh, Dubey, & Pinkhasov, 2013) Negatif seçime yol açan antijenler, plazma proteinleri ve hücresel proteinler gibi vücutta yüksek konsantrasyonlarda bulunan antijenlerdir. Normalde sadece periferik dokularda bulunduğu sanılan birçok öz proteinin timus epitel hücrelerinde olduğu gözlenmiştir. Bu periferik doku antijenleri, otoimmün düzenleyici (AIRE) proteininin kontrolü altında medüller timik epitel hücrelerinde (MTEC'ler) üretilir. (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2022) AIRE; Timik epitel hücrelerinde periferal doku protein antijenlerinin ekspresyonunu uyarma işlevi gören bir gen veya onun kodlanmış proteinidir. İnsanlarda ve farelerde AIRE genindeki mutasyonlar, AlRE'nin merkezi T hücre toleransındaki rolüyle tutarlı olarak, dokuya özgü otoimmün hastalığa yol açar. (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2007) Timusta negatif seçimdeki bir kusurdan kaynaklanan otoimmünitenin en iyi tanımlanmış örneği, otoimmün poliendokrin sendromudur (APS). Bu paratiroidler, adrenaller ve pankreatik adacıklar dahil olmak üzere çoklu endokrin organlarda antikor ve lenfosit aracılı hasar ile karakterize edilir. (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2007) Timusta kendi antijenlerini gören bazı kendi kendine reaktif CD4+ T hücreleri silinmez, bunun yerine bu antijenlere özgü Treg'lere farklılaşır. Düzenleyici hücreler timustan ayrılır ve periferik dokulara yerleşirler. (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2022)

Periferik tolerans, periferik dokulardaki kendi antijenlerini tanıyan olgun T hücrelerinin daha sonra bu antijenlere yanıt veremez hale geldiği mekanizmadır. (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2007) Periferik tolerans mekanizmaları, anerji (fonksiyonel yanıtsızlık), Treg'ler tarafından baskılanma ve apoptotik hücre ölümü ile T hücrelerinin silinmesidir. (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2022)

2.2.2. Anerji

Anerji indüksiyonu, lenfositin antijenle karşılaştıktan sonra işlevsel olarak yanıt vermediği, ancak hipo yanıt verme durumunda uzun süre canlı kaldığı başka bir lenfosit tolerans mekanizmasıdır. (Schwartz, 2003) Temel T hücresi anerjisi türleri iki gruba ayrılır. Biri esas olarak büyümeyi durdurma durumu klonal anerjidir ve diğeri adaptif tolerans veya in vivo anerjidir, proliferasyonun ve efektör fonksiyonların genelleştirilmiş bir inhibisyonudur. (Perez ve ark., 1997) Anerjiye karşı T hücresi aktivasyonunun iki sinyalli modeline göre, T hücrelerine TCR'lerin (sinyal 1) ve kostimülasyonun (CD28/B7; sinyal 2) tetiklenmesinin ön koşulunu sunma yeteneğine sahip ASH'ler, T hücresi aktivasyonunu indükler.

Anerjiyi indüklemek için başka bir mekanizma, aynı zamanda B7 moleküllerine bağlanan T lenfositleri üzerindeki CTLA-4 molekülleri tarafından spesifik bir inhibe edici sinyalin iletilmesini içerir. CTLA-4'ün B7 ile etkileşimi, IL-2 üretimini bloke ederek aktivasyonun inhibisyonu ile sonuçlanır. Anerji süreci geri döndürülemez. (Snyder, 2017) Kostimülatör moleküllerin normal doku tarafından sınırlı ekspresyonu, kendi kendine reaktif lenfositlere karşı periferik toleransın korunmasını kolaylaştırır. Genel olarak, hem CD28 dinlenme halindeki hem de aktive edilmiş T lenfositlerinde eksprese edilirken, CTLA-4 sadece aktive edilmiş T lenfositlerinde eksprese edilir. (Snyder, 2017)

T-hücre anerjisini oluşturan hücre-içsel programın daha iyi anlaşılmasına yol açmıştır. Anerjinin indüksiyon fazı sırasında, T hücrelerinin "eksik" uyarılması (ko-stimülasyon olmadan tetiklenen TCR), kalsiyum akışı yoluyla birkaç E3 ubikuitin ligazının up-regülasyonunu içeren değiştirilmiş bir gen ekspresyon programına yol açar.

Anerjik T hücreleri ASH'lerle temas ettiğinde, hücre içi sinyal proteinleri monoubikitine olur ve lizozomal bozunma için hedeflenir, böylece hücre içi sinyal iletimi azalır ve ayrıca T hücresi-APC temasının stabilitesinin azalmasına neden olur. (Heissmeyer ve ark., 2005)

2.2.3. Treg'ler Tarafından Baskılanma

Bir dizi T hücresi alt kümesinin otoimmüniteyi düzenlediği veya baskıladığı gösterilmiştir. Bu alt kümelerin en çok çalışılanı olan ve CD4+ CD25+ Foxp3+ hücreleri olarak tanımlanan Treg'ler, başka bir bölümde ("Düzenleyici Hücreler") açıklanmaktadır. (Singh, Dubey, & Pinkhasov, 2013) Bastırma, CD4+ TH1 lenfositlerinin daha önce tartışılan spesifik bir CD4+ T reg lenfosit popülasyonu tarafından çapraz regülasyonunun bir sonucu olarak ortaya çıkabilir. Spesifik olarak, IL-4, IL-10 ve TGF-β üreten CD25+ ve CD4+ Treg lenfositleri, lenfosit aktivasyonunu ve efektör fonksiyonunu etkili bir şekilde inhibe ederek TH1 yanıtlarını azaltır. (Snyder, 2017)

2.2.4. Apoptotik Hücre Ölümü ile T Hücrelerinin Silinmesi

Hem timusta hem de periferde kendiliğinden reaktif lenfositlerin silinmesi, apoptotik hücre ölümü ile sağlanır. Hem Fas hem de Bim aracılı apoptoz yolları, çevredeki kendi kendine reaktif lenfositler için önemli görünmektedir. (Xing, & Hogquist, 2012) Fas aracılı "ölüm reseptörü" sinyali ve "BCL-2 tarafından düzenlenen" apoptoz sinyali mekanik olarak farklı olsa da, bu yollar koordine edilir ve in vivo kendi antijenleri tarafından kronik olarak uyarılan T lenfositlerin öldürülmesinde işbirliği yapar. (Xing, & Hogquist, 2012) Kendi antijenlerini kostimülasyon veya eşlik eden doğuştan gelen bir bağışıklık tepkisi olmadan tanıyan T hücreleri, Rim adı verilen proapoptotik bir proteini aktive edebilir ve bu da mitokondriyal yolla apoptozla sonuçlanır. (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2007) Normal lenfosit yanıtlarında, TCR, kostimülatörler ve büyüme faktörlerinden gelen sinyaller, BcI-2 ailesinin (Bcl-2, Bcl-x) anti apoptotik proteinlerinin ekspresyonunu uyarır. ve bu proteinler, hücrenin hayatta kalmasını ve müteakip proliferasyonu destekler . (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2007) Lenfositler, TNF-reseptör ailesinin bir üyesi olan Fas'ı (CD95) eksprese etmek üzere indüklenebilir. Fas için ligand, FasL, birincil olarak aktive edilmiş T lenfositleri üzerinde eksprese edilir. Fas'ın FasL'ye bağlanması, aktive edilmiş T lenfositlerinin apoptozu ile sonuçlanır. Normal dokuda yüksek düzeyde eksprese edilen antijenler, kendi kendine reaktif T lenfositlerinin kalıcı olarak

uyarılmasına ve dolayısıyla Fas-FasL aracılı apoptoz yoluyla silinmeye neden olur. (Snyder, 2017) Çocuklarda FAS gen mutasyonları lenfositlerin birikimiyle birlikte otoimmün hastalık gelişimine yol açmaktadır. Otoimmün lenfoproliferatif sendrom (ALPS), malign olmayan organomegali, immün sitopeni ve artmış lenfoma riski ve ayrıca FAS aracılı apoptotik yoldaki mutasyon ile karakterizedir. (Kaya ve ark., 2021)

2.2.5. B Lenfosit Toleransı

T hücrelerinde olduğu gibi, kendi kendine tepkimeye giren B hücrelerinin toleransı, hem kemik iliğinde meydana gelen merkezi bir tolerans modunda hem de B hücrelerinin olgunlaşmasının farklı aşamalarında ve ayrıca olgun B hücrelerinin seviyesinde meydana gelen periferik tolerans modunda meydana gelir. (Singh, Dubey, & Pinkhasov, 2013) B lenfositlerinde tolerans, polisakkaritler ve lipidler gibi T'den bağımsız öz antijenlere yanıtsızlığı sürdürmek için gereklidir. B hücresi toleransı, protein antijenlerine karşı antikor yanıtlarının önlenmesinde de rol oynar. (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2022)

B hücre repertuvarında, merkezi tolerans (kemik iliğinde), hücre zarları veya katı yüzeylerle ilişkili kendi antijenlerini tanıyabilen gelişen B hücrelerinin klonal olarak silinmesiyle yapılır. Çözünür antijenle karşılaşıldığında, gelişmekte olan B hücreleri anerjik hale gelir (ve daha sonra periferde belirli koşullar altında yeniden etkinleştirilebilir) (Dembic, 2015)

B-hücresi reseptörü (BCR) sinyal gücü ve öz antijenin fiziksel yapısı (çözünür ve zara bağlı) seçim sürecinde önemli düzenleyici roller oynar. Daha güçlü sinyaller, klonal silinme adı verilen B hücrelerinin apoptozu ile sonuçlanır. (Singh, Dubey, & Pinkhasov, 2013) Daha zayıf sinyaller, B hücresini, anerji olarak bilinen bir durum olan antijen uyarımına yanıtsız hale getirir. Anerjik hücreler erken ölüme karşı hassastır. Bazı B hücrelerinde, rekombinant aktive edici gen (RAG) proteinlerinin yeniden ekspresyonu, receptor editing (reseptör düzenleme) olarak bilinen bir süreç olan, kendi kendine reaktif olan reseptörlerin kendi kendine reaktif olmayanlarla değiştirilmesine izin verir. (Singh, Dubey, & Pinkhasov, 2013) Reseptör düzenleme, otoreaktiviteyi ortadan kaldırmakta başarısız olursa, olgunlaşmamış B hücreleri silinebilir (yani, apoptoz ile ölürler). Self antijenlerin daha zayıf tanınması, hücre

ölümünden ziyade fonksiyonel inaktivasyona (anerji) yol açabilir. (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2007)

Periferde kalan potansiyel olarak otoreaktif B hücrelerinin çoğu, yeni göç eden B hücreleri saf immünokompetan lenfositlere dönüştüğünde uzaklaştırılır. (Wardemann, 2003) Kemik iliğinde olgunlaşmamış durumdan periferik lenfoid organlarda olgun naif duruma gelişmek için, bir B hücresinin birkaç kontrol noktasında hayatta kalması gerekir. (Jacobi, & Diamond, 2005) Self-antijenleriyle karşılaşma, B hücresinin hayatta kalmasını azaltır ve mitokondriyal yolla ölümü destekler. Periferde kendi antijenleriyle karşılaşan B hücreleri, normal, naif B hücrelerine göre lenfoid foliküllere daha az göç edebilir. (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2007) Foliküllerden ayrılan hücreler gerekli yaşam sinyallerini alamazlar ve ölürler. Anerjik B hücreleri herhangi bir antijene özgü yardımcı T hücresi ile karşılaşırsa, B hücreleri, FasL tarafından B hücreleri üzerinde Fas ile birleşen T hücreleri üzerinde öldürülebilir. (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2007)

2.3. Otoimmünite

Öz (self) antijenlere karşı immün yanıta, otoimmünite adı verilir. Gelişmiş ülkelerde toplumun %5 ila %10 arasında görülmektedir. Patojenik olan otoimmün hastalıklar daha az oranda görülmektedir. Otoimmün hastalıklar, bir veya birkaç organla sınırlı olabilir. Bazen, yaygın doku hasarı ve klinik bulgular ile sistemik de olabilme özelliği de gösterebilir. Otoimmün hastalıklarda meydana gelen doku hasarı genellikle, iki şekilde oluşur. İlki; öz-antijenlere karşı antikorların gelişim göstermesidir. İkincisi ise, öz antijenlere tepkili otoreaktif T hücrelerin meydana gelmesidir**.** (Abbas ve ark., 2022)

2.3.1. Patogenez

Otoimmünitenin gelişiminde, etkenler arasında, yatkınlık genlerinin kalıtımı ve enfeksiyonlar (çevresel uyarılar) yer alır. Öze tepkili T ve B lenfositlerinin kalıcı olmasına yol açtığı düşünülmektedir. Hücre, doku hasarına ve iltihaba sebep olan ise çevresel uyarılardır. Bunlar, otoimmün hastalıklardan sorumlu efektör T lenfosit ve

oto-antikorların meydana gelmesi ile neticelenen öze tepkili lenfositlerin aktifleşmesine katkıda bulunur**.** (Abbas ve ark., 2022)

2.3.2. Genetik Faktörler

Otoimmün hastalıkların çoğu kalıtımla korele olup; bunların içinde en büyük katkıyı MHC genleri yapmaktadır. Sıklık oranı ya da rölatif risk, otoimmün hastalığın bir HLA alelini taşıyan ve taşımayan bireyler arasında görülme sıklığı olarak isimlendirilmiştir. Sağlıklı bireylerde de polimorfik genler bulunmaktadır. Her bir genin otoimmünite gelişimine katkısı azdır. Sonucunda, otoimmün hastalık gelişimi için çok sayıda risk allelinin bulunması gerekir. Pek çok insan ve hayvanlardaki otoimmün hastalıklar, MHC allelleri ile koreledir. İnsan lökosit antijenleri (HLA) allelleri ile otoimmün hastalıklar arasındaki korelasyon eskiden beri bilinmekte ve T hücrelerinin de bu hastalıklarda kritik rol aldığının ilk kanıtlarından biridir. Belirli HLA allellerini taşıyan bireylerde, taşımayanlara oranla çok sayıda otoimmün hastalığın insidansı çok daha yüksek olup bu hastalıklara çoğunlukla, HLA allelleri (HLA-DR ve HLA-DQ) birliktelik gösterir. Bunun nedeni, sınıf II MHC moleküllerini, immün cevapları regüle ettiği gibi proteinlere karşı hem hücresel hem de hümoral immün cevaplarda rol alan CD4+ T hücrelerinin fonksiyonlarını da gözetlemesidir. Bazı otoimmün hastalıklarda da HLA-dışı (non-HLA) genler rol alabilir. Bunlar, öz toleransın yeterli olmamasına katkıda bulunur. (Abbas ve ark., 2022)

2.3.3. Enfeksiyonlar ve Diğer Çevresel Faktörlerin Etkisi

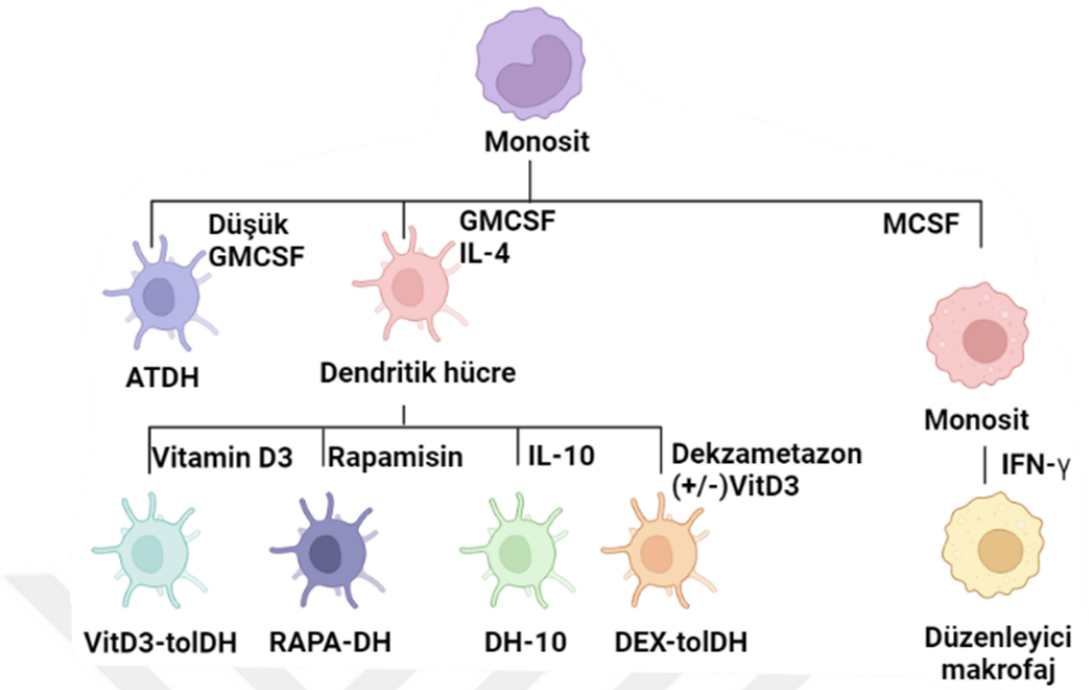
Otoimmün hastalıkların gelişim göstermesine, enfeksiyonlar da neden olabilir. Enfeksiyonlar öze tepkili lenfositleri etkin kılar ve birkaç yolla otoimmünitenin gelişimine katkıda bulunabilirler. Bir dokuda meydana gelen enfeksiyon, bulunduğu bölgedeki lokal doğal immün cevabı harekete geçirir. Böylelikle, doku ASH'lerinde eş-uyaran ve sitokin üretiminin yükselmesine sebebiyet verir. Sonucunda, etkin hale geçen ASH'ler dokuda karşılaştığı öz antijenlere karşı öze-tepkili T hücrelerini stimüle ederler ve bireylerde bu durum hastalığa neden olur. Tip-I interferon (IFN), virüslere

karşı doğal immün yanıtta üretilen önemli bir sitokindir. IFN'un önemli bir fonksiyonu; lenfositler ya da ASH 'leri etkinleştirebilir. Aynı zamanda bu sitokinin aşırı üretimi, sistemik lupus gibi önemli otoimmün hastalıklarda görülmesidir. (Abbas ve ark., 2022)

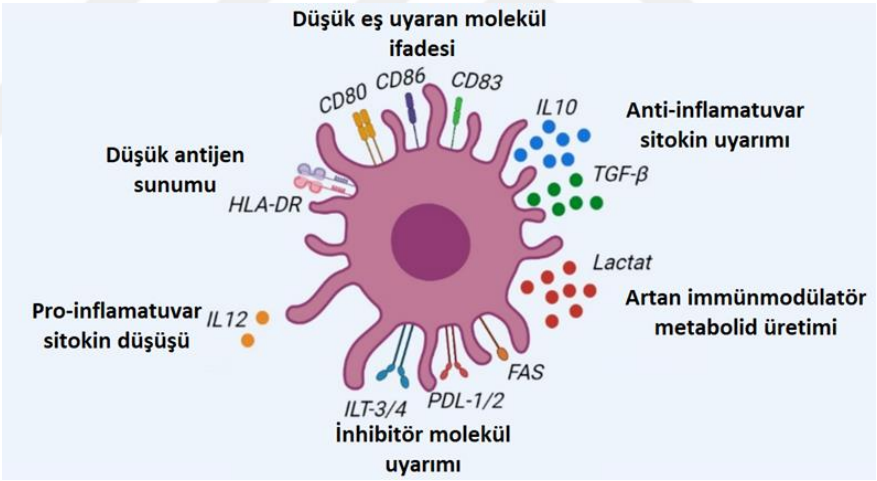
Bazı patojen mikroorganizmalar, öz antijenlerimize benzeyen veya çapraz reaksiyon gösteren peptidler meydana getirebilirler. Mikrobiyal peptidlere özgü immün cevaplar, öz antijenlere özgü immün saldırıya sebep olabilir. Moleküler benzerlik (mimicry), mikroorganizma peptitleriyle self-antijenlerimiz arasında gerçekleşen önemli bir terim olup otoimmün hastalıkların gelişim göstermesindeki katkısı, immünologların ilgisini çekmiştir. Bazı hastalıklarda, mikrobiyal proteinlere karşı üretilen antikorlar meydana gelebilir. Bu antikorlar, öz proteinlere bağlanabilir. Bunun en güzel örneği, romatizmal ateş hastalığıdır. Bu hastalıkta, streptokoklara karşı üretilen antikorlar, miyokardiyal antijenlerle çapraz reaksiyona girerek kalp hastalığına sebebiyet verirler. Enfeksiyonlara karşı gelişim gösteren doğal immün yanıt, öz antijenlerin kimyasal yapısını değiştirme özelliği gösterir. Örneğin periondantal bakteriyel enfeksiyonlar, romatoid artrit hastalığı ile beraber görülebilir. Enfeksiyonlar, dokuda hasara yol açabilir ve normalde bağışıklık sisteminden saklanmış antijenlerin ortama salınmasına da neden olabilir. Örneğin bazı saklı antijenler (başta; testis veya göz) immün sistem aracılığıyla yok sayılırlar. Bu antijenlerin (enfeksiyon ya da travma sonucu) ortama salınması, dokuda otoimmün tepkimeyi başlatabilir. Bağırsak, cilt ve diğer bölgelerde bulunan normal flora bakterilerinin (mikrobiyom) çeşitliliği ve fazlalılığı, bağışıklık sisteminin enerjik kalmasını ve öze toleransın devamlılığını da sağlar. Son olarak, otoimmüniteye diğer çevresel ve konakçıya ait bazı faktörler de katkıda bulunmaktadır. Kadınlarda, erkeklerden nazaran çoğu otoimmün hastalık daha sık görülmektedir fakat bunun sebebi halen çözülememiştir. Örneğin; SLE hastalığı, otoimmün bir hastalıktır. Bu hastalık; güneş ışığına maruziyet, öz-nükleik asitlere ve nükleo-proteinlere karşı oto-antikor üretiminin görülmesi ile karakterizedir. (Abbas ve ark., 2022)

2.4. Tolerojenik Dendritik Hücreler

Son yıllarda yeni immünolojik tedaviler ile ilgili çalışmaların bir kısmı miyeloid düzenleyici hücrelerin immün düzenleyici işlevine odaklanmıştır. İmmünolojik hastalıklar, immün homeostazın bozulması ve spesifik antijenler tarafından tetiklenen immünolojik tepkiler ile karakterize edilmektedir. Mevcut immünolojik tedaviler, monoklonal antikorlardan küçük moleküllere kadar değişen immünomodülatörlerin ve immünosupresanların kullanımını içerir. Dünya çapında yaklaşık her 10 kişiden 1'inin (%7,6-9,4) otoimmün hastalıklardan (Tip 1 Diyabet (T1D), Romatoid Artrit (RA) , Multiple Skleroz (MS)) muzdarip olduğu tahmin edilmektedir. Otoimmün hastalarda yapılan çalışmalar, lenfoid ve miyeloid hücreler dahil olmak üzere immün hücrelerin anormal aktivasyonunun, otoimmünitenin hedef organlarında inflamasyona yol açtığını göstermiştir. Otoimmün hastalıklar için onaylanmış tedaviler, hastalığın sonuçlarını verimli bir şekilde iyileştirebilen, ancak diğer yandan, genellikle ciddi yan etkilerle ilişkilendirilen immünomodülatör ve immünosüpresif ilaçların ömür boyu uygulanmasını içerir. Bu tedavilerde kullanılan ilaçlar spesifik değildir ve kronik enfeksiyon veya kanser gelişimi riskine yol açan sistemik, genelleştirilmiş ve kalıcı bir immünosüpresyona neden olabilir. Bu durumda alternatif yaklaşımlardan biri tolerans indükleyici özellik kazandırılmış dendritik hücrelerin (DH) sistemik ve/veya lokal uygulanması olabilir. Dendritik hücre bazlı terapötik yaklaşımlar, öz antijenlerin neden olduğu otoimmün hastalıkların tedavisinde ve organ transplantasyonu sonrası alloimmün toleransı sağlamak için hedeflenmektedir.Şekil 2’ de gösterildiği gibi çeşitli stratejiler ile tolerojenik dendritik hücre (TolDH) üretim çalışmaları yapılmaktadır. Şekil 3’ de görüldüğü gibi farmakolojik ajanlar (deksametazon, VitD3, rapamisin, mikofenolik asit, deoksipergualin (DSG), aspirin, retinoik asit, prostaglandin E2), immün düzenleyici sitokin kokteylleri (IL-10, TGF-β, GM-CSF), genetik modifikasyonlar ve/veya apoptotik hücreler ile DH’ler in vitro ortamda modifiye edilerek antijen spesifik TolDH üretimi geliştirilmekte olan stratejilerdir. (Wekerle , Segev , Lechler & Oberbauer ,2017)



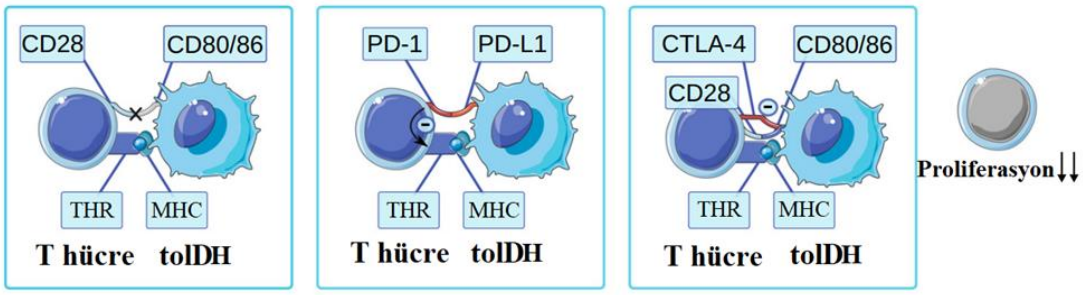
Şekil 2. tolDH (tolerojenik dendritik hücre) üretimine genel bakış



Şekil 3. Tol-DH özellikleri

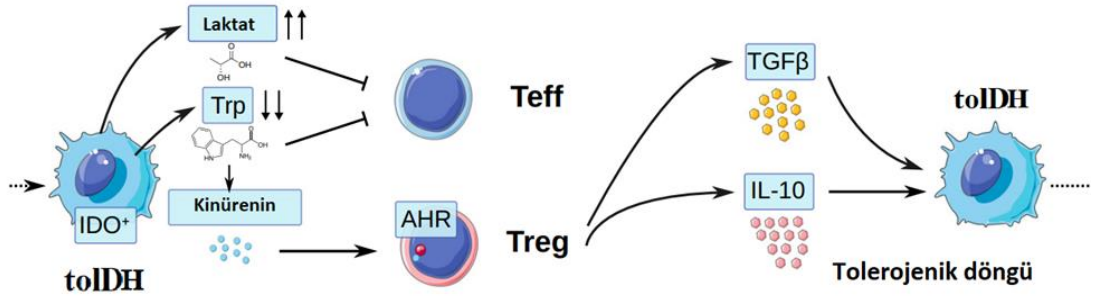
TolDH' lerin hem insanlarda hem de farelerde toleransı indükleyebildiği gösterilmiştir. İlk olarak, T hücreleri, T hücresi reseptörü (TCR) ve MHC arasındaki etkileşim yoluyla, bir ortak uyarıcı sinyal olmadan (DH' lerde T hücresi CD28'in CD80/CD86 ile bağlanması), TolDH' ler tarafından sunulan bir antijeni tanıdığında, T hücreleri IL-2 üretemezler ve çoğalamazlar.(Jenkins,Schwartz,1987)İkincisi, TolDH'lerde yardımcı inhibitör moleküllerin ekspresyonu, T hücrelerinde proliferasyonu baskılar ve klonal anerjiyi destekleyerek temasa bağlı inhibitör

sinyalleri yayar; bu da hücreleri hareketsiz tutan hipotepkisel bir durumdur. Şekil 4'de gösterildiği gibi birçok TolDH, T hücreleri tarafından eksprese edilen programlanmış hücre ölüm proteini 1'e (PD-1) bağlanan PD-L1 ve PD-L2'yi eksprese etmektedir fosfataz SHP-1 ve SHP-2'nin alımını tetiklemektedir. Bunlar TCR ve CD28 sinyal yolunu hedefler, ardından klonal anerji ve Treg farklılaşmasının indüklenmesi yoluyla toleransı arttırmaktadır. (Song ve ark. 2014) Aktive edilmiş T hücreleri ve Treg'ler tarafından eksprese edilen bir reseptör olan sitotoksik T-lenfosit ile ilişkili protein 4 (CTLA-4) DH' ler üzerinde eksprese edilen CD80 ve CD86 moleküllerini bağlayabilir ve bunların transendositoz ve degradasyonuna aracılık edebilir. Bu nedenle, CTLA-4, DH' ler tarafından ifade edilen yardımcı uyarıcı molekülleri düzenleyerek, saf T hücrelerinin hazırlanmasını bozabilir. Ayrıca, TolDH'ler, yüksek CTLA-4 ekspresyonu ve antijene özgü baskılayıcı aktiviteye sahip CD4+ T ve CD8+ T hücrelerini indükleyebilir. (Song ve ark. 2014) ; (Sage ve ark. 2018)



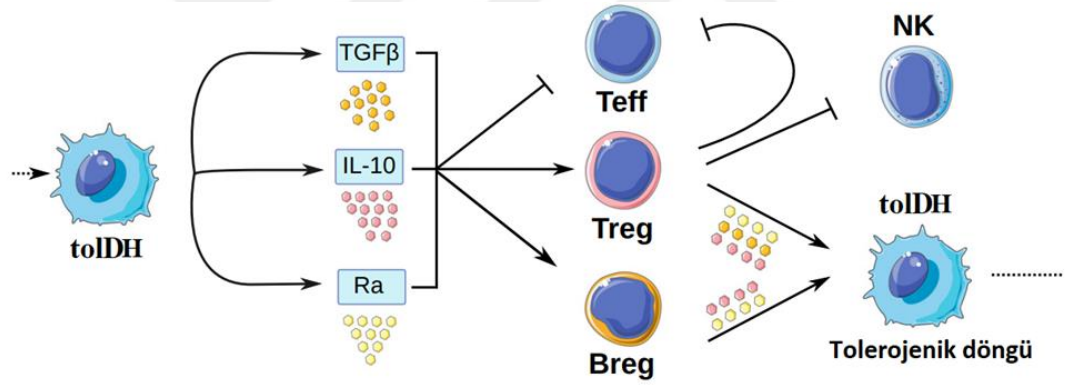
Şekil 4. Klonal Anerji

Şekil 5' de görüldüğü gibi TolDH' ler birkaç tolerojenik sitokin ve metabolit üretebilir. TolDH' ler, triptofanı tüketmenin yanı sıra T lenfosit hücre döngüsünü bloke edebilen ve hem farelerde hem de insanlarda apoptozu indükleyebilen IDO enzimi (triptofanı birkaç metabolite katabolize eden bir enzim) eksprese edebilmektedir. Ayrıca, bir triptofan kataboliti olan kinürenin, farelerde Treg'lerin farklılaşmasını destekleyen Aril Hidrokarbon Reseptörünün (AHR) doğal bir ligandıdır. (Awasthi ve ark.2007; Mascanfroni ve ark. 2013)



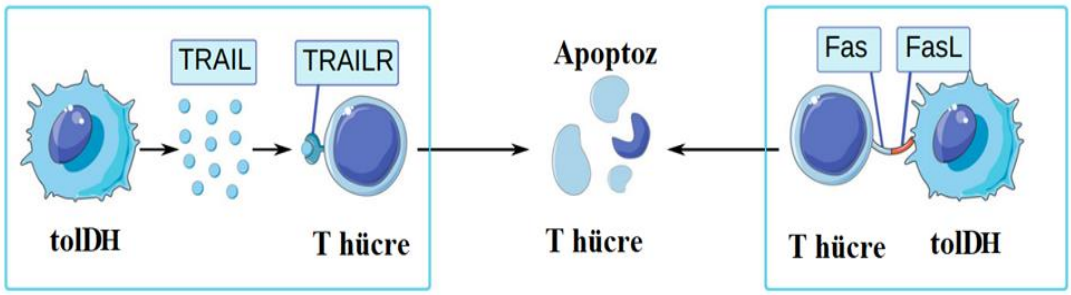
Şekil 5. T hücrelerinin metabolik modülasyonu

Şekil 6' da görüldüğü gibi çeşitli TolDH türleri IL-10 üretir ve hem efektör hem de bellek CD4+ T hücrelerinde in vitro anerjiyi ve IL-10, IFN-γ ve TGF-β salgılayan Treg'lerin farklılaşmasını indükleyebilir. TolDH tarafından salgılanan TGF-β ve IL-27, Treg oluşumunu teşvik eden ve IL-10 salgılanmasını uyaran diğer pleiotropik sitokinlerdir. (Karakhanova , Bedke, Enk & Mahnke ,2011)



Şekil 6. Anti-inflamatuar sitokin üretimi

Şekil 7' de görüldüğü gibi tolDH' ler klonal silinme yoluyla T hücrelerini doğrudan ortadan kaldırabilir. Örneğin, insan DH' lerinin Tümör Nekroz Faktörü (TNF) ile İlişkili Apoptozu İndükleyen Ligandı (TRAIL) ile T hücrelerinin ölüm reseptörleri arasındaki etkileşim, kaspaz yolunu aktive ederek apoptozisini teşvik edebilir. Aktivasyonları sırasında T hücrelerinde ekspresyonu artan Fas, TolDH' lerde FasL' ye bağlanabilir ve farelerde T hücresi apoptozunu destekleyebilir. (Xiao ve ark . 2008)



Şekil 7. Klonal Silinme

TolDH'leri lipopolisakkarit (LPS) yoluyla yarı olgun bir durumda uyarmak fenotipi potansiyel olarak stabilize edebilir ve antijen sunumunu ve göçünü iyileştirebilir. Tolerojenik ve immünojenik DH farklılaşmasını sağlayan mekanizmaların tam olarak anlaşılması, bunların yeni tedavilerde uygulanması için esastır. TolDH 'ler, spesifik antijen toleransını etkili bir şekilde teşvik etmeleri ve immün yanıtları kontrol etme ve periferik toleransı arttırma yetenekleri nedeniyle uzun süredir potansiyel bir hücre bazlı immünoterapi aracı olarak kabul edilmektedir. (Mucida ve ark. 2009)

2.4.1. Tolerojenik Geri Bildirim Döngüleri

Düzenleyici bir popülasyon tarafından oluşturulan bir tolerojenik sinyalin, diğer hücre popülasyonlarını, yine toleransı teşvik edebilen bir tolerojenik fenotipe doğru yeniden güçlendirdiği süreç 'Bulaşıcı tolerans' olarak adlandırılmaktadır. İnsan TolDH' leri, immünosüpresif pleiotropik üretimini uyararak Treg ve Breg indükleyebilir ve yeniden programlayabilir. Fare modellerinde, Treg'ler bu sürecin merkezinde rol alırlar. İnsan TolDH'leri, immünosupresif pleiotropik üretimini uyararak Treg ve Bregs'i indükleyebilir ve yeniden programlayabilir. (Ochando ve ark., 2019)Örneğin, insan VitD3-TolDH'leri, otoantijene özgü Treg'leri in vitro indükler bu durum otoreaktif T hücrelerini baskılamakla kalmaz, aynı zamanda proinflamatuar DH'leri tolerojeneze doğru yeniden programlayabilir. Spesifik olarak, TolDH'leri içeren çeşitli immün düzenleyici yollar, IL-10 üretimi gibi, bir tetikleyicinin tolerojenik ayak izinin aktarıldığı bir süreci başlattığı tolerojenik geri

besleme döngüleri görevi görebilir. Hücre temaslarını ve tolerans durumuna yol açan immünosupresif moleküllerin üretimini içeren geri bildirim döngülerinin varlığı, terapötik nedenlerle büyük önem taşımaktadır. (Lee ve ark. 2002)

2.4.2. DH'lerde Tolerogeneze Giden Yol: Transkripsiyonel Belirleyiciler

DH'lerin immünojenik veya tolerojenik özellikleri dahil olmak üzere immün hücre farklılaşması transkripsiyon faktörlerine (TF'ler) ve epigenetik mekanizmalara dayanan transkripsiyonel düzenleme gerektirir. DH'lerin farklı alt kümelerinin progenitörlerinden farklılaşmasını ve bunların tolerojenik veya immünojenik bir kadere bağlılıklarını belirleyen süreçler tam olarak oluşturulmamıştır. Farelerde, cDH gelişiminin ana düzenleyicisi olarak TF PU.1tanımlanmıştır. DH'nin önemli bir belirleyici olan PU.1 DH-SCRIPT'i etkinleştirir ve cDH'yi pDH geliştirmeye hazırlar, fare pDH'lerinde TF E2-2'nin kaybı, bunların cDH benzeri hücrelere farklılaşmasına yol açar, bu TF'nin en azından farelerde, pDH kimliğinin korunmasında sürekli bir rolü olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca, birkaç TF, cDH alt kümelerinin polarizasyonu ile ilişkilendirilmiştir: BATF3, IRF8, NFIL3, ID2, NOTCH2, IRF4 ve KLF4. Tolerojenik özelliklerin kazanılması için TF IRF4 'ün çok önemli olduğunu kanıtlanmıştır.Yapılan çalışmalarda IRF4'ün özellikle Treg üretimi için gerekli olduğu ve NF-κB'nin proinflamatuar sitokinlerin ve antijen sunum proteinlerinin ekspresyonunu indüklediği görülmüştür. (Ochando ve ark . 2019)

Bazı çalışmalarda da DH 'ler tarafından immün homeostazı ve toleransı için NF-κB sinyalinin gerekli olduğu öngörülmüştür. Nükleer reseptör yardımcı baskılayıcı 1 (NCoR1) tükenmesi DH'lerde immünomodülatör genlerin (IL10, IL2b, IL27, IDO1, vb.) ekspresyonunu arttırmaktadır bu yüzden murin cDH'lerinde tolerojenezin ana negatif düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır. NCoR1, Treg gelişimini düzenlemek için dendritik hücrelerde immünojenik ve tolerojenik programı doğrudan kontrol etmektedir. TF'ler, epigenetik modifikasyonlara yol açan spesifik genomik bölgeleri hedeflemek için epigenetik enzimlerle birlikte hareket eder. DNA metilasyonu ve histonların translasyon sonrası modifikasyonu gibi epigenetik işaretlerin hücre fenotipini ve fonksiyonunu yönlendirebileceği veya etkileyebileceği bilinmektedir. Birkaç çalışma, DH tolerogenezinin elde edilmesinde farklı epigenetik

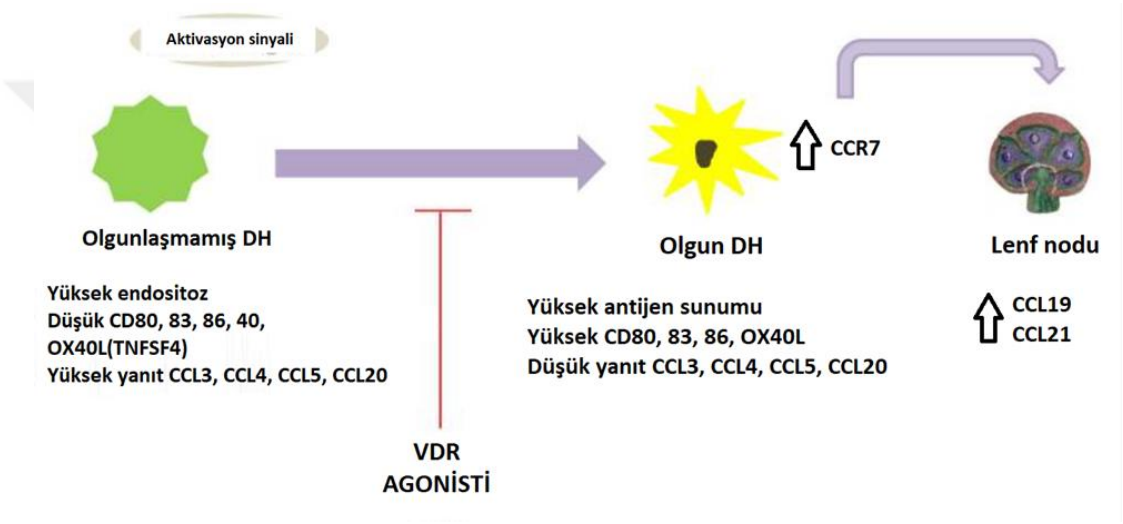
mekanizmaların rolünü göstermiştir. Örneğin, histon deasetilaz (HDAC)11, insanlarda ve farelerde DH'lerde IL10 geninin ekspresyonunu negatif olarak düzenlemektedir. (Kleijwegt ve ark. 2011)

2.5. D Vitamini Metabolizmasına Genel Bakış

Mineral iç dengesinin korunumunda kilit rol alan vitaminlerden biri de D vitaminidir. D vitamininin iki temel kaynağı vardır. Bunlar: D vitamininin diyetle vücuda alınması ve güneş ışığına maruz kalan ciltte sentezidir.(Deluca ,2004)

Diyetle alınan veya kutanöz olarak verilen D vitamininin, aktif forma çevirilebilmesi için karaciğer ve böbrekte iki metabolik modifikasyona uğraması gerekir. D vitamini karaciğerde, sitokrom P450 (CYP) vasıtasıyla kodlanan, 25-hidroksilaz enzimi aracılığıyla hidroksilasyona uğrar ve bu tepkimeye bazı CYP izoformları da eşlik edebilir. CYP27A1, CYP3A4 ve CYP2J3; 25-hidroksi-vitamin D (25(OH)D) oluşumuyla neticelenir. 25(OH)D, uzun bir yarı ömre sahip olup, dolaşımdaki ana metabolitlerden biridir. Metabolizmanın ikinci basamağı böbreklerdir. Böbrekler; kalsiyum/fosfor düzenleyici hormon, paratiroid hormonu (PTH) aracılığıyla stimüle edilen ve 1α-hidroksilasyonun (CYP27B1'in aracılık ettiği) oluştuğu ve bir organdır. En aktif metabolitlerden biri de 1,25-dihidroksivitamin D3 (1,25(OH)2D3)'tür. CYP27B1 aracılığıyla dönüşüm 1,25(OH)2D3 üretir. 1,25(OH)2D3'ün gen üzerindeki önemli bir fonksiyonu, CYP24A1'in gen ekspresyonunu güçlü bir şekilde indükleme özelliği göstermesidir. 1,25(OH)2D3 diğer önemli fonksiyonları arasında; bağırsakta kalsiyum ve fosfat emiliminin regülasyonu, kemikten kalsiyum mobilizasyonu ve böbrekte kalsiyumun yeniden emilimi bulunmaktadır. (Christakos, DeLuca 2011) Aynı zamanda, bu metabolitin vücutta farklı immün etkileri de mevcuttur. İnsan VDR geninin, birkaç polimorfizmi mevcuttur. Bunlar ya uzun bir f-VDR ya da daha kısa bir F-VDR olmak üzere, farklı özelliklere sahip VDR proteinleri ile neticelenir. (Bartels ve ark., 2010) Bir grup araştırmacı, insan mDH'lerinde IL-12 promotör aktivitesini değerlendirmiştir. Sonucunda, F-VDR'nin varlığının NF-κB ekspresyonunda, aktifleştirilmiş T-hücreleri (NFAT) güdümlü transkripsiyonun nükleer faktöründe ve yüksek IL-12p40 promotör aktivitesinde bir yükselişe neden olduğunu bildirmişlerdir. 1,25(OH)2D3, vitamin D

reseptörüne (VDR) bağlanma özelliği gösterir. Enflamatuvar cevapları denetleyen genlerin hem aktivasyonuna hem de baskılanmasına neden olan farklı gen transkripsiyon faktörleriyle VDR kompleksi etkileşebilir. Transkripsiyon faktörü aktivatör protein 1 (AP1) aracılığıyla VDR bağlanmasının işlevi kolaylaştırılabilir. VDR için öncü faktörler olarak faaliyet gösteren, transkripsiyon faktörleri arasında; Forkheadbox protein A1 (FOXA1) veya Spi-1 proto-onkogen (SPI-1) tarafından kodlanan hematopoetik transkripsiyon faktörü PU.1 yer alır. Aynı zamanda VDR agonistleri, bir immün-baskılayıcı molekül rolü de alabilir. (Whıte ,2012)



Şekil 8. Dendritik hücre (DH) işlevinde D vitaminine genel bakış**.**

2.5.1. DH'ler Olgunlaşma – Eş uyarım

İnsanlarda farklı uyaranlar tarafından üretilen sinyal kodlarıyla, DH'lerin fenotipindeki modifikasyonlar değişiklik gösterebilir. İnsan DH maturasyonunu; 1,25(OH)2D3 ve VDR regüle edebilir. Yapılan bir çalışmada, farklılaşan insan ve fare monositlerinin 1,25(OH)2D3'e maruziyeti, antijen yakalamada yer alan moleküllerin ekspresyonunu yükseltmiş, DH farklılaşmasının ve maturasyonunun inhibisyonuna neden olmuştur. Aynı zamanda, Treg sayısında artışı stimüle ederler, CD4+ T hücrelerini direkt etkilerler. IL-10'u regüle ederler ve tümör nekroz faktörü-α (TNF-α) ve interferon γ (IFN-γ) sitokin seviyelerini azaltırlar. Böylelikle, bu moleküler farklılıklar farelerde ve insanlarda DH'ler ve T hücreleri arasındaki inhibisyon ve

etkileşiminde görev alabilirler. Bir diğer yapılan in-vivo ve in-vitro deneylerde, 1,25(OH)2D3 metabolitin kullanımının; CD40, CD80 ve CD86 ve interlökin-12 (IL-12)'nin ekspresyon seviyelerini azalttığı gözlenmiş ve gelişmiş tolerojenik fenotipe sahip fare ve insan mDH'lerini indükleyebileceği bildirilmiştir. Ek olarak, 1,25(OH)2D3; insan mDH'lerinde CCL17 ve CCL22 kemokinlerini stimüle etme özelliği gösteren bir etkiye de sahiptir. (Mathieu & Adorini, 2002)

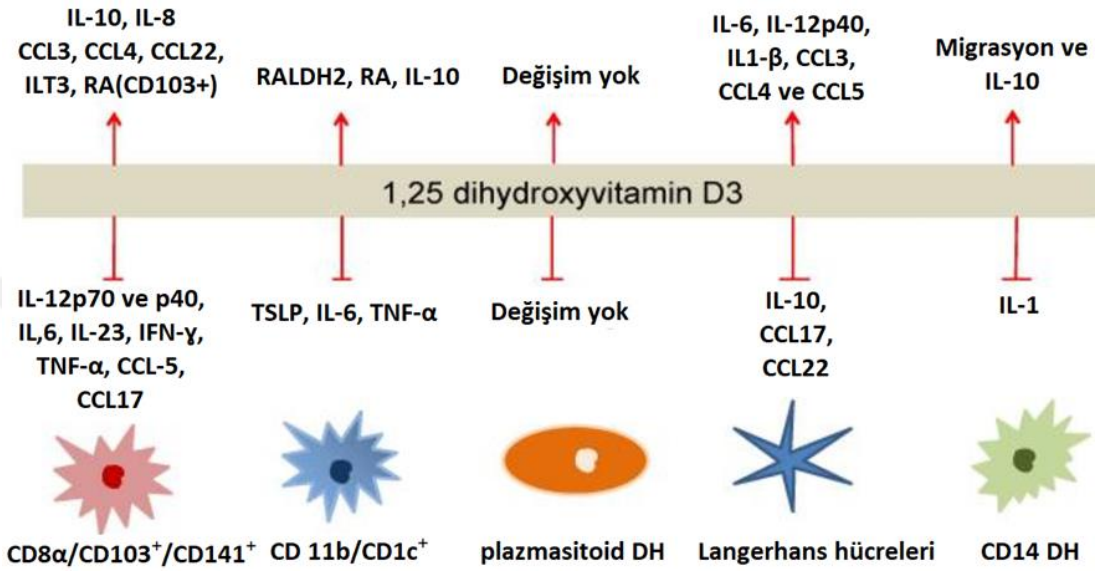
Şekil 8' de gösterildiği gibi CD4+ Foxp3+ düzenleyici T hücrelerini indüklemek için DH'ler aracılığıyla immünoglobulin benzeri transkript 3 (ILT3) ifadesine gerek vardır. Araştırmacılar yaptıkları bir çalışmada; 1,25(OH)2D3'ün, olgunlaşmamış ve olgun insan DH'leri üzerinde ILT3 ekspresyonunun up-regülasyonunu indükleyebildiğini bildirmişlerdir. NF-κB, tüm hücre tiplerinde bulunan bir transkripsiyon faktörü olup immün sistemde kritik rol alan bir enflamatuvar genlerdir. NF-κB; VDR ile aynı nükleer reseptör ailesini bağlayan birçok anti-enflamatuvar ve immün baskılayıcı ajan için hedef haline gelmiştir. IL-12, tip I IFN'ler, CCL7, kemokin reseptörü 22 (CCL22) üretimi ve MHC sınıf II molekülleri, CD40, CD80, CD86 ve ILT3'ün ekspresyonunu; NF-κB, (Nuclear Factor kappa B) aktivitesinin düzenlediği, yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Yapılan bir diğer çalışmada araştırmacılar, 1,25(OH)2D3 ile tedavi edilen insan mDH'lerinin, NF-κB'nin p65 alt biriminde nükleer translokasyonun düşüşe uğradığını bildirmişlerdir. (Halteren ve ark. 2004)

2.5.2. DH Sitokin Üretimi

Şekil 9' da gösterildiği gibi yapılan çalışmalar neticesinde; 1,25(OH)2D3 ile stimüle edilen DH'lerin, IL-10 üretimini yükselttiği ve TNF-α, IFN-y, IL-12 gibi proenflamatuvar sitokinlerin salınımının inhibisyonunu sağladığı bildirilmiştir. CD14 monosit/makrofaj belirtecidir. CD14'ün ifadesi; 1,25(OH)2D3'e maruz kaldıktan sonra yükseldiği bildirilmiştir. (Penna ve ark. 2007)

İnsan kanından türetilen mDH'ler, 1,25(OH)2D3'e maruz bırakılmış ve hem interlökin-12p70 (IL-12p70) hem de interlökin-12p40'ın (IL12-p40) CD40 ile tetiklenen üretimini inhibe etmiştir. Hem IL-12 hem de IL-23'ü meydana getirmek üzere heterodimerize olan, IL-12p40 zincirinin meydana gelen inhibisyonu, Th1 ve T

helper 17 (Th17) hücrelerinin gelişiminde önemli bir düşüş ile neticelenmiştir. Bir diğer yapılan çalışma; fare LC'leri 1,25(OH)2D3'e maruz bırakılmıştır. Sonucunda; IL-1β, CCL3, CCL4 ve CCL5 üretiminin up-regülasyonunu bildirmiştir. 1,25(OH)2D3 uyarımı, Th1 gelişiminin inhibisyonunu sağlar ve IL-2, IFN-y'nin transkripsiyonel baskılanmasıyla neticelenen mDH'leri de etkiler. (Etten ve ark. 2007)



Şekil 9. 1,25(OH)2D3'ün farklı DH altkümelerinde interlökinler, sitokinler ve düzenleyici moleküllerin ekspresyonu üzerindeki etkisi

2.5.3.D3 Vitamini Kaynaklı Tolerojenik Dendritik Hücreler (VITD3-tolDH)

TolDH'leri üretmeye yönelik yaklaşım, yağda çözünen bir hormon özelliği gösteren vitamin D3'ü (VitD3) kullanmaktır. D3 vitamininin aktif metaboliti 1α,25-dihidroksi vitamin D3 (1α,25(OH)2D3)'dür. En önemli özelliği, güçlü bir doğal modülatördür. Araştırmalar sonucunda; DH' ler VitD3 ile muamele edilmiş; IL-10 üretimi, sınıf II MHC-aracılı antijen sunumunun düşük ekspresyonu (örn: HLA-DR) ve uyarıcı moleküller (CD80, CD86) düşük ekspresyon sergilediği bildirilmiştir. Vitamin D3 ile indüklenen TolDH' lerin (vitD3-TolDH' ler) T hücre cevaplarının inhibisyonunu sağladığı veya düşürdüğü ve immün cevabı bir TH2 profiline dönüştürdüğü bildirilmiştir. VitD3-DH' ler; programlanmış ölüm ligand (PD-L1, PD-L2) ve immünoglobulin benzeri transkript (ILT)-3/-4 gibi inhibitör moleküllerinin ekspresyonu yükselir, IL-10, CCL22 gibi düzenleyici sitokinlerin üretimini indükleme özelliği gösterir. Aynı zamanda; TGF-β, TNF-α ve IL-12 üretiminde düşüş gözlenir.

VitD3-TolDH' ler, düşüşe uğrayan NF-κB aracılı aktivite ve yükselen mTOR aracılı glikoz metabolizması ile de benimsenir. VitD3-TolDH'ler sonuç olarak, T hücrelerinin davranışını değiştirme özelliği gösterir. Yapılan çalışmalar sonucunda, tolDH'lerin toleranslı karakterizasyonlarını muhafaza ederken, göç aktivitesini ve antijen sunumunu stimüle etmek için LPS aktivasyonunun gerekli olduğu fikrini ileri sürmüşlerdir. DH'leri CCL19'a cevap olarak ikincil lenf düğümlerindeki T hücre alanlarına göç etmeye CCR7 kemokini yönlendirir. LPS ile etkinleştirilen TolDH'ler, CCL19'a cevap olarak CCR7'ye bağlı bir göç sergiler.(Zubizarreta ve ark.,2019) Ancak etkinleştirilmemiş TolDH'ler düşük bir CCR7 seviyesi gösterir ve göç meydana gelmez. Yapılan araştırmalar, genellikle DH göçüne odaklanmış ve farklı sonuçlar bildirilmiştir. DH'nin farklı yöntemleri, tedavi ve göç analizi ile aydınlığa kavuşturulabilir. (Ferreira ve ark. 2012)

2.6. Glukokortikoidler

Glukokortikoidler (GC) şu anda mevcut olan en güçlü immünosüpresif ve antiinflamatuar ilaçlar arasındadır. Allogreft reddi, romatoid artrit ve astım dahil olmak üzere hem Th-1 hem de Th-2 ile ilişkili inflamatuar hastalıkların tedavisinde etkilidir. Yapılan çalışmalarda GC'nin terapötik etkileri başlangıçta T hücreleri üzerindeki güçlü inhibitör etkisi olduğu görülmüştür. Ancak şu anda antijen sunan hücrelerin (APC) de GC'den güçlü bir şekilde etkilendiği yapılan çalışmalarda görülmüştür. GC'nin monositler ve makrofajlar tarafından proinflamatuar sitokinlerin üretimini azalttığı ve ayrıca DH fonksiyonunu etkilediği gösterilmiştir. (Coutinho & Chapman ,2010)

Eksojen olarak uygulanan GC'nin yanında, endojen GC de önemli bir fizyolojik rol oynar. GC'nin, merkezi sinir sistemi ile doğuştan gelen bağışıklık sisteminin düzenlenmesi arasında önemli bir bağlantı vardır. Endojen GC, aktif 11-hidroksi (kortizol) veya aktif olmayan 11-keto (kortizon) formu olmak üzere iki farklı formda bulunur. Endojen GC aktivitesinin düzenlenmesi, 11β-hidroksisteroid dehidrogenaz (11β-HSD) enzimi yoluyla yapılır, bu enzimin tip-2 formu (böbrek ve fetüste yüksek oranda eksprese edilir) dehidrojenasyon yoluyla kortizolü inaktive edebilir. Tip-1 enzimi redüktaz aktivitesine sahiptir ve kortizondan kortizol üretir. (Beas ve ark. 2019)

Yapılan çalışmalarda olgunlaşmamış DH'lerin insan monositlerinden veya fare kemik iliği hücrelerinde 11β-HSD1'i ifade etmeye başladığı gösterilmiştir. DH kültürlerine fizyolojik inaktif kortizon konsantrasyonları eklendiğinde, bu, bir 11β-HSD inhibitörü tarafından önlenebilecek bir etki olan kortizol üretimi yoluyla DH aktivasyonunu inhibe eder.

2.6.1 Deksametazonun İmmün Düzenleyici Etkileri-Sitokinler

Dex DH'lerin aktivasyonu, IL-6, TNF-a, IL-1β ve IL-12 dahil olmak üzere proinflamatuar sitokinlerin üretiminin azalmasına neden olmaktadır. Deksametazon antiinflamatuar sitokin IL-10'un üretiminin artmasına da neden olur. IL-10 ve IL-12 arasındaki denge T hücresi aktivasyonu için önem taşımaktadır. Dex ile işlenmiş DH, ERK kinazın fosforile edilmiş formunun ekspresyonunda artış gözlenir ve IL-10 üretimi, ERK inhibitörü PD98059 tarafından inhibe edilir. (Mozo & Gutiérrez ,2004) Dex ile tedaviden sonra monositler de dahil olmak üzere diğer hücrelerde artan bir IL-10 üretimi gözlemlenmiştir. Ayrıca diğer sitokinlerin ve kemokinlerin üretimi de GC ile tedaviden etkilenir. CCL18, alternatif olarak aktive edilmiş makrofajlarla ilişkilendirilmiş bir kemokindir. Yapılan çalışmalarda IL-10 ve VitD3'ün insan olgunlaşmamış moDH tarafından CCL18 ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. (Xing ve ark. 2010)

2.6.2 .Dex-DH'nin İn Vivo Kullanımı

DH'nin immün düzenlemedeki rolleri göz önüne alındığında, bu hücreler hücresel immünoterapi için büyük bir potansiyele sahiptir. DH'ler tümör terapisinde veya enfeksiyöz ajanlara karşı aşılama stratejilerinde istenildiği gibi, bağışıklık tepkisinin güçlü bir şekilde uyarılması yönünde çalışabilir. Bununla birlikte, negatif aşılama için, yani spesifik bağışıklık tepkilerinin bastırılması için de DH'ler, otoimmünite veya transplantasyon durumlarında kullanılmaktadır. DH 'nin olgunlaşma aşamasının kontrol edilmesi kritik öneme sahiptir. İn vitro bulgulara dayalı olarak Dex, DH 'yi olgunlaşmamış bir durumda dondurmak ve bunların in vivo tolerojenitesini araştırmak için kullanılmaktadır. (Anderson ve ark. 2008)

2.6.3 Deksametazon/VitaminD3-Tolerojenik Dendritik Hücreler (DEX/VITD3-tolDH)

Glukokortikoidler (GC' ler), farklı klinik ortamlarda immünosüpresif ve anti-inflamatuar ajanlar olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Kortizon, 1948'de RA hastalarına uygulanan ilk GC'dir. GC'ler; astım, dermatit, otoimmün hastalıklar ve inflamasyonun tedavisi ile ilgilidir. GC' ler DH' ler üzerindeki immünosüpresif etkileri, temel olarak, düzenleyici sitokinlerin artan salgılanmasına, inflamatuvar sitokinlerin inhibisyonuna ve hücresel bağışıklığa ve TolDH' lerin indüklenmesine yol açan NK-κB ve AP-1 gibi anahtar inflamatuar sinyal yollarında ve transkripsiyonel düzenleyicilerde etki gösterir. Bu hücrelerin TolDH' lere yeniden programlanması, T hücrelerinin aşırı duyarlılığına ve Treg'lerin genişlemesine neden olmaktadır. Deksametazon ve diğer uyaranlarla, yani IL-10, TGF-β, VitD3 veya prostaglandin E2 ile oluşturulan TolDH' ler, stabil bir fenotipe sahiptir, yüksek MHC sınıf II, CD80 ve CD86 seviyeleri, düşük CD40 ekspresyonu ve yüksek seviyelerde IL-10 ifade eder ve TGF-β, zayıf T hücre stimülasyonu ve daha tolerojenik bir fenotipe geçiş ile sonuçlanır. Dex-tolDH 'ler CD209'u ifade eder ve düşük bir CD1a ve CD14 ifadesine sahiptir. (Osorio ve ark. 2015)

2.7. A151 ODN (Oligonükleotid) ile İndüklenen Dendritik Hücreler

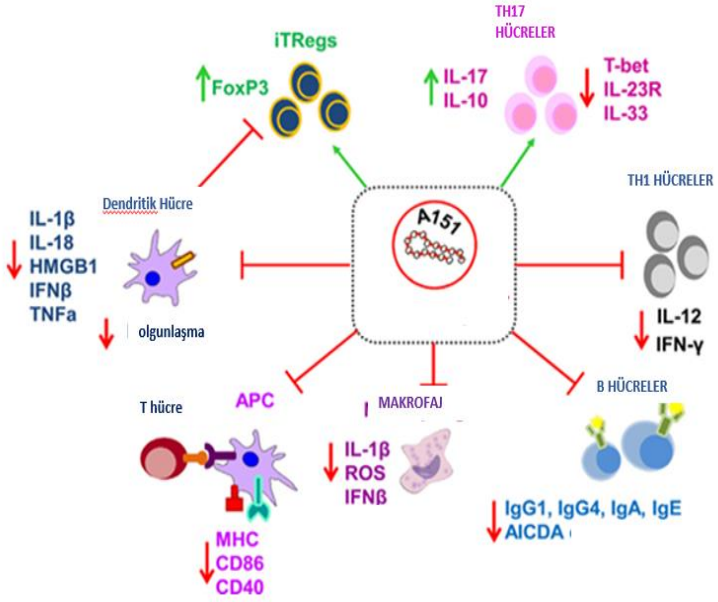
DNA'nın immün reaksiyonları inhibe etme yeteneği ilk olarak fosforotiyoat ile modifiye edilmiş ODN çalışmalarında gözlenmiştir. 1998'de Krieg ve ark. bazı adenovirüs serotiplerinden gelen DNA'nın, TLR ile indüklenen immün aktivasyonunu aşağı regüle edebilen "immünoinhibitör" motifler içerdiğini bildirmiştir. Bu aktivitenin çoğu, genişletilmiş G ve C açısından zengin sekans motiflerinin varlığıyla bağlantılıdır. Memeli DNA çalışmalarında, Gürsel ve ark. immün supresyona büyük ölçüde memeli telomerlerinde bulunan tekrarlayan TTAGGG motiflerinin aracılık ettiğini bulmuştur. İmmünomodülatör komensal bakterilerin genomlarının artık baskılayıcı DNA motifleri içerdiği bilinmektedir. (Bayik &Gursel & Klinman ,2016)

Şekil 10’ da gösterildiği gibi A151, memeli telomerlerinde yüksek frekansta bulunan tekrarlayan öğeleri taklit etmek için tasarlanmış dört TTAGGG motifinden

oluşmaktadır. Dendritik hücrelerin, telomerik DNA, makrofajların, dendritik hücrelerin, B hücrelerinin ve T hücrelerinin çoklu alt gruplarının aktivasyonunu ve farklılaşmasını inhibe eder. (Gürsel ve ark .2003)

A151, başlangıçta A151 ile CpG ODN'nin TLR9'a bağlanması için bakteriyel DNA tarafından indüklenen bağışıklık uyarımını bloke eder. Yapılan çalışmalar A151'in geniş immünosupresif aktivitesinin, öncelikle STAT fosforilasyonu üzerinde etkisi olabileceğini göstermektedir. STAT proteinleri, birçok bağışıklık hücresi tipinin olgunlaşmasını etkileyen transkripsiyon faktörleridir. TLR4 ile uyarılan makrofajlar üzerinde yapılan çalışmalarda A151'in STAT1 ve STAT4'ün fosforilasyonuna müdahale ettiğine dair kanıtlar elde edilmiştir. STAT3 fosforilasyonunun inhibisyonu daha sonra saf CD4 T hücresi farklılaşması çalışmalarında gözlenmiştir. A151, fosfo-STAT3'ün negatif düzenleyicisi olan SOCS3'ün oluşumunu bloke ederek Th17 hücrelerinin oluşumunu destekler. A151 ayrıca Treg'lerin oluşumunu da destekler . (Bode, Yang, Kiu,& Klinman,2013) Bu, A151'in, saf CD4+CD25− T hücrelerinin CD4+CD25+FoxP3+ iTreg'lere farklılaşmasını sağlayan STAT1 fosforilasyonunu bloke etmedeki doğrudan etkisinden ve A151'in aksi takdirde Treg oluşumunu azaltacak olan LpDH oluşumuna müdahale ettiği dolaylı bir etkiden kaynaklanmaktadır.(Bouladoux ve ark.2012 ; Bode, Wang, & Klinman 2014) İnsan B hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar, A151'in B hücresi aktivasyonunu, Ab üretimini ve plazma/hafıza hücrelerinin oluşumunu baskılayabildiğini göstermektedir. Bu aktivite, A151'in, B hücrelerinde sınıf değişimini ve somatik mutasyonu düzenlediği bilinen AICDA'yı (aktivasyon kaynaklı sitidin deaminaz) baskılama yeteneğinden dolayıdır. (Sackesen ve ark. 2013)

AIM2 ve IFNg ile indüklenebilir protein-16 (IFI16), sitozolik bakteriyel ve viral dsDNA'yı tanıyan DNA bağlayıcı proteinlerdir. Bu proteinlerin aktivasyonu, pro-IL-1B ve pro-IL-18'in fonksiyonel formlarına bölünmesine aracılık etmek için kaspaz-1'i kullanır. (Rathinam ve ark .2010 ; Unterholzner ve ark. 2010) A151 doğrudan AIM2'ye bağlanır ve bu da ASC'nin kullanılmasından sonra ve enflamasyon kompleksinin birleşmesini önler. (Kaminski ve ark .2013) Bu nedenle, A151'in çoklu hücre tiplerinin farklılaşmasını ve aktivasyonunu geniş ölçüde baskılama yeteneği, çoklu sinyal yolları üzerinde hareket etme kabiliyetinden kaynaklanmaktadır



Şekil 10. ODN A151, bağışıklık sisteminin hücresel elemanları üzerinde çeşitli etkilere sahiptir

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu yüksek lisans tez çalışması, Bursa Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 27.09.2022 tarihli 2012-13/05 nolu karar sonucu alınmış izin sonrasında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Çalışmada Kullanılan Maddeler

Bu tez kapsamında çeşitli kimyasallar ve biyolojik malzemeler kullanılmıştır. Bu malzemeler, ait oldukları firmalar ve ülkeleri aşağıda sıralanmıştır.

Fosfat tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS) (EUROIMMUN, Almanya); Fötal Buzağı Serumu (FBS) (Biowest, Fransa); Penisilin-Streptomisin (Biowest, Fransa); RPMI 1640 (Biowest, Fransa),FACS Flow Cell Wash (BD, ABD); Anti fare CD80 (klon: [16-10A1]) monoklonal antikor (mAb) elabscience ABD), Anti fare CD86 (klon: (B7-2) (PO3.1) monoklonal antikor (mAb) Tonbobio , ABD), Anti fare CD11c (klon: (N418) monoklonal antikor (mAb) Tonbobio ,ABD), Anti fare CD11b (klon: (M1/70) monoklonal antikor (mAb) Tonbobio, ABD), Tripan mavisi (Sigma, ABD), 1A,25-dihidroksi vitamin D3 (Sigma, ABD), Minosiklin Hidroklorür (Sıgma,ABD), deksamatazon (Sıgma,ABD), A151 ODN oligonükleotid (İnvivogen ,ABD)

3.2 Hazırlanan Tampon ve Çözeltiler

PBS Çözeltisi: Steril PBS tablet 1000 mL dH2O'ya eklenerek (1X) partikül kalmayacak şekilde manyetik karıştırıcıda çözüldü ve otoklavlanarak sterilize edildi. Daha sonra oda sıcaklığında (25°C) muhafaza edildi.

Tam RPMI 1640 Hücre Kültürü Ortamı: L-glutamin içeren RPMI 1640 üzerine steril alanda son konsantrasyonu %10 v/v olacak şekilde FBS (ısı-inaktive), %1 v/v olacak şekilde de penisilin/streptomisin eklenerek iyice karışması sağlandı ve +4°C'de

saklandı.

Tam DMEM Hücre Kültürü Ortamı: L-glutamin içeren DMEM üzerine steril alanda son konsantrasyonu %10 v/v olacak şekilde FBS (ısı-inaktive), %1 v/v olacak şekilde de penisilin/streptomisin eklenerek iyice karışması sağlandı ve +4°C'de saklandı.

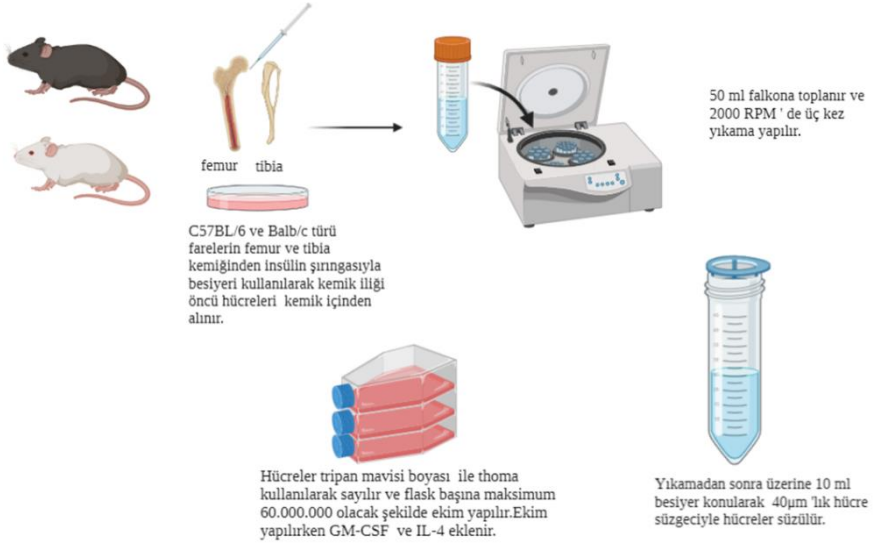
Tripan Mavisi Çözeltisi: Steril ortamda tartım işleminin sonrasında 1X PBS yardımıyla 0.4'lük çözelti hazırlandı ve 0.22 µm'lik filtreden geçirilerek oda sıcaklığında (25°C) muhafaza edildi.

1α-,25-dihidroksivitamin D3 (D3) Çözeltisi: Toz şeklinde alınan 10 µg D3, üzerine 1,2 ml saf etanol eklenerek konsantrasyonu 20 µM olan stok çözelti oluşturuldu ve alikotlanarak -80°C'de saklandı.

Deksametazon çözeltisi: Toz şeklinde alınan 100 MG üzerine 4 ml metanol eklenerek 63700 UM olan stok çözelti oluşturuldu. Konsantrasyonu 500 uM olacak şekilde ara stok hazırlandı.

3.3 Dendritik Hücre İzolasyonu

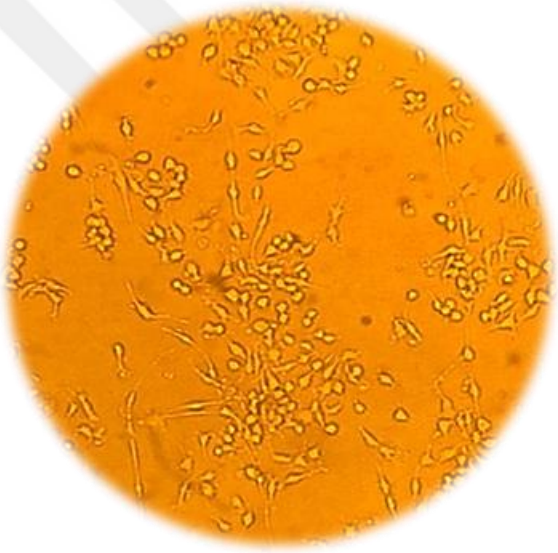
Şekil 11' de gösterildiği gibi dendritik hücre eldesi için C57BL/6J ve Balb/c türü fareler sevofluran ile bayıltıldı ve servikal dislokasyon uygulandı. Fare femur veya tibiasından ex vivo ortamda elde edilen kemik iliği hücreleri eritrosit ve lenfositlerden arındırıldıktan sonra 20 ng/mL fare rekombinant Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör (GM-CSF) ve Interlökin 4 (IL-4) ile inkübe edildi. 2 günde bir GMCSF ve IL-4 ile uyarımları yapıldı.



Şekil 11. Dendritik Hücre İzolasyonu



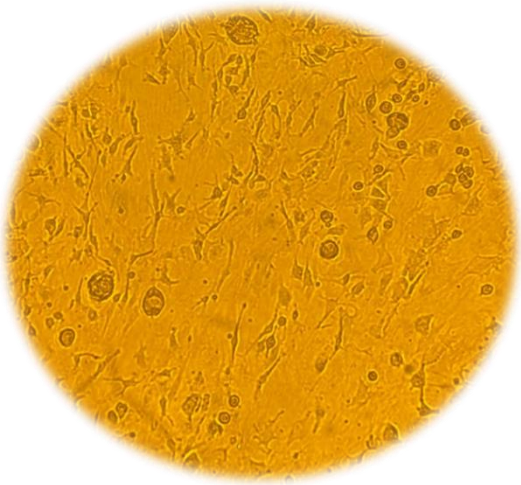
Şekil 12. C57BL/6 Flask 7.Gün



Şekil 13. C57BL/6 6 Kuyulu Plak 6.Gün Dendritik Hücre



Şekil 14. BALB/c Flask 7.Gün

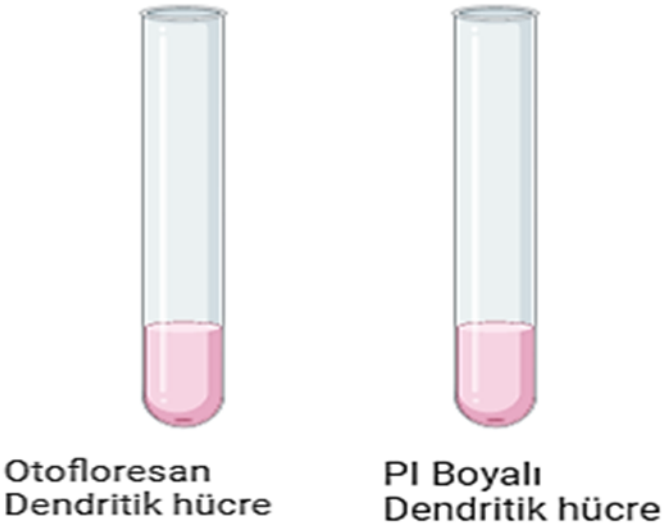


Şekil 15. BALB/C 6 Kuyulu Plak Dendritik Hücre 6. Gün

3.4 Hücre Sayımı

Tam RPMI ortamında bulunan hücreler pipetaj yapılarak iyice süspanse hale getirildi. Bu hücre süspansiyonunun içerisinden 10 µL alınarak eppendorf tüpün içerisinde 10 µL tripan mavisi çözeltisi ile karıştırıldı. Bu karışım Thoma lamı üzerine pipetlendi ve lam-lamel arasında yayılması sağlandı. Her sayım işlemi için Thoma lamı üzerindeki 4 alan rastgele seçildi ve bu bölgelere karşılık gelen canlı hücreler sayılarak aritmetik ortalaması alındı. Kullanılan Thoma lamının sayım haznesindeki karelerin boyutu 0,1 mm x 0,1 mm olup lam ile lamel arasındaki uzaklık yani yükseklik ise yine 0,1 mm'dir. Bu nedenle hücrelerin aritmetik ortalaması on ile çarpıldı. Elde edilen değer, sulandırma katsayısı olan iki ile ve sayılan 4 kareden dolayı 4 ile çarpıldı ve daha sonra mL başına düşen hücre sayısını bulmak için 1000 ile çarpıldı. Sonuç olarak 1 mL hacimdeki hücre sayısı bulundu. Tripan mavisi ölü hücreleri boyadığı için Thoma lamında boyanmayan hücreler canlı olarak kabul edilip sayıldı ve hesaplamalar buna göre yapıldı.

3.5 Dendritik Hücre, Makrofaj ve RAW.264.7 Hücrelerinin Canlılık Analizi



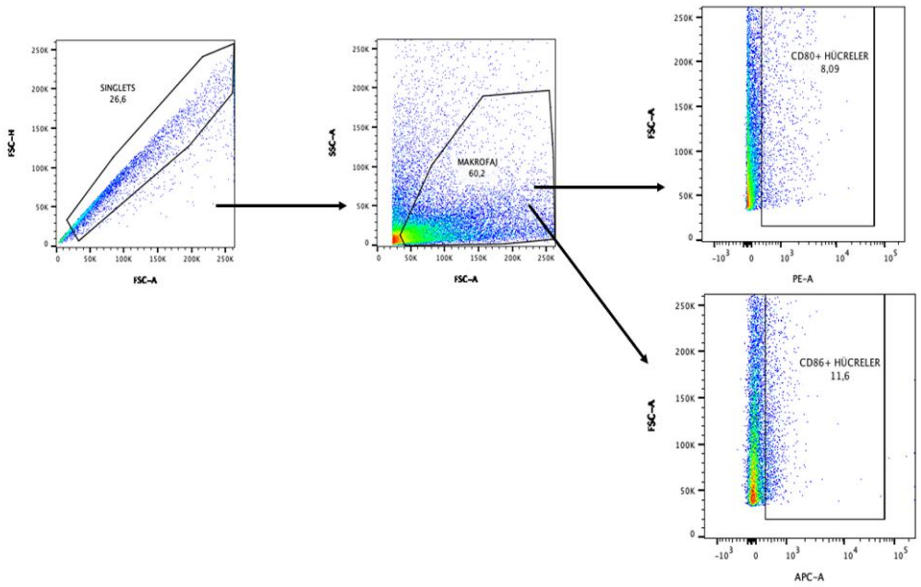
Şekil 17. Canlılık analizi

Şekil 17' de gösterildiği gibi elde edilen dendritik hücreler, makrofaj ve RAW.264.7 hücreleri 100'er µl olacak şekilde şekil ' daki gibi hazırlanan akım sitometri tüplerine dağıtıldı. Daha sonra 1µl PI (Propidyum İodür) eklendi ve vorteklendikten sonra 10 dk oda sıcaklığında ve karanlık ortamda inkübe edildi. İnkübe süresinden sonra (2000 rpm 5 dk) santrifüj edildi. 150 µl PBS içinde süspanse edilerek BD FACS ARIA III (BD, ABD) akım sitometri cihazında analiz edildi.

3.6. Dendritik Hücre / Makrofaj/ RAW.264.7 Hücre Hattı Karakterizasyonu

Çalışmamızda CD11c, CD80 ve CD86 belirteçleri analiz edildi. Hücreler akım sitometri tüplerine toplandı ve belirtilen antikorlar ile işaretlendi. Antikorlar eklendikten sonra vortekslendi ve 45 dk 4 C° karanlıkda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi bittikten sonra 2 ml PBS konuldu**,** santrifüj (2000 rpm, 5 dk) edildi ve süpernatan atıldı. Tüplere 150 µL PBS eklendi ve vortekslendi. Şekil 18 ve Şekil 19' da gösterildiği gibi hücreler flow sitometri cihazında analiz edildi. CD11c, CD80 ve CD86 belirteçlerinin pozitif olan hücrelerin yüzdesi belirlenirken ilk olarak tek tek düşen hücreler kapılandı. Forward scatter (FSC)-A ve FSC-H grafiğinden diagonal alanda saçılım gösteren hücreler analiz edildi. Bu hücrelerden granülarite (side scatter-area, SSC-A) ve boyutları (FSC-A) göz önüne alınarak yeni bir grafik daha çizildi ve

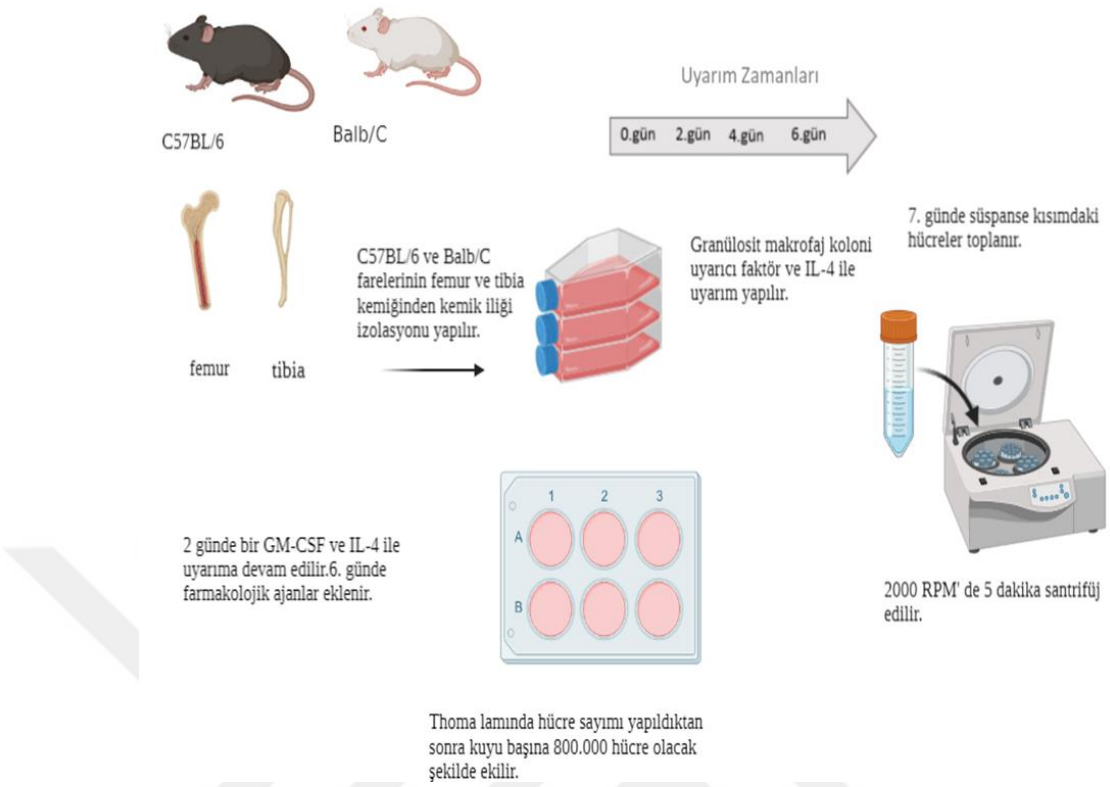
istenilen hücreler yeniden kapılandı.



Şekil 18. Makrofaj % Kapılama Stratejisi

3.7 .Dendritik Hücrelerin Üzerine Farmakolojik Ajanların Eklenmesi

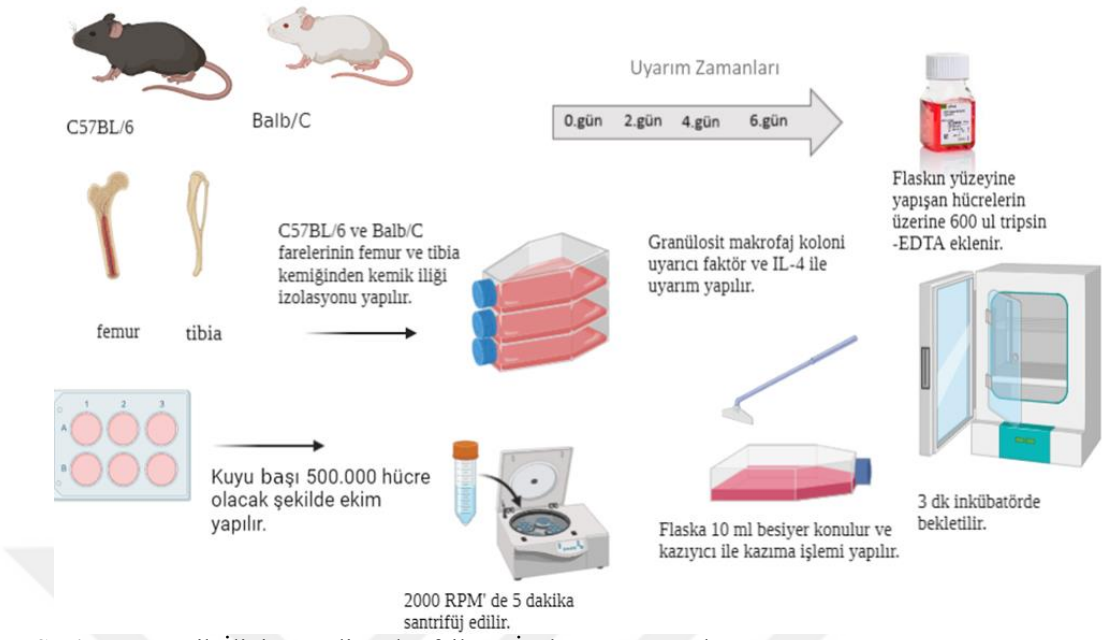
Şekil 20' de gösterildiği gibi C57BL/6 ve Balb/c farelerinden kemik iliği izolasyonu yapıldıktan sonra elde edilen hücreler flasklara ekildi. GM-CSF ve IL-4 ile 2 günde bir uyarım yapıldı. 7. Günün sonunda süspanse kısımdaki hücreler 6 kuyulu plaklara ekildi. 6 gün yapışması beklendi. Daha sonra vitamin D3, deksametazon, minosiklin, A151 ODN gibi farmakolojik ajanlar eklendi.



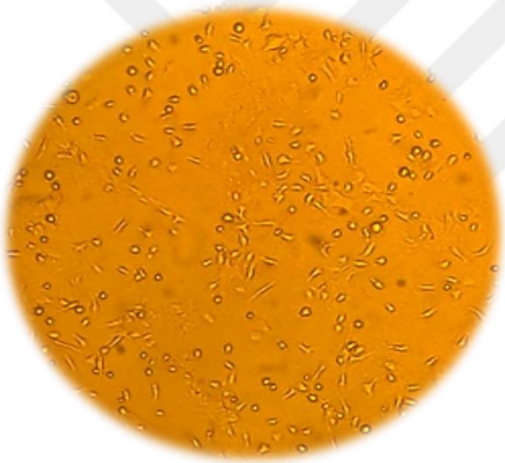
Şekil 19. Dendritik hücrelerin üzerine farmakolojik ajanların eklenmesi

3.8. Kemik İliği Türevli Makrofajların İzolasyonu ve Kültürü

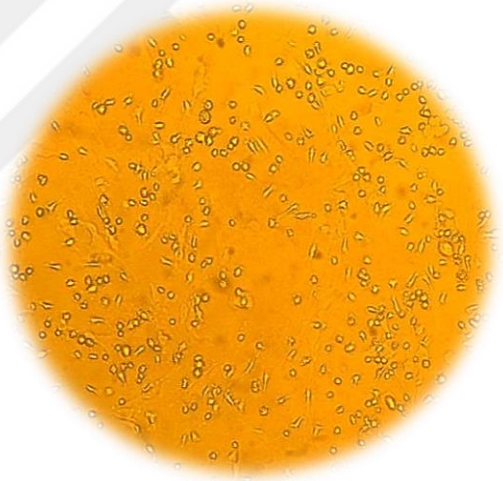
Şekil 21'de gösterildiği gibi makrofaj eldesi için C57BL/ 6J ve Balb/c türü fareler sevofluran ile bayıltılıp servikal dislokasyon uygulandı. Fare femur veya tibiasından ex vivo ortamda elde edilen kemik iliği hücreleri eritrosit ve lenfositlerden arındırıldıktan sonra 20 ng/mL fare rekombinan GM-CSF ve IL-4 ile inkübe edildi**.** 2 günde bir uyarımları yapıldı. 7.günün sonunda flaska yapışan hücreler 6 kuyulu plaklara ekildi. 2 gün yapışmasını bekledikten sonra üzerine 1,5 µM konsantrasyonunda A151 ODN isimli immünsüpresif bir oligonükleotid eklendi.



Şekil 20. Kemik İliği Türevli Makrofajların İzolasyonu ve Kültürü



Şekil 21. C57BL/6 Makrofaj Görüntüsü



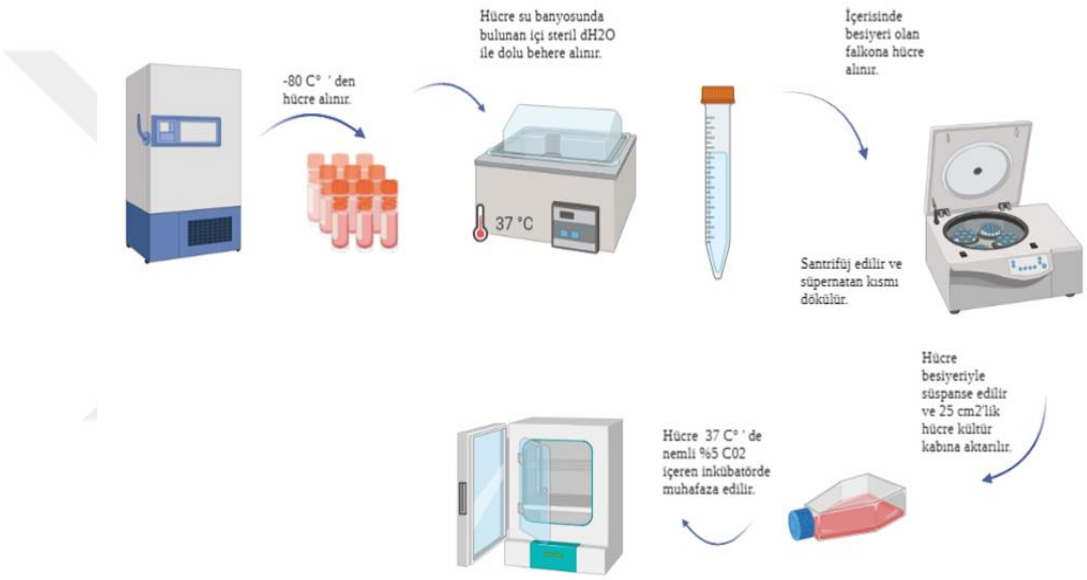
Şekil 22. BALB/c Makrofaj Görüntüsü

3.9. Hücre Hatları ile İn-vitro Çalışmalarının Planlanması

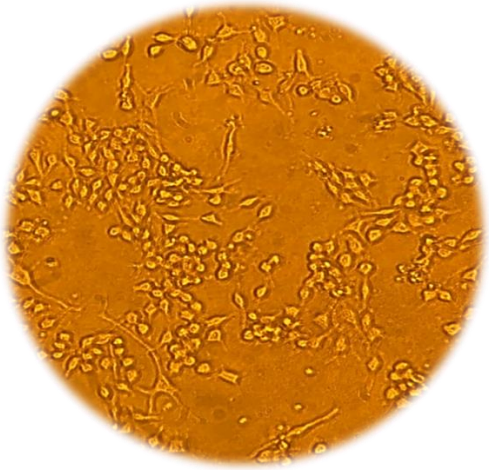
3.9.1 Hücre Hattının Kültürü

Çalışmamızda fare makrofaj hücre hattı olarak RAW.264.7 kullanıldı. Şekil 24'de görüldüğü gibi -80 C° 'den alınarak 37 C°' de su banyosunda ısıtılan dH2O ile dolu behere alındı. Tam olarak çözünmeleri beklenmeden hücrenin bulunduğu tüp

alkollerek laminer akım kabinine alındı, üzerlerine önceden 37 C° ‘de ısıtılmış tam hücre kültür ortamı pastör pipeti ile eklendi. Hücreler hızlı bir şekilde bulunduğu tüpten falkon tüpe alındı, santrifüj edildi ve süpernatan uzaklaştırılıp taze tam hücre kültür ortamında süspanse edildi. Hücreler ilk olarak 25 cm^2 lik hücre kültür kaplarına alındı. Hücreler iki gün sonra 75 $cm^{2'}$ lik kültür kabına alındı. Hücreler belirlenen yoğunluğa ulaştığında iki günde bir pasajlama işlemi yapıldı. Hücrelerin ekimi 6 kuyulu plaklara, kuyu başına 500.000 olacak şekilde yapıldı. 2 gün süspanse hücrelerin aderan hale geçmesi yani yapışması beklendikten sonra kuyulara 1,5 ,3 ve 5 µM konsantrasyonlarında A151 eklendi.



Şekil 23. RAW 264.7 Hücre Hattının Kültürü

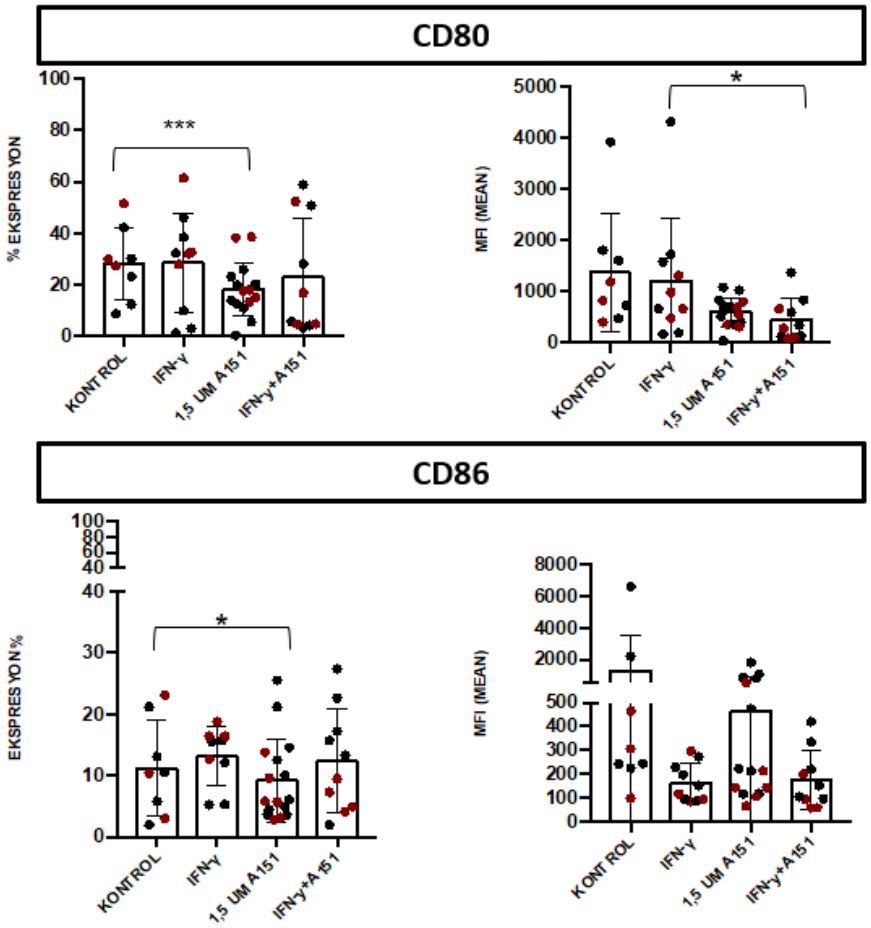


Şekil 24. RAW.264.7 Hücre Hattı Görüntüsü

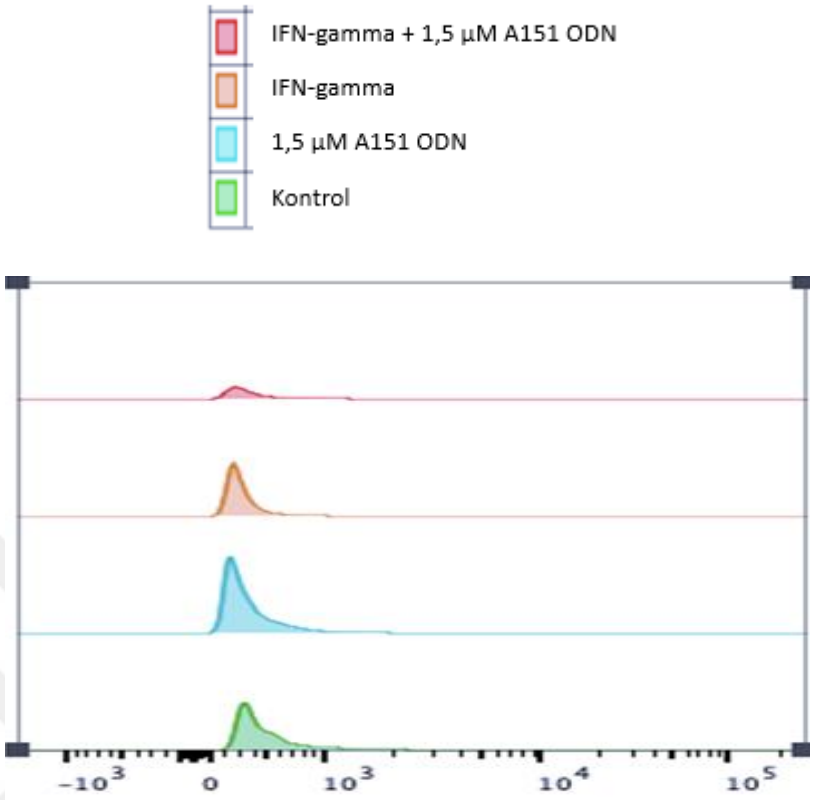
4. BULGULAR

4.1 .Makrofaj CD80 ve CD86 Ekspresyon Sonuçları

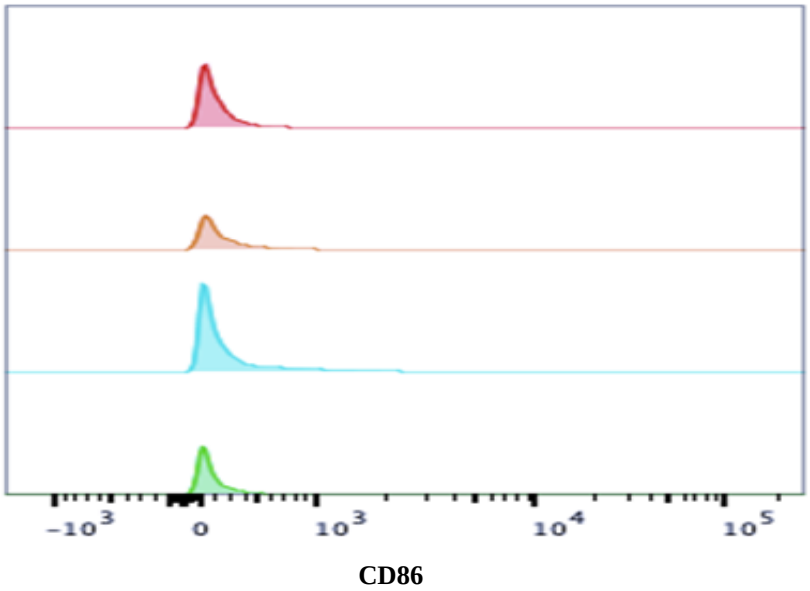
Şekil 26' da gösterildiği gibi C57BL/6 ve BALB/c farelerinden elde edilen makrofajların ekimini yaptıktan sonra 4 farklı grupta CD80 ve CD86 ekspresyon seviyeleri analiz edildi. % ekspresyon seviyelerine bakıldığında kontrol grubuna göre 1,5 µM A151 ve IFN-gamma + 1,5 µM A151 eklenilen koşulların CD80 ve CD86 seviyelerinde azalma gözlemlendi. Yapılan istatiksel analiz sonucunda kontrol grubuyla 1,5 µM A151 eklenilen grup arasında anlamlı bir farklılık görüldü. Buna ek olarak IFN-gamma ve IFN-gamma + 1,5 µM A151 koşulları arasında anlamlı farklılık görüldü. CD86'nın % ekspresyon değerlerine bakıldığında ise kontrol grubuyla 1,5 µM A151 eklenilen grup arasında anlamlı farklılık görüldü.



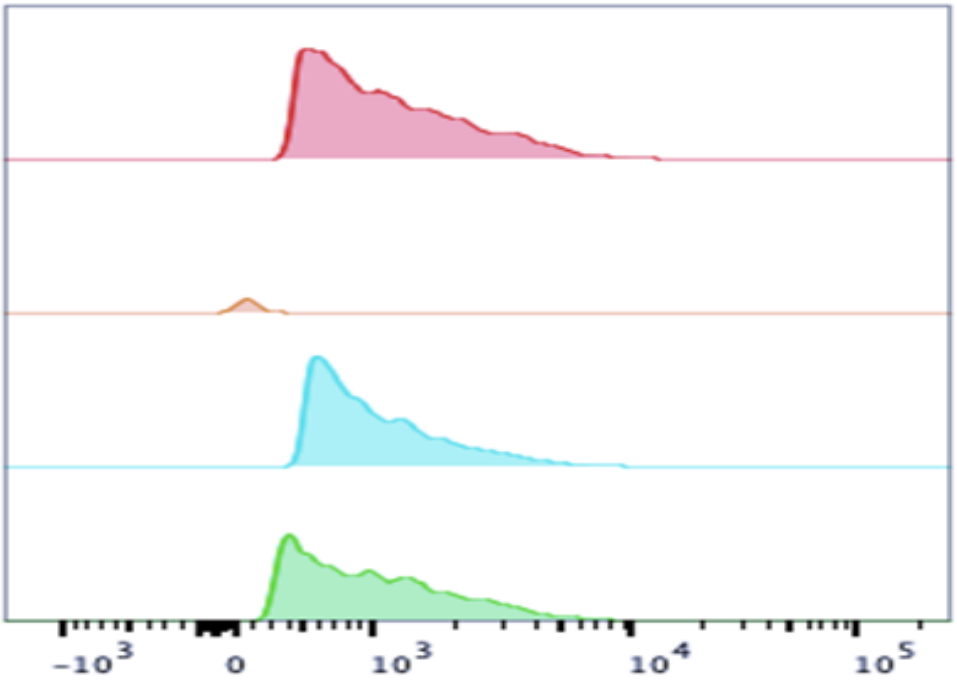
Şekil 25. C57BL/6 ve Balb/c farelerde CD80 ve CD86 belirtecinin yüzde ekspresyon ve ortalama floresan yoğunluğunun (MFI) değişimi



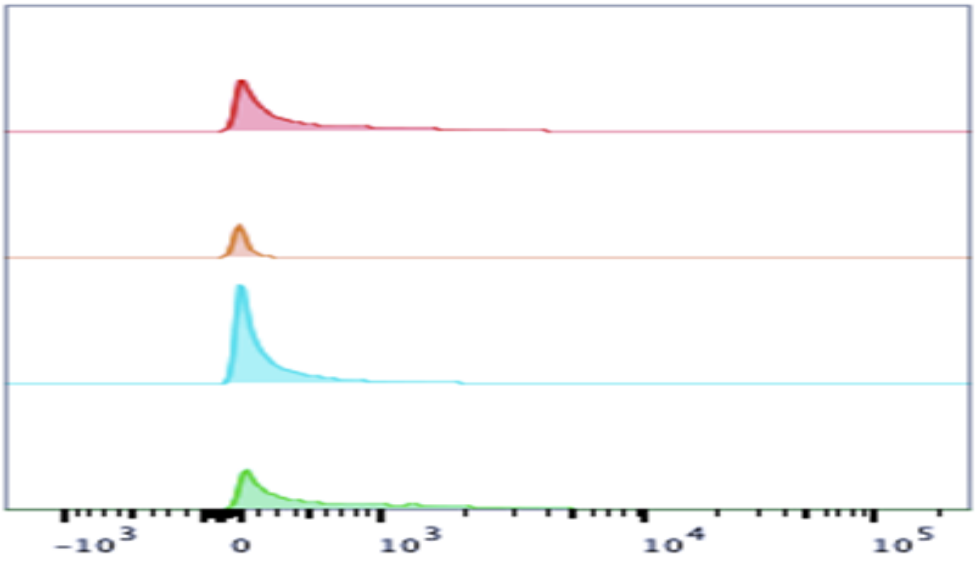
Şekil 26. CD86 % Ekspresyona Göre Represantatif



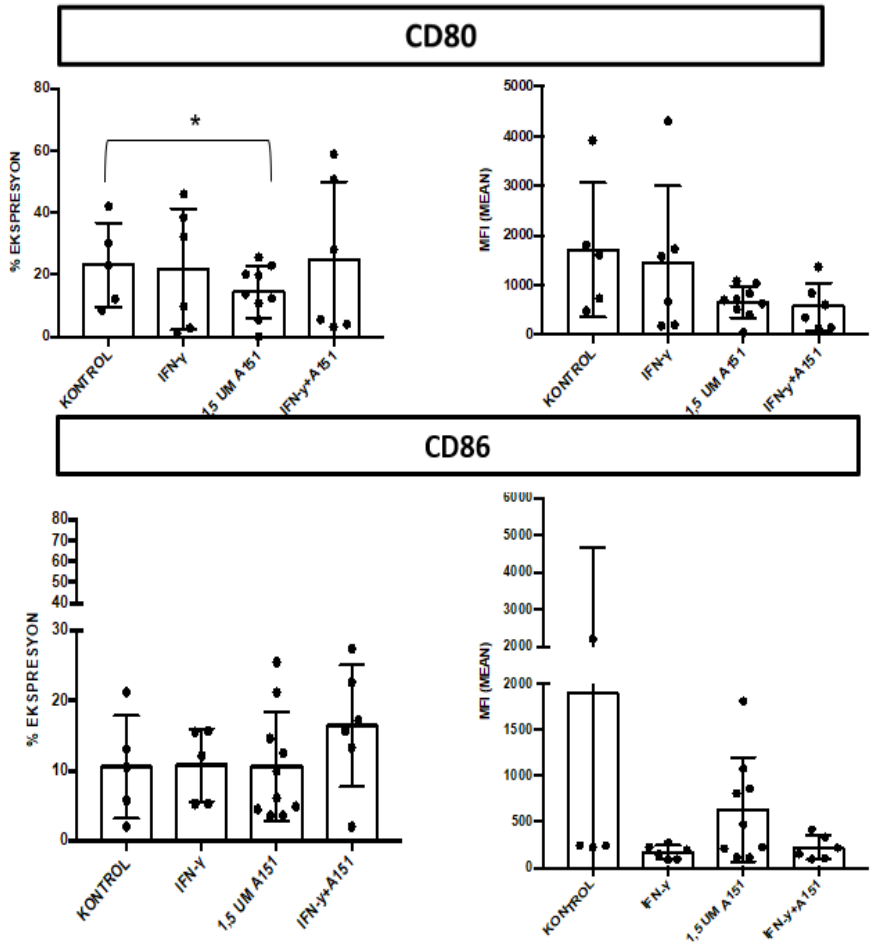
Şekil 27. CD86 MFI Değerlceriene Göre Represantatif



Şekil 28. CD80 % Ekspresyona Göre Represantatif

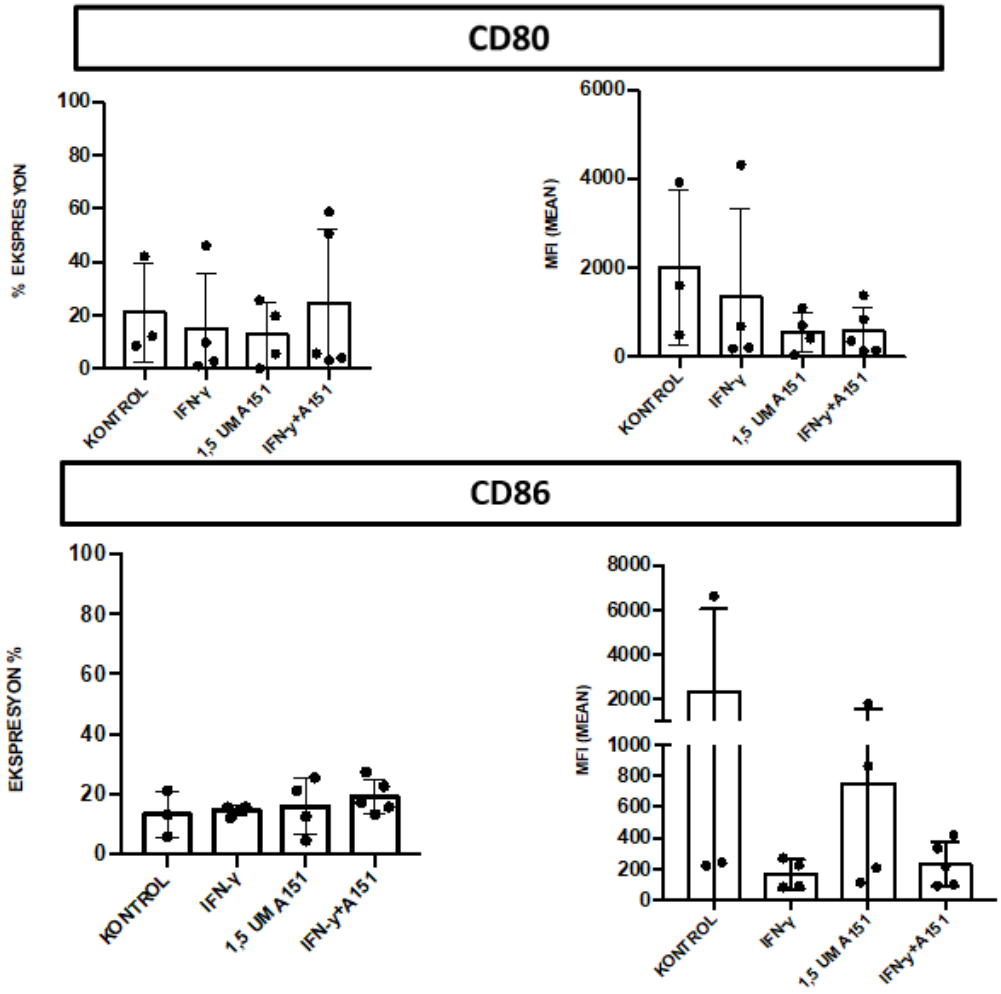


Şekil 29. CD80 MFI Değerlceriene Göre Represantatif



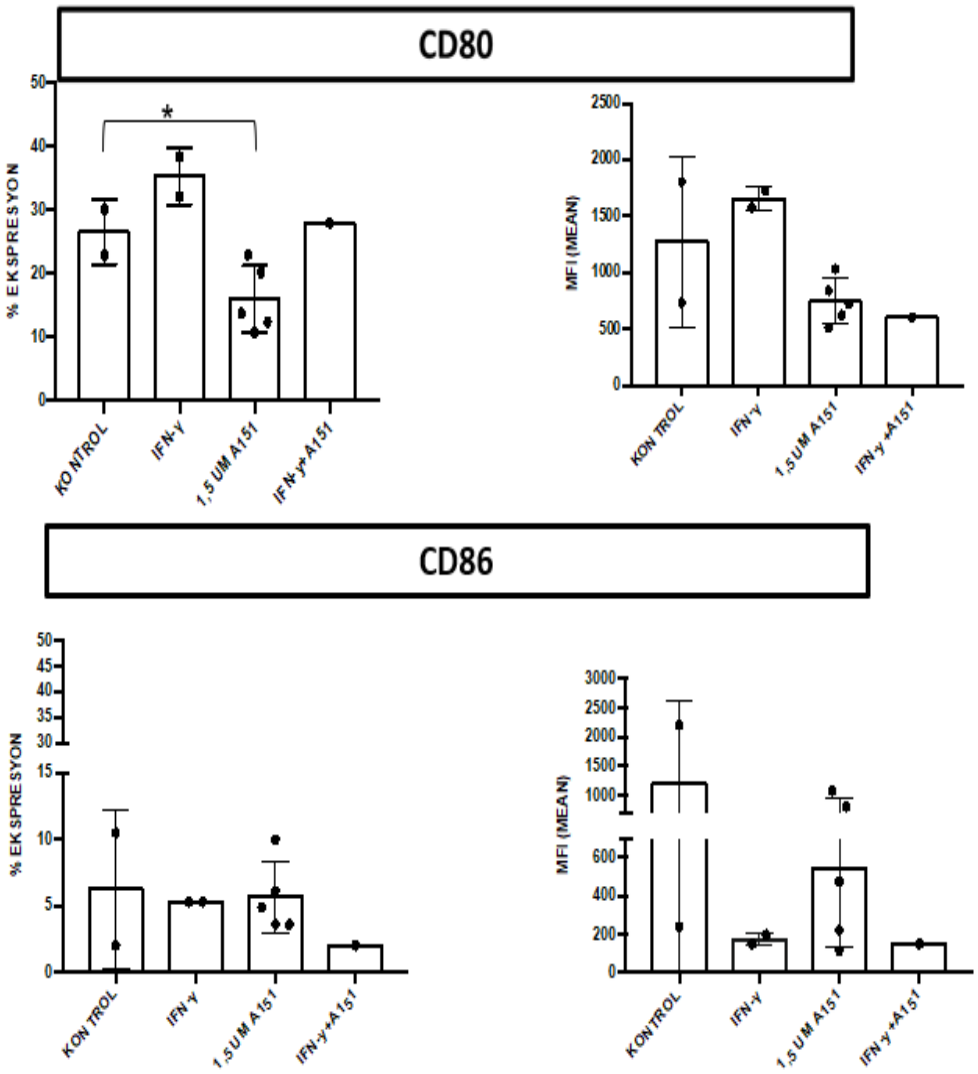
Şekil 30. C57BL/6 dişi ve erkek farelerinden elde edilen makrofajların CD80 ve CD86 belirtecinin yüzde ekspresyon ve ortalama floresan yoğunluğunun (MFI) değişimi

Şekil 31' de gösterildiği gibi C57BL/6 dişi farelerden elde edilen makrofajların CD80 ve CD86 ekspresyon seviyeleri analiz edildi. % ekspresyon seviyelerine bakıldığında kontrol grubuna oranla 1,5 µM A151 eklenilen koşulda CD80 seviyesinde azalma gözlemlendi ve bu azalma istetistiksel olarak anlamlı bulundu. Buna ek olarak IFN-gamma ve IFN-gamma + 1,5 µM A151 koşulları arasında anlamlı farklılık görüldü.



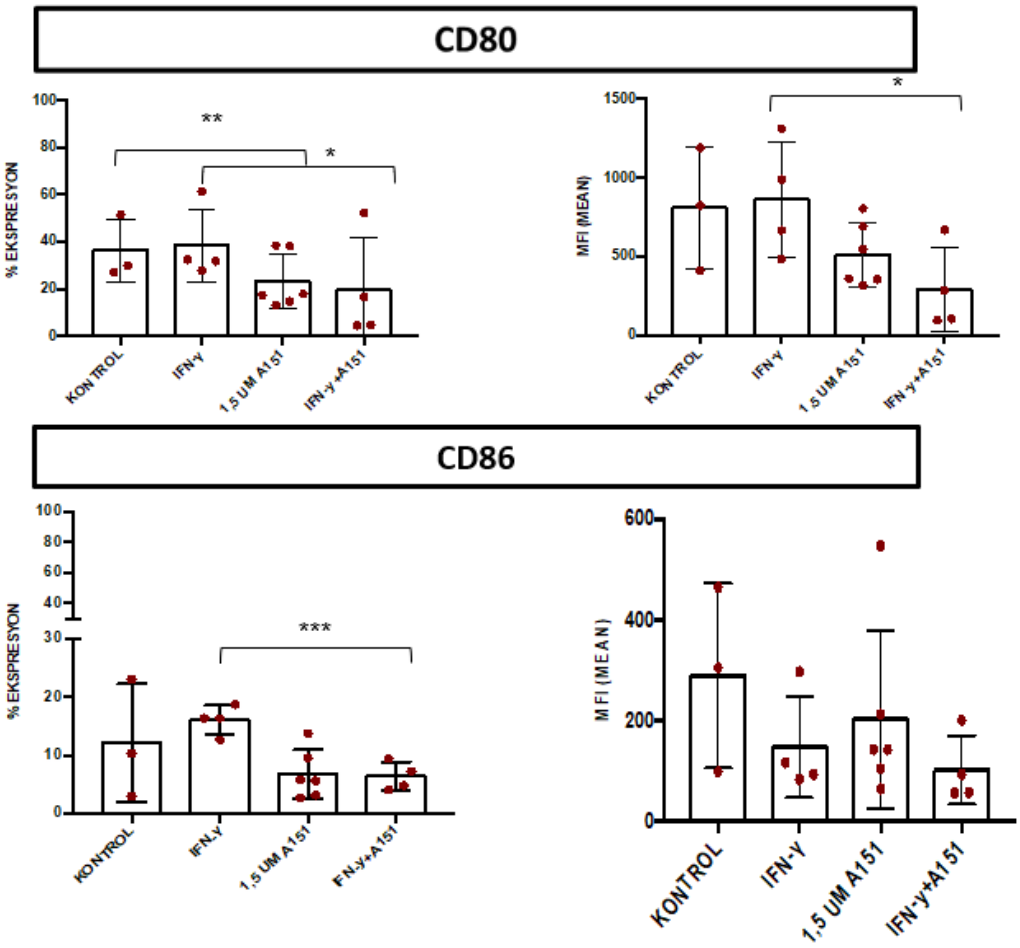
Şekil 31. C57BL/6 dişi farelerinden elde edilen makrofajların CD80 ve CD86 belirtecinin yüzde ekspresyon ve ortalama floresan yoğunluğunun (MFI) değişimi

Şekil 32' de gösterildiği gibi C57BL/6 dişi farelerde CD80 ve CD86 belirtecinin yüzde ekspresyon seviyelerine bakıldığında 1,5 µM A151, IFN-gamma ve IFN-gamma + 1,5 µM A151 koşulları kontrol grubuyla kıyaslandı ve istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı.



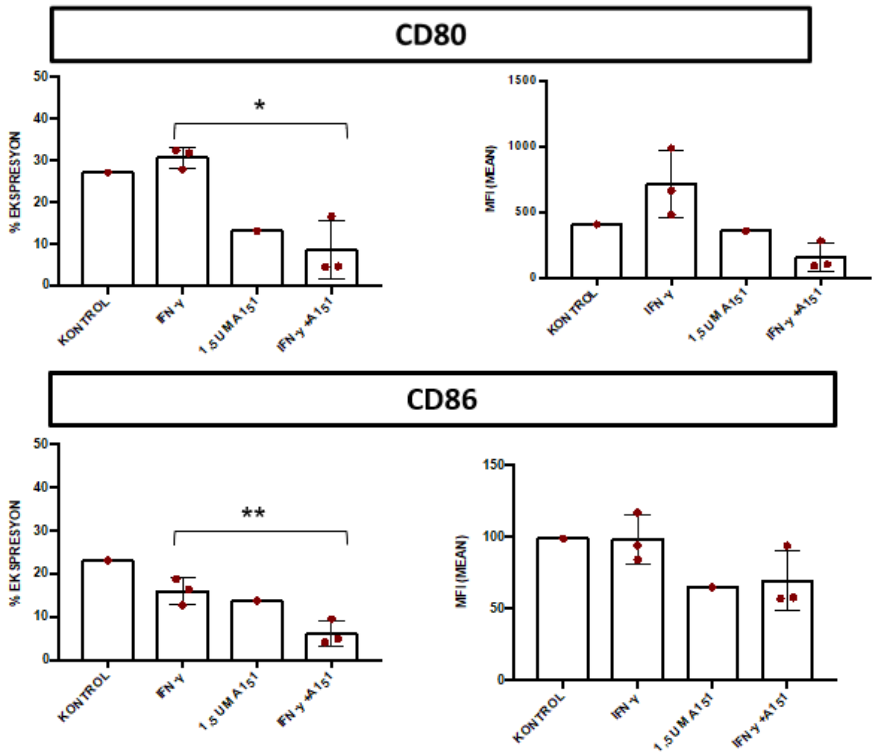
Şekil 32. C57BL/6 erkek farelerinden elde edilen makrofajların CD80 ve CD86 belirtecinin yüzde ekspresyon ve ortalama floresan yoğunluğunun (MFI) değişimi

Şekil 33' de gösterildiği gibi C57BL/6 farelerde CD80 ve CD86 belirtecinin yüzde ekspresyon seviyelerine bakıldığında kontrol grubuyla 1,5 µM A151 koşulu arasında anlamlı bir farklılık görüldü.



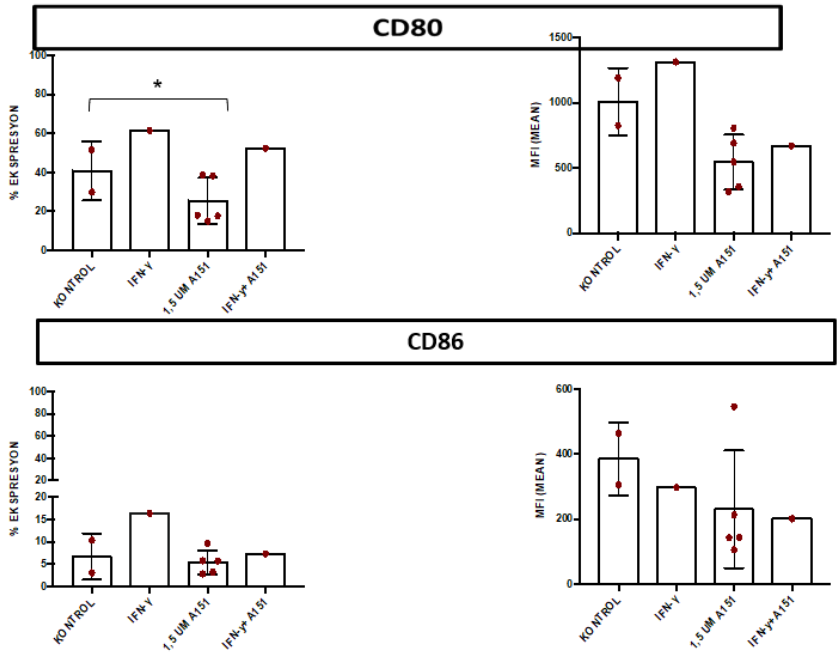
Şekil 33. Balb/c dişi farelerinden elde edilen makrofajların CD80 ve CD86 belirtecinin yüzde ekspresyon ve ortalama floresan yoğunluğunun (MFI) değişimi

Şekil 34'de gösterildiği gibi BALB/c dişi farelerinden elde edilen makrofajların ekimini yaptıktan sonra 4 farklı grupta CD80 ve CD86 ekspresyon seviyeleri analiz edildi. % ekspresyon seviyelerine bakıldığında kontrol grubuna göre 1,5 µM A151 ve IFN-gamma + 1,5 µM A151 eklenilen koşulların CD80 ve CD86 seviyelerinde azalma gözlemlendi. Yapılan istatiksel analiz sonucunda kontrol grubuyla 1,5 µM A151 eklenilen grup arasında anlamlı bir farklılık görüldü. Buna ek olarak IFN-gamma ve IFN-gamma + 1,5 µM A151 koşulları arasında anlamlı farklılık görüldü. CD80 MFI grafiklerine bakıldığında IFN-gamma ve IFN-gamma + 1,5 µM A151 grupları arasında anlamlı farklılık görüldü. CD86'nın % ekspresyon değerlerine bakıldığında ise IFN-gamma ve IFN-gamma + 1,5 µM A151 grupları arasında anlamlı farklılık görüldü.



Şekil 34. Balb/c dişi farelerinden elde edilen makrofajların CD80 ve CD86 belirtecinin yüzde ekspresyon ve ortalama floresan yoğunluğunun (MFI) değişimi

Şekil 35' de gösterildiği gibi BALB/c dişi farelerinden elde edilen makrofajların CD80 ve CD86 ekspresyon seviyeleri analiz edildi. % ekspresyon seviyelerine bakıldığında kontrol grubuna göre 1,5 µM A151 ve IFN-gamma + 1,5 µM A151 eklenilen koşulların CD80 ve CD86 seviyelerinde azalma gözlemlendi. Yapılan istatiksel analiz sonucunda IFN-gamma ve IFN-gamma + 1,5 µM A151 koşulları arasında anlamlı farklılık görüldü. CD86'nın % ekspresyon değerlerine bakıldığında ise IFN-gamma ve IFN-gamma + 1,5 µM A151 grupları arasında anlamlı farklılık görüldü.

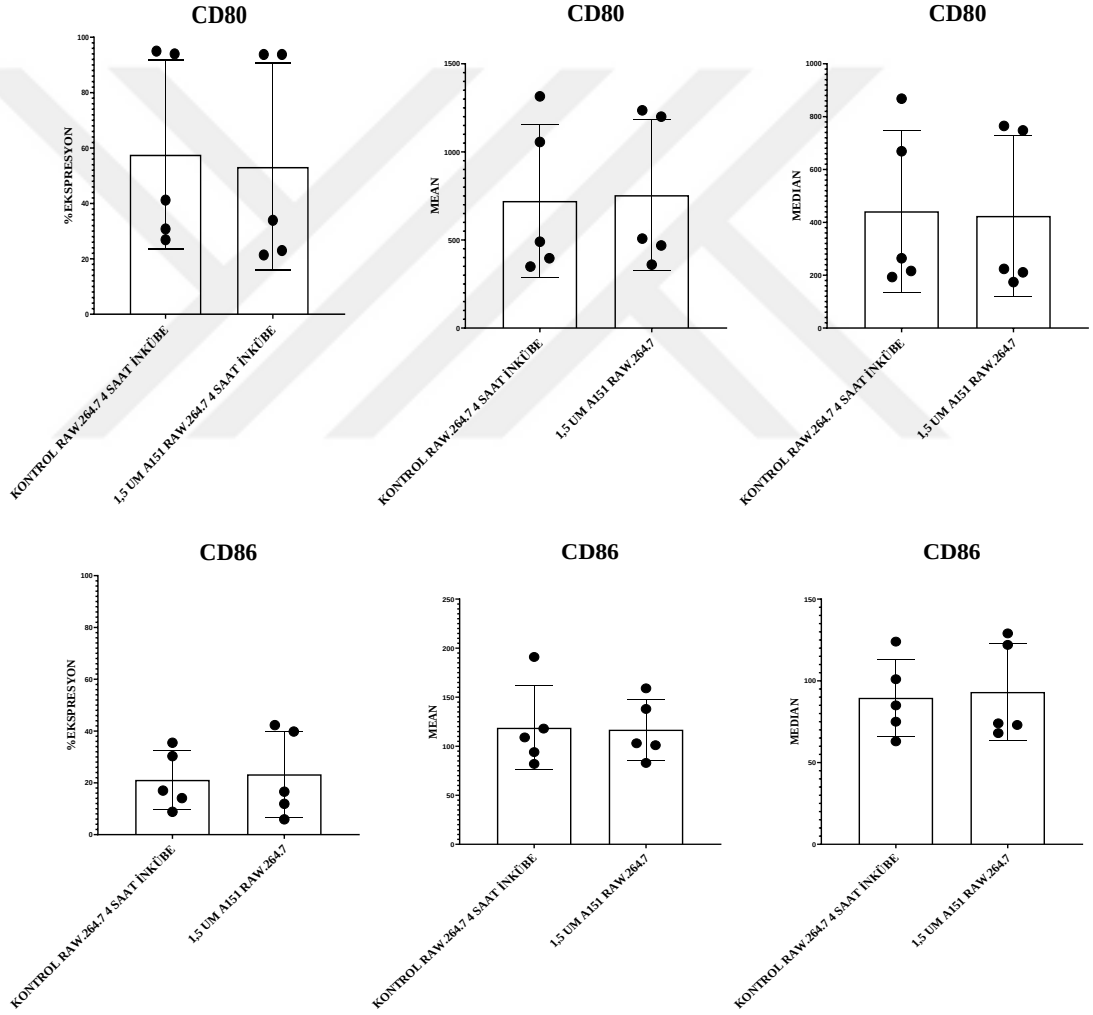


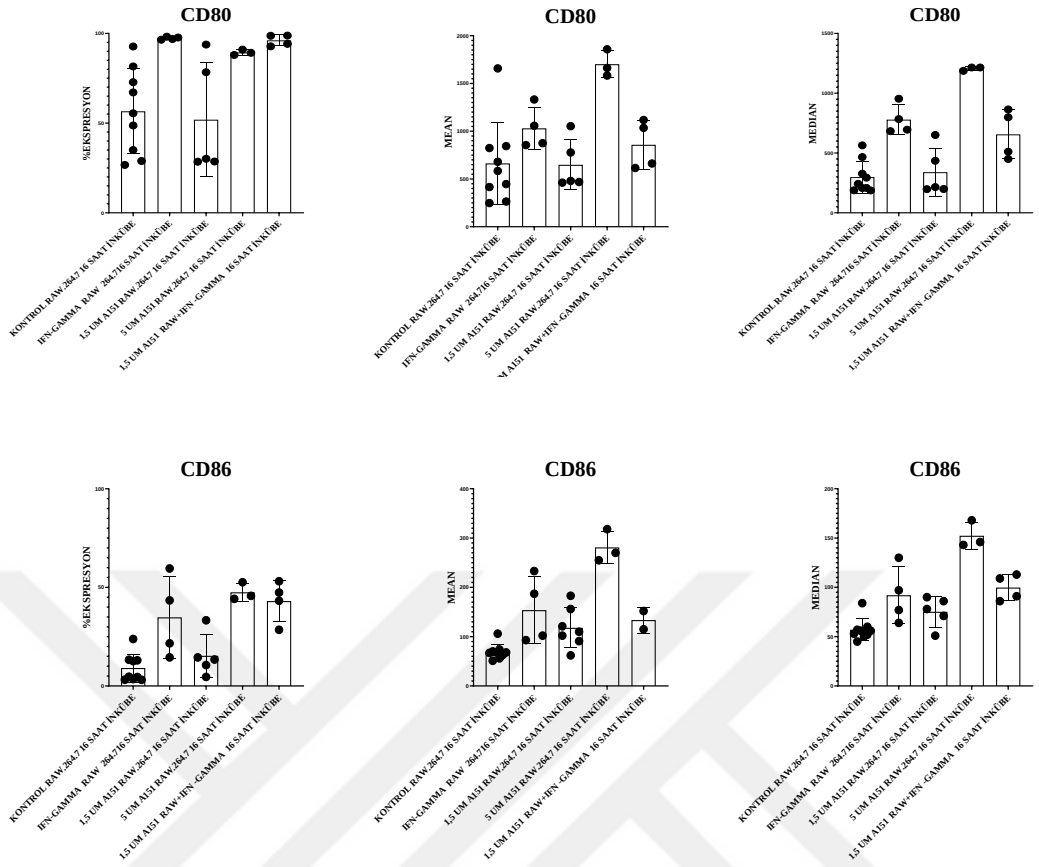
Şekil 35. Balb/c erkek farelerinden elde edilen makrofajların CD80 ve CD86 belirtecinin yüzde ekspresyon ve ortalama floresan yoğunluğunun (MFI) değişimi

Şekil 36' da gösterildiği gibi BALB/c erkek farelerden elde edilen makrofajların CD80 ve CD86 ekspresyon seviyeleri analiz edildi. % ekspresyon seviyelerine bakıldığında kontrol grubuna göre 1,5 µM A151 eklenilen koşulun CD80 ve CD86 ekspresyon seviyelerinde azalma gözlemlendi bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

4.2 .RAW 264.7 Hücre Hattı CD80 ve CD86 Ekspresyon Sonuçları

Çalışmamızda fare makrofaj hücre hattı olarak RAW.264.7 kullanıldı. Hücreler belirlenen yoğunluğa ulaştığında iki günde bir pasajlama işlemi yapıldı. Hücrelerin ekimi 6 kuyulu plaklara, kuyu başına 500.000 olacak şekilde yapıldı. 2 gün süspanse hücrelerin aderan hale geçmesi yani yapışması beklendikten sonra kuyulara 1,5 ve 5 µM konsantrasyonlarında A151 eklendi.





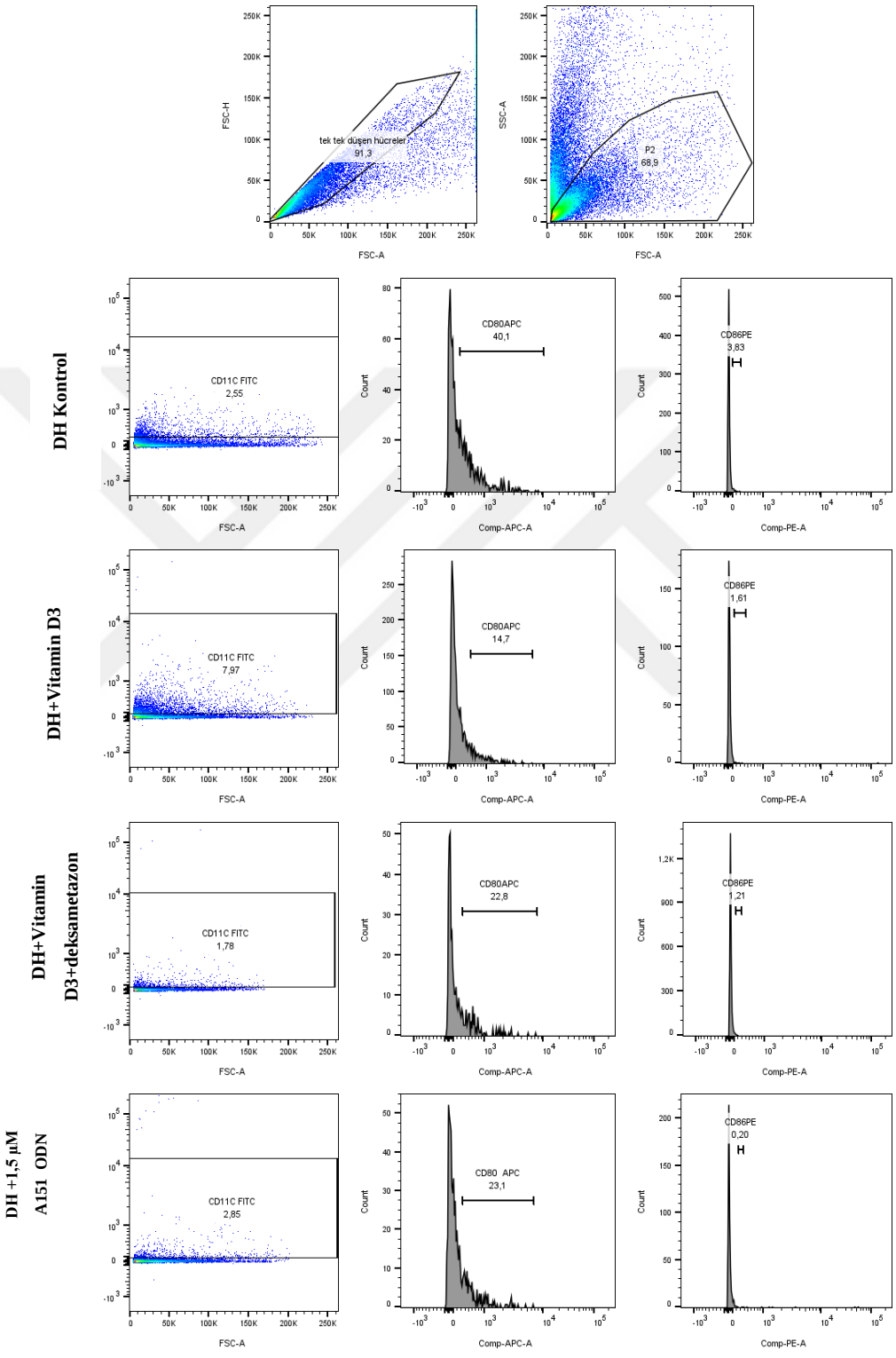
Şekil 36. RAW 264.7 hücre hattının CD80 CD86 yüzey belirteçlerinin % , MEDIAN, MEAN değişim grafikleri

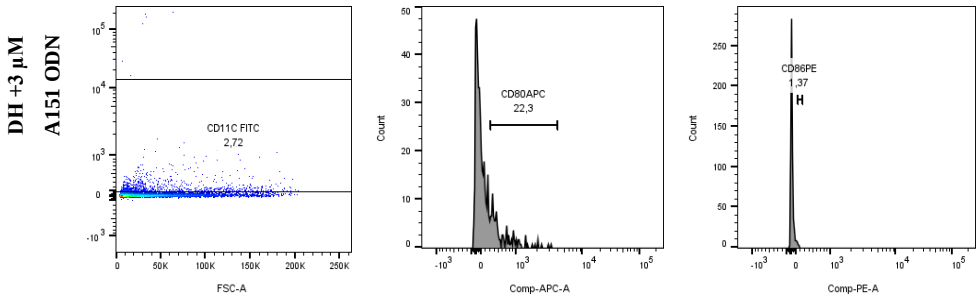
RAW 264.7 fare makrofaj hücre hattında 1,5 µM A151 ekleyip 4 saat inkübe ettiğimiz deney sonuçlarında CD80 ekspresyonuna baktığımızda % grafiğinde bazı koşullarda düşüş gözlense de gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. CD86 ekspresyon grafiklerini incelediğimizde kontrol ile 1,5 µM A151 eklediğimiz grup arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

1,5 µM A151 oligonükleodini 16 saat inkübe ettiğimiz sonuçlarda ise % CD80 ekspresyon grafiklerine baktığımızda kontrol grubuyla IFN-Gamma ve IFN-gamma +A151 ODN koşulları arasında eklediğimiz koşullarda anlamlı bir farklılık gözlenmiştir.

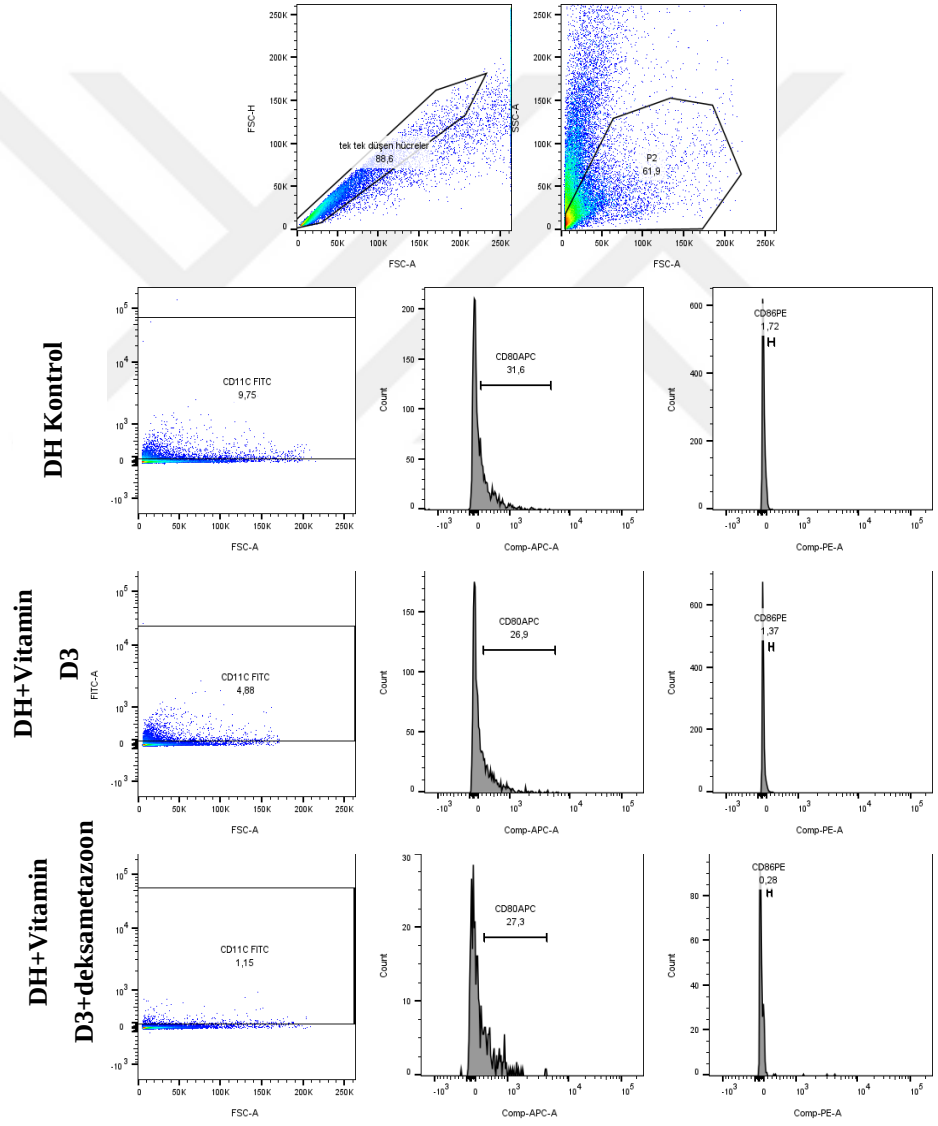
CD80 median grafiğine baktığımızda ise kontrol grubuyla IFN-Gamma koşulu arasında anlamlı bir farklılık gözlenmiştir. IFN-gamma eklediğimiz koşullarda CD80 ve CD86 seviyelerinde artış beklenmektedir. Sonuç literatür ile uyumludur.

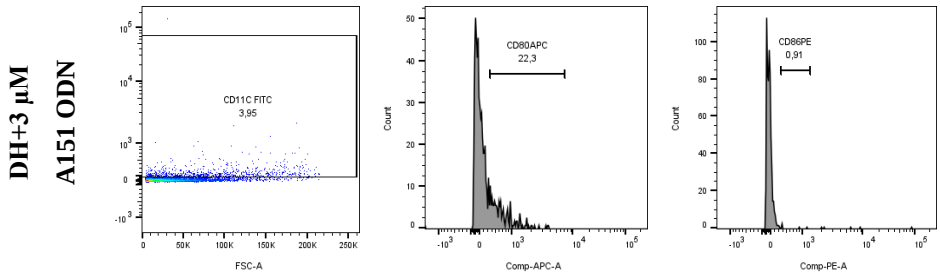
4.3. Dendritik Hücre CD80 ve CD86 Ekspresyon Sonuçları





Şekil 37.C57BL/6 farelerinden elde edilen dendritik hücelerin CD80, CD86 ekspresyon düzeylerinin temsili akım sitometri grafikleri





Şekil 38. C57BL/6 farelerinden elde edilen dendritik hücelerin CD80, CD86 ekspresyon düzeylerinin temsili akım sitometri grafikleri

C57BL/6 ve BALB/c farelerinden elde edilen hücrelerin ekimi 6 kuyulu plaklara yapıldıktan sonra vitamin D3, deksametazon, A151 ODN oligonükleoditi eklenmiştir. Akış sitometride CD11c , CD80 ve CD86 ekspresyon seviyeleri analiz edilmiştir.

Yapılan analizler sonucunda C57BL/6 ve Balb/C farelerinden elde edilen hücrelerin CD11c ekspresyonun %2-10 aralığında olduğu görülmüştür. Kontrol grubunun CD80 ekspresyon seviyesinin %40 civarında olduğu görülmüştür. CD86 ekspresyon seviyesine bakıldığında ise kontrol grubunda %2-10 aralığında olduğu gözlemlenmiştir.

Vitamin D3, deksametazon ve A151 ODN oligonükleotid eklenen koşullarda ise CD80 seviyelerinde azalma gözlenen koşullar olsa da belirgin bir azalma gözlenmemiştir. Vitamin D3 + Dex ve A151 ODN koşullarının CD80 ve CD86 seviyeleri karşılaştırılığında belirligin bir fark görülmemiştir. Vitamin D3 + Dex ve A151 ODN koşulların CD80 seviyesi % 20-25 civarında olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubuna göre CD80 seviyesinde düşüş gözlenmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İmmünolojik toleransın bozulması, Tip 1 Diyabet (T1D), Romatoid Artrit (RA), Multipl Skleroz (MS) ve İnflamatuar Bağırsak Hastalığı (IBD) gibi hastalıklara yol açar. Dünya çapında yaklaşık 10 kişiden 1'inin (%7,6-9,4) otoimmün hastalıklardan muzdarip olduğu tahmin edilmektedir. Otoimmün hastalarda yapılan çalışmalar lenfoid ve miyeloid hücreler de dahil olmak üzere bağışıklık hücrelerinin anormal aktivasyonunun, otoimmünitenin hedef organlarında enflamasyona yol açtığını göstermiştir. Şu anda, otoimmün hastalıklar için onaylanmış tedaviler, hastalığın sonuçlarını etkili bir şekilde iyileştirebilen ancak diğer yandan sıklıkla ciddi yan etkilerle ilişkili olan immünomodülatör ve immünosüpresif ilaçların ömür boyu uygulanmasını içerir. Bu tedavilerde kullanılan ilaçlar spesifik ve tedavi edici değildir. Yan etki olarak kronik enfeksiyon veya kanser gelişimi riskine yol açan sistemik, genelleştirilmiş ve kalıcı bir immünsüpresyona neden olabilir. (Wekerle, Segev, Lechler & Oberbauer, 2021). Bu durumda alternatif yaklaşımlardan biri tolerans indükleyici özellik kazandırılmış dendritik hücrelerin (DH) ya da makrofajların sistemik ve/veya lokal uygulanması olabilir. Dendritik hücre/ makrofaj bazlı terapötik yaklaşımlar, öz antijenlerin neden olduğu otoimmün hastalıkların tedavisinde ve organ transplantasyonu sonrası alloimmün toleransı sağlamak için hedeflenmektedir. (Cristiano Scottà ve ark,2016)

Makrofaj polarizasyonu, otoimmün hastalıklarda önemli bir rol oynar, makrofajlar çoğunlukla hastalık onarımının erken evresinde proinflamatuar M1 olarak ortaya çıkar ve iyileşmeyi destekleyen M2 tipi, hastalık onarımının geç evresinde yaygındır. M1/M2 polarizasyonundaki dengesizlik, otoimmün hastalıklarda hayati bir rol oynar. Bu nedenle, makrofaj polarizasyonunun yönünü düzenlemek, otoimmün hastalık patogenezini iyileştirebilir. (Gbaguidi, Colin & Staels, 2014) M1 ve M2 makrofajları, dinamik olarak değişen makrofaj fenotipi için iki uç durumdur. Bu nedenle hastalık aktivitesini ve tedavi etkinliğini değerlendirmek için M1 veya M2'nin sayısından ziyade M1/M2 oranını kullanmak gereklidir..

Çalışmamızda C57BL/6 ve BALB/c farelerinden elde ettiğimiz kemik iliğinden türevlenen makrofajları immünsüpresif bir oligonükleotid olan A151 ODN ekleyerek CD80 ve CD86 ekspresyonlarını azaltarak M2 fenotipli makrofaj tipine

dönüştürmeyi hedefledik. C57BL/6 ve BALB/c farelerinden elde ettiğimiz kemik iliğinden türevlenen makrofajların A151 ODN isimli immünsüpresif oligonükleotid eklendikten sonra CD80 ve CD86 ekspresyon seviyelerinde azalma olduğu ve uyarıcılık kapasitesinin azalabileceği sonucuna varılmıştır. Sonuç olarak elde ettiğimiz ilk verilere göre; A151 ile immünomodülator fenotipe döndürülmüş olan makrofajların, otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılabilme potansiyeli olduğu düşünülmektedir. BALB/c farelerinde CD80 ve CD86 baskılaması C57BL/6 farelerine göre daha belirgin olmuştur. Bunun nedeni ise C57BL/6 ve BALB/c farelerinin immünolojik olarak birbirinden farklı olmasıdır. C57BL/6 ve BALB/c fareleri doğuştan gelen bağışıklık yanıtlarında, özellikle tip 1 ve tip 2 yardımcı T hücreleri (Th1 ve Th2) arasında farklılık gösterir. C57BL/6 farelerinde, Th1 bağışıklık tepkisi ve IFNy üretimi kilit rol oynar. BALB/c farelerinde Th2 bağışıklık tepkisini indüklemek daha kolaydır. BALB/c fareleri, C57BL/6 farelerinden daha güçlü hümoral tepki üretme eğilimindedir. C57BL/6 ve BALB/c fareleri majör histokompatibilite (MHC) sınıfı I gen lokusunun H2 bölgesinde farklı gen sekanslarına sahiptir. BALB/c fareleri H2d iken C57BL/6, H2b'dir. Bu iki suşun gen sekansındaki fark, H2 lokusundadır. Bununla birlikte, her iki suşun hücrelerine yanıt verebilecek bazı antiserum veya antikorlar, MHC haplotipi arasında ayrım yapamaz bu nedenle, bunu elde etmek için spesifik monoklonal antikorlar (mAb'ler) kullanılmalıdır. (Trunova ve ark, 2011)

İlerleyen çalışmalarda Kollajen (CIA) ile indüklenen artritli fare modelinde ve Multipl skleroz (MS) modeli olan Deneysel Otoimmün Ensefalomiyelit *(Experimental Autoimmune Encephalomyelitis; EAE*)'de A151 ODN ile indüklelenen makrofajlar terapötik tedavi yöntemi olarak denenebilir. Çalışmanın devamında CD80 ve CD86'nın yanısıra M1 ve M2 polarizasyonu saptamaya yönelik olarak M2 makrofaj sitokinlerinin düzeylerine (IL-10,TGF-β, IL-13, IL-4, Arg1) bakılması planlanmıştır.

Çalışmamızda RAW 264.7 isimli fare makrofaj hücre hattı kullanılmıştır. RAW 264.7 hücreleri, BALB/c farelerinden türetilen Abelson lösemi virüsü dönüştürülmüş hücre hattından kaynaklanan monosit/makrofaj benzeri hücrelerdir. (Taciak ve ark, 2018) Bu makrofaj hücre hattında A151 ODN ekleyerek CD80 ve CD86 ekspresyon seviyelerini düşürerek M2 fenotipli hücre hattına dönüştürmeyi hedefledik. A151 ODN eklediğimiz koşulların CD80 ve CD86 ekspresyon

seviyelerinde belirgin bir azalma gözlemlenmemiştir. Literatürde RAW 264.7 hücre hattında A151 ODN ile bir çalışma yapılmamıştır. RAW 264.7 makrofaj hücre hattı M1 tipli makrofaj hücre hattıdır. Yaptığımız deneyler sonucunda pasaj sayısı yüksek olan hücreler ile pasaj ayısı düşük olan hücrelere göre CD80 ve CD86 seviyelerinde farklılık gözlenmiştir. Yapılan literatür çalışmalarında Raw 264.7 makrofaj hücre hattı pasaj sayısına göre stabilitesinin değiştiği gözlenmiştir. (Taciak ve ark ,2018) İlerleyen çalışmalarda pasaj numarası daha düşük olan hücrelerle çalışılıp, A151 ODN oligonükleotidinin konsantrasyonu arttırılarak çalışma tekrarlanarak CD80 ve CD86 seviyelerinde değişme olup olmadığına bakılacaktır. RAW 264.7 fare makrofaj hattında CD80 % ekspresyon seviyesine bakıldığında % 60-70 aralığında olduğu analiz edilmiştir. IFN-gamma eklediğimiz koşullarda % ekspresyon seviyesi % 90 -95 aralığına çıkmıştır. CD86 % ekspresyon seviyelerine bakıldığında 20-25 aralığında olduğu görülmüştür. IFN -gamma eklediğimiz koşullarda CD86 % ekspresyonu 40-50 aralığına çıktığı gözlenmiştir. A151 eklenen koşulların CD80 ve CD86 seviyelerinde anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

Çalışmamızda kullandığımız diğer bir hücre grubu ise dendritik hücrelerdir. DH' ler, bağışıklık tepkilerinin başlatılmasında ve ayrıca bağışıklık toleransının sürdürülmesinde çok önemli bir rol oynar. DH'ler hem yabancı antijenleri hem de dokulardan türetilen endojen antijenleri sunar. Bu nedenle bağışıklık sistemi, otoimmün veya istenmeyen bağışıklık yanıtlarından kaçınmak için zararsız ve zararlı antijenleri ayırt edebilir. (Comi ve ark. 2020)

Literatür, DH' lerin bağışıklığı veya toleransı başlatması için kilit bir faktörün, DH'lerin olgunlaşma aşaması olduğuna işaret etmektedir. Enfeksiyon veya enflamasyon tarafından sağlanan tehlike sinyallerinin yokluğunda, DH' lerin kendi kendine antijene özgü T hücrelerinin apoptozunu silerek veya indükleyerek toleransı indükleyecek olgunlaşmamış bir durumda kaldığı genel olarak kabul edilir. Yapılan çalışmalarda DH yüzeyindeki MHC moleküllerinin ve yardımcı uyarıcı reseptörlerin düşük ekspresyonunun T hücrelerini yeterince uyarmadığını ve bunun sonucunda T hücresi anerjisine yol açtığı bildirilmiştir. Vitamin D3, deksametazon gibi farmakolojik ajanlarla muamale edilen tolerojenik dendritik hücreler yapılan literatür çalışmalarında, yüksek MHC sınıf II ifadesi, düşük CD80 ve CD86 seviyesi ile karakterize edilir. (Comi ve ark. 2020)

Çalışmamızda C57BL/6 ve BALB/c farelerinden elde ettiğimiz dendritik hücreleri vitamin D3, deksametazon gibi farmakolojik ajanlarla ve immünsüpresif bir oligonükleotid olan A151 ODN oligonükleotid ile muamale edilmiştir. Literatürde DH' ler Vit D3 ve deksametazon ile muamele edildiğinde IL-10 üretimi, sınıf II MHC-aracılı antijen sunumunun düşük ekspresyonu (örn: HLA-DR) ve uyarıcı moleküllerin (CD80, CD86) düşük ekspresyon sergilediği bildirilmiştir. Vitamin D3 ve deksametazon ile indüklenen TolDH' lerin T hücre cevaplarının inhibisyonunu sağladığı veya düşürdüğü ve immün cevabı bir TH2 profiline dönüştürdüğü bildirilmiştir. VitD3-DH ve DEX-TolDH'ler programlanmış ölüm ligand (PD-L1, PD-L2) ve immünoglobulin benzeri transkript (ILT)-3/-4 gibi inhibitör moleküllerinin ekspresyonu yükselir, IL-10, CCL22 gibi düzenleyici sitokinlerin üretimini indükleme özelliği gösterir. (Ferreira ve ark. 2012)

Çalışmamızda CD11c ekspresyonu %2-10 aralığında gözlemlenmiştir. İleride ek deneyler yapılarak CD11c ekspresyon eden hücre popülasyonun arttırılması hedeflenmektedir. Çalışmamızda CD80 ekspresyon seviyesi % 30-40 aralığındadır. CD86 ekspresyon seviyesi ise % 2-10 aralığındadır. Literatürde yapılan çalışmalarda CD80 ekspresyon seviyesi % 40-60 CD86 seviyesi ise %20-30 aralığındadır. Bu farklılıklardan dolayı ek optimizasyon deneyleri yapılması planlanmıştır (Huang , Yan,Xuemei & Wang,2013). İleriki deneylerde kullanılan farmakolojik ajanlar farklı dozlarda uygulanacaktır. CD80 ve CD86 ekspresyonuna ek Ll-10 ve IDO gibi düzenleyici mediyatörlerin sentezi ve MHC-II ekspresyonundaki değişikliklerin de irdelenmesi hedeflenmektedir.

6. KAYNAKLAR

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2022). Cellular and molecular immunology E-book. Elsevier Health Sciences.

Adorini, L. Tolerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory Anderson, A.E.; Sayers, B.L.; Haniffa, M.A.; Swan, D.J.; Diboll, J.; Wang, X.-N.; Isaacs, J.D.; Hilkens, C.M.U. Differential regulate doi: 10.3390/ijms22157970

Awasthi, A. et al. (2007) A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. Nat. Immunol. 8, 1380–1389 doi: 10.1038/ni1541.

Banchereau, J.; Briere, F.; Caux, C.; Davoust, J.; Lebecque, S.; Liu, Y.J.; Pulendran, B.; Palucka, K. Immunobiology of dendritic cells. Annu. Rev. Immunol. 2000, 18, 767–811 doi: 10.1146/annurev.immunol.18.1.767.

Bartels LE, Hvas CL, Agnholt J, Dahlerup JF, Agger R. Human dendritic cell antigen presentation and chemotaxis are inhibited by intrinsic 25-hydroxy vitamin D activation. Int Immunopharmacol. 2010 Aug;10(8):922-8. doi: 10.1016/j.intimp.2010.05.003. Epub 2010 May 17. PMID: 20483384.

Bartels, L.E.; Hvasb, C.L.; Agnholtb, J.; Dahlerupb, J.F.; Aggera, R. Human dendritic cell antigen doi: 10.3390/nu7095383

Bode C, Wang J, Klinman DM, Suppressive oligodeoxynucleotides promote the generation of regulatory T cells by inhibiting STAT1 phosphorylation, Int. Immunopharmacol 23 (2014) 516–522 https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.09.027

Bode, C., Yang, X. P., Kiu, H., & Klinman, D. M. (2013). Suppressive oligodeoxynucleotides promote the development of Th17 cells. PloS one, 8(7), e67991. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067991

Bouladoux, N., Hall, J. A., Grainger, J. R., dos Santos, L. M., Kann, M. G., Nagarajan, V., Verthelyi, D., & Belkaid, Y. (2012). Regulatory role of suppressive motifs from commensal DNA. Mucosal immunology, 5(6), 623–634. https://doi.org/10.1038/mi.2012.36

Canning, M.O.; Grotenhuis, K.; de Wit, H.; Ruwhof, C.; Drexhage, H.A. 1-alpha,25-dihydroxyvitamin D3 (1,25(OH)(2)D(3)) doi: 10.1530/eje.0.1450351.

Cantorna MT, Snyder L, Lin YD, Yang L. Vitamin D and 1,25(OH)2D regulation of T cells. Nutrients. 2015 Apr 22;7(4):3011-21. doi: 10.3390/nu7043011. PMID: 25912039; PMCID: PMC4425186.

Cantorna, M.T.; Snyder, L.; Lin, Y.D.; Yang, L. Vitamin D and 1,25(OH)2D regulation of T cells. doi: 10.3390/nu7043011.

Cao W, Rosen DB, Ito T et al Plasmacytoid dendritic cell-specific receptor ILT7-FcεRIγ inhibits Toll-like receptor-induced interferon production. J Exp Med 2006; 203: 1399–1405. doi: 10.1084/jem.20052454

Carrasco YR, Batista FD. B cells acquire particulate antigen in a macrophage-rich area at the boundary between the follicle and the subcapsular sinus of the lymph node. Immunity (2007) 27(1):160–71. doi: 10.1016/ j.immuni.2007.06.007 cells. J. Bone Miner. Res. 2007, 22, V69–V73.

Cauwels, A., & Tavernier, J. (2020). Tolerizing Strategies for the Treatment of Autoimmune Diseases: From *ex vivo* to *in vivo* Strategies. *Frontiers in immunology*, *11*, 674. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00674

Christakos, S.; DeLuca, H.F. Minireview: Vitamin D: Is there a role in extraskeletal health? Endocrinology 2011, 152, 2930–2936. doi: 10.1210/en.2011-0243.

Collin, M., & Bigley, V. (2018). Human dendritic cell subsets: an update. Immunology, 154(1), 3–20. https://doi.org/10.1111/imm.12888

Comi, M. et al. (2020) Coexpression of CD163 and CD141 identifies human circulating IL-10-producing dendritic cells (DC-10). Cell. Mol. Immunol. 17, 95–107 DOI: 10.1038/s41423-019-0218-0

Coutinho, A.E.; Chapman, K.E. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. Mol. Cell. Endocrinol. 2011, 335, 2–13. D3, gamma interferon, and control of proliferation of Mycobacterium tuberculosis by human DeLuca, H.F. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. Am. J. Clin. DOI: 10.1016/j.mce.2010.04.005

DeLuca, H.F. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. Am. J. Clin. Nutr. 2004, 80 (Suppl. 6), 1689s–1696s https://doi.org/10.1093/ajcn/80.6.1689S

Dembic, Z. (2015). The cytokines of the immune system: the role of cytokines in disease related to immune response. Academic Press.

Diny, N. L., Rose, N. R., & Čiháková, D. (2017). Eosinophils in Autoimmune Diseases. Frontiers in immunology, 8, 484. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00484 Disord. 2012, 13, 21–29 DOI: 10.4049/jimmunol.164.9.4443

Falcón-Beas, C.; Tittarelli, A.; Mora-Bau, G.; Tempio, F.; Pérez, C.; Hevia, D.; Behrens, C.; Flores, I.; Falcón-Beas, F.; Garrido, P.; et al. Dexamethasone turns tumor antigen-presenting cells into tolerogenic dendritic cells with T cell inhibitory functions. Immunobiology 2019, 224, 697–705. doi: 10.1016/j.imbio.2019.05.011.

Ferreira, G.B.; van Etten, E.; Verstuyf, A.; Waer, M.; Overbergh, L.; Gysemans, C.; Mathieu, C. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 alters murine dendritic cell behaviour in vitro and in vivo. Diabetes/Metab. Res. Rev. 2011, 27, 933–941 doi: 10.1002/dmrr.1275.

Fu, X., Liu, H., Huang, G., & Dai, S. S. (2021). The emerging role of neutrophils in autoimmune-associated disorders: effector, predictor, and therapeutic targets. MedComm, 2(3), 402–413. https://doi.org/10.1002/mco2.69

Fukunaga, A., Khaskhely, N. M., Sreevidya, C. S., Byrne, S. N., & Ullrich, S. E. (2008). Dermal dendritic cells, and not Langerhans cells, play an essential role in inducing an immune response. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950),180(5),3057–3064. https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.5.3057

Gregory, G. D., Robbie-Ryan, M., Secor, V. H., Sabatino, J. J. Jr & Brown, M. A. Mast cells are required for optimal autoreactive T cell responses in a murine model of multiple sclerosis. Eur. J. Immunol. 35, 3478–3486 (2005)

Gursel, I., Gursel, M., Yamada, H., Ishii, K. J., Takeshita, F., & Klinman, D. M. (2003). Repetitive elements in mammalian telomeres suppress bacterial DNA-

induced immune activation. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 171(3), 1393–1400. https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.3.1393

Hamilos D. L. (1989). Antigen presenting cells. Immunologic research, 8(2), 98–117. https://doi.org/10.1007/BF02919073

Hampers the maturation of fully active immature dendritic cells from monocytes. Eur. J. Endocrinol. 2001, 145, 351–357. doi: 10.1530/eje.0.1450351.

Harry, R.A.; Anderson, A.E.; Isaacs, J.D.; Hilkens, C.M.U. Generation and characterisation of therapeutic tolerogenic dendritic cells for rheumatoid arthritis. Ann. Rheum. Dis. 2010, 69, 2042–2050. doi: 10.1136/ard.2009.126383

Huang, Y., Zhao, Y., Ran, X., & Wang, C. (2014). Increased expression of herpesvirus entry mediator in 1,25-dihydroxyvitamin D3-treated mouse bone marrow-derived dendritic cells promotes the generation of $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ regulatory T cells. *Molecular medicine reports*, *9*(3), 813–818. https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1874

Hughes, C. E., Benson, R. A., Bedaj, M., & Maffia, P. (2016). Antigen-Presenting Cells and Antigen Presentation in Tertiary Lymphoid Organs. Frontiers in immunology, 7, 481. https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00481 Immunopharmacol. 2010, 10, 922–928] immunomodulatory agents. Trends Mol. Med. 2002, 8, 174–179. induction of antigen-specific T cells. Clin. Immunol. 2009, 133, 69–77.

Jacobi AM, Diamond B: Balancing diversity and tolerance: lessons from patients with systemic lupus erythematosus. J Exp Med 202:341–344, 2005 DOI: 10.1084/jem.20050221

Jenkins, M.K. and Schwartz, R.H. (1987) Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. J. Exp. Med. 165, 302–319 https://doi.org/10.1084/jem.165.2.302

Kambayashi, T., & Laufer, T. M. (2014). Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell. Nature reviews. Immunology, 14(11), 719–730. https://doi.org/10.1038/nri3754

Kaminski, J. J., Schattgen, S. A., Tzeng, T. C., Bode, C., Klinman, D. M., & Fitzgerald, K. A. (2013). Synthetic oligodeoxynucleotides containing suppressive TTAGGG motifs inhibit AIM2 inflammasome activation. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 191(7), 3876–3883. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300530

Karakhanova, S. et al. (2011) IL-27 renders DC immunosuppressive by induction of B7-H1. J. Leukoc. Biol. 89, 837–845 https://doi.org/10.1189/jlb.1209788

Kendal, A.R. et al. (2011) Sustained suppression by Foxp3+ regulatory T cells is vital for infectious transplantation tolerance. J. Exp. Med. 208, 2043–2053 doi: 10.1084/jem.20110767.

Kleijwegt, F.S. et al. (2011) Transfer of regulatory properties from tolerogenic to proinflammatory dendritic cells via induced autoreactive regulatory T cells. J. Immunol. 187, 6357–6364 doi: 10.4049/jimmunol.1101638

Lane, P. J., Gaspal, F. M., McConnell, F. M., Withers, D. R. & Anderson, G. Lymphoid tissue inducer cells: pivotal cells in the evolution of CD4 immunity

and tolerance Front. Immunol. 3, 24 (2012). doi: 10.3389/fimmu.2012.00024
Lee, G.K. et al. (2002) Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. Immunology 107, 452–460 https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2002.01526.x

Lees J. R. (2019). Targeting antigen presentation in autoimmunity. Cellular immunology, 339, 4–9. https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.12.006

Ma, W. T., Gao, F., Gu, K., & Chen, D. K. (2019). The Role of Monocytes and Macrophages in Autoimmune Diseases: A Comprehensive Review. Frontiers in immunology, 10, 1140. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01140

Maldonado, R.A.; von Andrian, U.H. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. Adv Immunol. 2010, 108, 111–165 DOI: 10.1016/B978-0-12-380995-7.00004-5

Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. F1000Prime Rep 2014;6:13. doi: 10.12703/P6-13.

Mascanfroni, I.D. et al. (2013) IL-27 acts on DCs to suppress the T cell response and autoimmunity by inducing expression of the immunoregulatory molecule CD39. Nat. Immunol. 14, 1054–1063 DOI: 10.1038/ni.2695

Mozo, L., Suárez, A., & Gutiérrez, C. (2004). Glucocorticoids up-regulate constitutive interleukin-10 production by human monocytes. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, *34*(3), 406–412. https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2004.01824.x

Mucida, D. et al. (2009) Retinoic acid can directly promote TGF-β-mediated Foxp3+ Treg cell conversion of naive T cells. Immunity 30, 471–472 doi: 10.1016/j.immuni.2009.03.008.

Ochando, J., Ordikhani, F., Jordan, S., Boros, P., & Thomson, A. W. (2020). Tolerogenic dendritic cells in organ transplantation. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*, *33*(2), 113–127. https://doi.org/10.1111/tri.13504

Patente, T. A., Pinho, M. P., Oliveira, A. A., Evangelista, G. C. M., Bergami-Santos, P. C., & Barbuto, J. A. M. (2019). Human Dendritic Cells: Their Heterogeneity and Clinical Application Potential in Cancer Immunotherapy. Frontiers in immunology, 9, 3176. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03176

Penna, G.; Adorini, L. 1 Alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. J. Immunol. 2000, 164, 2405–2411. doı: 10.4049/jimmunol.164.5.2405

Piemonti, L.; Monti, P.; Sironi, M.; Fraticelli, P.; Leone, B.E.; Dal Cin, E.; Allavena, P.; Di Carlo, V. Vitamin D3 affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. J. Immunol. 2000, 164, 4443–4451.

Plantinga, M.; Guilliams, M.; Vanheerswynghels, M.; Deswarte, K.; Branco-Madeira, F.; Toussaint, W.; Vanhoutte, L.; Neyt, K.; Killeen, N.; Malissen, B.; et al. Conventional and Monocyte-Derived CD11b(+) Dendritic Cells Initiate and Maintain T Helper 2 Cell-Mediated Immunity to House Dust Mite Allergen. Immunity 2013, 38, 322–335.] doi: 10.1016/j.immuni.2012.10.016

Presentation and chemotaxis are inhibited by intrinsic 25-hydroxy vitamin D activation. Int. Rastogi, I., Jeon, D., Moseman, J. E., Muralidhar, A., Potluri,

H. K., & McNeel, D. G. (2022). Role of B cells as antigen presenting cells. Frontiers in immunology, 13, 954936. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.954936

Rathinam, V. A., Jiang, Z., Waggoner, S. N., Sharma, S., Cole, L. E., Waggoner, L., Vanaja, S. K., Monks, B. G., Ganesan, S., Latz, E., Hornung, V., Vogel, S. N., Szomolanyi-Tsuda, E., & Fitzgerald, K. A. (2010). The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. Nature immunology, 11(5), 395–402. https://doi.org/10.1038/ni.1864

Sackesen, C., van de Veen, W., Akdis, M., Soyer, O., Zumkehr, J., Ruckert, B., Stanic, B., Kalaycı, O., Alkan, S. S., Gursel, I., & Akdis, C. A. (2013). Suppression of B-cell activation and IgE, IgA, IgG1 and IgG4 production by mammalian telomeric oligonucleotides. Allergy, 68(5), 593–603. https://doi.org/10.1111/all.12133

Sage, P.T. et al. (2018) Dendritic cell PD-L1 limits autoimmunit and follicular T cell differentiation and function. J. Immunol. 200, 2592–2602 DOI: 10.4049/jimmunol.1701231

Sage, P.T. et al. (2018) Dendritic cell PD-L1 limits autoimmunity and follicular T cell differentiation and function. J. Immunol. 200, 2592–2602 https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701231

Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Totaro MG, et al. Macrophage polarization in tumour progression. Semin Cancer Biol 2008;18:349-55. DOI: 10.1016/j.semcancer.2008.03.004

Song, S. et al. (2014) Dendritic cells with an increased PD-L1 by TGF-β induce T cell anergy for the cytotoxicity of hepatocellular carcinoma cells. Int. Immunopharmacol. 20, 117–123 https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.02.027

Song, S., Yuan, P., Wu, H., Chen, J., Fu, J., Li, P., Lu, J., & Wei, W. (2014). Dendritic cells with an increased PD-L1 by TGF-β induce T cell anergy for the cytotoxicity of hepatocellular carcinoma cells. *International immunopharmacology*, *20*(1), 117–123. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.02.027

Sundrud, M.S. et al. (2009) Halofuginone inhibits th17 cell differentiation by activating the amino acid starvation response. Science 324, 1334–1338 T cells inhibiting autoimmune diabetes. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2003, 987, 258–261. T cells via the selective induction of apoptosis. J. Autoimmun. 2004, 23, 233–239. doi: 10.1126/science.1172638.

Taciak, B., Białasek, M., Braniewska, A., Sas, Z., Sawicka, P., Kiraga, Ł., Rygiel, T., & Król, M. (2018). Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. *PloS one*, *13*(6), e0198943. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198943

Tang-Huau, T. L., Gueguen, P., Goudot, C., Durand, M., Bohec, M., Baulande, S., Pasquier, B., Amigorena, S., & Segura, E. (2018). Human in vivo-generated monocyte-derived dendritic cells and macrophages cross-present antigens through a vacuolar pathway. Nature communications, 9(1), 2570. https://doi.org/10.1038/s41467-018-04985-0 treatment of autoimmune

diseases: Selective targeting of myeloid but not plasmacytoid dendritic

Trunova, G. V., Makarova, O. V., Diatroptov, M. E., Bogdanova, I. M., Mikchailova, L. P., & Abdulaeva, S. O. (2011). Morphofunctional characteristic of the immune system in BALB/c and C57BL/6 mice. *Bulletin of experimental biology and medicine*, *151*(1), 99–102. https://doi.org/10.1007/s10517-011-1268-1

Unterholzner, L., Keating, S. E., Baran, M., Horan, K. A., Jensen, S. B., Sharma, S., Sirois, C. M., Jin, T., Latz, E., Xiao, T. S., Fitzgerald, K. A., Paludan, S. R., & Bowie, A. G. (2010). IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. Nature immunology, 11(11), 997–1004. https://doi.org/10.1038/ni.1932

Van Halteren, A.G.S.; Tysma, O.M.; van Etten, E.; Mathieu, C.; Roep, B.O. 1α,25-Dihydroxyvitamin D3 or analogue treated dendritic cells modulate human autoreactive T cells via the selective induction of apoptosis. J. Autoimmun. 2004, 23, 233–239 https://doi.org/10.1016/j.jaut.2004.06.004

Verschoor, C. P., Puchta, A., & Bowdish, D. M. (2012). The macrophage. Leucocytes: Methods and Protocols, 139-156. doi: 10.1002/jbm.a.34599

Wang HB, Ghiran I, Matthaei K, Weller PF (2007) Airway eosinophils: allergic inflammation recruited professional antigen-presenting cells. J Immunol 179: 7585-7592. DOI: 10.4049/jimmunol.179.11.7585

Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, et al: Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. Science 301(5638):1374– 1377, 2003. DOI: 10.1126/science.1086907

Wekerle T., Segev D., Lechler R., Oberbauer R. Strategies for long-term preservation of kidney graft function. Lancet. 2017;389:2152–2162. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31283-7

Wekerle, T.; Segev, D.; Lechler, R.; Oberbauer, R. Strategies for long-term preservation of kidney graft function. Lancet 2017, 389, 2152–2162 https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31283-7

White, J.H. Vitamin D metabolism and signaling in the immune system. Rev. Endocr. Metab. Disord. 2012, 13, 21–29. https://doi.org/10.1007/s11154-011-9195-z

Withers, D. R. et al. Cutting edge: lymphoid tissue inducer cells maintain memory CD4 T cells within secondary lymphoid tissue. J. Immunol. 189, 2094–2098 (2012). https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201639

Xiao, S. et al. (2008) Retinoic acid increases Foxp3 + regulatory T cells and inhibits development of Th17 cells by enhancing TGF-β-driven Smad3 signaling and inhibiting IL-6 and IL-23 receptor expression. J. Immunol. 181, 2277–2284 doi: 10.4049/jimmunol.181.4.2277

Xing N, L Maldonado ML, Bachman LA, McKean DJ, Kumar R, Griffin MD (2002) Distinctive dendritic cell modulation by vitamin D(3) and glucocorticoid pathways. Biochem Biophys Res Commun 297:645–652 https://doi.org/10.1016/s0006-291x(02)02262-3

Xing, Y., & Hogquist, K. A. (2012). T-cell tolerance: central and peripheral. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 4(6), a006957. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006957

Ye, Y., Gaugler, B., Mohty, M., & Malard, F. (2020). Plasmacytoid dendritic cell biology and its role in immune-mediated diseases. Clinical & translational immunology, 9(5), e1139. https://doi.org/10.1002/cti2.1139

Yunna, C., Mengru, H., Lei, W., & Weidong, C. (2020). Macrophage M1/M2 polarization. European journal of pharmacology, 877, 173090.

Zanna, M. Y., Yasmin, A. R., Omar, A. R., Arshad, S. S., Mariatulqabtiah, A. R., Nur-Fazila, S. H., & Mahiza, M. I. N. (2021). Review of Dendritic Cells, Their Role in Clinical Immunology, and Distribution in Various Animal Species. International journal of molecular sciences, 22(15), 8044. https://doi.org/10.3390/ijms22158044

Zlatko Dembic, Chapter 3- Activation of Cells of the Immune System, Editor(s): Zlatko Dembic, The Cytokines of the Immune System, Academic Press, 2015, Pages 57-98, ISBN 9780124199989, https://doi.org/10.1016/B978-0-12-419998-9.00003-1.

Zubizarreta, I.; Flórez-Grau, G.; Vila, G.; Cabezón, R.; España, C.; Andorra, M.; Saiz, A.; Llufriu, S.; Sepulveda, M.; Sola-Valls, N.; et al. Immune tolerance in multiple sclerosis and neuromyelitis optica with peptide-loaded tolerogenic dendritic cells in a phase 1b trial. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2019, 116, 8463–8470. https://doi.org/10.1073/pnas.1820039116

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

MDP	Makrofaj dendritik hücre öncülü
MHC	Majör histokompatibilite kompleksi
PD1	Programlanmış ölüm proteini 1
TGF- β	Dönüştürücü büyüme faktörü β
THR	T hücre reseptörü
Tol-DH	Tolerojenik Dendritik Hücre
TNF-a	Tümör nekröz faktör
Treg	Düzenleyici T hücre
GMC-SF	Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
IL-4	İnterlökin 4
Dex	Deksametazon
NK-κB	Nükleer Faktör Kappa B
IL-10	İnterlökin 10
TCR	T hücresi reseptörü
CTLA-4	Sitotoksik T-lenfosit ile ilişkili protein 4
Mo	Monosit
Vit D3	Vitamin D3
Dex	Deksametazon
ASH	Antijen sunan hücreler
PI	Propidyum İodür
AHR	Aril Hidrokarbon Reseptörü
PD-1	Programlanmış hücre ölüm proteini 1

8. EKLER

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (HADYEK)

Sayı: B.30.2.ULU.0.8Z.00.00 / 26.04.2023
Konu: Dilekçeniz

Prof. Dr. H. Barbaros ORAL

İLGİ: 25.04.2023 Tarihli Dilekçeniz

İlgi dilekçeniz Kurulumuzun 26.04.2023 tarihli toplantısında görüşülmüştür. 27.09.2022 tarih ve 2022 – 13 / 05 karar numarası ile uygun bulduğumuz "*Tolerans İndükleyici Dendritik Hücrelerin Oluşturulması İçin Farklı Yaklaşımların Karşılaştırılması*" başlıklı araştırma projesinin isminin "*Tolerans İndükleyici Antijen Sunan Hücrelerin Oluşturulması İçin Farklı Yaklaşımların Karşılaştırılması*" olarak değiştirilmesi talebinizin uygun olduğuna karar verilmiştir.

Prof. Dr. Gökhan GÖKTALAY
HADYEK Başkanı

9. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda desteğini esirgemeyen, sabırlı ve anlayışlı yaklaşımıyla bendeki değeri çok ayrı olan öğrencisi olmaktan gurur duyduğum Sayın Prof. Dr. Barbaros ORAL hocama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimle ilgili deneysel süreçlerde bana her konuda destek olan, zamanını ayıran Sayın Dr. Öğr. Üyesi Diğdem YÖYEN ERMİŞ hocama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Her konuda desteğini esirgemeyen, sıcak yaklaşımıyla bendeki yeri ayrı olan Sayın Dr. Öğr. Üyesi S. Haldun BAL hocama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca deneysel süreçlerde bana yardımcı olan arkadaşlarım Gözde ARSLAN, Onur ETGÜ, Fatmanur DÜNDAR ve Ceren ESEN ve İmmünoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim boyunca bana manevi olarak destek olan Neslihan ÇAPAROĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisansa başladığım günden mezun olduğum güne kadar bana karşı hep sıcakkanlı davranan her biri benim için çok değerli İmmünoloji ve Doku Tipleme Laboratuvarlarında çalışanlarına Figen AYMAK başta olmak üzere çok teşekkür ederim.

Her kararımda beni koşulsuz destekleyen her zaman yanımda olan, yüksek lisansa başlamamda bana destek olan abim Semih ÇELİK başta olmak üzere tüm aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu yolda beni destekleyen, her anımda yanımda olan varlığıyla bana güç veren nişanlım Orçun İMAMOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Melis ÇELİK

Doğum Yeri ve Tarihi:

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)
Lisans: Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik 2015-2019

Yüksek Lisans: Bursa Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıp-İmmünoloji Anabilim Dalı (2020-Halen)

İletişim (e-posta):

Adres: Bursa Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İmmünoloji Anabilim Dalı 16059, Görükle/Bursa/TÜRKİYE