GÖZDE ARSLAN

İMMÜNOLOJİ ANA BİLİM DALI DOKTORA TEZİ

2025

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERi ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
İMMÜNOLOJİ ANA BİLİM DALI

GEN MODİFİKASYONLARI İLE TOLERANS İNDÜKLEYİCİ HALE GETİRİLMİŞ DENDRİTİK HÜCRELERLE DENEYSEL ARTRİT TEDAVİSİ

GÖZDE ARSLAN

(DOKTORA TEZİ)

BURSA-2025

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

GEN MODİFİKASYONLARI İLE TOLERANS İNDÜKLEYİCİ HALE GETİRİLMİŞ DENDRİTİK HÜCRELERLE DENEYSEL ARTRİT TEDAVİSİ

Gözde ARSLAN

(DOKTORA TEZİ)

DANIŞMAN:

Prof. Dr. H. Barbaros ORAL

ÖNAP - 626

BURSA-2025

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum "**Gen Modifikasyonları İle Tolerans İndükleyici Hale Getirilmiş Dendritik Hücrelerle Deneysel Artrit Tedavisi**" adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Gözde ARSLAN
Tarih ve İmza

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

...../...../.....

Adı Soyadı: Gözde ARSLAN

Anabilim Dalı: İmmünoloji A.D.

Tez Konusu: Gen Modifikasyonları İle Tolerans İndükleyici Hale Getirilmiş Dendritik Hücrelerle Deneysel Artrit Tedavisi

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

Prof. Dr. H. Barbaros ORAL

İmza:

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN……...……...I
KABUL ONAY SAYFASI ..…….. Hata! Yer işareti tanımlanmamış. **TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU ..... II**
İÇİNDEKİLER III
TÜRKÇE ÖZET..... V
İNGİLİZCE ÖZET VI
TEZ KONUSUNUN KÜRESEL SÜRDÜRÜLEBİLİR KALKINMA HEDEFLERİ İLE İLİŞKİSİ..... VII
1.GİRİŞ..... 1
2.GENEL BİLGİLER 2
2.1. Romatoid Artrit 2
2.2. Epidemiyoloji- Küresel Yaygınlık 2
2.3. Romatoid Artrit İçin Risk Faktörleri 4
2.3.1. Cinsiyet ve hormonal faktörler..... 5
2.3.2. Genetik ve epigenetik 6
2.3.3. Sigara kullanımı..... 9
2.3.4. İnhalasyon yoluyla partikül alımı..... 9
2.3.5. Peridontitis ve mikrobiyota..... 10
2.3.6. Diğer etkenler..... 13
2.4. Romatoid Artrit Patogenezi..... 13
2.5. Tanı Testleri 16
2.5.1. Romatoid faktör..... 16
2.5.2. Anti-siklik sitrüline peptit antikoru (ACPA)..... 17
2.5.3. Anti-nükleer antikor (ANA)..... 18
2.6. Tedavi Yöntemleri..... 18
2.7. Antijen Sunumunda Eş Uyaran Sinyalinin ve Dendirit Hücrelerin Önemi .. 19
2.8. Triptofan Metabolizması ve İndolamin 2,3-dioksijenaz (IDO) 22
2.9. Artrit Hayvan Modelleri 25
2.10. Artrit Modellerinde Toleran Dendritik Hücre Tedavisi..... 26
2.11. Gen Tedavisi ve Gen Transfer Yöntemleri..... 27
2.11.1. Viral yöntemler..... 29
2.11.2. Viral olmayan yöntemler..... 30
2.11.3. Direkt gen tedavisi..... 31
2.11.4. Hücresel gen tedavisi..... 32
3.GEREÇ VE YÖNTEM..... 34
3.1. Gereçler..... 34
3.1.1. Çalışmada kullanılan maddeler; 34
3.1.2. Hazırlanan tamponlar ve çözeltiler ve besiyerleri..... 34
3.2. Yöntem..... 35
3.2.1. Hayvan seçimi ve farelerde artrit oluşturma.……..35
3.2.2. Primer dendritik hücrelerin ve diğer hücre hatlarının kültürü..... 37
3.2.3. Primer dendritik hücrelerin boyanması ve morfolojik görüntülenmesi..... 41
3.2.3.1 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) boyama 41
3.2.3.2 Diff Quick boyama 41
3.2.4. Vektörlerin hazırlanması ve analizi..... 42

3.2.5. Plazmitlerin stoklanması ve çoğaltılması 54
3.2.5.1. Transformasyon……..54
3.2.5.2. Küçük ölçekli plazmit izolasyonu (Mini-prep)……...55
3.2.5.3. Orta ölçekli plazmit izolasyonu (Midi-Prep) ……56
3.2.6. Lentivirüs üretimi, titrasyonu ve konstre edilmesi 58
3.2.6.1. Virüs üretim aşamaları……...58
3.2.6.1.1. HEK293FT CaCL2 ile transfeksiyonu……58
3.2.6.1.2. Virüs üretiminin değerlendirilmesi aşaması (virüs titrasyonu)……60
3.2.6.1.3. Lenti konstratör ile lentivirüslerin konstre edilmesi…… …62
3.2.7. Primer dendritik hücrelere terapötik genin aktarılması 63
3.2.7.1. Primer hücrelere gen transdüksiyonu……..63
3.2.7.2. Primer hücrelere plate santirifüj ile gen transdüksiyonu……63
3.2.8. İDO,sitokin düzeylerinin ve T hücre yanıtlarının ölçümü 63
3.2.9. TolDH'lerin *in vivo* olarak kullanılacak miktarda üretilmesi 65
3.2.10. Artritli farelere terapötik TolDH uygulaması……..66
3.2.11. Tedavi uygulanmış farelerden alınan doku örneklerinde yapılan analizler ... 67
3.2.12. İstatistiksel analiz..... 70
4. BULGULAR 71
4.1. Farelerde Artrit Oluşturma..... 71
4.2. Primer Dendritik Hücre ve Diğer Hücre Hatlarının Kültürü 80
4.3. 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) Boyama 85
4.4. Diff Quik Boyama 87
4.5. HEK293 FT Hücrelerinin Üretilmesi 88
4.6. Hazırlanan Vektörlerin Haritaları..... 88
4.7. Plazmit Transformasonu ve Prep İzolasyonu..... 89
4.7.1. DH5& kompetan hücrelere transformasyon 89
4.7.2. Midi-Prep izolasyonu..... 90
4.8. HEK293FT Hücreleri ile Lentivirüs Transdüksiyonu Etkinliği Belirlenmesi ve Primer Dendiritik Hücrelere Terapötik Genin Aktarılması 91
4.9. IDO, Sitokin Düzeylerinin Ölçümü..... 102
4.10.TolDH'lerin in vivo olarak kullanılacak kalite ve miktarda üretilmesi..... 105
4.11. Artritli farelere terapötik TolDH uygulaması..... 110
4.12.Tedavi Uygulanmamış Farelerden Alınan Doku Örneklerinde Yapılan Analizler ……...117
4.13.Tedavi Uygulanmış Farelerden Alınan Doku Örneklerinde Yapılan Analizler 122
5.TARTIŞMA 144
6.KAYNAKÇA 155
7.SİMGELER VE KISALTMALAR..... 170
8.EKLER 172
9.TEŞEKKÜR..... 175
10.ÖZGEÇMİŞ..... 178

TÜRKÇE ÖZET

Romatoid artrit (RA) otoimmün bir hastalıktır ve eklemlerde kronik ağrı ve ilerleyici deformitelere neden olur. Genetik eğilim ve çevresel faktörler hastalığın nasıl ortaya çıktığını büyük ölçüde etkiler. Günümüzde RA tedavisinde kullanılan geleneksel ilaçlara ek olarak TNF-α gibi biyolojik ajanlar hastalığın seyrini değiştirebilir. Bu tedavilere rağmen hastaların büyük bir kısmında tedaviye yanıtsızlık, ilaçlara karşı direnç gelişimi ve ciddi yan etkiler görülmektedir. Özellikle biyolojik ilaçların sistemik olarak yüksek dozlarda uygulanması ve sık enjeksiyonlar gerekliliği nedeniyle, tedavi maliyetleri artmakta ve hasta yaşam kalitesi olumsuz etkilenmektedir.

RA tedavisinde yeni nesil hücre temelli terapötik yaklaşımlara ihtiyaç vardır. Bu tez, genetik olarak modifiye edilerek toleran hale getirilmiş dendritik hücrelerin (DH) kullanıldığı yeni bir hücresel tedavi yaklaşımının RA modeli üzerindeki etkilerini incelemektedir. Bu amaçla, üç farklı genetik modifikasyon yöntemi kullanılmıştır. Bu genetik modifikasyonlar ile (1) yüksek oranda IDO eksprese eden DH'ler, (2) CTLA4-KDEL füzyon proteini içeren vektör ile transfekte edilmiş DH'ler ve (3) CD80/CD86 ekspresyonu baskılanmış ve IDO overekspresyonu içeren kombinasyon vektörüyle modifiye edilmiş DH'ler elde edilmiş ve kolajen ile indüklenerek (CIA) model oluşturmuş farelere enjeksiyon yapılmıştır.

Tedavi uygulanan hayvanlarda klinik artrit skorları kaydedilmiştir ve eklem dokularından histopatolojik incelemeler yapılmıştır. ELISA ve akım sitometrisi testleri, IDO ekspresyonunun arttığını ve CD80/CD86 yüzey ekspresyonunun önemli ölçüde azaltıldığını göstermiştir. DH uygulamasının hayvanların kaliper ölçümleri ile birlikte klinik skorlarında azalmayı sağladığı ve histopatolojik incelemelerde eklemdeki iltihaplanmayı azalttığını ayrıca doku hasarını azalttığını göstermiştir. Ek olarak, primer DH'lere genetik transdüksiyonun literatürde belirtilen ortalama verimliliklerden çok daha başarılı şekilde uygulandığı gösterilmiştir.

Bu çalışma, literatürde çoğunlukla DBA/1 fareleri kullanılarak geliştirilen CIA modelinin aksine, özgün bir şekilde C57BL/6 – BALB/C farelerinde CIA modelini oluşturarak değerlendirmeleri gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: dendritik hücreler, romatoid artrit, genetik modifikasyon, tolerans, CIA fare modeli, IDO, CTLA4-KDEL ve gen transdüksiyon verimliliği

İNGİLİZCE ÖZET

TREATMENT OF EXPERIMENTAL ARTHRITIS WITH TOLERANCE INDUCING DENDRITIC CELLS OBTAINED BY GENE MODIFICATION

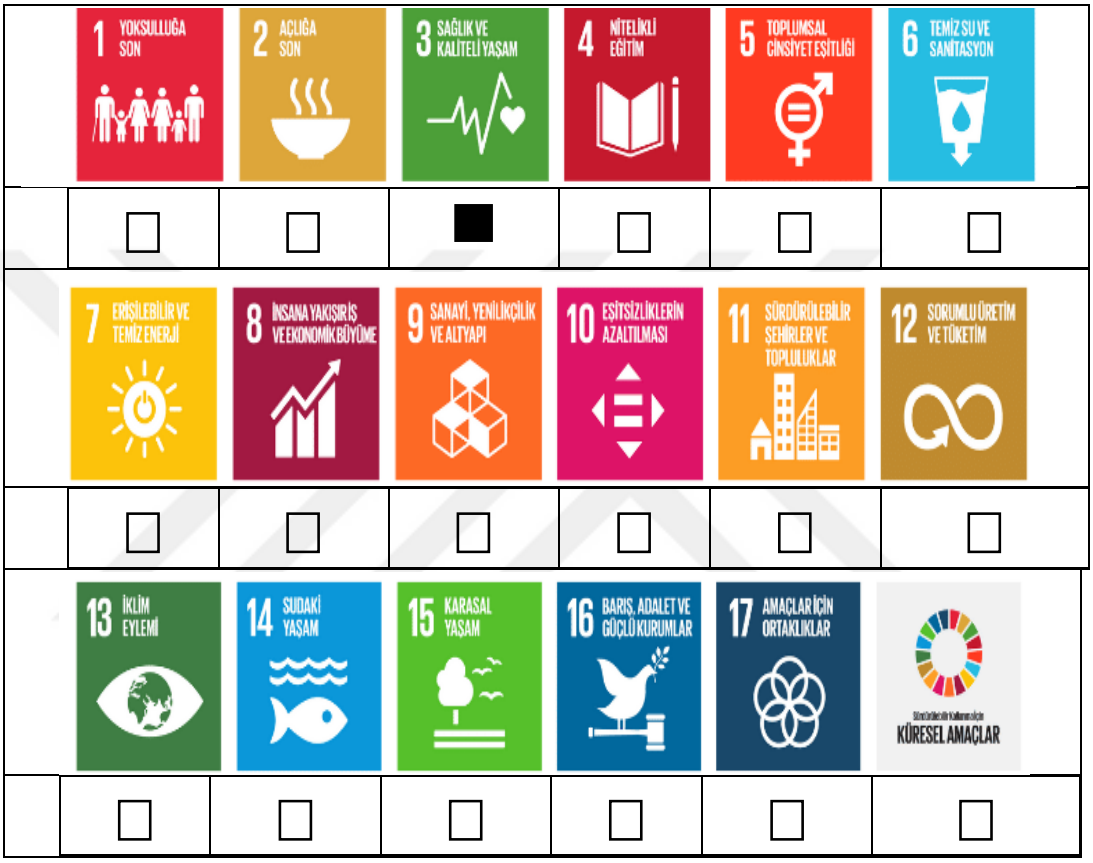
Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease that leads to chronic pain and progressive joint deformities. Both genetic predisposition and environmental factors play a key role in disease onset and progression. While conventional therapies are used in RA management, biological agents such as TNF-α have been shown to modify disease course. Nevertheless, a considerable proportion of patients still experience resistance to treatment, development of drug resistance, and severe side effects. Moreover, the need for frequent injections and systemic administration of high-dose biologics increases treatment costs and adversely affects quality of life. These limitations highlight the need for novel cell-based therapeutic strategies in RA.

This thesis focuses on the therapeutic potential of genetically modified dendritic cells (DCs) engineered to acquire tolerogenic properties. Three genetic modification strategies were employed: (1) DCs overexpressing IDO; (2) DCs transduced with a CTLA4-KDEL fusion protein; and (3) DCs engineered to simultaneously suppress CD80/CD86 expression while enhancing IDO expression. Tolerized DCs were locally administered to collagen-induced arthritis (CIA) mice using lentiviral vectors. Clinical arthritis scores were monitored, and histopathological analyses of joint tissues were conducted. ELISA and flow cytometry confirmed increased IDO expression and reduced CD80/CD86 surface levels. Administration of modified DCs significantly decreased clinical scores and caliper measurements, suppressed joint inflammation, and limited tissue damage demonstrated by histopathological evolation. Furthermore, genetic transduction of primary DCs was achieved with higher efficiency compared to most reports in the literature. Unlike traditional CIA models predominantly using DBA/1 mice, this study uniquely established and evaluated the CIA model in C57BL/6–BALB/c mice

Key words: dendritic cells, rheumatoid arthritis, genetic modification, tolerance, CIA mouse model, IDO, CTLA4-KDEL and gene transduction efficiency

BUÜ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEZ KONUSUNUN KÜRESEL SÜRDÜRÜLEBİLİR KALKINMA HEDEFLERİ İLE İLİŞKİSİ



Doktora tezi olarak sunduğum **"**Gen Modifikasyonları İle Tolerans İndükleyici Hale Getirilmiş Dendritik Hücrelerle Deneysel Artrit Tedavisi**"** başlıklı tez **3.** Küresel Sürdürülebilir Kalkınma Hedefleri ile ilişkilidir.

1.GİRİŞ

Romatoid artrit (RA), genetik ve çevresel faktörlerin etkisiyle ortaya çıkan, eklemlerde kronik ağrılara ve deformitelere yol açan otoimmün bir hastalıktır. Mevcut tedaviler hastalığın seyrini değiştirebilse de tedaviye verilen yanıt yetersizliği, tedaviye direnç ve yüksek maliyet gibi nedenlerden dolayı daha etkili ve sürdürülebilir tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu tez çalışmasında, genetik olarak modifikasyon yapılmış dendritik hücrelerin (DH) tolerans indükleyip indükleyemediği araştırıldı. *In vivo* RA modelinde (Kolajen ile indüklenen artrit, collahen induced artritis; CIA) en uygun tolerojenik DH (tolDH) elde edilmesine yönelik startejiler belirlenerek elde edilen tolDH'ler hayvanlara tedavi amaçlı enjekte edildi. Artrit oluşturulan farelerde eklem kalınlıklarının ve klinik skorlarının tedavi sonrasında gelişimini takip edildi. Genetik modifikasyonla elde edilmiş tolDH'lerin RA'nın tedavisinde veya hafifletilmesinde yeni hücresel tedavi yaklaşımı olarak kullanılıp kullanılamayacağını araştırıldı. Çalışmada, üç farklı şekilde tasarlanan plazmitler aracılığıyla üretilen lentivirüslerin primer DH'lere transdükte edilerek, bu hücrelerin tolerojenik özellik kazanması sağlandı. Birinci stratejide, eş uyaran sinyallerini baskılamak amacıyla özel olarak tasarlanmış bir vektör kullanıldı. İkinci stratejide, IDO (indoleamin 2,3-dioksijenaz) gen ekspresyonu artırmaya yönelik bir plazmit kullanıldı. Üçüncü stratejide ise hem IDO ekspresyonunun artırılması hem de CD80/CD86 kostimülatör moleküllerinin aynı anda baskılanması hedeflendi. Bu yaklaşımlar ile antijene özgü toleransın indüklenmesi ve otoimmün yanıta neden olan immün aktivitenin baskılanması amaçlandı. Ayrıca, geliştirilen bu hücresel tedavi modelinin CIA gibi insan artrit patagonezine en uygun fare artrit modellerinde uygulanabilirliği test edildi.

Proje kapsamında geliştirilen bu orijinal immünoterapötik yaklaşım, *in vivo* modeller üzerinde uygulanarak klinik ve immünolojik parametreler üzerinden değerlendirildi. Elde edilen bulgular, genetik olarak modifiye edilen tolerojenik DH'lerin RA ve benzeri otoimmün hastalıkların tedavisinde umut vadeden yeni nesil bir hücresel tedavi seçeneği olabileceğini göstermektedir.

1. GENEL BİLGİLER

2.1. Romatoid Artrit

Romatoid artritin (RA) tanımı antik Yunan ve Roma dönemlerine kadar uzanmaktadır. O dönemde "rheuma" veya "romatizma" terimleri, vücutta sıvı akışının bozulmasına bağlı olarak gelişen eklem ağrılarını tanımlamak için kullanılmıştır (Domen, 1992- Aceves-Avila, Medina & Fraga, 2021- Yeap, 2021).

RA, bağışıklık sistemi aracılı kronik bir inflamatuar hastalık olarak tanımlanmakta olup, sürekli devam eden sinovit, pannus oluşumu ve kemik erozyonu ile karakterize edilmektedir (Gravallese & Firestein, 2023). RA yaygınlığı ve insidansını değerlendiren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Ancak, literatürdeki epidemiyolojik tahminler, veri toplama yöntemlerindeki farklılıklar ve RA'nın tanımlanmasında kullanılan değişken kriterler nedeniyle doğrudan karşılaştırılması güçtür (O'Rourke ve ark.,2019- Videm, Thomas, Brown & Hoff, 2017).

Romatoid faktörün (RF) keşfi, RA patogenezi anlaşılması için önemli bir dönüm noktası olmuştur. İlk olarak Waaler (1940) tarafından tanımlanan bu fenomen, RA hastalarının serumunda bulunan oto-antikorların, duyarlı koyun eritrositlerine karşı aglütinasyon oluşturma yeteneğine sahip olduğunu ortaya koymuştur. Daha sonra Rose ve arkadaşları (1948) tarafından gerçekleştirilen çalışmalar, bu bulguları doğrulamış ve RF'nin serolojik bir biyobelirteç olarak tanısal değer taşıdığını göstermiştir. Bu araştırmalar sonucunda "Rose-Waaler Testi", RF tespiti için klasik bir yöntem olarak geliştirilmiştir (Jonsson, 2020- Li, Li & Zheng, 2024).

Günümüzde RF, RA'nın immünolojik mekanizmalarının anlaşılmasına katkıda bulunmanın yanı sıra, hastalığın laboratuvar tanısında yaygın olarak kullanılan serolojik belirteçlerden biri olarak kabul edilmektedir.

2.2. Epidemiyoloji- Küresel Yaygınlık

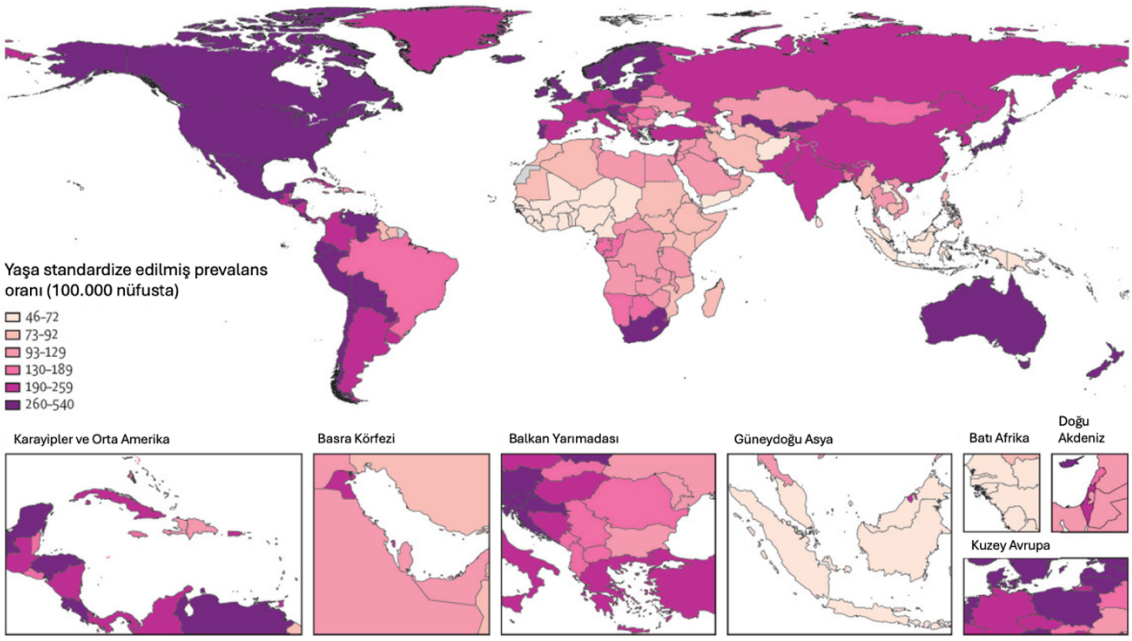
Küresel Hastalık Yükü (Global Burden of Disease; GBD) 2020 verilerine göre, RA' nın dünya genelinde yaklaşık 17,6 milyon kişiyi etkilediği ve yaş faktörü göz önünde bulundurularak hesaplanmış küresel prevalansının %0,21 olduğu tahmin edilmektedir. Bu oran, 1990 yılına kıyasla %14,1'lik bir artış göstermektedir. GBD 2021 RA İşbirlikçileri' nin ön görülerine göre, 2050 yılına kadar RA hasta sayısının 31,7 milyona ulaşması beklenmektedir (Finckh ve ark., 2022) (Şekil 1). Çin'de gerçekleştirilen epidemiyolojik çalışmalar, ülkede yaklaşık 5 milyon RA hastasının

bulunduğunu ve hastalığın %0,42 oranında bir prevalansa sahip olduğunu ortaya koymuştur (Zhonghua,2018).

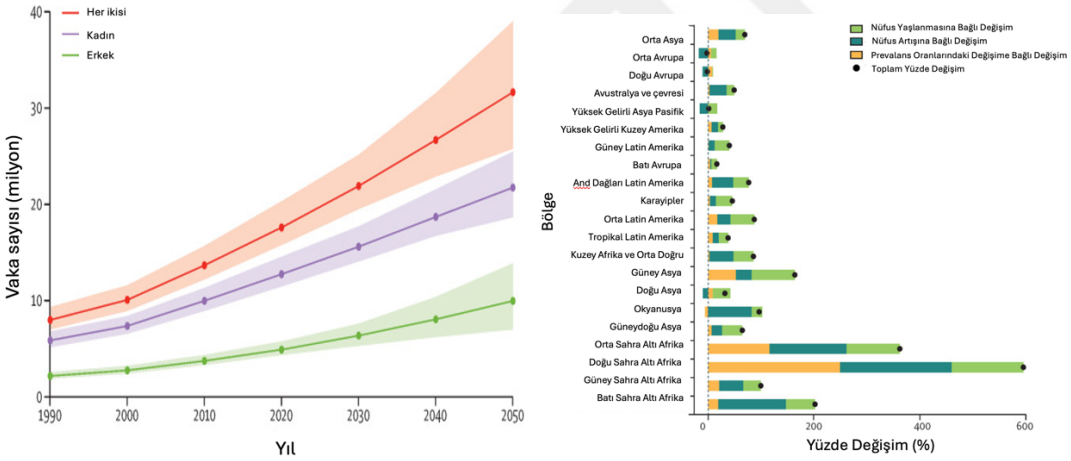
2020 yılında dünya genelinde yaklaşık 17,6 milyon kişinin (%95 güven aralığı: 15,8–20,3 milyon) RA hastası olduğu tahmin edilmektedir. Yaş standardizasyonu yapılmış küresel prevalans 100.000 kişide 208,8 vaka olarak hesaplanmış olup, bu oran 1990 yılına kıyasla %14,1 artış göstermektedir. Kadınlarda daha yaygın olduğu belirlenmiş ve kadın/erkek prevalans oranı 2,45 olarak tespit edilmiştir (The Lancet Rheumatology, 2023) (Şekil 2).

RA'ya bağlı yaş standardize edilmiş ölüm oranı 100.000 kişide 0,47 olup, 1990'a göre %23,8 oranında bir azalma gösterdiği raporlanmıştır. Bununla birlikte, 2020 yılında RA'nın GBD 3,06 milyon hastalık nedeniyle kaybedilen sağlıklı yaşam yılı (Disability Adjusted Life Years; DALY) olarak hesaplanmıştır. Bu hastalık yükünün %76,4'ü engelliliğe bağlı kaybedilen yıllardan (years lived with disability; YLDs) kaynaklanmaktadır. Ayrıca, sigara kullanımının RA'ya bağlı DALY yükünün %7,1'inden sorumlu olduğu belirlenmiştir (Conrad ve ark 2023- Hsieh ve ark.,2020).

Mevcut koşullar devam ederse, 2050 yılına kadar dünya genelinde RA hasta sayısının 31,7 milyona (25,8–39,0 milyon) ulaşacağı öngörülmektedir. Bu veriler, RA'nın küresel sağlık yükünün giderek arttığını ve özellikle kadınları daha fazla etkilediğini göstermektedir. Ölüm oranlarında azalma görülse de hastalığın uzun vadeli etkileri ve sağlık sistemleri üzerindeki yükü dikkate alındığında, RA tedavilerine yönelik daha kapsamlı stratejilere duyulan ihtiyaç giderek artmaktadır (Lau, 2023).



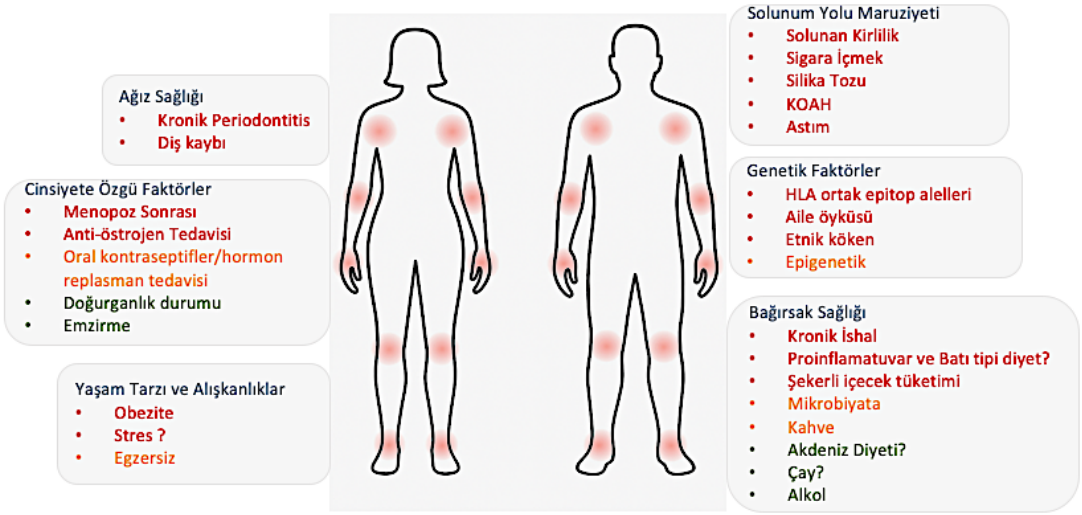
Şekil 1. 2020 yılında erkek ve kadın cinsiyetleri için romatoid artritin yaşa göre standardize edilmiş yaygınlık oranı (GBD 2021 Rheumatoid Arthritis Collaborators, 2023).



Şekil 2. RA Nüfus oranı ve dağılımı (GBD 2021 Rheumatoid Arthritis Collaborators, 2023).

2.3. Romatoid Artrit İçin Risk Faktörleri

RA'nın yaygınlığındaki değişimler ve bölgesel farklılıklar büyük ölçüde risk faktörlerindeki çeşitliliklere bağlıdır. RA gelişiminde çevresel faktörlerin daha iyi anlaşılması, gelecekte hastalığın önlenmesinde etkili stratejilerin geliştirilmesi açısından katkı sağlayabileceği belirtilmektedir (Şekil 3) (Finckh ve ark., 2022).



Şekil 3. RA patogenezisinin gelişmesine birçok faktör katkıda bulunabilmektedir. Genetik faktörler, hormonal faktörler, bulunulan ortamda yaşanan solunum maruziyeti, diyet faktörleri, ağız sağlığı ve yaşam tarzlarının hastalık patogenezinde zararlı ya da koruyucu olduğuna dair çalışmalar yapılmaya devam etmektedir. Şekilde bulunan yeşil renk ile yazılan belirteçler koruyucu faktörleri; kırmızı ile yazılan belirteçler zararlı faktörleri ve turuncu ile yazılan belirteçler ise çelişkili veya zayıf kanıtı göstermektedirler. (Finckh ve ark. 2022'dan ilham alarak çizilmiştir).

2.3.1. Cinsiyet ve hormonal faktörler

RA dünya genelinde kadınlarda erkeklere kıyasla daha yüksek prevalansa sahiptir. Bu oran genç bireylerde yaklaşık 4:1 (kadın/erkek) iken, ileri yaşlardaki hastalarda 2:1'in altına düşmektedir. Çeşitli çalışmalar, östrojen seviyelerindeki ani düşüşün (menopoz veya östrojen karşıtı tedaviler nedeniyle) RA gelişim riskini artırabileceğini, buna karşın yüksek östrojen maruziyeti ile ilişkili faktörlerin hastalığa karşı koruyucu bir etkiye sahip olabileceğini öne sürmektedir (Galarza-Delgado ve ark., 2017- Barragán-Martínez ve ark., 2012- Alpízar-Rodríguez, Pluchino, Canny, Gabay& Finckh, 2017).

Yapılan diğer çalışmalarda da RA görülme sıklığının kadınlarda erkeklere kıyasla üç ila beş kat daha yaygın olduğu gösterilmiştir. En belirgin fark, Arjantin'de yapılan bir çalışmada bildirilmiş olup, kadınlarda %3,2, erkeklerde %0,6 oranında RA patogenezi görülmüştür. RA prevalansına ilişkin en yakın değerler ise Sırbistan'da kaydedilmiş ve kadınlarda %0,29, erkeklerde %0,09 olarak rapor edilmiştir (Silman & Hochberg, 2009).

Östrojenin RA ile ilişkisi karmaşıktır ve henüz tam bir olumlu ya da olumsuz etkisi bildirilmemiştir ama yapılan birçok çalışma sonucunda östrojen seviyesindeki artışın RA hastalığının gelişme riskini azaltabileceğini ve hastalığın seyretme şiddetini hafifletebileceğini söylemektedir. Özellikle gebelik sürecinde östrojen seviyesi artışı

RA hastalarında semptomlarının yüksek oranda hafiflettiğini bildiren çalışmalar vardır fakat doğum sonrası östrojen seviyesinde meydana gelen düşüş sonrası RA hastalarının semptomlarının sıklıkla artığı gösterilmiştir. Menopoz döneminde de azalan östrojen seviyeleri RA insidansının artışına neden olmaktadır (Barrett, Brennan, Fiddler & Silman, 1999- Barrett, Brennan, Fiddler & Silman, 2000).

Hayvan modellerinde yapılan çalışmalar, östrojenin RA hastalığının seyrini etkileyebileceğini göstermiştir. Yumurtalıkları çıkarılan (OVX) farelerde östrojen seviyelerinin düşmesiyle birlikte, CIA daha sık ve daha şiddetli görüldüğü belirlenmiştir. Ayrıca, östrojenle tedavi edilen OVX fareler veya östrojen seviyeleri korunmuş fareler ile kıyaslandığında, östrojen eksikliğinin artrit gelişimini ve hastalık şiddetini artırdığı gözlemlenmiştir (Holmdahl, Jansson & Andersson,1986- Jansson & Holmdahl, 1989- Yamasaki, Enokida, Okano, Hagino & Teshima,2021).

2.3.2. Genetik ve epigenetik

RA ile yakından ilişkili olan anti-sitrüline protein antikorları (ACPA), bağışıklık sisteminin sitrülinlenmiş proteinlere karşı normal olmayan bir tepkisidir. Enzimatik olarak belirli proteinlerin arginin kalıntılarının sitrüline dönüştürülmesi sitrülinasyon olarak bilinir ve bu süreç inflamasyon sırasında gelişebilir. Bağışıklık sistemi normalde sitrülinlenmiş proteinleri tolere ederken, RA hastalarında immün sistem bu proteinleri yabancı olarak algılar ve ACPA üretir. ACPA, RA'nın erken teşhisinde önemli bir biyobelirteçtir ve hastalığın daha agresif bir şekilde ilerlemesiyle ilişkilidir. Ek olarak, bu antikorlar T ve B hücrelerini aktive ederek eklem hasarına katkıda bulunur (Aletaha & Smolen, 2018).

Kromozom 6'daki MHC (Major Histocompatibility Complex) bölgesi, diğer RA risk lokuslarına kıyasla belirgin ve güçlü bir genetik risk taşır ve RA'nın toplam genetik riskinin %30–%50'ini açıklamaktadır (van der Woude ve ark., 2009).

HLA-DRB1 (Human Leukocyte Antigen) varyant kombinasyonlarının RA'nın hastalık riskini en iyi şekilde açıklayabileceği uzun süredir tartışma konusu olmaktadır. 1987 yılında, HLA-DRβ1'in 70-74 pozisyonlarındaki belirli amino asit dizisi ile ilişkili riski göstermek için ortak epitop (Shared Epitope; SE) hipotezi tanıtılmıştır. SE hipotezi, dünya genelindeki popülasyonlardan elde edilen verilerle desteklenmiştir fakat hala, non-SE HLA allelleriyle (örneğin, Asyalılarda HLA-

DRB1*09:01) ilişkili RA riski konusunda tartışmalar bulunmaktadır (Okada, Eyre, Suzuki, Kochi & Yamamoto, 2019- Kochi ve ark., 2004).

RA sıklıkla çeşitli sistemik belirtilerle komplike hale gelmektedir**.** Hastalığın etiyolojisi, HLA-DRB1 alelleri gibi genetik yatkınlık faktörlerinin yanı sıra sigara kullanımı ve hormonal etkiler gibi çevresel faktörlerle ilişkilidir**.** RA gelişimine yatkın bireylerde, hastalık başlamadan yıllar önce RF ve ACPA gibi otoantikorlar tespit edilebilir ve bu otoantikorların seviyeleri hastalığın ilerlemesiyle birlikte artış gösterebilir (Silman & Pearson, 2002- Rantapää-Dahlqvist ve ark., 2003).

ACPA yüksek seviyeleri RA temel özelliklerinden biri olmasına rağmen, bu antikorların *in vivo* fonksiyonları tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Bir çalışmada, RA hastalarından elde edilen monoklonal ACPA'lar farelerde eksprese edilerek, işlevleri ve spesifik bağlanma özellikleri analiz edilmiştir. Hiçbir ACPA, artrit oluşturucu etki göstermemiş veya farelerde ağrı ile ilişkili davranışlara neden olmamıştır. Ancak, E4 klonu adı verilen bir antikor, antikorla indüklenen artrite karşı koruyucu etki göstermiştir. E4, fare ve insan artrit eklemlerinden elde edilen kıkırdak, deri, makrofajlar ve lenfoid dokulardaki dendritik hücrelere özgü bir bağlanma paterni sergilemiştir. Proteomik analizler, E4'ün makrofajlara ve RA sinoviyal sıvısında bulunan bazı proteinlere, özellikle α-enolaz'a güçlü bir şekilde bağlandığını ortaya koymuştur. Bu koruyucu etkinin E4'ün sitrüline α-enolaz ile oluşturduğu immün kompleksin FCGR2B (Fc Gamma Receptor IIb) reseptörü aracılığıyla makrofajlarla etkileşmesine bağlı olduğu tespit edilmiştir. Bu etkileşim sonucunda, IL-10 salgısında artış ve osteoklast oluşumunda azalma gözlemlenmiştir (He ve ark., 2023).

ACPA-pozitif ve ACPA-negatif RA arasında bulunan genetik farklılıklar raporlanmıştır. Örneğin, HLA-DRB1, PTPN22 (Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 22), BLK (B Lymphoid Tyrosine Kinase), ANKRD55 (Ankyrin Repeat Domain 55) ve IL6ST' (Interleukin 6 Signal Transducer)'deki varyantlar serolojik durumdan bağımsız olarak RA ile ilişkilidir, oysa AFF3 (AF4/FMR2 Family Member 3), CD28 ve TNFAIP3 (Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Protein 3) yalnızca seropozitif RA'da bulunmaktadır ayrıca PRL (Prolaktin) ve NFIA (Nuclear Factor I A) yalnızca seronegatif RA'da bulunmaktadır (Viatte ve ark., 2016- Viatte ve ark., 2012).

Epigenetik, DNA'nın yapısını değiştirmeden genlerin nasıl ifade edileceğini düzenleyen mekanizmaları içermektedir. Epigenetik, DNA metilasyonu ve histon

asetilasyonu mekanizmaları ile, RA gelişiminde etkili olabilmektedir. Epigenetik çalışmalar, RA ile ilişkili genetik varyantların CD4+ T yardımcı hücrelerinde aktif kromatinlerin epigenetik işaretlerinin zengin olduğu gösterilmiştir (Trynka ve ark., 2013).

Peptidil Arginin Deiminaz (PAD) enzimleri tarafından gerçekleştirilen sitrülinasyon, arjinin kalıntılarının sitrüline çevrilmesiyle antijenik özellik kazanmış neo-epitopların oluşmasına neden olur ve bu da ACPA gelişimini tetikler. PAD2 ve PAD4 gibi enzimlerin ekspresyon düzeyleri, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi epigenetik mekanizmalar aracılığıyla düzenlenmektedir. Özellikle PAD4 geninin promotör bölgesindeki hipometilasyon, RA hastalarında bu enzimin aşırı ekspresyonuna yol açmakta ve bu da artmış sitrülinasyon ve antijen sunumu ile sonuçlanmaktadır (Foulquier ve ark., 2007).

DNA metilasyonu, çevresel faktörlerin hücresel aktivitede değişiklikler indükleyebileceği bir mekanizma sağlar. Örneğin, sigara içenlerde, HLA-DRB1 risk alelini taşıyan ACPA-pozitif RA'lı bireylerde metilasyon seviyeleri, risk alelini taşımayanlara göre daha yüksektir; bu metilasyon farkı sigara içmeyenlerde gözlemlenmemiştir (He ve ark., 2023). İlginç bir şekilde, yapılan iki farklı çalışma, RA hastalarında farklı eklemlerden alınan fibroblast benzeri sinoviositlerde (Fibroblast like synoviocytes; FLS) DNA metilasyonu ve transkripsiyonunun farklı paternlerde gerçekleştiğini bildirmiştir. Böylece RA'nın neden simetrik olma eğiliminde olmadığını ve bazı eklemleri diğerlerinden daha şiddetli etkilediğini açıklayabilecek bir mekanizma sağlayabilir şeklinde açıklanmıştır (Meng ve ark., 2017).

Yapılan başka bir epigenetik çalışmasında, Histon H3 lizin 4 trimetilasyonu (H3K4me3) modifikasyonu RA hastalarında analiz edilmiştir. RA gibi otoimmün hastalıklarda hastalığın şiddetini ve ilerlemesini etkileyebilecek epigenetik değişikliklerden biri olarak değerlendirilmiştir**.** Artan H3K4me3 modifikasyonunun, RA'nın kronik inflamatuar sürecine katkıda bulunabileceği gösterilmiştir. (Laragione ve ark., 2018).

RA ile ilişkili tek nükleotit polimorfizm (single nucleotide polymorphism; SNP) incelenen bir çalışmada RA ile ilişkili 31 SNP analiz edilmiş ve bunların 34 dokuda H3K4me3 seviyesini etkilediğini ve CD4+ T hücrelerini etkiledikleri gözlemlenmiştir.

Fenotip olarak analiz yaptıklarında da özellikle CD4+ bellek T hücreleriyle anlamlı bir şekilde ilişkilendirilmiştir (Trynka ve ark., 2013).

2.3.3. Sigara kullanımı

Sigara içmek, RA gelişimi için en bilinen çevresel risk faktörüdür ve sigara kullanımının RA oluşma riskini artırdığını gösteren birçok çalışma bildirilmiştir (Sugiyama ve ark.,2010).

Sigara içmenin RA geliştirme etkisine dair bir hipoteze göre, sigara kullanımı peptitlerin sitrülinlenmesine neden olarak, bağışıklık sisteminin bu sitrüline proteinlere karşı yanıt oluşturmasını tetikleyebilmektedir. RA'ya yatkınlık sağlayan genetik faktörlerle birleştiğinde, bu süreç otoimmün bir yanıtı destekleyerek hastalığın başlamasına katkıda bulunabilmektedir (Klareskog ve ark., 2006).

Sigara kullanımıyla ilişkili artan RA riski için epigenetik modifikasyonlar tarafından düzenleniyor olabilir yaklaşımı bulunmaktadır**.** Çünkü sigara kullanımı belirli DNA bölgelerinde hipometilasyon ile ilişkilendirilirken**,** hastalık modifiye edici anti-romatizmal ilaç (Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs) (DMARD) tedavisinin aynı bölgelerde hipermetilasyonu indüklediği gözlemlenmiştir. İlgi çekici bir bulgu olarak, sigara dumanında bulunan nikotin içermeyen inhalasyon bileşenlerinin RA riskini artırabileceği**,** ancak tütün bileşenlerinin bu etkiye doğrudan katkıda bulunmadığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, sigara ve RA arasındaki ilişki hala tartışmalıdır**.** Çünkü bazı çalışmalar bu konuda çelişkili sonuçlar sunmaktadır (Svendsen ve ark., 2016- Jiang, Alfredsson, Klareskog & Bengtsson., 2014).

2.3.4. İnhalasyon yoluyla partikül alımı

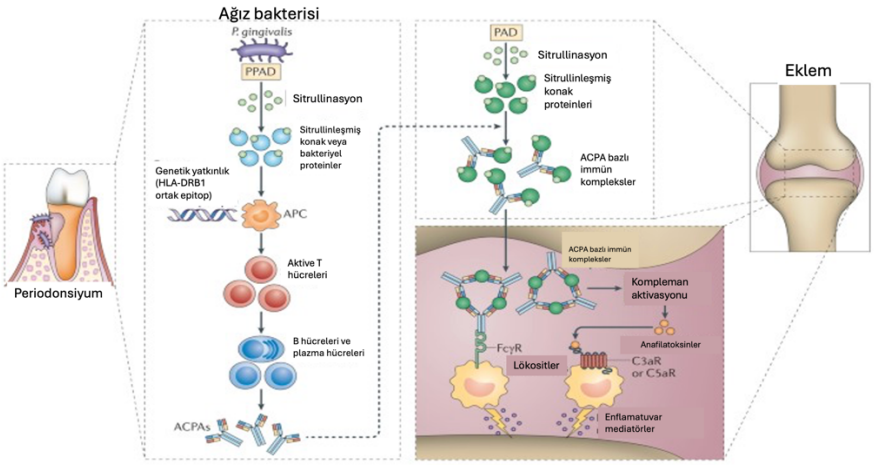
Silika maruziyeti, RA için bir çevresel risk faktörüdür. Amerika Birleşik Devletleri' nin New York şehrinde 2001 yılında Dünya Ticaret Merkezi yıkılması esnasında yoğun toza maruz kalan itfaiyeciler ve yıkıma müdahale eden diğer ekip çalışanları ile yapılan bir çalışmada, birçok sistemik otoimmün hastalıkların artmış risk oranı gösterilmiştir, özellikle otoimmün hastalıklardan RA oluşma riskinin en çok arttığı bildirilmiştir. Bu yıkım esnasında ortaya çıkan tozun öğütülmüş çimento, silika, asbest, cam lifleri ve diğer malzemeleri içerdiği bildirilmiştir (Webber ve ark.,2015).

2016 yılında Malezya'da çalışan kadınlar ile yapılan bir çalışmada 910 sağlıklı kadın ve 910 erken evre RA hastası kadın çalışmaya dahil edilmiş. Bu araştırma sonucunda, mesleki olarak tekstil tozuna maruz kalmanın ACPA-negatif ve ACPA-

pozitif RA gelişme riski üzerindeki etkisi incelenmiştir. Toza maruziyetin RA gelişme riskinin hem ACPA-pozitif RA hem de ACPA-negatif RA için artmasıyla önemli ölçüde ilişkili olduğu gösterilmiştir. (Too ve ark., 2016).

2.3.5. Peridontitis ve mikrobiyota

Periodontitis, hastaların sistemik inflamatuar bozukluklar geliştirme riskini artıran disbiyotik bir oral hastalıktır. ACPA pozitif RA hastaları osteoartritli kontrol hastalarıyla karşılaştırıldığında daha yüksek seviyede periodontitise sahip olduğu gösterilmiştir. Peridontitise sahip hastalarda artmış olan ACPA seviyesi *Porphyromonas gingivalis'*in varlığı ile ilişkilendirilmiştir (Mikuls ve ark., 2014). Bu ilişkilendirilme, oral mikrobiyotadaki belirli patojenlerin, özellikle *Porphyromonas gingivalis'*in, RA patogenezinde potansiyel bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. *P. gingivalis*, periodontitisin başlıca etkenlerinden biridir ve hem kendi üretimi olan bakteriyel PAD enzimiyle hem de konak hücrelerdeki PAD enzimlerini indükleyerek proteinlerin sitrülinasyonuna neden olabilir. Ortaya çıkan sitrünillenmiş konak veya bakteriyel proteinler, immünojenik hale gelerek bağışıklık sistemi tarafından yabancı antijenler olarak tanınır. Bu antijenler MHC sınıf II molekülleri aracılığıyla $CD4^+$ T hücrelerine sunulur; aktive olan T hücreleri B hücrelerini uyarır ve bu da ACPA üretimini indükler. Zamanla bu ACPA'lar dolaşımdaki sitrünillenmiş proteinlerle birleşerek immün kompleksler oluşturur. Bu kompleksler, lökosit yüzeyindeki Fcγ reseptörleri (FcγRs) aracılığıyla bağışıklık hücrelerini aktive ederken aynı zamanda kompleman sistemini de devreye sokar. Aktive olan kompleman sistemi sonucunda oluşan anafilatoksinler (C3a, C5a) inflamatuvar hücreleri bölgeye çeker ve aktive eder. Bu olaylar dizisi, sinovyal eklem dokusunda kronik inflamasyonun yerleşmesine neden olur. Sonuç olarak sinovit, kıkırdak ve kemik destrüksiyonu gibi RA'nın karakteristik patolojik bulguları gelişir (Hajishengallis, 2015) (Şekil 4).



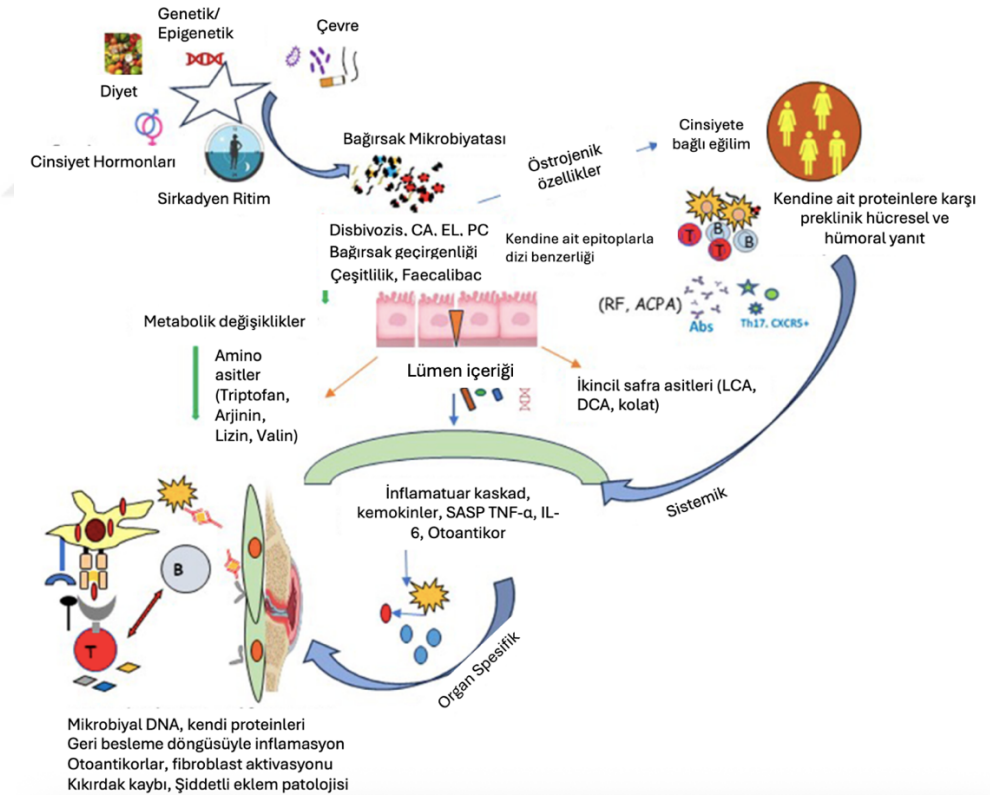
Şekil 4. Porphyromonas gingivalis (P. gingivalis) enfeksiyonunu ve RA patogenezi ilişkisi (Hajishengallis, 2015). Bakteriyel PAD ve konak PAD enzimleri sitrülinasyonu artırarak ACPA üretimine, immün kompleks oluşumuna ve inflamatuvar yanıtın tetiklenmesine yol açar. Bu süreç, sinovyal dokuda kronik inflamasyon ve doku destrüksiyonuna neden olur.

Vücudun belirli anatomik bölgelerinde (örneğin deri, ağız boşluğu, akciğerler ve gastrointestinal sistem) yer alan mikrobiyal ekosistemler genel olarak 'mikrobiyota' terimiyle ifade edilir. Her mukozal bölge kendi mikrobiyatasına sahiptir. Buna ek olarak mukozal bölgeler arasında takson paylaşımı bulunmaktadır. Tüm mukozal çevrelerin içerisinde bağırsak mikrobiyatası fazla sayıda ve çeşitli bakteriyi barındırmaktadır ve ikinci genomumuz olarak kabul edilmektedir. Bağırsak mikrobiyatası kolonizasyonu anne karnında rahim içinde başlamaktadır (Budden ve ark., 2017).

RA patogenezinde, genetik yatkınlık, MHC sınıf II genleri başta olmak üzere epigenetik mekanizmalar, cinsiyet hormonları, yaşam tarzı, diyet, sigara kullanımı, enfeksiyöz etkenler ve sirkadiyen ritim gibi çevresel faktörler, başta bağırsak olmak üzere vücuttaki çeşitli mukozal yüzeylerde yerleşik olan mikrobiyal toplulukların kompozisyonunu şekillendirmektedir. Bu etkileşimler bireye özgü bir mikrobiyota yapısının oluşmasına zemin hazırlar. Ancak bazı koşullarda bu denge bozulabilir ve disbiyozis olarak tanımlanan durum ortaya çıkar. Disbiyozis; yararlı taksonların azalması, bazı proinflamatuvar bakteriyel taksonların artışı, mikrobiyal çeşitliliğin düşmesi ve metabolik profildeki değişikliklerle karakterizedir. Bu mikrobiyal değişiklikler, bağırsakta doğuştan ve kazanılmış bağışıklık yanıtlarını tetikleyerek proinflamatuvar sitokinlerin (ör. IL-6, TNF-α) salınımına yol açabilir (Catrina, Deane & Scher, 2016).

Mikrobiyata, bağırsak yolunu dış ortamdan ayırır ve aynı zamanda hasar onarımı için epitel hücre çoğalması adına gerekli metabolitleri üreten fiziksel ve immünolojik bir bariyer oluşturmaktadır. Kommensaller enfeksiyonlardan korunabilmek için patojenlerle rekabet etmektedir. Ayrıca, IgA antikorlarının üretimini başlatmaktadır (Macpherson & Harris, 2004). Son yıllarda yapılmış olan çalışmalar, RA patogenezinde özellikle bağırsak mikrobiyotasındaki disbiyozunun da etkili olabileceğini ortaya koymuştur (Chen ve ark., 2016). Bir çalışmada RA hastalarından alınan dışkı örneklerinin analizleri sonucunda belirli taksonların genişlediği gösterilmiştir (Balakrishnan & Taneja, 2018).

Bağırsak mikrobiyotasına ek olarak, akciğer mikrobiyotasında da çevresel uyaranlar, enfeksiyonlar ve sigara kullanımı gibi faktörler aracılığıyla meydana gelen değişikliklerin RA'nın inflamatuvar sürecine katkı sağladığı bildirilmektedir (Lamba & Taneja, 2024) (Şekil 5).



Şekil 5. Romatoid artrit gelişiminde çevresel faktörler ve mikrobiyal popülasyonun RA gelişimine etkisi (Lamba & Taneja, 2024). Genetik, çevresel ve hormonal faktörler bağırsak mikrobiyotasının kompozisyonunu şekillendirerek disbiyozise neden olabilir. Disbiyozis, bağışıklık toleransının bozulmasına, proinflamatuvar sitokinlerin artışına ve otoantikor üretimine yol açarak RA patogenezini tetikler. Ayrıca bağırsak ve akciğer mikrobiyotasındaki değişiklikler, sistemik inflamasyonu artırarak eklem tutulumu ve doku yıkımını destekler.

Sigara içmek akciğer mikrobiyomunu da etkilemektedir ve RA riski taşıyan asemptomatik bireylerin akciğer mikrobiyomunun sağlıklı bireylerden farklı olduğunu gösteren bazı kanıtlar bulunmaktadır. Sigara içmek ayrıca bağırsak mikrobiyomunu da değiştirmektedir ve bu durum mukozal yüzeyler arasındaki bağlantıyı işaret etmektedir (Biedermann ve ark., 2013). RA hastalarının bazılarında distal hava yollarında (özellikle bronşiyal düzeyde) mikrobiyal çeşitliliğin azaldığını ve kompozisyonunun değiştiği gösterilmiştir (Scher ve ark., 2016).

2.3.6. Diğer Etkenler

2014 yılında Hu, Y. ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırma sonucunda şekerli gazlı içeceklerin tüketilmesinin, RA riskinin artmasıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Hu ve ark., 2014). 2015 yılında yapılan iki farklı çalışma sonucunda yüksek sodyum alımının RA için bir risk faktörü olduğu ileri sürülmüştür ancak bu risk durumunun yalnızca sigara içenlerde geçerli olduğu bildirilmiştir (Salgado, Bes-Rastrollo, Irala, Carmona & Gómez-Reino, 2015- Romão & Fonseca, 2021).

Besinsel diyet ve RA ilişkisinin mekanizmalarının aydınlatılabilmesi için hala çalışmaya ve keşfedilmeye devam edilmektedir. 2020 yılında hayvanlar ile yapılan bir çalışmada alkolden metabolize edilen asetatın otoantikor üretimine yardımcı olan T foliküler yardımcı hücrelerin işlevini bozabildiği gösterilmiştir (Azizov ve ark.,2020).

Travma sonrası stres bozukluğu semptomları olan kadınlarda RA'nın gelişme risklerinin daha yüksek olduğu gösterilmiş ayrıca düşük eğitim seviyesi ve düşük sosyoekonomik durum da RA'nın daha agrasif ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir, ancak çalışmaların sonucunda bu ilişkiyi destekleyen araştırmaların daha fazla genişletilmesi gerektiği bildirilmiştir (Lee ve ark., 2016- Camacho, Verstappen & Symmons, 2012).

2.4. Romatoid Artrit Patogenezi

RA en yaygın olarak görülen inflamatuar artritlerden biridir. Ayrıca uzun zamandır otoimmün hastalıklar içerisinde RA'nın kapsamlı olarak çalışılmasına rağmen kesin etiyolojisi hala belirsizliğini korumaktadır. Çevresel faktörlerler ve genetik ile RA duyarlılığının arttığı ve inflamatuar yolların, epigenetik değişikliklerin ve metabolik bozuklukların RA patogenezinde rol oynadığı bilinmektedir (Gao, Zhang, & Liu, 2024).

RA ilk olarak litaratürde RA'lı hastaların serumlarında RF tanımlanması ve bu faktörlerin otoantikorlar olarak nitelendirilmesine dayalı bir otoimmün hastalık olarak

kabul edilmiştir. Zvaifler ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışma sonucunda, RA'nın sinovyumda RF üretimi, RF-bağışıklık komplekslerinin oluşumu ve ardından inflamasyona ve eklem hasarına katkıda bulunan çeşitli hücrelerin (örneğin T hücreleri, B hücreleri, makrofajlar) katılımı ile karakterize lokalize bir immün kompleks hastalığı olduğunu öne sürülmüştür (Franklin, Holman, Muller-Eberhard, & Kunkel, 1957- Zvaifler, 1973). Ancak RA'lı bazı hastalarda RF'nin yokluğu, diğer hastalıkları olan hastalarda RF'nin varlığı, normal bireylerin bir kısmında RF'nin varlığı ve hastalığın diğer özellikleri açıklanamamıştır.

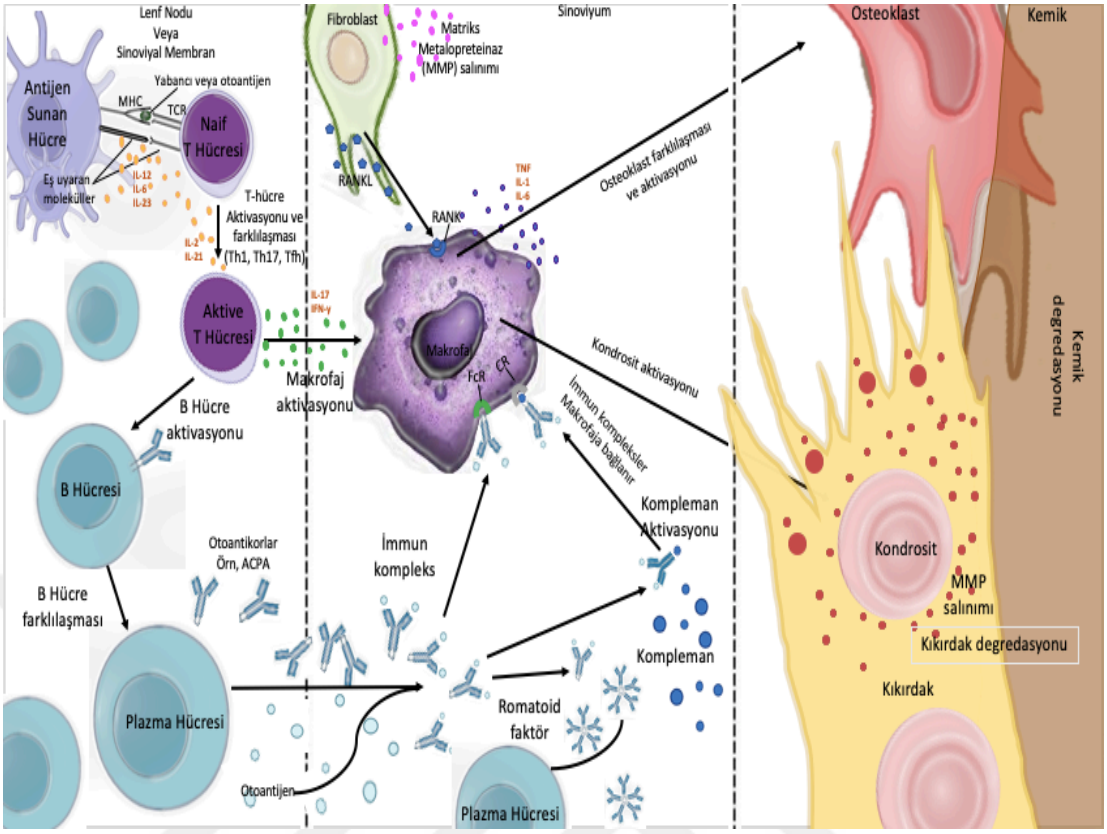
Hastalığın patogenezini anlamak için yapılan başka bir çalışmada, T hücrelerinin RA patogenezinde rol oynadığını gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışma immünogenetik bileşenlerin tanımlanmasıyla sonuçlanmıştır. Stastny ve arkadaşları RA ile MHC, HLA-DR genleri arasında bir ilişki olduğunu göstermişlerdir (Stastny, 1976). RA'nın genetik kökenine dair ilk kanıt olmasının yanı sıra, HLA'nın antijen sunan hücreler (ASH-ör. makrofajlar, dendritik hücreler) aracılığıyla T hücre aktivasyonundaki önemli rolü nedeniyle de önem taşımaktadır. Antijen sunumu, adaptif immünitenin temel adımlarından T hücresi ko-stimülasyonu ve aktivasyonu için kritik bir sinyal yoludur (Firestein, 2005).

Yapılan çalışmalarla, HLA'nın bağışıklık tepkisinin ayrılmaz bir parçası olduğu ve RA ilişkisinin DRβ zincirinin üçüncü hiperdeğişken bölgesini kodlayan spesifik bir gen lokusunu haritaladığı anlaşılmıştır. (Nepom ve ark.,1989). Olası bir mekanizma, bu molekülün artrit oluşturan bir peptide bağlanması ve duyarlı bireylerde T hücresi aktivasyonu ve inflamasyona neden olmasıdır. Ancak, bu mekanizma ile ilişkili uyarılar arasında spesifik bir reaktif peptidin tanımlanmaması, heterojen alel ilişkilerinin varlığı ve HLA'nın bağışıklık tepkisindeki çoklu işlevleri yer almaktadır. Bununla birlikte, T hücrelerinin RA patogenezinin düzenlenmesindeki rolü, artrit hayvan modellerinin çoğunun T hücresine bağımlı olmasıyla da desteklenmektedir (Weyand, Hicok, Conn & Goronzy,1992).

RA patogenezinde, bağışıklık hücrelerinin düzensiz aktivasyonu ile karakterize edilen ve kalıcı hale gelen inflamatuar yanıtın önemli bir rol oynadığı ortaya konmuştur. Bu bağışıklık hücreleri sinovyuma yaygın bir şekilde infiltre olurlar ve bu da toleransın bozulmasına ve RA patogenezinin hızlanmasına neden olur. RA'lı hastalarda, sinovyumda gözlenen lenfosit infiltratlarını $CD4^+$ T hücreleri oluşturmakta

olup, bu hücreler bölgede $CD8^+$ T hücrelerine göre daha baskın bir dağılım göstermektedir (Gao, Zhang, & Liu, 2024).

Hastalık, sinovyal eklemlerde kronik inflamasyon ve ilerleyici doku yıkımı ile karakterizedir. Patogenez süreci, ASH'lerin periferik lenfoid organlarda naif T hücrelerini aktive etmesiyle başlamakta; bu aktivasyon sonucunda Th1 ve Th17 gibi proinflamatuvar T hücre alt tipleri farklılaşmaktadır. Aktive olan T hücreleri, B hücrelerini plazma hücrelerine dönüşmeleri için uyararak RF ve ACPA gibi otoantikorların üretimini başlatmaktadır. Oluşan otoantikorlar, antijen-antikor kompleksleri oluşturarak kompleman sistemini aktive eder. Sinovyum içinde aktive olan FLS ve makrofajlar, yüksek düzeyde proinflamatuvar sitokinler (TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-17, IL-23) ve matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) salgılayarak inflamatuvar süreci derinleştirir. Bu inflamatuvar mikrosistem, RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) sinyallemesi aracılığıyla osteoklast farklılaşmasını uyararak kemik rezorpsiyonuna yol açar. Aynı zamanda sitokinler ve MMP'ler kıkırdak yıkımını da teşvik eder. Bu mekanizmaların birleşimiyle, sinovyal hipertrofi yani pannus oluşumu; kronik iltihap sonucu eklem yüzeyinde gelişen ve kıkırdak ile kemiği tahrip eden anormal granülasyon dokusu, kemik erozyonu ve kıkırdak dejenerasyonu meydana gelir ve sonuç olarak eklem hasarı ilerleyici bir seyir izler (Aletaha & Smolen, 2018) (Şekil 6).



Şekil 6. Romatoid artritin immünopatogenezi. RA'da doğuştan gelen ve kazanılmış bağışıklık sistemlerinin etkileşimi sonucu gelişen otoimmün süreç; otoantikor üretimi, sitokin salınımı ve osteoklast aktivasyonu aracılığıyla sinovyal inflamasyon ve eklem destrüksiyonu ile sonuçlanır (Aletaha & Smolen, 2018'den ilham alınarak çizilmiştir).

2.5. Tanı Testleri

RA teşhisi için laboratuvar ortamında otoimmün belirteçler, inflamasyon seviyeleri ve eklem hasarı biyobelirteçlerinin analizi yapılabilmektedir. Hastalığın teşhisi için bu testler ve birlikte klinik bulgular da göz önüne alınarak ortak bir değerlendirme yapılmaktadır.

2.5.1. Romatoid faktör

Romatoid faktör (RF), immünoglobulin G (IgG) antikorlarının Fc bölgesini hedef alan ve RA inflamatuvar süreçlerine katkıda bulunan, immün kompleksler oluşturan bir otoantikordur. RF, başta RA ve Sjögren sendromu olmak üzere çeşitli otoimmün hastalıklarla ilişkili bir otoantikor olup, genellikle hastalığın seropozitif formunun belirlenmesinde tanısal bir biyobelirteç olarak kullanılır. Bununla birlikte, RF pozitifliği yalnızca otoimmünite ile sınırlı değildir; çeşitli enfeksiyöz hastalıklar, kronik inflamatuvar durumlar ve bazı neoplastik süreçlerde de saptanabilmektedir. Ayrıca, düşük titrede olmak kaydıyla, RF pozitifliği genç ve sağlıklı bireylerin yanı

sıra yaşlı popülasyonun yaklaşık %4'ünde asemptomatik olarak tespit edilebilmektedir. RF, RA tanısında sıkça kullanılan serolojik belirteçlerden biri olmasına rağmen, her RA hastasında RF pozitifliği saptanmayabilir. Bazı bireylerde de RF pozitifliği bulunmasına karşın, klinik olarak RA gelişmeyebilir. Bu durum özellikle ileri yaş gruplarında veya asemptomatik bireylerde gözlenebilir. Bu nedenle RF tek başına tanı koydurucu değil, klinik ve laboratuvar bulgularla birlikte değerlendirilmesi gereken bir parametre olarak kabul edilir (Newkirk, 2002- Gioud-Paquet ve ark., 1987).

2.5.2. Anti-siklik sitrüline peptit antikoru (ACPA)

Sitrülin, arjinin metabolizmasında bulunan bir amino asittir sitrülinin epitelyal hücre iskeletinde bulunan türü antikorların hedefi haline gelir. Sitrüline edilmiş bu proteinlerin eklem sıvısında lokal immün yanıtı indükleyerek RA gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir. ACPA antikorları RA tanısında özgüllüğü yüksek (%95-98), duyarlılığı göreceli olarak daha düşük (%80-83) antikorlardır. ACPA antikorları RA'nın erken tanısında rol oynayabilirler. RA'ya bağlı bulgular başlamadan yıllar önce ACPA serum düzeylerinin yükseldiği gösterilmiştir. Ancak son meta-analizler anti-CCP antikorlarının pozitif prediktif değerinin %5 olduğunu, risk değerlendirilirken pozitif anti-CCP antikor varlığının yanı sıra pozitif aile öyküsü, RF varlığı ve artralji yakınmasının da dikkate alınması gerektiğini belirtmektedirler. ACPA antikorları prognostik potansiyele de sahip olup RA tedavisini yönlendirmede yardımcı olurlar (Karami, Gholamin, Fathi, Afsar & Johari-Ahar, 2024).

2.5.3. Eritrosit sedimentasyon hızı ("sed oranı" veya ESR)

Eritrosit sedimentasyon hızı (ESH), kandaki kırmızı kan hücrelerinin (eritrositlerin) bir saat içinde plazmanın altına çökme hızını ölçen bir testtir. Bu test, vücutta iltihaplanma veya enfeksiyon olup olmadığını gösterir. RA gibi iltihaplı durumlarda ESR genellikle yüksek değerler gösterir. RA tanısında, ESR ve C-reaktif protein (CRP) gibi iltihap belirteçleri, hastalığın aktivitesini ve şiddetini değerlendirmede kullanılmaktadır. Bu testler, hastalık aktivitesinin izlenmesinde ve tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde de önemli rol oynamaktadır. ESH testi, RA tanısında ve hastalık aktivitesinin izlenmesinde önemli bir laboratuvar testidir. Ancak, tek başına tanı koydurucu olmayıp, diğer klinik bulgular ve testlerle birlikte değerlendirilmelidir (Wolfe & Michaud, 1994).

2.5.4. Anti-nükleer antikor (ANA)

Anti-nükleer antikorlar hücre çekirdeğinde bulunan farklı antijenleri hedefleyen çok geniş bir otoantikor grubunu içermektedir. Kısaca "ANA" olarak da tanımlanan bu antikorların hedefi olan antijenler tüm çekirdekli hücrelerde bulunurlar ve hücre döngüsünde rol alırlar. ANA terimi sadece "anti-nükleer" antikorları işaret ediyor gibi anlaşılıyorsa da bu tanımlamanın içinde hücrede bulunan nükleus dışı (sitoplazmik) antijenlere karşı gelişen antikorlar da vardır. RA hastalarının %15-30'u ANA pozitiftir. Ayrıcı bir tanı olmamasına rağmen bazı klinik durumlarda başvurulabilen bir testtir (de Santana ve ark., 2023).

2.6. Tedavi Yöntemleri

RA tedavisinde geleneksel tedavi stratejileri uygulanmaktadır, yoğun olarak DMARD'lar olarak adlandırılan ilaç grubu ve glukokortikoidler (GC- spesifik olmayan bağışıklık baskılayıcı ancak uzun vadeli yan etkilere sahip), kullanılmaktadır fakat; biyolojik DMARD'lardan oluşan yeni tedavi stratejileri de geliştirilmekte ve sürekli olarak araştırılmaktadır. Geleneksel sentetik DMARD'lar (csDMARD'lar), biyolojik DMARD'lar (bDMARD'lar) ve hedeflenen sentetik DMARD'lar (tsDMARD'lar) olarak üç katagoriye ayırılmıştır (Prasad ve ark., 2023).

csDMARD'lar: Metotreksat, folik asit metabolizmasını inhibe ederek bağışıklık sisteminin aşırı aktivitesini baskılamaktadır. Hastalık aktivitesini azaltma ve ilerlemeyi yavaşlatmadaki etkinliği nedeniyle sıklıkla birinci basamak tedavidir. Diğer csDMARD'lar arasında hidroksiklorokin, sülfasalazin ve leflunomid bulunmaktadır.

Biyolojik DMARD'lar: Bunlar bağışıklık sisteminin belirli bileşenlerini hedeflemektedir. Örnekler arasında tümör nekroz faktörü (TNF) inhibitörleri (örneğin, infliximab, etanersept, adalimumab, golimumab, certolizumab) ve IL-1 inhibitörleri (anakinra), IL-6 inhibitörleri (tocilizumab), CD20 inhibitörleri (rituximab) ve sitotoksik T-lenfosit ilişkili antijen (CTLA)-4 inhibitörleri (abatacept). Bunlar genellikle csDMARD'lar yetersiz olduğunda kullanılmaktadır.

Hedefli Sentetik DMARD'lar (tsDMARD'lar): Tofasitinib gibi Janus kinaz (JAK) inhibitörleri, inflamatuar süreçte yer alan spesifik yollara müdahale eden daha yeni seçeneklerdir (Fraenkel ve ark., 2021- Patel ve ark., 2023). Kullanılan bu ilaçlara ek olarak, non-steroidal Anti-inflamatuar ilaçlar (NSAID'ler) da kullanılmaktadır bu ilaç grubu semptomları iyileştirir ancak hastalığın ilerlemesinin önlenmesi üzerinde hiçbir

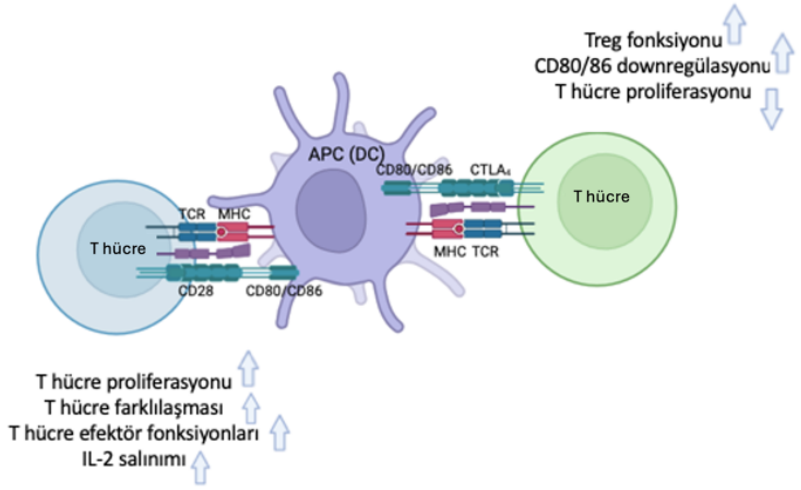
olumlu etki göstermemektedir. Hastalığın tedavisinde GC'ler de kullanılmaya devam etmektedir (Littlejohn & Monrad 2018).

2011 yılında Machado ve arkadaşları, metotreksatın güvenliği ve etkinliğini değerlendirmek amacıyla meta analiz yayınlamışlardır. Analize toplam 11 makale dahil edilmiş, toplam 3.461 hastayı içeren dokuz çalışma analiz edilmiştir. Hastalar, 24 ila 104 hafta boyunca adalimumab-MTX veya plasebo-MTX ile tedavi edilmiştir. Araştırmanın sonucunda, adalimumab-MTX kombinasyonu ile tedavi edilen hastaların, plasebo-MTX kullanılan hastalara kıyasla klinik etkinlik açısından daha iyi sonuçlar gösterdiğini ve hastalığın radyolojik ilerlemesinin daha belirgin şekilde azaldığını göstermişlerdir (de Avila Machado ve ark., 2013).

2.7. Antijen Sunumunda Eş Uyaran Sinyalinin ve Dendirit Hücrelerin Önemi

İmmün sistem kendi içerisinde bir dengeye sahiptir ve bu dengenin bozulması birçok hastalığa neden olmaktadır. Özellikle tolerans olarak adlandırılan kendi antijenlerine duyarsızlık durumunun bozulması sonucunda immün sistemin kendi antijenlerine karşı aktifleşmesi otoimmün hastalıkları meydana getirmektedir. ASH'ler, bağışıklık tepkisini düzenlemede kritik bir rol oynamaktadırlar. Bu hücre'ler yüzeylerinde MHC'ye sahiptirler ve bu moleküle bağlı antijen parçalarını sergilemektedirler. Sunulan antijenler, T hücreleri tarafından tanındığı zaman bir bağışıklık yanıtı başlayarak T hücreleri aktivasyon süreci ve farklılaşması indüklenir. Bu etkileşim, adaptif bağışıklık yanıtlarını başlatmak için gereklidir (şekil 7) (Trinchieri, 1994)

Mononükleer fagositik sistem (DH'ler, monositler ve makrofajlar dahil) hücrelerinden olan ASH'ler arasında DH'ler, naif T hücrelerine antijen sunmada ve T hücrelerinin aktivasyonunu sağlamada en yetenekli olan hücrelerdir (Banchereau ve ark., 2000).



Şekil 7. DH ve T hücresi antijen sunumu. DH antijen peptitini işleyip T hücresine MHC molekülü yardımı ile sunduğunda T hücresinde bulunan THR ile eşleşme sonrasında T hücrelerinin aktive olması için eş bir uyarana yani 2. sinyale ihtiyaç duymaktadır. Bu uyaran DH üzerinde olan CD80/86 ile T hücresi üzerinde bulunan CD28'in eşleşmesi ile tamamlanmaktadır. Eğer bu eşleşme olmazsa T hücreleri aktive olamaz (Neal ve ark., 2017). (biorender kullanılarak çizilmiştir).

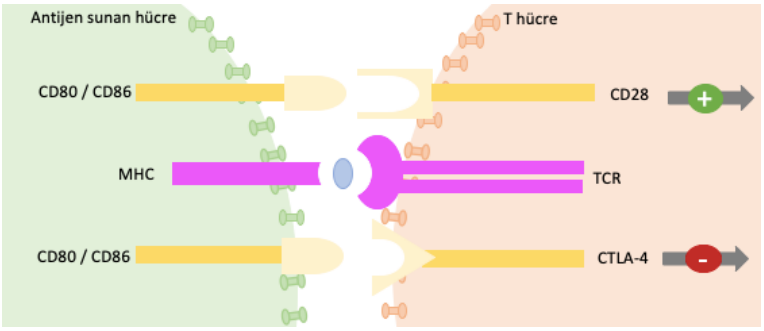
T hücre reseptörü (THR) aracılı sinyaller T hücre yanıtının özgüllüğünü belirleyen temel bir etkileşim mekanizması olmasına karşın, optimal T hücre aktivasyonu, proliferasyonu ve fonksiyonel farklılaşmanın sağlanmasında eş-uyarıcı (ko-stimülatör) sinyaller kritik bir rol oynamaktadır (Gimmi ve ark.,1991- Harding, McArthur, Gross, Raulet & Allison, 1992) En iyi karakterize edilmiş ikincil (eş uyaran) sinyal ASH'ler üzerinde yer alan B7 ailesi (CD80 ve CD86) moleküllerin T hücrelerinde eksprese edilen CD28'e bağlanması sonucu iletilen sinyalle sağlanmaktadır. Ayrıca, bu sinyaller, T hücrelerinin hayatta kalımını, sitokin üretimini ve immünolojik sinapsın stabilitesini artırarak adaptif immün yanıtın etkinliğini belirlemektedir. Dolayısıyla, THR sinyali antijenik özgüllüğü sağlarken, eş-uyarıcı sinyaller T hücre aktivasyonunun kalitesini ve büyüklüğünü modüle etme yeteneğine sahiptirler (Şekil 8) (Linsley, Clark & Ledbetter, 1990).

T hücre aktivasyonu sağlanması için sadece CD28-CD80/86 eşleşmesi yeterli değildir, aynı şekilde THR ile MHC eşleşmesi CD28-CD80/86 eş uyaran eşleşmesi olmadan yeterli değildir ve böyle bir durumda T hücreleri aktivasyonu gerçekleşemez ve T hücrelerinde Anerji olarak adlandırılan işlevsizlik meydana gelmektedir. Ayrıca, bir başka ikincil reseptör olan sitotoksik T lenfosit antijen 4 (CTLA4; CD152) aktive T lenfositlerde ifade edilmektedir (Linsley ve ark., 1991).

CTLA-4, T hücre aktivasyonunu negatif yönde düzenleyen temel immün kontrol noktası reseptörlerinden biridir. CD28 ile aynı ligandlar olan CD80 (B7-1) ve CD86 (B7-2)'ya çok daha yüksek afiniteyle bağlanarak, bu ligandların CD28 üzerinden pozitif sinyal iletimini kompetitif olarak engellemektedir. Bu etkileşim sonucunda T hücrelerinin aktivasyonu baskılanmakta ve immün yanıtın kontrol altında tutulması sağlanmaktadır. T hücre aktivasyonunu baskılama mekanizması hem CD80/CD86'nın ASH yüzeyinden uzaklaştırılması (trans-endositoz) hem de SHP2 ve PP2A gibi fosfatazların aktivasyonu yoluyla TCR/CD28 sinyallerinin negatif regülasyonu ile gerçekleşmektedir (Şekil 8) (Rudd, Taylor & Schneider, 2009- Linsley ve ark., 1994)

Birçok immünoterapötik yaklaşım CD80/86-CD28 bağlanmasınına karşı düzenleyici bir strateji geliştirmek için CTLA4 kullanmayı hedeflemektedir. Buradaki amaç CTLA4'ün CD80/86'ya (CD28'e göre kat kat daha fazla) yüksek bağlanma (afinite) göstermesi nedeniyle eş-uyaran sinyalinin bloke edilmesidir (Lenschow ve ark., 1992).

Son yapılan otoimmün hastalıkların tedavisindeki çalışmalarda da çeşitli ajanlar kullanılarak immatür-olgunlaşmamış fenotipte bulunan DH'lerin (iDH) *in vivo* uygulanması ön plandadır. iDH fenotipik özellik gösteren hücreler düşük düzeyde CD80/86 ifadesine sahiptir ve bu da antijen spesifik T hücrelerinde anerjiye neden olmaktadır (Kitajima, Ariizumi, Bergstresser & Takashima, 1996- Moser ve ark.,1995) Bazı çalışmalar ile bu anerjik hücrelerin hem *in vitro* koşullarda hem de *in vivo* olarak düzenleyici hücre rolünü üstlendiklerini göstermektedir. (Jooss, Gjata, Danos, von Boehmer & Sarukhan, 2001- Lombardi, Sidhu, Batchelor &Lechler, 1994) Bu yaklaşım ile uygun otoantijenleri taşıyıp sunan iDH'lerin otoimmün hastalıkların tedavisinde uygulanmasının terapötik bir yaklaşım olabilecekleri gösterilmiştir. Ama bu yaklaşımın ideal bir terapötik yaklaşım olamayacağı da tartışma konusudur çünkü iDH'ler *in vivo* koşullarda bulundukları mikroçevredeki hücrelerin ve mediyatörlerin etkileri ile aktive olabilir olması bir risk durumudur. (Jonuleit, Schmitt, Steinbrink& Enk, 2001- Riley ve ark., 2002)

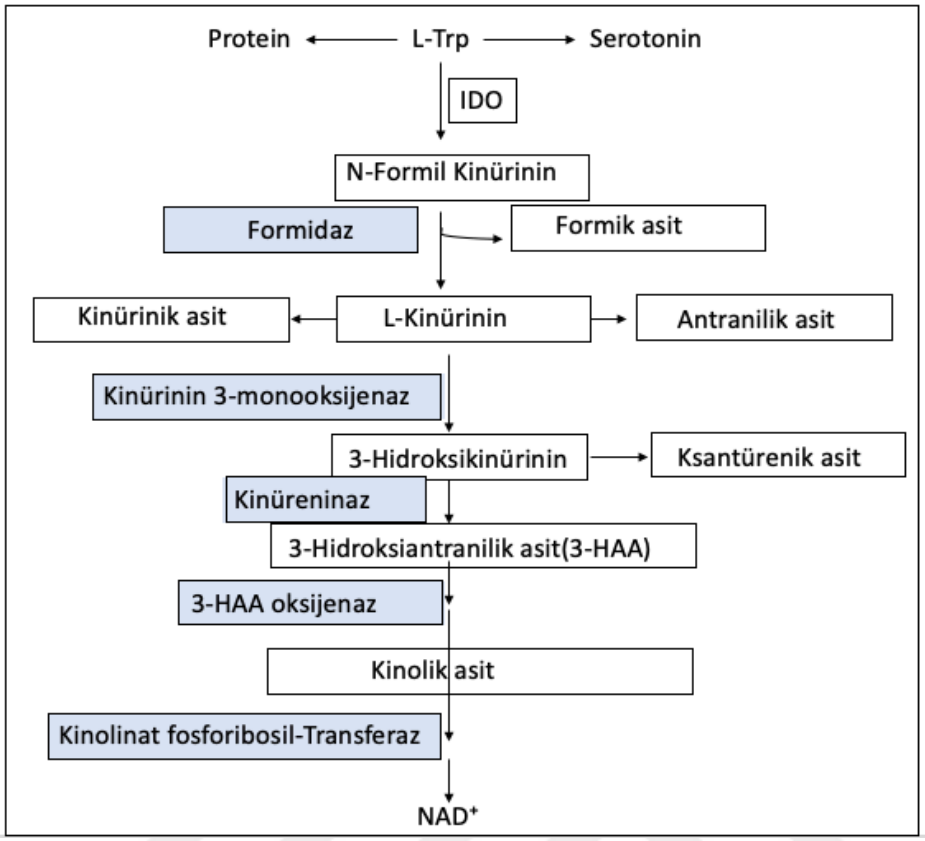


Şekil 8. CD80/CD86'nın CD28 ile bağlanması, T hücre aktivasyonunu destekleyen pozitif bir kostimülasyon sinyali sağlar ve böylece immün yanıtın etkinleşmesine katkıda bulunur. Buna karşılık, aynı ligandların CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4) ile etkileşimi, negatif bir düzenleyici sinyal oluşturarak immün yanıtın baskılanmasına neden olur. Bu mekanizma, bağışıklık sisteminin aşırı aktivasyonunu önleyerek otoimmüniteden korunmada kritik bir rol oynamaktadır (Pardoll, 2012) (BioRender kullanılarak oluşturulmuştur).

2.8. Triptofan Metabolizması ve İndolamin 2,3-dioksijenaz (IDO)

IDO kinürenin yolağındaki triptofan degradasyonu sırasında ilk aşamadaki kataliz reaksiyonunda yer alan ve HEM grubu içeren hücre içi bir enzimdir. HEM grubunu kofaktör olarak kullanarak triptofanın kinürenin yoluna girişini sağlamaktadır. HEM'in içerdiği demir iyonu, triptofanın oksidatif katabolizmasında elektron transferi için gereklidir (Mellor, Keskin, Johnson, Chandler& Munn, 2002). IDO tüketimi sonucu ortaya çıkan triptofan açlığı T hücre aktivasyonunun inhibisyonuna sebep olur (Mellor, 2002- Mellor & Munn, 1999). Buna karşın kinürenin ve oksijen radikalleri gibi triptofan katabolizma ürünleri T hücre proliferasyonunda ve yaşamını düzenlenmesinde etki gösterir (Mellor & Munn, 1999- Frumento ve ark., 2002).

IDO enzimi immün hücrelerde ve insan dokularında yaygın olarak eksprese edilmektedir. Enflamatuvar yanıt sırasında özellikle interferon-gamma (IFN-γ) başta olmak üzere çeşitli proinflamatuvar sitokinlerin etkisiyle ekspresyon düzeyi belirgin şekilde artış gösterir (Daubener & MacKenzie, 1999). Yapılan çalışmalar kapsamında IDO'nun otoimmün hastalıklarda, gebelik ve transplantasyon süreçlerinde, enfeksiyonlarda ve hematolojik maligniteler gibi neoplazileri de kapsayan birçok immünolojik durumda immün toleransın indüklenmesinde merkezi bir rol oynadığı gösterilmiştir (Mellor, 2002- Curti, Trabanelli, Salvestrini, Baccarani & Lemoli, 2009).



Şekil 9. Memelilerde L-Triptofan metabolizmasının Kinürinin yolağı (Mellor, 2002).

IDO'nun bağışıklık yanıtının modülasyonundaki işlevini açıklamak üzere literatürde iki temel hipotez öne sürülmüştür.

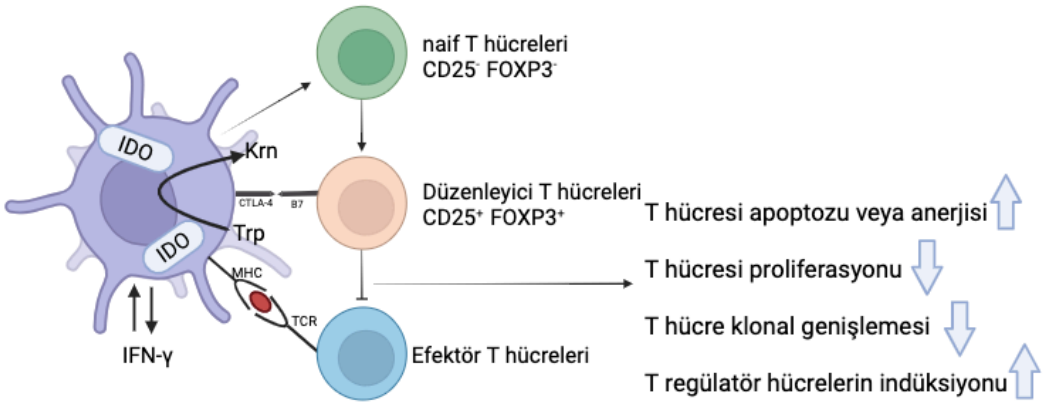
Birincisi; triptofan tüketim teorisi olarak adlandırılan doku mikroçevresi veya kültür sıvılarında triptofanın IDO-aracılı eksilmesinin T hücre proliferasyonunu azaltırken apoptozuna neden olduğunun gösterilmesi temeline dayanmaktadır. Triptofan kıtlığı, özellikle efektör T hücrelerin hücre döngüsünde G1 fazında duraklamasına ve apoptozise yönelmesine neden olmaktadır (Moffett & Namboodiri, 2003- Munn ve ark., 1999).

İkincisi triptofan kullanım teorisi olarak adlandırılan kinürenin yolağında triptofan degradasyonu sonucu açığa çıkan metobolitlerden bazılarının T hücre apoptozuna yol açarak immün süpresyona yol açmasıdır. Kinürenin türevleri, özellikle T hücreler üzerinde sitotoksik etki göstererek proliferasyonu inhibe ederken, düzenleyici T hücrelerinin (Treg) genişlemesini destekleyebilmektedir. Ayrıca bu metabolitler, ASH'ler ve doğal öldürücü hücreler (NK) gibi diğer immün hücre popülasyonları

üzerinde de immünosupresif etkilere yol açabilmektedir (Bauer ve ark., 2005- Fallarino ve ark.,2002- Frumento ve ark., 2002).

İmmün yanıtları baskılayan başlıca hücre alt popülasyonlarından biri $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ fenotipindeki Treg hücreleridir. IDO'nun Treg hücrelerinin baskılayıcı fonksiyonlarını desteklediği ve farklılaşmasını teşvik ettiği gösterilmiştir (O'Garra &Vieira, 2004- Miwa ve ark.,2005). Kanser patogenezine, tümörü drene eden lenf düğümlerinde Treg işlevlerini arttıran IDO ifade eden DH bulunmaktadır (Munn ve ark., 2004- Sharma ve ark., 2007) Yine, Puccetti ve arkadaşları fare modellerinde yaptıkları çalışmada triptofan katabolizmasının CD25-Foxp3+ öncüllerinden CD25+Foxp3+ Treg'lerin ortaya çıkmasını desteklediğini göstermiştir (Fallarino ve ark., 2006).

Yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde, IDO aracılı triptofan katabolizmasının T hücre proliferasyonunun baskılanması, artan T hücre apoptozu ve $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ düzenleyici T hücrelerin de novo indüksiyonu gibi mekanizmalar üzerinden hücresel immün yanıtın zayıflatılmasına neden olduğu anlaşılmaktadır. Bu nedenle çevresel uyaranlara yanıt olarak IDO ekspresyonunu artıran DH'lerin immün toleransın oluşumunda ve sürdürülmesinde kritik bir hücre tipi olarak görev yaptığı düşünülmektedir (Şekil 10).



Şekil 10. IDO ifadesi. IDO aracılı triptofan degradasyonu, T hücre proliferasyonunun baskılanması, T hücre apoptozu veya anerjisinin artışı ve Treg hücrelerinin de novo indüksiyonu ile sonuçlanarak hücresel immün yanıtın düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır. (Bianco, Kim, Ruffner & Robbins, 2009'dan esinlenilmiştir; şekil BioRender ile oluşturulmuştur).

Bianco ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları bir çalışmada CIA modellerinde, terapötik yaklaşım olarak IDO geni aktarılmış DH tedavisi incelenmiştir. Çalışmada artrit oluşturulan farelere IDO geninin adenovirus aracılı olarak DH'lere transdüksiyonu ardından elde edilen toleran DH'lerin ve bu DH'lerden kaynaklanan eksozomların enjeksiyonunun da artrit oluşumunu engellediği gösterilmiştir. Çalışmanın sonuçlarının olumlu olması heyacan verici olsada adenoviral vektörlere karşı zaman içerisinde gelişen immün yanıt ile bu vektörlerin etkisiz hale gelebilmesi ve ardışık uygulamalarda immün sistem tarafından hızla tanınarak etkisizleştirilmesinin olası olduğu düşünülmüştür (Schagen, Ossevoort, Toes & Hoeben, 2004).

2.9. Artrit Hayvan Modelleri

Kolajen ile indüklenen artrit fare modeli, romatoid artritin en sık tercih edilen otoimmün modelidir. Bu hayvan modelinde otoimmün artrit, tam Freund adjuvanı ve tip II kolajen (CII) emülsiyonun indüklemesi yoluyla oluşturulmaktadır (Brand, Latham, & Rosloniec, 2007). Otoimmün artrit hayvan modelleri, bu hastalığın patojenik mekanizmalarının incelenmesi ve yeni tedavilerin test edilmesi için önemlidir. Antijen-proteoglikan ile indüklenen artrit (PGIA) (Finnegan, Mikecz, Tao, & Glant, 1999) streptokok hücre duvarı artriti (Koga ve ark., 1985) CIA (Courtenay, Dallman, Dayan, Martin & Mosedale, 1980) ve antijen ile indüklenen artrit (Brackertz, Mitchell & Mackay, 1977) ve immünizasyon gerektirenler; kimyasal ajanlarla indüklenenler-yağ ile indüklenen artrit (Hopkins, Freemont, & Jayson, 1984); ve spontan modeller-tümör nekroz faktörü-α transgenik fare (Butler ve ark., 1997) ve K/BxN T-hücre reseptörü transgenik fare (Kouskoff ve ark., 1996) dahil olmak üzere çeşitli fare artrit modelleri litaratürde bulunmakta ve çalışılmaktadır.

CIA, insan RA ile hem immünolojik hem de patolojik özellikleri açısından benzerlik gösteren bir modeldir (Trentham, Townes, Kang & 1977- Wooley, 1988). Bu nedenle RA patogenezini incelemek için CIA bir model olarak kullanılabildiği gibi yeni tedavi yollarını test etmek için de yaygın olarak kullanılmaktadır. Model son derece tekrarlanabilir olmasına rağmen başarıyla artrit indüklemek için gerekli olan dikkat edilmesi gereken bazı noktalar vardır. Modelde kullanılacak hayvanlar sağlıklı ve genç (6-8 haftalık) olmalı ve hayvanlar spesifik patojen free ortamda bakılmalıdırlar. Genel olarak, viral veya bakteriyel enfeksiyonlar kolajene karşı

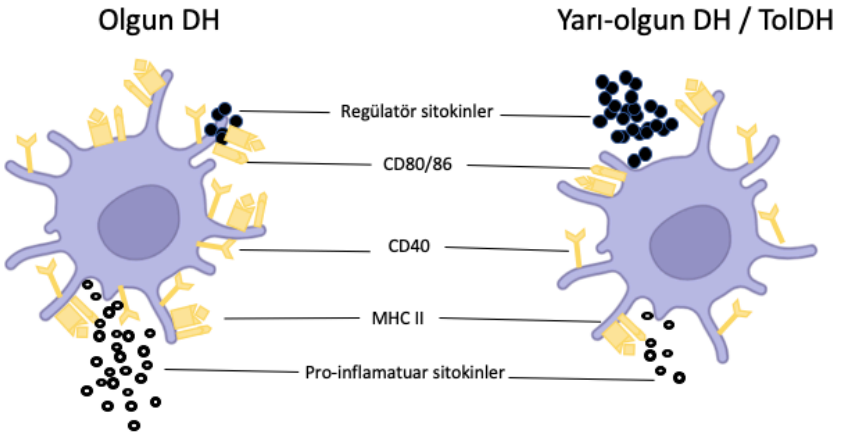
immün yanıtı ve dolayısıyla artrit gelişimini etkileyebilmektedir. Beslenme de artrit sıklığı ve şiddetini etkilemektedir. CIA oluşumu, farklı ticari olarak temin edilen fare yemleri ile beslenmiş farelerde de değişkenlik göstermektedir. Yüksek yağ içeriğine sahip diyet ile beslenen farelerde CIA insidansı daha yüksek olarak gözlenmiştir (Wooley ve ark., 1985).

CIA duyarlılık açısından kullanılan hayvan ırkı da önemlidir. CIA duyarlı oldukları için iki fare ırkı bu modelde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu türler tavuk, sığır, domuz ve insan tip II kolajen yanıt veren DBA /1 (H-2q) fareler ve sadece sığır ve domuz tip II kolajene güçlü, zayıf olarak da tavuk ve insan tip II kolajen yanıt veren B10.RIII (H-2r) farelerdir (Holmdahl, Jansson, Larsson, Rubin & Klareskog, 1986). Bununla birlikte BALB/c farelerde eklem içine tip II kolajen uygulamasıyla artrit oluşturulabildiği laboratuvarımızda gösterilmiştir (Güvenç ve ark.,2018).

Ayrıca, yine C57BL/6 farelerde de tavuk tip II kolajeni ile artrit oluşturulabildiği gösterilmiştir (Inglis, Šimelyte, McCann, Criado & Williams, 2008). DBA/1 fare suşu CIA modeli açısından en ideal ve duyarlı model olarak kabul edilse de hayvan başına talep edilen yüksek maliyet nedeniyle çalışmamızda alternatif olarak BALB/c ve C57BL/6 suşlarının kullanılması tercih edilmiştir. Böylece, iki farklı fare ırkında CIA modeli oluşturulması analiz edilmiştir.

2.10. Artrit Modellerinde Toleran Dendritik Hücre Tedavisi

DH'ler, vücuda giren patojenlere karşı özgül immün yanıtların başlatılmasında ve buna karşılık olarak self antijenlere karşı periferik toleransın sürdürülmesinde görev alan profesyonel ASH'lerdir. TolDH'ler, genetik mühendislik yaklaşımları ya da çeşitli farmakolojik ajanlar aracılığıyla *in vitro* olarak elde edilebilmektedir. Fonksiyonel olarak değerlendirildiğinde TolDH'ler, immünojenik DH'lere kıyasla daha düşük düzeyde kostimülatör moleküller (örneğin CD80, CD86) ve proinflamatuvar sitokinler (örneğin IL-12, TNF-α) eksprese ederken; buna karşılık yüksek düzeyde immünoregülatör mediatörler (örneğin IL-10, TGF-β) üretme kapasitesine sahiptirler. Bu fenotipik ve fonksiyonel özellikleri sayesinde TolDH'ler, immün yanıtın baskılanması ve antijen özgül toleransın indüklenmesinde terapötik potansiyel taşımaktadır (Şekil 11). (Butler ve ark., 1997).



Şekil 11. Olgun DH ile tolerojenik/yarı-olgun DH'lerin fenotipik ve özelliklerinin karşılaştırılması. Olgun DH'ler yüksek düzeyde MHC sınıf II moleküllü, kostimülatör moleküller (CD80/CD86, CD40) ve proinflamatuvar sitokinler eksprese ederler; TolDH'ler bu molekülleri düşük düzeyde eksprese ederler. Bununla birlikte, TolDH yüksek miktarda immünoregülatör sitokin (örneğin IL-10, TGF-β) üretirler. (Butler ve ark., 1997) (BioRender kullanılarak oluşturulmuştur).

TolDH'lerin immün toleransı indüklemek için kullandıkları başlıca mekanizmalar şu şekilde sıralanmaktadır: (1) T hücre delesyonu, (2) T hücre yanıtsızlığının (Anerji), (3) T hücre sitokin profilinin immün deviasyonu (Th1 → Th2), (4) Treg hücrelerin indüklenmesi ve (5) İmmünosüpressif sitokinlerin salgılanması (Butler ve ark., 1997).

CIA fare modelinde tolDH terapötik potansiyeli incelenmesi amacıyla model oluşturulan hayvanlara terapötik yaklaşım olarak DH'leri CCR9, IL-10 ve tip II kolajen kodlayan DNA yapılarıyla transfekte ederek antijen-spesifik tolDH'ler elde edilmiş ve artritli farelere bu tolDH'lerin uygulanması sonucunda, $CD4^+$ T hücre proliferasyonunun baskılandığı, IL-10 ve TGF-β gibi immünsüpresif sitokinlerin arttığı ve de novo Treg indüksiyonunun sağlandığı gösterilmiştir. Ayrıca tedavi edilen gruplarda ayak bileği şişliği, anti-kolajen antikor düzeyleri ve histolojik eklem hasarının anlamlı ölçüde azaldığı rapor edilmiştir (Fisher ve ark.,2024).

2.11. Gen Tedavisi ve Gen Transfer Yöntemleri

Gen tedavisi, bazı hastalıkların önlenmesi ya da tedavi edilmesi amacıyla hücrelere genetik materyal transfer edilmesini içeren bir yaklaşımdır. Bu yöntem, eksik veya işlevini yitirmiş genlerin yerine yeni genlerin yerleştirilmesini, hatalı çalışan genlerin baskılanmasını ve belirli genetik işlevlerin modifiye edilmesini hedeflemektedir (Haritha, Uma, Nagaratna, Chaitanya & Gunasekharan, 2012).

Gen tedavisi için ilk gelişmeler 1970'li yılların ortalarında Varmus ve Bishop tarafından gerçekleştirilmiştir. Yaptıkları çalışma ile Avian Sarkoma virüslerinin bazı kuş genlerine ait cDNA dizilerini, enfekte ettikleri hücrelerin genomuna entegre ederek tümör oluşumuna neden olduklarını göstermişlerdir. Daha sonra bu genler "proto-onkogen" olarak tanımlanmıştır (Stehelin, Varmus, Bishop, & Vogt, 1976). 1980 yılında yapılan bir çalışmada, retroviral tabanlı bir vektör kullanarak gen transferi gerçekleştirilmiştir (Watson, 1981). İnsanlardaki ilk gen tedavisi uygulaması 1982 yılında insanlarda talasemi hastalığı hedeflenerek yapılmıştır (Wade,1981).

TolDH üretiminde genetik modifikasyon kullanmak, hücrelerin *in vivo* stabilitesini ve immün regülatuvar kapasitesini artırma açısından önemli avantajlar sunmaktadır. Klasik yöntemlerde, tolDH'ler genellikle deksametazon, vitamin D3, IL-10 veya rapamisin gibi immünomodülatör ajanlarla elde edilmekte olup; bu yöntemler fenotipin geçici olmasına ve inflamatuvar koşullar altında tolerojenik özelliklerin kaybolmasına neden olabilmektedir. Buna karşın, IL-10, TGF-β veya CTLA4 gibi immünsüpresif moleküllerin ekspresyonunu artıracak şekilde yapılan genetik modifikasyonlar, tolDH'lerin uzun vadeli fonksiyonel stabilitesini sağlayabilmektedir (Comi ve ark., 2020). Ayrıca, CD80/CD86 gibi kostimülatör moleküllerin ekspresyonunun gen düzeyinde baskılanması, tolDC'lerin allojenik T hücre aktivasyonunu azaltmasına katkıda bulunur (Ma, Shi, Li, ve Chang, 2024). Genetik modifikasyonlar ayrıca antijen sunumu, kostimülasyon ve sitokin üretimi gibi temel fonksiyonlara doğrudan müdahale etme imkânı sunarak, tolDH'lerin hedefe yönelik tolerojenik işlevlerini daha güvenilir ve kontrollü hale getirmektedir. Bu nedenle, gen bazlı yaklaşımlar, özellikle otoimmün hastalıklar ve transplantasyon gibi durumlarda klinik uygulamaya geçişte daha sürdürülebilir ve terapötik olarak avantajlı bir seçenek sunmaktadır. Gen transfer yöntemleri genellikle viral ve viral olmayan vektörlerle yapılanlar olarak ikiye ayırılmaktadır. Gen tedavisi yaklaşımları hücresel gen bazlı (*ex vivo*) ve direkt (*in vivo*) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

2.11.1. Viral yöntemler

Gen transfer yönteminde kullanılan viral vektörler genellikle enfektivitesini korur ancak replikasyon kabiliyeti yoktur. Lentivirüs, adenovirüs, adeno-assosiye virüs, herpesvirüs ve retrovirüsler virüs vektörlerine örnektir. Bu virüslerin patojenik özellikleri silindikten sonra uygun restriksiyon enzimleri kullanılarak vektörün istenilen bölgesine rekombinant genler, klonlanır. Viral vektörlerin memeli hücrelerinde ekspresyonu için öncelikle paketleyici hücre hatlarına aktarılması gerekir.

Retroviral vektörlere dayalı gen tedavilerinde genellikle iki ayrı vektör sistemi kullanılır. Bu sistemlerden biri tedavi edici gen dizisini taşırken, diğeri retrovirüsün yapısal ve replikatif işlevlerinden sorumlu olan üç temel gen bölgesini (gag-pol,rev, env) içerir (Clark & Pazdernik, 2012).

Viral vektörler aracılığıyla gerçekleştirilen gen transferlerinde gen ekspresyon düzeyi oldukça yüksektir. Ayrıca gen terapisi ve immün modülasyon uygulamalarında farklı biyolojik özellikler gösterir. Ancak bu vektörlerin konak genomuna düzensiz entegrasyon olabilme ihtimali, genetik dengenin bozulmasına ve delesyonlara neden olabilir. Bu durum, özellikle genetik olarak işlevsel bölgelerin zarar görme riskine neden olabileceğinden dolayı, viral vektörlerin kullanımı hem biyogüvenlik hem de uygulama zorlukları açısından önemli sınırlılıklar taşımaktadır. Lentivirüsler, bölünmeyen hücreleri ve uzun süreli ekspresyonu ile öne çıkar. Retrovirüsler daha çok bölünen hücrelerde stabil bir şekilde ekspresyona sahiptir. AAV ve HSV gibi vektörler, yüksek taşıma kapasitesi ve düşük immünojenisite sergilerken, adenovirüs ve VSV gibi sistemler güçlü ekspresyon sağlamasına rağmen immünojenisite veya sitotoksisite gibi sınırlamalar taşımaktadır (Sheridan, 2011) (Tablo 1).

Tablo 1. Viral vektörler karşılaştırmalı tablo

Viral Vektör	Genom Türü	Taşıma Kapasitesi	Avantajları	Dezavantajları
Lentivirüs	ssRNA (+), Retrovirüs	~8–10 kb	- Hem bölünen hem de bölünmeyen hücreleri transdükte edebilir - Uzun süreli ve stabil ekspresyon sağlar	- Rastgele entegrasyon nedeniyle insertiyonel mutagenez riski - Üretimi karmaşıktır
Retrovirüs (gama)	ssRNA (+), Retrovirüs	~7–8 kb	- Stabil ve kalıcı ekspresyon sağlar - Kök hücreler için uygundur	- Yalnızca bölünen hücrelerde etkilidir - Genom entegrasyonu güvenlik riski oluşturur
Adenovirüs	dsDNA	~7,5–36 kb	- Yüksek transdüksiyon verimliliği - Güçlü fakat geçici ekspresyon	- Yüksek immünojenisite - Transgen ekspresyonu kısa sürelidir
AAV (Adeno-associated virus)	ssDNA	~4,7 kb	- Düşük immünojenisite - Uzun süreli ekspresyon - Serotip çeşitliliği ile doku hedeflemesi mümkündür	- Küçük gen taşıma kapasitesi - Yüksek maliyetli ve üretimi zordur
HSV (Herpes Simplex Virus)	dsDNA	>30–40 kb	- Çok yüksek taşıma kapasitesi - Sinir sistemi hedeflemesi	- Yüksek immünojenisite - Klinik uygulamalarda güvenlik endişeleri taşır
VSV (Vesicular Stomatitis Virus)	ssRNA (-)	~11 kb	- Hızlı ve güçlü transgen ekspresyonu sağlar - Onkolitik potansiyeli vardır	- Yüksek sitotoksisite - Klinik kullanımı sınırlıdır

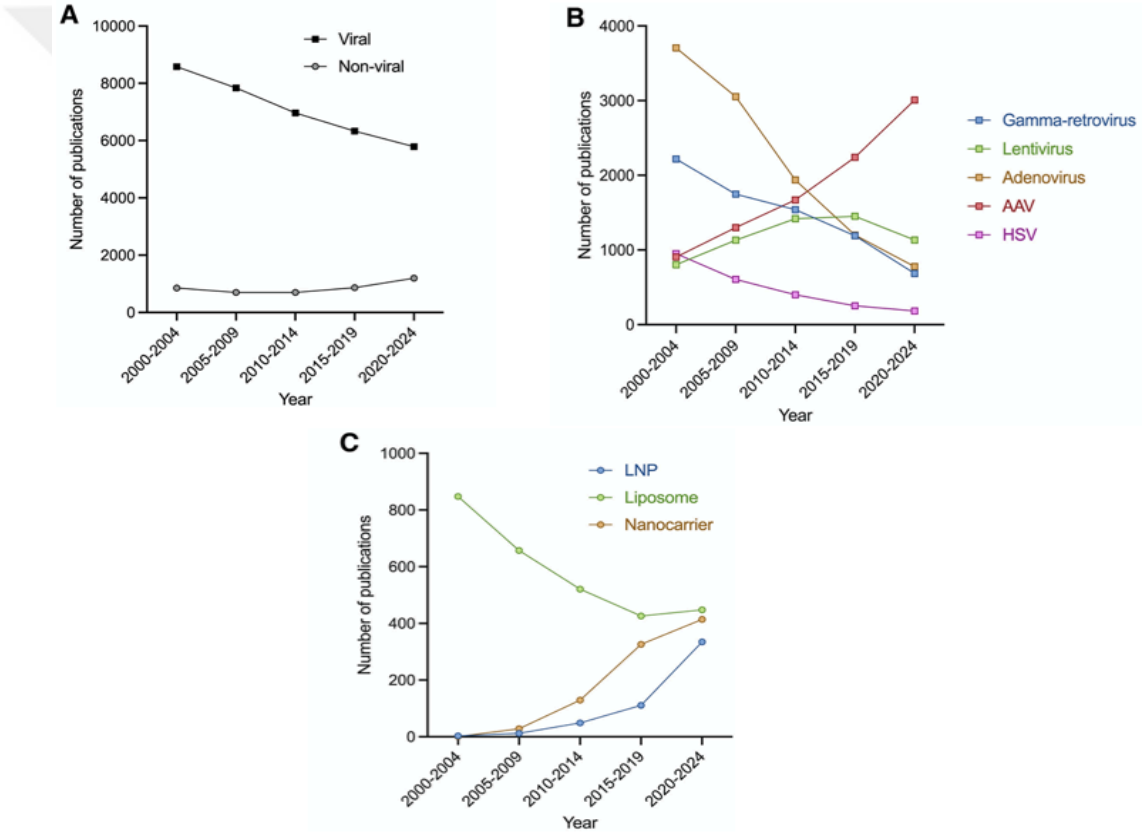
2.11.2. Viral olmayan yöntemler

Viral olmayan gen transfer yönteminde gen parçası doğrudan hücreye transfer edilmektedir. Bu sınıfta; gen tabancası, elektroporasyon, lipozomlar ve polimerler aracılı metotlar bulunmaktadır. Viral olmayan vektörler, özellikle lipit nanopartiküller (LNP'ler) ve katyonik polimerler gen yükleme kapasiteleri, yüksek güvenlikleri ve uygulanabilirlik açısından kolaylıkları ile daha yoğun kullanıldığı bilinmektedir. Ayrıca viral olmayan vektörler daha fazla klinik geliştirme ve uygulama için bir potansiyel sergilemektedir (Guo & Huang, 2012).

Elektroporasyon yönteminde elektrik akımından ve altının iletkenliğinden yararlanarak hücrelerde por oluşturarak istenilen genetik metaryalin geçişi sağlanır. Gen tabancası yönteminde altın parçacıkları ile kaplanan DNA hücre zarını hızla delerek sitoplazma içine girer ve çekirdeğe ulaşır (Patil, Chaudhari, Sahu & Duragkar, 2012). Lipozomal sistemler hücre zarının yapısına benzer fosfolipit yapılı, amfipatik

ve veziküler yapılardır DNA'nın negatif yükünden kaynaklanan çekim ile istenilen genetik materyalin hücre içerisine alınmasını sağlarlar (Duve, Trouet, Campeneere, & Baurain, 1978).

1968 yılında ilk kez denenen ve başarılı bir şekilde çalışılan lipozomların diğer gen transfer ajanları arasında en güvenli oldukları bilinmektedir. Salınım süreleri uzundur ve salınımları yavaştır bu nedenle enzim, ilaç, hormon çalışmalarında ve tedavilerinde sıklıkla kullanılmaktadırlar (Bangham, Standish & Watkins, 1965). 2025 yılında yayımlanan bir çalışmada viral olan ve viral olmayan gen tedavilerinin litaratürde kullanılma sıklıklarına göre analizleri yapılmış ve grafiksel olarak paylaşılmıştır (Şekil 12).



Şekil 12. Çeşitli vektör türlerinin kullanım oranları (A) Literatürde viral ve viral olmayan gen tedavisi araştırmalarındaki eğilimler. (B) Farklı viral vektörler arasındaki eğilimler. (C) Viral olmayan gen tedavileri arasındaki eğilimler (Wang, Stevens & Flotte, 2025).

2.11.3. Direkt gen tedavisi

Genetik temele dayalı immün tolerans stratejilerinden biri olan doğrudan (*in vivo*) gen tedavisi, terapötik genlerin viral veya viral olmayan taşıyıcı sistemler aracılığıyla doğrudan hastanın vücuduna uygulanması esasına dayanır. Bu yaklaşımda hedeflenen

gen, sıklıkla AAV, adenovirüs gibi viral vektörlerle taşınmakta olup; genetik materyalin doğrudan *in vivo* ortamda hedef hücrelere aktarılması amaçlanır. Pratik uygulama kolaylığı, klinik ölçeklenebilirlik ve bazı dokulara (örneğin kas, retina) etkin hedeflenebilme gibi avantajlar taşısa da, bu yöntem hücre tipi özgüllüğü, gen ekspresyonunun çevresel uyarılara bağlı olarak değişebilmesi ve vektöre veya transgene karşı gelişebilecek immün yanıtlar gibi ciddi sınırlamalara sahiptir (Maldonado ve ark., 2010). Özellikle otoimmün hastalıklar gibi bağışıklık dengesinin kritik olduğu durumlarda, istenmeyen hücrelerin hedeflenmesi ya da tolDH gibi nadir hücre popülasyonlarının etkili biçimde modifiye edilememesi, terapötik etkinliği sınırlayabilir. Ayrıca antijen-spesifik tolerans oluşturmak bu yöntemde oldukça zordur. Bu nedenlerle, doğrudan gen tedavisi bazı özel durumlar için avantaj sağlasa da tolDH gibi immün regülatör hücrelerin stabil fenotip ve hedefe özgü fonksiyonlarının sağlanmasında yetersiz kalabilmektedir.

İn vivo uygulamalarda, son yıllarda geliştirilen lipid nanoparçacık (LNP) temelli sistemler aracılığıyla mRNA veya CRISPR/Cas9 bileşenleri spesifik olarak hedef dokuya yönlendirilerek uygulanabilmektedir. Bu teknoloji, mRNA aşılarında kullanılan sistemlerle benzerlik gösterdiği için düşük immünojenite ile tanımlanmaktadır ve genetik materyalin kısa süreli ekspresyonunu sağlamaktadır (Hou, Zaks, Langer ve Dong, 2021).

2.11.4. Hücresel gen tedavisi

Hücre bazlı gen tedavisi, özellikle otoimmün hastalıkların kontrol altına alınmasında kontrollü, güvenli ve hedefe yönelik bir strateji olarak öne çıkmaktadır. Bu yaklaşımda, hastanın kendi periferik kanından izole edilen monositler, laboratuvar ortamında DH'lere farklılaştırılmakta ve ardından genetik olarak modifiye edilerek tolerojenik fenotipe dönüştürülmektedir. Genetik modifikasyon için sıklıkla lentiviral vektörler tercih edilmektedir, bu sayede DH'lerde IL-10, TGF-β veya PD-L1 gibi immünsüpresif moleküllerin aşırı ekspresyonu sağlanabilmektedir; buna karşılık CD80, CD86 gibi kostimülatör moleküllerin ekspresyonu baskılanabilmektedir (Derdelinckx ve ark., 2024). Bu modifikasyonlar tolDH'lerin T hücre aktivasyonunu engellemesine ve Treg indüksiyonu aracılığıyla antijen özgüllüğü olan immün toleransın sağlanmasına katkıda bulunabilmektedir. Ayrıca bu hücrelere hastalığa özgü otoantijenler (örneğin sitrülinlenmiş proteinler, GAD65, MOG) yüklenerek

antijen-spesifik tolerans oluşturulabilmektedir. Hücre bazlı yaklaşım, gen aktarımının sadece hedef hücrelere uygulanması, uygulama öncesinde hücrelerin fenotip ve fonksiyonlarının karakterize edilebilmesi ve *in vivo* ortamda daha stabil bir tolerojenik profille etkili şekilde görev yapabilmesi gibi özellikler taşımaktadır. (Schinnerling ve ark., 2015). Özellikle RA, multipl skleroz (MS) ve tip 1 diyabet gibi hastalıklarda, hedefe yönelik immün düzenleme gerekliliği göz önüne alındığında, hücre bazlı gen tedavisi, doğrudan yaklaşımlara kıyasla daha sürdürülebilir ve güvenli bir seçenek olarak öne çıkmaktadır.

Ex vivo gen tedavisinde, CRISPR/Cas9 sistemi, tolDH'lerde kostimülatuvar moleküller (CD80, CD86), MHC-II, IL-12 gibi immün aktive edici genlerin susturulması veya IL-10, TGF-β, PD-L1 gibi tolerojenik genlerin aktivasyonu amacıyla kullanılabilmektedir. Bu teknoloji, lentiviral vektörlerle karşılaştırıldığında viral gen entegrasyon riski taşımadan kalıcı gen düzenleme yapma olanağı sunmaktadır (Chen et al., 2021). Ayrıca epigenetik CRISPR/Cas9 araçları kullanılarak gen promotör bölgelerine hedefli DNA metilasyonu ya da histon modifikasyonu yapılabilmekte, böylece gen ekspresyonu kalıcı ama geri dönüşümlü şekilde kontrol altına alınabilmektedir. Bu, özellikle tolDH'lerin fenotip stabilitesi için büyük bir avantajdır. Ayrıca, "gene circuit" olarak bilinen sentetik biyoloji temelli sistemler, yalnızca belirli inflamatuvar sinyaller veya doku mikroçevresi sinyalleri (örn. IL-6, TNF-α) varlığında aktive olacak şekilde programlanabilmekte; böylece otoimmün hastalıkların patolojik bölgelerinde yerel ve zamana duyarlı gen ekspresyonu sağlanabilmektedir (Kwon et al., 2023).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu doktora tez çalışması, Bursa Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 21.06.2021 tarihli 2021-09/06 no' lu karar sonucu alınmış izin sonrasında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Gereçler

3.1.1. Çalışmada kullanılan maddeler;

Fosfat tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS) (EUROIMMUN, Almanya);

Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, ABD);

Penisilin-Streptomisin (Gibco, Thermo Fisher Scientific, ABD);

Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) (VivaCell, Sartorius, Almanya);

Tripan Mavisi (Sigma Aldrich, ABD);

Dimetil Sülfoksit (DMSO) (CDH, Hindistan);

Lenti Konsatratör (Takarabiyo ABD);

Poly-L-lysine (Sigma Aldrich, ABD);

HEPES (Sartorius, İsrail);

GM-CSF (İnvitrogen ABD);

IL-4 (İnvitrogen ABD);

LPS (Escherichia coli'den lipopolisakkarit, Sigma Aldrich, ABD)

Kolajen Sigma C7806 10mg Medsantek Laboratuvar Malzemeleri San. Ve tic. Ltd. Şti.

Compleate freud adjuvant CFA, Mycobacterium tuberculosis, heat killed and dried; Sigma-Aldrich Co. LLC., Medsantek Laboratuvar Malzemeleri San. Ve tic. Ltd. Şti.

3.1.2. Hazırlanan tamponlar ve çözeltiler ve besiyerleri;

PBS çözeltisi: 1 paket (10,2g) liyofilize Dulbecco's Tuzlu Fosfatlı Tamponun (Dulbecco's Phosphat Buffered Saline, PBS) 1000 mL distile su ile çözdürülerek hazırlandı. Otoklav ile sterilizasyonu sağlandı ve +4℃'de saklandı.

%10 FBS RPMI besiyeri: L-glutamin içeren RPMI içerisine, son konsantrasyon %10 olacak şekilde ısı ile inaktive edilmiş Fetal Bovine Serum (FBS) ve %1 oranında penisilin/streptomisin eklendi ve +4℃'de muhafaza edildi.

RPMI besiyeri: L-glutamin içeren RPMI içerisine, son konsantrasyon %1 olacak şekilde penisilin/streptomisin eklendi ve +4^{o}C'de muhafaza edildi.

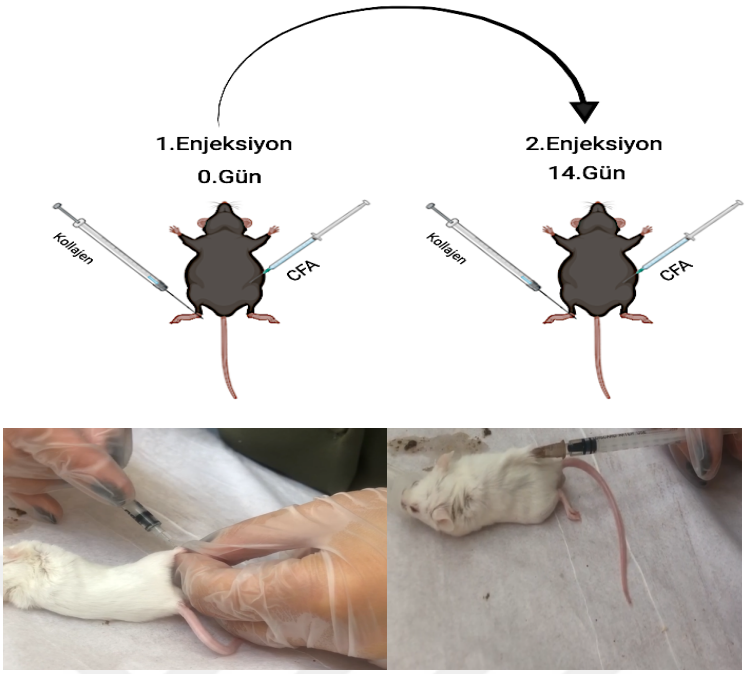
DMEM besiyeri: L-glutamin içeren DMEM içerisine, son konsantrasyon %1 olacak şekilde penisilin/streptomisin eklendi ve +4ºC'de muhafaza edildi.

3.2. Yöntem

3.2.1. Hayvan seçimi ve farelerde artrit oluşturma

6-8 haftalık yaklaşık 28-35 gram ağırlığında erkek farelerde CIA modeli daha önce BALB/c farelerde tanımlanan metoda uygun olarak BALB/c ırkında oluşturuldu (Guvenç ve ark., 2018). C57BL/6 ırkında da aynı protokolle bu tez çalışması kapsamında oluşturuldu. CIA modeli enjeksiyonu için sevofluarane (%2-4/%100 O_2) ile anestezi uygulandı. Anestezi altında "0" ıncı günde, 25 G'lık iğneye sahip 10 µl'lik hamilton enjektör kullanılarak 0,1 M asetik asit içerisinde sulandırılmış 2 mg/mL son konsantrasyona sahip tip II kolajen (Sigma-Aldrich Co. LLC., cat. no: C7806-10 MG) farelerin sağ arka ayak eklemi içerisine femur ve tibia kemikleri arasına 10 µl olacak şekilde intraartiküler olarak enjekte edildi. İntraartiküler kolajen enjeksiyonundan hemen sonra 100 µl Freund Complete Adjuvant (CFA, Mycobacterium tuberculosis heat killed and dried; Sigma-Aldrich Co. LLC., cat. no: F5881-6x10ML) farelerin sırt bölgesine subkutan olarak enjekte edildi.

İlk immünizasyon enjeksiyonundan iki hafta sonra, immün yanıtın güçlendirilmesi amacıyla aynı hayvanlara, aynı içerikteki enjeksiyonlar, aynı uygulama yolu kullanılarak ve yine anestezi altında tekrar edildi. 21. güne kadar artrit gelişimi takibi yapıldı. 21 günlük takip sonunda fareler sakrifiye edilerek histopatolojik incelemeleri gerçekleştirildi. Her bir gruptaki hayvanların sağ bacaklarına artrit indüklenirken aynı hayvanın hiçbir uygulama yapılmayan sol bacağı grup içi kontrol olarak değerlendirildi (Şekil 13).



Şekil 13. Farelerde CIA modeli oluşturma 0. gün: Hayvan başına 2 mg/mL Kolajen Intraartiküler. (10ul) + 0,1 mL CFA s.c. (100ul)-14. gün: Hayvan başına 2 mg/mL kolajen Intraartiküler + 0,1 mL CFA s.c. İlk fotoğraf inraartiküler olarak kollajen indüksiyonunu- ikinci fotoğraf CFA enjeksiyonunu göstermektedir.

Artritin klinik değerlendirilmesi için hayvanların hem CIA oluşturulmuş eklem kalınlıkları hem de sağlıklı kontrol olarak takip edilen eklem kalınlıkları kumpas yardımı ile ölçüldü (Şekil 14) ve eklem inflamasyonunun şiddeti skorlandı böylece artritin klinik olarak değerlendirilmesi de yapıldı. Eklemlerde oluşan inflamasyonun şiddeti Tablo 2 de açıklanan puanlama sistemi baz alınarak yapıldı (Ortmann & Shevach, 2001).



Şekil 14. Kumpas Ölçüm

Tablo 2. Artrit klinik skorlama kriterleri ve kullanılan nitel puanlama sistemi;

Semptom	Skor
Normal	0
Ayak bileğinde ve bazı pençelerde hafif kızarıklık şişlik	1
Ayak bileğinde ve bazı pençelerde orta kızarıklık şişlik	2
Ayak bileğinde ve tüm pençelerde şiddetli kızarıklık şişlik	3
Çoklu eklem tutulumu ile maksimum iltihaplı uzuv	4

3.2.2. Primer dendritik hücrelerin ve diğer hücre hatlarının kültürü

Primer DH'ler, daha önce yayınlanmış protokoller temel alınarak (Son ve ark., 2002) 8–10 haftalık farelerin femur ve tibia kemik iliğinden izole edildi. Hayvanlara etik kurallara uygun olarak ötenazi yapıldıktan sonra, biyogüvenlik kabini içerisinde her iki arka ekstremiteden femur ve tibia kemikleri dikkatli bir şekilde ayırıldı. Kas ve bağ dokuları tamamen uzaklaştırılan kemikler, öncelikle RPMI-1640 (Lonza, Belçika) besiyerine alınarak 5 dakika bekletildi, ardından %70 etanol ile 2 dakika dekontaminasyona tabi tutuldu.

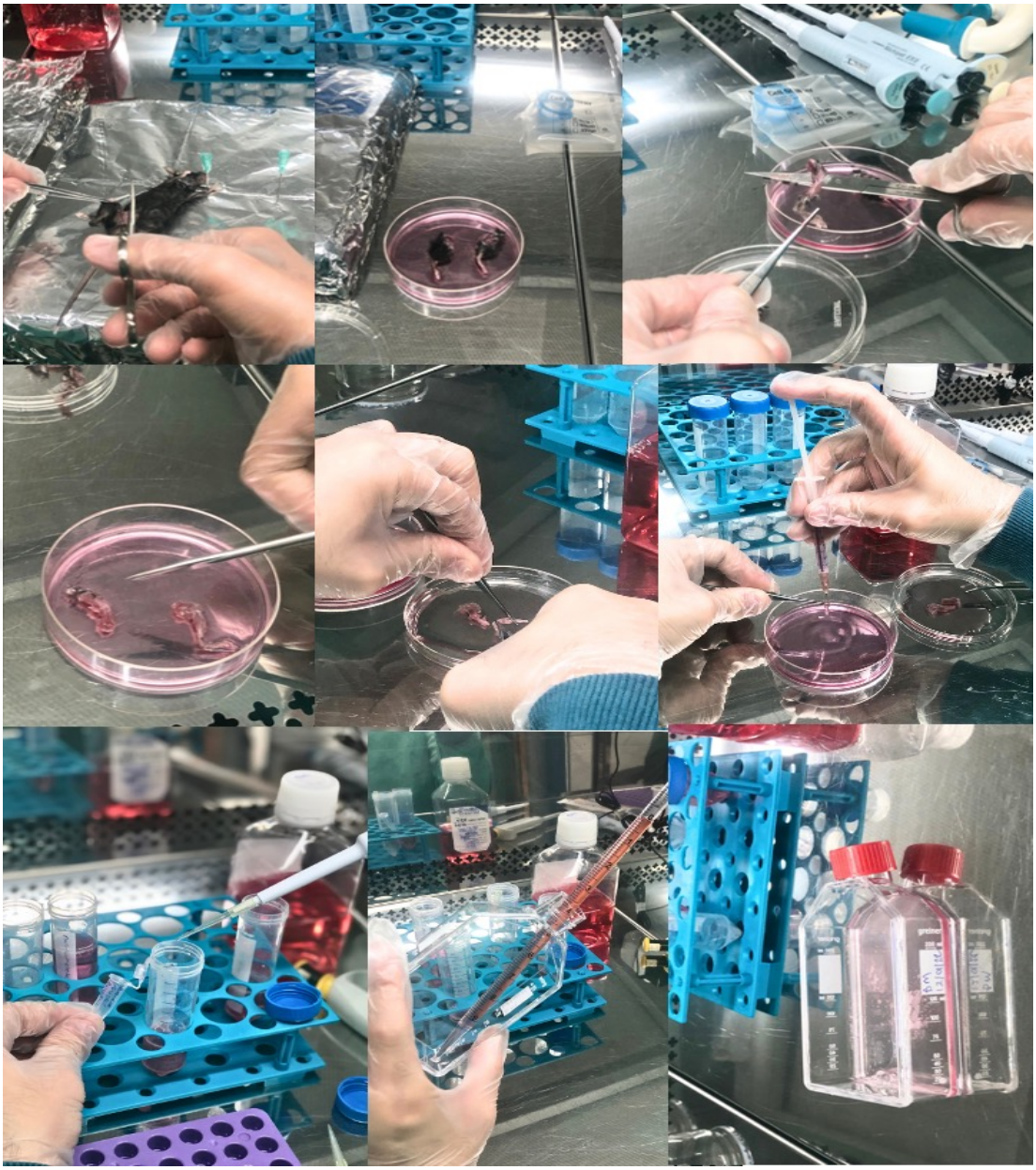
Etanol kalıntılarını uzaklaştırmak amacıyla kemikler sırasıyla PBS (Euroimmun, Almanya) ve RPMI-1640 içerisinde yıkandı. Steril şartlarda, 29 G'lik iğneye sahip insülin enjektörü kullanılarak kemik iliği, kemikler tamamen beyaz renk alana kadar petri kabı içerisine dikkatlice akıtıldı. Elde edilen kemik iliği hücre süspansiyonu, 50 mL'lik steril tüplere aktarıldı ve 2000 × RPM'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatan dikkatlice uzaklaştırıldı ve hücreler RPMI ile yeniden süspanse edildi. Bu yıkama işlemi toplamda üç kez tekrarlandı. Son yıkama sonrası süpernatan uzaklaştırıldı ve oluşan hücre pelleti 20 mL RPMI içinde resüspanse edilerek hücre sayımı gerçekleştirildi.

Hücre sayımını sonrasında, bir kez daha santrifüj edilen hücreler, son hücre yoğunluğu 1×10^7 hücre/mL olacak şekilde RPMI-1640 + %10 FBS **(**Gibco, Thermo Fisher Scientific, ABD**)** + 20 mM penicillin/streptomycin (10000 U/mL) (Lonza), içeren kültür medyumunda yeniden süspansiyon haline getirildi. Her bir 75 cm^2'lik hücre kültürü kabına total hacim 15 mL olacak şekilde ekildi. Granülosit-makrofaj koloni stimülasyon faktörü GM-CSF (20 ng/mL) + IL-4 (20 ng/mL) karışımı ilave edildi. 37 °C, %5 CO_2 ve %95 nem içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı (Şekil 15).

İnkübasyonun 2. ve 4. günlerinde, hücre kültürü kaplarına taze besi yeri ve rekombinantlar eklenerek inkübasyona devam edildi. Bu işlem, hücre farklılaşmasının

sürdürülmesi amacıyla gerçekleştirildi. Kültürün 6. gününde, flaskın tabanına yapışan hücreler ve süspanse olarak devam eden hücreler ayırıldı. Süspanse hücreler yeni hücre kültürü kaplarına alınarak DH fenotipinin oluşmasını desteklemek amacıyla uyarıma devam edildi. İnkübasyonların sonunda mikroskop kontrollerinde DH morfolojisine dönüşen hücreler CD11c [klon: (N418) monoklonal antikor (mAb)] yüzey belirteci ile işaretlendi ve doğrulama akan hücre ölçer ile de yapıldı.

Akan hücre ölçer analizinde, hücre popülasyonlarının değerlendirilmesi amacıyla FSC-H, FSC-A (doublet discrimination) parametreleri kullanılarak tekil hücreler seçildi. Ardından, bu tekil hücre popülasyonu içerisinden FSC-A (hücre boyutu) ve SSC-A (granülarite) baz alınarak canlı ve granüler hücreleri içeren bir alt kapı (gate) tanımlandı. Bu bölgede yer alan debris ve ölü hücreler dışlandıktan sonra, ikinci bir alt kapı tanımlanarak CD11c pozitif hücre yüzdesi belirlendi.



Şekil 15. Fare kemik iliği hücrelerinden primer DH eldesi.

HEK293FT (İnsan Embriyonik Böbrek Epitel) Hücrelerinin Stoktan Canlandırılması;

HEK293FT hücre hattı Dr. Öğr. Üyesi Tolga Sütlü'den (ACIBADEM, İstanbul) temin edildi. Biyogüvenlik kabini içerisinde ilk olarak hücrelerin canlandırılması için gereken DMEM **(**Lonza, Belçika) besi yeri hazırlandı. %1 L- glutamin içeren DMEM içerisine %10 Fetal Sığır Serumu (FBS) ve %1 Penicillin – Streptomisin eklendi ve tam besiyeri (complete medium) elde edildi. Daha sonra -80°C'de kriyojenik tüpler (cryo vials) içerisinde bulunan hücre stoğu çıkarıldı ve hücre süspansiyonunun uygun şekilde erimesi sağlandı. 15 mL falkon tüp içerisine 10 mL DMEM tam besiyeri

eklenerek, üzerine çözülen hücre süspansiyonu eklenip birkaç kez yavaşça pipetleme yapıldı. Hücrelerin bulunduğu falkon tüp 5 dakika 2000 x RPM'de santrifüj edildi. Biyogüvenlik kabinine alınan falkon tüp içerisindeki hücrelerin besiyeri aspire edilerek 5 mL taze besiyeri eklenip birkaç kez pipetle karıştırılarak 25 cm^2'lik steril flask içerisine alındı. Hücreler 37 °C, %5 CO_2 içeren inkübatörde bekletilerek çoğalmaları sağlandı. 25 cm^2'lik flask içerisindeki hücreler mikroskopla incelenerek %80-%85 doluluk oranına sahip olduğunda biyogüvenlik kabini içerisine alınıp, eski besiyeri uzaklaştırıldı 1 kez 7 mL PBS ile yıkandı ve PBS aspire edildi. Hücreleri yüzeyden kaldırmak amacıyla 500 µL %0,25 Tripsin-EDTA (1X) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, ABD) eklendi ve 5 dakika 37 °C, %5 CO^2 içeren inkübatörde bekletildi. Mikroskop altında hücrelerin yüzeyden ayrıldığı gözlendi ve biyogüvenlik kabini içerisine alınan hücrelerin üzerine 10 mL DMEM tam besiyeri eklendi, pipetle birkaç kez karıştırılıp 75 cm^2 'lik flask içerisine aktarılıp 37 °C, %5 CO^2 içeren inkübatörde çoğalmaları sağlandı. Pasajlanma işlemi birkaç sefer tekrar edilerek hücrelerin yeterli sayıya gelmesi sağlandı.

RAW 264.7 (Fare Makrofaj) Hücrelerinin Stoktan Canlandırılması;

RAW 264.7 hücresi American Type Culture Collection (ATCC) merkezinden daha önce laboratuvarımıza başka bir proje kapsamında temin edilmiştir. -80°C, kriyojenik tüplerde saklanan hücreler DMEM tam besiyerine eklendi ve birkaç kez yavaşça pipetleme yapılarak homojenize edildi. Hücre süspansiyonu 2000 × RPM'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan süpernatan aspire edilerek uzaklaştırıldı ve hücre pelletinin üzerine 5 mL DMEM tam besiyeri eklendi. Hücreler pipetleme ile tekrar süspanse edildi 25 cm^2 yüzey alanına sahip steril kültür kaplarına aktarıldı. Flask, 37 °C sıcaklık ve %5 CO_2 içeren inkübatöre yerleştirilerek hücrelerin çoğalması sağlandı Hücreler mikroskop altında takip edilerek %80–85 doluluk düzeyine ulaştıklarında pasajlama işlemine geçildi. Eski besiyeri aspire edildi, hücreler bir kez 7 mL PBS ile yıkandı ve PBS yeniden aspire edildi. Ardından yüzeye bağlı hücreleri ayırmak için hücrelerin üzerine DMEM tam besiyeri eklendi ve hücreler, steril hücre kazıyıcısı (cell scraper) yardımıyla orta kuvvette bir uygulama ile yüzeyden mekanik olarak uzaklaştırıldı. Mikroskop altında yapılan gözlemle hücrelerin yüzeyden ayrıldığı doğrulandıktan sonra elde edilen hücre süspansiyonu uygun oranda 75 cm^2'lik yeni kültür flasklarına aktarıldı ve 37°C, %5 CO_2

içeren inkübatörde çoğalmaları sağlandı. Pasajlanma işlemi birkaç sefer tekrar edilerek hücrelerin yeterli sayıya gelmesi sağlandı.

3.2.3. Primer dendritik hücrelerin boyanması ve morfolojik görüntülenmesi

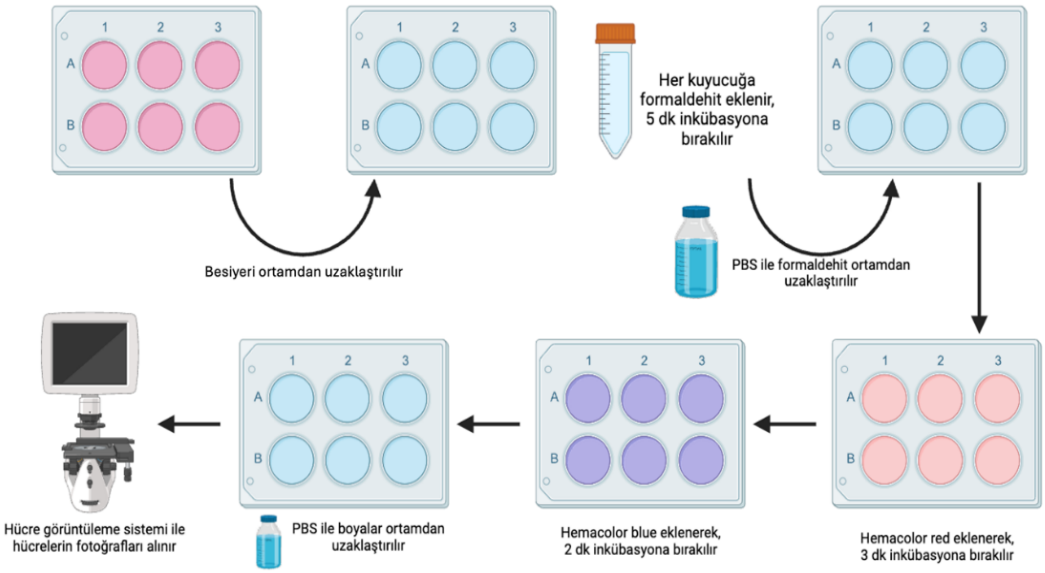
3.2.3.1. 4’,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) boyama

Altı kuyulu hücre kültür kabında kültüre edilen primer DH’lerin nükleer morfolojilerinin değerlendirilmesi amacıyla DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) ile boyama uygulandı. DAPI, çift sarmallı DNA'ya özellikle adenin-timin (A-T) açısından zengin bölgelerde yüksek afiniteyle bağlanan, UV ışık altında mavi floresans veren bir nükleik asit boyasıdır. Küçük moleküler yapısı sayesinde permeabilize edilmiş hücre zarından geçerek çekirdek içerisine ulaşabilmektedir. Bu nedenle genellikle sabitlenmiş (fikslenmiş) hücrelerde kullanılması tercih edilmektedir. Boyama işlemine başlamadan önce, her bir kuyuda bulunan besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkandı. Ardından hücrelerin sabitlenmesi amacıyla kuyulara %3,7’lik formaldehit çözeltisi eklendi ve oda sıcaklığında belirli bir süre inkübasyona bırakılarak hücre stabilizasyonu sağlandı sonrasında hücreler tekrar PBS ile yıkandı ve %0,1 Triton X-100 çözeltisi eklenerek membran permeabilizasyonu sağlandı. Devamında, permeabilize edilmiş hücrelere Phalloidin-Aktin boyası (aktin filamentlerini görüntülemek amacıyla) eklendi ve karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. Aktin boyasının ardından, her kuyucuğa DAPI solüsyonu eklendi ve karanlık koşullarda yaklaşık 5–10 dakika inkübasyona bırakıldı. Boyama işlemlerinin ardından, hücreler PBS ile son kez yıkandı ve görüntüleme işlemi için EVOS (Invitrogen M5000, ABD) floresan mikroskop sistemine alınarak incelendi (Floresan Mikroskop).

3.2.3.2 Diff Quick boyama

Altı kuyulu hücre kültür kabında kültüre edilen primer DH’lerin, morfolojik yapıların değerlendirilmesi amacıyla Diff Quick boyama protokolü uygulandı. Diff Quick, hücresel yapıların mikroskobik olarak incelenmesini sağlayan klasik bir boyama yöntemidir. Bu yöntemde, nükleik asitler gibi bazofilik yapıların mavi-mor; eozin ise sitoplazma gibi asidofilik yapıların pembe-kırmızı renkte görünmesini sağlamaktadır. Böylece hücre çekirdeği ve sitoplazmik sınırlar net bir şekilde ayırt edilebilir. Boyama işlemine geçmeden önce hücrelerin sabitlenmesi sağlandı. Bunun için, %37’lik formaldehit çözeltisi PBS ile seyreltilerek %1’lik tamponlu formaldehit hazırlandı. Her bir kuyuya 1000 µL formaldehit çözeltisi eklendi ve 5 dakika süreyle

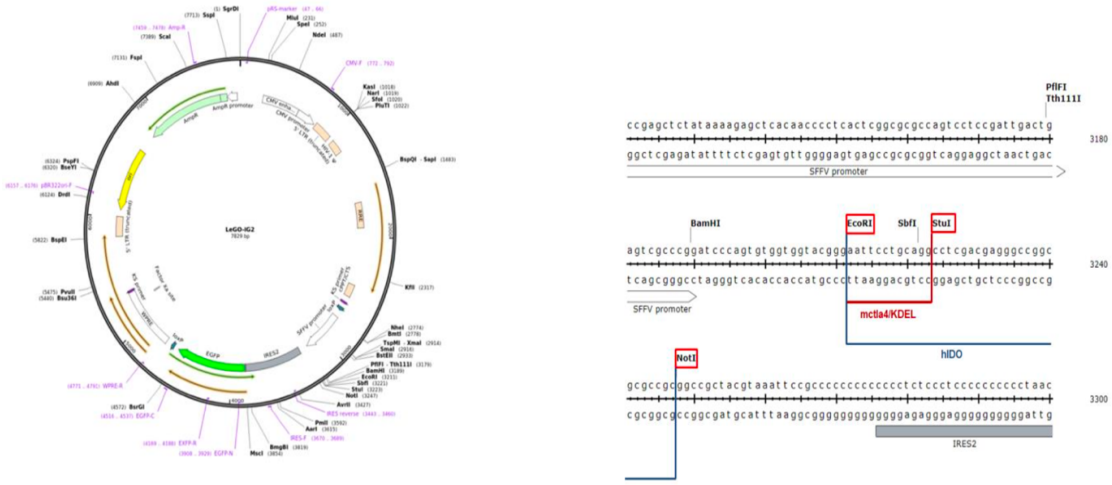
oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası formaldehit aspire edilerek uzaklaştırıldı ve her kuyucuk 1 mL PBS ile iki kez yıkandı. Fiksasyonun ardından her kuyucuğa 1 mL kırmızı boya solüsyonu eklendi ve 2 dakika inkübe edildi. Bu boya aspire edilip uzaklaştırıldıktan sonra, 1 mL mavi boya solüsyonu eklendi ve 1 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından boya uzaklaştırıldı ve her kuyucuk 1 mL PBS ile iki kez yıkandı. Boyama işlemi tamamlanan hücreler, morfolojik değerlendirme amacıyla EVOS mikroskobu kullanılarak görüntülendi (Faz Kontrast Mikroskop).



Şekil 16. Diff quick boyama işlemi ile EVOS hücre görüntüleme sistemi (biorender kullanılarak oluşturulmuştur).

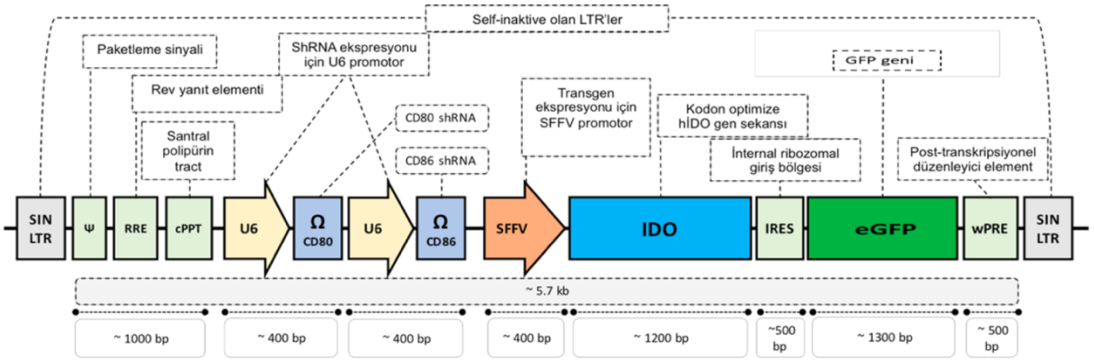
3.2.4. Vektörlerin Hazırlanması ve Analizi

Klonlama Stratejisi; daha önce yürütücülüğünü danışmanım Prof. Dr. Haluk Barbaros'un yaptığı 114S354 no.lu TÜBİTAK 1001 (COST Action BM1404) projesinde mCTLA4 ve hIDO genleri LeGo-iG2 lentiviral backbone plazmitine klonlandı (Şekil 17).



Şekil 17. pLeGo-iG2 detaylı vektörünün şeması ve pLeGo-iG2 vektöründe mCTLA4 ve hIDO klonlama bölgesinin ayrıntılı dizisi.

CD80 ve CD86 ekspresyonu bastırılmış aşırı IDO eksprese eden vektörün klonlanması 118S474 no.lu TÜBİTAK 1001 projemizde yapıldı. İlk aşamalarında CD80 ve CD86'ya karşı en az 2 farklı shRNA tasarlanarak, CD80 ve CD86'yı susturmak için en etkin shRNA analiz edildi (Şekil 18). Klonlama çalışmaları için 3.jenerasyon lentiviral vektör "LeGO-iG" (eGFP) (Addgene, ABD) kullanıldı. İki shRNA sekansı ayrı U6 promotorlar altında bu vektör içine klonlandı. Kodon optimize hİDO geni ise SFFV promotorü altına klonlandı, bunu IRES ve eGFP geni izledi. Final vektör tasarımı İDO aşırı ekspresyonunun yanı sıra CD80 ve CD86'ya karşı shRNA'ların aynı anda ekspresyonunu sağlamaktadır. Ayrıca, GFP belirteci hücrelerin *in vitro* ve *in vivo* takibinde kullanılma olanağını sağlamıştır.



Şekil 18. CD80 ve CD86 ekspresyonu susturulmuş İDO aşırı eksprese eden vektör klonlama tasarımı.

İzlenen klonlama stratejisinde ilk olarak CD80 ve CD86'ya karşı farklı shRNA'ların tasarlanıp susturmak için en etkin shRNA'yı saptamak üzere test edilmesi amaçlandı. NCBI uzantılı Pubmed makale arama sitesinden daha önce shRNA ile yapılmış olan makaleler taranarak shRNA nükleotit dizilimleri belirlendi. Çalışmamızda kullandığımız sekans dizisi için Zhiqiang Yang ve arkadaşlarının (2018) makalesinden shRNA sekans dizisi referans alındı. Makalede shRNA sekans dizileri:

CD80: (CCATTAAGTGTCTCATTAAAT);

CD86 1: (AATGGGACTGCATATCTGCCG);

CD86 2: (AAGAAGCCGAATCAGCCTAGC)

CD80 için bir sekans dizisi, CD86 için iki sekans dizisi olacak şekilde verildi. CD86 için belirlenen iki sekans arasında yapılan deneyler sonucunda CD86-2 sekans dizisinin daha susturucu özellik gösterdiği analiz edildi (Şekil 19).

Araştırmamızın sonraki aşamasında makaleden alınan referans numaraları (CD80: NM_009855.2 ve CD86: NM_019388.3) ile NCBI üzerindeki taramalarımız sonucunda, belirlediğimiz sekans dizilerinin Mus musculus ile çalışabilirliği projemiz için uyumlu görülerek, planlanan CD80 ve CD86 ekspresyonu susturulmuş İDO aşırı eksprese eden vektör klonlama tasarımımız da kullanılmak üzere belirlendi. Bu amaçla klonlanacak gen sekansları aşağıda belirtilmiştir:

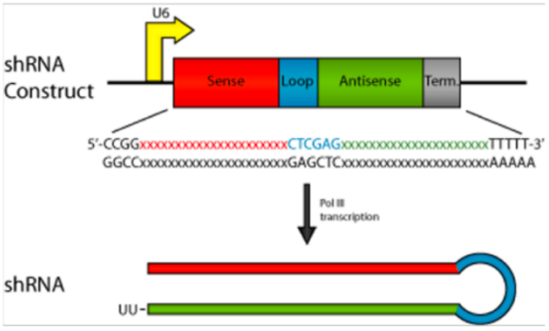
CD80 için shRNA Oligo oligoları

CD80 shRNA-sense (21bp)
CCATTAAGTGTCTCATTAAAT

XhoI Cut Site / Cleavage Close to the End of DNA Fragments

CGCTCGAGCG





5′-CCATTAAGTGTCTCATTAAATCTCGAGATTTAATGAGACACTTAATGGTTTTTC-3′
3′-GGTAATTCACAGAGTAATTTAGAGCTCTAAATTACTCTGTGAATTACCAAAAGAGCT-5′

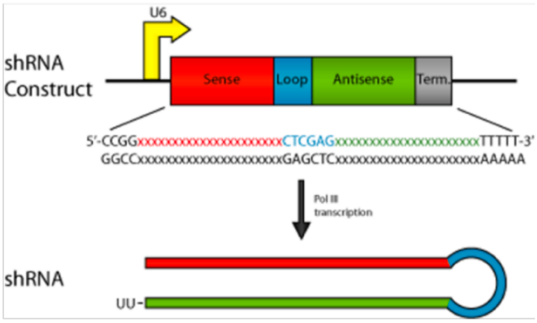
CD86-1 için shRNA Oligo oligoları

CD86 shRNA-sense
CD861: AATGGGACTGCATATCTGCCG

XhoI Cut Site / Cleavage Close to the End of DNA Fragments

CGCTCGAGCG





5′- AATGGGACTGCATATCTGCCGCTCGAGCGGCAGATATGCAGTCCCATTTTTTTC-3′
3′-TTACCCTGACGTATAGACGGCGAGCTCGCCGTCTATACGTCAGGGTAAAAAAAGAGCT-5′

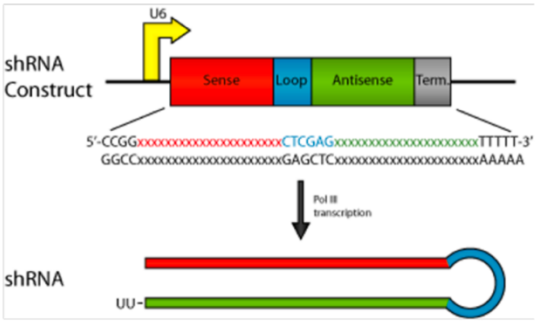
CD86-2 için shRNA Oligo oligoları

CD86 shRNA-sense
CD862: AAGAAGCCGAATCAGCCTAGC

XhoI Cut Site / Cleavage Close to the End of DNA Fragments

CGCTCGAGCG





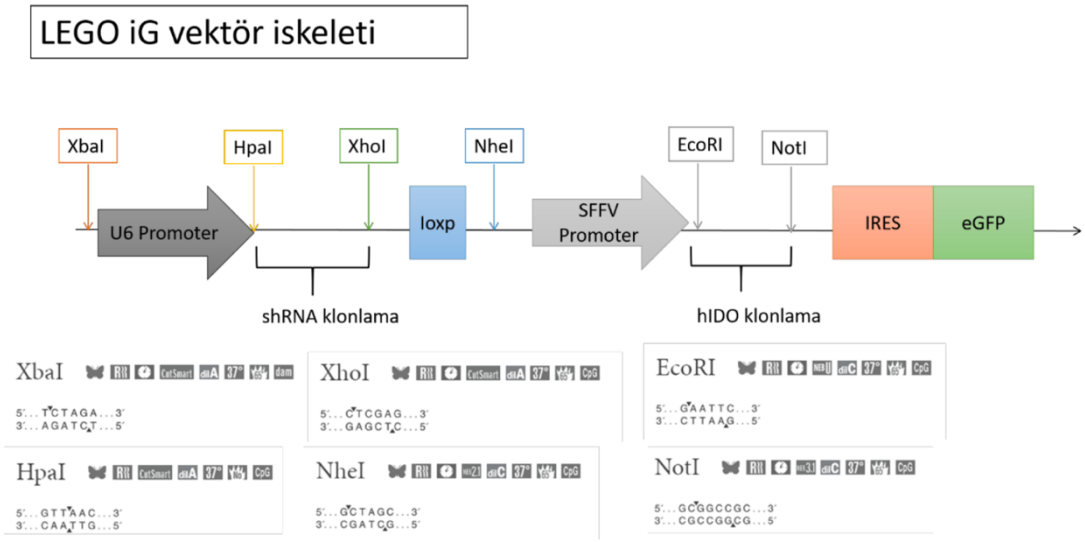
5′-AAGAAGCCGAATCAGCCTAGCCTCGAGGCTAGGCTGATTCGGCTTCTTTTTTC-3′
3′-TTCTTCGGCTTAGTCGGATCGGAGCTCCGATCCGACTAAGCCGAAGAAAAAAAGAGCT-5

Şekil 19. shCD80, shCD86-1. shCD86-2 için gerekli oligolar.

Yukarıda belirtilen genleri klonlamaya en uygun lentiviral klonlama vektörü olarak LeGO-iG (Addgene) seçildi. Plazmit Acıbadem Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Tolga Sütlü'den temin edildi (Şekil 20).

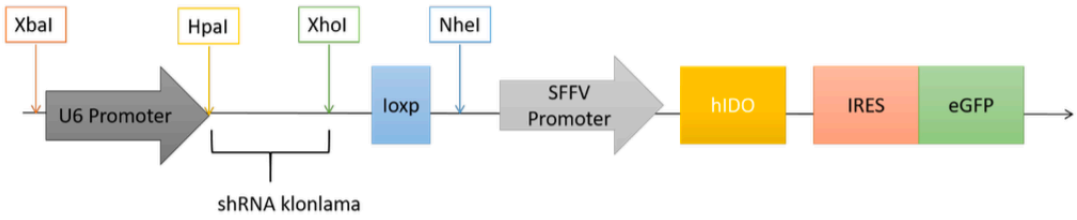


Şekil 20. LeGO-iG vektörünün haritası



Şekil 21. LeGO-iG vektörünün iskeleti ve kullanılacak kesim bölgeleri.

Klonlama adımlarına bakıldığında hIDO klonlaması için pCMV hIDO vektöründen LEGO-iG plazmitine NotI ve EcoRI enzimleri kullanılarak klonlandı (Şekil 21).



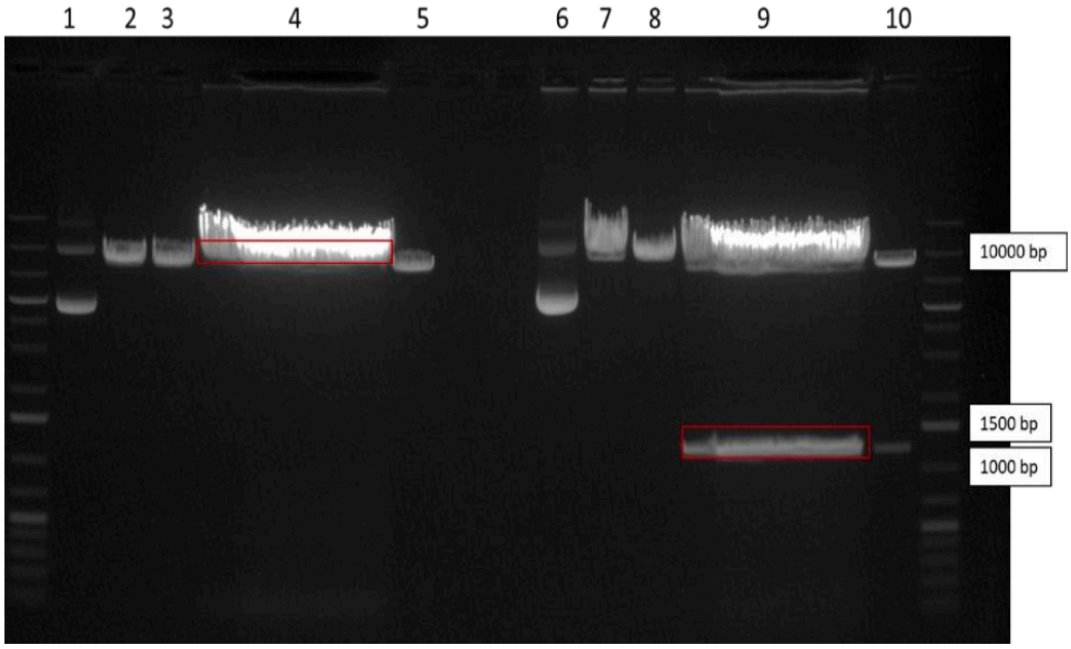
Şekil 22. LeGO-iG.hIDO vektörü.

LeGO.iG2.hIDO vektöründen hIDO bölgesi çıkartıldı ve U6 promotör içeren LeGO.iG plazmitin SFFV promoter bulunan bölgesine klonlandı. Klonlanma aşağıda belirtilen koşullarda gerçekleştirildi (Şekil 22).

Tablo 3. Klonlanma belirtilen koşullarda gerçekleştirildi.

LeGO-iG ve LeGO.iG2.hIDO	5 µg
NEB EcoRI-HF (10,000 U/ml)	1 µl
NEB NotI-HF (10,000 U/ml)	1 µl
NEB Cut Smart Buffer	5 µl
ddH2O	50 µl olacak şekilde tamamlanmıştır.
Toplam Hacim	50 µl

Kesilen plasmitler %1 Agaroz Jelde, 120 V'da TBE buffer ile 1 saat yürütüldü. Elde edilen jel görüntüsü Şekil 23'te gösterilmiştir. Kutu içine alınmış kısımlar kesilerek MN Nucleo Spin Gel ve PZR Clean-up kiti ile jelden ekstre edildi.



Şekil 23. Kesilmiş LeGO-iG ve LeGO.iG2.hIDO jel görüntüsü. 4. Kesilmiş LeGO-iG 9. EcoRI ve NotI ile kesilmiş hIDO (1233 bç).

Elde edilen LeGO-iG vektörüne CIP treatment uygulanarak 37^{o}C 'de, 30 dakika inkübe edildi.

Tablo 4. Klonlanma belirtilen koşullarda gerçekleştirildi.

All LeGO-iG vektörü jel ekstraksiyon ürünü (200 ng plasmid hariç)	30 µl
NEB CIP (10,000 U/ml)	DNA molar uçlarının konsantrasyonuna göre
NEB 10X Cut Smart Buffer	5 µl
ddH2O	50 µl olacak şekilde tamamlanmıştır.
Toplam Hacim	50 µl

Elde edilen ürün MN Nucleo Spin Gel and PZR Clean-up kiti ile enzim ve bufferdan uzaklaştırıldı ve ardından ligasyon reaksiyonunda kullanıldı. Reaksiyon 15 dakika oda sıcaklığında, 1 saat 16^{o}C'de inkübasyona bırakıldı. Ligasyon reaksiyonu aşağıda belirtildiği şekildedir:

Tablo 5. Klonlanma belirtilen koşullarda gerçekleştirildi.

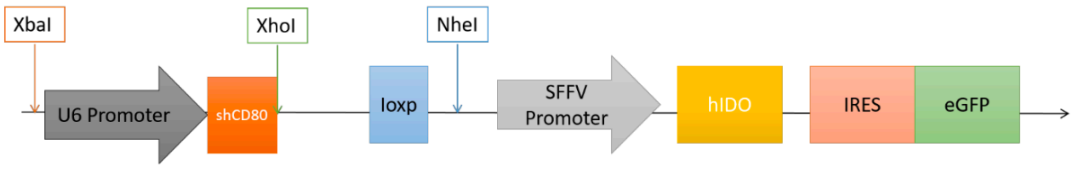
hIDO gel extract	22,76 ng
PZR-Cleanup ürünü CIP- LeGO-iG	50 ng
NEB T4 DNA ligaz	1 µl
NEB 10X T4 DNA ligase buffer	2 µl
ddH2O	20 µl'ye tamamlanmıştır.
Toplam Hacim	20 µl

İnkübasyonun ardından ligasyon reaksiyonun 10 µl'lik hacmi 200 µl TOP10 competent *E.coli* hücre ile transforme edilmek için kullanıldı. Sonraki gün elde edilen kolonilerden 3 koloni seçilerek kültür başlatıldı. Takip eden günde Nucleo Spin Macherey-Nagel kitinde belirtilen protokol ile DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen ürünler aşağıda belirtilen enzimler ile kesilerek ve ardından dizi analizi yapılarak kontrol edildi. Enzimler ile kesilmiş ve kesilmemiş örnekler, %1 Agaroz Jel'de, 100 V'da, 1,5 saat 0,5X TBE buffer ile yürütüdü. Beklenen DNA parçaları boyutları aşağıda belirtilmiştir:

Tablo 6. Klonlanmada kullanılan kesim enzimleri.

Plazmit-Enzim	Beklenen bant büyüklüğü (bp)
LeGO-iG-BamHI	8163
LeGO-iG-Pvull	8156
LeGO iG.hIDO-BamHI	8911,47
LeGO.iG.hIDO-Pvull	6425,2925

shRNA sekanslarının klonlanması sırasında shRNA CD80 LEGO-iG.hIDO plazmitine HpaI ve XhoI enzimleri kullanılarak klonlanmıştır (Şekil 24).



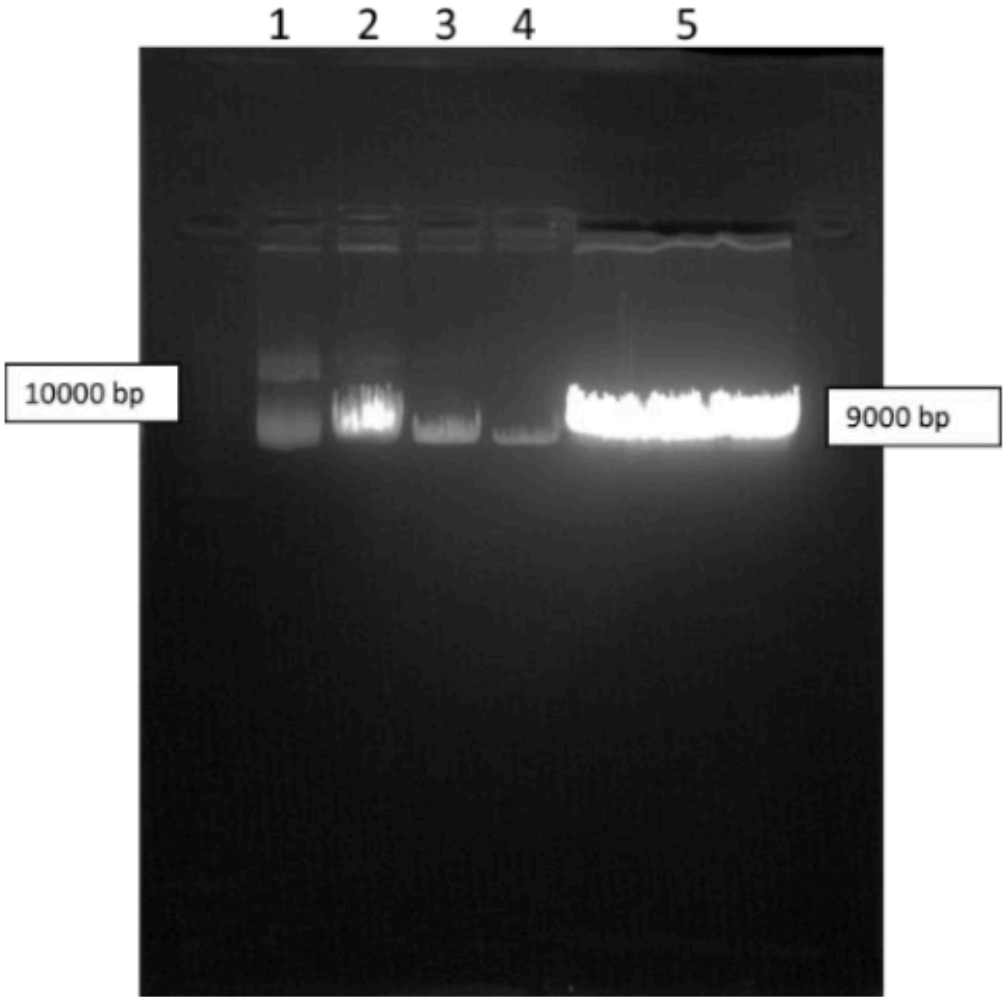
Şekil 24. LeGO-iG.hIDO.shCD80 vektörü.

Elde edilen LeGO-iG.hIDO vektörü shRNA klonlaması için aşağıdaki belirtilen koşullarda kesildi. Aynı zamanda tasarlanan shRNA oligolara annealing (yeniden birleştirme) işlemi uygulandı. Ayrıca oligoların uçlarına fosfat eklenmesi için PNK enzimi ile muamele edildi. Koşullar aşağıda belirtilmiştir.

Tablo 7. Klonlanma belirtilen koşullarda gerçekleştirildi.

LeGO-iG.hIDO	10 µg
NEB XhoI (10,000 U/ml)	2 µl
NEB HpaI (5,000 U/ml)	4 µl
NEB Cut Smart Buffer	5 µl
ddH2O	50 µl olacak şekilde tamamlandı.

Kesilen plasmidler %0,7 Agaroz Jelde, 100 V'da TBE buffer ile 1,5 saat yürütüldü. Elde edilen jel görüntüsü Şekil 25'te gösterilmiştir. Beklenen bölge uzunluğu 9335 bç'dir.



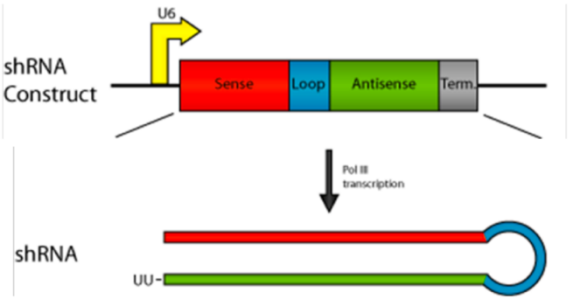
Şekil 25. Kesilmiş LeGO-iG.hIDO jel görüntüsü. 1.Kesilmemiş LeGO-iG.hIDO, 2. HpaI ile kesilmiş LeGO.iG.hIDO, 3. XhoI ile Kesilmiş LeGO.iG.hIDO 4-5 iki enzim ile kesilmiş LeGO.iG.hIDO.

Çift enzim ile kesilmiş plazmit (Numara 5) jelden kesilip çıkartılarak MN Nucleo Spin Gel and PZR Clean-up kiti ile pürifiye edildi. shRNA yapısı oluşturmak için TOP

ve BOTTOM oligolar ayrı tasarlanarak yeniden birleştirme işlemi uygulandı. Örnek olarak Şekil 26'da oluşturulan yapı gösterilmiştir:

CD80 için shRNA Oligoları:

CD80 shRNA-sense (21bp)
CCATTAAGTGTCTCATTAAAT



TOP OLİGO: 5'-TCCATTAAGTGTCTCATTAAATTTCAAGAGAATTTAATGAGACACTTAATGGTTTTTTC-3'
BOTTOM OLİGO: 3'-AGGTAATTCACAGAGTAATTTAAAGTTCTCTTAAATTACTCTGTGAATTACCAAAAAAGAGCT-5'

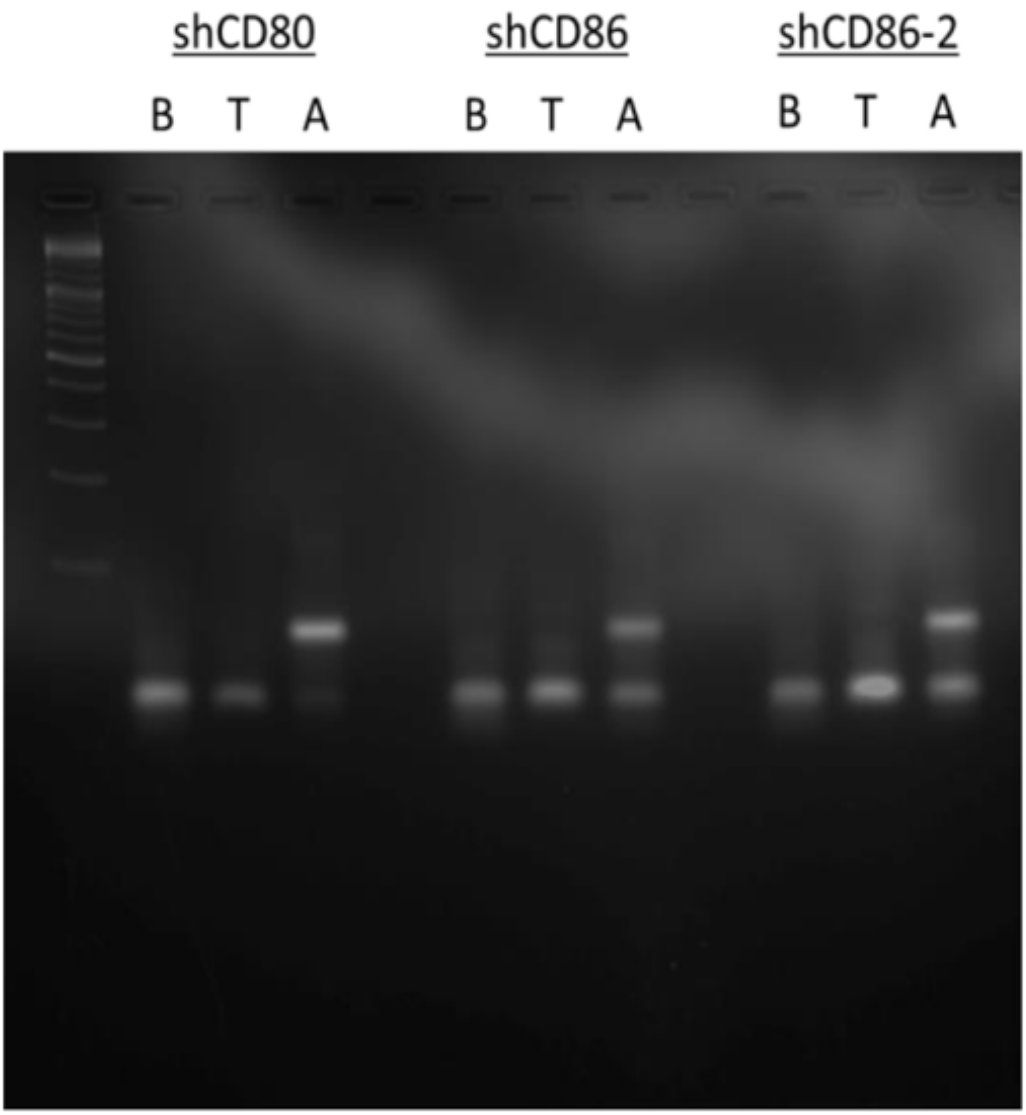
Şekil 26. Top ve Bottom Oligoların gösterilmesi.

Tasarlanan Bottom ve Top oligolar aşağıdaki koşullarda belirtilen reaksiyon ile 37°C'de 30 dakika, 95°C'de 10 dakika inkübe edildi, daha sonrasında 0,1°C/saniye olacak şekilde kademeli olarak soğutularak reaksiyon tamamlandı.

Tablo 8. Klonlanma belirtilen koşullarda gerçekleştirildi.

Top Primer Oligo 100 µM	1 µl
Bottom Primer Oligo	1 µl
NEB PNK (10,000 U/ml)	0,5 µl
NEB T4 Ligase Buffer	1 µl
ddH2O	6,5 µl
Toplam Hacim	10 µl

Oluşan oligo parçaları, görüntülemek için %2'lik Agaroz Gel'de 100 V'da, 30 dakika yürütüldü (Şekil 27).



Şekil 27. Oluşturulan Oligoların Agaroz Jel görüntüsü. B: Bottom Oligo, T: Top Oligo, A: Yeniden birleştirilmiş oligolar.

Oluşturulan oligolar ve kesilen LeGO-iG.hIDO vektörü ile aşağıda belirtilen ligasyon reaksiyonu kuruldu. Reaksiyon 15 dakika oda sıcaklığında, 1 saat 16^{o}C'de inkübasyona bırakıldı.

Tablo 9. Klonlanma belirtilen koşullarda gerçekleştirildi.

LeGO.iG.hIDO gel extract	50 ng
Yeniden birleştirilmiş Oligo (1:200, 1:400)	1 µl
NEB T4 DNA ligaz	1 µl
NEB 10X T4 DNA ligaz tampon	2 µl
ddH2O	20 µl tamamlanmıştır
Toplam Hacim	20 µl

Ligasyon reaksiyonun 10 µl'lik hacmi 200 µl TOP10 competent *E.coli* hücre ile transforme edilmek için kullanıldı. Ertesi gün elde edilen klonilerden 3 koloni seçilerek kültür başlatıldı. Takip eden günde Nucleo Spin Macherey-Nagel kitinde belirtilen protokol ile DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen ürünler tasarlanan iki farklı primer ile polimer zincir reaksiyonu ile kontrol edilmiştir. Kontrol edilmesi için primerler tasarlandı (Şekil 28).



Şekil 28. Tasarlanan polimeraz zincir reaksiyonu. Kullanılan primerlerin yerleri belirtilmiştir.

PZR ürünlerinin beklenen boyutları aşağıdaki gibidir (Tablo 10).

Tablo 10. PZR ürünlerinin beklenen boyutları

	Plazmit	Oluşacak PZR ürün büyüklüğü (bç)
Klonlama kontrol	LeGO-iG-EcoRI+NotI	500
PZR Koşulları:	LeGO.iG.hIDO.shCD86/80	559

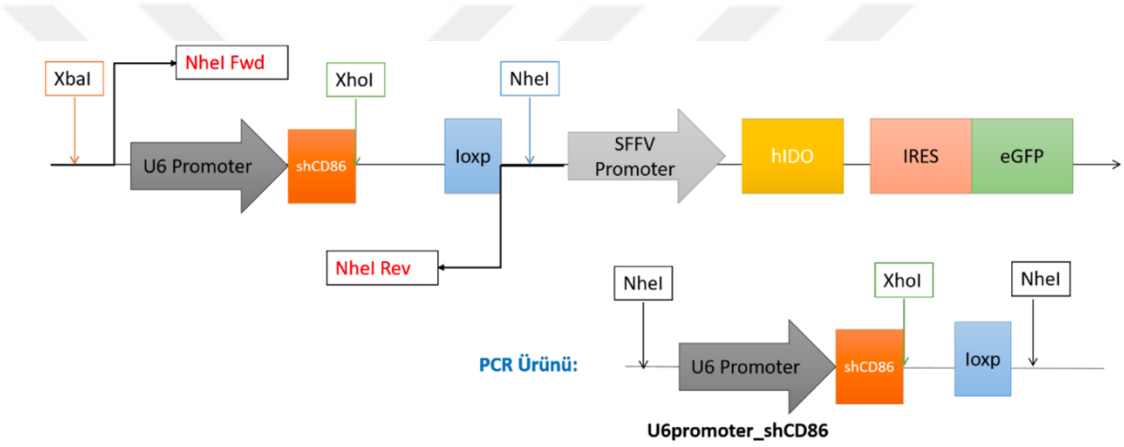
Tablo 11. Klonlanma belirtilen koşullarda gerçekleştirildi.

Klonlanan vektör	10 ng
10 mM NTPs	0,5 µl
Thermo 10X Taq Reaction Buffer	2,5 µl
25 Mm MgCl2	2 µl
10 µM XbaI_Foward Primer	2,5 µl
10 µM SFFV_Reverse Primer	2,5 µl
TAQ DNA Polimeraz	0,125 µl
ddH2O	25 µl'ye tamamlanmıştır.
Toplam hacim	25 µl

Tablo 12. Klonlanma belirtilen koşullarda gerçekleştirildi.

Basamak	Sıcaklık	Süre
İlk Denatürasyon	95°C	3 dakika
30 Döngü	95°C 48°C 72°C	30 saniye 30 saniye 15 saniye
Son Uzatma	72°C	5 dakika
Sonlandırma	4°C	

Oluşan ürünler %1 Agaroz Jel'de, 100 V'da, 0,5x TBE ile 1 saat yürütüldü. 3. İkinci shRNA sekansının klonlanması: shRNA CD86-1 veya -2 LeGO-iG.hIDO plazmitine HpaI ve XhoI enzimleri ile klonlandıktan sonra NHeI kesim bölgeleri olan primerler kullanılarak pürifiye edildi. (Şekil 29).



Şekil 29. LeGO-iG.hIDO.shCD86 vektörü.

3.2.5. Plazmitlerin stoklanması ve çoğaltılması

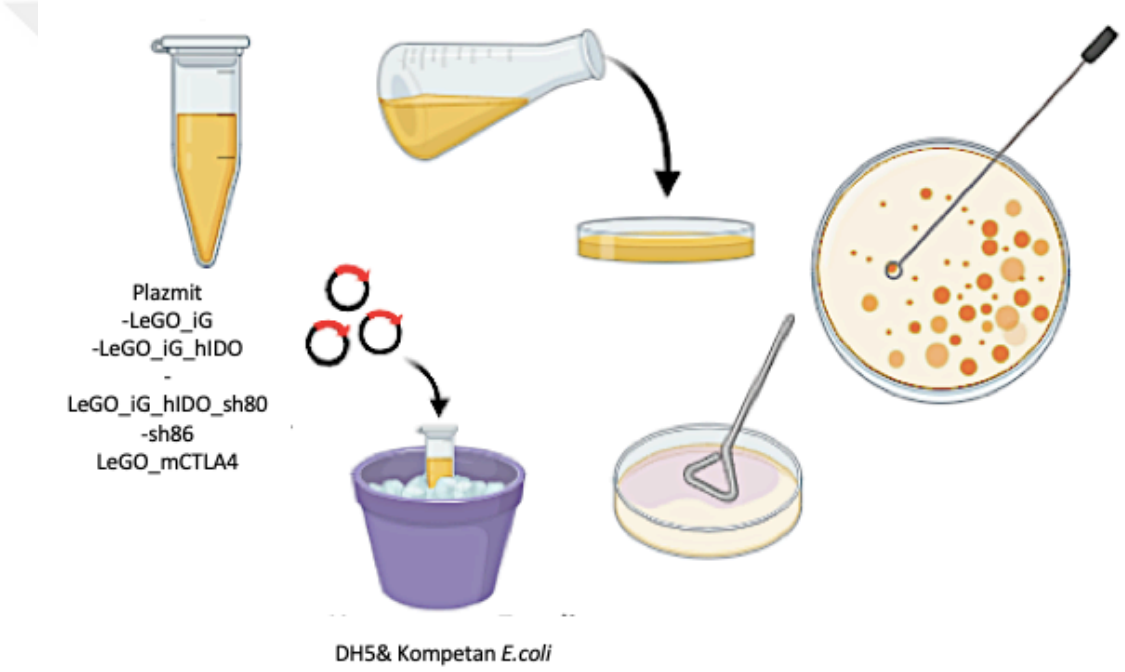
3.2.5.1. Transformasyon

Plazmit stoklarının hazırlanması ve lentiviral transfeksiyonlarda kullanılabilecek yeterli konsantrasyonda plazmit elde edilmesi amacıyla, klonlanmış DNA sekanslarını içeren plazmitler *E. coli* DH5-α kompetan hücrelerine (New England Biolabs, USA) transformasyon yöntemi ile aktarıldı. Transformasyon işlemi, üretici firmanın önerdiği protokole uygun şekilde gerçekleştirildi.

Steril koşullarda, 2 mL'lik tüplere 5 µL plazmit ve 50 µL *E. coli* DH5-α kompetan hücresi eklendi. Karışım, 30 dakika boyunca buz üzerinde inkübasyona bırakıldı ve ardından hücrelerin membran geçirgenliğini artırmak amacıyla 42 °C'de 30 saniye ısı şoku uygulandı**.** Isı şokunun ardından tüpler tekrar 5 dakika buzda bekletildi. Hücre süspansiyonlarının üzerine 300 µL LB sıvı besiyeri (antibiyotiksiz) eklendi ve

37 °C'de, 180 RPM'de 60 dakika çalkalanarak hücrelerin kendini toparlaması sağlandı.

İnkübasyon sonrasında hücreler, ampisilin içeren LB agar plakalarına yayma yöntemiyle ekildi. Petri kapları, 37 °C'de gece boyunca inkübasyona bırakılarak antibiyotik direnci kazanan ve rekombinant plazmiti taşıyan kolonilerin oluşması sağlandı. İnkübasyon sonrası tek koloni seçilerek sıvı LB içerisinde gece boyunca 37 °C'de 221 RPM'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası 500 µL LB+Plazmit karışımı ve 500 µL gliserol kriyojenik tüplere koyularak -80 °C'ye kaldırıldı ve böylece stoklar hazırlanmış oldu.



Şekil 30. Plazmit transformasyonu

3.2.5.2. Küçük ölçekli plazmit izolasyonu (Mini-prep)

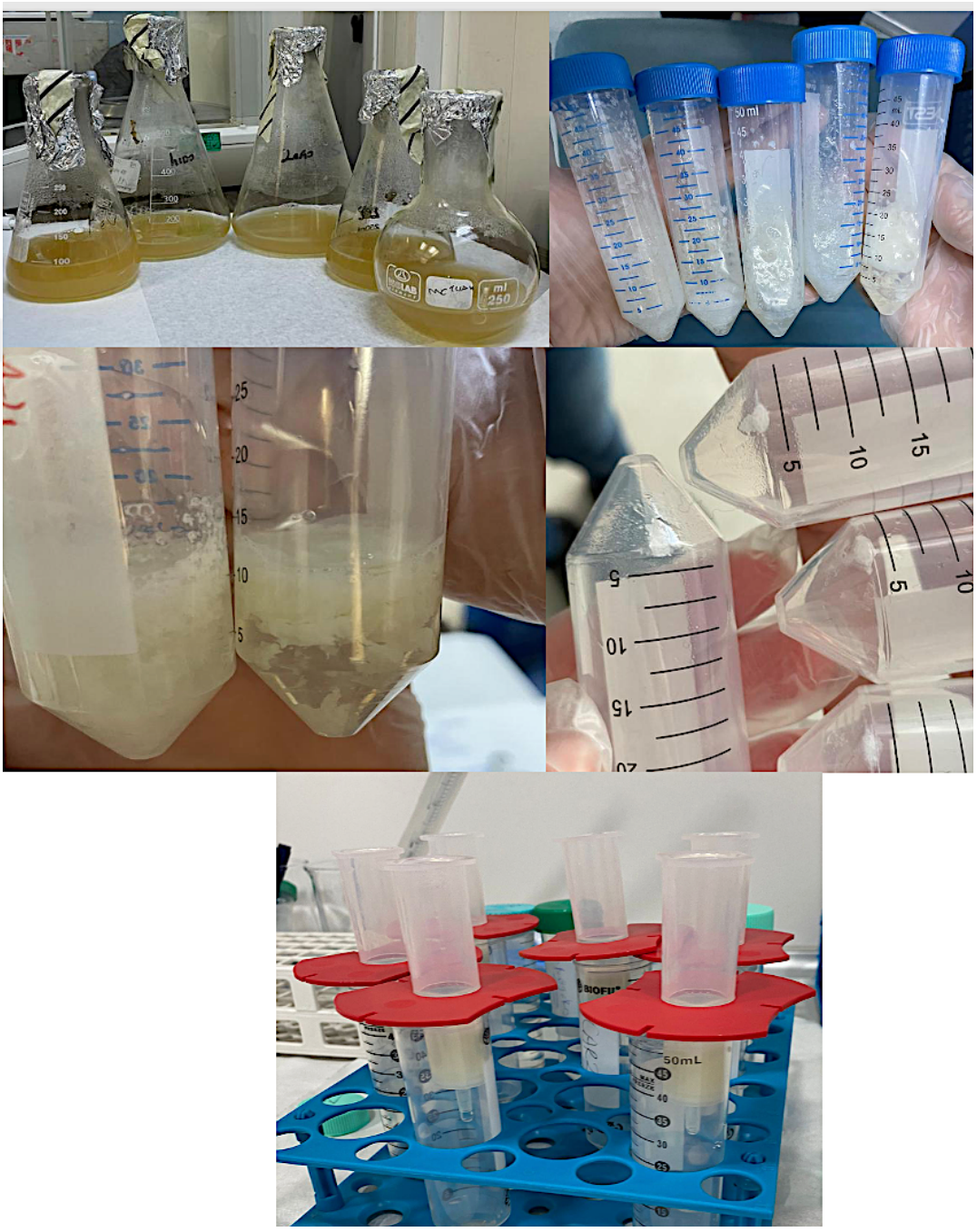
Plazmitler ticari bir mini-prep izolasyon kiti (QIAprep Spin, Qiagen, Almanya) kullanılarak üretici firmanın önerdiği şekilde izole edildi. 2 mL bakteri kültürü alınıp 5 dakika 15.000 x RPM'de santrifüj edilerek toplandı. Santrifüj sonrası üstte kalan süspanse kısım döküldü. Hücre peleti üzerine tampon P1 (250 µL) eklendi ve ardından vorteks ile karıştırılarak süspanse hale gelmesi sağlandı. Daha sonra tampon P2 (250 µL) eklendi ve tüp dört kere yavaşça ters düz edilerek karıştırıldı. Yaklaşık 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılan örneklere N3 solüsyonu (350 µL) eklenerek,

dört kez ters düz edilerek karıştırıldı. Örnek tüpleri 10 dakika süreyle 15000 x RPM'de santrifüj edildi. Lizat temizlenerek üstteki faz dönme (spin) kolonuna transfer edildi ve oda sıcaklığında 1 dakika 15000 x RPM'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra, toplama tüpündeki alt faz atılarak toplama tüpü geri çıkartıldı. 750 µL kolon yıkama solüsyon tamponu PE dönme kolonuna eklenerek oda sıcaklığında 1 dakika 15.000 x RPM'de santrifüj edildi. Süspanse kısım atılarak toplama tüpüne tekrar yerleştirildi ve 1 dakika daha santrifüj edilerek kalan yıkama tamponu tamamen uzaklaştırıldı. Dönme kolonu içeriği 1,5 mL yeni steril bir tüpe aktarıldı, plazmit DNA'sı 50 µL tampon EB (Elüsyon tamponu) eklendikten sonra 1 dakika 15.000 x RPM'de santrifüj yapılarak ayrıştırıldı. İzole edilen plazmit DNA'sı nanodrop spektrofotometre ile ölçülerek daha sonra kullanılmak üzere -20ºC derin dondurucuda saklandı.

3.2.5.3. Orta ölçekli plazmit izolasyonu (Midi-Prep)

Plazmid DNA izolasyonu, midi-prep izolasyon kiti (Thermo Fisher Scientific, Cat. No: K210004) kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokole uygun biçimde gerçekleştirildi. İzolasyon işlemi için antibiyotik içeren 100 mL'lik LB besiyerinde gece boyunca 37°C'de inkübasyona bırakılan *E.coli* kültürleri kullanıldı. Ertesi gün, hücreler 3.000–5.000 × g hızda 10 dakika santrifüjlenerek çöktürüldü ve oluşan pelet 4°C'de kısa süreli saklamaya alındı (maksimum 24 saat). Hücre peleti, RNaz A içeren 4 mL Resuspension Buffer (R3) ile homojen şekilde süspanse edildi. Ardından 4 mL Lysis Buffer (L7) eklenerek tüp birkaç kez yavaşça ters çevrilmek suretiyle karıştırıldı. Bu aşamada vortex kullanılmadı. Hücre lizisi oda sıcaklığında maksimum 5 dakika süreyle gerçekleştirildi. Lizatın üzerine 4 mL Precipitation Buffer (N3) eklendi ve tüp dikkatli fakat kuvvetli biçimde karıştırıldı. Oluşan karışım 12.000 × g hızda, 10 dakika santrifüjlenerek hücresel artıklar uzaklaştırıldı. Berrak süpernatant, PureLink™ Spin Cartridge üzerine dikkatlice aktarıldı. Kolonun yıkanması için iki kez 10 mL Wash Buffer 1 (W1) uygulandı. Daha sonra spin, steril yeni bir 15 mL tüpe yerleştirildi ve üzerine 5 mL Elution Buffer (E4) eklenerek DNA elüsyonu gerçekleştirildi. Elüsyon fraksiyonu 15 mL'lik Falcon tüpe alındı ve üzerine 3,5 mL izopropanol eklenerek DNA çöktürülmesi sağlandı. Bu karışım 12.000 × g hızda, 4°C'de, 40 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant uzaklaştırıldı. Peletin yıkanması amacıyla üzerine 3 mL %70'lik etanol eklendi ve 13.000 × g hızda, 4°C'de, 8 dakika santrifüj edildi. Süpernatant yeniden uzaklaştırıldı ve tüpler 15 dakika boyunca oda sıcaklığında

açık bırakılarak pelletin tamamen kuruması sağlandı. Kuruyan DNA peleti 120 µL TE tamponunda çözüldü. İzole edilen plazmit DNA'nın konsantrasyonu Nanodrop spektrofotometre ile ölçülerek daha sonra kullanılmak üzere -20ºC derin dondurucuda saklandı.

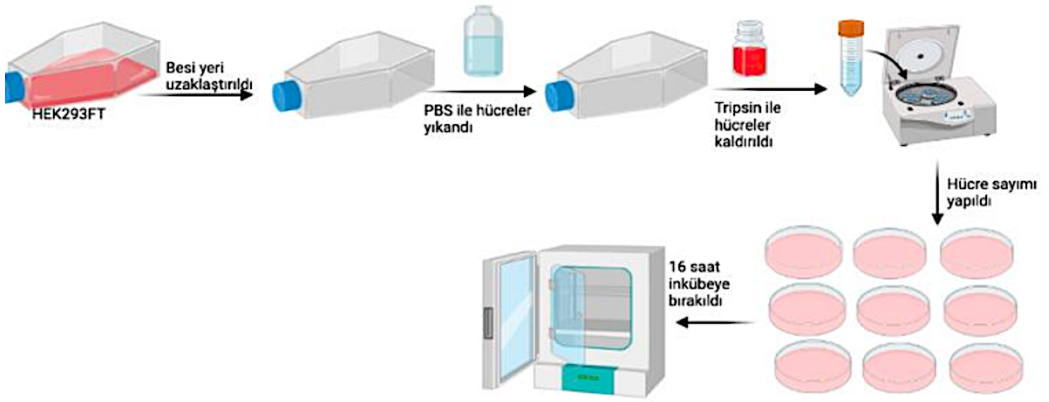


Şekil 31. Besi yeri içerisinde büyüyen *E.coli* bakterileri ve kit aşamlarındaki görüntüler.

3.2.6. Lentivirüs üretimi, titrasyonu ve konstre edilmesi

3.2.6.1. Virüs üretim aşamaları

HEK293FT hücreleri, 175 cm²'lik kültür flasklarında çoğaltıldı ve lentivirüs üretimi için yeterli miktarda hazırlandı. Flask içerisindeki besiyeri aspire edildi ve hücreler 5–6 mL steril 1X PBS ile yıkandı. Ardından hücrelerin üzerine 2 mL 1X tripsin-EDTA çözeltisi eklendi ve 37°C'de 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Tripsinizasyon sonrasında, hücre süspansiyonunun hacmi 15 mL'ye tamamlandı ve hücreler steril 15 mL'lik falcon tüplerine aktarılıp homojenize edildi. Hücre sayımı, hemositometre yardımıyla manuel olarak yapıldı. Hesaplanan hücre yoğunluğuna göre, her bir 10 cm²'lik petri kültür kabına 5×10^6 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve petri kültür kaplarının hacimi, DMEM tam besiyeri ile 10 mL'ye tamamlandı. Ekilen hücreler, %5 CO_2 içeren inkübatörde, 37°C'de 16 saat inkübasyona bırakıldı (Şekil 32).

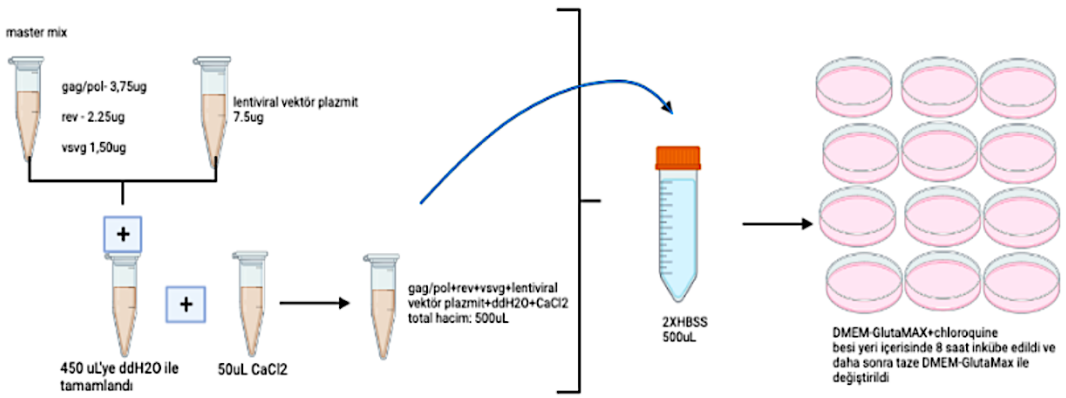


Şekil 32. HEK293FT hücre hattının sayılarak, petrilere ekilmesi

3.2.6.1.1. HEK293FT CaCL2 ile transfeksiyonu

Klonlanan lentiviral vektörlerin ve gerekli yardımcı paketleme plazmitlerinin HEK293FT hücrelerine transfeksiyonu gerçekleştirildi. Her bir lentiviral vektör için; 3,75 µg gag/pol (Addgene), 2,25 µg Rev **(**Addgene), 1,50 µg VSVG **(**Addgene), paketleme plazmidi ve 7,5 µg klonlanmış lentiviral vektör plazmidi (Lego-iG2, LeGO-iG2.mCTLA4-KDEL, LeGo-iG2.hIDO ve LeGO-iG. hIDO.shCD80.shCD86 olacak şekilde plazmit miktarları belirlendi. Toplamda dört farklı lentiviral vektör ile transfeksiyon işlemi yapılacağından, dört vektör üretilecek şekilde master mix

hazırlanarak her karışım için gerekli DNA miktarları ayrı ayrı steril eppendorf tüplerine dağıtıldı. Hazırlanan DNA karışımlarının üzerine, her tüp için son hacim 450 µL olacak şekilde steril ddH_2O eklendi. Bu karışıma 50 µL 1 M $CaCl_2$ ilave edilerek çözelti tamamlandı. Eş zamanlı olarak, transfeksiyonda kullanılacak 2X HBS tamponu steril 50 mL falcon tüplerine aktarıldı. Ardından, 2 mL'lik serolojik pipet ile oluşturulan hava kabarcıkları eşliğinde $CaCl_2$ içeren DNA karışımları, damla damla ve yavaşça 2X HBS solüsyonu üzerine eklendi ve 15–20 dakika süreyle oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sona ermeden önce, 10 cm^2'lik kültür kaplarında bulunan HEK293FT hücrelerinin eski besiyerleri aspire edildi. Her bir kültür kabına, önceden hazırlanmış 1:1000 oranında klorokin (25 µM) içeren ve toplam hacmi 10 mL olacak şekilde DMEM-GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, ABD) tam besiyeri yavaşça petrinin kenarından ilave edildi. Sonrasında, $CaCl_2$-HBS içerisinde bulunan DNA kompleksleri, hücrelerin üzerine damla damla eklendi ve petri hafifçe sağa sola hareket ettirilerek karışımın yüzeye yayılması sağlandı. Transfeksiyonun ardından hücreler, %5 CO_2 içeren inkübatörde, 37°C'de 8–10 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda, hücre kültürlerinden eski besiyerleri uzaklaştırıldı ve tam besi yeri ile değiştirildi. Hücreler, virüs üretiminin devamı için yeniden %5 CO_2 içeren inkübatörde, 37°C'de 24 saat daha inkübasyona bırakıldı (Şekil 33).



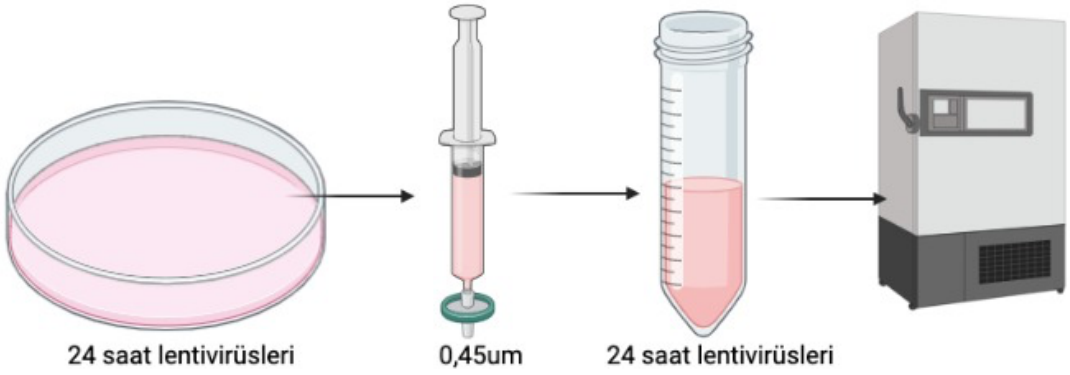
Şekil 33. HEK293FT hücre hattının üzerine CaCL2 yöntemi ile lentiviral vektörlerin eklenmesi.

24 Saat Virüslerinin Toplanması;

Taze tam besiyeri ile değiştirildikten 24 saat sonra petrilerdeki süpernatant yavaşça 10mL şırınga ile çekildi. Şırınga ucu steril 0,45 µm'lik filtreye aseptik olarak takıldı. 2 steril falcon içerisine iki eşit hacimde süzülen virüslü mediumlar falconun iç çeperinden bırakılarak baloncuk yapmadan toplandı. 100 µL her bir virüsten titrasyon için aliquat alınarak saklandı. Hücrelerin üzerine petri yan duvarının en üst kısmından yavaşça 10 mL taze tam besi yeri DMEM-GlutaMAX eklendi. 5% CO2 37^{o}C'de 16 saat daha inkübasyona bırakıldı. Toplanan virüsler -80^{o}C derin dondurucuya kaldırıldı.

36 Saat Virüslerinin Toplanması;

İlk taze medium değiştirildikten 36-40 saat sonra petrilerdeki süpernatant yavaşça eğilip 10mL şırınga ile çekildi. Şırınga ucu 0,45 µm'lik filtreye aseptik olarak takıldı 2 steril falcon içerisine iki eşit hacimde süzülen virüslü mediumları falcon tüp iç çeperinden bırakılarak baloncuk yapmadan toplandı. 100 µL her bir virüsten titrasyon için aliquat alınarak saklandı. Toplanan virüsler -80^{o}C derin dondurucuya kaldırıldı. (Şekil 34).

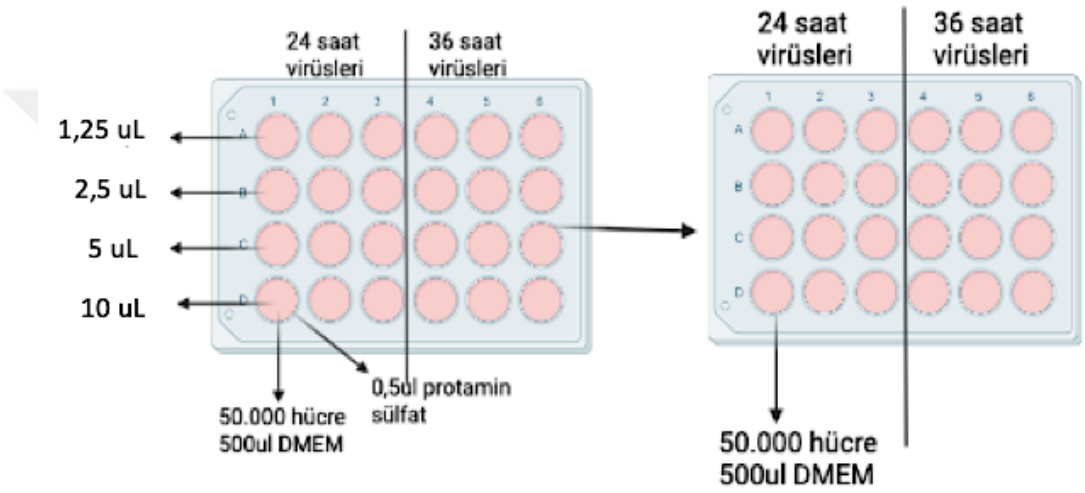


Şekil 34. 24 ve 36 saat virüslerinin 0,45 µm'lik filtreden geçirilerek toplanması ve daha sonra kullanım için -80 dolabına kaldırılması.

3.2.6.1.2. Virüs üretiminin değerlendirilmesi aşaması (virüs titrasyonu)

1.gün; Üretilen lentiviral partiküllerin miktarını ve verimliliğini değerlendirmek amacıyla titrasyon analizi için HEK293FT hücrelerinin ekimi gerçekleştirildi. 175 cm²'lik flasklarda büyütülen HEK293FT hücrelerinin besiyeri aspire edildi. Hücreler 5–6 mL steril 1X PBS ile yıkandı. Ardından flask içerisine 2 mL 1X tripsin edta eklendi ve hücreler 37°C'de 5 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. Tripsinizasyon sonrasında flask içerisindeki toplam hacim 15 mL'ye tamamlandı ve yüzeyden ayrılan

hücreler steril 15 mL'lik falcon tüplerine aktarıldı. Homojenize edilen hücre süspansiyonundan hücre sayımı yapıldı. Titrasyon için her biri 24 kuyucuktan oluşan kültür plakları hazırlandı. Her bir gen için elde edilen lentiviral süpernatantlar, 24 saatlik ve 36 saatlik üretim periyotlarına göre ayrı ayrı değerlendirildi. Bu doğrultuda toplam 36 kuyu olacak şekilde planlama yapıldı. Her bir kuyuya 50.000 HEK293FT hücresi ekildi ve kuyuların son hacmi, tam DMEM besi yeri ile 500 µL'ye tamamlandı. Hazırlanan plaklar %5 CO_2 içeren inkübatörde, 37°C'de 8–10 saat inkübasyona bırakıldı (Şekil 35).



Şekil 35. Virüs titrasyonu

2.gün; 16 saat sonra kuyulardaki medium düşük konsantrasyonda virüs bulunan kuyudan başlanarak aspire edildi ve kuyulara 500 µL taze tam besi yeri DMEM eklendi. Petriler 5% CO2 37ºC'de 72 saat inkübasyona bırakıldı.

3. gün; virüsler eklendikten 72 saat sonra, 24 kuyulu petrilerdeki mediumlar aspire edildi. Her bir kuyuya 50 µL 1X tripsin/EDTA eklendi. 5% CO2 37ºC' de 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Her bir kuyuya 1% FBS'li PBS eklenerek hücreler daha önceden kodlanmış akan hücre ölçer tüplerine dağıtıldı ve analiz gerçekleştirildi. Lentiviral vektör ile enfekte edilen HEK293FT hücreleri**,** plazmitlerin genomunda yer alan GFP (Green Fluorescent Protein) geni sayesinde, akan hücre ölçer ile FITC floresan kanalı üzerinden analiz edildi. GFP ifadesi, vektörün hücreye başarıyla transdükte edildiğini göstermesi açısından kantitatif bir biyobelirteç olarak kullanıldı. Transdüksiyon verimliliği, FITC kanalında saptanan GFP pozitif hücre yüzdesi temel alınarak değerlendirildi. GFP pozitifliği üzerinden IFU/mL (Infectious Units per

milliliter) hesaplaması yapıldı. Her bir kuyuda toplam 50.000 hücre bulunacak şekilde ekim yapıldı ve analiz sonucunda elde edilen GFP pozitiflik oranı ile matematiksel hesaplama yapıldı.

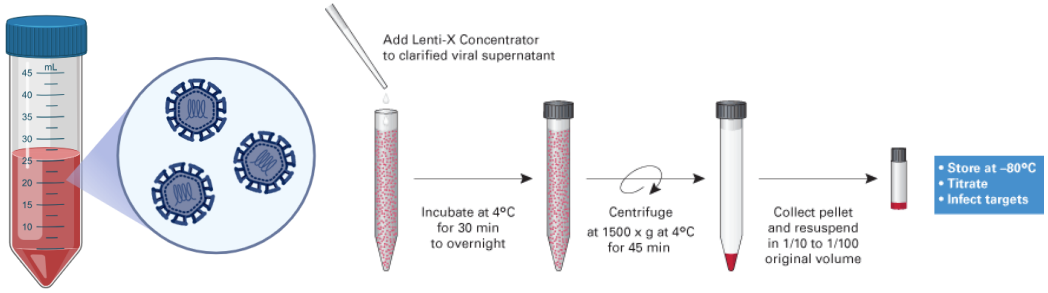
IFU değeri, aşağıdaki formül ile hesaplandı;

$$\text{IFU} = \left(\frac{\%\text{GFP pozitif hücre}}{100}\right) \times \text{toplam hücre sayısı} \times \text{dilüsyon katsayısı}$$

Örnek: %3 GFP pozitifliği elde edilen bir koşulda 50.000 hücreden 1500'ü transdükte olmuş kabul edilir. Eğer bu sonuç 0,5 µL virüs ile elde edildiyse, IFU değeri: 1500 × 2000 = 3.000.000 IFU/mL olarak hesaplanır.

3.2.6.1.3. Lenti konsantratör ile lentivirüslerin konstre edilmesi

Lentiviral partiküllerin yüksek transdüksiyon verimliliğiyle kullanılabilmesi amacıyla viral süspansiyonun hacmi düşürülerek partikül yoğunluğu artırıldı. Bu işlem için, lentivirüs konstre edici (Takara Lenti-X™ Lentiviral Concentrator) kullanıldı. Her 7 mL lentiviral süspansiyona 3 mL konsantratör çözeltisi eklendi ve karışım 4°C'de bir gece boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda oluşan çökelti, 1500×g hızda, 4°C'de 45 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Elde edilen viral pelet, 1 mL %5 FBS içeren PBS ile nazikçe resüspanse edildi. Konsantrasyon işleminin amacı, viral partikül miktarını küçük bir hacimde toplayarak özellikle primer hücre tiplerinde daha etkili bir transdüksiyon elde edebilmekti. Ayrıca, konsantre edilmiş virüslerin aliquotlanarak -80°C'de saklanabilmeleri ve dondurma-çözme döngülerine bağlı aktivite kaybı minimuma düşürülmesi de bu konstre ediciyi kullanmamız için bir neden oldu (Şekil 36).



Şekil 36. Lentivirüs konstanratör kullanımı ile hacim küçültme.

3.2.7. Primer dendritik hücrelere terapötik genin aktarılması

3.2.7.1. Primer hücrelere gen transdüksiyonu

Elde edilen primer DH, her biri 2,5 × 10^5 hücre içerecek şekilde 6 kuyulu kültür plaklarına ekildi ve daha sonra hücre yüzeyine 16-18 saat yapışması beklendi. Yapışma görüntüsü morfolojik olarak incelendikten sonra hücrelerin üzerine, daha önce konsantre edilerek titre edilmiş olan lentiviral süspansiyonlar, uygun MOI (multiplicity of infection) oranında eklendi. Transdüksiyon işleminin ardından hücreler, %5 CO_2 içeren inkübatörde, 37°C'de, 3 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresince hücrelerin morfolojileri mikroskobik olarak kontrol edildi.

Üçüncü günün sonunda, akan hücre ölçer analizine geçilmeden önce, transdüksiyon verimliliğini değerlendirmek amacıyla GFP ifadesi floresan mikroskop altında incelendi. Yüzeye yapışık durumdaki hücreler hem tripsinizasyon hem de mekanik yöntemlerle flask tabanından nazikçe kaldırıldı. Transdüksiyon verimliliği, FITC kanalında saptanan GFP pozitif hücre yüzdesi temel alınarak akan hücre ölçer cihazında analiz edildi.

3.2.7.2. Primer hücrelere plate santirifüj ile gen transdüksiyonu

Primer DH'ler elde edildikten sonra 24 kuyulu hücre kültürü kaplarına 100.000 olacak şekilde ekildi ve daha sonra üzerlerine 16-18 saat inkübasyon beklenilmeden MOI oranına uygun şekilde lentivirüsleri eklendi. 32 °C 1000xg 60 dakika plate rotor ile santrifüj edildi. 3 gün sonunda hücrelerin morfolojik görüntüleri ve GFP ışımaları kontrol edildi ve daha sonra transdüksiyon verimliliği, FITC kanalında saptanan GFP pozitif hücre yüzdesi temel alınarak akan hücre ölçer cihazında analiz edildi.

3.2.8. İDO,sitokin düzeylerinin ve T hücre yanıtlarının ölçümü

pLeGO-iG2.hIDO ile transfekte Raw 264.7 hücrelerinde IDO düzeyleri. Raw 264.7 hücreleri 6 kuyulu kültür plaklarına ekildi ve bir gece (yaklaşık 18 saat) kültüre edildi. Hücreler LeGOiG.hIDO ve LeGOiG.hIDO.shCD80.shCD86 ile transfekte edildi. Kontrol olarak transfekte edilmemiş hücreler uygunsuz plasmid (negatif kontrol) olarak pCMV/βgal ile kullanıldı. IDO düzeyleri ELISA ile 24 saat sonra elde edilen hücre lizatlarında ölçüldü.

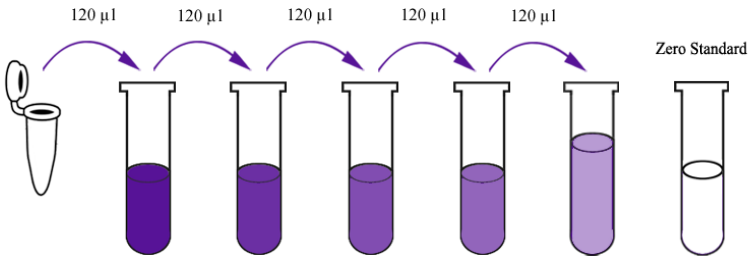
Primer DH' 24 kuyulu kültür plaklarına 100.000/kuyu olarak dağıtıldı ve MOI 5 oranında trasndüksiyon gerçekleştirildi (pLeGO-iG2.hIDO ve pLeGO-iG2.hIDO.sh80.sh86) ve transdüksiyondan üç gün sonra, her bir kültür kuyusuna

5 µg/mL konsantrasyonunda lipopolisakkarit (LPS) (Escherichia coli'den lipopolisakkarit, cat no: 93572-42-0, Sigma Aldrich, ABD) ilave edilerek hücreler stimüle edildi. Uyarımın ardından hücreler, 37 °C, %5 CO_2 koşullarında 2 gün inkübasyona bırakıldı İnkübasyon süresinin tamamlanmasından sonra, kuyularda bulunan hücreler iki farklı fraksiyon halinde ayrıldı. Süspansiyon halindeki hücreler ayrı bir tüpte, yapışık bulunan hücreler, steril hücre kazıyıcı yardımıyla mekanik olarak ayrıştırıldı ve ayrı bir tüpte toplandı. Böylece, süspansiyon ve yapışkan hücre fraksiyonlarının her biri, bağımsız olarak analiz edilebilecek şekilde ayırılmış oldu. Toplanan hücreler soğuk sıcak uygulaması ile degrede edildikten sonra şırıngadan geçirilerek ELISA için uygun biçimde hazırlandı.

IDO-1 standart 48 ng/ml standart stok solüsyonu oluşturmak için 120 µl standardı (96 ng/mL) 120 µl standart seyreltici ile sulandırıldı. Seyreltme yapılmadan önce standart hafifçe karıştırıldı ve 15 dakika inkübe edildi. Standart stok solüsyonu (48 ng/mL), 1:2 standart seyreltici ile 24 ng/mL, 12 ng/mL, 6 ng/mL ve 3 ng/mL solüsyonlar üretmek için seri olarak seyreltildi ve çift standart noktaları hazırlandı. Standart seyreltici, sıfır standart (0 ng/mL) olarak işlev gördü. Standart solüsyonların seyreltilmesi aşağıdaki gibi yapıldı:

Tablo 13. IDO-1 ELISA için standartların hazırlanması

48 ng/ml	Standard No.5	120 µl Original Standard + 120 µl Standard Diluent
24 ng/ml	Standard No.4	120 µl Standard No.5 + 120 µl Standard Diluent
12 ng/ml	Standard No.3	120 µl Standard No.4 + 120 µl Standard Diluent
6 ng/ml	Standard No.2	120 µl Standard No.3 + 120 µl Standard Diluent
3 ng/ml	Standard No.1	120 µl Standard No.2 + 120 µl Standard Diluent



Şekil 37. Standartların hazırlanması

Hücre kültürü süspanse kısımlarına ve lizatlarına IDO düzeyinin belirlenmesi amacıyla, üretici firma tarafından sağlanan kit protokolü doğrultusunda sandwich ELISA yöntemi uygulandı. Ölçüm işlemleri başlamadan önce, tüm reaktifler, standart solüsyonlar ve örnekler kit talimatlarına uygun şekilde hazırlandı. Kullanımdan önce, tüm bileşenler oda sıcaklığına getirildi. Standart eğrinin oluşturulabilmesi için seyreltilmiş standart çözeltiler, standart kuyucuklarına 50 µL olacak şekilde eklendi. Numune kuyucuklarına sırasıyla 40 µL örnek ve ardından 10 µL anti-IDO antikoru eklendi. Hem standart hem de numune kuyucuklarına 50 µL streptavidin-konjuge HRP çözeltisi ilave edildi. Plaka, yapışkan film ile kapatıldı ve 37°C'de, 60 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından yapışkan film çıkarıldı ve plaka, her biri en az 0,35 mL olacak şekilde, beş kez yıkama tamponu ile yıkandı. Her yıkama döngüsünde tamponun kuyularda en az 30 saniye ile 1 dakika bekletilmesine özen gösterildi. Yıkama sonrasında, plakanın kurutma kağıdı üzerinde ters çevrilerek yıkama solüsyonundan tamamen arındırılması sağlandı. Ardından, her kuyucuğa sırasıyla 50 µL Substrat Çözeltisi A ve 50 µL Substrat Çözeltisi B eklendi. Plaka, yeni bir yapışkan kağıtla kapatılarak 37°C'de karanlık ortamda 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda, reaksiyonun durdurulması için her kuyucuğa 50 µL durdurucu çözelti (stop solüsyonu) ilave edildi. Renk değişimi (mavi → sarı) gözlemlendi. Durdurma işlemini takiben optik yoğunluk (OD) değerleri, 450 nm dalga boyuna ayarlanmış mikroplaka okuyucu (mikroplate reader) ile 10 dakika içinde okundu. Elde edilen standart OD değerlerine karşılık gelen konsantrasyonlar kullanılarak, logaritmik eğri denklemi aracılığıyla bilinmeyen örneklerin IDO konsantrasyonları hesaplandı.

3.2.9. TolDH'lerin *in vivo* olarak kullanılacak miktarda üretilmesi

Elde edilen primer DH'ler, her kuyuda 1×10^5 hücre olacak şekilde 24 kuyulu kültür plaklarına ekildi. Hücrelerin yüzeye adezyonu beklenmeksizin, doğrudan lentiviral transdüksiyon işlemi gerçekleştirildi. Her kuyucuğa, ilgili plazmid vektörlere karşılık gelen MOI (multiplicity of infection) oranında viral süspansiyonlar eklendi. Transdüksiyonu kolaylaştırmak ve viral giriş verimliliğini artırmak amacıyla, plaklar 32°C'de, 1000×g'de, plate rotor kullanılarak 60 dakika santrifüj edildi. Üç gün süren inkübasyon süresinin sonunda, hücrelerin morfolojileri mikroskobik olarak değerlendirildi ve GFP miktarı EVOS görüntüleme sistemi kullanılarak floresan

mikroskop altında incelendi. Ardından hücreler yüzeyden kaldırıldı ve akan hücre ölçer cihazı ile transdüksiyon verimliliği kantitatif olarak analiz edildi.

Çalışmada, dört farklı lentiviral vektör kullanıldı:

- LeGO-iG2 (kontrol vektör)
- LeGO-iG2-mCTLA4-KDEL
- LeGO-iG2-hIDO
- LeGO-iG.hIDO.shCD80.shCD86

Her bir lentiviral vektör için birden fazla kuyu kullanılarak transdüksiyon işlemi uygulandı ve elde edilen hücre miktarı, *in vivo* uygulamalar için yeterli olacak şekilde üretildi. GFP pozitif hücre oranları, akan hücre ölçer cihazı ile belirlendi. Hücrelerin canlılık durumları ise trypan blue boyama yöntemi kullanılarak değerlendirildi ve manuel hücre sayımı gerçekleştirildi. Ayrıca, antijenle ön aktivasyon oluşturabilmek amacıyla, belirli kuyulara hücre kültür ortamında 10 µg/mL konsantrasyonunda tip II kolajen (Collagen Type II) eklendi. Kolajen eklenen hücreler, 12 saat inkübasyona bırakıldı. Bu uygulama, antijene spesifik tolDH'yi kültürde üretmek ve teröpatik yaklaşımda karşılaştırmalı analizlerin yapılabilmesi için kullanıldı.

3.2.10. Artritli farelere terapötik TolDH uygulaması

TolDH'ler akan hücre ölçer ile analiz edildikten sonra hücre sayımı gerçekleştirildi. Lego_iG2, LeGo-iG2-mCTLA4-KDEL, LeGo-iG2-hIDO, LeGO-iG. hIDO.shCD86 ve her bir koşulun kolajen eklenmiş hali triphan-blue ile sayıldı ve hayvanlara intraartiküler olarak 20 µl içerisinde 50.000 hücre olacak şekilde enjekte edildi ve hayvanlara 5'erli gruplar halinde enjeksiyon yapıldı.

Tablo 14. Artritli Farelere terapötik TolDH uygulaması

Primer DH	50.000 hücre/ 20 ul
Primer DH + 10ug/mlKolajen	50.000 hücre/ 20 ul
PBS	20ul
Lego_iG2	50.000 hücre/ 20 ul
Lego_iG2+ 10ug/mlKolajen	50.000 hücre/ 20 ul
LeGo-iG2-mCTLA4-KDEL	50.000 hücre/ 20 ul
LeGo-iG2-mCTLA4-KDEL+ 10ug/mlKolajen	50.000 hücre/ 20 ul
LeGo-iG2-hIDO,	50.000 hücre/ 20 ul
LeGo-iG2-hIDO, + 10ug/ml Kolajen	50.000 hücre/ 20 ul
LeGO-iG. hIDO.shCD86	50.000 hücre/ 20 ul
LeGO-iG. hIDO.shCD86+ 10ug/ml Kolajen	50.000 hücre/ 20 ul

3.2.11. Tedavi uygulanmış farelerden alınan doku örneklerinde yapılan analizler

Nekropside, sağ arka bacaklar RA yönünden pozitif olarak değerlendirildi, sol arka bacaklar ise kontrol olarak kabul edildi. Koksafemoral eklem bölgesinden dezartiküle edilen bacaklar, derileri yüzüldükten sonra %10'luk nötral formalin solüsyonu içinde tespit edildi. Tespit işlemini takiben, %14'lük EDTA (etilendiamin tetraasetik asit, pH 7,2) solüsyonu içerisinde kemik dokunun dekalsifikasyonu gerçekleştirildi ve dekalsifikasyon süresince her 3 günde bir EDTA solüsyonu yenilendi. Dekalsifiye edilen bacaklar, artikülasyon genu bölgesinden yatay düzleme dik açıyla kesilerek kasetlere alındı, rutin doku takip prosedüründen (70°C, 80°C, 90°C, Absolüt alkol (100°) 1, Absolüt alkol (100°) 2, ksilen 1, ksilen 2, parafin 1, parafin 2; her birinde 1'er saat) geçirilerek parafine gömüldü. Parafin bloklardan 4 μm kalınlığında alınan kesitler, Hematoksilen&Eozin (H&E) ile boyandı ve ışık mikroskobu altında incelendi. Tibiotarsal eklem bölgesinde; kalkaneus, talus ve sentral tarsal kemiklere sagittal olarak alınan kesit bölgelerinde sinovyal dokular ve subsinovyal alanların histolojik ve histopatolojik özelliklerinin değerlendirilmesi için H&E boyama prosedürü uygulandı.

Boyama işlemine geçilmeden önce, kullanılacak olan lamlar 37°C'deki etüvde (WiseCube Digital Fuzzy Control & Digital LCD-Back Light System, WIG-50, Daihan Scientific, Güney Kore) bir gece boyunca inkübe edilerek kurutuldu. Kurutulan lamlar, lam boyama sepetine yerleştirildi ve sırasıyla Ksilol I ve Ksilol II solüsyonlarında 10'ar dakika süreyle bekletildi. Bunu takiben lamlar, azalan derişimlerdeki etanol serilerinden geçirilerek rehidratasyon işlemi uygulandı. Bu amaçla, sırasıyla Saf Alkol I, Saf Alkol II, %96, %80 ve %70'lik etanol çözeltilerinde her birinde 3 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. Rehidratasyonun ardından lamlar akarsuda 3 dakika süreyle yıkanarak deparafinize ve rehidre edildi.

Kesitler, hematoksilen solüsyonunda (105174, Merck Millipore, MA, ABD) 10 dakika süreyle boyandı. Hematoksilen boyamasının ardından lamlar tekrar akarsuda 3 dakika boyunca yıkandı. Ardından, lam boyama sepeti bir kez asit alkol solüsyonuna (100 mL %70'lik alkol + 1 mL HCl; HCl, 07102, Sigma Aldrich) daldırılıp çıkarıldı. Diferansiasyon sonrası kesitler, nükleer yapının netleşmesi için, amonyak solüsyonu (100 mL distile su + 0,2 mL amonyak; 903.016, Isolab) içerisinde mavi renk oluşana dek inkübasyona bırakıldı.

Nükleer boyamayı takiben lamlar, eozin solüsyonunda (109844, Merck Millipore) 5 dakika süreyle inkübe edildi. Eozin boyamasının ardından lamlar yeniden akarsuda yıkanarak arındırıldı. Kurutma işleminden önce, lamlar artan derişimlerdeki etanol serilerinden geçirilerek dehidratasyon tamamlandı. Son olarak, lamlar ksilol içerisinde 10 dakika süreyle tutuldu ve ardından kesitlerin üzerine entellan (1.07961, Merck, Darmstadt, Almanya) damlatılarak lam ve lamel arasına hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatıldı (Şekil 38).



Şekil 38. Histopatalojik analizlerin aşamaları

Sinovyal dokuların histopatolojik muayenesinde, tablo 15'te belirtilen kriterler dahilinde değerlendirmeler yapıldı.

Tablo 15. Histopatoloji değerlendirme kriterleri ve skorları.

	Semptom	**Skor**
Synovial hiperplazi	Hafif-şiddetli	1
	Hafif-orta şiddetli	2
	şiddetli	3
	Çok şiddetli	4
Pannus oluşumu	Hafif-şiddetli	1
	Hafif-orta şiddetli	2
	Şiddetli	3
	Çok şiddetli	4
Synovial membranda infiltrasyonlar	Hafif-şiddetli	1
	Hafif-orta şiddetli	2
	Şiddetli	3
	Çok şiddetli	4
Neovaskülarizasyon	Hafif-şiddetli	1
	Hafif-orta şiddetli	2
	Şiddetli	3
	Çok şiddetli	4
Kıkırdak dokuda hiposelülarite	Hafif-şiddetli	1
	Hafif-orta şiddetli	2
	Şiddetli	3
	Çok şiddetli	4
Kıkırdak dokuda dejeneratif nekrotik değişiklikler ve fissür oluşumu	Hafif-şiddetli	1
	Hafif-orta şiddetli	2
	Şiddetli	3
	Çok şiddetli	4

3.2.12. İstatistiksel analiz

Çalışmadaki tüm sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verildi. Elde edilen sonuçların değerlendirilmesi bağımsız örneklem t-test ile yapıldı. Çalışmadaki tüm istatistiksel analizlerde p değerinin 0,05'ten küçük olduğu değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

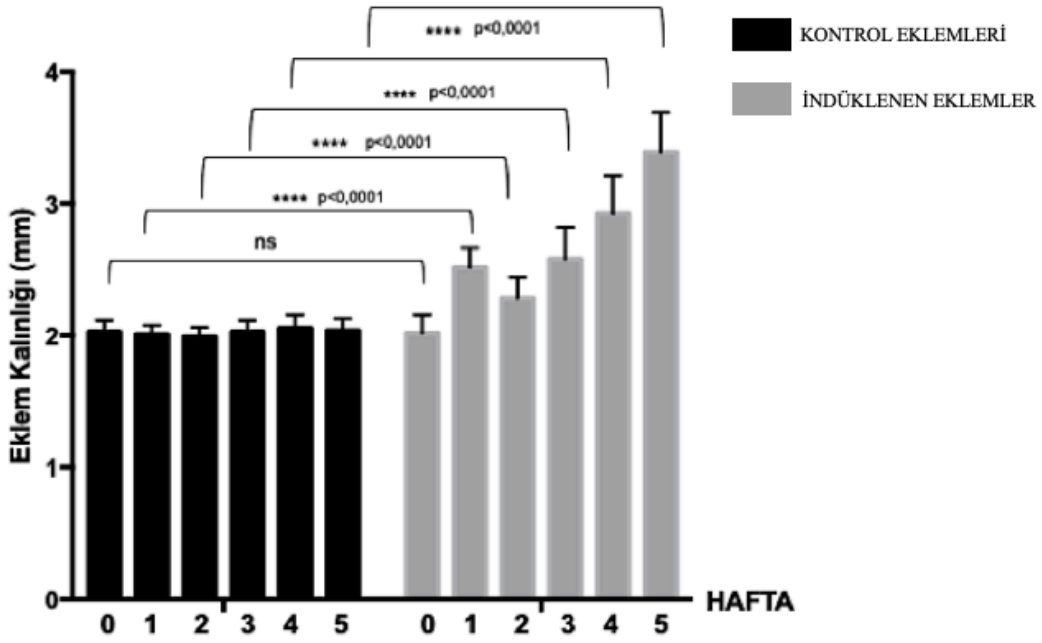
4. BULGULAR

4.1. Farelerde Artrit Oluşturma

Farelerde artrit oluşturmak amacıyla yapılan enjeksiyonlarından sonra hayvanların pençe/eklem ölçümleri kumpas ile düzenli aralıklarla ölçülmüştür. Enjeksiyonun yapıldığı gün 0. gün olarak belirlenmiş ve ikinci enjeksiyon 14.günde yapılmıştır. Hayvanların haftalık eklem ölçümleri takibi yapılırken artrit modeli oluşturulmasının hayvanların beden ağırlığı gelişimini etkileyip etkilemediğini anlamak amacıyla her kumpas ölçümü sırasında hayvanların beden ağırlığı ölçümleri de yapılmıştır.

Yapılan hayvan modeli çalışmaları sonucunda, literatürde C57BL/6 farelerinde tavuk kolajeni ile oluşturulabildiği gösterilen CIA modeli, bu tez çalışması kapsamında sığır (bovine) kolajeni kullanılarak başarıyla indüklenerek oluşturulmuştur. Ayrıca, BALB/c farelerinde de aynı yöntemle CIA modeli oluşturulmuş, eklem kalınlıkları ölçümleri, klinik belirtiler ve histopatoloji analizleri ile başarıyla oluşturulabildiği gözlemlenmiştir.

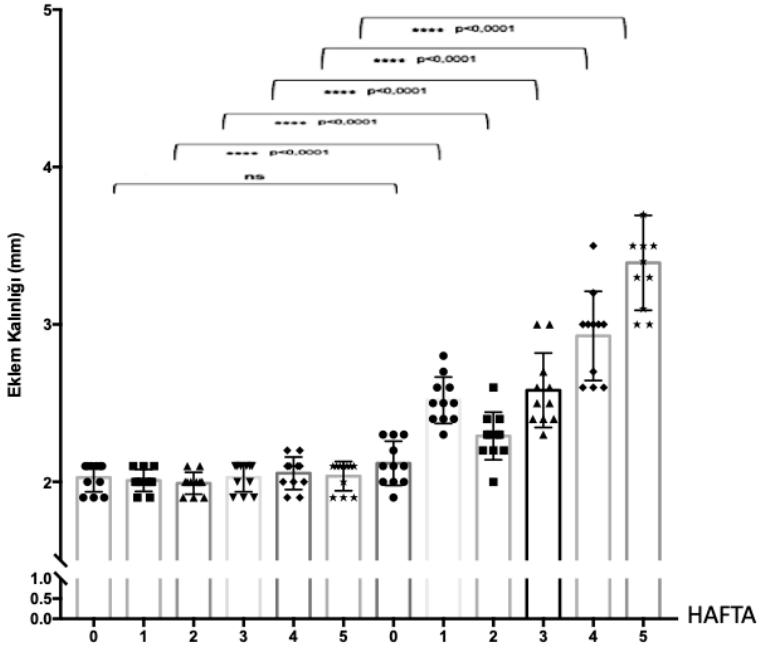
Modelleme çalışmaları, başlangıç aşamasında 11 C57BL/6 fare üzerinde yürütülmüş ve bu grupta indüksiyon protokollerinin uygulanabilirliği test edilmiştir. Takip sürecinde eklem kalınlıkları ölçülmüş ve elde edilen veriler Şekil 39'da gösterilmiştir. İndüklenen eklemlerde, kontrol grubuna kıyasla ilk haftada anlamlı düzeyde bir kalınlık artışı gözlemlenmiştir. Ancak, ikinci hafta (14. gün) ölçümlerinde eklem kalınlığında bir miktar azalma meydana gelmiştir. Bu bulgu, literatürde Güvenç ve ark. tarafından bildirilen çalışmadaki sonuçlarla paralellik göstermektedir. İkinci indüksiyonun ardından yapılan takiplerde ise eklem kalınlığında düzenli ve kademeli bir artış izlenmiştir (Şekil 39).



Şekil 39. Kontrol eklemi ve indüklenen eklem bir hafta aralıklarla kaliper yardımı ile ölçülmüştür. Siyah barlar kontrol eklemlerini-gri barlar indüklenen eklemleri göstermektedir (n=11)

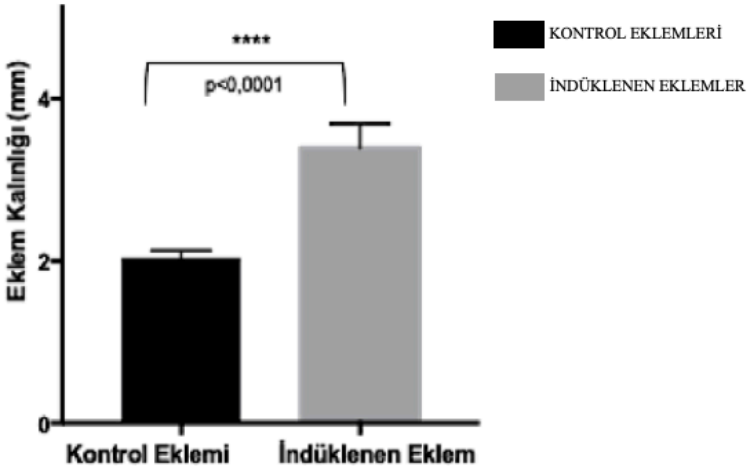
C57BL/6 farelerinde oluşturulan artrit modelinde, kontrol ve indüklenen eklemlerin ölçümleri birer hafta aralıklarla toplam altı kez kaliper yardımıyla yapılmıştır. Şekil 39'da yer alan grafikte, siyah barlar kontrol ekleminin 1. ölçümden 6. ölçüme kadar olan ortalama kalınlık değerlerini; gri barlar ise indüklenen eklemin aynı zaman dilimindeki ortalama değerlerini göstermektedir. İlk ölçümde, kontrol ve indüklenen eklemler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken; ikinci ölçümden itibaren iki grup arasında anlamlı farklar gözlemlenmiştir. Grafikte yer alan * sembolleri, yapılan istatistiksel analizler sonucunda elde edilen anlamlılık düzeylerini temsil etmektedir.

C57BL/6 farelerinde oluşturulan artrit modelinde, kontrol eklemi ve indüklenen eklem çapları kaliper yardımıyla haftalık aralıklarla toplam altı kez ölçülmüştür. Şekil 40'ta her bir fareyi temsil eden bireysel semboller (yuvarlak, kare, üçgen) yer almakta olup, bu sayede hayvanlar arası bireysel farklılıklar da değerlendirilmiştir. Kontrol ve artrit indüklenen eklemler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir ($p \leq 0.0001$).



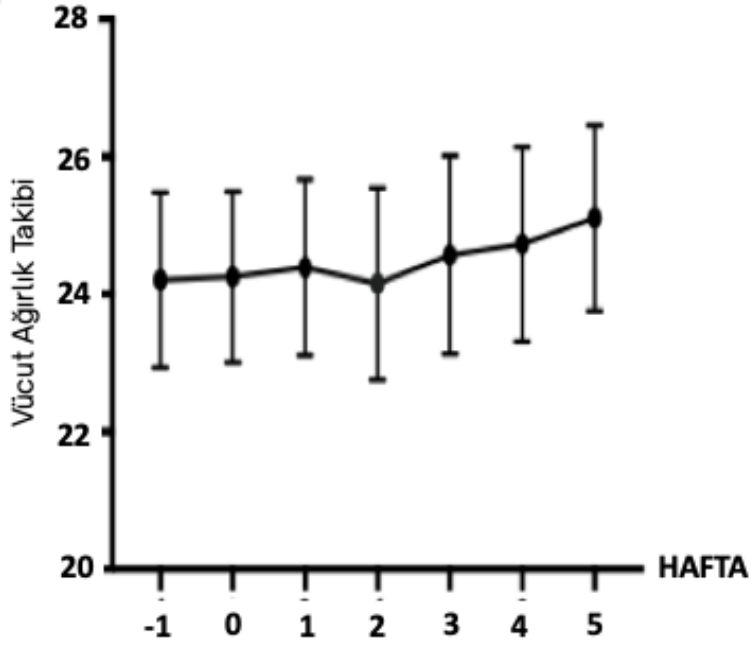
Şekil 40. Kontrol eklemi ve indüklenen eklem bir hafta aralıklarla kaliper yardımı ile ölçülmüştür.

Kaliper ölçümleri sonucunda elde edilen verilerin ortalamaları grafikte sunulmuştur (Şekil 41). Kontrol ve indüklenen eklem grupları karşılaştırıldığında, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir ($p \leq 0.0001$). Bu fark, artrit indüksiyonunun eklem kalınlığı üzerinde belirgin bir etki oluşturduğunu göstermektedir.



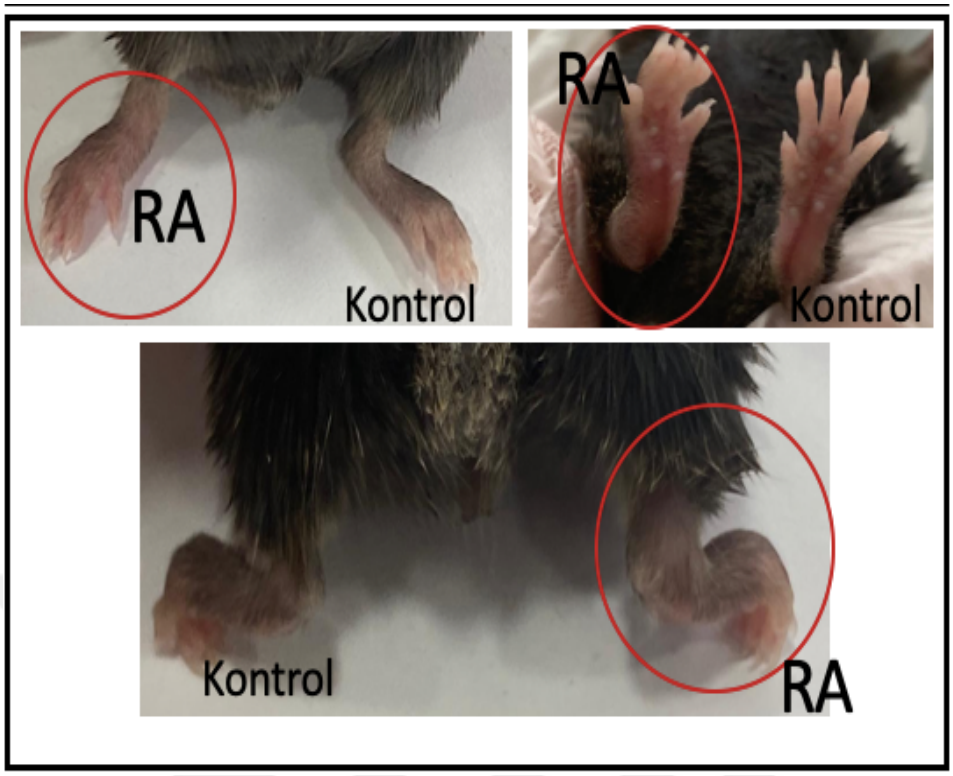
Şekil 41. Kontrol grubu eklemi ve artrit modeli indüklenen eklemin kaliper ile ölçülmesi.

Farelerde artrit modeli oluşturulmasına yönelik beden ağırlığı takibi, ilk enjeksiyon gününden itibaren başlatılmıştır. Şekil 42'de yer alan grafikte x ekseni haftalık zaman dilimlerini göstermektedir. 1. hafta, enjeksiyondan bir hafta öncesine; 2. hafta (0. gün) ise ilk enjeksiyonun uygulandığı güne karşılık gelmektedir. 4. hafta (14. gün) ikinci enjeksiyonun yapıldığı zamanı ifade etmektedir. Eklem kaliper ölçümleri sırasıyla 5. hafta (21. gün), 6. hafta (28. gün) ve 7. hafta (35. gün) gerçekleştirilmiştir. Her bir zaman noktasında farelerin vücut ağırlıkları kayıt altına alınmıştır. Grafik, yapılan enjeksiyonların ve artrit modellemesinin farelerin vücut ağırlığı değişimi üzerindeki etkilerini göstermektedir (Şeki42).



Şekil 42. Farelerin Beden Ağırlığı Takip Grafiği

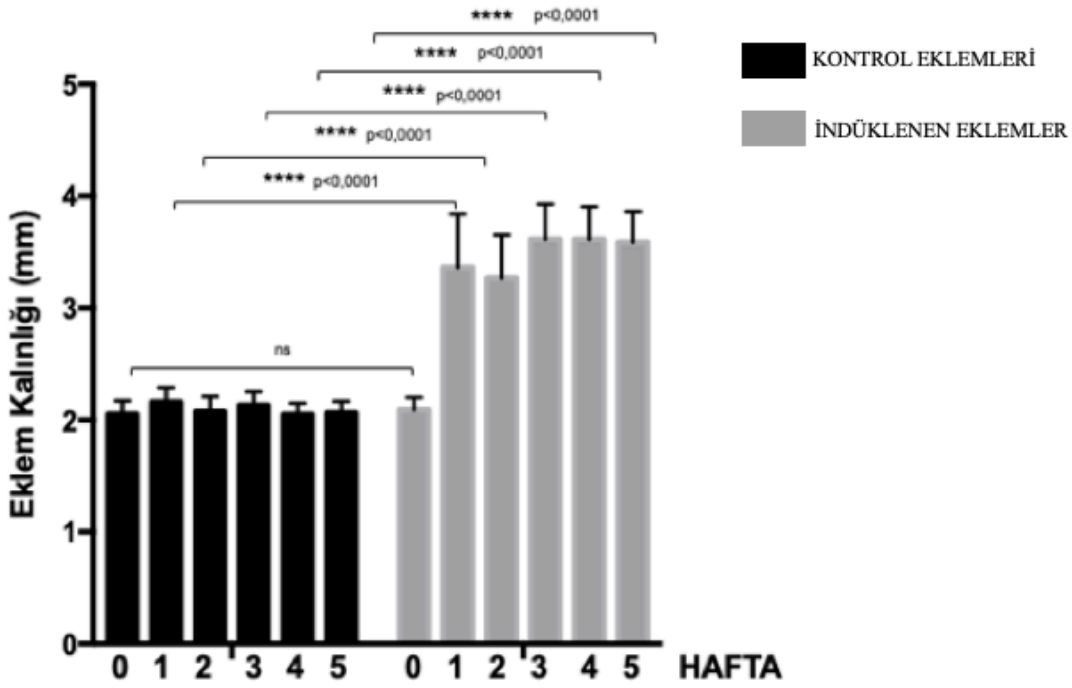
Şekil 43'te, CIA modeli oluşturulmuş fare örnekleri yer almaktadır. Sağ arka bacağa Tip II kolajen ve CFA enjeksiyonu yapılarak artrit indüklenmiş, sol arka bacak ise enjeksiyon uygulanmadan sağlıklı kontrol olarak bırakılmıştır. Artrit indüklenen bacakta eklemde belirgin şişlik, kızarıklık ve deformasyon gibi inflamatuvar artritin karakteristik belirtileri gözlemlenmiştir.



Şekil 43. CIA modeli oluşturulmuş farelerin görselleri

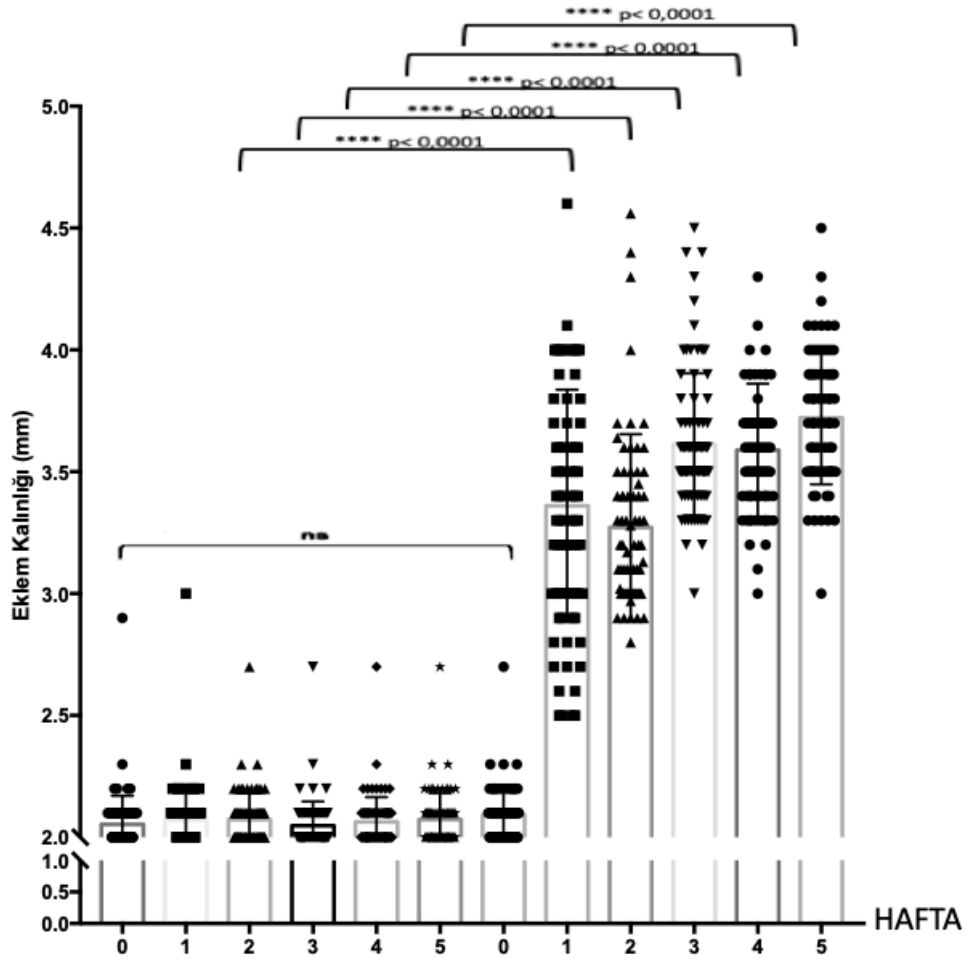
Balb/c ırkı farelerde CIA modeli oluşturma;

Balb/c farelerinde oluşturulan CIA modelinde, kontrol ve indüklenen eklemlerin kalınlık ölçümleri kaliper yardımıyla haftalık aralıklarla toplam altı kez yapılmıştır. Şekil 44'te siyah barlar, kontrol ekleminin 1. ölçümden 6. ölçüme kadar olan ortalama kalınlık değerlerini; gri barlar ise aynı zaman diliminde indüklenen eklemin ortalama değerlerini göstermektedir. İlk ölçümde iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmezken, ikinci ölçümden itibaren kontrol ve indüklenen eklemler arasında anlamlı farklılıklar oluşmuştur. Grafikte yer alan * sembolleri, yapılan istatistiksel analizler sonucunda anlamlılık düzeylerini ifade etmektedir.



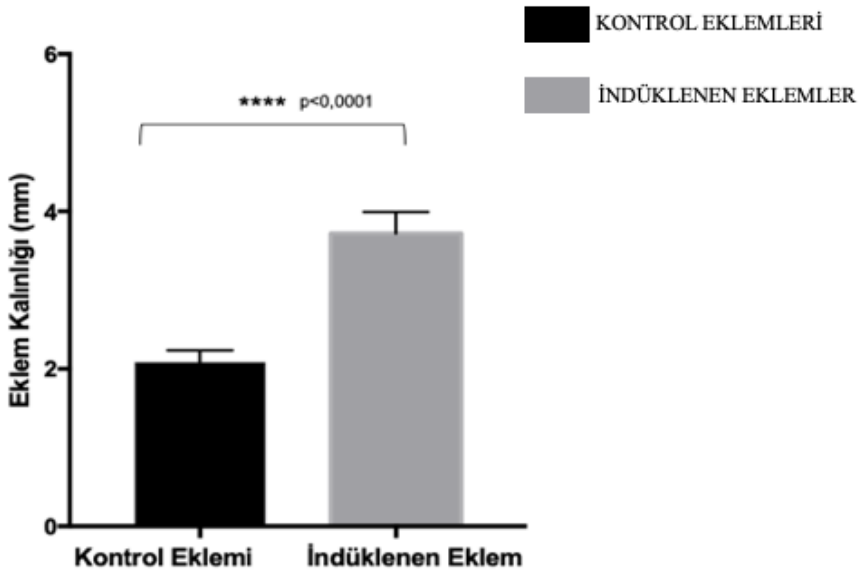
Şekil 44. Kontrol eklemi ve indüklenen eklem bir hafta aralıklarla kaliper yardımı ile ölçülmüştür. Siyah barlar kontrol eklemlerini-gri barlar indüklenen eklemleri göstermektedir.

Balb/c farelerinde oluşturulan artrit modelinde, kontrol eklemi ve indüklenen eklem çapları kaliper yardımıyla haftalık aralıklarla toplam altı kez ölçülmüştür. Şekil 45'te her bir fareyi temsil eden bireysel semboller (yuvarlak, kare, üçgen) yer almakta olup, bu sayede hayvanlar arası bireysel farklılıklar da değerlendirilmiştir.



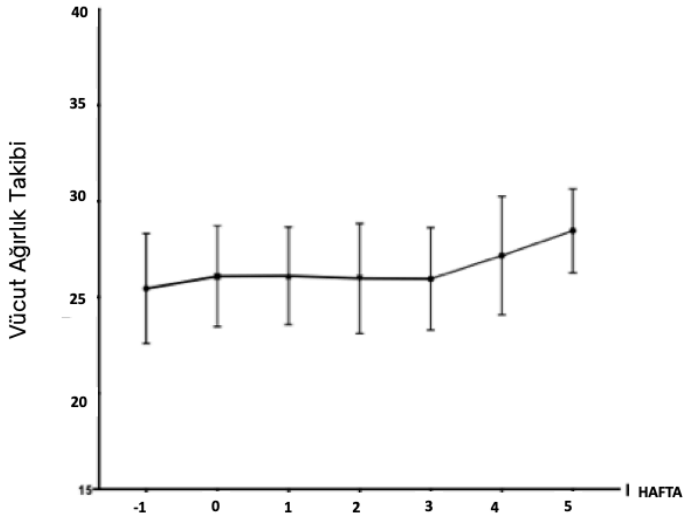
Şekil 45. Kontrol eklemi ve indüklenen eklem bir hafta aralıklarla kaliper yardımı ile ölçülmesi.

Kaliper ölçümleri sonucunda elde edilen ortalama değerler grafikte sunulmuştur (Şekil 46). Kontrol ve artrit indüklenen eklemler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir ($p \leq 0.0001$). Bu fark, artrit modelinin eklem kalınlığı üzerindeki etkisini açık şekilde ortaya koymaktadır.



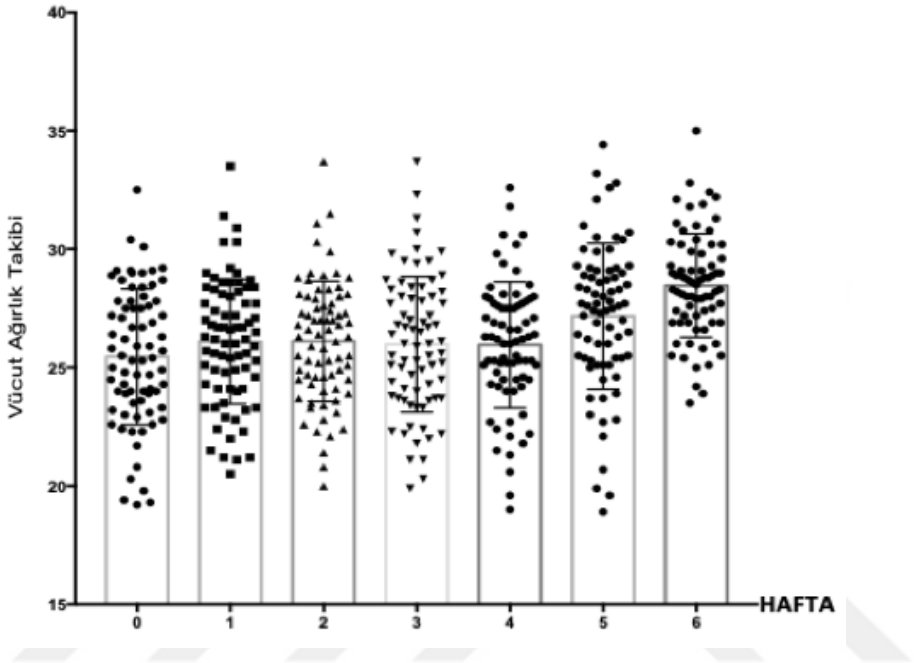
Şekil 46. Kontrol grubu eklemi ve artrit modeli indüklenen eklemin kaliper ile ölçülmesi.

Artrit modeli oluşturulan farelerin beden ağırlığı takibi, ilk enjeksiyonun yapıldığı günden itibaren başlatılmıştır. Şekil 47'de yer alan grafikte x ekseni haftalık zamanlamayı göstermektedir. 1. hafta, enjeksiyondan bir hafta öncesini; 2. hafta (0. gün) ilk enjeksiyonun yapıldığı zamanı; 4. hafta (14. gün) ise ikinci enjeksiyonun uygulandığı zamanı ifade etmektedir. Eklem kaliper ölçümleri 5. hafta (21. gün), 6. hafta (28. gün) ve 7. hafta (35. gün) gerçekleştirilmiştir. Her bir zaman noktasında farelerin vücut ağırlıkları kaydedilerek takip edilmiştir. Grafik, artrit modellemesinin ve enjeksiyonların beden ağırlığı üzerindeki etkilerini yansıtmaktadır.



Şekil 47. Farelerin Beden Ağırlığı Takip Grafiği

Şekil 48'de ise farelerin beden ağırlıkları dot plot formatında bireysel olarak sunulmuştur. Deneyde çok sayıda hayvan kullanıldığı için, fareler arası bireysel beden ağırlığı değişimlerini daha net bir şekilde gösterebilmek amacıyla bu grafik ayrıca eklenmiştir.



Şekil 48. Farelerin bireysel beden ağırlığı grafiği.

Şekil 49'da CIA modeli uygulanmış fareler görülmektedir. Sağ arka bacağa Tip II kolajen ve CFA enjeksiyonu yapılarak artrit indüklenmiş, sol arka bacak ise enjeksiyon uygulanmadan sağlıklı kontrol olarak bırakılmıştır. Artrit oluşturulan bacakta eklem şişliği, kızarıklık ve deformasyon gibi inflamatuar artritin karakteristik belirtileri gözlemlenmiştir.



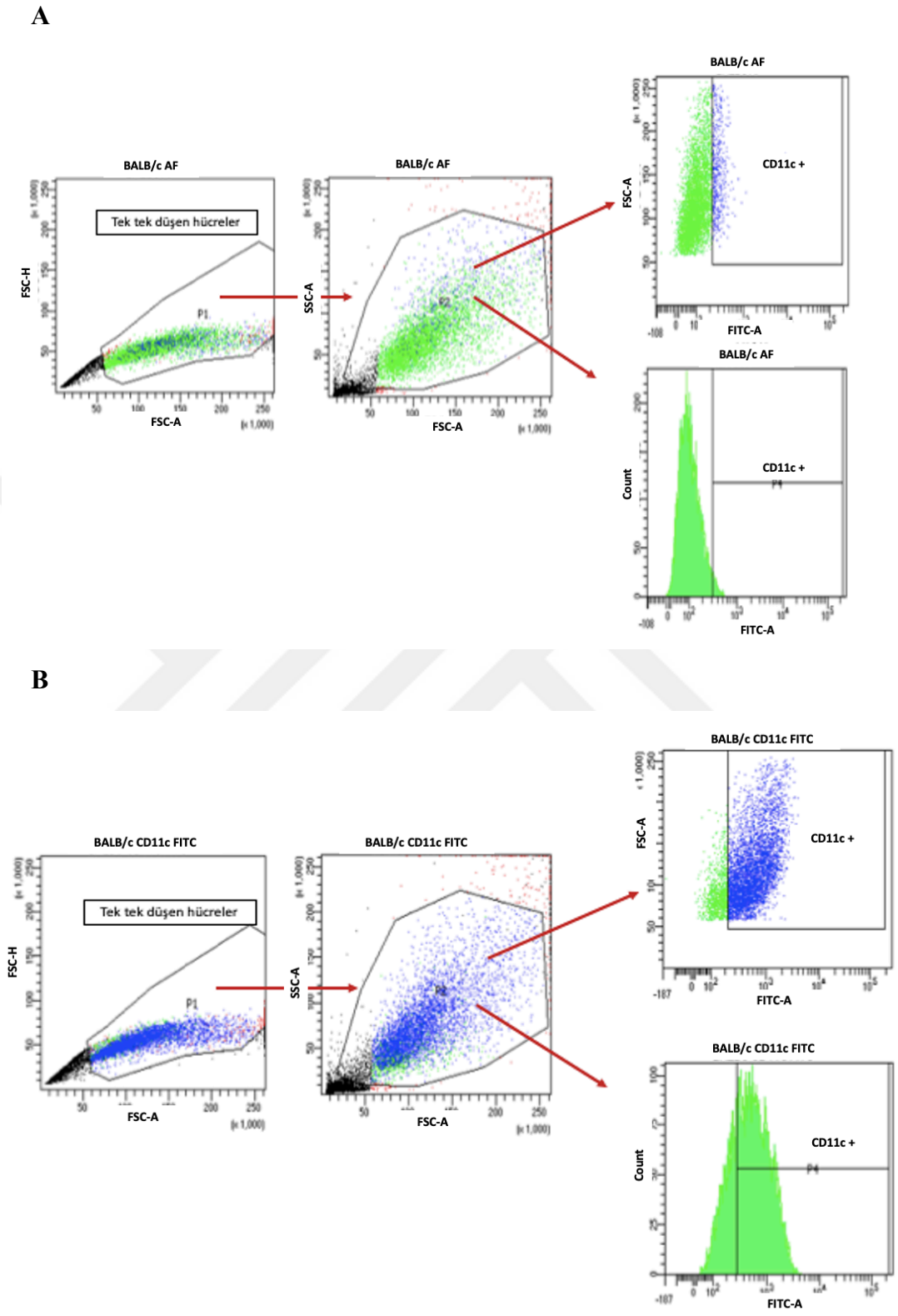
Şekil 49. CIA modeli oluşturulmuş farelerin görselleri.

4.2. Primer Dendritik Hücre ve Diğer Hücre Hatlarının Kültürü

Primer dendritik hücreler (DH) elde edildikten sonra, DH tanımlayıcı yüzey belirteci olan CD11c monoklonal antikoru ile işaretlenmiş ve hücreler akan hücre analiz sistemi (flow cytometry) ile değerlendirilmiştir. CD11c hem *in vitro* hem de *in vivo* koşullarda fare dendritik hücrelerini tanımlamak için yaygın olarak kullanılan bir belirteçtir (Singh-Jasuja ve ark., 2013).

Akan hücre ölçer analizinde ilk olarak tek tek düşen hücrelerin içerisinden, ileri saçılma grafiği (Forward scatter) ile hücrelerin yaklaşık büyüklüğü, yana saçılma grafiği (Side scatter) ile hücrelerin yaklaşık granülaritesi belirlenmiş ve popülasyon kapılanarak bu hücre grubu P1 olarak adlandırılmıştır. Ardından, P1 kapısı içerisinden dendritik hücrelerin yer aldığı bölge seçilerek P2 kapısı oluşturulmuştur. P2 kapısında, FITC ile konjuge edilmiş CD11c antikorunun ışıması değerlendirilmiş ve bu sayede dendritik hücre oranı belirlenmiştir. Otofloresan (auto-fluorescence; AF) sinyalinin tespiti amacıyla, ilk olarak CD11c ile işaretlenmemiş hücreler analiz edilmiş ve FITC kanalında temel ışıma düzeyi kapılanmıştır. Sonrasında hem BALB/c hem de C57BL/6 farelerinden elde edilen DH'ler ayrı ayrı analiz edilmiştir.

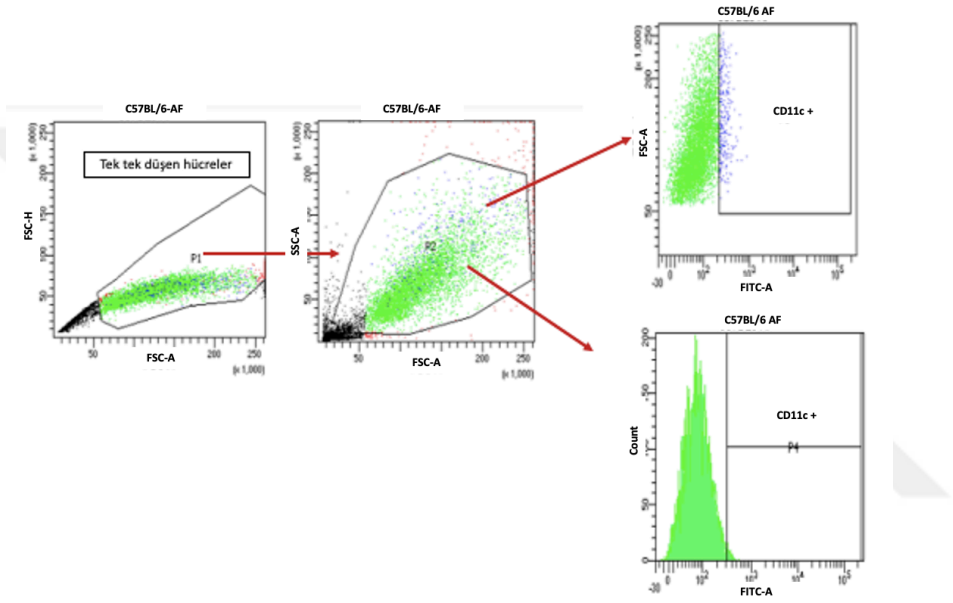
CD11c antikoru FITC-A konjugasyonu ile işaretlendiğinden, DH'lerin yüzdesel analizi P4 kapısı üzerinden gerçekleştirilmiştir. AF düzeyini belirlemek amacıyla CD11c ile işaretlenmemiş kontrol tüpünde yapılan analizde, P4 kapısındaki FITC pozitif hücre oranı %2,7 olarak görülmüştür (Şekil 50-A). Buna karşılık, CD11c ile boyanmış örnekte P4 kapısında %69,0 oranında FITC pozitiflik saptanmıştır. (Şekil 50-B) Bu veriler doğrultusunda, elde edilen hücre populasyonunun yaklaşık %66'sının primer DH'lerden oluştuğu görülmüştür.



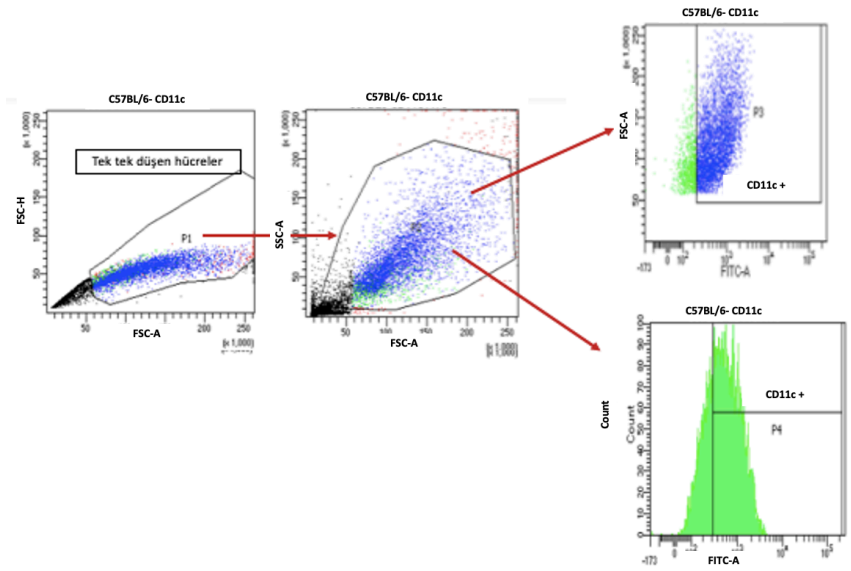
Şekil 50. Balb/c farelerinden elde edilen primer DH'lerin akar hücre ölçer ile işaretlenmesi ve kapılama stratejisi.

CD11c antikoru FITC-A ile konjuge olduğundan, hücre yüzdesi analizi P4 kapısı üzerinden gerçekleştirilmiştir. AF düzeyini belirlemek amacıyla, CD11c ile işaretlenmemiş kontrol tüpünde yapılan analizde P4 kapısındaki FITC pozitif hücre oranı %1,1 olarak görülmüştür (Şekil 51-A). Buna karşılık, CD11c ile boyanmış örnekte P4 kapısında %69,5 oranında FITC pozitiflik saptanmıştır (Şekil 51-B). Bu veriler doğrultusunda, elde edilen hücre popülasyonunun yaklaşık %68'inin primer DH'lerden oluştuğu belirlenmiştir.

A



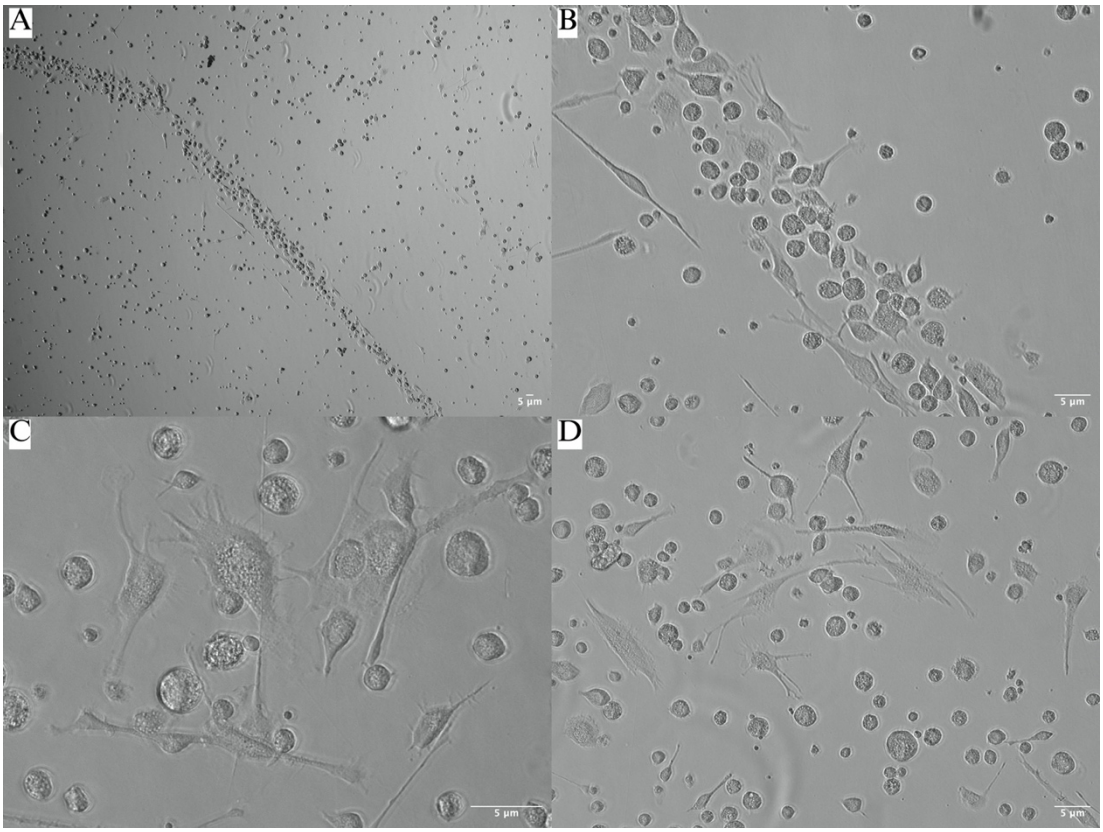
B



Şekil 51. C57BL/6 farelerinden elde edilen primer DH'lerin akar hücre ölçer ile işaretlenmesi ve kapılama stratejisi.

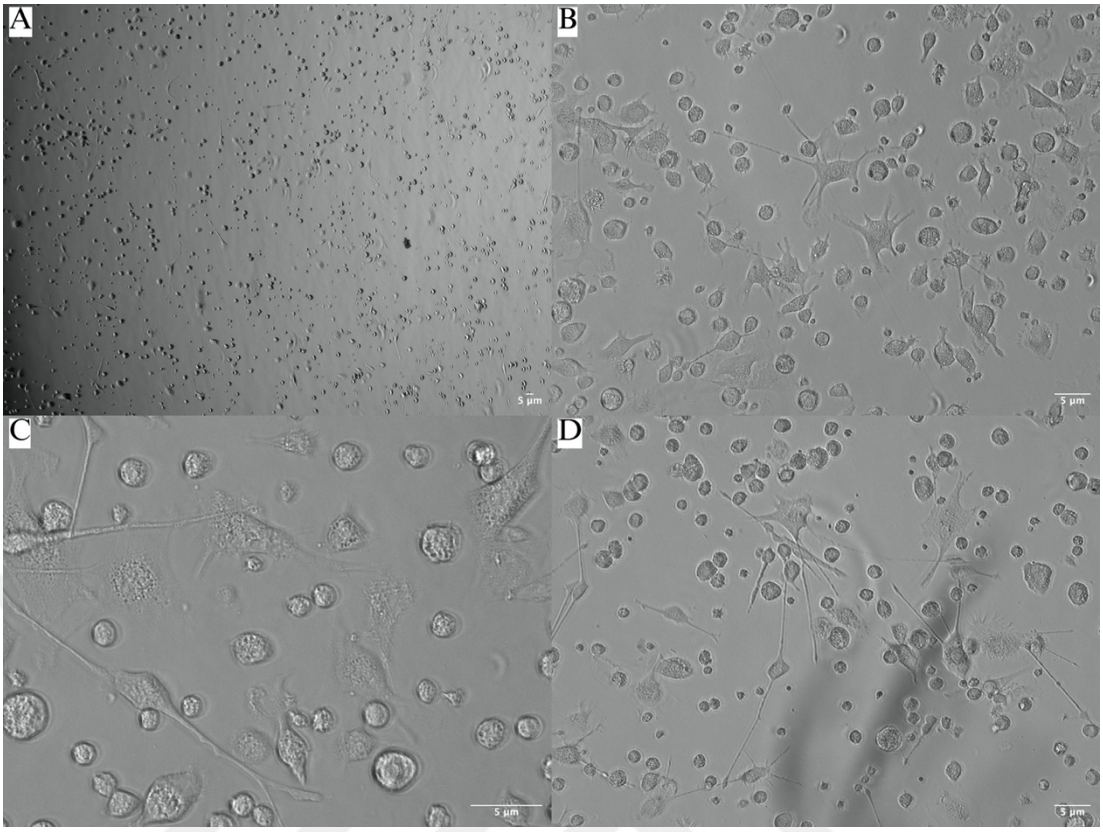
Elde edilen primer DH'lerin morfolojik görüntüleri;

EVOS görüntüleme sistemi kullanılarak BALB-c farelerden elde edilen primer hücrelere ait mikroskobik görüntüler Şekil 52'de sunulmuştur. Şekil 52A'da 4X büyütmede çekilen görüntüde, hücre popülasyonunun genel görünümü, yoğunluğu ve dağılımı gösterilmiştir. Şekil 52B ve Şekil 52D'de 20X büyütme ile hücre morfolojisi ve hücreler arası etkileşimler daha ayrıntılı şekilde incelenmiştir. Şekil 52C'de ise 40X büyütme ile hücrelerin sitoplazmik uzantıları ve hücre içi detayları daha net şekilde gözlemlenmiştir.



Şekil 52. BALB-c farelerinden elde edilen DH'lerin mikroskop ile görüntülenmesi (A x4 büyütme, B ve D x20 büyütme, C x40 büyütme).

EVOS görüntüleme sistemi kullanılarak C57BL/6 farelerden elde edilen primer hücrelere ait mikroskobik görüntüler Şekil 53'te sunulmuştur. Şekil 53A'da 4X büyütme ile hücre popülasyonunun genel görünümü, yoğunluğu ve kültür yüzeyine dağılımı gösterilmiştir. Şekil 53B ve Şekil 53 D'de 20X büyütme ile hücre morfolojisi ve hücreler arası etkileşimler daha ayrıntılı şekilde incelenmiştir. Şekil 53C'de ise 40X büyütmede hücrelerin sitoplazmik uzantıları ve yapısal detayları net biçimde gözlemlenmiştir.

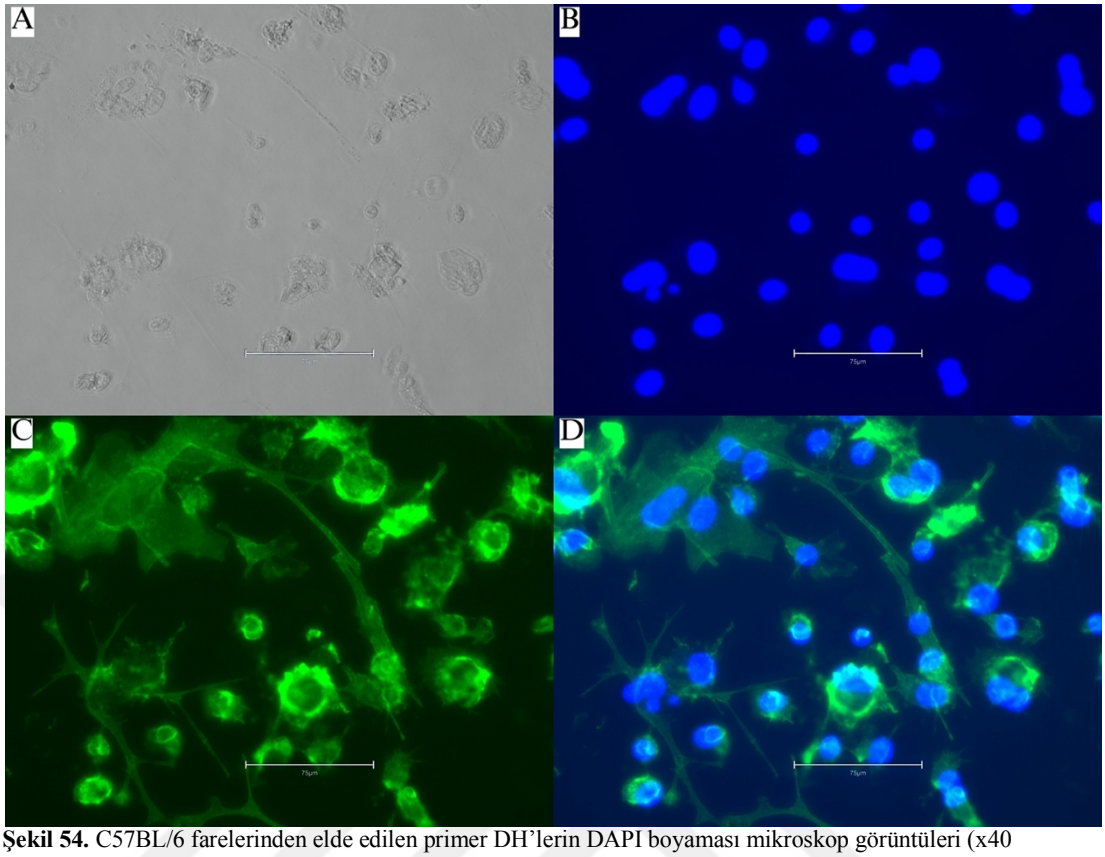


Şekil 53. C57BL/6 farelerinden elde edilen DH'lerin mikroskop ile görüntülenmesi (A x4 büyütme, B ve D x20 büyütme, C x40 büyütme).

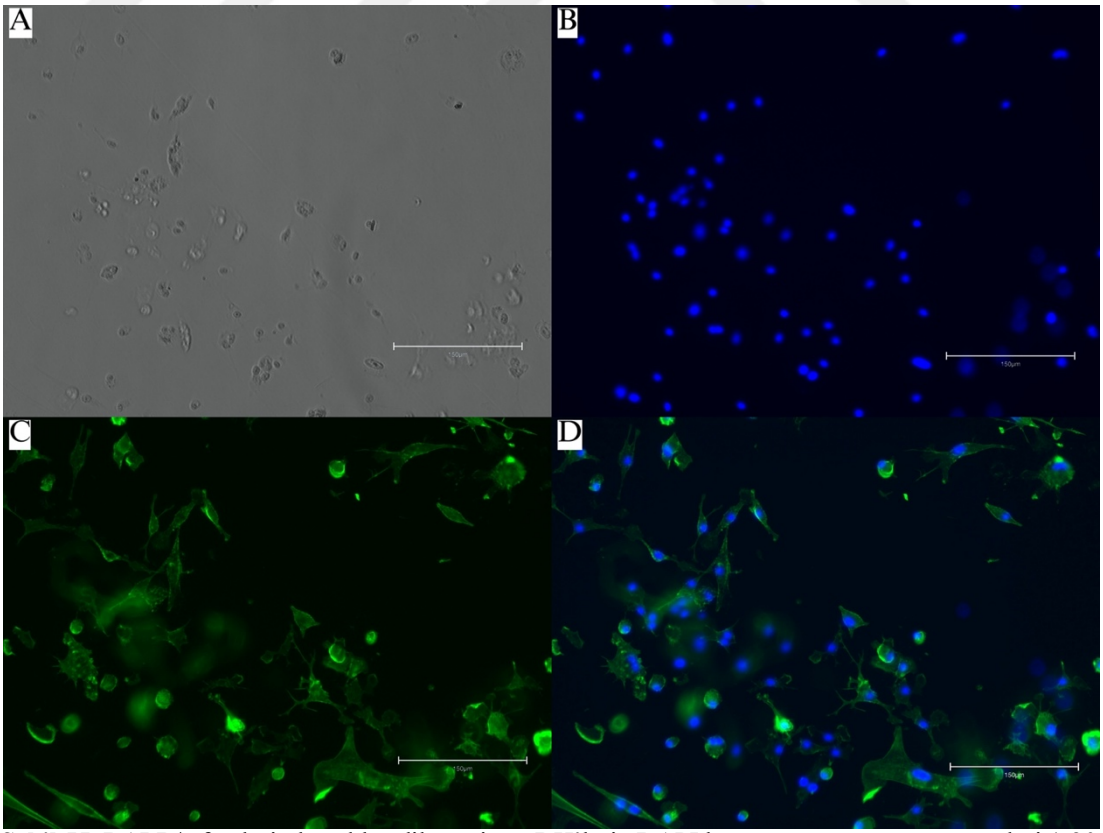
4.3. *4',6-diamidino-2-fenilindol* (DAPI) Boyama

Elde edilen primer DH'lerin 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) Boyama görüntüleri;

EVOS görüntüleme sistemi kullanılarak yapılan DAPI ve Phalloidin boyamaları sonucunda elde edilen hücresel görüntüler Şekil 54 ve 55'te sunulmuştur. Şekil 54A ve 55A'da hücrelerin genel morfolojisi gösterilmiştir. Şekil 54B ve Şekil 55B'de DAPI boyası (mavi) ile hücre çekirdekleri belirginleştirilmiştir. Şekil 54C ve Şekil 55C'de Phalloidin boyası (yeşil), hücre iskeletinin önemli bir bileşeni olan aktin filamentlerini görselleştirmektedir. Şekil 54D ve Şekil 55D'de ise bu iki boyamanın birleştirilmiş hali verilmiş olup, aktin filamentleri ile çekirdeklerin hücre içerisindeki lokalizasyonları net bir şekilde gözlemlenmiştir.



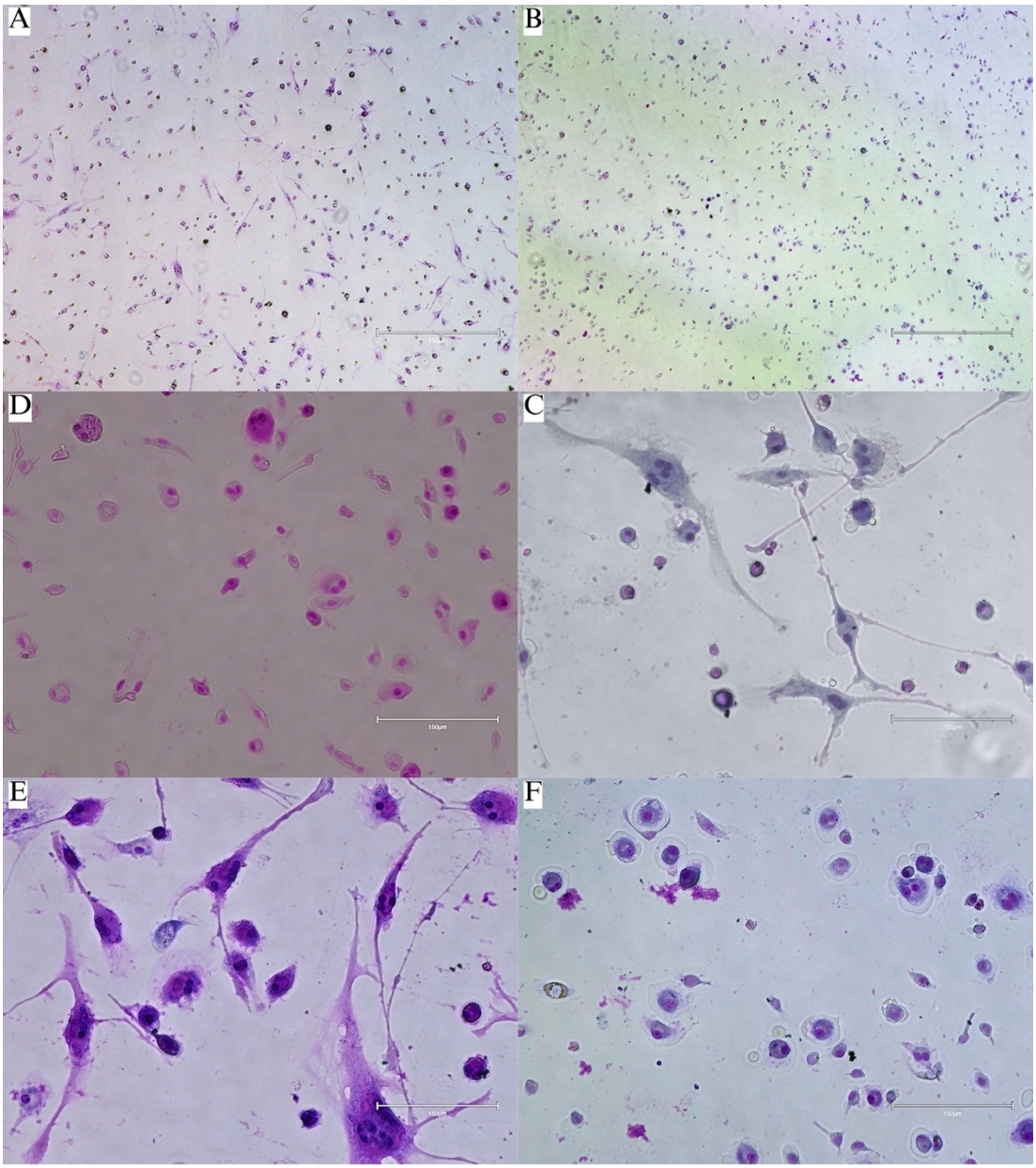
Şekil 54. C57BL/6 farelerinden elde edilen primer DH'lerin DAPI boyaması mikroskop görüntüleri (x40 büyütme).



Şekil 55. BALB/c farelerinden elde edilen primer DH'lerin DAPI boyaması mikroskop görüntüleri (x20 büyütme).

4.4. Diff Quik Boyama

EVOS görüntüleme sistemi kullanılarak elde edilen floresan mikroskop görüntüleri Şekil 56'da sunulmuştur. Şekil 56A-56C-56E'de primer dendritik hücreler (DH'ler), 56B–56D-57F'de primer makrofajlar görüntülenmiştir. Görüntüler, hücre morfolojisi ve hücresel yapılarının detaylı analizi amacıyla farklı büyütme seviyelerinde kaydedilmiştir.



Şekil 56. Primer DH'lerin (A-C-E) ve primer makrofajların (B-D-E) Diff Quik boyama mikroskop görüntüleri. (A-B x4 büyütme- C-D-E-F x20 büyütme)

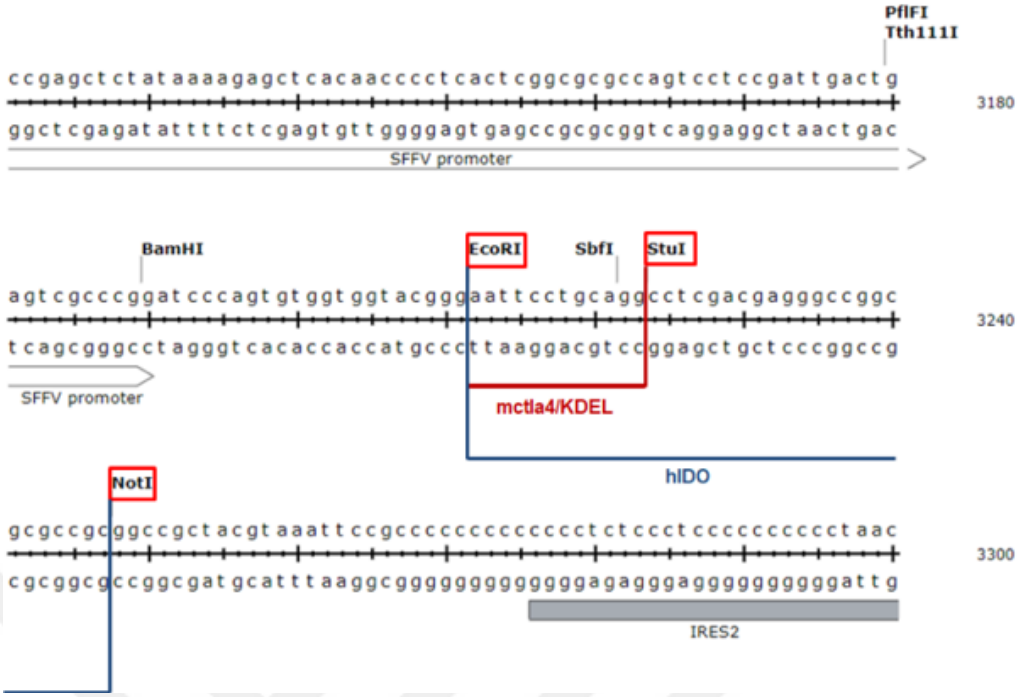
4.5. HEK293 FT Hücrelerinin Üretilmesi

Canlandırılan HEK293FT hücrelerinden elde edilen süspansiyonlar mikoplazma analizi için toplanmıştır. Mikoplazma testi, hücre kültürlerinde mikoplazma türlerinin varlığını tespit etmek amacıyla yapılmış olup, hücre kültürü güvenliği açısından kritik bir adımdır. Mikoplazmalar, hücre duvarı içermeyen ve hücre kültürlerinde kontaminasyona yol açabilen küçük bakterilerdir. Bu organizmalar hücre büyümesi, metabolizma ve genetik stabilite üzerinde olumsuz etkiler oluşturabilmekte, dolayısıyla deneysel sonuçların güvenilirliğini riske atabilmektedir.

Bu nedenle, HEK293FT hücre hattının kullanılmasından önce mikoplazma kontaminasyonu yönünden taranması gerekli görülmüş ve analiz bu doğrultuda gerçekleştirilmiştir. Yapılan mikoplazma testi sonucunda, HEK293FT hücre kültürlerinde herhangi bir Mycoplasma kontaminasyonuna rastlanmamıştır. Bu doğrultuda, lentiviral partikül üretiminde kullanılacak hücrelerin yeterli sayıya ulaşabilmesi amacıyla kültürler düzenli aralıklarla pasajlanarak çoğaltılmıştır.

4.6. Hazırlanan Vektörlerin Haritaları

Materyal ve Metot bölümünde kullanılan vektörlere ilişkin şemalar ilgili şekillerde sunulmuştur. Şekil 18'de tez çalışmasında kullanılan LeGO-iG.hIDO.shCD80.shCD86 vektörünün dizaynı, Şekil 20'de kontrol vektörümüz olan LeGO-iG2'nin detaylı şematik gösterimi, Şekil 57'de ise pLeGO-iG2 vektöründe mCTLA4 ve hIDO genlerinin klonlama bölgelerine ait ayrıntılı dizisi yer almaktadır.

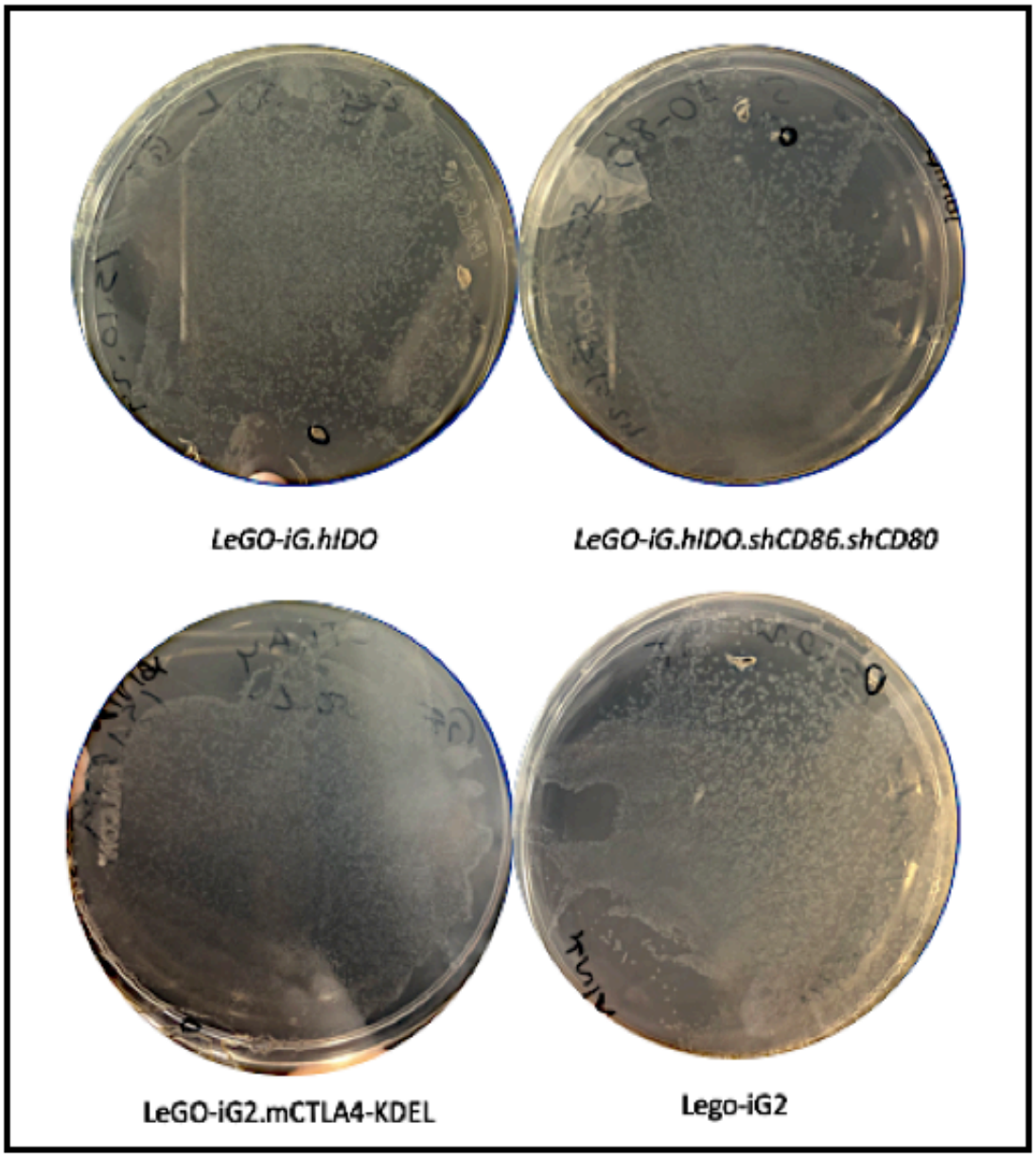


Şekil 57. pLeGo-iG2 vektöründe mCTLA4 ve hIDO klonlama bölgesinin ayrıntılı dizisi.

4.7. Plazmit Transformasonu ve Prep İzolasyonu

4.7.1. DH5& kompetan hücrelere transformasyon

Her bir plazmit dizaynı için ayrı ayrı hazırlanan petri kaplarına transformasyon sonrası ekim yapılmıştır. Ekim sonrasında oluşan koloniler tek tek incelenmiştir (Şekil 58). Plazmit transformasyonunu takiben, genetik homojenliği sağlamak ve olası kontaminasyonları önlemek amacıyla tek koloni izolasyonu yapılmıştır. Ekim yapılan petri kaplarındaki besiyeri ortamına Ampisilin antibiyotiği eklenmiştir. Bu sayede, sadece ilgili plazmit dizaynında bulunan antibiyotik direnç genini taşıyan bakterilerin koloni oluşturması beklenmiştir.



Şekil 58. Transformasyon sonrası petri koloni görüntüleri.

4.7.2. Midi-Prep izolasyonu

Ekimden sonra oluşan bakteriyel koloniler tek tek incelenmiş ve her plazmit dizaynına ait kolonilerden birer tane seçilerek, LB (Luria-Bertani) sıvı besiyeri içeren erlenmeyerlere aktarılmıştır. Erlenmeyerler 37°C sıcaklıkta ve 221 rpm çalkalama hızında bir gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlem, transformasyon sonrası bakteri hücrelerinin hedef plazmiti çoğaltarak yeterli hücre yoğunluğuna ulaşması amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen plazmitlerin konsantrasyonları,Qiagen-Maestro marka NanoDrop spektrofotometresi kullanılarak ölçülmüştür. Ölçümler sonucunda, her bir örnekte mikrolitre başına düşen plazmit DNA miktarı nanogram (ng/µL) cinsinden hesaplanmıştır (Tablo 16 ve 17). Bu işlem, elde edilen plazmitlerin sonraki aşamalarda kullanılabilirliğini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Tablo 16. Plazmitlerin konstrasyonları.

Lego_iG2	2307,61 ng/ul
LeGo-iG2-mCTLA4-KDEL	1797 ng/ul
LeGo-iG2-hIDO	2002,61 ug/ul
LeGO-iG.hIDO.shCD86.shCD80	1810,58 ng/ul

Tablo 17. Paketleme plazmitlerinin konstrasyonları.

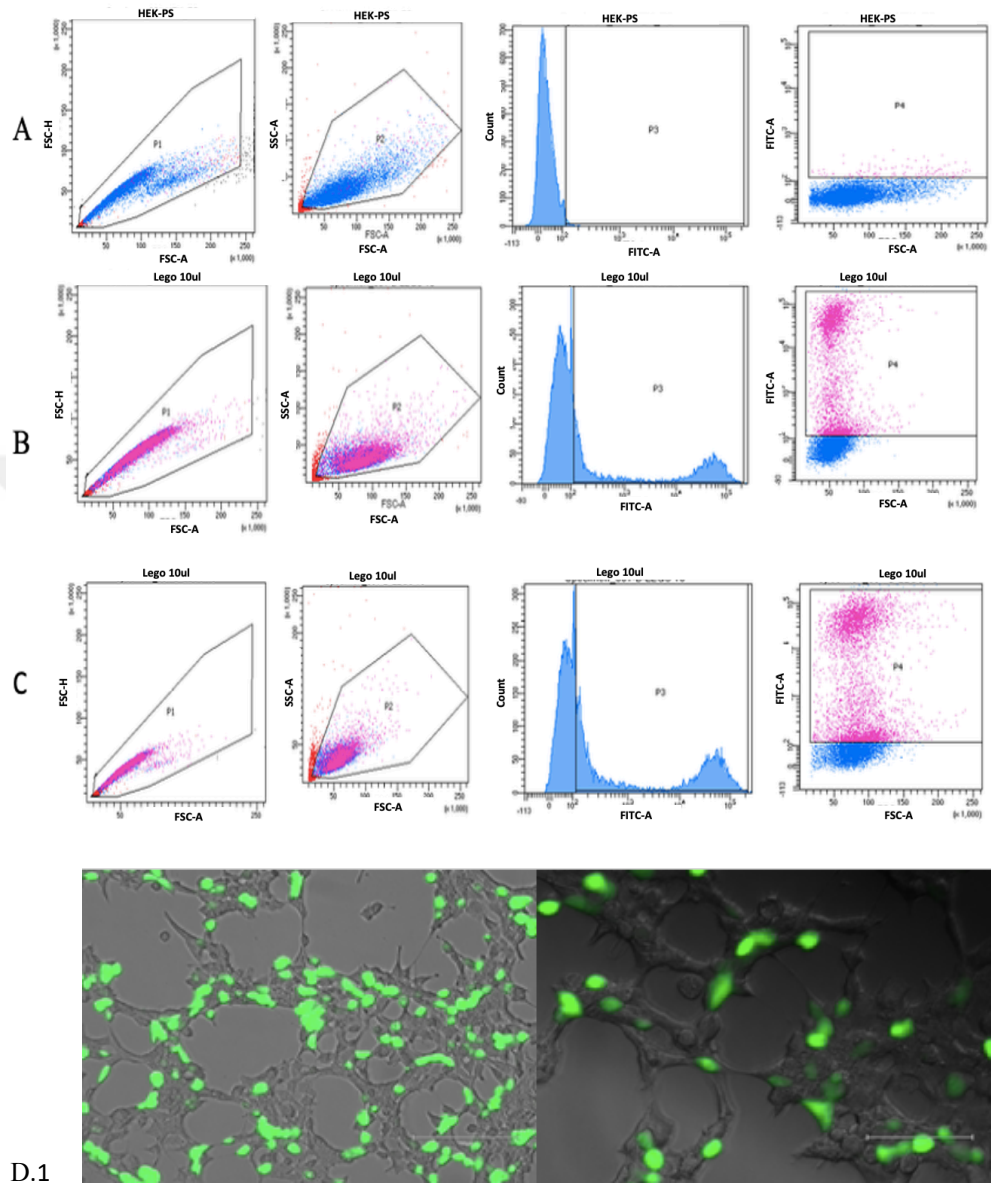
Rev	1647,1 ng/ul
VSV-G	1593,7 ng/ul
Gag/Pol	1713,97 ng/ul

4.8. HEK293 FT Hücreleri ile Lentivirüs Transdüksiyonu Etkinliği Belirlenmesi ve Primer Dendritik Hücrelere Terapötik Genin Aktarılması

Lentiviral partiküllerin üretiminin ardından, mililitre başına düşen virüs miktarının belirlenmesi gerekmektedir. Çünkü primer hücrelere transdüksiyon işlemi yapılırken, MOI (Multiplicity of Infection) değerine göre yapılması planlanmıştır. Bu nedenle, öncelikle HEK293FT hücrelerine lentiviral süpernatantların transdüksiyonu yapılarak mililitredeki virüs partikül sayısı, akan hücre analiz sistemi (flow cytometry) kullanılarak belirlenmiştir.

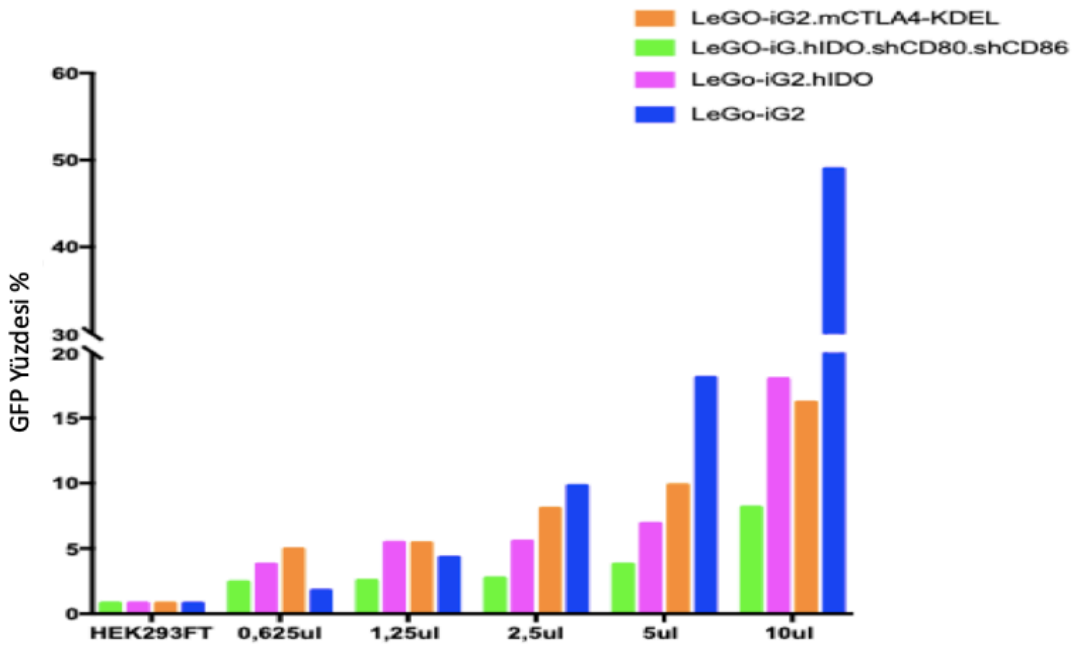
Şekil 59'da HEK293FT hücreleri ile gerçekleştirilen lentiviral transdüksiyonun akan hücre analiz sonuçları sunulmuştur. (A) panelinde, negatif kontrol olarak kullanılan ve herhangi bir GFP içermeyen HEK293FT hücrelerinin analiz sonucu gösterilmektedir. P4 kapısında FITC kanalında ışıma gözlemlenmemiştir; bu durum hücrelerin GFP taşımadığını göstermektedir. (B) panelinde, HEK293FT hücrelerine 10 µL Lego_iG plazmidi kullanılarak üretilen lentivirüsler ile yapılan transdüksiyon sonrasındaki GFP pozitif hücrelerin FITC kanalındaki ışıması gösterilmiştir. (C) paneli ise aynı transdüksiyonun farklı bir deneysel tekrarı olup, benzer şekilde GFP

ışımasının P4 kapısında yoğunlaştığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, üretilen lentiviral partiküllerin hedef hücrelere başarıyla entegre olduğunu doğrulamaktadır.



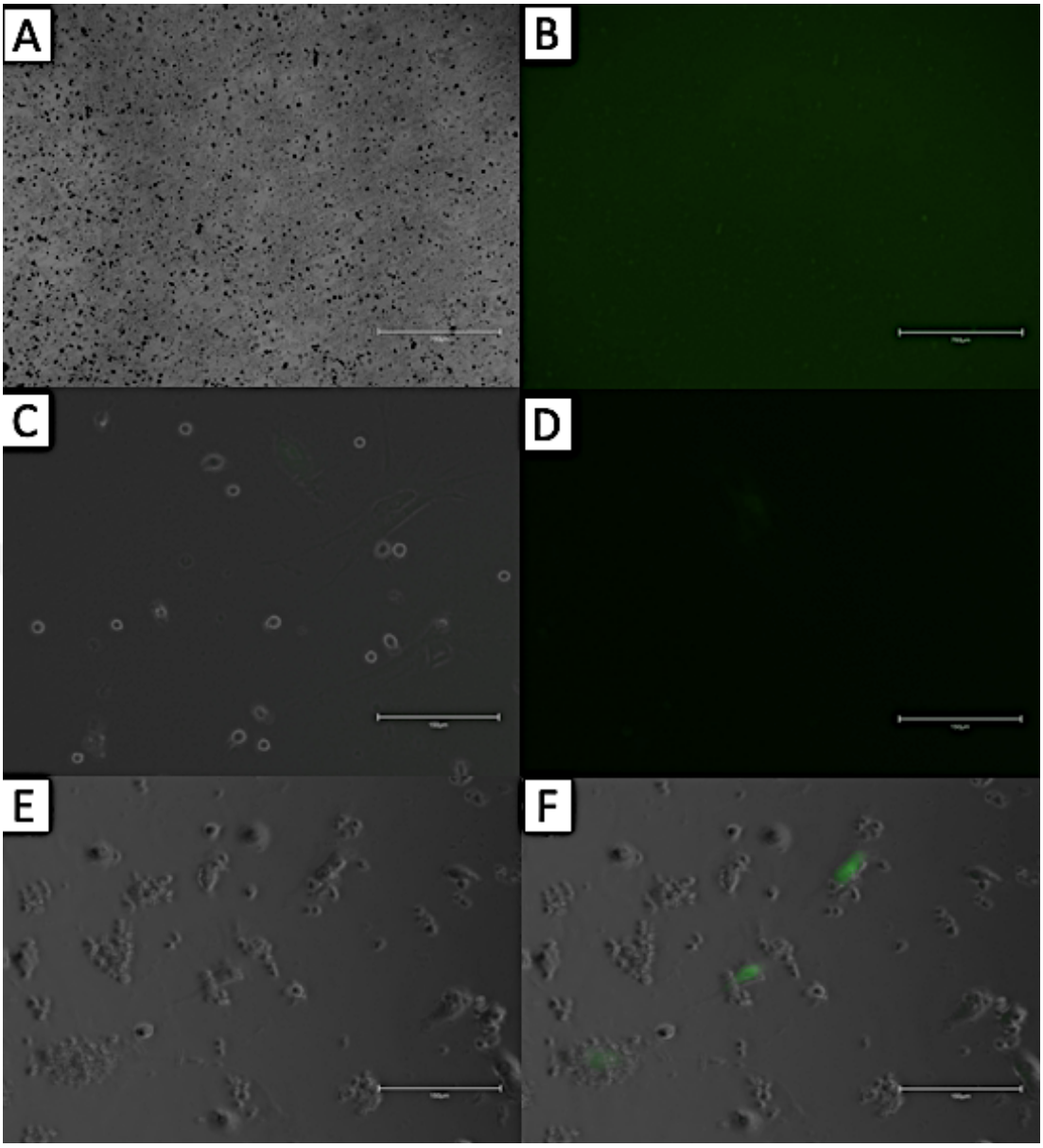
Şekil 59. HEK293 FT Hücre Hatlarına Terapötik Genin Aktarılmasından sonra akan hücre ölçer analizleri kapılama stratejisi (A-B-C) ve morfolojik görüntüsü (D-1.x20 büyütme, D-2. X40 büyütme)

Her bir kuyuya yöntemler kısmında anlatıldığı şekilde 10/5/2,5/1,25/0,625 ul titreler halinde lentivirüsler eklenmiştir ve akan hücre ölçer cihazında FITC pozitifliklerinin yüzdeleri alınarak excel'de hesaplama yapılarak ML içerisinde bulunan virüs partikülü miktarı hesaplanmıştır. Elde edilen virüs partiküllerinin yüzdeleri Şekil 60'ta gösterilmiştir.



Şekil 60. HEK293FT hücrelerine farklı dozlarda lentiviral vektörlerin transdüksiyon verimliliği.

Terapötik gen aktarımında MOI oranı esas alındığından, hücre başına düşen viral partikül miktarına göre hesaplanan MOI değerleriyle transdüksiyon uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Ancak deneylerde, hedef hücrelerin üzerine yüksek hacimlerde virüs içeren süspansiyon uygulanması sonucu, hücre canlılığında ciddi azalmalar gözlenmiş ve transdüksiyon etkinliği anlamlı düzeyde düşmüştür. Bu nedenle, primer DH sayılarak petri kaplarına ekilmiş ve ardından MOI:3 olacak şekilde, hem Protamin Sülfat (PS) varlığında transdüksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Virüsle temas süresi boyunca hücreler 37°C, %5 CO_2 içeren inkübatörde 3 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, hücrelerin morfolojik durumları mikroskobik olarak değerlendirilmiş ve hücrelerin kültür yüzeyinden ayrıldığı ve yapısal bütünlüklerini kaybettikleri gözlenmiştir (Şekil 61). Bu bulgular, transdüksiyon başarısının oldukça düşük olduğunu ve hücrelerin yüksek viral yükten olumsuz etkilendiğini ortaya koymuştur. A görseli primer DH'lerin morfolojik görüntüsünü B görseli transdükte olan hücrelerin GFP ışımasını göstermektedir (Şekil 61).



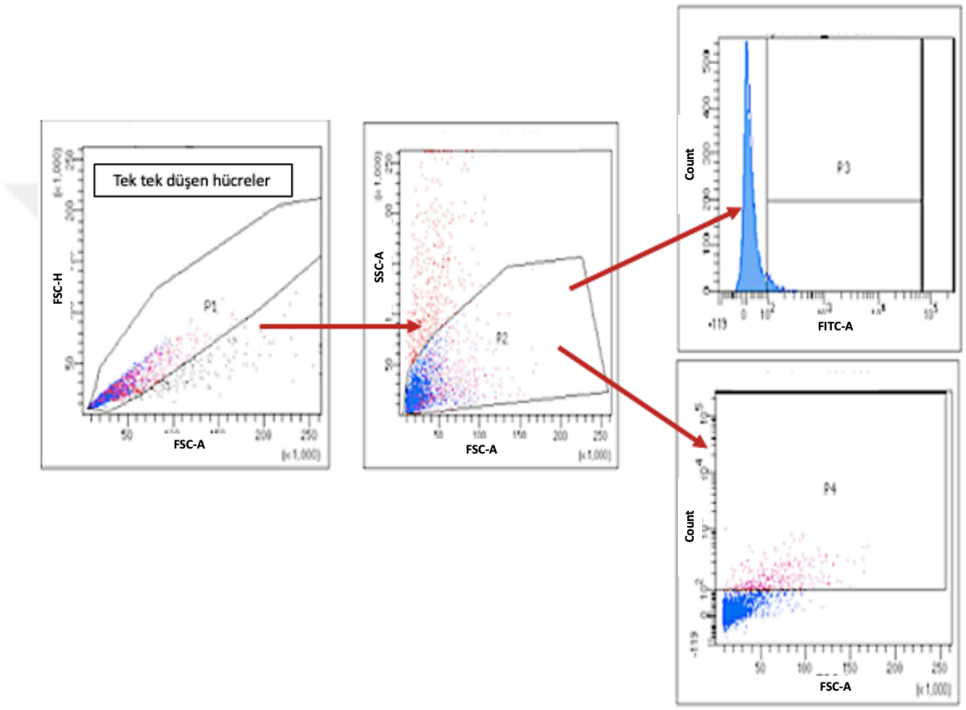
Şekil 61. DH'lere lenti virüs transdüksiyonu sonrası morfolojik görüntü analizi. (A-B x4 büyütme/ C-D-E-F x20 büyütme)

Şekil 62'da transdüksiyon sonrası GFP ekspresyonu, FITC kanalında yapılan analizle değerlendirildi. Plazmitler ile transdükte olan hücrelerin analizi için ilk olarak P1 ve P2 kapıları ile tekil ve canlı hücre popülasyonları seçildi. Ancak P2 kapısında, morfolojik bütünlüğünü kaybetmiş ve apoptotik/nekrotik hücrelerin yoğunluğu görülmüştür, bu durum MOI uygunluğu için yüksek miktarda virsü partikülü içeren solüsyonun hücrelerin üzerine eklenmesine bağlı sitotoksisite ile ilişkilendirilmiştir.

Transdüksiyon verimliliği P3 kapısında histogram analiz ile, P4 kapısında ise FITC pozitif hücrelerin yüzdesi üzerinden değerlendirilmiştir. P4 kapısında GFP pozitif hücre oranı %4,7 olarak görülmüştür. Bu oran, hedeflenen transdüksiyon

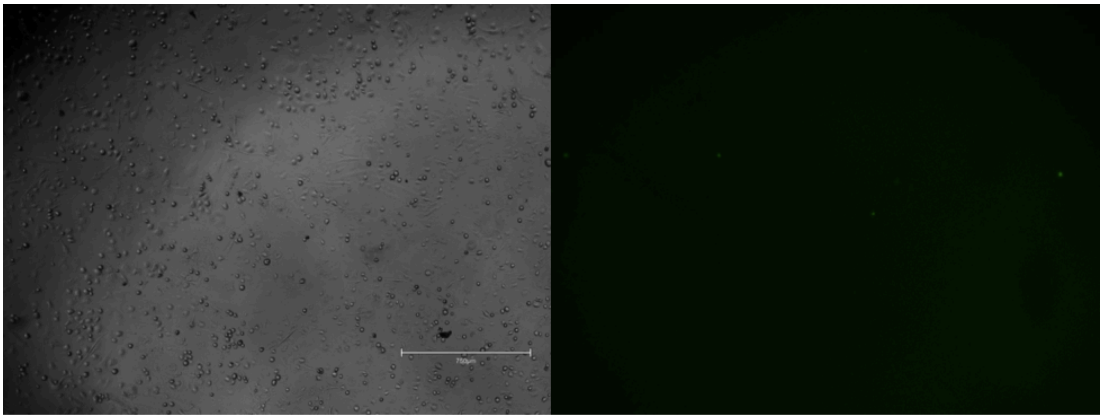
verimliliğinin oldukça altında olduğundan, yöntemin altarnetifleri denenmeye başlanmıştır.

Literatür araştırmalarımız sonucunda, lentiviral partiküllerin transdüksiyon verimliliğini artırmak amacıyla viral süpernatantların konsantrasyonunun önerildiği tespit edilmiştir. Lenti-X Konsantratörü, lentiviral süpernatantların hacmini azaltılmıştır. MOI:3, MOI:5, MOI10 olacak şekilde hem Protomin sülfat (PS) varlığında hem de PS yokluğunda transdüksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

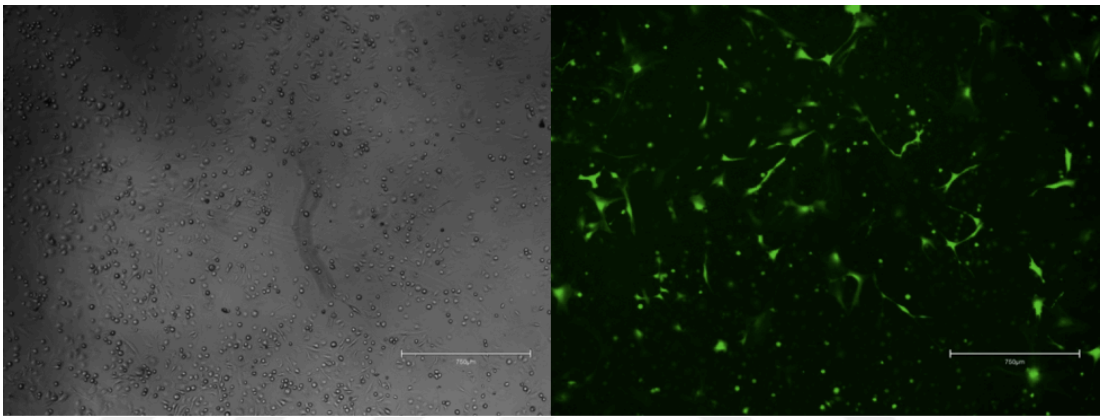


Şekil 62. DH transdüksiyonu akan hücre ölçer analizleri kapılama stratejisi.

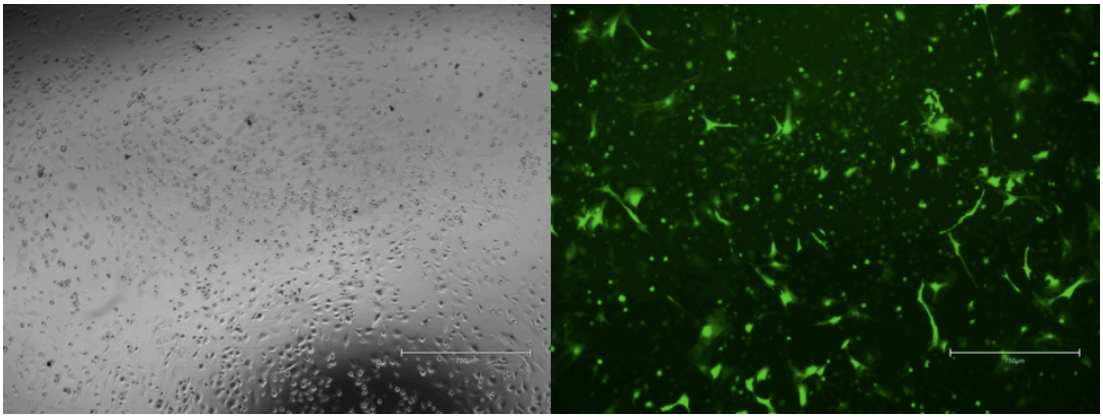
Farklı MOI oranlarında transdüksiyon uygulanan primer DH'lerin morfolojik görünümleri Şekil 63–68'de sunulmuştur. Her bir görsel, belirli bir MOI oranında gerçekleştirilen hücre transdüksiyonunu temsil etmektedir. Ayrıca Şekil 65, 67 ve 68'de PS varlığında elde edilen hücre transdüksiyon görüntüleri gösterilmektedir.



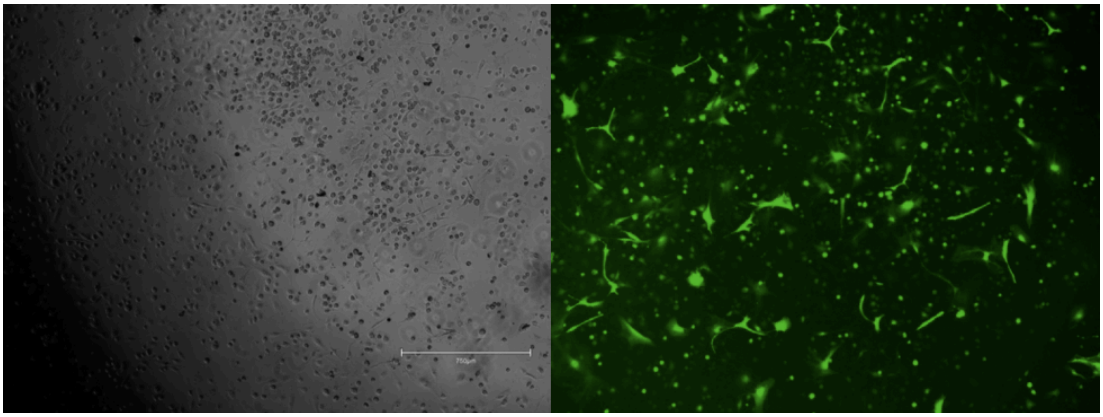
Şekil 63. Primer DH'lerin GFP ışıması (x4 büyütme)



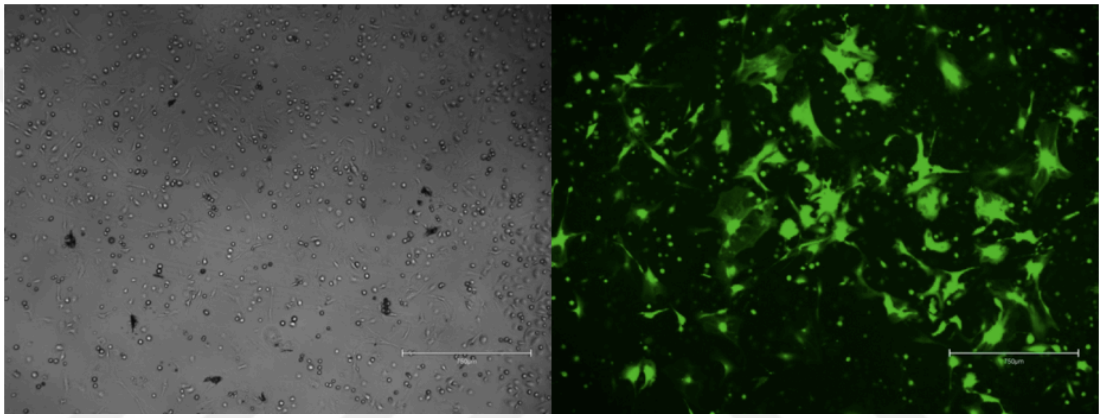
Şekil 64. Primer DH'lerin MOI:3 oranında transdüksiyonu -PS GFP ışıması (x4 büyütme)



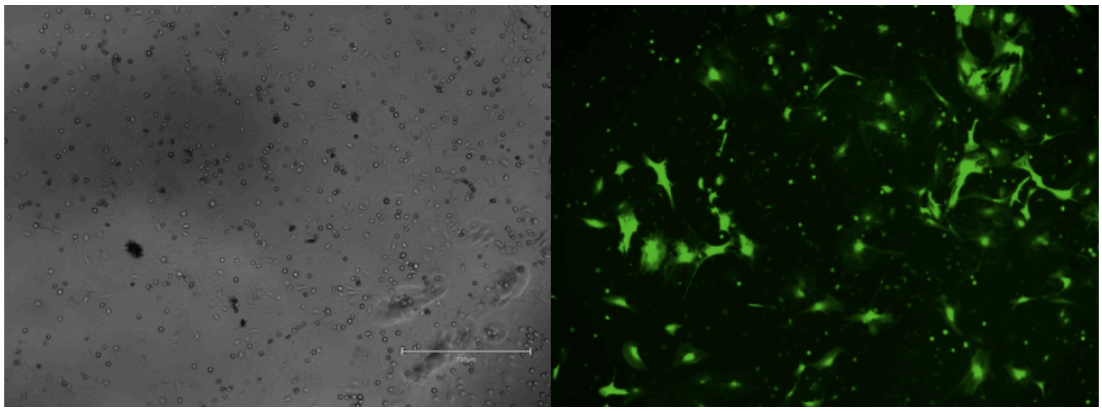
Şekil 65. Primer DH'lerin MOI:3 oranında transdüksiyonu +PS GFP ışıması (x4 büyütme)



Şekil 66. Primer DH'lerin MOI:5 oranında transdüksiyonu -PS GFP ışıması (x4 büyütme)

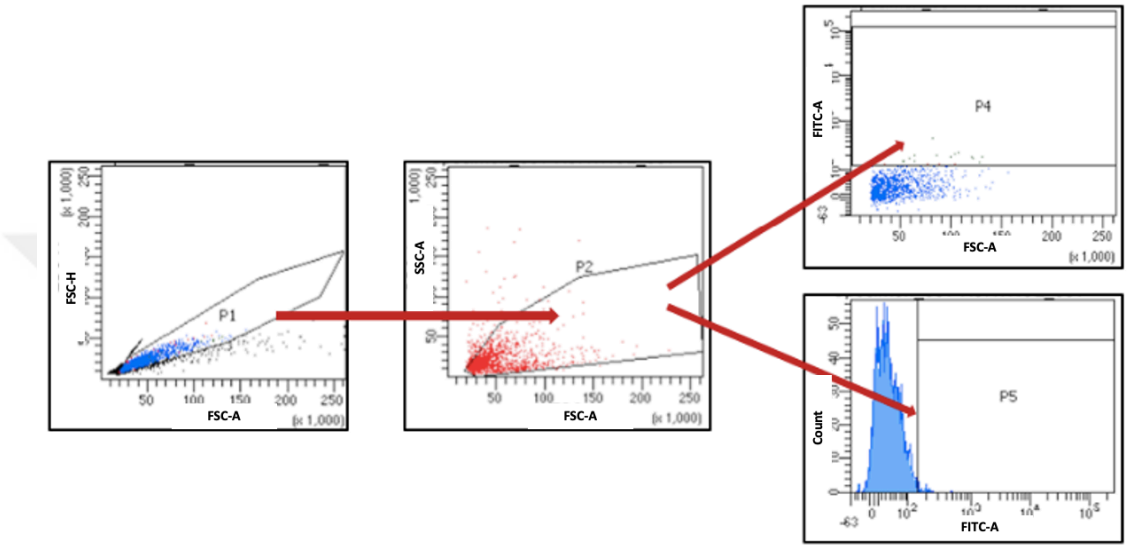


Şekil 67. Primer DH'lerin MOI:5 oranında transdüksiyonu +PS GFP ışıması (x4 büyütme)



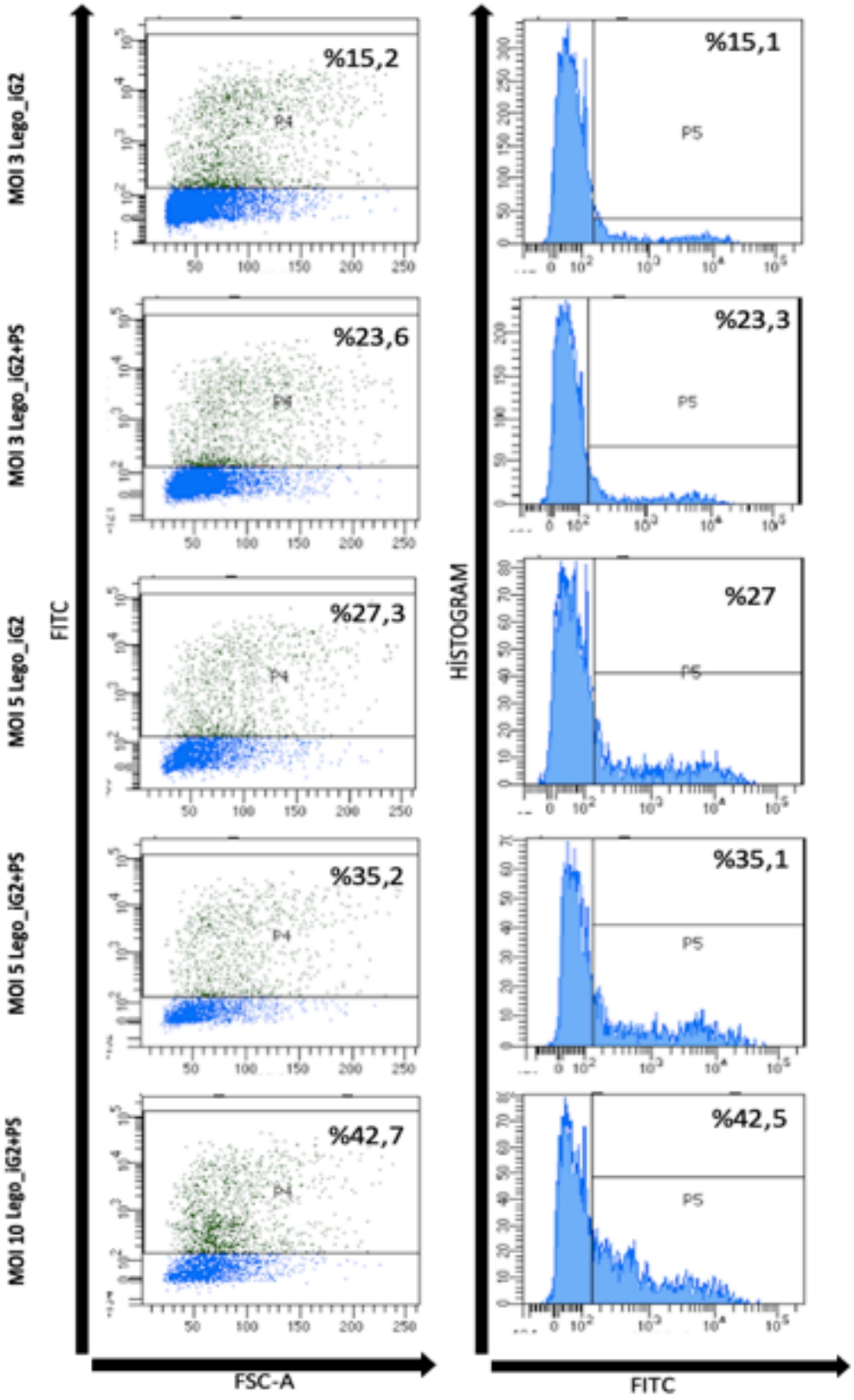
Şekil 68. Primer DH'lerin MOI:10 oranında transdüksiyonu +PS GFP ışıması (x4 büyütme)

Plazmitler GFP içerdiklerinden dolayı ve GFP FITC kanalında ışıma verdiğinden P4 kapısındaki yüzdeler analiz edildi. AF olarak (auto-floresan) transdüksiyon içermeyen hücrelerin analizinde (A) P4 kapısında yüzde değer 1,9 olarak analiz edildi (Şekil 69).



Şekil 69. Transdüksiyon içermeyen hücrelerin (oto-floresan) kapılama stratejisi.

Yapılan morfolojik değerlendirmeler sonucunda, farklı MOI değerleri (MOI:3, MOI:5 ve MOI:10) ile uygulanan lentiviral transdüksiyon denemeleri kapsamında, hücrelerin canlılığı, yapışma kapasitesi ve morfolojik bütünlükleri dikkatle incelenmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda, PS ilavesinin, viral partiküllerin hücre zarına daha etkin bağlanmasını sağladığı için transdüksiyon verimliliğini artırıcı etkide bulunduğunu göstermiştir. Özellikle MOI:5 + PS koşulunda, hücre morfolojisinin korunabildiği (Şekil 63-68) kültür tabanına adezyonun sürdüğü ve GFP pozitifliğinde artış gözlemlendiği belirlenmiştir. Akan hücre analizi sonucuda bu gözlemimizi doğrulamıştır. (Şekil 70-71)

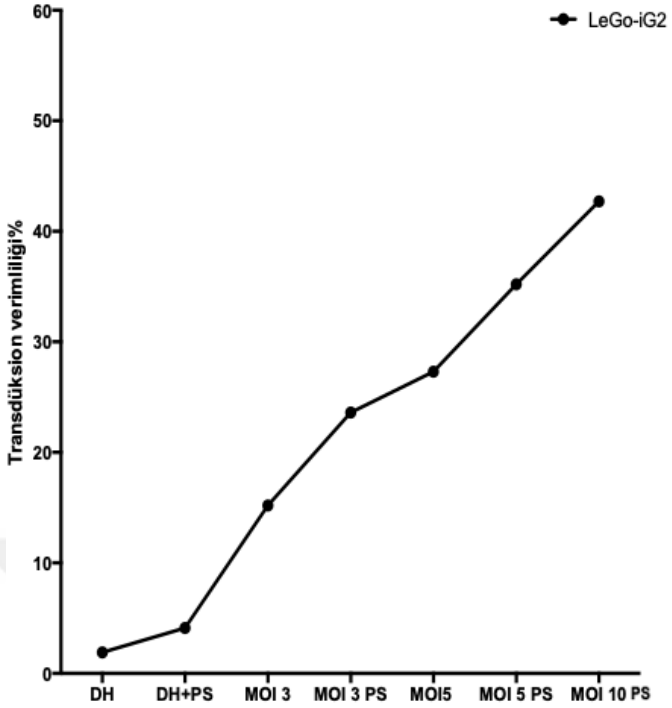


Şekil 70. DH transdüksiyon akan hücre ölçer analizleri.

Primer DH genetik olarak modifiye edilmesi amacıyla, LeGO-iG2 lentiviral vektörleri kullanılarak farklı MOI oranlarında transdüksiyon uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Deneysel protokol kapsamında hem PS içeren hem de PS içermeyen koşullar değerlendirilmiş; transdüksiyon verimliliğinin artırılması amacıyla plate santrifüj yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem, viral partiküllerin hücre yüzeyine daha etkin temas etmesini sağlamakta ve özellikle primer hücreler gibi transdüksiyon zorluğu yüksek hücre popülasyonlarında başarılı sonuçlar vermektedir.

Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda hem hücre canlılığını koruyan hem de transdüksiyon verimliliğini artıran en uygun koşulun MOI:5 oranında ve PS varlığında gerçekleştirilen transdüksiyon olduğu belirlenmiştir. Plate santrifüj eşliğinde yürütülen bu protokol ile, GFP pozitiflik oranları ve morfolojik bütünlük birlikte değerlendirilerek en verimli transdüksiyon parametresi seçilmiştir.

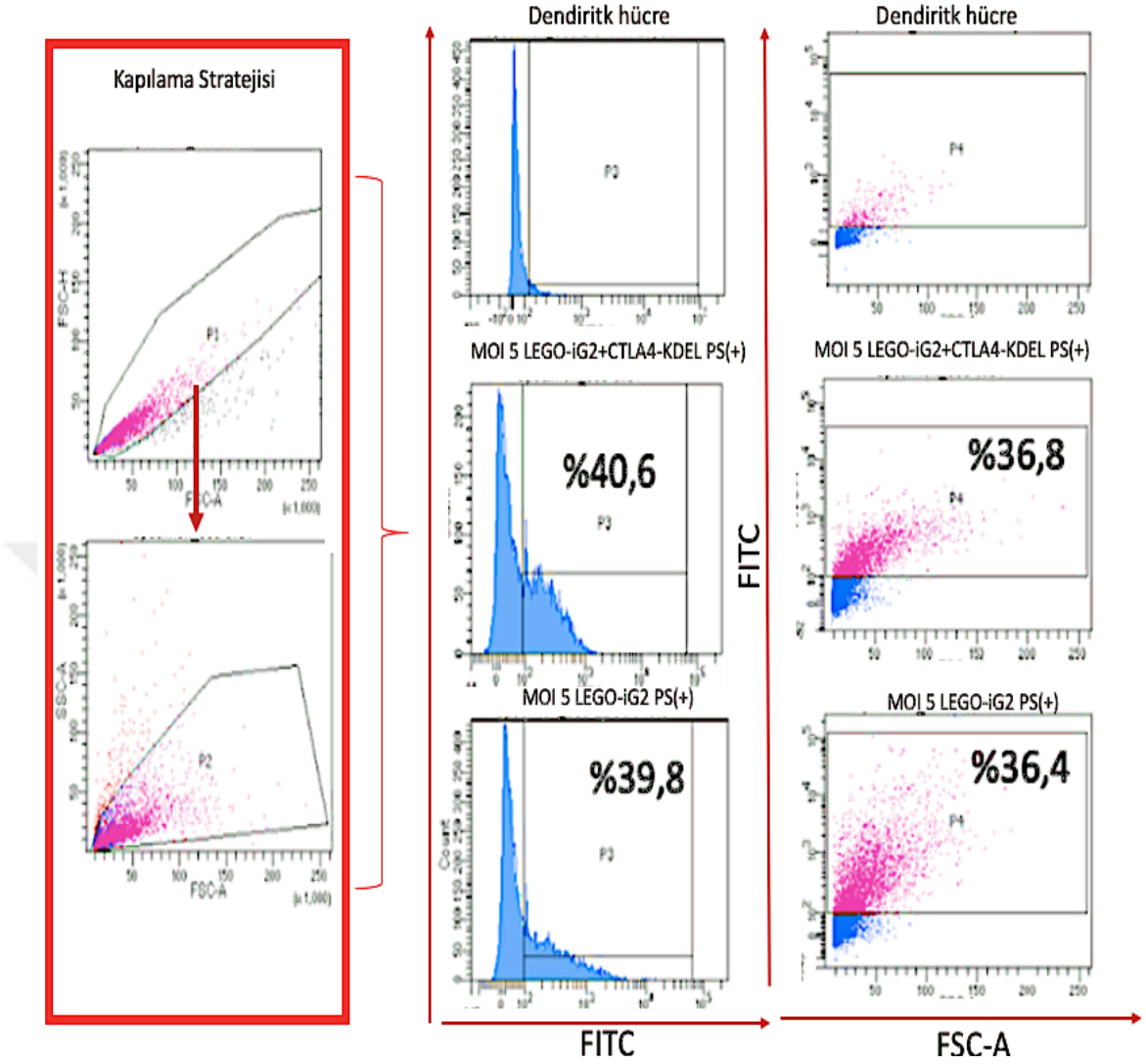
Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda, CIA modeli oluşturulan hayvanlara uygulanacak olan tolDH üretim sürecinde, MOI:5 + PS + plate santrifüj koşullarında transdükte edilen hücreler kullanılarak tolDH üretiminin gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.



Şekil 71. DH transdüksiyon yüzde ekspresyonu. Farklı MOI oranlarında ve PS varlığı/yokluğunda, plate santrifüj ile yapılan transdüksiyon sonrası GFP pozitif hücre yüzdeleri. En yüksek verimlilik MOI:5 + PS koşulunda elde edilmiştir.

Primer DH MOI:5 oranında transdüksiyon uygulanmasına karar verilmesinin ardından, aynı koşullar altında LeGO-iG2-mCTLA4-KDEL lentiviral vektöründen üretilen lentivirüsler ile de transdüksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Böylece, deneyde kullanılan farklı lentiviral konstraktların tamamının, aynı MOI oranında, PS varlığında ve plate santrifüj yöntemi ile transdüksiyon başarısı sağladığı gösterilmiştir. LeGO-iG2-mCTLA4-KDEL vektörüyle transdükte edilen hücrelerde %40,6 oranında GFP pozitiflik elde edilirken, LeGO-iG2 vektörü ile transdükte edilen hücrelerde ise PS varlığında %39,8 oranında pozitiflik tespit edilmiştir (Şekil 72).

Elde edilen bu veriler, plate santrifüj destekli ve PS içeren transdüksiyon protokolünün, transdüksiyon verimliliğini anlamlı düzeyde artırdığını ve hedef hücrelerin başarılı bir şekilde genetik olarak modifiye edilebildiğini ortaya koymaktadır. Optimizasyon çalışmalarının tamamlanmasının ardından, bu protokol esas alınarak üretilen terapötik dendritik hücreler, hayvan deneylerinde kullanılmak üzere hazırlanmıştır.

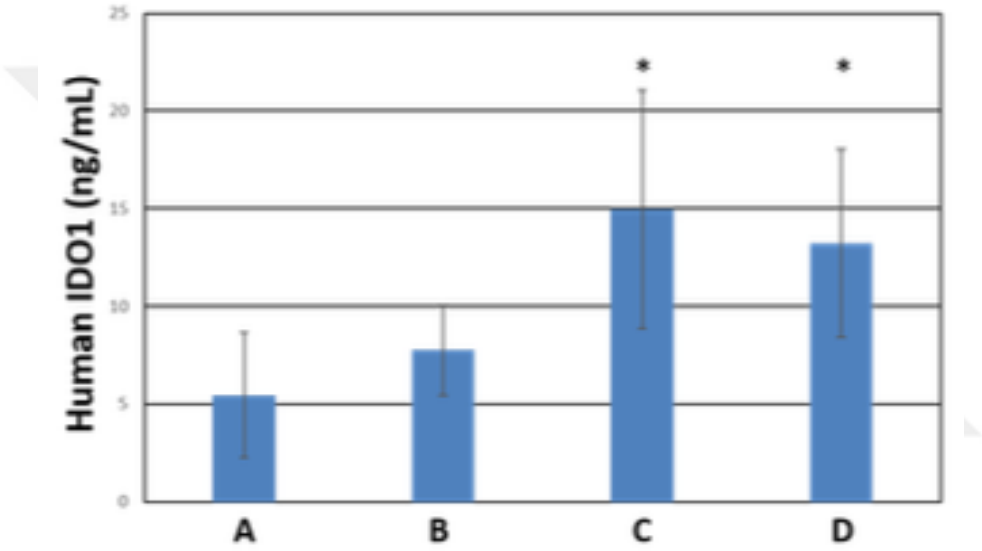


Şekil 72. DH transdüksiyon akan hücre ölçer analizFlow sitometri analizinde kullanılan kapılama stratejisi (solda) ve farklı koşullarda LeGO-iG2 ve LeGO-iG2-mCTLA4-KDEL lentiviral vektörleri ile transdükte edilen dendritik hücrelerin FITC kanalında değerlendirilmesi.

4.9. IDO, Sitokin Düzeylerinin Ölçümü

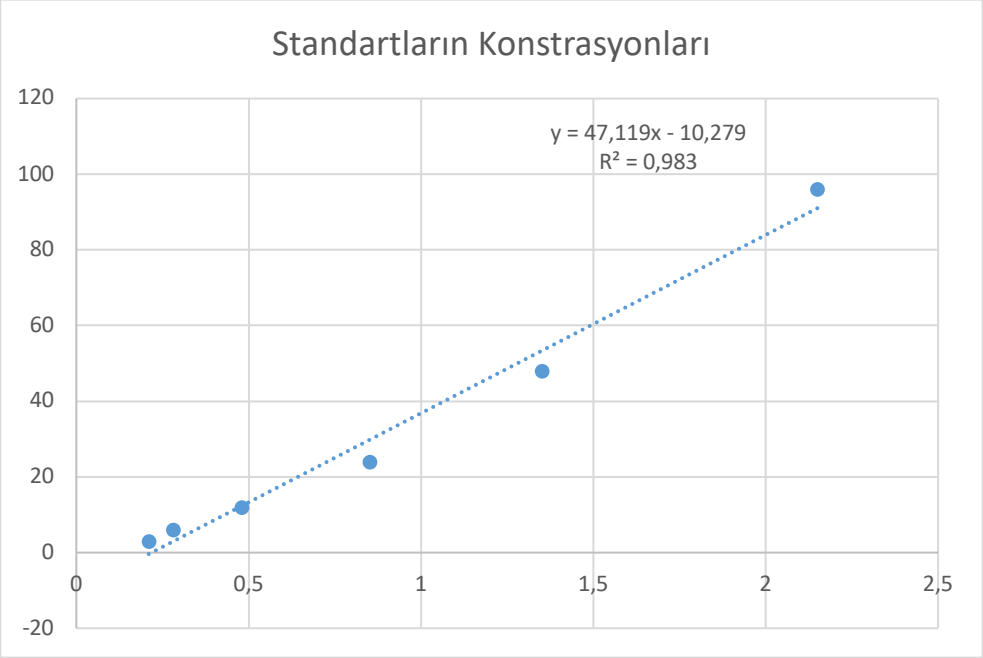
İnsan IDO Geninin RAW 264.7 Hücrelerine Transfeksiyonu ve ELISA ile Fonksiyonel Doğrulama için lentiviral paketleme sürecine geçilmeden önce, insan IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase) geninin ekspresyonunun doğrulanması amacıyla, genin taşıyıcısı olan lentiviral plazmit sistemlerinden LeGO.iG.hIDO ve LeGO.iG.hIDO.shCD80.shCD86 yapılarına sahip plazmitler kullanılarak RAW 264.7 makrofaj hücre hattına lipofeksiyon aracılı gen transferi gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyon işlemi için, kontrol grubu olarak uygunsuz plazmit içeren ve hIDO geni taşımayan pCMV/β-gal vektörü kullanılmıştır. Ayrıca, negatif kontrol grubunu oluşturmak üzere transfekte edilmemiş RAW 264.7 hücreleri de değerlendirmeye

alınmıştır. Transfeksiyonun ardından hücre kültürü lizatlarında insan IDO protein düzeylerini kantitatif olarak belirlemek amacıyla ticari olarak temin edilen bir hIDO ELISA kiti kullanılmıştır. Yapılan analiz sonucunda, LeGO.iG.hIDO ve LeGO.iG.hIDO.shCD80.shCD86 vektörleri ile transfekte edilen hücrelerde hem uygunsuz plazmit grubuna hem de negatif kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmış IDO ekspresyonu tespit edilmiştir (Şekil 73). Bu sonuçlar, kullanılan plazmitlerin insan IDO genini başarılı şekilde ifade ettiğini ve takip eden lentiviral üretim aşamaları için uygun vektörler olduğunu doğrulamıştır.



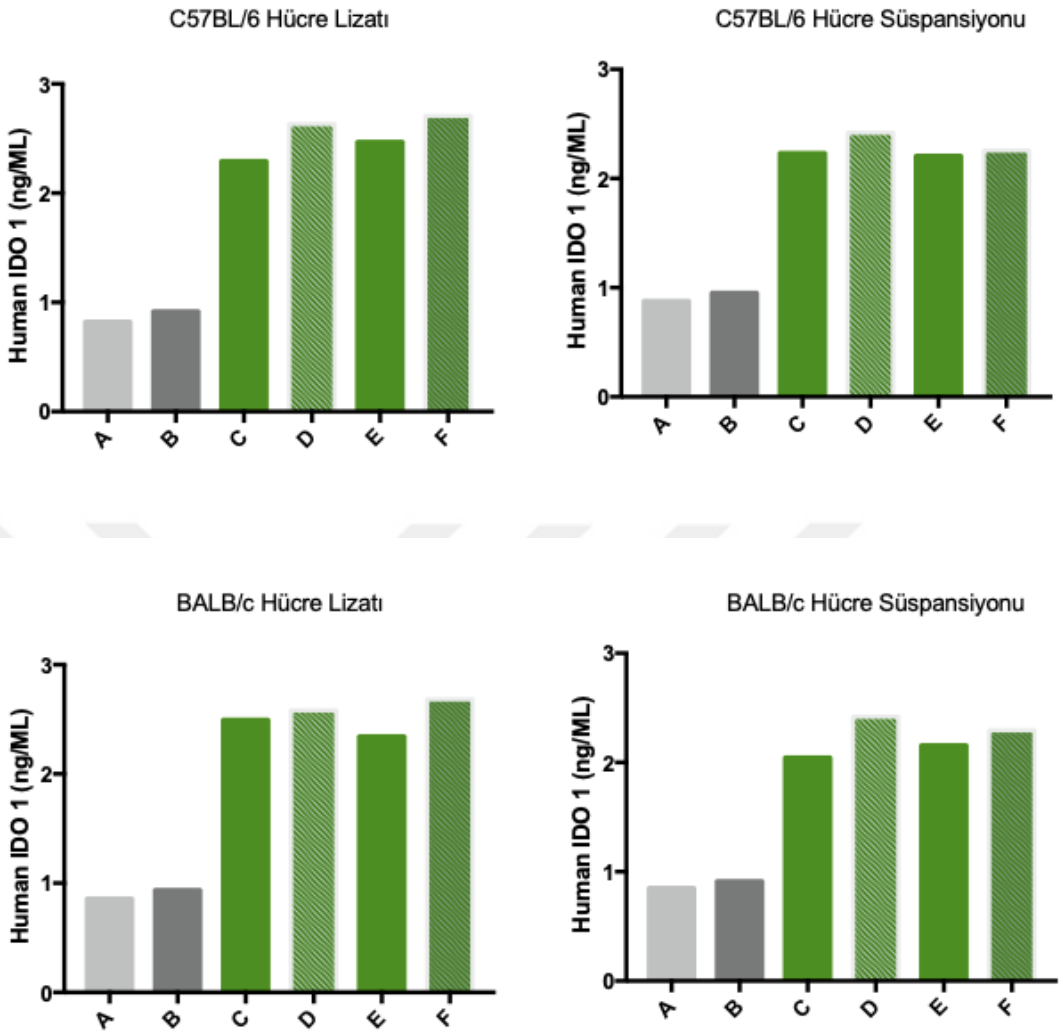
Şekil 73. pLeGO-iG2/hIDO ile transfekte Raw 264.7 hücrelerinde IDO düzeyleri. LeGOiG.hIDO (C) ve LeGOiG.hIDO.shCD80.shCD86 (D) ile transfekte edildi. Kontrol olarak transfekte edilmemiş hücreler (A) Uygunsuz plasmid (negative control) olarak pCMV/βgal (B)

BALB/c ve C57BL/6 farelerinden elde edilen primer DH'lere MOI:5 oranında transdüksiyon yapıldı ve daha sonra DH kültür lizatlarındaki hIDO düzeylerinin ölçümü için ticari ELISA testi kullanıldı. (Şekil 74).



Şekil 74. ELISA analizi için standartlar kullanılarak hesaplanmış standart eğri.

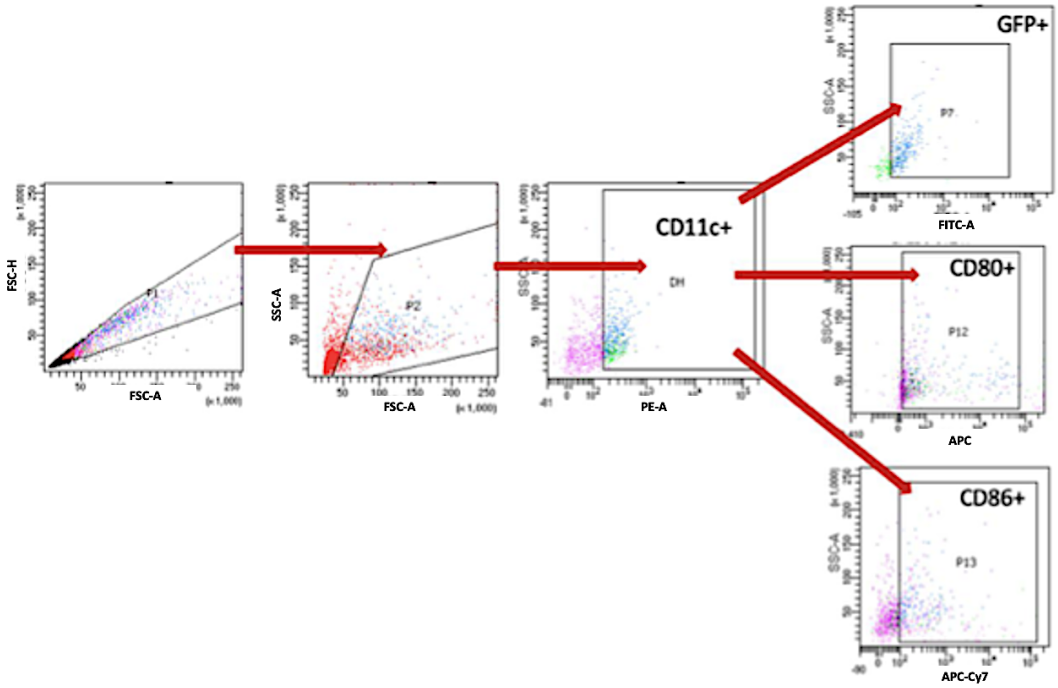
Primer DH'ler farklı lentiviral konstraktlarla transdükte edilmiştir ve deney grupları oluşturulmuştur. (A) yalnızca primer DH (negatif kontrol), (B) yalnızca LPS ile stimüle edilmiş primer DH (LPS kontrol), (C) LeGO-iG. hIDO ile transdükte edilen DH, (D) LeGO-iG.hIDO + LPS, (E) LeGO-iG.hIDO.shCD80.shCD86, ve (F) LeGO-iG.hIDO.shCD80.shCD86 + LPS. A ve B grupları, transfeksiyon veya transdüksiyon uygulanmamış negatif kontrol gruplarıdır. Tüm gruplarda uygun inkübasyon süreleri tamamlandıktan sonra, hem kültür ortamında süspansiyon halinde bulunan hücreler hem de kültür yüzeyine yapışık hücreler ayrı ayrı toplanmıştır. Ardından bu iki fraksiyondan elde edilen hücre süspansiyonları ve hücre lizatı örneklerinden, IDO protein düzeyleri, kantitatif ELISA yöntemi ile ölçülmüştür. A grubu (negatif kontrol) ile karşılaştırıldığında, transdüksiyon uygulanan tüm gruplarda IDO düzeylerinde anlamlı artış gözlenmiştir. Özellikle hem süspansiyon hem de hücre lizatı örneklerinde, LeGO-iG.hIDO (C), LeGO-iG.hIDO + LPS (D), LeGO-iG.hIDO.shCD80.shCD86 (E) ve LeGO-iG.hIDO.shCD80.shCD86 + LPS (F) gruplarında IDO konsantrasyonlarının arttığı tespit edilmiştir. Bu artış, transdüksiyon işlemiyle taşınan IDO geninin hücrelerde başarıyla ifade edildiğini ve ek olarak LPS stimülasyonunun bu ekspresyon düzeyini artırıcı yönde etkide bulunduğunu ortaya koymuştur.



Şekil 75. Primer DH transdüksiyon sonrası IDO konsantrasyonu (pLeGO-iG2/hIDO ve pLeGO-iG2/hIDO-sh80-sh86 ile transfekte primer DH IDO düzeyleri) (A) yalnızca primer DH (negatif kontrol), (B) yalnızca LPS ile stimüle edilmiş primer DH (LPS kontrol), (C) LeGO-iG.hIDO ile transdükte edilen DH, (D) LeGO-iG.hIDO + LPS, (E) LeGO-iG.hIDO.shCD80.shCD86, ve (F) LeGO-iG.hIDO.shCD80.shCD86 + LPS.

4.10. TolDH'lerin *in vivo* olarak kullanılacak kalite ve miktarda üretilmesi

Primer DH'lere gen transdüksiyonu yapıldıktan sonra CD80-86 analizleri yapıldı. Akan hücre ölçerde gerçekleştirilen analizin kapılama stratejisi şekil 76'da gösterilmiştir.



Şekil 76. BALB/c ve C57BL/6 fare ırkından elde edilen Primer DH'lerin transdüksiyonu sonrası LPS ile uyarılmasının CD80-CD86 yüzde ekspresyonu kapılama stratejisi.

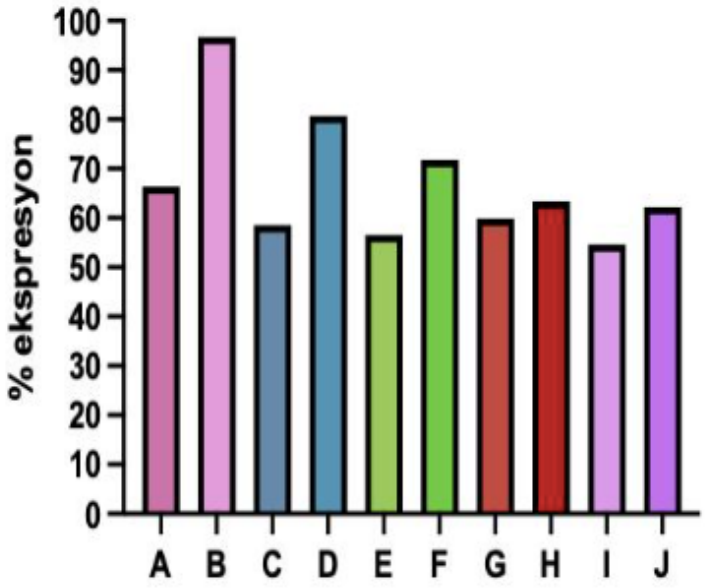
İki farklı ırktan elde edilen primer DH'lere yapılan transdüksiyon sonrası CD80 ve CD86 kostimülatör moleküllerinin yüzey ekspresyon seviyeleri yüzdelik olarak karşılaştırılmıştır (Şekil 77-79:CD80, Şekil 78-80:CD86). A'dan J'ye kadar harfler ile numaralandırılmış gruplarda hem lentiviral transdüksiyonun hem de aynı gen ile transdüksiyon yapılan koşulların LPS stimülasyonunun bu moleküllerin ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir.

Negatif kontrol grubu olan A (DH) ve B (DH + LPS) gruplarında, fizyolojik düzeyde doğal ekspresyon gözlenmiştir. LPS uyarımı ile B grubunda A grubuna göre bir artış eğilimi kaydedilmiştir; bu durum LPS'nin DH'leri olgunlaştırma etkisine paraleldir.

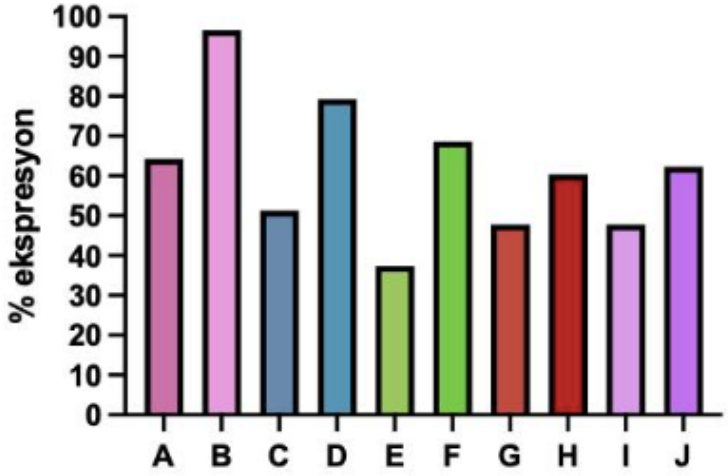
C ve D grupları (LeGO-iG2 vektörü ile transdükte edilen hücreler), vektör varlığının ekspresyonu orta düzeyde artırabildiğini, ancak LPS eklendiğinde bu artışın daha belirgin hâle geldiğini göstermektedir. E ve F gruplarında (LeGO-iG2-mCTLA4-KDEL), özellikle F grubunda (LPS ile uygulama) CD80 ve CD86 ekspresyon düzeylerinde anlamlı düşüş gözlenmiştir. Bu durum, mCTLA4-KDEL yapısının kostimülatör moleküller üzerinde baskılayıcı bir etki oluşturduğunu ve LPS ile uygulandığında dahi bu baskının korunduğunu göstermektedir.

G ve H grupları (LeGO-iG2-hIDO ve +LPS kombinasyonu), IDO'nun immunoregülasyon yaptığı ve hücre aktivasyonunu baskıladığı yönündeki literatürle uyumlu şekilde, özellikle H grubunda CD80/CD86 ekspresyonunun azaldığı görülmektedir. I ve J gruplarında ise, CD86 genine yönelik shRNA taşıyan LeGO-iG.hIDO.shCD80.shCD86 vektörü kullanılmıştır. Bu gruplarda, CD80 ve özellikle CD86 ekspresyonunda belirgin azalma gözlenmiştir. LPS uygulamasına rağmen J grubunda (shCD86 + LPS) ekspresyon seviyelerinin baskılanmış olması, hedefe yönelik gen susturma stratejisinin etkili olduğunu göstermektedir.

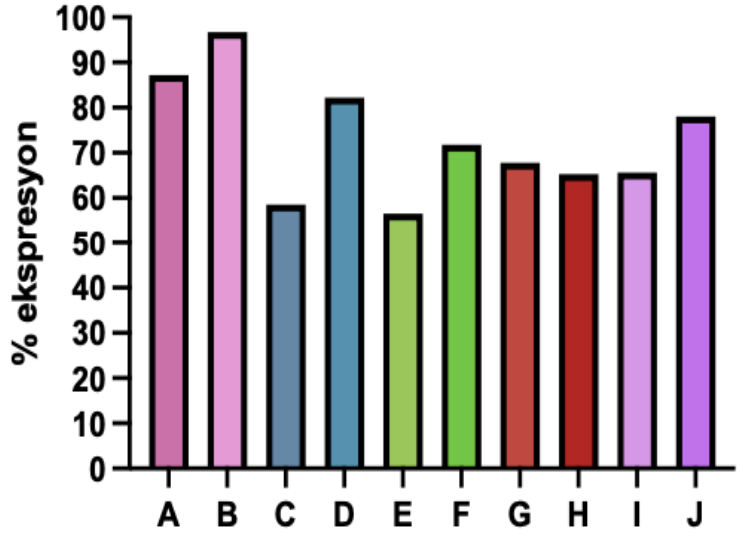
İki farklı ırk üzerinde yapılan analizler sonucunda, primer olarak elde edilen hücrelere gen transdüksiyonu uygulanmasının, CD80 ve CD86 gibi kostimülatör moleküllerin yüzey ekspresyonunu anlamlı ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Bu bulgu, terapötik yaklaşımımızın hücresel düzeyde etkili olduğunu ortaya koymaktadır.



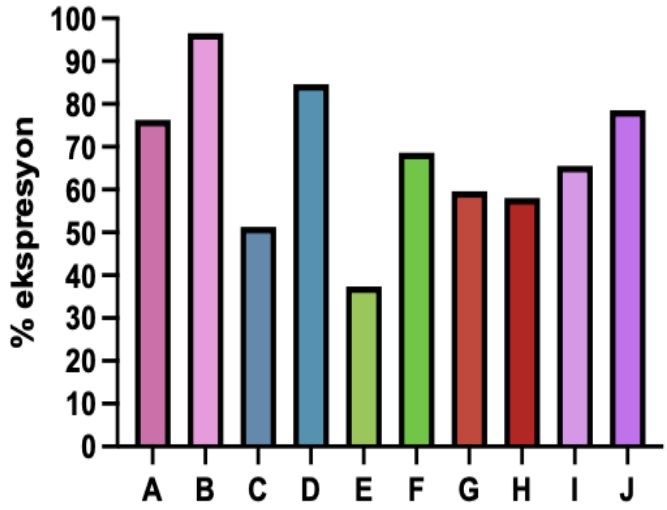
Şekil 77. BALB/c farelerinden elde edilen primer hücrelerin CD80 yüzde ekspresyonu. Grafikte yer alan koşullar; A. Primer DH –B. Primer DH+LPS- C. Primer DH + Lego_iG2- D. Primer DH + Lego_iG2 + LPS- E. Primer DH + LeGo-iG2- mCTLA4-KDEL- F. Primer DH + LeGoiG2-mCTLA4-KDEL + LPS- G. Primer DH + LeGo-iG2-hIDO- H. Primer DH + LeGo-iG2-hIDO + LPS- I. Primer DH + LeGO- iG.hIDO.shCD80.shCD86- J Primer DH + LeGO-iG.hIDO. shCD80.shCD86+ LPS



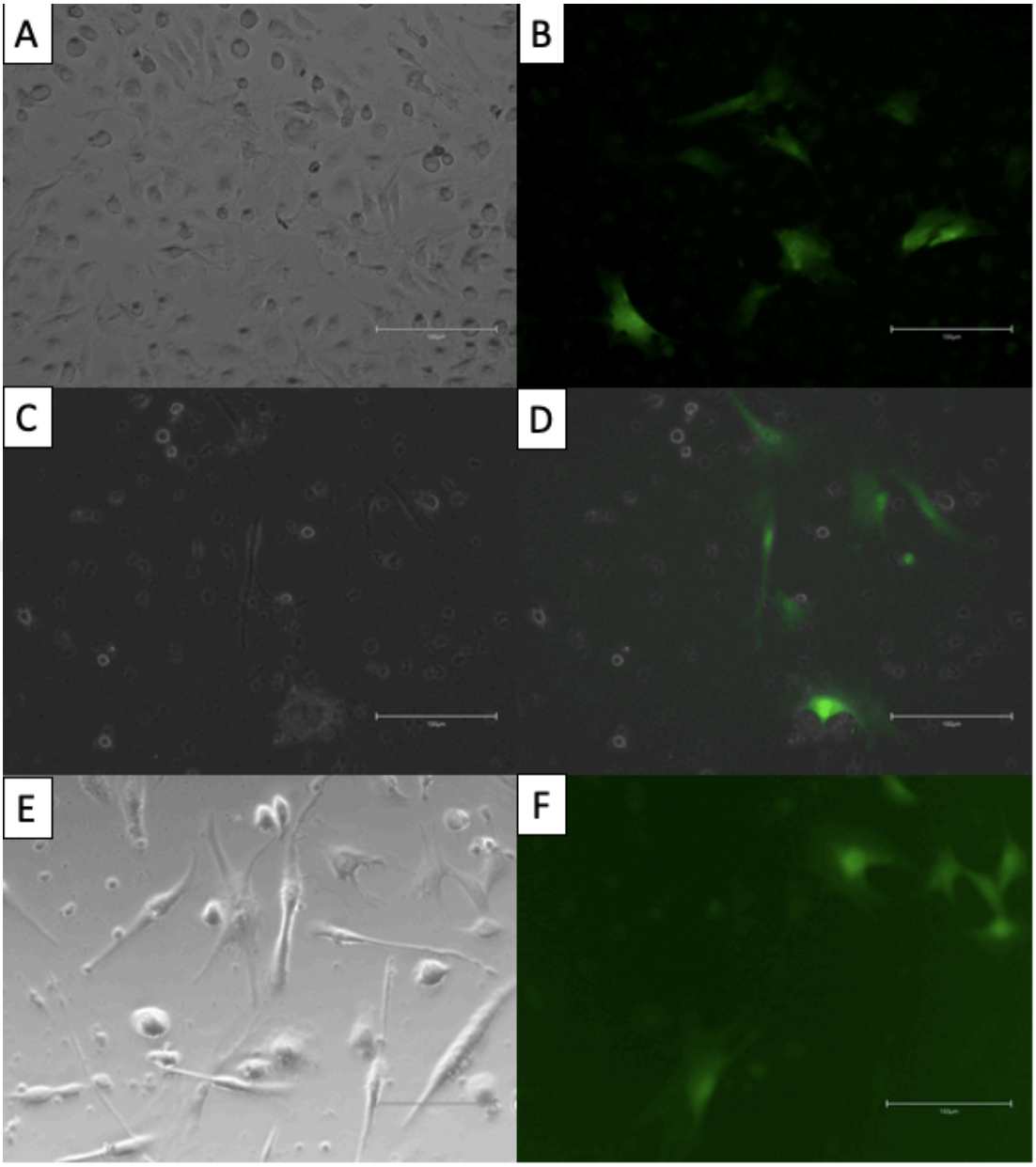
Şekil 78. BALB/c farelerinden elde edilen primer hücrelerin CD86 yüzde ekspresyonu. Grafikte yer alan koşullar; A. Primer DH –B. Primer DH+LPS- C. Primer DH + Lego_iG2- D. Primer DH + Lego_iG2 + LPS- E. Primer DH + LeGo-iG2- mCTLA4-KDEL- F. Primer DH + LeGoiG2-mCTLA4-KDEL + LPS- G. Primer DH + LeGo-iG2-hIDO- H. Primer DH + LeGo-iG2-hIDO + LPS- I. Primer DH + LeGO- iG.hIDO.shCD80.shCD86- J Primer DH + LeGO-iG.hIDO.shCD80.shCD86+ LPS



Şekil 79. C57BL/6 farelerinden elde edilen primer hücrelerin CD80 yüzde ekspresyonu. Grafikte yer alan koşullar; A. Primer DH –B. Primer DH+LPS- C. Primer DH + Lego_iG2- D. Primer DH + Lego_iG2 + LPS- E. Primer DH + LeGo-iG2- mCTLA4-KDEL- F. Primer DH + LeGoiG2-mCTLA4-KDEL + LPS- G. Primer DH + LeGo-iG2-hIDO- H. Primer DH + LeGo-iG2-hIDO + LPS- I. Primer DH + LeGO- iG.hIDO.shCD80.shCD86- J Primer DH + LeGO-iG.hIDO.shCD80.shCD86+ LPS



Şekil 80. C57BL/6 farelerinden elde edilen primer hücrelerin CD86 yüzde ekspresyonu. Şekil 83 ve 84'te grafikte yer alan koşullar; A. Primer DH –B. Primer DH+LPS- C. Primer DH + Lego_iG2- D. Primer DH + Lego_iG2 + LPS- E. Primer DH + LeGo-iG2- mCTLA4-KDEL- F. Primer DH + LeGoiG2-mCTLA4-KDEL + LPS- G. Primer DH + LeGo-iG2-hIDO- H. Primer DH + LeGo-iG2-hIDO + LPS- I. Primer DH + LeGO-iG.hIDO.shCD80.shCD86- J. Primer DH + LeGO-iG.hIDO.shCD80.shCD86+ LPS



Şekil 81. LPS ile uyarılan ve GFP taşıyan primer DH'lerin mikroskop görüntüleri. (x20 büyütme)

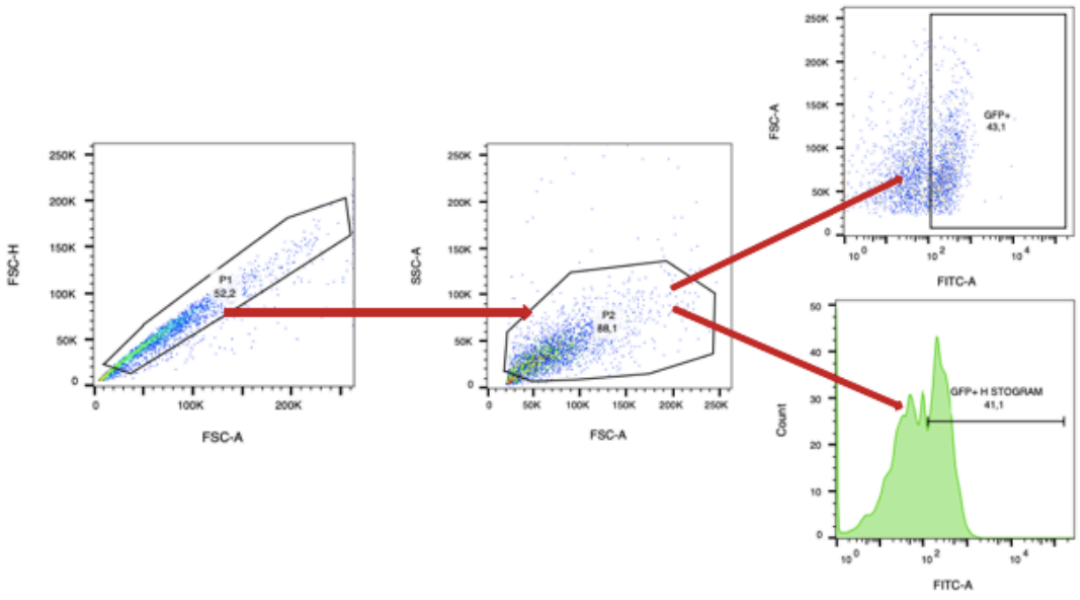
4.11. Artritli farelere terapötik TolDH uygulaması

BALB/c farelerinin deney gruplarının tamamında CIA modeli oluşturulup takip süreleri ve eklem ölçümleri tamamlanmıştır. Bu sürece paralel olarak tolDH üretimi yapılmış ve hayvanlara verilmeden önce bazı gruplar kültür ortamında kuyularda tip II kolajen ile uyarılarak antijene spesifik TolDH üretimi de yapılmıştır. Antijen uyarımı, enjeksiyon zamanından 12 saat önce uygulanmıştır. Transdüksiyon sonrası elde edilen hücreler**,** akan hücre ölçer ile değerlendirilmiş, GFP ekspresyonu belirlenmiştir. TolDH uygulanma koşulları tablo 18'de gösterilmiştir.

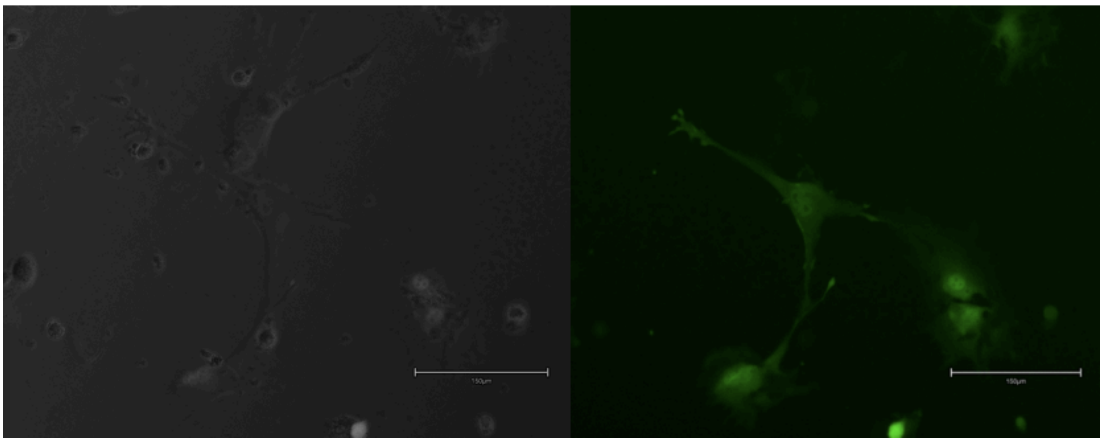
Tablo 18. TolDH uygulama koşulları

Primer DH	Primer DH+ LeGO_iG2	Primer DH+ LeGO_iG2_mCTLA4-KDEL	Primer DH+ LeGO_iG2_hIDO	Primer DH+ LeGO_iG_hIDO.shCD80/shCD86
Primer DH + 10 ug/mL kolajen	Primer DH+ LeGO_iG2+ 10 ug/mL kolajen	Primer DH+ LeGO_iG2_mCTLA4-KDEL + 10 ug/mL kolajen	Primer DH+ LeGO_iG2_hIDO+ 10 ug/mL kolajen	Primer DH+ LeGO_iG_hIDO.shCD80/shCD86+ 10 ug/mL kolajen

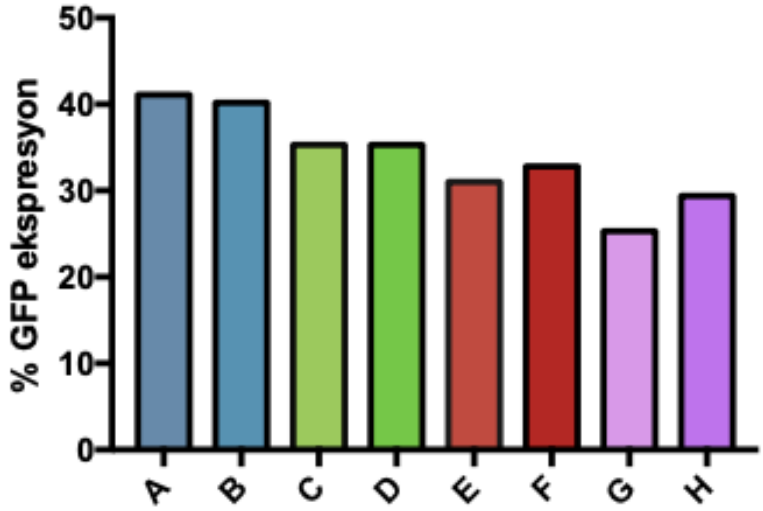
Lentiviral transdüksiyon sonrası elde edilen dendritik hücrelerde GFP ekspresyon düzeyleri flow sitometri ile analiz edilmiştir. A grubunda (%40,8) yalnızca LeGO-iG2 ile transdükte edilen hücrelerde en yüksek GFP ekspresyonu gözlenmiştir. B grubunda (%39,9) aynı vektör ile kollajen uyarımı sonrasında benzer seviyede ekspresyon tespit edilmiştir. C ve D gruplarında sırasıyla LeGO-iG2-mCTLA4-KDEL (%37,2) ve LeGO-iG2-mCTLA4-KDEL + kollajen (%36,1) ile transdükte edilen hücrelerde GFP pozitiflik oranlarının azaldığı görülmüştür. E ve F gruplarında LeGO-iG2-hIDO (%33,5) ve LeGO-iG2-hIDO + kollajen (%32,4) ile transdükte edilen hücrelerde ekspresyon düzeyleri daha düşük seyretmiştir. G (%27,1) ve H (%25,6) gruplarında ise LeGO-iG. hIDO.shCD86 vektörü ile yapılan transdüksiyon sonrası GFP pozitiflik oranlarının daha düşük düzeylerde kaldığı belirlenmiştir.



Şekil 82. Primer hücrelerin transdüksiyonu sonrası GFP ışıması kapılama stratejisi.



Şekil 83. Enjeksiyon öncesi GFP ekspresyon EVOS görüntüsü (x20 büyütme)



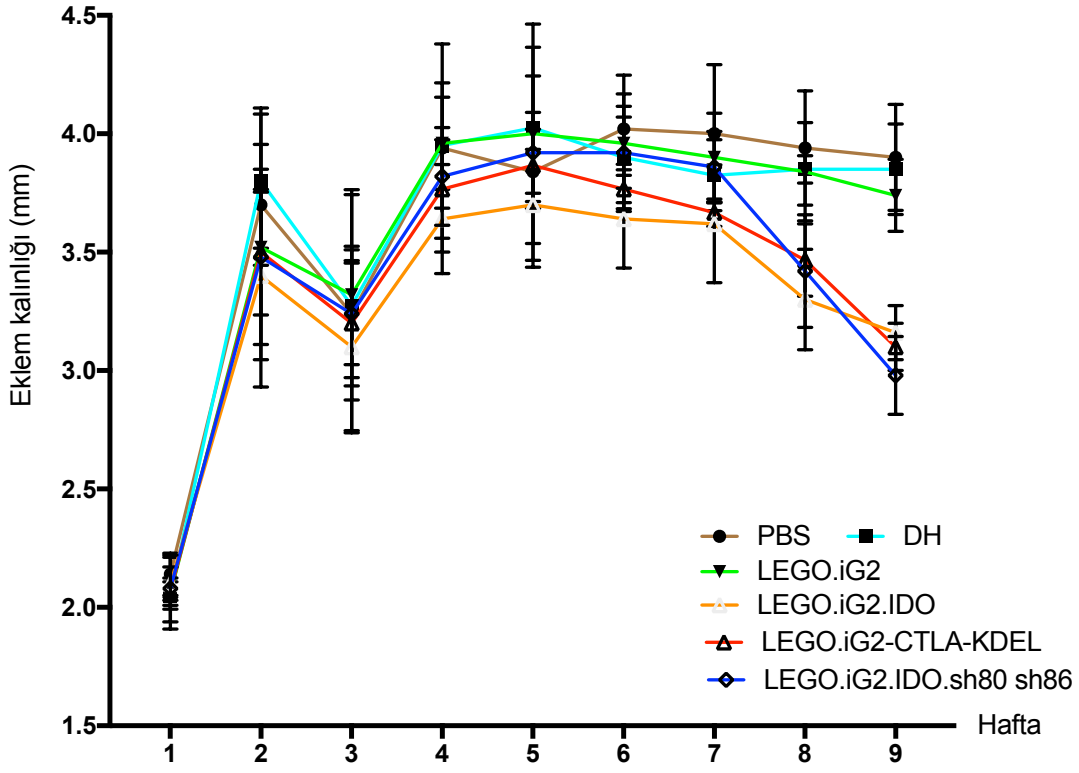
Şekil 84. Lentiviral vektörler ile transdükte edilen dendritik hücrelerde enjeksiyon öncesi GFP pozitiflik oranları. Her bir grup farklı vektör ve kolajen uyarımı kombinasyonunu temsil etmektedir.
A. Lego_iG2 B. Lego_iG2+Kollajen C. LeGo-iG2-mCTLA4-KDEL D. LeGo-iG2-mCTLA4- KDEL + Kollajen E. LeGo-iG2-hIDO F. LeGo-iG2-hIDO+Kollajen G. LeGO-iG.hIDO.shCD80.shCD86 H. LeGO-iG.hIDO.shCD80.shCD86 + Kollajen

Şekil 85'te BALB/c farelerinde oluşturulan CIA modelinin haftalık olarak ölçülen eklem kalınlığı (mm) değerleri sunulmaktadır. Deney gruplarına, farklı lentiviral vektörlerle genetik olarak modifiye edilmiş dendritik hücreler uygulanmıştır: PBS (negatif kontrol), DH, LeGO.iG2, LeGO.iG2.IDO, LeGO.iG2.CTLA4-KDEL ve LeGO.iG2.IDO.shCD80.shCD86.

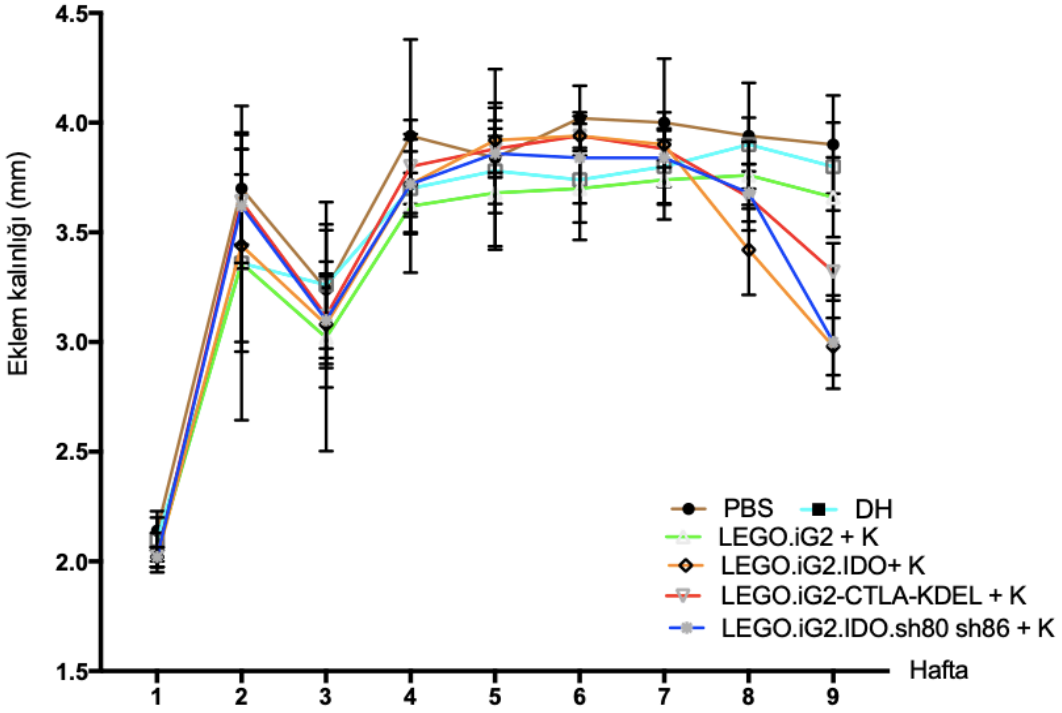
Deneysel modelin oluşturulması için ilk immunizasyon enjeksiyonu 1. haftada, ikinci (booster) kolajen enjeksiyonu ise 3. haftada uygulanmıştır. Tüm gruplarda 1–3. haftalar arasında eklem kalınlığında belirgin bir artış gözlemlenmiş, bu durum bize

artrit modelinin başarılı şekilde indüklendiğini ve inflamatuvar sürecin başladığını göstermiştir. 6. haftada, terapötik müdahale olarak TolDH'ler intraartiküler olarak uygulanmış ve bu enjeksiyondan sonra haftalık eklem kalınlığı ölçümleri ve klinik skorlamalar takip edilmiştir.

PBS ve sadece DH uygulanan gruplar, 3. haftadan itibaren en yüksek eklem kalınlığına sahip olmuş ve bu durum 6. haftaya kadar korunmuştur. Bu gruplarda, hastalığın ilerleyici bir şekilde devam ettiği gözlenmiştir. Benzer şekilde, yalnızca GFP taşıyan LeGO.iG2 vektörü ile modifiye edilen hücrelerin uygulandığı grupta da yüksek eklem kalınlığı tespit edilmiştir; bu bulgu, taşıyıcı vektörün tek başına terapötik bir etki göstermediğini doğrulamaktadır. Tedavi gruplarımız olan LeGO.iG2.IDO, LeGO.iG2.CTLA4-KDEL ve LeGO.iG2.IDO.shCD80.shCD86 ile modifiye edilmiş TolDH uygulanan gruplarda, 4. haftadan itibaren eklem kalınlıklarında düşüş eğilimi gözlenmiş ve bu azalma 9. haftaya kadar devam etmiştir. Özellikle LeGO.iG2.IDO.shCD80.shCD86 grubunda bu düşüş daha belirgin olup, 9. hafta sonunda en düşük eklem kalınlığı bu grupta kaydedilmiştir. Bu grubu sırasıyla IDO ve CTLA4-KDEL taşıyan TolDH grupları takip etmiştir.



Şekil 85. TolDH uygulamasının artrit modelinde eklem kalınlığı üzerine etkisi.



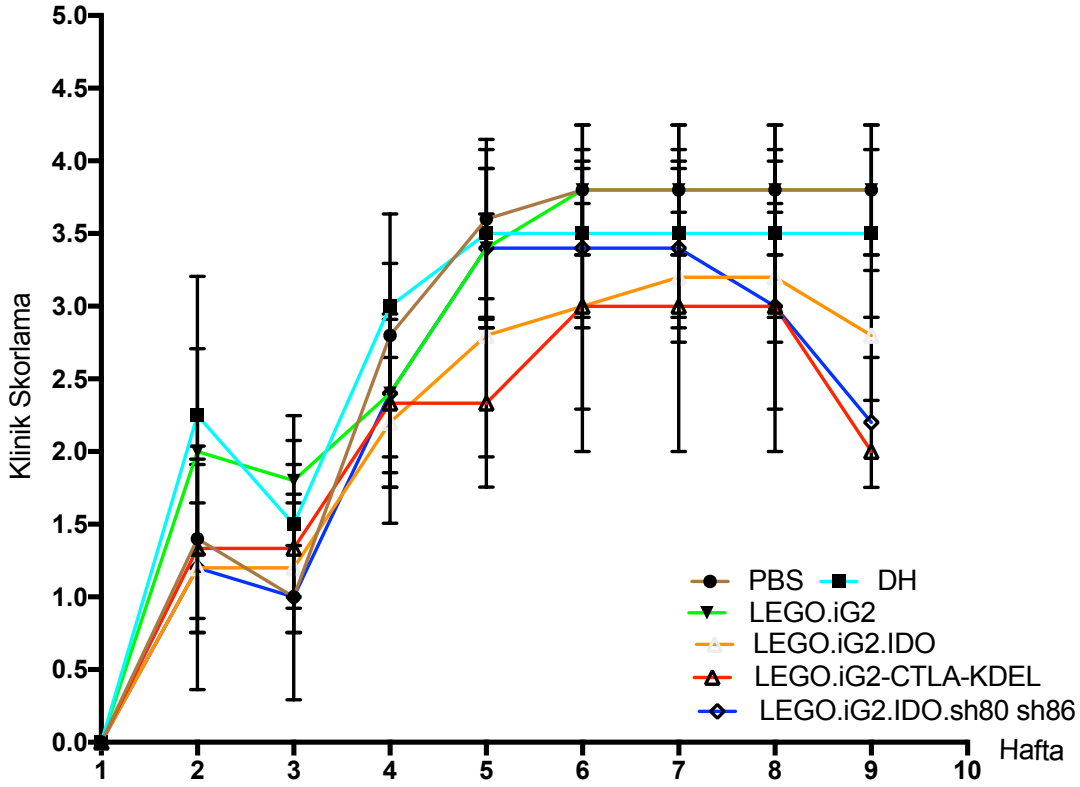
Şekil 86. TolDH uygulamasının artrit modelinde eklem kalınlığı üzerine etkisi

BALB/c farelerinde oluşturulan CIA modeli için hazırlanan TolDH'ler tip II kollajen ile kültür ortamında antijen-spesifik olarak da stimüle edilmiştir. Daha sonra bu TolDH'lerin enjekte edilmiş ve ardından elde edilen eklem kalınlıkları sonuçları takip edilmiştir. Tedavi grupları PBS (negatif kontrol), DH + K, LeGO.iG2 + K, LeGO.iG2.IDO + K, LeGO.iG2.CTLA4-KDEL + K ve LeGO.iG2.IDO.shCD80.shCD86 + K vektörleriyle modifiye edilen TolDH'lerden oluşmaktadır. CIA modeli için ilk enjeksiyonu 1. haftada, ikinci (booster) kolajen enjeksiyonu ise 3. haftada uygulanmıştır. Takip edilen haftalar süresince eklem kalınlıklarında artış gözlemlenmiş 6. haftada, kültür ortamında tip II kollajen ile antijen-spesifik olarak önceden uyarılmış TolDH'ler intraartiküler yolla uygulanmıştır. Takip eden haftalarda yapılan klinik değerlendirmelerde, tedavi grupları arasında belirgin farklılıklar oluşmaya başlamıştır. (Şekil 86)

PBS ve DH + K gruplarında, eklem kalınlıklar 4. Haftadan sonra artmış ve 6. haftadan sonra da 3,5–4,5 aralığında ilerlemiştir. LeGO.iG2 + K grubunda da benzer düzeyde yüksek eklem kalınlıkları gözlenmiş; bu durum GFP taşıyıcı kontrol vektörünün terapötik etkisinin bulunmadığını doğrulamıştır. Buna karşın, LeGO.iG2.IDO + K, LeGO.iG2.CTLA4-KDEL + K ve özellikle

LeGO.iG2.IDO.shCD80.shCD86 + K ile tedavi edilen gruplarda 6. haftadan itibaren eklem kalınlıkları değerlerinde azalma gözlenmiştir. En düşük eklem kalınlıkları, LeGO.iG2.IDO.shCD80.shCD86 + K grubunda tespit edilmiş; bu grubu IDO ve CTLA4-KDEL grupları takip etmiştir.

BALB/c farelerinde CIA modeli oluşturulduktan sonra uygulanan farklı TolDH gruplarına ait haftalık klinik skor değerleri Şekil 87'de gösterilmektedir. Tedavi grupları; PBS (negatif kontrol), DH, LeGO.iG2, LeGO.iG2.IDO, LeGO.iG2.CTLA4-KDEL ve LeGO.iG2.IDO.shCD80.shCD86 lentiviral vektörleri ile modifiye edilmiş dendritik hücreleri içermektedir. 1. ve 3. haftalarda yapılan artrit indüksiyonu sonrası, tüm gruplarda 4. haftadan itibaren klinik skorlar artış göstermiş, artrit belirtileri zamana bağlı olarak şiddetlenmiştir. 6. haftada terapötik enjeksiyon uygulaması yapılmış ve takip eden haftalarda klinik skorlamalar sürdürülmüştür. PBS ve DH gruplarında klinik skorlar, 6. haftadan sonra 3,5–4,5 aralığında sabitlenmiştir. Bu gruplarda TolDH enjeksiyonunun yapılmadığı için hastalığın ilerleyici formda devam ettiği görülmüştür. LeGO.iG2 grubu da benzer şekilde yüksek klinik skorlarla seyretmiş, sadece GFP taşıyan kontrol vektör olarak kullanılan bu yaklaşımın terapötik etkisi olmadığı gösterilmiştir. LeGO.iG2.IDO, LeGO.iG2.CTLA4-KDEL ve LeGO.iG2.IDO.shCD80.shCD86 uygulanan gruplarda 6. haftadan itibaren klinik skor değerlerinde seviyeli olarak bir azalma izlenmiştir. 9. haftaya gelindiğinde, LeGO.iG2.IDO.shCD80.shCD86 grubunda klinik skorun 2,5'a kadar gerilediği görülmüştür. Bu grubu sırasıyla IDO ve CTLA4-KDEL taşıyan gruplar takip etmiştir



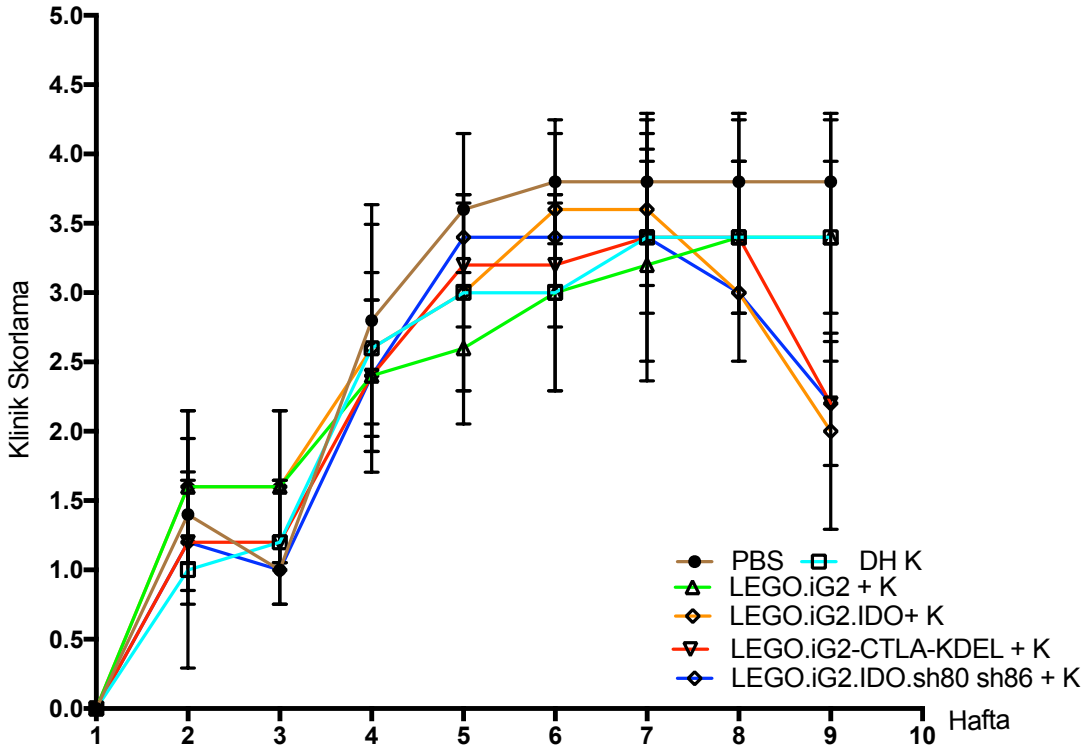
Şekil 87. TolDH uygulamasının artrit modelinde klinik skor etkisi.

Şekil 88'de BALB/c farelerinde oluşturulan CIA modelinde, terapötik enjeksiyon uygulamasından önce tip II kolajen ile kültür ortamında antijen-spesifik olarak stimüle edilmiş TolDH'lerin intraartiküler yolla enjeksiyonundan sonra elde edilen haftalık klinik skorları sunulmaktadır. Tedavi gruplarına PBS (negatif kontrol), DH + K, LeGO.iG2 + K, LeGO.iG2.IDO + K, LeGO.iG2.CTLA4-KDEL + K ve LeGO.iG2.IDO.shCD80.shCD86 + K modifikasyonuna sahip TolDH'ler uygulanmıştır.

Tüm gruplarda 1. ve 3. haftalarda yapılan kollajen enjeksiyonlarıyla artrit indüksiyonu sağlanmış, 4. haftadan itibaren klinik skorlarında belirgin artış gözlemlenmiştir. 6. haftada**,** kültürde antijenle önceden aktive edilen TolDH'ler intraartiküler olarak uygulanmıştır. Bu noktadan itibaren haftalık eklem kalınlığı ölçümleri ile tedaviye verilen yanıtlar takip edilmiştir.

PBS ve DH + K gruplarında klinik skorlar yüksek seyretmiş, bu gruplarda TolDH tedavisi uygulanmaması nedeniyle inflamasyonun ilerleyici karakter gösterdiği izlenmiştir. LeGO.iG2 + K grubu da benzer şekilde yüksek kalmıştır; bu durum, sadece GFP taşıyan teröpatik olmayan vektörün hastalığın klinik skor azalmasında bir

etkisi olmadığı görülmüştür. LeGO.iG2.IDO + K**,** LeGO.iG2.CTLA4-KDEL + K ve LeGO.iG2.IDO.shCD80.shCD86 + K uygulanan gruplarda ise 6. haftadan itibaren klinik skorlarda düşüş eğilimi gözlemlenmiş, bu etki 9. haftaya kadar devam etmiştir. En belirgin iyileşme LeGO.iG2.IDO.shCD80.shCD86 + K grubunda izlenmiştir. Böylece, antijenle kültür ortamında ön aktivasyon uygulanmış TolDH'lerin**,** eklem inflamasyonunu baskılamada etkin olduğunu; özellikle IDO ekspresyonu ve kostimülatör sinyal baskılanmasını birlikte içeren kombinasyonların, klinik skor tablosunda inflamatuvar yükü azaltmada daha etkili bir terapötik profil sunduğunu göstermektedir.

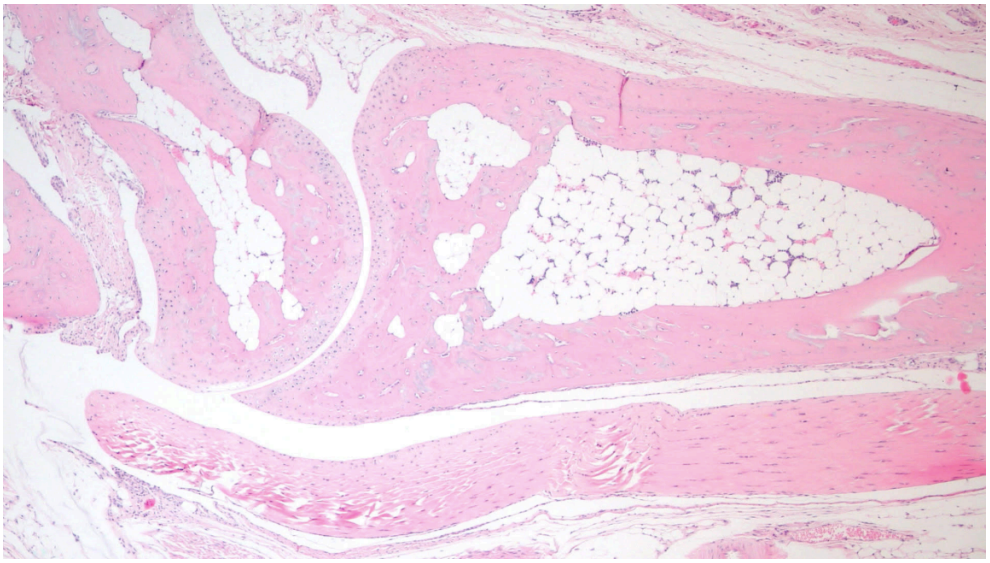


Şekil 88. TolDH uygulamasının artrit modelinde klinik skor etkisi.

4.12.Tedavi Uygulanmamış Farelerden Alınan Doku Örneklerinde Yapılan Analizler

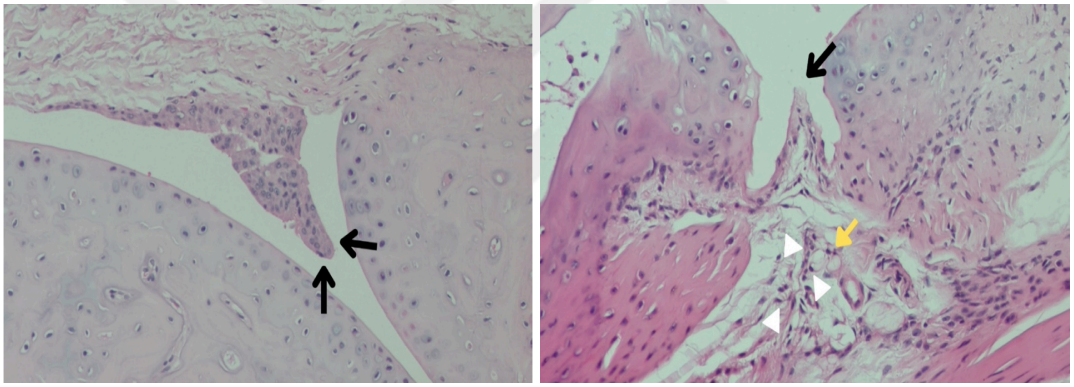
Tibiotarsal eklem bölgesinde, kalkaneus, talus ve sentral tarsal kemiklerde farelerde yaygın olarak sinovyal hiperplazi ve pannus oluşumu gözlenmiştir. Pannus oluşumunun şiddeti fareler arasında değişkenlik göstermekle birlikte, bazı farelerde çok şiddetli düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Aynı bölgelerde sıklıkla mononükleer

hücre infiltrasyonları gözlenmiş, bazı vakalarda infiltrasyonun yoğun olduğu ve dev hücrelerin de yer aldığı aktif-kronik bir inflamasyonun kas dokusuna kadar ilerlediği belirlenmiştir. Eklem kıkırdağında dejeneratif- nekrotik değişiklikler yaygın olup, bazı farelerde kıkırdak yüzeyinde fissürler ve kemik dokuda hafif şiddette lizis saptanmıştır. Bununla birlikte, sinovyal hücrelerin palizat görünümüne sahip olduğu vakalar da dikkati çekmiştir. Bulgular genel olarak kronik inflamatuar bir sürece işaret etmekte olup, sinovyal hiperplazi ve pannus oluşumunun ilerleyici yapısının eklem ve çevre dokular üzerinde belirgin histopatolojik değişikliklere yol açtığı görülmüştür. Bu çalışmanın temel bulgusu tibiotarsal eklem bölgesinde gözlenen belirgin inflamatuar süreçler ve eklem dokusunda meydana gelen histopatolojik değişikliklerdir. Bulgular, inflamasyonun eklem yapıları üzerindeki yıkıcı etkilerini ve pannus oluşumunun ilerleyici doğasını göstermektedir. Bu durum, inflamatuar artrit veya benzeri patolojilerle ilişkili mekanizmaların hayvan modeli bazında değerlendirilmesine olanak tanımaktadır. Gözlenen sinovyal hiperplazi, mononükleer hücre infiltrasyonu ve kıkırdak dejenerasyonu gibi değişiklikler, kronik inflamasyonun ilerleyici etkisini ve immün sistemin eklem yapıları üzerindeki etkilerini destekler niteliktedir. Ayrıca, pannus oluşumunun şiddetli olduğu durumlarda, sinovyal hücrelerin palizat görünümüne sahip olması, bu sürecin patogenezine dair ek ipuçları sunmaktadır. Elde edilen bu veriler, inflamatuar eklem hastalıklarının patolojisini anlamak için kullanılan hayvan modellerinin etkinliğini göstermekte olup, özellikle RA gibi hastalıkların mekanizmasını araştırmak ve potansiyel tedavi yaklaşımlarını değerlendirmek adına önemli bir referans sağlamaktadır. Bu nedenle, bu bulguların ilerleyen çalışmalarda terapötik müdahalelerin etkinliğini test etmek için kullanılabileceği düşünülmektedir. Model oluşturulmamış sağlıklı farelerin de tibiotarsal eklem bölgeleri incelenmiş ve bu alanlardada sinovyal hiperplazi ve pannus oluşumu olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 89).

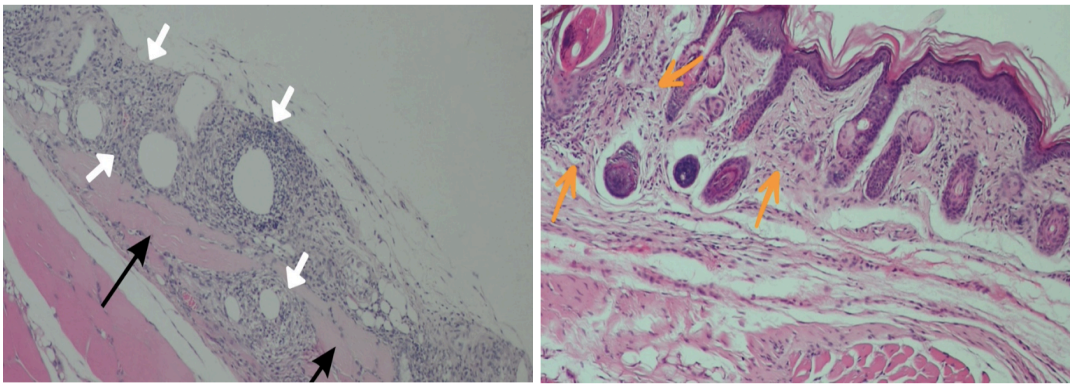


Şekil 89. Kontrol faresinin sağlıklı bacağının histopatolojik analizi (10x)

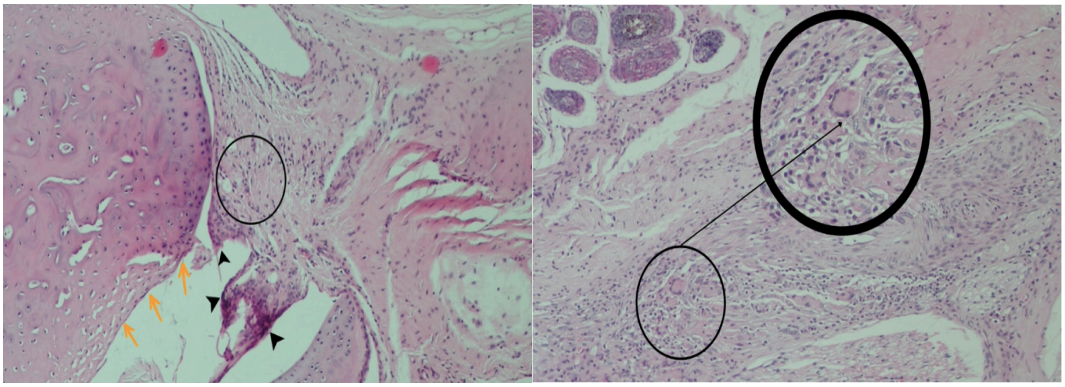
CIA Modeli oluşturulan farelerin histopatoloji analizleri (Şekil 90-96)



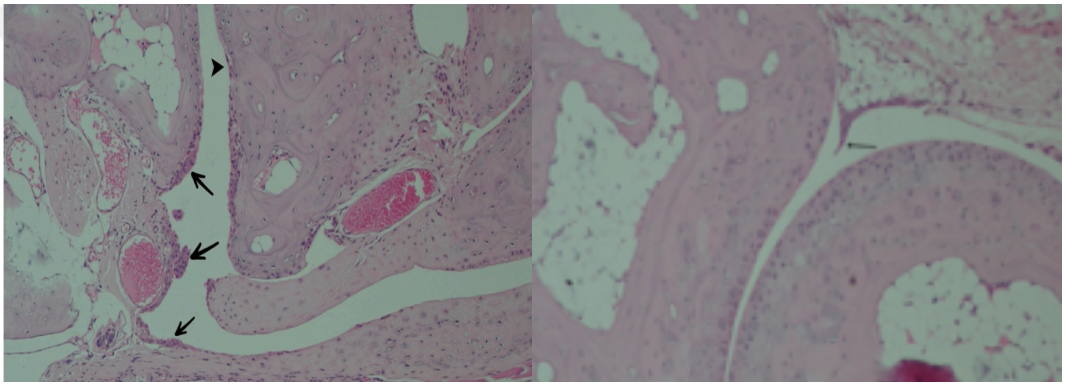
Şekil 90. Synovial hiperplazi, Pannus x20.- Kıkırdak dokuda nekroz ve fissür oluşumu (siyah ok). Mononükleer hücre infiltrasyonu (beyaz oklar), Neovaskülarizasyon x20 (sarı ok)



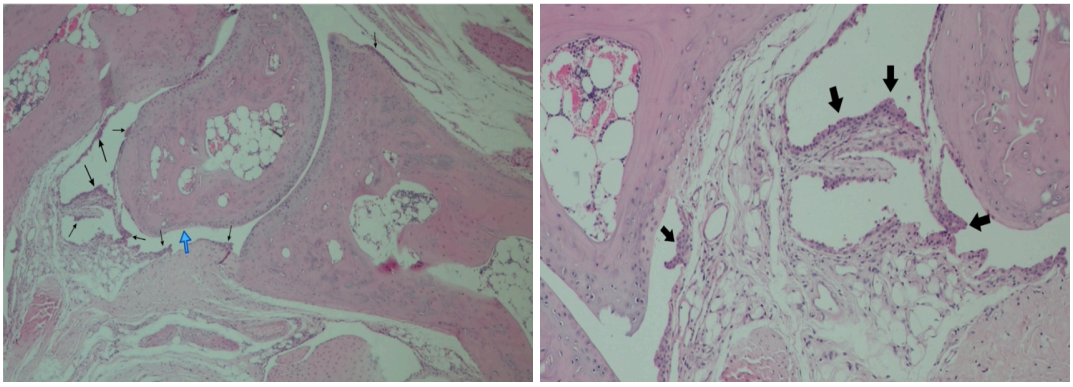
Şekil 91. Beyaz ok; Aktif- kronik infiltrasyon, Siyah oklar; Kas doku x10.- Subepidermal alanda ve dermiste yaygın şiddetli mononükleer hücre infiltrasyonu, Deri x10 (Turuncu oklar)



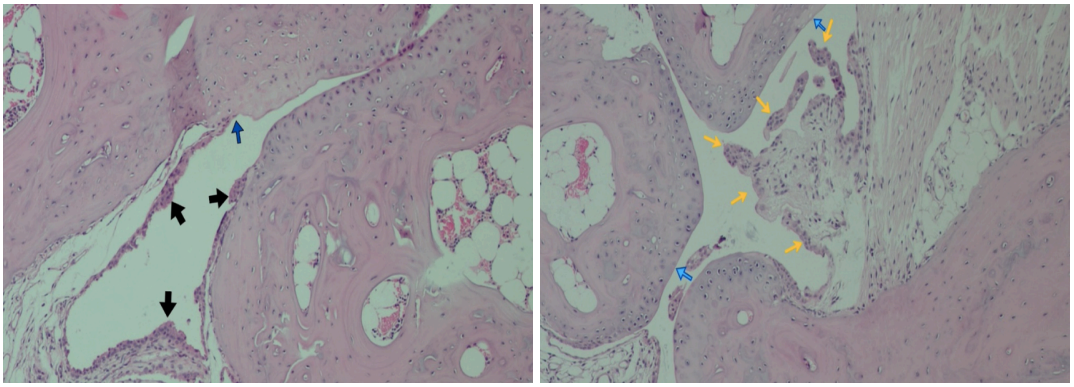
Şekil 92. Sinovyal hiperplazi (ok başları), Kondrositlerde dejeneratif-nekrotik değişiklikler x20 (sarı oklar), sinovyal membranda yangı hücreleri (çember içi).- Deri altında aktif-kronik infiltrasyon, daire içerisindeki dev hücresi, Deri x10, x20 (siyah çemberler).



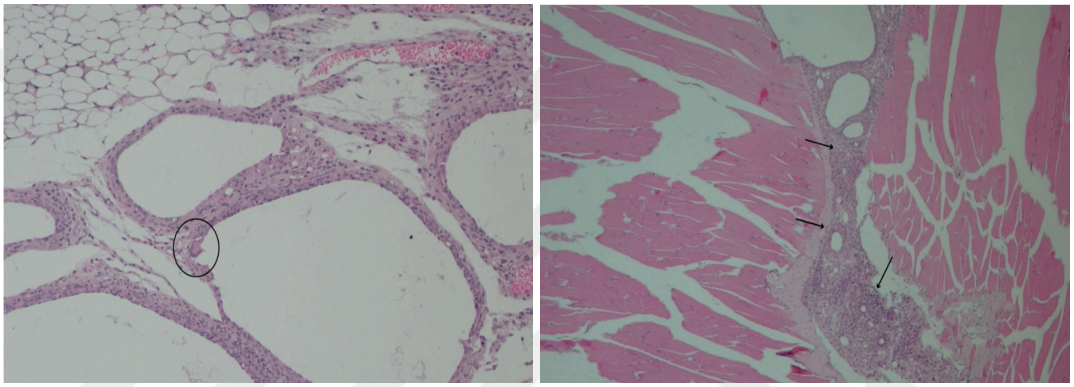
Şekil 93. Synovial hiperplazi ve palizatlanan hücreler (siyah oklar), Kondrositlerde dejeneratif değişiklikler (ok başı).- Synovial Hiperplazi, Pannus x10 (siyah ok).



Şekil 94. Synovial Hiperplazi (siyah oklar) x4, kıkırdak dokuda dejenerasyon ve nekroz (mavi ok). - Synovial Hiperplazi (siyah oklar) x10.



Şekil 95. Synovial Hiperplazi (siyah oklar), kıkırdak dokuda dejenerasyon ve nekroz (mavi ok) x1. -Synovial Hiperplazi, Pannus oluşumu (sarı oklar) x10 kıkırdak dokuda dejenerasyon ve nekroz (mavi oklar)



Şekil 96. Dev hücresi (çember) x10. -Muskular tabakaya kadar ilerlemiş, aktif-kronik infiltrasyon (siyah oklar) x4.

Hayvanların sinoviyal hiperplazi, pannus oluşumu, sinovyal membranda infiltrasyonlar, kıkırdak dokuda hiposelülarite ve Kıkırdak dokuda dejeneratif nekrotik değişiklikler ve fissür oluşumu bakımından skorlanarak değerlendirildi. Skor ortalamaları tablo 19'de gösterilmiştir.

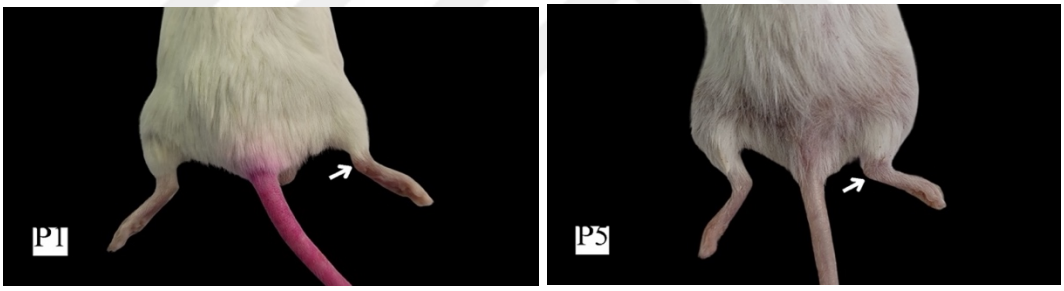
Tablo 19. CIA modeli oluşturulan farelerin histapatolojik skorlamaları (Skor 1: Hafif şiddetli, Skor 2: Hafif-orta şiddetli, Skor 3: Şiddetli, Skor 4: Çok şiddetli).

Synovial hiperplazi	3,22±0,66
Pannus oluşumu	2,66±0,86
Synovial membranda infiltrasyonlar	2,5±0,54
Kıkırdak dokuda hiposelülarite	3,33±0,86
Kıkırdak dokuda dejeneratif nekrotik değişiklikler ve fissür oluşumu	3,44±0,72

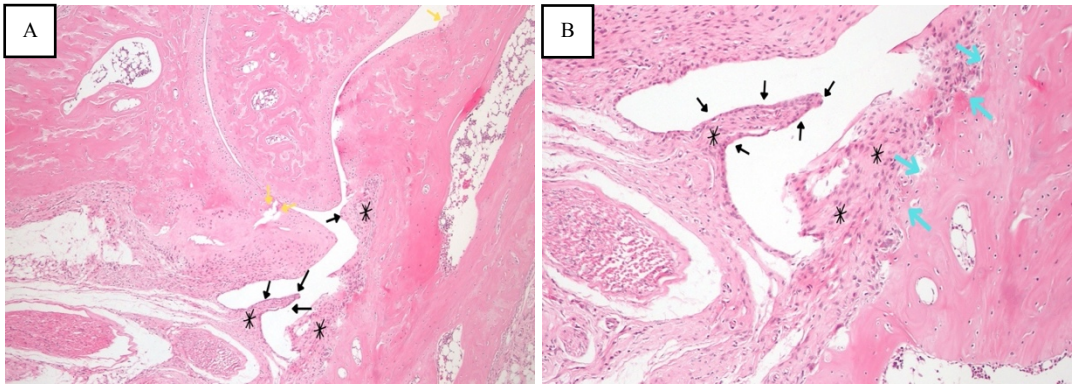
4.13.Tedavi Uygulanmış Farelerden Alınan Doku Örneklerinde Yapılan Analizler

Model oluşturulduktan sonra artrit oluşturulan ekleme PBS enjeksiyonu yapılan kontrol hayvanların doku örneklerinden yapılan analizler;

Tibiotarsal eklem bölgesinde; kalkaneus, talus ve sentral tarsal kemiklerde çok şiddetli sinovyal hiperplazi ile belirgin pannus oluşumu dikkati çekmiştir. Sinovyal hücrelerin yer yer palizat tarzında dizildiği, sinovyal membran ve subsinovyal bölgelerde ise çoğunluğu mononükleer hücrelerden oluşan yoğun hücresel infiltrasyonların bulunduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca tarsal kemiklerin kıkırdak dokusunda kondrositlerde belirgin dejeneratif ve nekrotik değişiklikler izlenmiş; bu alanlarda fissür oluşumları ve osteolizis saptanmıştır. Eklem boşluğunun neredeyse tamamen gözden kaybolmuş olduğu dikkati çekmiştir. Kıkırdak dokudaki nekrotik değişikliklerin, osteolizis ve süperfisiyal erozyonlar ile, pannus dokusunun periartiküler eklem yüzeyini kapladığı belirlenmiştir. Dermiste ise yaygın ve şiddetli, çoğunluğu mononükleer hücrelerden oluşan hücre infiltrasyonları gözlenmiştir.

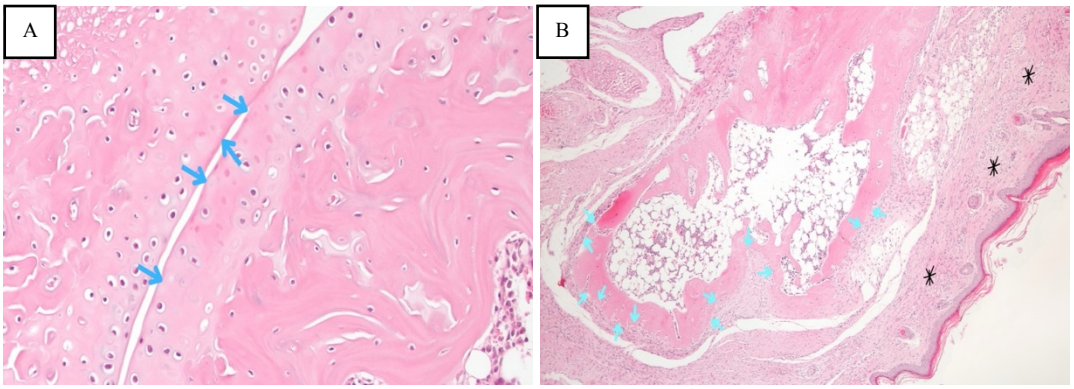


Şekil 97. Romatoid artritli tibiotarsal eklem bölgesi (beyaz ok)

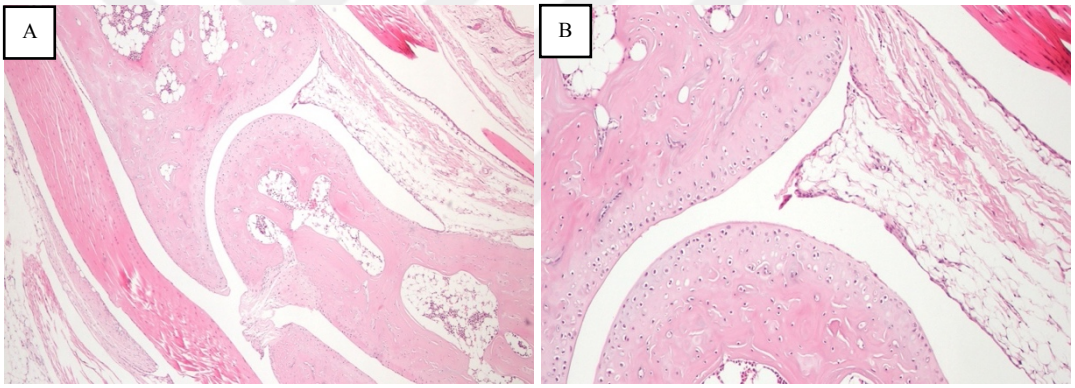


Şekil 98. A. Sinovyal hiperplazi (siyah oklar), Sinovyal membranda şiddetli mononükleer hücre infiltrasyonları (asteriks), kondrositlerde dejeneratif-nekrotik değişiklikler ve fissür oluşumları (sarı oklar) ile eklem boşluğu neredeyse tamamen gözden kaybolmuş olduğu dikkati çekmiştir. (x4 büyütme) B. Sinovyal hiperplazi (siyah oklar), Sinovyal membranda şiddetli mononükleer hücre infiltrasyonları

(asteriks), Kıkırdak dokuda meydana gelen nekrotik değişiklikler osteoliz ve süperfisiyal erozyonlar ile pannus periartiküler eklem yüzeyini kaplamıştır (mavi oklar). (x10 büyütme)



Şekil 99. A. Eklem boşluğu neredeyse tamamen gözden kaybolmuştur. Kondrasitik hiposelülerite (mavi oklar) gözlenmiştir. (x20 büyütme) B. Kıkırdak dokuda meydana gelen nekrotik değişiklikler osteoliz ve süperfisiyal erozyonlar ile pannus periartiküler eklem yüzeyini neredeyse tamamen kaplamıştır (mavi oklar). Dermiste yaygın, şiddetli çoğunluğunu mononükleer hücrelerin yer aldığı hücre infiltrasyonları dikkati çekmiştir (asteriks). (x4 büyütme)

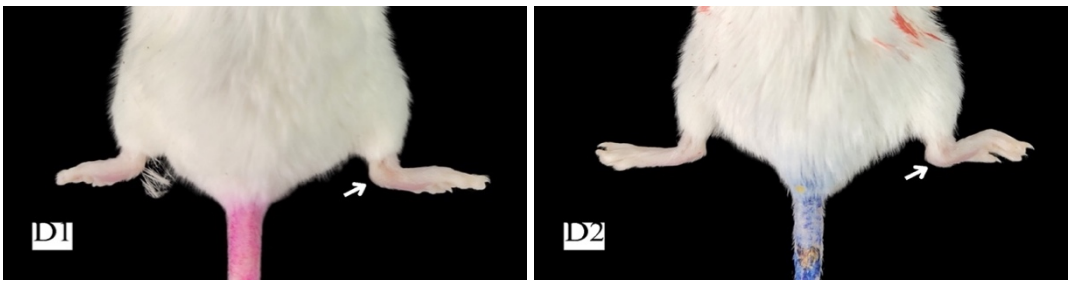


Şekil 100. A. kontrol dokusu sol tibiotarsal eklem bölgesi- (x4 büyütme) B. P5 kontrol dokusu sol tibiotarsal eklem bölgesi- (x10 büyütme)

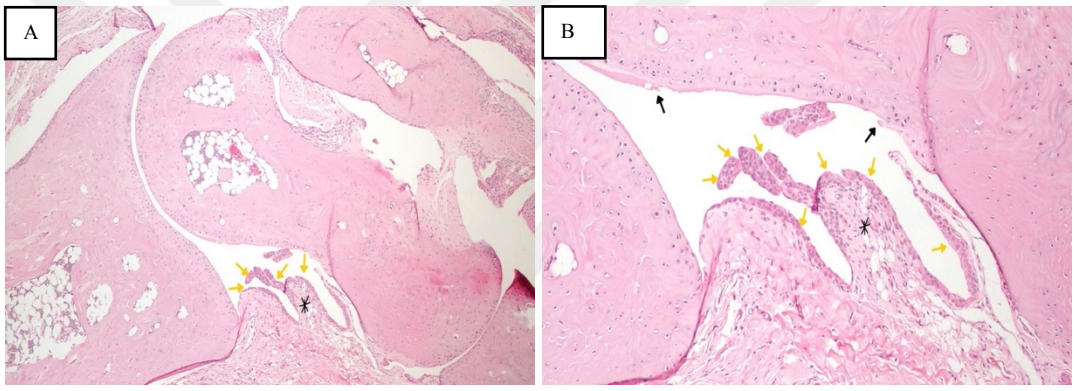
Model oluşturulduktan sonra modifikasyon yapılmamış primer DH'ler uygulanmış diğer kontrol hayvanların doku örneklerinden yapılan analizler;

Tibiotarsal eklem bölgesinde, kalkaneus, talus ve sentral tarsal kemiklerde sinovyal hiperplazi, sinovyal membranda hafif-orta şiddette mononükleer hücre infiltrasyonları ve pannus oluşumu dikkati çekmiştir. Bazı alanlarda pannus dokusu içerisinde yağ doku infiltrasyonlarına rastlanmıştır. Eklem boşluğunda yer yer fibröz materyal varlığı da belirlenmiştir. Kıkırdak dokuda kondrositlerde belirgin dejeneratif-nekrotik değişiklikler, hiposelülarite ve lamellasyon izlenmiş; bu değişikliklere eşlik eden osteolizis alanlarında periosteal kemik çıkıntıları saptanmıştır. Kıkırdak dokuda gelişen nekrotik değişikliklerin osteolizis ve süperfisiyal erozyonlarla birlikte pannus

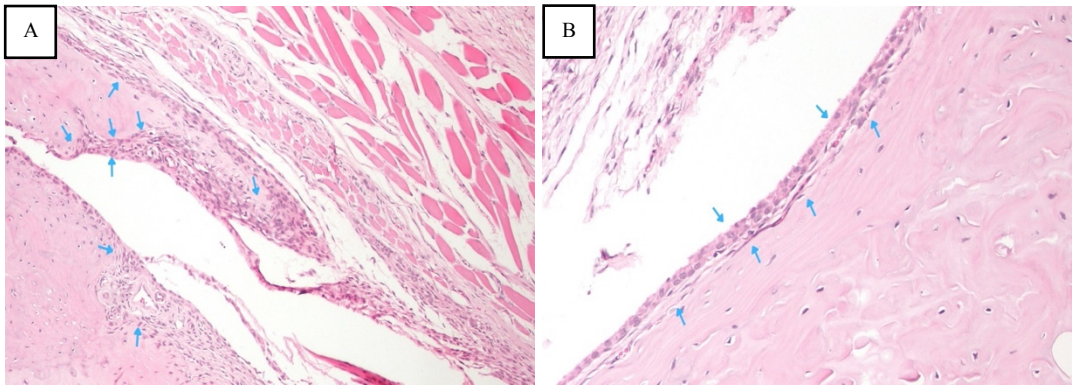
dokusunun periartiküler eklem yüzeyini neredeyse tamamen örttüğü gözlemlenmiştir. Dermiste yaygın ve şiddetli mononükleer hücre infiltrasyonları mevcut olup, bir bölgede kıl folikül epitellerinin ortadan kalktığı ve furunkulozis tablosu dikkati çekmiştir.



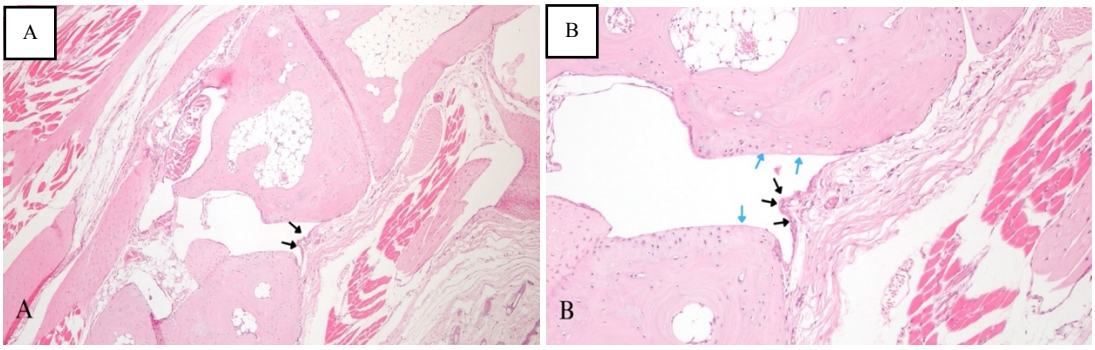
Şekil 101. Romatoid artritli tibiotarsal eklem bölgesi (beyaz ok)



Şekil 102. A. Sinovyal hiperplazi (sarı oklar), sinovyal membranda hafif şiddette mononükleer hücre infiltrasyonları ile pannus oluşumu (asteriks) dikkati çekti. (x4 büyütme) B. Sinovyal hiperplazi (sarı oklar), sinovyal membranda mononükleer hücre infiltrasyonları ve yağ doku infiltrasyonları ile pannus oluşumuna (asteriks) rastlanılmıştır. Kondrositlerde dejeneratif-nekrotik değişiklikler ile osteolizis alanlarında periosteal kemik çıkıntıları (siyah oklar) dikkati çekmiştir. (x10 büyütme)



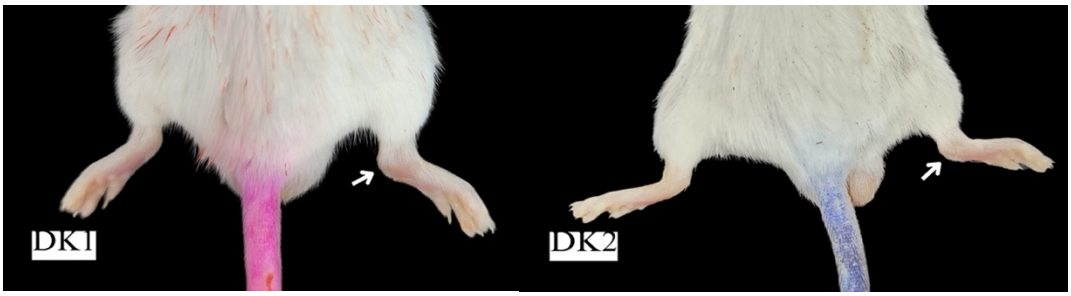
Şekil 103. A. Kıkırdak dokuda meydana gelen nekrotik değişiklikler osteoliz ve süperfisiyal erozyonlar ile pannus periartiküler eklem yüzeyini kaplamıştır (mavi oklar). (x10 büyütme)B. Kıkırdak dokuda meydana gelen nekrotik değişiklikler osteoliz ve süperfisiyal erozyonlar ile pannus periartiküler eklem yüzeyini kaplamıştır (mavi oklar). (x20 büyütme)



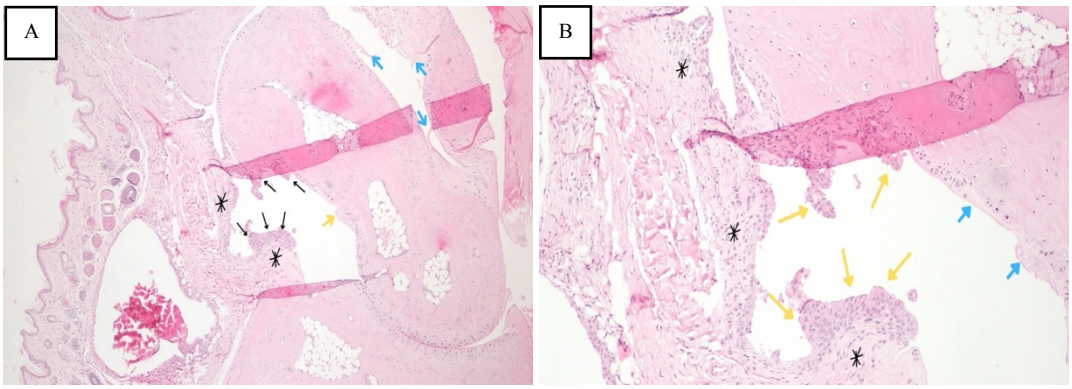
Şekil 104. A-B sağlıklı kontrol dokusu sol tibiotarsal eklem bölgesi Kondrositlerde dejeneratif-nekrotik değişiklikler ve hiposelülarite (mavi oklar) görülmüştür. Hafif derecede sinovyal hiperplazi (siyah oklar)(A: x4 büyütme, B: x10 büyütme)

Model oluşturulduktan sonra modifikasyon yapılmamış DH'lerin kolajen ile kültür ortamında muamele edilmesi ile tedavi edilen hayvanların doku örneklerinden yapılan analizleri;

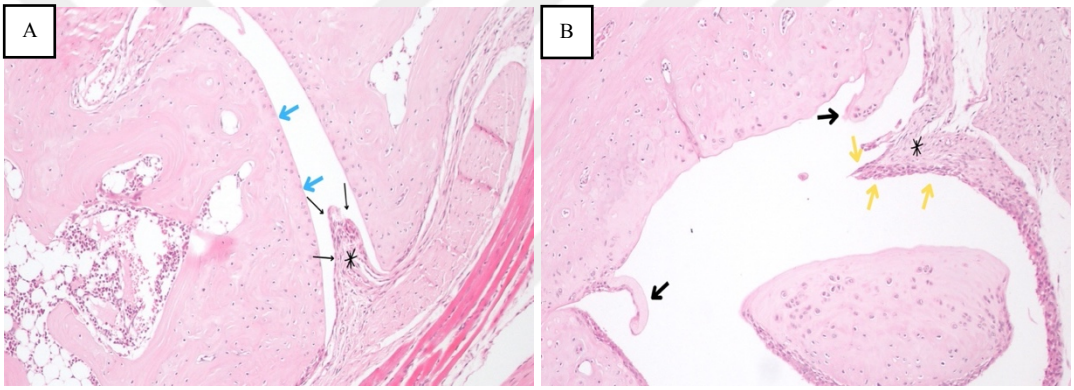
Tibiotarsal eklem bölgesinde sinovyal hiperplazi ve sinovyal membranda şiddetli mononükleer hücre infiltrasyonları dikkati çekmiştir. Bazı alanlarda sinovyal membranın eklem boşluğu içerisine doğru disloke olduğu gözlenmiştir. Eklem boşluğunun neredeyse tamamen ortadan kalktığı ve bu boşluğun, fibröz pannus dokusu ile dolduğu izlenmiştir. Pannus dokusunun periartiküler eklem yüzeyini kapladığı, bu süreçte osteolizis ve süperfisiyal erozyonlarla birlikte ilerlediği belirlenmiştir. Osteolizis alanlarında periosteal kemik çıkıntıları saptanmıştır. Kıkırdak dokuda, kondrositlerde belirgin dejeneratif-nekrotik değişiklikler, hiposelülarite, lamellasyon ve yer yer fissür oluşumları dikkat çekmiştir.



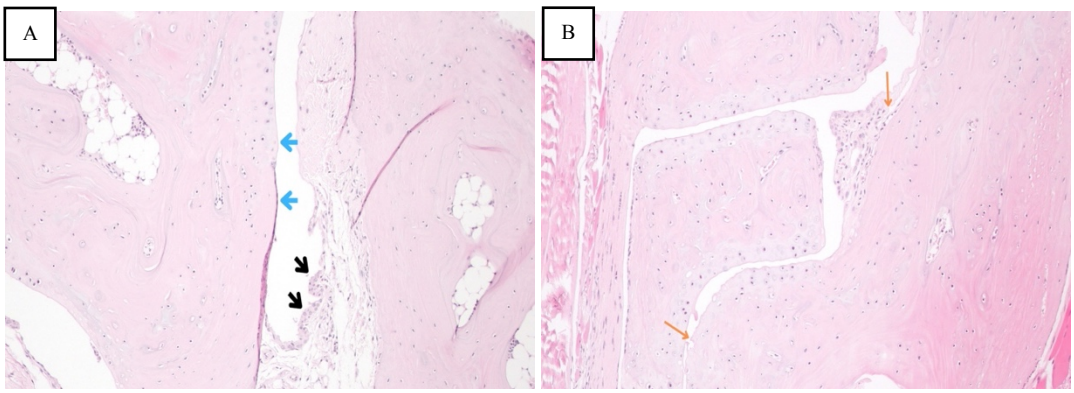
Şekil 105. Romatoid artritli tibiotarsal eklem bölgesi (beyaz ok)



Şekil 106. A. Sinovyal hiperplazi (siyah oklar), sinovyal membranda şiddetli mononükleer hücre infiltrasyonları (asteriks), kondrositlerde dejeneratif-nekrotik değişiklikler ve fissür oluşumları (sarı oklar) ve osteolizis alanlarında periosteal kemik çıkıntıları (mavi oklar) dikkati çekmiştir. (x4 büyütme) B. Sinovyal hiperplazi ve pannus oluşumu (sarı oklar), sinovyal membranda hafif-orta şiddetli mononükleer hücre infiltrasyonları (asteriksler) gözlenmiştir. Kondrositlerde dejeneratif-nekrotik değişiklikler ve hiposelülarite dikkati çekmiştir (mavi okları). (X10 büyütme)



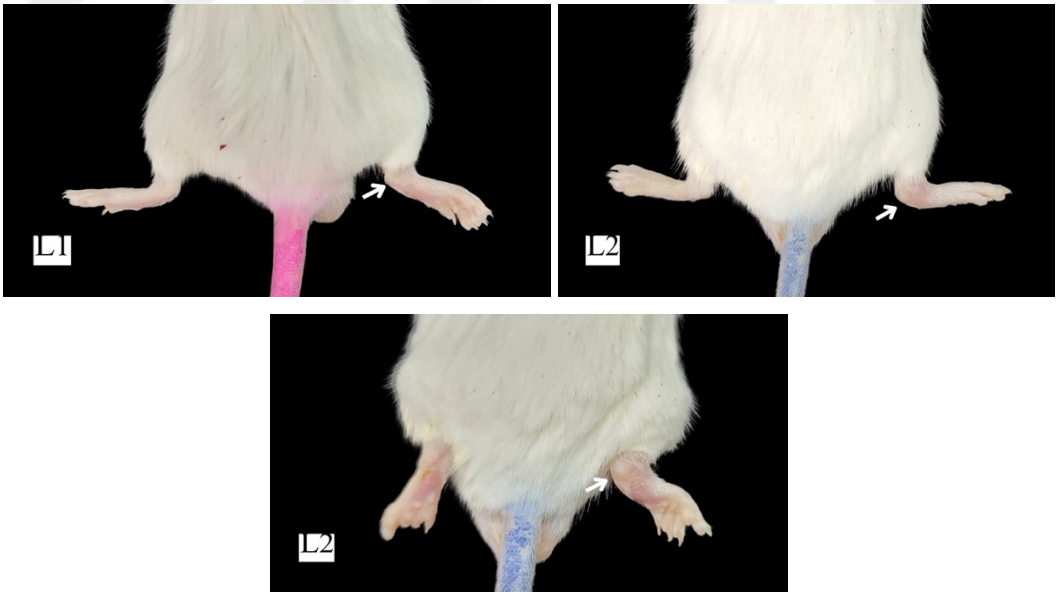
Şekil 107. A. Sinovyal hiperplazi (siyah oklar) ve sinovyal membranın eklem boşluğu içerisine dislokasyonu (asteriks) gözlenmiştir. Kondrositik hiposelülerite (mavi oklar) gözlenmiştir. (x10 büyütme) B. Osteolizis alanlarında periosteal kemik çıkıntıları (siyah oklar), sinovyal hiperplazi ve pannus oluşumu (sarı oklar) gözlenmiştir. Sinovyal membranda şiddetli mononükleer hücre infiltrasyonları (asteriks) dikkati çekmiştir. Kıkırdak dokuda meydana gelen nekrotik değişiklikler osteoliz ve süperfisiyal erozyonlar ile pannus periartiküler eklem yüzeyini kaplamıştır. (x10 büyütme)



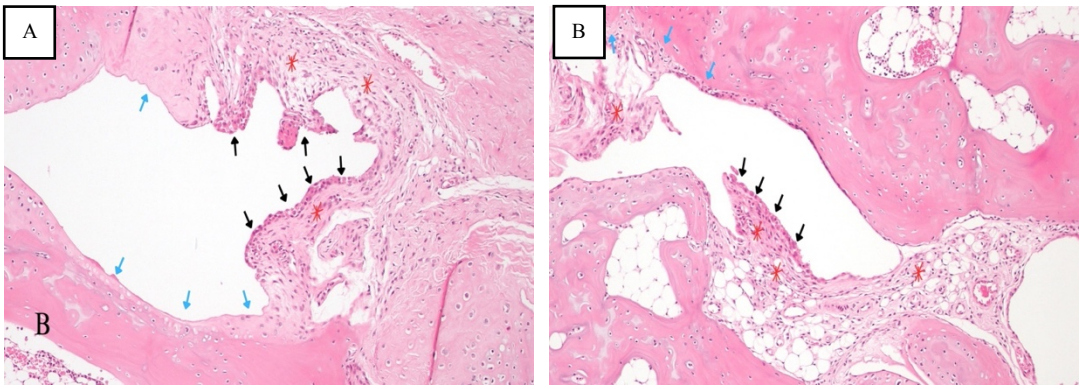
Şekil 108. Kontrol dokusu sol tibiotarsal eklem bölgesi A. Sinovyal hiperplazi (siyah oklar), Kondrositlerde dejeneratif- nekrotik değişiklikler ve hiposelülarite dikkati çekmiştir (mavi oklar). (x10 büyütme) B. Kondrositlerde dejeneratif-nekrotik değişiklikler ve fissür oluşumları (turuncu oklar) gözlenmiştir. Osteolizis alanlarında periosteal kemik çıkıntıları dikkati çekmiştir. (x10 büyütme)

Model oluşturulduktan sonra modifikasyon yapılmamış DH'lerin LeGo_iG2 lentivirüsü ile transüksiyon yapılması ile elde edilen TolDH'ler ile tedavi edilen hayvanların doku örneklerinden yapılan analizleri;

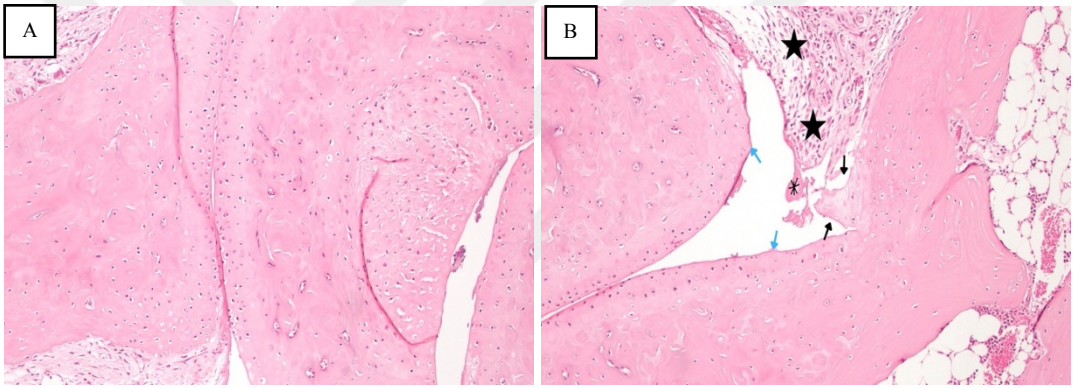
Tibiotarsal eklem bölgesinde, özellikle kalkaneus, talus ve sentral tarsal kemiklere ait eklem yüzeylerinde sinovyal hiperplazi ve sinovyal membranda şiddetli mononükleer hücre infiltrasyonları gözlenmiştir. Subsinovyal alanda hafif neovaskülarizasyon ile birlikte, bazı alanlarda infiltrasyon yoğunluğunun çok şiddetli olduğu dikkati çekmiştir. Sinovyal membranın eklem boşluğu içine doğru disloke olduğu ve pannus oluşumunun eşlik ettiği gözlenmiştir. Pannus dokusu içinde yer yer yağ doku infiltrasyonlarına da rastlanmıştır. Kıkırdak dokuda yaygın dejeneratif-nekrotik değişiklikler, kondrositik hiposelülarite, lamellasyon ve fissür oluşumları belirlenmiştir. Nekrotik kıkırdak bölgeleri, süperfisiyal erozyonlar ve osteolizis ile karakterize olup, bu alanlarda pannus dokusunun periartiküler eklem yüzeyini neredeyse tamamen örttüğü izlenmiştir. Osteolizis alanlarında periosteal kemik çıkıntıları dikkati çekmiştir. Eklem boşluğunun büyük oranda ortadan kalktığı ve yer yer bu boşlukta nekrotik, fibröz materyal varlığının tespit edildiği gözlenmiştir.



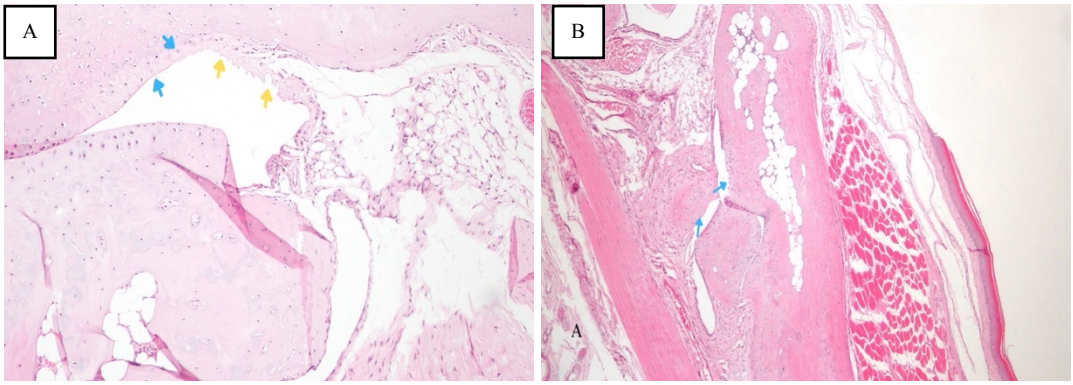
Şekil 109. Romatoid artritli tibiotarsal eklem bölgesi (beyaz ok)



Şekil 110. A. Sinovyal hiperplazi (siyah ok), sinovyal membranda çok şiddetli mononükleer hücre infiltrasyonları (asteriks) gözlenmiştir. Kondrositlerde dejeneratif-nekrotik değişiklikler ve hiposelülarite görülmüştür (mavi oklar). Eklem boşluğunun bir alanda neredeyse tamamen ortadan kalkmış olduğu dikkati çekmiştir. (x4 büyütme) B. Sinovyal hiperplazi (siyah oklar), sinovyal membranda şiddetli mononükleer hücre infiltrasyonları (asteriks) gözlenmiştir. Kıkırdak dokuda meydana gelen nekrotik değişiklikler osteoliz ve süperfisiyal erozyonlar ile pannus periartiküler eklem yüzeyini kaplamıştır (mavi oklar). (x10 büyütme)



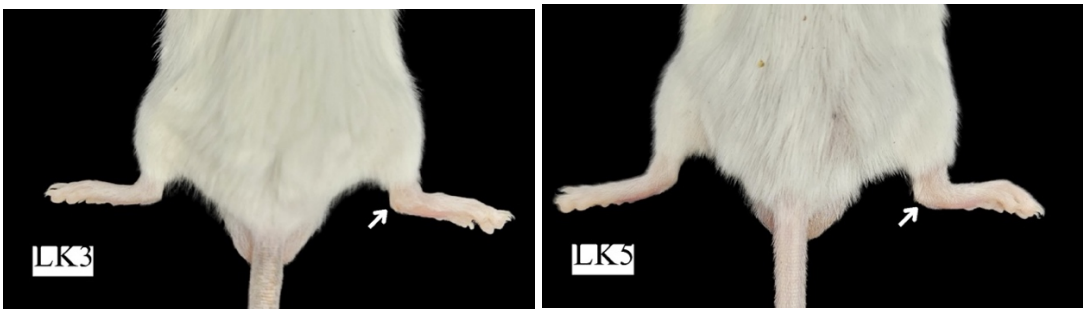
Şekil 111. A. Eklem boşluğu neredeyse tamamen gözden kaybolmuştur. (x10 büyütme) B. Osteolizis alanlarında periosteal kemik çıkıntıları (siyah oklar), Eklem boşluğunda nekrotik, fibröz materyal (asterisk) varlığı tespit edilmiştir. Sinovyal membranda şiddetli mononükleer hücre infiltrasyonlarına (yıldız) rastlanmıştır. Kondrositlerde nekrotik değişiklikler, fissür oluşumları ve hiposelülarite dikkati çekmiştir (mavi oklar). (x10 büyütme)



Şekil 112. A. Kondrositlerde nekrotik değişiklikler, fissür oluşumları (sarı oklar) ve hiposelülarite dikkati çekmiştir (mavi oklar). Osteolizis alanlarında periosteal kemik çıkıntıları gözlenmiştir. (x10 büyütme) B. Kondrositlerde dejeneratif-nekrotik değişiklikler ve hiposelülarite görülmüştür (mavi oklar). Kıkırdak dokuda meydana gelen nekrotik değişiklikler osteoliz ve süperfisiyal erozyonlar ile pannus periartiküler eklem yüzeyini kaplamıştır. (A: x4 büyütme, B: x10 büyütme)

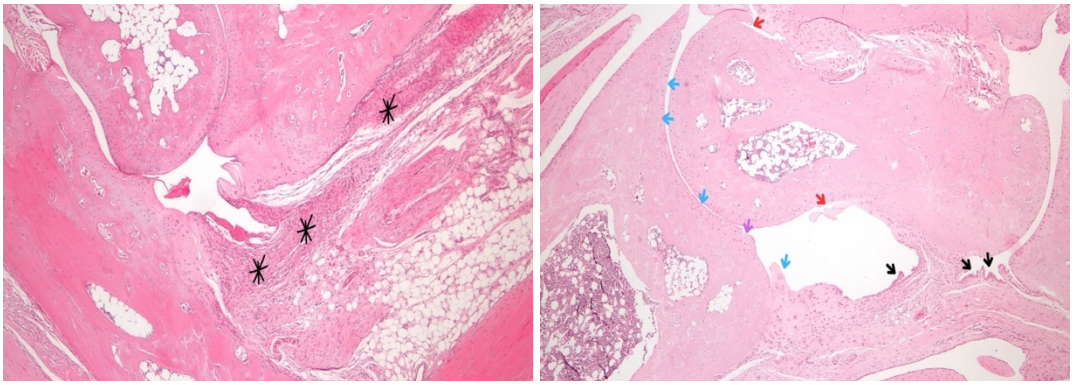
Model oluşturulduktan sonra DH'lerin LeGo_iG2 lentivirüsü ile transüksiyon yapılması sonrası kolajen ile kültür ortamında muamele edilerek antijene spesifik TolDH'ler elde edilerek tedavi edilen hayvanların doku örneklerinden yapılan analizler;

Tibiotarsal eklem bölgesinde sinovyal hiperplazi ve sinovyal membranda şiddetli ila çok şiddetli mononükleer hücre infiltrasyonları dikkati çekmiştir. Bazı alanlarda sinovyal membranın eklem boşluğu içerisine disloke olduğu gözlenmiştir. Subsinovyal alanda belirgin neovaskülarizasyon ve pannus dokusunda yağ infiltrasyonu izlenmiştir. Kondrositlerde yaygın dejeneratif-nekrotik değişiklikler, hiposelülarite ve fissür oluşumları gözlenmiştir. Kıkırdak dokudaki nekrotik odaklar ile birlikte gelişen süperfisiyal erozyonlar ve osteolizis bulguları eşliğinde, pannus dokusunun periartiküler eklem yüzeyini kapladığı belirlenmiştir. Osteolizis alanlarında periosteal kemik çıkıntıları ve bazı eklem boşluklarında nekrotik-fibröz materyal birikimi mevcuttur.

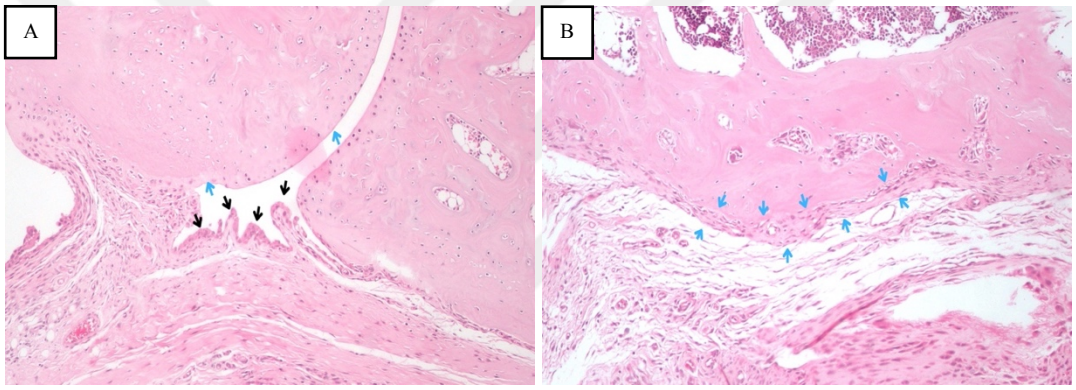


Şekil 113. Romatoid artritli tibiotarsal eklem bölgesi (beyaz ok)

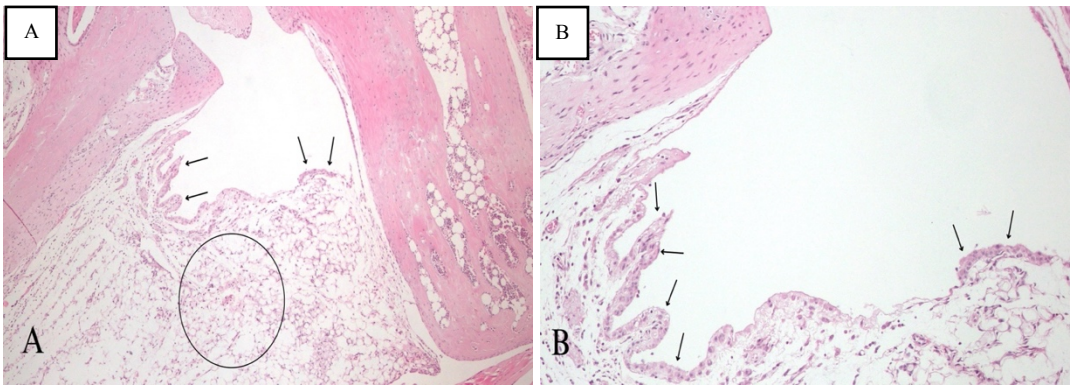
A B



Şekil 114. Sinovyal membranda çok şiddetli mononükleer hücre infiltrasyonları (asteriks) ve eklem boşluğunun neredeyse tamamen gözden kaybolmuş olduğu dikkati çekmiştir. (x4 büyütme) B. Sinovyal hiperplazi (siyah oklar), sinovyal membranda şiddetli mononükleer hücre infiltrasyonları gözlenmiştir. Kondrositlerde nekrotik değişiklikler, fissür oluşumları (mor ok) ve hiposelülarite dikkati çekmiştir (mavi oklar). Osteolizis alanlarında periosteal kemik çıkıntısı (kırmızı ok) gözlenmiştir. Eklem boşluğu neredeyse tamamen gözden kaybolmuştur. (x4 büyütme)



Şekil 115. Sinovyal hiperplazi (siyah oklar) ve kondrositik hiposelülarite dikkati çekmiştir (mavi oklar). (x10 büyütme) B. Kıkırdak dokuda meydana gelen nekrotik değişiklikler osteoliz ve süperfisiyal erozyonlar ile pannus periartiküler eklem yüzeyini (mavi oklar) kaplamıştır. (x10 büyütme)



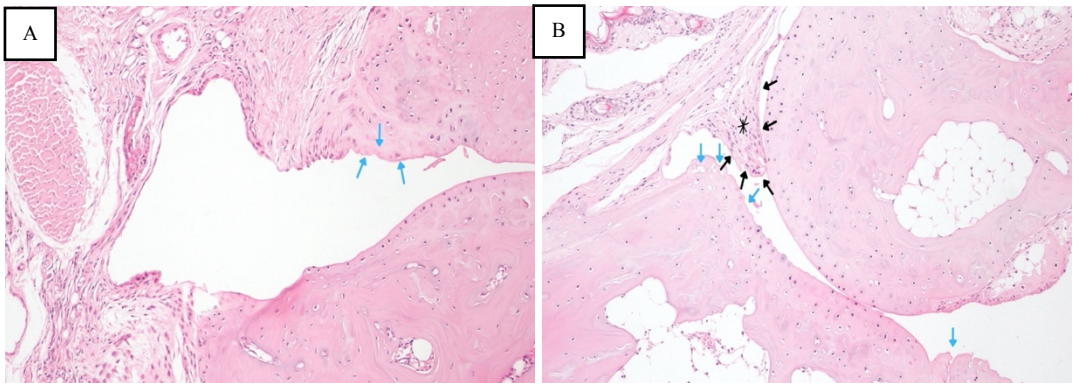
Şekil 116. LK5 kontrol dokusu sol tibiotarsal eklem bölgesi- Sinovyal hiperplazi (siyah oklar) ve subsinovyal alanda yağ doku infiltrasyonu gözlenmiştir (çember). (x20 büyütme)

Model oluşturulduktan sonra modifikasyon yapılmamış DH'lerin LeGo_mCTLA4 lentivirüsü ile transüksiyon yapılması ile elde edilen TolDH'ler ile tedavi edilen hayvanların doku örneklerinden yapılan analizleri;

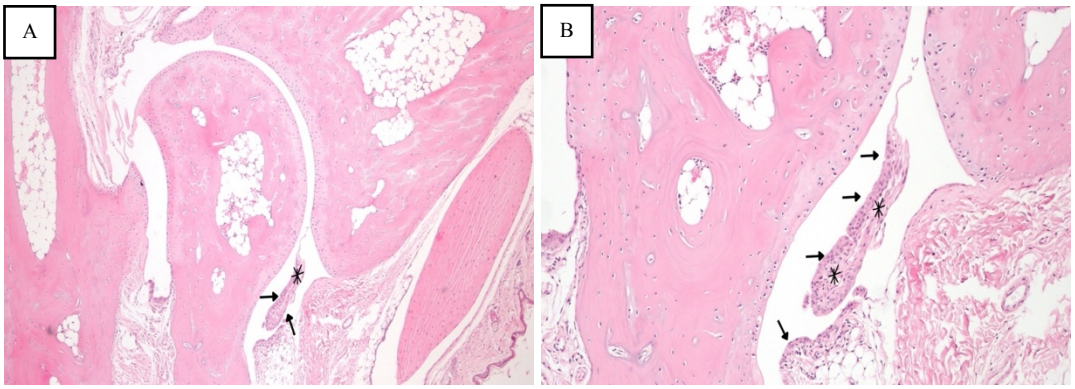
Histopatolojik değerlendirmede; sinovyal membranda hafiften şiddetliye değişen derecelerde mononükleer hücre infiltrasyonları dikkati çekmiştir. Sinovyal hiperplazi ve subsinovyal alanda yer yer neovaskülarizasyon mevcuttu. Bazı alanlarda sinovyal membranın eklem boşluğuna doğru disloke olduğu, pannus dokusu içerisinde ise yağ infiltrasyonunun yer aldığı gözlenmiştir. Kıkırdak dokuda yaygın dejeneratif-nekrotik değişiklikler, kondrositik hiposelülarite ve lamellasyon dikkati çekmiş; bu bölgelerde nekroz odaklarına eşlik eden fissür oluşumları ve süperfisiyal erozyon alanları izlenmiştir. Pannus dokusunun osteolizis ve kıkırdak erozyonları eşliğinde periartiküler eklem yüzeyini kapladığı tespit edilmiştir. Sadece primer DH'ler ile tedavi edilen gruba göre sinovyal hiperplazinin daha hafif olduğu görülmüştür.



Şekil 117. C3, Romatoid artritli tibiotarsal eklem bölgesi (beyaz ok)



Şekil 118. A. Kondrositlerde dejeneratif-nekrotik değişiklikler ve fissür oluşumları (mavi oklar) sinovyal membranda hafif şiddetli mononükleer hücre infiltrasyonları dikkati çekmiştir. (x10 büyütme) B. Kondrositlerde dejeneratif- nekrotik değişiklikler, hiposelülarite ve lamellasyona rastlanmıştır (mavi oklar). Sinovyal hiperplazi ve pannus oluşumu (siyah oklar), sinovyal membranda hafif şiddetli mononükleer hücre infiltrasyonları (asteriks) gözlenmiştir. (x10 büyütme)



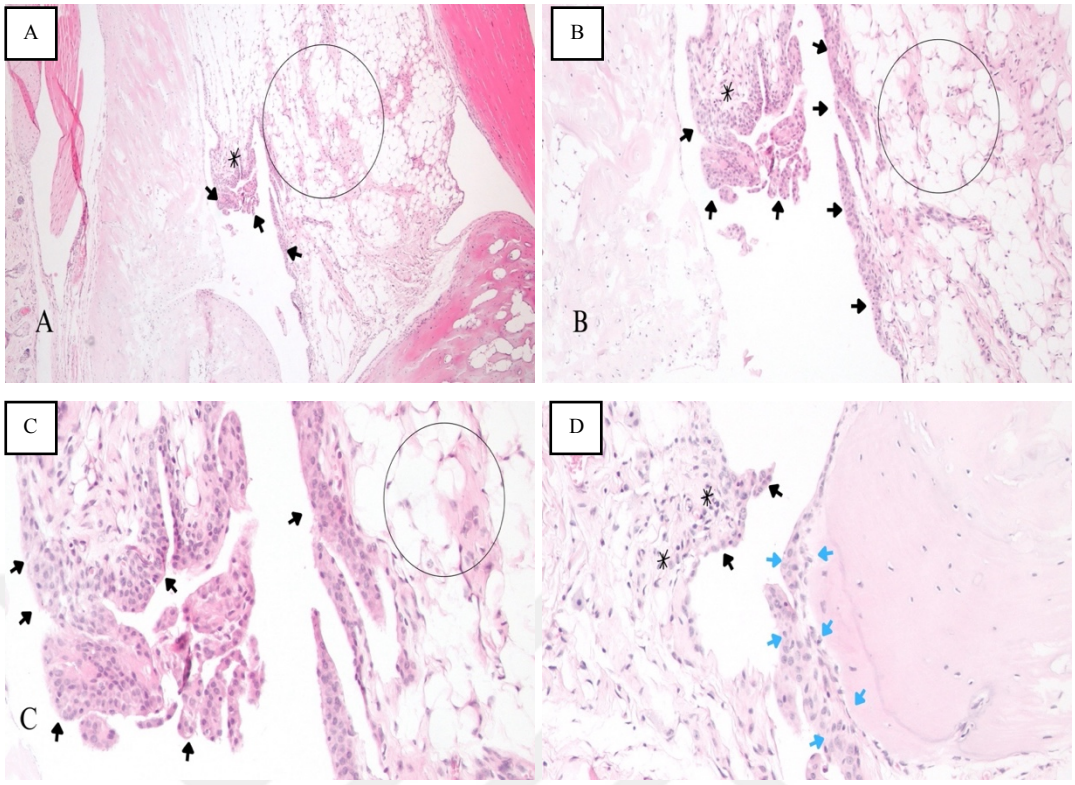
Şekil 119. A. C1 kontrol dokusu sol tibiotarsal eklem bölgesi- Sinovyal hiperplazi (siyah oklar) ve sinovyal membranın eklem boşluğu içerisine dislokasyonu (asteriks) gözlenmiştir. (x4 büyütme) B. C1 kontrol dokusu sol tibiotarsal eklem bölgesi- Sinovyal hiperplazi (siyah oklar) ve sinovyal membranın eklem boşluğu içerisine dislokasyonu (asteriks) gözlenmiştir. (x10 büyütme)

Model oluşturulduktan sonra DH'lerin LeGo_mCTLA4 lentivirüsü ile transüksiyon yapılması sonrası kolajen ile kültür ortamında muamele edilerek antijene spesifik TolDH'ler elde edilerek tedavi edilen hayvanların doku örneklerinden yapılan analizler;

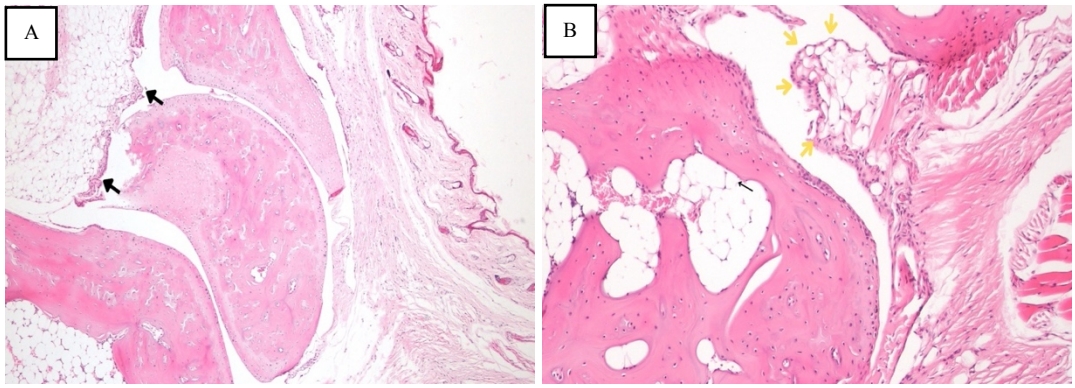
Tibiotarsal eklem bölgesinde, özellikle kalkaneus, talus ve sentral tarsal kemiklerde sinovyal hiperplazi ve sinovyal membranda hafif derecede mononükleer hücre infiltrasyonları gözlenmiştir. Subsinovyal alanda neovaskülarizasyona ve pannus dokusu içinde yağ infiltrasyonlarına rastlanmıştır. Kondrositik hiposelülarite, dejeneratif-nekrotik değişiklikler ve fissür oluşumları dikkat çekmiştir. İlerlemiş lezyon bölgelerinde osteolizis alanlarına eşlik eden periosteal kemik çıkıntıları görülmüştür. Sadece primer DH'ler ile tedavi edilen gruba göre sinovyal hiperplazinin daha hafif olduğu görülmüştür.



Şekil 120. Romatoid artritli tibiotarsal eklem bölgesi (beyaz ok)



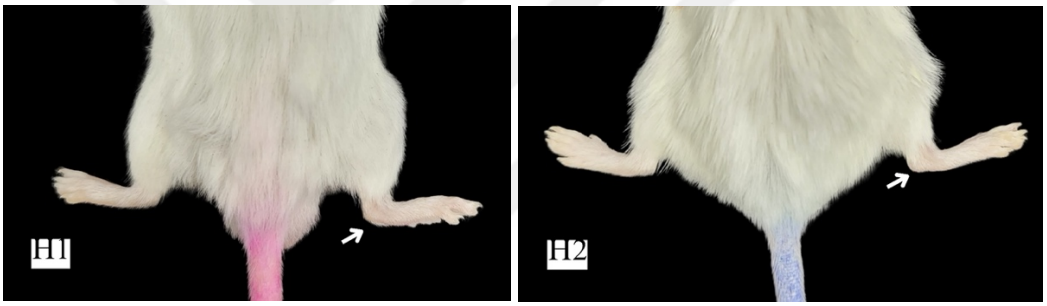
Şekil 121. Sinovyal hiperplazi (siyah oklar), sinovyal membranda hafif şiddetli mononükleer hücre infiltrasyonları (asteriks), pannus dokusunda yağ infiltrasyonu gözlenmiştir (çember). (A: x4 büyütme, B: x10 büyütme, C: x20 büyütme) D Sinovyal hiperplazi (siyah oklar), sinovyal membranda hafif şiddetli mononükleer hücre infiltrasyonları (asteriks) gözlenmiştir. Kıkırdak dokuda bir alanda nekrotik değişiklikler ile süperfisiyal erozyonlar ile pannus periartiküler eklem yüzeyini (mavi oklar) kaplamıştır. (x20 büyütme)



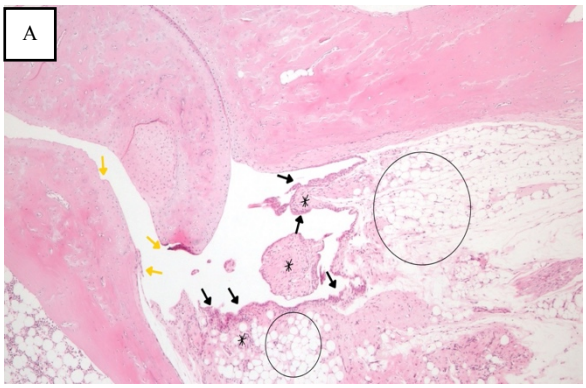
Şekil 122. CK 1 kontrol dokusu sol tibiotarsal eklem bölgesi Sinovyal hiperplazi (siyah oklar) gözlenmiştir. (x4 büyütme) CK2 kontrol dokusu sol tibiotarsal eklem bölgesi- Kıkırdak dokuda meydana gelen nekrotik değişiklikler osteoliz ve süperfisiyal erozyonlar ile pannus periartiküler eklem yüzeyini kaplamıştır. Sinovyal hiperplazi ve pannus oluşumu (sarı oklar) pannus dokusunda yağ infiltrasyonu gözlenmiştir. (x10 büyütme)

Model oluşturulduktan sonra modifikasyon yapılmamış DH'lerin LeGo_hIDO lentivirüsü ile transüksiyon yapılması ile elde edilen TolDH'ler ile tedavi edilen hayvanların doku örneklerinden yapılan analizleri;

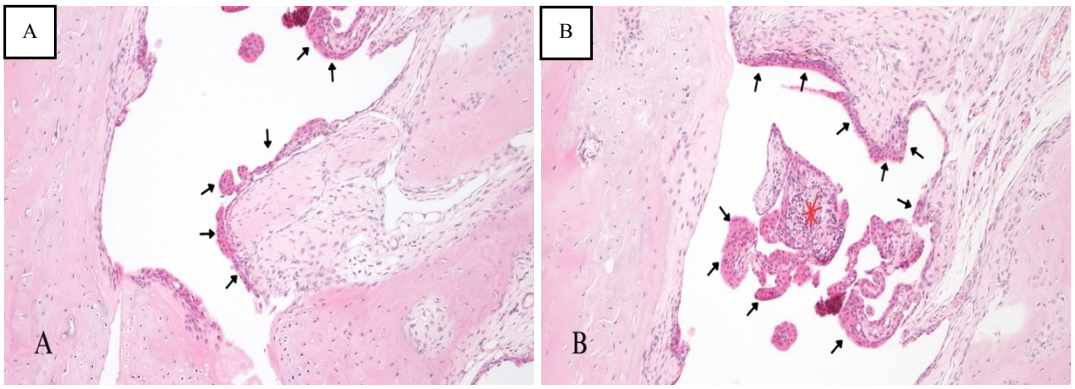
Sinovyal hiperplazi, sinovyal membranda orta ila hafif derecede mononükleer hücre infiltrasyonları ve belirgin pannus oluşumu gözlenmiştir. Pannus dokusu içerisinde hafif derecede yağ doku infiltrasyonları da dikkati çekmiştir. Kıkırdak dokuda yaygın dejeneratif-nekrotik değişiklikler, hiposelülarite ve fissür oluşumları dikkati çekmiştir. Nekrotik kıkırdak bölgelerine eşlik eden osteolizis ve süperfisiyal erozyonlar ile pannus dokusunun periartiküler eklem yüzeyini kapladığı saptanmıştır. Osteolizis alanlarında periosteal kemik çıkıntıları gözlenmiştir. Yer yer eklem boşluğunun neredeyse tamamen gözden kaybolduğu belirlenmiştir. Sadece primer DH'ler ile tedavi edilen gruba göre sinovyal hiperplazinin daha hafif olduğu görülmüştür.



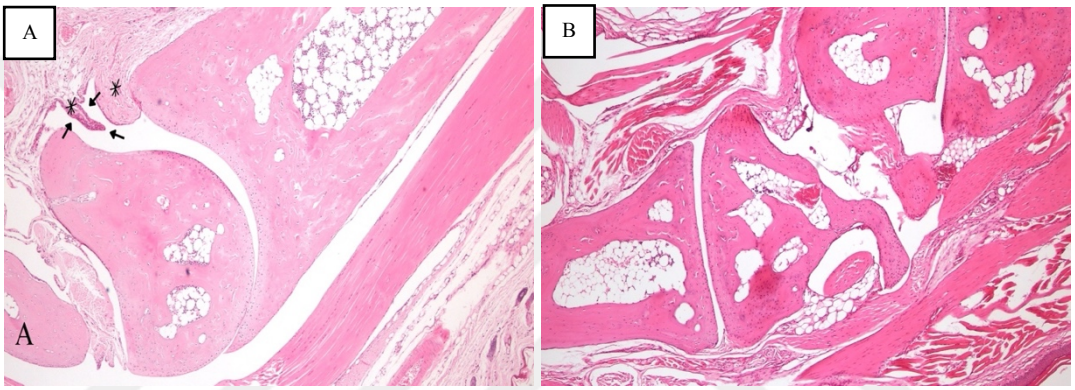
Şekil 123. H2, Romatoid artritli tibiotarsal eklem bölgesi (beyaz ok)



Şekil 124. Sinovyal hiperplazi (siyah oklar), sinovyal membranda hafif şiddetli mononükleer hücre infiltrasyonları ve pannus oluşumu (asteriks) gözlenmiştir. Pannusta yağ doku infiltrasyonlarına (çember) rastlanmıştır. Kondrositlerde dejeneratif-nekrotik değişiklikler ve fissür oluşumları (sarı oklar) ile eklem boşluğu neredeyse tamamen gözden kaybolmuş olduğu dikkati çekmiştir. (x4 büyütme)



Şekil 125. Sinovyal hiperplazi (siyah oklar) ve sinovyal membranın eklem boşluğu içerisine dislokasyonu gözlenmiştir. Sinovyal membranda orta şiddetli mononükleer hücre infiltrasyonu (asteriks) dikkati çekmiştir. (x10 büyütme)



Şekil 126. A. kontrol dokusu sol tibiotarsal eklem bölgesi- Sinovyal hiperplazi (siyah oklar), Sinovyal membranda orta şiddetli mononükleer hücre infiltrasyonları (asteriks), pannus oluşumu dikkati çekmiştir. (x4 büyütme) kontrol dokusu sol tibiotarsal eklem bölgesi. (x4 büyütme)

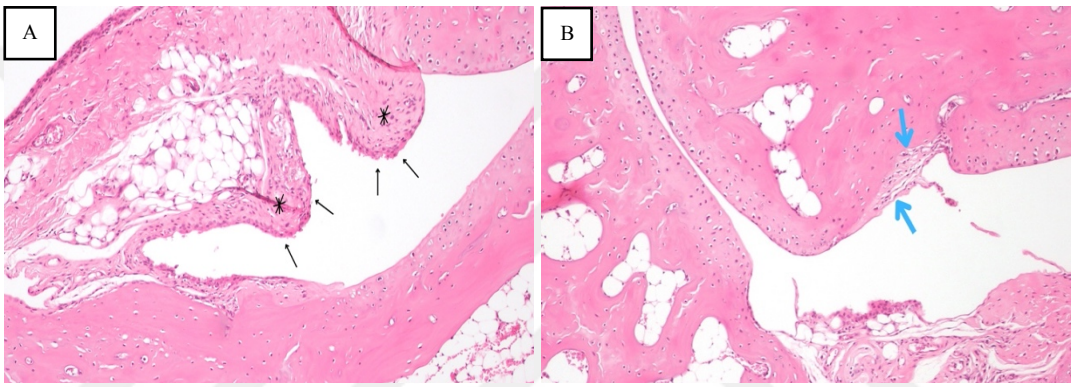
Model oluşturulduktan sonra DH'lerin LeGo_hIDO lentivirüsü ile transüksiyon yapılması sonrası kolajen ile kültür ortamında muamele edilerek antijene spesifik TolDH'ler elde edilerek tedavi edilen hayvanların doku örneklerinden yapılan analizler;

Tibiotarsal eklem bölgesinde sinovyal hiperplazi ve mononükleer hücre infiltrasyonları gözlenmiştir. Subsinovyal alanda neovaskülarizasyon ve pannus dokusu içerisinde yağ infiltrasyonları tespit edilmiştir. Bazı alanlarda sinovyal membranın yabancı cisim (keratin) ile ilişkili olarak çok şiddetli mononükleer hücre infiltrasyonu ve buna bağlı yabancı cisim reaksiyonu geliştirdiği izlenmiştir. Kıkırdak dokuda yaygın nekrotik değişiklikler, süperfisiyal erozyonlar ve osteolizis alanları dikkati çekmiş, bu lezyonlara eşlik eden pannus dokusunun periartiküler eklem yüzeyini kapladığı belirlenmiştir. Kondrositlerde dejeneratif-nekrotik değişiklikler, hiposelülarite ve belirgin fissür oluşumları izlenmiştir. Osteolizis alanlarında

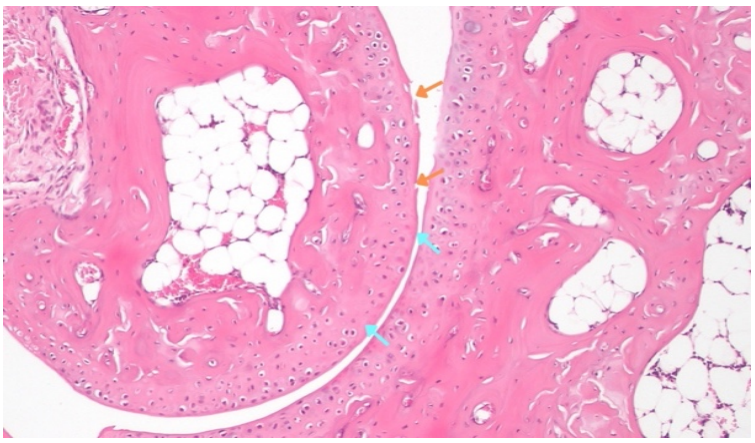
periosteal kemik çıkıntıları gözlenmiş ve eklem boşluğunun büyük oranda ortadan kalktığı saptanmıştır.



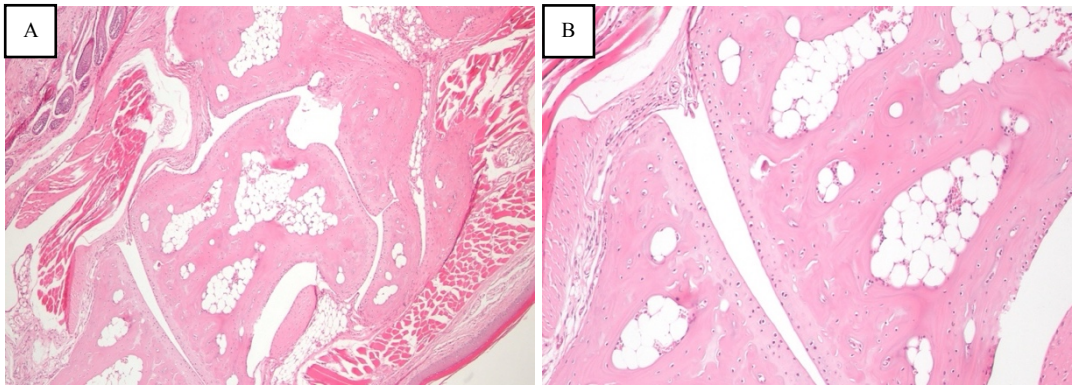
Şekil 127. Romatoid artritli tibiotarsal eklem bölgesi (beyaz ok)



Şekil 128. Sinovyal hiperplazi (siyah oklar) ve pannus oluşumu, sinovyal membranda şiddetli mononükleer hücre infiltrasyonları (asteriks) ve pannusta yağ doku infiltrasyonları gözlenmiştir. (x10 büyütme) B. Kıkırdak dokuda meydana gelen nekrotik değişiklikler osteoliz ve süperfisiyal erozyonlar ile pannus periartiküler eklem yüzeyini kaplamıştır. (Mavi oklar) (x10 büyütme)



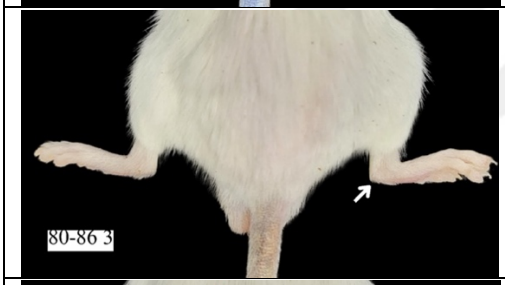
Şekil 129. Kondrositlerde nekrotik değişiklikler, fissür oluşumları (sarı oklar) ve hiposelülarite dikkati çekmiştir (mavi oklar). (x10 büyütme)

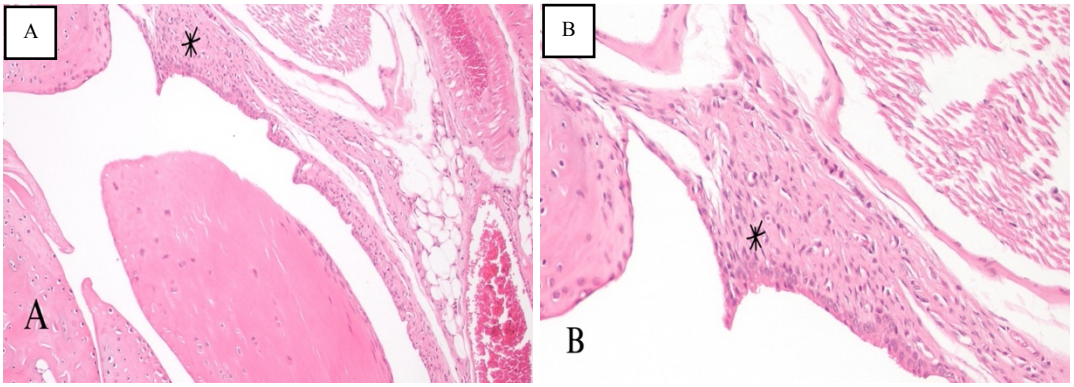


Şekil 130. HK4 kontrol dokusu sol tibiotarsal eklem bölgesi (x4 büyütme) B. HK4 kontrol dokusu sol tibiotarsal eklem bölgesi (x10 büyütme)

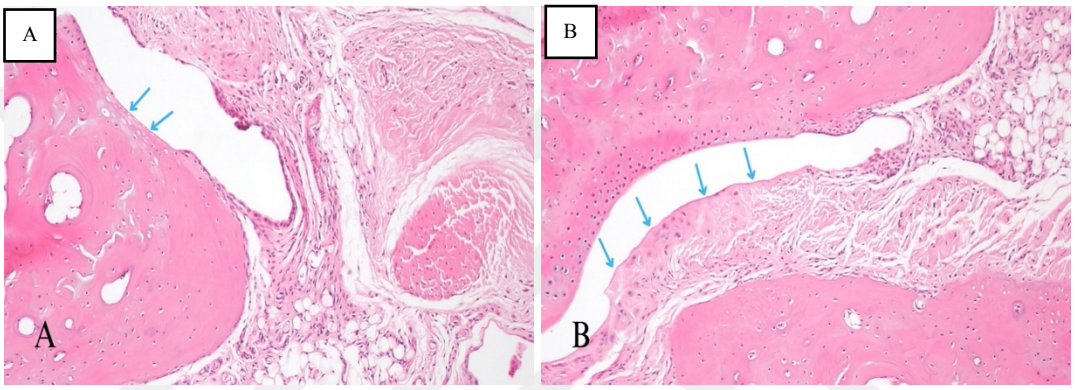
Model oluşturulduktan sonra modifikasyon yapılmamış DH'lerin LeGo_hIDO_sh80_sh86 lentivirüsü ile transüksiyon yapılması ile elde edilen TolDH'ler ile tedavi edilen hayvanların doku örneklerinden yapılan analizleri;

Tablo 20. Tedavi grubu hayvanları eklem görselleri ve tedavinin patolojik etkileri. Romatoid artritli tibiotarsal eklem bölgesi (beyaz ok)

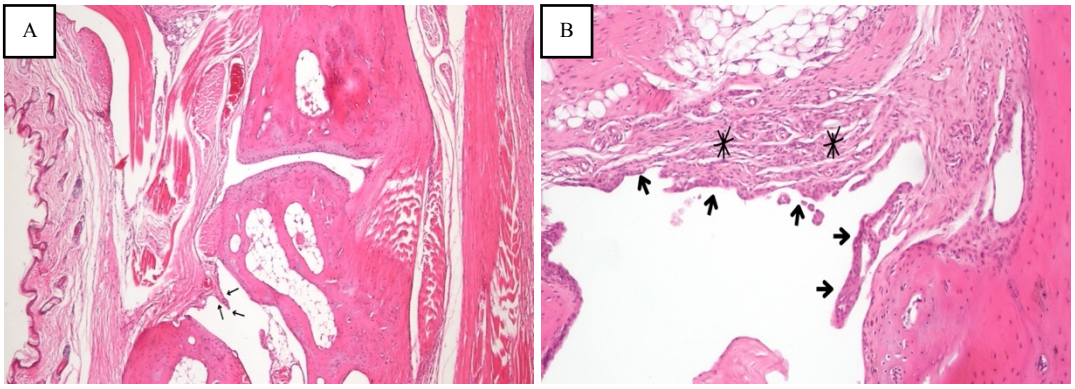
	Kıkırdak dokuda kontrol eklemine göre belirgin hiposelülarite dikkati çekmiştir. Sinovyal membranda hafif derecede sinovyal hiperplazi ve subsinovyal alanda neovaskülarizasyon izlenmiştir. Pannus dokusu içerisinde sınırlı yağ infiltrasyonu gözlenmiştir.
	Kıkırdak dokuda hafif derecede hiposelülarite izlenmiştir. Sinovyal membranda hafif sinovyal hiperplazi ve subsinovyal alanda belirgin neovaskülarizasyon gözlenmiş; pannus dokusu içerisinde yağ infiltrasyonu mevcuttur.
	Sinovyal hafif orta derecede hiperplazi ile birlikte, sinovyal membranda orta şiddette mononükleer hücre infiltrasyonları gözlenmiştir. Kıkırdak dokuda sınırlı bir alanda meydana gelen nekrotik değişikliklere osteolizis ve süperfisiyal erozyonlar eşlik etmiş; bu lezyonların periartiküler eklem yüzeyinde pannus oluşumu ile sonuçlandığı izlenmiştir. Subsinovyal alanda neovaskülarizasyon ve pannus dokusu içerisinde yağ infiltrasyonu mevcuttur.
	Sinovyal membranda hafif şiddette mononükleer hücre infiltrasyonları (asteriks) ve sinovyal hiperplazi gözlenmiştir. Subsinovyal alanda belirgin neovaskülarizasyon izlenmiş, pannus dokusu içerisinde yağ infiltrasyonu mevcuttur. Kondrositik hiposelülarite dikkati çekmiştir.
	Sinovyal membranda hafif-orta derecede hiperplazi ve subsinovyal alanda belirgin neovaskülarizasyon gözlenmiştir. Pannus dokusu içerisinde yağ infiltrasyonu mevcuttur. Kıkırdak dokunun sınırlı bir alanında kondrositik hiposelülarite tespit edilmiştir.



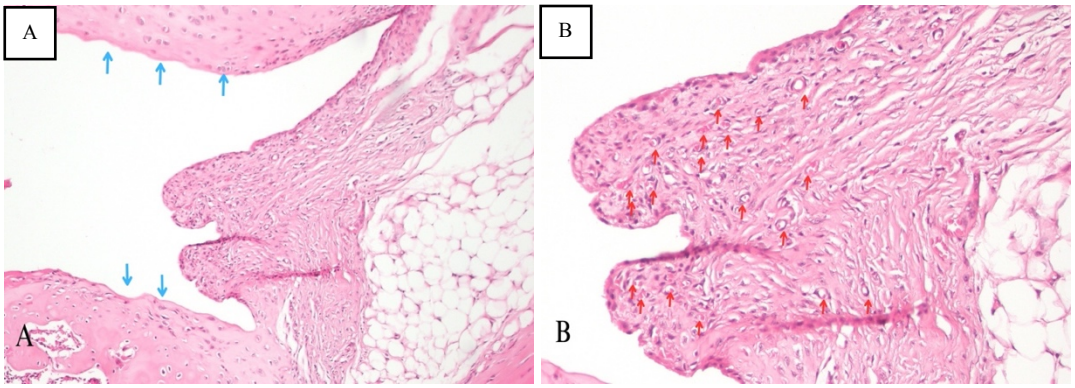
Şekil 131. Sinovyal membranda hafif şiddette mononükleer hücre infiltrasyonları (asteriks) gözlenmiştir. (A: x4 büyütme, B: x10 büyütme)



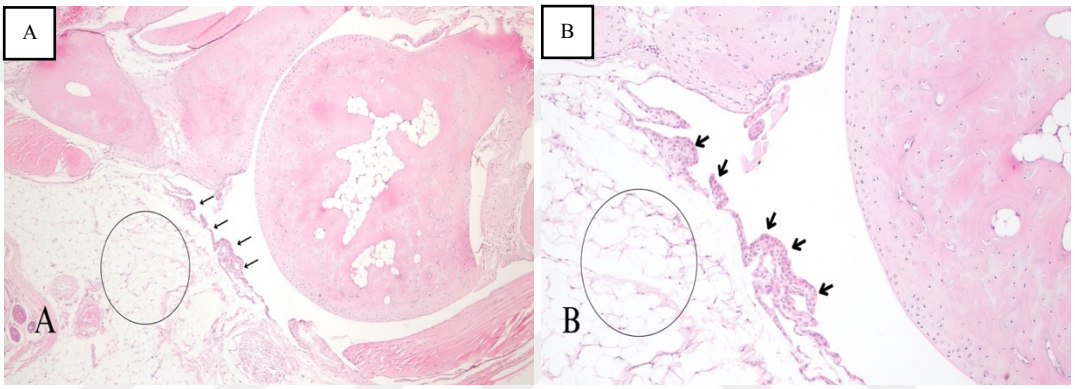
Şekil 132. Kondrositik hiposelülerite (mavi oklar) gözlenmiştir. (x10 büyütme)



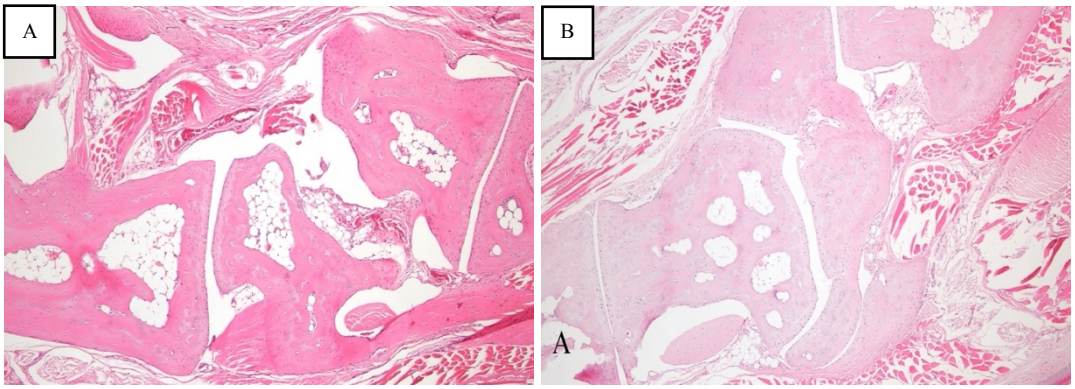
Şekil 133. Hafif derecede sinovyal hiperplazi (siyah oklar) (x4 büyütme) Sinovyal hiperplazi (siyah oklar), sinovyal membranda orta şiddetli mononükleer hücre infiltrasyonları (asteriks) ve neovaskülarizasyon gözlenmiştir. (x10 büyütme)



Şekil 134. Sinovyal membranda hafif şiddetli mononükleer hücre infiltrasyonları (asteriks) ve neovaskülarizasyon (kırmızı oklar) gözlenmiştir. Bir alanda kıkırdak dokuda kondrositik hiposelülerite (mavi oklar) gözlenmiştir. (A: x10 büyütme, B: x20 büyütme)



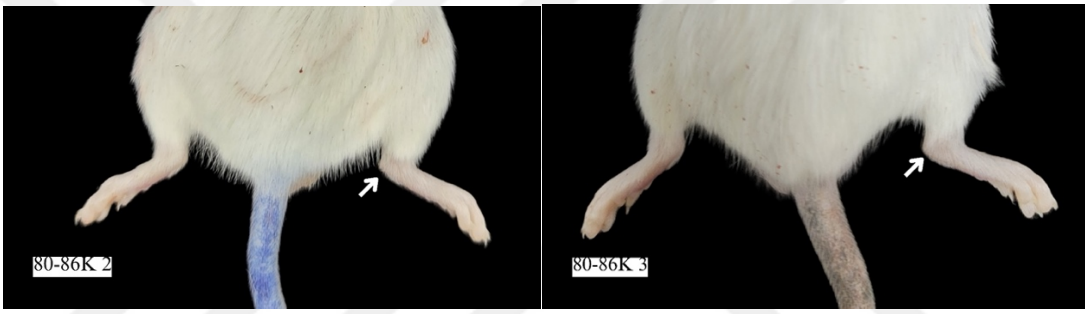
Şekil 135. Hafif derecede sinovyal hiperplazi (siyah oklar) ve subsinovyal alanda yağ doku infiltrasyonu gözlenmiştir (çember). (A: x4 büyütme, B: x10 büyütme)



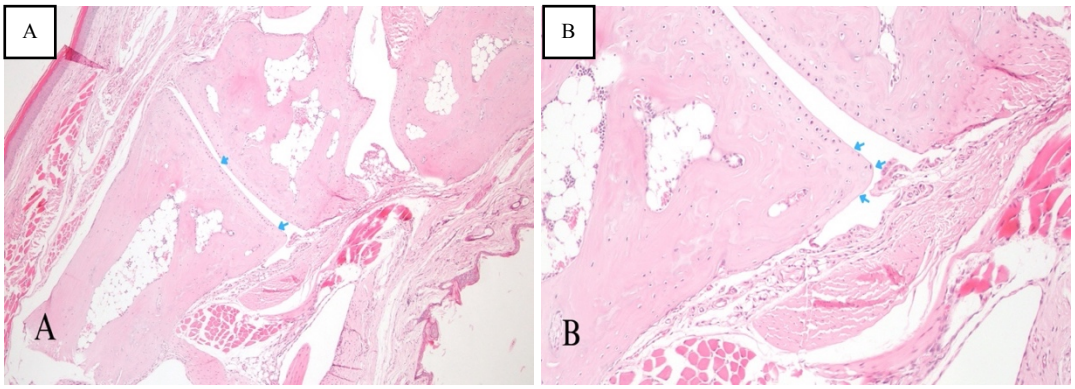
Şekil 136. 80-86 4 kontrol dokusu sol tibiotarsal eklem bölgesi (x4 büyütme) 5 kontrol dokusu sol tibiotarsal eklem bölgesi- Kondrositik hiposelülerite (mavi oklar) gözlenmiştir. (A: x4 büyütme, B: x10 büyütme)

Model oluşturulduktan sonra DH'lerin LeGo_hIDO_sh80_sh86 lentivirüsü ile transüksiyon yapılması sonrası kolajen ile kültür ortamında muamele edilerek antijene spesifik TolDH'ler elde edilerek tedavi edilen hayvanların doku örneklerinden yapılan analizler;

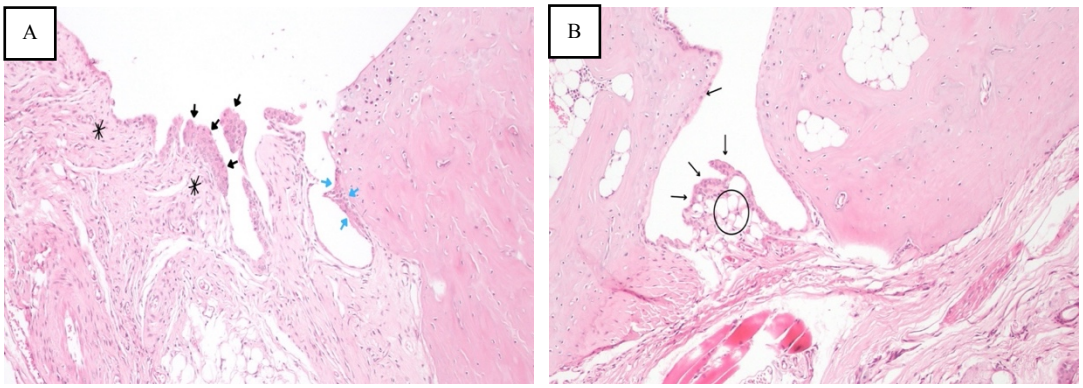
Tibiotarsal eklem bölgesinde, kalkaneus, talus ve sentral tarsal kemiklerde sinovyal hiperplazi, sinovyal membranda hafif şiddetli mononükleer hücre infiltrasyonları dikkati çekmiştir. Pannus dokusu içerisinde yağ infiltrasyonları izlenmiştir. Kıkırdak dokuda yer yer pannus dokusunun periartiküler eklem yüzeyini kapladığı belirlenmiştir. Ayrıca hafif derecede kondrositik hiposelülarite saptanmıştır. Bir alanda eklem boşluğunun gözden kaybolduğu dikkati çekmiştir.



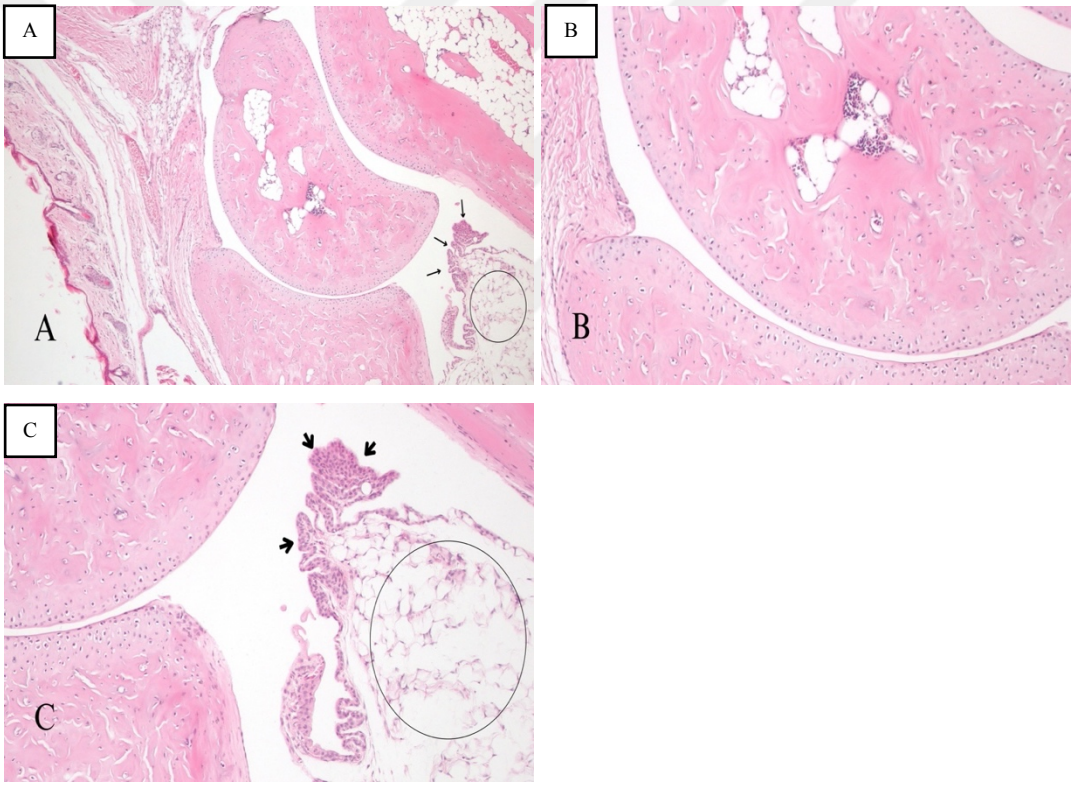
Şekil 137. Romatoid artritli tibiotarsal eklem bölgesi (beyaz ok)



Şekil 138. Hafif derecede sinovyal hiperplazi, kondrositik hiposelülerite (mavi oklar) gözlenmiştir. (A: x4 büyütme, B: x10 büyütme)



Şekil 139. Kıkırdak dokuda meydana gelen nekrotik değişiklikler osteoliz ve süperfisiyal erozyonlar ile pannus periartiküler eklem yüzeyini (mavi oklar) kaplamıştır. Sinovyal hiperplazi (siyah oklar) ve sinovyal membranda hafif şiddetli mononükleer hücre infiltrasyonları (asteriks) gözlenmiştir. (x10 büyütme) Sinovyal hiperplazi (siyah oklar) ve pannus dokusunda yağ infiltrasyonu gözlenmiştir (çember). Kondrositik hiposelülerite (mavi oklar) dikkati çekmiştir. (x10 büyütme)



Şekil 140. 2 kontrol dokusu sol tibiotarsal eklem bölgesi Sinovyal hiperplazi (siyah oklar) ve subsinovyal alanda yağ doku infiltrasyonu gözlenmiştir (çember). (A: x4 büyütme; B, C: x10 büyütme)

Hayvanların sinoviyal hiperplazi, pannus oluşumu, sinovyal membranda infiltrasyonlar, kıkırdak dokuda hiposelülarite ve Kıkırdak dokuda dejeneratif nekrotik değişiklikler ve fissür oluşumu bakımından skorlanarak değerlendirildi. Skor ortalamaları tablo 19'da gösterilmiştir.

Tablo 21. CIA modeli oluşturulan farelerin histapatolojik skorlamaları (Skor 1: Hafif şiddetli, Skor 2: Hafif-orta şiddetli, Skor 3: Şiddetli, Skor 4: Çok şiddetli).

	Synovial hiperplazi	Pannus oluşumu	Synovial membranda infiltrasyonlar	Neovasküları zasyon	Kıkırdak dokuda hiposelülarite	Kıkırdak dokuda dejeneratif nekrotik değişiklikler ve fissür oluşumu
PBS	3,5 ± 0,5	3,5 ± 0,5	3,5 ± 0,5	2	3	4
DH	3	3±1	3±1	1,5±0,5	3±	3±1
DH+Kolajen	4	3,5±0,5	3	2±1	4	3,5±0,5
İğne	1	1	0	2,5±0,5	0	0
LeGO_İG2	4	4	4	2	4	4
LeGO_İG2+Kolajen	3,5±0,5	3,5±0,5	3,5±0,5	2±1	3±1	3,5±0,5
LeGO_iG2-mCTLA4	3± 0,5	2,9+1	2,87±	2,83	3,5±1	2,87±
LeGO_iG2-mCTLA4+ Kolajen	2,5±0,5	2±0	1,5±0,5	2,5±0,5	2,5±0,5	2,5±0,5
LeGO_iG2_hIDO	3,5 ± 0,5	3,5 ± 0,5	2	1	3±1	3,5±0,5
LeGO_iG2_hIDO + Kolajen	2,5±0,5	3±1	3,5±0,5	2,5±0,5	1,5±0,5	2,5±0,5
LeGO_iG2_hIDO_shCD80/shCD86	0,5±0,5	1	1	2,5±0,5	1,5±1,5	1±1
LeGO_iG2_hIDO_shCD80/shCD86 + Kolajen	1,2±0,7	0,8±0,74	1±0,63	3,2±0,74	0,8±7,48	1±0,89

5. TARTIŞMA

Romatoid artrit (RA), otoimmün bir hastalıktır ve başta sinovyal eklemlerde olmak üzere sistemik inflamasyona neden olmaktadır (McInnes & Schett, 2011). Genetik yatkınlığı olan kişilerde çevresel faktörlerin, özellikle sigara gibi uyaranların etkisi olduğu düşünülmektedir. Hastalık genellikle küçük, periferik eklemlerde simetrik tutulumla başlar. Tedavi edilmediğinde, hastalık proksimal eklemlere ilerler ve eklem kıkırdağında kayıp ve kemik erozyonları ile geri dönüşü olmayan eklem yıkımına neden olur. Semptomların altı aydan kısa sürdüğü "erken romatoid artrit" ve altı aydan uzun sürdüğü "yerleşik romatoid artrit" klinik olarak iki kategoriye ayrılır (Aletaha et al., 2010). Tedavi edilmediğinde ciddi morbiditeye neden olur ve ölüm oranları artar. RA, klinik görünümü ve altta yatan patojenetik mekanizmaları açısından heterojendir. Bazı hastalar IgG'ye karşı gelişen romatoid faktör (RF) ve sitrülinlenmiş proteinlere karşı gelişen anti-sitrülinlenmiş protein antikorları (ACPA) gibi otoantikorlar taşırken, bazı hastalar bu antikorları göstermez (van der Helm-van Mil & Huizinga, 2008). Bu çeşitlilik, bireylerin hastalığın tanı, prognoz ve tedavi yanıtlarında büyük farklılıklar gösterebileceğini göstermektedir.

RA tedavisi için kullanılan biyolojik kökenli ajanlar mevcut tedavilerin istenmeyen etkilerini azaltmak amacıyla klinik kullanıma girmiş olsada tedavi maliyetleri önemli ölçüde yükselmiş ve tüberküloz reaktivasyonu gibi yeni yan etkilerin ortaya çıkmasına zemin oluşturmuştur. Ayrıca, bu ajanların kısa ömrlü olmalı nedeniyle tekrarlayan enjeksiyonlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle, alternatif bir strateji olarak genetik olarak modifiye edilerek immün tolerans oluşturma yeteneği kazandırılmış DH'lerin hem lokal hem de sistemik uygulamaları, yeni bir tedavi yaklaşımı olarak öne çıkmaktadır.

Otoimmün hastalık modellerinde (örneğin RA ve MS) DH'lerin terapötik amaçlı kullanımına ilişkin ilk çalışmalar 2000'li yılların başında başlamıştır. Bu dönemde daha çok fare kemik iliği kaynaklı dendritik hücrelere, TNF-α, vitamin D3 ile deksametazon, rapamisin veya NFκB inhibitörü (BAY-DC) gibi ajanlar kullanılarak kimyasal yolla tolerojenik özellik kazandırılmıştır (Stoop ve ark., 2013'ün derlemesi). Daha sonra geliştirilen bir yaklaşımda ise eksojen indolamin 2,3-dioksijenaz (İDO) ile muamele edilen DH'lerin immatür fenotip sergilediği ve antijene özgül T hücre yanıtlarını baskılayabildiği bildirilmiştir (Bracho-Sanchez, Hassanzadeh, Brusko,

Wallet, & Keselowsky, 2019). Bu yöntemlerle önemli ölçüde olumlu sonuçlar elde edilmekle birlikte, DH'lerin hangi koşullarda ve ne kadar süreyle bu ajanlara maruz bırakıldığı ve hangi immünolojik mikro çevrede uygulandığı, hücrelerin fenotipini değiştirerek tolerojenik özelliklerini kaybedip efektör fonksiyonlar kazanma riskini beraberinde getirmektedir. Bu riski azaltmak için öne çıkan alternatiflerden biri, DH'lerin doğrudan genetik olarak modifiye edilerek tolerans indükleyici nitelik kazandırılmasıdır. Örneğin, IL-4 ile transdükte edilmiş DH'lerin kolajen ile indüklenen artrit modelinde hastalık gelişimini engellediği veya hafiflettiği; buna karşılık IL-10 geni ile modifiye edilen DH'lerin etkisiz kaldığı bildirilmiştir (Kim ve ark., 2001; Morita ve ark., 2001). Başka bir genetik stratejide ise otoreaktif T hücreleri ortadan kaldırmak amacıyla FasL veya TRAIL eksprese eden "katil" DH'ler geliştirilmiş ve inflamasyonun baskılanmasında başarılı bulunmuştur (Liu ve ark., 2003). Bizim çalışmamızda ise daha önce transplantasyon modellerinde etkinliği kanıtlanan, fakat otoimmünite bağlamında henüz uygulanmamış iki farklı genetik modifikasyon ile tolerans indükleyici DH'ler elde edilmiştir (Tan ve ark., 2006; Khan ve ark., 2013). Ayrıca, literatürde ilk kez bizim tarafımızdan denenen çoklu gen modifikasyonu stratejisi ile oluşturulan TolDH'lerin RA için kullanıldığı bir tedavi yaklaşımı rapor edilmiştir.

Primer DH gen transferi, bu hücrelerin farklılaşmış ve oldukça hassas yapıları nedeniyle immünoterapi araştırmalarında önemli bir zorluk oluşturmaktadır. Bu çalışmada primer DH'lerin canlılığını koruyarak lentiviral transdüksiyonunun sağlanabilmesi amacıyla farklı stratejiler değerlendirildi.

İlk olarak protamin sülfatın varlığı ve yokluğu test edilerek, literatürde de belirtildiği üzere polikationik ajanların viral partiküllerin hücre yüzeyine bağlanmasını kolaylaştırdığı gözlemlendi. Ancak bizim deneylerimizde de protamin sülfat varlığı, transdüksiyon etkinliğini artırsa da hücre canlılığının sürdürülebilmesi açısından yeterli olmadığı görüldü. Bu bulgu, protamin sülfatın sitotoksik etkisinin primer DH'ler üzerinde belirgin olduğunu düşündürmektedir (Esslinger ve ark., 2003).

Elde edilen lentiviral partiküller konsantre edilerek daha yüksek MOI ile uygulama yapıldı ve eş zamanlı olarak TLR4 blokajı lenti konstratöt kullanılarak gerçekleştirimiştir. TLR4 sinyallemesi, DH'lerde güçlü bir aktivasyon ve apoptoz yanıtını tetiklediği için (Akira & Takeda, 2004), blokajı ile hücrelerin viral partikülleri

daha iyi tolere etmesi ve canlılığını koruması beklenmiştir. Bulgularımız bu hipotezi desteklemiş, TLR4 blokajı altında transdüksiyon oranı ve hücre viabilitesi artış gösterdi. Bununla birlikte, elde edilen transdüksiyon verimi hâlâ düşük seviyelerde kalmıştır.

Son aşamada viral partiküller ile hücrelerin fiziksel olarak yakın temasını artırmak amacıyla plate santrifüj yöntemi (spinoculation) uygulandı. Bu yaklaşım, viral partiküllerin hücre membranı ile etkileşimini artırarak internalizasyonu kolaylaştırmakta ve literatürde de primer hücrelerin transdüksiyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır (O'Doherty, Swiggard, Malim & 2000). Bizim deneylerimizde de en yüksek transdüksiyon verimi bu yöntemle elde edilmiş ve primer DH'lerin canlılığı büyük ölçüde korunabilmiştir

Tüm bu sonuçlar, primer DH'lere gen aktarımında tek bir yöntemin yeterli olmadığını, aksine hem biyokimyasal (protamin sülfat, TLR4 blokajı) hem de fiziksel (spinoculation) yaklaşımların kombinasyonunun gerekli olduğunu göstermektedir. Ancak optimizasyon çalışmalarına rağmen elde edilen transdüksiyon oranlarının maksimum yüzde 40'larda kalması yani hâlen hücre hatlarına göre düşük olması, primer DH'lerin biyolojik özelliklerinden kaynaklanan temel bir sınırlılığa işaret etmektedir. Gelecekte, daha hedeflenmiş lentiviral vektörlerin geliştirilmesi, non-viral gen transfer yöntemlerinin (örn. elektroporasyon, mRNA transkripsiyonu) denenmesi veya hücrelerin tolerojenik özelliklerini bozmadan transdüksiyon kapasitesini artıracak yeni stratejilerin uygulanması bu sınırlılıkların aşılmasına katkı sağlayabilir.

RA hastalığının patofizyolojisini araştırmak ve tedavi yöntemleri geliştirmek için çeşitli hayvan modelleri litaratürde kullanılmıştır. Modeller genellikle iki gruba ayırılmaktadır ilk grup indükleme ile oluşan artrit modellerini ikinci grup genetik olarak manipüle edilmiş spontan artrit modellerini içermektedir (Damerau & Gaber, 2020). Bu çalışamada kullandığımız kolajen kaynaklı artrit (CIA) modeli indükleme ile oluşturlan artrit grubuna girmektedir. Özellikle MHC sınıf II bağımlılığı sinovyal hiperplazi, pannus oluşumu, kıkırdak ve kemik erozyonu gibi histopatolojik bulgularla insan RA'sına önemli ölçüde benzerlik göstermesi nedeniyle en yaygın kullanılan modellerden biridir (Malmström et al., 2020).

Literatürde, DBA/1 fareleri, CIA modeli oluşturmak için yaygın olarak kullanılan bir modeldir. Bununla birlikte, bu farelerin yüksek maliyeti ve tedarik zorlukları,

alternatif fare suşlarının kullanımını gerekli kılmıştır. Ekibimiz tarafından yürütülen bir projede (113S375), DBA/1 farelerinin maliyetleri nedeniyle temin edilememesi üzerine BALB/c farelerinde CIA modeli başarıyla oluşturulmuş ve bu modelin geçerliliği Guvenc ve arkadaşları (2018) tarafından gösterilmiştir.

Mevcut projemizde ise literatürde daha önce bildirilmemiş bir yaklaşım benimsenerek, 11 adet erkek C57BL/6 faresinde bovine kollajen ile CIA modeli oluşturulmuştur. Bu model, RA patogenezini incelemek ve terapötik yaklaşımları test etmek için yeni bir yaklaşım sunmaktadır. Oluşturulan modelde hem eklem kalınlıkları hem de klinik skorları farelerde modelin oluştuğunu göstermiştir ayrıca modelin doğruluğunu ve geçerliliğini değerlendirmek amacıyla, farelerden alınan dokular histopatolojik incelemeye tabi tutulmuş ve modelin başarıyla oluşturulduğu doğrulanmıştır. Enjeksiyon yapılan eklemlerde sinoviyal hiperplazilerin kontrol bacaklarına oranla yüksek miktarda meydana geldiği görülmüştür. Ayrıca pannus oluşu ile desteklenen eklem deformasyonları meydana gelmiştir. Ancak, proje sürecinde C57BL/6 farelerinin üremesinde beklenmedik sorunlar yaşanmıştır. Bu sorunlar, projenin ilerleyişini önemli ölçüde etkilemiş ve hayvan tedarikinde gecikmelere neden olmuştur. Bu nedenle terapötik yaklaşım grupları BALB/c fareleri ile oluşturulmuştur.

BALB/c ve C57BL/6 farelerinin CIA modeli için kullanımı, literatürde sınırlı sayıda çalışma ile temsil edilmektedir. Bu nedenle, bu proje, bu fare suşlarının RA modellerindeki potansiyelini ortaya koyması açısından önemlidir. Tez çalışmamız sonucunda hayvan modellemeden elde edilen bulgular, C57BL/6 farelerinin de RA çalışmalarında kullanılabilecek uygun bir model olabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak, bu tez çalışması, C57BL/6 farelerinde bovine kolajen ile CIA modeli oluşturulması ve bu modelin RA çalışmalarında kullanılabilirliğini göstermesi açısından önemli bir bulgu sunmuştur. Eklem kalınlıklarının değerlendirilmesinde, gruplar arasındaki farkların daha net ortaya konulabilmesi amacıyla bireysel varyasyonlar da dikkate alınmış ve bulgular, her hayvanın ayrı bir nokta olarak gösterildiği grafiklerle sunulmuştur. Bu yaklaşım, yalnızca ortalama değerlerin değil, aynı zamanda bireysel yanıtların dağılımının da gözlemlenmesine olanak tanımıştır. Bununla birlikte, insan hastalıklarında olduğu gibi deneysel hayvan modellerinde de hastalığın şiddeti açısından belirgin heterojenite söz konusu olmuş, bazı bireylerde

daha ağır seyirler gözlenirken bazılarında ise hastalık daha hafif düzeyde seyretmiştir. Bu bulgu, modelin biyolojik gerçekçiliğini artırmasının yanı sıra, tedavi yaklaşımlarının etkinliğini değerlendirirken bireysel farklılıkların dikkate alınmasının önemini de vurgulamaktadır.

Çalışmamızda, farklı fare suşları kullanılmasının nedeni BALB/c farelerinin TH2 baskın bir immün yanıt geliştirdiği, C57BL/6 farelerinin ise TH1 ağırlıklı bir bağışıklık profiline sahip olmasıdır (Schulte, Sukhova ve Libby, 2008)-BALB/c fareleri, IL-4, IL-5 ve IL-13 gibi TH2 sitokinlerinin yüksek ekspresyonu nedeniyle humoral bağışıklık yanıtına yatkınlık göstermekte ve alerjik hastalıklara daha duyarlı olmaktadır. Buna karşın, C57BL/6 farelerinde IFN-γ üretimi baskın olup hücre aracılı bağışıklık yanıtı güçlüdür ve özellikle hücre içi patojenlere karşı direnç geliştirilmesinde kritik rol oynamaktadır (Mukhopadhyay ve ark., 2022). Bu farklılıklar, otoimmün hastalıklar ve enfeksiyon hastalıkları modellerinde uygun fare suşunun seçilmesini önemli hale getirmektedir. Çalışmamızda, bu immünolojik farklılıkları göz önünde bulundurarak iki fare suşunda da CIA modeli oluşturabilirliği gösterilmiştir. Laboratuvarımızda yürüttüğümüz diğer otoimmün hastalık modeli olan EAE çalışmalarında sıklıkla gözlenen beden ağırlığı kayıpları, CIA modeli uygulanan farelerde izlenmemiştir. Bu durum, deney süresince tüm hayvanların genel sağlık durumlarının korunmasını sağlamış ve herhangi bir farenin analiz dışı bırakılmasını gerektirmemiştir. Ayrıca, CIA modelinin bu yönü, deneysel tutarlılığı artıran önemli bir avantaj olarak değerlendirilebilir. İnsanlarda da RA seyrinde beden ağırlığı kaybı tipik bir bulgu olmayıp, hastalık daha çok eklem inflamasyonu ve buna bağlı fonksiyonel kısıtlılıkla karakterizedir. Bu paralellik, CIA modelinin translasyonel değerini güçlendirmekte ve elde edilen verilerin klinik yansıtılabilirliğini artırmaktadır.

Hem bölünen hem de bölünmeyen hücreleri enfekte edebilmeleri nedeniyle lentivirüsler gen aktarımında yaygın olarak kullanılır. Ek olarak, hedef hücre genomuna kalıcı entegrasyon sağlayarak uzun süreli ve tutarlı gen ekspresyonunun elde edilmesini sağlarlar. Bu tez kapsamında genetik modifikasyon için lentiviral vektör sistemi kullanılmıştır. Özellikle *in vivo* gen modifikasyonu çalışmalarında transgen ifadesinin sürekliliğini sağlamak için lentiviral vektörlerin konakçı genomuna kalıcı olarak entegre olma yeteneği çok önemlidir. Bunun yanı sıra, bu

sistemlerin replikasyon yeteneğinden yoksun olmaları ve immünojenitelerinin azaltılmış olması, güvenlik açısından daha uygun duruma gelmesini sağlamıştır. Lentiviral vektörlerin tercih edilme nedenlerinden bir diğeri de yaklaşık 8–10 kb'lık taşıma kapasiteleri sayesinde büyük gen dizilerinin veya birden fazla ekspresyon kasetinin aynı anda aktarılmasını sağlamasıdır. Bu çalışmada kullanılan lentiviral sistem, hedef genin uzun süreli, güvenli ve etkili bir şekilde hücre içine aktarılması için uygun bir vektör olarak değerlendirilmiştir. (Escors & Breckpot, 2010)

Profesyonel antijen sunan hücreler olarak bilinen DH'ler yabancı antijenleri tanıma, onları işleme ve MHC molekülleri aracılığıyla, naif T hücrelerine sunarak bağışıklık tepkilerini başlatırlar. DH'ler otoimmün hastalıkların hem patogenezinde hem de immünoregülasyon süreçlerinde hedef hücrelerdir. DH'lerin keşfi ve adaptif bağışıklık yanıtlarını başlatmadaki önemli rolünü anlaşılır kılmasından dolayı Ralph M. Steinman, 2011 yılında Nobel Fizyoloji veya Tıp Ödülü'ne layık görülmüştür. (Ganguly, Haak, Sisirak, & Reizis, 2013).

Biz projemizde DH'leri tolerans indükleyici hale getirmek için üç ayrı genetik modifikasyon stratejisi kullandık. İlk yaklaşım olarak indolamin 2,3-dioksijenaz (IDO) genini baskılayıcı bir strateji kullanılarak gen aktarımı yapılmış DH'leri kullandık. İkinci yaklaşımda ise, fare DH'lerine CTLA4-KDEL adı verilen ve eş uyaran molekülleri Endoplazmik retikulum'da tutarak hücre yüzeyinde B7 (CD80/86) moleküllerinin ekspresyonunu engelleyen füzyon proteinini kodlayan lentiviral vektör ile gen aktarımı yapıldı. Üçüncü yaklaşımda ise DH'lerde hIDO ifadesini arttırırken eş uyaran moleküllerinin (CD80 ve CD86) yüzeydeki ifadelerini azaltacak şekilde modifiye eden gen aktarımı yapılmış DH'leri kullandık. Bu yaklaşım, otoimmün hastalıkların tedavisinde DH'lerin potansiyelini değerlendirmek için yeni bir perspektif sunmaktadır. Hücresel olarak bu dizaynımızın primer hücrelerde T hücre uyarımı için gerekli olan eş uyarım sinyallerşinden CD80-CD86'yı azaltığını gösterdik. Uygulanan tedavi yaklaşımı, deneysel artrit modelimizde eklem kalınlıklarında anlamlı düzeyde azalma sağlamış ve buna paralel olarak klinik skorlar üzerinde belirgin bir iyileşme gözlemlenmiştir. Histopatoloji analizlerimiz de bu bulgularımızı desteklemektedir. Sinoviyal hiperplazide azalma olduğu gösterilmiş ve pannus oluşumunda tedavi edilmeyen gruba göre hafif derecede düzelme meydana gelmiştir. Hayvanların klinik

skorları için yapılan gözlemlerde tedavi verilen gruplarda gözle görülür şekilde enjeksiyon yapılan ayağının kullanabilirliğinin arttığını gözlemlenmiştir.

IDO, triptofan metabolizmasında rol oynayan bir enzim olup, immün toleransın indüklenmesinde önemli bir rol oynar. RA hastalarında yapılan erken dönem çalışmalarda, güçlü bir IDO indükleyici ajan olan interferon- gama (IFN-γ)'nın klinik tedavi edici etkinliği gösterilmiştir. Bu etkinin, IDO aktivitesi sonucu triptofan düzeylerinin azalması ve T hücre aktivasyonunun baskılanmasıyla ilişkili olduğu belirtilmiştir. Daha sonraki çalışmalarda, triptofan metabolizmasının artırılmasının, RA hastalarında T hücre aktivitesini baskılamak için yeni bir terapötik strateji olabileceği öne sürülmüştür (Szántó ve ark.,2007). Bu görüş, RA hastalarında yapılan bir başka çalışmayla daha da desteklenmiştir. Bir çalışmada, sinoviyal dokudan izole edilen DH'lerin IDO eksprese ettiği ve bu durumun T hücre proliferasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (Munn ve ark., 2002). Bu bulgular, IDO'nun RA patogenezinde ve tedavisinde önemli bir rol oynayabileceğini ortaya koymuştur.

Çalışmamızda, uygulanan tedavi protokollerinin etkinliği hem eklem kalınlıkları hem de klinik skorlamalar üzerinden değerlendirilmiş ve her iki parametrede de anlamlı iyileşmeler saptanmıştır. Özellikle IDO ile tedavi edilen gruplarda, klinik gözlemler histopatolojik bulgularla da desteklenmiştir. Histopatoloji analizleri, tedavi edilmeyen kontrol grubuna kıyasla sinoviyal hiperplazide belirgin bir azalma olduğunu ve pannus oluşumunun da anlamlı şekilde gerilediğini ortaya koymuştur. Bu bulgular, IDO aracılı immün regülasyonun yalnızca klinik düzeyde iyileşmeye katkı sağlamakla kalmadığını, aynı zamanda eklem dokusundaki patolojik değişikliklerin de gerilemesine yol açtığını göstermektedir. Dolayısıyla, IDO temelli tedavilerin eklem inflamasyonunu baskılamada ve doku hasarını sınırlandırmada potansiyeli güçlü bir aday olarak öne çıktığı söylenebilir. Bu strateji, T hücre aktivitesini baskılayarak immün toleransı artırmayı ve hastalık semptomlarını hafifletmeyi hedeflemektedir.

Kolajen ile indüklenen artrit modellerinde IDO geni aktarılmış DH tedavisi ile ilgili olarak Bianco ve arkadaşlarının 2009 yılında yayımladıkları çalışma dikkat çekmektedir. Bu ilginç çalışmada kolajen ile artrit oluşturulan farelere IDO geninin adenovirus aracılı olarak DH'lere transdüksiyonu ardından elde edilen tolDH'lerin ve bu DH'lerden kaynaklanan eksozomların artrit gelişiminin önleyebildiği gösterilmiştir. Çalışmanın sonuçları heyecan verici olmakla beraber adenoviral

vektörlere karşı zaman içerisinde gelişen immün yanıt ile bu vektörlerin etkisiz hale gelebilmesi ve ardışık uygulamalarda immün sistem tarafından hızla tanınarak etkisizleştirilmesi olasıdır (Bianco, Kim, Ruffner ve Robbins, 2009). Dolayısıyla bizim çalışmamızda immünojenitesinin daha düşük olduğu bilinen lentiviral vektörlerle gen transferi yapılan DH'ler kullanılmıştır. Kullanılan lentiviral vektör ile tolDH eldesinin CIA modeli oluşturulan farelerin hem eklem kalınlıklarında hem de klinik skorlarında azalmayı sağladığı gösterilmiştir. Histopatoloji bulgularımız da sonuçlarımıza paralel şekilde inflamasyonun azaldığını gösterilmiştir.

Abatacept, insan sitotoksik T lenfosit ilişkili protein (CTLA-4) ile insan immünoglobulin G1'in (IgG1) Fc kısmının füzyonundan oluşan bir proteindir. CTLA-4, hem B7.1 (CD80) hem de B7.2 (CD86) moleküllerine yüksek afiniteyle bağlanarak CD28-B7 etkileşimini bloke eder ve bu sayede T hücre ko-stimülasyonunu engeller. Bu mekanizma üzerinden abatacept'in RA tedavisinde etkili olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, CD28-B7 etkileşimi naif T hücrelerin aktivasyonu için kritik bir basamaktır. Dolayısıyla abatacept, bu sinyal yolunu baskılayarak T hücre aktivasyonunu inhibe eder. Yapılan çalışmalarda abatacept kullanımının CIA fare modelinde, $CD4^+$ T hücrelerinin yokluğunda dahi hastalığın ilerlemesini ve aktivitesini anlamlı ölçüde azaltığı gösterilmiştir (Jansen ve ark., 2015). Yapılan başka bir çalışmada, CTLA-4 hücre dışı kısmı ile insan immünoglobulin G1'in (IgG1) Fc bölgesinden oluşan çözünür bir füzyon proteini kodlayan bir gen taşıyan adenovirüs vektörü geliştirilmiş ve fare tip II CIA modeli bu vektör ile tedavi edildiğinde, tek bir intraartiküler enjeksiyonun serum CTLA4-IgG düzeylerini en az 12 hafta boyunca 10 µg/ml'nin üzerinde koruduğu ve artriti hem klinik hem de histolojik olarak anlamlı şekilde baskıladığı gösterilmiştir (Ijima ve ark., 2001)

Bu veriler ışığında tez çalışmamızda kullandığımız diğer gen modifikasyonu yaklaşımı ise CTLA4-KDEL denilen ve eş uyaran molekülleri ER'da tutarak hücre yüzeyinde CD80/86 moleküllerinin ekspresyonunu engelleyen füzyon proteinini kodlayan genin lentiviral vektör ile DH'lere aktarımı olmuştur. Bu yaklaşım daha önce sadece transplantasyon modelinde kullanılmış olup bizim dışımızda otoimmün hastalık modellerinde araştırma yapılmamıştır. Kornea transplantasyon modelinde, CTLA4-KDEL eksprese eden DH'lerin sistemik (intravenöz) olarak uygulandığında graft yaşamını belirgin olarak uzattığı gösterilmiştir (Khan ve ark., 2013).

Bizim çalışmamızda da CIA modeli oluşturulan farelere benzer bir yaklaşım temel alınarak elde edilen DH'ler lokal olarak uygulanmış ve RA benzeri klinik tablonun belirgin ölçüde geriletilebildiği ortaya konmuştur. Terapötik etkinlik, yalnızca eklem kalınlıklarında gözlenen azalmalarla değil, aynı zamanda klinik skorların anlamlı şekilde düşmesiyle de doğrulanmıştır. Bunun yanı sıra histopatolojik analizler, sinoviyal hiperplazi ve pannus oluşumunda gözlenen gerileme ile bu klinik bulguları desteklemiş ve uygulanan tedavi stratejisinin hem fonksiyonel hem de yapısal düzeyde koruyucu/iyileştirici etkiler ortaya koyduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar, lokal olarak uygulanan genetik olarak modifiye edilmiş DH'lerin, CIA modeli üzerinden değerlendirildiğinde, RA tedavisinde kullanılabilecek güçlü bir hücresel immünoterapi adayı olduğunu düşündürmüştür.

Üçüncü yaklaşımda ise, DH'lerde IDO ekspresyonunu artırırken aynı zamanda kostimülatör moleküller olan CD80 ve CD86'nın ekspresyonlarını azaltacak biçimde genetik modifikasyon gerçekleştirildi. Sebebi Treg hücreleri yüzeylerindeki CTLA-4 ile DH yüzeyinde bulunan eş uyaran sinyalleri CD80/CD86'yla etkinleşerek IDO sentezini artırdığı için plazmit dizaynımızda CD80/86'yı düşürdüğümüzde IDO sentezi de azalacağı için, IDO seviyesini artırabilmek adına aynı plazmitte IDO genetik modifikasyon ile artırılmıştır.

Elde edilen bu genetik olarak değiştirilmiş DH'ler, kolajen ile indüklenerek RA modeli oluşturulan farelere lokal olarak uygulandı ve terapötik etkileri değerlendirildi. Çalışmamızda hem yüksek düzeyde IDO eksprese eden DH'lerin hem de CD80/86 yüzey ekspresyonu baskılanmış DH'lerin uygulanması sonucunda, CIA modeli farelerin eklem kalınlıklarında düzelme ve klinik skorlarında anlamlı iyileşme sağlandığı açıkça ortaya konmuştur. Ayrıca, histopatolojik incelemeler ile elde edilen klinik ve mikroskobik bulgular da bu analiz sonuçlarımızı doğruladı, böylece uygulanan stratejinin yalnızca fonksiyonel düzeyde değil aynı zamanda doku morfolojisi açısından da etkin olduğu gösterilmiştir

TolDH, immün yanıtı baskılayıcı özellikleri nedeniyle otoimmün hastalık modellerinde sıkça denenmektedir. Ancak tolDH'lerin hazırlanmasında kullanılan stratejiye bağlı olarak immün yanıt üzerindeki etkileri farklılık gösterebilmektedir. Antijenle yüklenmemiş veya genel tolerojenik özellik kazandırılmış tolDH'ler, immün sistemde geniş kapsamlı bir baskılama oluşturarak hem hedef antijene hem de kısmen

diğer antijenlere karşı immün yanıtı azaltabilmektedir. Bu durum, spesifik olmayan immünsupresyon nedeniyle enfeksiyon ve tümör gelişimi gibi istenmeyen yan etkilerle ilişkili olabilmektedir. Buna karşılık antijen-spesifik tolDH'ler yalnızca hedef antijene özgü T hücre yanıtlarını baskılamakta, aynı zamanda antijen-spesifik Treg hücrelerinin indüksiyonunu sağlayarak daha seçici ve güvenli bir tolerans profili oluşturmaktadır. Tip II kolajen ile yüklenmiş tolDH'lerin CIA modelinde eklem inflamasyonunu ve klinik artrit skorlarını belirgin şekilde azalttığı daha önce rapor edilmiştir. (Charbonnier ve ark.,2006; Healy, Collins & Thompson, 2008).

Bu doğrultuda çalışmamızda, tip II kolajen ile stimüle edilerek antijen-spesifik özellik kazandırılan tolDH'ler kültür ortamında üretilmiş ve CIA modeli oluşturulan hayvanlara lokal olarak uygulanmıştır. Elde edilen veriler, antijen-spesifik tolDH tedavisinin hem eklem kalınlıklarında hem de klinik artrit skorlarında anlamlı bir iyileşme sağladığını açıkça ortaya koymuştur. Histopatolojik değerlendirmeler de bu bulguları desteklemiş; özellikle sinovyal hiperplazide belirgin bir gerileme saptanmıştır. Bu sonuçlar, antijen-spesifik tolDH uygulamasının CIA modelinde yalnızca semptomatik iyileşmeye değil, aynı zamanda eklem dokusundaki patolojik süreçlerin baskılanmasına da katkı sağladığını göstermektedir. Dolayısıyla, elde edilen bulgular bu yaklaşımın hedefe yönelik, güvenli ve potansiyeli yüksek bir immün tolerans stratejisi olduğunu güçlü bir biçimde desteklemektedir.

Bu projenin uzun dönem hedefi, genetik olarak modifiye edilerek tolerans indükleyici hale getirilmiş dendritik hücrelerin otoimmüniteye yol açan bağışıklık yanıtını hangi moleküler ve hücresel mekanizmalar aracılığıyla düzenlediğinin tanımlanmasıdır. Elde edilecek bulguların, bu zayıflatıcı hastalığın tedavisinde ve önlenmesinde söz konusu yolakların hedeflenebilirliğine dair yeni perspektifler sağlaması beklenmektedir. Eğer başarılı olunursa, bu projenin sonuçları, genetik olarak modifiye edilmiş tolerojenik dendritik hücrelerin RA ve diğer otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılabilecek yenilikçi ve etkili bir strateji olduğunu ortaya koyacaktır.

Tez çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz sonuçları özetlersek;

1. Fare kemik iliğinden elde edilen DH'lerine lentiviral vektörler kullanmak suretiyle %25-40 oranında gen aktarımı yapılabildiği gösterilmiştir.
2. CTLA4-KDEL ile transfeksiyonu veya transdüksiyonu yoluyla modifie edilen gerek Raw 264.7 hücrelerinde gerekse kemik iiğinden elde edilen DH'lerde *de novo* (IFN veya LPS ile uyarım sonrası) CD80 ve CD86 yüzey ekspresyonunun engellenebildiği gösterilmiştir. IDO sentezi aktivitesi ölçüldüğünde de IDO artışı gösterilmiştir.
3. Farelerde RA benzeri model oluşturarak optimize etmek için öncelikle daha ucuz olan BALB/c ve C57BL/6 fareler deneylerde başarı ile kullanılmıştır.
4. Artrit oluşturulan farelerde IDO'yu aşırı eksprese eden DH veya CD80/86 yüzey ekspresyonu azaltılmış DH uygulaması sonrası uygunsuz DH hücre (boş lentiviral vektör, modifiye edilmemiş DH veya PBS) uygulanan farelerle karşılaştırıldığında eklem kalınlıklarının, klinik skorun ve histopatolojik skorun azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca, tedaviyi takiben sinoviyal dokudaki CD4+ T hücre ve CD68+ sinoviyal makrofaj oranlarının azaldığı gösterilmiştir.
5. Çalışmamızda primer dendritik hücrelere (DH) gen transferi için en uygun koşullar belirlenmiş, uygulanan optimizasyon stratejileri sayesinde hem transfeksiyon verimliliği artırılmış hem de hücrelerin canlılıklarının korunması sağlanmıştır. Bu bulgu, tolerojenik veya terapötik amaçlarla genetik olarak modifiye edilmiş DH'lerin fonksiyonel bütünlüklerini kaybetmeden ileri deneysel ve translasyonel çalışmalarda kullanılabileceğini göstermesi açısından önemlidir.

6. KAYNAKÇA

Abhari, K., Shekarforoush, S. S., Hosseinzadeh, S., Nazifi, S., Sajedianfard, J., & Eskandari, M. H. (2016). The effects of orally administered Bacillus coagulans and inulin on prevention and progression of rheumatoid arthritis in rats. Food & Nutrition Research, 60(1). https://doi.org/10.3402/fnr.v60.30876

Aceves-Avila, F. J., Medina, F., & Fraga, A. (2001). The antiquity of rheumatoid arthritis: a reappraisal. The Journal of rheumatology, 28(4), 751–757.

Ai, R., Laragione, T., Hammaker, D., Boyle, D. L., Wildberg, A., Maeshima, K., Palescandolo, E., Krishna, V., Pocalyko, D., Whitaker, J. W., Bai, Y., Nagpal, S., Bachman, K. E., Ainsworth, R. I., Wang, M., Ding, B., Gulko, P. S., Wang, W., & Firestein, G. S. (2018). Comprehensive epigenetic landscape of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. Nature communications, 9(1), 1921. https://doi.org/10.1038/s41467-018-04310-9

Akintayo, R. O., Aworinde, O. O., Ojo, O., Akintayo, F. C., Akinlade, O. M., Awodun, R. O., & Isa, S. O. (2018). Is rheumatoid arthritis an innocent bystander in female reproductive problems? A comparative study of fertility in Nigerian women with and without rheumatoid arthritis. European journal of rheumatology, 5(3), 179–183. https://doi.org/10.5152/eurjrheum.2018.17180

Akira, S., & Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology, 4*(7), 499–511. https://doi.org/10.1038/nri1391

Aletaha, D., & Smolen, J. S. (2018). Diagnosis and management of rheumatoid arthritis: a review. Jama, 320(13), 1360-1372. doi:10.1001/jama.2018.13103

Alpízar-Rodríguez, D., Pluchino, N., Canny, G., Gabay, C., & Finckh, A. (2017). The role of female hormonal factors in the development of rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford, England), 56(8), 1254–1263. https://doi.org/10.1093/rheumatology/kew318

Aqaeinezhad Rudbane, S. M., Rahmdel, S., Abdollahzadeh, S. M., Zare, M., Bazrafshan, A., & Mazloomi, S. M. (2018). The efficacy of probiotic supplementation in rheumatoid arthritis: a meta-analysis of randomized, controlled trials. Inflammopharmacology, 26, 67-76. DOI: 10.1007/s10787-017-0436-y

Azizov, V., Dietel, K., Steffen, F., Dürholz, K., Meidenbauer, J., Lucas, S., Frech, M., Omata, Y., Tajik, N., Knipfer, L., Kolenbrander, A., Seubert, S., Lapuente, D., Sokolova, M. V., Hofmann, J., Tenbusch, M., Ramming, A., Steffen, U., Nimmerjahn, F., Linker, R., … Zaiss, M. M. (2020). Ethanol consumption inhibits TFH cell responses and the development of autoimmune arthritis. Nature communications, 11(1), 1998. https://doi.org/10.1038/s41467-020-15855-z

Balakrishnan, B., & Taneja, V. (2018). Microbial modulation of the gut microbiome for treating autoimmune diseases. Expert review of gastroenterology & hepatology, 12(10), 985-996. https://doi.org/10.1080/17474124.2018.1517044

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., & Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. Annual review of immunology, 18, 767–811. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.767

Bangham, A. D., Standish, M. M., & Watkins, J. C. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. Journal of molecular biology, 13(1), 238-IN27. DOI: 10.1016/S0022-2836(65)80093-6

Barragán-Martínez, C., Amaya-Amaya, J., Pineda-Tamayo, R., Mantilla, R. D., Castellanos-de la Hoz, J., Bernal-Macías, S., Rojas-Villarraga, A., & Anaya, J. M.

(2012). Gender differences in Latin-American patients with rheumatoid arthritis. Gender medicine, 9(6), 490–510.e5. https://doi.org/10.1016/j.genm.2012.10.005
Barrett, J. H., Brennan, P., Fiddler, M., & Silman, A. (2000). Breast-feeding and postpartum relapse in women with rheumatoid and inflammatory arthritis. Arthritis and rheumatism, 43(5), 1010–1015. https://doi.org/10.1002/1529-0131(200005)43:5<1010::AID-ANR8>3.0.CO;2-O
Barrett, J. H., Brennan, P., Fiddler, M., & Silman, A. J. (1999). Does rheumatoid arthritis remit during pregnancy and relapse postpartum? Results from a nationwide study in the United Kingdom performed prospectively from late pregnancy. Arthritis and rheumatism, 42(6), 1219–1227. https://doi.org/10.1002/1529-0131(199906)42:6<1219::AID-ANR19>3.0.CO;2-G
Bauer, T. M., Jiga, L. P., Chuang, J. J., Randazzo, M., Opelz, G., & Terness, P. (2005). Studying the immunosuppressive role of indoleamine 2, 3-dioxygenase: tryptophan metabolites suppress rat allogeneic T-cell responses in vitro and in vivo. *Transplant international*, *18*(1), 95-100. DOI: 10.1111/j.1432-2277.2004.00031.x
Bianco, N. R., Kim, S. H., Ruffner, M. A., & Robbins, P. D. (2009). Therapeutic effect of exosomes from indoleamine 2, 3-dioxygenase–positive dendritic cells in collagen-induced arthritis and delayed-type hypersensitivity disease models. Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology, 60(2), 380-389. DOI: 10.1002/art.24229
Bianco, N. R., Kim, S. H., Ruffner, M. A., & Robbins, P. D. (2009). Therapeutic effect of exosomes from indoleamine 2,3-dioxygenase-positive dendritic cells in collagen-induced arthritis and delayed-type hypersensitivity disease models. *Arthritis & Rheumatism, 60*(2), 380–389. https://doi.org/10.1002/art.24229
Biedermann, L., Zeitz, J., Mwinyi, J., Sutter-Minder, E., Rehman, A., Ott, S. J., ... & Rogler, G. (2013). Smoking cessation induces profound changes in the composition of the intestinal microbiota in humans. PloS one, 8(3), e59260. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059260
Brackertz, D., Mitchell, G. F., & Mackay, I. R. (1977). Antigen-induced arthritis in mice. Arthritis & Rheumatism, 20(3), 841-850. DOI: 10.1002/art.1780200314
Brand, D. D., Latham, K. A., & Rosloniec, E. F. (2007). Collagen-induced arthritis. Nature protocols, 2(5), 1269–1275. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.173
British Society for Immunology. (n.d.). Antigen processing and presentation.
Budden, K. F., Gellatly, S. L., Wood, D. L., Cooper, M. A., Morrison, M., Hugenholtz, P., & Hansbro, P. M. (2017). Emerging pathogenic links between microbiota and the gut–lung axis. Nature Reviews Microbiology, 15(1), 55-63. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.142
Butler, D. M., Malfait, A. M., Mason, L. J., Warden, P. J., Kollias, G., Maini, R. N., ... & Brennan, F. M. (1997). DBA/1 mice expressing the human TNF-alpha transgene develop a severe, erosive arthritis: characterization of the cytokine cascade and cellular composition. Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950), 159(6), 2867-2876. DOI: 10.4049/jimmunol.159.6.2867
Camacho, E. M., Verstappen, S. M., & Symmons, D. P. (2012). Association between socioeconomic status, learned helplessness, and disease outcome in patients with inflammatory polyarthritis. Arthritis care & research, 64(8), 1225–1232. https://doi.org/10.1002/acr.21677

Catrina, A. I., Deane, K. D., & Scher, J. U. (2016). Gene, environment, microbiome and mucosal immune tolerance in rheumatoid arthritis. Rheumatology, 55(3), 391-402. https://doi.org/10.1093/rheumatology/kev282

Charbonnier, L. M., van Duivenvoorde, L. M., Apparailly, F., Cantos, C., Han, W. G., Noël, D., Duperray, C., Huizinga, T. W., Toes, R. E., Jorgensen, C., & Louis-Plence, P. (2006). Immature dendritic cells suppress collagen-induced arthritis by in vivo expansion of CD49b+ regulatory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *177*(6), 3806–3813. https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.6.3806

Chen, D., et al. (2021). *CRISPR/Cas9-mediated gene editing in dendritic cells: A new strategy for tolerance induction*. *Nature Reviews Immunology*, 21(9), 558–572. https://doi.org/10.1038/s41577-021-00526-0

Chen, J., Wright, K., Davis, J. M., Jeraldo, P., Marietta, E. V., Murray, J., ... & Taneja, V. (2016). An expansion of rare lineage intestinal microbes characterizes rheumatoid arthritis. Genome medicine, 8, 1-14 https://doi.org/10.1186/s13073-016-0299-7

Chinese Rheumatology Association (2018). Zhonghua nei ke za zhi, 57(4), 242–251. https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0578-1426.2018.04.004

Clark, D. P., & Pazdernik, N. J. (2012). Molecular biology. Elsevier. https://doi.org/10.1002/bmb.20760

Comi, M., Amodio, G., Passeri, L., Fortunato, M., Santoni de Sio, F. R., Andolfi, G., ... & Gregori, S. (2020). Generation of powerful human tolerogenic dendritic cells by lentiviral-mediated IL-10 gene transfer. *Frontiers in immunology*, *11*, 1260. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01260

Conrad, N., Misra, S., Verbakel, J. Y., Verbeke, G., Molenberghs, G., Taylor, P. N., Mason, J., Sattar, N., McMurray, J. J. V., McInnes, I. B., Khunti, K., & Cambridge, G. (2023). Incidence, prevalence, and co-occurrence of autoimmune disorders over time and by age, sex, and socioeconomic status: a population-based cohort study of 22 million individuals in the UK. Lancet (London, England), 401(10391), 1878–1890. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)00457-9

Courtenay, J.S., Dallman, M.J., Dayan, A.D., Martin, A. & Mosedale, B. Immunization against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. Nature 283, 666–668 (1980)

Curti, A., Trabanelli, S., Salvestrini, V., Baccarani, M., & Lemoli, R. M. (2009). The role of indoleamine 2, 3-dioxygenase in the induction of immune tolerance: focus on hematology. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 113(11), 2394-2401.DOI: 10.1182/blood-2008-07-144485

Däubener, W., & MacKenzie, C. R. (1999). IFN-γ activated indoleamine 2, 3-dioxygenase activity in human cells is an antiparasitic and an antibacterial effector mechanism. Tryptophan, Serotonin, and Melatonin: Basic Aspects and Applications, 517-524.DOI: 10.1007/978-1-4615-4709-9_64

de Avila Machado, M. A., Maciel, A. A., de Lemos, L. L. P., Costa, J. O., Kakehasi, A. M., Andrade, E. I. G., ... & de Assis Acurcio, F. (2013). Adalimumab in rheumatoid arthritis treatment: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Revista Brasileira de Reumatologia (English Edition)*, *53*(5), 419-430. DOI: 10.1016/S2255-5021(13)70113-5

de Groot, P. F., Frissen, M. N., de Clercq, N. C., & Nieuwdorp, M. (2017). Fecal microbiota transplantation in metabolic syndrome: History, present and future. Gut Microbes, 8(3), 253–267. https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1293224

de Santana, F. M., de Carvalho, J. F., Spolidoro, N., Fuoco, L., Lopes, J. B., Perez, M. O., Bunjes, B. G., & others. (2023). Differences of antinuclear antibodies positivity and pattern in psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. *International Journal of Rheumatic Diseases*, *26*(10), 1624–1625. https://doi.org/10.1111/1756-185X.14889
Derdelinckx, J., et al. (2024). Genetic Engineering of Tolerogenic Dendritic Cells: A New Era for Antigen-Specific Immune Modulation. *Cell Communication and Signaling*, 22(1), 75. https://doi.org/10.1186/s12964-024-01641-7
Domen R. E. (1992). The antiquity and origins of rheumatoid arthritis. JAMA, 268(19), 2649. https://doi.org/10.1001/jama.1992.03490190049018
Duve, C. D., Trouet, A., Campeneere, D. D. D., & Baurain, R. (1978). Liposomes as lysosomotropic carriers. Annals of the New York Academy of Sciences, 308(1), 226-234. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1978.tb22025.x
Esslinger, C., Chapatte, L., Finke, D., Miconnet, I., Guillaume, P., Lévy, F., & MacDonald, H. R. (2003). In vivo administration of a lentiviral vaccine targets DCs and induces efficient CD8(+) T cell responses. *The Journal of clinical investigation*, *111*(11), 1673–1681. https://doi.org/10.1172/JCI17098
Fallarino, F., Grohmann, U., Vacca, C., Bianchi, R., Orabona, C., Spreca, A., ... & Puccetti, P. (2002). T cell apoptosis by tryptophan catabolism. Cell Death & Differentiation, 9(10), 1069-1077. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401073
Fallarino, F., Grohmann, U., You, S., McGrath, B. C., Cavener, D. R., Vacca, C., ... & Puccetti, P. (2006). The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor ζ-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. The Journal of Immunology, 176(11), 6752-6761.DOI: 10.4049/jimmunol.176.11.6752
Finckh, A., Gilbert, B., Hodkinson, B., Bae, S. C., Thomas, R., Deane, K. D., Alpizar-Rodriguez, D., & Lauper, K. (2022). Global epidemiology of rheumatoid arthritis. Nature reviews. Rheumatology, 18(10), 591–602. https://doi.org/10.1038/s41584-022-00827-y
Finckh, A., Gilbert, B., Hodkinson, B., Bae, S.-C., Thomas, R., Deane, K. D., Alpizar-Rodriguez, D., & Lauper, K. (2022). Global epidemiology of rheumatoid arthritis. Nature Reviews Rheumatology, 18, 591–602. https://doi.org/10.1038/s41584-022-00835-0
Finnegan, A., Mikecz, K., Tao, P. & Glant, T.T. Proteoglycan (aggrecan)-induced arthritis in BALB/c mice is a Th1-type disease regulated by Th2 cytokines. J. Immunol. 163, 5383–5390 (1999). DOI: 10.4049/jimmunol.163.10.5383
Firestein G. S. (2005). Immunologic mechanisms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Journal of clinical rheumatology : practical reports on rheumatic & musculoskeletal diseases, 11(3 Suppl), S39–S44. https://doi.org/10.1097/01.rhu.0000166673.34461.33
Fisher, M. S., Kurilin, V. V., Bulygin, A. S., Shevchenko, J. A., Philippova, J. G., Taranov, O. S., ... & Sennikov, S. V. (2024). Dendritic cells transfected with DNA constructs encoding CCR9, IL-10, and type II collagen demonstrate induction of immunological tolerance in an arthritis model. *Frontiers in Immunology*, *15*, 1447897.
Foulquier, C., Sebbag, M., Clavel, C., Chapuy-Regaud, S., Al Badine, R., Méchin, M. C., ... & Serre, G. (2007). Peptidyl arginine deiminase type 2 (PAD-2) and PAD-4 but not PAD-1, PAD-3, and PAD-6 are expressed in rheumatoid arthritis synovium in close association with tissue inflammation. Arthritis & Rheumatism: Official Journal

of the American College of Rheumatology, 56(11), 3541-3553. DOI: 10.1002/art.22983
Fraenkel, L., Bathon, J. M., England, B. R., St Clair, E. W., Arayssi, T., Carandang, K., Deane, K. D., Genovese, M., Huston, K. K., Kerr, G., Kremer, J., Nakamura, M. C., Russell, L. A., Singh, J. A., Smith, B. J., Sparks, J. A., Venkatachalam, S., Weinblatt, M. E., Al-Gibbawi, M., Baker, J. F., … Akl, E. A. (2021). 2021 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. Arthritis care & research, 73(7), 924–939. https://doi.org/10.1002/acr.24596
Franklin, E. C., Holman, H. R., Muller-Eberhard, H. J., & Kunkel, H. G. (1957). An unusual protein component of high molecular weight in the serum of certain patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of experimental medicine*, *105*(5), 425-438.DOI: 10.1084/jem.105.5.425
Frumento, G., Rotondo, R., Tonetti, M., Damonte, G., Benatti, U., & Ferrara, G. B. (2002). Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2, 3-dioxygenase. The Journal of experimental medicine, 196(4), 459-468. DOI: 10.1084/jem.20020121
Frumento, G., Rotondo, R., Tonetti, M., Damonte, G., Benatti, U., & Ferrara, G. B. (2002). Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2, 3-dioxygenase. The Journal of experimental medicine, 196(4), 459-468. DOI: 10.1084/jem.20020121
Galarza-Delgado, D. A., Azpiri-Lopez, J. R., Colunga-Pedraza, I. J., Cárdenas-de la Garza, J. A., Vera-Pineda, R., Wah-Suárez, M., Arvizu-Rivera, R. I., Martínez-Moreno, A., Ramos-Cázares, R. E., Torres-Quintanilla, F. J., Valdovinos-Bañuelos, A., Esquivel-Valerio, J. A., & Garza-Elizondo, M. A. (2017). Prevalence of comorbidities in Mexican mestizo patients with rheumatoid arthritis. Rheumatology international, 37(9), 1507–1511. https://doi.org/10.1007/s00296-017-3769-3
Gao, Y., Zhang, Y., & Liu, X. (2024). Rheumatoid arthritis: pathogenesis and therapeutic advances. MedComm, 5(3), e509. https://doi.org/10.1002/mco2.509
Gao, Y., Zhang, Y., & Liu, X. (2024). Rheumatoid arthritis: pathogenesis and therapeutic advances. *MedComm*, *5*(3), e509. doi: 10.1002/mco2.509. PMID: 38469546; PMCID: PMC10925489. https://doi.org/10.1002/mco2.509
GBD 2021 Rheumatoid Arthritis Collaborators (2023). Global, regional, and national burden of rheumatoid arthritis, 1990-2020, and projections to 2050: a systematic analysis of the Global Burden of Disease Study 2021. The Lancet. Rheumatology, 5(10), e594–e610. https://doi.org/10.1016/S2665-9913(23)00211-4
Gimmi, C. D., Freeman, G. J., Gribben, J. G., Sugita, K., Freedman, A. S., Morimoto, C., & Nadler, L. M. (1991). B-cell surface antigen B7 provides a costimulatory signal that induces T cells to proliferate and secrete interleukin 2. Proceedings of the National Academy of Sciences, 88(15), 6575-6579.DOI: 10.1073/pnas.88.15.6575
Gioud-Paquet, M., Auvinet, M., Raffin, T., Girard, P., Bouvier, M., Lejeune, E., & Monier, J. C. (1987). IgM rheumatoid factor (RF), IgA RF, IgE RF, and IgG RF detected by ELISA in rheumatoid arthritis. Annals of the rheumatic diseases, 46(1), 65–71. https://doi.org/10.1136/ard.46.1.65
Gravallese, E. M., & Firestein, G. S. (2023). Rheumatoid Arthritis - Common Origins, Divergent Mechanisms. The New England journal of medicine, 388(6), 529–542. https://doi.org/10.1056/NEJMra2103726
Gregersen, P. K., Silver, J., & Winchester, R. J. (1987). The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid

arthritis. Arthritis and rheumatism, 30(11), 1205–1213. https://doi.org/10.1002/art.1780301102
Guo, X., & Huang, L. (2012). Recent advances in nonviral vectors for gene delivery. Accounts of chemical research, 45(7), 971-979. https://doi.org/10.1021/ar200151m
Güvenç, G., Karaçay, M., Akkoç, A., Çiftçi, K., Oral, H. B., & Yalçın, M. (2018). A New Protocol for Collagen-Induced Local Arthritis Model in Balb/c Mice. Turkish Journal of Immunology, 6(1). 10.25002/tji.2018.771
Güvenç, G., Karaçay, M., Akkoç, A., Çiftçi, K., Oral, H. B., & Yalçın, M. (2018). A New Protocol for Collagen-Induced Local Arthritis Model in Balb/c Mice. *Turk J Immunol*, *6*(1), 30-36. DOI: 10.25002/tji.2018.771
Hajishengallis G. (2015). Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. Nature reviews. Immunology, 15(1), 30–44. https://doi.org/10.1038/nri3785
Harding, F. A., McArthur, J. G., Gross, J. A., Raulet, D. H., & Allison, J. P. (1992). CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. Nature, 356(6370), 607-609.DOI: 10.1038/356607a0
Hargreaves E. R. (1958). A survey of rheumatoid arthritis in West Cornwall; a report to the Empire Rheumatism Council. Annals of the rheumatic diseases, 17(1), 61–75. https://doi.org/10.1136/ard.17.1.61
Haritha, P. N., Uma, S. K. D., Nagaratna, D. P., Chaitanya, S. P. K., & Gunasekharan, V. (2012). Gene therapy-a review. International Journal of Biopharmaceutics, 3(1), 55-64.
He, Y., Ge, C., Moreno-Giró, À., Xu, B., Beusch, C. M., Sandor, K., Su, J., Cheng, L., Lönnblom, E., Lundqvist, C., Slot, L. M., Tong, D., Urbonaviciute, V., Liang, B., Li, T., Lahore, G. F., Aoun, M., Malmström, V., Rispens, T., Ernfors, P., … Holmdahl, R. (2023). A subset of antibodies targeting citrullinated proteins confers protection from rheumatoid arthritis. Nature communications, 14(1), 691. https://doi.org/10.1038/s41467-023-36257-x
Healy, L. J., Collins, H. L., & Thompson, S. J. (2008). Systemic administration of tolerogenic dendritic cells ameliorates murine inflammatory arthritis. *The open rheumatology journal*, *2*, 71–80. https://doi.org/10.2174/1874312900802010071
Holmdahl, R., Jansson, L., & Andersson, M. (1986). Female sex hormones suppress development of collagen-induced arthritis in mice. Arthritis and rheumatism, 29(12), 1501–1509. https://doi.org/10.1002/art.1780291212
Holmdahl, R., Jansson, L., Larsson, E., Rubin, K., & Klareskog, L. (1986). Homologous type II collagen induces chronic and progressive arthritis in mice. Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology, 29(1), 106-113. DOI: 10.1002/art.1780290114
Holoshitz J. (2010). The rheumatoid arthritis HLA-DRB1 shared epitope. Current opinion in rheumatology, 22(3), 293–298. https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e328336ba63
Hopkins, S.J., Freemont, A.J. & Jayson, M.I. Pristane-induced arthritis in Balb/c mice. I. Clinical and histological features of the arthropathy. Rheumatol. Int. 5, 21–28 (1984). DOI: 10.1007/BF00541361
Hou, X., Zaks, T., Langer, R., & Dong, Y. (2021). Lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nature Reviews Materials*, *6*(12), 1078-1094. DOI:10.1038/s41578-021-00358-0

Hsieh, P. H., Wu, O., Geue, C., McIntosh, E., McInnes, I. B., & Siebert, S. (2020). Economic burden of rheumatoid arthritis: a systematic review of literature in biologic era. Annals of the rheumatic diseases, 79(6), 771–777. https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-216243
Hu, Y., Costenbader, K. H., Gao, X., Al-Daabil, M., Sparks, J. A., Solomon, D. H., Hu, F. B., Karlson, E. W., & Lu, B. (2014). Sugar-sweetened soda consumption and risk of developing rheumatoid arthritis in women. The American journal of clinical nutrition, 100(3), 959–967. https://doi.org/10.3945/ajcn.114.086918
Ijima, K., Murakami, M., Okamoto, H., Inobe, M., Chikuma, S., Saito, I., ... & Uede, T. (2001). Successful gene therapy via intraarticular injection of adenovirus vector containing CTLA4IgG in a murine model of type II collagen-induced arthritis. *Human gene therapy*, *12*(9), 1063-1077. https://doi.org/10.1089/104303401750214285
Inglis, J. J., Šimelyte, E., McCann, F. E., Criado, G., & Williams, R. O. (2008). Protocol for the induction of arthritis in C57BL/6 mice. Nature protocols, 3(4), 612-618. DOI: 10.1038/nprot.2008.19
Jansen, D. T., el Bannoudi, H., Arens, R., Habets, K. L., Hameetman, M., Huizinga, T. W., ... & Toes, R. E. (2015). Abatacept decreases disease activity in the absence of CD4+ T cells in a collagen-induced arthritis model. *Arthritis Research & Therapy*, *17*(1), 220. https://doi.org/10.1186/s13075-015-0731-1
Jansson, L., & Holmdahl, R. (1989). Oestrogen induced suppression of collagen arthritis. IV: Progesterone alone does not affect the course of arthritis but enhances the oestrogen-mediated therapeutic effect. Journal of reproductive immunology, 15(2), 141–150. https://doi.org/10.1016/0165-0378(89)90033-8
Jiang, X., Alfredsson, L., Klareskog, L., & Bengtsson, C. (2014). Smokeless tobacco (moist snuff) use and the risk of developing rheumatoid arthritis: results from a case-control study. Arthritis care & research, 66(10), 1582–1586. https://doi.org/10.1002/acr.22325
Jonsson R. (2020). Erik Waaler (1903-1997): one of the founders of rheumatological immunology who discovered rheumatoid factor. Annals of the rheumatic diseases, 79(9), 1141–1142. https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-216822
Jonuleit, H., Schmitt, E., Steinbrink, K., & Enk, A. H. (2001). Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. Trends in immunology, 22(7), 394-400. DOI: 10.1016/S1471-4906(01)01952-4
Jooss, K., Gjata, B., Danos, O., von Boehmer, H., & Sarukhan, A. (2001). Regulatory function of in vivo anergized CD4+ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(15), 8738-8743. DOI: 10.1073/pnas.151088898
Karami, P., Gholamin, D., Fathi, F., Afsar, T., & Johari-Ahar, M. (2024). Anti-CCP biosensors in rheumatoid arthritis. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry, 561, 119767. https://doi.org/10.1016/j.cca.2024.119767
Kitajima, T., Ariizumi, K., Bergstresser, P. R., & Takashima, A. (1996). A novel mechanism of glucocorticoid-induced immune suppression: the inhibiton of T cell-mediated terminal maturation of a murine dendritic cell line. The Journal of clinical investigation, 98(1), 142-147.DOI: 10.1172/JCI118759
Klareskog, L., Stolt, P., Lundberg, K., Källberg, H., Bengtsson, C., Grunewald, J., Rönnelid, J., Erlandsson Harris, H., Ulfgren, A.-K., Rantapää-Dahlqvist, S., Eklund, A., Padyukov, L. and Alfredsson, L. (2006), A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: Smoking may trigger HLA–DR (shared epitope)–restricted

immune reactions to autoantigens modified by citrullination. Arthritis & Rheumatism, 54: 38-46. https://doi.org/10.1002/art.21575
Kochi, Y., Yamada, R., Kobayashi, K., Takahashi, A., Suzuki, A., Sekine, A., Mabuchi, A., Akiyama, F., Tsunoda, T., Nakamura, Y., & Yamamoto, K. (2004). Analysis of single-nucleotide polymorphisms in Japanese rheumatoid arthritis patients shows additional susceptibility markers besides the classic shared epitope susceptibility sequences. Arthritis and rheumatism, 50(1), 63–71. https://doi.org/10.1002/art.11366
Koga, T., Kakimoto, K., Hirofuji, T., Kotani, S., Ohkuni, H., Watanabe, K., ... & Saisho, K. (1985). Acute joint inflammation in mice after systemic injection of the cell wall, its peptidoglycan, and chemically defined peptidoglycan subunits from various bacteria. Infection and immunity, 50(1), 27-34.DOI: 10.1128/iai.50.1.27-34.1985
Konig, M. F., Abusleme, L., Reinholdt, J., Palmer, R. J., Teles, R. P., Sampson, K., Rosen, A., Nigrovic, P. A., Sokolove, J., Giles, J. T., Moutsopoulos, N. M., & Andrade, F. (2016). Aggregatibacter actinomycetemcomitans-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. Science translational medicine, 8(369), 369ra176. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaj1921
Kouskoff, V., Korganow, A. S., Duchatelle, V., Degott, C., Benoist, C., & Mathis, D. (1996). Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. Cell, 87(5), 811-822.DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81989-3
Kvien, T. K., Uhlig, T., Ødegård, S., & Heiberg, M. S. (2006). Epidemiological aspects of rheumatoid arthritis: the sex ratio. Annals of the New York Academy of Sciences, 1069, 212–222. https://doi.org/10.1196/annals.1351.019
Kwon, K., et al. (2023). *Synthetic gene circuits for inflammation-responsive cell therapies*. *Nature Biomedical Engineering*, 7(3), 212–226. https://doi.org/10.1038/s41551-022-00945-w
Lamba, A., & Taneja, V. (2024). Gut microbiota as a sensor of autoimmune response and treatment for rheumatoid arthritis. Immunological reviews, 325(1), 90-106. https://doi.org/10.1111/imr.13160
Lau C. S. (2023). Burden of rheumatoid arthritis and forecasted prevalence to 2050. The Lancet. Rheumatology, 5(10), e567–e568. https://doi.org/10.1016/S2665-9913(23)00240-0
Lee, Y. C., Agnew-Blais, J., Malspeis, S., Keyes, K., Costenbader, K., Kubzansky, L. D., Roberts, A. L., Koenen, K. C., & Karlson, E. W. (2016). Post-Traumatic Stress Disorder and Risk for Incident Rheumatoid Arthritis. Arthritis care & research, 68(3), 292–298. https://doi.org/10.1002/acr.22683
Lenschow, D. J., Zeng, Y., Thistlethwaite, J. R., Montag, A., Brady, W., Gibson, M. G., ... & Bluestone, J. A. (1992). Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4lg. Science, 257(5071), 789-792. DOI:10.1126/science.1323143
Li, P. F., Li, S., & Zheng, P. S. (2024). Reproductive Effect by Rheumatoid Arthritis and Related Autoantibodies. Rheumatology and therapy, 11(2), 239–256. https://doi.org/10.1007/s40744-023-00634-1
Li, P. F., Li, S., & Zheng, P. S. (2024). Reproductive Effect by Rheumatoid Arthritis and Related Autoantibodies. Rheumatology and

Linsley, P. S., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, L. S., Damle, N. K., & Ledbetter, J. A. (1991). CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. The Journal of experimental medicine, 174(3), 561-569.DOI: 10.1084/jem.174.3.561
Linsley, P. S., Clark, E. A., & Ledbetter, J. A. (1990). T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *87*(13), 5031-5035.DOİ: 10.1073/pnas.87.13.5031
Linsley, P. S., Greene, J. L., Brady, W., Bajorath, J., Ledbetter, J. A., & Peach, R. (1994). Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. Immunity, 1(9), 793-801. DOI: 10.1016/S1074-7613(94)80021-9
Littlejohn, E. A., & Monrad, S. U. (2018). Early Diagnosis and Treatment of Rheumatoid Arthritis. Primary care, 45(2), 237–255. https://doi.org/10.1016/j.pop.2018.02.010
Lombardi, G., Sidhu, S., Batchelor, R., & Lechler, R. (1994). Anergic T cells as suppressor cells in vitro. Science, 264(5165), 1587-1589. DOI: 10.1126/science.8202711
Ma, Y., Shi, R., Li, F., & Chang, H. (2024). Emerging strategies for treating autoimmune disease with genetically modified dendritic cells. *Cell Communication and Signaling*, *22*(1), 262. DOI: 10.1186/s12964-024-01641-7
Macpherson, A. J., & Harris, N. L. (2004). Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. Nature Reviews Immunology, 4(6), 478-485. https://doi.org/10.1038/nri1373
Maldonado, R. A., & von Andrian, U. H. (2010). In vivo manipulation of dendritic cells to induce tolerance. *Current Opinion in Immunology*, 22(5), 566–572. https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.08.012
Mellor, A. L., & Munn, D. H. (1999). Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation?. Immunology today, 20(10), 469-473. DOI: 10.1016/S0167-5699(99)01520-0
Mellor, A. L., Keskin, D. B., Johnson, T., Chandler, P., & Munn, D. H. (2002). Cells expressing indoleamine 2, 3-dioxygenase inhibit T cell responses. The Journal of Immunology, 168(8), 3771-3776.DOI: 10.4049/jimmunol.168.8.3771
Meng, W., Zhu, Z., Jiang, X., Too, C. L., Uebe, S., Jagodic, M., Kockum, I., Murad, S., Ferrucci, L., Alfredsson, L., Zou, H., Klareskog, L., Feinberg, A. P., Ekström, T. J., Padyukov, L., & Liu, Y. (2017). DNA methylation mediates genotype and smoking interaction in the development of anti-citrullinated peptide antibody-positive rheumatoid arthritis. Arthritis research & therapy, 19(1), 71. https://doi.org/10.1186/s13075-017-1276-2
Mikuls, T. R., Payne, J. B., Yu, F., Thiele, G. M., Reynolds, R. J., Cannon, G. W., Markt, J., McGowan, D., Kerr, G. S., Redman, R. S., Reimold, A., Griffiths, G., Beatty, M., Gonzalez, S. M., Bergman, D. A., Hamilton, B. C., 3rd, Erickson, A. R., Sokolove, J., Robinson, W. H., Walker, C., … O'Dell, J. R. (2014). Periodontitis and Porphyromonas gingivalis in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.), 66(5), 1090–1100. https://doi.org/10.1002/art.38348
Min, W. P., Gorczynski, R., Huang, X. Y., Kushida, M., Kim, P., Obataki, M., Lei, J., Suri, R. M., & Cattral, M. S. (2000). Dendritic cells genetically engineered to express Fas ligand induce donor-specific hyporesponsiveness and prolong allograft survival. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *164*(1), 161–167. https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.1.161

Miwa, N., Hayakawa, S., Miyazaki, S., Myojo, S., Sasaki, Y., Sakai, M., Takikawa, O., & Saito, S. (2005). IDO expression on decidual and peripheral blood dendritic cells and monocytes/macrophages after treatment with CTLA-4 or interferon-gamma increase in normal pregnancy but decrease in spontaneous abortion. Molecular human reproduction, 11(12), 865–870. https://doi.org/10.1093/molehr/gah246

Moffett, J. R., & Namboodiri, M. A. (2003). Tryptophan and the immune response. Immunology and cell biology, 81(4), 247-265. DOI: 10.1046/j.1440-1711.2003.t01-1-01177.x

Morita, Y., Yang, J., Gupta, R., Shimizu, K., Shelden, E. A., Endres, J., Mulé, J. J., McDonagh, K. T., & Fox, D. A. (2001). Dendritic cells genetically engineered to express IL-4 inhibit murine collagen-induced arthritis. *The Journal of clinical investigation*, *107*(10), 1275–1284. https://doi.org/10.1172/JCI11490

Moser, M., De Smedt, T., Sornasse, T., Tielemans, F., Chentoufi, A. A., Muraille, E., ... & Leo, O. (1995). Glucocorticoids down-regulate dendritic cell function in vitro and in vivo. European journal of immunology, 25(10), 2818-2824. DOI: 10.1002/eji.1830251016

Mukhopadhyay, S., Saha, S., Chakraborty, S., Prasad, P., Ghosh, A., & Aich, P. (2022). Differential colitis susceptibility of Th1- and Th2-biased mice: A multi-omics approach. *PloS one*, *17*(3), e0264400. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264400 https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264400

Munn, D. H., Shafizadeh, E., Attwood, J. T., Bondarev, I., Pashine, A., & Mellor, A. L. (1999). Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. The Journal of experimental medicine, 189(9), 1363-1372. DOI: 10.1084/jem.189.9.1363

Munn, D. H., Sharma, M. D., Hou, D., Baban, B., Lee, J. R., Antonia, S. J., ... & Mellor, A. L. (2004). Expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. The Journal of clinical investigation, 114(2), 280-290. DOI: 10.1172/JCI21583

Munn, D. H., Sharma, M. D., Lee, J. R., Jhaver, K. G., Johnson, T. S., Keskin, D. B., Marshall, B., Chandler, P., Antonia, S. J., Burgess, R., Slingluff, C. L., & Mellor, A. L. (2002). Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science, 297*(5588), 1867–1870. https://doi.org/10.1126/science.1073514

Navarro-Barriuso, J., Mansilla, M.J., Naranjo-Gómez, M. *et al.* Comparative transcriptomic profile of tolerogenic dendritic cells differentiated with vitamin D3, dexamethasone and rapamycin. *Sci Rep* **8**, 14985 (2018). https://doi.org/10.1038/s41598-018-33248-7

Neal, L. R., Bailey, S. R., Wyatt, M. M., Bowers, J. S., Majchrzak, K., Nelson, M. H., Haupt, C., Paulos, C. M., & Varela, J. C. (2017). The Basics of Artificial Antigen Presenting Cells in T Cell-Based Cancer Immunotherapies. Journal of immunology research and therapy, 2(1), 68–79.

Nepom, G. T., Byers, P., Seyfried, C., Healey, L. A., Wilske, K. R., Stage, D., & Nepom, B. S. (1989). HLA genes associated with rheumatoid arthritis. Identification of susceptibility alleles using specific oligonucleotide probes. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, *32*(1), 15-21. DOI: 10.1002/anr.1780320104

Newkirk M. M. (2002). Rheumatoid factors: host resistance or autoimmunity?. Clinical immunology (Orlando, Fla.), 104(1), 1–13. https://doi.org/10.1006/clim.2002.5210

Newkirk M. M. (2002). Rheumatoid factors: what do they tell us?. The Journal of rheumatology, 29(10), 2034–2040.
Nguyen, Y., Salliot, C., Gelot, A., Mariette, X., Boutron-Ruault, M. C., & Seror, R. (2022). Passive smoking in childhood and adulthood and risk of rheumatoid arthritis in women: results from the French E3N cohort study. RMD open, 8(1), e001980. https://doi.org/10.1136/rmdopen-2021-001980
O'Doherty, U., Swiggard, W. J., Malim, M. H. (2000). Human immunodeficiency virus type 1 spinoculation enhances infection through virus binding. *Journal of Virology, 74*(21), 10074–10080. https://doi.org/10.1128/jvi.74.21.10074-10080.200
O'garra, A., & Vieira, P. (2004). Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. Nature medicine, 10(8), 801-805. DOI: 10.1038/nm0804-801
O'Rourke, J. A., Ravichandran, C., Howe, Y. J., Mullett, J. E., Keary, C. J., Golas, S. B., Hureau, A. R., McCormick, M., Chung, J., Rose, N. R., & McDougle, C. J. (2019). Accuracy of self-reported history of autoimmune disease: A pilot study. PloS one, 14(5), e0216526. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216526
Okada, Y., Eyre, S., Suzuki, A., Kochi, Y., & Yamamoto, K. (2019). Genetics of rheumatoid arthritis: 2018 status. Annals of the rheumatic diseases, 78(4), 446–453. https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-213678
Okada, Y., Eyre, S., Suzuki, A., Kochi, Y., & Yamamoto, K. (2019). Genetics of rheumatoid arthritis: 2018 status. Annals of the rheumatic diseases, 78(4), 446–453. https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-213678
Ortmann, R. A., & Shevach, E. M. (2001). Susceptibility to collagen-induced arthritis: cytokine-mediated regulation. Clinical Immunology, 98(1), 109-118. DOI: 10.1006/clim.2000.4961
Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer. 2012 Mar 22;12(4):252-64. doi: 10.1038/nrc3239. PMID: 22437870; PMCID: PMC4856023.
Patel, J. P., Srinivasa, N. K. K., Gande, A., Anusha, M., Dar, H., Baji, D. B., & Baji, D. B. (2023). The role of biologics in rheumatoid arthritis: a narrative review. *Cureus*, *15*(1). doi:10.7759/cureus.33293
Patil, P. M., Chaudhari, P. D., Sahu, M., & Duragkar, N. J. (2012). Review article on gene therapy. Research Journal of Pharmacology and Pharmacodynamics, 4(2), 77-83. http://dx.doi.org/10.9735/0975-2862.4.1.74-79
Prasad, P., Verma, S., Surbhi, Ganguly, N. K., Chaturvedi, V., & Mittal, S. A. (2023). Rheumatoid arthritis: advances in treatment strategies. Molecular and cellular biochemistry, 478(1), 69–88. https://doi.org/10.1007/s11010-022-04492-3
Pu, Y., Zhang, Q., Tang, Z., Lu, C., Wu, L., Zhong, Y., Chen, Y., Hashimoto, K., Luo, Y., & Liu, Y. (2022). Fecal microbiota transplantation from patients with rheumatoid arthritis causes depression-like behaviors in mice through abnormal T cells activation. Translational psychiatry, 12(1), 223. https://doi.org/10.1038/s41398-022-01993-z
Rantapää-Dahlqvist, S., de Jong, B. A., Berglin, E., Hallmans, G., Wadell, G., Stenlund, H., Sundin, U., & van Venrooij, W. J. (2003). Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. Arthritis and rheumatism, 48(10), 2741–2749. https://doi.org/10.1002/art.11223
Riley, J. L., Mao, M., Kobayashi, S., Biery, M., Burchard, J., Cavet, G., ... & Linsley, P. S. (2002). Modulation of TCR-induced transcriptional profiles by ligation of CD28,

ICOS, and CTLA-4 receptors. Proceedings of the National Academy of Sciences, 99(18), 11790-11795.DOI: 10.1073/pnas.162359999
Romão, V. C., & Fonseca, J. E. (2021). Etiology and Risk Factors for Rheumatoid Arthritis: A State-of-the-Art Review. Frontiers in medicine, 8, 689698. https://doi.org/10.3389/fmed.2021.689698
Rudd, C. E., Taylor, A., & Schneider, H. (2009). CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunological reviews*, *229*(1), 12-26.DOI: **10.1111/j.1600-065X.2009.00770.x**
Salgado, E., Bes-Rastrollo, M., de Irala, J., Carmona, L., & Gómez-Reino, J. J. (2015). High Sodium Intake Is Associated With Self-Reported Rheumatoid Arthritis: A Cross Sectional and Case Control Analysis Within the SUN Cohort. Medicine, 94(37), e0924. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000924
Schagen, F. H., Ossevoort, M., Toes, R. E., & Hoeben, R. C. (2004). Immune responses against adenoviral vectors and their transgene products: a review of strategies for evasion. Critical reviews in oncology/hematology, 50(1), 51-70. DOI:10.1016/S1040-8428(03)00172-0
Scher, J. U., & Abramson, S. B. (2011). The microbiome and rheumatoid arthritis. Nature reviews rheumatology, 7(10), 569-578. https://doi.org/10.1038/nrrheum.2011.121
Scher, J. U., Joshua, V., Artacho, A., Abdollahi-Roodsaz, S., Ockinger, J., Kullberg, S., ... & Catrina, A. I. (2016). The lung microbiota in early rheumatoid arthritis and autoimmunity. Microbiome 4 (1): 60. https://doi.org/10.1186/s40168-016-0206-x
Schinnerling, K., et al. (2015). Generation of clinical-grade dendritic cells for tolerance induction: State-of-the-art and future prospects. *Frontiers in Immunology*, 6, 586. https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00586
Schulte, S., Sukhova, G. K., & Libby, P. (2008). Genetically programmed biases in Th1 and Th2 immune responses modulate atherogenesis. *The American journal of pathology*, *172*(6), 1500–1508. https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070776
Seida, I., Al Shawaf, M., & Mahroum, N. (2024). Fecal microbiota transplantation in autoimmune diseases–An extensive paper on a pathogenetic therapy. Autoimmunity Reviews, 103541. DOI: 10.1016/j.autrev.2024.103541
Sharma, M. D., Baban, B., Chandler, P., Hou, D. Y., Singh, N., Yagita, H., ... & Munn, D. H. (2007). Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2, 3-dioxygenase. The Journal of clinical investigation, 117(9), 2570-2582. DOI: 10.1172/JCI31911
Sheridan, C. (2011). Gene therapy finds its niche. Nature biotechnology, 29(2), 121-128. DOI: 10.1038/nbt.1769
Silman, A. J., & Hochberg, M. C. (2009). Descriptive Epidemiology of Rheumatoid Arthritis. Rheumatoid Arthritis, 15–22. doi:10.1016/b978-032305475-1.50008-2
Silman, A. J., & Pearson, J. E. (2002). Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. Arthritis research, 4 Suppl 3(Suppl 3), S265–S272. https://doi.org/10.1186/ar578
Singh-Jasuja, H., Thiolat, A., Ribon, M., Boissier, M. C., Bessis, N., Rammensee, H. G., & Decker, P. (2013). The mouse dendritic cell marker CD11c is down-regulated upon cell activation through Toll-like receptor triggering. *Immunobiology*, *218*(1), 28-39.DOI:10.1016/j.imbio.2012.01.021
Smolen, J. S., Aletaha, D., Barton, A., Burmester, G. R., Emery, P., Firestein, G. S., Kavanaugh, A., McInnes, I. B., Solomon, D. H., Strand, V., & Yamamoto, K. (2018).

Rheumatoid arthritis. Nature reviews. Disease primers, 4, 18001. https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.1
Son, Y. I., Egawa, S., Tatsumi, T., Redlinger, R. E., Jr., Kalinski, P., Kanto, T., 2002. "A novel bulk-culture method for generating mature dendritic cells from mouse bone marrow cells", J Immunol Methods 262 (1-2), 145-157. 10.1016/S0022-1759(02)00013-3
Stastny, P. E. T. E. R. (1976). Mixed lymphocyte cultures in rheumatoid arthritis. *The Journal of clinical investigation*, *57*(5), 1148-1157.DOI: 10.1172/JCI108382
Stehelin, D., Varmus, H. E., Bishop, J. M., & Vogt, P. K. (1976). DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. Nature, 260(5547), 170–173. https://doi.org/10.1038/260170a0
Stoop, J. N., Robinson, J. H., & Hilkens, C. M. U. (2024). *Developing tolerogenic dendritic cell therapy for rheumatoid arthritis: What can we learn from mouse models? Annals of the Rheumatic Diseases*. Advance online publication. https://ard.eular.org/article/S0003-4967(24)19151-0
Sugiyama, D., Nishimura, K., Tamaki, K., Tsuji, G., Nakazawa, T., Morinobu, A., & Kumagai, S. (2010). Impact of smoking as a risk factor for developing rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. Annals of the rheumatic diseases, 69(1), 70–81. https://doi.org/10.1136/ard.2008.096487
Svendsen, A. J., Gervin, K., Lyle, R., Christiansen, L., Kyvik, K., Junker, P., Nielsen, C., Houen, G., & Tan, Q. (2016). Differentially Methylated DNA Regions in Monozygotic Twin Pairs Discordant for Rheumatoid Arthritis: An Epigenome-Wide Study. Frontiers in immunology, 7, 510. https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00510
Szántó, S., Koreny, T., Mikecz, K., Glant, T. T., Szekanecz, Z., & Varga, J. (2007). Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan catabolism accelerates collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis research & therapy*, *9*(3), R50. https://doi.org/10.1186/ar2205
therapy, 11(2), 239–256. https://doi.org/10.1007/s40744-023-00634-1
Too, C. L., Muhamad, N. A., Ilar, A., Padyukov, L., Alfredsson, L., Klareskog, L., Murad, S., Bengtsson, C., & MyEIRA Study Group (2016). Occupational exposure to textile dust increases the risk of rheumatoid arthritis: results from a Malaysian population-based case-control study. Annals of the rheumatic diseases, 75(6), 997–1002. https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2015-208278
Trentham, D. E., Townes, A. S., & Kang, A. H. (1977). Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. The Journal of experimental medicine, 146(3), 857-868. DOI: 10.1084/jem.146.3.857
Trinchieri G. (1994). Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. Blood, 84(12), 4008–4027. DOI: 10.1182/blood.V84.12.4008.bloodjournal84124008
Trynka, G., Sandor, C., Han, B., Xu, H., Stranger, B. E., Liu, X. S., & Raychaudhuri, S. (2013). Chromatin marks identify critical cell types for fine mapping complex trait variants. Nature genetics, 45(2), 124–130. https://doi.org/10.1038/ng.2504
Tsokos, G. C., & Tsokos, M. (2003). The TRAIL to arthritis. *The Journal of clinical investigation*, *112*(9), 1315–1317. https://doi.org/10.1172/JCI20297
van der Woude, D., Houwing-Duistermaat, J. J., Toes, R. E., Huizinga, T. W., Thomson, W., Worthington, J., van der Helm-van Mil, A. H., & de Vries, R. R. (2009). Quantitative heritability of anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-

citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis. Arthritis and rheumatism, 60(4), 916–923. https://doi.org/10.1002/art.24385
Viatte, S., Massey, J., Bowes, J., Duffus, K., arcOGEN Consortium, Eyre, S., Barton, A., & Worthington, J. (2016). Replication of Associations of Genetic Loci Outside the HLA Region With Susceptibility to Anti-Cyclic Citrullinated Peptide-Negative Rheumatoid Arthritis. Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.), 68(7), 1603–1613. https://doi.org/10.1002/art.39619
Viatte, S., Plant, D., Bowes, J., Lunt, M., Eyre, S., Barton, A., & Worthington, J. (2012). Genetic markers of rheumatoid arthritis susceptibility in anti-citrullinated peptide antibody negative patients. Annals of the rheumatic diseases, 71(12), 1984–1990. https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2011-201225
Videm, V., Thomas, R., Brown, M. A., & Hoff, M. (2017). Self-reported Diagnosis of Rheumatoid Arthritis or Ankylosing Spondylitis Has Low Accuracy: Data from the Nord-Trøndelag Health Study. The Journal of rheumatology, 44(8), 1134–1141. https://doi.org/10.3899/jrheum.161396
Wade, N. (1981). Gene Therapy Caught in More Entanglements: With five review committees overseeing him, a UCLA researcher did an experiment his own way. Science, 212(4490), 24-25. DOI: 10.1126/science.6259731
Wang, D., Stevens, G., & Flotte, T. R. (2025). Gene therapy then and now: A look back at changes in the field over the past 25 years. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, *33*(5), 1889–1902. DOI: 10.1016/j.ymthe.2025.02.040
Wang, P., Tao, J. H., & Pan, H. F. (2016). Probiotic bacteria: a viable adjuvant therapy for relieving symptoms of rheumatoid arthritis. Inflammopharmacology, 24(5), 189–196. https://doi.org/10.1007/s10787-016-0277-0
Wang, Q., Zhang, S. X., Chang, M. J., Qiao, J., Wang, C. H., Li, X. F., Yu, Q., & He, P. F. (2022). Characteristics of the Gut Microbiome and Its Relationship With Peripheral CD4+ T Cell Subpopulations and Cytokines in Rheumatoid Arthritis. Frontiers in microbiology, 13, 799602. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.799602
Watson, J. D. (1981). Gene therapy: How ripe the time. Lancet, 317(8213), 196-7. DOI: 10.1016/S0140-6736(81)90067-2
Webber, M. P., Moir, W., Zeig-Owens, R., Glaser, M. S., Jaber, N., Hall, C., Berman, J., Qayyum, B., Loupasakis, K., Kelly, K., & Prezant, D. J. (2015). Nested case-control study of selected systemic autoimmune diseases in World Trade Center rescue/recovery workers. Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.), 67(5), 1369–1376. https://doi.org/10.1002/art.39059
Weyand, C. M., Hicok, K. C., Conn, D. L., & Goronzy, J. J. (1992). The influence of HLA-DRB1 genes on disease severity in rheumatoid arthritis. *Annals of internal medicine*, *117*(10), 801-806. DOI: 10.7326/0003-4819-117-10-801
Wolfe, F., & Michaud, K. (1994). The clinical and research significance of the erythrocyte sedimentation rate. *The Journal of rheumatology*, *21*(7), 1227–1237.
Wooley, P. H. (1988). Collagen-induced arthritis in the mouse. In Methods in enzymology (Vol. 162, pp. 361-373). Academic Press. DOI: 10.1016/0076-6879(88)62091-X
Wooley, P. H., Luthra, H. S., Griffiths, M. M., Stuart, J. M., Huse, A., & David, C. S. (1985). Type II collagen-induced arthritis in mice. IV. Variations in immunogenetic regulation provide evidence for multiple arthritogenic epitopes on the collagen

molecule. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *135*(4), 2443-2451. DOI: 10.4049/jimmunol.135.4.2443
Yamasaki, D., Enokida, M., Okano, T., Hagino, H., & Teshima, R. (2001). Effects of ovariectomy and estrogen replacement therapy on arthritis and bone mineral density in rats with collagen-induced arthritis. Bone, 28(6), 634–640. https://doi.org/10.1016/s8756-3282(01)00426-4
Yeap S. S. (2009). Rheumatoid arthritis in paintings: a tale of two origins. International journal of rheumatic diseases, 12(4), 343–347. https://doi.org/10.1111/j.1756-185X.2009.01434.x
Zeng, J., Peng, L., Zheng, W., Huang, F., Zhang, N., Wu, D., & Yang, Y. (2021). Fecal microbiota transplantation for rheumatoid arthritis: A case report. Clinical case reports, 9(2), 906-909. https://doi.org/10.1002/ccr3.3645
Zvaifler, N. J. (1973). The immunopathology of joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Advances in immunology*, *16*, 265-336. DOI: 10.1016/S0065-2776(08)60299-0

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

ACPA	**:**	Anti-sitrüline protein antikorları
AF	**:**	Autofloresan
AFF3	**:**	AF4/FMR2 Ailesi Üyesi 3 (AF4/FMR2 Family Member 3)
ANA	**:**	Anti-nükleer antikor
ANKRD55	**:**	Ankyrin Repeat Domain 55
APC	**:**	Antijen sunan hücre (Antigen-Presenting Cell)
BLK	**:**	B lenfosit kinaz (B-Lymphoid Tyrosine Kinase)
CCP	**:**	Siklik sitrüline peptit (Cyclic Citrullinated Peptide)
CFA	**:**	Tam Freund Adjuvanı (Complete Freund's Adjuvant)
CIA	**:**	Kollajen kaynaklı artrit (Collagen-Induced Arthritis)
CII	**:**	Tip II kollajen (Collagen Type II)
CRP	**:**	C-reaktif protein
CTLA-4	**:**	Sitotoksik T lenfosit ilişkili protein 4
DALY	**:**	Engelliliğe göre ayarlanmış yaşam yılı (Disability-Adjusted Life Years)
DH	**:**	Dendritik Hücre
DMARD	**:**	Hastalığı değiştiren antiromatizmal ilaçlar (Disease-Modifying Antirheumatic Drugs)
EAE	**:**	Deneysel otoimmün ensefalomiyelit (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis)
EBNA2	**:**	Epstein-Barr nükleer antijen 2 (Epstein-Barr Nuclear Antigen 2)
EDTA	**:**	Etilendiamin tetraasetik asit (Ethylenediaminetetraacetic Acid)
ESR (ESH)	**:**	Eritrosit sedimentasyon hızı (Erythrocyte Sedimentation Rate)
FBS	**:**	Fetal Sığır Serumu (Fetal Bovine Serum)
FLS	**:**	Fibroblast benzeri sinoviosit
FMT	**:**	Fekal mikrobiyom nakli (Fecal Microbiota Transplantation)
GBD	**:**	Küresel Hastalık Yükü (Global Burden of Disease)
GC	**:**	Glukokortikoidler
GFP	**:**	Yeşil floresan protein (Green Fluorescent Protein)
H&E	**:**	Hematoksilen&Eozin (Histolojik Boyama)
H3K4me3	**:**	Histon H3 lizin 4 trimetilasyonu
HLA	**:**	İnsan lökosit antijeni (Human Leukocyte Antigen)
IDO	**:**	Indoleamine 2,3-dioxygenase
İ.A	**:**	İntraartiküler
JAK	**:**	Janus kinaz
LB	**:**	Luria-Bertani (besiyeri)
MHC	**:**	Majör histokompatibilite kompleksi
MOI	**:**	Enfeksiyon çarpanı (Multiplicity of Infection)
MS	**:**	Multipl Skleroz
MTX	**:**	Metotreksat
NK	**:**	Doğal öldürücü hücre (Natural Killer Cell)
NSAID	**:**	Non-steroidal anti-inflamatuar ilaç (Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug)
OD	**:**	Optik yoğunluk (Optical Density)
OVX-fare	**:**	Overektomi (Ovarectomy), Yumurtalıkları çıkarılmış fare

pCMV	**:**	Sitomegalovirüs promotoru içeren plazmid (Plasmid with Cytomegalovirus Promoter)
PGIA	**:**	Antijen-proteoglikan ile indüklenen artrit (Proteoglycan-Induced Arthritis)
PP2A	**:**	Protein fosfataz 2A (Protein Phosphatase 2A)
PS	**:**	Protamin sülfat
PTPN22	**:**	Protein tirozin fosfataz non-reseptör tip 22
RA	**:**	Romatoid Artrit
RANKL	**:**	Reseptör aktivatör nükleer faktör kappa-B ligandı (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand)
RF	**:**	Romatoid faktör
SE	**:**	Paylaşılan epitop (Shared Epitope)
SFFV	**:**	Spleen Focus-Forming Virus
SHP2	**:**	Src homoloji 2 içeren tirozin fosfataz 2 (Src Homology Region 2 Domain-Containing Phosphatase-2)
ShRNA	**:**	Kısa saç tokası RNA (Short Hairpin RNA)
SNP	**:**	Tek nükleotid polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism)
STING	**:**	Uyarıcı genlerin stimülatörü (Stimulator of Interferon Genes)
TCR (THR):		T hücre reseptörü (T Cell Receptor)
TNF	**:**	Tümör nekroz faktörü
Treg	**:**	Düzenleyici T hücreleri (Regulatory T Cells)
YLD	**:**	Engellilik ile yaşanan yıl (Years Lived with Disability)

8. EKLER

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

Sayı: I 06.07.2021

Konu: Araştırma Projeniz

Sayın Prof. Dr. Haluk Barbaros ORAL

Yürütücüsü olduğunuz *"Gen Modifikasyonları ile Tolerans İndükleyici Hale Getirilmiş Dendritik Hücrelerle Deneysel Artrit Tedavisi"* isimli çalışmanız Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 06.07.2021 tarihli toplantısında görüşülmüş olup kurul kararı ekte sunulmuştur. Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Gökhan GÖKTALAY
HADYEK Başkanı

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
Görükle Yerleşkesi, 16059 Nilüfer/ BURSA-TÜRKİYE
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN ADI	*Gen Modifikasyonları ile Tolerans İndükleyici Hale Getirilmiş Dendritik Hücrelerle Deneysel Artrit Tedavisi*
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ KURUMU	Prof. Dr. Haluk Barbaros ORAL BUÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji AD, İmmünoloji BD
	YARDIMCI ARAŞTIRICILAR	Prof. Dr. Murat YALÇIN — Dr. Öğr. Gör. Diğdem YÖYEN ERMİŞ Doç. Dr. Ahmet AKKOÇ — Uzm. Biolog Gözde ARSLAN
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Gözde ARSLAN'ın Doktora Tez Projesi
	ARAŞTIRMANIN SÜRESİ	[illegible]
	KULLANILACAK HAYVAN TÜRÜ VE SAYISI	

	Belge Adı	Tarihi
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	ARAŞTIRMA BAŞVURU FORMU	**21.06.2021**

KARAR BİLGİLERİ	**Karar [illegible]021** Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma projesi gerekçe, amaç ve yöntemler dikkate alınarak görüşüldü ve ilgili belgeler incelendi. Projenin etik açıdan uygun olduğuna, çalışmanın aşağıdaki hususlar dikkate alınarak yürütülmesine ve sorumlu araştırıcıya iletilmesine oy birliği/oy çokluğu ile karar verildi. 1) Projede herhangi bir değişiklik gerektiğinde kurulumuzdan onay alınması, 2) Projede çalışacağı bildirilen araştırıcılarda değişiklik olduğunda kurulumuzdan onay alınması, 3) Deney hayvanları üzerinde yapılacak girişimin başlangıç ve bitiş tarihinin bildirilmesi, 4) Çalışma süresinde tamamlanamaz ise ek süre talebinde bulunulması, 5) Çalışma tamamlandığında sonuç raporunun gönderilmesi.

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÜYELER

Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	İlişki (*)	Ret	Düşünceler
Prof. Dr. Gökhan GÖKTALAY Başkan	Tıp- Farmakoloji	Tıp Fakültesi	☐ E ■ H		
Prof. Dr. Erdoğan ŞENDEMİR Üye	Tıp- Anatomi	Tıp Fakültesi	☐ E ■ H		
Dr.Öğr. Üyesi Sezer ERER KAFA Üye	Tıp - Tıp Tarihi ve Etik	Tıp Fakültesi	☐ E ■ H		
Prof. Dr. Veli Yılgör ÇIRAK Üye	Veteriner-Parazitoloji	Veteriner Fakültesi	☐ E ■ H		
Prof. Dr. Özgür ÖZYİĞİT Üye	Veteriner-Patoloji	Veteriner Fakültesi	☐ E ■ H		
Prof. Dr. Aydın İPEK Üye	Ziraat- Zootekni	Ziraat Fakültesi	☐ E ■ H		
Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ Üye	Fen Edebiyat - Biyoloji	Fen Edebiyat Fakültesi	☐ E ■ H		
Asiye Işıl SEZER Üye	Sivil Toplum Kuruluş Üyesi	Diş Hekimi	☐ E ■ H		
Filiz TORUN Üye	Sivil Üye	Emekli	☐ E ■ H		
Faruk KÜÇÜKYILDIZ Üye	Veteriner Hekim	BUÜ-DEHYUAM	☐ E ■ H		

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

Sayı:
Konu: Dilekçeniz

06.07.2021

Prof. Dr. Haluk Barbaros ORAL

İLGİ: 06.07.2021 Tarihli Dilekçeniz

Dilekçeniz Bursa Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 06.07.2021 tarihli toplantısında görüşülmüştür. "*Gen Modifikasyonları ile Tolerans İndükleyici Hale Getirilmiş Dendritik Hücrelerle Deneysel Artrit Tedavisi*" başlıklı araştırma projesinde kullanılacak olan deney hayvanı olarak kurulumuz tarafından sehven adet dişi fare olarak yazıldığı anlaşılmıştır. Araştırmada kullanılacak deney hayvanı adet erkek faredir. Etik Kurul kararının bu şekilde revize edilmesi talebinizin uygun olduğuna karar verilmiştir.

Veteriner Hekim Faruk KÜÇÜKYILDIZ
BUÜ – HADYEK Sekretervası

9. TEŞEKKÜR

Lisans 3. sınıfta katıldığım bir seminerde kendisini ilk kez dinleme fırsatı bulduğum andan itibaren immünolojinin kapıları benim için aralanmıştı. O günden bu yana, doktora mezuniyetime kadar geçen süreçte, immünolojiye dair öğrendiğim her konu, danışmanım sayın Prof. Dr. Haluk Barbaros ORAL'ın akademik rehberliğiyle daha anlamlı hale geldi. Takıldığım her deneyde bana yol göstermesi, yalnızca akademik hayatımda değil bireysel yaşamımda da bana danışmanlık etmesi, bu uzun yolculuğu benim için eşsiz kılmıştır. Her zaman asistanı olmaktan gurur duyduğum, empatinin, sempatinin ve toleransın yaşamımızdaki önemini bana öğreten ve varlığıyla bu süreci daha değerli kılan danışman hocam, akıl mentörüm Prof. Dr. Haluk Barbaros ORAL'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

İçinde yer alma fırsatı bulduğum projelerde, hayvan modelleme konusundaki tüm deneyim ve yetkinliğimi kazanmamda öncülük eden; kendi laboratuvarını bana emanet edecek kadar güven duyan; ailesinin evinin kapılarını açarak yalnızca akademik değil, insani anlamda da her zaman yanımda olan kıymetli hocam Prof. Dr. Murat YALÇIN'a en derin teşekkürlerimi sunarım.

Eksozomlar ile ilgili araştırmalarıyla eksozom dünyasının kapılarını açan, projesini bana emanet ederek güvenini gösteren, yalnızca akademik olarak değil, her zaman yüksek enerjisi ve neşesiyle yanımda olup bu süreci daha motive edici hale getiren Sayın Dr. Öğr. Üyesi Salih Haldun BAL'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bölümümüze geldiği süreçten itibaren deneysel ve bilimsel konularda bana aktardığı değerli bilgi ve katkılarından dolayı Doç. Dr. Diğdem YÖYEN ERMİŞ'e teşekkür ederim. Bu süreçte yalnızca kendi öğrencilerine değil, hepimize öğretme gayreti gösterdiği her analiz ve deney için ayrıca minnettarım.

Danışman hocamın yönlendirmesiyle bir süreliğine ekibine dahil olma fırsatı bulduğum, iş birliğini her zaman sürdüren ve her sorumda rahatlıkla ulaşabildiğim, İstanbul'a her gidişimde kendimi bir aile ortamında hissettiğim Sütlü Lab'ın değerli hocası Dr. Öğr. Üyesi Tolga SÜTLÜ'ye en içten teşekkürlerimi sunarım. Bu süreçte birlikte çalışmaktan her zaman büyük keyif aldığım, desteğini ve yol arkadaşlığını esirgemeyen Sütlü Lab'ın en deli üyesi Elif ÇELİK'e, bilgilerini ve masasını benimle paylaşan değerli arkadaşım, memleketlim Dr. Ayhan PARLAR'a da gönülden teşekkür ederim.

Tedavi enjeksiyonlarını yapıp süreci tamamladığım her hayvanın patolojik analizlerini heyecanla takip ederken, mikroskop başında patoloji açısından gördüğüm verileri yorumlamayı öğreten, bilimde etik ve ahlakın ne kadar güzel bir şekilde işleyebileceğini gösteren değerli hocam Prof. Dr. Ahmet AKKOÇ'a teşekkür ederim.

Tezimin birçok bölümünü gerçekleştirebilmem için laboratuvarını bana açan, sorumluluk almama fırsat tanıyan, sohbetiyle her zaman kendimi en yakın hissettiğim benim için yeri çok özel olan değerli hocam Prof. Dr. Arzu Yılmaztepe ORAL'a en içten teşekkürlerimi sunarım. O laboratuvarı kendime bir ev gibi hissettim ve en mutlu deneylerimi orada gerçekleştirdim. Sizden öğrendiklerim hem akademik hayatımda hem de kişisel yolculuğumda daima yol gösterici olacaktır.

Her zaman 'Birileri yaptıysa biz de yaparız. Sen yoluna bak, kalbini temiz tut; herkes er ya da geç emeklerinin karşılığını alır.' sözleriyle beni yetiştiren, kıdemlim ve artık değerli hocam Doç. Dr. Gökçen BAYRAM GÜVENÇ bilim yolunda attığım her adımda bana yol gösterdiğin, her zorlandığımda sabırla destek olduğun için teşekkür ederim. Bana çalışma disiplini kadar, dürüstlüğün ve temiz kalbinle bilim

insanı olmanın insani tarafını da öğrettin. Sözlerinle, tavırlarınla ve emeğinle bıraktığın iz, bu yolculuğumda hep yanımda olacak.

Kıdemlim Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KARAÇAY; birlikte saatlerce deney yaptığımız, FACS başında sabahladığımız gecelerde konserler izlediğimiz, gecenin üçünde tatlı molalarıyla motivasyonumuzu artırdığımız anılar için, laboratuvarda temizlik yaparken bile keyifli tavırların ve bıkmadan yanıtladığın immünoloji sorularım için teşekkür ederim. Senden öğrendiğim bilimsel bilgiler ve Seda Sayan repklikleri her zaman aklımda olacak.

Stajyer olarak geldiğiniz günden, yüksek lisans mezunu olana kadar hiç ayrılmamak ve her an bağımızın güçlenmesi benim için tarifsiz bir mutluluk ve gurur kaynağıdır. Akademik sürecimde olduğu kadar hayat yolculuğumda da beni abla olarak gören, kan bağı olmadan kardeşlik bağı kurmayı başardığımız, hangimizin deneyi varsa birlikte koşturduğumuz, kimin sorunu varsa birlikte çözdüğümüz, kimin mutluluğu varsa üçümüzün kadeh kaldırarak kutladığı canım kızlarım MSc. Ceren ESEN KİREZ ve MSc. Fatmanur DÜNDAR siz olmasaydınız bu yolculuk ne bu kadar kolay ne de bu kadar anlamlı olurdu. Varlığınız, samimiyetiniz ve yanımda oluşunuz, bu sürecin en kıymetli armağanlarından biridir.

Bir proje sayesinde kesişen yollarımızı birlikte yürümeye devam edeceğimize gönülden inandığım, patoloji bölümünün en neşeli, en çalışkan, en düzenli ve en çok kalemine sahip asistanı canım arkadaşım Veteriner Hekim PhD,c Ezgi YUMUŞAK'a tüm analizlerimi uykusuz kalarak yetiştirdiği için ve bana verdiği o müthiş arkadaşlık için sana sonsuz teşekkür ederim. Seninle bilim konuşmak, resim yapmak, kitapları analiz etmek ve sessizce saatlerce doku kesmek hayatımın en keyifli anılarından oldu.

Mesafelerin dostlukla bir ilgisi olmadığını bana her defasında hatırlatan, aramızdaki 8.200 kilometre ve 8 saatlik zaman farkına rağmen ne zaman arasam ulaşabildiğim, her buluşmamızda enerjisi ve motivasyonuyla beni yeniden yükselten, bilgi birikimiyle her zaman gurur duyduğum, hayatımın "baş asistanı" olan kıymetli arkadaşım Dr. Bahar DAKİKİ KORUCU'ya en içten teşekkürlerimi sunarım. Doktora sürecimde dönem arkadaşım olması, benim için büyük bir şans ve ayrıcalıktı.

Doya doya gen terapi konuşabildiğim, hayatıma keşke daha önce girseydi dediğim canım arkadaşım PhD,c Didem AKYÖNEY ÇAKIRSOY bazen yollar ayrılabiliyor ama kalpler beraber olduğu sürece ve facetime varlığında hep yan yana olmaya devam edeceğimizi biliyorum. Laboratuvara gelerek bana kattığın bilimsel katkılar ve hayattıma kattığın o güzel dostluğun için çok teşekkür ederim. Tekrar seninle aynı eşyaları almak ve her gün pişti olmak için sabırsızlanıyorum çünkü biliyorum ki akademi yolculuğumuzda ayrılmadan ilerleyeceğiz.

Laboratuvarımızın en küçüğü ama kalbi kocaman olan ekip arkadaşım Müjdat ATILGAN; ne zaman arasam hemen yanımda olduğun için, tez sürecimde bana verdiğin tüm destek ve yardımlar için minnettarım. Bağımızın kopmayacağına inanıyorum, iyi ki varsın, her şey için çok teşekkür ederim. Umarım yolun çok güzel bir akademik sürece dönüşür.

Bu süreçte bıkmadan benimle yürüyen, akademinin zorlu hava koşullarını göğüslememe yardımcı olan, güneşli günlerinde de benden çok sevinen mutlu olan, en ihtiyaç duyduğum anlarda hem sosyalleşmeme katkı sağlayan hem de psikolojimi toparlayan ve benimle gurur duyduklarından emin olduğum canım arkadaşlarım Cansu BUDAK, Hüseyin BUDAK, Sevim PULLU, Metehan PULLU, Çakır PULLU, Ömer SÜRMELİ ve Dilek KAHRAMAN… İyi ki varsınız, bu yol sizinle çok daha eğlenceli ve dayanılır oldu!

Akademik ilerleme sürecimde bana sadece ellerinde olan imkanlarla değil olamayacakları bile zorlayarak oldurmak için çabalayarak destek olan, Bursa'da kendime bir konfor alanı oluşturmamı mümkün kılan ve benimle bıkmadan 40 metrekarelik evde yaşamaya katlanan anneme ve babama teşekkür ederim. Herkesin 'Sen şimdi ne olacaksın?' sorularına benimle birlikte bıkmadan cevap veren, stresten uyuyamadığım gecelerde benimle sabahlayan ve her başarımda benden çok sevinen canım Annem Vahide ARSLAN, Babam Zeki ARSLAN size her şey için minnettarım.

Motivasyon kaynaklarım, en yakın arkadaşlarım, aynı zamanda küçük annem ve babam olan canım ablam Özge KARAGÖZ ve abim Barış KARAGÖZ, sizin kardeşiniz olmak harika, beni inandırdığınız güzel gelecek için ve tüm eğitimim sürecimde maddi sponsorluğunuzla beraber manevi desteğiniz için teşekkür ederim. Artık ailemizin bir bilim doktoru var hayallimizi gerçekleştirdim 18 yaşımda benimle çıktığınız bu yolculuğun duraklarından birine daha geldik diğer durakları ararken tek emin olduğum şey sizin yine benimle o yola çıkmaya benden daha hevesli olduğunuz sizi seviyorum.

Bursa Uludağ Üniversitesi İmmünoloji Laboratuvarının tüm üyelerine, Experim ekibimize, Bursa Uludağ Üniversitesi Araştırma Projeleri birimine, Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına teşekkür ederim. Bu tez çalışması, Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından Öncelikli Alan Projesi kapsamında kabul edilmiş ve ÖNAP-626 kodlu proje olarak desteklenmiştir. BAP birimine teşekkürlerimizi sunarız. Ayrıca, BAP tarafından desteklenen TAY- 2022-601 kodlu alt yapı projesi kapsamında temin edilen cihazları kullanmamıza izin veren proje yürütücüsüne teşekkür ederiz. Bu destekler, çalışmamızın bilimsel ve teknik açıdan daha güçlü bir şekilde yürütülmesine olanak sağlamıştır.

İmmünoloji dünyasında biriktirdiğim tüm aileme teşekkür ederim.

Geriye bakınca anladım yolculuk güzeldi olay sadece ilerlemekti.

10. ÖZGEÇMİŞ

Lisans eğitimimi 2011–2016 yılları arasında İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda tamamladım. 2017–2020 yılları arasında Bursa Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimimi bitirdim. 2021 yılında Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı'nda başladığım doktora eğitimime başladım ve bu süreçte birçok projede yer alma fırsatı buldum. Özellikle gen terapi ve hayvan modelleme konusunda çalışmalarım bulunmakta aynı zamanda eksozomlar ile ilgili çalışmalarda da bulunma fırsatı buldum. Yurt içi ve uluslararası indekslerde taranan dergilerde yer alan araştırma çalışmalarım bulunmaktadır.