

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PERİFERİK KAN MONONÜKLEER HÜCRE  
KAYNAKLI DENDRİTİK HÜCRE ÜRETİMİNİN  
OPTİMİZASYONU: IL-15 SİTOKİNİNİN  
MATURASYON SÜRECİNE ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

Fatma EYÜBOĞLU ÜNÜVAR

Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi  
Programı için Öngördüğü  
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ  
2014



T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PERİFERİK KAN MONONÜKLEER HÜCRE  
KAYNAKLI DENDRİTİK HÜCRE ÜRETİMİNİN  
OPTİMİZASYONU: IL-15 SİTOKİNİNİN  
MATURASYON SÜRECİNE ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

Fatma EYÜBOĞLU ÜNÜVAR

Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi  
Programı için Öngördüğü  
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır

DANIŞMAN: PROF. DR. ERDAL KARAÖZ

KOCAELİ  
2014

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(Tez Onay Sayfası)




Tez adı: Periferik Kan Mononükleer Hücre Kaynaklı Dendritik Hücre Üretiminin Optimizasyonu; IL-15 sitokininin Matürasyon Sürecine Etkisinin Araştırılması

Tez yazarı: Fatma EYÜBOĞLU

Tez savunma tarihi: 03.07.2014

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Erdal KARAÖZ

İş bu çalışma Jürimiz tarafından .....Kök Hücre..... Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans..... tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı jüri üyeleri Ünvanı Adı Soyadı		İmzası
Üye	Prof. Dr. Erdal Karaöz	
Üye	Prof. Dr. Feriument Ovalı	
Üye	Dr. Doç. Dr. Cokhan Durukan	

ONAY

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

...../...../20

Prof. Dr. Tuncay Çolak  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

### **Periferik Kan Mononükleer Hücre Kaynaklı Dendritik Hücre Üretiminin Optimizasyonu: IL-15 Sitokininin Maturasyon Sürecine Etkisinin Araştırılması**

İmmün yanıt profesyonel antijen sunan hücreler olarak bilinen dendritik hücrelerin T hücrelerine antijeni sunması ile başlar.

Kanser immün sistemin rolünün büyük miktarda kendini gösterdiği bir klinik durumdur. Tümörlere karşı immün yanıtın artırılması esasına dayanarak dendritik hücreler (DH) ile elde edilen kanser aşılı, kanser tedavisinde son 10 yıldır kullanılmaktadır. Kanser immünterapisinin ana stratejileri anti tümör efektörleri sağlamak, hastaları tümörlere karşı aktif olarak bağışıklamak ve hastanın kendi anti-tümör yanıtını uyarmaktır. Bu yolla tümöre özgü bağışıklık oluşturularak hastaya zarar vermeden seçici olarak tümörü yok etmek amaçlanmaktadır. Mevcut sitokin kokteylleri ile oluşturulan kanser aşılarının etkinliğinin değişken olması ve henüz istenildiği kadar aktif olmaması aşılması gereken bir problemdir. Bu problemler göz önünde bulundurularak gerçekleştirilen bu çalışmanın amacı, etkinliği yüksek DH aşısı üretimi için en etkili modelin saptanmasıdır.

Bu çalışmada periferik kandan elde edilen mononükleer hücrelerden farklı sitokin kokteylleri ve antijen yükleme zamanı kullanılarak DH'ler elde edilmiş ve bu hücrelerin metabolik aktivite, maturite, morfolojik özellikler ve T hücre stimülasyon yetenekleri karşılaştırılmıştır. Çalışma DH farklılaştırmasında IL-4+GM-CSF ve IL15+GM-CSF sitokinlerinin kullanılması ve antijen yükleme zamanı açısından ise beşinci ve yedinci gün olmak üzere 2 ana grup olarak dizayn edilmiştir. Bu iki temel farklılığın yanı sıra maturasyon için üç farklı grup oluşturulmuş böylelikle on iki farklı çalışma grubunun karşılaştırılması gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmanın sonucunda IL-15 ile IL-4 sitokinlerinin DH farklılaşmasında, antijen yükleme zamanıyla birlikte değerlendirildiğinde, birbirinden farklı özelliklere sahip oldukları görülmüştür. IL-15 kullanılan gruplarda erken antijen yüklemesi ile migrasyon yeteneği, T hücre stimülasyon kabiliyeti ve ko-stimulatuar molekül ifadesi yüksek DH popülasyonunun elde edildiği görülmüştür. Kullanılan maturasyon kokteylleri arasında yapılan karşılaştırma da ise IFN $\alpha$  ve IFN $\gamma$  sitokinlerinin etkinliği ortaya koyulmuştur.

Sonuç olarak IL-15 sitokini ile immatur DH eldesi ardından beşinci gün antijen yüklemesi ve maturasyon kokteyli olarak ise IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$  ve IFN $\gamma$  kokteylinin kullanılması ile, kanser immunterapisinde etken bir DH aşısı modeline ulaşılabileceği gösterilmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Dendritik Hücre, İnterlökin-4, İnterlökin-15, İnterferon Alfa, İnterferon Gama, Maturasyon, Prostaglandin E2

## ABSTRACT

### **Production Optimization of Peripheral Blood Mononuclear Cell-Derived Dendritic Cells: Investigation of the Effect of IL-15 on Maturation Process**

The immune response starts with dendritic cells, the most effective professional antigen-presenting cells, by presenting antigen to T cells.

Cancer is a clinical condition that the role of the immune system manifests itself in large amounts. On the basis of increasing the immune response against tumors with cancer vaccines obtained from dendritic cells, used for the past 10 years in the treatment of cancer. The main strategies of cancer immunotherapy are ensuring anti-tumor effectors in patients, obtaining active immunizations against tumors and stimulating the patient's own anti-tumor response. In this way, creating a tumor-specific immunity is intended to destroy tumors selectively without harming the patient. However, variable effectiveness of current cancer vaccines which are created with cytokine cocktails and the inadequate effectiveness are problems to overcome.

By considering these problems, the aim of this study is to determine the most effective cytokine cocktail for maturation and the appropriate timing for antigen loading to produce high-efficient dendritic cell vaccine.

To do this, different cytokine cocktails obtained from mononuclear cells isolated from peripheral blood and antigen load time were used to get dendritic cells. The metabolic activity, the maturity, morphological features and T cell stimulation capabilities of these cells were compared. To obtain immature dendritic cells, the study initiated with two main groups, using IL-4 + GM-CSF and IL15 + GM-CSF cytokines, and besides, the fifth day and the seventh day antigen loading. As well as the basic difference of these two different groups, three different groups used for maturation, therefore twelve different working group were compared.

It was observed that obtaining immature dendritic cells shows different characteristics when cytokines IL-15 and IL-4 are used, depending on the antigen to the loading time. In IL-15 used group, early antigen installation revealed a high migration capability, ability of T cell stimulation and co-stimulatory molecule expression of the revealed dendritic cell population. The effectiveness of the cytokines IFN $\alpha$  and IFN has been revealed from compared use of maturation cocktails.

As a result, after synthesis of immature dendritic cell by IL-15 cytokine, fifth day loading of antigen and using IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$  and IFN $\gamma$  maturation cocktail, effective dendritic cell vaccine for cancer immunotherapy formula can be achieved.

**Keywords:** Dendritic Cell, Interleukin-4, Interleukin-15, Interferon alpha, Interferon gamma, Maturation, Prostaglandin E2



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmamın yürütülmesi ve değerlendirilme süreci boyunca her türlü bilgi, destek ve yardımlarını esirgemeyen, teşvik ve özveride bulunan danışman hocam sayın **Prof. Dr. Erdal Karaöz'e**; tez çalışmam süresince özveriyle tecrübelerini ve yenilikçi fikirlerini benimle paylaşarak, çalışmalarımın yönlendirilmesinde ve gerçekleştirilmesinde sabırla yanımda olarak bana destek veren sayın hocam **Prof. Dr. Ercüment Ovalı'ya**; yüksek lisans eğitimime ilk başladığım andan itibaren manevi desteğini ve insani ilgisini esirgemeyen sayın **Dr. Nil Banu Pelit'e**; yine eğitimimde katkıları olan, yardım ve katkılarını esirgemeyen sayın **Dr. Meltem Kilercik'e**; eğitimim boyunca bilgisi, sabrı ve anlayışıyla her zaman yanımda hissettiğim sayın **Dr. Pınar Çetinalp'e**; alanında üstün tecrübesi ve sabrı ile çalışmam boyunca bana önemli ölçüde destek veren sayın **Ash Önder Gül'e**; gönülden saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam boyunca gerek manevi destekleri gerek ise çalışmaların yürütülmesinde tecrübeleriyle katkılarını benden esirgemeyen sayın **Meryem Akbaş, Muhammet Yılandı, Utku Seyis, Hasan Aydın, Merve Kongur, Ferda Işık, Türker Toktay** ve sayın **Serdar Çelik'e**; yüksek lisans eğitimim boyunca sıcak ilgilerini, bilgi birikimlerini, yardımlarını ve desteklerini hiçbir zaman unutmayacağım dönem arkadaşlarım ve Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi ekibine sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Sınırsız destekleri, anlayışları ile çalışmam boyunca güler yüzleri ve pozitif enerjileri ile yanımda olan sevgili **İrem Peker**, sevgili **Suat Ördekbay** ve sevgili eşim **Anıl Ünüvar'a** sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Yaşamları boyunca tek istekleri çocuklarının hayal ettikleri huzur, başarı ve sevgiyi yakaladıklarını görmek olan, bunu büyük özveri ile gerçekleştirmek için elinden geleni yapan ve başaran sevgili babam **Ali İhsan Eyüboğlu** ve sevgili annem **Saniye Eyüboğlu'na**; eğitim yaşamım ve çalışmalarım boyunca desteğini esirgemeyen sevgili ablam **Gülderen Eyüboğlu**, sevgili kardeşim **Ali Servet Eyüboğlu'na** ve tüm aileme derinden sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmamı birer güneş olan ve her geçen gün sanat, bilim ve insani değerler ile daha fazla aydınlanarak, gelecekte etraflarına ışık saçacak olan yeğenlerime adıyorum.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. İnsan Bağışıklık Sistemi	4
2.1.1. Bağışıklık Sistemi Hücreleri	6
2.1.1.1. Lenfositler	6
2.1.1.2. B Hücreleri	6
2.1.1.3. T Hücreleri ve Doğal Öldürücü T Hücreleri	6
2.1.1.4. Doğal Öldürücü Hücreler	7
2.1.1.5. Fagositik Hücreler	8
2.1.1.6. Antijen Sunan Hücreler	8
2.1.1.7. Eozinofiller	9
2.1.1.8. Bazofiller ve Mast Hücreler	9
2.1.2. Bağışıklık Sistem Organları	10
2.1.2.1. Kemik iliği	10
2.1.2.2. Timus	11
2.1.2.3. Dalak	11
2.1.2.4. Lenf Düğümleri	11
2.2. Dendritik Hücreler	12
2.2.1. Dendritik Hücrelerin Fenotipi, Dağılımı ve Alt Tipleri	14
2.2.2. Dendritik Hücrelerin Morfolojisi	20
2.2.3. Dendritik Hücrelerin Fonksiyonel Özellikleri	20
2.2.4. Dendritik Hücrelerin Bağışıklık Sistemindeki Rolü ve Yaşam Döngüsü	20
2.2.5. İmmatur DH'ler	23
2.2.6. Matur DH'ler	23

2.2.7. Semi-Matur DH'ler .....	24
2.2.8. Antijen Sunumu .....	24
2.2.9. Antijenin İşleme Girmesi .....	25
2.2.10. Endojen antijenlerin işlenmesi .....	25
2.2.11. Ekzojen antijenlerin işlenmesi .....	25
2.2.12. İmmunoterapi ve Dendritik Hücreler .....	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	28
3.1. Materyaller ve Cihazlar .....	28
3.2. Yöntemler .....	29
3.2.1. Periferik Kandan Mononükleer Hücre İzolasyonu .....	29
3.2.2. Hücrelerin Sayılması ve Canlılık tayini .....	31
3.2.3. Mononükleer Hücrelerden DH kültürü .....	31
3.2.4. Sitospin ve Giemsa Boyama ile DH'lerin Morfolojik Analizi .....	34
3.2.5. MTT Bazlı Lenfosit Proliferasyon Testi .....	36
3.2.6. MTT Bazlı DH Metabolik Aktivite Tayini.....	37
3.2.7. DH'lerin Akım Sitometrik Analiz ile Karakterizasyon Çalışmaları	38
4. BULGULAR .....	38
4.1. Farklı Antijen Yükleme Zamanı ve Farklı Sitokin Grupları ile Elde Edilen DH'lerin Morfolojik Özellikleri .....	38
4.2. Farklı Antijen Yükleme Zamanı ve Farklı Sitokin Grupları ile Elde Edilen DH'lerin Hücre Sayısı ve Canlılık Oranları.....	45
4.3. Farklı Antijen Yükleme Zamanı ve Farklı Sitokin Grupları ile Elde Edilen DH'lerin İmmunofenotipik Özellikleri.....	46
4.4. Farklı Antijen Yükleme Zamanı ve Farklı Sitokin Grupları ile Elde Edilen DH'lerin Lenfosit Proliferasyon Aktiviteleri (MTT Bazlı).....	49
4.5. Farklı Antijen Yükleme Zamanı ve Farklı Sitokin Grupları ile Elde Edilen DH'lerin Metabolik Aktiviteleri (MTT Bazlı).....	54
5. TARTIŞMA .....	56
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....	59
KAYNAKLAR DİZİNİ .....	60
ÖZGEÇMİŞ .....	69

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DH : Dendritik hücre

CD : Cluster of differentiation

IL : İnterlökin

IgM : İmmun globulin M

IgD : İmmun globulin D

Blimp-1 : B lenfosit indükleyen maturasyon protein 1

Xbp1 : X-box bağlayıcı protein 1

IRF4 : İnterferon düzenleyici faktör 4

THR : T hücre reseptör

HLA : İnsan lökosit antijeni

MHC : Majör histokompatibilite kompleks

ASH : Antijen sunan hücre

B7-1 : B7 protein reseptör 1

IgE : İmmun globulin E

CLP : Lenfoid öncül hücreler

CMP : Miyeloid öncül hücreler

pDH : Plazmasitoid dendritik hücre

Flt3L : Fms tipi tirozin kinaz 3 ligand

GM-CSF : Granulosit makrofaj koloni uyarıcı faktör

LH : Langerhans hücreleri

MoDH : Monosit kökenli dendritik hücre

NK: Doğal öldürücü hücre

NKT : doğal öldürücü T hücre

TLR : Toll benzeri reseptör

KiDH : kemik iliği dendritik hücre

BDCA : Kan dendritik hücre antijeni  
CCR : C kemokin reseptör  
CCL : Kolesistokinin reseptör  
DC-LAMP: Dendritik hücre lizozomal ilişkili membran proteini  
GMDH : Germinal Merkez dendritik hücreleri  
fDH : Foliküler dendritik hücreler  
IgG : İmmun globulin G  
CXCR : C-X-C kemokin reseptör  
PAF : Platelet aktive edici faktör  
fMLP : N-Formil-L-metionil-L-lösil-L-fenilalanin  
C5a : C5a reseptör  
MIP : Makrofaj enflamatuar protein 3 alfa  
CXCL : C-X-C kemokin ligand  
Bcl : B hücre lenfoma  
imDH : İmmatür dendritik hücre  
HCV : Hepatit C virüs  
HPV : İnsan papilloma virüsü  
HIV : İnsan bağışıklık yetmezlik virüsü  
HSA : İnsan serum albumin  
DMSO : Dimetilsülfoksit  
MTT : Metil tetrazolium  
PBS : Fosfat tampon çözeltisi  
TNF $\alpha$  : Tümör nekroz faktör alfa  
PGE2 : Prostaglandin E2  
IFN $\alpha$  : İnterferon alfa  
IFN $\gamma$  : İnterferon gamma  
FITC : Floresan izotiyosiyanat

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1.</b> Doğal ve edinsel bağışıklık sistemleri arasındaki etkileşimi sağlayan kilit bileşenler.....	5
<b>Şekil 2.2.</b> Bağışıklık sistemi organları.....	10
<b>Şekil 2.3.</b> Dendritik hücre alt tipleri ve etkileşimde buldukları T hücre tipleri.....	14
<b>Şekil 2.4.</b> İmmatur, semi-matur ve matur DH mikroskopik görüntüsü.....	24
<b>Şekil 3.1.</b> Oluşturulan çalışma gruplarının şematik gösterimi.....	32
<b>Şekil 3.2.</b> MTT bazlı lenfosit proliferasyon testi kurulumunun şematik gösterimi.....	35
<b>Şekil 3.3.</b> MTT bazlı DH metabolik aktivite testi kurulumunun şematik gösterimi.....	36
<b>Şekil 3.4.</b> MTT bazlı DH metabolik aktivite testi kurulumunun şematik gösterimi.....	37
<b>Şekil 4.1.</b> A grubu immatür DH'lerin kültür kabındaki morfolojik görünümleri.....	39
<b>Şekil 4.2.</b> B grubu immatür DH'lerin kültür kabındaki morfolojik görünümleri.....	39
<b>Şekil 4.3.</b> A grubu DH'lerin hücre kültür kabındaki morfolojik görünümleri.....	40
<b>Şekil 4.4.</b> B grubu DH'lerin hücre kültür kabındaki morfolojik görünümleri.....	41
<b>Şekil 4.5.</b> A grubu immatür DH'lerin giemsa boyamaları.....	42
<b>Şekil 4.6.</b> B grubu immatür DH'lerin giemsa boyamaları.....	42
<b>Şekil 4.7.</b> A grubu matür DH'lerin giemsa boyamaları.....	43
<b>Şekil 4.8.</b> B grubu matür DH'lerin giemsa boyamaları.....	44
<b>Şekil.4.9.</b> 5. gün antijen yüklemesi yapılan DH'lerin akım sitometri cihazında tespit edilen verilerinin grafik ile gösterimi.....	47
<b>Şekil.4.10.</b> 7. gün antijen yüklemesi yapılan DH'lerin akım sitometri cihazında tespit edilen verilerinin grafik ile gösterimi.....	48
<b>Şekil.4.11.</b> 5. gün antijen yüklemesi yapılan A1 ve B1 grubu DH'lerin	

MTT analizi ile tespit edilen T hücre proliferasyon verilerinin grafik ile gösterimi.....	51
<b>Şekil.4.12.</b> 5. gün antijen yüklemesi yapılan A2 ve B2 grubu DH'lerin MTT analizi ile tespit edilen T hücre proliferasyon verilerinin grafik ile gösterimi.....	51
<b>Şekil.4.13.</b> 5. gün antijen yüklemesi yapılan A3 ve B3 grubu DH'lerin MTT analizi ile tespit edilen T hücre proliferasyon verilerinin grafik ile gösterimi.....	52
<b>Şekil.4.14.</b> 7. gün antijen yüklemesi yapılan A1 ve B1 grubu DH'lerin MTTanalizi ile tespit edilen T hücre proliferasyon verilerinin grafik ile gösterimi.....	52
<b>Şekil.4.15.</b> 7. gün antijen yüklemesi yapılan A2 ve B2 grubu DH'lerin MTT analizi ile tespit edilen T hücre proliferasyon verilerinin grafik ile gösterimi.....	53
<b>Şekil.4.16.</b> 7. gün antijen yüklemesi yapılan A3 ve B3 grubu DH'lerin MTT analizi ile tespit edilen T hücre proliferasyon verilerinin grafik ile gösterimi.....	53
<b>Şekil.4.17.</b> 5. gün antijen yüklemesi yapılan DH'lerin MTT analizi ile tespit edilen metabolik aktivite verilerinin grafik ile gösterimi.....	55
<b>Şekil.4.18.</b> 5. gün antijen yüklemesi yapılan DH'lerin MTT analizi ile tespit edilen metabolik aktivite verilerinin grafik ile gösterimi.....	55

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 4.1.</b> DH'lerin giriş ve çıkış hücre sayıları ve canlılık oranları .....	45
<b>Çizelge 4.2.</b> 5. gün antijen yüklemesi yapılan DH'lerin akım sitometri cihazında tespit edilen verileri.....	47
<b>Çizelge 4.3.</b> 7. gün antijen yüklemesi yapılan DH'lerin akım sitometri cihazında tespit edilen verileri.....	48
<b>Çizelge 4.4.</b> 5. gün antijen yüklemesi yapılan DH'lerin MTT analizi ile tespit edilen T hücre proliferasyon verileri.....	50
<b>Çizelge 4.5.</b> 7. gün antijen yüklemesi yapılan DH'lerin MTT analizi ile tespit edilen T hücre proliferasyon verileri.....	50
<b>Çizelge 4.6.</b> DH'lerin MTT analizi ile tespit edilen metabolik aktivite verileri.....	54



## 2. GİRİŞ

Dendritik hücreler (DH) kemik iliğinden farklılaşmış, neredeyse tüm dokularda bulunan karmaşık bir antijen sunucu ağ oluşturan ve T hücrelerini en etkili şekilde aktive eden hücre grubudur. DH'ler yüksek oranda MHC molekülü ve naif T lenfositlerin çoğalması ve farklılaşması için gerekli ikincil uyarıları oluşturan ko-stimulatuar moleküllerini taşımaktadırlar. DH'leri en etken antijen sunan hücre yapan diğer bir farklılık ise intraselüler antijenleri CD8+ T lenfositlere sunabilmelerinin yanında CD4+ T lenfositlerine de sunabilmeleri olduğu gösterilmiştir (Sönmez, 2005). Dendritik hücreler, tümöre özgül sentetik ya da hastaların kendi tümör hücrelerinden elde edilen antijenler ile yüklenerek kanser hastasına hücre sel aşı olarak enjekte edilmekte ve T hücreleri özgül olarak uyatabilmektedir. Bu şekilde, tümör hücreleri ve bunun yanında hepatit C, insan bağışıklık yetmezlik virüsü gibi kronik viral enfeksiyonların da saf dışı bırakılması mümkündür, (Fan, 2001).

Subkutan ve intravenöz olarak 2 haftada 2 kez  $5 \times 10^7$  dozunda DH aşısı uygulanmış 5 HLA-A2 hastası ile yapılan çalışmada, immunolojik yanıt, güvenilirlik ve aşuya karşı hassasiyet değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda, üç hastanın yaşam süresinin beklenenden fazla olduğu, iki hastanın yaşam süresinin umulandan 2 kat daha fazla olduğu ve sadece bir hastada aynı anda HER-2 ve CEA ekspresyonu olduğu gösterilmiştir. Bu faz I pilot çalışmanın umut veren sonuçları dikkate alınarak erken dönem akciğer kanserli hastalar üzerinde çoklu dozlarla yapılacak geniş kapsamlı çalışmalar ile DH aşısı ile tedavi stratejilerinin geliştirilebileceği düşünülmektedir, (Perroud, 2001).

DH aşısının umut verici immünoterapiye iyi bir örnek olduğu diğer bir hastalık ise Multiple Myelomdur (Qui, 2002). DH'lerin myelom hücrelerine karşı güçlü anti-tümör etkisine sahip olduğu fareler üzerinde yapılan bir çalışmayla gösterilmiştir, (Ruffini, 2001).

DH'lerin doğrudan kolorektal tümöre ya da kanser karaciğer metastazına enjekte edildiğinde şiddetli bir anti-tümör etkiye sahip oldukları bulunmuştur. Qian ve ark. 2002 yılında yaptıkları bir çalışmada HBsAg yüksek derecede ifade edilerek adenovirus vektör ile ex vivo olarak hazırlanmış DH'lerin, güçlü ve özgün anti-tümör etkileri indükledikleri gösterilmiştir. 8 adet fareden 3'ünde tümörlerin yok olduğu, 5 tanesinde ise DH verilmeyen gruplara göre önemli ölçüde küçülme olduğu gösterilmiştir. DH aşısının rekombinant HBsAg aşısına göre daha güçlü olduğu ve HBsAg'nin karaciğer kanser immünoterapisinde hedef antijen olarak kullanılabilirliği sonucuna varılmıştır, (Qian, 2002).

Yapılan klinik çalışmalar, DH aşı uygulamalarının güvenli olduğunu ortaya koymuştur. Ridgway 2003 yılında 15 farklı ülkede DH aşısı uygulanmış malign myeloma, prostat kanseri, klorektal kanser veya multiple myelomlu ilk 1000 hastayı incelediği çalışmanın raporunu yayınlamıştır. DH aşısına bağlı ciddi yan etki gözlemlenmediği, vakaların yaklaşık %50'sinde klinik yanıtın alındığı gözlemlenmiştir, (Ridgway, 2003). Meme kanseri, glioblastoma multiforme (GBM), prostat kanseri, renal kanser, pankreas kanseri gibi diğer kanser çeşitleri için de DH aşılması üzerine birçok araştırma gerçekleştirilmiş ve optimizasyon araştırmaları hala devam etmektedir. Çünkü, DH aşılması ile ilgili henüz tam olarak aşılmamış sorunlar varlığını sürdürmektedir. Hazırlanan aşının uygulama şekli, sıklığı ve dozu ile ilgili net olarak ortak bir görüş oluşmamıştır. DH'lerin daha başarılı olgunlaştırılması için hangi sitokin gruplarının hangi zamanlamalarla DH'lere uygulanmasına ilişkin ortak görüşün olmayışı bir başka sorundur. Ayrıca, tümör lizatları ve tümör DNA-RNA'ları ve tümör hücresinin direk DH'ye transforme edilmesiyle üretilen DH aşılarının hangi çeşidinin daha etkin olduğu tam olarak bilinmemektedir. DH'lere yapılacak antijen yüklemesinin maturasyon öncesi ve eş zamanlı ya da sonrasında yapılmasıyla ilgili optimizasyon çalışmaları devam etmektedir.

İn vitro çalışmalar, tümör özgün T hücrelerinin lösemik hücreleri yok edebildiğini göstermiştir. KLL li hastaların dolaşan kanından elde edilen monositler kullanılarak elde edilen DH'lere apoptotik KLL hücrelerinin yüklenmesiyle APO-DC aşısı elde edilmiştir. Aşı en az 5 kez  $10^7$  dozunda KLL li hastalara uygulanmış ve hastaların 52 hafta boyunca gözlemlenmesinin sonucunda DH temelli aşı tedavisinin antilösemik hücreli immüniteyi arttırabileceği düşünülmüştür, (Palma, 2008). DH aşısı ile tedavi stratejileri geliştirmek için üzerinde yoğun olarak çalışılan bir başka kanser tipi Malign Melanomadır. 2009 yılında Lopez MN. ve arkadaşlarının yaptığı faz II çalışması bu anlamda önemli bir araştırma olmuştur. Evre III ve IV Malign Melanomlu 43 hastaya 4 doz lizat yüklü DH aşısı uyguladıkları çalışmanın sonucunda %60'dan fazla hasta gecikmiş tip aşırı duyarlılık (hipersensitivite) reaksiyonu (DTH) göstermiştir. Evre IV DTH pozitif hastalarda 33 ay, DTH negatif hastalarda 11 ay sağ kalım, evre III DTH pozitif hastalarda ise 48 ay tümör oluşumu olmadığı gösterilmiştir, (Lopez, 2009).

Çalışmamızda, DH aşı üretiminde mononükleer hücrelerden olgunlaşmamış DH elde edilmesinde iki farklı sitokin koktyeli, matur DH üretimi için ise üç farklı sitokin kokteylinin ve ardından antijen yüklemesi için iki farklı zaman diliminin karşılaştırmalı olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmanın sonucunda kanser tedavisinde kullanılmak

üzere DH aşısı için etkili bir model geliştirilmesi hedeflenmiştir. Sonuçta diğer kanser aşılara göre daha etkili olduğu düşünülen DH aşısı için bir sorun olan maturasyon ve antijen yükleme zamanlamasına ilişkin gelecekte klinik uygulamalarda kullanılacak verilerine ulaşılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. İnsan Bağışıklık Sistemi

Enfeksiyonlara karşı savunmayı sağlayan hücreler, dokular ve moleküllerin toplamına bağışıklık sistemi adı verilir, bu hücrelerin ve moleküllerin enfeksiyonlara yol açan mikroorganizmalara karşı düzenli olarak verdikleri tepkiye de immün yanıt denir. Bağışıklık sisteminin fizyolojik işlevi enfeksiyonları engellemek ve yerleşmiş enfeksiyonları yok etmektir. Bağışıklık sisteminin sağlık için ne denli önemli olduğu, bağışıklık sisteminin kusurlu olduğu durumlarda sağlığı tehdit eden sonuçların ortaya çıkması ile kanıtlanmaktadır, (Abbas and Lichtman, 2004).

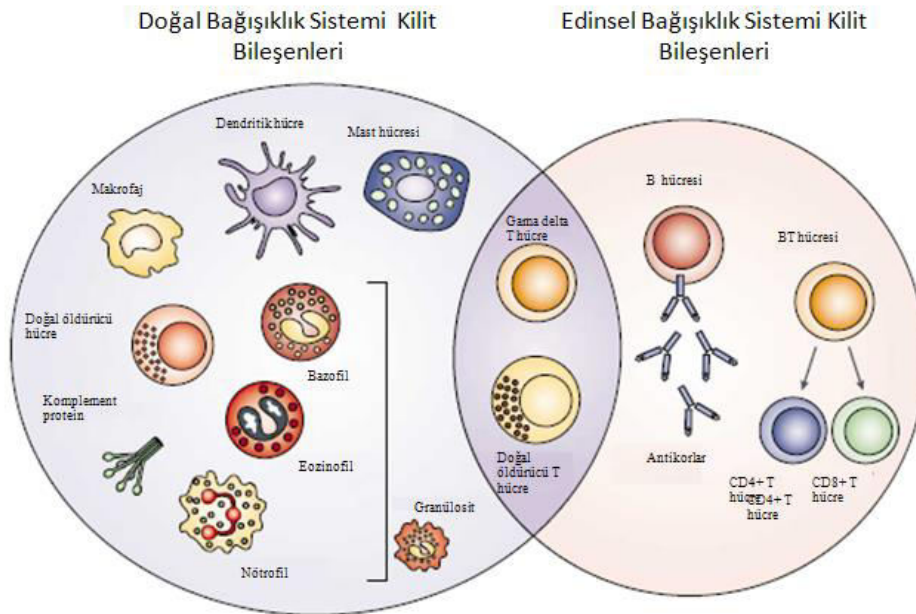
İnsan bağışıklık sistemi, farklı özellikte bileşen ve mekanizmalara sahip olan edinsel ve doğal bağışıklık olarak iki başlık altında incelenmektedir. Doğal bağışıklık, doğuştan kazanılarak kuşaktan kuşağa aktarılırken edinsel bağışıklık bireyin hayatı boyunca gelişmeye devam etmektedir. Doğal bağışıklık sistemi, genellikle patojen istilası ile karşılaşılmasını takiben birkaç saat içerisinde ilk immün yanıtı oluşturmakla görevlidir. Buna karşılık, edinsel bağışıklık sistemi daha özelleşmiş bir yanıt oluşturabilmek için, günler ya da aylar ile ifade edilebilecek çok daha uzun bir zamana gereksinim duymaktadır, (Coico et al. 2003).

Bağışıklık sistemi, birbirleriyle etkileşim halinde olan özelleşmiş moleküller, hücreler ve organlardan oluşmaktadır. Bağışıklık bileşenleri arasındaki etkileşimler ana tehditlerin tanınması ve giderilmesini sağlayan, zengin ve karmaşık bir yapının ortaya çıkmasını sağlamaktadır. Bağışıklık sisteminin ana bileşenleri çeşitli hücre topluluklarıdır. Bunlar, antijen sunan hücreler, T hücreleri ve B hücreleridir. Hücre-hücre ya da hücresel iletişimi gerçekleştirmek üzere sitokin olarak bilinen moleküller, sinyal taşıyıcı olarak işlev görürler. Bağışıklık sistem hücreleri, yüzeylerinde diğer hücrelerden gönderilen sinyalleri alabilmek için almaçlar içermektedir. Bu almaçlar aynı zamanda antijen olarak bilinen bazı proteinlere de bağlanabilmektedir. Antijenler için yaygın olarak kullanılan tanım; bağışıklık sistem hücrelerinin almaçları tarafından tanınan ve bu almaçlara bağlanabilen herhangi bir yapı şeklindedir, (Coico et al. 2003).

Doğal bağışıklık enfeksiyonlara karşı bağışıklık sisteminin ilk savunma hattıdır ve özelleşmemiş bağışıklık olarak da adlandırılmaktadır. Doğal bağışıklık deri, asitlerin bazı özel tipleri, enzimler ve çözünen proteinler gibi bazı fiziksel ve kimyasal koruyucular ile başlamaktadır. Bunun yanında doğal bağışıklık sistemi doğal öldürücü hücreler, antijen

sunan hücreler gibi çeşitli hücre grupları ile tehditleri ortadan kaldırmayı ya da bağışıklık sisteminin geri kalanı ile etkileşimini sağlamaktadır, (Janeway and Medzhitov, 2002).

Edinsel bağışıklık sistemi, aynı mikroorganizmaların yeniden bulaşmasını engelleyen antijen özgün hücrelerini ve bağışıklık bellek mekanizmasını içeren antijen özgün bağışıklık olarak da bilinmektedir, (Lutz and Schuler, 2002). Edinsel bağışıklık, doğal bağışıklık sisteminin ilk savunmasından kaçan patojenleri ortadan kaldıracak şekilde tasarlanmıştır. Doğal bağışıklığın hızlı cevabının aksine, edinsel bağışıklık sistemi yanıtı çok daha uzun zaman almaktadır. Bunun nedeni edinsel bağışıklığın T hücre ve B hücreye özgün olması ve antijen özgün efektör hücre tiplerine farklılaşmadan önce mikroorganizmaların klonal genişlemesinin gerekmesidir. Doğal ve edinsel bağışıklık vücudu çeşitli patojenlere karşı korumak için işbirliğine ihtiyaç duyar, bu nedenle birbirine bağlı ve ayrılmazdır. Bu iki bağışıklık sistemi arasındaki bağlantı antijen sunan hücrelerin bir grubu olan dendritik hücreler tarafından yönetilmektedir. Özgün antijenlere karşı bağışık yanıtını uyarmak için, dendritik hücrelerin T hücreleri ile etkileşmesi gerekmektedir. Antijen tipine göre etkileşime geçmesi gereken hücreler B hücreleri de olabilir, (Weng, 2006). Doğal ve edinsel bağışıklık sistemleri arasındaki etkileşimi sağlayan anahtar bileşenler Şekil 2-1 de gösterilmiştir.



**Şekil 2.1.** Doğal ve edinsel bağışıklık sistemleri arasındaki etkileşimi sağlayan kilit bileşenler, (Dranoff, 2004).

## **2.1.1. Bağışıklık Sistemi Hücreleri**

### **2.1.1.1. Lenfositler**

Lenfositler, antijenlere özğün almaçlar taşıyan tek hücre grubudur ve edinsel bağışıklığı düzenleyen kilit hücrelerdir. Lenfositler morfolojik olarak birbirlerinden ayırt edilememelerine karşılık, işlevsel anlamda köken aldığı dizi ve fenotip olarak birbirlerinden farklıdır ve bu nedenle karmaşık biyolojik yanıtlara ve aktivitelere neden olmaktadır. Bu hücreler, ancak yüzeylerinde bulundurdukları proteinler aracılığı ile birbirlerinden ayırt edilmektedir. Yüzey proteinlerin standart adlandırması "CD" (Cluster of differentiation, ayırım kümesi) sayısal tanımlamasıdır. Bu moleküller belli bir hücre tipi veya hücre başkalaşım evresini tanımlamak için kullanılır ve bir antikor kümesi ya da grubu tarafından tanınmaktadır, (Abbas and Lichtman, 2004). Lenfoid öncül hücreleri genel olarak 4 ana hücre topluluğuna farklılaşmaktadır bunlar B hücreleri, T hücreleri, doğal katil hücreler ve doğal katil T hücreleridir, (Chaplin D. D. 2009).

### **2.1.1.2. B Hücreleri**

B hücreleri kemik iliğinde hematopoietik kök hücrelerden farklılaşmaktadır. B hücrelerinin kök hücrelerden farklılaşması kemik iliği stromal hücrelerinin IL-7 üretmesine bağlıdır, B hücresi yüzey antijeni oluşumu ve antikor ağır ve hafif zincirler genlerinin yeniden düzenlenmesi ile gelişimine devam etmektedir. Böylece IgM ve IgD taşıyan olgun B hücreleri oluşmaktadır, bu oluşum antijen yokluğunda gerçekleşmektedir. B hücrelerin yüzeyinde antijenlerin tanınması ve hücre aktivasyonunun başlaması için yüzey almacı olarak görev alan antikorlar bulunmaktadır. B hücreleri, dolaşan kan beyaz hücrelerinin yaklaşık %15'ini oluşturur ve antikor üretimi ile tanımlanmaktadır. Çevresel lenfoid dokularda antijenle karşılaşan B hücresi daha olgun hale gelir. B hücresinden, antikor salgılayan plazma hücresine farklılaşma B lenfositine bağlı maturasyon protein 1 (Blimp-1), X-box bağlayıcı protein (Xbp1) ve interferon düzenleyici faktör 4 (IRF4) transkripsiyon faktörleri tarafından kontrol edilmektedir, (Chaplin D. D. 2009).

B hücreleri antikor üretebilen tek hücre grubudur ve sıvısal bağışıklığı düzenlemekle görevli oldukları bilinmektedir. Çözünür antijenler ve mikrop veya diğer hücrelerin yüzeylerindeki antijenler B hücre yüzeyindeki antijen bağlayan almaçlara bağlanarak, sıvısal bağışıklığı aktive etmektedir, (Abbas and Lichtman, 2004).

### **2.1.1.3. T Hücreleri ve Doğal Öldürücü T Hücreleri**

T hücreler kemik iliğinde bulunan hematopoietik kök hücrelerden köken almaktadır. CD3, CD4, ya da CD8 taşımayan hematopoietik kök hücreler kemik iliğinden

timik subkapsüler bölgeye gider ve burada THR (T hücre almaç) genlerini yeniden düzenlemektedir. Burada THR beta zinciri oluşuktan sonra THR alfa zincirinin yeniden düzenlendiği, CD3, CD4 ve CD8 proteinlerinin yüzeyde olduğu timik korteksine ulaşmaktadırlar. CD4 ve CD8 bakımından pozitif olan hücreler kendilerine ait sınıf I ve sınıf II HLA proteinlerini tanıyabilme yeteneği kazanmak için kortikal epitelyum hücrelerinde pozitif olarak seçilmektedirler. Gelişen T hücrenin sınıf I proteini tanıma yeteneğine sahip olarak gelişmesi halinde oluşan T hücre CD8 bakımından pozitif CD4 bakımından negatiftir. Gelişen T hücrenin sınıf II proteini tanıma yeteneğine sahip olarak gelişmesi halinde ise oluşan T hücre CD4 bakımından pozitif CD8 bakımından negatif olmaktadır. Sadece CD4 ya da CD8 bakımından pozitif olan hücreler timik medullaya giderek burada tek yönlü pozitif seçim ile CD4 pozitif ya da CD8 pozitif hücreler olarak dolaşıma salınmaktadır. Pozitif ya da negatif seleksiyona uğramayan hücreler apoptoizise uğramaktadır. T hücrelerin küçük bir kısmı THR beta-alfa yerine THR gama-delta zincirlerini oluşturmak üzere farklılaşmaktadır, (Chaplin D. D. 2009).

Esas olarak T hücre sınıfları yüzeylerinde alfa-beta THR taşıma durumlarına göre belirlenmektedir. Bu almaçların gelişmesindeki birincil neden özel peptit sunan moleküller olan sınıf I veya sınıf II majör histokompatibilite antijenleri (MHC) ile sunulan peptid yapılı antijenleri tanımadır. Alfa-beta T hücreleri bazı farklı alt gruplara farklılaşmaktadır. Bunlardan biri öncelikli hedefleri hücre içi patojenler ile enfekte hücreleri öldürmek olan CD8(+) T hücreleridir. Diğer bir alt küme ise, öncelikli görevi hücrel ve sıvısal immün yanıtı düzenlemek olan CD4(+) T hücreleridir. Alfa-beta T hücrelerinin bir diğer küçük alt grubu ise doğal öldürücü T hücreleridir. Bu hücreler genellikle hem CD4 hem de CD8 bakımından negatiftirler ve CD1d molekülü tarafından sunulan glikolipid yapısındaki antijenleri tanımadır. Doğal öldürücü T hücreleri hızlı bir biçimde yüksek miktarda sitokin salgılayarak immünregulasyonda etkilerini göstermektedirler, (Godfray, 2004).

T hücreleri hücrel bağışıklığın hücreleridir. T hücrelerinin antijen almaçları yalnızca MHC moleküllerine bağlı durumda olan, peptid yapılı antijenleri tanımadır, (Abbas and Lichtman, 2004).

#### **2.1.1.4. Doğal Öldürücü Hücreler**

IL-2, IL-15 ve kemik iliği stromal hücrelerinin etkisi altında kemik iliğinde gelişmektedir. Doğal öldürücü hücreler aktif durumdayken granüllü, büyük bir lenfosit görünümündedir. Dolaşan kanın ve dalak ve diğer çevresel lenfoid organlarda bulunan lenfoid hücrelerin küçük bir kısmını oluşturmaktadır. Doğal öldürücü hücrelerin antijen

özgün almaçları yoktur. Bu hücrelerin sitotoksik etkisi yüzeylerinde bulunan ve sınıf I HLA moleküllerini tanıyan inhibitör almaçlar aracılığıyla, kendi MHC molekülleri ile karşılaşmaları sonucu inhibe edilmektedir. Bu nedenle doğal öldürücü hücreler artık sınıf I moleküllerini taşımayan doğal öldürücü hücreleri de öldürebilmektedir. Bu vücudun korunması için oldukça önemli bir mekanizmadır, çünkü bazı virüsler CD8+ hücrelerinden gizlenmek için sınıf I ekspresyonunu düşüren bir mekanizma geliştirebilmektedir.

Doğal öldürücü hücrelerin önemli antitümör aktiviteleri vardır ve viral enfeksiyonlu hücrelerin yok edilmesinde oldukça etkindirler, (Cooper, 2009).

#### **2.1.1.5. Fagositik Hücreler**

Esas olarak, fagositik hücreler nötrofiller, makrofajlar ve monositler olarak sayılabilmektedir. Bu hücreler, patojenleri fagosite eder ardından nitrik oksit, super oksit ve birtakım enzimleri içeren toksik etkili moleküllerin salındığı hücre içi vakuollerine yerleştirerek burada parçalanmalarını sağlamaktadır. Fagositik hücreler doğal veya edinsel bağışıklık sistemi elemanları tarafından işaretlenmiş partikülleri komplement almaçları aracılığı ile hücre içerisine almaktadırlar, (Chaplin D. D. 2009).

#### **2.1.1.6. Antijen Sunan Hücreler**

Mikroorganizmaların vücuda giriş yerleri olan deri, gastrointestinal ve solunum sistemi, antijenleri yakalayıp çevresel lenfoid organlara taşıyabilen özgün epitel hücreleriyle kaplıdır. Bu hücrelerin başında antijen sunan hücreler (ASH) gelmektedir. ASH'ler mikropları ve diğer antijenleri yakalamak için özelleşmişlerdir. ASH'ler yakaladıkları antijenleri lenfositlere sunarak oluşturduğu sinyal ile lenfositlerin çoğalması ve farklılaşmasını sağlamaktadır, (Hume, 2008)

ASH'ler yabancı yapıları antijenleri hücre içerisine alarak işlemek ve MHC sınıf II moleküllerini kullanarak diğer bağışıklık sistem hücrelerine sunmak üzere özelleşmiş hücrelerdir. Örneğin sınıf II MHC molekülü-antijen kompleksi T hücre almasına bağlanabilmektedir. MHC bağımlı olarak adlandırılan bu sürecin gerçekleşmesi için, antijen ve bireysel MHC II moleküllerinin her ikisinin de bulunması gerekmektedir.

Antijeni alarak epitop peptidleri naif T hücrelerine sunmakla görevli iki tip ASH bulunmaktadır. Her biri farklı immün yanıt oluşturabilmektedir. Vücuttaki en güçlü profesyonel antijen sunan hücrelerden biri dendritik hücrelerdir. DH'ler, antijen alımındaki yüksek verimlilikleri, peptidleri MHC sınıf II molekülleri ve B7-1 (CD80) gibi kostimulatuar moleküller ile ifade edebilmeleri ve immün yanıtta yaşamsal bir role sahip olmaları gibi özelliklere sahiptirler, (Banchereau and Steinman 1998).



Bağışıklık sisteminin temel efektör hücreleri, enfekte hücreleri ve toksik materyalleri ortadan kaldıran T ve B hücreleridir. Ancak, virüs ve bakteri gibi antijenler bu özelleşmiş efektör hücreleri direkt olarak uyarmamaktadır. Bunun yerine özelleşmiş ASH üzerinde bulunan antijenler aracılığıyla lenfosit uyarılması sağlanmaktadır. Antijen sunumunu takiben bir kez bellek ya da efektör lenfositler oluştuktan sonra geniş oranda hücre tipleri aktive hücrelere antijen sunabilmektedir, (Stagg and Knight, 2001)

Lenfosit aktivasyonunu başlatmak veya geliştirmek için özelleşmiş hücreler profesyonel antijen sunan hücreler olarak adlandırılmaktadır. Daha geniş bir alana sahip, ikincil veya efektör işlevleri uyaran antijen sunan hücreler ise profesyonel olmayan antijen sunan hücreler olarak adlandırılmaktadır, (Stagg and Knight, 2001)

Makrofajlar antijen sunan hücre grubunun bilinen diğer bir üyesidir. Makrofajlar çeşitli antijenleri hücre içine alarak yapısını bozmaktadır. Bu hücrelerin makrofaj mannoz almaç, temizleyici almaç gibi patojen bileşenleri tanıyan bazı almaçları bulunmaktadır. Bu almaçların patojene bağlanması durumunda fagositoz süreci başlamaktadır. Aktif makrofajlar mikroorganizmaları fagosit edebilir, yok edebilir, proinflamatuvar sitokin salgılayabilir ve antijenleri yardımcı T hücrelerine sunabilmektedirler, (Abbas and Lichtman, 2004).

Makrofajlar, normal şartlarda az miktarda MHC sınıf II molekülü ve kostimulatuar molekülleri taşımaktadır, bu miktar mikrobiyal ürünlerin sayısı ile değişkenlik gösterebilmektedir. Bunun yanında, makrofajlar yüksek miktarda IFN- $\gamma$  üretirler ve bu sayede CD4+ T hücrelerine antijen sunumunu gerçekleştirerek, CD4+ T hücrelerinin aktive olmasını sağlamaktadır, (Lambrecht, 2005)

#### **2.1.1.7. Eozinofiller**

Eozinofiller helmint ve diğer parazitlere karşı aktif olan toksik molekül ve enzimler içeren sitoplazmik granülleri sayesinde kolayca tanımlanmaktadır. Kemik iliğinde eozinofil üretimi ve bu hücrelerin çevresel dokularda hayatta kalma süresinde IL-5 sitokini etkilidir, (Fleminger and Schaffer, 2009).

#### **2.1.1.8. Bazofiller ve Mast Hücreler**

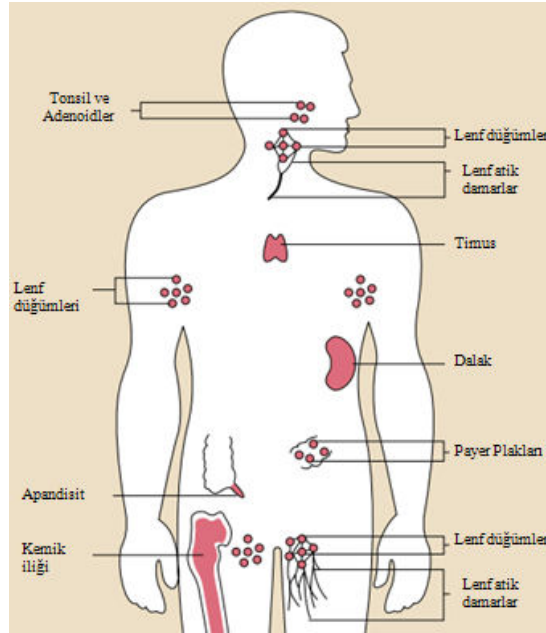
Bazofil ve mast hücreleri morfolojik olarak birbirlerine benzer özellikler göstermektedirler. Hücre yüzeylerinde yüksek ilgililik IgE almaçlarını bulundukları için helmintik parazitlere karşı aşırı duyarlılık reaksiyonu ve vücudun immün yanıtını hızlıca oluşturabilmektedir. Granüllerinden histamin, diğer mediatörler salgılanabilir ayrıca doku inflamasyon, ödem ve düz kas kasılmasını uyaran lipit mediatörleri önemli miktarda

üretebilmektedir. Mast hücrelerinin aşırı duyarlılık yanıtındaki rollerinin yanı sıra vücutta oluşan bakteriyel enfeksiyonlarda da önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir. Mast hücreleri ve bazofiller IL-4 salgırlar bu nedenle alerjik immün yanıtta önemli bir yere sahiptirler, (Schroeder, 2009).

### 2.1.2. Bağışıklık Sistem Organları

Lenfoid organlar santral (primer) ve çevresel (sekonder) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Primer organlar, yeni lenfositlerin antijene bağımlı olmaksızın otonom olarak yapıldıkları ve immün tepkime oluşturma yeteneğini kazandıkları yerlerdir. İnsanda primer lenfoid organları kemik iliği ve timus oluşturur.

Çevresel lenfoid organlar ise, lenfositlerin çoğaldıkları ve antijenik uyarılara tepki gösterdikleri yerlerdir. Çevresel lenfoid sistemin başlıca organları dalak, lenf düğümleri, tonsiller ve diğer lenfoid dokulardır. Bağışıklık sistemi organları vücuttaki dağılımı şekil 2.2 de görülmektedir.



Şekil 2.2. Bağışıklık sistemi organları (NIAID Science Education, 2007)

#### 2.1.2.1. Kemik iliği

Kemik iliği retikülüm lifleri ve retiküler hücrelerden oluşmuş gevşek bir stroma içinde yer alan, değişik olgunlaşma evrelerindeki kan hücreleri ve yağ hücrelerinden oluşmaktadır. Kemik iliği tüm kan hücrelerinin yapıldığı kırmızı ilik ve yağ hücrelerinden zengin sarı ilikten oluşmaktadır. Sarı ilik yağ deposudur ancak bazı şartlarda hematopoietik etkinlik kazanabilmektedir.

Kemik iliği uzun kemiklerin diafizlerindeki medüller kanallarda ve yassı kemiklerin kavitelerinde yer almaktadır, (Kılıçturgay, 2003).

#### **2.1.2.2. Timus**

Sternum arkasında üst mediastene yerleşik ve kapsülle çevrili iki lobdan oluşan bir lenfoid organdır, (Kılıçturgay, 2003). Kemik iliği kaynaklı öncül hücrelerden T lenfosit olgunlaşması bu iki lobda gerçekleşmektedir. Timus, epitelyal hücre, makrofaj, DH ve olgunlaşma sürecinin farklı aşamalarında çok sayıda T hücre öncülünü içermektedir, (Abbas and Lichtman, 2004).

#### **2.1.2.3. Dalak**

Dalak sol hipokondrium ile kısmen epigastriumda yerleşik, bağ dokudan oluşmuş bir kapsülle çevrili, dolaşım sisteminin en büyük lenforetiküler organıdır. Dalak parankimasi, kırmızı ve beyaz pulpadan oluşmaktadır. Kırmızı ve beyaz pulpa arasında birçok sinüzoid ve lenfoid dokunun oluşturduğu marginal bölge yer almaktadır. Antijen bu bölgede DH tarafından alınarak kanla gelen immunositlere sunulur ve antijene karşı özgün cevabın başlamasını sağlamaktadır

Dalağın başlıca fizyolojik işlevleri şu şekilde sıralanabilir.

- Etkin sıvısal ve hücrel cevapların oluşturulması.
- Damar yapısı ile portal kan akımını düzenmesi.
- Fetusda kemik iliğinin görevini yaparak kan hücrelerinin yapılması.
- Bazı hastalık hallerinde aynı şekilde ekstramedüller hematopoietik organ gibi işlev görülmesi.
- Normal ve anormal kan hücrelerini ortadan kaldırılması, (Kılıçturgay, 2003).

#### **2.1.2.4. Lenf Düğümleri**

Oval biçimde lenf damarları boyunca yer alan lenfoid oluşumlardır. Lenf füğümleri dağınık veya küçük gruplar halinde bulunmaktadır, (Kılıçturgay, 2003). Lenf düğümleri tüm vücuda yayılan lenfatik kanalların etrafında yer alan lenfoid dokuların bir araya gelmesinden oluşmaktadır. Bütün epitelyum, bağ dokusu ve çoğu parankimal organlardaki sıvılar lenfatikler tarafından boşaltılmaktadır. Dokulardan lenf düğümlerine boşaltılan bu sıvıya lenf denir, ve lenf düğümlerinden akışı sırasında burada bulunan ASH'ler epitelden dokulara geçen patojenlere ait antijenleri yakalayabilmektedir. DH'ler epiteldeki antijenleri yakalayıp bunları lenf düğümüne taşımaktadır. Böylece epitelde giren veya dokularda kolonize olan patojen antijenleri boşaldığı lenf düğümünde yoğunlaşmaktadır. Lenf

düğümüleri lenf kaynaklı antijenlere karşı edinsel immun yanıtların başladığı oluşumlardır, (Abbas and Lichtman, 2004).

Lenf düğümünde, antijenle aktive B hücre blastlarının yığılmasıyla oluşan germinal merkez denilen yapılar bulunmaktadır. Germinal merkezler aktif çoğalma ve olgunlaşma alanlarına sahiptir. Bu alanlarda, B hücre çoğalması, foliküler DH'lerdeki antijenleri bağlamak üzere pozitif seleksiyonu, bellek hücre ve plazma hücre öncüllerinin oluşumu gerçekleşmektedir.

Lenf düğümü parakorteksinde başlıca T hücreleri yer alır. T hücrelerin çoğu ASH'ler ile ilişkili durumdadır, (Kılıçturgay, 2003).

## **2.2. Dendritik Hücreler**

DH'ler immün cevabın düzenlemesinde önemli rol oynayan beyin, testis ve göz haricinde tüm dokularda bulunan antijen sunan hücrelerdir. DH'lerin öncelikli işlevi antijen sunmak olduğundan bu hücrelere profesyonel antijen sunan hücrelerde denilmekte ve özellikle henüz farklılaşmamış T lenfositleri uyararak primer immün yanıtın oluşmasına yol açmaktadırlar. Bu işlevlerini gerçekleştirebilmek için antijeni yakalama, işleme tabi tutma ve uygun kostimulan moleküllerle hücre yüzeyinde sunma yeteneğine sahiptirler. Aynı zamanda, DH'ler B hücre işlevlerinin oluşumunda etkili olduklarından sıvısal immünitinin gelişiminde de önemli rol oynamaktadırlar, (Sönmez ve Ovalı, 2007)

DH'ler kemik iliği kökenli antijen sunan hücreler olup özel olarak T hücrelerin birincil ve ikincil immun yanıtını ve B hücrelerin immun yanıtının uyarılmasından sorumludur, (Ovalı ve ark. 2007). DH'ler immun yanıtın başlamasında anahtar role sahip olan, naif T hücreleri uyarılmasında en güçlü uyarıcı hücrelerdir, (Ovalı ve ark. 2007).

DH'ler ilk kez 1973 yılında tanımlanmış olsa da, bu tarihten önceki çalışmalarda araştırmacılar tarafından, lenfatik sistem aracılığıyla çevresel dokulardan çevresel lenfoid organlara göç eden hücreler tarif edilmiştir, (Pugh et al. 1983). DH'ler Steinman ve Chon tarafından 1973 yılında dalak ve çevresel lenf nodlarında bulunan, yıldız şeklinde morfolojik özelliklere sahip bir bağışıklık sistem hücresi olarak tanımlanmıştır. Hücre gövdesinden çıkan sayısız filopodial çıkıntıları için ise dendritik terimi kullanılmıştır, (Steinman et al. 1979). Takip eden çalışmalarda DH'lerin antijen sunumunda başlıca mekanizma olduğu bilinen MHC moleküllerini yüksek oranda taşıdıkları saptanmıştır. Buna bağlı olarak olası ASH olarak görülen DH'lerin 1978 yılında T lenfositler ile "karışık lenfosit reaksiyonu" (mixed lymphocyte reaction) yapılarak bu özellikleri doğrulanmıştır. Karışık lenfosit reaksiyonu DH'lerin MHC moleküllerini kullanarak T hücrelerine antijen sunumu

yapabilme ve özgün antijeni tanıyan T hücreleri aktive edebilme yeteneklerini belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. (Steinman et al. 1978)

DH'lerin ilk tanımlanmasından daha öncesi için, bilinen en eski rapor 1868 yılında Alman tıp öğrencisi olan Paul Langerhans tarafından hazırlanmıştır, (Langerhans, 1868). Paul Langerhans epidermiste dendritik uzantılı görünüme sahip hücrelerin var olduğunu bulmuş, fakat o zaman dilimi için dendritik uzantıya sahip olan tek hücre tipi olarak sinir hücresi bilindiği için bu hücrelerin de sinir sistemi hücresi olduğunu düşünmüştür. Langerhans hücrelerinin DH olarak tanımlanması, keşfedilmelerinden uzun zaman sonra gerçekleştirilebilmiştir. Langerhans hücrelerinin genellikle buldukları dokular tarafından farklılaştırılan DH alt tipinden biri olduğu artık bilinmektedir, (Patterson et al. 2002)

Başlangıçta, kanda ve çevresel lenfoid organlarda az miktarda bulunduğu için DH'ler üzerinde çalışma yapmak oldukça zor olmuştur, (Fearnley et al. 1999). DH araştırmaları için en önemli ilerleme, Inaba ve arkadaşları tarafından 1992 yılında, yüksek miktarda DH elde etmeyi sağlayan hücre kültür tekniklerinin geliştirilmiş olmasıdır. (Inaba et al. 1992).

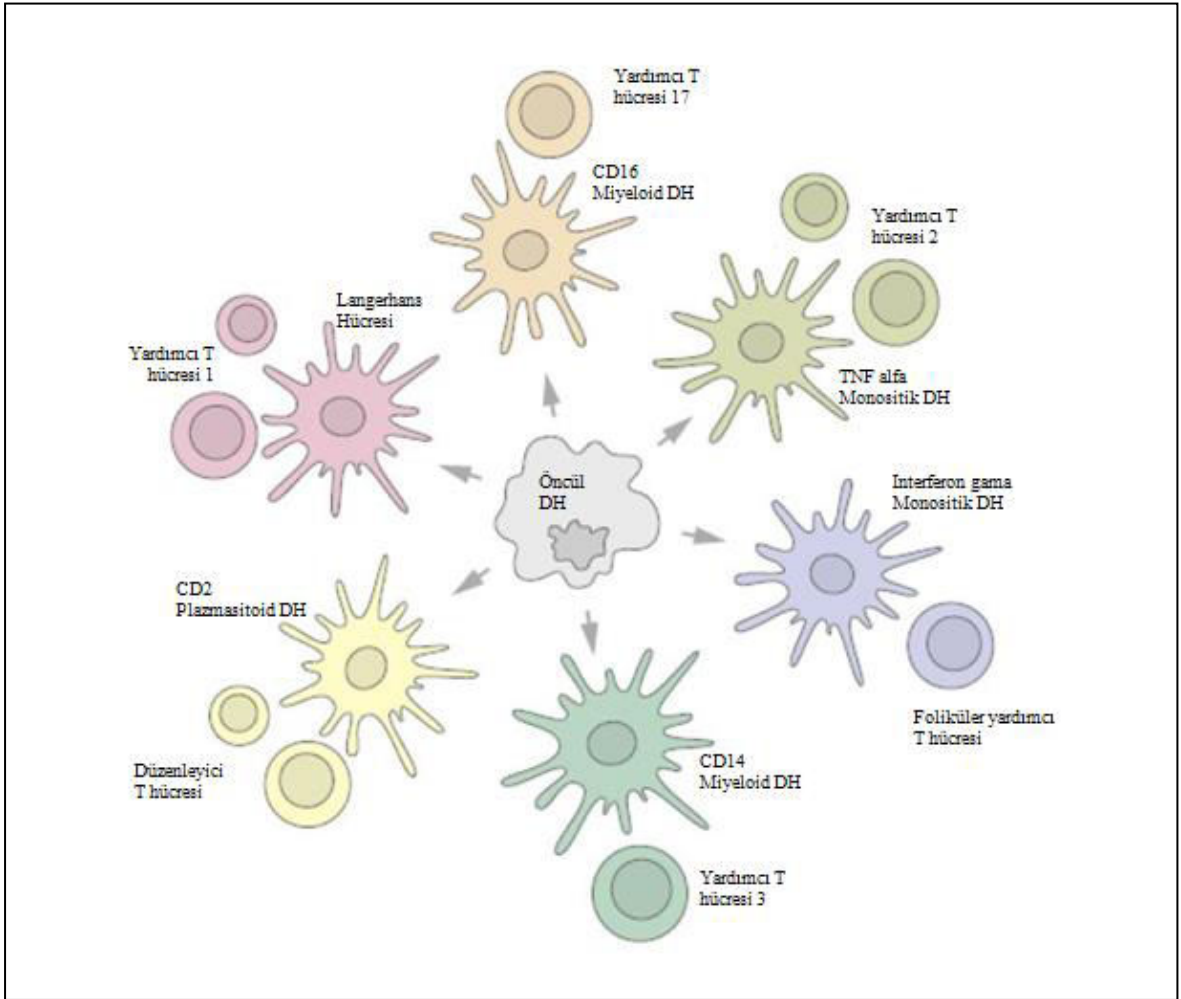
DH'ler makrofaj gibi diğer antijen sunan hücrelerden farklı olarak naif T hücreleri etkinleştirebilen yüksek oranda özelleşmiş ASH'lerdir. DH'ler yabancı antijenlere karşı immune yanıtı başlatabilen ve düzenleyen özel bir yeteneğe sahiptir. DH'ler aynı zamanda vücudun kendi antijenlerine karşı T hücre toleransında da önemli bir role sahip olup böylece otoimmün reaksiyonların indüksiyonunu engellemektedir, (Steinman 1991; Steinman 2003).

DH'ler, kemik iliğinde CD34+ hematopoietik kök hücrelerden köken almaktadır. CD34+ hücreler lenfoid öncül hücreleri (CLP) ve miyeloid öncül hücrelerine (CMP) farklılaşmaktadır, (Liu, 2001). Miyeloid öncül hücrelerinin farklılaşması ile deri dermisinde yerleşik olgunlaşmamış CD11c+/CD1a- DH alt tipi, veya CD11c+/CD1a+ deri epidermisinde yerleşik Langerhans hücreleri oluşmaktadır. Miyeloid öncül hücreleri, DH öncül hücre alternatifi olarak görev yapan monositleri de oluşturmaktadır. Lenfoid öncül hücreleri ise plazmasitoid DH (pDH) alt tipini oluşturmaktadır, (Liu, 2001).

DH'ler oldukça heterojen bir gruptur. Birçok organın bağ dokusunda bulunmaktadırlar. Lenfoid organların T bağımlı bölgelerinde daha boldur. Mononukleer hücrelerin %0.1-1'ni oluşturmaktadır. Deri, burun mukozası, respiratuar sistem ve intestinal sistem gibi genellikle vücudun dışı açılan bölgelerinde yerleşim göstermektedirler (Hoffbrand and Petit, 1994; Ross et al. 2003)

### 2.2.1. Dendritik Hücre Fenotipi, Dağılım ve Alt Çeşitleri

DH'lerin birbirlerinden farklı fenotipik özelliklere, işlevlere ve dokulardaki yerleşimlere sahip olmaları DH'lerin çeşitli tiplerde heterojen bir grup oluşturduğunu göstermektedir. DH'ler hematopoietik kök hücre kökenli lenfoid ve miyeloid öncül hücrelerinden farklılaşmaktadır. Bu serinin ara öncülleri DH'lere farklılaşmanın tamamlanacağı ve potansiyel antijen girişinin olabileceği bölgelere yerleşmektedirler, (Hart 1997; Ueno 2007). Dendritik hücrelerin alt tiplerinin şematize edilmiş hali Şekil 2.3. de görülmektedir.



**Şekil 2.3.** Dendritik hücre alt tipleri ve etkileşimde buldukları T hücre çeşitleri, (Palucka et al. 2010).

Dendritik hücreler Flt3L ve GM-CSF gibi büyüme ve farklılaştırma faktörlerine cevap olarak kemik iliğinde üretilen heterojen bir hücre grubudur. DH'ler insan kanında taşıdıkları CD11, CD123 ve langerin seviyelerine göre miyeloid ve plazmasitoid olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadırlar, (Ovalı, 2007).

Üzerinde en fazla çalışılmış olan miyeloid DH alt tipleri deride bulunan üç tip DH'dir. Bunlardan biri sadece epidermiste yerleşik Langerhan hücreleri ve dermiste CD1a(+) DH'leri ve CD14(+) DH'leri dir. LH'leri ve CD14(+) DH'leri moleküler profillerine göre birbirlerinden ayrılmaktadır, CD14(+) DH'ler IL-12 gibi çözünür faktörleri yüksek oranda üretebilirken LH'leri IL-15'i içeren az sayıda sitokin salgılayabilmektedirler, (Klechevsky et al. 2008)

İntegrin CD11c ve sitokini ve büyüme faktörü GM-CSF için almaç taşıyan kan DH-öncül alt tipleri GM-CSF ve IL-4 etkisi altında konvansiyonel miyeloid DH'lere farklılaşabilmektedir. Miyeloid DH'lerin monosit, makrofaj ve granüositler ile yakından ilişkili olduğu düşünülmektedir. Buna karşılık, CD11(-) DH öncülleri düşük oranda GM-CSF almaç fakat yüksek oranda IL-3 almaç taşımaktadır ve IL-3 - CD40 ligasyonuna cevap vererek olgunlaşarak konvansiyonel olmayan plazmositoid DH'lere farklılaşmaktadırlar, (Grouard 1997; Rissoan 1999). Plazmositoid DH'ler ilk olarak plazma hücresine benzer hücre olarak tanımlanmış ve (Lennert 1958). Plazmasitoid DH'lerin lenfositler ile sıkı bir gelişimsel bağlantıya sahip gibi görünmüştür, (Facchetti 1988; Facchetti 2003; Galy 1995). Kandaki tüm DH alt tiplerini oluşturabilen ortak bir DH öncülünün olduğunu savunan alternatif bir hipotez de bulunmaktadır, (Hoyo 2002). Fakat, genel kanı kan monositlerinin dokular arası hareket ederek bir uyarı ile DH'lere farklılaştığı üzerinedir. Monosit türevli DH (moDH) farklılaşmasını yöneten local mekanizmalar tam olarak açıklanamamıştır, (Randolph 1998). DH farklılaşma faktörü GM-CSF'in endotel hücreleri ve/veya NK ve NKT hücreleri tarafından lokal üretimi, monositlerin DH'lere farklılaşmak üzere uyaran potansiyel mekanizmalardan biridir, (Hegde 2007; Kaushansky 1989; Zhang 2007).

DH'ler genel olarak buldukları dokuya göre sınıflandırılabilir. Patojenlerin vücuda giriş yerleri olan deri, hava yolu ve bağırsak gibi bölgelerde yerleşik durumdadırlar. CD11b<sup>+</sup>CD207<sup>+</sup> LH'leri deriyi gözetim altında tutarken bağırsak içerisinde ise bu görevi, çoğunlukla CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>, CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> ve CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> fenotipik özelliklere sahip konvansiyonel DH alt tipleri üstlenmektedir, (Coomes and Powrie, 2008)

Miyeloid, konvansiyonel ve plazmasitoid DH'ler fenotipik özellikleri, farklı öncüllerden türev almaları ve taşıdıkları TLR tiplerine göre birbirlerinden ayrılmaktadır, (Shortman and Liu, 2002, Jarrossay et al. 2001). Fenotipik olarak pDH'ler genellikle küçük, küresel ve plazma hücresine benzer özelliktedir, konvansiyonel DH'ler ise bir çok sitoplazmik

çıkıntıya sahip olmaları ile karakterizedir. Miyeloid DH'ler miyeloid seriden pDH'ler ise lenfoid seriden köken alırlar, (Shortman an Liu, 2002)

Yapılan çalışmalar daha çok kemik iliği kaynaklı DH'ler (KiDH) üzerine odaklanmıştır. Kemik iliğinde bulunan CD34(+) miyeloid seri hücreleri GM-CSF ile uyarılırken diğer lökosit serileri bu uyarıdan etkilenmemektedir. Makrofajlar da GM-CSF uyarısı ile yüksek oranda üretilebilen hücrelerdir ve güçlü yapışan özellikleri sayesinde DH'lerden kolayca ayırt edilebilmektedirler. DH'ler düşük oranda yapışan hücrelerdir. KiDH'leri kolay elde edilebildikleri ve kültüre edildikleri için çalışmalarda tercih edilmektedirler. Fakat, dalak, lenf düğümü yada çevre dokulardan elde edilen DH'ler ile KiDH'leri arasında farklar bulunmaktadır. (Barchet et al. 2005)

Plazmasitoid DH'lerin öncelikli olarak doğal bağışıklık sistemi içerisinde görev almaktadırlar ve elde edilmeleri miyeloid DH'lerine göre çok daha zordur. Daha etkili anti-kanser tedavisi ve DH bazlı kanser aşısı gibi DH uygulamalarının geliştirilmesine yönelik edinsel bağışıklık sistemi prensipleri üzerinden çalışmak daha yararlıdır, bu anlamda pDH'leri ile yapılan çalışma sayısı oldukça düşüktür, (Barchet et al. 2005)

Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalara göre, moDH'ler DH ağının gerçek bileşenleri olarak tanımlanmaktadır fakat sadece inflamasyon olan bölgelerde görülmektedir, (Tacke 2006; Trapani 2002). Böylece, moDH'lerin diğer DH alt tiplerinin etkili olamadığı enfeksiyon olgularında immün yanıtı etkili bir biçimde yöneterek iltihaplanmada önemli bir role sahip olduğu ortaya çıkmaktadır. Yapılan çalışmalar ile monositlerin enfeksiyon bölgesine yüksek oranda akış gösterdiği ve lenf düğümlerine sızdıkları gösterilmiştir. Bu bölgelere yerleşen monositlerin moDH'lere farklılaştığı ve ardından enfeksiyon bölgesinden lenf düğümlerine göç ettikleri kanıtlanmıştır. Tüm bunlar göz önünde bulundurularak moDH'lerin DH topluluğu içerisinde antijen sunabilen ve koruyucu bir bağışık yanıt sağlayacak antijen özgün T hücreler oluşturabilen DH tipi olduğu ortaya koyulmuştur, (Leon, 2007).

DH'ler insan vücudunun neredeyse tüm doku ve organlarında bulunmaktadır. İnsan vücudu DH ağı heterojendir ve farklı insan dokularından ve lenflerden izole edilmiş DH'ler ile ilgili sınırlı sayıda veri bulunmaktadır, (Bendriss, Vermare et al., 2001).

Kan dolaşımı DH'leri: Kemik iliğinden çevresel dokulara geçişte gelişmekte olan heterojen DH topluluğudur. İnsan kanında çeşitli tiplerde DH tipleri tanımlanmıştır, CD34(+), CD16(+), BDCA1 (+), BDCA3 (+) ve CD123(+) plazmasitoid DH'leri olarak en az beş alt tip sayılabilmektedir, (MacDonald et al., 2002b).



**Langerhans Hücreleri (LH):** Oral, nazal ve pulmoner epitelinin bazal tabakasının üzeri ve deri epidermisinde yerleşiktir. Kendilerine özel sitopilazmik organel olan Birbeck granüllerinin varlığıyla karakterizedirler, (Valladeau et al., 2000). LH'leri dokuda yerleşik olmaları ile karakterizedir, (MacDonald et al., 2002b). Periferden vücudun kendi antiijenleri ve yabancı antiijenleri içeren antiijenleri yakalayarak lenf düğümlerine göç etmek ve T hücrelerine antiijen sunmak üzere özelleşmiş hücrelerdir, (Romani et al., 2003). LH'leri E-kadherin, CD1a, CD68, ve CD11b, CD11c ve CD33 gibi ortak miyeloid antiijenlerini taşımaktadır. LH'leri yabancı antiijenlerin endositozu için çeşitli almaçlar kullanabilmektedir, (Girolomoni et al., 2002). *Candida-Albicans* ile enfekte deri dermisinde LH sayısının normal deriye kıyasla arttığı saptanmıştır bu durum LH'lerinin antiijenleri özgün olarak tanıdığını göstermektedir, (Katou et al., 2000).

**İnterstisyel DH'ler:** Tüm olgunlaşmamış DH'leri kapsamaktadır ve kalp, karaciğer, akciğer, bağırsak ve diğer mukozal yüzeyler gibi hayati önem taşıyan organ ve dokuların interstisyel boşluklarında bulunmaktadır. Birçok farklı interstisyel hücre tanımlanmış ve halen tek bir hücre serisi veya birçok farklı seriyi mi temsil ettiği bilinmemektedir. Dermal interstisyel DH'ler ile LH'leri CD11c ve CD33 gibi birçok miyeloid fenotipik belirteci paylaşmaktadır. Fakat aralarında birçok fonksiyonel ve fenotipik farklılık olduğu tanımlanmıştır. Bunlardan biri dermal interstisyel DH'lerin LH'lerinin aksine DH'lere özgün interselüler yapışma molekülü taşıyor olmasıdır, (Ebner et al., 2004). Ayrıca hematopoietik öncül hücre türevli dermal interstisyel DH'lerin doğrudan olarak NK hücre çoğalmasını ve sitotoksitesini uyarırken LH'leri bunu yapabilmek için dışarıdan IL-2 ve IL-12'ye gereksinim duymaktadır, (Munz et al., 2004). Bir diğer fark ise LH'lerinin viral antiijenlere karşı sitolitik T lenfosit aktivitesini dermal interstisyel DH'lerine kıyasla çok daha yüksek oranda uyarmasıdır, (Ratzinger et al., 2004)

**Kapalı DH'ler:** Antiijeni periferden lenf düğümlerine taşıyan, getirici lenfatiklerin arasında yer almaktadırlar, (Moser , 2003). Kağıt şeklinde LH ve interstisyel DH'ler gibi heterojen bir hücre grubunu temsil ederler.

**Plazmasitoid DH'ler:** (pDH) Fenotip ve işlevine bağlı olarak CD11c(-) DH'ler, doğal interferon üreten hücreler, DH2 ve plazmasitoid monosit/T hücre gibi çeşitli isimlendirmelere sahip DH alt birimidir, (Briere et al., 2002). pDH'ler seyrek sayıdadır ve sadece normal derinin epidermis bazal zarında en fazla beş hücrelik grup olarak olgunlaşmamış halde bulunmaktadır, (Ebner et al., 2004). Kandaki DH'lerin toplamının yaklaşık %20'sini tonsillerdeki DH'lerin ise %50'sini oluşturmaktadırlar. Uyarılmamış ve

kan ya da tonsillerden taze olarak izole edilmiş pDH'lerin morfolojileri miyeloid DH'lerden se lenfositlere daha çok benzemektedir. İzolasyonlarını kolaylaştıran iki adet pDH'ye özel belirteç tanımlanmıştır, c-tip lektin ve antijen almaç BDCA2 ve BDCA4 (Dzionic et al., 2000; Dzionic et al., 2002). Viral uyarılara karşı kan miyeloid DH'lerin aksine pDH'leri yüksek miktarda interferon alfa ve interferon beta üretmektedirler, (Cella et al., 1999; Siegal et al., 1999). Miyeloid DH'ler ile kıyaslandığında, pDH'ler farklı almaçalmaçları (TLR – Tool Like Receptor) taşıdıkları için miyeloid DH'lerin sahip olamadığı, farklı çeşitlerdeki mikrobiyal bileşenlere karşı uzman hücre olma özelliğini kazanmışlardır, (Briere et al., 2002). Miyeloid DH'ler TLR1, 2, 3, 4, 6, 7 ve 8'i pDH'ler ise TLR1, 6, 7, 9, ve 10'u taşımaktadırlar. Kültür şartlarında IL-3 ile uyarılmadıkları takdirde ani bir biçimde ölümleri gerçekleşmektedir. Lateks boncuklarını fagositozu ve FITC (fluoresan izotiyosiyonat ) - dekstran endositozunu düşük oranda gerçekleştirebilmektedirler, (Grouard et al., 1997). Uyarıya bağlı olarak pDH'ler, efektör yardımcı T hücreleri 1 ve 2 cevabına karşı naif T hücre cevabını hazırlamaktadır, (Cella et al., 2000; Rissoan et al., 1999). Çeşitli fenotipik özelliklerin varlığı ve farklı uyarılma kapasiteleri sebebiyle, pDH'lerin periferik kandan lenfoid ve miyeloid benzeri plazmositoid hücre alt fraksiyonlara ayrılabilceği ortaya çıkmaktadır, (Comeau et al., 2002)

**İnterdigitating DH'ler (iDH):** Özellikle timusta yer almaktadırlar. Lenf nodunun T- hücre zonunda bulunmaktadırlar. T-hücelere antijen sunmaktadırlar.

İkincil lenfoid organların T hücre bölgelerinde yer almaktadırlar, (Steinman et al., 1997). CCR7 taşıdıkları için iDH'lerin bir kısmı DH'ler tarafından üretilen CCL19 ve yüksek endotel venül hücrelerinin taşıdığı CCL21 kemokinlerine cevap vererek T hücre bölgesinde toplanabilmektedirler, (Cyster, 1999). İmmunohistolojik analizler dendritik hücre lizozomal ilişkili membran proteini (DC-LAMP)'in iDH için özel bir belirteç olduğunu göstermiştir. Tonsiler dokuda, HLA-DR, CD11c, CD123 ve CD13 taşımalarına göre farklı fenotiplerde dört ayrı topluluk tanımlanmıştır, (Summers et al., 2001).

Deriye temas eden antijeni alan Langerhans hücreleri dermal lenfatikler yoluyla bölgesel lenf nodlarının T hücre zonlarına geçerek antijeni interdigitating hücre vasıtasıyla T hücrelerine sunmaktadırlar. İnterdigitating hücreler immün işaretlemeye CD1a ile boyanmaktadırlar (Paraskevas, 2004)

**Germinal Merkez DH'leri (GMDH):** Foliküler dendritik hücreler dışında B hücre folikülünde bulunan tek DH alt tipidir. 1996 yılında CD11(+) hücreler olarak

tanımlamaları yapılmıştır, (Grouard et al., 1996). GMDH'lerin T hücreleri uyarma kapasiteleri oldukça yüksektir ve CD71(+) makrofajları ve CD40(+) iDH'lerinden ayrılabilirler. Bu hücre alt tipinin B hücre farklılaşmasını yönetmektedir, (Dubois et al., 1999). Akım sitometri ile ayrıştırmada CD40 azaltılması ile CD4(+),CD11c(+),CD3(-), CD20(-),CD1a(-), profili kullanılmaktadır. Bu izolasyon prosedürü GMDH'lerin iDH'ler ile benzer oranda CD40 taşımalarından dolayı, tonsillerde miyeloid DH'lerin zenginleşmesine sebep olabilmektedir, (Summers et al., 2001). İmmunohistolojik olarak GMDH'lere özgül bir belirteç henüz belirlenmemiştir, bu nedenle GMDH'lerin germinal merkezde ayrı bir DH alt tipi olduğuna dair düşük kanıtlar bulunmaktadır, (Lindhout et al., 2001; Summers et al., 2001).

**Foliküler DH'ler (FDH):** Bellek B hücre farklılaşması, sürekliliği ve seçilimi üzerine etkilerine ek olarak germinal merkez oluşumunda önemli bir role sahip olduğuna inanılmaktadır, (van Nierop and de Groot, 2002). Bu hücreler bağ dokunun stromal hücreleridir ve mezenkimal öncüllerinden köken aldıkları rapor edilmiştir. Antijenleri işlemez ve varolan antijenik peptitleri MHC sınıf II molekülleri ile T hücrelerine sunmamaktadırlar. Yüzeylerinde immün yanıtın düzenlenmesi için önemli role sahip olan, B hücreleri tarafından üretildiği düşünülen, MHC sınıf II mikrokesecekler taşımaktadırlar, (Denzer et al., 2000). Komplement almaçları olan uzun sitoplazmik uzantıları ile foliküller arasında geniş bir ağ oluşturmaktadırlar, (van Nierop and de Groot, 2002).

Bu hücreler, sadece primer ve sekonder lenfoid folliküllerde bulunmaktadır. Kemik iliğinden türemez, antijen sunamaz, endositoz yapamaz ve fagositik aktiviteleri bulunmamaktadır. Bununla birlikte, antijeni yakalamada ve antikor ile birleşmesinde oldukça etkindirler. Bu hücreler IgG için Fc almaçları taşımaktadır. Bu mekanizma makrofajların antijen-antikor mekanizmasına benzemekle beraber, antijen endositozla alınmamaktadır. Sitoplazmik uzantılar arasında yüzeyde kalmaktadırlar. Folliküler dentritik hücreler antijen sunan hücreler değildir. Zira yüzeyinde MHC class II antijeni yoktur. CD45 taşımazlar; CD21 ve CD35 ise pozitifdir. Bu hücreler antijenleri yüzey membranlarında uzun bir süre (haftalar ve aylar) tutarlar ve B hücreleri tarafından bu antijenler tanınır ve böylece immünolojik hafızanın devamına katkıda bulunmaktadırlar. Asit fosfataz ve nonözgün esteraz ile boyanmamaktadırlar. İmmün işaretlemede Folliküler dendritik hücre CD1a (-) izlenmektedir, (Lehrer 2001; Paraskevas 2004).

### **2.2.2. Dendritik Hücrelerin Morfolojisi**

DH'ler şişkinlik, psödopod ve lamellipodia gibi uzantılara ve çıkıntılara sahip düzensiz bir şekle sahiptir. Oval şeklinde hücre çekirdekleri bulunmaktadır. Sitoplazmalarında birçok oval mitokondri, otofagozom ve iyi gelişmiş endoplazmik retikulum yer almaktadır, (Ovalı, 2007).

### **2.2.3. Dendritik Hücrelerin İşlevsel Özellikleri**

DH'ler işlevlerine göre üç ayrı kategoriye ayrılabilirler. İlk kategoriye antijen sunumu ve T hücreleri aktive etme özellikleri oluşturmaktadır. İnflamasyon oluşması halinde DH'ler bu bölgeye çekilerek antijenleri yakalar, hücre içinde işlemek ve T hücrelerine sunmak üzere uyarılmaktadırlar, (Ovalı, 2007).

DH işlevlerinden ikinci kategori çok iyi şekilde bilinmemektedir fakat bazı DH alt sınıflarının immun toleransı indüklediği ve devamlılığını sağladığı ileri sürülmüştür. DH'ler T hücreler için timusta meydana gelen merkezi toleransda önemli bir role sahiptir. Kendi peptitlerini taşıyan DH'lere yanıt veren T hücreler timus içerisinde negatif seleksiyon sonucu ortadan kaldırılmaktadırlar. DH'lerin çevresel toleransda da önemli bir yeri vardır. İmmatür DH'ler CD4+ ve CD8+ T hücrelerinde anerjiyi de uyarabilmekte ve bu yolla düzenleyici T hücreleri aktive etmektedirler. Karşılıklı olarak düzenleyici T hücreler ise DH gelişimini etkileyebilme, maturasyonu önleyebilme ve bağışıklık baskılayıcı molekülleri indükleyebilme özelliklerine sahiptir. Tüm bu veriler tolerans mekanizmasının DH ve düzenleyici T hücreler arasında karşılıklı bir iletişim ile desteklendiğini ortaya koymaktadır, (Ovalı, 2007).

DH'ler lenf nodlarının T hücre bölgelerinde ve jerminal merkezlerde B hücreleri uyarabilmektedirler. Foliküler DH'ler B hücre belleğinin devamlılığında önemli bir yere sahip olduğu düşünülmektedir. Yabancı antijenlere karşı antikor cevabının başlamasının ardından foliküler DH'ler, B hücrelerine devamlı uyarılmanın kaynağı olarak işlev görmektedir, (Ovalı, 2007).

### **2.2.4. Dendritik Hücrelerin Bağışıklık Sistemindeki Rolü ve Yaşam Döngüsü**

DH'ler vücudun değişik bölgelerinde bağışıklık sisteminin nöbetçileri olarak görev alırlar ve dokularda olgunlaşmamış formda durağan bir biçimde bekleme halindedirler. DH maturasyonu imDH'nin tehlike sinyali almasıyla başlayan bir farklılaşma süreci sonunda gerçekleşmektedir. Nükleotidler, interferon, ürik asit, bradikinin, ısı-şok proteinleri, reaktif oksijen ara ürünleri ve yıkılmış ekstraselüler matriks bileşenlerini içeren bu sinyaller genellikle stres altındaki bölgesel hücreler tarafından oluşturulmaktadır, (Shi et al. 2003;

aliberti et al. 2003; Gallucci and Matzinger, 2001). Bunun yanı sıra DH'ler bakteri kaynaklı lipopolisakkarit veya DH üzerindeki TLR'lere bağlanan patojen-ilişkili moleküler modeller gibi bir patojenden direk olarak gelen tehlike sinyallerine karşı da duyarlıdır. DH'ler bu tehlike sinyallerini aldıklarında antijen alımı düşerken MHC ekspresyonu ve CD86, CD80, CD83 kostimulatuar faktörleri yukarı doğru düzenlenmektedir, (Banchereau and Steinman 1998).

DH'ler maturasyon durumlarına bağlı olarak kemokin ekspresyonunu da düzenlemektedirler. moDH öncülleri kanda dolaşmakta ve çevresel dokulara geçmektedirler, (Randolph et al. 2005). Çevresel dokudaki iDH'ler inflamatuvar kemokinlerine cevap veren ve DH'lerin inflamatuvar uyarıya ve peripheral dokusuna doğru migrasyonu yönetmeyi sağlayan çeşitli kemokin almaçları ifade etmeye devam etmektedirler. Kendilerine özel olarak imDH'ler CXCR3 ve CXCR4'ün yanı sıra CCR1'den CCR6'ya kadar kemokin almaçlarını da taşımaktadırlar, (Sozzani et al. 1998). Tehlike sinyallerine maruz kalan DH'ler CXCR4 hariç birçok kemokin almaçını aşağı doğru düzenlemekte bunun yanı sıra bir inflamatuvar almaç olan CCR7'yi ise yukarı doğru düzenlemektedir, (Sozzani et al. 1998; Yanagihara et al. 1998). CXCR4 kemokin almaçının görevi tam olarak açıklanamamıştır, fakat CCR7, DH'lerin yüksek seviyede CCR7 ligandları CCL19 ve CCL21'in ifade edildiği çevresel lenfoid organlara migrasyonunu kontrol etmektedir, (Luther et al. 2002).

Bağışıklık sisteminin organizasyonu etkin bir gözetim ve korunma için hedeflenen hücre cevabını kolaylaştırmaktadır. Bu verimi elde etmede bağışıklık sistem hücrelerinin kan dolaşımı, dokular ve çevresel lenfoid organlar arasında hareket halinde olmasının önemi büyüktür. DH'ler kemokin almaçlarını düzenleyerek dokuya özgüllük elde ederler. DH'ler matur hale geçtikten sonra yüksek oranda hareketlidir ve çevresel lenfoid organlara göç etmektedirler. DH'lerin çevresel lenfoid organlara göçü işlevleri için oldukça önemlidir. İkincil lenfoid organa ulaşan DH'ler edinsel bağışıklığı düzenleyen uzman hücreler haline gelirler, (Banchereau and Steinman 1998). DH'ler, antijenleri T hücrelerine sunmak üzere işlemeleri ve yüksek seviyede kostimulatuar faktörleri taşıyarak T hücre aktivasyonunun ince ayarını yapabildikleri için bağışıklık sisteminin en etkin ASH'leri olarak bilinmektedirler, (Randolph et al. 2005).

Hematopoez sürecinde DH üretimi antijenden bağımsız olarak gerçekleşmektedir (Liu, 2001). Çeşitli DH öncülleri kemik iliğinden seyrek bir topluluk oluşturdukları kan dolaşımına geçmektedir. Transendotelyal geçiş ve imDH'lerin çevresel dokularda

toplanması bazı inflamatuvar etkenlerin ekspresyonuyla yönetilmektedirler. Lenfoid olmayan dokularda bulunan DH'lerin seçici göçünde etkili olan kemotaktik faktörler arasında platelet aktive edici faktör (PAF), N-Formil-L-metionil-L-lösil-L-fenilalanin (fMLP) ve C5aSozzani et al., 1997), makrofaj inflamatuvar protein 3 alfa (MIP-3 alfa),  $\beta$ -defensin, CCR6 ve CCL22 sayılabilir. İnflamatuvar sinyallerin bulunmadığı durumlarda periferde bulunan DH'ler sessiz halde bulunmaktadır. Durağan durumdayken LH'leri deride aylarca kalabilmektedirler. İnflamatuvar sinyaller LH'lerinin lenf düğümlerine göçünü ve dolaşıma yeni LH öncül hücrelerinin salınımını sağlamaktadır. Bu sürecin gerçekleşebilmesi için deride CCR2- bağlayıcı kemokinlerinin salgılanması gerekmektedir, (Merad et al., 2002)

Antijen alımı, C-tip lektin ailesinden DEC205, DC-SIGN, Dectin-2 mannoz almaçı ve FcRS gibi birçok özelleşmiş almaç vasıtasıyla pinositoz, fagositoz veya almaç aracılı endositoz ile gerçekleşmektedir, (Figdor et al., 2002) (Moser et al., 2002). İm DH'ler çevresel dokularda yerleşmelerini veya inflamasyon bölgesine göçleri için kullandıkları CCR1, CCR2, CCR5, CCR6 VE CXCR1 gibi kemokin almaçlarını taşımaktadırlar. DH'ler antijenik özelliğe bağlı olarak, maturasyon sürecini başlatabilir ve bunun doğal bir sonucu olarak lenf düğümlerine göç edebilmektedirler. DH'lerin tam olarak işlevsel özellikleri maturasyon sırasında oluşur ve endositozik hücre profilinden MHC moleküllerini taşıyan profesyonel antijen sunan hücre profiline geçmektedirler, (Sallusto and Lanzavecchia, 2000; Steinman, 2003).

DH'lerin lenfatik damarlara girişi için gerekli olan almaç CCR7 kemokin almaçtır, (Ohl et al. 2004). Periferde bulunan DH'lerin bakteri ya da viral ürünler gibi tehlikeli sinyalleri ile aktivasyonu ve maturasyonu bölgesel lenf düğümlerinde bağışıklığı uyarır, (Hawiger et al. 2001)

DH'lerin çevresel dokulardan lenf düğümlerine geçiş için kullandıkları göç mekanizması sadece maturasyon durumuyla ilgili değil aynı zamanda özelleşmiş DH alt tiplerine de bağlıdır. CXCL9 ve E-selektine bağlı yolla, pDH'leri getirici lenfatik veya direkt olarak yüksek endotelial venülleri kullanarak lenf düğümlerine girebilmektedirler, (Yoneyama et al., 2004). Buna karşılık, ne imDH nede matur miyeloid DH'ler lenf düğümlerine girerken yüksek endotelial venülleri kullanamaz. CCR7'ye ek olarak, LH'leri için osteopontin gibi bazı kemotaktik düzenleyicileri de DH'lerin lenf düğümlerine girişini kontrol etmektedir. (Weiss et al., 2001). Monositten farklılaşmış DH'ler deriden lenf düğümlerine geçerken CCR7 ve CCR8 yollarını kullanmaktadır, (Qu et al., 2004).

Deride CXCL5 ifade eden DH'ler öncelikli olarak fDH'lerin CXCL13 ligandı ifade ettikleri B hücre bölegelrine göç etmektedirler, (Saeki et al., 2000; Wu and Hwang, 2002). CCL21 kemokini, her ikisi de CCR7 almaçı taşıyan naif T hücrelerinin ve antijen ile uyarılmış DH'lerin çevresel lenfoid organlardaki T hücre bölgesine girişini yönetmektedir, (Gunn et al., 1999). Lenf düğümü içersindeki T hücre bölgesinde bulunan DH'ler naif CCR7(+)/CD4(+) T hücreleri için güçlü bir kemotaktik olan CCL19 üretmektedirler, (Ngo et al., 1998).

Dokulardan lenf düğümlerine gelen matur DH'lerin yüksek seviyede antijen özgün T hücre teması sağlamak için, durağan haldeki DH'lere göre çok daha hareketli olduğu düşünülmektedir, (Lindquist et al., 2004). DH'lerin saatte 5000 T hücre ile temasa geçtiği tahmin edilmektedir, (Miller et al., 2004a).

DH'lerin antijen özgün T hücrelerine temas ederek görevini tam olarak yerine getirdikten sonra lenfoid dokularda apoptoza uğradıklarına inanılmaktadır, (Matsue and Takashima, 1999). Bu durum T hücreler için antijen ulaşabilirliğini sınırlı kılarak, immün yanıt indüksiyonunun kontrol edilmesini sağlamaktadır. Lenf düğümlerindeki DH işlevi iki yolla kontrol edilir, bunlar Bcl-XI'i içeren yaşam yolağı ve apoptotik faktör Bcl-2 üzerindeki moleküler zamanlayıcıya bağlı yolağıdır. BCl-XL bağımlı yaşam yolağı edinsel ve doğal bağışıklık sisteminin bileşenlerinin uyarısından 24 saat sonra aktifleşirken, Bcl-2 bağımlı yolak sadece doğal bağışıklık bileşenleri tarafından uyarılmayı takiben yaklaşık üç veya 4 gün gibi daha uzun bir zaman sonrası aktif hale gelir, (Hou and Van Parijs, 2004).

### **2.2.5. İmmatur DH'ler (imDH)**

Dokuya vardıklarında DH'ler olgunlaşmamış haldedirler ve fagositik davranış gösterirler. Dokuda antijenleri toplayan imDH'ler antijeni T hücreye sunmak üzere hücre zarı yüzeyine çıkarır. DH'ler antijen işlemesine ek olarak yüzeylerinde bulunan almaçlar sayesinde dokuda bulunabilecek çeşitli sinyallere algılayabilir durumdadırlar. Bu almaçlar tehlike sinyalleri ve apoptotik doku hücreleri tarafından üretilen güvenlik sinyallerine karşı hassastır, (Lutz and Schuler, 2002). DH'ler dokulardaki inflamasyon seviyesine karşı da hassastır. Farklı sinyallerin konsantrasyonu ve gücü imDH'lerin farklılaşmasının son durumunu belirlemektedir. Uyarı alınması ile imDH'lerin işlev, morfoloji ve davranışları değişmektedir. Gerekli sitokin uyarılarını almadığı sürece imDH'ler T hücrelerine antijen sunumunu yapamaz ve T hücre aktivasyonunu gerçekleştirememektedir, (Sporri and Caetano, 2005)

### **2.2.6. Matur DH'ler**

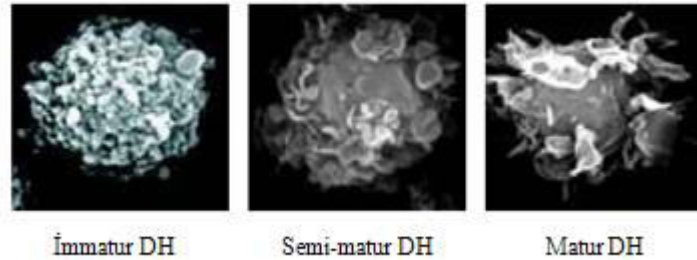
Antijen sunabilen ve T hücreleri uyarabilen DH'lerdir. İmmatur DH'nin matur hale

gelmesi için tehlike sinyalleri ile uyarılması gerekmektedir. DH'ler tehlike sinyallerinin etkisi ile antijen toplar ve lenf düğümüne ulaşmaktadırlar. Lenf düğümlerinde yüksek miktarda T hücre bulunması başarılı bir DH ve T hücre eşleşmesini kolaylaştırmaktadır. Göç sırasında olgunlaşmamış DH'lerin morfolojileri değişerek daha geniş yüzey alanına sahip olmalarını sağlayan sitoplazmik çıkıntılara sahip olurlar. Bu da T hücreler ile bağlanmalarını kolaylaştıran bir diğer etkidir, (Mosmann and Livingstone, 2004). Ayrıca matur DH'lerin en önemli özellikleri T hücre aktivasyonunu uyaran, inflamatuvar bir sitokin olan IL-12'yi üretmeleridir. Matur DH'ler antijen sunumunun gerçekleşmesini sağlayan bir diğer faktör olan kositimulatuvar molekülleri de üretebilmektedirler, (Medzhitov and Janeway, 2002).

### 2.2.7. Semi-Matur DH'ler

Apoptotik şartlar altında, güvenlik sinyallere maruz kalan olgunlaşmamış DH'ler semi-matur DH'lere dönüşmektedirler. Morfolojik olarak matur DH'lere çok benzerler, antijen sunabilme yeteneğine de sahiptirler fakat T hücreleri uyaramamaktadırlar. Olgun DH'lerin ürettiği gibi IL-12 üretmek yerine güvenlik sinyallerinin alınmasından sorumlu IL-10 sitokinini üretmektedirler. IL-10, sunulan antijen ile eşleşmiş T hücreleri baskılama etkisine sahiptir. Güvenlik sinyalleri ile toplanmış antijenler toleransı olarak sunuldukları için T hücreleri tarafından bu antijenlere cevapsızlık sağlanmış olur. Bu mekanizma antijenlere karşı aşırı reaksiyonu durdurmak için gelişmiş doğal bir mekanizmadır, (Williams et al. 2007).

İmmatur, semi-matur ve matur DH'lerin mikroskopik görüntüleri şekil 2.4 de görülmektedir.



Şekil 2.4. İmmatur, semi-matur ve matur DH mikroskopik görüntüsü. (Greensmith, 2007)

### 2.2.8. Antijen Sunumu

Organizmaya herhangi bir yoldan bir antijen girdiği zaman bu antijen ilk olarak antijen sunan hücreler tarafından karşılanırlar. Başka bir deyişle, antijenlerin çoğu direkt



olarak lenfositleri uyarmamaktadır. Bu hücreler, antijeni kendi içlerinde belirli oranda sindirip saklar ve daha sonra, azar azar ancak sürekli olarak ya B ya da T lenfositlere sunmaktadırlar. Antijenin kısmi bir lizozomal sindirime tabi tutulduğu ve kısmen sindirilmiş olan bu antijenin çok özel bir bölümünün hücre zarına gönderildiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir, (Karaöz, 2001)

### **2.2.9. Antijenin İşleme Girmesi**

Antijenin işleme girmesi özellikle protein yapısındaki antijenler için geçerlidir. Antijenler fagositoz ya da almaç bağımlı endositoz yolu ile hücre içine alınır ve burada sunulmak üzere işlenmektedir, (Ovalı, 2007). İmmün yanıtta T-hücre gereksinimi olan antijenlerin ASH'de işleme girmeleri ve hücre yüzeyinde MHC antijenleriyle sunulmaları gereklidir. B-hücrelerinde protein dışı antijenlere karşı immün yanıt oluşunda bu tür işleme gerek yoktur. B hücre almaçlarına serbest olarak bağlanan bu tür antijenler yeterli uyarım yapabilirlerse immün yanıt oluşturmaktadırlar.

ASH'lerde antijenin işlenmesi endojen antijenlerin işlenmesi ve ekzojen antijenlerin işlenmesi şeklinde iki türlü olur, (Karaöz, 2001).

### **2.2.10. Endojen antijenlerin işlenmesi**

Endojen antijenler, hücre içinde sentezlenen virus antijenleri ve tümör antijenleridir, (Karaöz, 2001). Endojen antijenler proteozom içerisinde parçalanarak ve endoplazmik retikulum içerisine girmektedirler. Peptit yapıları burada yeni sentezlenmiş sınıf I doku uygunluk kompleks (Histocompatibility complex MHC) moleküllerine bağlanmaktadır. Oluşan bu yeni yapı CD8+ T hücrelerine sunulmak üzere plazma zarına geçmektedir, (Ovalı, 2007).

### **2.2.11. Ekzojen antijenlerin işlenmesi**

Yabancı protein yapısındaki antijen, kısa süre içinde ASH'lere bağlanarak fagositoz yolu ile hücre içine alınmaktadır. Çözünür haldeki protein antijenleri pinositozis ile hücreye girmektedir. Bu içeri alınan antijenler endozom adı verilen zara bağlı kesecikler içinde kalmaktadırlar. İşleme girme olayı, en az bir veya üç saat süren kimyasal bir olaydır. Bu işlem asit pH'daki intrasellüler kesecik içinde olur. İşleme giren protein antijeni endozom keseciğinde kalır, MHC sınıf II molekülü de sentezlenmiş olarak post Golgi keseciklerinde bulunmaktadır, (Karaöz, 2001)

Sonuçta, her iki kesecik birleşerek ve endozom keseciklerindeki peptit parçacıkları MHC sınıf II moleküllerine non- kovalent bağlar ile bağlanmaktadır. Daha sonra, birleşme sonucunda oluşan yeni kesecik hücre yüzeyine doğru geç ederek, plazma zarında antijen

parçacığı MHC sınıf II molekülünün  $\alpha$ - $\beta$  dimerleri arasında oluşan oluğa yerleşmiş olarak CD4+ T hücrelerine sunulmaktadır. Hücre içinde sentezlenen antijen ile dışarıdan hücreye giren antijenin hücre içindeki lokalizasyonu farklıdır. Endojen sentezlenen antijen asitik endozomlarda işleme girerken, ekzojen antijenin işleme girmesi, asitik endozomlarda gerçekleşmektedir, (Karaöz, 2001)

### **2.2.12. İmmunoterapi ve Dendritik Hücreler**

Bağışıklık sistemi, kansere karşı savunmada önemli bir rol oynar. Bağışıklık sistemi hücreleri mutasyona uğramış hücreleri saptamak için sürekli olarak vücutta dolaşmaktadır. Bir anormallik veya tümör ile karşılaşma durumunda bağışıklık sistemi kötü huylu hücreleri genellikle yok etmektedir, (Euvrard,2008). Bu nedenle, bağışıklık baskılayıcı ilaç kullanan hastalarda kanser sıklığı artış göstermektedir. Fakat bağışıklık sistemini engelleyen tek şey ilaçlar değildir. Birtakım kanser türleri kendilerini bağışıklık sisteminden kaçırabilme yeteneğine sahiptir. Diğer bazı türler ise bağışıklık baskılayıcı ürünler salgılayarak kanser hücrelerini öldüren bağışıklık sistem hücrelerini susturabilmektedir. Sonuç olarak, malign hücreler bağışıklık sisteminden kaçarak tümör dokularını oluşturabilmektedir, (Fraser et al. 2003; Kim et al. 2007). Baskılanmış olan bağışıklık sistemini yeniden uyararak kalan kanser hücrelerini yok edebilecek bir tedavi yöntemi geliştirmek için birçok girişimde bulunulmuştur, (Rolinski and Hus, 2010)

Hastaların kendi bağışıklık yanıtını yöneterek, kanserin önlenmesi veya mücadele edilmesi temeline dayalı tedavi yöntemi olan aşı tedavisi uzun zamandan bu yana aşı kullanımı ile uygulanmaktadır. Aşı uygulamasının arkasında yatan biyolojik prensip aşının hastalığa neden olan molekülün benzerini içermesidir. Böylece, aşı bağışıklık sistemi hücrelerini bu antijenik yapıyı yabancı olarak algulamaları için eğitmektedir. Sonuç olarak, eğitilmiş hücreler antijen ile bir sonraki karşılaşmalarında bu antijeni taşıyan hücreleri vücuttan temizlemek üzere saldırı başlatmaktadır, (Kindt et al. 2007). Çiçek hastalığı, grip ve çocuk felci gibi birçok hastalıkla mücadele etmek için geliştirilen koruyucu ve tedavi edici aşılarda, bulaşıcı hastalıklara karşı aşı tedavisinin başarısını göstermiştir. Fakat enfeksiyöz olmayan hastalıklarda bu ilerleme henüz istenilen düzeyde değildir. (Kalinski and Okada, 2010)

DH'lerin uyku halinde T hücrelerini aktive etme potansiyelleri kanser gibi durumlarda aşı tedavisinde kullanılabilir. Bu durumda DH'ler tümöre özgül antijenler tarafından duyarlılaştırılarak duyarlı DH'ler kanser hastasına infüze edilmekte ve T hücreleri özgün olarak aktive edilmektedir. Bu şekilde tümör hücreleri ve hepatit C, persistan serviks

displazilerinde görülen insan papilloma virüs enfeksiyonu ve insan bağışıklık yetmezlik virüsü gibi kronik viral enfeksiyonlar da tedavi edilebilir, (Ovalı ve ark. 2007).

Dendritik hücre aşıları, periferik kan monositlerinin sitokin uyarılması sonucu elde edilmektedir. Elde edilen DH'ler otolog lizat, peptit ya da gen transferi ile RNA kullanılarak ya da tüm bunların dışında DH-tümör hücre füzyon hücresi oluşturularak sensitize edilmektedir, (Ovalı ve ark. 2007). Böylelikle, tümöre özgül sitotoksit T hücre yanıtı sağlanmış olur. CD8+ T hücreleri özellikle tümör hücrelerine karşı oluşturulan bağışık yanıtında önemlidirler. Patojenlerin ve tümöre özgül antijenlerin lizatları da DH'leri duyarlılaştırmak için kullanılan diğer seçeneklerdir. DH aşısı ile yapılan insan tedavileri ve hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda ya hiç ya da çok düşük oran da toksisiteye rastlanması DH aşı uygulamasının güvenilir bir yöntem olduğunu ortaya koymuştur. (Ovalı ve ark. 2007)

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu tez çalışmasında farklı sitokin kokteylleri kullanılarak *in vitro* koşullarda elde edilen olgunlaşmamış ve matur DH'lerin işlevsel, karakteristik ve morfolojik özelliklerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu araştırmada, insan periferik kanından elde edilen mononükleer hücreler kullanılarak iki farklı antijen yükleme zamanı ve altı farklı sitokin grubu ile elde edilen DH'lerin karakterizasyonu, morfolojik incelemeleri, canlılık oranları, fagositik aktiviteleri, metabolik aktiviteleri ve T hücre çoğalma yeteneklerinin belirlenmesi için deneysel çalışmalar gerçekleştirilmiştir. DH kültüründe kullanılan besiyerleri, hücre kültür kapları, destekleyici yan ürünler ve pipetlerin tümü hücre kültürü çalışmaları için uygunluğu test edilmiş steril ve tek kullanımlık olarak seçilmiştir. Kontaminasyona karşı önlem olarak çalışma esnasında steril pudrasız eldiven, maske ve bone kullanılmış. Çapraz kontaminasyonu engellemek adına karşılaştırılması yapılacak gruplar kabin içerisine birbirlerinden ayrı alınarak işlemleri yapılmıştır.

#### 3.1. Materyaller ve Cihazlar

Zıt faz Mikroskop, (Olympus CKX41, Tokyo, JAPAN)

Laminar akışlı steril kabin, (Nüve, LN090, TÜRKİYE)

CO<sub>2</sub> İnkübatör, (Thermo Scientific, Rockford, USA)

Santrifüj, (Thermo Scientific, Rockford, USA)

Akım sitometri cihazı, (Becton Dickinson Biosciences, California, USA)

Sitospin, (Thermo Scientific, Rockford, USA)

-20 °C – Derin dondurucu, (Arçelik, TÜRKİYE)

-80 °C – Derin dondurucu, (Thermo Scientific, Rockford, USA)

-196 °C Sıvı azot tankı, (MVE Chart Industries, Minnesota, USA)

+4 °C buzdolabı. (Arçelik, TÜRKİYE)

Pipet aid, (Eppendorf, Hamburg, GERMANY)

Giemsa boyama cihazı, (Sysmex Corporation SP- 1000i, Kobe, JAPAN)

Su banyosu, (Thermo Scientific, Rockford, USA)

Vorteks (Grant- Bio, UK)

Hassas terazi (Cas Elektronik, TÜRKİYE)

Eliza okuyucu (ChroMate, USA)

Işık mikroskobu (Olympus CKX31, Tokyo, JAPAN)

Orbital karıştırıcı (Bio-San 05-20, Riga, LATVIA)

25 cm<sup>2</sup> hücre kültür flasksı, (Becton Dickinson Falcon, California, USA )  
196 Kuyucuklu plaka, (Grienier bio-one, Caroline, USA)  
Konik kapaklı santrifüj tüpü - 15 ml, (Becton Dickinson Falcon, California, USA )  
Konik kapaklı santrifüj tüpü - 50 ml. (Becton Dickinson Falcon, California, USA)  
Tek kullanımlık steril serolojik pipet 2 ml, (Nunc, Newyork, USA)  
Tek kullanımlık steril serolojik pipet 10 ml, (Nunc, Newyork, USA)  
Tek kullanımlık steril serolojik pipet 25 ml, (Nunc, Newyork, USA)  
Giemsa boyası, (Sigma Aldrich, USA)  
FITC-Dextran, (Sigma Aldrich, USA)  
Dendritik hücre kültür besiyeri, (Cell Genix, Freiburg, GERMANY)  
Phosphate Buffer Saline, (PAA, New Jersey, USA)  
Human Serum Albumin, (Centurion Pharma, USA)  
Penisilin/Streptomisin, (PAA, New Jersey, USA)  
Fikol, (Stem Cell Technologies, CANADA)  
İnterlökin 15, (Cell Genix, Freiburg, GERMANY)  
İnterlökin 4, (Invitrogen, Grand Island, USA)  
Granulosit, makrofaj koloni stimulan faktör, (Invitrogen, Grand Island, USA)  
İnterlökin 6, (Invitrogen, Grand Island, USA)  
İnterlökin 1 $\beta$ , (Invitrogen, Grand Island, USA)  
İnterferon alfa, (Invitrogen, Grand Island, USA)  
İnterferon gamma, (Invitrogen, Grand Island, USA)  
Prostaglandin E2. (Invitrogen, Grand Island, USA)  
CD 83 monoklonal antikor (Becton Dickinson Biosciences, California, USA)  
CD45 monoklonal antikor (Becton Dickinson Biosciences, California, USA)  
CD 209 monoklonal antikor (Becton Dickinson Biosciences, California, USA)  
CD 11c monoklonal antikor (Becton Dickinson Biosciences, California, USA)  
CD 1a monoklonal antikor (Becton Dickinson Biosciences, California, USA)  
CD 86 monoklonal antikor (Becton Dickinson Biosciences, California, USA)  
Dimetil sülfoksit, (Wak Chemie, GERMANY)  
MTT solusyonu, (Amresco, OH, USA)  
Serum fizyolojik, (Eczacıbaşı Baxter, TÜRKİYE)  
Kriyovial tüp, (Nalgene, Newyork, USA)  
0,45 ve 0,22  $\mu$ m gözenek  $\mathcal{C}$ aplı filtre (TPP, Trasadingen, SWITZERLAND)

Hucre sayım kamarası (İso-Lab, TÜRKİYE)  
Lamel 22x22mm (Honka, TÜRKİYE)  
Tiripan mavisi (Sigma Aldrich, USA)  
Boş steril beher (İso-Lab, TÜRKİYE)  
Laboratuar kalemi (Edding, Ahrensburg, GERMANY)  
%70 alkol (Necm Kimya, TÜRKİYE)  
Steril pudrasız cerrahi eldiveni (Baby, TÜRKİYE)  
Bone (Mölnlycke Health Care, SWEDEN)  
Maske (Mölnlycke Health Care, SWEDEN)

### **3.2. Yöntemler**

#### **3.2.1. Periferik Kandan Mononükleer Hücre İzolasyonu**

Bu tez çalışması süresince mononükleer hücreler tek bir kişiden alınan tam kandan elde edilmiştir. Dolaşan kandan mononükleer hücre izolasyonu fikol dansite gradient yöntemi ile yapılmıştır. 50 ml'lik konik tabanlı 2 adet falkon tüpe 15'er ml fikol eklenmiştir. Her bir tüpe fikol miktarının iki katı olan 30 ml dolaşan kök hücre eklenmiştir. Dolaşan kök hücre konik tüpün kenarından yavaşça sızdırılarak fikol üzerine yayılması, iki sıvının birbirine karışmadan tabakalandırılması sağlanmıştır. Tüpler 21 C° de 800 G'de 25 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda mononükleer hücrelerin fikol ile yoğunluk gradientine göre ayrıldığı görülmüştür. En altta eritrosit çökeltisi, çökeltinin üzerinde fikol tabakası, en üstte plazma tabakası ve fikol ile en üst tabaka arasında ise bulutumsu mononükleer hücre tabakasının olduğu görülmüştür. En üstte bulunan plazmanın bulutumsu tabakaya kadar olan kısmı tabakalar birbirine karışmayacak bir biçimde, düşük emiş ayarında pipet ile alınarak atılmıştır. Düşük emiş ayarı ile pipet hare şeklinde görünen bulutumsu tabaka içine daldırılarak mononükleer hücreler toplanmış ve başka bir konik tüp içerisine alınmıştır. Hücrelerin bulunduğu tüp PBS Ca<sup>-</sup>Mg<sup>-</sup> ile 40 ml'ye tamamlanarak 21 C° de 400 G'de 10 dakika boyunca santrifüj ile hücrelerin yıkaması yapılmıştır. Santrifüj sonrası konik tüpün dip kısmında hücrelerin toplandığı görülmüştür. Üstte bulunan sıvı atıldıktan sonra tüp içerisine yeniden 40 ml PBS Ca<sup>-</sup>Mg<sup>-</sup> eklenerek yıkama işlemi tekrarlanmış ve fikol uzaklaştırılmıştır. Fikol uzaklaştırıldıktan sonra hücreler DC-Growth medium eklenerek 13 ml'lik hücre süspansiyonu elde edilmiştir. Elde edilen hücre süspansiyonundan 1 ml alınarak Tripan mavisi ile hücre sayısı ve canlılığı belirlenmiştir.

### 3.2.2. Hücrelerin Sayılması ve Canlılık tayini

Hazırlanan hücre süspansiyonundan 100 µl alınıp, üzerine 100 µl ölü hücreleri Tripan mavisi eklenerek ve pipetaj yapılmıştır. Pipetajdan sonra homojen karışımdan 10 µl alındı Thoma lamında 10X40 büyütmeyle sayım yapılmıştır. Sayım yapılırken Tripan mavisi ile boyanmamış olan canlı ve düzgün hücre morfolojisine sahip hücreler dikkate alınmıştır.

Hücre sayısı not edildikten sonra Tripan mavisi ile boyanmış hücreler de sayılarak canlılık oranı belirlenmiştir.

### 3.2.3. Mononükleer Hücrelerden DH kültürü

Altı farklı sitokin grubunun karşılaştırılması yapılan çalışmada deney grupları tasarlanmış ve buna göre flaskların üzerine grup isimlendirmeleri, kültür başlangıç tarihi not edilmiştir. DH'lerin aktivite ve karakteristik özelliklerinin karşılaştırıldığı gruplar ilk olarak olgunlaşmamış DH elde edilmesinde kullanılacak sitokin grubuna göre 2 gruba ayrılmıştır. IL-4 ve GM-CSF kullanılan grup A grubu, IL-15 ve GM-CSF kullanılan grup ise B grubu olarak adlandırılmıştır. Bu iki grup maturasyon için kullanılacak sitokin gruplarına göre ise 1, 2 ve 3 olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. Antijen yükleme zamanlarına göre ise her bir grup isminin başına 5.gün ve 7. gün ibareleri eklenmiştir. Bu şekilde 5. gün-A1, 5. Gün-A2, 5. gün-A3, 5. gün-B1, 5. gün-B2 ve 5. gün-B3 ve 7. gün-A1, 7. Gün-A2, 7. gün-A3, 7. gün-B1, 7. gün-B2 ve 7. gün-B3 olmak üzere 12 adet çalışma grubu oluşturulmuştur. Çalışma gruplarının şematik gösterimi şekil 3.1 de gösterilmiştir.

A1 grubu için; IL-4, GM-CSF, IL-1β, IL-6, TNFα, PGE2

A2 grubu için; IL-4, GM-CSF, IL-1β, TNFα, IFNα

A3 grubu için; IL-4, GM-CSF, IL-1β, TNFα, IFNα, IFNγ

B1 grubu için; IL-15, GM-CSF, IL-1β, IL-6, TNFα, PGE2

B2 grubu için; IL-15, GM-CSF, IL-1β, TNFα, IFNα

B3 grubu için; IL-15, GM-CSF, IL-1β, TNFα, IFNα ve IFNγ sitokinleri kullanılmıştır.

2 Farklı Sitokin Grubu ile İmmatur DH (im DH).Üretimi

**A Grubu**

IL-4  
GM-CSF

**B Grubu**

IL-15  
GM-CSF

3 farklı sitokin grubu ile matur DH  
üretimi  
5. gün antijen yükleme

**5. gün  
A1  
Grubu**

IL-1 $\beta$   
IL-6  
TNF- $\alpha$   
PGE2

**5. gün  
A2  
Grubu**

IL-1 $\beta$   
TNF- $\alpha$   
IFN- $\alpha$

**5. gün  
A3  
Grubu**

IL-1 $\beta$   
TNF- $\alpha$   
IFN- $\alpha$   
IFN- $\gamma$

**5. gün  
B1  
Grubu**

IL-1 $\beta$   
IL-6  
TNF- $\alpha$   
PGE2

**5. gün  
B2  
Grubu**

IL-1 $\beta$   
TNF- $\alpha$   
IFN- $\alpha$

**5. gün  
B3  
grubu**

IL-1 $\beta$   
TNF- $\alpha$   
IFN- $\alpha$   
IFN- $\gamma$

**A Grubu**

IL-4  
GM-CSF

**B Grubu**

IL-15  
GM-CSF

3 farklı sitokin grubu ile matur DH  
üretimi  
7. gün antijen yükleme

**7. gün  
A1  
Grubu**

IL-1 $\beta$   
IL-6  
TNF- $\alpha$   
PGE2

**7. gün  
A2  
Grubu**

IL-1 $\beta$   
TNF- $\alpha$   
IFN- $\alpha$

**7. gün  
A3  
Grubu**

IL-1 $\beta$   
TNF- $\alpha$   
IFN- $\alpha$   
IFN- $\gamma$

**7. gün  
B1  
Grubu**

IL-1 $\beta$   
IL-6  
TNF- $\alpha$   
PGE2

**7. gün  
B2  
Grubu**

IL-1 $\beta$   
TNF- $\alpha$   
IFN- $\alpha$

**7. gün  
B3  
grubu**

IL-1 $\beta$   
TNF- $\alpha$   
IFN- $\alpha$   
IFN- $\gamma$



### Şekil 3.1. Oluşturulan çalışma gruplarının şematik gösterimi

Mononükleer hücreler çalışma gruplarına göre ayrılmış ve isimlendirilmiş T-25 kültür flasklarında %2 HSA ve %1 oranında penisilin-streptomisin içeren DH-Büyüme besiyerinde 37 °C, %5 CO<sub>2</sub>'li inkubatörde kültüre alınmıştır. İnkubasyondan 1 saat sonra flask içerikleri toplanarak atılmıştır. Tüm flasklara yeniden besiyeri eklenmiş ve A grubu flasklarına ml'de 1000 ünite IL-4 ve GM-CSF, B grubu flasklarına ise ml'de 1000 ünite IL-15 ve GM-CSF eklenerek kültüre devam edilmiştir.

Kültürün 3. gününde flask içerikleri toplanarak 15 ml'lik konik tüplere aktarılmıştır ve 350 G'de 10 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Tüm gruplardan santrifüj öncesi 1 ml örnek alınarak morfolojileri incelenmek üzere sitosantrifüj ve giemsa boyama yapılmıştır. Santrifüj sonrası üst sıvısı atılan tüplere besiyeri eklenerek hücre süspansiyonu elde edilmiş ve yeniden aynı flask içerisine ekilmiştir. Hücre ekimi yapılan flasklara taze besiyeri ve yeniden A grubu flasklarına ml'de 1000 ünite IL-4 ve GM-CSF, B grubu flasklarına ise ml'de 1000 ünite IL-15 ve GM-CSF eklenmiştir.

Beşinci gün antijen yüklemesinin etkilerinin gözlemleneceği çalışma dizaynı için tüm gruplara kültürün 5. gününde ml'de 20 µg oranında *Candida Albicans* mayasından elde edilen lizat, antijen olarak yüklenmiştir. Antijen yüklemesini takip eden 2 saat sonrasında her bir gruba belirlenmiş maturasyon sitokinleri eklenmiştir. A1 ve B1 grubuna ml'de 1000 ünite IL-1β, IL-6, TNFα ve ml'de 10ng oranında PGE2 eklenmiştir. A2 ve B2 grubuna ml'de 1000 ünite IL-1β, TNFα ve ml'de 3000 ünite oranında IFNα eklenmiştir. A3 ve B3 grubuna ml'de 1000 ünite IL-1β, TNFα, ml'de 3000 ünite IFNα ve ml'de 100 ünite oranında IFNγ eklenmiştir. Sitokin eklemeleri yapılan hücrelerin kültürüne devam edilmiştir. Kültürün 7. gününde tüm flaskların zıt faz mikroskopa bağlı kamera ile fotoğrafları çekilerek kaydedilmiştir. Tüm gruplardan 1 ml örnek alınarak morfolojileri incelenmek üzere sitosantrifüj ve giemsa boyama yapılmıştır. Tüm flask içerikleri 15 ml'lik falkon tüplere alınarak 400 G'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen hücreler besiyeri ile sulandırılarak her biri için 5'er ml hücre süspansiyonu elde edilmiştir. Tüm gruplar için hücre süspansiyonundan MTT analizi, hücre sayımı, hücre canlılığı ve akım sitometrik analiz için örnek alınmıştır.

Yedinci gün antijen yüklemesinin etkilerinin gözlemleneceği çalışma dizaynı için tüm gruplara kültürün 5. gününde her bir gruba belirlenmiş maturasyon sitokinleri eklenmiştir. A1 ve B1 grubuna ml'de 1000 ünite IL-1β, IL-6, TNFα ve ml'de 10ng oranında PGE2 eklenmiştir. A2 ve B2 grubuna ml'de 1000 ünite IL-1β, TNFα ve ml'de 3000 ünite

oranında IFN $\alpha$  eklenmiştir. A3 ve B3 grubuna ml'de 1000 ünite IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , ml'de 3000 ünite IFN $\alpha$  ve ml'de 100 ünite oranında IFN $\gamma$  eklenmiştir. Sitokin eklemeleri yapılan hücrelerin kültürüne devam edilmiştir. Kültürün 7. gününde tüm gruplara ml'de 20  $\mu$ g oranında *Candida Albicans* mayasından elde edilen lizat, antijen olarak yüklenmiştir. Antijen yüklemesini takip eden 2 saat sonrasında zıt faz mikroskopa bağlı kamera ile fotoğrafları çekilerek kaydedilmiştir. Tüm gruplardan 1 ml örnek alınarak morfolojileri incelenmek üzere sitosantrifüj ve giemsa boyama yapılmıştır. Tüm flask içerikleri 15 ml'lik falkon tüplere alınarak 400 G'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen hücreler besiyeri ile sulandırılarak her biri için 5'er ml hücre süspansiyonu elde edilmiştir. Tüm gruplar için hücre süspansiyonundan MTT analizi, hücre sayımı, hücre canlılığı ve akım sitometrik analiz için örnek alınmıştır.

### **3.2.4. Sitospin ve Giemsa Boyama ile DH'lerin Morfolojik Analizi**

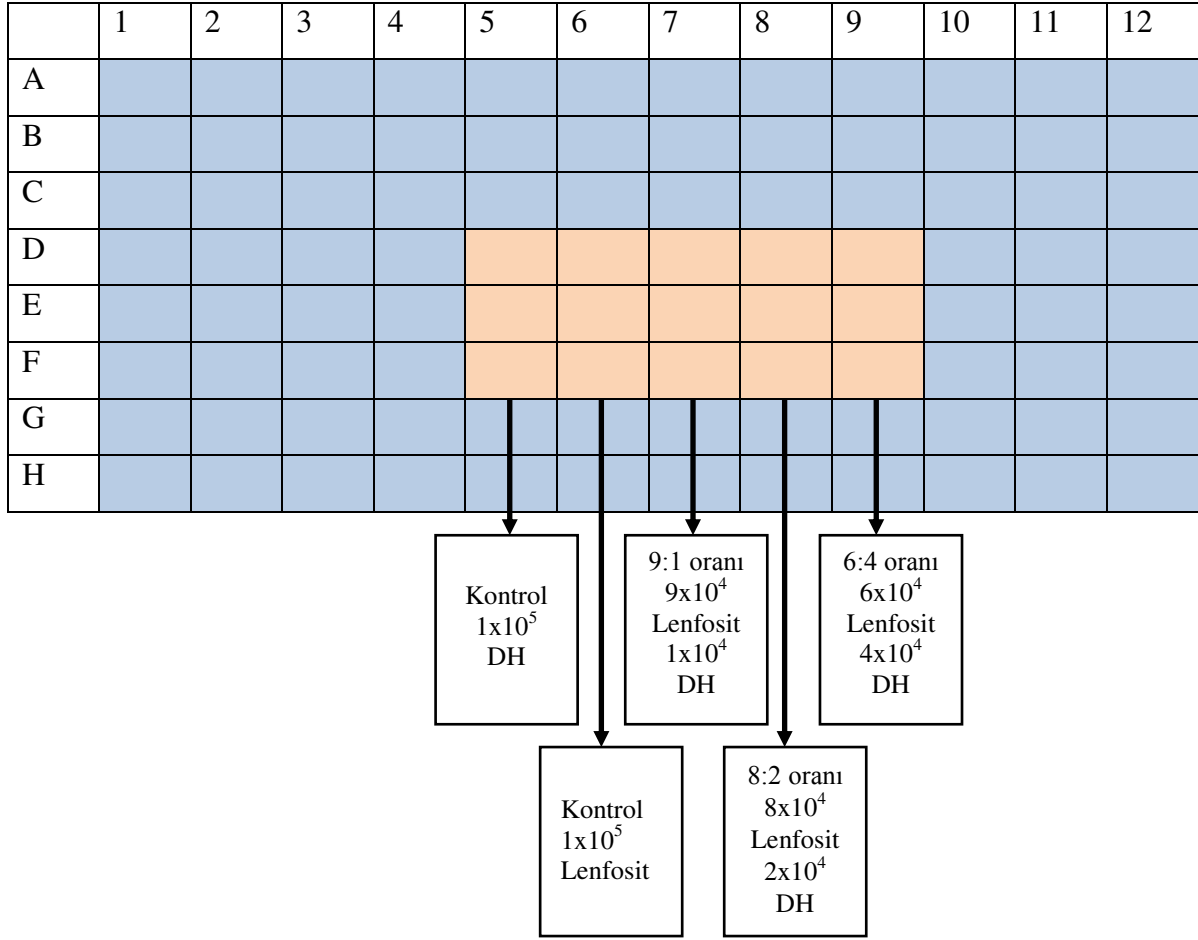
Sitosantrifüj yöntemi ile küçük bir alana yoğunlaştırılmış tek tabaka halinde hücre yayması oluşturulmuştur. Böylelikle, mikroskop incelemesinde küçük bir tarama alanında çok sayıda hücre incelenmesi mümkün olmuştur. Sitosantrifüj cihazı için özel olarak tasarlanmış tek kullanımlık örnek kaplarına lamalar yerleştirilmiştir. Örnek kapları haznesine konulan numuneyi akıtmayı engelleyen filtre kağıdı ve lamı sabitleyen kilit sistemine sahiptir. DH numuneleri laminar akışlı steril kabin altında örnek haznelere eklendikten sonra örnek kapları yalıtılmış rotora yerleştirilmiş ve 500 G'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası lamın işaretli bölgesinde hücrelerin biriktiği görülmüş ve laminar akışlı steril kabin altında 1 dakika kuruması sağlanmıştır.

Yaymaları tamamlanan hücreler Sysmex SP-1000i cihazı ile giemsa boyamaları yapılmıştır. Boyamaları tamamlanan hücrelerin morfolojik incelemeleri ışık mikroskobu altında 10X100 büyütmeyle yapılmıştır.

### **3.2.5. MTT Bazlı Lenfosit Çoğalma Testi**

MTT bazlı lenfosit çoğalma testi uygulanarak, farklı antijen yükleme zamanları ve farklı sitokin grupları ile elde edilen DH'lerin lenfosit çoğalması üzerine etkileri incelenmiştir.

Dolaşan kandan fikol dansite gradient yöntemi ile lenfosit izolasyonu yapılmıştır. 96 kuyucuklu plağın 5-D kuyucuğundan başlanarak önce kontrol grupları sonrasında ise lenfositler ve DH'ler 9:1, 8:2 ve 6:4 oranında kuyucuklara eklenmiştir. Yapılan hücre dağılımı art arda üç kuyucukta tekrarlanmıştır, (Şekil 3.2.)



**Şekil 3.2.** MTT bazlı lenfosit çoğalma testi kurulumunun şematik sönerimi

Hücrelerin eklendiği kuyucukların dışında boş kalan kuyucuklara buharlaşmayı en az seviyeye indirmek için steril saf su eklenmiştir. Plaklar 37 °C, %5 CO<sub>2</sub>'li inkubatörde 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücrelerin ve saf antijenin bulunduğu tüm kuyucuklara 10µl MTT solusyonu eklenmiş ve 3 saat boyunca inkübe edilmiştir. MTT solusyonu ile inkübasyon tamamlanadıktan sonra her bir kuyucuğa 200µl DMSO (Dimetil Sülfoksit) eklenmiştir. Plaklar orta şiddetli olarak ayarlanmış orbital karıştırıcıda 20 dakika boyunca bekletilerek çalkalanmış ve ardından plak okuyucu ile dalga boyları ölçülmüştür.

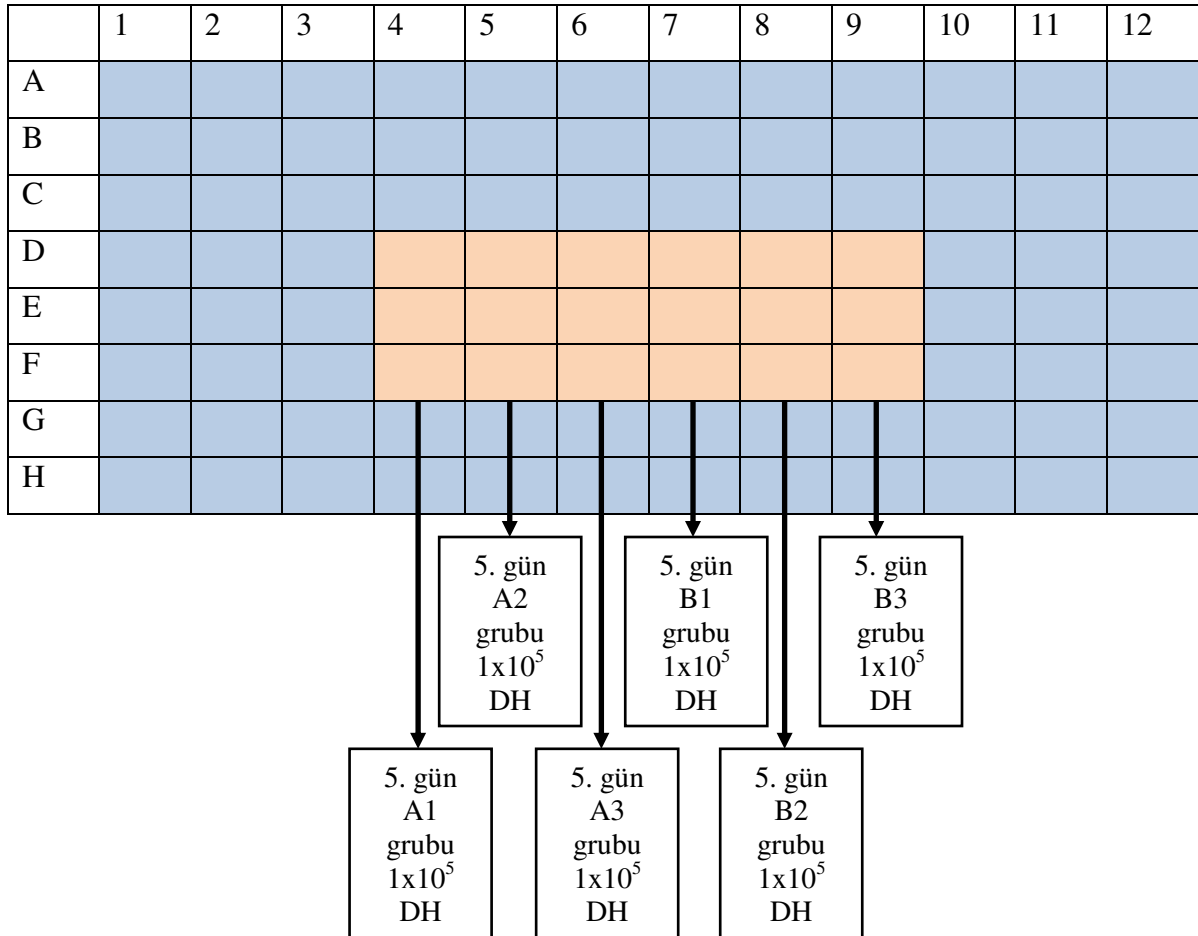
Dalga boyları ölçülen kuyucukların, tekrar olarak kurulmuş 3 kuyucuk ölçüsünün ortalaması alınarak, her bir grup için ortalama değerler elde edilmiştir. Aktivite hesabı yapılırken kontrol grubu olan saf lenfosit ölçüsü temel alınmıştır. DH ve lenfositlerin bir arada bulunduğu kuyucukların ortalama değerlerinden saf lenfosit değeri çıkarılarak artış

miktarı hesaplanmıştır. Artış miktarı bilinen değerlerin yüzde artış oranı yine saf lenfosit dalga boylarından elde edilen ortalama değer ile oranlama yapılarak tespit edilmiştir.

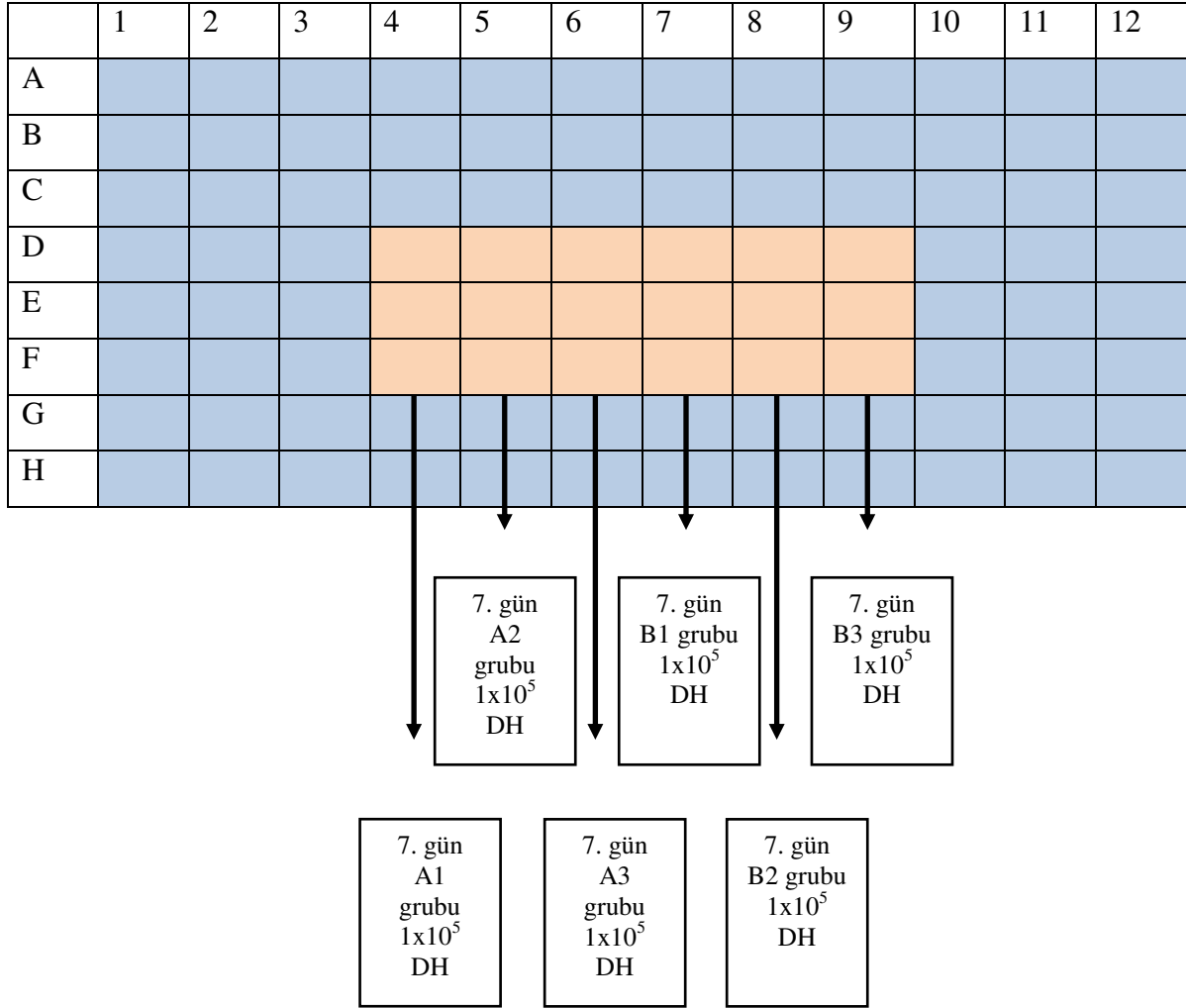
### 3.2.6. MTT Bazlı DH Metabolik Aktivite Tayini

MTT protokolü tüm gruplar için saf DH'ler için tekrarlanmıştır. 5. gün antijen yüklemesi yapılan çalışma grupları ve 7. gün antijen yüklemesi yapılan çalışma grupları için iki ayrı 96 kuyucuklu plak kullanılmıştır. Plâğin 4-D kuyucuğundan başlanarak her bir gruba ait  $1 \times 10^5$  DH kuyucuklara eklenmiştir. Yapılan hücre dağılımı art arda üç kuyucukta tekrarlanmıştır, (Şekil 3.3.)

Aktivite hesabı yapılırken tüm gruplara eşit miktarda hücre eklendiği göz önünde tutulmuştur. Dalga boyu ölçüsü bilinen eşit miktardaki saf lenfosit ölçüsü temel alınmıştır. DH bulunan kuyucukların ortalama değerlerinden saf lenfosit değeri çıkarılarak artış miktarı hesaplanmıştır. Artış miktarı bilinen değerlerin yüzde artış oranı yine saf lenfosit dalga boylarından elde edilen ortalama değer ile oranlama yapılarak tespit edilmiştir.



Şekil 3.3. MTT bazlı DH metabolik aktivite testi kurulumunun şematik gösterimi.



**Şekil 3.4.** MTT bazlı DH metabolik aktivite testi kurulumunun şematik gösterimi.

### 3.2.7. DH'lerin Akım Sitometrik Analiz ile Karakterizasyon Çalışmaları

DH'lerin immunofenotipik özellikleri akım sitometrik analizler ile belirlenmiştir. A1, A2, A3, B1, B2 ve B3 gruplarının analizleri tekrar çalışmaları da dahil olmak üzere *FACS Calibur* akım sitometri cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

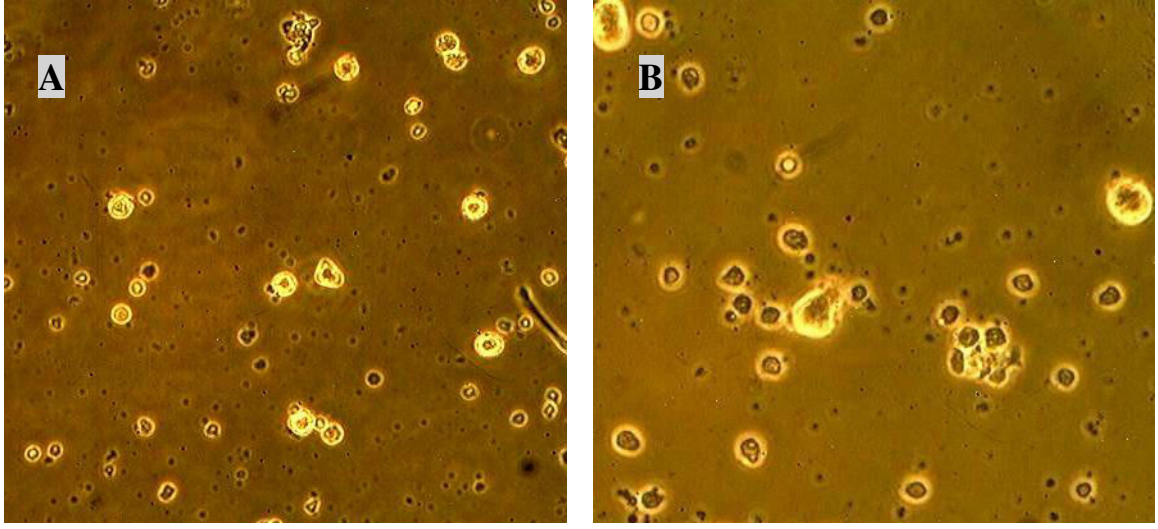
Kültürün 7. Gününde sonlandırma yapıldıktan sonra elde edilen hücre süspansiyonundan akım sitometrik analiz için örnek alınmıştır. Daha sonra belirlenen hücre yüzey işaretleyicilerine özel floresan işaretleyici konjuge monoklonal antikorlar ve uygun izotip kontrollerinden 10µl eklenerek oda ısısında ve karanlıkta 45 dakika inkube edilmiştir. İnkubasyonun ardından yıkaması yapılan hücreler yıkama solüsyonu ile resüspand edilmiştir. Hazırlanan hücre süspansiyonu *FACS Calibur* akım sitometri cihazında okutulmuş ve analizi BD Cell Quest TM software programı ile

gerçekleştirilmiştir.

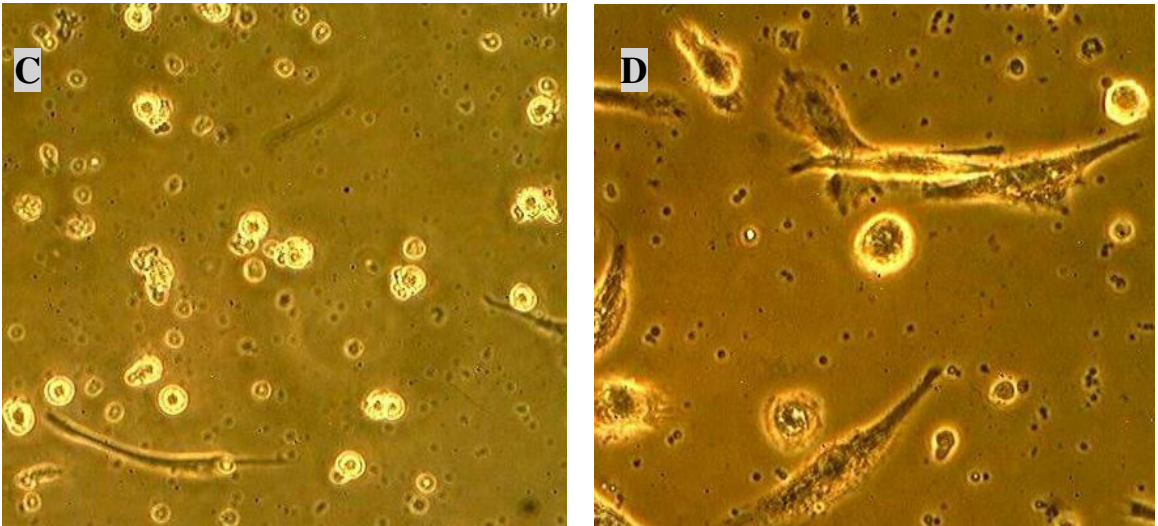
#### **4. BULGULAR**

##### **4.1. Farklı Antijen Yükleme Zamanı ve Farklı Sitokin Grupları ile Elde Edilen DH'lerin Morfolojik Özellikleri**

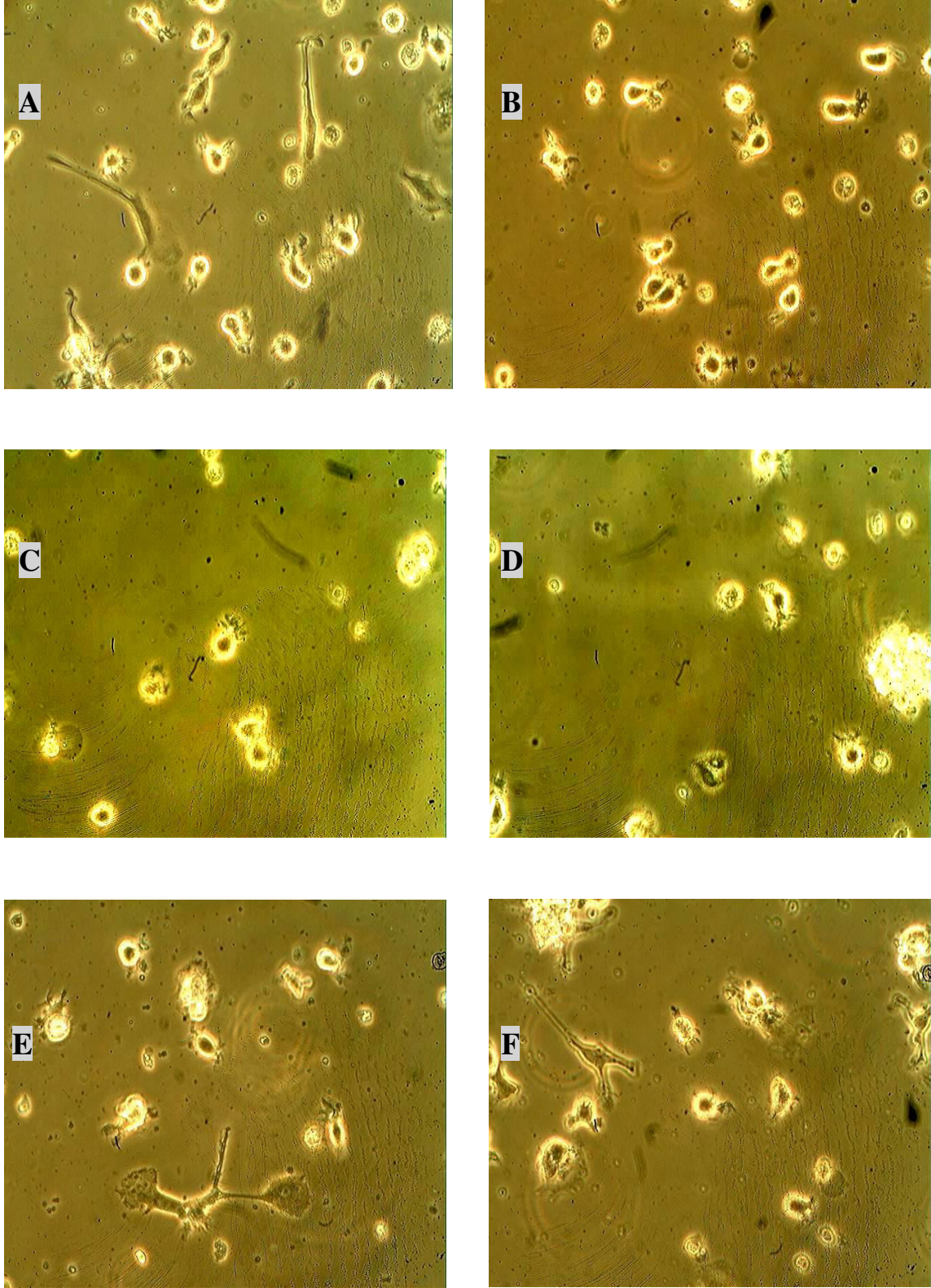
DH'lerin morfolojik özellikleri kültür sonlanıncaya kadar zıt faz mikroskobu ile incelenmiştir. Antijen yükleme zamanı ve maturasyon sitokinlerine göre tüm gruplar için kültürün birinci gününden beşinci gününe kadar hücrelerin yuvarlak biçimli oldukları gözlenmiştir, (Şekil 4.1.) Maturasyon sitokinlerinin eklendiği kültürün beşinci gününden itibaren kültür kabında bir çok hücrenin sitoplazmik çıkıntılar oluşturdukları ve yedinci günde tipik DH morfolojisine sahip oldukları gözlenmiştir, (Şekil 4..) Zıt faz mikroskobu ile kültür süresince yapılan incelemeler ile IL-4 kullanılan A grubu ile IL-15 kullanılan B grubu arasındaki olası farklılıkların belirlenmesi amaçlanmıştır. B grubunda flask tabanına yapışan hücre miktarının A grubuna göre çok daha fazla olduğu temel farklılık olarak gözlenmiştir. Kültürün sonlandırıldığı yedinci gününde kültür mediumundan alınan örneklerin sitosantrifüj ile yaymalarının hazırlanması giemsa boyaması yapıldıktan sonra mikroskopik incelemelerinde A ve B grubu hücrelerinin morfolojik yapıları arasında farklar gözlenmiştir. Hücrelerin sitoplazmik çıkıntılarının IL-4 kullanılan A grubunda, IL-15 kullanılan B grubuna göre daha belirgin ve daha uzun olduğu gözlenmiştir. B grubu hücrelerinin sitoplazmik çıkıntılarının daha kısa ve ince fakat daha fazla olduğu gözlenmiştir. Hücre içi vakuol büyüklükleri ve sayıları dikkat çeken diğer bir farklılık olmuştur. B grubu hücrelerinin çok daha büyük ve az sayıda, A grubu hücrelerinin ise küçük fakat çok sayıda vakuol bulundurdıkları gözlenmiştir. Maturasyon kokteyllerinin hücre morfolojisi üzerinde belirgin bir etkisi gözlenmemiştir.



**Şekil 4.1.** A grubu immatür DH'lerin kültür kabındaki morfolojik görünüşleri.

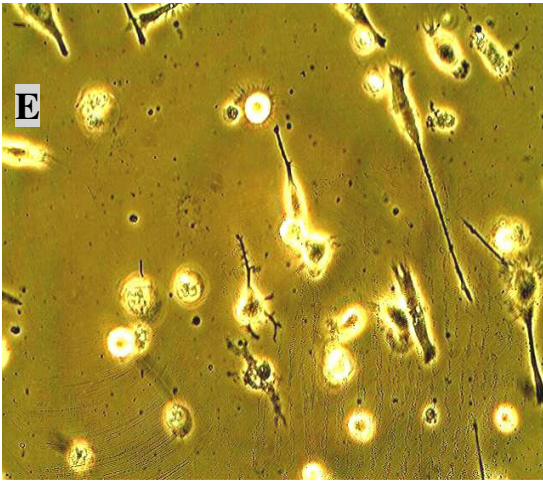
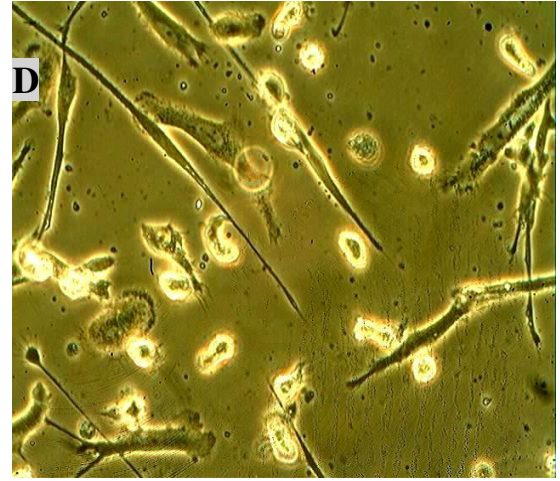
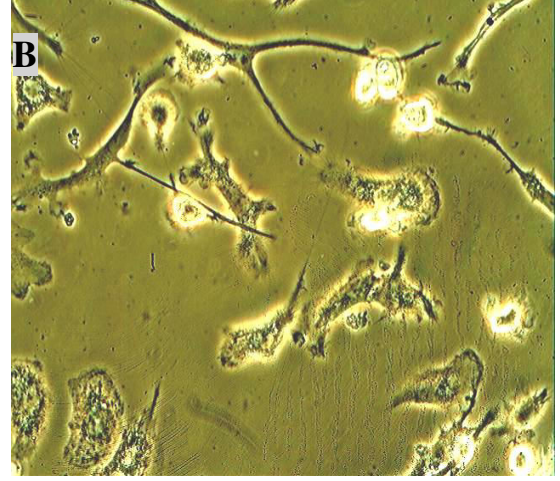
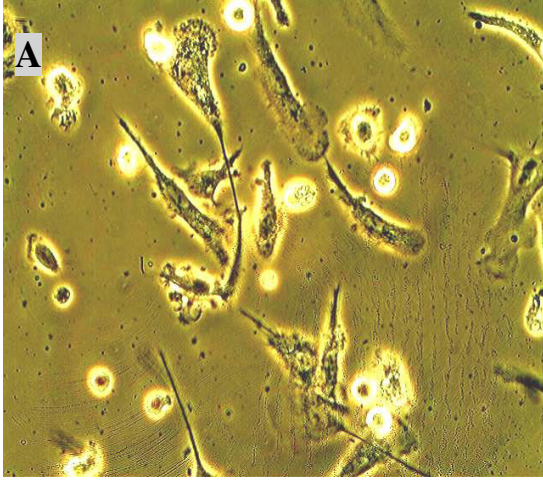


**Şekil 4.2.** B grubu immatür DH'lerin kültür kabındaki morfolojik görünüşleri.

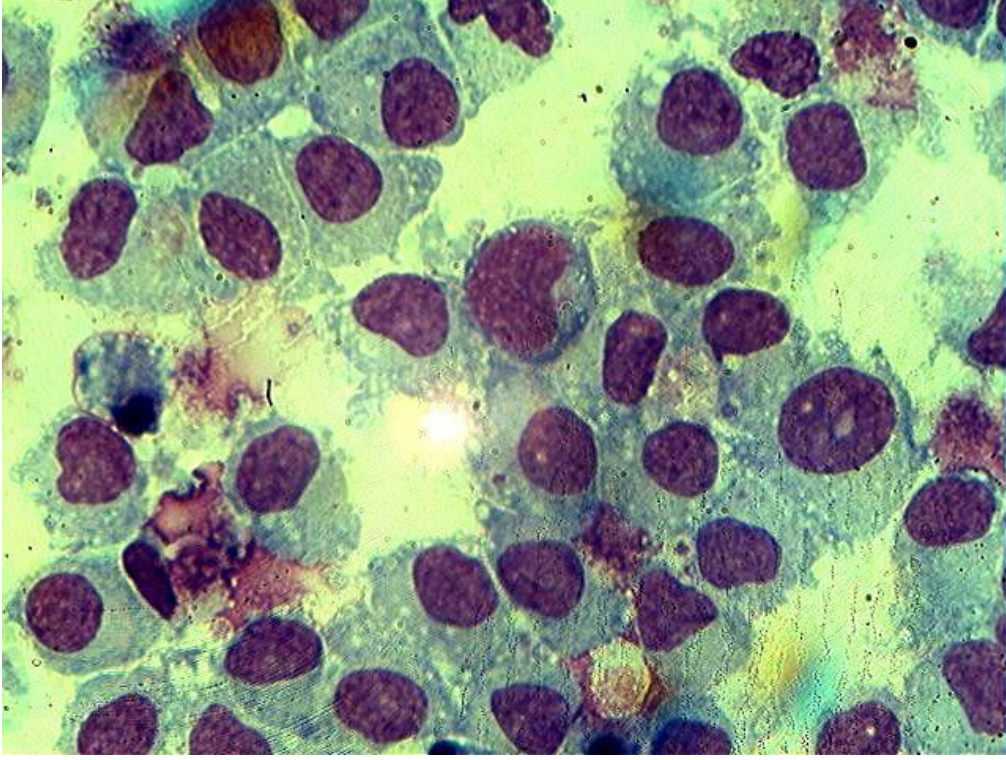


**Şekil 4.3.** A grubu DH'lerin hücre kültür kabındaki morfolojik görünüşleri. A,C,E sitokin yüklemesi ve antijen yüklemesi 5. gün yapılmış olan A1, A2 ve A3 gruplarının kültür sonu flask görüntüleri. B,D,F 5. gün sitokin yüklemesi 7. gün antijen yüklemesi yapılmış olan A1, A2 ve A3 gruplarının kültür sonu flask görüntüleri, (40X büyütme, Olympus CKX41)

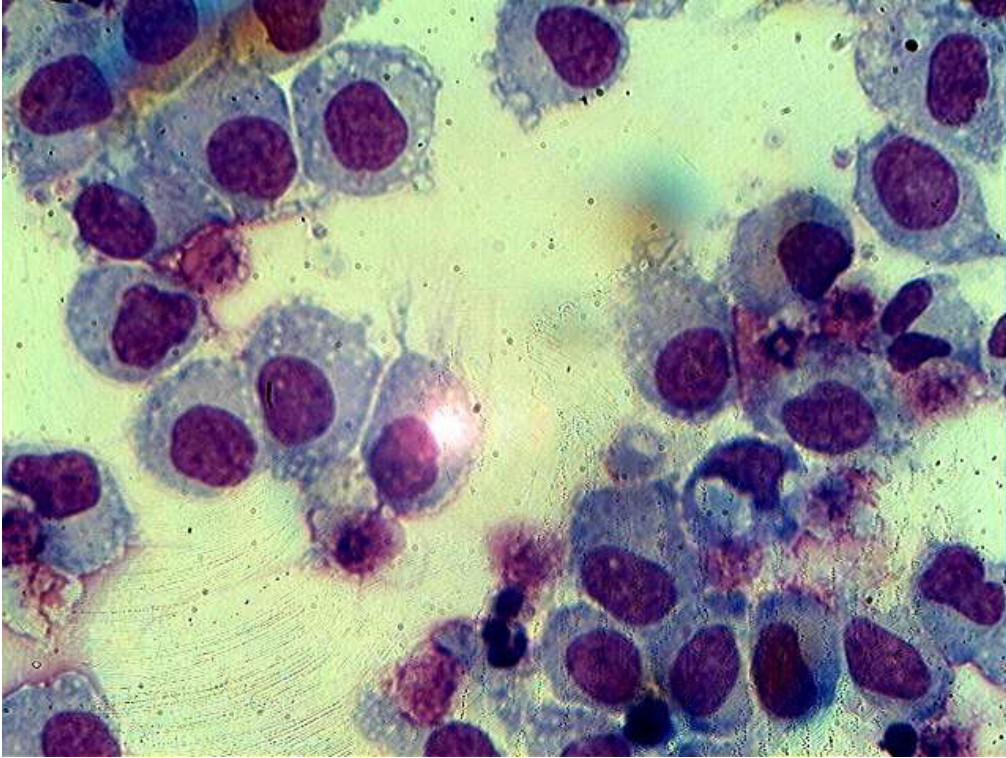




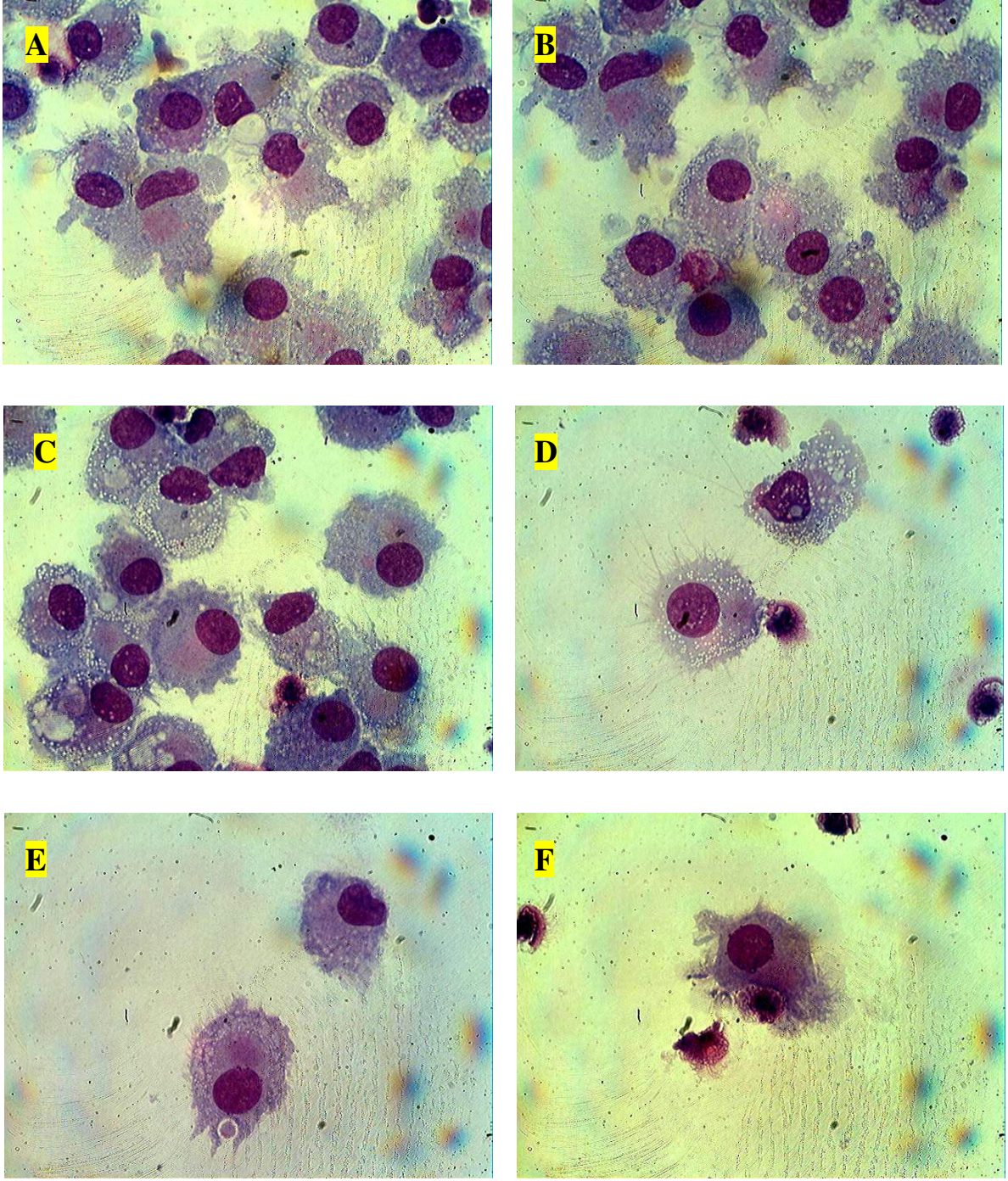
**Şekil 4.4.** B grubu DH'lerin hücre kültür kabındaki morfolojik görünüşleri. A,C,E sitokin yüklemesi ve antijen yüklemesi 5. gün yapılmış olan B1, B2 ve B3 gruplarının kültür sonu flask görüntüleri. B,D,F 5. gün sitokin yüklemesi 7. gün antijen yüklemesi yapılmış olan B1, B2 ve B3 gruplarının kültür sonu flask görüntüleri, (40X büyütme, Olympus CKX41)



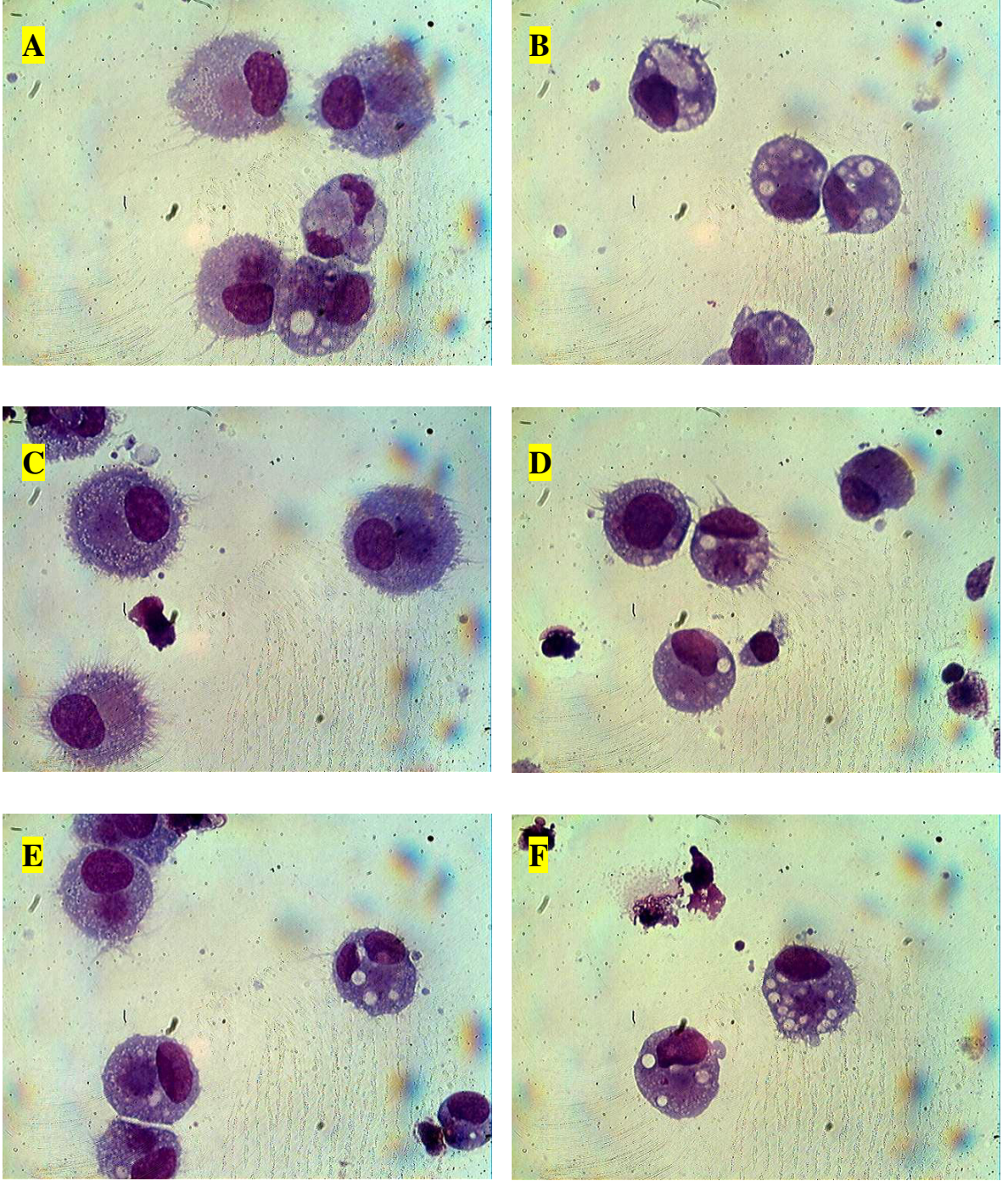
**Şekil 4.5.** A grubu immatür DH'lerin giemsa boyamaları, ( 100 X büyütme Olympus CKX31)



**Şekil 4.6.** B grubu immatür DH'lerin giemsa boyamaları, (100 X büyütme Olympus CKX31)



**Şekil 4.7.** A grubu matür DH'lerin giemsa boyamaları. A,C,E, sitokin yüklemesi ve antijen yüklemesi 5. gün yapılmış olan A1, A2 ve A3 gruplarının sitospin yaymalarının giemsa boyama görüntüleri. B,D,F, 5. gün sitokin yüklemesi 7. gün antijen yüklemesi yapılmış olan A1, A2 ve A3 gruplarının sitospin yaymalarının giemsa boyama görüntüleri, (100 X büyütme Olympus CKX31)



**Şekil 4.8.** B grubu matür DH'lerin giemsa boyamaları. A,C,E sitokin yüklemesi ve antijen yüklemesi 5. gün yapılmış olan B1, B2 ve B3 gruplarının sitospin yaymalarının giemsa boyama görüntüleri. B,D,F 5. gün sitokin yüklemesi 7. gün antijen yüklemesi yapılmış olan B1, B2 ve B3 gruplarının sitospin yaymalarının giemsa boyama görüntüleri, (100 X büyütme Olympus CKX31)

## 4.2. Farklı Antijen Yükleme Zamanı ve Farklı Sitokin Grupları ile Elde Edilen DH'lerin Hücre Sayısı ve Canlılık Oranları

Kültür sonlandırıldıktan sonra tüm grupların hücre sayıları ve canlılık oranları Tripan mavisi ile ışık mikroskobu altında belirlenmiştir. Veriler üç kez tekrarlanan çalışmaların ardından elde edilen sonuçların ortalaması alınarak ve standart sapma ( $\pm$ SD) göz önünde bulundurularak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar için  $p < 0,05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Yapılan üç çalışmada da kültür başlangıcı için kullanılan hücre sayıları tüm gruplar için eşit olarak ayarlanmıştır. Canlılık oranı ve hücre sayısı dikkate alındığında, IL-15 ve GM-CSF sitokinlerinin kullanıldığı B grubu hücrelerinin canlılık ve hücre sayısının IL-4 ve GM-CSF sitokinlerinin kullanıldığı A grubuna kıyasla daha düşük olduğu gözlenmiştir. Maturasyon kokteyllerinin hücre sayısı ve canlılık oranı üzerinde farklı etkilere sahip olduğu gözlenmiştir. A ve B gruplarının her ikisi için de maturasyon kokteyli olarak IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$  kullanılarak kullanılan üçüncü alt gruplarında (A3 ve B3), canlılık oranının diğer gruplara göre daha düşük olduğu gözlenmiştir. Çizelge 4.1. de gruplara ait hücre sayısı ve canlılık oranları görülmektedir.

**Çizelge 4.1.** DH'lerin giriş ve çıkış hücre sayıları ve canlılık oranları

	Giriş Hücre Sayısı	Çıkış Hücre Sayısı	Canlılık
5. gün A1 ( IL-4, GM-CSF & IL-1 $\beta$ , IL-6 , TNF $\alpha$ , PGE2)x3	$2 \times 10^6$	$1 \times 10^6 \pm$	% 95 $\pm$
5. gün A2 ( IL-4, GM-CSF & IL-1 $\beta$ , IFN $\alpha$ , TNF $\alpha$ ) x3	$2 \times 10^6$	$0,9 \times 10^6 \pm$	%88 $\pm$
5. gün A3 ( IL-4, GM-CSF & IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) x3	$2 \times 10^6$	$0,77 \times 10^6 \pm$	%80 $\pm$
5. gün B1 (IL-15, GM-CSF & IL-1 $\beta$ , IL-6 , TNF $\alpha$ , PGE2)x3	$2 \times 10^6$	$0,95 \times 10^6 \pm$	%84 $\pm$
5. gün B2 (IL-15, GM-CSF & IL-1 $\beta$ , IFN $\alpha$ , TNF $\alpha$ ) x3	$2 \times 10^6$	$0,88 \times 10^6 \pm$	%79 $\pm$
5. gün B3 (IL-15, GM-CSF & IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ )x3	$2 \times 10^6$	$0,5 \times 10^6 \pm$	%77 $\pm$
7. gün A1 ( IL-4, GM-CSF & IL-1 $\beta$ , IL-6 , TNF $\alpha$ , PGE2) x3	$2 \times 10^6$	$0,99 \times 10^6 \pm$	%90 $\pm$
7. gün A2 ( IL-4, GM-CSF & IL-1 $\beta$ , IFN $\alpha$ , TNF $\alpha$ ) x3	$2 \times 10^6$	$0,94 \times 10^6 \pm$	% 90 $\pm$
7. gün A3 ( IL-4, GM-CSF & IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) x3	$2 \times 10^6$	$0,72 \times 10^6 \pm$	%79 $\pm$
7. gün B1 (IL-15, GM-CSF & IL-1 $\beta$ , IL-6 , TNF $\alpha$ , PGE2)x3	$2 \times 10^6$	$0,87 \times 10^6 \pm$	%85 $\pm$
7. gün B2 (IL-15, GM-CSF & IL-1 $\beta$ , IFN $\alpha$ , TNF $\alpha$ ) x3	$2 \times 10^6$	$0,84 \times 10^6 \pm$	%80 $\pm$
7. gün B3 (IL-15, GM-CSF & IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ )x3	$2 \times 10^6$	$0,64 \times 10^6 \pm$	%78 $\pm$

### **4.3. Farklı Antijen Yükleme Zamanı ve Farklı Sitokin Grupları ile Elde Edilen DH'lerin İmmunofenotipik Özellikleri**

Yedinci günde kültür sonlandırılmasından sonra, her bir gruptan alınan örnekler ile hücrelerin akım siometrik incelemeleri gerçekleştirilmiştir. A ve B grubu alt gruplarının tümünde olgunlaştırılmış DH'lerde CD45, CD83, CD209, CD86, CD11c, CD1a ve HLA-DR belirteçlerinin ifadesine bakılmıştır.

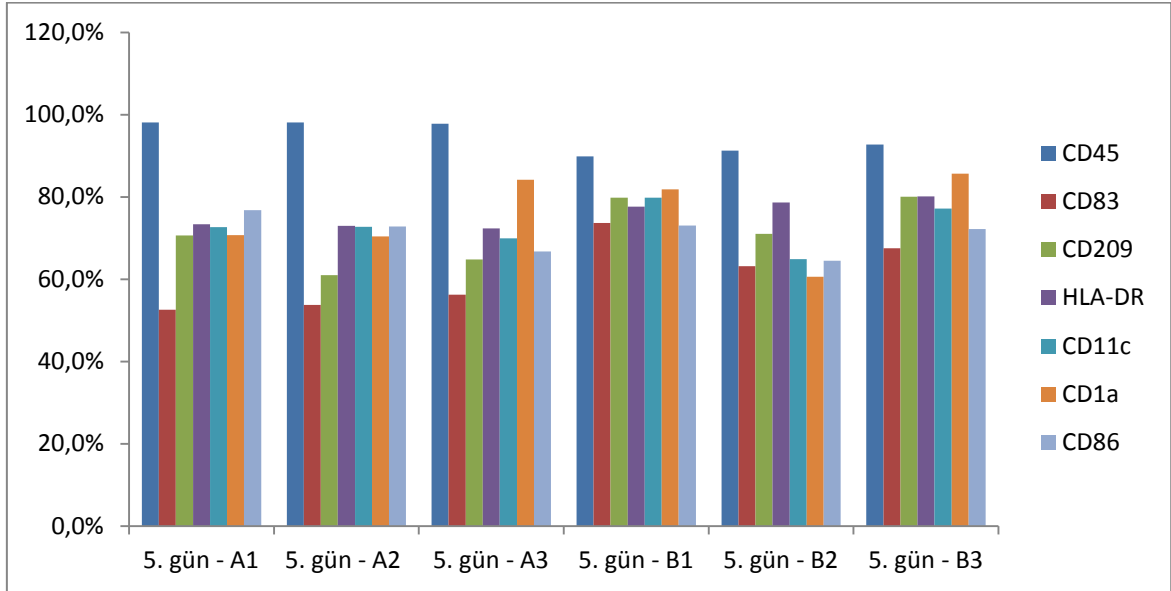
Maturasyon için kullanılan altı farklı sitokin grubu arasında antijen yüklemesi beşinci gün ve yedinci gün yapılan her iki grupta da önemli bir fark olmadığı saptanmıştır. Antijen yükleme zamanına göre değerlendirildiğinde ise IL-15 ve IL-4 sitokinlerinin ko-stimulatuar faktörleri farklı oranlarda ifade ettikleri görülmüştür. Yedinci gün antijen yüklemesi yapılan çalışma gruplarından IL-4 kullanılan A grubu DH'lerinin ko-stimulatuar faktörleri daha yüksek oranda ifade ettikleri saptanmıştır. Beşinci gün antijen yüklemesi yapılan çalışma gruplarından ise IL-15 kullanılan B grubu DH'lerinin daha yüksek oranda ko-stimulatuar faktörleri ifade ettikleri saptanmıştır.

Veriler üç kez tekrarlanan çalışmaların ardından elde edilen sonuçların ortalaması alınarak ve standart sapma ( $\pm$ SD) göz önünde bulundurularak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar için  $p < 0,05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Çizelge 4.2. de beşinci gün antijen yüklemesi yapılmış tüm gruplara ait akım sitometrik analiz sonuçları, çizelge 4.3. de ise yedinci gün antijen yüklemesi yapılmış tüm gruplara ait sonuçları görülmektedir. Şekil 4,9. ve 4,10 da her bir grup için akım sitometrik analiz ile bakılan yüzey belirteçlerinin pozitiflik yüzde oranlarının grafikleri görülmektedir.

**Çizelge 4.2.** 5. gün antijen yüklemesi yapılan DH'lerin akım sitometri cihazında tespit edilen verileri.

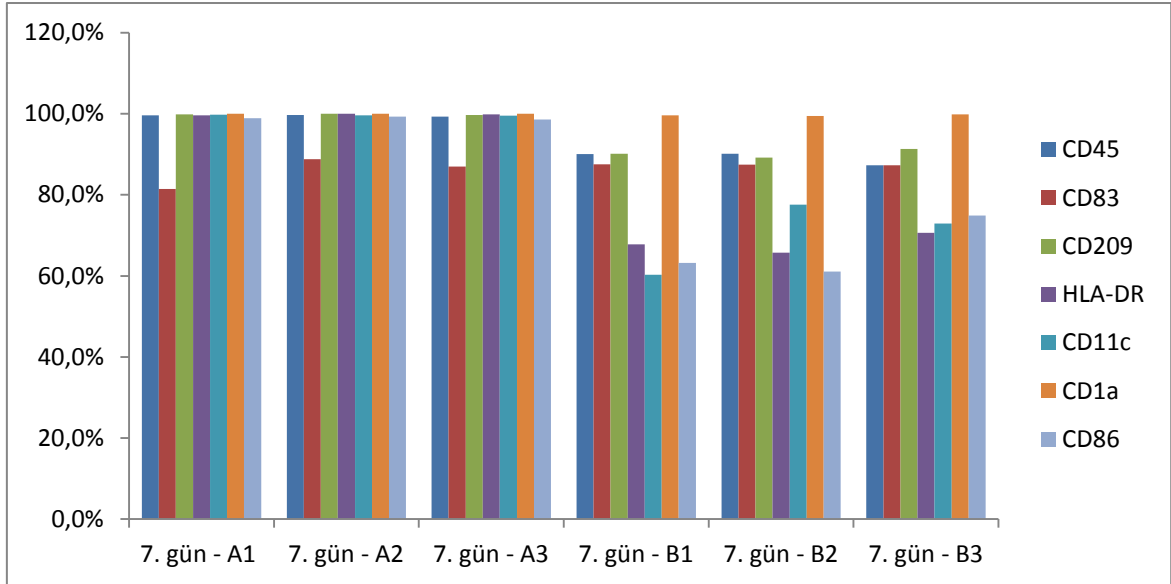
5. gün antijen yüklemesi	CD45	CD83	CD209	HLA-DR	CD11c	CD1a	CD86
<b>A1</b>	98,1%	52,6%	70,6%	73,4%	72,6%	70,7%	76,8%
<b>A2</b>	98,1%	53,8%	61,0%	73,0%	72,8%	70,4%	72,8%
<b>A3</b>	97,8%	56,2%	64,8%	72,3%	69,9%	84,2%	66,7%
<b>B1</b>	89,9%	73,7%	79,8%	77,6%	79,8%	81,9%	73,1%
<b>B2</b>	91,3%	63,1%	71,0%	78,7%	64,9%	60,6%	64,5%
<b>B3</b>	92,7%	67,6%	80,1%	80,1%	77,2%	85,7%	72,2%



**Şekil.4.9.** 5. gün antijen yüklemesi yapılan DH'lerin akım sitometri cihazında tespit edilen verilerinin grafik ile gösterimi.

**Çizelge 4.3.** 7. gün antijen yüklemesi yapılan DH'lerin akım sitometri cihazında tespit edilen verileri.

7. gün antijen yüklemesi	CD45	CD83	CD209	HLA-DR	CD11c	CD1a	CD86
<b>A1</b>	99,6%	81,4%	99,8%	99,6%	99,8%	100,0%	98,9%
<b>A2</b>	99,7%	88,8%	100,0%	100,0%	99,6%	100,0%	99,3%
<b>A3</b>	99,3%	87,0%	99,7%	99,8%	99,5%	100,0%	98,6%
<b>B1</b>	90,0%	87,5%	90,1%	67,8%	60,3%	99,6%	63,2%
<b>B2</b>	90,1%	87,4%	89,2%	65,7%	77,6%	99,4%	61,1%
<b>B3</b>	87,3%	87,3%	91,3%	70,6%	72,9%	99,8%	74,9%



**Şekil.4.10.** 7. gün antijen yüklemesi yapılan DH'lerin akım sitometri cihazında tespit edilen verilerinin grafik ile gösterimi.



#### **4.4. Farklı Antijen Yükleme Zamanı ve Farklı Sitokin Grupları ile Elde Edilen DH'lerin Lenfosit Çoğalma Aktiviteleri (MTT Bazlı)**

DH kültürleri sonlandırıldıktan sonra her bir gruptan elde edilen DH'lerin lenfosit çoğalma aktivitelerini ölçmek için MTT bazlı lenfosit çoğalma testi uygulanmıştır. Çalışma verileri, çalışmalar üç kez tekrarlandıktan sonra elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması alınarak ve standart sapma ( $\pm$ SD) göz önünde bulundurularak değerlendirilmiştir. Beşinci gün antijen yüklemesi yapılan çalışmanın her bir grup için elde edilen sonuçların birbirleri arasında istatistiksel farklılığın belirlenmesi için tek yönlü varyans analizi (One-Way Anova) kullanılmıştır. Gruplar arasında ( $p < 0,05$ ) anlamlı farklılık tespit edilmiştir. Benzer şekilde yedinci gün antijen yüklemesi yapılan gruplar arasındaki fark aynı istatistiksel yolla saptanmıştır.

Çizelge 4.4 ve çizelge 4.5. de beşinci gün ve yedinci gün antijen yüklemesi yapılan çalışma gruplarına ait sonuçların tümü görülmektedir. IL-4 kullanılan A grubu ile IL-15 kullanılan B grubu hücrelerinin farklı antijen yükleme zamanlarında, farklı lenfosit çoğalma kapasitelerine sahip oldukları saptanmıştır.

Şekil 4.11 , 4.12 ve 4.13, de görüldüğü gibi beşinci gün antijen yüklemesi yapılan gruplarda IL-15 kullanılan B grubu DH'lerinin A grubuna göre daha yüksek oranda T hücre çoğalma kapasitesine sahip oldukları gözlenmektedir. Yedinci gün antijen yüklemesi yapılan gruplarda ise IL-4 kullanılan A grubu hücrelerinin, IL-15 kullanılan B grubu hücrelerine göre daha yüksek T hücre çoğalma kapasitesine sahip olduğu görülmektedir, (Şekil 4.14 , 4.15 ve 4.16)

**Çizelge 4.4.** 5. gün antijen yüklemesi yapılan DH'lerin MTT analizi ile tespit edilen T hücre çoğalma verileri.

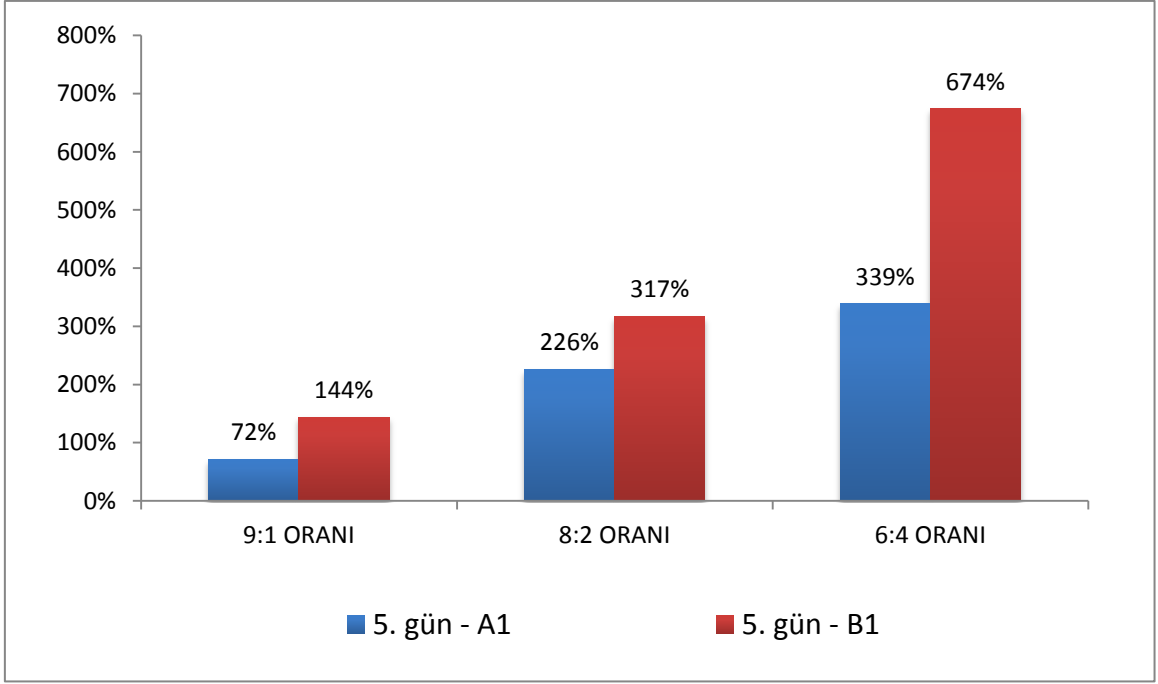
	9:1 ORANI	8:2 ORANI	6:4 ORANI
5. gün - A1	72%	226%	339%
5. gün - A2	141%	283%	535%
5. gün - A3	56%	146%	311%
5. gün - B1	144%	317%	674%
5. gün - B2	136%	263%	352%
5. gün - B3	144%	399%	698%

Verileri, çalışmalar üç kez tekrarlandıktan sonra elde edilen değerlerinin ortalaması alınarak ve standart sapma ( $\pm$ SD) göz önünde bulundurularak belirtilmiştir. Değerlendirme tek yönlü varyans analizi (One-Way Anova) kullanılarak yapılmıştır. Çalışma grupları arasındaki farklar için  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir.

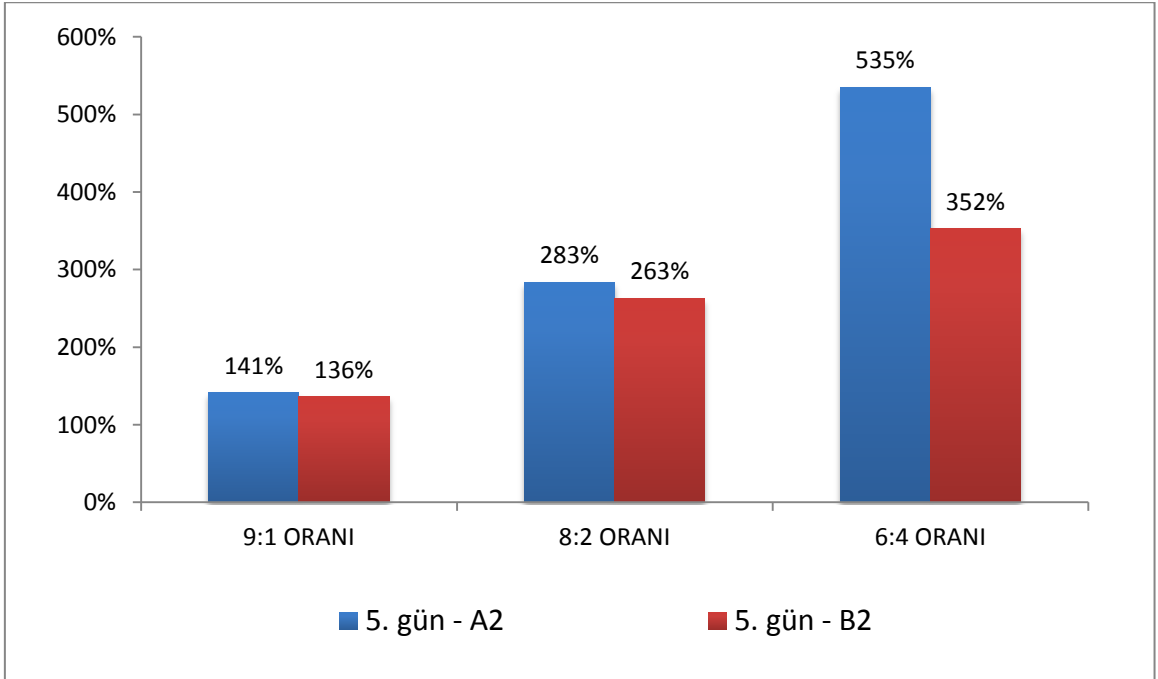
**Çizelge 4.5.** 7. gün antijen yüklemesi yapılan DH'lerin MTT analizi ile tespit edilen T hücre çoğalma verileri.

	9:1 ORANI	8:2 ORANI	6:4 ORANI
7. gün - A1	139%	377%	655%
7. gün - A2	205%	531%	854%
7. gün - A3	204%	532%	858%
7. gün - B1	107%	279%	563%
7. gün - B2	41%	119%	286%
7. gün - B3	63%	179%	319%

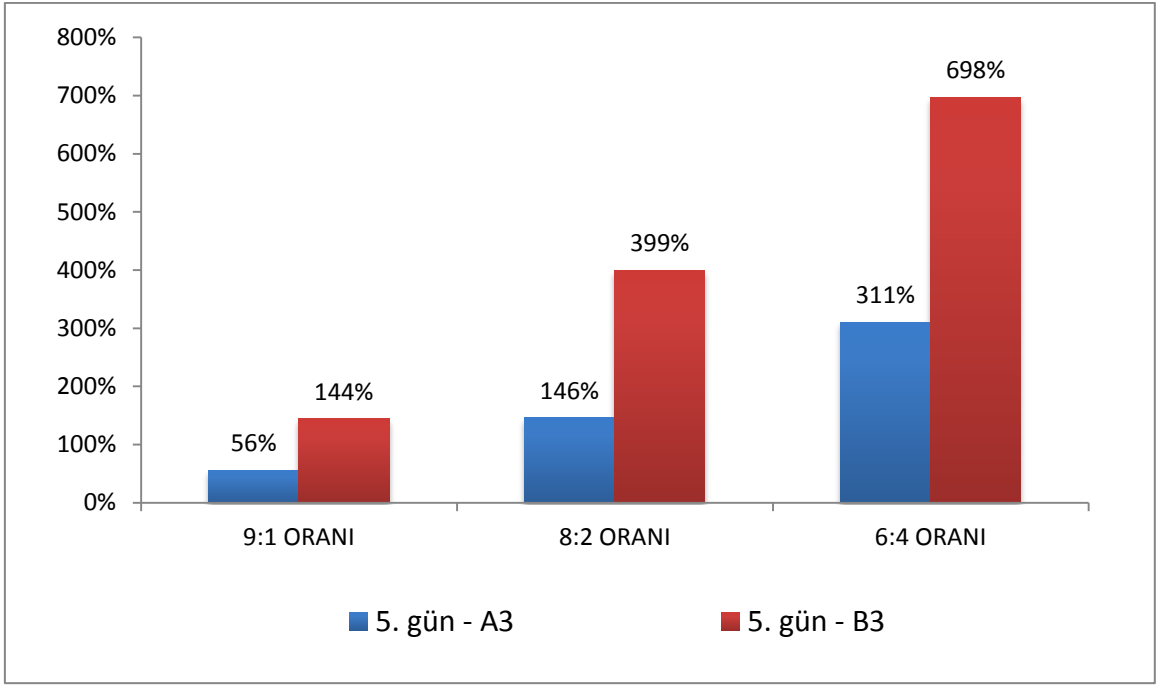
Verileri, çalışmalar üç kez tekrarlandıktan sonra elde edilen değerlerinin ortalaması alınarak ve standart sapma ( $\pm$ SD) göz önünde bulundurularak belirtilmiştir. Değerlendirme tek yönlü varyans analizi (One-Way Anova) kullanılarak yapılmıştır. Çalışma grupları arasındaki farklar için  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir.



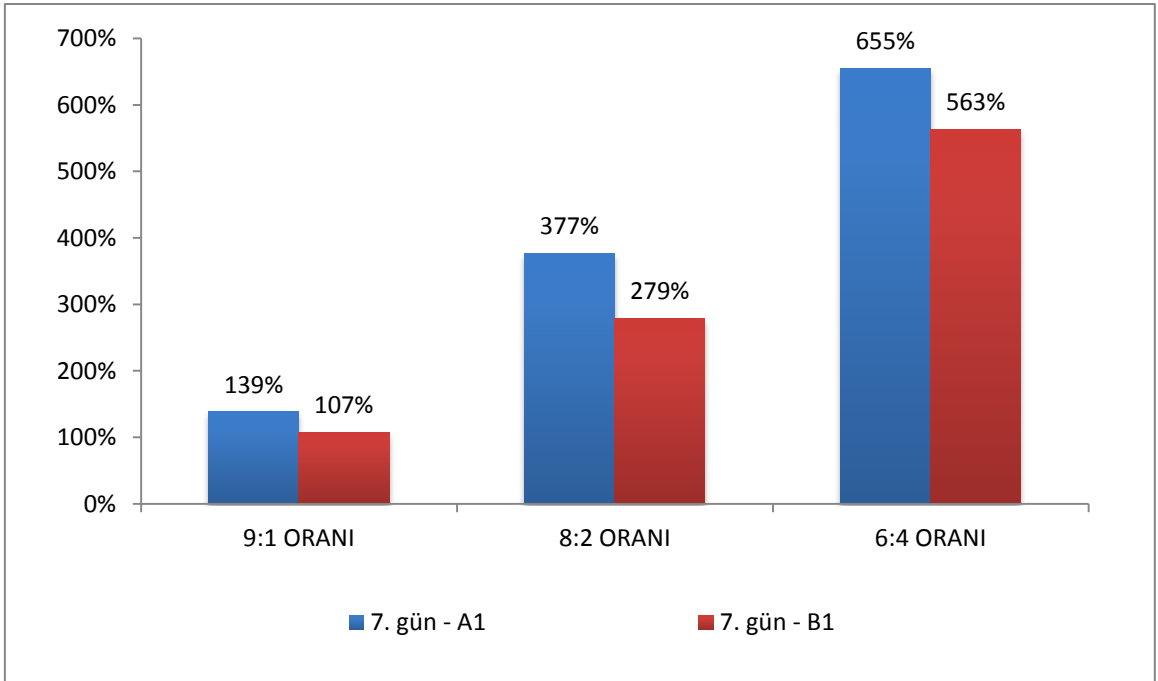
**Şekil.4.11.** 5. gün antijen yüklemesi yapılan A1 ve B1 grubu DH'lerin MTT analizi ile tespit edilen T hücre çoğalma verilerinin grafik ile gösterimi.



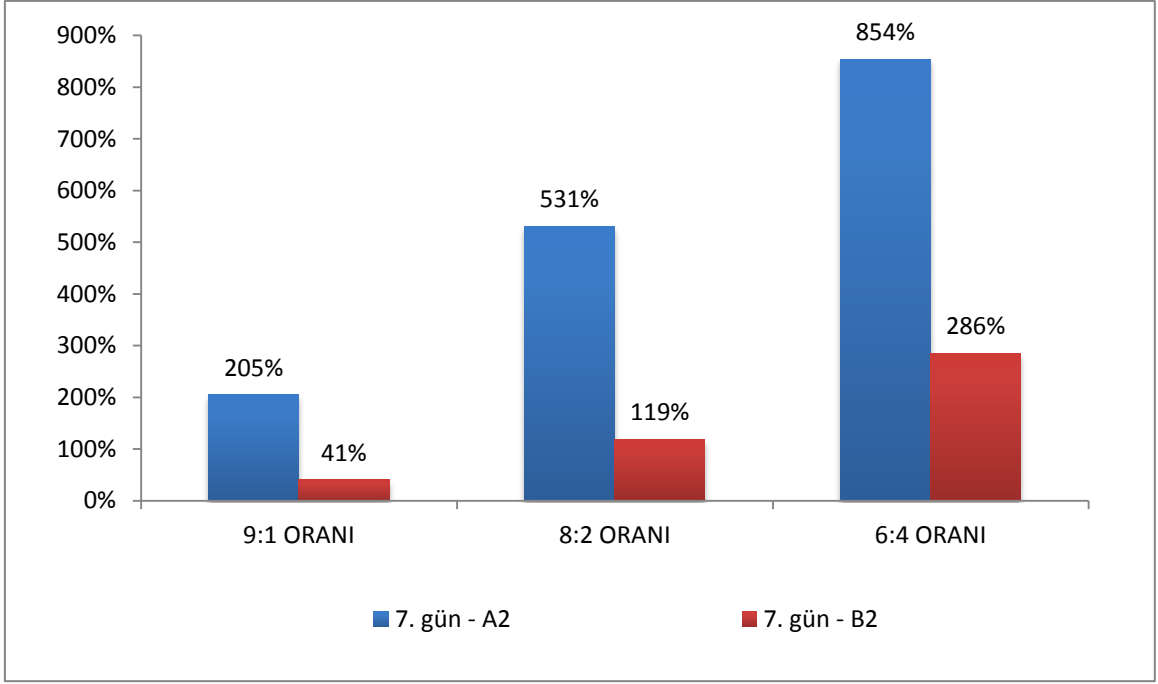
**Şekil.4.12.** 5. gün antijen yüklemesi yapılan A2 ve B2 grubu DH'lerin MTT analizi ile tespit edilen T hücre çoğalma verilerinin grafik ile gösterimi.



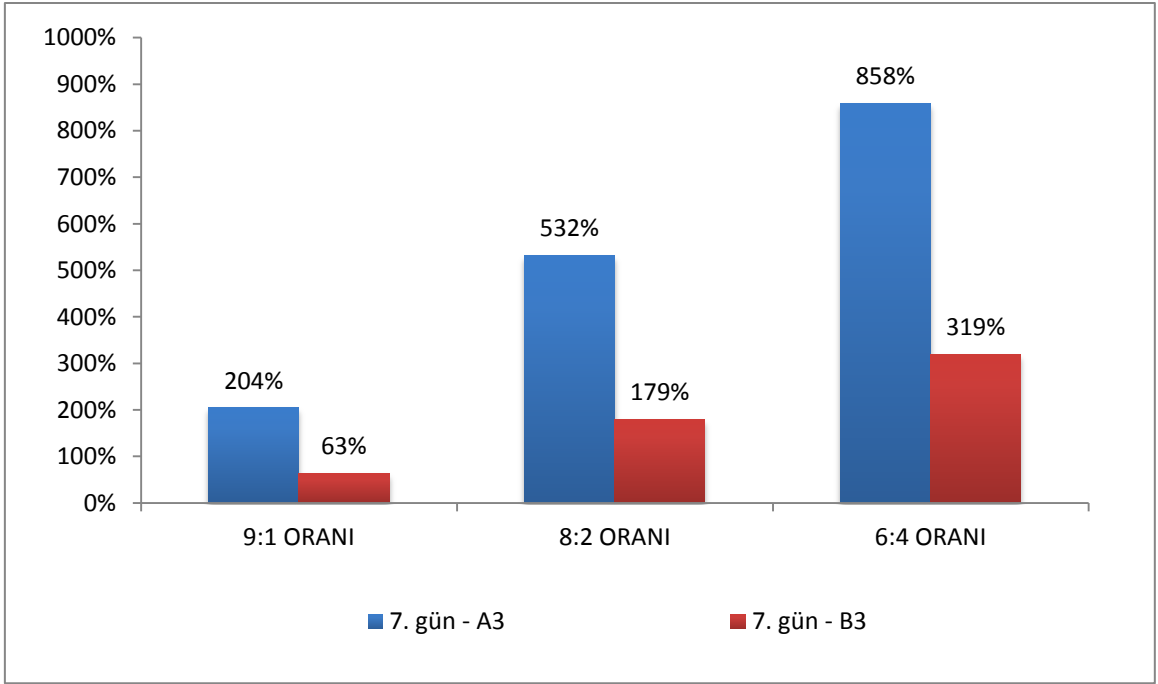
**Şekil.4.13.** 5. gün antijen yüklemesi yapılan A3 ve B3 grubu DH'lerin MTT analizi ile tespit edilen T hücre çoğalma verilerinin grafik ile gösterimi.



**Şekil.4.14.** 7. gün antijen yüklemesi yapılan A1 ve B1 grubu DH'lerin MTT analizi ile tespit edilen T hücre çoğalma verilerinin grafik ile gösterimi.



**Şekil.4.15.** 7. gün antijen yüklemesi yapılan A2 ve B2 grubu DH'lerin MTT analizi ile tespit edilen T hücre çoğalma verilerinin grafik ile gösterimi.



**Şekil.4.16.** 7. gün antijen yüklemesi yapılan A3 ve B3 grubu DH'lerin MTT analizi ile tespit edilen T hücre çoğalma verilerinin grafik ile gösterimi.

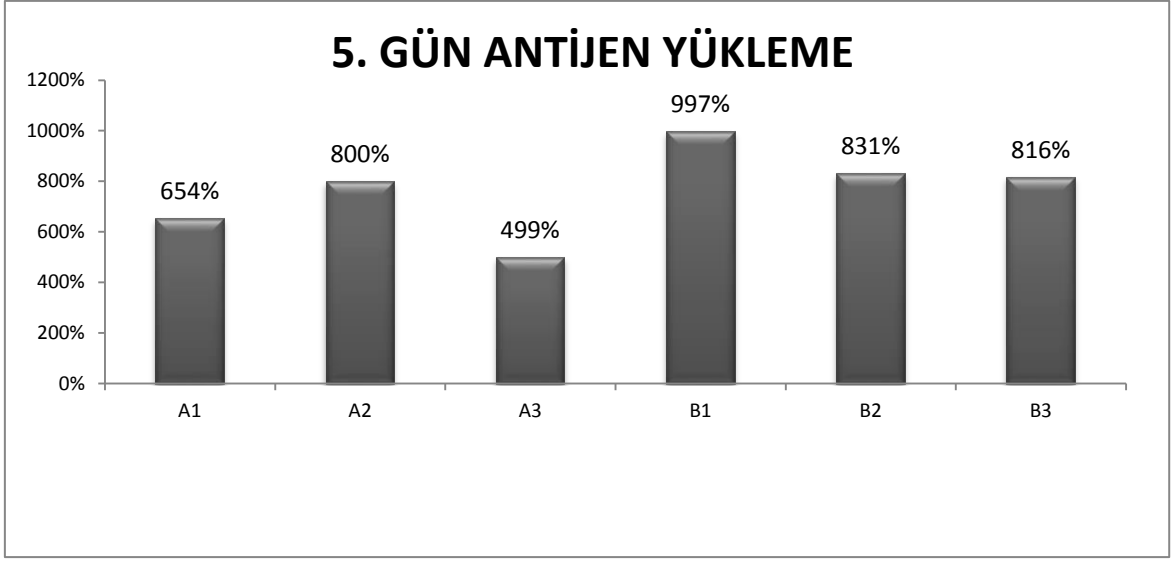
#### 4.5. Farklı Antijen Yükleme Zamanı ve Farklı Sitokin Grupları ile Elde Edilen DH'lerin Metabolik Aktiviteleri (MTT Bazlı)

DH kültürleri sonlandırıldıktan sonra her bir gruptan elde edilen DH'lere MTT bazlı aktivite testi uygulanmıştır. Çalışma verileri, çalışmalar üç kez tekrarlandıktan sonra elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması alınarak ve standart sapma ( $\pm$ SD) göz önünde bulundurularak değerlendirilmiştir. Beşinci gün antijen yüklemesi yapılan çalışmanın her bir grup için elde edilen sonuçların birbirleri arasında istatistiksel farklılığın belirlenmesi için t-testi kullanılmıştır. Gruplar arasında ( $p < 0,05$ ) anlamlı farklılık tespit edilmiştir. Benzer şekilde yedinci gün antijen yüklemesi yapılan gruplar arasındaki fark aynı istatistiksel yolla saptanmıştır.

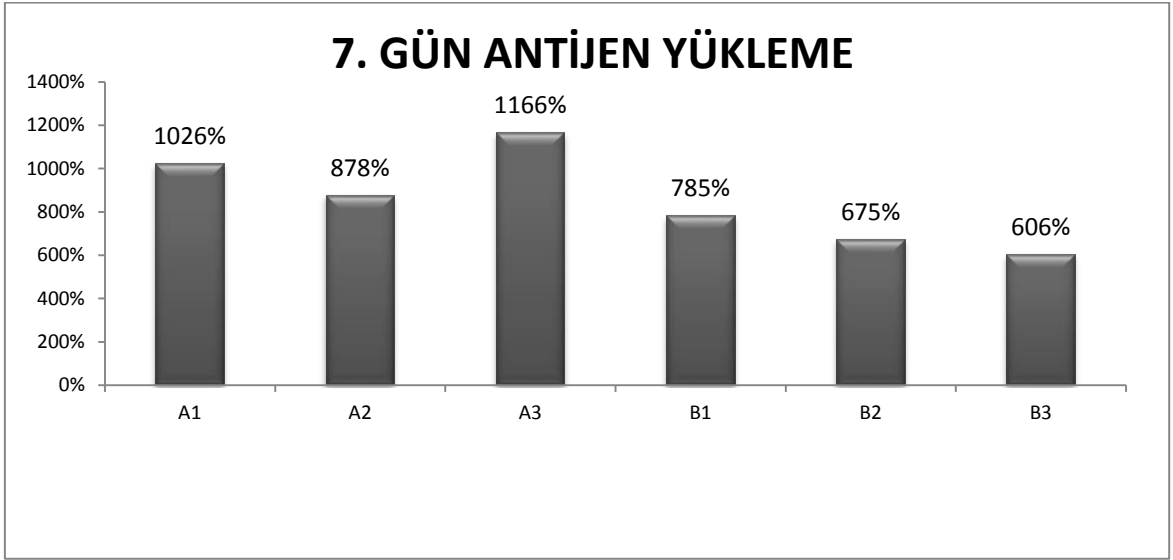
Çizelge 4.6 da beşinci gün ve yedinci gün antijen yüklemesi yapılmış gruplara ait metabolik aktivite oranları yüzde değer olarak ifade edilmiştir. Beşinci gün ve yedinci gün antijen yükleme çalışma grupları kendi içinde değerlendirildiğinde beşinci gün yükleme yapılması halinde IL-15 kullanılan B grubu, yedinci gün yükleme yapıldığında ise IL-4 kullanılan A grubu hücrelerinin daha yüksek metabolik aktiviteye sahip oldukları görülmektedir, (Şekil 4.17 ve şekil 4.18 )

**Çizelge 4.6.** DH'lerin MTT analizi ile tespit edilen metabolik aktivite verileri.

	5. GÜN ANTİJEN YÜKLEME	7. GÜN ANTİJEN YÜKLEME
A1	654%	1026%
A2	800%	878%
A3	499%	1166%
B1	997%	785%
B2	831%	675%
B3	816%	606%



**Şekil.4.17.** 5. gün antijen yüklemesi yapılan DH'lerin MTT analizi ile tespit edilen metabolik aktivite verilerinin grafik ile gösterimi.



**Şekil.4.18.** 7. gün antijen yüklemesi yapılan DH'lerin MTT analizi ile tespit edilen metabolik aktivite verilerinin grafik ile gösterimi.

## 5. TARTIŞMA

Kanser immunoterapisi neoplastik hücreleri tanımlamak ve yok etmek ya da tümör büyümesini kontrol altında tutmak için, tümör hücre antijenlerine karşı bağışıklık yanıtını oluşturmayı amaçlar. Bu amaçla geliştirilen bazı tedavi yaklaşımları özellikle minimal rezidüel hastalarında yaşam kalitesini ve süresini arttırabilmektedir. Bu yaklaşımlar arasında, araştırmacıların giderek artan ilgisi DH kullanarak lenfositlerin tümör antijenlerine karşı etkili bir biçimde uyarılması esasına dayalı immunoterapi üzerine odaklanmıştır (Lombardi and Yanira,2009). DH'ler bağışıklık düzenleme ve çok az sayıda olsalar dahi aktif haldeyken antijenlere karşı yüksek oranda bağışıklık yanıtı oluşturabilme kapasiteleri sayesinde, bugüne kadar kanser ve kronik intani hastalıkların tedavisi gibi çeşitli klinik uygulamalarda kullanılmıştır (Steinman and Banchereau, 2007). Yapılan çalışmalardan etkileyici miktarda veri elde edilmiş olsa da sonuçların umut edilen ile aynı boyutta olmadığı düşünülmüştür (Bodey, 2000 and Schuler, 2007). Elde edilen klinik başarılarla rağmen DH tabanlı anti-tümör immunoterapisi bazı kısıtlamalar nedeniyle tam olarak rutin bir klinik uygulama haline dönüşmemiştir. (Palucka and Banchereau, 2012)

Klinik düzeyde bağışıklık uyarıcı DH üretimi için, en uygun laboratuvar şartlarının oluşturulması ve özellikle DH'lerin immunostimulatör aktivitelerinin optimizasyonuna yönelik geliştirme çalışmaları devam etmektedir (Palucka and Banchereau, 2012 and Brussel et al, 2012). Çalışmamız ile günümüze kadar üzerinde çalışılmış yöntemler arasında en etkili olduğunu düşündüğümüz bileşenleri bir araya getirerek birbirleri üzerine olan etkilerini ve farklılıklarını incelemek suretiyle yeni bir model oluşturmayı ve bu yolla DH temelli immunoterapinin optimizasyonuna yönelik arayışa katkıda bulunmayı amaçladık.

DH temelli aşı geliştirilmesindeki kritik nokta, DH'lerin bağışıklık yanıtı uyarabilmelerinin büyük ölçüde aktivasyon şekline bağlı olduğudur (Brussel,2012). Başka bir deyişle DH'lerin uyarılması için seçilecek yöntem, aşı dizaynı için oldukça önemli bir bileşen olarak kendini göstermektedir (Dhodapkar et al. 2001). DH'lerin farklılaşması inflamatuvar uyarı ya da bakteriyel ürünler, lipopolisakkaritler ve yerel olarak üretilen GM-CSF, TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  gibi sitokinleri kapsayan mikroçevresel faktörler ile gerçekleşir. Bilinen bu temelden hareketle laboratuvar koşullarında monosit ya da CD34+ öncül hücrelerinden DH elde edilmesinde farklılaşma için GM-CSF ve ardından olgunlaşma için proenflamatuvar faktörler ve lipopolisakkarit gibi ikincil bir uyarıya gereksinim vardır (Saikh et al. 2001).



Laboratuvar şartlarında mononükleer hücrelerden DH farklılaştırılması için GM-CSF ve IL-4 yaygın olarak kullanılmaktadır (Saikh et al. 2001). Periferik kan monositlerinden yüksek antijen sunma ve T hücre stimule edebilen olgun DH elde edilmesinde, GM-CSF ve IL-4 varlığında farklılaşma ve takiben TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ve prostaglandin E2 pro-enflamatuar sitokin kokteyli ile uyarma altın standart olarak kabul edilmektedir (Anguille et al. 2009). Fakat yapılan çalışmalar ile mononükleer hücrelerden DH farklılaştırılmasında kullanılan IL-4 yerine IL-15 kullanılabileceği, IFN $\gamma$  sinyal yolunun ve antijen yükleme zamanlamasının DH olgunlaşmasında önemli olduğu gösterilmiştir (Bürdek et al. 2010), (Pan et al, 2004)

IL-15 T hücre çoğalmasını uyarmaya yeteneğine sahip olması ile tanımlanan birden fazla fenotipik özelliği etkileyen (pleyotropik) bir sitokindir. Yapılan çalışmalar IL-15 in doğal öldürücü hücre, B hücre ve IFN üreten öldürücü DH, çoğalmasını indüklediğini ortaya koymuştur. IL-15, CD8+ bellek T hücreleri, ve doğal öldürücü hücrelerinin farklılaşma ve devamlılığı için gereklidir. Ayrıca B hücrelerinden immunoglobulin sentezini tetiklemekte, DH gelişimini yönetmekte ve makrofajlardan pro-enflamatuar sitokinlerin üretilmesini uyarılmaktadır (Steel et al. 2010). IL-15 hem lenf nodu hem de kemik iliğinden köken alan bağışıklık sistemi hücrelerinin üzerinde etkili olmasından dolayı, kazanılmış ve doğal bağışıklığın düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir (Bykovskaia et al. 1999). IL-15'in doğal öldürücü hücreler ve doğal öldürücü T hücreler üzerinde büyük bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Moretta et al. 2002). Yapılan çalışmalarda IL-15'in, CD8+/CD44 yüksek oranda pozitif bellek fenotip T hücrelerinin, doğal öldürücü hücrelerin ve bellek T hücrelerinin devamlılığı için oldukça önemli olduğunu göstermiştir (Liu et al. 2000, Sprent et al. 2003). IL-15 sitokini ile ilgili olarak ilgi çekici başka bir özellik ise DH kökenli olan bu sitokinin, T hücre bağımlı özgün bağışıklık yanıtının, DH-T hücre etkileşiminde, pozitif bir geri sinyal olarak DH aktivasyonunda işlev gördüğüdür (Ruckert et al. 2003). Aynı şekilde bu otokrin döngünün DH'ler üzerindeki ko-stimulatuar moleküllerin artırarak, IL-15 ile B hücreleri arasındaki pozitif bir geri besleme mekanizması oluşturduğu düşüncesi ortaya koyulmuştur (Tourkova, 2002). Tüm bunlar IL-15'in direk olarak hücre bağışıklık üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. (Dubois et al. 2005)

GM-CSF ve IL-15 varlığında oluşturulan DH'lerin, GM-CSF ve IL-4 varlığında elde edilen hücrelere göre antijen özgün CD8+ T hücre uyarılmasında çok daha etkili olan, Langerhans hücre fenotipi ve karakteristiğinde olduğu rapor edilmiştir. (Dubsky et al. 2007)

and Anguille, 2009). Mohamadzadeh ve arkadaşlarının DH farklılaştırmasında IL-4 ve IL-15'i karşılaştırdıkları çalışmalarında, IL-15 DH'lerinin IL-4 DH'lerinden farklı olarak Langerhans hücrelerine özgün karakteristik özellikler olan E-kaderin, CC kemokin reseptörü 6 be Langerhans bağlantılı tanecik (Langerhans associated granules) ifade ettikleri gösterilmiştir (Mohamadzadeh et al. 2001). Langerhans hücrelerinin en önemli özelliği, hücrel ve humoral bağışıklık yanıtının en yüksek seviyede tutabilmesidir. Bu durum Langerhans hücrelerini ve buna bağlı olarak IL-15 temelli DH oluşumunu, güçlü bağışık yanıtı elde etmek amacıyla aşı dizaynı için oldukça önemli bir seçenek haline getirmektedir (Banchereau et al. 2009, Palucka et al. 2009).

Arimoto-Miyamoto ve arkadaşlarının yaptığı çalışma sonucunda IL-15 ile yapılan DH kültüründe, olgunlaşmadan önce güçlü bir şekilde plastiğe yapışma ile hücre kaybı ve maturasyon sonrası az sayıda uzantıya sahip DH oluşumu gösterilmiştir (Arimoto-Miyamoto et al. 2010). Çalışmamız sonucunda, IL-15'in hücre morfolojisi üzerine etkilerinin belirtildiği bu çalışma ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmamız boyunca zıt faz mikroskop ile yapılan incelemelerde ve kaydedilen görüntülerde IL-15 kullanılan tüm gruplarda kültür kabına yapışan hücre miktarının IL-4 kullanılan gruplara göre çok daha fazla olduğu, buna bağlı olarak IL-15 kullanılan kültür kaplarından daha az sayıda hücre elde edildiği tespit edilmiştir. Ayrıca, giemsa boyama yapılan preparatlar ışık mikroskobu ile incelendiğinde, IL-15 kullanılan gruplara ait hücrelerin daha kısa uzantılara sahip olduğu buna karşılık IL-4 kullanılan gruplarda çok daha uzun ve belirgin sitoplazmik çıkıntılarının olduğu gözlenmiştir.

Pulendran ve arkadaşlarının 4 ayrı grup oluşturarak yaptıkları çalışma sonucunda IL-15 varlığında elde edilecek DH'lerin kanser immunoterapisinde etkili bir role sahip olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada sadece GM-CSF, GMCSF+TGF- $\beta$ , GM-CSF+IL-4 ve GM-CSF+IL-15 varlığında DH elde edilmesine göre 4 ayrı grup incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda IL-15 varlığında elde edilmiş DH'lerin in-vitroda allojeneik CD8+ hücre uyarma kapasitelerinin IL-4 kullanılan gruba göre şaşırtıcı derecede yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu sonuç in-vivo olarak da doğrulanmış, IL-15 ile elde edilen DH'lerin yüksek seviyede tip 1 yardımcı T hücre sitokin profili ile, antijene özgün CD8+ T hücre cevabının diğer gruplara göre çok daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Ayrıca IL-15 DH'lerinin ko-stimulatuar faktörler CD40, CD80 ve CD86'yı yüksek oranda ifade ettiği belirlenmiştir (Pulendran et al. 2004). Çalışmamızda elde edilen tüm DH'lerin ko-stimulatuar faktörleri kabul edilen ölçütlerde ifade ettiği görülmüştür. Bunun yanında

5.gün ve 7.gün antijen yüklemesi yapılan gruplar karşılaştırıldığında IL-15 varlığında elde edilen DH'lerin 5.gün antijen yüklemesi ile daha yüksek oranda ko-stimulatuar faktör ifade edebildiği görülmüştür.

Dubsky ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları çalışmada IL-15 ve IL-4 ile elde edilmiş DH gruplarının her ikisi de melanoma peptidi ile yüklendiğinde IL-15'in çok daha düşük oranda peptit miktarına ihtiyaç duyduğu gösterilmiştir. İki grup karşılaştırıldığında IL-15-DH grubunun tümör özgün CD8+ T hücre çoğalmasını aynı zamanda IFN salınımı, Garanzyme B ve Perforin ifadesi ve melanoma hücre serilerini öldürme kapasitesini artırması ile işlevsel olarak IL-4 DH'lerine kıyasla oldukça üstün olduğu gösterilmiştir (Dubsky et al. 2007). Çalışmamızdaki gruplar T hücre çoğaltım kapasitelerine göre karşılaştırıldığında, IL-15 'li DH grubundaki hücrelerin standart olarak kabul edilen kültürün 5. günde antijen yüklemesi yapılması halinde IL-4'lü gruba göre çok daha etkin olduğu görülmüştür. Elde edilen hücre verimliliği bakımından IL-15 in IL-4'lü gruba göre daha düşük olmasında rağmen T hücre çoğalmasını daha yüksek oranda uyarması ilgi çeken bir sonuç olmuştur. Elde edilen DH hücrelerin metabolik aktivitelerine baktığımızda ise benzer şekilde 5. gün antijen yüklemesi yapılmış ve IL-15 varlığında oluşturulmuş DH'lerin daha yüksek metabolik aktiviteye sahip oldukları görülmüştür. IL-15'in etkilerinin incelenmesi üzerine yapılan çalışmalarda antijen yüklemesinin genellikle standart olarak kabul edilen 5. gün yapıldığı, 7. gün antijen yüklemesi esasına dayalı bir yöntem uygulanmadığı görülmüştür. Çalışmamızın sonucunda IL-15'in etkilerine ilişkin elde edilen verilerin, bu anlamda yapılan diğer çalışmalar ile uyumlu olduğu görülmektedir. Fakat IL-15'in 7.gün antijen yüklemesi yapıldığında IL-4'e göre aynı üstünlüğü sağlayamadığı tespit edilmiştir.

IFN $\gamma$  tip 1 yardımcı T hücrelerin çoğalmasını uyurarak allograft reddinde rol alan proinflamatuvar bir sitokindir ve bu özellikleri sayesinde monosit kökenli DH'lerin uyarılmasında da kullanılmaktadır (Rojas and Krishnan, 2010, Frasca et al. 2008). IFN $\gamma$  eksikliği bulunan farelerin, allograft nakil yapıldığında şaşkıncı olarak kısa sürede reddettiği görülmüş ve IFN $\gamma$ 'nın alloimmün yanıtın düzenlenmesinde farklı bir yere sahip olduğu düşünülmüştür. DH'lerin allograft reddinin başlangıcında önemli bir yere sahip olduğu düşünülerek IFN $\gamma$ 'nın DH ler üzerindeki etkileri laboratuvar koşullarında incelenmiştir. Bu amaçla, Rojas ve Krishnan'ın yaptığı çalışmada IL-4 ve GM-CSF ile farklılaştırılan DH'ler 0. gün ve 5. gün IFN $\gamma$  ile uyarılarak olgunlaştırılmış ve IFN $\gamma$  ile uyarılmamış gruba ait DH'ler ile karşılaştırmıştır, çalışmanın sonucunda IFN $\gamma$ 'nın DH

öncülleri üzerinde etkili olduğu ve bu yolla alloimunitenin düzenlenmesinde rol aldığı ortaya koyulmuştur. (Rojas and Krishnan, 2010).

Tang ve arkadaşlarının DH serisi ile yaptıkları bir diğer çalışmada ise IFN $\gamma$  ile uyarılmış DH'lerin MHC sınıf II molekülleri, CD40,CD80 ve CCR7'yi yüksek oranda ifade edebildiği ve in-vivo ve in-vitro çalışmalar ile CD8+ T hücre ve anti-tümör yanıtı daha etkili bir şekilde uyarabildiği gösterilmiştir. Tüm bu sonuçlar IFN $\gamma$ 'nın DH olgunlaşmasını pozitif yönde uyardığını ortaya koymuştur (Tang et al. 2007).

Kanser tedavisinde tip 1 yardımcı T hücre uyarılması ve IL-10 kullanımının azaltılması bir arada istenen bir durumdur. Frasca ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada IFN $\gamma$ 'nın, DH'lerden baskılayıcı, düzenleyici ve antiinflamatuvar süreçlerde etkili olan IL-10 salınımını düşürdüğü gösterilmiştir. Aynı çalışmada CD8+ T hücre öldürücü aktivitesinin IFN $\gamma$  varlığında üretilmiş DH ile uyarıldığını aynı zamanda yanıtlayıcı T hücre çoğalmasını uyararak otoimmün hastalıkların düzelmesinde de etkili olduğu ifade edilmiştir (Frasca et al. 2008).

Mailliard ve arkadaşları yaptıkları çalışmada DH'lerin ikincil uyarımı için standart olarak kabul edilen IL-6, TNF $\alpha$  ve PGE2 katkılı formül ile IL-1 $\beta$  ve TNF $\alpha$ 'nın IFN $\alpha$  ve IFN $\gamma$  ile birlikte kullanıldığı alternatif formülü karşılaştırmış ve IL-12 salınımı ve tümör özgül sitotoksik T hücre uyarılması bakımından daha güçlü DH'lerin elde edildiğini göstermişlerdir (Mailliard et al. 2004).

Çalışmamızda IFN $\gamma$ 'nın DH'ler üzerine olan etkileri göz önünde bulundurularak, DH olgunlaştırılmasında yaygın olarak kullanılan IFN $\alpha$ , TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  sitokinlerine IFN $\gamma$  da eklenmiştir. Çalışmamızın sonucunda IFN gammanın kullanıldığı gruplarda canlılık ve hücre sayısının diğer gruplara göre daha düşük olduğu fakat buna rağmen IL-15 ile birlikte, 5. gün antijen yüklemesi ile T hücre proliferasyonu açısından pozitif yönde etkili olduğu görülmüştür. Bu durumun kullanılan doza bağlı olduğu, uygun dozun belirlenmesiyle DH üretiminde kullanılmasının yarar sağlayacağı düşünülmektedir.

DH aşısı dizaynında bir diğer önemli parametre ise antijen yüklemesidir. Antijen yüklü matur DH'lerin enjeksiyonu, antijen spesifik T hücrelerin çoğalmasını sağlamaktadır (Dhodapkar et al. 1999). Başarılı bir MHC kısıtlı tümör antijen sunumu için birçok antijen yükleme yöntemleri denenmiştir (Thumann et al. 2003). DH'lerin tümör veya viral kökenli mRNA, DNA, peptid ile yüklenmesi yada tümör hücreleri ile direk birleşmesi gibi yöntemler antijen özgün bağışıklık yanıtının uyarılması için test edilmiştir (Brussel et al, 2012). Hayvan modelleri ile yapılan çalışmalar tümör türevli peptitler ile uyarılmış kemik

iliği kaynaklı DH'lerin antitümör sitotoksik T hücreler için etkili bir uyarıcı olduğunu açıkça ortaya koymuştur (Baar, 1999).

Thumann ve arkadaşları yaptıkları çalışmada antijen tipine göre 3 farklı yükleme metodunu karşılaştırmıştır. Bu çalışmada DH'ler farklı antijen tipleri olan nekrotik, apoptotik melanoma hücreleri ve lizat ile kültürün beşinci gününde yüklenmiştir. Eş zamanlı bir şekilde sitokin kombinasyonu olarak GM-CSF, IL-4, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ve prostaglandin E2 eklenmiştir. Çalışmanın sonucunda her  $1 \times 10^6$  DH için 5mg/ml oranında lizatın kültürün 5. gününde yüklenme metodunun diğer metotlara kıyasla daha etkili olduğu gösterilmiştir (Thumann et al. 2003).

Sadanaga ve arkadaşları yaptıkları çalışmada DH'lerin IL-4 katkılı sitokin kombinasyonu ile uyarılmasının ardından kültürün 7. gününde peptit yüklemesi yapılarak elde edilen DH aşıları 3 haftalık periyotlar ile 4 doz olarak hastalara uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda toksik etki saptanmaması, peptit özgün sitotoksik T lenfosit yanıtının oluşması, performans gelişimi ve tümör belirteçlerinin düşmesi ile peptit yüklü DH aşısının güvenli ve umut vaat eden bir yaklaşım olduğu ortaya koyulmuştur (Sadanaga et al. 2001).

Stift ve arkadaşlarının 4. evrede 20 hastaya üzerinde yaptığı çalışmada, uygulanan DH aşısı IL-4 katkılı sitokin kombinasyonu ile uyarılmasını takiben kültürün 5. günü tümör lizatı yüklemesi ile elde edilmiştir. Çalışmanın verileri dolaşan kandan elde edilmiş ve olog tümör lizatı ile uyarılmış DH'lerin güvenli ve tümör özgün hücrel sitotoksisiteyi uyurabildiğini ortaya koymuştur.

DH aşı üretiminde antijen yüklenmesine ilişkin yapılan çalışmalar incelendiğinde, kullanılan sitokin kombinasyonuna bağlı olmadan tasarlandıkları görülmektedir. Buna göre sonuçlar değerlendirildiğinde, 5. gün ve 7. gün antijen yüklemesi yapılan DH'lerin istenilen düzeyde etkiye sahip oldukları görülmektedir. Çalışmamız sonucunda iki farklı antijen yükleme zamanlamasının kullanılın sitokin kombinasyonuna göre değişiklik gösterdiği saptanmıştır. Buna göre IL-15 kullanılan gruplar T hücre çoğaltım kapasitelerine göre değerlendirildiğinde, 5.gün antijen yüklemesi yapılan DH'lerin 7.güne göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. IL-15 ile IL-4 içeren gruplar karşılaştırıldığında ise 5.gün antijen yüklenmesinde IL-15'in, 7.günde ise IL-4'ün daha aktif olduğu görülmüştür.

Daha etkin bir DH aşı modelinin geliştirilmesi ve yeni bir yöntem elde edilmesine yönelik, aşı üretiminin bileşenleri üzerinde değişiklikler yapılan çalışmalar devam etmektedir. Çalışmamız birbirinden ayrı olarak incelenen tüm bu parametreleri aynı anda

incelemesi ve birbirleri üzerine olan etkilerinin ortaya çıkarılması açısından bir ilk olma niteliği taşımaktadır. Yapılan çalışmalarda IL15'in ve IFN $\gamma$ 'nın DH'ler üzerindeki kanıtlanmış etkileri ve elde ettiğimiz veriler göz önünde bulundurulduğunda, bu tez çalışmasının etkin bir DH aşısı model adayını işaret ettiğini görmekteyiz. Buna göre IL-15, GM-CSF varlığında farklılaştırılmış DH'lerin ikincil uyarı olarak IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$  proinflatuar sitokinler ile uyarılması ve 5.gün antijen yüklemesi ile olgunlaştırılması sonucunda elde edilen DH'lerin bağışıklık yanıtını istenilen düzeyde uyarabilme kapasitesine sahip olduğu görülmektedir. Bu formül ile elde edilen DH'lerin Langerhans hücre belirteçlerini ifade edebilme oranlarının, antijen özgün CD8+ hücreler üzerine olan etkilerinin ayrıntılı ve karşılaştırmalı olarak incelenmesi ile daha kesin kanıtlar elde edilebilecektir.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada kanser aşısı tedavisinde etkili bir DH aşısı modelinin geliştirilmesi için, kültür şartları farklı yönlerden değiştirilerek birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak yüksek verimli DH aşısına ait özellikler açısından değerlendirme yapıldığında; Metabolik aktivitesi, T hücre çoğalma yeteneği, migrasyon yeteneği ve ko-stimulatuar faktör ekspresyonu yüksek bir model için kullanılabilir formül ortaya çıkmıştır. Bu çalışmanın verileri göstermiştir ki IL-15 + GM-CSF varlığında farklılaştırılan, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$  sitokin kombinasyonu ile maturasyonu sağlanan ve beşinci gün antijen yüklemesi yapılarak elde edilen DH'lerin tüm bu özellikler bakımından oldukça üstündür. Çalışmada ortaya çıkan IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ 'nın canlılık oranı üzerindeki negatif etkisinin farklı dozlar üzerinde yapılacak çalışmalar ile çözüleceği düşünülmektedir. Bu kombinasyonun düşük hücre sayısı ve canlılığa rağmen yüksek etkinliğe sahip olan DH'ler ortaya çıkarmasından hareketle, yapılacak doz çalışması sonrası çok daha etkin, yüksek canlılığa sahip hücre grubu elde edileceği düşünülmektedir.

Bu çalışma verilerinden elde edilen etkin aşısı modelinin hayvan modelleri üzerinde yapılacak çalışmalar ile, in-vivo etkinliğinin gösterilmesi ile, iyi bir DH aşısı modeli olarak kullanılabilir güvenli bir yöntem olduğu ortaya koyulacaktır.

## KAYNAKLAR

- Abbas A.K., Lichtman A. H. W. B. Saunders Co, (2004) Basic Immunology: Functions, Disorders of the Immune System. St. Louis.
- Aliberti, J.(2003) Cutting Edge: Bradykinin Induces IL-12 Production by Dendritic Cells: A Danger Signal That Drives Th1 Polarization. *J Immunol* 170(11):5349-5353.
- Anguille S, Smits ELJM, Cools N, Goossens H, Berneman Z.N2009) Short-term cultured, interleukin-15 differentiated dendritic cells have potent immunostimulatory properties. *J Transl Med* 7: 109
- Armitage, R. J., B. M. Macduff, J. Eisenman, R. Paxton, K. H. Grabstein.(1995) IL-15 has stimulatory activity for the induction of B cell proliferation, differentiation. *J. Immunol.* 154:483–490
- Banchereau J, Steinman RM, (1998) Dendritic cells, the control of immunity. *Nature.* 392(6673):245-52.
- Stagg, A. J. , Knight, S. C, (2001) Antigen-presenting Cells. *eLS.* April 2001
- Barchet, W., Cella, M. , Colonna, M, (2005) Plasmacytoid dendritic cells-virus experts of innate immunity. *Seminars in Immunology* 17(4):253-261.
- Bendriss-Vermare, N., Barthelemy, C., Dur, I., Bru, C., zutter-Dambuyant, C., Moulian, N., Berrih-Aknin, S., Caux, C., Trinchieri, G., Briere, F.2001) Human thymus contains IFN-alpha-producing CD11c(−), myeloid CD11c(+), , mature interdigitating dendritic cells. *J. Clin. Invest.* 107, 835–844.
- Briere, F., Bendriss-Vermare, N., Delale, T., Burg, S., Corbet, C, Risoan, M. C, Chaperot, L., Plumas, J., Jacob, M. C, Trinchieri, G., Bates, E. E, (2002) Origin, filiation of human plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol* 63, 1081-1093.
- Bulfone-Paus, S., D. Ungureanu, T. Pohl, G. Lindner, R. Paus, R. Ruckert, H. Krause, U. Kunzendorf, (1997) Interleukin-15 protects from lethal apoptosis in vivo. *Nat. Med.* 3:1124–1128.
- Bykovskaia, S. N., M. Buffo, H. Zhang, M. Bunker, M. L. Levitt, M. Agha, S. Marks, C. Evans, P. Ellis, M. R. Shurin, , J. Shogan, (1999) The generation of human dendritic, NK cells from hemopoietic progenitors induced by interleukin-15. *J. Leukoc. Biol.* 66: 659–666.
- Cella, M., Facchetti, F., Lanzavecchia, A., Colonna, M, (2000) Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus, CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat Immunol* 1, 305-310.
- Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., Colonna, M, (1999) Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes, produce large amounts of type I Interferon.
- Chaplin D. D, (2009) Overview of the immune response, *The Journal of Allergy, Clinical Immunology*, Volume 125, Issue 2, Supplement 2, Pages S3-S23February 2010)
- Coico R., Sunshine G., Benjamini E, (2003) Immunology: A short course. John Wiley, Sons, Inc., 5th edition.
- Comeau, M. R., Van der Vuurst de Vries, A. R., Maliszewski, C. R., Galibert, L, (2002) CD123bright plasmacytoid predendritic cells: progenitors undergoing cell fate conversion? *J Immunol* 169, 75-83.
- Coombes JL, Powrie F (2008) Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat Rev Immunol* 8(6):435-446.
- Cooper MA, Colonna M, Yokoyama WM, (2009) Hidden talents of natural killers: NK cells in innate , adaptive immunity. *EMBO Rep*;10:1103-10.
- Cyster, J.G, (1999) Chemokines, the homing of dendritic cells to the T cell areas of lymphoid organs. *J Exp Med* 189, 447-450



del Hoyo, G.M., Martin, P., Vargas, H.H., Ruiz, S., Arias, C.F., Ardavin, C, (2002) Characterization of a common precursor population for dendritic cells. *Nature* 415(6875): 1043-1047.

Denzer, K., van Eijk, M., Kleijmeer, M. J., Jakobson, E., de Groot, C., Geuze, H. J, (2000) Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. *J Immunol* 165, 1259.

Dhodapkar, M. V., R. M. Steinman, J. Krasovsky, C. Munz, N. Bhardwaj, (2001) Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J. Exp. Med.* 193: 233–238.

Dhodapkar, M. V., R. M. Steinman, M. Sapp, H. Desai, C. Fossella, J. Krasovsky, S. M. Donahoe, P. R. Dunbar, V. Cerundolo, D. F. Nixon, N. Bhardwaj, (1999) Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells. *J. Clin. Invest.* 104: 173–180.

Dranoff G, (2004) Cytokines in Cancer pathogenesis, cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 4:11-22.

Dubois, S. P., T. A. Waldmann, J. R. Muller, (2005) Survival adjustment of mature dendritic cells by IL-15. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:8662–8667.

Dubsky, P., H. Saito, M. Leogier, C. Dantin, J. E. Connolly, J. Banchereau, A. K. Palucka, (2007) IL-15-induced human DC efficiently prime melanoma-specific naive CD8+ T cells to differentiate into CTL. *Eur. J. Immunol.* 37: 1678–1690

Dzionek, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D. W., Schmitz, J, (2000) BDCA-2, BDCA-3, BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 165, 6037-6046.

Dzionek, A., Inagaki, Y., Okawa, K., Nagafune, J., Rock, J., Sohma, Y., Winkels, G., Zysk, M., Yamaguchi, Y., Schmitz, J, (2002) Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. *Hum Immunol* 63, 1133-1148.

E. Ovali<sup>1</sup>, T. Dikmen<sup>1</sup>, M. Sonmez, M. Yilmaz, A. Unal<sup>2</sup>, T. Dalbasti<sup>3</sup>, K. Kuzeyleli<sup>4</sup>, M. Erturk<sup>5</sup>, S.B. Omay<sup>1</sup> (2007) Active Immunotherapy for Cancer Patients Using Tumor Lysate Pulsed Dendritic Cell Vaccine: a Safety Study *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 26, 2.

Ebner, S., Ehammer, Z., Holzmann, S., Schwingshackl, P., Forstner, M., Stoitzner, P., Huemer, G. M., Fritsch, P., Romani, N, (2004) Expression of C-type lectin receptors by subsets of dendritic cells in human skin. *Int Immunol* 16, 877-887

Euvrard, S, (2008) [Skin cancers after organ transplants]. *Presse Med* 37, 1475-1479.

Facchetti, F., de Wolf-Peeters, C., Mason, D.Y., Pulford, K., van den Oord, J.J. Desmet, V.J, (1988) Plasmacytoid T cells. Immunohistochemical evidence for their monocyte/macrophage origin. *Am J Pathol* 133(1): 15-21.

Facchetti, F., Vermi, W., Mason, D., Colonna, M, (2003) The plasmacytoid monocyte/interferon producing cells. *Virchows Arch* 443(6): 703-717.

Fearnley DB, Whyte LF, Carnoutsos SA, Cook AH, Hart DNJ (1999) Monitoring human blood dendritic cell numbers in normal individuals, in stem cell transplantation. *Blood* 93(2):728-736.

Figdor, C. G., van Kooyk, Y., Adema, G.J, (2002) C-type lectin receptors on dendritic cells, Langerhans cells. *Nat Rev Immunol* 2, 77-84

Fraser, C.K., Brown, M.P., Diener, K.R., Hayball, J.D, (2010) Unravelling the complexity of cancer-immune system interplay. *Expert Rev Anticancer Ther* 10, 917-934.

Gallucci, S., Matzinger, P (2001) Danger signals: SOS to the immune system. *Current Opinion in Immunology* 13(1):114-119.

Galy, A., Travis, M., Cen, D., Chen, B, (1995) Human T, B, natural killer, dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* 3(4): 459-473.

Girolomoni, G., Caux, C, Lebecque, S., Dezutter-Dambuyant, C, Ricciardi-Castagnoli, P, (2002) Langerhans cells: still a fundamental paradigm for studying the immunobiology of dendritic cells. *Trends Immunol* 23, 6-8

Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L. NKT (2004) cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol.* 4:231-7.

Greensmith J, (2007). *The Dendritic Cell Algorithm*. Thesis (PhD). University of Nottingham.

Grouard, G., Dur, I., Filgueira, L., Banchereau, J., Liu, Y.J, (1996). Dendritic cells capable of stimulating T cells in germinal centres. *Nature* 384, 364-367.

Grouard, G., Risoan, M.C., Filgueira, L., Dur, I., Banchereau, J., Liu, Y.J, (1997). The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3, CD40-lig. *J Exp Med* 185(6): 1101-1111.

Gunn, M. D., Kyuwa, S., Tarn, C, Kakiuchi, T., Matsuzawa, A., Williams, L. T., Nakano, H, (1999) Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing, dendritic cell localization. *J Exp Med* 189, 451-460.

Harris K.M (2011) Monocytes differentiated with GM-CSF, IL-15 initiate Th17, Th1 responses that are contact-dependent, mediated by IL-15. *J Leukoc Biol* 90: 727-734.

Hart, D.N, (1997) Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90(9): 3245-3287.

Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., Ravetch, J. V., Steinman, R. M., Nussenzweig, M. C, (2001) Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* 194, 769-779.

Hegde, S., Chen, X., Keaton, J.M., Reddington, F., Besra, G.S., Gumperz, J.E, (2007) NKT cells direct monocytes into a DC differentiation pathway. *J Leukoc Biol* 81(5): 1224-1235.

Hoffbr, AV, Petit JE, (1994) Normal haemopoiesis, blood cells. In: Hoffbr, AV, Petitt JE, eds. *Clinical Haematology*, 2nd edn. London: Hardcover: 26.

Hou, W. S., Van Parijs, L, (2004) A Bcl-2-dependent molecular timer regulates the lifespan, immunogenicity of dendritic cells. *Nat Immunol* 5, 583-589.

Hume DA, (2008) Macrophages as APC, the dendritic cell myth. *J Immunol.*;181(9):5829-35.

Inaba K., (1992) Generation Of Large Numbers Of Dendritic Cells From Mouse Bone- Marrow Cultures Supplemented With Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Journal Of Experimental Medicine* 176(6):1693-1702

Janeway C.A., Medzhitov R, (2002) Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, 20:197-216.

Jarrossay, D., Napolitani G, Colonna M, Sallusto F, Lanzavecchia, A, (2001) Specialization, complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid, plasmacytoid dendritic cells. *European Journal of Immunology* 31(11):3388-3393.

Jason C. Steel, Charmaine A. Ramlogan<sup>1</sup>, Ping Yu<sup>1</sup>, Yoshio Sakai, Guido Forni, Thomas A.

Waldmann1, John C. Morris (2010) Interleukin-15, Its Receptor Augment Dendritic Cell Vaccination against the neu Oncogene through the Induction of Antibodies Partially Independent of CD4

K. U. Saikh, a. S. Khan, t. Küssner, r. G. Ulrich (2001) IL-15-induced conversion of monocytes to mature dendritic cells Laboratory of Molecular Immunology, Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, Frederick, MD, USA (Accepted for publication)

Kalinski, P., Okada, H, (2010) Polarized dendritic cells as cancer vaccines: directing effector-typeT cells to tumors. *Semin Immunol* 22, 173-182.

Karaöz, E., Demirel, S.(2001) Tıp Fakültesi Histoloji Embryoloji Ana Bilim Dalı, Özel Histoloji Ders Notları, Isparta.

Karolina Palucka, Hideki Ueno, Jacques Banchereau *J Immunol*, ( 2011) Recent Developments in Cancer Vaccines.

Katou, F., Ohtani, H., Saaristo, A., Nagura, H., Motegi, K, (2000) Immunological activation of dermal Langerhans cells in contact with lymphocytes in a model of human inflamed skin. *Am J Pathol* 156, 519-527.

Kaushansky, K, (1989) Control of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production in normal endothelial cells by positive, negative regulatory elements. *J Immunol* 143(8): 2525-2529.

Kılıçturgay K, (2003) Nobel-Güneş Kitabevi, İmmünoloji; Yenileştirilmiş 3. Basım, İstanbul.

Kim, R., Emi, M., Tanabe, K, (2007) Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 121, 1-14.

Kindt, T.J., Goldsby, R.A., Osborne, B.A. , Kuby, J, (2007) Kuby immunology W.H. Freeman, New York,)

Klechevsky E, Morita R, Liu M, Cao Y, Coquery S, Thompson-Snipes L, Briere F, Chaussabel D, Zurawski G, Palucka AK(2008) Functional specializations of human epidermal Langerhans cells, CD14+ dermal dendritic cells. *Immunity*; 29: 497–510. [PubMed: 18789730]

Lambrecht BN, (2005) Dendritic Cell, the regulation of the allergic immune response. *Allergy*; 60: 271-282.

Langerhans P (1868) Ueber die Nerven der menschlichen Haut. *Virchows Archiv* 44(2):325-337.  
Patterson BK,, (2002) Susceptibility to Human Immunodeficiency Virus-1 Infection of Human Foreskin, Cervical Tissue Grown in Explant Culture. *Am J Pathol* 161(3):867-873.

Langerin(2000) Novel C-Type Lectin Specific to Langerhans Cells, Is an Endocytic Receptor that Induces the Formation of Birbeck Granules *Immunity*, Vol. 12, 71–81, Copyright ©2000 by Cell Press

Lapenta, C., S. M. Santini, M. Logozzi, M. Spada, M. ,reotti, T. Di Pucchio, S. Parlato, , F. Belardelli, (2003) Potent immune response against HIV-1, protection from virus challenge in hu-PBL-SCID mice immunized with inactivated virus-pulsed dendritic cells generated in the presence of IFN-alpha. *J. Exp. Med.* 198: 361–367.

Lehrer, R.I., Ganz, T, (2001) Biochemistry , Function of Monocytes , Macrophages. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U, eds. *Williams Hematology*, 6th edn. New York: Mc Graw Hill.;865-869.

Lennert, K. , Remmele, W, (1958) [Karyometric research on lymph node cells in man. I. Germinoblasts, lymphoblasts, lymphocytes]. *Acta Haematol* 19(2): 99-113.

Leon, B., Lopez-Bravo, M. , Ardavin, C, (2007) Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania. *Immunity* 26(4):

519-531.

Lin, F. Butcher, E.C, (2008) Modeling the Role of Homologous Receptor Desensitization in Cell Gradient Sensing. *J Immunol* 181(12):8335-8343.

Lindhout, E. Vissers, J. L., Hartgers, F. C, Huijbens, R. J., Scharenborg, N. M., Figdor, C. G., Adema, G. J, (2001) The dendritic cell-specific CC-chemokine DC-CK1 is expressed by germinal center dendritic cells , attracts CD38-negative mantle zone B lymphocytes. *J Immunol* 166, 3284-3289.

Liu Y.J, (2001) Dendritic cell subsets, lineages, their functions in innate, adaptive immunity. *Cell*.106 (3):259-62.

Liu, C.-C., B. Perussia, J. D.-E. Young, (2000) The emerging role of IL-15 in NK-cell development. *Immunol. Today* 21: 113–116.

López MN, Pereda C, Segal G, Muñoz L, Aguilera R, González FE, Escobar A, Ginesta A, Reyes D, González R, Mendoza-Naranjo A, Larrondo M, Compán A, Ferrada C, Salazar-Onfray F, (2009) Prolonged Survival of Dendritic Cell–Vaccinated Melanoma Patients Correlates With Tumor-Specific Delayed Type IV Hypersensitivity Response, Reduction of Tumor Growth Factor Expressing T Cells.

Luther, S.A(2002) Differing Activities of Homeostatic Chemokines CCL19, CCL21, CXCL12 in Lymphocyte, Dendritic Cell Recruitment, Lymphoid Neogenesis. *J Immunol* 169(1):424-433.

Lutz M.B., Schuler G, (2002) Immature, semi-mature , fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *TRENDS in Immunology*, 23(9):445-449.

M.Sonmez Moleküler (2005) Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komitesi Temel Moleküler Hematoloji Kursu Dendritik Hücre İmmünobiyolojisi.

MacDonald, KP., Munster, DJ., Clark, GJ., Dzionek, A., Schmitz, J., Hart, D.N, (2002) Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* 100:4512–4520.

Matsue, H., Takashima, A, (1999) Apoptosis in dendritic cell biology. *J Dermatol Sci*20, 159-171.

Maurício W Perroud, Jr,1 Helen N Honma,1 Aristóteles S Barbeiro,1Simone CO Gilli,2 Maria T Almeida,2 José Vassallo,3 Sara TO Saad,2 Lair Zambon (2011) Mature autologous dendritic cell vaccines in advanced non-small cell lung cancer: a phase I pilot study. *J Exp Clin Cancer Res.* 17; 30: 65. doi: 10.1186/1756-9966-30-65.

Medzhitov R., Janeway C, (2002) Decoding the patterns of self, nonself by the innate immune system. *Science*, 296:298–300.

Mehmet Sonmez, MD, Ercument Ovali, MD, Tamer Dikmen, MD, Mustafa Yilmaz, MD, Murat Erturk, MD, PhD, Bircan Sonmez, MD, Serdar B. Omay, MD, PhD, (2007) The role of hepatocyte growth factor in the differentiation of dendritic cells from peripheral blood monocytes *Saudi Med J.* Vol. 28 (5): 688-695.

Merad, M., Manz, M. G., Karsunky, H., Wagers, A., Peters, W., Charo, I., Weissman, I. L., Cyster, J. G., Engleman, E. G, (2002) Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol* 3, 1135-1141.

Miller, M. J., Hejazi, A. S., Wei, S. H., Cahalan, M. D., Parker, I, (2004) T cell repertoire scanning is promoted by dynamic dendritic cell behavior, T cell motility in the lymph node. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 998-1003.

Minai-Fleminger Y, Levi-Schaffer F.(2009) Mast cells, eosinophils: the two key effector cells in allergic inflammation. *Inflamm Res.* 58:631-8.

Moretta, A, (2002) Natural killer cells, dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 957–965.

- Moser M, (2003) Dendritic cells. In *Fundamental Immunology*, W.E.Pul.
- Moser, B., Schaerli, P., Loetscher, P, (2002) CXCR5 (+) T cells: follicular homing takes center stage in T-helper-cell responses. *Trends Immunol* 23, 250-254.
- Mosmann, T., Livingstone, A, (2004) Dendritic cells: the immune information management experts. *Nature Immunology*, 5(6):564–566.
- Munz, C, Dao, T., Ferlazzo, G., De Cos, M. A., Goodman, K., Young, J. W, (2004) Mature myeloid dendritic cell subsets have distinct roles for activation , viability of circulating human natural killer cells. *Blood*.
- Ngo, V. N. Tang, H. L., Cyster, J. G, (1998) Epstein-Barr virus-induced molecule 1 lig, chemokine is expressed by dendritic cells in lymphoid tissues , strongly attracts naive T cells, activated B cells. *JExpMed* 188, 181-191.
- NIAID (National Institute of Allergy, Infectious Diseases) Science Education, NIH Publication No.07-5423, 2007, U.S Department of Health, Human Services National Institutes of Health, Underst, ing The Immun System How it Works, Bethesda.
- Ohl, L., Mohaupt, M., Czeloth, N., Hintzen, G., Kiafard, Z., Zwirner, J., Blankenstein, T., Henning, G., Forster, R, (2004) CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory, steady-state conditions. *Immunity* 21, 279-288.
- Ovalı (2007) *Dendritic Cells Therapy Journal compilation (2007) Blackwell Publishing Ltd. ISBT Science Series (2007)*
- Özyurt E, (2006) Dendritik Hücreler ve İmmunoterapi, *Türk Nöroşirürji Dergisi*,), Cilt: 16, Sayı: 1, 28-30.
- Palma M, Adamson L, Hansson L, Kokhaei P, Rezvany R, Mellstedt H, Osterborg A, Choudhury A, (2008) Development of a dendritic cell-based vaccine for chronic lymphocytic leukemia. Departments of Oncology, Hematology, Karolinska University Hospital, 171 76 Stockholm, Sweden. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, Volume 57, Number 11, November, pp. 1705-1710(6)
- Palucka K, Banchereau J (2012) Cancer immunotherapy via dendritic cells. *NatRev Cancer* 12: 265–277.
- Palucka, K., Banchereau, J. Mellman, I, (2010) Designing vaccines based on biology of human dendritic cell subsets. *Immunity* 33, 464-478.
- Paraskevas, F, (2004) Effector Mechanisms in Immunity. In: Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, eds. *Wintrobe’s Clinical Hematology*, 11th edn. Philadelphia: Lippincott-Williams,Wilkins, A Wolter Kluwer Co: 544-548.
- Pugh C, MacPherson G, Steer H (1983) Characterization of nonlymphoid cells derived from rat peripheral lymph. *The Journal of Experimental Medicine* 157(6):1758-1779.
- Qiu S, Ye S, Tang Z, Qian S, Li L, (2002) Feasibility of using hepatitis B virus surface antigen as target antigen in immunogen therapy against cancer] *Liver Cancer Institute, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China. Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 25;82(4):253-6.
- Qu, C, Edwards, E. W., Tacke, F., Angeli, V., Llodra, J., Sanchez-Schmitz, G., Garin, A., Haque, N.S., Peters, W., van Rooijen, N.(2004) Role of CCR8, Other Chemokine Pathways in the Migration of Monocyte-derived Dendritic Cells to Lymph Nodes. *J Exp Med* 200, 1231-1241.
- R,olph GJ, Angeli V, , Swartz MA (2005) Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol* 5(8):617-628.

Rolph, G.J., Beaulieu, S., Lebecque, S., Steinman, R.M., Muller, W.A., (1998) Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* 282(5388): 480-483.

Ratzinger, G., Baggers, J., de Cos, M. A., Yuan, J., Dao, T., Reagan, J. L., Munz, C, Heller, G., , Young, J.W., (2004) Mature human Langerhans cells derived from CD34+ hematopoietic progenitors stimulate greater cytolytic T lymphocyte activity in the absence of bioactive IL-12p70, by either single peptide presentation or cross-priming, than do dermal-interstitial or monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 173, 2780-2791.

Rissoan, M.C., Soumelis, V., Kadowaki, N., Grouard, G., Briere, F., de Waal Malefyt, R., Liu, Y.J., (1999) Reciprocal control of T helper cell, dendritic cell differentiation. *Science* 283(5405): 1183-1186.

Rolinski, J., Hus2010) I. Dendritic-cell tumor vaccines. *Transplant Proc* 42, 3306-3308.

Romani, N., Holzmann, S., Tripp, C. H., Koch, F., , Stoitzner, P, (2003) Langerhans cells – dendritic cells of the epidermis. *Apms* 111, 725-740. Rothenberg, E., Yui, M., Telfer2003)

Ross MH, Gordon IK, Powlina W, (2003) *Histology Text, Atlas*, 4th edn. Philadelphia, Lippincott-Williams, Wilkins, A Wolter Kluwer Co, 375-377.

Ruckert, R., K. Br,t, E. Bulanova, F. Mirghomizadeh, R. Paus, S. Bulfone-Paus, (2003) Dendritic cell-derived IL-15 controls the induction of CD8 T cell immune responses. *Eur. J. Immunol.* 33: 3493–3503.

Ruffini PA, Kwak LW, (2001) Immunotherapy of multiple myeloma.. Department of Experimental Transplantation, Immunology, Medicine Branch, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA. *Semin Hematol.* 38(3):260-7.

Saeki, H., Wu, M. T., Olasz, E., Hwang, S. T, (2000) A migratory population of skin-derived dendritic cells expresses CXCR5, responds to B lymphocyte chemoattractant in vitro, , co-localizes to B cell zones in lymph nodes in vivo. *Eur J Immunol* 30, 2808-2814.

Sallusto, F. Lanzavecchia, A, (2000) Understanding dendritic cell, T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol Rev* 177, 134-140.

Sangro B, Qian C, Schmitz V, Prieto J, (2002) Gene therapy of hepatocellular carcinoma, gastrointestinal tumors. Gene Therapy Unit, Department of Internal Medicine, Clinica Universitaria, Universidad de Navarra, Pamplona, Spain. *Ann N Y Acad Sci.* 963:6-12.

Schroeder JT, (2009) Basophils: beyond effector cells of allergic inflammation. *Adv Immunol.* 101:123-61.

Shi, Y., Evans, J.E., Rock KL (2003) Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 425(6957):516-521.

Shortman, K. Liu, Y.J (2002) Mouse, human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2(3):151-161.

Sozzani S,, (1998) Cutting Edge: Differential Regulation of Chemokine Receptors During Dendritic Cell Maturation: A Model for Their Trafficking Properties. *J Immunol* 161(3):1083-1086.

Sozzani, S., Luini, W., Borsatti, A., Polentarutti, N., Zhou, D., Piemonti, L., DAmico, G., Power, C. A., Wells, T. N., Gobbi, M, (1997) Receptor expression, responsiveness of human dendritic cells to a defined set of CC, CXC chemokines. *J Immunol* 159, 1993-2000.

Sporri, R., Caetano, C, (2005) Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation, promote expansion of cd4+ t cell populations lacking helper function. *Nature Immunology,* 6(2):163–170.

- Sprent, J, (2003) Turnover of memory-phenotype CD8 T cells. *Microbes Infect.* 5: 227–231.
- Steinman RM, Kaplan G, Witmer MD, Cohn ZA (1979) Identification Of A Novel Cell Type In Peripheral Lymphoid Organs Of Mice. 5.Purification Of Spleen Dendritic Cells, New Surface Markets, Maintenance In Vitro. *Journal Of Experimental Medicine* 149(1):1-16.
- Steinman RM, Witmer MD (1978) Lymphoid Dendritic Cells Are Potent Stimulators Of Primary Mixed Leukocyte Reaction In Mice. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 75(10):5132-5136.
- Steinman, R. M., Pack, M., Inaba, K, (1997) Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. *Immunol Rev* 156, 25-37.
- Steinman, R.M, (1991) The dendritic cell system, its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9: 271-296.
- Steinman, R.M., Hawiger, D. , Nussenzweig, M.C, (2003) Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21: 685-711.
- Summers, K. L., Hock, B. D., McKenzie, J. L., Hart, D. N, (2001) Phenotypic characterization of five dendritic cell subsets in human tonsils. *Am J Pathol* 159, 285-295.
- T.W. Alex, er Drive (2003) The first 1000 dendritic cell vaccinees Lineberry Research Associates, P.O. Box 14626, Research Triangle Park, 79, #4401, North Carolina 27709, USA. *Cancer Invest.* ;21(6):873-86.
- Tacke, F. , Rolph, G.J, (2006) Migratory fate, differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology* 211(6-8): 609-618.
- Tinhofer, I., I. Marschitz, T. Henn, A. Egle, R. Greil, (2000) Expression of functional interleukin-15 receptor, autocrine production of interleukin-15 as mechanisms of tumor propagation in multiple myeloma. *Blood* 95: 610–618.
- Tourkova, I. L., Z. R. Yurkovetsky, A. Gambotto, V. P. Makarenkova, L. Perez, L. Balkir, P. D. Robbins, M. R. Shurin, , G. V. Shurin, (2002) Increased function, survival of IL-15-transduced human dendritic cells are mediated by up-regulation of IL-15 R alpha, Bcl-2. *J. Leukoc. Biol.* 72: 1037–1045.
- Trapani, J.A. , Smyth, M.J, (2002) Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2(10): 735-747.
- Ueno, H., Klechevsky, E., Morita, R., Aspord, C., Cao, T., Matsui, T., Di Pucchio, T., Connolly, J., Fay, J.W., Pascual, V., Palucka, A.K. , Banchereau, J, (2007) Dendritic cell subsets in health, disease. *Immunol Rev* 219: 118-142.
- Valladeau J., Odile Ravel, Colette Dezutter-Dambuyant, Kevin Moore, Monique Kleijmeer, Ying Liu, Valerie Duvert-Frances, Claude Vincent, Daniel Schmitt, Jean Davoust, Christophe Caux, Serge Lebecque, Sem Sael,
- Van Nierop, K., de Groot, C, (2002) Human follicular dendritic cells: function, origin, development. *Semin Immunol* 14, 251-257.
- Weiss, J. M., Renkl, A. C, Maier, C. S., Kimmig, M., Liaw, L., Ahrens, T., Kon, S., Maeda, M., Hotta, H., Uede, T., Simon, J. C, (2001) Osteopontin is involved in the initiation of cutaneous contact hypersensitivity by inducing Langerhans , dendritic cell migration to lymph nodes. *J Exp Med* 191, 1219-1229.
- Weng N.P (2006) Aging of the immune system: How much can the adaptive immune system adapt? *Immunity*, 24(5):495-499.

Williams, C. Harry, R., McLeod J.(2007) Mechanisms of apoptosis induced DC suppression. Submitted to the Journal of Immunology.

Yanagihara, S., Komura, E., Nagafune, J., Watarai, H., Yamaguchi, Y, (1998) EB1/CCR7 Is a New Member of Dendritic Cell Chemokine Receptor That Is Up-Regulated upon Maturation. J Immunol 161(6):3096-3102.

Yoneyama, H., Matsuno, K., Zhang, Y., Nishiwaki, T., Kitabatake, M., Ueha, S., Narumi, S., Morikawa, S., Ezaki, T., Lu, B.2004) Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules. Int Immunol 16, 915- 928.

Zhang, A.L., Colmenero, P., Purath, U., Teixeira de Matos, C., Hueber, W., Klareskog, L., Tarner, I.H., Engleman, E.G. , Soderstrom, K, (2007) Natural killer cells trigger differentiation of monocytes into dendritic cells. Blood 110(7): 2484-2493.

Zheng Fan,<sup>1</sup> Xiao-Li Huang,<sup>1</sup> Luann Borowski,<sup>1</sup> John W. Mellors,<sup>1,2,3,4</sup> Charles R. Rinaldo Jr.<sup>1,3</sup> (2000) Restoration of Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Responses in CD8+ T Cells from Late-Stage Patients on Prolonged Antiretroviral Therapy by Stimulation In Vitro with HIV-1 Protein-Loaded Dendritic Cells.,\* 7th July /Accepted 28 January 2001



## ÖZGEÇMİŞ



<b>Ad Soyad</b>	<b>Fatma Eyüboğlu Ünüvar</b>
<b>Doğum Yeri Tarihi</b>	ELAZIĞ - 25.06.1983
<b>Uyruğu</b>	T.C.
<b>Medeni Durum</b>	Evli
<b>Çalıştığı Kurum</b>	Acıbadem Sağlık Grubu
<b>Adres</b>	Hurriyet mh. Spor cd. Camli sk. 8/10 Yakacık- Kartal - İSTANBUL 34876
<b>Posta Kodu</b>	34876
<b>Telefon</b>	541 309 16 49
<b>E-mail</b>	<a href="mailto:fteyuboglu@gmail.com">fteyuboglu@gmail.com</a>
<b>Eğitim</b>	
<b>Tarih</b>	09.2010 – devam ediyor
<b>Eğitim</b>	Yüksek Lisans - Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi
<b>Eğitim kuruluşunun adı</b>	Kocaeli Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
<b>Tarih</b>	09.2001 - 06.2006
<b>Eğitim</b>	Lisans - Biyoloji (İngilizce)
<b>Eğitim kuruluşünün adı</b>	Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi
<b>Tarih</b>	09.1997 - 06.2001
<b>Eğitim</b>	Lise – Fen Matematik
<b>Eğitim kuruluşünün adı</b>	Yakacık Süper Lisesi
<b>Yabancı Dil</b>	
<b>Ana Dil</b>	Türkçe
<b>Diğer Diller</b>	İngilizce
<b>Anlama: Dinleme/Okuma</b>	İleri seviye
<b>Konuşma</b>	İyi
<b>Yazma</b>	İleri seviye
<b>Mesleki Deneyimi</b>	
<b>Tarih</b>	04.2007 - .....
<b>Organizasyondaki pozisyon</b>	Biyolog
<b>Başlıca iş sorumlulukları</b>	Kordon kanı ve aferez ürünü kriyoprezervasyonu Kemik iliği, yağ doku ve dolaşan kandan mezenkimal kök hücre izolasyonu Kıkırdak dokudan kondrosit izolasyonu Deri dokudan fibroblast izolasyonu Kemik iliği ve dolaşan kandan mononükleer hücre izolasyonu Dendritik hücre aşısı üretimi Clinimacs TCR $\alpha/\beta$ Deplezyon Clinimacs CD34+ hücre zenginleştirilmesi Dondurulmuş ürün bankalama&depolama Dokümantasyon Method&Cihaz Validasyon
<b>Tarih</b>	11.2006 – 04.2007
<b>Organizasyondaki pozisyon</b>	Biyolog
<b>Başlıca iş sorumlulukları</b>	Bölge temsilcisi
<b>Kuruluş adı ve adresi</b>	Yaşam Bankası Kordon Kanı Bankası - Sancak M. Cidde C. No:12/15 A

## Bilimsel Etkinlikler

<b>Tarih</b>	27.07.2012 – 28.07.2012
<b>Kurs / program adı</b>	Clinimacs TCR $\alpha$ / $\beta$ Deplesyon Kursu
<b>Organizasyon adı</b>	Miltenyi Biotec
<b>Verildiği yer</b>	Acıbadem Labcell
<b>Tarih</b>	28.09.2011 – 02.10.2011
<b>Kurs / program adı</b>	Uluslararası katılımlı, 1. Kök Hücre Araştırmaları Kongresi Sözlü Bildiri – “Dendritik Hücre Üretim Optimizasyonu” Üçüncülük ödülü
<b>Organizasyon adı</b>	Kocaeli Üniversitesi
<b>Verildiği yer</b>	Güral Sapanca Otel
<b>Tarih</b>	26.01.2011
<b>Kurs / program adı</b>	Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sonbahar Bilgi Şenliği
<b>Organizasyon adı</b>	Sözlü Bildiri – “Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünesüpresif Etkileri”
<b>Verildiği yer</b>	Kocaeli Üniversitesi
<b>Tarih</b>	14.12.2010
<b>Kurs / program adı</b>	Uygulamalı Flow Sitometri Kursu
<b>Organizasyon adı</b>	Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi
<b>Verildiği yer</b>	Kocaeli Üniversitesi
<b>Tarih</b>	13.12.2010 - 17.12.2010
<b>Kurs / program adı</b>	Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu
<b>Organizasyon adı</b>	Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi
<b>Verildiği yer</b>	Kocaeli Üniversitesi
<b>Tarih</b>	03.03.2010
<b>Kurs / program adı</b>	İyi Üretim Uygulamaların – Validasyon Eğitimi
<b>Organizasyon adı</b>	Acıbadem Labcell Hücre Lab. Ve Kordon Kanı Bankası
<b>Verildiği yer</b>	Acıbadem Sağlık Grubu (Eğitmen: Prof. Dr. Ercüment Ovalı)
<b>Tarih</b>	03.03.2010
<b>Kurs / program adı</b>	GMP’ye Uygun Bina, Ekipman Ve Çevre Kontrolü Eğitimi
<b>Organizasyon adı</b>	Acıbadem Labcell Hücre Lab. Ve Kordon Kanı Bankası
<b>Verildiği yer</b>	Acıbadem Sağlık Grubu (Eğitmen: Prof. Dr. Ercüment Ovalı)
<b>Tarih</b>	02.03.2010
<b>Kurs / program adı</b>	İyi Üretim Uygulamaları – Dökümantasyon Eğitimi
<b>Organizasyon adı</b>	Acıbadem Labcell Hücre Lab. Ve Kordon Kanı Bankası
<b>Verildiği yer</b>	Acıbadem Sağlık Grubu (Eğitmen: Prof. Dr. Ercüment Ovalı)
<b>Tarih</b>	01.03.2010
<b>Kurs / program adı</b>	Hücre ve Gen Tedavilerinde İyi Üretim Uygulamaları Eğitimi
<b>Organizasyon adı</b>	Acıbadem Labcell Hücre Lab. Ve Kordon Kanı Bankası
<b>Verildiği yer</b>	Acıbadem Sağlık Grubu (Eğitmen: Prof. Dr. Ercüment Ovalı)
<b>Tarih</b>	26.04.2010
<b>Kurs / program adı</b>	ISO 9001: 2008, Kuruluş İçi Kalite Sistem Tetkikçisi
<b>Organizasyon adı</b>	Acıbadem Sağlık Grubu Kalite ve Standartizasyon
<b>Verildiği yer</b>	Acıbadem Sağlık Grubu (Eğitmen: Ayşe Nihan Karaçam)

<b>Tarih</b>	08.06.2009 - 12.06.2009
<b>Kurs / program adı</b>	Flow Sitometri Uygulamaları Kursu
<b>Organizasyon adı</b>	İstanbul Üni.Tıp Fak. İmmunoloji Ana Bilim Dalı & Becton Dickonson
<b>Verildiği yer</b>	İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Arş. Enst, (DETAM)
<b>Tarih</b>	05.03.2009 - 08.03.2009
<b>Kurs / program adı</b>	1. Ulusal Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Kongresi
<b>Organizasyon adı</b>	Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Derneği
<b>Verildiği yer</b>	Nevşehir Dedeman Otel
<b>Tarih</b>	20.12.2008 - 21.12.2008
<b>Kurs / program adı</b>	GMP (Good Manufacture Practice) Sertifika Programı
<b>Organizasyon adı</b>	Fatih Üniversitesi Kimya Ana Bilim Dalı & Kimyagerler Derneği
<b>Verildiği yer</b>	Fatih Üniversitesi