

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI HEMATOLOJİ BİLİM DALI

**MONOSİT KÖKENLİ DENDRİTİK HÜCRE GELİŞİMİNDE HEPATOSİT
GROWTH FAKTÖR'ÜN ROLÜ**

HEMATOLOJİ UZMANLIK TEZİ

Dr. Mehmet SÖNMEZ



Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ercüment OVALI

TRABZON-2004

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2-14
3. MATERYAL ve METOT.....	15-18
4. BULGULAR.....	19-31
5. TARTIŞMA.....	32-37
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	38
7. ÖZET.....	39
8. İNGİLİZCE ÖZET.....	40
9. KAYNAKLAR.....	41-46

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Dendritik hücreler (DH) immün cevabın düzenlenmesinde önemli rol oynayan beyin, testis ve göz haricinde tüm dokularda bulunan antijen sunan hücrelerdir (1,2). Özellikle henüz farklılaşmamış T lenfositleri uyararak primer immün yanıtın oluşmasına yol açmaktadırlar. Bu fonksiyonlarını gerçekleştirebilmek için antijeni yakalama, işleme tabi tutma ve uygun kostimulan moleküllerle hücre yüzeyinde sunma yeteneğine sahiptirler. Bu hücrelerin görünümü DH'ye spesifik olmayıp makrofaj ve B lenfositleride içeren bir çok hücrede benzer görünüm bulunabilir. Bundan dolayı DH'lerin morfolojik görünümünün yanında mutlaka fonksiyonel özelliklerinin tanımlanması gerekmektedir (1-3).

DH'ler özellikle immünoterapi uygulamalarında kullanılmak üzere vücut dışında uygun kültür ve sitokin ortamında üretilmektedirler. Üretim aşamasında granülosit makrofaj koloni stimulan faktör (GM-CSF), interleukin-4 (IL-4), tümör nekrozis faktör- α (TNF- α), kit ligand, fms-like tyrosine kinase ligand (Flt-3 L) ve interleukin-2 (IL-2) gibi sitokinler tek veya kombine olarak kullanılabilirler (4). Fetal dönemde hematopoezde önemli rol oynayan bir sitokin olan hepatosit growth faktör (HGF)'ün reseptörü c-met'in erişkinlerde saptanması ile HGF'nin ileri yaşta hematopoezde rol oynayabileceği düşünülmüş ve yapılan çalışmalarda HGF'nin kök hücrelerde proliferasyon ve differansiasyona neden olduğu gözlenmiştir (5,6). Monosit ve monosit öncülü hücrelerden HGF sekresyonunun gösterilmesinden sonra yapılan çalışmalarda HGF'nin monosit ve makrofaj fonksiyonlarında önemli rol oynadığı, bunun sonucunda nonspesifik immün yanıtı etkilediği saptanmıştır (7,8). Periferik ve kord kanı monositlerine HGF'nin etkilerini inceleyen çalışmalarda ise periferik kandaki monositlerin antijen sunma özelliği artarken kord kanı monositlerinde bu durum gözlenmemiştir (9,10). Buna karşın kemik iliği CD34+ hücrelerinden HGF ile DH geliştiği hatta bunun GM-CSF'ye göre daha da belirgin olduğu bildirilmiştir (11). Bunu takip eden çalışmalarda fare DH'lerinde HGF reseptörü c-met saptanmış ve HGF'nin DH fonksiyonlarında etkili olduğu belirtilmiştir (12).

Bizde bu tez çalışmamızda periferik kan monositlerinden DH gelişiminde, henüz DH üzerine tam etkisi bilinmeyen HGF'nin etkilerini araştırmayı planladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 DENDRİTİK HÜCRE

DH'ler immün cevabın düzenlenmesinde önemli rol oynayan beyin, testis ve göz haricinde tüm dokularda bulunan antijen sunan hücrelerdir (1,2). DH'lerin öncelikli fonksiyonu antijen sunmak olduğundan bu hücrelere profesyonel antijen sunan hücrelerde denilmekte ve özellikle henüz farklılaşmamış T lenfositleri uyararak primer immün yanıtın oluşmasına yol açmaktadırlar. Bu fonksiyonlarını gerçekleştirebilmek için antijeni yakalama, işleme tabi tutma ve uygun kostimulan moleküllerle hücre yüzeyinde sunma yeteneğine sahiptirler. Aynı zamanda DH'ler B hücre fonksiyonlarının oluşumunda etkili olduklarından humoral immünitinin gelişiminde de önemli rol oynamaktadırlar (1-3).

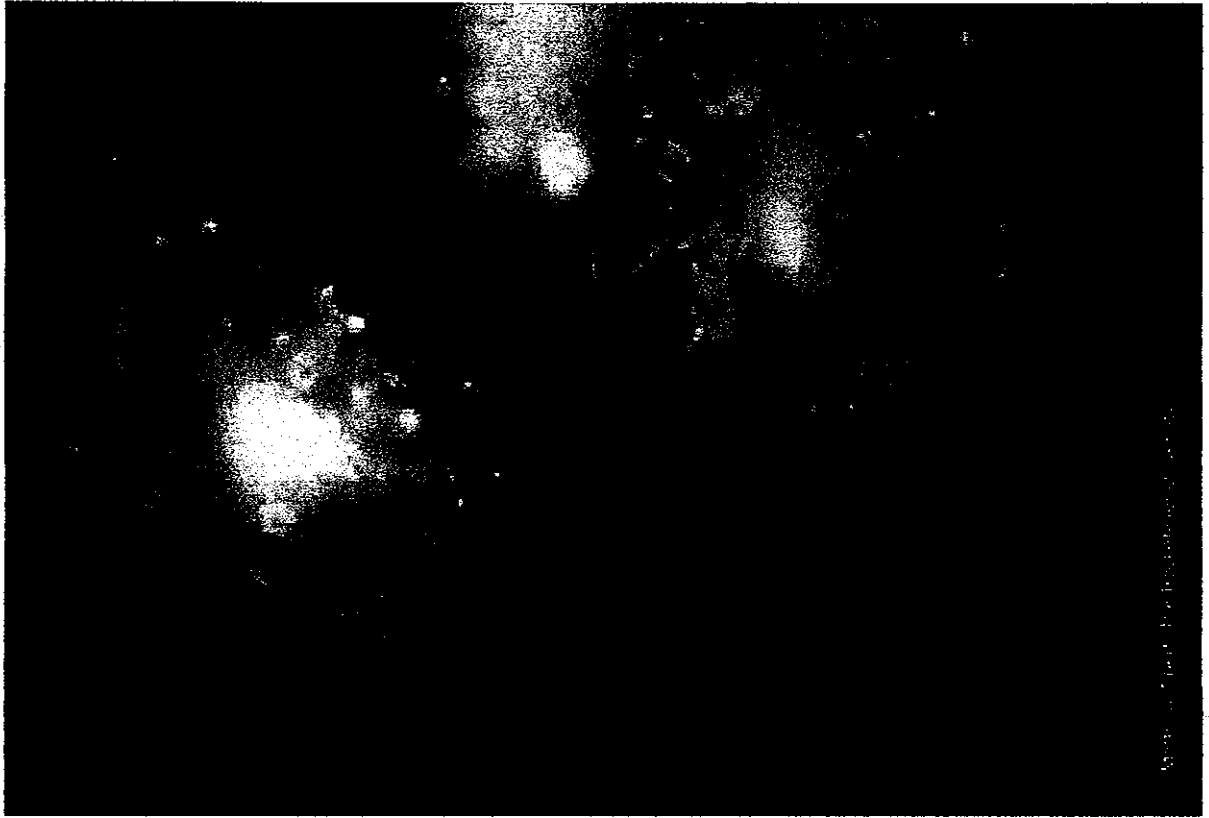
2.1.1 Tarihçe

DH'ler ilk olarak Langerhans tarafından tanımlanmış ve nöronal kökenli olduğu düşünülmüştür. Takiben 1973 yılında Ralph Steinman tarafından dalakta dendritik şekilli hücre grubu olarak tanımlanmıştır (13). Bu tespitten kısa bir süre sonrada bu hücrelerin sadece dalakta değil birçok lenfoid ve lenfoid olmayan dokuda bulunduğu tespit edilmiştir. Ancak 1980'li yıllara kadar makrofajların DH'lere göre vücutta bol miktarda bulunmasından dolayı, makrofajların antijen sunma yeteneğine sahip hücreler olduğu kabul görmüştür. Bu görüşte DH'lerin vücutta az miktarda olmasından dolayı bu hücreler hakkında bilgi edinmek amaçlı çalışmaların yapılamaması etkili olmuştur. 1990'lı yıllarda araştırmacıların in vitro CD34+ kemik iliği hücreleri ve CD14+ monositlerden DH oluşumunu başararak bu hücrelerin immün sistemdeki etkileri daha geniş olarak anlaşılmış ve klinik olarak DH tedavi prosedürleri uygulanmaya başlanmıştır (14,15).

2.1.2 Tanım

DH'leri sadece morfolojik görünümüleriyle tanımlamak yeterli olmayıp, morfolojik görünümünün yanında yüzeyindeki çeşitli moleküllerin varlığının veya yokluğunun ve fonksiyonel yeteneklerinin tanımlanması gerekmektedir.

DH'lerin ana morfolojik görünümü hücre yüzeyinden dışarı doğru çok miktarda membran uzantılarının varlığıdır (Resim 1). Ancak bunun yanında antijeni işleme tabi tutma fonksiyonlarını yapabilmek için endosom, lisosom ve epidermisdeki langerhans hücrelerinin Birbeck granülleri gibi bol miktarda intrasellüler yapılarda mevcuttur.



Resim 1: DH'nin morfolojik görünümü (Luekine sargramostim healthcare professionals'dan)

DH'lerin saptanmasındaki başlıca zorluk henüz DH'yi spesifik olarak tanımlayan hücre yüzey belirleyicisinin tespit edilememiş olmasıdır. Bundan dolayı da DH'yi tanımlamak için çeşitli yüzey belirleyicilerinin varlığı veya yokluğunun birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir. Bunların neler olduğuna baktığımızda;

a. CD3 (T cell), CD14 (monosit), CD19 (B cell), CD56 (NK cell), CD66b (granulosit) gibi çeşitli spesifik yüzey belirleyicilerinin yokluğunda bol miktarda MHC klas II antijenlerinin varlığı,

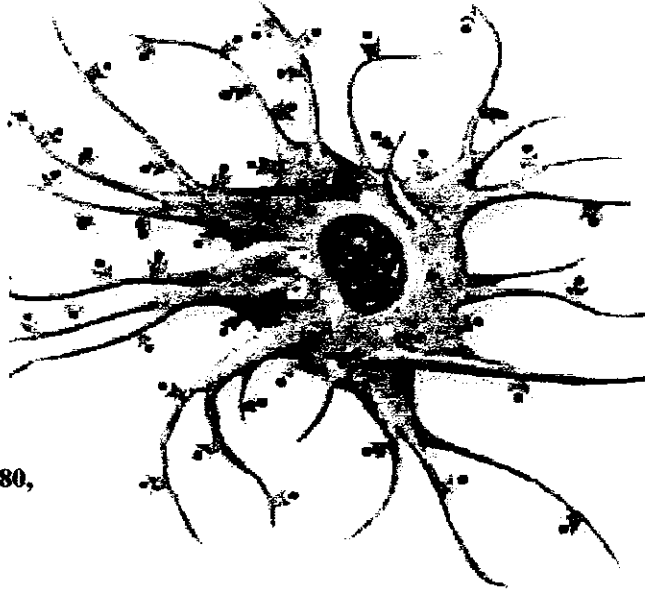
b. CD11a (LFA-1), CD11c, CD50 (ICAM-2), CD54 (ICAM-1), CD58 (LFA- β) ve CD102 (ICAM-3)'yi içeren adezyon moleküllerinin varlığı,

c. Kostimulan moleküllerden aktivasyon belirleyici olarak CD1a, CD80 ve CD86 ekspresyonu. CD86 erken maturasyon belirleyicisi iken CD80 sadece matür DH'lerde bulunmaktadır. Ayrıca CD83 ve CMRF-44 maturasyon belirleyici olarak kullanılmakla birlikte, CD83'ün aynı zamanda aktive B lenfositleri, CMRF-44'ün makrofaj ve monositleri boyadıklarına dikkat edilmelidir (Resim-2).

T lenfositlerle
oluşan immünite ve
tolerans için
spesifik antijen
sunumu

Yüksek aksesuar
moleküller:
ICAMs, LFAs

Yüksek kostimulan
moleküller: B7s (CD80,
CD86)



CD3, 14, 16, 19 olmaması

Yüksek antijen sunan
moleküller: MHC I-II ve
CD1

FcRs, C₃Rs düşük, zayıf
fagositoz ve adhezyon
yeteneği

GM-CSF'ye cevap:
canlılık, fonksiyon ve
büyüme

Resim 2: DH fonksiyonel özellikleri (Luekine sargramostim healthcare professionals'dan)

Yukarıdaki tanımlamadanda anlaşıldığı gibi henüz DH'ye spesifik tanımlanmış bir belirleyici yoktur. Pratikte basitçe diğer hücreler için spesifik yüzey belirleyicilerinin yokluğunda, yüksek MHC klas II seviyeleri ve CD 80,86 gibi kostimulan molekülünün varlığı ile tanımlanmaktadır (16-18).

2.1.3 Fonksiyonları

DH'nin fonksiyonları başlıca 3 grupta toplanır:

1. Antijen sunumu, T lenfosit bölgelerine migrasyon ve T lenfosit aktivasyonu,
2. İmmün toleransın oluşumu ve devamı,
3. Özellikle folliküler DH'de olmak üzere B lenfositler üzerinden humoral (bellek) immüntenin oluşturulması.

Bunları tek tek incelersek,

1. Antijen sunumu ve T lenfosit aktivasyonu:

DH'ler CD4+ ve CD8+ T lenfositleri aktive etmek için antijeni yakalar, onları işleme tabi tutup T lenfositlere sunarlar. Ancak diğer antijen sunan hücrelerden farklı olarak DH'lerin henüz farklılaşmamış T lenfositleri aktive etme yetenekleri bu hücreler açısından çok önemli bir özelliktir. İmmatür DH'ler kemik iliğinde yapıp tüm vücuda dağılırlar. Bu esnada DH'ler henüz herhangi bir patojen veya yabancı bir yapıyla

karşılaşmadığından immatür halde vücutta hazır olarak beklemektedirler. İmmatür halde dolaşımında bulunan DH'ler düşük seviyede CD2 ekspresyonu yapan monosit'lerden farklı fenotip, morfolojik ve fonksiyonel özelliklere sahiptirler. Antijenik uyarı geldiğinde lenfoid yapıda olmayan dokulara yönelirler. Bu işlevi gerçekleştirebilmek için adezyon molekülleri ve kemoatraktanlar (CC) yoluyla vasküler endotelyum ve hücre dışı ortamlarla etkileşimleri gerekmektedir. Dolayısıyla da immatür DH'ler adezyon molekülleri ve CC-kemokin reseptörleri (CCR) taşımaktadırlar. Aynı zamanda immatür DH'ler yabancı antijenleri daha kolay yakalamak için organların yüzeyine yerleşmiş olarak bulunurlar (19-22).

Herhangi bir şekilde doku bütünlüğü bozulup inflamasyon geliştiğinde veya antijenle karşılaşıldığında DH'ler bu alana doğru yönelip antijeni yakalamak ve içine alıp işleme tabi tutmak üzere uyarılırlar. Bu durumdan anlaşılacağı gibi immatür DH'lerin ana fonksiyonu antijeni veya yabancı cisimleri bulmak ve yakalamaktır. Antijen veya yabancı cisim yakalandığında ya eksojen ve endosomal yolla yada endojen ve proteosomal yolla işleme tabi tutulurlar. Bu işlemlerin nasıl gerçekleştiğine baktığımızda;

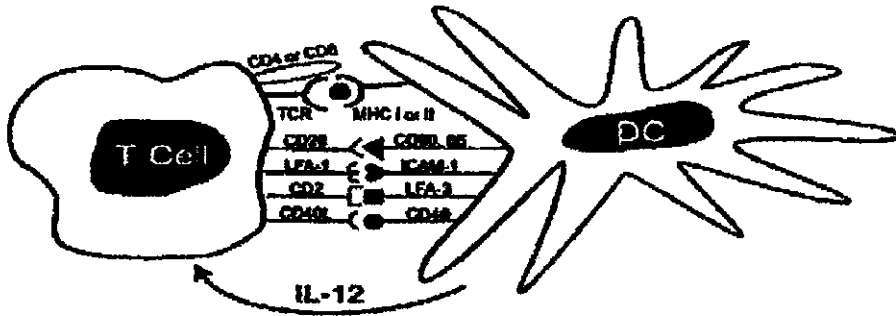
a. DH'ler diğer antijen sunan hücreler gibi eksojen ve ekstrasellüler antijenleri fagositoz, endositoz yolu ile içine aldıktan sonra bu antijenleri endozomlar içinde parçalarlar. Takiben yeni sentezlenen MHC klas II molekülleri ile membranda eksprese ederek CD4+ T lenfositlere sunarlar.

b. Antijen sunan hücreler endojen ve intrasellüler antijenleri kendi sitozollerinde parçaladıktan sonra yeni sentezledikleri MHC klas I molekülleri ile hücre membranından CD8+ T lenfositlere sunarken, DH'ler bu hücrelerden farklı olarak eksojen ve ekstrasellüler antijenleride bu yolla CD8+ T lenfositlere sunabilmektedirler. Buda eksojen ve ekstrasellüler antijenlere karşı direkt CD8 sitotoksik yanıtı neden olmaktadır. Dolayısıyla DH'lerin bu fonksiyonu, eksojen antijenlere karşı klasik antijen sunumundan farklı olarak CD4+ T lenfosit yardımı olmaksızın direkt CD8+ T lenfosit uyarımı yapabildiği anlamına gelmektedir.

Her iki işlemin gerçekleşmesi içinde DEC-205 ve mannoz reseptörlerinden oluşan c-tip lektin reseptörlerinin varlığı gerekmektedir (23,24).

Bir tane DH fazla miktarda kostimulan moleküller taşıdığından 100-3000 kadar T lenfosit uyarabilir, bundan dolayı diğer antijen sunan hücrelere göre 100 kat daha fazla antijen sunumu sağlayabilmektedir. DH'lerin yüzeylerinde bulunan CD58 (LFA-β), CD54

(ICAM-1), CD50 (ICAM-2), CD102 (ICAM-3), CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) gibi adezyon ve kostimulan moleküller ile T lenfositlerde bulunan CD2 ve CD28 gibi moleküller ilişkiye girerek primer immün yanıtın başlaması için gerekli sekonder sinyalleri oluştururlar (25,26), (Şekil 1).



Şekil 1: DH T lenfosit etkileşimi

DH'ler aynı zamanda interferon-gamma (INF- γ), interleukin (IL)-1, IL-6, IL-7, IL-12 ve IL-15 sekrete ederek primer immün cevapta etkili olmaktadır. Monositlerden gelişen DH'lerin IL-12 ile T helper (Th)1 ve IL-10 ile Th2 sitokin yanıtı oluşturduğu gözlenmiştir. IL-12 INF- γ sekresyonunu artırarak T lenfositleri Th1 fenotipine yönlendirerek T ve NK lenfositlerin sitotoksik etkilerini artırır. IL-10 ise kostimulan moleküllerin ekspresyonunu azaltıp IL-1, IL-6, IL-8, TNF ve GM-CSF gibi inflamatuvar sitokinleri baskılayarak Th yanıtı Th2' ye yönlendirmekte böylece DH maturasyonunu inhibe etmektedir (27,28).

İmmatür DH'ler antijenle karşılaşp antijeni yakalayınca immunitiyi başlatmak için lenfoid organlara göç ederler. Bu işlem yaklaşık 48 saat içinde gerçekleşmekte ve bu zaman sürecinde DH'lerde bir takım morfolojik ve fonksiyonel değişiklikler gözlenmektedir. Bunun sonucunda matür DH denilen immün yanıtın oluşmasını sağlayan aktif hücreler oluşmaktadır.

DH'lerin fonksiyonel ve morfolojik özellikleri:

Matür ve immatür DH'lerin morfolojik ve fonksiyonel olarak farklı özelliklere sahip olduğu saptanmıştır. Bu DH'lerin özelliklerinin neler olduğuna baktığımızda;

a. Öncül DH'lerin kemik iliğinde yerleştiği, CD4-, CD11c-, MHC klas I/II+/-, CD40-, CD80-, CD86- olduğu ve sitokin salınımı (IFN, TNF- α , IL-1) yaptığı gözlenir. Bunlar hematopoetik öncül hücreler olarakta bilinir. Örnek: CD34+ kök hücre

b. İmmatür DH'ler kan ve dokularda bulunup, CD4+, CD11c+, MHC klas I/II+/-, CD40+ (düşük), CD80+ (düşük), CD86+ (düşük) olan, sitoplazmik çıkıntıları oluşmaya

başlamış, antijen alımı için reseptörlere sahip, yüksek intrasellüler MHC klas II , yüksek CCR1-CCR5-CCR6 ve düşük CCR7'ye sahip antijeni tanıma ve yakalama özelliği olan hücrelerdir.

c. Matür DH'ler ise lenfoid organlarda yerleşmiş, CD4+, CD11c+, MHC klas I/II +/+, CD40+ (yüksek), CD80+ (yüksek), CD86+ (yüksek), CD83+, p55+ olan, belirgin sitoplazmik uzantıları, hızlı hareket yeteneği ve antijen alımı için reseptörleri azalmış, düşük CCR1-CCR5-CCR6 ve yüksek CCR7'ye sahip, T lenfosit sitokinlerini üretebilme özellikleriyle antijenin işlenmesi ve immünojenik antijenlerin sunumunu sağlayan hücrelerdir (19). (Tablo 1).

2. İmmün toleransın oluşumu ve devamı:

Spesifik bir antijene karşı immün sistemin yanıt oluşturmamasına tolerans denilmektedir. Bu olay iki şekilde oluşmaktadır.

a. Santral tolerans:

Santral tolerans T lenfositlerde timusta, B lenfositlerde ise kemik iliğinde oluşmaktadır. T lenfositlerinde santral toleransı oluşturan primer mekanizma T hücre ölümünün gerçekleşmesidir. DH'ler timusta bol miktarda bulunup, burada yeni üretilmiş T lenfositleri fonksiyonel CD8+ ve CD4+ hücreler olarak eğitirken aynı zamanda kendi vücuduna karşı geliştirebilecekleri immüniteyi engellemek için onları seleksiyona tabi tutarlar. Dolayısıyla kendi antijenlerine karşı düşük affiniteye sahip T lenfositleri seçip, periferik çıkmasına ve yaşamasına olanak sağlarlar. DH'nin taşıdığı proteinlerle (self antijen) etkileşime giren T lenfositler timusta negatif seleksiyonla ortadan kaldırılır. Bu işlemlerin sonunda MHC peptitlerini çok iyi tanıyan ancak self antijenlere duyarsız T lenfositler oluşmaktadır. Bu negatif seleksiyon işlemi timusta mevcut olan epitelyal hücreler rol oynamaktadır.

b. Periferik tolerans:

T lenfositlerindeki periferik tolerans T lenfosit ölümü, anergi ve regülatör T lenfositlerin supresyonuyla gerçekleşir. Th2 tipi DH IL-10 üreterek T lenfositlerde apoptosis'e yol açarken aynı zamanda bu sitokin regülatör Th2-Th3 T lenfositlerin oluşumunda neden olmaktadır. Ayrıca DH'ler T lenfositlerde anerjiye yol açarak toleransı etkilerler (29,30).

Tablo-1: DH maturasyon Özellikleri

	<u>İmmatür DH</u>	<u>Matür DH</u>
1- Dendritik çıkıntılar	Belirgin değildir	Çok belirginleşmiştir
2- Antijen yakalama		
Makropinositoz	++	-
Mannoz reseptörleri	++	-
Fc Reseptörleri	++	-
3- Antijen sunumu		
klas II Ag	++	++
klas II sentezi	++	-
klas II yarı ömrü	10 saat	>100 saat
klas I Ag	+	++
klas I sentezi	-	++
4- Co-stimulan moleküller		
CD80(B7.1)	-	++
CD86(B7.2)	-	++
5- Adhezyon molekülleri		
CD54(ICAM-1)	-	++
CD58(LFA-3)	±	++
CD83	±	++
6- T hücre stimülasyonu	+	+++

Avigan D. Blood Reviews 1999;13:51. Lanzavecchia A. Haematologica 1999;84:23

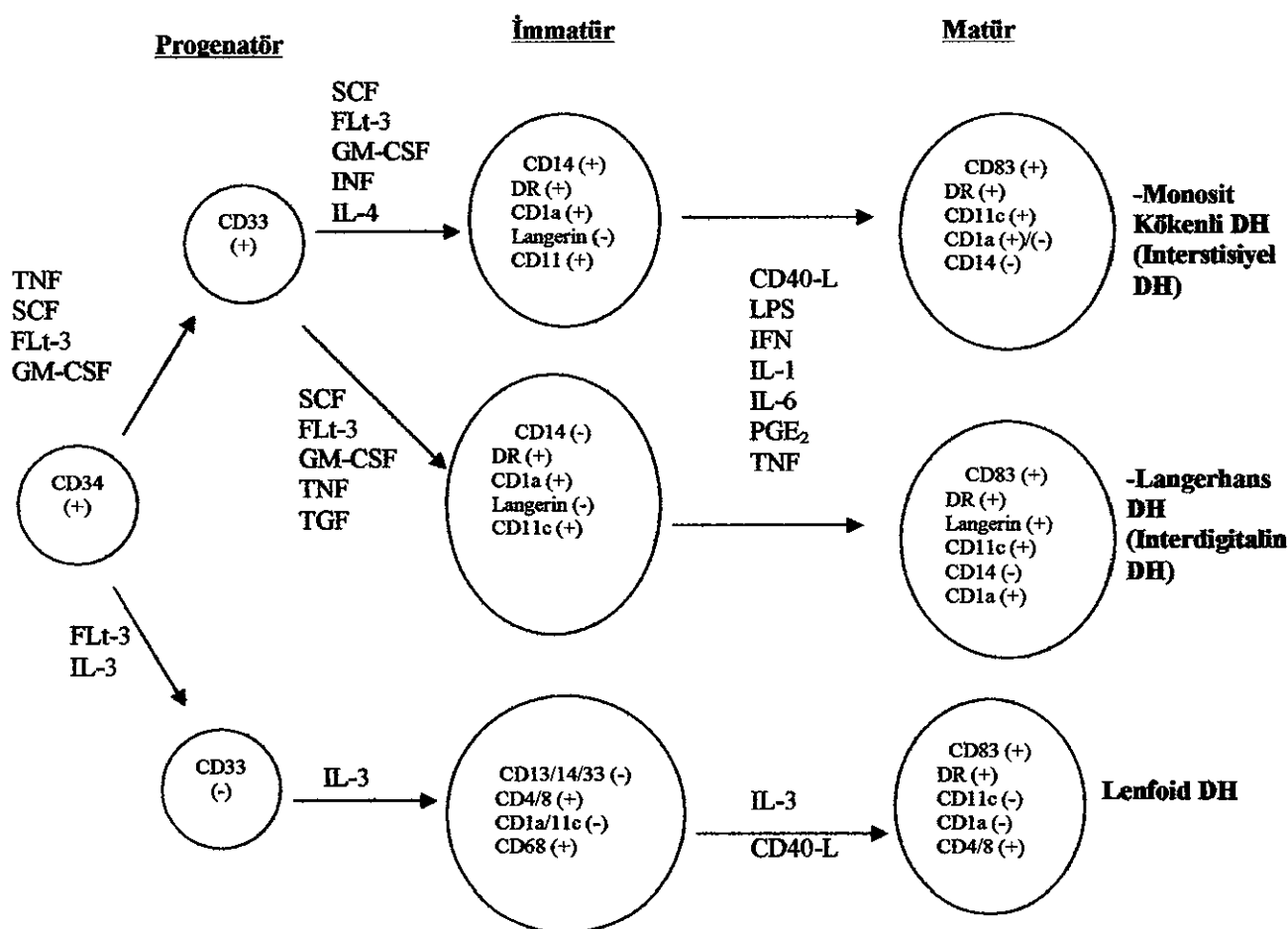
3. B lenfosit uyarımı :

DH'ler lenf nodunun T lenfosit alanlarında ve germinal merkezde B lenfositlerin uyarımını sağlayabilirler. DH'ler B lenfositlerin aktivasyon ve differansiasyonunda önemli rol oynayan çeşitli sitokin ve faktörler salgılayabilmektedirler. Lenf nodunun germinal merkezinde bulunan folliküler DH'ler B lenfositlerin belleğinin gelişiminde önemli rol

oyunlar. Folliküler DH'ler yabancı cisme karşı başlangıç antikor cevapta etkili olmayıp, antikor cevabı geliştikten sonra çok sayıda antijen antikor kompleksleri oluşturmaktadırlar. Folliküler DH'lerin antikorlar için depo ve B lenfosit uyarımının devamını sağlayan kaynak olarak görev yaptığına inanılır. Bu B lenfositler antijeni folliküler DH'den alıp T lenfositlere sunabilirler. Folliküler DH'lerdeki antijen antikor kompleks deposunun aylar hatta yıllarca sürebilen uzun bir süreçte tüketilebileceği sanılmaktadır (31,32).

2.1.4 Oluşumu ve farklılaşması

DH'ler ilk olarak hematopoetik kök hücrelerden kaynaklanıp, takiben kemik iliğinde miyeloid ve lenfoid seriden köken alan farklı iki tipte DH oluşmaktadır. Bu farklılaşmayı sağlayan ana sitokin ise Flt-3L olduğu saptanmıştır. İki DH hücre arasındaki en belirgin fark ise lenfoid DH'lerde CD8 α yüzey belirleyicisi mevcutken miyeloid DH'lerde bu belirleyici yoktur. İnsanda miyeloid DH'lerin klasik DH olduğu düşünülmektedir. Bu hücreler CD34+ myeloid kök hücreden ve monositlerden başlıca GM-CSF, IL-4 ve TNF- α varlığında oluşmaktadır. Oluşan DH matür hale geldiğinde interstisyel DH olarak bilinir. Bu hücrelerde başlangıçta CD14+, DR+, CD1a+ iken matür hale gelince CD14 negatifleşirken DR ekspresyonu artar ve CD11c ile CD83 pozitifleşir. Bu hücrelerin henüz farklılaşmamış CD4 ve CD8 T lenfositleri aktive etme yetenekleri olduğu gibi, aynı zamanda B lenfositleride antikor sekrete eden plazma hücrelerine doğru differansiye edebilmektedirler. İnterstisyel DH'ler lenfoid folliküllere göç edip orada folliküler DH'leri oluşturmaktadırlar. CD14 negatif olan CD34+ myeloid kök hücreler transforming growth factor (TGF)- β 'nın varlığında Langerhans DH olarak adlandırılan DH'ye dönebilmektedir. Bu hücrelerde ise CD14- iken DR+, CD1a+ ve langerin + olup maturasyonla birlikte CD83+ gözlenir. Langerhans DH ise farklılaşmamış T lenfositleri aktive ederken, B lenfositlere karşı etkisizdir. Langerhans DH'ler antijeni yakalayıp lenfoid dokuya gider ve orada antijeni T lenfositlere sunarlar. Lenfoid DH'ler ise CD34+ hücrelerden köken alıp lenfoid hücre yapısına yönelen ve IL-3, CD40L ile oluşumu gerçekleşen CD11c-, CD1a- hücrelerdir. Bunlar plasmasitoid DH olarak adlandırılırlar ve lenfoid dokulardaki T lenfosit bölgesinde bulunup IFN- α sekrete ederler (Tablo 2.) (33-35)



Tablo 2: DH gelişim özellikleri

2.1.5 Üretimi:

DH üretmek için başlıca iki yaklaşım söz konusudur.

1. Kemik iliğinden, kord kanından veya granülosit koloni stimulan faktör (G-CSF) ile perifere mobilize edilerek elde edilen CD34+ kök hücreler alınarak, uygun kültür ortamında ve uygun dozda GM-CSF, IL-4 ve TNF- α ile kültüre edilerek DH oluşumu sağlanır.

2. CD14+ monositlerden zengin periferik mononükleer hücreler uygun kültür ortamında ve uygun dozda GM-CSF ve IL-4 ile kültüre edildiğinde çok sayıda DH benzeri hücreler oluşur. Daha sonra bunlara TNF- α veya monosit conditioned media ilave edildiğinde antijene spesifik T lenfosit cevabını sağlayan DH oluşumu sağlanır.

Ancak üretimin başlangıcında kullanılan hücrenin özelliğine, elde edilmek istenen hücrenin tipine göre yukarıda belirtilen sitokinlere Flt-3L, stem cell factor (SCF), TGF- β , IL-3 ve CD40L eklenebilmektedir (18,33).

2.1.6 DH gelişiminde sitokinler ve bazı prostaglandinlerin etkisi:

GM-CSF: GM-CSF DH'nin gelişiminde en önemli mediatördür. Monositlerin MHC klas II ekspresyonunu artırarak fonksiyon ve metabolizmalarının artmasına neden olur ve böylece monositlerin büyük makrofaj benzeri hücelere differansiye olmasına yol açarlar. Ancak başlangıçta yapılan çalışmalarda kan ve kemik iliği kültürlerinde GM-CSF ile DH oluşumunun sağlandığı gözlenmesine rağmen daha sonra yapılan benzer çalışmalarda başarı oranının daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bundan dolayıda başarılı bir üretim için diğer faktörlerinde gerekli olduğu gündeme gelmiştir. GM-CSF ile periferik kan monositlerinden CD14/1a (+) DH oluşumu gözlenirken, ortama IL-4 ve TNF- α ilavesi ile daha bol ve daha spesifik DH oluşumu gözlenmektedir.

IL-4: Monositlerin DH'ye doğru differansiye olmasını sağlarlar. IL-4 makrofaj kolonilerinin oluşumunu inhibe ederken DH'lerin büyümesini ve maturasyonunu sağlamaktadır. Öncül hücrelerin IL-4 ile monositlere differansiye olması engellenir bunun sonucunda da CD14 ekspresyonu azalır. Dolayısıyla da DH differansiasyonunda IL-4 çok önemli rol oynamaktadır. GM-CSF ile birlikte kullanıldığında bol miktarda DH gelişimine neden olurlar.

TNF- α : CD34+ hücrelerin GM-CSF varlığında monosit ve granüositlere dönüşümüne engel olarak onların CD1a+ DH' ye dönüşümünü sağlarlar. Ayrıca monosit kaynaklı DH'lerin matür hale gelmesinde önemli rol oynamaktadırlar.

G-CSF, Stem cell faktör (SCF) ve Flt3-L: G-CSF'nin başlıca etkisi nötrofil üretimini ve maturasyonunu sağlamak olmakla birlikte, yakın zamanda Th2 yanıtı neden olan DH'lerin mobilizasyonunu sağladığı gözlenmiştir. SCF G-CSF'nin CD34+ hücreleri kemik iliğinden perifere mobilize etme etkisini artırırken aynı zamanda GM-CSF ve TNF- α ile kombine edildiğinde CD34+ kemik iliği hücrelerinden DH oluşumunu artırır. Flt3-L'inde başlıca etkisi kök hücreyi perifere mobilize etmek olmakla birlikte bunlarda SCF gibi DH oluşumunu artırmaktadır.

IL-3, IL-13: Her iki sitokinde DH gelişiminde değişik protokollerde kullanılmaktadır. IL-3 DH'nin geliştiği öncül hücrelerin canlılığında rol oynarken, IL-4'e çok benzer etki gösteren IL-13 DH maturasyonunda rol oynamaktadır.

IL-10: İmmunosupresif bir sitokindir ve özellikle DH'nin gelişimini, maturasyonunu ve fonksiyonlarını engelleyici etkileri vardır.

TGF- β : Kemik iliğinden gelişen DH'lerin maturasyonunu engeller. Dolayısıyla adezyon ve kostimulan molekül ekspresyonu azalmış ve T lenfositleri uyarıcı etkisi en aza inmiş DH'lerin oluşumuna yol açarlar.

IL-6, IL-1 β ve Prostaglandin E2 (PGE2): DH kültür ortamlarına katıldıklarında DH maturasyonunun çok daha belirgin olmasına yol açmaktadırlar.

Tüm bu tanımlanan sitokinlerin tek başlarına veya birlikte kullanılması DH gelişimi ve maturasyonunda etkili olup değişik klinik çalışmalarda kullanılmaktadır (4).

2.1.7 DH ile immünoterapi:

DH immünoterapi çalışmaları başlangıçta malign hastalıklarda immün cevabı artırmak amaçlı kullanılmakta olup, takip eden dönemlerde enfeksiyona yol açan patojenlere ve otoimmün hastalıklara neden olan otoreaktif lenfositlere karşı immünizasyonda da kullanım alanı bulmaya başlamıştır (36-38). DH ile immünoterapide, aşılama olarak adjuvant ve kansere karşı immüniteyi geliştirmek için direkt olarak uygulamalar gerçekleştirilebilmektedir. Değişik kaynaklardan üretilen DH'ler tümör lizati, tümör antijeninden elde edilen peptidler veya MHC klas I peptidler ile karşılaştırılıp takiben uygulandıklarında anti-kanser immun cevap ve aktivitenin ortaya çıktığı gözlenmiştir. Hatta bazı vakalarda komplet remisyonlar bildirilmiştir. Meme, akciğer, prostat, renal cell ve malign melanom gibi çeşitli kanserlerde geniş kapsamlı çalışmalar yapılmış ve sonuçları yayınlanmıştır. DH'lerin elde edilmesi, çoğaltılması, antijenle yüklenmesi ve hastaya infüze edilmesi işlemleri başarılı olarak gerçekleştirilirken, DH ile immünoterapide hangi antijen veya peptidin en iyi ve faydalı olduğuna dair çalışmalar halen devam etmektedir. Her kanser farklı bir özelliğe sahip olduğundan kansere karşı tam ve efektif bir immünite için birden çok antijene karşı immüniteye ihtiyaç duyulabileceği şüphesizdir. Gelecekte herbir kanseri tarayarak antijen kokteylini ortaya çıkarmak hangisinin immüniteyi uyardığına bakarak tedavi mümkün olabilir. Ayrıca DH'ye RNA veya DNA transfer ederek uygun antijen üretimi ve bunu yüzeyinde sunması sağlanabilir (38).

2.2 HEPATOSİT GROWTH FAKTÖR

2.2.1 Yapısal özellikleri ve fonksiyonları:

HGF bir disülfid aracılığıyla birbirine bağlanan 2 zincirden oluşan heterodimer yapıda bir sitokindir. α zinciri N- terminal alanına, β zinciri ise serin proteaz benzeri bir yapıya sahiptir. HGF başlangıçta biyolojik olarak inaktif glikoprotein öncülleri olarak tek

zincir yapıda sekrete edilir, takiben uygun durumlarda proteolizis ile aktif hale dönüşür. Bu dönüşümde doku düzeyinde plasminojen aktivatörlerinin önemli rolleri vardır. HGF c-met olarak adlandırılan reseptörleri aracılığıyla etki gösterir. c-met reseptörlerinin oluşumu MET protoonkogeni tarafından yönetilir ve özellikle tirozinkinaz aracılığıyla fonksiyonlarını gerçekleştirirler. IL-1, fibroblast büyüme faktörü, trombosit büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü ve prostoglandinler HGF ekspresyonunu artırırken, heparin gibi polisakkarid sülfadlar HGF sentezini uyarır fakat sentez sonrasında etki etmezler. TGF- β ve glukokortikoidler ise HGF ekspresyonunu inhibe etmektedir. HGF ve HGF reseptörü c-met, bronşial epitel hücrelerde, dışdaki mezenkimal dokularda, kosta, kol ve bacak eklemlerinin kıkırdak bölgelerinde, böbrek, karaciğer, beyin, kalp gibi birçok dokuda bulunmakta ve hücrelerin gelişimi, olgunlaşması ve diğer dokulara yönelmesinde etkili olmaktadır (39-41).

HGF başlangıçta karaciğerin yenilenmesinde etkin olan sitokin olarak tanımlanmasına rağmen yapılan çalışmalarda etkilerinin sadece karaciğer üzerinde sınırlı kalmayıp birçok dokuda olduğu gözlenmiştir. HGF mezenkimal hücrelerden salınıp birçok epitelyal orijinli hücrede parakrin tarzda hücre çoğalmasına, aktivitesinin artmasına ve invazyonuna yol açarken, epitelyal karaciğer öncülü hücrelere benzer hücre gruplarında tubular yapıların oluşmasına neden olmaktadır. HGF'nin endotelyal hücreler için invitro ve invivo olarak angiogenik olduğu saptanmıştır. Dış gelişiminde, karaciğer ve böbrek regenerasyonunda etkili olup, ayrıca bu organlarda anti-apoptotik etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. Böbrek, over ve testisin mezenkimal hücrelerden epitelyal hücreye dönüşüm sürecinde etki gösterdiği gözlenmiştir. HGF kemik dokusunun yapılanmasında kemik yapımı ve yıkımı arasındaki dengeyi sağlayarak etki gösterir. Bunun yanında osteoklastlardan salgılanan HGF ise osteoklast ve osteoblastların reseptörlerini aktive etme özelliğine sahiptir. Monosit ve monosit öncülü hücrelerden salınan HGF eritroid hematopoetik öncül hücrelerin gelişiminde ve yaşam sürecinde etkili olmaktadır. Ayrıca sinir hücrelerinin gelişimi ve yaşamında da etkileri gösterilmiştir. Son zamanlarda papiller renal kanserlerde c-met reseptörlerinde gözlenen mutasyonlar kanserle ilişkilendirilmiş ve lösemi-lenfoma hücre dizilerinde, meme ve mesane kanserinde HGF ekspresyonunun arttığı saptanmıştır. Bunun üzerine yapılan çalışmalarda birçok kanser türünde HGF ve HGF reseptörü c-met'de değişimlerin olduğu gösterilmiştir (40, 42- 44)

2.2.2 Dendritik hücre oluşumuna etkisi:

Fetal dönemde hematopoezde önemli rol oynayan HGF'nin reseptörü c-met'in erişkinlerde saptanması ile HGF'nin ileri yaşta hematopoezde rol oynayabileceği düşünülmüş ve yapılan çalışmalarda HGF'nin kök hücrede proliferasyon ve differansiasyona neden olduğu gözlenmiştir (5,6). Monosit ve monosit öncülü hücrelerden HGF sekresyonunun gösterilmesinden sonra yapılan çalışmalarda HGF'nin monosit-makrofaj fonksiyonlarında önemli rol oynadığı ve bunun sonucunda nonspesifik immün yanıtı etkilediği saptanmıştır (7,8). Bunun yanında periferik ve kord kanı monositlerine HGF'nin etkisini inceleyen çalışmalarda, periferik kanda monositlerin antijen sunma özelliği artarken kord kanı monositlerinde bu durum gözlenmemiştir (9,10). Ancak bu çalışmalarda monositler, DH'ye dönüşümü sağlanmaksızın direkt olarak HGF ile inkübe edilmişlerdi. Buna karşın kemik iliği CD34+ hücrelerinden HGF ile DH geliştiği hatta bunun GM-CSF'ye göre daha da belirgin olduğu bildirilmiştir (11). Bunu takip eden çalışmalarda fare DH'lerinde HGF reseptörü c-met saptanmış ve HGF'nin DH fonksiyonlarında etkili olduğu belirtilmiştir (12).

3. MATERYAL METOT

3.1 GEREKLİ MALZEMELER:

Demirbaş malzemeler:

Akımsitometri (Epics XL Beckman Coulter), soğutmalı santrifüj (Rotina 35R), klas II hücre kültür kabini (Holten Laminair), invert mikroskop (Olympus), CO₂ inkübatörü (Binder), pipet (Rainin), eliza okuyucu (Anthos reader 2001).

Sarf malzemeleri:

Hücre kültür kabı (Cellstar greiner bio-one), pipet ucu, 96' lık hücre kültür kabı (orange scientific), ficollü tüp (Vacutainer CPT), human albumin %20 (Baxter), MTT solusyonu thiozoly blue (Sigma kat.no: m.5655), IL-4 (Sigma kat.no: I-4269), GM-CSF (Leucomax Aesca 400µg shering), PPD test tuberculin (BB-NCIP-ltd. Sofia-Bulgaria), TNF (Cell-genix: Kat.no:1006), DC Growth Medium (Cell-genix: Kat.no:2005), HGF (Sigma: Kat.no:H1404), CD86 FITC (Beckman Coulter:Kat.no:IM2729), CD83 PE (Beckman Coulter:Kat.no:IM2218), CD80 PE (Beckman Coulter:Kat.no:IM1976), CD14-FITC (Beckman Coulter:Kat.no:IM0650), HLA-DR-PE (Beckman Coulter:Kat.no:IM0464), RPMI 1640 medium (stem cell: Kat. No: 36750), CD1a-PE (Beckman Coulter:Kat.no:IM1942).

3.2 METOT:

3.2.1 Mononükleer hücre izolasyonu

Sağlıklı 5 donörden alınan 100 cc kan 10'ar cc'lik ficollü tüplere (Vacutainer CPT) aktarılıp 30 dk. 1400 rpm de santrifüj yapıldı. Üsteki serum kısmı atılarak mononükleer hücreler alındı. Mononükleer hücreler RPMI 1640+%0,5 HSA karışımı ilave edilerek 10 dk 1200 rpm santrifüj ile 2 kez yıkandı. Yapılan yıkama işlemi sonrasında üsteki kısım atıldı ve elde edilen hücrelerin üzerine 80cc olacak şekilde RPMI 1640+%0,5 HSA solusyonu ilave edildi. Hazırlanan bu hücre solusyonundan hücre sayımı yapıldı ve hücre sayısının $5 \times 10^6 / \mu\text{l}$ üzerinde olduğu saptandığında, süspansiyon 10'ar cc olarak 8 hücre kültür kabına dağıtıldı ve 2 saat 37 °C de inkübe edildi. Yapışmayan üsteki hücreler RPMI 1640+%0,5 HSA solusyonu ile tekrar 4 kez yıkanarak ortamdan uzaklaştırıldı ve sonuçta hücre kültür kabına yapışmış mononükleer hücreler elde edildi.

3.2.2 Dendritik hücre üretimi

Mononükleer hücrelerin bulunduğu kültür kablarına 9 cc olacak şekilde DC growth medium (%1 glutamin+%1 HSA ilaveli) ilave edildi. 8 kültür kabı katılacak sitokin karışımına göre kontrol (sitokinsiz), GM-CSF, IL-4, HGF, HGF+GM-CSF, HGF+IL-4, GM-CSF+IL-4, HGF+GM-CSF+IL-4 olmak üzere işaretlendi. Çalışma öncesinde herbir sitokin için uygun dozda (Dozlar GM-CSF: 100ng/ml, IL-4: 50ng/ml, HGF: 20ng/ml) 1 cc olarak hazırlanmış sitokinler kültür kablarına ilave edildi. Böylece DH gelişimi için 7 farklı sitokin kokteyli içeren kültür ortamı yaratıldı.

3.2.3 DH kültürünün izlemi

Mononükleer hücreler 5 gün boyunca 37°C ve %5 CO₂'li ortamda inkübasyona alındı ve 2, 3, ve 4. günlerde incelenip fotoğrafları çekildi. 5. gün fotoğraf çekimini takiben 2 cc örnek alınıp akımsitometri ile CD14, CD1a, HLA-DR, CD80, CD83, CD86 yüzey belirleyicileri çalışıldı. Takiben alınan örnek oranında eksilen DH growth medium ilave edilerek kontrol grubu hariç her bir kültür kabına 20ng/ml olacak şekilde TNF- α katıldı. 6 ve 7. gün fotoğraf çekimi yapıldı. 7. gün tekrar 2 cc örnek alınarak yukarıda tanımlanan yüzey belirleyicileri tekrar çalışıldı (45).

3.2.4 DH'lerin lenfosit proliferasyonu ve fonksiyonları üzerine etkisinin tayini

Kültür kaplarında kalan 8 cc kültür ortamı 20 μ g/ml PPD ile 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında hücreler irradie edildi. Daha önce kanları alınıp DH'leri üretilen 5 kişiden yeniden kan alınarak yukarıda tanımlandığı gibi lenfosit elde etmek için mononükleer hücreleri ayrıştırıldı. Mononükleer hücreler RPMI ile bir flaskta 2 saat inkübe edilerek flaska yapışan monositlerin dışında kalan lenfositler alındı ve 96 kuyucuklu hücre kültür kabınının her kuyucuğuna 1x10⁵ lenfosit/200 μ l içinde dağıtıldı. 96 kuyucuklu kültür kabı 8'li gruplara ayrıldı. 1. gruptaki kuyucuklara 20 μ g/ml PPD ile inkübe edilmiş irradie monositler 3 kez yıkandıktan sonra DC growth medium içinde 1000 otolog monosit/50 μ l olacak şekilde ilave edildi. Diğer gruptaki kuyucuklara DH üretim çalışmalarının yapıldığı 8 gruptan elde edilen DH'ler irradie edildikten sonra DC growth medium ile 3 kez yıkandı ve her bir kuyucuğa 1000 hücre/50 μ l olacak şekilde dağıtıldı. (1 uyarana 100 uyarılan hücre oranı oluşturuldu). Boş kalan kuyucuklara ise buharlaşmayı en aza indirmek amacıyla steril su dağıtıldı (Şekil 2). 48 saat inkübasyon sonrası lenfosit proliferasyonu ve fonksiyonlarını takip için MTT testi yapıldı.

3.3 İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler $\text{mean} \pm \text{stardart sapma}$ olarak hesaplanarak kontrole göre sitokin etkileri Mann Whitney-U testi kullanılarak karşılaştırıldı. Gruplar arası karşılaştırma ise Wilcoxon testi ile yapıldı.

4. BULGULAR

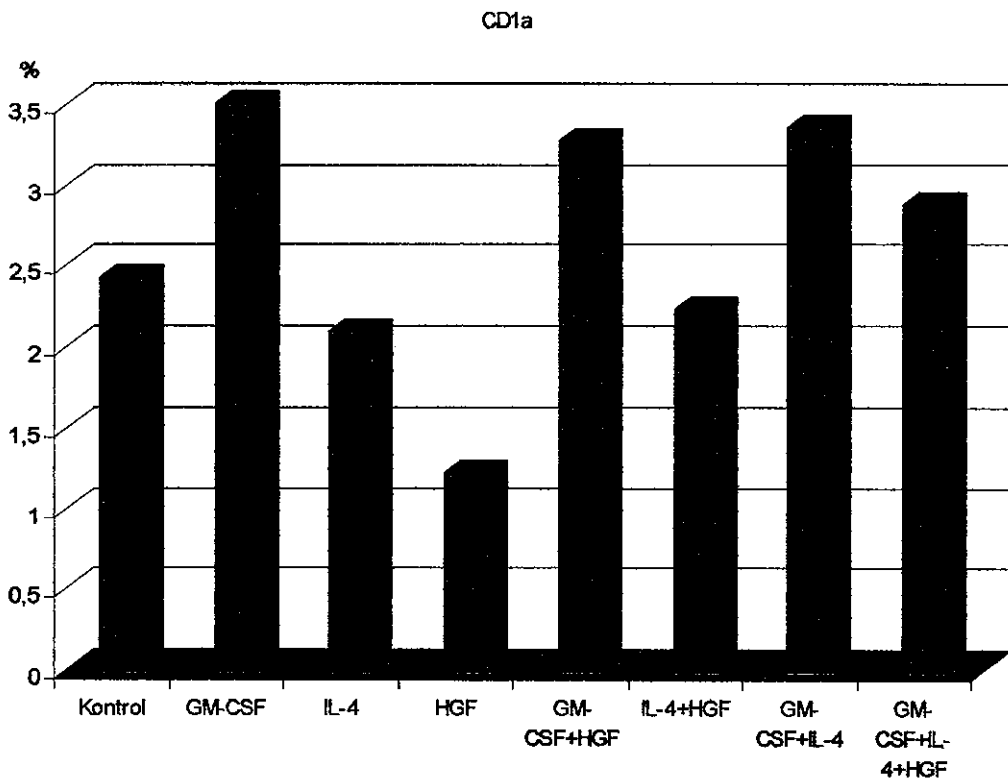
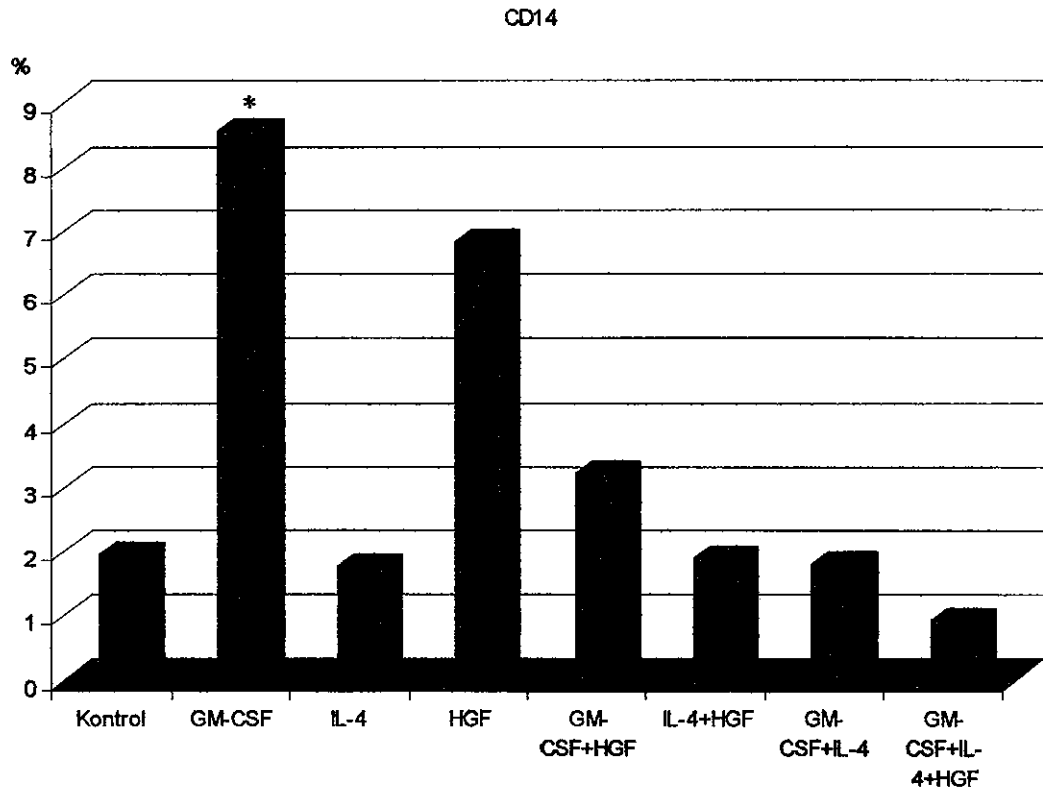
Periferik kandan elde edilen mononükleer hücrelerin GM-CSF, IL-4, HGF, HGF+GM-CSF, HGF+IL-4, GM-CSF+IL-4, HGF+GM-CSF+IL-4 olmak üzere 7 farklı sitokin karışımı ile DC growth medium içeren kültür ortamında 5 günlük inkübasyonunun sonrasında elde edilen yüzey ve kostimulan moleküllere ait akım sitometrik verileri kontrol (sitokinsiz) grubuyla karşılaştırdığımızda; HGF+GM-CSF+IL-4 ve GM-CSF+IL-4 grubunda HLA-DR, CD83 ve CD86 ekspresyonunun arttığı CD14, CD1a ve CD80 ekspresyonunun ise değişmediği gözlemlendi ($p<0.05$, $p<0.01$). GM-CSF grubunda ise HLA-DR, CD83, CD86 ve CD14 ekspresyonu artarken CD1a, CD80 ekspresyonunun değişmediği saptandı ($p<0.05$, $p<0.01$). Bunlara karşın IL-4+HGF grubunda HLA-DR ve CD83 ekspresyonu artarken CD14, CD1a, CD80 ve CD86 ekspresyonunun değişmediği ($p<0.05$, $p<0.01$), IL-4, HGF ve HGF+GM-CSF grubunda ise sadece HLA-DR ekspresyonunun arttığı CD14, CD1a, CD80, CD83 ve CD86 ekspresyonlarının değişmediği gözlemlendi ($p<0.05$). Ayrıca CD83 ekspresyonu GM-CSF grubuna göre GM-CSF+IL-4 grubunda, HGF grubuna göre HGF+IL-4 grubunda, GM-CSF+HGF grubuna göre GM-CSF+IL-4+HGF grubunda yüksek saptanırken, GM-CSF+HGF grubunda GM-CSF grubuna göre düşük saptandı ($p<0.01$) (Tablo 3, Grafik 1, Resim 3).

Tablo 3. İnkübasyonun 5. gününde grupların antijen ekspresyon yüzdeleri.

	CD14	CD1a	HLA-DR	CD80	CD83	CD86
Kontrol	1.96±2.85	2.42±1.33	61.14±20.55	15.86±8.52	9.76±1.77	32.06±16.20
GM-CSF	8.58±3.27*	3.50±1.35	88.88±11.22*	16.24±3.81	24.66±5.17 _a **	61.87±12.58*
IL-4	1.78±1.72	2.09±0.68	88.74±11.88*	29.73±12.08	13.50±3.56 _b	43.57±14.94
HGF	6.84±7.33	1.22±0.94	87.76±11.78*	20.06±17.66	11.38±4.74 _c	30.79±14.58
GM-CSF+HGF	3.23±3.23	3.27±2.26	86.82±8.42*	17.53±10.18	12.58±2.71 _d	47.86±17.82
IL-4+HGF	1.88±1.61	2.23±1.72	89.11±5.10*	17.11±8.00	24.02±3.92 _e **	38.06±20.65
GM-CSF+IL-4	1.80±1.20	3.36±3.38	87.41±9.63*	21.91±13.27	51.22±16.75 _f **	53.74±8.60*
GM-CSF+IL-4+HGF	0.92±0.52	2.88±1.89	87.49±10.05*	22.44±12.93	50.14±23.28 _g **	66.32±8.60**

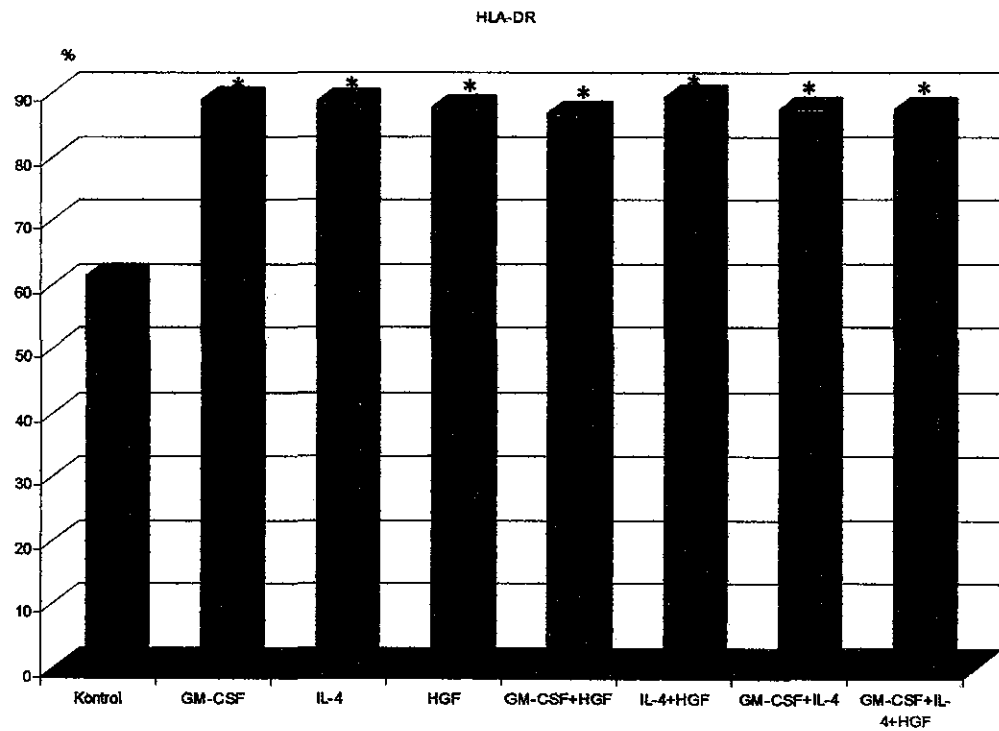
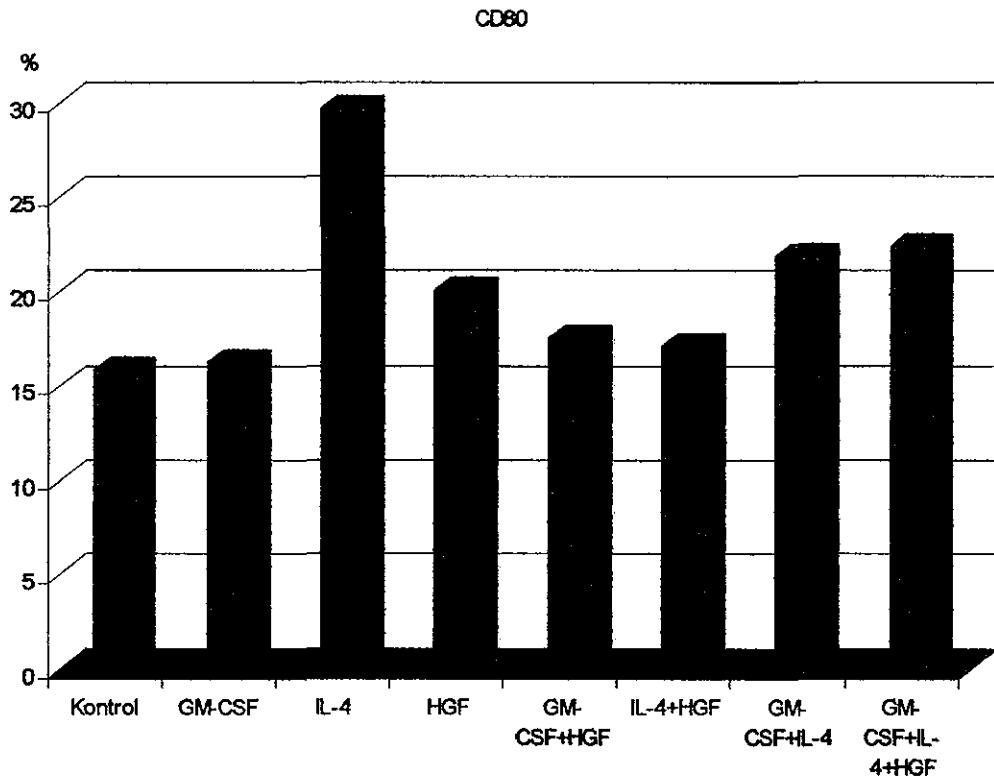
* $p<0.05$ ** $p<0.01$ (kontrole göre) a-f, a-d, b-f, c-e, d-g, $p<0.01$

Grafik 1. İnkübasyonun 5. günündeki grupların antijen ekspresyon yüzdeleri.



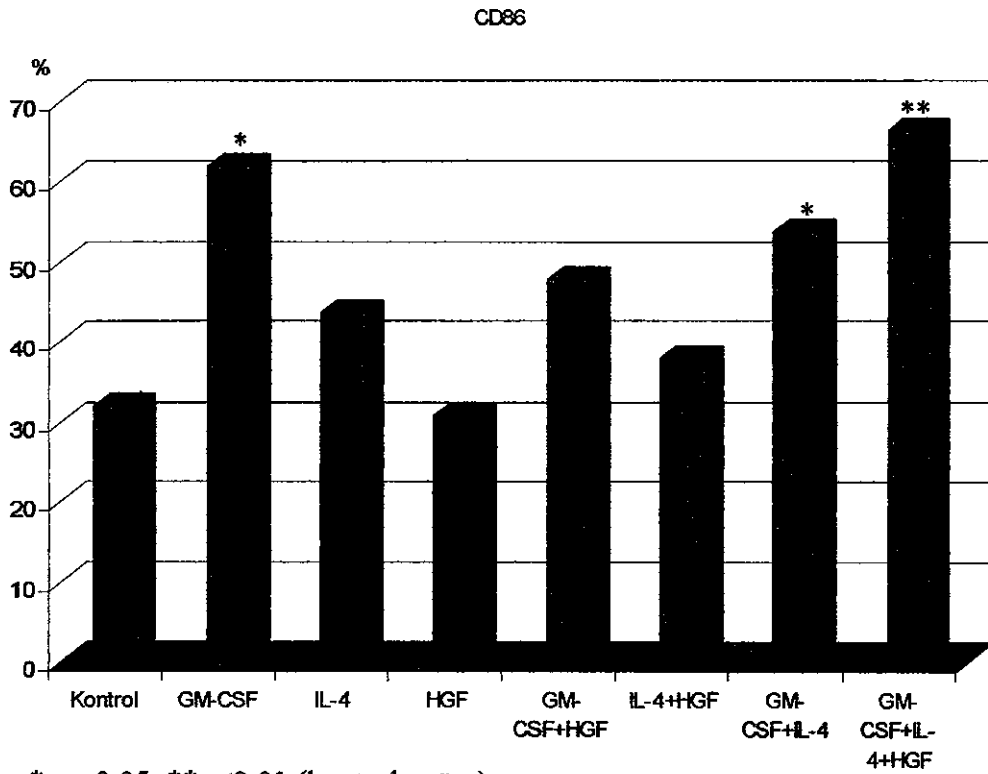
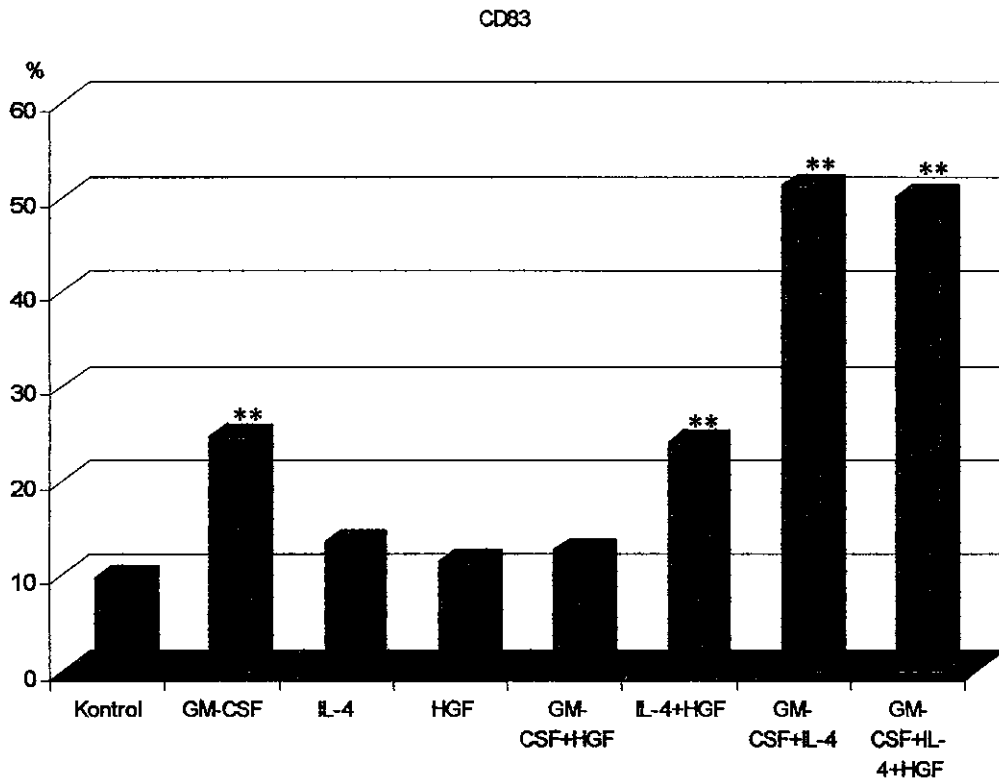
* $p < 0.05$ (kontrole göre)

Grafik 1. İnkübasyonun 5. günündeki grupların antijen ekspresyon yüzdeleri. (devamı)



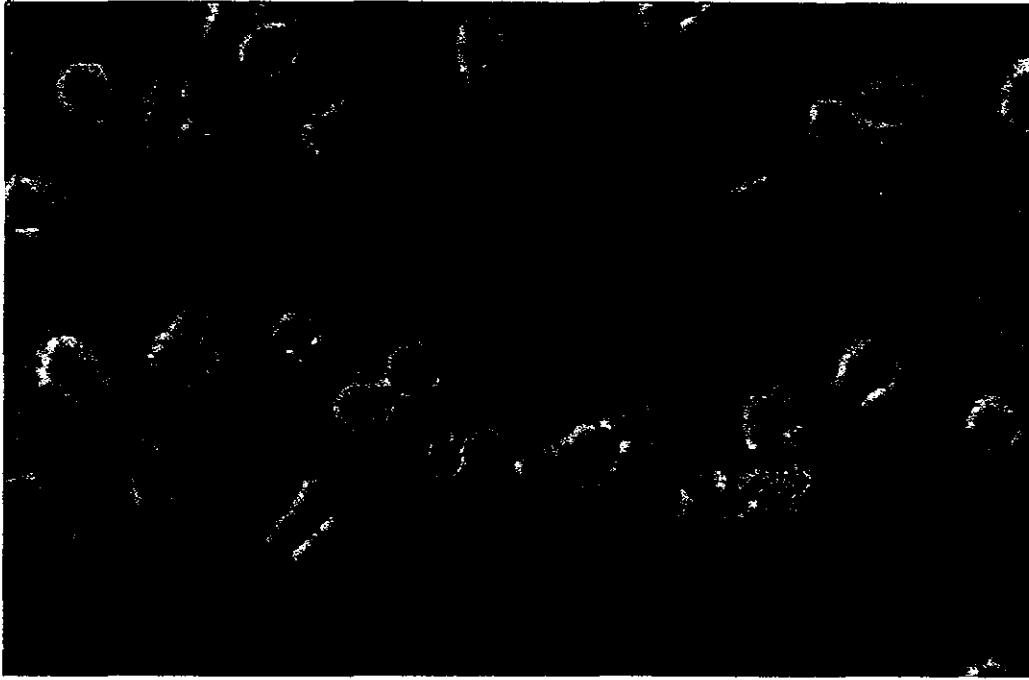
* $p < 0.05$ (kontrole göre)

Grafik 1. İnkübasyonun 5. günündeki grupların antijen ekspresyon yüzdeleri. (devamı)



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (kontrole göre)

Resim 3,4. İnkübasyonun 5. gününde gözlenen DH'lerden birer örnek



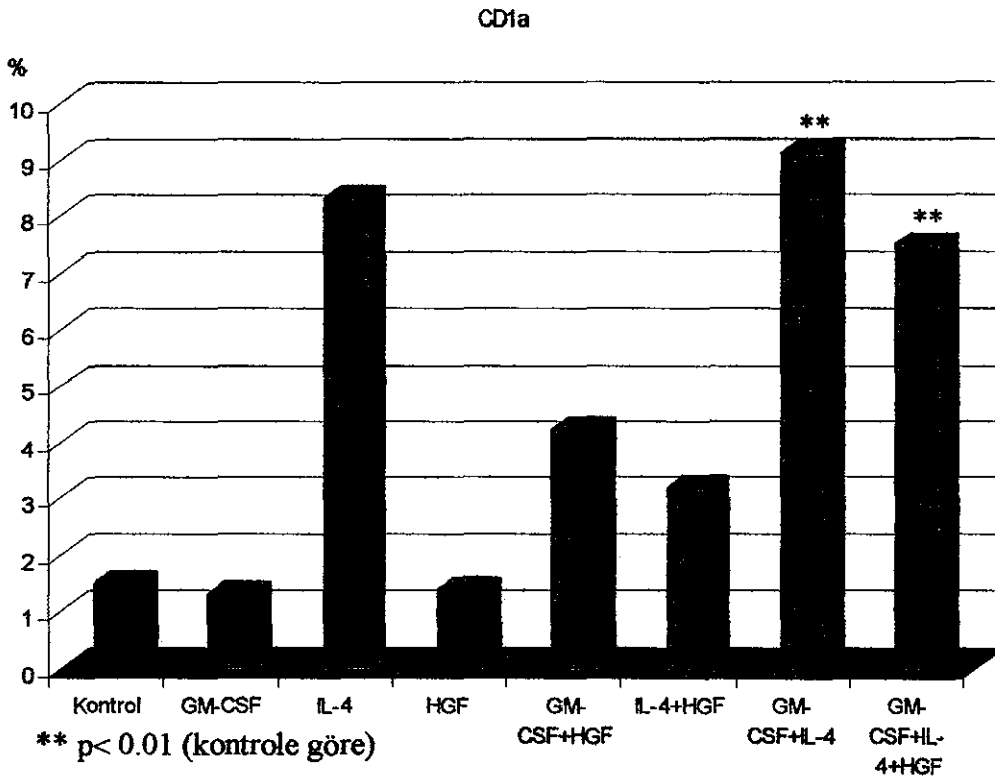
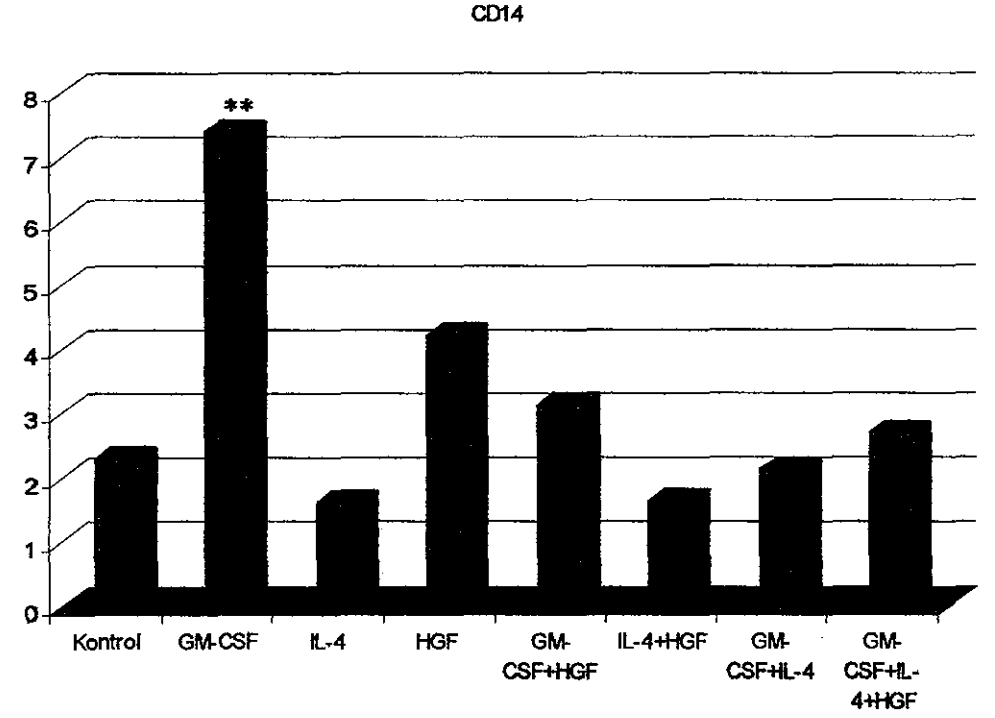
5. gün kültür ortamına ml'de 20 ng olacak şekilde TNF- α ilave edildikten sonra 7. günde yapılan akım sitometri analizlerinde : HGF+GM-CSF+IL-4 ve GM-CSF+HLA grubunda kontrol grubuna göre HLA-DR, CD1a, CD80, CD83 ve CD86 ekspresyonu artarken CD14 ekspresyonunun değişmediği gözlemlendi ($p<0.01$, $p<0.05$). IL-4, IL-4+HGF grubunda ise HLA-DR, CD80, CD83 ve CD86 ekspresyonu kontrol grubuna göre artarken CD14 ve CD1a ekspresyonu değişiklik göstermiyordu ($p<0.01$, $p<0.05$). GM-CSF grubu ile kontrol grubunu karşılaştırdığımızda HLA-DR, CD83, CD86, CD14 ekspresyonu artarken CD1a ve CD80 ekspresyonunda değişiklik saptanmadı ($p<0.01$, $p<0.05$). Bunlara karşılık HGF+GM-CSF ve HGF grubunda sadece HLA-DR ve CD86 ekspresyonu artarken CD14, CD1a, CD80 ve CD83 ekspresyonunun değişmediği gözlemlendi ($p<0.01$, $p<0.05$). Bunların yanında TNF- α öncesine benzer şekilde CD83 ekspresyonu GM-CSF grubuna göre GM-CSF+IL-4 grubunda, HGF grubuna göre HGF+IL-4 grubunda, GM-CSF+HGF grubuna göre GM-CSF+IL-4+HGF grubunda yüksek saptanırken, GM-CSF+HGF grubunda GM-CSF grubuna göre düşük saptandı ($p<0.05$, $p<0.01$) (Tablo 4, Grafik 2, Resim 4,5).

Tablo 4. İnkübasyonun 7. gününde TNF- α sonrası grupların antijen ekspresyon yüzdeleri.

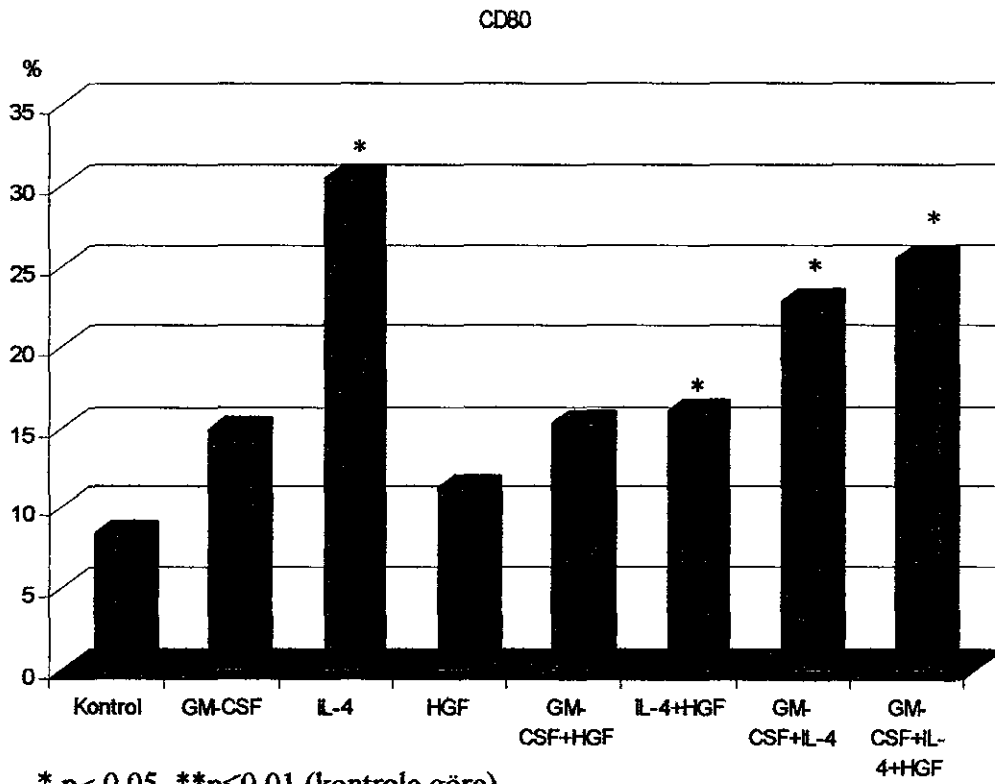
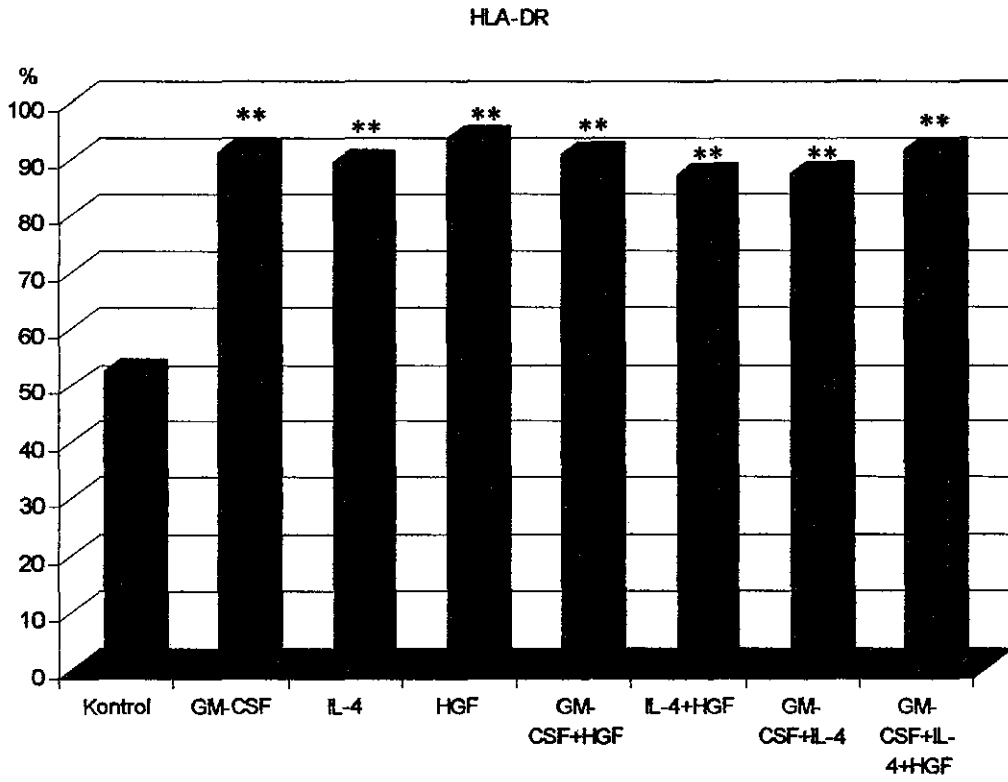
	CD14	CD1a	HLA-DR	CD80	CD83	CD86
Kontrol	2.30 \pm 1.23	1.49 \pm 1.31	52.34 \pm 10.04	8.34 \pm 4.02	12.98 \pm 2.88	23.30 \pm 14.23
GM-CSF	7.40 \pm 2.81**	1.29 \pm 1.02	91.14 \pm 8.80**	14.92 \pm 5.98	26.60 \pm 4.17 _a **	68.44 \pm 10.46**
IL-4	1.62 \pm 1.13	8.32 \pm 10.13	89.50 \pm 9.25**	30.38 \pm 18.55*	27.20 \pm 5.40 _b **	65.56 \pm 7.58**
HGF	4.22 \pm 6.03	1.38 \pm 1.20	93.54 \pm 8.44**	11.18 \pm 6.81	12.44 \pm 3.45 _c	49.02 \pm 10.57*
GM-CSF+HGF	3.13 \pm 2.07	4.21 \pm 4.93	90.68 \pm 8.07**	15.28 \pm 8.86	10.24 \pm 3.64 _d	56.94 \pm 21.55*
IL-4+HGF	1.64 \pm 1.25	3.18 \pm 3.34	86.96 \pm 10.61**	16.06 \pm 4.88*	30.96 \pm 11.62 _e **	51.96 \pm 7.82*
GM-CSF+IL-4	2.12 \pm 1.59	9.13 \pm 3.91**	87.32 \pm 14.71**	22.76 \pm 9.55*	41.40 \pm 11.39 _f **	52.84 \pm 15.84*
GM-CSF+IL-4+HGF	2.70 \pm 2.05	7.48 \pm 4.78**	91.38 \pm 5.48**	25.38 \pm 14.02*	45.06 \pm 17.36 _g **	60.96 \pm 14.61*

* $p<0.05$ ** $p<0.01$ (kontrole göre) a-f $p<0.05$, a-d, b-f, c-e, d-g $p<0.01$

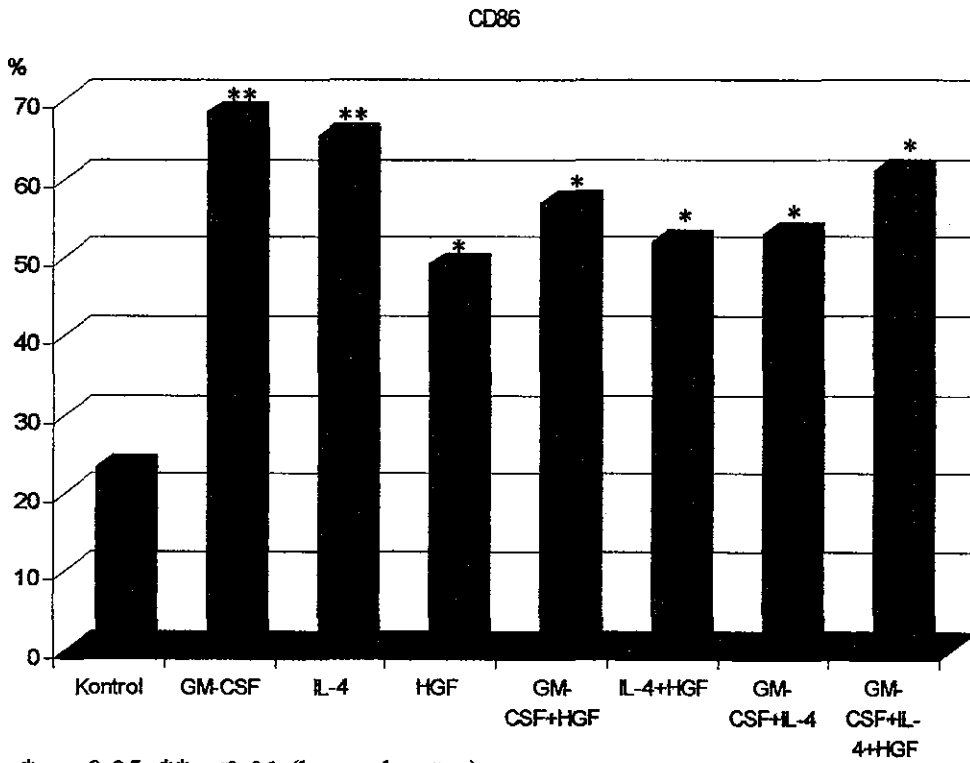
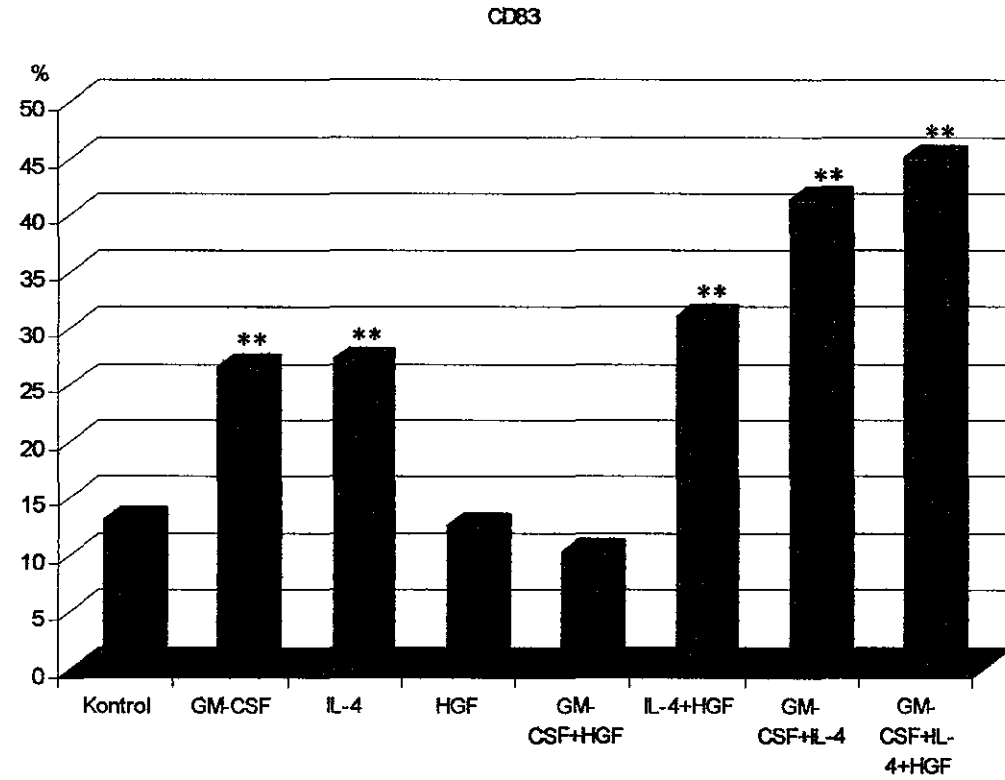
Grafik 2. İnkübasyonun 7. gününde grupların antijen ekspresyon yüzdeleri.



Grafik 2. İnkübasyonun 7. gününde grupların antijen ekspresyon yüzdeleri. (devamı)

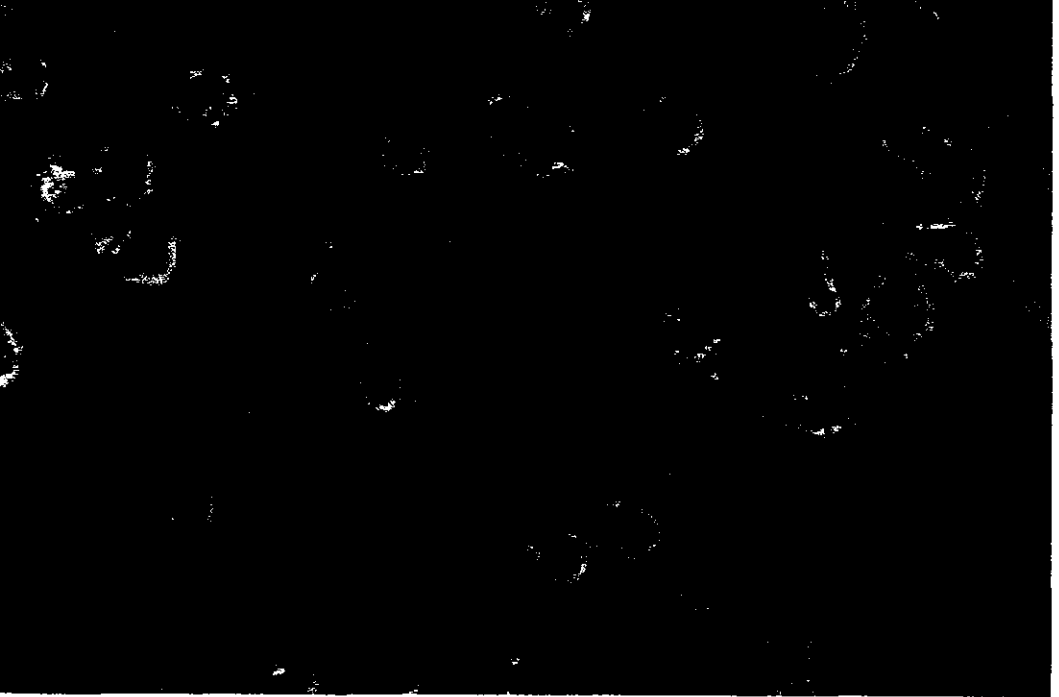
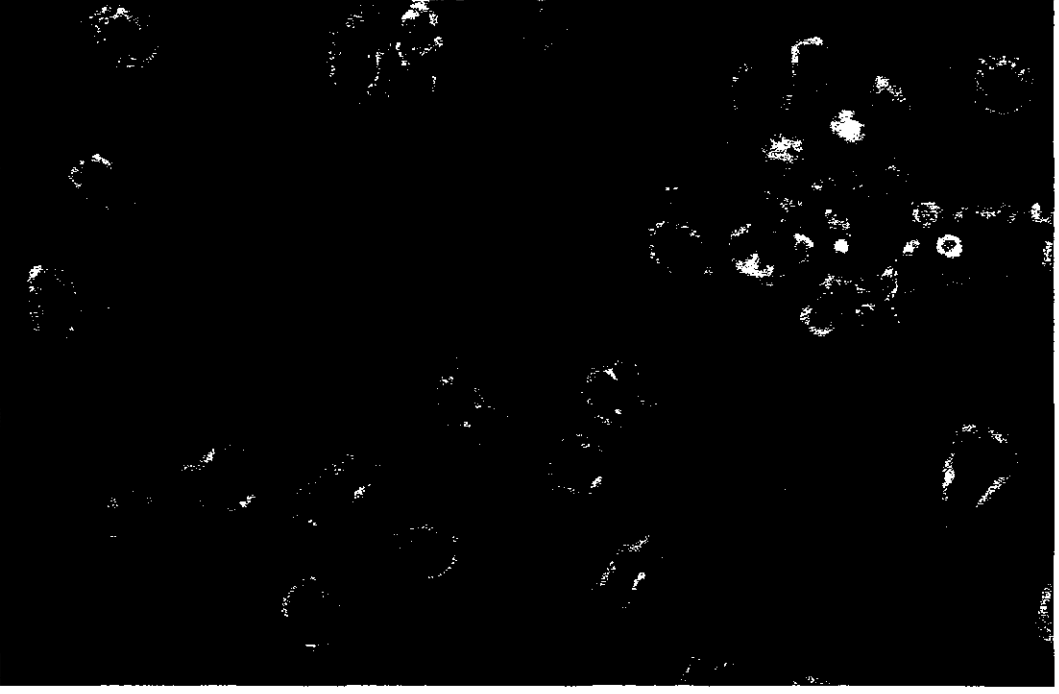


Grafik 2. İnkübasyonun 7. gününde grupların antijen ekspresyon yüzdeleri. (devamı)



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (kontrole göre)

Resim 5,6 : İnkübasyonun 7. gününde gözlenen DH'lere örnekler.



Kültür ortamına TNF- α ilave edildikten sonra sitokinlerin yüzey belirleyicileri ve kostimulan molekül ekspresyonları üzerine olan etkilerini TNF- α öncesi ile karşılaştırdığımızda: CD1a ekspresyonunun GM-CSF+IL-4 ve GM-CSF+IL-4+HGF grubunda, CD83 ekspresyonunun IL-4 grubunda TNF- α öncesine göre belirginleştiği gözlemlendi. Buna karşın diğer yüzey ve kostimulan molekül ekspresyonlarında TNF- α öncesi ve sonrası arasında anlamlı bir fark bulunmadı. (Tablo 5)

Tablo 5: TNF- α öncesi ve sonrası grupların antijen ekspresyon yüzdeleri .

	CD14	CD1a	HLA-DR	CD80	CD83	CD86
GM-CSF	8.58 \pm 3.27	3.50 \pm 1.35	88.88 \pm 11.22	16.24 \pm 3.81	24.66 \pm 5.17	61.87 \pm 12.58
GM-CSF+TNF- α	7.40 \pm 2.81	1.29 \pm 1.02	91.14 \pm 8.80	14.92 \pm 5.98	26.60 \pm 4.17	68.44 \pm 10.46
	CD14	CD1a	HLA-DR	CD80	CD83	CD86
IL-4	1.78 \pm 1.72	2.09 \pm 0.68	88.74 \pm 11.88	29.73 \pm 12.08	13.50 \pm 3.56	43.57 \pm 14.94
IL-4+TNF- α	1.62 \pm 1.13	8.32 \pm 10.13	89.50 \pm 9.25	30.38 \pm 18.55	27.20 \pm 5.40*	65.56 \pm 7.58
* P<0.05						
	CD14	CD1a	HLA-DR	CD80	CD83	CD86
HGF	6.84 \pm 7.33	1.22 \pm 0.94	87.76 \pm 11.78	20.06 \pm 17.66	11.38 \pm 4.74	30.79 \pm 14.58
HGF+TNF- α	4.22 \pm 6.03	1.38 \pm 1.20	93.54 \pm 8.44	11.18 \pm 6.81	12.44 \pm 3.45	49.02 \pm 10.57
	CD14	CD1a	HLA-DR	CD80	CD83	CD86
GM-CSF+HGF	3.23 \pm 3.23	3.27 \pm 2.26	86.82 \pm 8.42	17.53 \pm 10.18	12.58 \pm 2.71	47.86 \pm 17.82
GM-CSF+HGF+ TNF- α	3.13 \pm 2.07	4.21 \pm 4.93	90.68 \pm 8.07	15.28 \pm 8.86	10.24 \pm 3.64	56.94 \pm 21.55
	CD14	CD1a	HLA-DR	CD80	CD83	CD86
IL-4+HGF	1.88 \pm 1.61	2.23 \pm 1.72	89.11 \pm 5.10	17.11 \pm 8.00	24.02 \pm 3.92	38.06 \pm 20.65
IL-4+HGF+TNF- α	1.64 \pm 1.25	3.18 \pm 3.34	86.96 \pm 10.61	16.06 \pm 4.88	30.96 \pm 11.62	51.96 \pm 7.82

	CD14	CD1a	HLA-DR	CD80	CD83	CD86
GM-CSF+IL-4	1.80±1.20	3.36±3.38	87.41±9.63	21.91±13.27	51.22±16.75	53.74±8.60
GM-CSF+IL-4+	2.12±1.59	9.13±3.91*	87.32±14.71	22.76±9.55	41.40±11.39	52.84±15.84
TNF-α						
* P<0.05						
	CD14	CD1a	HLA-DR	CD80	CD83	CD86
GM-CSF+IL-4+HGF	0.92±0.52	2.88±1.89	87.49±10.05	22.44±12.93	50.14±23.28	66.32±8.60
GM-CSF+IL-4+HGF+TNF-α	2.70±2.05	7.48±4.78*	91.38±5.48	25.38±14.02	45.06±17.36	60.96±14.61
* p<0.05						

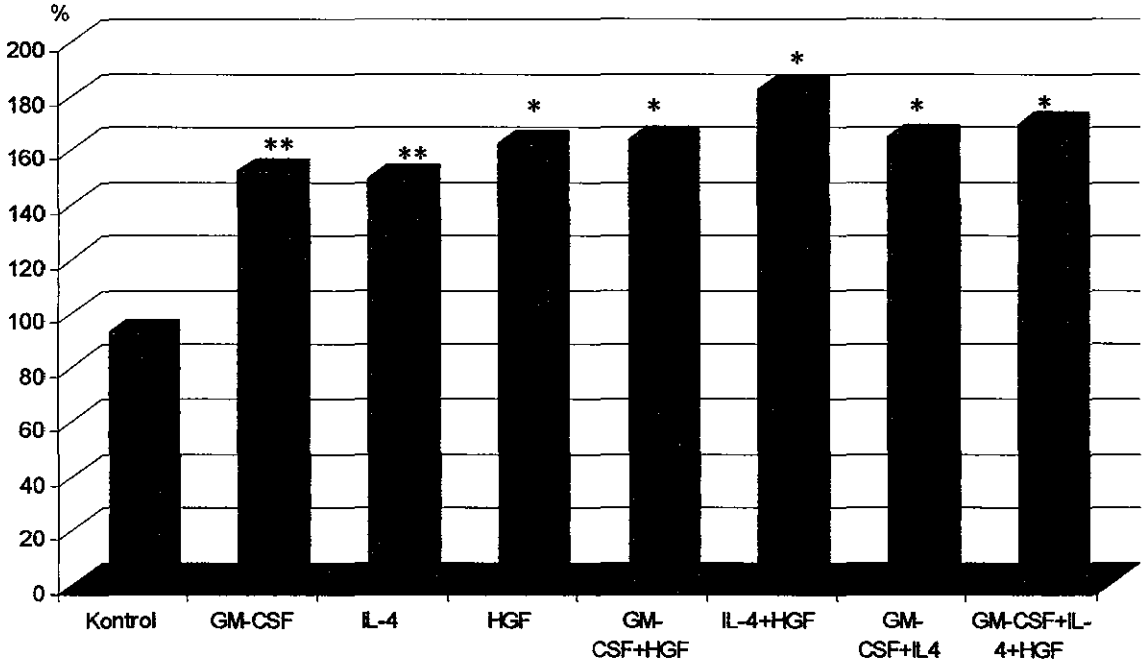
TNF-α ile maturasyonu tamamlanan DH gruplarının 7. günde ortama ml'de 20µg olacak şekilde PPD ilavesinden sonra yapılan MTT testinde: Kontrol grubuna göre tüm gruplarda hücre sayısı ve/veya metabolik aktivitelerinin arttığı gözlenirken (p<0.001, p<0.01) bu artışın özellikle IL4+HGF kombinasyonunda daha belirgin olmak üzere tüm HGF içeren kombinasyonlarda HGF'siz eşdeğerlerine göre daha fazla olduğu gözlemlendi. Sadece IL-4 ve GM-CSF içeren gruplarda artış olmakla birlikte diğerlerine göre daha düşüktü (Tablo 6, Grafik 3).

Tablo 6. 7 gün TNF-α ile maturasyon sonrası PPD ile yüklenen DH gruplarının lenfosit proliferasyonu ve metabolik aktiviteleri üzerine olan etkileri (MTT testi).

Kontrol %	GM-CSF %	IL-4 %	HGF %	GM-CSF+HGF %	IL-4+HGF %	GM-CSF+IL4 %	GM-CSF+IL-4+HGF %
92.65±12.51	152.2±25.64**	149.7±22.8**	162.4±21.4*	163.8±43.8*	182.2±30.9*	164.4±34.4*	169.4±29.3*

*p< 0.001 **p<0.01 (kontrole göre)

Grafik 3. MTT testi sonuçları.



* $p < 0.001$ ** $p < 0.01$ (kontrole göre)

Çalışmamızın her aşamasında ışık mikroskopu ile DH gelişimini morfolojik olarak değerlendirdik ve kontrole göre tüm gruplarda resim 3,4'de görüldüğü gibi iğsi uzantılarıyla DH görünümüne sahip hücrelerin oluştuğunu gözledik. Özellikle IL-4 içeren gruplarda DH morfolojisine sahip hücrelerin daha belirgin olduğu dikkati çekmekteydi. Resim 5,6'da görüldüğü gibi TNF- α ilavesinden sonra DH'nin morfolojik görünümünde herhangi bir değişikliğin gözlenmediğini ve TNF- α ilavesinden öncesiyle benzer bir yapıda olduğunu izledik.

5. TARTIŞMA

Malign hastalıklarda günümüzde kullanılan tedavi yöntemleriyle tedaviye yanıtız veya tedavi yanıtı olmakla birlikte minimal rezidüel hastalığın varlığında tümöre yönelik immunoterapi yaklaşımları sıkca kullanılmaya başlanmıştır. Bu amaçla DH'lerle yapılan tümöre yönelik immünoterapi uygulamalarının umut verici olduğu görülmektedir. Bu süreç içinde DH'nin gelişimi, fonksiyonları ve etkinliği üzerine birçok çalışma yapılmıştır.

Bilindiği gibi DH'ler kemik iliği, periferik kan ve kord kanı CD34+ hücrelerden üretilebildiği gibi, periferik kan monositlerinden de üretilebilmektedir. Periferik kandan elde edilen monositler uygun kültür ortamında ve çeşitli sitokinlerin varlığında fenotip ve fonksiyonel özellikleriyle DH'ye dönüşebilmektedir. Yapılan çalışmalarda GM-CSF, IL-4 ve TNF- α 'nın uygun sitokin kombinasyonu olduğu ve DH üretim prosedürlerinde kullanılabileceği tanımlanmıştır. Bu sitokin kombinasyonu ile değişik kültür ortamlarında kültür işlemini takiben, morfolojik görünümüleriyle birlikte CD14-, HLA-DR+, CD83+, CD80+, CD86+ ve CD1a'nın +/- olabildiği fonksiyonel DH'ler elde edilebilmektedir (47-50).

Bizde çalışmamızda, serum içermeyen kültür ortamda GM-CSF, IL-4, HGF, GM-CSF+HGF, IL-4+HGF, GM-CSF+IL-4, GM-CSF+IL-4+HGF olarak düzenlediğimiz 7 farklı sitokin karışımının morfolojik ve fonksiyonel olarak DH gelişimine etkilerini inceledik. Çalışmamıza genel olarak baktığımızda sadece TNF- α ilavesinden önce GM-CSF grubu dışında diğer sitokin gruplarında DH gelişiminin bir göstergesi olarak monositlere spesifik CD14 yüzey ekspresyonunun az olduğunu, buna karşın antijen sunumu için gerekli olan MHC klas II moleküllerinin göstergesi olan HLA-DR ekspresyonunun artmış olduğunu gözledik. Bunlara karşılık sitokin grupları arasında DH'yi tanımlamada kullanılan kostimulan molekül ekspresyonları açısından farklılıklar gözlenmekteydi.

Ancak çalışmamız genelinde tüm sitokin gruplarında CD1a ekspresyonunun DH'yi tanımlamada kullanılan diğer kostimulan molekül (CD80, CD83, CD86) ekspresyonlarına göre daha düşük olduğunu saptadık. Yapılan çalışmalarda bir kostimulan molekül olan CD1a ekspresyonunun varlığı veya yokluğunun kültür ortamına konan medium ile ilişkili

olduğu gösterilmiştir. Moldenhauer A ve arkadaşları yaptıkları çalışmada periferik kandan elde edilen monositlerden DH oluşumunda, otolog plazma ve fetal sığır serumu içeren iki değişik kültür ortamının CD1a ekspresyonu üzerine farklı etkilerinin olduğunu ve fetal sığır serumu içeren kültür ortamında muhtemelen sığır antijenlerinin uyarımına bağlı olarak CD1a ekspresyonunun arttığını, buna karşın otolog plazma içeren kültür ortamında ise CD1a'nın azaldığını göstermişlerdir. Fakat her ikisi arasında antijen sunumu açısından fark olmadığını belirtmektedirler (51). Oysaki Xia C-Q ve arkadaşları CD1a+ olan DH'lerin CD4 T lenfositleri daha etkin olarak uyarabildiğini söylemektedirler (52). Bizim çalışmamızda tüm sitokin gruplarında gözlenen CD1a ekspresyon azlığının kullandığımız serum içermeyen kültür ortamıyla ilişkili olduğunu düşünüyoruz. Bu konuda serum içermeyen kültür ortamını aldığımız Cell-Genix laboratuvarından Dr. Torsten Dickmann ile yaptığımız kişisel tartışmada bu olumsuzluğun söz konusu olduğunu, ancak ortama IL-1 β , PGE2, IL-6 gibi sitokinlerin ilavesiyle sorunun giderilebileceği belirtilmiştir. Biz HGF'nin etkisini test etmek istediğimizden ilave sitokin kullanmamayı tercih ettik.

Bu çalışmada TNF- α ilave etmeden önce 5. günde sitokinlerin DH gelişimi üzerine olan etkilerini incelediğimizde:

Sadece GM-CSF içeren grupta DH gelişiminin bir bulgusu olarak HLA-DR, CD83, CD86 yüzey molekül ekspresyonlarının kontrole göre arttığı izlenirken, beraberinde CD14 ekspresyonunda artması GM-CSF'nin monositik ve DH kolonilerini beraberce indüklediğini telkin etmekteydi. Gerçektende bu bulgular morfolojik olarak gözlemlenmişti. Nitekim yapılan çalışmalarda tek başına GM-CSF'nin monositleri antijen sunabilen makrofaj benzeri hücrelere dönüştürebildiği (53), ayrıca tek başına kullanıldığında özellikle DH öncüllerinin oluşumu ve yaşamı üzerine etkili olduğu belirtilmektedir (54,55).

IL-4 ise GM-CSF'den farklı olarak monositlerin DH'ye differansiasyonunda çok önemli bir sitokin olup, makrofajların aşırı çoğalmasını engelleyerek periferik kandan DH oluşumu ve maturasyonuna yol açmaktadır. Bu etkilerinden dolayı monositlerin IL-4 ile kültüre edilmesiyle DH morfolojisine dönüştüğü gözlenmektedir (54-56). Chapuis F. ve arkadaşları IL-4 ile monositlerin makrofaja doğru differansiasyon yetenekleri azaltılmadıkça periferik kan öncül hücrelerinin makrofajlara dönüşme yeteneğinin olduğunu belirterek, IL-4 ile CD14 ekspresyonunun azalmasının DH'ye dönüşümün ana bulgusu olduğunu belirtmektedirler (57). Bizde yaptığımız çalışmada sadece IL-4 ile

belirgin olmayan CD14 ekspresyonu ile kontrol grubuna göre HLA-DR ekspresyonunun arttığını, buna karşılık kontrol grubuna göre CD80, CD83 ve CD86 ekspresyonunun artmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı olmadığını saptadık.

IL-4 çalışmamızda kullandığımız sitokinlerden GM-CSF'yle kombine edildiğinde tek başına GM-CSF grubunda gözlenen CD14 ekspresyonu azalırken beraberinde artmış HLA-DR, CD83, CD86 ekspresyonu izlendi. Benzer olarak HGF ile kombine edildiğinde CD14 ekspresyonu azalırken, HLA-DR ve CD83 ekspresyonunun arttığını gözledik. Özellikle HGF, GM-CSF ve HGF+GM-CSF içeren gruplara IL-4 ilave ettiğimizde CD83 ekspresyonlarının belirginleşmesi dikkat çekiciydi. Bu bulgular monosit kökenli DH gelişiminde IL-4'ün önemli bir sitokin olduğunu telkin etmekteydi. Morfolojik değerlendirmelerde de IL-4 içeren gruplardaki DH belirginliği bunu destekler nitelikteydi. Nitekim kemik iliğine göre periferik kandan DH üretiminde tek başına kullanılan GM-CSF'nin daha az başarılı olduğu belirtilerek, yapılan çalışmalarda periferik kandan elde edilen monositlerden DH oluşumunda IL-4'ün önemli rol oynadığı sadece GM-CSF ile hücrelerin çoğunun matür hale gelemeyeceği gösterilmiştir. Bu çalışmalarda GM-CSF'in DH öncüllerinin oluşumu ve yaşam süresini artırırken, IL-4'ün makrofaj koloni oluşumunu inhibe ederek daha fazla DH büyümesi ve matürasyonuna neden olduğu belirtilmektedir. Böylece monosit kültürlerinde IL-4 ve GM-CSF birlikte kullanıldığında antijeni yakalama ve işleme tabi tutma yeteneğine sahip, CD14 ekspresyonu oldukça azalmış, HLA-DR ekspresyonu artmış immatür özellikle DH'ler elde edilebilmektedir (54,55). Takip eden çalışmalarda da IL-4+GM-CSF birlikte kullanımında periferik kan monositlerinden bol miktarda ve etkin DH oluştuğu ve bunlarında klinik uygulamalarda başarıyla kullanılabileceği belirtilmektedir (58-60).

Tek başına HGF kullanıldığında monosit kültürlerinde HLA-DR ekspresyonu artarken CD14 ekspresyonunun belirginleşmemesi ve morfolojik analizlerde DH benzeri hücrelerin varlığı bu sitokinin DH gelişiminde etkili olabileceğini düşündürmekle birlikte CD1a, CD80, CD83 ve CD86 ekspresyonlarının zayıf olması HGF'nin monositik DH gelişiminde önemli rolü olmadığını telkin etmektedir. HGF ilave edilen GM-CSF, IL-4 ve GM-CSF+IL-4 gruplarında GM-CSF grubundaki CD83 ekspresyonunun azalması haricinde genel olarak CD1a, CD80, CD83, CD86 ve HLA-DR ekspresyonlarında olumsuz bir değişiklik gözlemedik. Benzer olarak literatürde periferik kan monositlerinin HGF ile kısa süreli kültürlerini takiben periferik kan monositlerinin antijen sunma kapasitesinin

arttığı, ancak bu kısa süreli kültür işlemi sonrasında HGF'nin monositlerde HLA klas I ekspresyonunun artmasına yol açtığı gözlenirken, CD80 ve CD86 gibi DH için spesifik diğer kostimulan moleküllerde herhangi bir değişim yapmadığı rapor edilmiştir (9,10).

Bu sonuçlar, monosit kökenli DH gelişiminde 5. günde en önemli sitokinin IL-4 ve uygun kombinasyonun GM-CSF+IL-4 olduğunu, HGF'nin ise DH gelişiminde belirgin bir katkısının olmadığını göstermektedir.

Çalışmamızın 5. gününde kontrol grubu hariç tüm sitokin gruplarına ilave ettiğimiz TNF- α 'nın çeşitli biyolojik, kimyasal ve fiziksel uyarılarla monosit ve makrofajlardan salınarak immün cevabın uyarılmasında önemli rol oynadığı bilinmektedir. TNF- α 'nın uygun konsantrasyonlarda hematopoetik öncül hücrelerin DH'ye differansiasyon ve maturasyonuna yol açtığı, artan dozlarda kullanımında ise DH sayısını daha fazla artırdığı gözlenmiştir (61). Ancak yapılan çalışmalarda sadece CD34+ öncül hücrelerde değil aynı zamanda periferik kan CD14+ hücrelerde de DH farklılaşmasına yol açtığı gösterilmiştir (62). Schwarz F.' de yaptığı bir çalışmada TNF- α 'nın GM-CSF reseptörlerini artırarak DH gelişimini artırdığını belirtmektedir (63). Aynı zamanda TNF- α 'nın DH maturasyonunda önemli rol oynadığı belirtilerek, bir çok çalışmada DH kültür ortamlarına maturasyon sağlamak amacıyla TNF- α ilavesinin yararlı olduğu rapor edilmiştir (64-66).

Bu çalışmada maturasyon indükleyici sitokin olarak kullandığımız TNF- α 'nın 5.günde sitokin gruplarına eklenmesini takiben 2 gün sonra yapılan analizlerde;

TNF- α öncesi bakılan değerlerden farklı olarak tüm gruplarda CD86 ekspresyonlarının kontrole göre anlamlı ölçüde arttığı saptanmıştır. CD80 ekspresyonu ise kontrole göre IL-4 içeren tüm gruplarda TNF- α ilavesinden önceki değerlerin aksine artarken, CD83 ekspresyonunda kontrole göre HGF ve GM-CSF+HGF gruplarının haricinde tüm gruplarda arttığı gözleniyordu. Son olarakta CD1a ekspresyonunun GM-CSF+IL-4 ve GM-CSF+IL-4+HGF gruplarında kontrole göre anlamlı olarak arttığı izleniyordu.

Kontrol grubuna göre değişik gruplarda izlenen HLA-DR, CD80, CD83, CD86, CD1a ve CD14 arasındaki artışları gruplar içinde yani TNF- α eklenmeden önceki ekspresyonları ile bu gruplara TNF- α eklendikten sonraki 2. gündeki ekspresyonları açısından karşılaştırdığımızda ise, bir maturasyon belirleyicisi olan CD1a ekspresyonunun GM-CSF+IL-4 ve GM-CSF+IL-4+HGF grubunda kontrole göre anlamlı olarak arttığı saptandı. Ayrıca TNF- α ilavesiyle IL-4 grubunda CD83 ekspresyonunun arttığı gözlemlendi.

Bu bulgular birlikte yorumlandığında, TNF- α ilavesinden sonra DH matürasyon göstergesi olan CD80, CD83, CD86 ve özellikle CD1a ekspresyonlarının DH gelişimi gösteren gruplarda daha belirginleştiğini ve TNF- α 'nın DH matürasyonunda özellikle IL-4 ile aditif bir rol oynayabileceğini göstermekteydi. Çalışmamızda özellikle TNF- α ilavesinden önce kontrole göre belirgin olmayan CD80 ekspresyonlarının, TNF- α ilavesinden sonra IL-4 ve IL-4 içeren sitokin karışımlarında kontrole göre artmış olduğu gözleniyordu. Nitekim yapılan çalışmalarda CD80 ekspresyonunun daha spesifik ve matür DH'yi hücreyi gösterdiği, CD86 gibi sadece GM-CSF ile ekspresse edilemediği belirtilmektedir (67,68). Chen B ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada TNF- α ile DH'ye ait kostimulan molekül ekspresyonları artarken matürasyonunun göstergesi olarak DH'nin fagositik kapasitesinin azaldığı gözlenmiştir (69). Büchler T ve arkadaşlarında çalışmalarında çeşitli sitokin kombinasyonlarının DH üretiminde benzer etkileri olduğunu ancak periferik kan monositlerinden DH oluşumunda IL-4+GM-CSF kombinasyonuna 5. günde ilave edilen TNF- α 'nın en uygun karışım olduğunu söylemektedirler (70).

Buraya kadar olan veriler ışığında bizim modelimizde DH gelişiminde ve matürasyonunda en etkili sitokin kombinasyonunun GM-CSF+IL-4+TNF- α kombinasyonu olduğu söylenebilir. Bunun yanında HGF'nin bu kombinasyona ilavesiyle istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte CD80, CD83, CD86 ve HLA-DR ekspresyonlarındaki artışın daha belirgin olması HGF'nin olumlu bir katkısının olabileceğini telkin etmektedir. Literatürde periferik kan monositlerinden DH gelişiminde HGF'nin etkilerini inceleyen bir çalışma olmamakla birlikte, Ovalı E. ve arkadaşları kemik iliği CD34+ hücrelerden HGF ile DH geliştiğini hatta bunun GM-CSF'ye göre daha da belirgin olduğunu bildirmişlerdir (11).

Benzer olarak çalışmanın ikinci aşamasında DH kültür ortamlarına PPD ilavesi ile antijenik uyarıyı takiben DH'lerin lenfositler üzerine olan proliferatif ve fonksiyonel yeteneklerine baktığımızda, tüm gruplarda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı lenfosit proliferasyonu olduğunu gözledik. Aynı zamanda en belirgin proliferasyonun HGF+IL-4 grubunda olduğu ve HGF'nin bulunduğu tüm sitokin karışımlarında lenfosit proliferasyonunun özellikle HGF içermeyen gruplardan daha fazla olduğu izlendi. Bu durum bize HGF'nin DH'lerin fonksiyonel kapasitesini etkileyebileceğini telkin etmekteydi. Literatürde DH gelişiminde IL-4 ve HGF birlikteliğinin etkisini tanımlayan bir bilgi olmamakla birlikte, HGF reseptörü c-met transfer edilmiş IL-3 bağımlı murine

myeloid hücre dizisi 32D'nin IL-4 ve HGF birlikte kullanıldığında sinerjik etkiyle proliferasyon kapasitesinin arttığı belirtilmektedir (71). Monositler üzerinde HGF reseptörü c-met'in saptanmasını takiben yapılan çalışmalarda, HGF'nin monosit fonksiyonlarında etkili olduğu gözlenmiş olup endotoksin ile uyarımı takiben HGF reseptörlerinin aktive olduğu, bunun sonucundada monositlerin etkilenen bölgeye hareket ettiği ve sitokin sekresyonlarının arttığı tespit edilmiştir. Tüm bunların sonucunda da hücresele inflamatuvar yanıtın arttığı gözlenmiştir (7,8). Bu konuda yapılan diğer çalışmalarda ise, kord kanı ve periferik kan monositlerinin hem serum içermeyen hemde fetal calf serum içeren kültür ortamlarında HGF ile kısa süreli kültürlerini takiben periferik kan monositlerinin antijen sunma kapasitesinin arttığı, kord kanı monositlerinin ise antijen sunma kapasitelerinin değişmediği gösterilmiştir (9,10). Kurz MS ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise, C57BL/6 veya BALB/c fare kemik iliğinden elde edilen DH'lerin HGF reseptörü c-met taşıdıkları saptanmış ve c-met reseptörünün aktivasyonu ile DH'lerin laminine adezyonu ve hareket yetenekleri artarken, antijen sunma fonksiyonlarının etkilenmediği gözlenmiştir. Buna karşın ise TNF- α ve IL-1'nin epitelyal hücrelerdeki aktivitelerine benzer şekilde c-met reseptörlerini uyarabildiklerini söylemektedirler (12).

Sonuç olarak, bizim modelimizde periferik kan monositlerinden DH oluşum sürecindeki kültür aşamalarında en uygun kombinasyonun GM-CSF+IL-4+TNF- α olduğu ve ortama katılan HGF'nin DH üretimine belirgin bir katkı sağlamadığı gözlemlendi. Buna karşılık HGF'nin DH kültür ortamlarına katılması bize DH matürasyon ve fonksiyonunu olumlu etkileyebileceğini telkin etmekte olup, mevcut bulguların başka araştırmalarda desteklenmesi gerektiğini düşündürmektedir.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Çalışmamızda, serum içermeyen kültür ortamında GM-CSF, IL-4, HGF, GM-CSF+HGF, IL-4+HGF, GM-CSF+IL-4, GM-CSF+IL-4+HGF olarak düzenlediğimiz 7 farklı sitokin karışımının morfolojik ve fonksiyonel olarak DH gelişimine etkilerini inceledik. Bu amaçla monositler 5 gün boyunca bu sitokin karışımlarıyla serum içermeyen kültür ortamında inkübe edildi ve 5. gün ortama TNF- α ilave edilerek inkübasyon süresi 7 güne tamamlandı. 5. ve 7. günde elde edilen hücrelerin yüzey ve kostimulan molekül belirleyicileri (HLA-DR, CD1a, CD14, CD80, CD83, CD86) akım sitometrik analizle belirlendi. 7 günün sonunda PPD solusyonu ile antijenik uyarı yapılan DH'lerin MTT testi ile fonksiyonel yetenekleri değerlendirildi.

İnkübasyonun 5. gününde elde ettiğimiz sonuçlara baktığımızda;

- a. Genel olarak tüm sitokin gruplarında morfolojik ve yüzey belirleyici moleküllerinin varlığıyla DH gelişti,
- b En belirgin DH gelişimi IL-4 içeren kombinasyonlarda, özellikle IL-4+GM-CSF ve IL-4+GM-CSF+HGF kombinasyonlarında izlendi.

Ortama 5. gün ilave edilen TNF- α 'dan sonra yapılan değerlendirmelerde;

- a. TNF- α öncesine göre yüzey ve kostimulan molekül ekspresyonları dahada belirginleşti,
- b. DH gelişiminde en etkili kombinasyonlar IL-4+GM-CSF+TNF- α ve IL-4+GM-CSF+HGF+TNF- α idi,
- c. HGF'nin tek başına DH gelişiminde çok etkisi olmadı,
- d. HGF'nin IL-4+GM-CSF+TNF- α kombinasyonuna ilavesiyle istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte CD80, CD83, CD86 ve HLA-DR ekspresyonlarındaki artışın daha belirgin olması HGF'nin olumlu bir katkısının olabileceğini telkin etti.

DH'lerin lenfositler üzerine olan proliferatif ve fonksiyonel yeteneklerine baktığımızda ise;

- a. Tüm sitokin gruplarında kontrole göre lenfosit proliferasyonu izlenmekle birlikte en belirgin proliferasyon HGF+IL-4 grubunda oldu,
- b. HGF'nin bulunduğu tüm sitokin karışımlarında lenfosit proliferasyonu, özellikle HGF içermeyen gruplardan daha fazlaydı.

Sonuç olarak;

- a. HGF'nin DH kültür ortamlarına katılması DH matürasyon ve fonksiyonunu olumlu etkileyebilir,
- b. Mevcut bulguların başka araştırmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

7. ÖZET

Dendritik hücreler özellikle immünoterapi uygulamalarında kullanılmak üzere in vitro olarak uygun kültür ve sitokin ortamında üretilebilmektedirler. Üretim aşamasında granulosit makrofaj koloni stimulan faktör (GM-CSF), interleukin-4 (IL-4), tümör nekrozis faktör- α (TNF- α), kit ligand, fms-like tyrosine kinase ligand (Flt-3 L) ve interleukin-2 (IL-2) gibi sitokinler tek veya kombine olarak kullanılabilirlerdir.

Hepatosit growth faktör (HGF)'ün kök hücrelerde proliferasyon ve differansiasyona neden olduğu, monosit ve makrofaj fonksiyonlarında önemli rol oynadığı ve nonspesifik immün yanıtı etkilediği bilinmektedir. Ayrıca HGF'nin periferik kandaki monositlerin antijen sunma özelliğini artırdığı gözlenmiştir. Takip eden çalışmalarda fare DH'lerinde HGF reseptörü c-met saptanmış ve HGF'nin DH fonksiyonlarında etkili olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada periferik kan monositlerinden DH gelişiminde, henüz DH üzerine etkisi tam olarak bilinmeyen HGF'nin etkileri araştırıldı.

Çalışmamızda, serum içermeyen kültür ortamda GM-CSF, IL-4, HGF, GM-CSF+HGF, IL-4+HGF, GM-CSF+IL-4, GM-CSF+IL-4+HGF olarak düzenlediğimiz 7 farklı sitokin karışımının morfolojik ve fonksiyonel olarak DH gelişimine etkilerini inceledik. Bu amaçla monositler 5 gün boyunca bu sitokin karışımlarıyla serum içermeyen kültür ortamında inkübe edildi ve 5. gün ortama TNF- α ilave edilerek inkübasyon süresi 7 güne tamamlandı. 5. ve 7. günde elde edilen hücrelerin yüzey ve kostimulan molekül belirleyicileri (HLA-DR, CD1a, CD14, CD80, CD83, CD86) akım sitometrik analizle belirlendi. 7 günün sonunda PPD solusyonu ile antijenik uyarı yapılan DH'lerin MTT testi ile fonksiyonel yetenekleri değerlendirildi.

Inkübasyonun 5. gününde genel olarak tüm sitokin gruplarında DH gelişimi izlenirken, en belirgin DH gelişiminin IL-4 içeren kombinasyonlarda özellikle IL-4+GM-CSF kombinasyonunda olduğu gözlemlendi. Ortama 5. gün ilave edilen TNF- α 'dan sonra yapılan değerlendirmelerde ise TNF- α öncesine göre yüzey ve kostimulan molekül ekspresyonlarının kontrol grubuna göre dahada belirginleştiği saptandı. Sonuçta DH gelişiminde en etkili kombinasyonun IL-4+GM-CSF+TNF- α olduğunu, HGF'nin tek başına DH gelişiminde çok etkisi olmadığını ancak matürasyonda fayda sağlayabileceğini gözledik. DH'lerin lenfositler üzerine olan proliferatif ve fonksiyonel yeteneklerine baktığımızda ise, tüm gruplarda kontrole göre lenfosit proliferasyonu izlenmekle birlikte en belirgin proliferasyonun HGF+IL-4 grubunda olduğunu ve HGF'nin bulunduğu tüm sitokin karışımlarında lenfosit proliferasyonunun daha fazla olduğunu saptadık.

Sonuç olarak, bizim modelimizde periferik kan monositlerinden DH oluşum sürecindeki kültür aşamalarında en uygun kombinasyonun GM-CSF+IL-4+TNF- α olduğu ve ortama katılan HGF'nin DH üretimine belirgin bir katkı sağlamadığı gözlemlendi. Buna karşılık HGF'nin DH kültür ortamlarına katılması bize DH matürasyon ve fonksiyonunu olumlu etkileyebileceğini telkin etmekte olup, mevcut bulguların başka araştırmalarda desteklenmesi gerektiğini düşündürmektedir.

8. SUMMARY

Dendritic cells (DCs) can be produced from the monocytes in appropriate culture media enriched with appropriate cytokines such as granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), interleukin-4 (IL-4), tumor necrosis factor- α (TNF- α), kit ligand, fms-like tyrosine kinase ligand (Flt-3 L) and interleukin-2 (IL-2).

In previous studies it has been shown that hepatocyte growth factor (HGF) causes proliferation and differentiation of the stem cells and plays important role in the functions of monocytes and macrophages affecting non-specific immune functions. Additionally, it has been observed that HGF augments the antigen presentation capacity of the peripheral blood monocytes and in a recent study it was shown that mouse DCs express c-met, the receptor of HGF. In this study, we tried to find out the effects of HGF in the development of DCs from the peripheral blood monocytes.

We studied the effect of 7 different cytokine groups (GM-CSF, IL-4, HGF, GM-CSF+HGF, IL-4+HGF, GM-CSF+IL-4, GM-CSF+IL-4+HGF) on the morphological and functional development of DCs from the peripheral monocytes in serum free culture media. Peripheral monocytes were incubated in serum free culture media with cytokines, mentioned above, for 5 days. On the end of the 5th day TNF- α was added to the cell culture and incubated for further 2 days. Surface and co-stimulating molecules (HLA-DR, CD1a, CD14, CD80, CD83, CD86) on the cells, obtained on the 5th and 7th day of the cultures, were assessed by flow cytometry. On the end of the 7th day functional capacity of the DCs stimulated with PPD was evaluated by using MTT test.

On the 5th day of incubation DC development was observed in all cytokine groups. DC development was superior in groups containing IL-4, particularly IL-4+GM-CSF, compared with others. Expression of surface and co-stimulating molecules was increased significantly after incubation with TNF- α . The most effective combination in the development of DCs was IL-4+GM-CS+TNF- α . HGF, alone, played minor role in the development of DCs. However, it augmented the maturation of the DCs. The effect of DCs on proliferation of lymphocytes was more striking in HGF containing groups, especially HGF+ IL-4.

In conclusion, in this study the best combination for the production of the DCs, from the peripheral monocytes, was found to be GM-CSF+IL-4+TNF- α . While HGF had a minor additive effect in production of DCs, it significantly augmented DCs maturation and function. These findings should be supported with further studies.

9. KAYNAKLAR:

1. Lehrer RI, Ganz T. Biochemistry and function of monocytes and macrophages. Williams hematology sixty edition. 865-871, 2001.
2. Avigan D. Dendritic cells: development, function and potential use for cancer immunotherapy. Blood Rev. 1999 Mar;13(1):51-64.
3. Satthaporn S, Eremin O. Dendritic cells(I): Biological functions .JR Coll Surg Edinb. 2001 Feb;46(1):9-19.
4. Syme R, Gluck S. Generation of dendritic cells: role of cytokines and potential clinical applications. Transfus Apheresis Sci. 2001 Apr;24(2):117-24.
5. Weimar IS, Miranda N, Muller EJ, Hekman A, Kerst JM, de Gast GC, Gerritsen WR. Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) is produced by human bone marrow stromal cells and promotes proliferation, adhesion and survival of human hematopoietic progenitor cells (CD34+). Exp Hematol. 1998 Aug;26(9):885-94.
6. Ratajczak MZ, Marlicz W, Ratajczak J, Wasik M, Machalinski B, Carter A, Gewirtz AM. Effect of hepatocyte growth factor on early human haemopoietic cell development. Br J Haematol. 1997 Oct;99(1):228-36.
7. Galimi F, Cottone E, Vigna E, Arena N, Boccaccio C, Giordano S, Naldini L, Comoglio PM. Hepatocyte growth factor is a regulator of monocyte-macrophage function. J Immunol. 2001 Jan 15;166(2):1241-7.
8. Beilmann M, Vande Woude GF, Dienes HP, Schirmacher P. Hepatocyte growth factor-stimulated invasiveness of monocytes. Blood. 2000 Jun 15;95(12):3964-9.
9. Jiang Q, Azuma E, Tanaka M, Kobayashi M, Hirayama M, Kumamoto T, Iwamoto S, Yamamoto H, Nakashima K, Sakurai M, Komada Y. Differential responsiveness of cord and adult blood monocytes to hepatocyte growth factor. Clin Exp Immunol. 2001 Aug;125(2):222-8.
10. Jiang Q, Azuma E, Hirayama M, Iwamoto S, Kumamoto T, Kobayashi M, Yamamoto H, Sakurai M, Komada Y. Functional immaturity of cord blood monocytes as detected by impaired response to hepatocyte growth factor. Pediatr Int. 2001 Aug;43(4):334-9.
11. Ovali E, Ratip S, Kibaroglu A, Tekelioglu Y, Cetiner M, Karti S, Aydin F, Bayik M, Akoglu T. Role of hepatocyte growth factor in the development of dendritic cells from CD34+ bone marrow cells. Haematologica. 2000 May;85(5):464-9.

12. Kurz SM, Diebold SS, Hieronymus T, Gust TC, Bartunek P, Sachs M, Birchmeier W, Zenke M. The impact of c-met/scatter factor receptor on dendritic cell migration. *Eur J Immunol.* 2002 Jul;32(7):1832-8.
13. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med.* 1973 May 1;137(5):1142-62.
14. Reid CD. The biology and clinical applications of dendritic cells. *Transfus Med.* 1998 Jun;8(2):77-86.
15. Rescigno M, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells at the end of the millennium. *Immunol Cell Biol.* 1999 Oct;77(5):404-10.
16. Thery C, Amigorena S. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol.* 2001 Feb;13(1):45-51.
17. Makala LH, Nagasawa H. Dendritic cells: a specialized complex system of antigen presenting cells. *J Vet Med Sci.* 2002 Mar;64(3):181-93.
18. Di Nicola M, Lemoli RM. Dendritic cells: specialized antigen presenting cells. *Haematologica.* 2000 Feb;85(2):202-7.
19. Yao V, Platell C, Hall JC. Dendritic cells. *ANZ J Surg.* 2002 Jul;72(7):501-6.
20. Granucci F, Zanoni I, Feau S, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cell regulation of immune responses: a new role for interleukin 2 at the intersection of innate and adaptive immunity. *EMBO J.* 2003 Jun 2;22(11):2546-51.
21. McColl SR. Chemokines and dendritic cells: a crucial alliance. *Immunol Cell Biol.* 2002 Oct;80(5):489-96.
22. Mahnke K, Schmitt E, Bonifaz L, Enk AH, Jonuleit H. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunol Cell Biol.* 2002 Oct;80(5):477-83.
23. Clark GJ, Angel N, Kato M, Lopez JA, MacDonald K, Vuckovic S, Hart DN. The role of dendritic cells in the innate immune system. *Microbes Infect.* 2000 Mar;2(3):257-72.
24. Pierre P, Turley SJ, Gatti E, Hull M, Meltzer J, Mirza A, Inaba K, Steinman RM, Mellman I. Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature.* 1997 Aug 21;388(6644):787-92.
25. Bhardwaj N, Friedman SM, Cole BC, Nisanian AJ. Dendritic cells are potent antigen-presenting cells for microbial superantigens. *J Exp Med.* 1992 Jan 1;175(1):267-73.
26. Inaba K, Young JW, Steinman RM. Direct activation of CD8+ cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells. *J Exp Med.* 1987 Jul 1;166(1):182-94.

27. Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, Wysocka M, Trinchieri G, Murphy KM, O'Garra A. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4⁺ T cells. *J Immunol*. 1995 May 15;154(10):5071-9.
28. Morel AS, Quaratino S, Douek DC, Londei M. Split activity of interleukin-10 on antigen capture and antigen presentation by human dendritic cells: definition of a maturative step. *Eur J Immunol*. 1997 Jan;27(1):26-34.
29. Knight SC, Burke F, Bedford PA. Dendritic cells, antigen distribution and the initiation of primary immune responses to self and non-self antigens. *Semin Cancer Biol*. 2002 Aug;12(4):301-8.
30. Melief CJ. Regulation of cytotoxic T lymphocyte responses by dendritic cells: peaceful coexistence of cross-priming and direct priming? *Eur J Immunol*. 2003 Oct;33(10):2645-54.
31. Van Nierop K, de Groot C. Human follicular dendritic cells: function, origin and development. *Semin Immunol*. 2002 Aug;14(4):251-7.
32. Fayette J, Durand I, Bridon JM, Arpin C, Dubois B, Caux C, Liu YJ, Banchereau J, Briere F. Dendritic cells enhance the differentiation of naive B cells into plasma cells in vitro. *Scand J Immunol*. 1998 Dec;48(6):563-70.
33. Ardavin C, Martinez del Hoyo G, Martin P, Anjuere F, Arias CF, Marin AR, Ruiz S, Parrillas V, Hernandez H. Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends Immunol*. 2001 Dec;22(12):691-700.
34. Curti A, Fogli M, Ratta M, Biasco G, Tura S, Lemoli RM. Dendritic cell differentiation from hematopoietic CD34⁺ progenitor cells. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2001 Jan-Mar;15(1):49-52.
35. Lechmann M, Berchtold S, Hauber J, Steinkasserer A. CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation. *Trends Immunol*. 2002 Jun;23(6):273-5.
36. Colino J, Snapper CM. Dendritic cells, new tools for vaccination. *Microbes Infect*. 2003 Apr;5(4):311-9.
37. Cravens PD, Lipsky PE. Dendritic cells, chemokine receptors and autoimmune inflammatory diseases. *Immunol Cell Biol*. 2002 Oct;80(5):497-505.
38. Schuler G, Schuler-Thurner B, Steinman RM. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. 2003 Apr;15(2):138-47.
39. Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor (HGF) as a tissue organizer for organogenesis and regeneration. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Oct 29;239(3):639-44.

40. Stella MC, Comoglio PM. HGF: a multifunctional growth factor controlling cell scattering. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999 Dec;31(12):1357-62.
41. Somers DA, Afford SC, Strain AJ, Kilby MD. Fetal growth restriction and hepatocyte growth factor. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1997 Nov;77(3):F244-8.
42. Maulik G, Shrikhande A, Kijima T, Ma PC, Morrison PT, Salgia R. Role of the hepatocyte growth factor receptor, c-Met, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002 Feb;13(1):41-59.
43. Takai K, Hara J, Matsumoto K, Hosoi G, Osugi Y, Tawa A, Okada S, Nakamura T. Hepatocyte growth factor is constitutively produced by human bone marrow stromal cells and indirectly promotes hematopoiesis. *Blood.* 1997 Mar 1;89(5):1560-5.
44. Danilkovitch-Miagkova A, Zbar B. Dysregulation of Met receptor tyrosine kinase activity in invasive tumors. *J Clin Invest.* 2002 Apr;109(7):863-7.
45. Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kampgen E, Eibl B, Niederwieser D, Schuler G. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods.* 1996 Sep 27;196(2):137-51.
46. Jost LM, Kirkwood JM, Whiteside TL. Improved short- and long-term XTT-based colorimetric cellular cytotoxicity assay for melanoma and other tumor cells. *J Immunol Methods.* 1992 Mar 4;147(2):153-65.
47. Loudovaris M, Hansen M, Suen Y, Lee SM, Casing P, Bender JG. Differential effects of autologous serum on CD34(+) or monocyte-derived dendritic cells. *J Hematother Stem Cell Res.* 2001 Aug;10(4):569-78.
48. Ferlazzo G, Klein J, Paliard X, Wei WZ, Galy A. Dendritic cells generated from CD34+ progenitor cells with flt3 ligand, c-kit ligand, GM-CSF, IL-4, and TNF-alpha are functional antigen-presenting cells resembling mature monocyte-derived dendritic cells. *J Immunother.* 2000 Jan;23(1):48-58.
49. Santin AD, Hermonat PL, Ravaggi A, Chiriva-Internati M, Cannon MJ, Hiserodt JC, Pecorelli S, Parham GP. Expression of surface antigens during the differentiation of human dendritic cells vs macrophages from blood monocytes in vitro. *Immunobiology.* 1999 Jun; 200(2): 187-204.
50. Kiertcher SM, Gitlitz BJ, Figlin RA, Roth MD. Granulocyte/macrophage-colony stimulating factor and interleukin-4 expand and activate type-1 dendritic cells (DC1) when administered in vivo to cancer patients. *Int J Cancer.* 2003 Nov 1;107(2):256-61.
51. Moldenhauer A, Nociari MM, Dias S, Lalezari P, Moore MA. Optimized culture conditions for the generation of dendritic cells from peripheral blood monocytes. *Vox Sang.* 2003 Apr;84(3):228-36.

52. Xia CQ, Kao KJ. Monocyte-derived CD1a⁺ dendritic cells generated in two different culture systems: immunophenotypic and functional comparison. *Scand J Immunol.* 2003 Apr;57(4):324-32.
53. Fischer HG, Frosch S, Reske K, Reske-Kunz AB. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activates macrophages derived from bone marrow cultures to synthesis of MHC class II molecules and to augmented antigen presentation function. *J Immunol.* 1988 Dec 1; 141(11): 3882-8.
54. Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med.* 1994 Jul 1;180(1):83-93.
55. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 1994 Apr 1;179(4):1109-18.
56. te Velde AA, Klomp JP, Yard BA, de Vries JE, Figdor CG. Modulation of phenotypic and functional properties of human peripheral blood monocytes by IL-4. *J Immunol.* 1988 Mar 1; 140(5): 1548-54.
57. Chapuis F, Rosenzweig M, Yagello M, Ekman M, Biberfeld P, Gluckman JC. Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. *Eur J Immunol.* 1997 Feb; 27(2): 431-41.
58. Kiertcher SM, Gitlitz BJ, Figlin RA, Roth MD. Granulocyte/macrophage-colony stimulating factor and interleukin-4 expand and activate type-1 dendritic cells (DC1) when administered in vivo to cancer patients. *Int J Cancer.* 2003 Nov 1; 107(2): 256-61.
59. Kim YT, Hersh EM, Trevor KT. Feasibility to generate monocyte-derived dendritic cell from coculture with melanoma tumor cells in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and interleukin-4. *Am J Reprod Immunol.* 2003 Apr; 49(4): 230-8.
60. Kiertcher SM, Roth MD. Human CD14⁺ leukocytes acquire the phenotype and function of antigen-presenting dendritic cells when cultured in GM-CSF and IL-4. *J Leukoc Biol.* 1996 Feb; 59(2): 208-18.
61. Morrison RS 3rd, Cruse JM, Wang H, Lewis RE. Dendritic cell differentiation and proliferation: enhancement by tumor necrosis factor-alpha. *Exp Mol Pathol.* 2003 Dec;75(3):228-37.
62. Chomarat P, Dantin C, Bennett L, Banchereau J, Palucka AK. TNF skews monocyte differentiation from macrophages to dendritic cells. *J Immunol.* 2003 Sep 1; 171(5): 2262-9.

63. Santiago-schwarz F. Positive and negative regulation of the myeloid dendritic cell lineage. *J. Leukocyte Biol.* 1999, 66,209-216.
64. Thurner B, Roder C, Dieckmann D, Heuer M, Kruse M, Glaser A, Keikavoussi P, Kampgen E, Bender A, Schuler G. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J Immunol Methods.* 1999 Feb 1;223(1):1-15. Review. Erratum in: *J Immunol Methods* 1999 Apr 22;224(1-2):211.
65. Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kampgen E, Eibl B, Niederwieser D, Schuler G. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods.* 1996 Sep 27;196(2):137-51.
66. Zhou LJ, Tedder TF. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Mar 19;93(6):2588-92.
67. Dilioglou S, Cruse JM, Lewis RE. Costimulatory function of umbilical cord blood CD14+ and CD34+ derived dendritic cells. *Exp Mol Pathol.* 2003 Aug;75(1):18-33.
68. Dilioglou S, Cruse JM, Lewis RE. Function of CD80 and CD86 on monocyte- and stem cell-derived dendritic cells. *Exp Mol Pathol.* 2003 Dec;75(3):217-27.
69. Chen B, Stiff P, Sloan G, Kash J, Manjunath R, Pathasarathy M, Oldenburg D, Foreman KE, Nickoloff BJ. Replicative response, immunophenotype, and functional activity of monocyte-derived versus CD34(+)-derived dendritic cells following exposure to various expansion and maturational stimuli. *Clin Immunol.* 2001 Feb; 98(2): 280-92.
70. Buchler T, Hajek R, Bourkova L, Kovarova L, Musilova R, Bulikova A, Doubek M, Svobodnik A, Mareschova I, Vanova P, Tuzova E, Vidlakova P, Vorlicek J, Penka M. Generation of antigen-loaded dendritic cells in a serum-free medium using different cytokine combinations. *Vaccine.* 2003 Feb 14;21(9-10):877-82.
71. Day RM, Soon L, Breckenridge D, Bridges B, Patel BK, Wang LM, Corey SJ, Bottaro DP. Mitogenic synergy through multilevel convergence of hepatocyte growth factor and interleukin-4 signaling pathways. *Oncogene.* 2002 Mar 28;21 (14):2201-11.