

T.C.

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**BETA GLUKANIN İMMUNOMODÜLATÖR ETKİNLİĞİNİN HAYVAN
MODELİNDE İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Dr.KADRIYE USLU

Tez Danışmanı:Prof.Dr.Turgut İmir

ANKARA

Ocak 2008

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

DOKTORA /YÜKSEK LİSANS TEZ SAVUNMA SINAV TUTANAĞI

ÖĞRENCİNİN ADI ve SOYADI : Kadriye Uslu
ANABİLİM DALI : Mikrobiyoloji
SINAV TARİHİ : 23.01.08
TEZ KONUSU : Beta Glukanın İmmümodülatör etkisi
için hayvan modelinde incelenmesi

KARAR :

Yukarıda belirtilen tarihte yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda yukarıda konusu belirtilen tezin

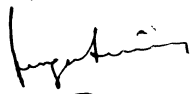
Düzeltilmesine :


Kabulüne : X


Reddine :


OYBİRLİĞİ / ~~OYÇOKLUĞU~~ ile karar verilmiştir.

GEREKÇE :


Prof. Dr. Turgut Yılmaz
JÜRİ BAŞKANI


Prof. Dr. Semra Kustimur
ÜYE


Prof. Dr. Semra Kustimur
ÜYE


Prof. Dr. Seyyal Rota
ÜYE


Prof. Dr. Abdullah Ekmeleci
ÜYE

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim boyunca ve tez çalışmalarım sırasında bana yol gösteren sayın Prof. Dr. Turgut İmir'e, eğitimim boyunca bilgilerinden faydalanmamı sağlayan başta anabilim dalı başkanı sayın Prof. Dr. Nedim Sultan olmak üzere Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyelerine,

Bu çalışmanın planlanması ve yapılmasında büyük emeği geçen, birlikte çalışmaktan zevk aldığım, bitmez enejesi, sabrı ve engin bilgisiyile bana yol gösteren Doç. Dr. Emin Ümit Bağrıaçık'a,

Çalışmalarım sırasında maddi manevi yardımlarını esirgemeyen başta Dr.Cahit Babür'e, Dr.Ayşegül Taylan'a ve Vet. Hekim Mesut Mungan'a Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığında Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü Parazitoloji Laboratuvarı personeline,

Doktora eğitimim süresince her zaman desteklerini ve içten yardımlarını gördüğüm Yrd. Doç. Dr. Funda Doğruman Al'a ve Uzm. Dr. E. Doruk Engin'e, Yrd. Doç. Dr .Işıl Fidan'a ve her zaman yanımda olan Uzm. Dr. Nurhan Albayrak'a

Anabilim dalımızdaki beraber çalıştığım asistan ve uzman arkadaşlarıma, anabilim dalı personeline,

Varlıkları ile bana güç veren aileme

Teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

Kabul ve Onay	I
Önsöz	II
İçindekiler	III
Simgeler ve Kısaltmalar	VI
Şekiller Dizini	VIII
Grafikler Dizini	IX
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1 Mantar Hücre Duvarı Ve Glukan	3
2.2 Beta Glukan	4
2.3 Saccharomyces cerevisiae Glukanının Moleküler Yapısı	5
2.4 Arpa Glukanının Moleküler Yapısı	6
2.5 Glukanların Fiziksel Ve Kimyasal Özellikleri	7
2.6 Glukanın İmmün Sistem Üzerine Etkileri	8
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER	20
3.1 Deneysel Hayvanları	20
3.2 Kimyasal malzemeler	20
3.3 Monoklonal Antikorlar	21
3.4 Hücre kültür materyalleri	22
3.5 Araçlar	22
3.6 Glukanlar	23
3.7 Yöntemler	24

3.7.1 Dalak Hücre İzolasyonu	24
3.7.2 Periton Makrofaj İzolasyonu	25
3.7.3 Glukanların Farklı konsantrasyonlarının Dalak Hücre Süpernatantında Sitokin Düzeylerine Etkisinin Değerlendirilmesi	26
3.7.4 Glukanların Farklı Konsantrasyonlarının Periton Makrofaj Hücre Süpernatantında Sitokin Düzeylerine Etkisinin Değerlendirilmesi	27
3.7.5 Glukanların, Periton Makrofaj Ve Dalak Hücre Yüzey Reseptörleri Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi	27
3.8 İstatistiksel Değerlendirme	28
4. BULGULAR	29
4.1 Hücresel İmmün Yanıtın Değerlendirilmesi	29
4.1.1 Dalak hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon sonunda ölçülen TNF- α üzerine glukanların etkisi	30
4.1.2 Dalak hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon sonunda ölçülen IL-1 β üzerine glukanların etkisi	32
4.1.3 Dalak hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon sonunda ölçülen IL-2 üzerine glukanların etkisi	33
4.1.4 Dalak hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon sonunda ölçülen IL-6 üzerine glukanların etkisi	34
4.2 Doğal İmmün Yanıtın Değerlendirilmesi	36
4.2.1 Periton Makrofaj hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon sonunda ölçülen TNF- α üzerine glukanların etkisi	37
4.2.2 Periton Makrofaj hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon sonunda ölçülen IL-1 β üzerine glukanların etkisi	38
4.2.3 Periton Makrofaj hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon sonunda ölçülen IL-6 üzerine glukanların etkisi	40

4.2.4 Periton Makrofaj hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon sonunda ölçülen IL-12p40 üzerine glukanların etkisi	42
4.3 Hücre Yüzey Reseptörlerinin Değerlendirilmesi	43
4.3.1 Dalak Hücre Yüzey Reseptörleri Üzerine Glukanın Etkisi	44
4.3.2 Periton Makrofaj Hücre Yüzey Reseptörlerine Glukanın Etkisi	51
5.TARTIŞMA VE SONUÇLAR	56
6.ÖZET	69
7.SUMMARY	71
8.KAYNAKLAR	73
9.ÖZGEÇMİŞ	84

SİMGELER VE KISALTMALAR

ANOVA	Varyans Analizi
ASH	Antijen sunan hücre
BSA	Bovine Serum Albumine
C°	Santigrat
CCL21	CC kemokin ailesine ait küçük bir sitokin
CCR7	CCL21 kemokinine bağlanan kemokin reseptörü
CR3	Kompleman Reseptör 3
CR2(CD21)	Kompleman Reseptör 2
C3b	Kompleman 3b
C3bi	C3b'nin serum faktör I ile parçalanması sonucunda oluşur
CD	ayırım kümesi (cluster of differentiation)
DMEM	Dulbeco's Modified Eagle's Medium
ELISA	Enzyme-linked immunosorbant assay
FBS	Fetal Bovine Serum
GlyCAM-1	HEV üzerindeki L-selektin ligandı
H2O2	hidrojen perokside
ICAM-1, ICAM-2	İnterselüler Adezyon Molekülü-1,2
IFN	İnterferon
Ig	İmmunoglobülin
IL	İnterlökin
I.P	Periton içi
ITAM	sitoplazmik immünoresptör tirozin bazlı aktivasyon motifi
LFA-1	lymphocyte function associated antigen-1
LPS	Lipopolisakkarit
MadCAM-1	mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1

MIP	Makrofaj inflamatuvar proteini
MHC	Major doku uygunluk molekülü
ml	Mililitre
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
NF-κB	Nükleer faktör-kappaB
NO	Nitrik oksit
NK	Doğal öldürü hücre
OVA	Ovalbumin
ör:	örneğin
PAMP	Patojenite ile ilişkili moleküler yapılar
PBS	Fosfat tampon solüsyonu
Pg	pikogram
P.O	oral
ss	standart sapma
Th	yardımcı T hücre
TLR	Tool like reseptör
TNF-a	Tümör nekrozis faktör-alfa
VCAM-I	Vasküler adezyon molekülü-1

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil1.	Mantar hücre duvar yapısı	3
Şekil2.	Glukanın yapısal formları	5
Şekil3.	Mantarın hücre duvar yapısını oluşturan glukanın a) β (1-3) bağlı lineer formu b) (1-6) dallanma yapan formu gösterilmektedir	6
Şekil4.	β -(1,3) ve β -(1,4) bağlı beta glukan yapısı	7
Şekil5.	Mantar hücre duvar elemanları için Pattern-tanıyıcı reseptörler	9

GRAFİKLER DİZİNİ

Sayfa

Grafik1. sSCBG' nin dalak hücre kültür ortamında 24 saat sonra TNF- α cevabı	31
Grafik2. sBBG' nin dalak hücre kültür ortamında 24 saat sonra TNF- α cevabı	31
Grafik3. sSCBG' nin dalak hücre kültür ortamında 24 saat sonra IL-1 β cevabı	32
Grafik4. sBBG' nin dalak hücre kültür ortamında 24 saat sonra IL-1 β cevabı	33
Grafik5. sSCBG' nin dalak hücre kültür ortamında 24 saat sonra IL-2 cevabı	34
Grafik6. sBBG' nin dalak hücre kültür ortamında 24 saat sonra IL-2 cevabı	34
Grafik7. sSCBG' nin dalak hücre kültür ortamında 24 saat sonra IL-6 cevabı	35
Grafik8. sBBG' nin dalak hücre kültür ortamında 24 saat sonra IL-6 cevabı	36
Grafik9. sSCBG' nin periton makrofaj hücre kültür ortamında 24 saat sonra TNF- α cevabı	38
Grafik10. sBBG' nin periton makrofaj hücre kültür ortamında 24 saat sonra TNF- α cevabı	38
Grafik11. sSCBG' nin periton makrofaj hücre kültür ortamında 24 saat sonra IL-1 β cevabı	39
Grafik12. sBBG' nin periton makrofaj hücre kültür ortamında 24 saat sonra IL-1 β cevabı	40
Grafik13. sSCBG' nin periton makrofaj hücre kültür ortamında 24 saat sonra IL-6 cevabı	41
Grafik14. sBBG' nin periton makrofaj hücre kültür ortamında 24 saat sonra IL-6 cevabı	41

Grafik15. sSCBG' nin periton makrofaj hücre kültür ortamında 24 saatlik inkübasyonunda IL-12p40 cevabı.	42
Grafik16. sBBG' nin periton makrofaj hücre kültür ortamında 24 saatlik inkübasyonunda IL-12p40 cevabı.	43
Grafik17. sSCBG uygulanmış ve uygulanmamış fare dalak hücrelerinde CD4+CD25+ hücre yüzde değerleri	46
Grafik18. sSCBG uygulanmış ve uygulanmamış fare dalak hücrelerinde CD4+CD69+ hücre yüzde değerleri	46
Grafik19. sSCBG uygulanmış ve uygulanmamış fare dalak hücrelerinde CD4+CD62L+ hücre yüzde değerleri	46
Grafik20. sSCBG uygulanmış ve uygulanmamış fare dalak hücrelerinde CD4+CD45R+ hücre yüzde değerleri	47
Grafik21. sSCBG uygulanmış ve uygulanmamış fare dalak hücrelerinde CD4+CD45RB+ hücre yüzde değerleri	47
Grafik22. sSCBG uygulanmış ve uygulanmamış fare dalak hücrelerinde CD8+CD25+ hücre yüzde değerleri	48
Grafik23. sSCBG uygulanmış ve uygulanmamış fare dalak hücrelerinde CD8+CD69+ hücre yüzde değerleri	48
Grafik24. sSCBG uygulanmış ve uygulanmamış fare dalak hücrelerinde CD8+CD62L+ hücre yüzde değerleri	48
Grafik25. sSCBG uygulanmış ve uygulanmamış fare dalak hücrelerinde CD8+CD45R+ hücre yüzde değerleri	49
Grafik26. sSCBG uygulanmış ve uygulanmamış fare dalak hücrelerinde CD8+CD45RB+ hücre yüzde değerleri	49
Grafik27. sSCBG uygulanmış ve uygulanmamış fare dalak hücrelerinde CD19+CD86+ hücre yüzde değerleri	50
Grafik28. sSCBG uygulanmış ve uygulanmamış fare dalak hücrelerinde CD19+CD80+ hücre yüzde değerleri	50
Grafik29. sSCBG uygulanmış ve uygulanmamış fare dalak hücrelerinde CD19+MHC class-II+ hücre yüzde değerleri	51

Grafik30. sSCBG uygulanmış ve uygulanmamış fare dalak hücrelerinde CD19+ICAM-I+ hücre yüzde değerleri	51
Grafik31. sSCBG; sBBG ve sadece PBS uygulanmış fare periton makrofaj hücrelerinde F4/80+CD86+ hücre yüzde değerleri	53
Grafik32. sSCBG; sBBG ve sadece PBS uygulanmış fare periton makrofaj hücrelerinde F4/80+CD80+ hücre yüzde değerleri	53
Grafik33. sSCBG; sBBG ve sadece PBS uygulanmış fare periton makrofaj hücrelerinde F4/80+MHC class-II+ hücre yüzde değerleri	54
Grafik34. sSCBG; sBBG ve sadece PBS uygulanmış fare periton makrofaj hücrelerinde F4/80+ICAM-I+ hücre yüzde değerleri	54
Grafik35. sSCBG; sBBG ve sadece PBS uygulanmış fare periton makrofaj hücrelerinde F4/80+CD11b+ hücre yüzde değerleri	55

1-GİRİŞ

Polisakkaritlerin immunomodulatör olarak oldukça uzun bir geçmişleri vardır. Bir çok ülkede kanser tedavisinde immün sistemi stimüle etmek için kullanılmakta olan bu moleküller çalışmaların odağı olmuşlardır. İmmunomodulatör ajanlar, vücut savunmasında görev alan makrofajların, T ve B lenfositlerinin, lökositlerin ve doğal öldürücü (NK) hücrelerin fonksiyonel aktivitelerini, sayılarını ve birbirleriyle etkileşimlerini bu hücrelerin ortama salgıladığı hormon benzeri etki gösteren sitokinlerin miktarını ve çeşitliliğini değiştirerek düzenlerler. Bu nedenle bu ajanlar çok çeşitli bakteriyel, viral, fungal, parazitik enfeksiyonlar ve neoplastik durumlara karşı vücut savunmasını non-spesifik olarak artırmaktadırlar.^{11,61,77}

İlk olarak *Serratia marcescens*'den 1943'de izole edilen ve 'Shear's polisakkariti' olarak bilinen maddenin tümör nekroz edici etkisinin belirlenmesi ile polisakkaritlere ilgi artmıştır.⁶⁷ Yine aynı dönemlerde zimosan; *Saccharomyces cerevisiae* mayasının hücre duvar elemanı olarak tanımlanmıştır. Zaman içinde zimosanın protein lipit ve polisakkarit içeren bir bileşik olduğu gösterilmiştir.^{51,67}

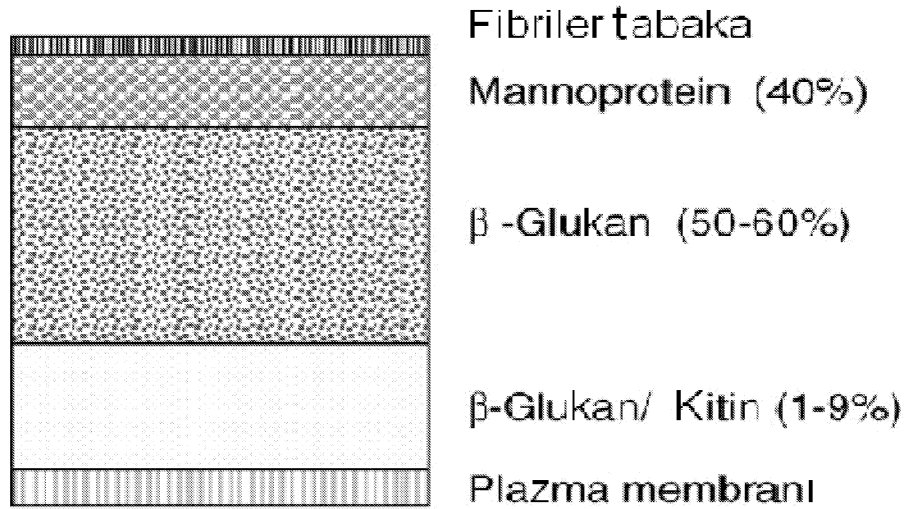
Zamanla β -1,3 glukan saf olarak tanımlanmış ve mantar hücre duvar elemanlarının, makrofajları kompleman sisteminin aktivasyonu yoluyla uyarma özelliklerinin olduğu gösterilmiştir. İlk başlarda yalnızca Zimosan (*S. cerevisiae* preparatı) yapısında bulunan glukanın bu etkinliğe sahip olduğu düşünülmüştür. O dönemden bu yana bilimsel literatürde yer alan bir çok çalışmada glukanların immunobiyolojik özellikleri, anti-kanserojen ve anti-infektif etkinlikleri üzerinde durulmuştur. Bir immunomodulatör olarak glukanın immün hücreler ve immün olmayan hücreler üzerindeki özgül reseptörlerine bağlanarak hem oral yoldan (P.O.) hemde intravenöz (I.V.) yoldan etkin olduğu düşünülmektedir.^{11, 16, 76, 59, 86}

Çalışmamızda; üzerinde yapılan araştırmalara rağmen immünomodülatör etkinliği tam açıklık kazanmamış olan glukanın etkinliği hakkında bilgi edinilmeye çalışılacaktır. Glukanın doğal ve hücreyel immün sistem üzerine etkisini araştırmak için; invitro ortamda β -D -glukana verilen inflamatuvar yanıt değerlendirilmiş, invivo uygulama sonrasında hücre yüzey reseptörlerinin değişimine olan etkisi incelenmiştir. β -D-glukanların elde edildikleri organizmaların farklılığının immun cevabı düzenleyici özellikleri üzerine olan etkisi değerlendirilerek; genel immunmodulatör etkinliği hakkında bilgi edinilmesi amaçlanmıştır.

2-GENEL BİLGİLER

2.1 Mantar Hücre Duvarı Ve Glukan

Saprofitik ve patojenik mantarlar; plazma zarının dışına yerleşmiş olan hücreyi osmoz değişikliklerine karşı koruyan, besin alımında rol oynayan ve ortam ile mantar arasındaki ilişkileri düzenleyen bir hücre duvarına sahiptir.⁴⁶ Hücre duvarı mantar hücresinin biçimini, morfogenezini, virulansını, antijenlerini -yani mantar-konak etkileşimini- ve mantarın antifungallere duyarlılığını belirleyen dinamik çok tabakalı bir yapıdır (Şekil,1).¹² Yapısında protein, karbonhidrat ve lipit bulunur. Glukan ve kitin sert bir ağ oluşturarak duvarın yapısal bileşenini oluşturur. Proteinler ve gluko(manno)proteinler bu iskelete bağlanırlar. Duvar kuru ağırlığının %40'ını mannan, kuru ağırlığın % 50-60' ını da glukan oluşturur. Proteinler %6-25, lipitler %1-7 ve kitin %1-9 oranında bulunur.^{2,46}



Şekil 1: Mantar hücre duvar yapısı : mantar hücre duvarını oluşturan yapıların başında bulunan karbonhidrat molekülleri hücrenin yapısal bütünlüğü ve yaşamsal devamlılığı için esastır. ⁴

Mantar hücre duvar yapısında bulunan glukan α ve β olmak üzere iki farklı pozisyonda bulunmaktadır. (1,3)- β -D glukan mikroorganizmalarda, bitkilerde ve özellikle mantarlarda daha yaygın olarak

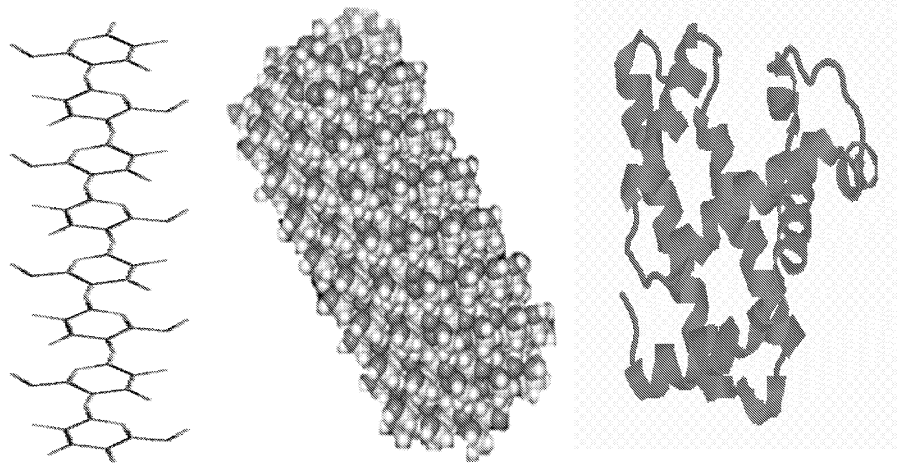
bulunmaktadır. Özellikle patojenik mantarlarda β -glukandan daha fazla oranda bulunan α -glukan hakkında çok fazla bilgi henüz olmasa da, lineer glukoz polimerlerinden oluştuğu gösterilmiştir. α -glukan sentezinde defekt olan mantar hücrelerinin morfolojik olarak anormal görüldüğü bilinmektedir. Hücrelerin bölünme aşamalarında ve olgun mantar hücrelerinde α -glukan'ın yaşamsal öneme sahip olduğu gösterilmiştir.^{28,33,35,65}

2.2 Beta Glukan

Glukanlar D-glükopiranozil ünitelerini içeren doğal polisakkaritlerdir. Tabiatta tohumlarda, bitkilerde, bakteri, mantar ve mayaların yapılarında bulunurlar.⁹¹ Glukanların bir kısmı yapısal olarak, glüköz ünitelerinin 1,3 pozisyonunda glikozidik bağlarla birbiri ardınca tekrarı ile oluşan doğrusal bir formda bulunurlar (Şekil, 3a). Bazıları ise (1,3) glikozidik bağlarla oluşmuş doğrusal yapı üzerinde (1,6) (Şekil, 3b) yan dallanmalar veya (1,4) (Şekil, 4) karma bağlanmalar yapmaktadır.^{39,40,41} Bu bağların uzunlukları ve yapı üzerindeki dağılımları farklılıklar göstermektedir. Glukanın makromoleküler yapısı büyük ölçüde elde edildiği organizmaya ve izolasyon yöntemine bağlıdır.^{43,44,89,91}

Glukan; çözücü sistemin değişmesine bağlı olarak solüsyon içinde farklı yapısal formlarda bulunur.^{44,56,57,90} Suda çözünebilen glukanlar tek sarmal ve/veya üçlü sarmal ve gelişmiş güzel sarmal yapı olarak başlıca üç yapısal formda bulunurlar. Tek sarmal yapı karakteristik olarak yarı esnek spiral şeklindedir (Şekil, 2A). Spiralin her bir döngüsünde 6 adet β -D-glükopiranozil molekülü bulunmaktadır. Üçlü sarmal yapı ise üç adet yarı esnek sarmal yapının bir araya gelmesi ile oluşur (Şekil, 2B). Bu yapısal formun stabil kalabilmesi ve suda çözünebilmesi; sarmalın merkezinde bulunan C2 hidroksil gruplarını da içeren fazla sayıda hidrojen bağlarına bağlıdır.^{39, 44,91}

Mantar hücre duvarında (1,3) ve (1,6) pozisyonlarında birbirlerine bağlanan anhidroglüköz ünitelerinin bir araya gelmesiyle oluşan glukanlar hücre duvarında bulunan diğer karbohidratlara, proteinlere ve lipitlere bağlanarak üç boyutlu bir ağ oluştururlar.^{4,12,28,72,91}



A:Tekli sarmal

A-) Serge Pérez;

B:Üçlü Sarmal

B-) D.B.Zekovic;

C:Gelişmiş Sarmal

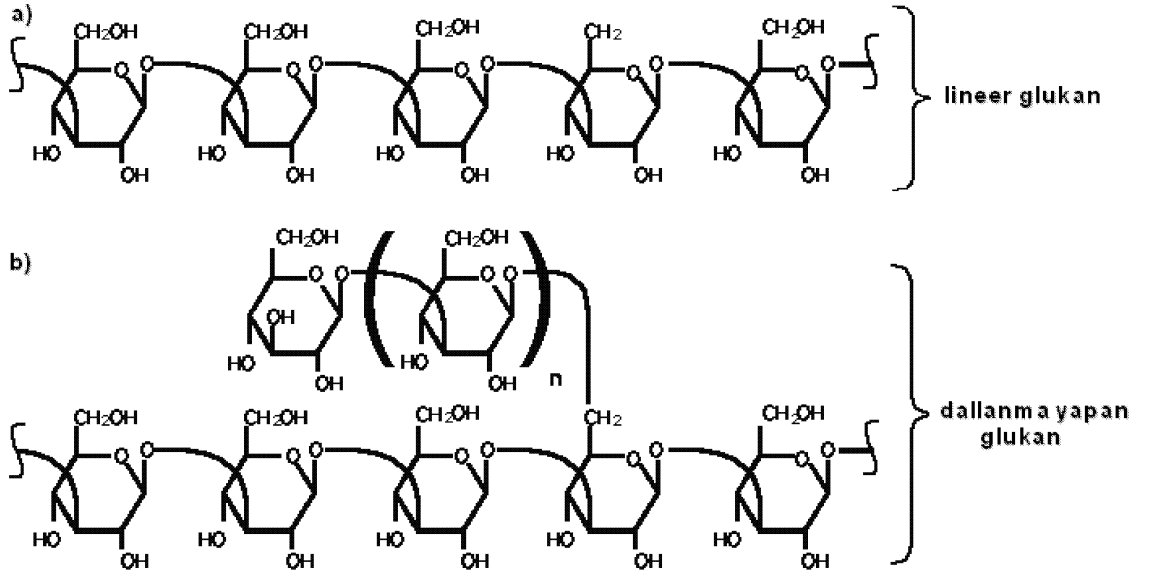
C-) W.M. Kulicke

Şekil,2 : Glukanın yapısal formları

2.3 *Saccharomyces cerevisiae* Glukanının Moleküler

Yapısı:

S.cerevisiae hücre duvar glukanı farklı makromoleküler bileşik yapıdaki iki farklı glukandan oluşmaktadır. Bunlardan lineer olanı 1,3 pozisyonda glikozidik bağlarla bağlı β -D-glükopiranozil ünitelerinin oluşturdukları zincir üzerinde (1,6) pozisyonda dallanmalar içermektedir. Nispeten daha az oranda da (1,6) pozisyonda bağlanan ve (1,3)-bağlı dallanmalar yapan glukan polimerleri de bu yapıda bulunmaktadır.^{2,10,91}



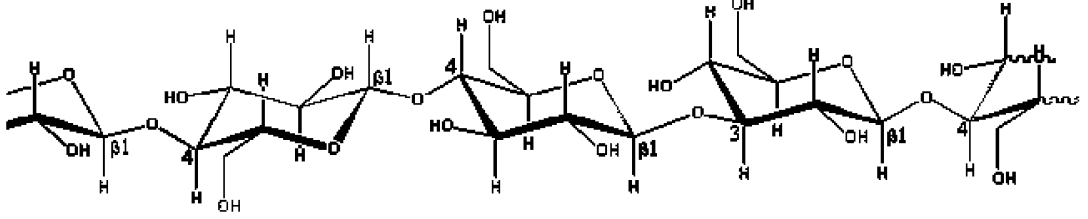
Şekil 3 : Mantarın hücre duvar yapısını oluşturan glukanın a) β (1-3) bağlı lineer formu b) (1-6) dallanma yapan formu gösterilmektedir ⁴

S. cerevisiae'den ilk elde edilen glukun yüksek moleküler ağırlıkta ve suda çözünmeyen mikropartiküler formda bulunurken, moleküler ağırlığının bir miktar azalmasıyla suda çözünür forma geçmektedir. *S.cerevisiae*'nın hücre duvarında en alt tabakada alkali ortamda çözünmeyen β -glukun (%30-35),orta katmanda alkali ortamda çözünen β -glukun (%20-22), en üstteki katmanında ise fosforile olmuş mannandan oluşan glikoprotein yer almaktadır (%30) ^{48,91} Alkali ortamda çözünmeyen (1,3) glukun hücrenin dış ortama direnme gücünden ve mantar hücresinin şeklinden sorumlu olduğu, alkali ortamda çözünen (1,3) glukun hücre duvarına esnek olma özelliği kazandırdığı, (1,6) glukun ise hücre duvar organizasyonunda mannoprotein ve kitin ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. ^{16,41,91}

2.4 Arpa Glukunun Moleküler Yapısı

Karbonhidrat bakımından yoğun olan tahıl tanelerinde kuru maddenin başlıca komponentinin nişasta olduğu bilinmektedir. Buğday, arpa, yulaf, mısır ve çavdar bu gruba giren tanelerin başlıcalarıdır. Tahıl tanelerinin

hücre duvarlarının ise % 70-95'ini nişasta olmayan polisakkaritler oluşturmaktadır.^{34,36} Bu hücre duvarı polisakkaritlerinin başlıcaları beta gluklanlar, arabinoksilanlar (pentozanlar), hemiselüloz, selüloz ve pektinlerdir. Arpa ve yulafta endosperm hücre duvarlarının en önemli polisakkaritleri ise beta-glukanlardır.^{21,22,36} Nişasta olmayan diyet liflerinden (1→3),(1→4)-β-D-β- gluklan (Şekil,4) suda çözünen ve çözünmeyen olarak iki farklı formda arpa hücre duvarında bulunmaktadır.²¹ Arpa gluklanı dallanma yapmadan çok yönlü dağılım gösteren, karakteristik olarak her döngüsünde üç adet sellotrioz ünitesi taşıyan üç kez katlanmış helikal yapısı olan lineer zincirlerden oluşmaktadır. β-(1/4): β-(1/3) oranı arpa gluklanının yapısında oldukça yüksek olarak bulunmaktadır. Bu oranın yüksek olması çözünürlük ve viskozite ile de ilişkilendirilir.^{21,22,34,91}



Şekil,4: β-(1,3) ve β-(1,4) bağlı beta gluklan yapısı gösterilmektedir.⁶⁸

2.5 Glukanların Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri:

Glukanlar çok çeşitli mantarlar, bitkiler, algler ve az miktarda bakterilerden üretilmektedir.^{2,22,91} Farklı mikroorganizmalar birbirinden farklı fiziksel ve kimyasal etkilere sahip olan gluklanlar üretebilirler. Aynı zamanda gluklanların organizmalardan izole edilirken farklı yöntemlerin kullanılması da gluklanlar arasındaki farklılığı artırır. Bu yöntemlerin gluklanların doğal yapısına etkisinin anlaşılması oldukça önemlidir.^{5,57,83} Bu karmaşık yapıli karbonhidratların fiziksel ve kimyasal farklılıklarının değerlendirilmesi için ilk

önce temel yapılarının ,dallanma derecelerinin ,moleküler ağırlıklarının ,polidispersti ve polimerizasyon derecelerinin , saflık oranlarının, polimer yüklerinin ve solüsyon içindeki yapısal formlarının değerlendirilmesi gerekmektedir.^{7,82,91}

Glukanların ve glukan türevlerinin doku kültüründe ve hayvan çalışmalarında kullanılabilmesi için suda çözünür forma getirilmesi gerekmektedir.⁶⁴ Glukanların büyük miktarı hücre duvarında lipitler, proteinler ve glukan olmayan diğer karbonhidratlarla birlikte bir kompleks oluşturmuş şekilde bulunurlar.³⁹ Son zamanlarda glukanların saf olarak ve suda çözünür formda izolasyonları ,analizleri, yapısal olarak tanımlanmaları ve elde edildikleri formda miktarlarını belirleyebilmek için çok fazla zaman ve emek harcanmaktadır. Günümüzde kullanılan kimyasal izolasyon bazlı çalışmalar bizlere elde edilen glukanların gerçek miktarlarını tam olarak verememektedir. Glukanların buldukları bu kompleks karışım içinden hızlı ve basit olarak tanımlanması ve miktarlarının belirlenmesine ihtiyaç vardır.² Bu doğal olarak üretilen karbonhidratların moleküler ağırlıklarının tam olarak belirlenmesinin, glukanın etkinliğinin değerlendirilmesi açısından önemli olduğu belirtilmiştir.⁸³

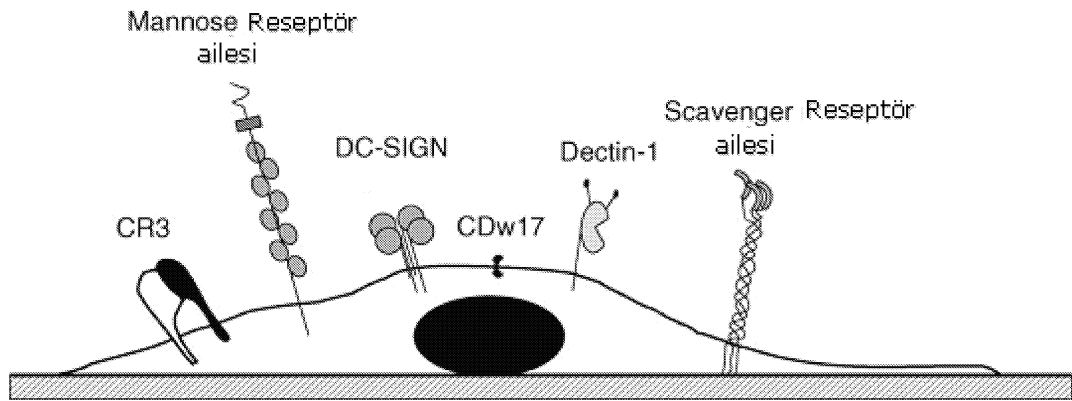
2.6 Glukanın İmmün Sistem Üzerine Etkileri:

Organizmaların mikrobiyal ürünler ile etkileşimi doğal immün cevabı başlatan en önemli etmendir. Bu etkileşim mikroorganizmaların tanınmasının yanında akut ve kronik cevabı harekete geçirmesi açısından da önemlidir. Doğal immün sistemdeki bu kompleks reseptör ağı ,farklı mikroorganizmalardaki yapısal olarak değişmeyen karbonhidrat, protein ve lipit moleküllerindeki antijenik bölgelerin hızlı bir şekilde tanınmalarını sağlar.^{6,10,32,85} Bu değişmeyen ve doğal immün yanıt hücreleri tarafından tanınan stabil moleküler yapılar; patojenite ile ilişkili moleküler yapılar olarak adlandırılır (pathogen-associated molecular patterns -PAMP-). Bu yapıları tanıyan reseptörlere de patojenite ile ilgili moleküler yapıları tanıyan

reseptörler (pattern-recognition reseptor) denir. PAMP'lar arasında bakteriyal lipopolisakkarit, lipoteikoik asit, peptidoglikan, lipoprotein, lipoarabinomannan, bakteriyal DNA, çift zincirli RNA ve glukan polimerleri sayılabilir.^{6,9,10,53} Bu moleküller kimyasal yapı olarak birbirlerinden farklı da olsalar ortak özelliklere sahiptirler.^{52,53,66}

Glukanların hücresel aktivite üzerindeki etkisinin başlaması için gerekli olan ilk basamak hücre membranı üzerine lokalize olmuş reseptörler tarafından glukan polimerlerinin tanınmasıdır.^{85,86} Bir çok türün (1,3)- β -D-glukanı tanıyarak bağlanan reseptörlere sahip olduğu düşünülmektedir ve bu günümüzde de araştırılmakta olan bir konudur.^{56,57,71,78} Her ne kadar mantar hücre duvar bileşenlerinin tanınmasında oldukça önemli ve merkezi rol oynadıkları bilinse de; glukan polimerlerinin immün yanıtı nasıl aktive ettikleri tam olarak bilinmemektedir.^{32,66}

Organizmada immün ve immün olmayan hücreler üzerinde – monosit, makrofaj, nötrofil, langerhans hücresi, eozinofil, alveolar epitel hücre ve fibroblast- beta glukan reseptör aktivitesi tanımlanmıştır.^{6,7,42}



Şekil. 5. Mantar hücre duvar elemanları için Pattern-tanıyıcı reseptörler: mannan tanıyan Reseptörler: (mannose reseptör ailesi ve DC-SIGN)⁹ glukan polimerlerini tanıyan reseptörler: (CR3, lactosylceramide (CDw17), Çöpçü receptorler ve Dectin-1)⁹

Yapılan çalışmalarda bazı (1,3)- β -D-Glukan polimerlerinin nötrofil, NK ve makrofajlar üzerindeki kompleman reseptör 3 (CR3)'e bağlanmakta olduğu ortaya konmuştur.^{8,80,87} CR3 sitotoksiste ve fagositoz için bir reseptör olmasının yanında lökosit diyapedezinden sorumlu bir adezyon molekülü olarak da görev yapmaktadır.^{7,10,53,80,82} CR3 komplemanla ya da opsonin antikor ile opsonize olmuş mikroorganizmalara; ayrıca hücre dışı matriks yapılarına (fibrinojen, fibrin, laminin); endotel hücre yüzeyinde bulunan ICAM-1 adezyon molekülüne ve bazı mikroorganizmaların hücre yüzey yapılarına opsonizasyon olmaksızın bağlanmaktadır.^{7,9,26,80} Aynı zamanda bu reseptör, glukan polimerlerin kandan temizlenmesi içinde görev yapmaktadır. Küçük moleküler ağırlıklı glukan bağlandığı CR3 ile birlikte kandan glomerüler filtrasyon ile hızlı bir şekilde temizlenir. Daha büyük moleküler ağırlıklı glukan polimerlerinin ise karaciğerde metabolize olduğu bilinmektedir ve bunun glukanın etkinliğinde önemli olduğu düşünülmektedir.⁸²

Beta glukanın makrofajlardan başka NK hücrelerini de alternatif kompleman yolağını uyararak aktive ettiği düşünülmektedir.^{2,53} CR3'ün C terminalinde lokalize olmuş olan lektin bükümü –domaini- (I bükümü) opsonize olmamış partiküllerin bağlandığı yer olarak değerlendirilir.^{6,25,26} Opsonize olmamış partiküllerin makrofajlar tarafından fagositozu non spesifik olarak doğal immün yanıtı başlatır. Glukan polimerleri CR3'ün lektin bükümü tarafından tanındıktan sonra aktif nötrofillerin endotel arası göçünü ve C3b ile opsonize olmuş tümör hücrelerinin sitotoksitesini artırır.^{80,87} Mikroorganizmalar, mantar hücre duvar elemanları ve glukan ile aktive olan makrofajlar tarafından ortama salınan sitokinlerden olan TNF- α ve IL-1 β o bölgedeki endotele etki ederek E-selektin ve P-selektin olarak isimlendirilen adezyon molekül grubunun ifadenmesini artırır. Aynı zamanda özellikle vasküler endotel hücreler olmak üzere stromal ve dendritik hücreler tarafından yapılan bir kemokin olan CCL21 salınımı da artar. Bu kemokinler naif T hücreleri üzerinde olan

CCR7 kemokin reseptörü ile bağlanarak T hücresi üzerinde bulunan LFA-1 (lymphocyte function associated antigen-1) aktive ederek endotel yüzeyindeki vasküler adhezin (CD34) ile T lenfosit yüzeyindeki L-selektin'in zayıf bağlantısını daha kuvvetli hale getirir. Bu bağlantılar ile vasküler endotel arasından periferik lenf nodlarına giren naif T lenfositlerinin ASH ile karşılaşmaları ve aktive olmaları sağlanır. Aktive olan lenfositler lenf nodlarını terk ederek enfeksiyon bölgesine göç ederler. T lenfositleri üzerinde bulunan LFA-1 ile enfeksiyon bölgesindeki endotel hücresi üzerinde bulunan ICAM-1 ve ICAM-2 adezyon molekülleri ile bağlanan T lenfositlerinin enfeksiyon alanına yönelmeleri söz konusu olmaktadır. Enfeksiyon alanında özgül olarak aktive olduğu antijene yanıt verecek olan efektör lenfositler adezyon molekülleri ile doku matrixine bağlanarak bölgede kalırlar.^{62,9,23}

Zamanla nötrofil hücre membranı üzerinde glukanın bağlandığı CR3'den farklı bir reseptör tanımlanmıştır. Farklılaşmamış -CR3 taşımayan- promonositler üzerinde de spesifik gluklan reseptörleri gösterilmiştir. Bu reseptörler arasında Dectin-1 reseptörü, Çöpçü reseptör (scavenger), lactosylceramide reseptörü sayılabilir. Bu gluklan bağlayan promonosit reseptörleri immünregülasyon için hücre içi ileti yolağını aktiflemişler ve proinflamatuvar transkripsiyonel aktivatör proteinlerin artışına neden olmuşlardır.^{9,10,29,92}

Lökositler üzerinde bulunan glikosfingolipit yapıdaki lactosylceramide reseptörlerinin tam olarak ispat edilememesine rağmen gluklan bağladığı düşünülmektedir. Bu reseptörlerin yüksek moleküler ağırlıklı beta gluklan ile (PGG-glucan) hücresel düzeyde bağlandığı Zimmerman ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir.⁹² Reseptörün çalışma mekanizmasına tam olarak bir açıklık getirilemese de bilinen aktivitesi; beta gluklan ile etkileşiminde NF κ B sinyal yolağını aktive etmesi sonucunda makrofaj inflamatuvar proteini (MIP) artırmasıdır. Bu etki Hahn P.Y. ve arkadaşları 2003²⁹; tarafından alveolar epitel hücrelerinde gösterilmiştir. Bu

uyarımın sonunda nötrofil oksidatif mekanizmaların aktivasyonu ve antimikrobiyal fonksiyonlarda artış gerçekleşir.^{6,7,92}

Bu reseptörlerin yanında beta glukan polimerlerinin hücresel düzeyde tanınmasında Dectin 1, çöpçü reseptörler ve Toll-like reseptörlerden 2 ve 6'nın da görevli olduğu düşünülmektedir.^{6,9,10,53} Bazı araştırmacılar Toll-like reseptörlerinin beta glukan polimerlerini tanınmasında Dectin-1 reseptör varlığına ihtiyaç duyduklarını söylemektedirler.^{6,23} Bu reseptörlerin özellikle (1-3) zincir üzerine (1-6) dallanma yapan glukan polimerlerinin tanınmasında oldukça önemli olduğu düşünülmektedir. Bu reseptörün çözünür ve mikropartikül yapıdaki β -glukanların ve mantar enfeksiyonlarının tanınmasında, immün cevap oluşturulmasında görevli temel lökosit reseptörü olduğu literatürde yer almaktadır.⁹ Dectin-1 reseptörünün özellikle monosit, makrofaj ve nötrofiller üzerinde bulunduğu gösterilmiştir. Dentritik hücreler ve T hücre alt gruplarında da ifadenmesi oldukça düşük düzeyde bulunmaktadır.^{2,9,10,75} (1-3), (1-6) glukanın bağlandığı tip II transmembran glikoprotein olan dectin reseptörünün hücre membranı üzerinde kısa bir sap bölgesi bulunur. Hücre içi tirozin bazlı aktivasyon yolağı ile aktive olur. Bu reseptör glukan ile bağlanma sonucunda aktive olarak fagositoz, endositoz ve hücre içi oksidatif mekanizmaları da içeren hücresel faaliyetleri artırmaktadır.^{7,8,9,10} Aynı zamanda dectin-1 reseptörünün glukan polimerleri ile bağlanması pro-inflamatuvar sitokin ve kemokinlerin salınımına neden olmaktadır. (ör: TNF- α , MIP-2 ve IL-12).³² Dectin reseptörünün farklı aktivasyonlardan sorumlu iki izoformu bulunur.³¹

Araşidonik asidi parçalayarak akut inflamasyonu başlatan sitoplazmik fosfolipaz A₂'nin fagositoz boyunca aktif olduğu bilinmektedir. Dectin reseptörü aynı zamanda patojenik mantarlar tarafından ya da mantar hücre duvar elemanları tarafından uyarıldığında araşidonik asid salınımını ve siklooksijenaz 2 reseptör ifadenmesini uyaran bir reseptör olarak da tanımlanmaktadır.⁷³

Organizmada bir çok hücre üzerinde gösterilmeye çalışılan glukan reseptörleri özellikle doğal immün cevapta rol oynayan hücreler üzerinde bulunmaktadır. Genel kaniya göre : Büyük ve orta moleküler ağırlıklı glukanların çözünen ve çözünmeyen formlarının bu hücrelerin fagositik, sitotoksik ve antimikrobiyal aktivitelerini arttırdıkları düşünülmektedir.^{6,86,87} Mantar glukanlarının immün yanıt geliştirebilmesi için doğal immünitenin elemanları tarafından tanınması ve immün yanıtı geliştirecek proinflamatuvar ve immünoregülatör sitokinlerin salınımı gerekmektedir.^{83,85}

Makrofajlar, hem doğal hemde kazanılmış immün yanıtın başlatılmasında ve devamında aktif rol oynayan hücrelerdir. Epitel bariyeri geçen mikroorganizma makrofaj tarafından fagosite edilir ve lizozomal enzimler ile parçalanır. Lizozomal enzimler ve fagositik aktivite hücrenin temel fonksiyonlarındandır. Ayrıca makrofajlardan salınan IL-1 β , IL-6, IL-12, IL8 ve TNF- α sitokinler ve inflamatuvar mediyatörler (nitrik oksit –NO-, hidrojen peroksidi-H₂O₂-) makrofajın immün yanıtta rol oynayan ve immün yanıtı yönlendiren fonksiyonları arasındadır.^{2,26,54} Beta glukanların makrofaj fonksiyonlarını artırarak immün defansı kuvvetlendirdiği saptanmıştır.^{30,47}

Bu polisakkaritler hücre yüzey reseptörlerinde up-regülasyona neden olarak antijene spesifik T hücre cevabının uyarılması için gereken ikincil sinyalin oluşumunu kolaylaştırmaktadırlar. Ayrıca glukanlar hücrelerin antijen sunum kabiliyetini artırarak malign hücrelere karşı gelişen T-hücre aracılı immün yanıtın da gelişmesine neden olurlar. β -glukanların periton makrofajlarda anti-tümör aktiviteyi uyararak etkin bir immün düzenleme sağladığı düşünülmektedir.^{2,18,30,32,54}

Doğal immün yanıtın aktive edilmesi; kazanılmış yanıtın oluşmasında ve farklılaşmasında oldukça önemlidir. Doğal immün yanıt hücreleri kazanılmış immün yanıt hücrelerinden farklı olarak özellikle patojenik mikroorganizmalara spesifik yapıları tanıyarak cevap verirler.

Doğal immün yanıtın vermiş olduğu bu cevap kazanılmış immün yanıtın aktivasyonunda ve kontrolünde oldukça önemlidir.^{30,54,55} Sonuç olarak farklı tip mikroorganizmalar veya moleküller, farklı tip doğal direnç mekanizmalarını uyarırken, bunlarda en uygun edinsel bağışık yanıtını harekete geçireceklerdir.

Edinsel immüniteyi düzenlemekle görevli lenfositlerin birbirleriyle, diğer hücreler, doku matriksi ve antijen ile ilişkileri hücre membranlarında bulunan, hücelere göre özelleşmiş protein, glikoprotein ve glikolipit yapıdaki reseptörler ile belirlenmektedir.²⁰ Bu hücre yüzey reseptörleri hücrelerin biyolojik yanıtlarını ve aktivitelerindeki farklılığı da etkiler ve buna bağlı olarak hücreler alt gruplara ayrılırlar. Bu proteinler genel olarak "CD" –ayırım kümesi (cluster of differentiation)- olarak tanımlanırlar. Bu hücre yüzey reseptörleri hücreden hücreye ve hücrelerin gelişim evrelerinde farklılıklar göstermektedir.⁶²

CD4:

Özellikle Th hücrelerinde olmak üzere, regelatr T hücrelerinde, monosit, makrofaj ve dendritik hücre yüzeylerinde bulunan bir glikoproteindir. Sirklasyonda olan α , β T hücreleri yüzeyinde ifadelenen hücre yüzey moleküllerinden birisidir. T hücre yüzeyinde T hücre reseptörü (TCR) ile birlikte ko-reseptör olarak bulunmaktadır. CD4 immünoglobülin süperaillesinin bir üyesidir. CD4 molekülü MHC II taşıyan antijen sunucu hücreler ile etkileşmektedir. Hücre yüzeyine gelen sinyaller, sitoplazmik ve hücre içi tirozin kinaz sinyal ileti yolağı ile çoğaltılmaktadır. Hücre dışında patojen etki gösteren organizmalara karşı verilen cevapta görevlidir.⁶²

CD8:

T hücreleri üzerinde bulunan transmembran glikoprotein yapısında TCR reseptörüne ko-reseptör olarak bulunmaktadır. MHC I reseptörüne spesifik olarak bağlanmaktadır. Sitotoksik T lenfositleri

üzerinde bulunmakla birlikte doğal öldürücü (NK) hücreler üzerinde de yer almaktadır. Reseptör hücre membranının dış yüzeyinde bulunur. α ve β zincirlerinden oluşur, yapısal olarak $\alpha\alpha$ homodimeri yada $\alpha\beta$ heterodimeri şeklinde bulunur. Her iki zincir de immünglobulin süperaillesinin bir üyesidir.^{24,62}

CD69

Aktivasyon indükleyici molekül olarak bilinen CD69; 28 ve 32 kD homodimerik zincir yapısına sahiptir. C-tip lektin yapısında bulunan transmembran glikoproteindir. Aktive T, B, NK, nötrofil, bazofil, eozinofil, trombosit, langerhans hücreleri yapısında yer almaktadır. Aktivasyonu tetikleyen molekül olarak bilinir ve antijen varlığında çok erken olarak ifadelenir.⁵⁰

CD62L

Selektin ailesinden olan CD62L glikoprotein yapıda bir adezyon molekülüdür. Hücre yüzeyinde yer almaktadır. L-selektin, LECAM-1, LAM-1 olarak da bilinmektedir. Etkileştiği glikoproteinler arasında CD34, GlyCAM-1 ve MAdCAM-1 bulunmaktadır. Naif lenfositler üzerinde bulunan CD62L endotele adezyonunu sağlayarak periferik lenf nodlarına ve peyer plaklarına yerleşimde rol oynamaktadır. Aynı zamanda lökositlerin inflamasyon bölgelerinde toplanmasını sağlamaktadır. B ve T hücresi monosit, granülosit, kemik iliği kökenli myeloid hücrelerin bir kısmı ve timositler CD62L'yi hücre yüzey reseptörü olarak taşımaktadır. CD62L nötrofil ve lenfositlerin hücre yüzeyinden devamlı olarak hücre içi proteaz aktivitesi ile azaltılır. Bu proteaz aktivitesi T hücrelerinin antijen ile aktive olmalarından sonra artar.⁷⁹

CD25

55 kD ağırlığında glikoprotein molekülü olan CD25 IL-2 reseptörünün alfa zincirine yüksek afinite göstermektedir. Naif lenfositler üzerinde IL-2 sitokinine düşük afinite gösteren reseptörler bulunmaktadır. Aktive olan T ve B hücreleri, makrofaj, monosit ve NK hücre yüzeyinde IL-2 reseptörüne yüksek afinite gösteren CD25 reseptörünün ifadenmesi artmaktadır.⁴⁵

CD19

95 kD ağırlığında bir transmembran glikoproteinidir. İmmünoglobülin süperailisinin bir üyesidir. B lenfosit gelişimi sırasında pro-B hücrelerden olgun-B hücrelerine geçişte hücre yüzeyinde belirlemektedir. Aynı zamanda plazma hücreleri hücre yüzeyinde CD19 bulundurmamaktadırlar.⁴⁵ Olgun-B hücreleri hücre yüzey belirteci olan CD19 reseptörü CD21 (CR-2) ve CD81 (TAPA-1) molekülleri ile etkileşim içindedir. Bu multimoleküler kompleks hücre aktivasyonunu artıran yüzeyel immünoglobülinler ile sinerjistik etki yapar. CD19 hücre yüzey belirteci; B lenfosit aktivasyonunda, hafıza B hücre gelişiminde ve toleransın düzenlenmesinde görev yapmaktadır. CD19 peritoneal mast hücreler üzerinde de yer almaktadır. CD21/CD35 ile birlikte ifade edilmekte ve komplement aracılı mast hücre aktivasyonunda görev yapmaktadır.⁶⁰

CD11b

CD11b molekülü C3bi komplemanı için bir reseptör olarak monosit, makrofaj, daha az olarak granülositler, NK ve dentritik hücrelerin bazı grupları üzerinde de ifade edilmektedir. CR3 (kompleman reseptör 3) olarak adlandırılan reseptör yapısal olarak heterodimerik integrin moleküllerinden oluşur. Lökosit adezyonu ve migrasyonu düzenlemekle görevlidirler. Aynı zamanda kompleman sisteminin karıştığı hücresel

aktivasyonlarda görev yapmaktadır: örneğin: fagositoz, hücre aracılı sitotoksiste.^{6,62}

CD80 ve CD86

T hücre aktivasyonu ve bu aktivasyonun devamı için gerekli olan ko-stimülatör sinyali sağlarlar. CD80=B7,1;CD86=B7,2 olarak da bilinmektedir. Antijen sunan hücre ile birincil uyarısını almış T hücresi ikincil uyarısını CD80/CD86 molekülü ile CD28 molekülüne bağlanması ile almaktadır. T hücresine antijen sunan hücreler arasında bulunan B hücreler üzerinde de CD86'nın az miktarda bulunmakta olduğu gösterilmiştir. Antijen ile aktive olan hücreler üzerinde CD80/CD86 artmaktadır. Aktive olmamış B hücreler üzerinde de normalde bulunan CD86'lar artmakta ve CD80 ifadesi belirlemektedir. T hücreler üzerinde bulunan CTLA-4 (CD152) molekülü B hücresinin ve dendritik hücrelerin üzerinde bulunan CD80/CD86 kompleksinden ikincil uyarısını aldığı anda ise T hücresindeki aktivasyon son bulmaktadır. Bu olaylar immün stimülasyonun belirlenmesinde ve düzenlenmesinde oldukça önemli rol oynamaktadır.^{30,53,62}

ICAM-I (CD54)

Hücreler arası adezyon molekülü olarak bilinen ICAM I immünoglobülin süperaillesine aittir. Lenfositler üzerinde bulunan LFA (Lymphocyte function associated antigen-1) ve makrofaj yüzeyinde bulunan Mac-1(CD11b) ile etkileşir. Lökosit ve endotelial hücrelerin membranlarında sürekli olarak düşük konsantrasyonlarda ifade edilmektedir. Sitokin uyarımı ile özellikle IL-1ve TNF- α salınımı sonrasında vasküler endotel, makrofaj ve lenfositler yüzeyinde ifadenmesi artmaktadır.^{62,80}

MHC II

Membran glikoproteini olan MHC molekülü; peptit antijenlerini T hücelere sunmakla görevlidirler. MHC II molekülü iki adet transmembran zincire (α ve β) sahiptir. Her iki zincir de MHC genleri tarafından kodlanır. MHC II molekülünün β_2 zincirinin membrana bağlı bulunan kısmı T hücre üzerinde bulunan CD4 molekülünün eş reseptörüdür. MHC II molekülü B hücreleri, aktive olmuş T hücreler, timusdaki epitelyal hücreler, mikroglial hücreler, makrofajlar ve profesyonel olarak antijen sunan hücreler üzerinde bulunmaktadır. İnflamasyon sırasında salınan sitokinler hücreler üzerindeki ifadenmeyi artırmaktadır. Hücre dışı bakteri proteinleri, virüs partikülleri hücre içi veziküller içinde asidifiye edilerek MHC II molekülünde sunulur.^{53,62}

CD45

Naif T hücresi, efektör T hücresi ve bellek T hücresi üzerinde ifadelenen hücre yüzey molekülleri birbirlerinden farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıklar T hücresinin antijen sunan hücreye ve endotele adezyon kabiliyetinde ve antijen uyarımına verdiği cevapta değişikliklere neden olmaktadır. Transmembran bir molekül olan CD45 sitoplazmik parçasında tirozin fosfataz aktivitesi bulunmaktadır. Farklı izoformları bulunduğu bilinmektedir. CD45RA; Naif CD4+ T hücreleri üzerinde bulunan CD45 molekülüne verilen isimdir. Bu molekül hücrenin spesifik antijenine zayıf cevap verirken, bellek ve uyarılmış T hücreleri üzerinde bulunan CD45R0 (CD45RB) molekülü ise daha kuvvetli bir yanıt vermektedir.^{45,62}

F4/80

F4/80 160 kD ağırlığında bir hücre yüzey glikoproteinidir. Makrofaj aktivasyonu ve olgunlaşması sonrasında hücre yüzeyinde ifadenmesi artmaktadır. Bir miktar dendritik hücrelerde de bulunmaktadır. Farelerde kompleman regülatör protein olan CD55 ile etkileşim içindedir.

İnsanda ilişkide olduğu ligandı ve biyolojik fonksiyonları tam olarak belirlenmemiştir. Bu antijen doku makrofajları üzerinde de saptanmıştır (dalak, lenf nodları, timus, karaciğer ve deri). Aynı zamanda derideki langerhans hücreleri ve karaciğerdeki kupfer hücreleri üzerinde de bulunmaktadır. Granüositler, lenfositler ve trombositler üzerinde bulunmamaktadır. Kemik iliğinde ve kanda olgun makrofajlar üzerinde F4/80 ifadelenmesi artmaktadır.²⁶

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Gereçler

3.1 Deney Hayvanları

Türü : Fare

Soyu : Swiss albino

Cinsiyeti : Dişi

Yaşı : 8-10 hafta

Çalışma, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı İmmunoloji laboratuvarında , Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan 27.12.06 tarihli B.30.2.GÜN.0.EU.00.00/139-18802 sayılı yazısı ile Etik Kurulu Yönergesi'ndeki ilkelere uygunluk açısından etik onay alınarak yürütülmüştür. Deneylerde 8-10 haftalık Swiss albino ırkı dişi fare kullanılmıştır. Deney gruplarında her konsantrasyon düzeyinde 3'er fare kullanılmıştır.

3.2 Kimyasal malzemeler

Penisilin (Biochrom AG , Almanya)

Streptomisin (Biochrom AG , Almanya)

L-glutamine (Biochrom AG , Almanya)

Tripan Mavisi (Applichem, Almanya)

FBS (Fetal Bovine Serum) (Isı ile inaktive edilmiş) (Biochrom AG, Almanya)

RPMI - 1640 besiyeri (Sigma, Amerika)

MEM (Minimal Essential Medium) Sodyum Piruvat (Gibco, İskoçya)

Beta-2 mercaptoethanol (Fluca Biochemica, Almanya)

DMEM Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma, Amerika)

PBS (Biochrom AG , Almanya)

TNF- α ELISA ölçüm kiti (BioSource, Amerika)

IL-1 β ELISA ölçüm kiti (BioSource, Amerika)

IL-4 ELISA ölçüm kiti (BioSource, Amerika)

IFN- γ ELISA ölçüm kiti (BioSource, Amerika)

IL-12 ELISA ölçüm kiti (BioSource, Amerika)

IL-2 ELISA ölçüm kiti (BioSource, Amerika)

IL-6 ELISA ölçüm kiti (BioSource, Amerika)

ELISA mikropalak (96 kuyucuklu, düz tabanlı,yüksek bağlama kapasiteli steril mikropalak)

Barley beta glucan, Medium Viscosity Cat.No: P-BGBM; (Megazyme, İrlanda)

Saccharomyces cerevisiae beta glucan, (Yeast; Alkali Soluble), Cat.No: P-BGYST; (İrlanda, Megazyme)

3.3 Monoklonal Antikorlar

CD4 PE/ FITC (eBioscience, Amerika)

CD8 PE/ FITC (eBioscience, Amerika)

CD19 PE/ FITC (eBioscience, Amerika)

F4/80 Biotin (eBioscience, Amerika)

CD25 PE (eBioscience, Amerika)

CD69 PE (eBioscience, Amerika)

CD62L PE (eBioscience, Amerika)

ICAM-I PE (eBioscience, Amerika)

MHC class II (eBioscience, Amerika)

CD80 PE (eBioscience, Amerika)

CD86 PE (eBioscience, Amerika)

CD11b PE (eBioscience, Amerika)

IgG izotip PE (eBioscience, Amerika)

3.4 Hücre kültür materyalleri

96-kuyucuklu düz tabanlı steril hücre kültür mikroplak
(Costar,corning incorporated)

15-ml ve 50-ml polipropilen konik tüp (Greiner,Bio-one GmbH,
Germany)

25-cm² ve 75- cm² hücre kültürü flask

Kapaklı ependorf (Rnase, Dnase ve pirojenden yoksun) (TPP,
İskoçya)

3.5 Araçlar

Sınıf 2 Biyogüvenlik Kabini (Apollo Metis Biyoteknoloji, Türkiye)

Akan Hücre Ölçüm cihazı (Bectan Coulter, Amerika)

Vorteks (Heidolph, Almanya)

Soğutmalı Santrifüj (BD, Amerika)

Soğutmalı mikro Santrifüj (BD, Amerika)

Işık mikroskobu (Olympus, Japonya)

Inverted mikroskop (Leica DMLS)

CO₂ 'li Etüv (Revco Eite II, Amerike)

Derin dondurucu (-20) (Arçelik, Türkiye)

Derin dondurucu (-86) (Uğur, Türkiye)

Süzgeç -Metal mesh, (Dizdarer, Ankara)

Thoma lamı (REIGHERT, Amerika)

Otomatik pipet (Drummond, Amerika)

Tek kanallı ve sekiz kanallı Pipetör (Scorex)

Serolojik pipet, 5,10,25 ml'lik (Beta Pette™, Amerika))

Sarı ve mavi pipet ucu; (Isolab)

Steril pastör pipeti,3ml'lik (LP ITALIANA SPA, İtalya)

Su banyosu (termostatlı, ısıtmalı , rotorlu su banyosu)

Hassas Terazı (Shimadzu, Japonya)

pH-metre (Fisher Scientific, Amerika)

Distile su cihazı; (Sartorius)

Enjektör 2ml, 5ml, 10ml, 20ml'lik steril enjektör (Süperset, Türkiye)

Tek kullanımlık steril enjektör filtresi 0,2 µm (Corning incorporated, Corning, Germany)

Otoklav (Sanyo, Japonya)

Pastör Fırını (Electro-mag, Türkiye)

Makas (Dizdarer, Ankara)

Pens (Dizdarer, Ankara)

Penset (Dizdarer, Ankara)

Kuru Isı Bloğu (Boeco, Almanya)

3.6 Glukanlar:

Arpa Glukanı:

Megazyme laboratuvarından satın alınan arpa beta glukanının moleküler ağırlığı (MW) Multiangle laser light scattering teknik ile belirlenmiştir. 1,3:1,4-beta-D-glukan'da; 1,3 bağlarının 1-4 bağlarına oranı 32/68 olarak belirtilmiştir. 50⁰C lik bir ortamda vakumlanmıştır ve nem oranı %2,2 dir.

Saflık oranı	: %~ 96 oranında 1,3:1,4-beta-D-glukan içermektedir.
Viskozite	: 28 cSt (1 % w/v; Ostwald C-type viscometer, 30°C).
Moleküler Ağırlık	: 260,000 dalton.
Nişasta oranı	: < 0.1 %.
Arabinoxylan	: < 0.3 %.
Protein	: 0.4 %

S.cerevisiae Glukanı :

Megazyme laboratuvarından satın alınan alkali ortamda çözünen S.cerevisiae glukununun moleküler ağırlığı (MW) Multiangle laser light scattering teknik ile belirlenmiştir. 1,3:1,6-beta-D-glukan; 1,6 bağları %3 olarak belirtilmiştir. 50⁰C lik bir ortamda vakumlanmıştır ve nem oranı %2,2 dir.

Saflık oranı	: > 90 % oranında 1,3:1,6-beta-D-glukan içermektedir.
Moleküler Ağırlık	: < 200,000 dalton
α -Glucan	: < 0.1%.
Protein	: 0.1 %

3.7 Yöntemler

3.7.1 Dalak Hücre İzolasyonu

Beta glukun ile I.P (Periton İçi) olarak uyarılmamış, dalak izolasyonu yapılacak farelere servikal dislokasyon ile ötenazi uygulanmıştır. Ötenazi uygulanan farelerin sol üst gastrik bölgede orta aksillar çizgiden başlayarak mesogastriuma paralel kesi ile açıldı. Dalak temiz bir penset yardımıyla steril besiyeri içine alınarak steril metal bir mesh üzerinde ezildi. Hücre süspansiyonu haline getirilen besiyeri santrifüj tüplerine aktarılarak

335 X g'de 10 dk santrifüj edilerek eritrosit lizis solusyonu içinde 2 dk bekletilerek yeniden 335 X g'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası % 10 FBS, penisilin (100U/ml) / streptomisin (0,1mg/ml), L-glutamine, MEM, sodium Pyruvat içeren RPMI 1640 içinde yeniden süspansiyon haline getirildi. Tripan mavisi ile boyanarak canlılık değerlendirmesi yapılarak sayıldı (Dairesel, net konturlu hücreler "canlı", patlamış ve maviye boyanmış hücreler ise "ölü" olarak değerlendirildi). Kültür kuyucuklarına 1×10^6 /ml hücre olarak ekildi.

3.7.2 Periton Makrofaj İzolasyonu

Beta glukan ile I.P olarak uyarılmamış farelere servikal dislokasyon ile ötenazi uygulanmıştır. Buz üzerinde soğutulmuş DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 10'luk enjektörler içine 5-7 ml alınarak farenin periton boşluğuna verilmiştir. Nazik bir şekilde yapılan masajla yapışan hücrelerin periton sıvısına geçmeleri sağlanmıştır. Lavaj sonucunda elde edilen hücreler 300 X g'de 10 dakika santrifüj edilerek %10 FBS içeren DMEM içinde yeniden süspansiyon haline getirilerek, tripan mavisi ile boyanarak canlılık değerlendirmesi yapılarak sayıldı (Dairesel, net konturlu hücreler "canlı", patlamış ve maviye boyanmış hücreler ise "ölü" olarak değerlendirildi). DMEM, % 10 fetal bovine serumu ve penisilin (100U/ml)/ streptomisin (0,1mg/ml), L-glutamine, MEM ile kültür kuyucuklarına $0,5 \times 10^6$ /ml hücre ekildi. 37°C de, % 5 CO₂'li ve nemli etüvde 4 saat kültüre edildi. 4 saat sonrasında plak içindeki yüzeye yapışmamış hücrelerin temizlenmesi için PBS ile üç kez yıkandı. Hücreler 37°C de, % 5 CO₂'li ve nemli etüvde 2 saat daha kültüre edildi. 2 saat sonrasında hücre kültür besiyeri alınarak üzerine farklı konsantrasyonlarda beta glukan içeren besiyeri eklendi.

Deneylerde beta glukan ile invitro uyarılmış ve uyarılmamış hücrelerin santrifüj edilmiş kültür süpernatantları ve serumları değerlendirme yapılacağı güne kadar -86 °C saklanmıştır. Sitokin

seviyelerinin ELISA ile ölçümü için ependorf tüpleri – 86 °C ‘den çıkarılarak oda ısısına getirilmiştir. Farklı beta glukan konsantrasyonları ile uyarılmış ve uyarılmamış hücrelerin IL-6, IL-1 β ,TNF- α , IFN- γ , IL-12, IL-2 seviyeleri ticari ELISA kitleriyle prospektüsünde yazıldığı şekilde yapılarak ölçülmüş, absorbanları spektrofotometrik mikropalak okuyucusunda 450 nm’de değerlendirilmiş ve protein seviyeleri pikogram cinsinden hesaplanmıştır.

3.7.3 Glukanların Farklı Konsantrasyonlarının Dalak Hücre Süpernatantında Sitokin Düzeylerine Etkisinin Değerlendirilmesi

Çalışmada Megazyme laboratuvarından satın alınmış çözünmüş formda glukanlar kullanılmıştır. Glukanların deneyleri ayrı ayrı çalışılmıştır. Deneyde antijen olarak Lipopolisakkarit (LPS) kullanılmıştır. Çözünmüş formda olan Arpa glukanı ve S.cerevesia glukanı 1000 μ g / 100 μ l olacak şekilde PBS içinde hazırlanmıştır. Ayrıca glukanlardan 1000 μ g /ml; 100 μ g /ml; 10 μ g /ml; 1 μ g /ml; 0,1 μ g /ml; 0,01 μ g /ml; 0,001 μ g /ml konsantrasyonlar %10 FBS içeren RPMI-1640 içinde hazırlanmıştır. LPS kültür ortamında 20 ng/ml olacak şekilde hazırlandı. Herhangi bir glukan enjeksiyonu yapılmamış farelerin dalak hücreleri klasik metodla izole edilmiştir. %4'lük tripan mavisini ile boyanıp sayılmış ve canlılığı değerlendirilmiş hücreler 24'lü kültür kuyucuklarına 1.10⁶ hücre /ml olacak şekilde dağıtılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda beta glukan içeren besiyeri hücreler üzerine eklendi. Kontrol kuyucuğuna yalnızca besiyeri kullanılmıştır. 24 saat sonrasında süpernatantlar toplanarak 10.000 X g 10 dakika santrifüj edilerek , üst sıvı sitokin değerlendirmesi için ependorflar içinde daha küçük miktarlarda ayrılarak - 86 °C ‘ye kaldırıldı

Hücre kültür üst sıvısından IL-2 ,TNF- α , IL-1 β , IL-6 çalışıldı.

3.7.4 Glukanların Farklı Konsantrasyonlarının Periton Makrofaj Hücre Süpernatantında Sitokin Düzeylerine Etkisinin Değerlendirilmesi

Çalışmada Megazyme laboratuvarından satın alınmış çözülmüş formda glukanlar kullanılmıştır. Deneyde antijen olarak Lipopolisakkarit (LPS) kullanılmıştır. Fare peritonundan klasik yöntemle izole edilen periton makrofaj hücreleri %4'lük tripan mavisi ile boyanıp sayılmış ve canlı hücreler 24'lü kültür plate kuyucuklarına $0,5 \cdot 10^6$ hücre /ml olacak şekilde dağıtılmıştır. Glukan konsantrasyonları 1000 µg /ml; 100µg /ml; 10µg /ml; 1µg /ml; 0,1µg /ml; 0,01µg /ml; 0,001µg /ml besiyeri içinde hazırlanmış ve kuyucuklara dağıtılmıştır. Kontrol kuyucukları olarak sadece besiyeri içeren ve 20 ng/ml LPS içeren kuyucuklar kullanılmıştır. 24 saat sonrasında süpernatantlar toplanarak 10.000 X g 10 dakika santrifüj edilerek , üst sıvı sitokin değerlendirmesi için ependorflar içinde daha küçük miktarlarda ayrılarak - 86 °C'ye kaldırıldı

Hücre kültür üst sıvısından IL-12 ,TNF- α , IL-1 β , IL-6 çalışıldı.

3.7.5 Glukanların, Periton Makrofaj Ve Dalak Hücre Yüzey Reseptörleri Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi

Glukan uygulanmış ve uygulanmamış farelerin dalak ve periton boşluğundan klasik yöntemle toplanmış hücreler %1 BSA (Bovine Serum Albumine) içeren PBS solusyon içinde suspansiyon haline getirildi. Suspansiyon içindeki hücreler $10^6/100\mu\text{l}$ hücre olacak şekilde ayrı ayrı non-tissue kültür kuyucuklarına aktarıldı. Buz üzerindeki hücrelerin üzerlerine spesifik olmayan bağlanmayı önlemek için Fc blok etmek için anti-CD16/32 antikoru kullanıldı. Antikor titreleri üretici firmanın tavsiye ettiği dozlar üzerinden hesaplandı. Anti CD16/32 ile 15' +4°C inkübe edilen hücreler %1 BSA içeren PBS ile 3 kez yıkandıktan sonra PE (Phycoerythrin) ve FITC (fluorescein isothiocyanate) işaretli fare monoklonal antikoları kuyucuklara

eklenerek 20' +4 °C de bekletildi. Biotin ile işaretli antikorla yapılan boyamada ilk olarak Biotin işaretli antikor hücreler üzerine eklendi ve 20' +4 °C de inkübe edildi. %1 BSA içeren PBS ile 3 kez yıkandıktan sonra FITC (fluorescein isothiocyanate) işaretli streptavidin ve PE işaretli incelenecek hücre yüzey molekülüne özgül olan monoklonal antikor ile 20' +4 °C de bekletildi. Deneyde FITC ve PE işaretli; kullanılan fare immünoglobülinlerinin isotipleri olan anti IgG ile işaretlenerek negatif kontrol olarak değerlendirildi. Boyama sonrasında yine 3 kez yıkanan hücreler %2 paraformaldehit içeren PBS içinde stabilize edildi. Akan Hücre Ölçüm cihazına uygun tüplere aktarıldı. Özgül işaretli antikorlar ile boyanan hücreler üzerlerindeki reseptörler FACS-can (Becton Dickinson) Akan Hücre Ölçüm cihazıyla değerlendirildi. Her örnekten 10.000 hücre analiz edildi.

3.8 İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmaların istatistiksel değerlendirilmesi SPSS paket programında yapılmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki glukonların sitokin yanıtları ve hücre yüzey reseptörlerinin ifadenme düzeyleri arasındaki fark üçlü gruplarda tek yönlü One-Way-ANOVA testi yardımıyla ikili gruplar için Bağımsız İki Örneklem T Testi (Independent-samples T test) ile yapılmıştır. 0,05 anlam düzeyinde test edilmiştir. Üç gruplu örnekler için farklılığın hangi seviyede kaynaklandığının tespiti ise çoklu karşılaştırma deneylerinden LSD (Post Hock) ile yapılmıştır. Değerlendirmelerin sonucunda $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

4.BULGULAR

Saccharomyces cerevisiae ve arpa kökenli β -glukanların çözümler formlarının immün sistem üzerine olan etkisi araştırıldı. Bu amaçla invitro hücre kültür çalışmaları ile sitokin salınımı, akış sitometresi ile hücre yüzeyinde ifadelenen hücre yüzey reseptörlerinin farklılaşması değerlendirildi.

Bu araştırmalar sonucunda :

Hücrel immün yanıt ve;

Doğal immün yanıt üzerine glukanların etkisi değerlendirildi.

Hem hücrel immün yanıt hem de doğal immün yanıt için; sitokin analizleri ELISA yöntemi, hücre yüzey reseptörlerinin incelenmesi akış sitometrik yöntem kullanılarak yapıldı.

4.1 Hücrel Immün Yanıtın Değerlendirilmesi :

Hücrel immün yanıtı değerlendirmek için invitro çalışmalar yapıldı. Invitro çalışmalarda Swiss albino farelerden elde edilen dalak hücreleri her bir kuyucukta 1×10^6 / ml hücre olacak şekilde hücre kültür kuyucuklarına dağıtıldı. Hazırlanan dalak hücreleri üzerine eklenen besiyeri içinde hazırlanan *Saccharomyces cerevisiae* ve arpa kökenli β -glukanların çözümler formlarının 1000 $\mu\text{g/ml}$; 100 $\mu\text{g/ml}$; 10 $\mu\text{g/ml}$; 1 $\mu\text{g/ml}$; 0,1 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonları ile in vitro kültür koşulları altında yirmi dört saat 37°C %5 CO_2 inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra kültür süpernatantları toplandı. Logaritmik olarak hazırlanan konsantrasyonlar ile yapılan ön çalışmalarda belirlenen doz eğrisi diğer çalışmalarda kullanılan dozlar için belirleyici olmuştur.

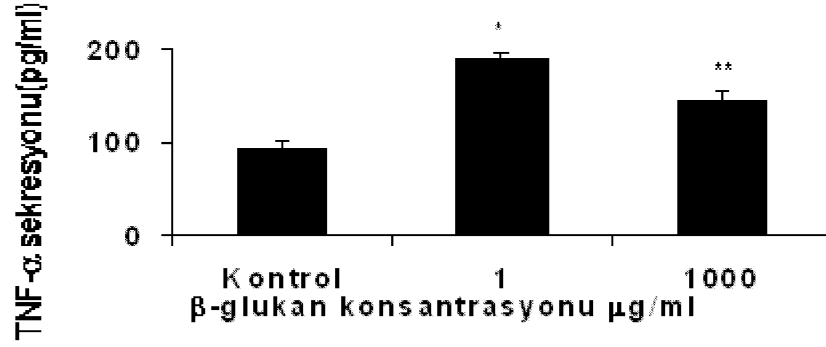
Hazırlanan deney düzeneğinde oluşan immün yanıtın optimum seviyelerde ölçülebilmesi için, kuyucuklardaki hücre sayısı (1×10^6 /ml) sabit tutularak çeşitli deney parametreleri ayrı ayrı test edildi. Deneylerin çalışıp çalışmadığını test etmek için LPS kullanıldı. Kültürlerde glukun miktarının etkisini bulmak amacıyla, kültürlerle farklı miktarlarda glukun ilave edildi. Bunun için hücre kültür kuyucuklarına dağıtılan dalak hücreleri üzerine 1000 $\mu\text{g/ml}$ ve 1 $\mu\text{g/ml}$; konsantrasyonlarında sSCBG, sBBG eklendi. Kontrol kuyucuğuna yalnızca besiyeri eklendi. Her konsantrasyon üçer kuyucuk şeklinde çalışıldı. 24 saat süreyle; 37C^0 ve %5 CO_2 etüvde inkübe edildi.

Hücrel immün yanıtın değerlendirilmesinde sitokin analizleri:
(IL-1 β , TNF- α , IL-2, IL-6)

4.1.1 Dalak hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon sonunda ölçülen TNF- α üzerine glukunların etkisi

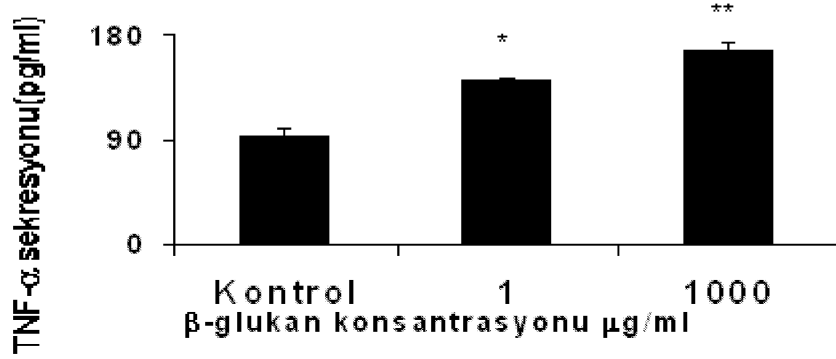
Çözünür formda bulunan arpa kökenli glukun dalak hücreleri üzerinde sitokin miktarının doza bağımlı olarak artışına neden olmuştur. 1 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda TNF- α değeri= $140,03 \pm 1,69$ pg/ml $p < 0,05$; 1000 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda TNF- α değeri ise= $166,27 \pm 8,13$ pg/ml $p < 0,05$ olarak bulunmuştur (Grafik, 2). *S.cerevesia* kökenli glukun ise 1 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda bir pik değeri oluşturmuş ve bu değer kontrole göre anlamlı bulunmuştur (1 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda TNF- α değeri= $190,94 \pm 5,85$ pg/ml $p < 0,05$; Grafik,1). Yine arpa glukununun çözünür formu 1000 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda kontrole göre 1,5 kat TNF- α salınımına neden olmuşken ($166,27 \pm 8,13$ pg/ml; Grafik, 2); *S.cerevesia* glukununun yüksek konsantrasyonda (1000 $\mu\text{g/ml}$) uygulanması sonrasında TNF- α değerinde düşmeye neden olmuştur. Fakat ölçülen sitokin düzeyi kontrol değerine göre istatistiksel olarak anlamlı olarak değerlendirilmiştir. Kontrol TNF- α değeri= $92,20 \pm 10,55$ pg/ml; sSCBG1000 $\mu\text{g/ml}$ TNF- α değeri= $145,42 \pm 10,54$ pg/ml $p < 0,05$ (Grafik, 1)

sSCBG' nin dalak hücre kültür ortamında 24 saat sonra TNF- α cevabı



Grafik 1: sSCBG uygulanmış dalak hücre kültürlerinde TNF- α değerleri gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm ss olarak verilmiştir. * p<0,05; ** p<0,05

sBBG' nin dalak hücre kültür ortamında 24 saat sonra TNF- α cevabı

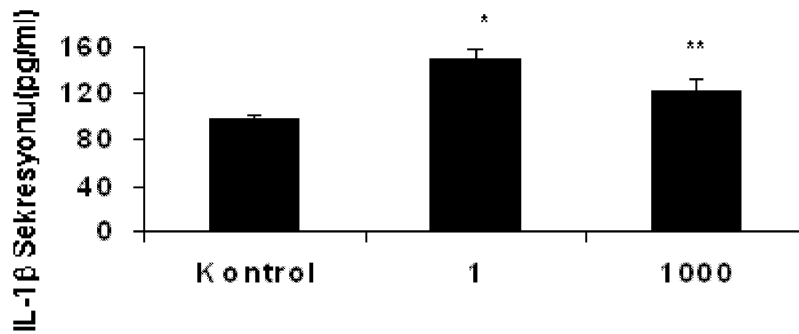


Grafik 2: sBBG uygulanmış dalak hücre kültürlerinde TNF- α değerleri gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm ss olarak verilmiştir. * p<0,05; ** p<0,05

4.1.2 Dalak hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon sonunda ölçülen IL-1 β üzerine glukanların etkisi

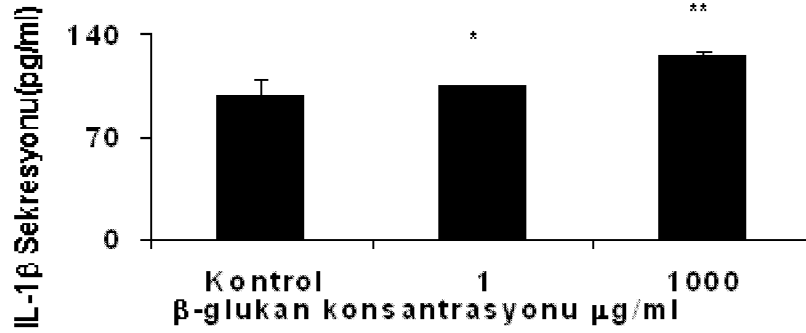
Arpa kökenli çözünen formdaki β -glukanın 1000 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarında dalak hücrelerinde 24 saatlik kültürde anlamlı IL-1 β sitokin salınımına neden olmuşken ($125,58 \pm 10,50$ pg/ml $p < 0,05$; Grafik, 4) arpa kökenli glukanın 1 $\mu\text{g/ml}$ uygulanması sonucunda ölçülen sitokin miktarı kontrole göre anlamlı bulunmamıştır ($105,62 \pm 10,07$ pg/ml $p > 0,05$; Grafik, 4). *S.cerevesia*'dan elde edilmiş olan çözüner yapıdaki glukan ise 1 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda bir pik değeri oluşturmuş ve bu değer kontrole göre anlamlı bulunmuştur (1 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda IL-1 β seviyesi= $149,86 \pm 8,55$ pg/ml $p < 0,05$;Grafik,3). *S.cerevesia* glukanın yüksek konsantrasyonda (1000 $\mu\text{g/ml}$) uygulanması sonrasında IL-1 β değerinde ise düşme saptanmıştır (Grafik 3, $120,51 \pm 10,50$ pg/ml $p < 0,05$).

sSCBG' nin dalak hücre kültür ortamında 24 saat sonra IL-1 β cevabı :



Grafik 3: sSBG uygulanmış dalak hücre kültürlerinde IL-1 β değerleri gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm ss olarak verilmiştir. * $p < 0,05$; ** $p < 0,05$;

sBBG' nin dalak hücre kültür ortamında 24 saat sonra IL-1 β cevabı :



Grafik 4: sBBG uygulanmış dalak hücre kültürlerinde IL-1 β değerleri gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm ss olarak verilmiştir. * $p > 0,05$; ** $p < 0,05$

4.1.3 Dalak hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon sonunda ölçülen IL-2 üzerine glukanların etkisi

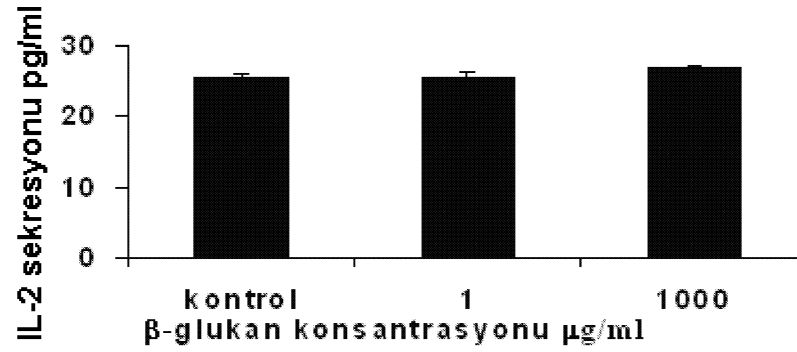
Deneyde kullanılan çözünür formdaki arpadan ve *S.cerevesia*'dan elde edilen glukanların 1000 μ g/ml ve 1 μ g/ml uygulanması sonrasında dalak hücreleri üzerinde 24 saatlik inkübasyonda ölçülen IL-2 sitokin düzeyleri üzerine kontrol gruplarına göre anlamlı bir etkisi bulunmamıştır (Grafik, 5; 6; $p > 0,05$).

sSCBG' nin dalak hücre kültür ortamında 24 saat sonra IL-2 cevabı



Grafik 5: sSCBG uygulanmış dalak hücre kültürlerinde IL-2 değerleri gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm ss olarak verilmiştir. $p>0,05$

sBBG' nin dalak hücre kültür ortamında 24 saat sonra IL-2 cevabı



Grafik 6: sBBG uygulanmış dalak hücre kültürlerinde IL-2 değerleri gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm ss olarak verilmiştir. $p>0,05$

4.1.4 Dalak hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon sonunda ölçülen IL-6 üzerine glukanların etkisi

Arpa kökenli çözünen formdaki β -glukan 1000 μ g/ml konsantrasyonlarında dalak hücrelerinde 24 saatlik kültürde anlamlı IL-6 sitokin salınımına neden olmuştur (Grafik, 8; $17,31 \pm 0,89$ pg/ml $p<0,05$). Yine arpa kökenli glukanın 1 μ g/ml konsantrasyonda anlamlı sitokin cevabı

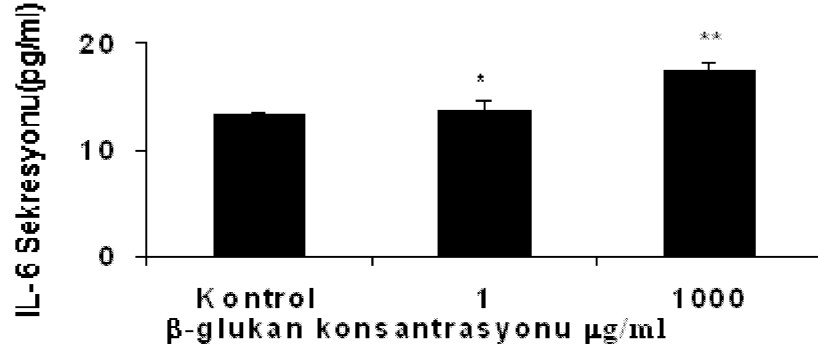
görülmemiştir (Grafik, 8; $13,73 \pm 0,87$ pg/ml $p > 0,05$). S.cerevesia kökenli glukanda ise dalak hücrelerinde $1 \mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda bir pik değeri oluşmuş ve bu değer kontrole göre anlamlı bulunmuştur (Grafik, 7; $18,03 \pm 0,50$ pg/ml $p > 0,05$). S.cerevesia glukanın yüksek konsantrasyonda ($1000 \mu\text{g/ml}$) uygulanması sonrasında IL-6 değerinde de düşme saptanmıştır ve bu dozda sSCBG'nin uyardığı sitokin seviyesi kontrole göre anlamlı bulunmamıştır (Grafik, 7; $13,56 \pm 0,50$ pg/ml $p > 0,05$).

SCBG' nin dalak hücre kültür ortamında 24 saat sonra IL-6 cevabı



Grafik 7: sSCBG uygulanmış dalak hücre kültürlerinde IL-6 değerleri gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm ss olarak verilmiştir. * $p < 0,05$; ** $p > 0,05$

sBBG' nin dalak hücre kültür ortamında 24 saat sonra IL-6 cevabı



Grafik 8: sBBG uygulanmış dalak hücre kültürlerinde IL-6 değerleri gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm ss olarak verilmiştir. * $p > 0,05$; ** $p < 0,05$

4.2 Doğal İmmün Yanıtın Değerlendirilmesi :

Doğal immün yanıtı değerlendirmek için; Swiss albino farelerden elde edilen periton makrofaj hücreleri her bir kuyucukta $0,5 \times 10^6 / \text{ml}$ hücre olacak şekilde hücre kültür kuyucuklarına dağıtıldı. Dağıtılan periton makrofaj hücreleri 4 saat inkübasyon sonrası üç kez PBS ile yıkandıktan sonra 2 saat daha hücre besiyeri içinde 37C^0 %5 CO_2 de inkübe edildi. Hazırlanan periton makrofaj hücreleri üzerine besiyeri içinde hazırlanan *S. cerevisiae* ve arpa kökenli β -glukanların çözünür formlarının 1000 $\mu\text{g/ml}$; 100 $\mu\text{g/ml}$; 10 $\mu\text{g/ml}$; 1 $\mu\text{g/ml}$; 0,1 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonları eklendi ve invitro kültür koşulları altında yirmi dört saat 37C^0 %5 CO_2 inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra kültür süpernatantları toplandı. Logaritmik olarak hazırlanan konsantrasyonlar ile yapılan ön çalışmalarda belirlenen doz eğrisi diğer çalışmalarda kullanılan dozlar için belirleyici olmuştur.

Hazırlanan deney düzeneğinde oluşan immün yanıtın optimum seviyelerde ölçülebilmesi için, kuyucuklardaki hücre sayısı ($0,5 \times 10^6 / \text{ml}$) sabit tutularak çeşitli deney parametreleri ayrı ayrı test edildi. Deneylerin çalışıp çalışmadığını test etmek için LPS kullanıldı. Kültürlerde

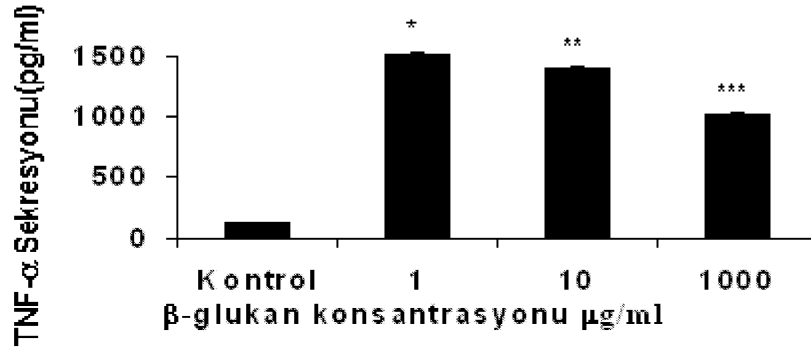
glukan miktarının etkisini saptamak amacıyla, kùltùrlere farklı miktarlarda glukan ilave edildi. Bunun için hücre kùltür kuyucuklarına dağıtılan periton makrofaj hücreleri üzerine 1000µg/ml; 10µg/ml; 1 µg/ml; konsantrasyonlarında sSCBG, sBBG eklendi. Kontrol kuyucuğuna yalnızca besiyeri eklendi. Her konsantrasyon üçer kuyucuk şeklinde çalışıldı. 24 saat süreyle; 37C⁰ ve %5 CO₂ etüvde inkübe edildi.

Doğal immün yanıtın değerlendirilmesinde sitokin analizleri: IL-1β, TNF-α, IL-12p40, IL-6

4.2.1 Periton Makrofaj hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon sonunda ölçülen TNF-α üzerine glukanların etkisi

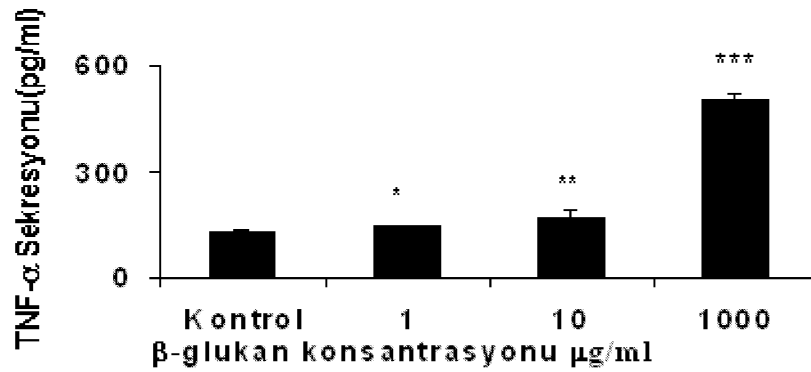
Arpa kökenli çözüner formdaki glukan (sBBG) uygulanan hücre kùltürlerinde; 1µg/ml ve 10µg/ml konsantrasyonlarda anlamlı sitokin salınımı görülmezken; 1000µg/ml konsantrasyonda kontrol grubuna göre anlamlı sitokin salınımı olmuştur (Şekil,10; *p>0,05; **p>0,05; ***p<0,05). *S. Cerevisiae* elde edilen çözüner formda bulunan glukan en yüksek sitokin seviyesini 1µg/ml konsantrasyonda vermiştir (Grafik,9; sSCBG 1µg/ml konsantrasyonda TNF-α değeri=1515,48 ± 11,76 pg/ml *p<0,05). Bu değer arpadan elde edilen glukanın 1000µg/ml de ölçülen sitokin seviyesinin (Grafik,10; 504,76± 15,69 pg/ml) 3 katı kadardır. sSCBG 1µg/ml; 10µg/ml ve konsantrasyonda ölçülen sitokin seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Grafik,9; *p<0,05;**p<0,05). 1000µg/ml konsantrasyonda ölçülen sitokin seviyesi 1µg/ml konsantrasyonda ölçülen sitokin seviyesine göre düşme göstermiştir. Fakat kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Grafik,9; Kontrol TNF-α değeri=129,92± 5,02 pg/ml; sSCBG 1000µg/ml TNF-α değeri= 1016,71 ± 10,17 pg/ml ***p<0,05)

sSCBG' nin periton makrofaj hücre kültür ortamında 24 saat sonra TNF- α cevabı



Grafik 9: sSCBG uygulanmış periton makrofaj hücre kültürlerinde TNF- α değerleri gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm ss olarak verilmiştir.*p<0,05;** p<0,05 *** p<0,05

sBBG' nin periton makrofaj hücre kültür ortamında 24 saat sonra TNF- α cevabı



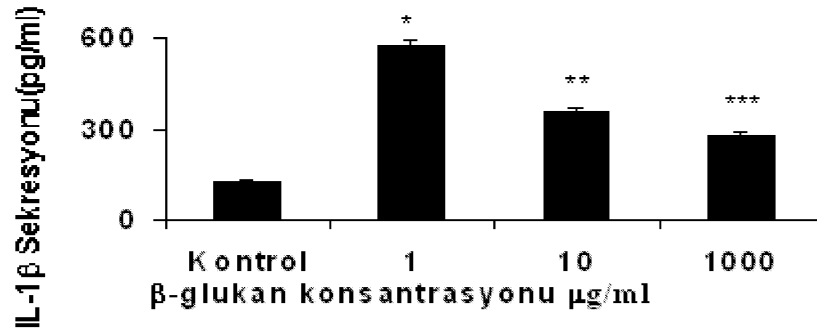
Grafik 10: sBBG uygulanmış periton makrofaj hücre kültürlerinde TNF- α değerleri gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm ss olarak verilmiştir.*p>0,05;** p>0,05 *** p<0,05

4.2.2 Periton Makrofaj hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon sonunda ölçülen IL-1 β üzerine glukanların etkisi

Arpa kökenli çözünür formdaki glukan (sBBG) TNF- α cevabında olduğu gibi 1 μ g/ml, 10 μ g/ml konsantrasyonda anlamlı sitokin

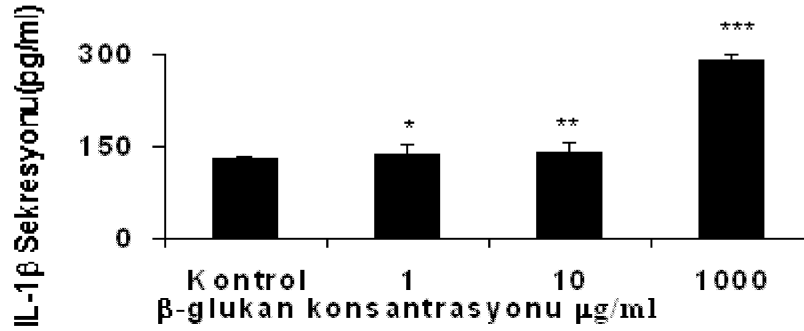
salınımına neden olmazken 1000 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda kontrol grubuna göre sitokin salınımının yüksekliği istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Grafik,12; * $p>0,05$; ** $p>0,05$; *** $p<0,05$). Arpadan elde edilen glukanın 1000 $\mu\text{g/ml}$ de ölçülen sitokin seviyesi (Grafik, 12; $287,34 \pm 12,91$ pg/ml) olarak bulunmuştur. *S. Cerevisiae* elde edilen çözünür formda bulunan glukun (sSCBG) ise 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda kontrol grubuna göre anlamlı sitokin salınımına neden olmuşken en yüksek değerini 1 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda vermiştir (Grafik,11; 1 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda ölçülen IL-1 β düzeyi $574,56 \pm 21,10$ pg/ml). Yine çözünür β -glukanların yüksek konsantrasyonda (1000 $\mu\text{g/ml}$) uygulanması 1 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda ölçülen IL-1 β sitokin seviyesine göre düşüş göstermiştir. Fakat kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. (Grafik,11; Kontrol IL-1 β değeri= $118,55 \pm 5,97$ pg/ml; sSCBG 1000 $\mu\text{g/ml}$ IL-1 β değeri= $279,01 \pm 12,91$ pg/ml *** $p<0,05$)

sSCBG' nin periton makrofaj hücre kültür ortamında 24 saat sonra IL-1 β cevabı



Grafik 11: sSCBG uygulanmış periton makrofaj hücre kültürlerinde IL-1 β değerleri gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm ss olarak verilmiştir.* $p<0,05$;** $p<0,05$ *** $p<0,05$

sBBG' nin periton makrofaj hücre kültür ortamında 24 saat sonra IL-1 β cevabı



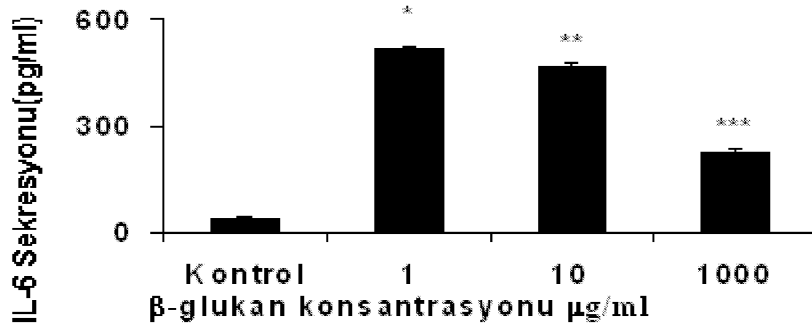
Grafik 12: sBBG uygulanmış periton makrofaj hücre kültürlerinde IL-1 β değerleri gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm ss olarak verilmiştir. *p>0,05; ** p>0,05 *** p<0,05

4.2.3 Periton Makrofaj hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon sonunda ölçülen IL-6 üzerine glukanların etkisi

Arpa kökenli çözümlü glukan 1 μ g/ml konsantrasyonda istatistiksel olarak anlamlı sitokin salınımına neden olmazken; 10 μ g/ml, 1000 μ g/ml konsantrasyonda ölçülen sitokin miktarı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Grafik,14;*p>0,05;**p<0,05; ***p<0,05). *S.cerevesia* kökenli çözümlü formdaki glukan 1 μ g/ml konsantrasyonda bir pik değeri oluşturmuş ve bu değer kontrole göre anlamlı bulunmuştur (Grafik,13; p<0,05). sSCBG 10 μ g/ml, 1000 μ g/ml konsantrasyonda uygulanması da kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek sitokin salınımına neden olmuştur (Grafik,13; *p<0,05; **p<0,05). sSCBG'nin en yüksek sitokin değerini verdiği 1 μ g/ml ölçülen değer sBBG' nin en yüksek değerinden (1000 μ g/ml) yüksek bulunmuştur (Grafik, 13; sSCBG 1 μ g/ml konsantrasyonda IL-6 değeri= 517,54 \pm 6,63 pg/ml; Grafik,14; sBBG 1000 μ g/ml konsantrasyonda IL-6 değeri= 364,52 \pm 43,62 pg/ml). *S.cerevesia* glukanının yüksek konsantrasyonda (1000 μ g/ml) uygulanması sonrasında ölçülen IL-6 sitokin seviyesi 1 μ g/ml konsantrasyonda ölçülen

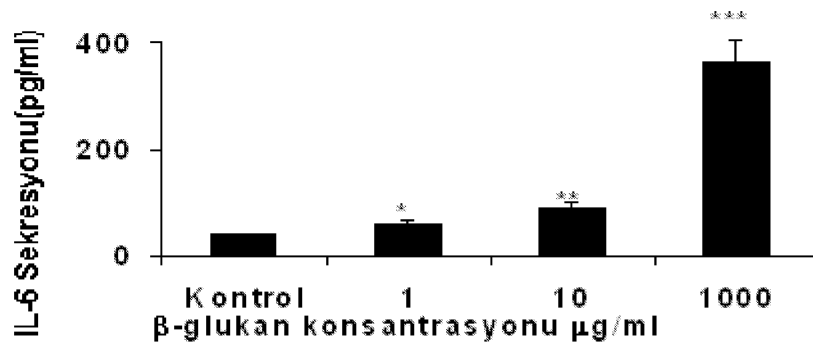
sitokin seviyesine göre düşüş göstermiştir. Fakat kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. (Grafik,13; Kontrol IL-6 değeri= $41,61 \pm 1,46$ pg/ml; sSCBG 1000 μ g/ml IL-6 değeri= $222,93 \pm 11,63$ pg/ml *** $p < 0,05$)

sSCBG' nin periton makrofaj hücre kültür ortamında 24 saat sonra IL-6 cevabı



Grafik 13: sSCBG uygulanmış periton makrofaj hücre kültürlerinde IL-6 değerleri gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm ss olarak verilmiştir. * $p < 0,05$; ** $p < 0,05$ *** $p < 0,05$

sBBG' nin periton makrofaj hücre kültür ortamında 24 saat sonra IL-6 cevabı

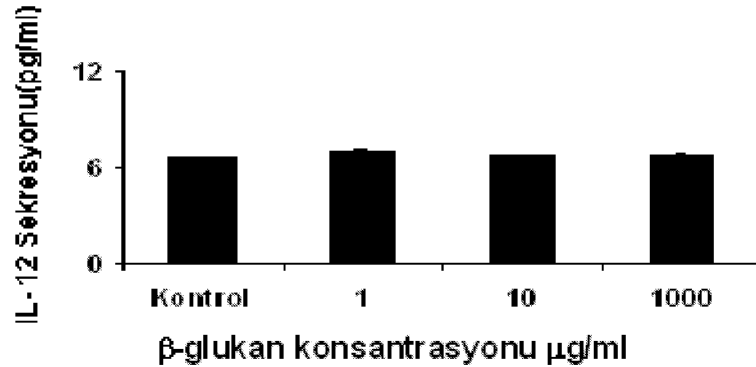


Grafik 14: sBBG uygulanmış periton makrofaj hücre kültürlerinde IL-6 değerleri gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm ss olarak verilmiştir. * $p > 0,05$; ** $p < 0,05$ *** $p < 0,05$

4.2.4 Periton Makrofaj hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon sonunda ölçülen IL-12p40 üzerine glukanın etkisi

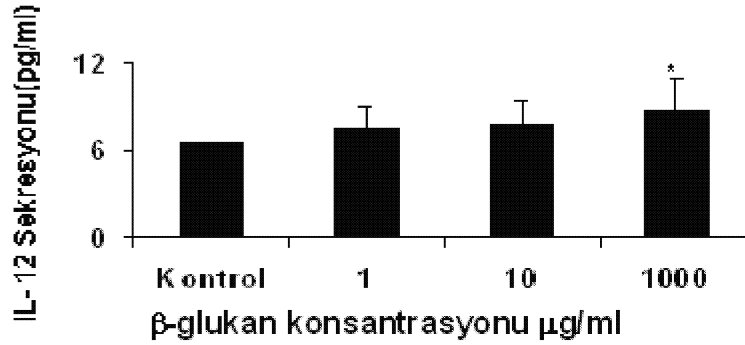
S.cerevesia kökenli çözünür formdaki glukanın 1µg/ml, 10µg/ml, 1000µg/ml konsantrasyonlarının periton makrofaj hücreleri üzerinde 24 saatlik inkübasyonda ölçülen IL-12p40 sitokin düzeyleri üzerine anlamlı bir etkisi bulunmamıştır (Grafik,15; $p>0,05$). sBBG glukanın 1000 µg/ml de uyardığı sitokin seviyesi kontrole göre biraz daha yüksek olarak ölçülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. (Grafik,16; Kontrol IL-12p40 değeri= $6,52 \pm 0,02$ pg/ml; pg/ml; sBBG 1000µg/ml IL-12p40 değeri= $8,67 \pm 2,33$ pg/ml * $p>0,05$). sBBG glukanın 1 µg/ml ve 10 µg/ml konsantrasyonda uyardığı sitokin seviyesi kontrole göre anlamlı bulunmamıştır (Grafik,16; $p>0,05$)

sSCBG' nin periton makrofaj hücre kültür ortamında 24 saatlik inkübasyonda IL-12p40 cevabı aşağıdaki grafikte gösterilmiştir.



Grafik 15: sSCBG uygulanmış periton makrofaj hücre kültürlerinde IL-12p40 değerleri gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm ss olarak verilmiştir. $p>0,05$

sBBG' nin periton makrofaj hücre kültür ortamında 24 saatlik inkübasyonda IL-12p40 cevabı aşağıdaki grafikte gösterilmiştir.



Grafik 16: sBBG uygulanmış periton makrofaj hücre kültürlerinde IL-12p40 değerleri gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm ss olarak verilmiştir. * $p < 0,05$

4.3 Hücre Yüzey Reseptörlerinin Değerlendirilmesi

Hücre yüzey reseptörleri üzerine beta glukanın etkisini değerlendirmek için çözünür formdaki glukanolardan hem arpa kökenli hemde *S.cerevesia* kökenli glukanolar PBS içinde 1000 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$; konsantrasyonlarda hazırlanmışlardır. Birbirini takip eden dört gün boyunca 8-10 haftalık farelerin periton içlerine 100 μl olarak enjekte edilmiştir. Her grupta üç fare kullanılmıştır. 4.gün sonunda periton makrofaj hücreleri periton boşuğundan klasik yöntem ile besiyeri içinde toplanmıştır. Bu farelerin dalakları da eş zamanlı olarak alınmıştır. Toplanan periton makrofaj ve dalak hücreleri $1 \times 10^6 / 100\mu\text{l}$ olacak şekilde kuyucuklara dağıtılmıştır. Floresans (FITC ve PE) işaretli monoklonal antikorlar ile buz üzerinde boyanmıştır. Boyanan hücreler üzerinde antikorlar %2 paraformaldehit içeren PBS içinde stabilize edilmiştir. Akış Sitometre cihazında her örnekten 10.000 hücre analiz edilmiştir.

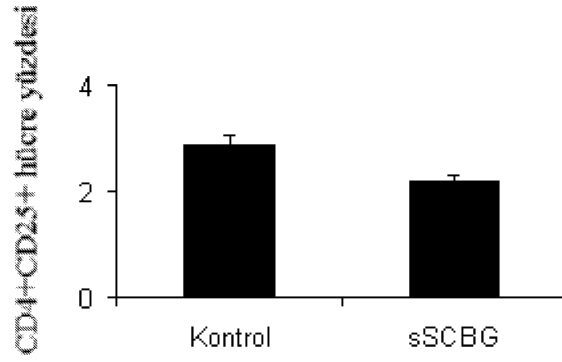
4.3.1 Dalak Hücre Yüzey Reseptörleri Üzerine Glukanın Etkisi

Dört gün boyunca birbiri ardınca periton içi enjeksiyon yapılmış farelerden izole edilen dalak hücreleri floresans işaretli monoklonal antikolar ile standardize edilmiş teknik yöntemle boyanmıştır. Akış sitometrik yöntemle analiz edilen hücrelerde glukanın CD4+ ve CD8+ hücre grupları üzerinde CD25, CD69, CD62L, CD45R, CD45RB varlığına glukanın etkisinin araştırılması için ayrı ayrı ikili boyamalar yapılmıştır. Yine CD19+ hücre grubunda CD86, CD80, ICAM-I, MHC-class II hücre yüzey reseptörleri üzerine glukanın etkisinin araştırılması için monoklonal antikoları ile ikili boyamalar yapılmıştır. CD4+ T hücreler üzerinde ifadelenen CD25 hücre yüzey reseptörü varlığı açısından; sSCBG uygulanmış farelerde kontrole göre anlamlı farklılık görülmemiştir. (Grafik,17; kontrol fare CD4+CD25+ =%2,9±0,9; sSCBG fare CD4+CD25+ =%2,2±1,2 p>0,05). Yine CD4+ T hücreleri üzerinde ifadelenen CD69 reseptöründe sSCBG uygulanmış farelerde kontrole göre anlamlı değişiklik bulunmamıştır (Grafik,18; Kontrol fare CD4+CD69+ =%3,0±1,5; sSCBG fare CD4+CD69+ =%3,1±1,44 p>0,05). sSCBG uygulanması sonrasında CD4+ T hücrelerinde CD62L ifadelenmesinde yüzde olarak kontrole göre anlamlı bir artış saptanmıştır (Grafik,19; Kontrol fare CD4+CD62L+ =%10,3±1,38; sSCBG fare CD4+CD62L+ =%18,3±3,44 p<0,05). Glukan uygulaması sonrasında CD4+ hücrelerde ifadelenen CD45R reseptörlerindeki artış kontrol grubuna göre anlamlı bulunmamıştır (Grafik,20; Kontrol fare CD4+CD45R+ =%2,4±0,35; sSCBG fare CD4+CD45R+ =%2,7±0,87 p>0,05). CD4+ T hücrelerinde ifadelenen CD45RB reseptörlerindeki artış anlamlı bulunmuştur (Grafik,21; Kontrol fare CD4+CD45RB+ =%14,7±1,37; sSCBG fare CD4+CD45RB+ =%22,2±2,64 p<0,05).

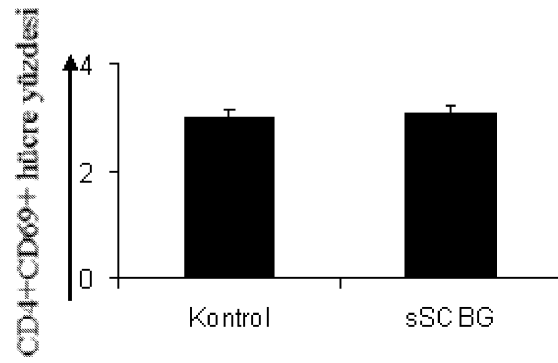
Glukan uygulanan farelerde CD8+ T hücreler üzerinde ifadelenen CD25 ve CD69 reseptör yüzdelerinde kontrol grubuna göre anlamlı farklılık bulunmamıştır (Grafik,22; kontrol fare CD8+CD25+

=%1,2±0,15; sSCBG fare CD4+CD25+ =%1,1±0,2 p>0,05; Grafik,23; kontrol fare CD8+CD69+ =%1,7±0,25; sSCBG fare CD4+CD69+ =%1,8±0,4 p>0,05). CD8+T hücreler üzerinde glukun uygulaması sonrası CD62L + hücre yüzdesinde kontrole göre anlamlı bir azalma görülmüştür. (Grafik,24; kontrol fare CD8+CD62L+ =%12,4±1,8; sSCBG fare CD8+CD62L+ =%5,3±0,93 p<0,05). Glukun uygulanan farelerde CD8+ T hücreler üzerinde ifadelenen CD45R reseptöründe anlamlı bir farklılık bulunmazken CD45RB ifadelenmesinde azalma görülmüştür. Bu azalma kontrol grubuna göre anlamlı bulunmuştur (Grafik,25; kontrol fare CD8+CD45R+ =%2,5±0,52; sSCBG fare CD8+CD45R+ =%1,9±0,5 p>0,05; Grafik,26; kontrol fare CD8+CD45RB+ =%14,8±0,85; sSCBG fare CD8+CD45R+ =%6,1±0,9 p<0,05).

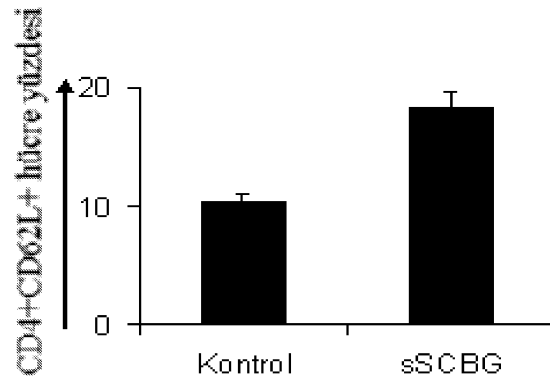
CD19+ B hücreler üzerinde bulunan ve ko-stimülasyonda görevli reseptörlerden olan CD86 ve CD80 ifadelenmesinde sSCBG uygulanmış fare grubunda, kontrol fare grubuna göre artış görülmüştür. (Grafik,27; kontrol fare CD19+CD86+ =%6,7±1,3ss; sSCBG fare CD19+CD86+ =%9,0±0,66 p<0,05; Grafik,28; kontrol fare CD19+CD80+ =%6,1±0,75; sSCBG fare CD19+CD80+ =%7,9±0,6 p<0,05). Yine glukun uygulanmış fare grubunda CD19+ hücreler üzerinde MHC class-II ve ICAM-I ifadelenmesinde kontrol grubuna göre artış saptanmıştır (Grafik,29; kontrol fare CD19+ MHC class-II+ =%61,1±1,66; sSCBG fare CD19+ MHC class-II+ =%67,0±0,88 p<0,05; Grafik,30; kontrol fare CD19+ICAM-I+ =%4,0±0,8; sSCBG fare CD19+ICAM-I+ =%6,0±0,9 p<0,05).



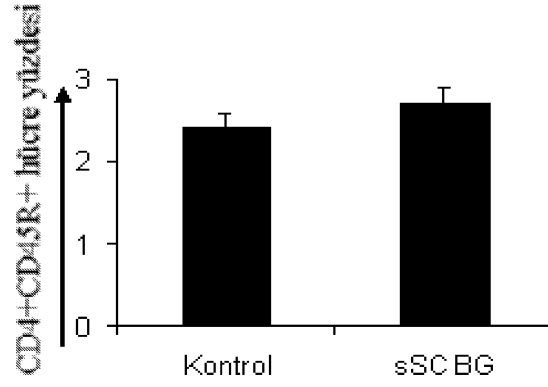
Grafik,17 : sSCBG uygulanmış ve uygulanmamış fare dalak hücrelerinde CD4+CD25+ hücre yüzde değerleri gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm ss olarak verilmiştir. $p>0,05$



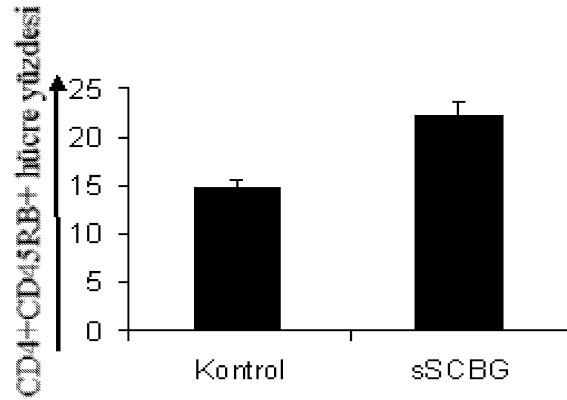
Grafik,18 : sSCBG uygulanmış ve uygulanmamış fare dalak hücrelerinde CD4+CD69+ hücre yüzde değerleri gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm ss olarak verilmiştir. $p>0,05$



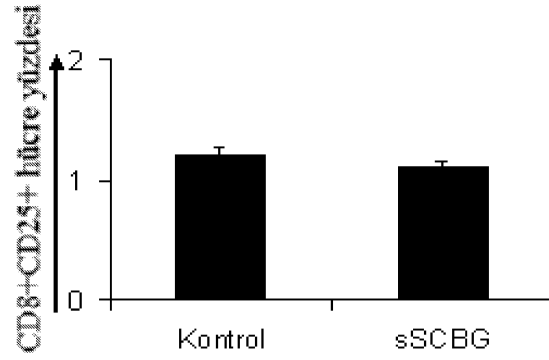
Grafik,19 : sSCBG uygulanmış ve uygulanmamış fare dalak hücrelerinde CD4+CD62L+ hücre yüzde değerleri gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm ss olarak verilmiştir. $p<0,05$



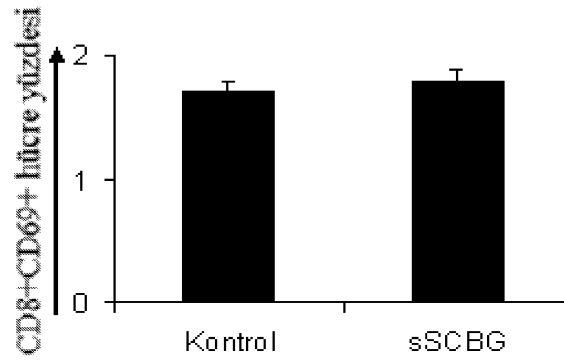
Grafik,20 : sSCBG uygulanmış ve uygulanmamış fare dalak hücrelerinde CD4+CD45R+ hücre yüzde değerleri gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm ss olarak verilmiştir. $p>0,05$



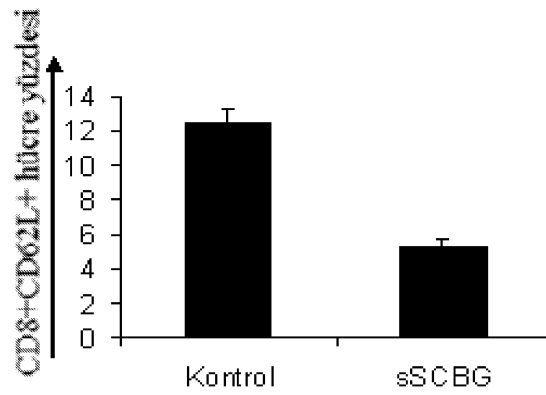
Grafik,21 : sSCBG uygulanmış ve uygulanmamış fare dalak hücrelerinde CD4+CD45RB+ hücre yüzde değerleri gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm ss olarak verilmiştir. $p<0,05$



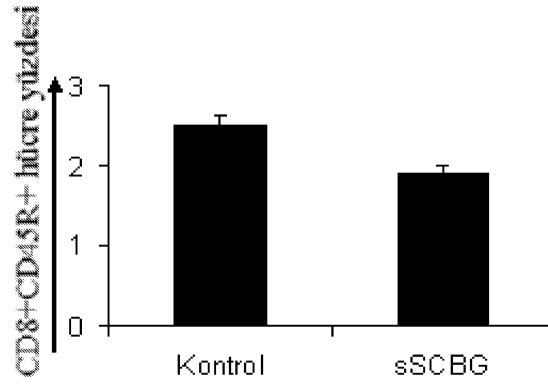
Grafik,22 : sSCBG uygulanmış ve uygulanmamış fare dalak hücrelerinde CD8+CD25+ hücre yüzde değerleri gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm ss olarak verilmiştir. $p>0,05$



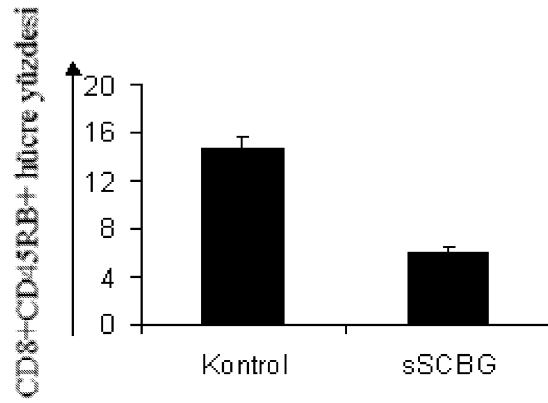
Grafik,23 : sSCBG uygulanmış ve uygulanmamış fare dalak hücrelerinde CD8+CD69+ hücre yüzde değerleri gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm ss olarak verilmiştir. $p>0,05$



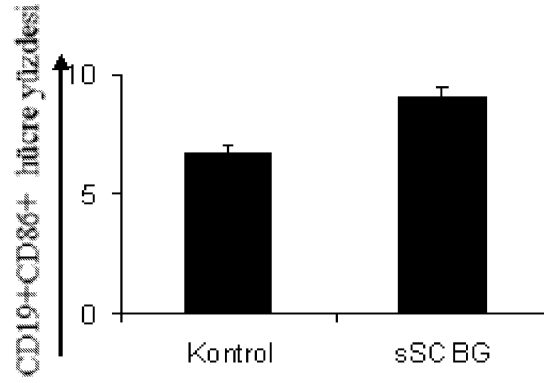
Grafik,24 : sSCBG uygulanmış ve uygulanmamış fare dalak hücrelerinde CD8+CD62L+ hücre yüzde değerleri gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm ss olarak verilmiştir. $p<0,05$



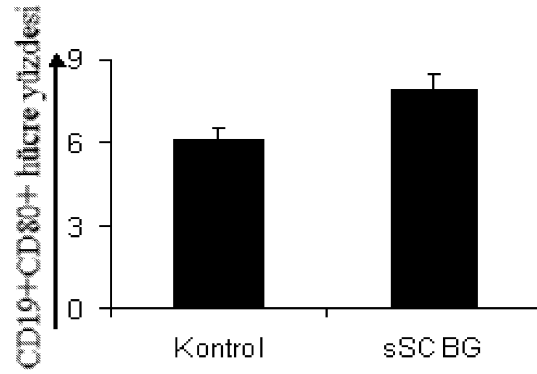
Grafik,25 : sSCBG uygulanmış ve uygulanmamış fare dalak hücrelerinde CD8+CD45R+ hücre yüzde değerleri gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm ss olarak verilmiştir. $p>0,05$



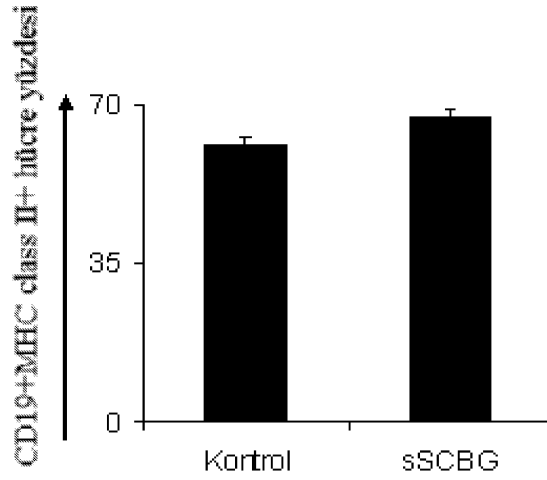
Grafik,26 : sSCBG uygulanmış ve uygulanmamış fare dalak hücrelerinde CD8+CD45RB+ hücre yüzde değerleri gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm ss olarak verilmiştir. $p<0,05$



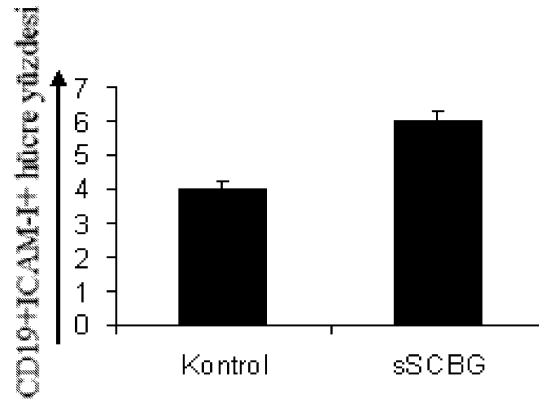
Grafik,27 : sSCBG uygulanmış ve uygulanmamış fare dalak hücrelerinde CD19+CD86+ hücre yüzde değerleri gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm ss olarak verilmiştir. $p < 0,05$



Grafik,28 : sSCBG uygulanmış ve uygulanmamış fare dalak hücrelerinde CD19+CD80+ hücre yüzde değerleri gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm ss olarak verilmiştir. $p < 0,05$



Grafik,29 : sSCBG uygulanmış ve uygulanmamış fare dalak hücrelerinde CD19+MHC class-II+ hücre yüzde değerleri gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm ss olarak verilmiştir. $p < 0,05$



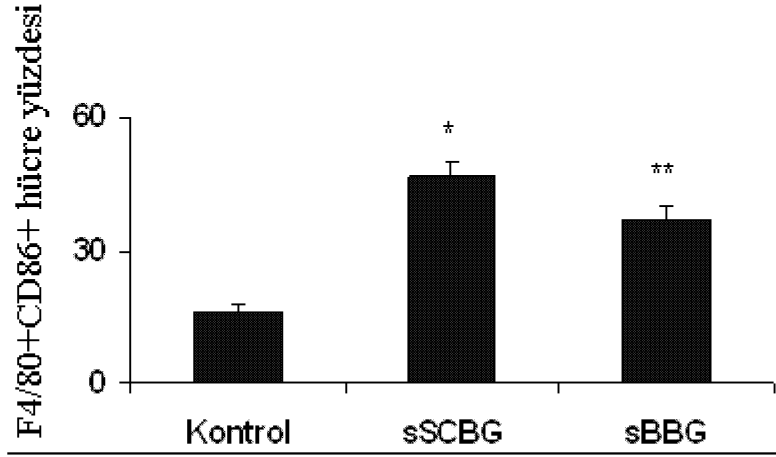
Grafik,30 : sSCBG uygulanmış ve uygulanmamış fare dalak hücrelerinde CD19+ICAM-I+ hücre yüzde değerleri gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm ss olarak verilmiştir. $p < 0,05$

4.3.2 Periton Makrofaj Hücre Yüzey Reseptörlerine Glukanın Etkisi

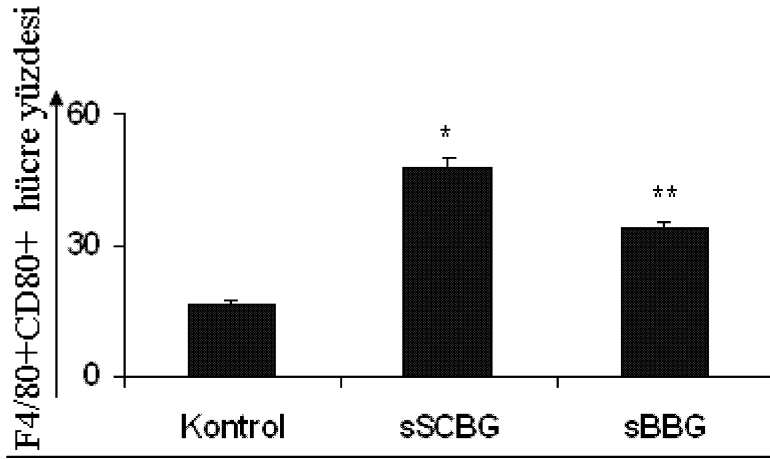
Dört gün boyunca birbiri ardınca periton içi enjeksiyon yapılmış farelerden izole edilen periton makrofaj hücreleri floresans işaretli monoklonal antikolar ile standardize edilmiş teknik yöntemle boyanmıştır. Akış sitometrik yöntemle analiz edilen hücrelerde makrofajlara özgün olan anti F4/80 monoklonal antikorunu kullanılarak makrofajlar belirlenmiştir.

Belirlenen makrofajlar üzerinde bulunan CD86, CD80, ICAM-I, MHC-class II ,CD11b ifadelenmesine glukanın etkisinin araştırılması için ayrı ayrı ikili boyamalar yapılmıştır. F4/80+ hücreler üzerinde ifadelenen CD86 hücre yüzey reseptörü varlığı açısından; sSCBG ve sBBG uygulanmış farelerde kontrol grubuna göre anlamlı bir artış görülmüştür. Aynı zamanda *S.cerevesia* kökenli çözünür formdaki glukanın etkisi arpadan elde edilmiş olan glukanın etkisinden daha fazla görülmüştür. Ve sSCBG'nin etkisinin sBBG'nin etkisinden farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (Grafik,31; kontrol fare F4/80+CD86+ =%16,6±1,28 ;sSCBG fare F4/80+CD86+ =%46,8±2,83 p<0,05; sBBG F4/80+CD86+ =%37,2±1,56 p<0,05 ; Grafik,32; kontrol fare F4780+CD80+ =%16,0±1,5; sSCBG fare F4/80+CD86+ =%47,6±3,23 p<0,05; sBBG F4/80+CD86+ =%33,7±1,68 p<0,05). F4/80+ hücreler üzerinde ifadelenen MHC class-II reseptör düzeyinde glukan uygulama sonrasında artış saptanmıştır. Arpa kökenli çözünür formdaki glukanın MHC class-II reseptörler üzerine olan etkisinin *S.cerevesia* kökenli çözünür formdaki glukanın etkisinden fazla olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Grafik,33; kontrol fare F4/80+MHC class-II+ =%16,8±0,95; sSCBG fare F4/80+MHC class-II+ =%32,9±2,57 p<0,05; sBBG F4/80+MHC class-II+ =%42,6±3,97 p<0,05). Periton makrofaj hücreleri üzerinde ifadelenen ICAM-I adezyon molekülünün glukan uygulanan farelerde kontrole göre artmış olduğu görülmüştür. Aynı zamanda sSCBG uygulanmış farelerin ICAM-I reseptörü üzerine olan etkisi arpadan elde edilen glukanın etkisinden daha güçlü olduğu gözlenmiştir. Bu etki farklılığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (Grafik,34; kontrol fare F4/80+ICAM-I+ =%17,3±1,27; sSCBG fare F4/80+ICAM-I+ =%50,3±3,17 p<0,05; sBBG F4/80+ICAM-I+ =%39,0±1,86 p<0,05). Periton makrofaj hücreleri üzerinde ifadelenen CD11b reseptörü üzerine glukanın etkisi araştırıldığında ise, kontrol grubuna göre glukanın uygulandığı farelerde CD11b hücre yüzey reseptörünün de arttığı gözlenmiştir. Yine sSCBG uygulanmış farelerde sBBG uygulanmış fareye göre artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (Grafik,35; kontrol fare F4/80+ CD11b+ =%19,8±1,5;

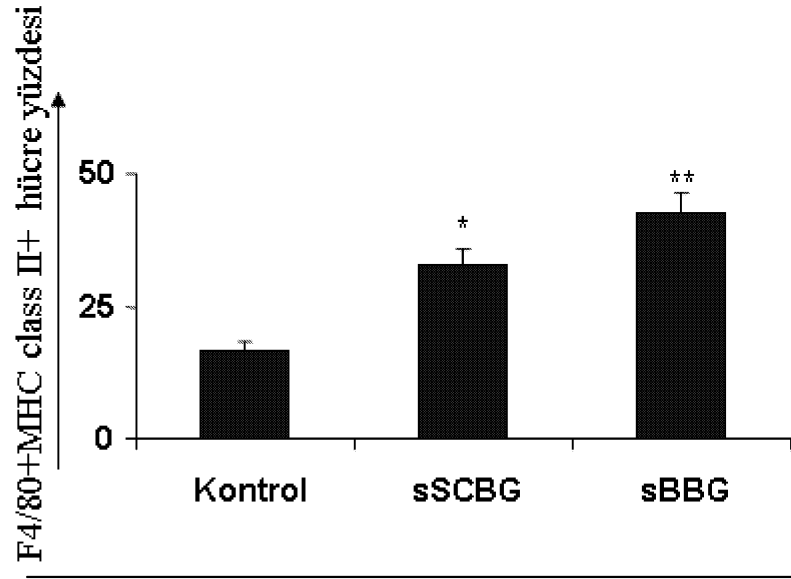
sSCBG fare F4/80+ CD11b+ =%64,5±2,86 p<0,05; sBBG F4/80+ CD11b+ =%43,7±1,85 p<0,05)



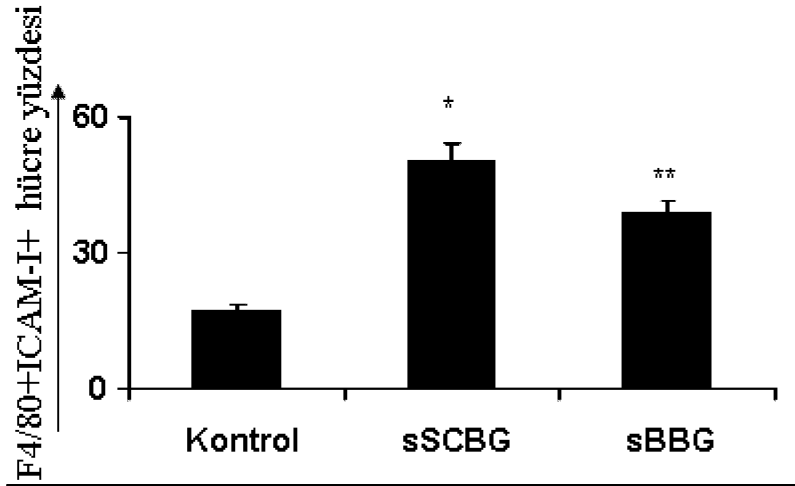
Grafik, 31 : sSCBG; sBBG ve sadece PBS uygulanmış fare periton makrofaj hücrelerinde F4/80+CD86+ hücre yüzde değerleri gösterilmiştir. Değerler ortalama ± ss olarak verilmiştir. *p<0,05; **p<0,05



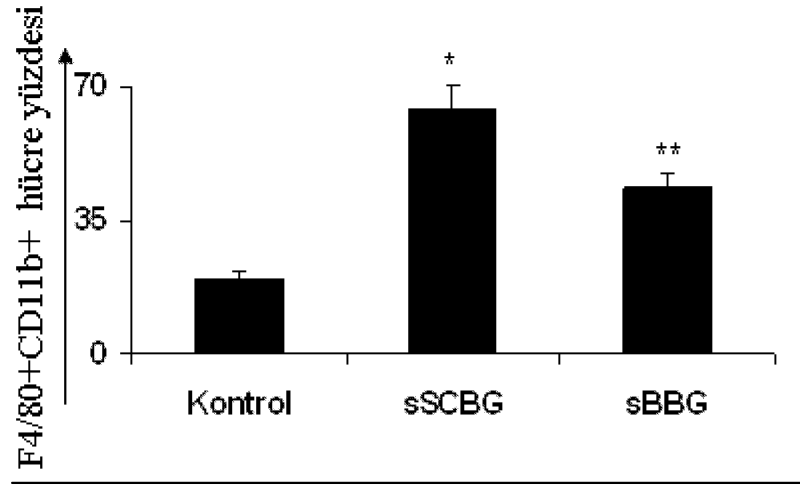
Grafik,32 : sSCBG; sBBG ve sadece PBS uygulanmış fare periton makrofaj hücrelerinde F4/80+CD80+ hücre yüzde değerleri gösterilmiştir. Değerler ortalama ± ss olarak verilmiştir. *p<0,05; **p<0,05



Grafik,33 : sSCBG; sBBG ve sadece PBS uygulanmış fare periton makrofaj hücrelerinde F4/80+MHC class-II+ hücre yüzde değerleri gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm ss olarak verilmiştir. * $p < 0,05$; ** $p < 0,05$



Grafik,34 : sSCBG; sBBG ve sadece PBS uygulanmış fare periton makrofaj hücrelerinde F4/80+ICAM-I+ hücre yüzde değerleri gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm ss olarak verilmiştir. * $p < 0,05$; ** $p < 0,05$



Grafik,35 : sSCBG; sBBG ve sadece PBS uygulanmış fare periton makrofaj hücrelerinde F4/80+CD11b+ hücre yüzde değerleri gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm ss olarak verilmiştir. *p<0,05; **p<0,05

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Literatürde glukanın çeşitli biyolojik sistemler üzerine etkisinin tanımlandığı çalışmalar bulunmaktadır.^{5,80,78} Bu çalışmaların bir kısmı diğerleriyle gerçek bir çelişki hatta tutarsızlık içindedir.⁷ Bu nedenle çalışmalardan anlamlı ve kapsamlı bir sonuç çıkarmak çok da mümkün olmamaktadır. Çalışmalarda farklı glukun preparatlarının ve biyolojik sistemlerin kullanılması ve hücre duvar yapısında bulunan glukunun değişik miktarlarda olmasının buna sebep olduğu düşünülmektedir. Bunun için yapılan değerlendirmelerde kullanılan glukunların kimyasal olarak saf olması önemli kabul edilmiştir.^{2,7} β -(1,3) glukunı çözümlü forma getirebilmek için çeşitli prosedürler geliştirilmeye çalışılmıştır. (ör: sulfanilasyon, sulfasyon, fosfatyon ve karboksimetilasyon, asit ve alkali hidroliz, enzimatik parçalama)^{14,47,91}

Bu karbonhidrat moleküllerinin etkinliğinin belirlenmesinde hangi reseptörlere bağlandıklarının ve sonrasında hangi sinyal ileti yollarının aktive olduğunun bilinmesi gerekmektedir. Glukun polimerlerinin nötrofil ve makrofaj hücre serilerine bağlandıkları, immün sistemi uyardıkları, infeksiyonlara karşı direnç sağladıkları bir çok çalışmada gösterilmiş olmasına rağmen hücrel ve moleküler mekanizmalarına tam bir açıklık getirilememiştir.⁵⁶

Doğal immün yanıtın, kazanılmış immün yanıtla geçişte ve immün homeostazın regülasyonunda; doğal immün yanıt hücreleri bir kavşak noktası oluşturmakta ve antijene nasıl yanıt oluşturulacağını belirlemede oldukça önemli görevlere sahip bulunmaktadır.⁵³ Doğal immün yanıtın neyi antijen olarak belirleyip immün cevap oluşturacağı oldukça önemlidir. Oluşan sitokinler, immün yanıtla ilgili farklı hücreleri, hücre yüzeyindeki özgül reseptörlerine bağlanarak ve dış ortamı uyaran sinyalleri oluşturarak farklı şekillerde etkilemektedir. Sonuçta lokal veya

sistemik değişik biyolojik fonksiyonların oluşumuna aracılık etmektedir.^{51,52,54}

Yapılan çalışmalarda, glukan polimerlerinin reseptörlerine bağlanarak yanıt oluşturabilmesi için fiziksel ve kimyasal birtakım parametrelere sahip olması gerektiği söylenmektedir. Ancak bu immünomodulator özellikler ile bu parametreler arasındaki ilişki tam olarak tanımlanamamıştır.⁵⁶ Yine immün hücreler üzerindeki reseptörlerin glukan polimerlerine olan özgülüğünün derecesinin değişkenliği kadar, bu moleküllerin reseptörlerine afinitelerinin birbirleri arasında da farklılığı söz konusudur.^{6,57}

Doğal immün yanıtta patojenle karşılaşan epitel ve makrofaj hücrelerinden salınan TNF- α ve IL-1 β hem salındıkları hücreler üzerinde hem de profesyonel antijen sunan hücreler üzerinde etki ederler. TNF- α 'nın makrofajlarda fagositozu artırdığı da yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Proinflamatuvar sitokinlerden olan IL-1 β ve TNF- α hücrelerden Prostaglandin E2, Platelet faktör ve Nitrik oksid (NO) üretimini uyarır. Porinflamatuvar özelliklerinin yanında IL-1'in hücreler arası adezyon molekülü olan ICAM-1, mezenkimal hücreler ve endotelial hücreler üzerinde vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) ifadenmesini artırdığı bilinmektedir.¹⁷

S.cerevisiae dan elde edilmiş farklı yapılarıdaki glukanlar ile yapılmış birçok çalışmada (1-3);(1-6)- β -D yapıdaki glukanın immuno modulator etkinliği kanıtlanmıştır.^{14,37,43,47,48,78,82} Bu çalışmalar mantar glukan polimerlerinin patern-tanıyıcı reseptörlere bağlandığı konusunda bir delil olmaktadır.³² Brown ve Gordon tarafından beta glukan polimerlerinin özgül reseptörü olarak tanınan Dectin-1 molekülünün farklı bağlar içeren bazı glukan partiküllerini tanımadığı gösterilmiştir. Bunlar arasında (1-4) bağlı selüloz ve α bağı içeren mannan sayılabilir.⁹

Bizim çalışmamızda iki farklı kaynaktan elde edilmiş farklı moleküler ağırlık, yapısal boyut ve özellik gösteren iki glukan polimerinin immün sistem üzerine olan etkisi araştırılarak, glukanların immün düzenleyici özellikleri hakkında genel bir değerlendirme yapılmaya çalışılmıştır.

Çalışmada hem periton makrofajları, hem de dalak hücreleri üzerinde (1-3) bağlı zincir üzerinde %3 oranında (1-6) bağlı dallanma gösteren ve alkali ortamda çözünen *S.cerevisiae*'dan elde edilmiş glukan kullanılmıştır. Glukan polimerinin deneylerde kullanılan logaritmik konsantrasyonlarından; 1µg/ml kullanım dozunda optimal etkiyi verdiği; yüksek konsantrasyonlarında kullanılmasının ise TNF-α, IL-1β ve IL-6 sitokinleri üzerinde inhibitör etki yaptığı gösterilmiştir. Dalak hücre kültüründe 24. saatte hücre kültür üst sıvısında ölçülen IL-2 sitokin seviyelerinde ise bir değişiklik görülmemiştir. Yine *S.cerevisiae*'dan elde edilmiş glukan bizim deneylerimizde periton makrofajlar üzerinde IL-12p40 sitokin yanıtı oluşturmamıştır. Literatürde (1-3)-β-D ve (1-3);(1-6)-β-D yapıdaki glukan polimerleri ile yapılmış çalışmalarda da TNF-α, IL-1β ve IL-6 sitokinleri üzerinde benzer etkiler verdiği ancak IL-12 ve 2 sitokin salınımının arttığını gösteren yayınlar bulunmaktadır.^{3,43,47,48,63,81,88}

Vetvicka V. ve arkadaşları⁸¹, 2007 ; sulfatlanmış, sentetik olarak üretilen lentinan'ın uygulandığı dalak hücre kültürlerinde 72. saatte IL-2 salınımında artış göstermişlerdir. Pelizon A.C. ve arkadaşları⁶³, 2005; *S.cerevisiae* glukan derivativesinin invivo verildiği farelerin dalak hücre kültürlerinde IL-12 salınımında artış saptamışlarken, invitro kültür ortamına direk verildiğinde sitokin salınımının olmadığını söylemektedirler. Kubala L. ve arkadaşları⁴³, 2003; kökenleri farklı glukan polimerlerinin periton makrofaj kültürlerinde IL-6, TNF-α, IL-8 salınımlarını değerlendirmiş glukan polimerlerinin farklı etkinlik gösterdiğini belirtmişlerdir. Yoon T.J. ve arkadaşları⁸⁸, 2008; *S.cerevisiae* mutant suşundan elde edilen glukanın,

periton makrofaj kültüründe mutant olmayan suşlara göre daha etkin IL-1 β , TNF- α , IL-12, IFN- γ salınımı gerçekleştirdiğini göstermişlerdir.

İmmün yanıtın belirlenmesinde ve yönünün tayininde kritik öneme sahip olan bu sitokinlerin glukanın yüksek konsantrasyonlarında kullanımları ile miktarlarının azalmasının nedeni olarak; fagosite edilememiş glukana polimerlerinin ortamda salınmış olan sitokinlerin lektin bağlayan domainlerine bağlanmasının, sitokin konsantrasyonlarının etkili ve doğru bir şekilde ölçümünü engellemesi ve sitokinin etkisini azaltması olduğu düşünülür.^{47,48} Lucas R. ve arkadaşları⁴⁹, tarafından 1994; N-N-diacetylchitobiose moleküllerine TNF- α 'nın benzer bir bağlanma göstererek inhibe edilmesi; sitokinlerin lektin bağlı etkileşimini desteklemektedir.

Berner M.D. ve arkadaşları³, 2005; yüksek dozda kullanılan glukanın hücreler üzerinde toksik etkisinin olduğunu ve bu toksik etkinin sitokin sekresyonuna olan olumsuz etkiden sorumlu olduğunu savunmaktadırlar. Çalışmalarında invitro makrofaj hücre kültüründe IFN- γ 'nın glukana uygulanmadan önce hücre kültür ortamına verilmesinin hücreler üzerinde koruyucu etkisi olduğunu göstermişlerdir. Williams D.L. ve arkadaşları⁸⁴, 1999; LPS uygulamasına karşı hücrelerin vermiş olduğu TNF- α salınımını; fungal patojenler tarafından ortama salınmış olan β -glukana polimerlerinin baskıladığını göstermişlerdir. Bu çalışmadan farklı olarak Adachi Y. ve arkadaşları¹, 1994; *Grifola frondosa*'dan elde edilmiş glukana olan grifolan'ın makrofaj hücrelerinden LPS'nin uyardığı TNF- α cevabından daha fazla sitokin salınımına neden olduğunu göstermişlerdir.

Literatürde yapılmış bir çok çalışmada aynı mantardan farklı bir şekilde elde edilmiş glukana polimerlerinin ve mutant suşlardan elde edilmiş glukana farklı konsantrasyonlarda farklı miktarlarda sitokin salınımına neden olduğu gösterilmektedir.^{14,47,48,70} Farklı yapısal özellikleri olan glukana polimerlerinin özgül reseptörlerine bağlanmalarının ve sonrasında uyardıkları sinyal mekanizmalarının farklılığının bu sonuçlardan

sorumlu olduğu düşünölmektedir.⁵⁶ Düşük molekül ağırlıklı glukan polimerlerinin, çok yüksek molekül ağırlıklı glukan polimerlerine göre bağlanmada ve fagositozda daha etkin oldukları savunulmaktadır.⁶ Yine çok dallanma gösteren glukan polimerlerinin molekül ağırlığını artırmalarından dolayı etkilerinde azalma olduğu söylenmektedir.⁴⁴ Japon araştırmacıların bir kısmı ise üçlü sarmal yapının immün etkinlik için gerekli bir kriter olduğunu savunmuştur.⁵⁸ Farklı olarak; Kataoka K. ve arkadaşları³⁷, 2002; lineer yapıdaki (1-3)- β -D glukanın (curdlan) makrofajları diğer glukan polimerlerine göre daha kuvvetli bir şekilde aktive ettiğini belirtmişlerdir. Bu aktivasyonun ortaya çıkmasında glukan molekülünün zincir uzunluğunun kısa olmasının önemli olduğu vurgulanmıştır. Kulicke W.M. ve arkadaşları³⁸, 1997; immün etkinliğin üçlü sarmal yapının sıkı ve stabil forma gelmesi ile azaldığını iddia ederken; Mueller A. ve arkadaşları⁵⁷, 2000; solusyon içinde stabil olan yapıların reseptörler tarafından daha kolay tanındığını savunmaktadır.

İnvaziv patojen mantar enfeksiyonlarında örn: aspergilloz, kandidoz; serumda oldukça yüksek oranda bulunan glukanın varlığı serolojik tanı parametresi olarak kullanılmaktadır. (1-3)- β -D glukanın günümüzde yapılan çalışmalarla immünofarmakolojik, immünotoksikolojik aktiviteleri gösterilmiştir. Pelizon A.C. ve arkadaşları⁶³, 2005; Parakoksidiyoidomikoz' lu farelerde *S.cerevisiae*'den elde edilmiş glukanın patojen mantar enfeksiyonunun tedavisinde kullanılabileceğini göstermişlerdir.

Patojenik mantar hücre duvar yapısında α -glukanın β -glukandan fazla olduğunu gösteren yayınlar bulunmaktadır. Küf formundan, enfeksiyon yapan maya formuna geçen mantar hücrelerinde β -glukanın α -glukan yapısına değiştii düşünölmektedir.^{35,63,65} Aynı zamanda, Rappleye ve arkadaşları⁶⁵, 2006; α -glukanın patojen mantar hücre duvar yapısının dış katmanında yer alarak β -glukanın maskelenmesine ve spesifik reseptör-

lerine bağlanmasının engellenmesine neden olduğunu, *Histoplasma capsulatum* α -glukanı ile göstermişlerdir.

Bartnicki ve Garcia⁴, 1968; *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* ve *Aspergillus fumigatus* gibi patojen mantarların özgül β -glukan reseptörü olarak tanımlanan dectin reseptörleri tarafından tanınmadığını göstermişlerdir. Aynı zamanda Herre J. ve arkadaşları³², 2004; patojen olmayan *S.cerevisiae*'nin Dectin-1 reseptörü tarafından fırsatçı fungal patojenlere göre daha etkin olarak tanındığını söylemektedirler.

Çalışmamızda arpadan elde edilen (1-3); (1-4) bağlı zincir yapısında bulunan moleküler ağırlığı 260 kD ve (1-3)/(1-4) bağ oranı 32/68 olan, çözünür formda bulunan glukan polimerleri de kullanılmıştır. Tahıl tohumlarının hücre duvar yapısında bulunan (1-3);(1-4) glukanın tüketiminin kolesterol kan seviyelerini düşürdüğünü gösteren çalışmalar bulunmaktadır.³⁴ Arpa ve yulaftan elde edilen glukan genel anlamda birbirine yapısal ve moleküler ağırlık olarak eş kabul edilir.³⁶ Bu glukan polimerlerinin çözünmeyen formlarının çok büyük moleküler ağırlıkları vardır (500-2000 kD). Çok büyük moleküler ağırlıklı (1-3); (1-4) glukan polimerlerinin invitro çalışmalarda hücrelerin spesifik reseptörlerine bağlanmada problem oluşturacağı belirtilmiştir. Oral kullanımda gastro intestinal absorpsiyonlarının ve M hücreleri tarafından fagositozunun etkin bir şekilde gerçekleşmeyeceği düşünülmektedir.^{13,19,69}

Bu çalışmada kullanılan orta moleküler ağırlıklı ve çözünür formda bulunan (1-3); (1-4) arpa glukanı invitro makrofaj hücrelerinde ve dalak hücrelerinde doza bağımlı olarak TNF- α , IL-1 β ve IL-6 salınımının artışında etkili olmuştur. Çalışmamızda doz arttıkça artan sitokin salınımı saptanmıştır. Optimal cevabın alındığı en etkin doz 1000 μ g/ml olarak değerlendirilmiştir. Arpa glukanı uygulanmış dalak hücre kültüründe 24. saatte hücre kültür üst sıvısında ölçülen IL-2 sitokin seviyelerinde ise bir

değişiklik görülmemiştir. Yine bu glukanla yapılmış olan çalışmalarda periton makrofaj hücre kültüründe IL-12p40 sitokin seviyesine bir etki saptanmamıştır. (1-3);(1-4) bağlı glukanın literatürde immün hücreler üzerine etkisini gösteren az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda invitro olarak immünomodülatör aktivitesi TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4, INF- γ sitokin etkinliği; invivo olarak antibakteriyel etkinliği ile değerlendirilmiştir.^{13, 22,69}

Estrada A. ve arkadaşları²², 1997; yulaftan elde edilen (1-3); (1-4) glukanın I.P uygulama sonrasında dalak hücrelerinde 48. saatte yapılan ölçümlerde IL-2, IL-4, IFN- γ sitokinlerinde doza bağımlı bir artış göstermişlerdir. Yine aynı araştırmacılar periton makrofojlarında TNF- α , IL-1 β salınımında da doza bağımlı bir artış saptamışlardır. Delaney B. ve arkadaşları¹⁹, 2003; oral ve tekrarlayan dozlarda konsantre olarak verilen çok büyük molekül ağırlıklı barley glukanının periferik lenfosit sayısında artış yapmasına rağmen, inflamatuvar hücreler üzerinde fonksiyon açısından bir etkisinin olmadığını göstermişlerdir. Estrada ve arkadaşları²¹, 1999; dexamethazone tedavisi verdikleri ve vermedikleri sığırlarda orta molekül ağırlıklı yulaf beta glukanı kullandıkları grubun IgG anti-OVA yanıtının, glukan vermedikleri gruba göre daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Sealey W.M. ve arkadaşları⁷¹, 2007; yüksek, orta ve düşük molekül ağırlıklı arpa beta glukanını oral olarak verdikleri balıklarda infeksiyöz hematopoetik nekrozis virüsüne (IHNV) karşı oluşan IgG yanıtının orta moleküler ağırlıkta kullanılan arpa glukan kullanımında arttığını ve aynı zamanda TNF- α ve IL-12 sitokin düzeylerinde de artışa neden olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmalarda absorpsiyonda ve özgül reseptörlerine bağlanmada molekül ağırlığının önemli olduğunu göstermişlerdir.

CR3 hem opsonize olmuş hemde opsonize olmamış moleküllerin bağlanarak etki ettikleri bir reseptördür. Normalde bilinen

etkinliği C3b'nin serum faktör I ile parçalanması sonucunda oluşan iC3b'yi bağlayarak bu kompleman parçası ile opsonize olmuş bakterilerin fagositozunda etkin olmasıdır. Glukan polimerleri ortamda hedef patojen olmadan da CR3'ün I domainine bağlanmakta; üzerinde bulunduğu hücreyi uyarmakta ve inflamasyonun başlamasına neden olmaktadır.^{7,13,53, 80,87}

Bizim çalışmamızda *S.cerevisiae* uygulanmış ve uygulanmamış fare dalak hücrelerinde heterodimerik integrin reseptörü olan CR3'ün α zincirinin (CD11b) ifadelenmesindeki artışta glukanın etkisi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Yine periton makrofaj hücrelerinde her iki glukan polimerinin uygulanması CD11b ifadelenmesini arttırmıştır. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Cheung N.K ve arkadaşları¹³, 2002; P.O ve I.P verilen arpa glukunun nöroblastomalı farelerde monoklonal antikor tedavisi ile birlikte verildiğinde tümör volümünü verilen doza bağımlı olarak küçülttüğünü göstermişlerdir. Tek başına verilen arpa glukunun antitümör etkinliğinin olmadığı gösterilmiştir. Bu çalışmada lineer zincir yapısında; dallanma göstermeyen β -(1-3);(1-4) arpa glukunun immün hücreler üzerinde spesifik reseptörlerine özellikle CR3'e bağlanarak etki gösterdiği belirtilmiştir. Vetvicka V. ve arkadaşları⁸⁰, 1996; nötrofiller üzerinde opsonize olmuş koyun eritrositlerinin, ortama çözülmüş formda glukan polimeri eklendiğinde hemolizin gerçekleştiğini göstermişlerdir. Yine aynı çalışmada, arpa glukunun CR3 reseptörüne; *S.cereviviae*'den elde edilmiş glukana göre daha düşük bir afinite ile bağlandığını belirtmişlerdir.

Özgül olmayan immün yanıtın aktive edilmesi aynı zamanda uygun özgül yanıtın da aktivasyonunu sağlar. Profesyonel antijen sunan hücreler antijenleri sunarken aynı zamanda hücre yüzeylerinde bulundukları ko-stimülatör molekülleri ile T hücre aktivasyonunu gerçekleştirirler. T hücreleri bu ikinci sinyallerini hücre yüzeylerinde buldukları CD28 ile antijen sunan hücre (ASH) yüzeyinde bulunan (CD80 ve CD86) molekülleri ile etkileşiminde kazanır. Normalde ASC

yüzeyinde düşük düzeyde ifadelenen ko-sitülatör moleküller bir antijen ile uyarıldıklarında ifadelenmeleri artar.^{30,53,54,55} İkinci sinyalin gerekliliği immün yanıtın gerçekten zararlı mikroorganizmalara karşı geliştirilip infeksiyöz olmayan ajanlara karşı, bunları tanıyan lenfositler bulunabilmesine rağmen, gelişmemesini garanti altına alır.⁵² Biyolojik cevap düzenleyicileri olarak değerlendirilen moleküllerden olan glukanlar etkilerini özellikle ko-stimülatör molekülleri artırarak gösterirler.²⁷

Bu çalışmada I.P glukan uygulanmış ve uygulanmamış fare peritonundan toplanmış makrofajlara glukanların etkinliğini değerlendirmek için; özgül matür makrofaj hücre yüzey reseptörü olduğu bilinen F4/80 ile boyanmış hücreler üzerinde CD86, CD80, ICAM-I, MHC-class II, CD11b, ifadelenmesine akım sitometre yöntemiyle bakılmıştır. Çalışmamızda ko-stimülatör moleküllerden olan CD80 ve CD86 ifadelenmesinde kontrole göre her iki glukan uygulaması sonrasında bir artış görülmüştür. Kikuchi T. ve arkadaşları⁴⁴, 2002; *Candida albicans*'dan elde edilmiş çözünür formda bulunan β -glukanın fare dendritik hücreleri üzerinde CD80 ve CD86 ifadelenmesini arttırdığını göstermişlerdir. Hunter K.W. ve arkadaşları³⁰, 2004; *S.cerevisiae*'den elde edilmiş mikropartiküler glukanın periton makrofajları F4/80+ üzerindeki CD80 ve CD86 ifadelenmesini arttırdığını göstermişlerdir. β -(1-3);(1-4) glukanın bu etkisi ise ilk defa bizim çalışmamız ile gösterilmiştir.

Çalışmamızda *S.cerevisiae*'den elde edilmiş glukan uygulanmış ve uygulanmamış farelerde dalak hücre yüzey reseptörlerinin ifadelenmesine bakıldığında CD19+CD80+ ve CD19+CD86+ hücrelerde kontrole göre istatistiksel olarak artış saptanmıştır. Glukan uygulaması sonrasında CD19 ifadelenmesini değerlendiren çalışmalar literatürde bulunmaktadır. Vetvicka V. ve arkadaşları⁸², 2004; dalak hücrelerinde *Lentinus.edodes*'den elde edilen lentinan ve *Laminaria digitata*'dan elde edilmiş laminarin ile CD4, CD8, CD11b, CD19, CD71, CD122 hücre yüzey reseptörlerini değerlendirmişlerdir. Lentinan kullanılan fare dalak

hücrelerinde kontrol grubuna göre bir değişiklik gösterilmemiştir. Bu farklılıktan glukanların yapısal farklılıklarının özgül reseptörlerine bağlanmadaki farklılıkları sorumlu tutulmuştur.

Beta glukanın tetiklediği lökosit aktivasyonu üzerine yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde; inflamatuvar reaksiyonların başlamasında TLR oldukça önemli rol oynadıkları görülmüştür. Özellikle TLR-2 nin zimosan moleküllerinin tanınmasında önemli olduğu düşünülmektedir.⁷ Bazı glukan polimerlerinin TLR-2 ve TLR-6 ile birlikte bağlandıkları zaman sitokin ve kemokin üretimine neden oldukları gösterilmiştir. TLR sinyal ileti yolağında NF κ B ve MyD88 aktivasyonuna ihtiyaç duymaktadır.³⁷

Brown ve arkadaşları⁸, 2003; glukan uygulaması sonrasında TNF- α ve IL-12 salınımının olması için glukan polimerinin hem TLR-2 hem de dectin-1 reseptörünü aynı anda uyarması ve NF κ B aktivasyonunun gerçekleşmesi gerektiğini göstermişlerdir. Gantner ve arkadaşları²³, 2003; Dectin-1 reseptörünün TLR-2 olmasa da glukan polimerlerini tanıdıkları ve reseptörün sitoplazmik bir parçaya sahip olduğunu ve bu parçanın sitoplazmik immünoresseptör tirozin bazlı aktivasyon motifi (ITAM) olduğunu göstermişlerdir.

Dectin-1 reseptörü, farklılıkları olmakla birlikte NK hücrelerinde bulunan C-tip lektinlere benzemektedir.³² Glukan polimerlerini tanıyan, mantar partiküllerinin tanınmasında etkili bir reseptör olan dectin reseptörlerinin, organizmada farklı izoformlarının varlığı gösterilmiştir. Bu izoformların, zimosan moleküllerini tanımada farklı davrandıkları ve hücrede uyardıkları cevapta değişikliklere neden oldukları gösterilmiştir. Bu değişikliklerin glukan polimerlerinin uygulanması ile oluşan proinflamatuvar cevaptaki farklılıklarının nedeni olabileceği düşünülmektedir.^{32,67}

Edinsel immün yanıtta T hücreleri kendilerine sunulan antijeni tanıyarak ona uygun cevap vermektedirler. MHC molekülleri ile birlikte

sunulan küçük peptit antijenlerinin tanınması sonrasında antijenin sunulduğu T hücrelerine göre yanıtta değişiklikler görülmektedir. Antijen sunan hücreler MHC-class II bakımından zengindir ve bu CD4+ T hücrelerine antijen sunumu açısından önemlidir. Profesyonel antijen sunan hücreler arasında bulunan dendritik hücre, makrofaj ve B hücresi; üzerlerindeki MHC-class-II molekülleri ve ko-stimülatör proteinleri ile T hücrelerini uyarmaktadırlar.^{18,62}

Glukan polimerleri ile yapılan çalışmamızda hem dalak CD19+ B hücrelerinde hem de periton makrofaj hücrelerinde MHC-class II moleküllerinin ve ASH ile T hücre arasındaki ilk karşılıklı etkileşimi gerçekleştiren ICAM-I moleküllerinin ASH üzerinde ifadelenmesinin arttığı gösterilmiştir. Aynı zamanda bu hücreler üzerinde ko-stimülatör moleküllerinde ifadelenmesinde artış görülmüştür.

MHC moleküllerinin yalnızca peptitleri bağladığı ve peptit bağlamak için geniş bir özgüllüğü olduğu kabul edilir.^{18,62} MHC moleküllerinin taşıdıkları T hücre reseptörüne özgül antijen, T hücreler tarafından tanındığında ko-stimülatör moleküllerden ikincil sinyalde alan T hücrelerinde aktivasyon gerçekleşir. Naif T hücresi, efektör T hücresi ve hafıza T hücresi üzerinde ifadelenen hücre yüzey molekülleri birbirlerinden farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıklar T hücrelerinin antijen sunan hücreye ve endotele adezyon kabiliyetinde ve antijen uyarımına cevabında değişikliklere neden olmaktadır.⁶²

Çalışmamızda glukanın dalak CD4+T ve CD8+T hücreleri üzerinde ifadelenen CD25, CD69, CD62L, CD45R ve CD45RB gibi hücre aktivasyonu ile hücre yüzeyinde ifadelenmesi değişen reseptörleri değerlendirdiğimizde: CD4+T hücrelerinde ve CD8+T hücrelerinde CD25 (IL 2 α zincir reseptörü) ve CD69 ifadelenmesinde anlamlı bir değişiklik bulunmamıştır. CD4+T hücrelerinde CD62L ve CD45RB ifadelenmesinde glukan uygulanan fare dalak hücrelerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir

artış görülmüşken CD45R ifadelenmesinde bir değişiklik saptanmamıştır. CD8+T hücrelerinde ise CD62L ve CD45RB ifadelenmesinde kontrol grubuna göre azalma görülmüşken CD45R ifadelenmesinde bir değişiklik saptanmamıştır. Naif lenfositler üzerinde bulunan CD62L endotele adezyonunu sağlayarak periferik lenf nodlarına ve peyer plaklarına yerleşimde görevli bir moleküldür. Aynı zamanda lökositlerin inflamasyon bölgelerinde toplanmasını sağlamaktadır.⁷⁹ Kubala L. ve ark. 2003, *Schizophyllum commune*'den elde edilmiş Schizophyllan ve *S.cerevisiae*'den elde edilmiş carboxymethyl glukun'ın periferik mononükleer hücreler ve lenfositler üzerinde ifadelenen CD11b, CD62L, CD69, yüzey moleküllerini değerlendirdiklerinde monositler üzerinde CD62L ve CD11b ifadelenmesinde azalma, lenfositler üzerinde CD69 nin ifadelenmesinde ise artma saptamışlardır. Vetvicka V. ve arkadaşları⁸²,2004; phycarine ile dalak hücreleri üzerinde ifadelenen CD4, CD8, CD11b, CD19, CD71, CD122 hücre yüzey moleküllerinde artış gördüklerini ama Letinan'ın hücre yüzey molekülleri üzerinde herhangi bir etkisini görmediklerini söylemişlerdir. Vervicka V. ve arkadaşları⁸¹, 2007 ; CD69, CD4, CD8, CD122 –NK hücreleri üzerinde bulunan IL 2 β reseptörü-semisentetik sülfatlanmış glukun polimeri olan sülfatlanmış laminarin ile dalak hücrelerinde ifadelenmelerinin arttığını, CD11b reseptör ifadelenmesinde bir değişme olmadığını göstermişlerdir.

CD45RA ; Naif CD4+ T hücreleri üzerinde bulunan CD45 molekülüne verilen isimdir. Bu molekül hücrenin spesifik antijenine zayıf cevap verirken, hafıza ve uyarılmış T hücreleri üzerinde bulunan CD45R0 (CD45RB) molekülü ise daha kuvvetli bir yanıt vermektedir.⁶² β -(1-3);(1-6) uygulanmış farelerde CD4+ T hücrelerinde CD45RB ifadelenmesinin kontrol grubuna göre arttığı görülmüşken CD8+T hücrelerinde ise azaldığı gözlemlenmiştir. Cross G.G. ve arkadaşları¹⁴, 2001; glukun oksidasyon ve karboksimetilasyon yöntemiyle elde ettikleri glukunların etkilerinin dalak

hücreleri üzerindeki değerlendirmelerinde CD4+CD45+ ifadenmesinin kontrol grubuna göre artmış olduğu saptanmıştır.

Geçtiğimiz beş altı yıl içinde yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular, glukan hakkındaki bilgi birikimini anlamlı bir şekilde arttırmasına rağmen yapılan bir çok çalışma glukanın hücrel aktivite üzerindeki etkisine; hücrel ve moleküler mekanizma açısından tam bir açıklık getirememiştir.^{7,8,9,10,42} Bununla birlikte; özellikle Japonya ve Kore'de immün cevap düzenleyici olarak değerlendirilen glukan polimerleri anti-infektif ve anti-tümöral özellikleri nedeniyle klasik tedaviye yardımcı moleküller olarak kullanılmaktadır. Konuya açıklık getirilmesinde hücrel düzeydeki moleküler mekanizmaların yanında; glukanın fiziksel ve kimyasal yapısının tanımlanmasını sağlayan yeni teknolojilerin bulunması ve varolan teknolojilerin geliştirilmesi de oldukça önem kazanmıştır.³⁹

Bu bilgilerin ışığında bu makromoleküler komplekslerin biyolojik sistemler üzerindeki etkileri daha kapsamlı değerlendirilmelidir.

6. ÖZET

Bazı mantar, patojenik bakteriler, yulaf ve arpa gibi bitkilerin hücre duvarında bulunan ve önemli bir yapı olan $\beta(1,3)$ glukanın biyolojik aktif immunomodülatör rolü yaklaşık 40 yıldır incelenmektedir. Yapılan birçok çalışmaya rağmen biyolojik etkilerinin bir çok değişkene bağlı olduğu düşünülen glukanın hücresel düzeyde bağlandıkları spesifik reseptörlerin varlığı hakkında bir fikir birliği oluşmamıştır.

Çalışmamızda; glukanın immun cevaba olan etkisi, inflamatuvar yanıtın başlamasında ve yönlendirilmesinde etkin rol oynayan TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12p40 ve IL-2 sitokinleri üzerinden değerlendirilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış olan glukane ile fare dalak ve periton makrofajları karşılaştırılmıştır. 24 saatlik inkübasyon sonrasında sitokin miktarları ELISA kitleriyle ölçülmüştür. Ayrıca immün yanıt sırasında immün sistem hücrelerinin immun yanıtın siddetini ve yönünü tayin etmek için belirledikleri hücre yüzey reseptörlerinin değişiminde glukane etkisi akan hücre ölçüm yöntemiyle değerlendirilmiştir. Bunun için anti-CD4, CD8, CD25, CD69, CD62L, CD19, ICAM-I, MHC-class II, F4/80, CD11b-monoklonal antikoları kullanılmıştır. β -D-glukanların yapısal olarak farklılığının immun cevabı düzenleyici özellikleri üzerine olan etkisi değerlendirilerek; genel immunomodülatör etkinliği hakkında bilgi edinilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaların istatistiksel değerlendirilmesi One-Way ANOVA ve Bağımsız İki Örneklem T testleri ile yapılmıştır.

Çalışmalar sonunda; *S.cerevisiae*'den elde edilmiş glukane 1 μ g/ml konsantrasyonda en yüksek sitokin değeri verdiğini, yüksek konsantrasyonlarda ise alınan sitokin cevabının düştüğü görülmüştür. Bundan farklı olarak arpa glukane doza bağlı olarak etkinliğinin arttığı gözlemlenmiştir. Her iki glukane polimerinin özgül olmayan immun yanıtı uyardığı ve sonrasında hücre yüzeyinde aktivasyon ve ko-stimulasyonda görev yapan moleküllerin ifadenmesini değiştirdiği değerlendirilmiştir.

Konuya açıklık getirilmesinde hücresel düzeydeki moleküler mekanizmaların yanında; glukanın fiziksel ve kimyasal yapısının tanımlanmasını sağlayan yeni teknolojilerin bulunması ve varolan teknolojilerin geliştirilmesi de oldukça önemlidir.

7. SUMMARY

β 1,3-glucan, one of the major cell wall components of plants, such as oat, barley, certain fungi and pathogenic bacteria. Glucan's role as a biologically active immunomodulator has been well documented for over 40 years. Despite the progress, it is not clear if there is a separate receptor for glucan. As biological effects of glucans appear to be multifactorial.

In our study, the effect of glucan over the immune response is evaluated over the TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12p40 and IL-2 playing major role in the initiating inflammatory response and its directing. Spleen cells and peritoneal macrophages prepared with varied glucan concentrations were incubated and after 24 hours, supernatants were collected from each well for measurement of cytokine production. Also during the immune response the effect of glucan over the determination and alteration of cell surface receptors, specified by immune cells, directing the degree and the way of immune response was evaluated. For this anti-CD4, CD8, CD25, CD69, CD62L, CD19, ICAM-1, MHC-class II, F4/80, CD11b- monoclonal antibodies were used. By evaluating the effect of structural variability of beta glucans over their regulatory characteristic in immune response, acknowledgement of about efficiency of general immunomodulatory of glucans is aimed. Statistical analysis of studies were made by One-Way ANOVA and Independent samples T test.

At the end of the studies we observed the fact that the one obtained from *S.cerevisiae* gives optimal cytokine level in 1 μ g/ml concentration and this response decreases in high concentration. However, the efficiency of barley glucan increases related to dose. The fact that both of the glucan polymers induce non-specific immune response and after the expression of molecules responsible for activation and co-stimulation in the cell surface alters, is observed.

To sum up; for the elucidation of the topic, the investigation of new technologies providing the description of physical and chemical structure of glucans and cellular immune response mechanism, and improvement of existing ones is considerably important.

8. KAYNAKLAR

- 1- ADACHI Y., OKAZAKI M., OHNO N., YADOMAE T., Enhancement of cytokine production by macrophages stimulated with (1→3)-beta-D-glucan, grifolan (GRN), isolated from *Grifola frondosa*. *Biol Pharm Bull.* 1994;17(12):1554-60.
- 2- AKRAMIENE D., KONDROTAS A., DIDZIAPETRIENE J., KEVELAITIS E., Effects of b-glucans on the immune system. *Medicina.* 2007; 43(8) :597-606
- 3- BERNER M.D., SURA M.E., ALVES B.N., HUNTER K.W.Jr., IFN-gamma primes macrophages for enhanced TNF- α expression in response to stimulatory and non-stimulatory amounts of microparticulate β -glucan. *Immunol. Lett.* 2005; 98(1):115-22
- 4- BARTNICKI-GARCIA S., Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Annu Rev Microbiol.* 1968; 22:87-108
- 5- BOHN J.A., BEMILLER J.N., (1→3)- β -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydr. Polym.* 1995; 28(1): 3-14
- 6- BROWN D.G., GORDON S., Immune recognition of fungal b-glucans. *Cell Microbiol.* 2005 ; 7(4) :471-479
- 7- BROWN D.G., GORDON S., Fungal β -Glucans and Mammalian Immunity. *Immunity.* 2003; 19:311-315
- 8- BROWN G.D., HERRE J., WILLIAMS D.L., WILLMENT J.A., MARSHALL A.S., GORDON S., Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med.* 2003; 197(9): 1119-1124.
- 9- BROWN G.D., TAYLOR P.R., REID D.M., WILLMENT J.A., WILLIAMS D.L., MARTINEZ-POMARES L., WONG S.Y., GORDON S., Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J Exp Med.* 2002; 196(3): 407-12.
- 10- BROWN G.D., GORDON S. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature.* 2001; 413(6851):36-7.

- 11-CARROW D.J., β -(1-3)-D-glucan as a Primary Immune Activator. Townsend lett. 1996;(5):86-91
- 12-CHAFFIN W.L., LOPEZ-RIBOT J.L., CASANOVA M., GOZALBO D., MARTÍNEZ J.P. Cell Wall and Secreted Proteins of *Candida albicans*: Identification, Function, and Expression. Microbiol. Mol. Biol. Rev.1998; 62: 130-180
- 13-CHEUNG N.K., MODAK S., Oral (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)- β -D-glucan synergizes with antiganglioside GD2 monoclonal antibody 3F8 in the therapy of neuroblastoma. Clin Cancer Res. 2002; 8(5):1217-1223
- 14-CROSS G.G.; JENNINGS H.J.; WHITFIELD D.M.; PENNEY C.L.; ZACHARIE B.; GAGNON L., Immunostimulant oxidized beta-glucan conjugates. Int Immunopharmacol. 2001; 1(3):539-50.
- 15-CZOP J.K., KAY J., Isolation and Characterization of β -Glucan Receptors on Human Mononuclear Phagocytes. J Exp Med. 1991; 173(6):1511–1520
- 16-DÌ LUZIO NR, WILLIAMS DL, MCNAMEE RB, EDWARDS BF, KİTAHAMA A., Comparative tumor-inhibitory and anti-bacterial activity of soluble and particulate glucan. Int J Cancer. 1979; 24(6):773-9.
- 17-DİNARELLO C.A., The Beta Trefoil Cytokines and Proinflammatory Signaling Receptors:Interleukin-1 Family. THOMSON A.W., Lotze M.T. , The Cytokine Handbook. dördüncü basım. London, San Diego; Akademic Press 2003,syf: 643-667
- 18-DİXON B., STET R.J.M., The relationship between major histocompatibility receptors and innate immunity in teleostfish. Dev Comp Immunol. 2001; 25(8-9):683-699
- 19-DELANEY B., CARLSON T., ZHENG G.-H., HESS R., KNUTSON N.; FRAZER S., OSTERGREN K., VAN ZIJVERDEN M., KNIPPELS L.; JONKER D., PENNINKS A., Repeated dose oral toxicological pevaluation of concentrated barley beta-glucan in CD-1 mice

- including a recovery phase. *Food Chem. Toxicol.* 2003; 41(8):1089-102.
- 20-ERBER W.N., Human leucocyte differentiation antigens: review of the CD nomenclature. *Pathology.* 1990; 22(2):61-9
- 21-ESTRADA A.; VAN KESSEL A.; LAARVELD B., Effect of Administration of Oat β -Glucan on Immune Parameters of Healthy and Immunosuppressed Beef Steers. *Can J Vet Res.* 1999; 63:261-268
- 22-ESTRADA A, YUN CH, VAN KESSEL A, LI B, HAUTA S, LAARVELD B., Immunomodulatory activities of oat beta-glucan in vitro and in vivo. *Microbiol Immunol.* 1997; 41(12):991-998.
- 23-GANTNER B.N., SIMMONS R.M., CANAVERA S.J., AKIRA S., UNDERHILL D.M., Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor. *J Exp Med.* 2003; 197(9):1107-17
- 24-GAO G.F., JAKOBSEN B.K., Molecular interactions of coreceptor CD8 and MHC class I: the molecular basis for functional coordination with the T-cell receptor. *Immunol Today.* 2000; 21(12): 630-6.
- 25-GORDON S., Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell.* 2002; 111:927-930
- 26- GORDON S., The role of the macrophage in immune regulation. *Res. Immunol.* 1998; 149: 685-688
- 27-GRÜNEBACH F., WECK M.M., REICHERT J., BROSSART P., Molecular and functional characterization of human Dectin-1. *Exp Hematol.* 2002; 30: 1309-1315
- 28-GRÜN C.H., HOCHSTENBACH F., HUMBEL B.M., VERKLEIJ A.J., SIETSMA J.H., KLIS F.M., KAMERLING J.P., VLIÉGENTHART J.F.G., The structure of cell wall α -glucan from fission yeast. *Glycobiol.* 2005;15(3): 245–257,
- 29-HAHN P.Y., EVANS S.E., KOTTOM T.J., STANDING J.E., PAGANO R.E., LIMPER A.H., *Pneumocystis carinii* cell wall beta-glucan

- induces release of macrophage inflammatory protein-2 from alveolar epithelial cells via a lactosylceramide-mediated mechanism. *J Biol Chem.* 2003; 278: 2043–2050.
- 30-HUNTER K.W. JR., DuPRE' S., REDELMAN D., Microparticulate beta-glucan upregulates the expression of B7.1, B7.2, B7-H1, but not B7-DC on cultured murine peritoneal macrophages. *Immunol Lett.* 2004; 93(1):71-8.
- 31-HEINSBROEK S.E.M., TAYLOR P.R., ROSAS M., WILLMENT J.A., WILLIAMS D.L., GORDON S., BROWN G.D., Expression of Functionally Different Dectin-1 Isoforms by Murine Macrophages. *J.Immunol.* 2006; 176: 5513-5518
- 32-HERRE J., GORDON S., BROWN G.D., Dectin-1 and its role in the recognition of β -glucans by macrophages. *Mol Immunol.* 2004; 40:869-876
- 33-HOGAN L.H., KLEIN B.S., Altered expression of surface alpha-1,3-glucan in genetically related strains of *Blastomyces dermatitidis* that differ in virulence. *Infect. Immun.* 1994; 62(8): 3543-3546,
- 34-IKEGAMI S., TOMITA M., HONDA S., YAMAGUCHI M., MIZUKAWA R., SUZUKI Y., ISHII K., OHSAWA S., KIYOOKA N., HIGUCHI M., KOBAYASHI S., Effect of boiled barley-rice-feeding in hypercholesterolemic and normolipemic subjects. *Plant Foods Hum Nutr.* 1996; 49(4): 317-328.
- 35-ISHIBASHI KI., MIURA N.N., ADACHI Y., TAMURA H., TANAKA S., OHNO N., The solubilization and biological activities of *Aspergillus* beta-(1 --> 3)-D-glucan. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2004; 42(2):155-66.
- 36-JOHANSSON L., TUOMAINEN P., YLINEN M., EKHOLM P., VIRKKI L., Structural analysis of water-soluble and -insoluble beta-glucans of whole-grain oats. *Carbohydr.Poly.* 2004; 58: 267-274

- 37-KATAOKA K.,MUTA T., YAMAZAKI S., TAKESHIGE K., Activation of Macrophages by Linear β -(1 \rightarrow 3)-D-glucans. *J Biol Chem.* 2002; 277: 36825-36831
- 38-KIKUCHI T., OHNO N., OHNO T., Maturation of dendritic cells induced by Candida beta-D-glucan. *Int Immunopharmacol.* 2002; 2(10): 1503-8
- 39-KIM Y.T., KIM E.H., CHEONG C., WILLIAMS D.L., KIM C.W., LIM S.T., Structural characterization of β -D-(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-linked glucans using NMR spectroscopy. *Carbohydr Res.* 2000; 328(3):331-41
- 40- KOGAN G., ALFÖLDI J., MASLER L., ¹³C-NMR spectroscopic investigation of two yeast cell wall β - Image -glucans. *Biopolym.* 1988; 27(7):1055–1063.
- 41-KOLLÁR R., REINHOLD B.B., PETRÁKOVÁ E., YEH H.J., ASHWELL G., DRGONOVÁ J., KAPTEYN J.C., KLIS F.M., CABIB E., Architecture of the yeast cell wall. Beta(1 \rightarrow 6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1 \rightarrow 3)-glucan, and chitin. *J Biol Chem.* 1997; 272(28):17762-75.
- 42-KOUGIAS P., WEI D., RICE P.J., ENSLEY H.E., KALBFLEISCH J., WILLIAMS D.L., BROWDER I.W., Normal human fibroblasts express pattern recognition receptors for fungal (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucans. *Infect Immun.* 2001; 69(6):3933-8.
- 43-KUBALA L., RUŽICKOVA J., NICKOVA K., SANDULA J., CIZ M., LOJEKA.,The effect of (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucans, carboxymethylglucan and schizophyllan on human leukocytes in vitro. *Carbohydr Res.* 2003; 338: 2835-2840
- 44-KULICKE W.M., LETTAU A.I., THIELKING H.,Correlation between immunological activity, molar mass, and molecular structure of different (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucans. *Carbohydr Res.* 1997 ;297(2):135-143

- 45-LAI L., ALAVERDI N., MALTAIS L., MORSE H.C., 3rd. Mouse cell surface antigens: nomenclature and immunophenotyping. *J Immunol.* 1998; 160(8): 3861-8
- 46- LIPKE P.N., OVALLE R., Cell Wall Architecture In Yeast:New Structure And New Challenges. *J Bacteriol.* 1998;180(15): 3735–3740.
- 47-LEE D.Y., JI I.H., CHANG H.I., KIM C.W., High-level TNF-alpha secretion and macrophage activity with soluble beta-glucans from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 2002; 66(2):233-8.
- 48-LEE J-N., LEE D-Y., JI I-H., KIM G-E., KIM H N., SOHN J., KIM S., KIM C-W., Purification of Soluble β -Glucan with Immune-enhancing Activity from the Cell Wall of Yeast. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2001; 65(4):837-841
- 49-LUCAS R., MAGEZ S., DE LEYS R., FRANSEN L., SCHEERLINCK J.P., RAMPELBERG M., SABLON E., DE BAETSELIER P., Mapping the lectin-like activity of tumor necrosis factor. *Science.* 1994; 263(5148): 814-7
- 50-MARZIO R., MAUËL J., BETZ-CORRADIN S., CD69 and regulation of the immune function. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 1999; 21(3): 565-82
- 51-MIURA T., OHNO N., MIURA N.N., SHIMADA S., YADOMAE T., Inactivation of a Particle β -glucan by Proteins in Plasma and Serum. *Biol.Pharm.Bull.* 1997; 20(10): 1103-1107
- 52-MEDZHITOV R., JANEWAY CA Jr., Decoding the Patterns of Self and Nonself by the Innate Immune System. *Science.* 2002; 296(5566): 298-300.
- 53-MEDZHITOV R., JANEWAY CA Jr., Innate immunity. *N Engl J Med.* 2000; 343(5):338-44.

- 54-MEDZHİTOV R., JANEWAY CA Jr., Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin.Immunol.* 1998;10: 351-353
- 55-MEDZHİTOV R., JANEWAY C.A. Jr., Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol.* 1997; 9(1):4-9.
- 56-MUELLEA A., RAPTİS J., RİCE P.J., KALBFLEİSCH J.H., STOUT R.D., ENSLEY H.E., BROWDER I.W., WİLLAMS D.L., The influence of glucan polymer structure and solution conformation on binding to (1-->3)-beta-D-glucan receptors in a human monocyte-like cell line. *Glycobiology.* 2000; 10(4): 339-346
- 57-MULLER A., ENSLEY H., PRETUS H., MCNAMEE R., JONES E., MCLAUGHLİN E., CHANDLEY W., BROWDER W., LOWMAN D., WİLLIAMS D., The application of various protic acids in the extraction of (1-->3)-beta-D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydr Res.* 1997; 299(3): 203-8.
- 58-OHNO N., ASADA N., ADACHİ Y., YADOMAE T., Enhancement of LPS triggered TNF-alpha (tumor necrosis factor-alpha) production by (1-->3)-beta-D-glucans in mice. *Biol Pharm Bull.* 1995; 18(1):126-33.
- 59-OLSON E.J., STANDİNG J.E., GRİEGO-HARPER N., HOFFMAN O.A., LİMPER A.H., Fungal beta-glucan interacts with vitronectin and stimulates tumor necrosis factor alpha release from macrophages. *Infect Immun.* 1996; 64(9): 3548–3554.
- 60-OLLİLA J., VİHİNEN M., Cells in focus B cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005; 37: 518–523
- 61-OOI V.E., LIU F., Immunomodulation and Anti-Cancer Activity of Polysaccharide-Protein Complexes. *Curr Med Chem.* 2000; 7(7): 715-729
- 62-PARHAM P., *The Immune System*, 2.baskı.New York and London: Garland Science; 2004 syf: 43-271

- 63-PELIZON A.C., KANENO R., SOARES A.M.V.C., MEIRA D.A., SARTORI A., Immunomodulatory Activities With B-Glucan Derived From *Saccharomyces Cerevisiae*. *Physiol. Res.* 2005 ; 54:557-564
- 64-PRETUS H.A., ENSLEY H.E., MCNAMEE R.B., JONES E.L., BROWDER I.W., WILLIAMS D.L., Isolation, physicochemical characterization and preclinical efficacy evaluation of soluble scleroglucan. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991 ;257(1): 500-510.
- 65-RAPPLEYE C.A., EISSENBERG L.G., GOLDMAN W.E., *Histoplasma Capsulatum* α -(1-3)-Glucan Blocks Innate Immune Recognition By The β -Glucan Receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104: 1366-1370
- 66-RICE P.J., KELLEY J.L., KOGAN G., ENSLEY H.E., KALBFLEISCH J.H., BROWDER I.W., WILLIAMS D.L., Human monocyte scavenger receptors are pattern recognition receptors for (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans. *J. Leukoc Biol.* 2002; 72(1):140-6.
- 67-RIGGI S.R., DI LUZIO N.R., Identification of a reticuloendothelial stimulating agent in zymosan. *Amer.J. Physiol.* 1961; 200: 297-300
- 68-Ronald R. Marquardt http://www.crdi.ca/es/ev-30917-201-1-DO_TOPIC.html
- 69-ROUBROEKS J.P., SKJAK-BRÆK G., RYAN L., CHRISTENSEN B.E., Molecular weight dependency on the production of the TNF stimulated by fractions of rye (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)-beta-D-glucan. *Scand J Immunol.* 2000 ; 52(6):584-7.
- 70-SAKAI Y., AZUMA M., TAKADA Y., UMEYAMA T., KANEKO A., FUJITA T., IGARASHI K., OOSHIMA H., *Saccharomyces cerevisiae* mutant displaying beta-glucans on cell surface. *J Biosci Bioeng.* 2007 ;103(2):161-166.
- 71-SEALEY W.M., BARROWS F., HANG A., JOHANSEN K.A., OVERTURF K.E., LAPATRA S., HARDY R.W., Evaluation of the ability of barley varieties containing different amounts of β -glucan to alter growth, immune function, and disease resistance of rainbow

- trout oncorhynchus mykiss. Anim. F. Sci. and Technol. 2007; in press :1-14
- 72-SHAHINIÁN S, BUSSEY H., β -1,6-Glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Microbiol. 2000; 35(3):477-89.
- 73-SURAM S., BROWN G.D., GHOSH M., GORDON S., LOPER R., TAYLOR P.R., Regulation of cytosolic phospholipase A2 activation and cyclooxygenase 2 expression in macrophages by the beta-glucan receptor. J Biol Chem. 2006;281:5506-14.
- 74-SURENJAV U., ZHANG L., XU X., ZHANG X., ZENG F., Effects of molecular structure on antitumor activities of (1/3)- β -D-glucans from different *Lentinus Edodes*. Carbohydr. Polym. 2006; 63: 97–104
- 75-TAYLOR P.R., BROWN G.D., REID D.M., WILLMENT J.A., MARTÍNEZ-POMARES L., GORDON S., The β -glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. J Immunol 2002;169:3876-82
- 76-TSUKADA C., YOKOYAMA H., MIYAJI C., ISHIMOTO Y., KAWAMURA H., ABO T., Immunopotential of intraepithelial lymphocytes in the intestine by oral administrations of beta-glucan. Cell Immunol. 2003; 221(1):1-5
- 77-TZIANABOS A.O., Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. Clin Microbiol Rev. 2000;13(4):523-33.
- 78-XIAO Z.,TRINCADO C.A., MURTAUGH M.P., β -glucan enhancement of T cell IFN γ response in swine. Vet Immunol Immunopathol. 2004; 102(3):315-20.
- 79-VESTWEBER D., BLANKS J.E., Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. Physiol Rev. 1999; 79(1): 181-213.
- 80-VETVÍCKA V., THORNTON B.P., ROSS G.D., Soluble beta-glucan polysaccharide binding to the lectin site of neutrophil or natural killer

- cell complement receptor type 3 (CD11b/CD18) generates a primed state of the receptor capable of mediating cytotoxicity of iC3b-opsonized target cells. *J Clin Invest.* 1996; 98(1):50-61.
- 81-VETVÍČKA V., VETVÍČKOVÁ J., FRANK J., YVĚN J.C., Enhancing Effects Of New Biological Response Modifier B-(1-3) Glucan Sulfate PS3 On Immune Reactions. *Biomed Pharmacother.* 2007; in press :1-6
- 82-VETVÍČKA V., YVĚN J.C., Effects of marine β -1,3 glucan on immune reactions. *Int Immunopharmacol.* 2004; 4:721-730
- 83-VETVÍČKA V., β -glucans as immunomodulators. *JANA.* 2001; 3(4): 31-34
- 84-WILLIAMS D.L., HA T., LI C., KALBFLEISCH J.H., LAFFAN J.J., FERGUSON D.A., Inhibiting early activation of tissue nuclear factor-kappa B and nuclear factor interleukin 6 with (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucan increases long-term survival in polymicrobial sepsis. *Surgery.* 1999; 126(1): 54-65
- 85-WILLIAMS D.L., Overview of (1-3)- β -D-glucan Immunobiology. *Media.of.Inflam.* 1997; 6:247-250
- 86-WILLIAMS D.L., MUELLER A., BROWDER W., Glucan-based macrophage stimulators: A review of their anti-infective potential. *Clin. Immunother.* 1996; 5:392-399.
- 87-YAN J., VETVÍČKA V., XIA Y., HANÍKYROVÁ M., MAYADAS T.N., ROSS G.D., Critical role of Kupffer cell CR3 (CD11b/CD18) in the clearance of IgM-opsonized erythrocytes of soluble β -glucan. *Immunopharmacol.* 2000; 46: 39-54
- 88-YOON T.J., KIM T.J., LEE H., SHIN K.S., YUN Y.P., MOON W.K., KIM D.W., LEE K.H., Anti-tumor metastatic activity of beta-glucan purified from mutated *Saccharomyces cerevisiae*. *Int Immunopharmacol.* 2008; 8(1):36-42.
- 89-YOUNG SH, ROBINSON VA, BARGER M, FRAZER DG, CASTRANOVA V, JACOBS RR., Partially opened triple helix is the

biologically active conformation of 1 \rightarrow 3-beta-glucans that induces pulmonary inflammation in rats. *J Toxicol Environ Health A*. 2003; 66(6): 551-63.

90-YOUNG S-H., YE J., FRAZER D.G., SHI X., CASTRANOVA V.,
Molecular mechanism of tumor necrosis factor-alpha production in 1-
 \rightarrow 3-beta-glucan (zymosan)-activated macrophages. *J Biol Chem*.
2001; 276(23):20781-7

91-ZEKOVIC B. D., VRVIC M. M., JAKOVLJEVIC D., MORAN C.A.,
Natural and Modified (1-3)- β -D-Glucans in Health Promotion and
Disease Alleviation. *Crit. Rev. Biotechnol*. 2005; 25:205-230

92-ZIMMERMAN J.W., LINDERMUTH J., FISH P.A., PALACE G.P.,
STEVENSON T.T., DEMONG D.E., A novel carbohydrate-
glycosphingolipid interaction between a β -(1-3)-glucan
immunomodulator, PGG-glucan, and lactosylceramide of human
leukocytes. *J Biol Chem*. 1998; 273:22014-22020.

9.ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Uşak'da doğdum. 1991 yılında Ankara Bahçelievler Ortaokulunda orta öğretimimi, 1994 yılında Cumhuriyet Lisesinde lise eğitimimi tamamladım. 1994'de Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesini kazanarak lisans eğitimime başladım. 2001 yılında Orta Doğu Teknik Üniversitesinde Yabancı Diller Bölümünde hazırlık sınıfına devam ettim. 2002 yılında Gazi Üniversitesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimime başladım. Ve aynı yıl Başkent Üniversitesinde Sağlık Spor Kültür Dairesi Başkanlığında sözleşmeli doktor olarak çalışmaya başladım. 2002 Ağustos ayında Gündül Devlet Hastanesi acil servisinde nöbetçi doktor olarak çalışmaya başladım. 2005 ağustos ayından itibaren Ankara Refik Saydam Hıfzısıhha enstitüsünde Ulusal Zehir Merkezinde nöbetçi doktor olarak atandım. 2007 senesinde " Beta Glukanın İmmünomodülatör Etkinliğinin Hayvan Modelinde İncelenmesi" konulu tez çalışmamı tamamladım. Halen Refik Saydam Hıfzısıhha enstitüsünde Ulusal Zehir Merkezinde nöbetçi doktor olarak çalışmaktayım. İyi derecede ingilizce bilmekteyim.