



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENDRİTİK HÜCRELERİN
MUKOZAL TOLERANS ÜZERİNDEKİ ROLÜ**

AYŞEGÜL YILDIZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ALLERJİ VE İMMÜNOLOJİ BİLİM DALI

DANIŞMAN
DOÇ.DR. TUNÇ AKKOÇ

İSTANBUL- 2009



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENDRİTİK HÜCRELERİN
MUKOZAL TOLERANS ÜZERİNDEKİ ROLÜ**

AYŞEGÜL YILDIZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ALLERJİ VE İMMÜNOLOJİ BİLİM DALI

DANIŞMAN
DOÇ.DR. TUNÇ AKKOÇ

İSTANBUL- 2009

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Programın seviyesi : Yüksek Lisans (x) Doktora ()

Anabilim Dalı : Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları

Tez Sahibi : Ayşegül Yıldız

Tez Başlığı : Dendritik Hücrelerin Mukozal Tolerans Üzerindeki Etkisi

Sınav Yeri : Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi

Sınav Tarihi : 09.07.2009

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)	Kurumu	İmza
Doç. Dr. Tunç Akkoç	Marmara Üniversitesi	
Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)		
Prof. Dr. Işıl Barlan	Marmara Üniversitesi	
Yrd. Doç. Dr. Gaye Erten	İstanbul Üniversitesi	

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nimet GENÇOĞLU

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

Önsöz.....	i
Tablolar	ii
Şekiller	iii
Kısaltmalar	iv
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. İmmün Sistem ve Hücreleri	
4.1.1. B ve T hücreleri	6
4.1.2. Doğal Öldürücü Hücreler	7
4.1.3. Makrofaj	7
4.1.4. Nötrofil	8
4.1.5. Eozinofil	8
4.1.6. Bazofil	9
4.1.7. Mast Hücresi	9
4.1.8. Antijen Sunucu Hücreler	10
4.1.9.T Hücresine Antijen Sunumu	13
4.2. İMMÜN SİSTEMDE TOLERANS	
4.2.1. T Hücre Aktivasyonu	14
4.2.2. T hücre Yanıtının Fazları	15
4.2.2.1. Klonal Genişleme.....	16
4.2.2.2. Naif T Hücrelerinin Efektör Hücelere Farklılaşması.....	16
4.2.3. T hücre Aktivasyonu ve CD28 Fonksiyonu	19
4.2.4. T Hücre Anerjisinin Neden Olduğu Durumlar	19
4.3.REGÜLATÖR HÜCRELER	20
4.3.1. T Regülatör Hücreler.....	21
4.3.2.CD4 ⁺ CD25 ⁺ Regülatör T Hücresi	21
4.3.3. TH3 Hücreleri	22

4.3.4. Tr1 Hücreleri	23
4.3.5. Diğer Regülatör Hücreler	25
4.4. ALLERJİK ASTİM İMMÜNOPATOGENEZİ.....	26
4.4.1. Havayollarında Yeniden Yapılanmada Rol Alan Sitokinler	27
4.4.2 .Th1/Th2 Dengesi.....	30
4.4.3. Hijyen Hipotezi	31
4.5. İMMÜNOTERAPİ.....	33
4.5.1.Subkutan İmmunoterapi	34
4.5.2.Sublingual İmmunoterapi.....	35
4.6. Luminex Yöntemi	36
5. GEREÇ ve YÖNTEM.....	38
5.1. Çalışmaya alınacak hastaların çalışmaya alınma kriterleri ve takibi	38
5.2. Allerji Deri Testi Uygulaması.....	39
5.3. Çalışma Grupları	40
5.4. Çalışma Protokolü.....	41
5.5. Kandan PKMH İzolasyonu	42
5.6. İzole edilen PKMH' den ASH ve CD4 ⁺ T Lenfosit İzolasyonu	44
5.7. Hücre Kültürü	45
5.8. Hücre Kültür Süpernatantlarında IL-10 Sitokin Düzeyinin Luminex Sistem Yöntemi İle Ölçülmesi.....	47
5.9. İstatistik Değerlendirme	49
6. BULGULAR	50
6.1. Hastaların Klinik Değerleri	51
6.2. Allerji Deri Testi Sonuçları	52
6.3. PKMH İzolasyonu Sonuçları.....	53

6.4. ASH ve CD4 ⁺ T Hücre İzolasyon Sonuçları	54
6.5. ASH ve CD4 ⁺ T hücre Saflığı	55
6.6. Kültür Süpernatantlarında Sitokin Seviyeleri	56
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	61
8. REFERANSLAR	67
9. ÖZGEÇMİŞ	84

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'ndaki yüksek lisans eğitimim süresince; tezimin planlanmasından yazılımına kadar her aşamasında desteklerini her an yanımda hissettiğim; özverili ve sevecen bir üslupla bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan değerli hocam Prof. Dr. Işıl Barlan

Engin bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak, her zaman bilimsel düşünceyi geliştirici, yapıcı eleştirilerinden ve deneyimlerinden yararlandığım, tezimin her aşamasında hiçbir konuda yardımlarını esirgemeyen ve her türlü konuda bana destek olan saygı değer hocam Doç. Dr. Tunç Akkoç'a,

Sorgulayıcı, yaratıcı düşünce tarzı, çalışkanlığı ve azmi ile daima kendilerini örnek aldığım tezimin yapılandırılmasının her aşamasında yardımlarını ve sonsuz desteklerini benden esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Nerin Bahçecilere,

Eğitimim boyunca desteklerini ve bilgisini hiçbir zaman esirgemeyen Doç. Dr. Cevdet Özdemir'e,

Tezimin klinik çalışmalarında ve yazımında her türlü desteği ve bilgiyi esirgemeyen yakınlığı ve sıcak kanlılığı ile her zaman pozitif düşündüren Dr. Aarif Eifan,

Yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda bilgisini ve tecrübesini benden esirgemeyen birlikte çalışmaktan büyük zevk aldığım ve kendisinden her zaman bir şeyler öğrendiğim çok sevdiğim Dr. Sevgi Keleş'e,

Deneyisel ve laboratuvar çalışmalarım sırasında birlikte çalışmaktan büyük zevk duyduğum, yazmakla bitmeyecek kadar pek çok anımı paylaştığım, sevecenlikleri ile her zaman yanımda olan, birlikte çalışmaktan dolayı mutluluk duyduğum arkadaşlarım Ayşegül İzgi ve Ayzer Tevetoglu'na,

Ve bana eğitimim süresince her türlü fedakarlıkta bulunan çok sevdiğim canım aileme

Teşekkür ederim.

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 5.1: Demografik Data.....	40
Tablo5.2: Çalışma Protokolü.....	42
Tablo5.3: PKMH kültür şeması	46
Tablo5.4: ASH ve CD4 ⁺ T hücre kültürleri	47
Tablo 6.1: Tedavi sürecine göre solunum testi değerleri	51
Tablo 6.2: Hastaların Allerji Deri Testi Sonuçları	52
Tablo 6.3: Hastalardan İzole Edilen PKMH Sayıları	53
Tablo 6.4: Hastalardan İzole Edilen ASH ve CD4 ⁺ T Hücre Sayıları	54
Tablo 6.6: PKMH kültüründe 0. ay ve 8. ayda ölçülen IL-5 sitokin değerleri (pg/ml).....	57
Tablo 6.7: PKMH kültüründe 0. ay ve 8. ayda ölçülen IL-10 sitokin değerleri (pg/ml).....	57
Tablo 6.8: PKMH kültüründe 0. ay ve 8. ayda ölçülen IL-13 sitokin değerleri (pg/ml).....	58
Tablo 6.9: PKMH kültüründe 0. ay ve 8. ayda ölçülen IFN- γ sitokin değerleri (pg/ml)	58
Tablo 6.10: SLİT ve FARMAKOTERAPİ grupları arasında yapılan çapraz kültürde 8. ay sitokin değerleri (pg/ml)	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 6.1: ASH FACS analiz sonucu	55
Şekil 6.2: CD4 FACS analiz sonucu.....	56
Şekil 6.3: Hücre Kültür Süpernatantlarında IL-10 Sitokin Düzeyinin Sütun Grafiği.....	60

RESİM DİZİNİ

Resim 5.2: Lüminex Cihazı	48
---------------------------------	----

KISALTMALAR

ASH	: Antijen Sunucu Hücre
BAL	: Bronkoalveolar lavaj
DH	: Dendritik hücre
DF	: Dermatophagoides Farinae
DP	: Dermatophagoides Pteronyssinus
GM-CSF	: Granulosit makrofaj-koloni stimule edici faktör
ICAM-I	: Hücre içi yapışma molekülü-1
IFN	: Interferon
mDH	: Myleoid dendritik hücre
MHC	: Major Histokompatibilite Kompleks
NK	: Doğal Öldürücü Hücreler
PAMP	: Patojenle ilgili moleküler
PKMH	: Periferik Kan Mononükleer Hücre
PAF	: Platalet Activity Factor
pDH	: Plasmoid dendritik hücre
PRR	: Patern tanıma reseptör
SCIT	: Subkutan İmmunoterapi
SIT	: Spesifik immünoterapi
SLIT	: Sublingual immünoterapi
SNP	: Single nucleotide polymorphism
THR	: T Hücre reseptörü
Th1	: Tip 1 yardımcı T lenfosit
Th2	: Tip 2 yardımcı T lenfosit
Th3	: Tip 3 yardımcı T lenfosit
TGF-beta	: Tumor growth factor-beta
TGF-alfa	: Tumor growth factor-alfa
TLR	: Toll benzeri Reseptör

Treg : T regölatör
VCAM : Vasköler hñcre adezyon moleköl
VLA-4 : Very Late Antijen 4
VCAM-1 : Vasköler hñcre adezyon moleköl-1

1- ÖZET

Allerjik astım gelişmiş ülkelerde popülasyonun % 25' den fazlasını etkileyen kronik bir havayolu hastalığıdır. İlaç tedavisi ve allerjenle temastan kaçınma allerjik hastalıkların kontrolünde etkili olmaktadır. Allerjen spesifik immünoterapi ise sadece allerjik hastalıkların semptomlarını tedavi etmekle kalmaz aynı zamanda hastalığın altında yatan sebeplerini de tedavi edebilir. Sublingual immünoterapinin (SLİT) allerjik hastaların tedavisinde efektif olduğu gösterilmiştir. SLİT'in tam olarak mekanizması hala bilinmemektedir, fakat oral mukozada bulunan antijen sunan hücrelerin (ASH) T regülatör hücrelerin IL-10 üretimini arttırarak allerjik immün cevabı baskılamalarına neden olduğu bilinmektedir.

Bu çalışmaya ev tozuna duyarlı olan 4-10 yaş arası 10 astımlı hasta alındı. Çalışmaya alınan hastalar iki gruba ayrıldı. İlk gruba tedavi için sublingual immünoterapi ve farmakoterapi verildi (n=5). İkinci gruba tedavi için farmakoterapi verildi (n=5). Çalışmanın başında ve 8 ay sonra her iki gruptaki hastalardan PKMH izolasyonu yapıldı. İzole edilen PBMC' ler Derp1, Betv1, PHA ile kültüre edildi ve kültürün 5. gününde alınan süpernatantlarında IL-5, IL-10, IL-13 ve IFN- γ sitokinleri analiz edildi.

Çalışmamızın diğer bölümünde her iki gruptaki hastalardan ASH ve CD4⁺ T hücreleri magnetik ayırım ile ayrıldı. Ayrılan hücreler Derp1 antijeni ile çapraz kültür yapıldı. Çapraz kültürün 5. gününde alınan süpernatantlarda IL-5, IL-10, IL-13 ve IFN- γ sitokinleri analiz edildi.

Analizler sonucunda SLİT ve farmakoterapi tedavisi alan hastalardan izole edilen ASH ile sadece farmakoterapi alan hastalardan izole edilen CD4⁺ T hücrelerinin Derp 1 ile yapılan kültüründe IL-10 seviyesi yüksek bulunmuştur.

Sonuç olarak; SLİT grubundan izole edilen ASH in vitro olarak allerjen ile uyarıldığında kontrol grubundan izole edilen CD4⁺ T hücresinden IL-10 salınımını tetiklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Astım, ASH, CD4⁺ T hücresi, sitokin, spesifik immünoterapi.

2- SUMMARY

THE ROLE OF DENDRITIC CELL IN MUCOSAL IMMUNOTHERAPY

The most common form of allergy IgE mediated hypersensitivity affects more than 25% of the population in industrialized countries. Asthma is currently defined as a chronic inflammatory disease in which allergens are often implicated as causative and triggering factors of respiratory attacks.

T cell and antigen presenting cell are functionary to asthma mechanisms. Although we have some ideas about sublingual immunotherapy, we don't have any idea of sublingual immunotherapy effect mechanism. In this study, APC's effects to the CD4⁺ T cell which the children had treatment SLIT that we evaluated the effect that SLIT on the APC and/or CD4⁺ T cell.

In this study ten patients (age range 4-10 years) suffering from mild to moderate asthma with single sensitization to mite allergen were enrolled. Patients divided in two groups. First group had given sublingual immunotherapy and pharmacotherapy for treatment (n=5). Second group had given pharmacotherapy for treatment (n=5). At the beginning of and 8 months later PBMC were isolated and cultured with Derp1, Betv1, PHA and supernatants were collected at the fifth day and IL-5, IL-10, IL-13 and IFN- γ cytokines level analyzed. In a separate experiment APC and CD4⁺ T cell were separated with magnetic separation from both two groups and cross culture were performed with Derp1 stimulation Supernatants were collected at the fifth day IL-5, IL-10, IL-13 and IFN- γ cytokines level analyzed.

We concluded that antigen delivery via sublingual route stimulates tolerogenic antigen presents cell, which stimulates IL-10 secretion in untreated CD4⁺ T cells.

Key words: Asthma, APC, CD4⁺ T cell, cytokines, specific immunotherapy.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Astım; havayollarında çeşitli çevresel allerjenlere karşı aşırı hassasiyet sonucunda ortaya çıkan kronik obstrüktif akciğer hastalığı olarak tanımlanmaktadır (1,2). Kronik astımı olan hastalarda hava yolu inflamasyonu ve aşırı duyarlılığı hastalığın en belirgin özelliği olup (3,4), çoğunlukla serum IgE düzeylerinde artışla seyrettiği görülür (5). Eosinofiller ve mast hücrelerinin sayılarında artış olmakta ve humoral bağışıklık yanıtından sorumlu olan Th2 tip sitokinlerden IL-4, IL-5 ve IL-13 düzeylerinde artış gözlenmektedir. Buna karşın hücresel immün yanıtta rol oynayan IFN-gama gibi Th1 tip sitokinler allerjik inflamasyonu baskılamakta ve oluşabilecek havayolu aşırı duyarlılığını da engelleyebilmektedir (6). Bu nedenle immün mekanizmayı Th2 den uzaklaştırarak Th1 yönüne doğru kaydırmak atopik hastalıkların tedavisinde önemli bir yaklaşım haline gelmiştir (7).

Saman nezlesi, atopik dermatit, besin allerjisi ve astım gibi IgE aracılıklı allerjik hipersensitivite hastalıkları birçok gelişmiş ülkede popülasyonun %25'den fazlasını etkilemektedir (8). Allerjik cevap çevredeki allerjenlere karşı oluşur ve klinik özellikleri arasında allerjik astım yer almaktadır. Astım genellikle allerjenlerin neden olduğu ve solunum güçlüğünün tetiklendiği kronik inflamatuvar bir hastalıktır (9).

Astım ve allerjik hastalıklara neden olan faktörler ve efektör hücreler iyi karakterize edilmiş olmalarına rağmen bu hastalıkların gelişimine karşı koruyan spesifik immünolojik mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılamamıştır (10).

Astım, başta T hücreleri olmak üzere eosinofiller, antijen sunucu hücreler (ASH) gibi birçok hücrenin rol aldığı, havayollarının kronik yangısal bir hastalığıdır.

Günümüzde antijen sunma kapasitesine sahip ASH'lerin astımın patofizyolojisinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (11). Farelerde yapılan deneysel çalışmalarda T hücre tiplerinin ve ASH'lerin astımın gelişmesinde önem taşıdığı ileri sürülmektedir (12).

T hücre cevabının düzenlenmesinde antijen sunucu hücrelerin önemli görevleri vardır. ASH'lerin farklı tipleri T hücrelerine antijen sunarak T hücrelerinin Th1 veya Th2 yönünde farklılaşmasına neden olurlar (13).

Günümüzde astımın tedavisinde kullanılan ilaçlar sadece semptomları kontrol altına almaktadır (14). Yapılan çalışmalar göstermiştir ki allerjene özgü uygulanan immünoterapi, hastalığın seyrini değiştirebilen ve yeni duyarlılıkların oluşmasını önleyebilen bir tedavi seçeneğidir (8). Spesifik immünoterapi (SIT); ASH, T ve B hücre cevabını etkilemek ve allerjik cevapta yer alan efektör hücrelerin fonksiyonlarını ve sayılarını düzenlemektir. SIT uygulamasını takiben allerjen duyarlılaşma bölgelerinde eosinofil ve Th2 hücreleri sayılarında azalma, deride bulunan mast hücrelerinde, mukozada eosinofil ve bazofil sayısında mevsimsel artışlarında azalma gözlenmiştir. Bazofillerden salınan IgE aracılıklı histamin salımında da düşüş saptanmıştır (17). Kişinin duyarlı olduğu allerjeni artan dozlarda uygulayarak bu allerjene tolerans geliştirmeyi amaçlayan SIT'ın günümüzde en sık cilt altına uygulanan subkutan immünoterapi (SCIT) ve dil altına uygulanan sublingual immünoterapi (SLIT) formu kullanılmaktadır (18). Her iki immünoterapinin immünolojik etkinlik mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Uygulanan immünoterapi yöntemlerinin etki mekanizmalarında aynı etkiler gözlenmekle birlikte farklılıkları da mevcuttur. Günümüzde en çok uygulanan immünoterapi yöntemlerinden SCIT'de IL-10 sitokininde ve regülatuar T hücrelerinin sayısında artış gözlenirken; diğer bir immünoterapi yöntemi olan SLIT'de IL-10 sitokininde artış ve mukozal tolerans gelişimi gözlenmektedir (19).

İmmünoterapi yöntemlerindeki bu farklılığın nedenleri üstüne yapılan çalışmalarda her iki yöntemin etki mekanizması hakkında bilgiye sahip olunmasına rağmen hala bu yöntemlerin mekanizmalarında görevli hücrelerden olan ASH ve T hücreler hakkında yeterli bilgiye sahip değiliz.

SIT uygulamalarının klinik etkileri yapılan çalışmalar doğrultusunda karşılaştırıldığında klinik anlamda daha güvenilir ve efektif uygulamanın SLIT olduğu belirtilmiştir (20). Tüm bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda SIT uygulamalarından SLIT'in etki mekanizmasındaki önemli kriterlerden olan ASH ve T hücreleri üzerindeki etkisi araştırmaya açık konulardan bir tanesidir.

Bu çalışmamızda, Marmara Üniversitesi Çocuk Allerji ve İmmünoloji Bilim Dalı tarafından takip edilmekte olan ev tozu akarına (HDM) duyarlı astımlı çocuklarda tedavi amacı ile sadece farmakoterapi alan hastalar ile farmakoterapi tedavisi ile

birlikte sublingual immünoterapinin (SLİT) uygulandığı çocuklardan izole edilen antijen sunucu hücreler ve CD4⁺ T hücrelerinin ev tozu akarı ile çapraz kültürlerini yaparak SLİT'in etki mekanizmasının ASH ve/veya CD4⁺ T hücresi üzerindeki etkisini araştırmayı amaçladık.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Astım; havayollarında çeşitli çevresel allerjenlere karşı aşırı hassasiyet sonucunda ortaya çıkan kronik obstrüktif akciğer hastalığı olarak tanımlanmaktadır (1,2). Kronik astımı olan hastalarda hava yolu inflamasyonu ve aşırı duyarlılığı hastalığın en belirgin özelliği olup (3,4), çoğunlukla serum IgE düzeylerinde artışla seyrettiği görülür (5). Eosinofiller ve mast hücrelerinin sayılarında artış olmakta ve humoral bağışıklık yanıtından sorumlu olan Th2 tip sitokinlerden IL-4, IL-5 ve IL-13 düzeylerinde artış gözlenmektedir. Buna karşın hücrel immün yanıtta rol oynayan IFN-gama gibi Th1 tip sitokinler allerjik inflamasyonu baskılamakta ve oluşabilecek havayolu aşırı duyarlılığını da engelleyebilmektedir (6). Bu nedenle immün mekanizmayı Th2 den uzaklaştırarak Th1 yönüne doğru kaydırmak atopik hastalıkların tedavisinde önemli bir yaklaşım haline gelmiştir (7).

Saman nezlesi, atopik dermatit, besin allerjisi ve astım gibi IgE aracılıklı allerjik hipersensitivite hastalıkları birçok gelişmiş ülkede popülasyonun %25'den fazlasını etkilemektedir (8). Allerjik cevap çevredeki allerjenlere karşı oluşur ve klinik özellikleri arasında allerjik astım yer almaktadır. Astım genellikle allerjenlerin neden olduğu ve solunum güçlüğünün tetiklendiği kronik inflamatuvar bir hastalıktır (9).

Astım ve allerjik hastalıklara neden olan faktörler ve efektör hücreler iyi karakterize edilmiş olmalarına rağmen bu hastalıkların gelişimine karşı koruyan spesifik immünolojik mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılamamıştır (10).

Astım, başta T hücreleri olmak üzere eosinofiller, antijen sunucu hücreler (ASH) gibi birçok hücrenin rol aldığı, havayollarının kronik yangısal bir hastalığıdır.

Günümüzde antijen sunma kapasitesine sahip ASH'lerin astımın patofizyolojisinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (11). Farelerde yapılan deneysel çalışmalarda T hücre tiplerinin ve ASH'lerin astımın gelişmesinde önem taşıdığı ileri sürülmektedir (12).

T hücre cevabının düzenlenmesinde antijen sunucu hücrelerin önemli görevleri vardır. ASH'lerin farklı tipleri T hücrelerine antijen sunarak T hücrelerinin Th1 veya Th2 yönünde farklılaşmasına neden olurlar (13).

Günümüzde astımın tedavisinde kullanılan ilaçlar sadece semptomları kontrol altına almaktadır (14). Yapılan çalışmalar göstermiştir ki allerjene özgü uygulanan immünoterapi, hastalığın seyrini değiştirebilen ve yeni duyarlılıkların oluşmasını önleyebilen bir tedavi seçeneğidir (8). Spesifik immünoterapi (SIT); ASH, T ve B hücre cevabını etkilemek ve allerjik cevapta yer alan efektör hücrelerin fonksiyonlarını ve sayılarını düzenlemektir. SIT uygulamasını takiben allerjen duyarlılaşma bölgelerinde eosinofil ve Th2 hücreleri sayılarında azalma, deride bulunan mast hücrelerinde, mukozada eosinofil ve bazofil sayısında mevsimsel artışlarında azalma gözlenmiştir. Bazofillerden salınan IgE aracılıklı histamin salımında da düşüş saptanmıştır (17). Kişinin duyarlı olduğu allerjeni artan dozlarda uygulayarak bu allerjene tolerans geliştirmeyi amaçlayan SIT'ın günümüzde en sık cilt altına uygulanan subkutan immünoterapi (SCIT) ve dil altına uygulanan sublingual immünoterapi (SLIT) formu kullanılmaktadır (18). Her iki immünoterapinin immünolojik etkinlik mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Uygulanan immünoterapi yöntemlerinin etki mekanizmalarında aynı etkiler gözlenmekle birlikte farklılıkları da mevcuttur. Günümüzde en çok uygulanan immünoterapi yöntemlerinden SCIT'de IL-10 sitokininde ve regülatuar T hücrelerinin sayısında artış gözlenirken; diğer bir immünoterapi yöntemi olan SLIT'de IL-10 sitokininde artış ve mukozal tolerans gelişimi gözlenmektedir (19).

İmmünoterapi yöntemlerindeki bu farklılığın nedenleri üstüne yapılan çalışmalarda her iki yöntemin etki mekanizması hakkında bilgiye sahip olunmasına rağmen hala bu yöntemlerin mekanizmalarında görevli hücrelerden olan ASH ve T hücreler hakkında yeterli bilgiye sahip değiliz.

SIT uygulamalarının klinik etkileri yapılan çalışmalar doğrultusunda karşılaştırıldığında klinik anlamda daha güvenilir ve efektif uygulamanın SLIT olduğu belirtilmiştir (20). Tüm bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda SIT uygulamalarından SLIT'in etki mekanizmasındaki önemli kriterlerden olan ASH ve T hücreleri üzerindeki etkisi araştırmaya açık konulardan bir tanesidir.

Bu çalışmamızda, Marmara Üniversitesi Çocuk Allerji ve İmmünoloji Bilim Dalı tarafından takip edilmekte olan ev tozu akarına (HDM) duyarlı astımlı çocuklarda tedavi amacı ile sadece farmakoterapi alan hastalar ile farmakoterapi tedavisi ile

birlikte sublingual immünoterapinin (SL T) uygulandığı çocuklardan izole edilen antijen sunucu hücreler ve CD4⁺ T hücrelerinin ev tozu akar  ile çapraz kültürlerini yaparak SL T'in etki mekanizmasının ASH ve/veya CD4⁺ T h creti üzerindeki etkisini araştırmayı amaçladık.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. İMMÜN SİSTEM ve HÜCRELERİ

İmmünite yabancı organizmalara özellikle enfeksiyon hastalıklarına karşı direnç olarak tanımlanmaktadır. Enfeksiyonlara karşı savunmayı sağlayan hücreler, dokular ve moleküllerin toplamına immün sistem denir. Bu hücrelerin ve moleküllerin mikroplara karşı düzenli olarak verdikleri tepkiye immün yanıt denir.

İmmün sistemin mikroplara veya diğer enfeksiyona neden olmayan organizmalara karşı verdikleri hızlı ve tüm organizmalara karşı verilen aynı cevaba doğal bağışıklık denir. Doğal bağışıklık elemanları epitel bariyer, fagositik immün sistem hücreleri, immün sistemi düzenleme görevine sahip özel proteinlerdir (21).

Enfeksiyon ajanlarına, yabancı antijen ve mikroplara karşı verilen cevaba edinsel immünite denir. Edinsel immünite dokuları istila eden mikroplara karşı harekete geçen bir tip konak savunmasıdır. Bu nedenle istilacı mikroplara karşı uyarlanabilmektedir ve özgüllük taşımaktadır. Edinsel immünitinin elemanları ise antikor adı verilen özel savunma görevli proteinler, lenfosit adı verilen savunma görevli hücreler ve epitel bariyerdir. Edinsel immünitinin hafıza ve özgüllük özellikleri vardır. Doğal ve edinsel immünitinin cevabında görevli hücelere lökosit adı verilir. Lökositler kemik iliğinde üretilerek fonksiyonel hale geleceği dokulara göç ederler. İmmün sistemin öncelikli hücreleri lenfositler, antijen sunucu hücreler ve efektör hücrelerdir. Lenfositler yüzeylerinde taşıdıkları özel moleküller ile tanıma ve yabancı antijenlere karşı cevap oluşturmakla görevlidirler (22).

4.1.1 B ve T HÜCRELERİ

Lenfositler morfolojileri ile birbirlerinden ayırt edilebilirler. Lenfositlerden en önemli iki tanesi B ve T lenfositleridir. B lenfositleri hücre dışı antijenleri tanırlar ve antikor üretebilen hücrelere farklılaşabilirler. Bu fonksiyonları ile humoral immünitede rol almaktadırlar. B hücreleri yüzeylerinde antijenleri tanıyan ve hücre aktivasyon işlemlerini başlatan reseptörler olarak görev alan antikorlar bulundurulur. T lenfositleri hücre içi antijenleri tanıır. Mikropları ve enfekte olmuş hücreleri yok ederek hücrel immünitede rol alır. T hücreleri antikor üretmezler, fakat yüzeylerinde T hücre reseptörleri taşırlar (22). T hücrelerinin reseptörleri yalnızca peptit yapılı antijenleri tanırlar. Bu peptit yapılı antijenleri major histokompatibilite antijenleri (MHC) adı verilen özel peptit sunan moleküllere bağılı durumdadırlar. T hücreleri yüzeyinde taşıdıkları CD4 ve CD8 glikoprotein yüzey proteinleri ile iki ana gruba ayrılmaktadır. Yüzeyinde CD8 glikoprotein molekülünü eksprese eden T hücrelerine CD8⁺ T hücreleri denir. CD8⁺ T hücreleri sitotoksik özelliğe sahiptir ve sitotoksik T hücreleri adı verilir. CD8⁺ T hücreleri viruslerle veya diğeri hücre içi patojenlerle enfekte olmuş hücreleri öldürerek enfeksiyonun yayılmasını engellemiş olurlar. CD8⁺ T hücreleri MHC sınıf I ile bağılantılı olan hücreyi tanıyabilir. Yüzeyinde CD4 glikoprotein molekülünü taşıyan T hücreleri CD4⁺ T hücreleri olarak adlandırılır. CD4⁺ T hücreleri sitokin salgılayarak diğeri immün sistem hücrelerini aktive eder. CD4⁺ T hücreleri MHC sınıf II ile sunulan antijenlere cevap oluşturlar (23).

CD4⁺ T hücreleri kendilerini aktive eden efektör mekanizmalara ve sitokinlere bağılı olarak antijenlere karşı farklı cevap oluşturlar. CD4⁺ T hücrelerinin farklılaşmasına bağılı olarak iki farklı alt gruba ayrılmaktadır. CD4⁺ T hücrelerin alt grupları yardımcı T hücreleri 1 ve 2 (Th1\Th2) olarak bilinmektedir. CD4⁺ T hücrelerinin alt gruplarına ayrılmasında iki sitokin önemli göreve sahiptir. IL-12, CD4⁺ T hücrelerinden Th1 farklılaşmasını sağlarken, IL-4 Th2 farklılaşmasını sağlamaktadır. Bazı mikroplar makrofaj ve dendritik hücreler üzerinde bulunan Toll benzeri Reseptörlere (TLR) bağlanarak bu hücrelerden IL-12 salınımını sağlarlar. IL-12, antijen ile uyarılmış CD4⁺ T hücreleri üzerindeki reseptöre bağlanarak STAT-4 transkripsiyon faktörünü

aktive eder ve CD4⁺ T hücresi Th1 hücresi olarak farklılaşır. T-bet olarak bilinen transkripsiyon faktörü Th1 gelişiminde oldukça kritik bir role sahiptir. T-bet IFN- γ üretimini sağlar ve Th1 cevabın oluşumunu sağlar. Antijenle ile uyarılmış CD4⁺ T hücresinden Th2 hücresinin farklılaşmasında STAT 6 transkripsiyon faktörün aktive edilmesinde görevli IL-4 sitokini önemlidir. Başka bir transkripsiyon faktörü olan GATA-3 Th2 gelişiminde kritik bir role sahiptir. CD4⁺ T hücresinden farklılaşan Th1 ve Th2 hücreleri fenotipik olarak farklı olmamakla birlikte salgıladıkları sitokinler ile birbirlerinden ayırt edilmektedirler. IFN- γ Th1 sitokini olup Th1 farklılaşmasına öncülük eder ve Th2 proliferasyonunu engeller. Th1 hücresi tarafından üretilen IFN- γ hücre içi mikropların yok edilmesinde görevlidir. IL-4, IL-5 ve IL-13 Th2 hücreleri tarafından üretilir, Th2 farklılaşmasını sağlar ve Th1 aktivasyonunu engeller. Helmintik parazitlerin infeksiyonlarında ve allerjik reaksiyonlarında Th2 cevabın oluşmasından sorumlu sitokinlerdir (22).

4.1.2.DOĞAL ÖLDÜRÜCÜ HÜCRELER (NK)

Doğal immünitede rol alan diğer bir lenfosit çeşidi doğal öldürücü (NK) hücrelerdir. Bu hücreler kemik iliğinde üretilirler. T hücreleri ile aynı kökeni paylaşırlar, fakat gelişme yerleri T hücrelerinden farklıdır. NK hücrelerinin yüzey reseptörleri B ve T hücrelerinden farklı olup viral infeksiyonlara karşı koymakla görevli savunucu hücrelerdir. NK hücreleri vücuda giren patojenlerden çok patojenle enfekte olmuş hücrelere saldırırlar.

NK hücreleri her zaman sitotoksiktir ve sitoplazmalarında perforin ve granzim denilen geniş granüller bulundurlar. Bu granüller sayesinde enfekte olmuş hücreleri degrade ederler (24).

4.1.3. MAKROFAJ

Kemik iliğinden perifere çıkan ilk hücre tipi henüz değişimini tamamlamamış olan monositlerdir. Monositler 12-20 μ m çapında, fasülye biçiminde nükleusları olan hücrelerdir. Nükleusları tek lobludur. Monositler dokulara yerleşip maturasyonlarını

tamamladıktan sonra makrofaj adını alırlar. Makrofajlar tüm organlarda ve bağ dokularda bulunan hücrelerdir. Bulundukları yere göre farklı biçimde adlandırılabilirler.

Makrofajların fonksiyonları mikropları, antijenleri ve hasarlı dokuları fagosite etmek ve lizozomal enzimleriyle degrade etmektir. Ayrıca salgıladıkları enzimler, lipid kaynaklı mediatörler, patojenlerin öldürülmesinde ve infeksiyonun yayılmasını engellemede rol oynarlar. Yabancı organizmalara karşı verilen tehlike sinyallerine yanıt olarak immün sistemi aktive ederek doğal immün sistemin savunmasında rol alırlar. Bu fonksiyonları sırasında sitokin salınımı yaparlar. IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8, IL-12 sitokinlerin salınımlarından sorumludurlar (25).

4.1.4. NÖTROFİL

Kemik iliğinde oluşan fagositik özellikteki hücrelerdir. Makrofajlardan farklı olarak sağlıklı dokularda bulunmazlar, fakat doku hasarı gerçekleştiğinde hızlı bir şekilde bu alana göç edebilirler. Nötrofiller 3-5 loblu, 12-15 μ m çapında olabilirler. Yaşam süreleri 4-10 saat arasındadır. Bu süre içerisinde bir inflamasyon alanına gitmezlerse apoptoza uğrayarak makrofajlar tarafından fagosite edilirler. Nötrofiller makrofajlar gibi genel patojen tanıma mekanizmasında mikroorganizmaları fagosite ederek yer alırlar.

Nötrofiller ve makrofajlar patojenleri patojenle ilgili moleküler pattern (PAMP) lar aracılığıyla, pattern tanıma reseptörleri (PRR) ler ile tanırırlar.

Nötrofil, eozinofil ve bazofiller granülosit adı ile tanınırlar. Bu hücreler mikroorganizmaları öldürerek inflamasyonu arttırırlar. Bu hücrelerin nükleusları düzensiz olarak bölündüklerinden polimorfonükleer lökosit adını alırlar (26).

4.1.5. EOSİNOFİLLER

Allerjik iltihabi durumlarda görülen hücreleridir. Bu hücreler bronşial hiperreaktivitenin gelişmesinde başlıca rol oynarlar.

Astmatik iltihapta karakteristik olarak bulunan eosinofillerin havayollarına gelmesi ve bronşial hiperreaktiviteye yol açması sitokinlerin ve mediatörlerin bir dizi etkileşimi ile gerçekleşir. Havayollarında allerjenle karşılaşmış yardımcı T lenfositleri, mast hücreleri ve eosinofillerden salgılanan IL-5, kemik iliğindeki öncül eosinofillerin perifere çıkmasına ve yüzeylerinde Very Late Antijen 4 (VLA-4) adı verilen yapışma molekülünün gösterimine yol açar. Damar içinde dolaşan eosinofiller, endotel hücre yüzeyinde IL-4 indüksiyonu ile oluşan VCAM-1 (Vasküler hücre adezyon molekül-1) ve ICAM-I (Hücre içi yapışma molekülü-1) yapışarak damar dışına çıkar. Ortamda bulunan MIP-1, IL-5 ve PAF (Platelet Activity Factor)'ın kemoatraktan etkileri ile mukozaya yerleşirler. IL-5, GM-CSF, IL-3 ve PAF ise eozinofilleri aktive eder ve aynı zamanda apoptozu önleyerek yaşamlarını uzatırlar (27).

4.1.6. BAZOFİL

Diğer granülositlerde olduğu gibi kemik iliğinde oluşup burada gelişimini tamamlayan bazofiller kan dolaşımına katılırlar. Bazofiller total kan lökositlerin %1'den azını oluştururlar. Normal durumlarda bazofiller dokularda bulunmazlar. Bazofiller inflamasyon alanında genelde eosinofiller ile birlikte bulunurlar. Bazofiller çeşitli mediatörler salgırlar ve FcεRI eksprese ederler ve antijenin IgE'ye bağlanmasını tetiklerler. Bazofiller antijenin sunulduğu alanda toplanarak hipersensitivite reaksiyonlarının yapılandırılmasında rol alırlar (28).

4.1.7. MAST HÜCRESİ

Mast hücreleri kemik iliğinden köken almaktadırlar. Mast hücreleri normalde kan dolaşımında yer almazlar. Mast hücrelerinin öncülleri periferik dokuya olgunlaşmamış mast hücresi olarak göç ederler ve uyarım sonucunda olgunlaşırlar. Olgunlaşan mast hücreleri genellikle kan damarlarının yanında veya epitel altında bulunurlar.

Solunum epitelindeki yüzeysel yerleşimleri nedeniyle inhale edilen allerjenlere verilen erken yanıtta mast hücrelerinin major rol oynadığı düşünülmektedir. IgE molekülleri Fc kısımlarıyla mast hücre yüzeyinde kendilerine ait yüksek afiniteli tip I reseptörlere

bağlanır. Aynı allerjenin yeniden vücuda girmesi ile iki Fc reseptörü arasında köprü oluşturur. Köprüleşme sonucu protein kinazlar, enerji ve kalsiyum gerektiren bir sinyal iletimi başlar, ekzositoz ile mast hücresinden degranülasyon gerçekleşir. Ortama salınan mediatörler erken allerjik reaksiyondan sorumludur. Bu reaksiyon kendini bronkospazm, vazodilatasyon, ödem, mukus sekresyonunun artışı olarak gösterir (29).

4.1.8. ANTİJEN SUNAN HÜCRELER (ASH)

Mikropların vücuda giriş yerleri deri, gastrointestinal sistem ve solunum sistemi, epitel içine yerleşmiş ve antijenleri yakalayıp periferik lenfoid dokulara taşıyan özgül hücrelerle döşelidir. Bu hücrelerin başında antijen sunan hücreler gelmektedir. ASH'ler mikropları ve diğer antijenleri yakalamakta özelleşmişlerdir. ASH'ler yakaladıkları antijenleri lenfositlere sunarak oluşturduğu sinyal ile lenfositlerin proliferasyonunu ve farklılaşmasını sağlar. ASH'lerden dendritik hücrelerdir T hücre cevabında rol alan hücrelerdendir. Hücresel immün yanıt boyunca T hücrelerine antijen sunan makrofajlar olup, B hücreleri humoral immün yanıt boyunca yardımcı T hücrelerine antijen sunmaktadırlar. Özel bir ASH olan foliküler dendritik hücreler foliküler fazda humoral immün yanıt boyunca B hücrelerine antijen sunmaktadırlar (30).

CD4⁺ T hücreleri protein yapılı antijenlere karşı oluşturulan immün cevabı kontrol eder. CD4⁺ T hücreleri hücresel immünitede efektör hücre görevine sahiptir. Ayrıca B lenfositleri ile sitotoksik T hücrelerinin proliferasyonunu ve farklılaşmasında önemli göreve sahiptir. CD4⁺ T hücresinin immün cevabın oluşumunda etkin olabilmesi için MHC II molekülünü eksprese eden hücreler tarafından CD4⁺ T hücresine immün cevabın oluşturulacağı antijenin sunulması gerekir. MHC II molekülü ise immün sistem hücreleri arasında sadece ASH tarafından eksprese edilir.

ASH'lerin CD4⁺ T hücre aktivasyonu için üstlendiği iki önemli görevi vardır. Birinci görevi protein yapıdaki antijeni CD4⁺ T hücresinin tanıyabileceği peptit formuna dönüştürmektir. İkinci önemli görevi ise; bazı ASH'ler peptit MHC kompleksinin CD4⁺ T hücresi tarafından antijenin T hücre reseptörleri ile tanınmasının ötesinde tanıma fonksiyonunun kostimulatörler aracılığı ile gerçekleşmesini sağlarlar.

Literatürde ASH olarak dendritik hücre, makrofaj ve B hücresi bilinmektedir. Bu hücreler profesyonel ASH olarak tanımlanmakta olup içlerinden daha spesifik olarak antijen yakalama ve sunma fonksiyonuna dendritik hücreler sahiptir (31).

MAKROFAJ HÜCRESİ

Makrofaj aktif fagositoz özelliğine sahip bir ASH'dir. Bakteri ve parazit gibi fagositte ettiği enfeksiyona yol açan organizmaları sunmakla görevlidir. Makrofaj hücresel immün cevabın efektör fazında fagositte ettiği mikropları aktif $CD4^+$ T hücresine sunar. Makrofajlar düşük seviyede MHC II molekülü eksprese eder, fakat yüksek seviyede IFN- γ üretirler. Yüksek seviyede üretilen IFN- γ makrofajın $CD4^+$ T hücresine antijen sunumunu ve $CD4^+$ T hücresinin aktive olmasını sağlar (32).

B HÜCRESİ

B lenfositleri sahip olduğu antijen reseptörleri ile solubl protein antijenleri bağlayabilir. İmmün B hücreleri periferik lenfoid dokularda bulunan foliküllerde konuşlanmışlardır. Olgun immün B hücrelerinin ömürleri antijenle karşılaştıkları süre ile sınırlıdır. Antijen dolaşıma veya lenfoid dokulara girdiğinde B hücresi reseptörleri ile antijeni bağlar. Antijen bağlayan reseptörler bu aşamadan sonra iki kritik görev üstlenir. Antijen bağlamış olan reseptörlerin bir görevi B hücresinin aktive olabilmesi için biyokimyasal sinyaller oluşturmak, ikinci görevi ise eğer bağlanmış olan antijen protein yapıda ise antijeni B hücre yüzeyinde sunarak $CD4^+$ T hücresinin antijeni tanımasını sağlamaktır. Bu görev B hücresinin antijen sunma görevi olarak tanımlanmaktadır (33).

DENDRİTİK HÜCRE

Dendritik hücreler (DH) lenfoid organlarda, deri, gastrointestinal alanın epitelinde, parenkimal organlarda ve hava yollarının bazal membranının altında ve üstünde bulunmaktadır. Tüm dendritik hücreler kemik iliğinden köken almaktadırlar. İmmatür

(olgunlaşmamış) haldeki dendritik hücreler epitel doku, gastrointestinal ve havayollarındaki epitelde yerleşirler (34). Burada antijenle karşılaşan immatür dendritik hücreler yakaladıkları antijenleri lenf nodlarına transfer ederler ve bu yolculuk sırasında matüre (olgun) hale gelirler (35). Antijeni yakalayıp profesyonel ASH'lerin sahip olduğu kostimulatör ve kemokinleri eksprese ederek matürasyonlarını tamamlarlar. Matüre dendritik hücreler lenf nodlarının T hücre zonunda yer almaktadırlar. Matüre dendritik hücreler bu zonda CD4⁺ T hücrelerine antijen sunarak CD4⁺ T hücrelerini aktive ederler (36). DH'ler lenf nodunda T hücrelerin zengin olduğu alana göç ederler. Bu alanda DH'ler T hücreleri ile etkileşime girerler. Bu süreç sonunda T hücreleri aktive olur, bölünür ve farklılaşır (37). Ayrıca DH spesifik ekspresyonları ve salgıladıkları sitokinler ile T hücrelerinin polarizasyonunu etkiler (38). Antijen kısa immünolojik peptitler halinde MHC II kompleksine bağlanarak CD4⁺ T hücrelerine DH hücreler tarafından sunulur (39).

ASH'ler doğal immün cevabın düzenlenmesinde görev alırlar. Doğal immün yanıt non-spesifik patojenlerin PAMP yardımı ile patojenlerin ayrılmasıyla oluşur. Profesyonel ASH olan DH'ler PAMP ile tanınan antijeni CD4⁺ T hücrelerine sunarak T hücre cevabını oluşturur (40). T hücre subgruplarından Th2 cevabının yapılandırıldığı süreçte de DH'in rolü bulunmaktadır. Th2 sensitizasyonu sonrasında DH'ler T hücrelerine antijen sunarak hava yolu inflamasyonunu kontrol eder (41). Yapılan çalışmalarda allerjik hastaların periferik kanından izole edilen DH'ler Der p 1 (ev tozu allerjisi) ile inkübe edildiğinde CD86 kostimulatör ve PD-1 ekspresyonu ile IL-10 sekresyonunun arttığı gözlenirken, sağlıklı bireylerde CD80 kostimulatör ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir (42).

DH'ler miyeloid ve plasmoid olmak üzere iki farklı altgruba ayrılmaktadır. Myeloid DH (mDH) astmatik özellik gösteren antijenlere karşı Th2 sensitizasyonunun oluşmasına neden olur. mDH'ler bakteriyel ve viral enfeksiyonlara karşı Th1 cevabının oluşmasına neden olmaktadır. Plasmoid DH (pDH) Th1 cevabına neden olmazlar, Th2 sensitizasyonunu engeller ve tolerans oluşumunda görevlidirler. Yapılan çalışmalarda saptanan bulgulara göre pDH astmatik hastaların kanlarında sağlıklı bireylere kıyasla daha fazla oranda bulunmuştur. Bu sebeple pDH'lerin Th2 fenotipe sahip hücreler olduğu söylenmektedir.

mDH ve pDH T hücre cevabının oluşumunda görevli hücrelerdir (43). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda sadece DH alt gruplarının T hücre cevabının oluşumunda görevli olmadığı sitokinlerin ve/veya inflamatuvar mediatörlerin salınımında görevli oldukları ayrıca immün cevabın yapılandırılmasında etkili oldukları gösterilmiştir (44).

4.1.9. T HÜCRESİNE ANTİJEN SUNUMU

T lenfositleri protein yapılı antijenlere karşı verilen edinsel immün yanıtta önemli görev üstlenmektedirler. T lenfositleri protein yapılı antijen fragmanlarını tanıyabilmesi için hücre yüzeyinde MHC moleküllerini bulunduran ASH'ye ihtiyacı vardır. T hücrelerinin büyük bir bölümü ASH'lerde MHC moleküllerine bağlanan ve bu moleküllerce gösterilen peptit antijenlerini tanır (45). MHC, peptit yapıları immün sistemde gösteren moleküler olan genetik bir bölgedir. Her bireyde farklı T hücreleri kolonileri ancak o bireyin kendi MHC molekülleri ile gösterilen peptitleri tanıyabilir. T hücrelerinin bu özelliği MHC sınırlılığı olarak adlandırılmaktadır. Mikrobik antijenleri yakalayıp T lenfositlerinin tanınması için gösteren özelleşmiş hücreler olarak bilinen ASH'ler naif T hücrelerine yakaladıkları antijenleri sunarak immün yanıtın tetiklenmesini sağlarlar. ASH'lerin $CD4^+$ T hücrelerini ile ilgili iki önemli görevi vardır. Birincisi; ASH'ler antijenleri T hücreleri tanıyabilecekleri forma dönüştürür ve MHC moleküllerinde sergiler. İkinci görevi ise; peptit-MHC kompleksinin T hücresi tarafından tanınmasını sağlamaktır (46).

Vücuda giren mikropların protein yapılı antijenleri profesyonel ASH'lerce yakalanır ve immün yanıtın başladığı periferik lenfoid organlarda yoğunlaştırılır. Mikroplar vücuda genellikle deri, gastrointestinal ve solunum yolu ile girerler (47). Mikrobial antijenler daha birçok infekte olmuş dokuda bulunabilirler. Deri, mukozal epitel doku, parenkimal organlar bölgesel lenf nodlarının içine kadar ilerleyebilen lenf kılcallarından oluşmaktadırlar. Lenf nodları lenfatik kanallar ile gelen soluble ve partiküler antijenleri dolaşıma katılmadan önce süzmek ile görevlidirler. İmmatür dendritik hücreler epitelde doku veya diğer dokularda bulunarak eksprese ettikleri mannoz ve Toll benzeri reseptörler ile antijenleri yakalarlar (48). Yakalanan antijenler

MHC molekülüne bağlanabilecek peptit fragmentlerine dönüştürülür. Yakalanan antijenler inflamatuvar sitokinlerin üretilmesiyle beraber doğal immün yanıtı başlatırlar. Antijen ve sitokin kompleksi dendritik hücrelerin aktive olmasını sağlar (49). Aktive dendritik hücreler epitelyum duvarından ayrılarak lenf nodunda yer alan T hücre zonuna göç edebilmelerine sağlayacak CCR7 adlı spesifik kemokin reseptör eksprese etmeye başlar. T hücre zonunda üretilen CCR7 kemokini dendritik hücreyi T hücre zonundaki lenf noduna çeker. İmmün T hücreleri aynı şekilde CCR7 kemokin reseptörü eksprese ederek dendritik hücre ile birlikte aynı lenf noduna göç etmesinin sebebini açıklamaktadır (50). Dendritik hücrelerin yakaladıkları antijenler ile birlikte ilgili lenf noduna göçü sırasında olgun hale geçerler. Olgunlaşan dendritik hücreler yüksek seviyede MHC II eksprese eder. Aynı zamanda olgunlaşan dendritik hücreler T hücrelerini aktive edebilmek için kostimulatör moleküller eksprese ederler (51). Antijenler dendritik hücreler, makrofajlar ve B hücreleri gibi ASH'ler tarafından solubl form halinde lenf kanalları ile lenf nodu ulaşırlar. Makrofaj hücreleri antijeni fagositoz ile alırken B hücreleri solubl form ile antijeni tanır. Dendritik hücreler, makrofajlar ve B hücreleri antijeni alırlar ve immün T hücrelerine sunarlar. Böylece naif T hücreleri efektör hale gelir (52,53).

4.2. İMMÜN SİSTEMDE TOLERANS

4.2.1. T HÜCRE AKTİVASYONU

Hücrel bağışıklık sistemi, hücre içi mikroplarla oluşan enfeksiyonlara karşı savaşta rol oynayan edinsel immün yanıtın bir koludur. İmmünitinin bu kolu T hücre aracılığı ile gerçekleşir. İki tip enfeksiyon, hücre içinde saklanan mikropların bulunup nasıl ve nerede cevap verileceği hakkında yol gösterici olabilir. Birinci tip enfeksiyonda mikroplar doğal bağışıklık sisteminin erken koruyucu sistemlerinden biri olan fagositoz ile hücre içine alınır, fakat bu mikropların bir kısmı fagositlerin öldürücü aktivitelerine karşı direnç kazanmıştır. Patojenik hücre içi bakteri ve protozaların çoğu fagositlerin veziküllerinde yaşayabilme hatta çoğalabilme yeteneğindedir. Sitoplazmik mikroplar mikrobisidal mekanizmalardan korunmuştur. Çünkü bu mekanizmalar veziküler kompartmanlarla sınırlandırılmıştır. İkinci olarak virüsler pek

çok hücrede reseptörlere bağlanabilir ve bu hücrelerin sitoplazmasında enfeksiyona neden olarak çoğalabilir. Fagositik veziküllerde veya enfekte hücrelerin sitoplazmalarında yaşayan mikropların ortadan kaldırılması edinsel bağışıklık sisteminde T lenfositlerinin ana fonksiyonudur (54). CD4+ T hücreleri antikor üretiminde B hücrelerine de yardım eder. T lenfositlerinin fonksiyonlarını göstermesinde ortak özellik; fagosit, enfekte konak hücreleri veya B lenfositleri gibi diğer hücrelerle etkileşime girmesidir (55).

4.2.2. T HÜCRE YANITININ FAZLARI

T lenfositleri yabancı protein antijenlerini arayıp bulmak için periferik lenfoid organlarda devamlı olarak dolaşırlar. Naive T hücreleri antijen tanımada rol oynayan antijen reseptörleri ve diğer molekülleri eksprese ederler. Fakat naive T lenfositleri mikropların eliminasyonu için gerekli efektör fonksiyonları gösterme yeteneğine sahip değildir (56). Bu fonksiyonları gösterebilmek için naive T hücreleri efektör hücrelere farklılaşmak için uyarılmalıdır, bu süreç antijen tanınması ile başlamaktadır. Mikropların protein antijenleri mikropların girdiği bölgelerden naive T hücrelerinin yer aldığı periferik lenfoid organlara taşınır. Bu organlarda antijen işlenir ve profesyonel antijen sunan hücreler (ASH) üzerinde MHC molekülleri tarafından sunulur. Böylece naive T lenfositleri ilk olarak periferik lenfoid organlardaki protein antijenleri ile karşılaşır (57). Aynı zamanda T hücreleri antijeni görür, mikroplardan veya mikroplara karşı gelişen doğal immün reaksiyonlardan ek sinyalleri alırlar. Uyarıların kombinasyonuna yanıt olarak antijene özgül T hücreleri sitokin salgılamaya başlarlar. Bazı sitokinler antijen ile birlikte fonksiyon görür ve mikrop kökenli ikinci sinyallerle antijene özgül T hücrelerinin çoğalmasını uyarırlar. Bu çoğalmanın sonucu olarak 'klonal genişleme' olarak adlandırılan, antijene özgü kenfositlerin sayısında hızla artış izlenir (58). Aktive lenfositlerin bir kısmı naive T hücrelerinin değişimi ile sonuçlanan, efektör T hücre popülasyonunda mikrobiyal antijenleri tanıyabilen, mikropları elimine edebilen farklılaşma sürecine girerler. Bazı efektör T hücreleri lenf düğümü içinde kalabilirler ve lenf düğümündeki enfekte hücreleri eradikasyonunda veya mikroplara karşı antikor yanıtlarının oluşumunda B hücrelerine sinyal sağlamada

işlev gösterirler. Bazı efektör T hücreleri ise naive T hücrelerinin T hücrelerinin farklılaştığı lenfoid organlardan ayrılırlar ve dolaşıma katılabilirler, eradikasyonları inhibe edecekleri enfeksiyon bölgelerine göç ederler. Antijene yanıt olarak çoğalan diğer T hücreleri uzun ömürlü, fonksiyonel olarak inaktif ve aynı mikropla tekrar karşılaştığında hızlıca yanıt verebilen, aylarca veya yıllarca dolaşımda kalan hafıza (memory) T hücrelerine dönüşür (59). Efektör T hücreleri enfeksiyona neden olan ajanı ortadan kaldırdığında T hücre genişlemesini ve farklılaşmasını sağlayan uyaran sinyal de kaybolur. Sonuç olarak çok fazla genişlemiş antijene özgül lenfosit klonu ölür, böylece sistem bazal dinlenme safhasına geri döner. Olayların bu dizisi CD4⁺ T ve CD8⁺ T lenfositleri için ortaktır (60).

4.2.2.1. KLONAL GENİŞLEME

Aktivasyondan sonra 1 veya 2 gün içinde, T lenfositleri çoğalmaya başlar ve antijene özgül klonlar genişler. Bu çoğalma enfeksiyonda savaştık efektör hücreleri üretebilen antijene özgül lenfositlerin oluşumunu sağlar. Bu noktada CD8⁺ T lenfositlerindeki klonal genişleme dikkati çekmektedir (61). Enfeksiyon sırasında gerçekleşen klonal genişlemenin bazı özellikleri vardır. Birinci olarak; mikrobe özgü T hücre genişlemesine mikrobi tanımayan komşu hücrelerde saptanabilir bir artış eşlik etmez. İkinci olarak; birçok protein antijenini içeren kompleks mikropların neden olduğu enfeksiyonlarda bile çoğalan klonların büyük bir kısmı mikrobun sadece immünite açısından baskın peptidi için özgüdür. CD4⁺ T ve CD8⁺ T hücreleri arasındaki klonal genişlemedeki bu fark fonksiyonlarındaki farklılığı da gösterir (62).

4.2.2.2. NAİF T HÜCRELERİN EFEKTÖR HÜCRELERE FARKLILAŞMASI

Antijen ile uyarılarak çoğalan T hücreleri enfeksiyonları yok etmek üzere efektör hücrelere farklılaşmaya başlarlar. Bu farklılaşma gen ekspresyonu (örneğin; CD4⁺ T ve CD8⁺ T hücrelerinde sitokinleri kodlayan genlerin aktivasyonu gibi.) veya sitolitik proteinlerdeki (CD8⁺ T hücrelerinde) değişiklik sonucu oluşur. Bu işlemler klonal

genişleme ile başlar ve mikropla karşılaştıktan sonra 3-4 gün içinde farklılaşmış efektör T hücreleri gelişir. Bu hücreler periferik lenfoid organlardan ayrılır, enfeksiyon bölgesine göç eder ve kendilerini uyaran mikrobial antijenlerle burada tekrar karşılaşırlar. Antijenin tanınması aşamasında, efektör hücreler enfeksiyonu yok etmek üzere yanıt verirler. $CD4^+$ ve $CD8^+$ efektör popülasyonlarının efektör hücreleri farklı fonksiyon gösterir ve bunların farklılaşma kalıpları da benzer şekilde birbirinden farklıdır (63).

$CD4^+$ T hücreleri esas olarak makrofajların ve B lenfositlerin aktivasyonunda fonksiyonel olarak etkili yüzey molekülü ve sitokinleri üreterek antijene yanıt veren efektör hücrelere farklılaşırlar. $CD4^+$ T hücrelerinin efektör fonksiyonunda rol oynayan en önemli hücre yüzey proteini CD40 ligand (CD40L) 'dır. CD40L geni $CD4^+$ T hücrelerinde antijen tanıma ve eş-uyarıma karşı yanıtta transkripsiyonel olarak aktif hale geçer ve bunun sonucunda CD40L aktivasyon sonrasında yardımcı T hücrelerinde eksprese olur. CD40L'in reseptörü olan CD40 molekülü esas olarak makrofajlar, B lenfositleri ve dendritik hücrelerde eksprese olur. CD40'ın bağlanması bu hücreleri aktive eder ve bu nedenle CD40L makrofajların ve B lenfositlerin aktivasyonunda önemli bir role sahiptir. Dendritik hücrelerdeki CD40 ve T hücrelerinde eksprese edilen CD40L molekülleri arasındaki reaksiyon ASH'lerdeki eş-uyaranların ekspresyonunu ve T hücrelerini aktive eden sitokinlerin üretimini stimule eder ve böylece ASH ile sağlanan T hücre aktivasyonu için pozitif geri bildirim mekanizmasını sağlar (64).

$CD4^+$ T yardımcı T hücreleri değişik sitokinleri üreterek farklı fonksiyonlara neden olan efektör hücre alt gruplarına farklılaşabilirler. Bu alt grupların en iyi tanımlananı Th1 ve Th2 hücreleri olarak adlandırılmıştır. Th1 hücreleri tarafından üretilen en önemli sitokin IFN- γ makrofajların güçlü bir aktivatörüdür. Ayrıca mikropların fagositozunu uyaran antikor izotiplerinin üretimini de stimule eder, çünkü bu antikorlar direkt olarak fagosit Fc reseptörüne bağlanırlar ve fagosit kompleman reseptörlerine bağlanan kompleman ürünlerini aktive ederler. Bu nedenle, Th1 hücreleri fagosit aracılı sindirimi ve mikropların öldürmesini uyarır, bu nedenle hücrel immünitenin anahtar yapıtaşıdır. IFN- γ aynı zamanda antijen sunan hücreler üzerinde MHC sınıf II moleküllerinin ve B7 eş-uyaranlarının ekspresyonunu uyarır, bu

etki T hücre yanıtlarını da arttırmaktadır. Diğer taraftan Th2 hücreleri, IgE antikor üretimini stimule eden IL-4 ile eozinofilleri uyaran IL-5 üretirler. Bu nedenle, Th2 hücreleri özellikle helmintik parazitlere karşı etkili eozinofil aracılı, fagosit bağımsız immüniteyi stimule eder. IL-4, IL-10 ve IL-13 gibi Th2 hücreleri tarafından üretilen sitokinlerin bazıları makrofaj aktivasyonunu inhibe eder ve Th1 hücreleri aracılı immüniteyi baskılar. Bu nedenle, bir mikroba karşı hücre aracılı immün yanıtların etkisi bu mikroba yanıtta Th1 ve Th2 hücrelerinin aktivasyonu arasındaki denge ile sağlanabilir.

Th1 ve Th2 hücrelerinin gelişimi rastlantısal bir olgu değildir, naive CD4⁺ T hücrelerinin mikrobial antijenlerle karşılaştığı zaman aldığı uyarı tarafından düzenlenir. Makrofajlar ve dendritik hücreler IL-12 adı verilen bir sitokin üreterek bakteri ve virüslere yanıt verirler. Naive T hücresi aynı ASH tarafından sunulan bu mikropların antijenlerini tanıdığı zaman, T hücreleri aynı zamanda IL-12'ye de maruz kalır. IL-12, T hücrelerinin makrofajları mikropları öldürmek üzere aktive eden IFN- γ üreten Th1 alt grubuna farklılaşmasını uyarır. Doğal immün yanıt bu durumda, ASH'den IL-12 üretimi ile edinsel immün yanıtın doğal gidişini etkiler ve Th1 hücrelerine doğru yönlendirilir. Eğer enfeksiyöz mikrop ASH tarafından IL-12 üretimine neden olmazsa T hücreleri bu durumda IL-4 üretir. Bu da bu hücrelerin Th2 alt grubuna doğru farklılaşmasını indükler (65). Th1 ve Th2 farklılaşmasındaki denge öncelikle belirli enfeksiyonlara karşı yanıtta dendritik hücrelerin tipleri tarafından etkilenebilir. Mikropların sınıflarındaki farklılıklara göre tanımlanan farklı dendritik hücre alt grupları, mikroplar tarafından aktive olduklarında farklı sitokinleri salgılamaları ve farklı yanıt vermeleri sonucunda efektör T hücrelerini Th1 veya Th2 yönünde indüklerler. CD4⁺ yardımcı T hücrelerinin Th1 veya Th2 alt grubuna farklılaşması edinsel immünitenin özelleşmesine örnektir. Bu örnek farklı tipteki mikroplara karşı immün yanıtların nasıl bu mikroplara karşı en etkili biçiminde düzenlendiğini göstermektedir. Antijenle uyarılmış yardımcı T hücresinden Th1 veya Th2 hücresinin gelişmesinin, oluşan alt grup T hücrelerine doğru farklılaşmayı arttıran ve karşıt popülasyonunun gelişimini inhibe eden sitokinleri üretilir. Bu 'çapraz-düzenleme' yanıtın bir yöne kaymasında artışa neden olabilir (66).

4.2.3. T HÜCRE AKTİVASYONU ve CD28 FONKSİYONU

T hücreleri T hücre reseptörü (TCR) ile aktive olur. Peptit antijenleri MHC I ve MHC II kompleksleri ile tanılırlar. T hücrelerinin aktive olabilmeleri için peptit yapılı antijenlerin ASH tarafından T hücrelerine sunulması gerekir. Böylece MHC/peptit-TCR kompleksi ile T hücre aktivasyonu tamamlanmış olur. T hücre cevabının yapılandırılmasında önemli role sahip olan faktörler arasında kostimulatör molekülde de bulunmaktadır. Bunlardan en önemlileri CD80/B7-1 ve CD86/ B7-2 dir. T hücre yüzeyinde bu kostimulatör molekül ile birlikte CD28 kostimulatör molekül ekspresyona edilir. CD28 kostimulatör ekspresyonu sitokin gen ekspresyonuna, sitokin mRNA stabilizasyonuna, hücre proliferasyonunu artmasına, glikoz yıkımının artmasına ve hücre canlılığının desteklenmesini sağlar (Boise et al. ,1995; Frauwirth et al. , 2002; Lindstein et. al. 1989). Bu bilgiler ışığında CD28 ligand (CD28L) T hücresinde restimulasyonla cevap oluşmasını sağlar. Fakat TCR'nin kostimulasyon yokluğunda oluşturduğu cevaba anerji denir (Schwartz, 2003). T hücresinde anerji T hücre odaklı periferik tolerans mekanizmasını düzenler. Özellikle kendinden olan antijenlere karşı immün sistemin aktive olmasının istenmediği durumlarda T hücre anerji mekanizması fonksiyonel hale gelir (67).

4.2.4. T HÜCRE ANERJİSİNİN NEDEN OLDUĞU DURUMLAR

Anerji hem in vitro hem de in vivo olarak gözlenebilir. İn vitro olarak anerji ilk defa 1980'lerde Schwratz laboratuvarlarında CD4⁺ Th1 hücre klonları kullanılarak karakterize edilmiştir.

ASH ile antijenin T hücresine sunulmasıyla kostimulatör liganlar aktive olur, T hücre proliferasyonu ve az miktarda IL-2 sekresyonu olur. T hücresinin tekrar aynı antijen ile stimule olması sonrasında oluşan cevaba anerji denir. Anerjide sunulan peptit yapılı antijenin bir ajan eşliğinde sunulma durumu gözlenmektedir. Bu ajanların başlıcaları MHC-peptit kompleksleri ile birlikte bulunan plonar lipid bilayer, anti-CD3 monoklonal antikoru, mitojen concovalin A yada peptitlerdir (Gajewski et. al. 1994). IL-2 bloke edildiğinde ve T hücre proliferasyonu engellendiğinde anerjik T hücresi

diğer sitokinlerin örneğin IFN-gamma ve IL-13 gibi sitokinlerin sekresyonlarını azaltır. Anergik durum uzun süre stabil kalabilir. Fakat ekzojen sitokinler ile (IL-2 yada IL-15) bu durum geri dönüşümlü olarak farklılık gösterebilir (Beverly et al. ,1992; Essery et al. , 1988). Anergide gözlenen geri dönüşüm kanser ve kronik enfeksiyonda görülen anergi ile birlikte, ilgili araştırmalarla bakış açısı kazandırmak da ve doğru T hücre cevabının restrosyonuna olanak sağlar (68).

4.3. REGÜLATÖR HÜCRELER

İmmün sistemin en belirgin özelliklerinden biri, birçok mikroba karşı yanıt oluştururken bireyin öz antijenlerine karşı yanıt oluşturmamasıdır. İmmünolojik tolerans olarak adlandırılan öz antijenlere yönelik yanıtsızlık hali, lenfosit reseptörlerinin ekspresyon düzenekleri sadece öz olmayan antijenlere yönelik reseptörler oluşturmaya yatkınlık göstermemesine karşılık muhafaza edilmektedir (69). Tolerans, immün sistemin kendi antijenine karşı yanıt eksikliği şeklinde ifade edilir. Fakat tolerans için yapılabilecek en uygun tanımlama potansiyel olarak hasara yol açan immün yanıtın önlendiği, baskılandığı veya hasarın olmadığı yöne kaymanın sağlandığı bir mekanizmadır. Solunum yolları ve intestinal mukozadan giren antijenlere karşı oluşan immün yanıtta periferal tolerans büyük önem taşır. Bu bölgeler, çeşitli çevresel ve patojenik olmayan antijenlere maruz kalmaktadır. Bu antijenler de aktif immün sistemden daha çok yanıtsızlık ve tolerans durumunu arttırıcı etki göstermektedir (70). Tolerans mekanizmaları klonal delesyon ve antijen spesifik efektör T hücrelerinin cevapsızlığını içerir. Antijenin düşük dozları aktif hücresel regülasyonun tetiklenmesini sağlarken, yüksek doz ise anergi ve delesyonu başlatmaktadır. Anerji, antijenle tekrar karşılaşmanın ardından antijen spesifik T hücrelerinin uzun süreli proliferasyon olamamalarıdır (71).

Düzenleyici T hücreler tarafından aktif süpresyon in vivo olarak hem organizmanın kendi antijenlerine hem yabancı antijenlere karşı periferal toleransın indüksiyonu için gereklidir. Pek çok düzenleyici T hücre, inhibitör hücre yüzey moleküllerinin gösterimi ve /veya IL-10 ve TGF-beta gibi immün sistemi düzenleyici sitokinlerin üretimi ile etkilerini gösterirler (72).

Timusta öz antijeni tanıyan bazı olgunlaşmamış T hücreleri düzenleyici (regulatör) hücre niteliği kazanarak periferik dokulara girerler. Öz antijenlere bağlanan olgunlaşmamış T hücresinin negatif seçim ile silinmesini veya regülâtör T hücre olmasını neyin belirlediği henüz bilinmemektedir (73).

4.3.1. T REGÜLATÖR HÜCRELER

1990'lı yıllardan beri T hücre aracılıklı immün baskılama açıklanmaktadır. Ayrı sistemlerde birçok tip supresör T hücresi ve onların biyolojik hedefleri yoğun olarak araştırılmaktadır. Bir çok açıdan supresör T hücre mekanizmaları ve onların etkileri henüz net olarak açıklanamamıştır. Fakat T regülâtör (Treg) hücrelerin immün cevabı hücre-hücre interaksyonu yada ürettikleri supresör sitokinler ile baskıladığı bilinmektedir (74).

4.3.2. CD4⁺ CD25⁺ REGÜLATÖR T HÜCRESİ

Sakaguchi ve arkadaşları tarafından CD4⁺ T hücrelerinin küçük bir kısmını (yaklaşık %5-10) oluşturan, organ-spesifik otoimmünitede, allograft rejeksiyonun önlenmesinde ve self-toleransın sağlanmasında önemli rol oynayan hücreler olarak tarif edilmiştir (73,75). Bu hücreler yüzeylerinde IL-2 reseptör zinciri (CD25) eksprese etmektedirler ve timusta üretilmektedirler (75,76). CD4⁺ CD25⁺ T hücreleri IL-12 üretimini inhibe ederek, CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinin THR (T hücre reseptörü) uyarımlarında çoğalmasını baskılamaktadır (77). CD25⁺ düzenleyici T hücreleri için spesifik olan transkripsiyon faktörü FoxP3 ve TNF reseptörü tanımlanmıştır. CD25⁺ hücrelerin azalması otoimmün hastalıkların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (73,78). CD4⁺ CD25⁺ T hücrelerinin insanlarda da periferik kandan izole edilebileceği ve in vitro olarak fonksiyonları kaybolmadan çalışabileceği gösterilmiştir (79). CD25⁺ hücreleri CTLA-4 sinyaline bağlı olarak, direkt olarak hücre-hücre ilişkisi ile ve sitokin bağımsız bir yol ile immün yanıtları baskılayabilmektedir(73,80,81). Normal immün yanıtların oluşmasında ve spesifik immünoterapide mukozal alerjenlere karşı düzenleyici T hücre cevabında IL-10 ve TGF-β etki etmektedir. Allerjik olan

bireylerde spesifik immünoterapinin $CD4^+ CD25^+$ T hücrelerinde antijen spesifik aktiviteyi arttırdığı gösterilmiştir (82). Ancak bu fonksiyonu gerçekleştirirken diğer hücreleri ($CD4^+ CD25^-$) anerjik hale getirmeyip bu hücrelerin yüksek seviyede IL-10 salan hücreler haline dönüşmesine neden olmaktadır. IL-10 üreten anerjik T hücreleri daha sonra IL-10 bağımlı yol ile T hücre çoğalmasını baskılamaktadır (83).

$CD4^+ CD25^-$ hücre popülasyonunun IL-2 üretiminin artışı inhibe etmektedir. TGF- β , $CD4^+ CD25^-$ T hücrelerinin supresör fonksiyonlarındaki rolleri hala tam olarak anlaşılamamıştır (84,85). Yapılan çalışmalarda bu hücrelerin aktivasyonunun antijen spesifik olduğu, timik seleksiyona girdikleri, self-peptitler için yüksek affinite ile THR interaksyonuna ve IL-2 sinyalizasyonuna ihtiyaç gösterdikleri gösterilmiştir. Ancak in vitro ortamda THR uyarımına karşı anerjiktir. Dendritik hücreler tarafından Toll-like reseptörleri yoluyla üretilen IL-6 varlığında $CD25^+$ düzenleyici hücrelerin bloke edildiği gösterilmiştir (85). $CD4^+ CD25^+$ T reg hücreleri otoimmüniteyi engelleyerek normal immün sistemde profesyonel Treg hücreleri olarak adlandırılmaktadır. $CD4^+ CD25^+$ Treg hücreleri elimine edildiğinde çeşitli otoimmün hastalıklarla birlikte bireyin genetik yapısına bağlı olarak gastirit, tiroid gibi hastalıklar gelişir (74).

4.3.3. TH3 HÜCRELERİ

TGF- β salgılayan T hücrelerinin mukozal bölgelerde örneğin oral toleransının indüksiyonunda düzenleyici role sahip olduğu düşünülmektedir (86). Mukozal tolerans, tolerans indüksiyonunun açıklanabilmiş mekanizmalarından biridir. Oral yolla alınmasıyla beraber antijene karşı hücrel ve humoral immün yanıtların spesifik olarak baskılanması ile ifade edilmektedir (87). Bu amaçla yapılan çalışmalarda ilk olarak Chen ve arkadaşları tarafından oral olarak antijen alınmasından sonra mezenterik lenf nodlarında yüksek miktarda TGF- β ve çeşitli miktarlarda da IL-4 ve IL-10 üreten $CD4^+$ T hücreler belirlenmiştir. TGF- β salınımindan sorumlu olan bu hücreler Th3 olarak isimlendirilmektedir (85). Oral tolerans mukozal florada bulunan bakteriyel antijenlere ve besin proteinlere karşı aşırı duyarlılık reaksiyonlarının önlemesi için oluşmaktadır. Düşük doz antijenin oral yolla alınması peyer plakları ve

lenf nodları gibi GALT ile ilişkili olan yapılarda oral tolerans gelişimine neden olmaktadır. Barsakta antijen-sunan hücre olarak görev alan dendritik hücreler dinlenme fazındaki T hücrelerinin sitokin mikroçerçevesine bağlı olarak aktifleşmesini sağlarlar böylece Th2 veya Th3 hücre farklılaşmasını arttırır. Th3 hücreleri antijen-spesifik bir yol ile tetiklenirken, antijen spesifik olmayan bir yol ile süpresyonu gerçekleştirmektedir. Th3 hücreleri IgA yapımına katkıda bulunarak primer olarak TGF- β salmaktadır. Th1 ve Th2 hücreleri için supresif etkilere sahiptir (87,88).

4.3.4. Tr1 HÜCRELERİ

İlk kez Groux ve arkadaşları; IL-10 varlığında CD4⁺ T hücrelerinin bazılarının yüksek seviyede IL-10, düşük seviyede IL-2 salınımı ve hiç salınmayan IL-4 sitokin profiline ve düşük proliferasyon kapasitesine sahip olduklarını göstermişlerdir (89). Dolayısıyla Tr1 hücreleri Th1 ve Th2 T hücre klonlarından farklı yeni bir CD4⁺ T hücre alt grubu olup, yüksek seviyede immün sistemi baskılayıcı sitokinler olan IL-10 ve TGF- β 'yı yüksek seviyede salgılamaları fakat buna karşın IL-4 salgılamamaları ile karakterize edilmiştir (90,91). IL-5 etkisini yenebildikleri sürece proliferere özellik gösterirler (92). Tr1 hücreleri IL-10 ve TGF- β üreterek naive ve hafıza Th1 ve Th2 hücre cevabını baskılar. Tr1 hücreleri allerji ve otoimmünitede periferel toleransın modülasyonunu sağlayacak hücrelerel terapi ve yeni terapatik ajanların gelişmesi için yeni hedeflerin idendifikasyonunda görev alır (15). IL-10 ile birlikte IFN- α sinerjistik bir şekilde çalışarak Tr1 hücrelerinin farklılaşmasını kolaylaştırmaktadır. THR (T hücre reseptörü) bağımlı aktivasyonu takiben Tr1 hücre klonları CD40L, CD69 ve HLA-DR gibi normal T hücre aktivasyon işaretlerini gösterir. Th1 ve Th2 hücrelerinin aksine Tr1 hücreleri CCR7 eksprese etmektedir. IL-15'in Tr1 hücreleri gelişim faktörü olduğu gösterilmiştir. Tr1 hücreleri hem antijen sunan hücrelerinin hem de T hücrelerinin fonksiyonlarını düzenleme, allerjene karşı toleransın indüksiyonunun sağlanmasında görevlidir. Antijene karşı oluşan yanıtta CD4⁺ T hücrelerinin çoğalmasını baskılamaktadır. IL-10 ile artan CD4⁺ Tr1 hücreleri antijen spesifik immün yanıtları düzenlemektedir (85,91).

Tr1 hücreleri naive CD4⁺ T hücrelerini stimule ederek IL-10,IFN- γ veya IL-4 ve IL-10 kombinasyonunun ortamda bulunmasını sağlar (89,93). Vitamin D3 ve deksamethasan Tr1 hücrelerinin sitokin profilini yenebilirse insan ve farelerin naive CD4⁺ T hücrelerinin Tr1 hücrelerine farklılaşmasını sağlar (94). IL-10 ve TGF- β üreten Tr1 hücreleri insanlarda allerjen spesifik immünoterapi boyunca yüksek ve artan allerjen dozuna bağlı olarak Tr1 hücrelerin oluşumuna neden olur (95). Oral tolerans geliştiren hayvanlarda mesenterik lenf nodlarından izole edilen CD4⁺ T hücrelerini uygun antijen ve anti-CD3 ile aktive edildiğinde CD4⁺ T hücre kolonu yüksek seviyede TGF- β ve farklı miktarlarda IL-4,IL-10 ürettiği gösterilmiştir. Tr1 hücreleri myelin esas proteini ile birlikte ensephalitis indüksiyonu baskılama fonksiyonunu yerine getirdiğinde Th3 hücresi olarak in vitro ortamda baskılanmayı sağlar. Th3 ve Tr1 hücreleri immünolojik özellik bakımından aynı T hücre kökeninden gelir (15). Ancak Th3 hücrelerinin tr1 hücrelerine göre daha fazla TGF- β salgıladığı bilinmektedir.

Respiratuar tolerans sırasında IL-10 üreten dendritik hücreler ile kültüre edildiğinde Tr hücre klonlarının geliştiği görülmüştür. Tr hücreleri havayolu aşırı duyarlılığının ve havayolu inflamasyonunun gelişimini baskılamaktadır. Bu hücrelerin allerjen-spesifik T hücreleri üzerinde inhibitör etkileri IL-10 üretimine ayrıca ICOS-ICOS ligand yolunun Th2 yanıtı humoral immünite gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalar Tr hücrelerinden üretilen IL-10'un Th2 hücrelerinin fonksiyonları üzerinde ve ayrıca Th1 hücre fonksiyonları üzerinde direkt olarak etkisi olduğu gösterilmiştir. Tr hücreleri gelişimleri için ICOS-ICOS ligand kostimulasyonuna gerek duymaktadır (85,96). Farklı miktarlarda IL-4 ve IL-10 üretirler ve mukozal yanıt ile ilişkilidirler. Th3 hücreleri Tr hücre gelişimi için gerekli olan IL-10 ürettikleri bilinmektedir. Bu sebeple Tr hücrelerinin de Th3 hücreleri gibi solunum yolu hastalıklarının immün yanıtında görev aldıkları düşünülmektedir (85). Dendritik hücreler havayollarındaki en önemli antijen sunan hücrelerdir. Olgunlaşmamış dendritik hücreler düşük seviyede major doku uyumluluğu kompleksi (MHC) Sınıf II ve yardımcı moleküller eksprese etmektedirler (95). Buna karşın gastrointestinal kanaldaki dendritik hücreler ise hem IL-10 hem de TGF- β üretmektedirler. Tr hücrelerinin havayolu inflamasyonunu ve

havayolu aşırı duyarlılığını önlemesine karşın $CD25^{+}$ T hücreleri havayolu inflamasyonunu önleyebilirken, havayolu aşırı duyarlılığını önleyememektedirler (85).

4.3.5. DİĞER REGÜLATÖR HÜCRELER

Oral tolerans ile artan $CD8^{-}$ T hücrelerinin lokal süspansiyon için gerekli olduğuna dair yapılan çalışmalar bulunmaktadır (97). $CD8^{+}$ Tr hücreleri sadece tolerans gelişiminde değil, aynı zamanda toleransın indüklenmesinde ve otoimmünitenin önlenmesinde rol oynamaktadır. Çift negatif ($CD4^{-} CD8^{-} TH\alpha\beta^{+}$) Tr hücreleri pek çok otoimmün hastalıklarda toleransın sağlanmasında rol oynamaktadır (75).

Araştırmalar $CD4^{+}$ T hücrelerin ve $CD8^{+}$ Treg hücrelerin oral toleransta rol aldıkları düşünülmektedir (98,99). Yeni bir supresör hücre klonu olarak $CD8^{+} CD28^{-}$ T hücre popülasyonu göze çarpmaktadır. HLA I allojenik antijenleri ile sınırlıdır. B7 molekülünün ekspresyonunu önlemede rol oynamaktadır (100). $CD4^{-} CD8^{-} TCR\alpha\beta^{+}$ Treg hücreleri birçok otoimmün hastalıklara karşı tolerans gelişiminde görevlidir. $CD4^{-} CD8^{-} TCR\alpha\beta^{+}$ Treg hücreleri MHC I molekülüne spesifiktir. Bu hücreler $CD8^{+}$ T hücrelerinin proliferasyonunu ve sitotoksik özelliklerine karşı baskılayıcı etki gösterir (101).

Son zamanlarda yapılan çalışmalara göre IL-10 salını yapan B hücreleri regülatör role sahip olduğu bilinmektedir (102). IL-10 üretebilen B hücreleri artirit gelişimini engelleyerek regülatör etki göstermektedirler. Bu tip hücrenin baskılayıcı etkilerinin IL-10 sitokinine bağlı olduğu bildirilmiştir. Zira IL-10'dan yoksun farelerden izole edilen B hücreleri artirit gelişimini engelleyemedikleri gösterilmiştir.

Yapılan çalışmalarda ortaya çıkan bulgulara göre dendritik hücreler periferel T hücre toleransına neden olmaktadır. Bu sebeple bu tip dendritik hücreler regülatör etkiye sahip oldukları bildirilmiştir. Farelerden izole edilen plasmositoid dendritik (pDH) hücreler havayolu antijenleri ile karşılaştıklarında IL-10 üretirler (96). Olgun pDH ($B7^{hi}$) $CD4^{+}$ Tr1 benzeri hücre gelişimini stimule eder. $CD4^{+}$ Tr1 benzeri hücreler yüksek seviyede IL-10 üretebilen hücrelerdir. IL-10^{+/+} farelerden izole edilen pDH IL-10^{-/-} fareye adoptif olarak transfer edildiğinde alıcı farede havayolu antijenine karşı cevapsızlık oluşmuştur. Bu bulgulara göre IL-10 sitokinin DH olgunlaşmasını

engellediği ve böylece CD4+ T hücresinde alloantijen spesifik anergi oluşumuna neden olduğu sonucu çıkarılmaktadır (103).

NK, epitel hücreler, makrofaj ve glial hücrelerden de supresör sitokinlerden IL-10 ve TGF- β üretilmektedir. Fakat bu hücreler profesyonel regülatör hücreler değildir (104,105). Bu hücrelerden salınan supresör sitokinler doku hücrelerine yerleşerek regülatör immün cevabın yapılandırılmasında görevlidirler.

4.4. ALLERJİK ASTIM İMMÜNOPATOGENEZİ

Astım en yaygın olarak bilinen kronik inflamatuvar hastalıktır. Astım semptomlarının insidansı farklı popülasyonlarda, çocukluk çağındaki bireylerde %1-30 arasında farklılık göstermekte ve birçok ülkede özellikle genç bireyler arasında astım insidansında zamanla bir artış gözlenmektedir. Dünyanın birçok ülkesinde astım morbidite ve mortalitesi artmaktadır (106).

Allerjik astım kronik bir akciğer hastalığı olup çevresel ve hava yolu allerjenlerine karşı bireyin allerjik reaksiyon verdiği bir hastalıktır. Allerjik astımda çevresel allerjenlere karşı Th2 aracılıklı cevap oluşturulur. Astım Th2 hücrelerinde salınan IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 ve granulosit makrofaj-koloni stimule edici faktör (GM-CSF) tarafından kontrol edilir. Ayrıca immün sistemde görevli olan hücrelerden mast hücreleri ve eozinofiller astım cevabında görevli hücrelerdendir. Astım patolojik semptomları ise havayolu obstruksiyonu, mukus üretiminde artış, kronik eozinofil inflamasyonu, bronşial düz kas hipertrofisi, epitel hücrelerde dökülme ve airway remodeling ve IgE antikor sentezidir (107).

Yapılan çalışmalarda astımda epitelyal hasarların olduğu gözlenmiştir. Ayrıca bronkoalveol sıvılarında (BAL) da epitel hücre sayılarında artış gösterilmiştir. Bu nedenle epitel hücrelerindeki hasar veya diğer bir deyişle epitel dökülmesi astımın patolojik özelliklerinden biri olarak kabul edilmektedir (108).

Astımda görülen diğer bir değişiklik ise subepitelial retikular bazal membran kalınlaşmasıdır. Lamina retikularisin kalınlaşması; retikülin birikmesi ile oluşan asmatik bronkosun karakterisitik özelliğidir (109). Subepitelial kalınlaşma; proteoglikanlar gibi ekstrasellüler matriks komponentlerin depolanması, havayolu aşırı

duyarlılığı, astım ataklarının sıklığı, fibroblast ve miyofibroblastların sayısı ile pozitif yönde korelasyon gösterir (109).

Allerjik cevaptan havayolu düz kası etkilenebilir ve aynı zamanda allerjik cevaba katkıda bulunabilir (110). Astımda küçük ve/veya büyük havayollarında düz kas kitlesinde artış görülmektedir (111,112). Normal bireylere kıyasla astımlı bireylerde kas kitlesinde 3 ila 4 kat arasında artış olduğu belirtilmiştir. Bu artışın sebebi tam olarak bilinmemekle birlikte kasılma ve gevşemeye sebep olabilecek muhtemel mekanizmaların mast hücrelerinden IgE-bağımlı histamin ve prostaglandin salınımı, nöral uyarımlar, trofik uyarımlar ve sitokinler olabileceği düşünülmektedir (113). Ayrıca inflamatuvar mediatörler, sitokinler ve gelişim faktörleri ile düz kas proliferasyonu artmaktadır (111).

Astımın karakteristik özelliklerinden biri ise; mukusun aşırı derecede üretilmesidir. Mukus mekanik olarak havayolu lümenini daraltabilir ve ağır astımda yapışkan plaklar oluşturarak havayolunu tahrip edebilir (114). Goblet hiperplazisi hem astımda hem de kronik bronşitte büyük havayolları patolojisinin en önemli özelliğidir. Yapılan çalışmalarda astımlı hastalarda normal sağlıklı bireylere göre goblet hücre sayısının 2,5 kat daha fazla olduğu bulunmuştur. Mukusun aşırı derecede yapımı olursa havayolu obstrüksiyonuna neden olmaktadır (115).

Astımda görülen değişikliklerde bir diğeri ise vasküler değişikliktir. Bronşial mukozal kan damarlarının vazodilatasyonu, vaskülitinde artış ve bronşial duvarda ödem oluşumu astımda havayollarında meydana gelen yeniden yapılanmanın karakteristik özellikleridir. Astımda havayollarının damar yapısında yeniden yapılanma gerçekleşmektedir. Kronik inflamasyonu olan dokularda inflamatuvar hücrelerin toplanması için kan damarlarında ya proliferasyon oluşmakta ya da genişlemeler meydana gelebilmektedir (116).

4.4.1. HAVAYOLLARINDA YENİDEN YAPILANMADA ROL ALAN SİTOKİNLER

IL-2: T hücrelerinden ve büyük granular lenfositlerden salınır. T hücreleri tarafından üretilen IL-2 antijen spesifik hücrelerin proliferasyonunda görevlidir. IL-2 aynı

zamanda diğer immün hücrelerin proliferasyonunu ve farklılaşmasını sağlar. NK hücreleri yüksek seviyede IL-2 ile uyarılmaktadır. B hücresi ise IL-2 ile stimule edildiğinde büyüme faktörü ve antikor üretimini gerçekleştirmektedir. Böylece B hücreleri üzerinde gelişim ve farklılaşmayı arttırıcı etkiye sahiptirler. Aynı zamanda IL-2 T hücre gelişimini de desteklemektedir (117).

IL-3: Multispesifik hemapoetin olarak bilinmektedir. IL-3 bütün hemapoetik serilerin öncülerinin gelişimini uyarmaktadır (117). En önemli etkisi eozinofiller ve mast hücreleri üzerinde olmaktadır. Bu hücreler hem IL-3 salınımı yapmakta hem de IL-3 ile uyarılmaktadırlar. Eozinofiller ve mast hücreler dışında ayrıca Th1 ve Th2 lenfositlerden de salınmaktadır. IL-3'ün ortamdaki varlığı, eozinofil için kemotaktik olup, yaşam süresini, aktivasyonunu; lipid mediatörler ve serbest oksijen radikellerinin salınmasını; mast hücrenin çoğalma ve farklılaşmasını arttırmaktadır (118,119) .

IL-4: IgE üretimi ve mast hücrelerini, eozinofil aracılıklı reaksiyonları ve makrofaj aracılıklı reaksiyonlarını uyarır (21). IL-4 B hücrelerinin aktivasyonunu ve farklılaşmasını arttırarak, IgG4 ve IgE üretimine neden olur. T hücreleri üzerinde de gelişim ve aktivasyon faktörü olarak etki gösterir. T hücrelerini Th2 yönde farklılaşmasını arttırmaktadır. IL-4 makrofaj hücrelerini aktive edebilen IFN- γ ile antagonist olarak çalışmaktadır. Böylece hücre aracılıklı immün reaksiyonu inhibe eder (110).

IL-5: En önemli görevi olgun eosinofil hücrelerini aktive etmek , eosinofil hücrelerinin gelişimini ve farklılaşmasını sağlamaktır. Böylece IL-5 eozinofillerin adhezyonlarını dolayısıyla yaşam sürelerini arttırmaktadır. IL-5 CD4⁺ Th2 hücrelerinden salınmakla birlikte ayrıca CD8⁺ ve CD4⁻ CD8⁻ hücreler tarafından da üretilmektedir (120). Allerjen inhalasyonu havayolunda BAL'da IL-5 üretimini artmasına ve ayrıca havayolu aşırı duyarlılığının artmasına neden olmaktadır. IL-4,IL-13 ile birlikte vasküler adhezyon molekülü (VCAM-1) gösterimini arttırıp; eozinofil, mast hücresi ve bazofil hücrelerinin aktivasyonunu sağlar ve havayolu inflamasyonuna neden olur (121).

IFN- γ : IFN- γ makrofajları aktive ederek doğal bağışıklıkta, hücre aracılıklı immünitede görev alarak edinsel immünitede yer almaktadır. Doğal bağışıklıktaki görevlerinden bir diğeri ise nötrofil ve NK hücrelerini aktive etmektir.

ASH'nin sınıf I ve sınıf II MHC molekülü ile kostimulatör molekülüleri eksprese etmesini uyarır. İmmün CD4⁺ T hücresinin Th1 yönünde farklılaşması sağlarken aynı zamanda Th2 hücrelerin proliferasyonunu engeller. IFN- γ B hücresinin IgG alt gruplarından IgG2 ve IgG4 üretimini uyarırken IL-4 aracılıklı IgE ve IgG1 üretimini engellemektedir (21).

IL-10: IL-10 Th2 hücreleri, B hücreleri, makrofajlar, keranositler, dendritik hücreler, mast hücreleri ve bazı tümör hücreleri tarafından üretilen anti-inflamatuar bir sitokin olup, bu hücrelerin farklılaşmasında ve gelişmelerin düzenlenmesinde görevlidir (113,122). Th1 hücre klonlarından IFN- γ ve IL-2 üretimini sağladığı buna karşın IL-10'un in vitro olarak insan lenfositlerinden IL-5 üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir (123). Ayrıca IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF ve TNF- α gibi monosit ve makrofajlardan salınan çeşitli inflamatuvar sitokinlerinin de salınımını azaltmaktadır. Dolayısıyla IL-10 direkt olarak Th2 cevabının Th1 yanıtına dönüşümünü sağlamaktadır (124). Antijen spesifik immünoterapi boyunca artan IL-10 antijen spesifik IgE ve IgG4 antikor sentezini düzenler. IL-10 allerjen spesifik total IgE üretimini baskılayarak IgG4 üretimini arttırır. Böylece IL-10 sadece T hücre toleransına yol açmakla kalmaz, aynı zamanda spesifik antikor formu ve spesifik cevabını düzenler (21). Allerjik inflamasyon hücrelerinden mast, bazofil, eozinofil gibi hücreler aktive olabilmek ve canlı kalabilmek için T hücre sitokinlerine ihtiyaç duyarlar. Fakat bu sitokinler Th2 hücrelerini baskılamaz ve regülatör T hücre oluşumunu sağlayamazlar(74,21). IL-10 mast hücrelerinden salınan proinflamatuvar sitokinlerin salınımını, eozinofil fonksiyonunu ve aktivasyonunu azaltır (74,125,126). T0 ve Th2 hücrelerinden üretilen IL-5 sitokinini baskılar ve aktive olmuş eozinofillerin aracılığı ile oluşan GM-CSF üretimini ve CD40 ekspresyonunu inhibe eder. Ayrıca hücre ölümünü arttırır. T hücrelerinin direkt olarak IL-10 ile baskılandığında CD28 kostimulasyonu inhibe olur. IL-10 PKMH içinde yer alan T hücresinin farklı antijenlere ve süperantijenlere karşı proliferatif cevap oluşturmalarını engeller. IL- 10 düşük sayıda TCR sahip ve CD28 molekülüne ihtiyaç duyan T hücrelerini baskılamakla görevlidir (74,127,128). IL-10'un immün yanıtın farklılaşmasında ve toleransta rol alan düzenleyici T hücrelerinin farklılaşması ve fonksiyonu için önemli olduğu düşünülmektedir (129).

IL-12: IL-12 NK ve T lenfositlerinden IFN- γ üretmeni stimule eder. Bu şekilde CD4⁺ T lenfositlerinin IFN- γ üretebilen Th1 hücrelerine farklılaşmasını sağlar. IL-12 inhale antijenlere karşı Th2 kaynaklı cevabı engellediği, eozinofiliyi ve aşırı duyarlılığı baskıladığı bilinmektedir. IL-10 ve IFN- γ üretimi için etkili bir uyarandır. Ayrıca NK hücrelerinin ve CD8⁺ T hücrelerinin sitotoksik fonksiyonlarını arttırıcı etkiye sahiptir (21,130).

TGF- β : T hücrelerinin proliferasyonunu ve farklılaşmasını ayrıca makrofajların aktivasyonunu engeller. B hücrelerinden IgA üretimini stimule eder. TGF- β immün sistemi baskılayıcı etkin bir sitokin olduğu için; otoimmün hastalıklar ve atopik dermatit gibi kronik inflamatuvar hastalıkları gibi kronik inflamatuvar tedavi etmede kullanılabileceği ileri sürülmüştür. TGF- β hem Th2 hem de Th1 sitokinlerini düzenleyebilmektedir (74).

4.4.2. Th1/Th2 DENGESİ

1986'da Mosmann ve Coffman T hücrelerinin ayrımını sitokin profillerine göre Th1 ve Th2 şeklinde yapmıştır. IFN- γ , TGF- β ve IL-2 üreten T hücrelerini Th1; IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 üreten T hücrelerini Th2 olarak tanımlamışlardır. Th1 ve Th2 hücrelerinin birbiri üzerinde karşılıklı olarak düzenleyici etkisi olduğunu belirtmişlerdir (131). Astımı olan hastaların biyopsi ve BAL sıvılarında yapılan incelemede, sadece T hücreleri, eozinofiller ve mast hücrelerinde sayıca artış olmadığı, aynı zamanda IL-4 ve IL-5 miktarlarında da artış olduğu gözlenmiştir. Bu da astımın Th2 baskın bir immün cevap ile karakterize edildiği fikrini uyandırmıştır. Allerjik olmayan bireylerde Th1 tip sitokin profili baskın olduğu (132), ayrıca allerjen immünoterapisi alan allerjik bireylerde sitokin profilinin Th2'den Th1'e kaydığı görülmüştür (133,134). Allerjen ile artan havayolu aşırı duyarlılığının oluşmasında Th2 hücrelerinin ve sitokinlerinin önemi yapılan pek çok çalışmada gösterilmiştir (135,136). Yapılan bu araştırmalarda Th2 hücre klonunun pasif transferinin havayolu aşırı duyarlılığını arttırdığı görülmüştür. Th1 hücreleri, Th2 hücre gelişimini inhibe edebilir ancak Th2 efektör hücrelerinin fonksiyonunu inhibe edemez. Aynı şekilde Th2 hücreleri de, Th1 hücrelerinin gelişimini inhibe edebilmektedir (85).

İmmun cevapta Th1/Th2 dengesini etkileyen faktörler sırasında; antijen tipi, antijenin dozu, duyarlılaştırma yolu, antijen sunan hücrenin fonksiyonu, farklı tip kostimulatör moleküllerin seçici aktivasyonu, lokal olarak üretilen sitokin mikroçevresi, bireyin genetik yapısı ve enfeksiyonlar sayılabilir (129).

4.4.3. HİJYEN HİPOTEZİ

Son yıllarda özellikle sanayileşmiş bölgelerde çocukluk çağı astımı ve allerjik hastalıklarda rahatsız edici boyutta bir artış söz konusudur (137). Batı topluluklarındaki bu belirgin artışın sadece genetik faktörler ya da tanı olanaklarındaki iyileşme ile açıklanmasının pek mümkün olmadığı vurgulanmakta, çevresel faktörlerin, özellikle batılılaşmış yaşam biçiminin önemli rol oynadığı düşünülmektedir (138). Astım ve diğer allerjik hastalıklardaki prevalans artışının nedeni ile ilgili olarak en etkileyici açıklama ilk kez 1989 yılında David Strachan tarafından yapılmıştır (139). Strachan'a göre; “Son yüzyıl süresince aile yapısının küçülmesi, ev içi konforundaki iyileşme, kişisel temizlik standartlarında yükselme, ailedeki genç bireyler arasında çapraz enfeksiyonları azaltmıştır. Bu durum, atopik hastalıkların yaygınlaşmasına neden olabilir.” Hijyen hipotezi” olarak adlandırılan bu açıklama, 17 414 İngiliz çocuk ile yapılan bir çalışmada evdeki çocuk sayısı ile saman nezlesi arasında negatif korelasyonun gösterilmesinden sonra gündeme gelmiştir (139). Bu bulgu daha sonra yapılan birkaç epidemiyolojik çalışma ile doğrulanmıştır. Başlangıçta hijyen hipotezinin en önemli dayanağı, allerjik hastalık prevalansı ile artmış enfeksiyon yükünün dolaylı belirleyicileri arasındaki negatif korelasyonun gösterildiği epidemiyolojik çalışmalar olmuştur (140,141). Aynı yıllarda, yaşamın erken döneminde bağışıklık sisteminin gelişimi üzerine yapılan çalışmaların, bu hipotezin biyolojik temellerini oluşturan veriler sağladığı bildirilmektedir. Hipoteze göre yaşamın erken dönemindeki olaylar (özellikle enfeksiyon), bağışıklık sisteminin gelişmesinde temel rolü oynamaktadır (142,143).

Hijyen hipotezinin immünolojik temelinde Th-1 ve Th-2 T hücrelerin rol oynadığı iki ana immünolojik yoldan söz edilmektedir. Bu iki efektör hücre grubu karşılıklı

inhibitör ve regülatör özelliklere sahiptir. Çevresel faktörlerin, özellikle çocukluk döneminde sistemik enfeksiyonların varlığı ya da yokluğunun genetik yatkınlığı olan çocuklarda dominant Th hücre fenotipinin belirlenmesinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (144). Th-1 ve Th-2 hücreler, ya gecikmiş hücresel yanıt ve düşük serum IgG düzeyi (Th-1) ya da yüksek IgE düzeyi, eozinofili, atopi, hava yolu aşırı duyarlılığı (Th-2) ile sonuçlanan sitokin ve kemokin etkileşim sürecini başlatır (145). Th-2 hücreler IL-4, IL-5, IL-10 üretirken, Th-1 hücrelerde antagonistik sitokinler üretilmektedir (IFN- γ , lenfotoksin , IL-2) ve bu sitokinler, mikrobiyal antijenlere bir yanıt olarak yapılmaktadır. Gebelik süresince, doğumda ve yaşamın ilk aylarında Th-2 bağışıklık yanıtı baskındır (146). Yaşamın erken döneminde mikrobiyal ajanlar, özellikle intraselüler patojenler, bağışıklık sisteminin doğuştan var olan hücrelerinden olan makrofajlardan IL-12 üretimine neden olur. IL-12, Th-1 hücrelerin ayrımlaşmasında gerekli en önemli faktördür. Bu sitokinin üretiminin mikroorganizmalar tarafından tetiklenmesi, başarılı bağışıklık yanıtının başlangıcında anahtar belirleyicidir. Hijyen hipotezine göre eğer IL-12 üretimi, çocukluk çağında ilk sistemik enfeksiyonun erken evresinde meydana gelmezse Th-2 hücreler baskın olacak ve genetik olarak yatkın çocuklarda atopi gelişecektir (138). Başka bir deyişle Th-1 yolunu güçlendirecek enfeksiyonlara maruziyetin engellenmesi, allerjik hastalık riskini artıracaktır. Hijyen hipotezinin atopi prevalansındaki artış eğilimini açıklayabildiği belirtilmekle birlikte, astım için kanıtların atopideki kadar belirgin olmadığı vurgulanmaktadır (147). Ancak allerjik astımda diğer allerjik hastalıklarda ortaya çıkan immünolojik mekanizmalar söz konusu olduğundan astım prevalansındaki artışta da aynı faktörlerin rolü olması beklenir. Literatür incelendiğinde, hipotezin ileri sürdüğü gerekçelerle ilişkili olduğu düşünülen pek çok çevresel faktörün ele alındığı dikkati çekmektedir. Bu faktörlerden bir tanesi ailenin büyüklüğüdür (148). Aile içinde kardeş sayısının fazla olmasının koruyucu etkisi olduğu ileri sürülmektedir. Kreşlerin çocuklarda sonradan gelişen atopi ve allerjik hastalıklar üzerindeki etkisi, astım gelişimini etkileyen faktörlerden biri olarak bilinmektedir (149). Bir araştırmada yaşamının birinci yılı içinde (6-11 ay) kreşe verilen, küçük ailelerden gelen çocuklarda, 1 yaşından sonra verilenlere göre geç dönemde (5-14 yaş) atopi ve saman nezlesi prevalansının daha düşük olduğu saptanmıştır (150). Bireylerin sosyoekonomik

durumları astım ve atopi gelişiminde önemli faktörlerden bir tanesidir. Avrupa'da sosyoekonomik düzeyi düşük olanlarda ve büyük ailelerde allerjik hastalıkların daha az olduğunun saptanması, batılı yaşam biçimine geçiş sonucu küçülen aile yapısının atopi ve astımdan koruyucu etkiyi (bebeğin bağışıklık sistemini uyaracak enfeksiyona maruz kalmasını) ortadan kaldırdığı teorisini güçlendirmektedir (151,152).

4.5. İMMÜNÖTERAPİ

Allerjik ve astım hastalıkları sanayileşmenin yoğun olarak görüldüğü ülkelerde büyük sağlık problemleri olarak raporlandırılmaktadır. Ülke popülasyonlarının yaklaşık %20-30 tip I allerjik semptomlarından rinit, konjunktivitis, atopik dermatit ve bronşial astım hastası olarak tespit edilmiştir (8,153). Bu hastalıkların morbidite ve mortalitenin en büyük nedenlerinden biri olduğu gösterilmiştir. Atopik hastalar rahatsızlıkları ile ilgili büyük sosyoekonomik problemlerle karşı karşıya kalmaktadırlar. Sağlık problemleri için maddi olarak ağır yük altına girmek zorunda kalmaktadırlar (154). Bu tip hastalıklarda birey zararsız çevresel antijenlere karşı allerjen-spesifik IgE üretirler. Sensitize olmuş birey tekrar aynı allerjen ile karşılaştıklarında efektör hücreler üzerinde bulunan ve IgE bağlanmış bulunan FcER I arasında çapraz reaksiyona ve anafilaktik mediatörlerin salınımına neden olmaktadır. Antihistaminikler, kortikosteroidler, bronkodilatörler ve anti-IgE antikor terapileri gibi allerjik hastalıklarda kullanılan ilaçlar oluşan inflamatuvar reaksiyonları önlemede kullanılmakta fakat hastalık semptomlarını azaltmak için bireyin uzun süreli ilaç kullanması gerekmektedir (155). Allerjen –spesifik immünoterapi (SIT) sadece allerjik rahatsızlıkların semptomlarının tedavisinde kullanılmaktadır. Özellikle böcek venom allerjik reaksiyonlarında oldukça başarılı olduğu gösterilmiştir ve hastaların allerjik rinitleri güçlenmiştir. Fakat diğer kompleks allerji sendromlarında örneğin ekzema, besin ve küf allerjik sendromlarında aynı başarıyı gösterememiştir (156). Bu durum allerjik hastalıkların tedavisinde daha etkili bir tedavi için yeni terapatik ajanların ve stratejilerin bulunması gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Fakat yeni tedavi stratejilerinin bireylerin yaşam kalitelerini yükseltmeli ve allerjik hastalıkların tedavisi için yaptıkları yıllık masraflarını azaltması gerekliliği göz önünde bulundurulmalıdır (8,74).

İmmünoterapi sonradan ortaya çıkan allerjenlerin neden olduğu semptomların düzeltilmesi için allerjik bireylere miktarı yavaş yavaş artan allerjen ekstratların uygulaması olarak tanımlanmaktadır. Allerjen ekstratlarının standartizasyonu ‘World Healty Organization’ tarafından yapılmış ve allerjen immünoterapisi başlığı altında aşı olarak düzenlemesi yapılmıştır. Allerjen –SIT doğal kaynaklardan var olan allerjen karışımları ile istenmeyen nonallerjik komponentleri içermektedir. Allerjik hastalıklarda immünoterapatik tedavi süresi 3 ila 5 yıl arasında sürebilmektedir (157).

4.5.1. SUBKUTAN İMMUNOTERAPİ

Subkutan İmmünoterapi (SCIT) yaklaşık olarak bu yüzyılda keşfedilmiştir. SCIT böcek venom, ev tozu, çimen, polen ve hayvan epiteli allerjenlerinin neden olduğu allerjik reaksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır (158). SCIT allerjen spesifik deri, burun, göz de meydana gelen densitizasyon veya duyarlanma sonucu meydana gelen semptomları azaltmaktadır. Özellikle SCIT ile Betv1 ve Feld1 allerjenlerine karşı oluşan semptomların azaldığı SCIT uygulanan bireylerde gözlenmiştir. Bu bireylerde IgG4 üretimini artmasına bağlı olarak allerjen spesifik IgE üretimini azaldığı gösterilmiştir (159). Yapılan çalışmalarda SCIT allerjik bireylerde Th1/Th2 cevabını azaltarak IL-10 üretimini arttırmış ve T regülatör hücre farklılaşmasını sağlamıştır. Allerjik-SIT sadece tip I allerjik reaksiyonların iyileştirilmesini sağlar. Çünkü kapasite olarak sadece bu tip reaksiyonların düzeltilmesine kullanılabilir. SCIT’ ten bir terapi yöntemi olarak kullanılmakta fakat SCIT için çoklu injeksiyona ihtiyaç duyulduğu buna bağlı olarak şiddetli ve acı veren etkilere sebep olabileceğini özellikle anafilaksi durumunun oluşabileceğini göz ardı etmemek gerekmektedir. SCIT’in bu etkileri dikkate alındığında SIT için farklı, alternatif, daha güvenli mukozal yollar yapılan çalışmalar sonucu ortaya atılmıştır. Nazal, oral ve sublingual yollar mukozal immünoterapi uygulama yolları olarak ideal olduğu son zamanlardaki çalışmalarla desteklenmiştir (160).

4.5.2. SUBLİNGUAL İMMUNOTERAPİ

Allerjik hastalıkların tedavisinde kullanılan SCIT'den sonra son yıldan daha fazla bir süre önce yeni bir immünoterapi yöntemi olan sublingual immünoterapi (SLİT) uygulanmaya başlandı (160). 1980'lerde ve 1900'lerde yapılan ilk çalışmalarla sublingul terapinin daha güvenli ve etkin olduğuna dair veriler elde edilmiştir (161). Son 20 yılda yapılan çalışmalar allerjik hastalıkların tedavisinde kullanılan SLIT'in güvenilirlik ve etkinlik konusunda daha başarılı olduğuna dikkatleri çekmişlerdir. Wilson ve arkadaşlarının yayınladığı meta-analiz sonuçlarına göre SLIT anlamlı olarak hastalardaki allerjik rinit semptomlarını ile ilaç kullanma gereksinimlerini azalttığını göstermişlerdir (161). 2006 yılında Calamita ve arkadaşlarının yayınladığı çalışmada SLİT'in astım tedavisinde de güvenilir ve tekin olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmada astımlı bireylerde SLIT tedavisine bağlı olarak ilaç kullanımı azalmış, tedavi sürecinin başlangıcına göre solunumu testleri normal düzeye yaklaşmıştır. SLİT tedavisinin en dikkat çekici özelliği güvenilir olmasıdır. Son 20 yıldır SLIT ile yapılan klinik denemelerde ciddi sistemik reaksiyonlar gözlenmemiştir (162).

SLIT immünizasyonu boyunca allerjen ekstratı dil altında 1-2 dakika bekletilir. Böylece allerjenin oral Langerhans benzeri hücreler tarafından yakalanması sağlanmış olur. SLIT'in biyolojik mekanizması hala açıklanmaya çalışılmaktadır. Kesin olarak bilinenlerin yanında hala açıklanamamış noktalarda mevcuttur. 4-6 hafta titrasyon fazından sonra maksimum doza ulaşılır ve haftada bir kez uygulama ile tedavi süreci devam eder. SLIT'in yapılan çalışmalarda polen ve HDM na karşı duyarlı bireylerde üretilen allerjen spesifik IgE seviyesinin düştüğü ve IgG4 seviyesinin arttığı gösterilmiştir. IgE seviyesinin düşmesine bağlı olarak bazofil ve monosit degranulasyonunun önlendiği gösterilmiştir. SLIT hedef organlarına (göz, burun vs.) allerjen duyarlılaşmasına neden olan inflamatuvar hücrelerinin yerleşmesini engeller (163,164,165). SLIT ile çimen ve ev tozu allerjenlerine karşı üretilen inflamatuvar mediatörlerin azalmasını sağlar. ICAM I 'in epitel hücreler üzerinde eksprese edilmesini SLIT tedavisi ile azaltılmıştır (166,167). Ayrıca nazal mukozaya nötrofil ve eozinofil yerleşimini azaltmaktadır. SLIT HDM allerjisi olan

hastalarda Th2 sitokinlerinden IL-13 üretimini azaltır ve periferel kan mononükleer hücrelerin proliferasyonunu azaltır (168,169,170). Ayrıca SLIT ile HDM allerjisi olan hastalarda T hücrelerinden IL-10 sitokininin üretilmesini tetiklemektedir. SLIT tedavisi ile immunoterapi uygulamaların sıklıkla karşılaşılan yeni sentisizasyonların gelişimini astım ve rinitte engellemektedir.

ARIA'nın en son yayınladığı yayınlarda SLIT'in astım, allerjik rinit gibi allerjik hastalıklarda daha efektif olduğuna dair güçlü kanıtlar gösterilmiştir. Fakat hala SLIT mekanizması hakkında açıklanması gereken noktalar bulunmaktadır. Bu sebeple SLIT ile ilgili daha çok çalışma yapılması gerekmektedir (160).

4.6. Luminex Yöntemi

xMAP Teknolojisi Nasıl Çalışır

Luminex, renk kodlu mikroküreleri iki floresan boya ile içten boyamak için patentli teknikler kullanmaktadır. Bu boyaların kusursuz konsantrasyonları ile her biri ayrı bir biyodeneye spesifik reaktifler ile kaplanabilmektedir. Böylece 100 farklı boncuk kümesi elde edilmiş olur. Reaktifler antijen, antikor, oligonükleotit, enzim, substrat veya reseptör içerebilir. Boncuk tarafından test örneğinden bir analit yakalandığında, farklı bir floresan boya ile etiketli raporör molekül her bir mikroküre üzerinde reaksiyonu tamamlamak için devreye sokulmaktadır.

Daha sonra mikroküreler büyük bir hızla, işaretlemek amacı ile kendilerine emdirilmiş olan boyaları uyaran/tanımlayabilen, bir lazerin önünden geçerler. İkinci bir lazer ise raporör molekül üzerindeki flöresan boyayı uyarır. Son olarak yüksek hızlı dijital sinyal işlemcileri her bir mikroküreyi tanımlar ve floresan raporör sinyalleri sayesinde mikrokürenin ait olduğu biyo deneyin sonucunu kantitatif olarak ölçer.

Uygulamalar

İlaç Araştırmaları/Genomik

- Farmakogenomik uygulamalar için single nucleotide polymorphism (SNP) teşhisi
- Transkripsiyonel profilendirme ile ekspresyon analizi

İlaç Araştırmaları/Proteomics

- Kinaz ve proteaz gibi enzimatik hedeflerin inhibisyonu ile potansiyel ilaç bileşenlerini yüksek şekilde verimli taraması
- İlaç adaylarının yaygın kinazlara karşı kinaz seçiciliğinin taranması
- Hayvan ve insan klinik deneklerde serum analitlerinin ölçümü
- Toksikoloji ve ilaç metabolizması çalışmalarında kullanılmak üzere ilaç ve ilaç metabolitlerinin çoklu analit profilendirilmesi
- Reseptör-ligand analizleri ile ilaç hedefinin doğrulanması

Diagnostik

- Kistik fibroz gibi genetik yolla geçen hastalıkların taranması
- Hepatit gibi enfektif hastalıkların serolojik olarak taranması
- Hormon seviyelerinin çoklu olarak profilendirilmesi
- Transplantasyon için HLA tiplendirmesi
- Çoklu otoimmün ve allerji testleri

Temel Araştırma

- Gen ekspresyon analizi
- Genotiplendirme
- Protein ekspresyon analizi
- Antikor avidite analizi
- Hayvan modeli serum analitlerinin profilendirilmesi
- Antikor epitop haritalandırması
- Enzim/substrat araştırmaları
- Protein-protein etkileşim analizleri

5. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Allerji ve İmmünoloji Bilim Dalı'nda yapılmıştır. Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu'ndan 17.03.2008 tarih ve B.30,2.MAR.0.01.02/AEK/132 sayılı rapor ile onay almıştır. Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi (BAPKO) tarafından SAG-C-YLP-030408-0070 nolu yüksek lisans projesi olarak desteklenmiştir.

Çalışmanın ana basamakları

- 1- Çalışmaya alınacak hastaların klinik kriterleri ve takibi
- 2- Çalışma grupları
 - a. Grupların belirlenmesi
 - b. Protokol
- 3- Hastalardan venöz kan alımı ve PKMH İzolasyonu
- 4- İzole edilen PKMH' den ASH ve CD4⁺ T lenfosit izolasyonu
- 5- Hücre kültürü
- 6- Hücre kültür süpernatantlarında IL-5, IL-10, IL-13 ve IFN- γ sitokin düzeyinin ölçülmesi.

5.1. Çalışmaya alınacak hastaların klinik kriterleri ve takibi

Bu çalışmaya, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Allerji-İmmünoloji Bilim Dalı'nda takibe alınan, 5-10 yaş arası, en az bir yıldır astım tanısı ile izlenen ev tozu akarlarına (Dermatophagoides Farinae (Der f 1)) ve(Dermatophagoides Pteronyssinus (Der p 1)) duyarlı çocuklar dahil edilmiştir.

Çalışmaya katılan hastaların şikayetleri 1 ay süre ile yakından takip edildi. Bu dönemde şikayetleri ve kullandıkları ilaçlar takiplerini yapan uzman doktor tarafından günlük kartına kaydedilmeye başlandı. Aynı dönemde hastalar randomize olarak iki gruba ayrıldı. Her iki grupta 5'er hasta olacak şekilde gruplara yerleştirildi. Tedavi

döneminde hastalar tedaviye bağlı şikayetlerini ayrı bir takip kartına kaydettiler. Böylece tedavinin yan etkileri uzman doktor tarafından değerlendirilmiş oldu.

Çalışmaya Alınma Kriterleri

1. Ev tozu akarına karşı gerekli çevresel önlemlerin alınmasına ve uygun inhale kortikosteroid tedavisine rağmen astım semptomlarını kontrol altına alınabilmesi için inhale kortikosteroid tedavisine gereksinim duymak.
2. Allerji deri testinde Der p 1- Der f 1 pozitifliği (>3mm endürasyon) gösterilmiş olması
3. En az bir yıldır antienflamatuar tedaviye (inhale steroidler) rağmen astım semptomları devam etmesi veya ilacın kesilememesi
4. Daha önce immünoterapi almamış olması
5. Başka herhangi bir kronik hastalığının olmaması
6. 5 yaşından küçük ve 10 yaşından büyük olmamak
7. En az 2 yıldır Pediatrik Allerji-İmmünoloji polikliniğimizde persistant astım tanısı ile takipte olmak.
8. FEV1> %80 olması.

5.2. Allerji Deri Testi Uygulaması

Allerji deri testi hastaların tümünün ön kolun iç yüzeyinden uygulandı. Allerjen olarak ev tozu akarları Der p 1 ve Der f 1, polen, çimen ve havyan epiteli solüsyonları kullanıldı (ALK-Abello). Erken faz cilt reaksiyonu allerjenler yerleştirildikten 15 dakika sonra değerlendirildi. Deride meydana gelen endürasyonun çapı ölçülerek >3mm üstü anlamlı kabul edildi.

Çalışmaya alınan hastalar allerji deri testi sonucunda Der p 1 ve Der f 1 allerjenine karşı duyarlı olup, kullanılan diğer allerjenlere karşı duyarlılıkları tespit edilmemiştir.

5.3.Çalışma Grupları

Çalışmaya Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Allerji- İmmünoloji Bilim Dalı polikliniğinde takipli ve astım tanısı almış 4-10 yaş arası 10 hasta seçildi.

Çalışmaya alınma kriterlerine uyan hastalar her grupta 5 hasta olacak şekilde rastgele olarak iki gruba ayrıldı. Grup I olarak kodlandırılan '**Sublingual immunoterapi Grubu (SLİT)**'na alınan hastalara tedavi amacı ile farmakoterapi ve sublingual immünoterapi verildi. Grup II olarak kodlandırılan '**Farmakotx Grubu**'na ise tedavi amacı ile sadece farmakoterapi verildi. Çalışmaya alınan hastaların demografik özellikleri Tablo 5.1'de verilmiştir.

Tablo 5.1 Demografik Data

	GRUP I (İMMUNOTERAPİ GRUBU)	GRUP II (KONTROL GRUBU)
Toplam Hasta Sayısı	5	5
Cinsiyet (Kız/Erkek)	2/3	3/2
Yaş Ortalaması	7,6 (6-10)	7,2 (4-9)
Çalışmadan Ayrılan Kişi Sayısı	-	-
Duyarlı olunan allerjen	Der p 1 Der f 1	Der p 1 Der f 1

5.4. Çalışma Protokolü

SLİT grubu (Grup I) ve Farmakotx grubu (Grup II)' ndaki hastalar randomize olarak belirlendikten sonra tedavi süreçleri başlamıştır. Grup'I deki hastalara farmakoterapi ile birlikte SLİT tedavisi verilirken; Grup II' deki hastalara sadece farmakoterapi verilmiştir.

Çalışmaya alınan tüm hastalardan çalışmaya başlamadan önce ve çalışmanın 8. ayında üç farklı kültür yapılmıştır.

Birinci kültürde çalışmanın 0. ayında ve 8. ayında yapılan birinci kültürde tüm hastalardan izole edilen PKMH'lerden 6×10^5 hücre alındı. Hücre kültür plağına her bir hastadan alınan 6×10^5 PKMH'ler ayrı ayrı Der p 1 ($10\mu\text{g/ml}$), Betv 1($10\mu\text{g/ml}$) ve PHA ($5\mu\text{g/ml}$) antijenleri ile kültüre edildi. Kültürün beşinci gününde toplanan süpernatantlarda IL-5, IL-10, IL-13 ve IFN- γ sitokin düzeylerine lüminex yöntemi ile bakıldı.

İkinci kültürde çalışmanın 8. ayında Grup I den izole edilen ASH ile Grup II den izole edilen CD4^+ T hücresi 1:3 oranında Der p 1 ($10\mu\text{g/ml}$) antijeni ile birlikte kültüre kondu. Her bir kuyuya $500\mu\text{L}$ de toplam 6×10^5 olacak şekilde hücre konuldu. Kuyuların son hacmi $500\mu\text{L}$ ye tamamlandı. Kültürün beşinci gününde toplanan süpernatantlarda IL-5, IL-10, IL-13 ve IFN- γ sitokin düzeylerine lüminex yöntemi ile bakıldı.

Üçüncü kültür çalışmanın 8. ayında Grup II den izole edilen ASH ile Grup I den izole edilen CD4^+ T hücresi 1:3 oranından Der p 1 ($10\mu\text{g/ml}$) antijeni ile birlikte kültüre edildi. Yapılan kültürlerdeki her bir kuyuya $500\mu\text{L}$ de toplam 6×10^5 olacak şekilde hücre konuldu. Kuyuların son hacimleri $500\mu\text{L}$ ye tamamlandı. Kültürün beşinci gününde toplanan süpernatantlarda IL-5, IL-10, IL-13 ve IFN- γ sitokin düzeylerine lüminex yöntemi ile bakıldı.

Kültür plakları 37^0 C 'de CO_2 'li etüvde 5 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonunda toplanan süpernatantlarda IL-10, IL-13, IL-5, IFN- γ sitokin düzeyleri Luminex yöntemi ile ölçüldü. Çalışmamızın protokolü Tablo 5. 2' verilmiştir.

Tablo 5.2 Çalışma Protokolü

GRUPLAR	SÜRE	1. HÜCRE KÜLTÜRÜ	İZOLASYON	TEDAVİ	SÜRE	2. HÜCRE KÜLTÜRÜ	3. HÜCRE KÜLTÜRÜ
Grup I (SLİT)	0. ve 8. ay	PKMH kültürü	PKMH izolasyonu ardından ASH ve CD4 ⁺ T hücre izole edildi.	SLİT ve farmakoterapi	8.ay	Grup I ASH ile Grup-II CD4 ⁺ T kültürü	Grup II ASH ile Grup-I CD4 ⁺ T kültürü
Grup II (Farmakotx)			PKMH izolasyonu ardından ASH ve CD4 ⁺ T hücre izole edildi.	Farmakoterapi			

1. kültürlerde Der p 1, PHA ve Betv1 antijenleri uyaran olarak kullanılmış, 2. ve 3. kültürlerde ise Der p 1 antijeni uyaran olarak kullanılmıştır.

5.5. Kandan PKMH İzolasyonu

Çalışmaya alınan hastalardan EDTA'lı tüplere 10 cc venöz kan alındı. Hastalardan alınan kandan PKMH izolasyonu yapılmak üzere steril ortam olan UV kabinine alınan kan örnekleri steril 50 ml'lik falkon tüplerine aktarıldı. PKMH izolasyonu fikal ayırma yöntemi ile yapıldı.

5.5.1. PKMH İzolasyon Protokolü

1. Steril falkon tüplere alınan kan örnekleri 1/1 oranında steril PBS ile sulandırıldı.
2. Her hasta için ayrı steril 50 ml'lik falkon tüp alınarak hastalara göre kodlandı. Her tüpe 3 cc steril fikol ayırıcı eklendi.
3. PBS ile volümü arttırılan kan örnekleri hastalara uygun olarak kodlanmış falkon tüplerde bulunan fikol üzerine steril pastör pipeti kullanılarak yayıldı. Bu işlem sırasında kan örneği ile fikolün karışmaması için yayma işlemi yavaşça gerçekleştirildi.
4. Yayma işlemi tamamlandıktan sonra tüpler 20 dakika 2000 rpm devirde santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonrasında tüpler steril UV ortamına alındı. Her kodlanmış tüp ile aynı kodu taşıyan yeni steril 15 ml'lik falkon tüpler hazırlandı.
6. Santrifüj işlemi sonrasında tüplerin ortasında toplanmış olan buffy-coat kısmı hazırlanmış yeni falkon tüplere alındı.
7. Tüplere hücre kültür mediumu RPMI 1640 %10 FCS konularak 1500 rpm de 10 dakika santrifüj edilerek yıkama işlemi yapıldı.
8. Santrifüj işlemi sona erdikten sonra tüplerin üstleri boşaltıldı ve çökmüş olan lenfositler kaldırılarak yıkama işlemi 2 kez hücre kültür mediumu ile tekrarlandı.
9. Son yıkama işleminden sonra hücreler 1ml'ye hücre kültür mediumu ile tamamlandı.
10. 1 ml'deki lenfosit sayısı tayini için lenfosit süspansiyonundan 10µL alınarak 10µL Tripan mavisi ile karıştırıldı.
11. Boyayı içine almamış ve şişmemiş lenfositler canlı olarak nitelendirilerek Thoma lamında 16 büyük kare 40x'lık büyütme altında sayıldı.
12. Çıkan sayı 2×10^4 ile çarpılarak lenfosit sayısı belirlendi. Hücre kültüründe kullanılmak üzere 5×10^6 'lık lenfosit süspansiyonu hazırlandı.

RPMI 1640 hazırlama Protokolü

1. 500 mL'lik Fetal Calf Serum (FCS) 56⁰ C'de 30 dak. bekletilip inaktivasyonu sağlandıktan sonra içine 50mL L-glutamin eklendi.
2. FCS ve L-glutamin karışımı 50'lik falcon tüplere ayrılarak -20⁰ C de saklandı.
3. 450 mL hazır RPMI 1640 solüsyonu içine 50 mL FCS+L-glutamin eklendi.
4. 5 mL sodyum pürivat eklendi.
5. 5 mL ampisilin eklendi.
6. 2,5 mL gentomisin eklendi.

5.6. İzole edilen PKMH'den ASH ve CD4⁺ T Lenfosit İzolasyonu

Her hastadan izole edilen PKMH'ler sayıldıktan sonra toplam hücre popülasyonlarından magnetik boncuklar ile Automacs aleti kullanılarak ASH ve izolasyon sonrası geride kalan hücre popülasyonundan ise spesifik magnetik boncuklarla CD4⁺ T hücre izolasyonu yapıldı. Resim 5.1'de kullanılan Automacs cihazının görüntüsü verilmiştir.

5.6.1. PMBC'den ASH İzolasyonu

1. Ayrılan PKMH MACS rinsing buffer ile 300 x g de 10 dakika santrifüj edilerek yıkama işlemine tabi tutuldu.
2. Santrifüj işleminden sonra tüplerin üst kısmında toplanan sıvı kısım atıldı. Dibe çöken hücreler kaldırıldı. Hücreler üzerine 80µL buffer eklendi.
3. Süspansiyonun üzerine 20µL MACS HLA-DR Microbeads eklenerek homojen olarak karışması sağlandı. 4 -8⁰ C de 15 dakika inkübe edildi.
4. Hücreler toplam hacmin 1-2 mL kadar rinsing buffer ile 300 x g de 10 dakika santrifüj edilerek yıkandı.

5. Santrifüj işleminden sonra üstte toplanan sıvı kısım atılarak dibe çöken hücreler kaldırıldı.
6. Son hacim 500µL ye rinsing buffer ile tamamlandı.
7. HLA- DR⁺ hücrelerin pozitif seleksiyonu için Automacs aleti kullanıldı. ‘Possel’ programı seçilerek ‘Pos1’ kısmından mikrobead ile işaretlenmiş HLA- DR⁺ hücrelerin seçimi yapıldı.

5.6.2. PKMH’den CD4⁺ T Hücre İzolasyonu

1. Ayrılan PKMH MACS rinsing buffer ile 300 x g de 10 dakika santrifüj edilerek yıkama işleminin tabi tutuldu.
2. Santrifüj işleminden sonra tüplerin üst kısmında toplanan sıvı kısım atıldı. Dibe çöken hücreler kaldırıldı. Hücreler üzerine 80µL buffer eklendi.
3. Süspansiyonun üzerine 20µL MACS CD4⁺ T Microbeads eklenerek homojen olarak karışması sağlandı. 4° -8° C de 15 dakika inkübe edildi.
4. Hücreler toplam hacmin 1-2 mL kadar rinsing buffer ile 300 x g de 10 dakika santrifüj edilerek yıkandı.
5. Santrifüj işleminden sonra üstte toplanan sıvı kısım atılarak dibe çöken hücreler kaldırıldı.
6. Son hacim 500µL ye rinsing buffer ile tamamlandı.
7. CD4⁺ T hücreler automacs aleti kullanılarak ‘Depletes’ programı seçilerek ‘neg1’ kısmından mikrobead ile işaretlenmemiş CD4⁺ T hücreleri alındı, ‘Pos1’ kısmından ise CD4⁺ T hücreleri alınmış oldu.

5.7.Hücre Kültürü

1. Kültür

Hücre kültürü 48 kuyulu steril düz tabanlı hücre kültür plaklarında yapıldı. Çalışmanın 0. ayında ve 8. ayında yapılan birinci kültürde tüm hastalardan izole edilen PKMH’lerden 6 x 10⁵ hücre alındı. Hücre kültür plağına her bir hastadan

alınan 6×10^5 PKMH'ler ayrı ayrı Der p 1 (10µg/ml), Betv 1(10µg/ml) ve PHA (5µg/ml) antijenleri ile kültüre edildi. Kültürün beşinci gününde toplanan süpernatantlarda IL-5, IL-10, IL-13 ve IFN-γ sitokin düzeylerine luminex yöntemi ile bakıldı.

Tablo 5.3 PKMH kültür şeması

GRUP	HÜCRE	UYARAN (DOZ)
Tüm Hastalar	PKMH	Der p 1 (10µg/ml)
		PHA (5µg/ml)
		Betv 1 (10µg/ml)
		Us

1. Kültür 0. ay ve 8. ayda yapıldı.

İkinci Kültür

Hücre kültürü 48 kuyulu steril düz tabanlı hücre kültür plaklarında yapıldı. Çalışmanın 8. ayında Grup I den izole edilen ASH ile Grup II den izole edilen $CD4^+$ T hücresi 1:3 oranında Der p 1 (10µg/ml) antijeni ile birlikte kültüre kondu. Her bir kuyuya 500µL de toplam 6×10^5 olacak şekilde hücre konuldu. Kuyuların son hacmi 500µL ye tamamlandı. Kültürün beşinci gününde toplanan süpernatantlarda IL-5, IL-10, IL-13 ve IFN-γ sitokin düzeylerine luminex yöntemi ile bakıldı.

Üçüncü Kültür

Hücre kültürü 48 kuyulu steril düz tabanlı hücre kültür plaklarında yapıldı. Çalışmanın 8. ayında Grup II den izole edilen ASH ile Grup I den izole edilen $CD4^+$ T hücresi 1:3 oranından Der p 1 (10µg/ml) antijeni ile birlikte kültüre edildi. Yapılan kültürlerdeki her bir kuyuya 500µL de toplam 6×10^5 olacak şekilde hücre konuldu. Kuyuların son hacimleri 500µL ye tamamlandı. Kültürün beşinci gününde toplanan süpernatantlarda IL-5, IL-10, IL-13 ve IFN-γ sitokin düzeylerine luminex yöntemi ile bakıldı.

Kültür plakları 37⁰ C’de CO₂’li etüvde 5 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonunda toplanan süpernatantlarda IL-10, IL-13, IL-5, IFN- γ sitokin düzeyleri Luminex yöntemi ile ölçüldü Tablo 5.4 de yapılan 2. ve 3. kültür şemaları gösterilmiştir.

Tablo 5.4 ASH ve CD4⁺ T hücre kültürleri

	KONTROL	SLİT	UYARAN (DOZ)
2. Kültür	CD4	+ ASH	Der p 1 (10µg/ml)
3. Kültür	ASH	+ CD4	Der p 1 (10µg/ml)

2. Kültür ve 3. Kültür tedavinin 8. ayında izole edilen hücreler ile yapıldı.

5.8 Hücre Kültür Süpernatantlarında IL-10 Sitokin Düzeyinin Luminex Sistem Yöntemi İle Ölçülmesi

Multipleks yöntemi geleneksel ELİSA yönteminden geliştirilmiştir. Multipleks yönteminde amaç az miktarda çalışılan örnek ile eş zamanlı olarak multipli sitokin düzeylerini tesbit edebilmektir. Flow sitometri kökenli olmakla birlikte farklı bir sistemdir. Multipleks yöntem ile yüksek seviyede güvenilir analiz yapılabilmektedir. ELİSA yöntemine göre daha az örnek volümü ile çalışılabilir ve aynı anda çoklu sitokin düzeyi ölçümü daha ekonomik şekilde yapılabilir. Eş zamanlı sitokinlerin analizinin yapılması ekonomik olduğu kadar araştırmacılara zamandan da tasarruf etmelerine olanak sağlamaktadır. Koşulların aynı kalması şartı ile sitokin panelleri analiz edilen örneklerle aynı sitokin düzeylerinin analizleri yapılabilir. xMAP teknolojisinden geliştirilen Lumineks 100 IS sistemi esnektir ve flow sitometri ilkesi ile paralellik göstermektedir. Lumineks 100 IS sistemi 3 farklı teknolojinin kombinasyonundan oluşmaktadır. İlk teknoloji 100 farklı seçenekte ve 5.6 mikron ölçekli florasan boyama yapabilen teknolojidir. İkincisi ise flow sitometrik temelli

olan aletlerden oluşmaktadır. Lazer, optik ve yüksek seviyede digital sinyal işlemcisi özelliklerine sahiptir. 3. teknolojisi ise IS 2.3 software analiz teknolojisidir.

Luminex® Corporation fen bilimleri endüstrisi ve klinik tanıda kullanılmak üzere yenilikçi xMAP® teknolojisi uygulamalarını geliştirmekte, üretmekte ve pazarlamaktadır. Açık bir tasarım olan xMAP teknolojisi biyolojik testlerin çoklandırılmasını (multiplexing) ve geleneksel metotlara kıyasla zaman, işçilik ve maliyette azalma sağlamaktadır.

xMAP teknolojisi kullanılan sistemler, daha sonra kompakt bir analizörde değerlendirilmek üzere, mikro küre olarak bilinen renk kodlu boncukların yüzeyinde farklı biyodeneşler gerçekleştirmektedir. Analizör, birden fazla lazer ve yüksek hızlı dijital sinyal işlemcisi yardımı ile çoklu deneyleri okumaktadır.

Çalışmamızda güvenilir olan ve geleneksel yöntemlere göre daha hızlı ve ekonomik sonuç alabilmek için kültürlerden elde edilen örneklerde IL-5, IL-10, IL-13, IFN- γ sitokin düzeyleri Luminex yöntemi ile analiz edilmiştir. Resim 5.2’de kullanılan luminex cihazının görüntüsü verilmiştir.



Luminex® 200™ Total System LX200-IS2.3WB

Resim 5.2 Luminex Cihazı

5.9. İstatistik Değerlendirme

Yapılan üç kültür sonunda toplanan supernatanlarda saptanan IL-5, IL-10, IL-13 ve IFN- γ sitokin düzeylerinin karşılaştırması Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı. İstatistiksel değerlendirmeler SPSS (Release 5.0.1-SPSS Inc., 1989 to 1992) paket programı kullanılarak yapıldı.

Yapılan karşılaştırmalarda p değeri ≤ 0.05 bulunduğunda, gruplar arasında fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

Çalışmaya Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Allerji- İmmünoloji Bilim Dalı Polikliniği'nde takipli ve astım tanısı almış 4-10 yaş arası 10 hasta seçildi.

Çalışmaya alınan hastaların 1 ay şikayetleri yakından takip edildi. Bu dönemde şikayetleri ve kullandıkları ilaçlar takiplerini yapan uzman doktor tarafından günlük kartına kaydedilmeye başlandı. Çalışmaya alınan hastalara allerji deri testi uygulaması yapıldı. Allerji deri test uygulaması sonucu hastaların sadece ev tozuna karşı duyarlı oldukları ve diğer antijenlere karşı duyarlı olmadıkları saptandı. Aynı dönemde basit randomizasyon yöntemiyle hastalar rastgele olarak iki gruba ayrıldı. Her iki grupta 5'er hasta olacak şekilde gruplara yerleştirildiler. Grup I olarak kodlandırılan '**Sublingual İmmünoterapi Grubu**'na alınan hastalara tedavi amacı ile farmakoterapi ve sublingual immünoterapi verildi. Grup II olarak kodlandırılan '**Farmakotx Grubu**'na ise tedavi amacı ile sadece ilaç tedavisi verildi.

Çalışmanın 0. ay ve 8. ayında tüm hastalardan PKMH izolasyonu yapılarak Der p 1, Betv 1, PHA uyaranlarına karşı verdikleri IL-5, IL-10, IL-13 ve IFN- γ sitokin yanıtlarına bakıldı (Birinci Kültür). Kültürün beşinci gününde sitokin yanıtlarına bakmak amacı ile supernatanlar toplandı. Sitokin yanıtları Luminex yöntemi kullanılarak ölçüldü.

Tedavinin 8. ayında SLİT ve Farmakotx grubunda yer alan hastalardan izole edilen PKMH'lerden ASH ve CD4⁺ T hücre izolasyonu spesifik mikrobeadler kullanılarak Automacs aleti ile yapıldı. SLİT grubundan izole edilen CD4⁺ T hücresi ile Farmakotx grubundan izole edilen ASH Der p 1 antijeni kullanılarak hücre kültürü yapıldı (ikinci kültür). SLİT grubundan izole edilen ASH ile Farmakotx grubundan izole edilen CD4⁺ T hücresi Der p 1 antijeni kullanılarak hücre kültürü yapıldı (Üçüncü Kültür).Yapılan kültürlerin beşinci gününde IL-5, IL-10, IL-13 ve IFN- γ sitokin yanıtına bakmak amacı ile süpernatantlar toplandı. IL-5, IL-10, IL-13 ve IFN- γ sitokin seviyesi Luminex yöntemi kullanılarak ölçüldü.

6.1. Hastaların klinik değerleri

Çalışmaya alınan hastalar 8 ay boyunca klinik açıdan takip edilmiştir. Hastalara solunum fonksiyon ve bronkodilatörlü provokasyon testleri yapılarak hastalık semptomları 8 ay boyunca izlenmiştir. Tablo 6.1 da hastaların çalışma başlangıcındaki ve çalışma sonundaki solunum fonksiyon test değerleri Tablo 6.1 de verilmiştir.

Tablo 6.1 Tedavi sürecine göre solunum testi değerleri

				0. ay			8. ay		
	Tedavi	Yaş	Cinsiyet	PRE FEV 1 (%)	PRE PEF (%)	PRE FEF 25-75 (%)	PRE FEV 1 (%)	PRE PEF (%)	PRE PEF 25-75 (%)
1. Hasta	PHARMATX	9	K	101	109	153	97	101	145
2. Hasta	SLİT	7	K	97	72	104	104	89	108
3. Hasta	PHARMATX	8	E	87	92	112	104	100	121
4. Hasta	PHARMATX	4	K						
5. Hasta	SLİT	9	K	123	131	144	128	113	140
6. Hasta	SLİT	6	K	102	88	123	116	98	130
7. Hasta	PHARMATX	8	E	77	81	90	80	72	82
8. Hasta	SLİT	10	E	108	86	96	112	96	92
9. Hasta	SLİT	6	K	105	85	95	110	95	90
10. Hasta	PHARMATX	7	E	108	95	106	104	85	88

6.2 Allerji Deri Testi Sonuçları

Çalışmaya alınan hastalara allerji deri testi yapılmış ve hastaların Der p 1 ve Der f 1'ye olan duyarlılıkları tespit edilmiştir. Hastaların çalışma başlangıcında ve çalışma sonunda Der p 1 ve Der f 1 antijenleri ile yapılan cilt deri testi sonuçları Tablo 6.2' de verilmiştir.

Tablo 6.2 Hastaların Allerji Deri Testi Sonuçları

			0. ay		8. ay	
	Tedavi	Yaş	Der p 1 Çapı (mm)	Der f 1 Çapı (mm)	Der p 1 Çapı (mm)	Der f 1 Çapı (mm)
1. Hasta	PHARMATX	9	10x10	8x8	8x8	8x8
2. Hasta	SLİT	7	13x10	11x7	10x10	4x4
3. Hasta	PHARMATX	8	12x12	16x16	10x10	12x10
4. Hasta	PHARMATX	4	10x10	3x3	8x8	15x15
5. Hasta	SLİT	9	11x10	6x6	8x8	5x5
6. Hasta	SLİT	6	13x13	6x6	10x10	5x5
7. Hasta	PHARMATX	8	10x10	10x5	10x7	10x7
8. Hasta	SLİT	10	10x10	8x8	8x6	6x6
9. Hasta	SLİT	6	5x5	5x5	5x5	5x5
10. Hasta	PHARMA	7	8x8	5x5	6x6	6x6

6.3. PKMH İzolasyonu Sonuçları

Çalışmaya alınan bireylerden 10 ml venöz kan alındı ve Fikol ayırma yöntemi kullanılarak PKMH izolasyonu yapıldı. Hastalardan izole edilen PKMH sayıları değerlendirildiğinde izole edilen PKMH sayılarının mikrobead yöntemi ile PKMH'den ASH ve CD4⁺ T hücresi ayırmak için yeterli olduğu tespit edilmiştir. Hastalara göre PKMH izolasyon sayıları Tablo 6.3'de verilmiştir.

Tablo 6.3 Hastalardan İzole Edilen PKMH Sayıları

KONTROL GRUBU	PKMH SAYISI (ml)
1. Hasta	4,7 x 10⁶
2. Hasta	3,4 x 10⁶
3. Hasta	2,8 x 10⁶
4. Hasta	1,4 x 10⁶
5. Hasta	1,5 x10⁶
İMMUNOTERAPİ GRUBU	
1. Hasta	2,3 x 10⁶
2. Hasta	1,4 x 10⁶
3. Hasta	2,6 x 10⁶
4. Hasta	2,4 x 10⁶
5. Hasta	2,4 x 10⁶

6.4. ASH ve CD4⁺ T Hücre İzolasyon Sonuçları

Her hastadan izole edilen PKMH'lerden HLA-DR mikrobeadleri kullanılarak ASH ve CD4 mikrobeadleri kullanılarak CD4⁺ T hücresi izolasyonu yapıldı. Çalışmamızda izole edilen ASH ile CD4⁺ T hücrelerini Der p 1 antijeni ile hücre kültürü yapıldı. İzole edilen ASH ve CD4⁺ T hücre sonuçlarına göre; bu kültürde ASH:CD4⁺ T hücre oranı 1:3 olarak belirlendi. Hastalara göre toplam PKMH'den izole edilen ASH ve CD4⁺ T hücre sayıları Tablo 6.4' de verilmiştir.

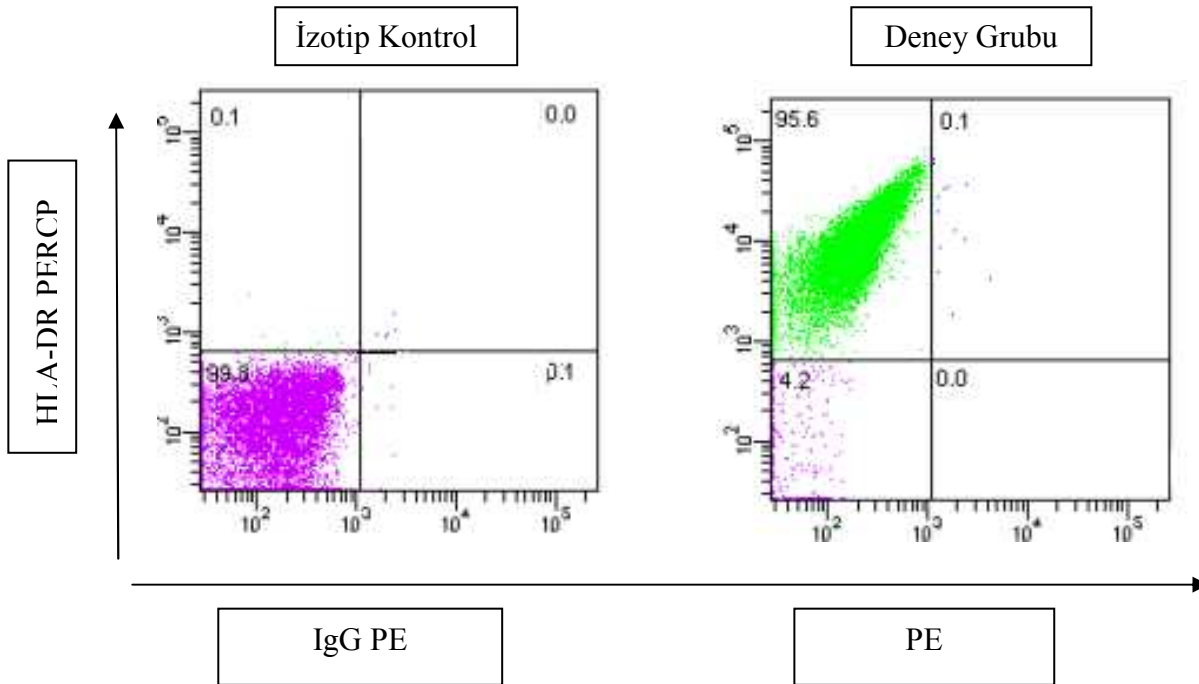
Tablo 6.4 Hastalardan İzole Edilen ASH ve CD4⁺ T Hücre Sayıları

KONTROL GRUBU	ASH Sayısı (ml)	CD4 ⁺ T Hücre Sayısı (ml)
1. Hasta	2,4 x 10 ⁶	1,28 x 10 ⁶
2. Hasta	1,46 x 10 ⁶	3,68 x 10 ⁶
3. Hasta	1,4 x 10 ⁶	6,0 x 10 ⁵
4. Hasta	2,98 x 10 ⁴	8,8 x 10 ⁵
5. Hasta	9,0 x 10 ⁵	7,6 x 10 ⁵
İMMÜNÖTERAPİ		
1. Hasta	1,5 x 10 ⁶	6,6 x 10 ⁵
2. Hasta	8,4 x 10 ⁵	1,54 x 10 ⁶
3. Hasta	1,56 x 10 ⁶	8,6 x 10 ⁵
4. Hasta	1,0 x 10 ⁶	1,14 x 10 ⁶
5. Hasta	1,44 x 10 ⁶	5,2 x 10 ⁵

ASH ve CD4⁺ T Hücre Saflığı

Grup I ve Grup II’ deki hastalardan izole edilen ASH ve CD4⁺ T hücrelerinin saflığını tespit edebilmek için gruplardan izole edilen CD4⁺ T ve ASH’lerden 50 µL’lik örnekler iki ayrı FACS (flow sitometri) tüpüne alındı. Grup I ve Grup II ‘den alınan CD4⁺ T hücrelerin saflığını anti-CD4; ASH’lerin saflığını tesbit edebilmek için anti-HLA-DR eklenerek karanlık ortamda 1 saat bekletildi. Bekleme süresi sonunda anti-CD4 ve anti-HLA-DR’nin eklendiği tüplerdeki CD4⁺ T ve ASH saflıkları FACS aleti kullanılarak tespit edildi. ASH izolasyonunda kullanılan Automacs mikrobeadleri ile elde edilen ASH ve CD4⁺ T hücrelerin saflıkları Şekil 6.1 ve 6.2’de gösterilmiştir.

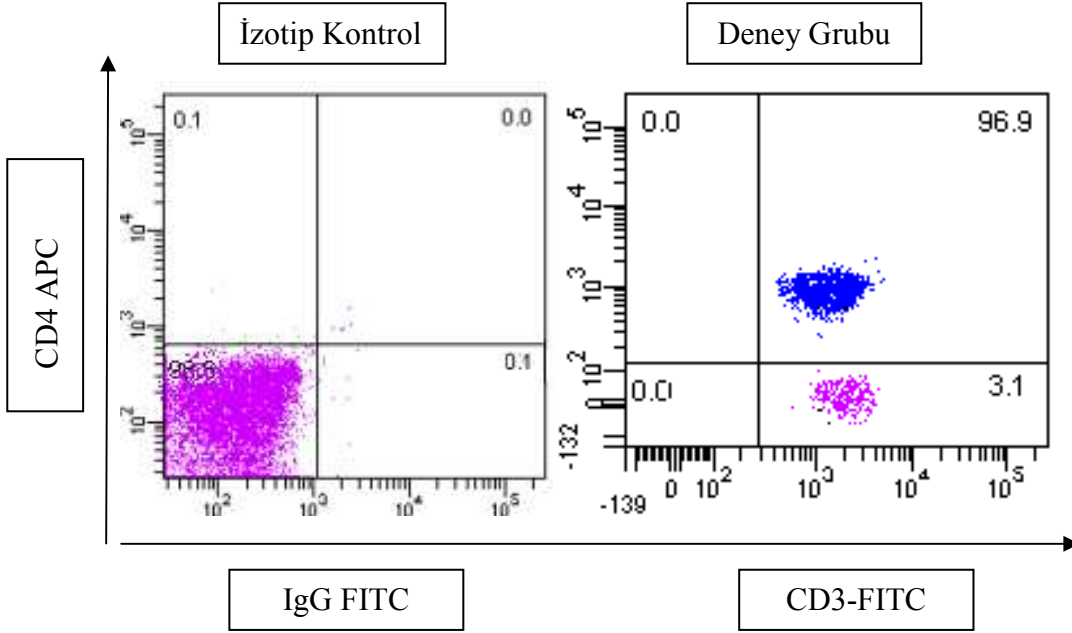
ASH Saflığı



Şekil 6.1 ASH FACS analiz sonucu

FACS analizi değerlendirildiğinde PKMH’lerden HLA-DR izolasyonu %95.6 saflıktadır.

CD4⁺ T Hücre Saflığı



Şekil 6.2 CD4 FACS analiz sonucu

FACS analizi değerlendirildiğinde PKMH'lerden CD4⁺ T hücreleri %96.9 saflıktadır.

6.6. Kültür Süpernatantlarında Sitokin Seviyeleri

1. Kültür

Çalışmaya alınan hastalardan izole edilen PKMH'ler Der p 1, Betv1, PHA uyarınları kullanılarak hücre kültürü yapıldı. Kültürün 5. gününde IL-5, IL-10, IL-13 ve IFN- γ sitokinlerin değerleri çalışmanın 0. ayı ve 8. ayında luminex yöntemi ile ölçüldü.

SLİT ve Farmakotx gruplarının Der p 1, Betv1 ve PHA uyarınları ile 0. ve 8. ayda yapılan kültürlerinden elde edilen sitokin değerleri karşılaştırıldığında IL-5, IL-13 ve IFN- γ sonuçları bakımından her iki grup arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlenmiştir. Fakat Farmakotx grubunda SLİT grubuna kıyasla Betv1 ve PHA uyarımlarında IL-10 düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı düşük olduğu bulunmuştur (P= 0.04). 0. ve 8. ayda yapılan birinci kültürdeki sitokin değerleri Tablo 6.6, 6.7, 6.8, 6.9 da gösterilmiştir.

Tablo 6.6 PKMH kültüründe 0. ay ve 8. ayda ölçülen IL-5 sitokin değerleri (pg/ml)

IL-5	Uyaranlar	0.ay (mean/std)	8.ay (mean/std)	P değeri
SLİT Grubu	Der p 1	0	6 ± 2	0,33
	Betv1	0	0	1,0
	PHA	32,2 ± 12,45	108,25 ± 63,55	0,13
Farmakotx Grubu	Der p 1	9,3 ± 13,15	10,67 ± 18,48	1,0
	Betv1	5,35 ± 7,6	1,9 ± 2,7	0,79
	PHA	137 ± 143,4	128 ± 80,48	1,0

Tablo 6.7 PKMH kültüründe 0. ay ve 8. ayda ölçülen IL-10 sitokin değerleri (pg/ml)

IL-10	Uyaranlar	0.ay (mean/std)	8.ay (mean/std)	P değeri
SLİT Grubu	Der p 1	98,25 ± 138,9	323,2 ± 350,1	0,88
	Betv 1	121 ± 117	7,6 ± 11,24	0,21
	PHA	604,7 ± 606	63,4 ± 80,96	0,37
Farmakotx Grubu	Der p 1	230,5 ± 159,3	106 ± 48,04	0,34
	Betv 1	149 ± 76,9	14,5 ± 18,45	0,04
	PHA	600,8 ± 144,3	49,64 ± 32,97	0,04

Tablo 6.8 PKMH kültüründe 0. ay ve 8. ayda ölçülen IL-13 sitokin değerleri (pg/ml)

IL-13	Uyaranlar	0.ay (mean/std)	8.ay (mean/std)	P değeri
SLİT Grubu	Der p 1	0	14,7 ± 6,35	0,19
	Betv1	2,4 ± 2,23	3,73 ± 5,63	0,75
	PHA	6904 ± 4378	1422 ± 408,3	0,46
Farmakotx Grubu	Der p 1	19,85 ± 24,16	25 ± 33	0,86
	Betv1	10,2 ± 13,12	6,12 ± 2,78	0,14
	PHA	7615 ± 4131	1222,2 ± 594,67	0,8

Tablo 6.9 PKMH kültüründe 0. ay ve 8. ayda ölçülen IFN-γ sitokin değerleri (pg/ml)

IFN-γ	Uyaranlar	0.ay (mean/std)	8.ay (mean/std)	P değeri
SLİT Grubu	Der p 1	0	4,05 ± 5,72	0,44
	Betv1	0	0	0,37
	PHA	725,7 ± 930	192 ± 145,2	1,0
Farmakotx Grubu	Der p 1	0	0	1,0
	Betv1	0	1,6 ± 2,26	1,0
	PHA	886 ± 501,9	36,15 ± 12,9	0,09

2. Kùltür

Çalışmanın 8. ayda SLİT grubu (Grup I) izole edilen ASH ve Farmakotx grubu (Grup II) ndan izole edilen $CD4^{+}$ T hücreleri Der p 1 antijeni ile kùltür yapıldı. Kùltürün 5. gününde toplanan süpernatantlarında IL-5, IL-10, IL-13 ve IFN- γ sitokin seviyeleri Luminex yöntemi ile ölçüldü.

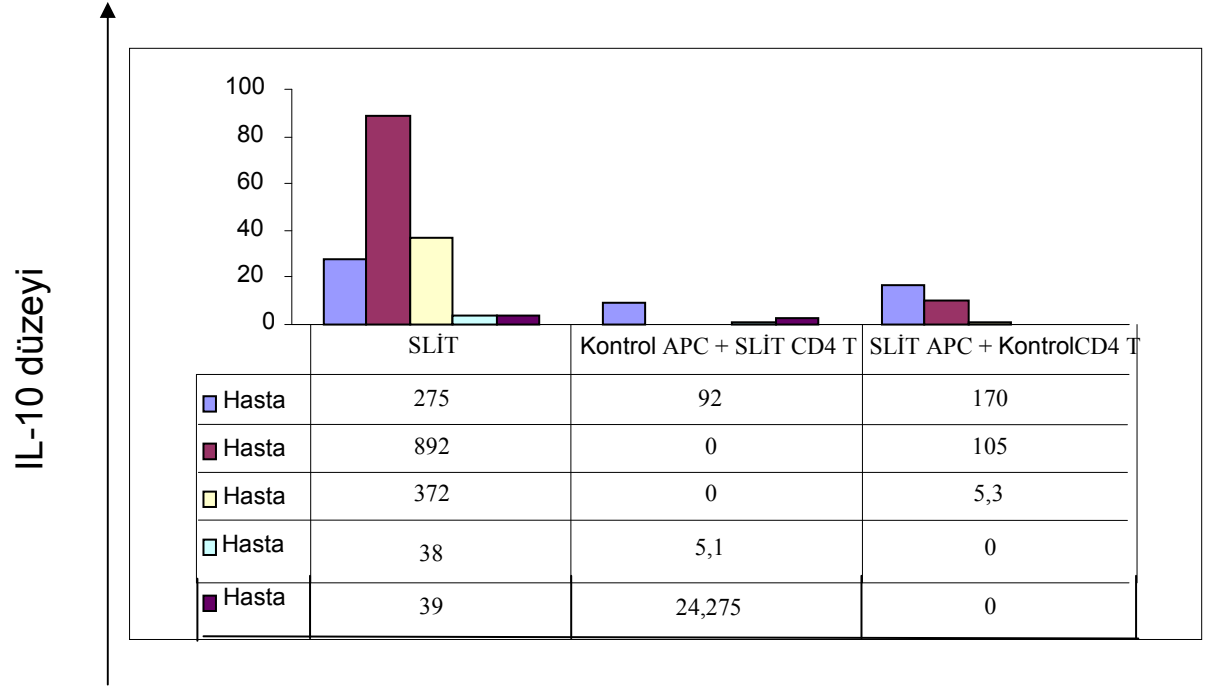
3. Kùltür

Çalışmanın 8. ayda SLİT grubu (Grup I) izole edilen $CD4^{+}$ T hücresi ve Farmakotx grubu (Grup II) ndan izole edilen ve ASH Der p 1 antijeni kùltür yapıldı. Kùltürün 5. gününde toplanan süpernatantlarında IL-5, IL-10, IL-13 ve IFN- γ sitokin seviyeleri Luminex yöntemi ile ölçüldü.

Elde edilen sonuçlara göre 2. kùltürde Der p 1 ile indüklenen IL-10 (ort. 56,06), 3. kùltürde Der p 1 indüklemesi sonucu oluşan IL-10 (ort. 24,28) üretiminden anlamlı olmasa da yüksek olduğu tespit edilmiştir. Tespit edilen sitokin değeri Tablo 6.10' da verilmiştir.

Tablo 6.10 SLİT ve FARMAKOTERAPİ grupları arasında yapılan çapraz kùltürde 8. ay sitokin değeri (pg/ml)

	SLİT ASH + KONTROL $CD4^{+}$ T (Mean/std)	SLİT $CD4^{+}$ T + KONTROL ASH (Mean/std)	P değeri
IL-10	56,06 $\pm$ 77,85	24,28 $\pm$ 39,16	0,09
IFN-γ	0	0	1,0
IL-5	5,56 $\pm$ 10,31	0,84 $\pm$ 1,68	0,47
IL-13	9,97 $\pm$ 16,37	1,8 $\pm$ 3,5	0,48



Şekil 6.3 Hücre Kültür Süpernatantlarında IL-10 Sitokin Düzeyinin Sütun Grafiği

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Allerjen spesifik immunoterapi halen bilinen tedavi yöntemleri arasında allerjik solunum yolu hastalıklarının doğal seyrini değiştirme kapasitesine sahip olan tek tedavi seçeneğidir.

Etkin medikal tedaviye rağmen allerjik rinit ve astım semptomları kontrol altına alınamayan hastalar bulunmaktadır.

Allerjik rinit ve astımda semptomların hastalara verdiği sıkıntılar, okul ve iş başarısının etkilenmesi, devamsızlıklara neden olması, sosyal ve fiziksel kısıtlamalar, duygusal durumun bozulması ile yaşam kalitesi oldukça etkilenmektedir (180). Ayrıca bazı hastalar düzenli ilaç kullanmaya tepki verip SİT gibi diğer tedavi seçeneklerine yönelmektedir. Medikal tedaviye (Farmakotx) yanıt vermeyen, düzenli ya da uzun süre Farmakotx kullanmayı istemeyen ve Farmakotxnin yan etkileri görülen hastalar için SİT endikasyonu vardır (177).

Allerjen spesifik subkütan immünoterapinin uzun dönem olumlu etkisinin olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Elde edilen veriler subkütan immünoterapinin yeni sensitizasyonları önlediğini ve allerjik rinitli hastalarda astımın gelişmesini engelleyebileceğini göstermektedir (178). Ayrıca bu terapötik yaklaşım Dünya Sağlık Örgütü tarafından astım tedavisi ile bütünleşmiş bir allerji tedavi stratejisi olarak kabul edilmektedir (171). Ancak klinik çalışmalar subkütan immünoterapinin allerjik rinokonjunktivitte etkinliğini göstermesine rağmen, sistemik yan etkilerinin olmasından dolayı, klinik uygulamada ve özellikle çocuklarda kullanımı hala tam güvenilir değildir. Subkutan immünoterapinin en önemli yan etkisi anafaktik reaksiyonun oluşma riskidir. Bu nedenle allerjen spesifik immünoterapi uygulamalarında allerjenin verililiş yolu ve dozu konusunda çeşitli araştırmalar yapılmaktadır.

Son yıllarda öngörülen uygulama yollarından biri sublingual allerjen immünoterapisidir.

Sublingual immünoterapinin etkinliği ve güvenilirliği birçok kontrollü çalışmada gösterilmiştir (179). Dünya Sağlık Örgütü tarafından 1998 yılında yayınlanan bildiride, ocuk ve erişkinlerde allerjenin subkütan yol yerine alternatif olarak

sublingual yolla verilebileceği belirtilmiştir (171). Sublingual immünoterapinin immünolojik mekanizması günümüzde tam olarak aydınlanmamıştır. Bu konuda yürütülmüş pek az araştırma mevcuttur. Öte yandan subkütan immünoterapinin etki mekanizması konusunda literatürde pek çok araştırmaya rastlamak mümkündür.

Çalışmamızda astım tanısı almış ve ev tozu allerjisi olan hastalarımızı iki gruba ayırarak bir gruba tedavi amacı ile Farmakotx verirken, diğer gruba tedavi amacı ile sublingual immünoterapi (SLİT) ve Farmakotx verildi. Çalışmamızda SLİT mekanizmasında dendritik hücrelerin rolünü araştırmayı amaçladık.

Tedavi sürecine başlamadan önce her iki grupta yer alan hastalardan PKMH kültürü yapılarak izole edilen PKMH'ler Der p1, Betv1, PHA uyaranları ile kültür edildi. Kültürün 5. gününde toplanan kültür süpernatantlarında IL-5, IL-10, IL-13 ve IFN- γ sitokin düzeyleri luminex yöntemi ile ölçüldü.

Tedavinin 8. ayında tekrar tüm hastalardan PKMH izolasyonu yapılarak Der p 1, Betv1, PHA uyaranları ile kültür edildi. Kültürün beşinci gününde toplanan kültür süpernatantlarında IL-5, IL-10, IL-13 ve IFN- γ sitokin düzeyleri luminex yöntemi ile ölçüldü.

0. ve 8. ayda Derp1, Betv1, PHA uyaranları ile yapılan kültürler sonrası elde edilen veriler değerlendirildiğinde IL-5, IL-13 ve IFN- γ sitokin düzeylerinde SLİT ve Farmakotx grupları arasında istatistiksel fark olmadığı bulunmuştur. Fakat Farmakotx grubunda Betv1, PHA uyarımlarında IL-10 sitokin değeri istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuştur (P= 0.04).

Allerjik bireylerin tedavisinde kullanılan antijen spesifik immünoterapi (SIT) IL-10 üretebilen ASH'lerin sayısında artışa sebep olduğu ve IL-10'un T hücrelerinin regülatör fenotip ve fonksiyon kazanmasında etkili bir sitokin olduğu gösterilmiştir. T regülatör hücreler SIT mekanizmasında Th1 ve Th2 dengesini sağlamakta görevli hücre tipi olduğu bilinmektedir (74).

Bohle ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 52 hafta boyunca SLİT tedavisi alan hastalarda yapılan analizlerde IL-10 üretiminin arttığı ve Treg transkripsiyon faktörü FoxP3 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (175).

Akdiş ve arkadaşlarının yayınladıkları çalışmalarında SLİT'in allerjik immün yanıtı baskılamakla görevli olan IL-10 üretimini arttırdığını belirtmişlerdir (176).

ASH'ler T hücrelerine antijen sunarak T hücre farklılaşmasında görev alırlar. Yapılan hayvan çalışmalarında oluşturulan havayolu allerjik inflamasyon modellerinde profesyonel antijen sunucu hücre olarak tanımlanan dendritik hücrelerin (DH) duyarlılaştırma ve sensitizasyon fazlarında kritik öneme sahip oldukları gösterilmiştir (172).

DH'ler deri, solunum yolları ve mukozal alanlara yerleşerek immün sistem içerisinde kritik rol üstlenirler. DH₂ 'ler allerjik-immünojenik reaksiyonların gelişimini izleyen allerjik hastalıkların gelişimi; antiallerjik, tolerojenik reaksiyonları bastırmak veya allerjik immün cevabın inhibisyonu gibi önemli görevleri vardır (171).

DH'ler vücutta lokalize oldukları yerler ve üstlendikleri görevler göz önünde bulundurulduğunda immünoterapötik faktör olarak subkutan enjeksiyonlar, sublingual yada intranasal mukus uygulamaları için oldukça idealdir (172,173).

DH'ler önemli sitokinler üretmektedirler. IL-10 DH, makrofaj, B hücreleri gibi farklı özellikteki ASH'ler tarafından salınan ve bu hücrelerin farklılaşmasında görev alan anti-inflamatuar bir sitokindir (173).

Başta ASH'ler tarafından salınan IL-10 immünoregulator bir sitokindir. IL-10 sitokini IFN- γ ve IL-12 sitokinlerinin Th₂ hücrelerinden salınımı inhibe etmektedir. Ayrıca IL-10 Th₂ hücrelerinden salınan IL-5 inflamatuvar sitokin düzeyini düşürerek Th₂ cevabının azalmasında görev almaktadır. IL-10 MHC II ekspresyonunun azaltarak T hücrelerine antijen sunumunu azaltılır ve böylece T hücrelerinin stimülasyonu engellerler. Böyle bir durumda T hücresi uyarılmadığı için anergi oluşumu gözlenir (172).

Bellinghausen ve arkadaşları yaptıkları çalışmada IL-10 ile muamele edilmiş DH'ler Th₁ ve Th₂ hücrelerinin DH'ler tarafından stimüle edilme kapasitelerini azalttığını göstermiştir (174).

Yapılan çalışmalar Farmakotx ile birlikte tedavi amaçlı uygulanan antijen spesifik immünoterapinin astımlı hastalarda semptomları azalttığı ve bu hastaların tedavi yanıtlarında daha etkin sonuçlar alındığı gösterilmiştir. Fakat tedavi amacı ile uygulanan antijen spesifik immünoterapinin tedavi sürecindeki etki mekanizması hakkında yeterli bilgiye henüz sahip değiliz. Biz çalışmamızda astımlı hastalarda Farmakotx ile birlikte uygulanan SLIT'in ASH üzerinden mi yoksa, ASH tarafından

kendisine antijen sunulan CD4⁺ T hücresi üzerinden mi etki göstereceği sorusuna yanıt aramaya çalıştık. Bu amaçla çalışmamızın 8. ayında sadece Farmakotx ve Farmakotx ile birlikte SLİT tedavisi alan hastalardan ASH ve CD4⁺ T hücresi izole ettik. İzole edilen hücreleri gruplar arasında çapraz olarak Der p1 ile birlikte kültür yaptık. Kültürün beşinci gününde toplanan süpernatantlarda IL-5, IL-10, IL-13 ve IFN- γ sitokin düzeylerine baktık.

Yapılan çapraz kültürün ilki, SLİT grubundan izole edilen ASH ile Farmakotx grubundan izole edilen CD4⁺ T hücresi Der p1 antijeni kullanılarak kültür edildi. Yapılan diğer çapraz kültür ise; Farmakotx grubundan izole edilen ASH ile SLİT grubundan izole edilen CD4⁺ T hücresi Der p1 antijeni kullanılarak kültür edildi. Kültürlerin beşinci gününde yapılan kültürlerden toplanan süpernatantlarda IL-5, IL-10, IL-13 ve IFN- γ sitokin düzeylerine luminex yöntemi ile bakıldı.

Çalışmanın 8. ayında yapılan çapraz kültürün amacı SLİT grubundan izole edilen ASH'nin Farmakotx grubundan izole edilen CD4⁺ T hücresine antijen sunumu sonrası sitokin düzeylerini, Farmakotx grubundan izole edilen ASH'nin SLİT grubundan izole edilen CD4⁺ T hücresine antijen sunumu sonrası belirlenen sitokin düzeyleri ile karşılaştırmak ve belirlenen sitokin düzeylerinden SLİT etki mekanizması hakkında fikir sahibi olmaktır.

Yapılan çapraz kültürlerde bakılan sitokin düzeyleri değerlendirildiğinde SLİT grubundan izole edilen ASH ve Farmakotx grubundan izole edilen CD4⁺ T hücresinin Derp1 varlığında yapılan kültüründe IL-10 düzeyinin yapılan diğer çapraz kültüre kıyasla istatistik olarak anlamlı olmasa da yüksek olduğu bulunmuştur. Çalışmamız bir ön çalışma niteliğinde olduğundan çalışmaya katılan hasta sayısı arttırıldığında istatistiksel olarak anlamlılıkta artacaktır.

Bulduğumuz sonuç istatistiksel olarak anlamlı olmasa da SLİT mekanizması hakkında yapılan diğer çalışmalarda SLİT'in IL-10 sitokin seviyesini arttırdığına dair veriler literatürde mevcuttur. IL-10 Th2 cevabını Th1 yanıtına dönüşümünü sağlamaktadır (124). IL-10 un antijen spesifik total IgE üretimini baskıladığı ve IgG4 üretimini arttırarak T hücre toleransına neden olduğu bilinmektedir (21).

Bizim çalışmamızda yapılan sitokin yanıtlarının literatürdeki çalışmalardan farklı yönleri birkaç nedenle açıklanabilir: Bu çalışmada asıl amaç SLİT cevabının

oluşumunda ASH ve/veya CD4⁺ T hücrelerinin rollerini araştırmaktı. Tedavinin 8. ayında yapılan sitokin çalışmalarında İT'nin mekanizmasına yönelik çıkarımlar şöyle açıklanabilir: Öncelikle sitokinlerin İT sırasında dinamiği çok iyi bilinmemektedir. Literatürdeki çalışmalarda da bu nedenle değişik zamanlamalar sonucu değişik veriler elde edilmektedir. Bu sorunu gidermek için İT'nin başlangıcından itibaren seri sitokin ölçümleri yapmak aydınlatıcı olabilir. Çalışmamızın 8. ayında yapılan PKMH kültürlerinden elde edilen sitokin yanıtlarının farklılığı kısmen bu yolla açıklanabilir. Ayrıca hücre kültür ortamında kullanılan antijen (Derp 1) dozu sitokin yanıtında belirleyici önemli bir faktördür. Öte yandan şimdiye kadar *in vitro* çalışmalarda belirlenmiş standart bir Derp 1 dozu yoktur. Farklı Derp 1 dozu ile aynı zaman diliminde değişik tipteki sitokin salınımının arttığı gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda yüksek doz Der p 1 kullanılmıştır (10µg/ml). Genel olarak yüksek antijen dozunda IL-10 yanıtının baskılanabileceği kabul edilmektedir. Çalışmamız 8. ayında yapılan çapraz kültürde ise sadece ASH ve CD4⁺ T hücreleri Derp 1 antijeni ile kültür edilmiştir. Literatürde ise IL-10 üreten farklı hücre popülasyonları olduğu bilinmektedir. Biz çalışmamızda IL-10 üretim yollarında görevli sadece iki hücre tipini kullandık.

Sonuç olarak ev tozu allerjisi olan astım tanısı almış bireylerde tedavi amaçlı uygulanan SLIT hastaların IL-10 düzeylerinin Farmakotx grubundaki hastalara kıyasla yüksek olduğu bulunmuştur. Çalışmamızın 8. ayında SLIT grubundan izole edilen ASH ile Farmakotx grubundan izole edilen CD4⁺ T hücrelerinin Der p1 antijeni varlığında yapılan kültüründe IL-10 seviyesinin Farmakotx grubundan izole edilen ASH ve SLIT grubundan izole edilen CD4⁺ T hücrelerinin Der p1 uyararı ile yapılan çapraz kültürüne kıyasla daha yüksek bulunması ise bize SLIT'in ASH popülasyonu üzerinden bir mekanizma ile etki göstererek IL-10 sitokin üretimini arttırdığını düşündürmektedir. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde çocukluk çağı allerjik rinit ve astımda SLIT yöntemi ASH'lerin IL-10 üretimini arttırarak Th2 cevabının baskılanmasında etkin bir role sahip olduğu gözlenmektedir.

Günümüzde hastalıkların tedavi süreçlerinde farmakoterapiden uzaklaşarak hücre boyutunda daha spesifik stratejiler geliştirilmektedir. Astımlı hastaların tedavisinde immünoterapinin ve DH'lerin büyük önemi olduğu bilinmektedir. Bu sebeple

geliştirilecek olan bir dendritik hücre aşısı bu tip hastalıkların tedavi sürecini hızlandırılmasının, daha etkin sonuçların alınmasının ve bu konuda yeni bilgilere ulaşılmasının önünü açacağını düşünmekteyiz.

8- REFERANSLAR

1. Kay AB. Asthma and inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 1991 ;87(5):893-910.
2. Sly M. Asthma Im: Behreman RE, Kliegman RM, Jenson HB, Nelson Textbook of Pediatrics. 16th ed. Pennsylvania, Saunder 2000:645-97
3. Vignola AM, Campell AM, Chanez P, Bousquet J, Paul-Lacoste P, Michel FB, Godard P. HLA-DR and ICAM-1 expression on bronchial epithelial cells in asthma and chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis.* 1993 Sep;148(3):689-94.
4. Djukanovic R, Roche WR, Wilson JW. Mucosal inflammation in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1990;142:434-457.
5. Arm, JP, T.H. Lee. 1992. The pathobiology of bronchial asthma. *Adv. Immunol.* 51:323-382.
6. Iwamoto I, Nakajima H, Endo H, Yoshida S,. Interferon-gamma regulates antigen induced eosinophil recruitment into the mouse airways inhibiting the infiltration of CD4+ T cells. *J Exp Med* 1993; 177:573-6
7. Bousquet J, Jeffery PK, Buse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodelling. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 May; 161(5):1720-45
8. Mark Larche, Cezmi A.Akdiş and Rudolf Valenta. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* 2006 Oct; 6: 761-768
9. Delacourt C, Lable D, Vassoult A, Brunet Langot D, De Blic J, Scheinmann P. Sensitization to inhalant allergens in wheezing infants is predictive of the develepment of infantile asthma. *Allergy* 1994; 49:843-847.
10. P. Moingen, T. Batard, R. Fadel, F. Frati, J. Sieber, L. Van Overtvelt. Immune mechanisms of allergen-specific sublingual immunotherapy. *Allergy* 2006; 61:151-165
11. Holt PG, Oliver J, Bilyk N, et al. Downregulation of the antigen presenting cell function(s) of pulmonary dendritic cell in vivo by resident alveolar macrophages. *J Exp Med* 1993; 177:397-407

12. C. Grüber, K. Gerhold, S.L. von Stuckrad, A. Avagyan, D. Quarcoo, B. Ahrens, U. Wahn, E. Hamelmann. Common vaccine antigens inhibit allergen-induced sensitization and airway hyperresponsiveness in a murine model. *Allergy* 2006; 61:820-827
13. Ian P. Lewkowich, Nancy S. Herman, Kathleen W. Schleifer, Matthew P. Dance, Brian L. Chen, Krista M. Dienger, Alyssa A. Sproles, Jaimin S. Shah, Jörg Köhl, Yasmine Belkaid, and Marsha Wills-Karp. CD4⁺ CD25⁺ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. *JEM* 2007; 202:1549-1561
14. Bousquet J, Lockey RF, Malling H-J, editors. WHO Position Paper. Allergen immunotherapy: Therapeutic vaccines for allergic disease. *Allergy* 1998; (53)44:1- 42.
15. Laurent Mascarell, PhD, Laurens Van Overtvelt, PhD, Philippe Moingeon, PhD. Novel Ways for Immunotherapy: Mucosal Allergy Vaccines. *Immunol Allergy Clin N Am* 2006; 26:283-306
16. Pichler CE, Helbling A, Pichler WJ. Three years of specific immunotherapy with house dust- mite extracts in patients with rhinitis and asthma: significant improvement of allergen specific parameters and of nonspecific bronchial hyperreactivity. *Allergy* 2001; 56:301- 6
17. Francis JN, Till SJ, Durham SR. Induction of IL-10+CD4+CD25+ T cells by grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:1255-61
18. Reto Cramer, PhD. Allergy Diagnosis, Allergen Repertoires, and Their Implications for Allergen-specific Immunotherapy. *Immunol Allergy Clin N Am* 2006(26):179-189
19. Nouri-Aria KT, Wachholz PA, Francis JN. Grass pollen immunotherapy induces mucosal and peripheral IL-10 responses and blocking IgG activity. *J Immunol*.2004;172;3252-3259.
20. Mungan D, Misirligil Z, Gürbüz L. Comparison of the efficacy of subcutaneous and sublingual immunotherapy in mite-sensitive patients with rhinitis and asthma placebo controlled study. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1999;82(5):485-90.

21. Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunological tolerance and negative control of immune response. *Annu. Rev. Immunol.* 2005(22):531-562.
22. Jobim M, Jobim LF. Natural Killer Cells and Immune Surveillance. *J Pediatr (Rio J)*. 2008;84(4 Suppl):S58-67.
23. Payne D, Bush A. Phenotype-specific treatment of difficult asthma in children *Paediatr Respir Rev*. 2004 ;5(2):116-23.
24. Elghetany MT. Surface antigen changes during normal neutrophilic development: a critical. *Blood Cells Mol Dis*. 2002 Mar-Apr;28(2):260-74.
25. Spahn J. Clinical trial efficacy: what does it really tell you? *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Nov;112(5 Suppl):S102-6.
26. Graziano FM, Cook EB, Stahl JL. Antihistamines and epithelial cells. *Allergy Asthma Proc*. 2000 May-Jun;21(3):129-33.
27. Lordan JL, Holgate ST. H1-antihistamines in asthma. *Clin Allergy Immunol*. 2002;17:221-48.
28. Patrick G. Holt and John W. Upham. The Role of Dendritic Cells in Asthma. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2004; 4:39-44
29. L. S. Van Rijt and B. N. Lambrecht. Dendritic cells in asthma: a function beyond sensitization. *Clin Exp Allergy* 2005; 35:1125-1134.
30. Hume DA. Macrophages as APC and the dendritic cell myth. *J Immunol*. 2008 Nov 1;181(9):5829-35.
31. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman *Textbook of Cellular and Molecular Immunology* 5th Edition (87-90).
32. Lambrecht BN. Dendritic Cell and the regulation of the allergic immune response. *Allergy* 2005; 60: 271-282.
33. Leonie S. Van Rijt, Nanda Vos BSc, Monique willart, Alex Klein Jan, Anthony J. Coyle, Henk C. Hoogsteden, Bart N. Lambrecht, MD, PhD. Essential role of dendritic cell CD80\CD86 costimulation in the induction, but not reactivation, of Th2 effector response in a mouse model of asthma.

34. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991; 9:271-296.
35. Amsen D, Blander J, Lee G, et al. Instruction of distinct CD4⁺ T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell* 2004; 117:515-526.
36. Ge O, Palliser D, Eisen HN, Chen J. Homeostatic T cell proliferation in a T cell-dendritic cell coculture system. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:2983-2968.
37. Caulfield JJ, Fernandez MH, Sousa AR, Lane SJ, Lee TH, Hawrylowicz CM. Regulation of major histocompatibility complex class II antigens on human alveolar macrophages by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the presence of glucocorticoids. *Immunology*. 1999 Sep;98(1):104-10.
38. Eisenbarth SC, Piggott DA, Huleatt JW, Visintin I, Herrick CA, Bottomly K. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med* 2002; 196:1645-51.
39. Gett AV, Sallusto F, Lanzavecchia A, Geginat J. T cell fitness determined by signal strength. *Nat Immunol* 2003; 4:355-60.
40. Hammad H, Charbonnier AS, Duez C et al. Th2 polarization by Derp1-pulsed monocyte-derived dendritic cells is due to the allergic status of the donors. *Blood* 2001; 98:1135-41.
41. Cella M, Facchetti F, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent Th1 polarization. *Nat Immunol* 2000; 1:35
42. Huh JC, Strickland DH, Jahnsen FI et al. Bidirectional interactions between antigen-bearing respiratory tract dendritic cells and T cells precede the late phase reaction in experimental asthma: DC activation occurs in the airway mucosa but in the lung parenchyma. *J Exp Med* 2003; 198:19-30.
43. Holt PG, Schon-Hegrad MA, Oliver J. MHC class II antigen-bearing dendritic cells in pulmonary tissues of the rat. Regulation of antigen

- presentation activity by endogenous macrophage populations. *J exp Med* 1988; 167:262-74.
44. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman Textbook of Cellular and Molecular Immunology 5th Edition (81-105).
 45. L.S. Van Rijt and B.N. Lambrecht. Dendritic cells in asthma: a function beyond sensitization. *Clin Exp Allergy* 2005; 35:1125-1134.
 46. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman Textbook of Cellular and Molecular Immunology 5th Edition Chapter 3 (41-60).
 47. De Smedt T, Van Mechelen M, De Becker G, Urbain J, Leo O, Moser M. Effect of IL-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur J Immunol* 1997; 27:1229-35.
 48. Marchal-Sommé J, Uzunhan Y, Marchand-Adam S, Valeyre D, Soumelis V, Crestani B, Soler P. Cutting edge: nonproliferating mature immune cells form a novel type of organized lymphoid structure in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Immunol*. 2006 May 15;176(10):5735-9.
 49. Vermaelen K, Pauwels R. Accelerated airway dendritic cell maturation, trafficking, and elimination in a mouse model of asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003 Sep;29(3 Pt 1):405-9. Epub 2003 Apr 17.
 50. Lambrecht BN, Salomon B, Klatzmann D, Pauwels RA. Dendritic cells are required for the development of chronic eosinophilic airway inflammation in response to inhaled antigen in sensitized mice. *J Immunol* 1998; 160:4090-7.
 51. Lambrecht BN, Hammad H. Taking our breath away: dendritic cells in the pathogenesis of asthma. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:994-1003.
 52. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman Textbook of Cellular and Molecular Immunology 5th Edition (163-167)
 53. Makala LH, Nishikawa Y, Mishima M. Phenotype and function of murine peritoneal cavity macrophage derived-dendritic cells. *J Vet Med Sci* 2002; 64:813-20.
 54. Vaschetto R., J. Grinstein L, Del Sorbo A, Khine A, Voglis S, Tullis E, Slutsky AS, H. Zhang..Role of human neutrophil peptides in the initial

- interaction between lung epithelial cells and CD4⁺ lymphocytes. *J. Leukocyte Biol.* 2007; 81: 1022–1031.
55. Christophe von Garnier, Laurent P. Nicod. Immunology taught by lung dendritic cells. *Swiss med w k ly* 2009; 139 (13–14): 186–192.
 56. Goronzy JJ, Weyand CM. T-cell co-stimulatory pathways in autoimmunity. *Arthritis Res Ther.* 2008;10 Suppl 1:S3. Epub 2008 Oct 15.
 57. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman Textbook of Cellular and Molecular Immunology 5th Edition (189-190).
 58. Koya T, Miyahara N, Takeda K, Matsubara S, Matsuda H, Swasey C, Balhorn A, Dakhama A, Gelfand EW. CD8⁺ T cell-mediated airway hyperresponsiveness and inflammation is dependent on CD4⁺ IL-4⁺ T cells. *J Immunol.* 2007; 179(5):2787-96.
 59. Turner MJ, Jellison ER, Lingenheld EG, Puddington L, Lefrançois L. Avidity maturation of memory CD8 T cells is limited by self-antigen expression. *J Exp Med.* 2008 Aug 4;205(8):1859-68. Epub 2008 Jul 14.
 60. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman Textbook of Cellular and Molecular Immunology 5th Edition (94-96)
 61. Walker C, Bode E, Boer L, Hansel TT, Blaser K, Virchow JC Jr. Allergic and nonallergic asthmatics have distinct patterns of T cell activation and cytokine production in peripheral blood and bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146:109–15.
 64. Kondo E, Topp MS, Kiem HP et al. Efficient generation of antigen-specific cytotoxic T cells using retrovirally transduced CD40- activated B cell *J Immunol* 2002; 169:2164–71.
 65. Hiroshi Nakajima, Kiyoshi Takatsu. Role of Cytokines in Allergic Airway Inflammation *Int Arch Allergy Immunol* 2007;142:265–273
 66. Schwartz RH. T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 2003;21:305-34.
 67. Zheng Y, Zha Y, Gajewski TF. Molecular regulation of T-cell anergy. *EMBO reports* 2008; 9:1

68. Seeyoung Choi and Ronald H. Schwartz. Molecular mechanisms for adoptive tolerance and other T cell anergy models. *Semin Immunol.* 2007 June; 19(3):140-152.
69. Weigner H. Induction and mechanisms of action of transforming growth factor- β - secreting Th3 regulatory cells. *Microbes Infect* 2001;182:207-214.
70. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman Textbook of Cellular and Molecular Immunology 5th Edition (161-163)
71. Lecher R, Chai JG, Marelli-Berg F, Lombardi G. The contributions of T-cell anergy to peripheral T-cell tolerance. *Immunology* 2001; 103:262-269.
72. Levings MK, Sangregorio R, Santirana C, Moschin AL, Battaglia M, Orban PC, Roncarolo MG. Human CD25⁺ CD4⁺ T supressor cell clones produce transforming growth factor β but not IL-10 and are distinct from Type 1 regulatory cells. *J. Exp Med* 2002; 196(10):1335-46.
73. Levings MK, Bacchetta R, Schulz U, Roncarolo MG. The role of IL-10 and TGF- β in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;129(4):263-76.
74. Verhagen J, Blaser K, Akdis C, Akdis M. Mechanisms of Allergen-Specific Immunoteraph: T-Regulatory Cells and more. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 2006; 207(26)-231.
75. Roncarolo MG, Levings MK. The role of different subset T regulatory cells in controlling autoimmunity. *Cur Opin in Immunol* 2000; 12:676-683.
76. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintenanced by activated T cells expressing IL-2 receptor α chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol* 1995; 160:1151-64.
77. McHugh RS, Shevach EM. The role of supressor T cells in regulation of immune response. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110(5):693-702.

78. Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, Sakaguchi S. Thymus and autoimmunity: Production of CD25⁺ CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cell as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 1999;162:5317.
79. Levings M, Sangregorio R, Roncarolo MG. Human CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med* 2001, 193(11):1295-1302.
80. Zhang X, Izikson L, Liu L, Weiner HL. Activation of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells by oral antigen administration. *J Immunol* 2001; 167(8):4245-53
81. Tsitoura Dc, DeKruyff RH, Lamb JR, Umetsu DT. Intranasal exposure to protein antigen induce immunological tolerance mediated by functionally disabled CD4⁺ T cells. *J Immunol* 1999; 163:2592-2600
82. Thornton AM, Shevach EM. CD4⁺ CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 1998, 188 (2), 287-296.
83. Dieckmann D, Bruett CH, Ploettner H, Lutz MB, Schuler G. Human CD4⁺CD25⁺ regulatory, Contact-dependent T cell induce interleukin-1 producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells. *J Exp Med* 2002, 196 (2), 247-253.
84. Nakamura K, Kitani A, Straber W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor β . *J Exp Med* 2001, 194:629-644.
85. Umetsu DT, Akbari O, DeKruyff RH. Regulatory T cell control the development of allergic disease and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112(3):480-7.
86. Oh JW, Seroogy CM, Meyer EH, Akbari O, Berry G, Fathman G, DeKruyff R, Umetsu DT. CD4 T-helper cells engineered to produce IL-

- 10 prevent allergen-induced airway hyperactivity and inflammation. *J Allergy clin Immunol* 2002;110:460-8.
- 87.** Weiner H. Induction and mechanisms of action of transforming growth factor- β -secreting Th3 regulatory cells *Immunologic Reviews*. 2001;182:207-214.
- 88.** Weiner HL. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect* 2001; 3(11):947-54.
- 89.** Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE. CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997; 389:737-42.
- 90.** Levigs MK, Roncarolo Mg. T regulatory 1 cells: a novel subset of CD4 T cells with immunoregulatory properties. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106 (1pt 2):109-12.
- 91.** Roncarolo MG, Levings MK. The role of different subsets T regulatory cell in controlling autoimmunity. *Cur Opin in Immunol* 2000; 12:676-683.
- 92.** Bacchetta R, Satirana C, Levings MK. Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are independent from TCR activation but require exogenous cytokines. *Eur J Immunol* 2002;32:2237-45.
- 93.** Levings MK, Sangregorio R, Galbiati F. IFN- α and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J Immunol* 2001; 166:5530-9.
- 94.** Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, et al. In vitro generation of IL-10 producing regulatory CD4⁺ T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 and Th2- inducing cytokines. *J Exp Med* 2002; 195:603-16.
- 95.** Von Reyn CF, Akkoc T, Bahceciler NN, Kucukercan D, Barlan IB, Basaran MM. Impact of *Mycobacterium vaccae* immunization on lung histopathology in a murine model of chronic asthma. *Clin. Exp. Allergy* 2003;33:266-270.

96. Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nature Immunol* 2001;2(8):725-31.
97. Grdic D, Hornquist E, Kjerrulf M, Lycke NY. Lack of local suppression in orally tolerant CD8-deficient mice reveals a critical regulatory role of CD8⁺ T cells in the normal gut mucosa. *J Immunol* 1998;160:754-762.
98. Ke Y, Kapp JA. Oral antigen inhibits priming of CD8⁺ CTL, CD4⁺ T cells, and antibody responses while activating CD8⁺ suppressor T cells. *J Immunol* 1996;156:916-21.
99. Weiner HL. Oral tolerance for the treatment of autoimmune diseases. *Annu Rev Med* 1997;48:341-51.
100. Ciubotariu R, Colovai AI, Penesi G. Specific suppression of human CD4⁺ Th cell responses to pig MHC antigens by CD8⁺ CD28⁻ regulatory T cells. *J Immunol* 1998;161:5193-202.
101. Zhang ZX, Yang L, Young KJ. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat Med* 2000;6:782-9.
102. Mauri C, Gray D, Mushtaq N. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J Exp Med* 2003;197:489-501.
103. Steinbrink K, Wolfl M, Lönkleit H. Induction of tolerance by IL-10 treated dendritic cells. *J Immunol* 1997;159:4772-80.
104. Morganti-Kossmann MC, Kossmann T, Brandes ME. Autocrine and paracrine regulation of astrocyte function by transforming growth factor-beta. *J Neuroimmunol* 1992;39:163-73.
105. Kitamura M, Suto T, Yokoo T. Transforming growth factor-beta 1 is the predominant paracrine inhibitor of macrophage cytokine synthesis produced by glomerular mesangial cells. *J Immunol* 1996; 156:2964-71.
106. Pocket Guide for asthma management and prevention in children-Gina Ped Guide 2006.
107. L.S. Van Rijt and B.N. Lambrecht. Dendritic cells in asthma: a function beyond sensitization. *Clin Exp. Allergy* 2005;35:1125-1134

108. Marguet CF, Jouen-Boedes F, Dean TP, Warner JO. Bronchoalveolar cell profiles in children with asthma, infantile wheeze chronic cough, or cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159:1533-1540.
109. Jeffery PK. Remodelling in asthma and chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:28-38.
110. Bruselle GG, Kips JC, Tavernier JH, Van der Heyden JG, Cuvelier CA, Pauwels RA, Bluethmann H. Attenuation of allergic airway inflammation in IL-4 deficient mice. *Clin Exp Allergy* 1994;24(1):73-80.
111. Bousquet J, Jeffery PK, Buse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From Bronchoconstriction to airway inflammation and remodelling. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1720-1745.
112. Tiddens H, Silverman M, Bush A. The role of inflammation in airway disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:7-10.
113. Cottrez F, Hurst SD, Coffman RL, Groux H. T regulatory Cells 1 inhibit a Th2-specific response in vivo. *J Immunol* 2000, 165:4848-4853.
114. Lemanske RF, Buse WW. Allergic Disorders. Asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111(2):502-19.
115. Fahy JV. Remodelling of the airway epithelium in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:46-51.
116. Jeffery PK. Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *Am. J respir Crit Care Med* 2001; 164:28-38.
117. Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunology. S 330-332, Mosby, Toronto, Canada,2001.
118. Buse WW and Reed CE. Asthma, Definition and Pathogenesis, In: Middleton E, reed CE, Ellis EF, Adkinson NF, Yunginger JW, Buse WW, editors. *Allergy Principles and Practise*. St Louis: Mosby, 1993. 1173-1202.
119. Ortega-Carr D, Buse WW. Asthma: Pathogenesis and treatment, In Kaplan, editor. *Allergy*, Philadelphia: WB Saunders Company, 1997. 480-504.

120. Kapsenberg ML, Hilkens CM, Jansen HM, Bos JD, Snuders A, and Wierenga EA. Production and modulation of T-cell cytokines in atopic allergy. *Int Arch Allergy Immunol*, 1996;110:107.
121. Muro S, Minshall EM, Hamid QA. The pathology of chronic asthma, *Clinics in Chest Medicine* 2000; 21(2):225-44. Review.
122. Moore KW. Interleukin-10 and the interleukin receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001, 19:683-765.
123. Schandene L, Alonso-Vega C, Willems F, Gerard C, Delvaux A, Velu T, Devos R, De Boer M, Goldman M. B7\CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells inhibited by IL-10. *J. Immunol* 1994; 152:4368.
124. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol*. 1991; 147:3815.
125. Broish L, Aarons A, Rumblyrt J. Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1996;97:1288-96.
126. Koning H, Neijeens HJ, Baert MR. T cells subsets and cytokines in allergic and non allergic children. II. Analysis and IL-5 and IL-10 mRNA expression and protein production. *Cytokine* 1997;9:427-36.
127. Walker C, Virchow J-C, Bruijnzeel PLB. T cell subsets on their soluble products regulate eosinophilia in allergic and nonallergic asthma. *J Immunol* 1991; 146:1829-35.
128. Marshall JS, Leal-Berumen I, Nielsen L. IL-10 Inhibits long-term IL-6 production but not preformed mediator release from peritoneal mast cells. *J Clin Invest* 1996;97:1122-8.
129. Tournoy KG, Kips JC, Pauwels RA. Is Th1 the solution for Th2 in asthma? *Clin Exp allergy* 2002; 31:17-29.
130. Tournoy KG, Kips JC, Pauwels RA. Mechanisms of Allergy. Counterbalancing of Th2 driven allergic airway inflammation by IL-2 does not require IL-10. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107(3):483-91.

131. Mosmann TR, Coffman RL. Th1 and Th2 cells: Different pattern of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7:145-173.
132. Wierenga EA, Snoek M, Jansen HM, Bos JD, Van Lier Raw, Kapsenberg ML. Human-atopen spesific types 1 and 2 T helper cell clones. *J Immunol* 1991; 147:2942-2947.
133. Secrist H, Chelen CJ, wen Y, Marshall JD, Umetsu DT. Allergen-immunoteraphy decreases interleukin 4 production in CD4⁺ T cells from allergic individuals. *J Exp Med* 1993; 178:2123-30.
134. Jutel M, Pichler WJ, Skrbic D, Urwyler A, Dahinden C, Muller UR. Bee venom immunoterapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increases of IFN- γ secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures. *J Immunol* 1995; 154:4187-94.
135. Raz E, Tighe H, Sato Y, Corry M, Dudler JA, Roman R. Preferential induction of a Th1 immune response and inhibition of spesific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996; 93:514-5.
136. Yeung VP, Gieni RS, Umetsu DT, DeKruyff RH. Heat-killed *Listeria monocytogenes* as an adjuvant converts established Th2 dominated immune responses into Th1-dominated responses. *J Immunol* 1998; 161:4146-52.
137. Woolcock AJ, Peat JK. Evidence for the increase in asthma worldwide. In: Ciba Foundation Editor. *The Rising Trends in Asthma*. John Wiley & Sons, Chiester 1997;122-39.
138. Von Hertzen LC. The hygiene hypothesis in the development of atopy and asthma-still a matter of controversy? *Q J Med* 1998; 91:767-771.
139. Strachan DP. Hay fever, hygiene and household size. *BMJ* 1989;299:1259-60.
140. Von Mutius E, Martinez FD, Fritzsche C, et al. Skin test reactivity and number of siblings. *BMJ* 1994;308:692-695.

141. Jarvis D, Chinn S, Luczynska C, Burney P. The association of family size with atopy and atopic disease. *Clin Exp Allergy* 1997;27:240-245
142. Martinez FD. The coming-of-age of the hygiene hypothesis. *Respir Res* 2001;2:129-132.
143. Von Mutius E. Infection: friend or foe in the development of atopy and asthma? The epidemiological evidence. *Eur Respir J* 2001;18:872-81.
144. Arshad SH. Development of allergic disease in children. *Clin Exp Allergy* 1997;27:1231-3.
145. Magnan A, Mely L, Prato S, et al. Relationships between natural T cells, atopy, IgE levels, and IL-4 production. *Allergy* 2000;55:286-290.
146. Kalliomaki M, Isolauri E. Pandemic of Atopic Diseases-A lack of Microbial Exposure in Early Infancy? *Current Drug Targets Infectious Disorders* 2002;2:193-199.
147. Custovic A, Wahn U, Woodcock A. Prevention of asthma. *Eur Respir Mon* 2003;23:429-448.
148. Wickens K, Crane J, Pearce N. The magnitude of the effect of smaller family sizes on the increase in the prevalence of asthma and hay fever in the United Kingdom and New Zealand. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:554-558.
149. Kramer U, Heinrich J, Wjst M. Age at entry to day nursery and allergy in later childhood. *Lancet* 1999;353:450-4.
150. Ball TM, Castro-Rodriguez JA, Griffith KA, et al. Siblings, day care attendance and the risk of asthma and wheezing during childhood. *N Engl J Med* 2000;343:538-543.
151. Strachan DP. Family size, infection and atopy: the First decade of the "hygiene hypothesis". *Thorax* 2000; 55 (Suppl): S2-S10.
152. Martinez FD, Holt PG: Role of microbial burden in aetiology of allergy and asthma. *Lancet* 1999;354 (Suppl):12-15.
153. Valenta R. Immunotherapy of allergic disease. *Adv. Immunol* 2004; 82:105-153

154. Bousquet J, Lockey R, Malling HJ. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic disease. World Healthy Organization. American Academy of Allergy, Asthma and immunology. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998;81:401-5.
155. Ebner C. Immunological mechanisms operative in allergen-specific immunoterapy. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 119:1-5
156. Golden DB, Kagey Sobotka. A, Norman, PS, Hamilton, RG, Lichtenstein I.M.. Outcomes of allergy insect sting in children with and without venom immunoterapy. *N. Engl. J.Med.*2004; 351:668-674
157. Bryan Leatherman, MD, FAAOA. Injection and Sublingual Immunoloterapy in the Management of Allergies Affecting the Unified Airway.
158. Wachholz PA, Durham SR. Induction of ‘blocking’ IgG antibodies immunoterapy. *Clin Exp Allergy* 2003; 33:1171-4
159. Pierson- Mullany LK, Jackola D, blumenthal M, et al. Altered allergen binding capacities of Amb a 1-spesific IgE and IgG4 from ragweed-sensitive patients receiving immunoterapy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000; 84:241-3
160. Laurent Mascarell, PhD, Laurence Van Overtvelt, PhD, Philipe Moingeon, PhD. Novel Ways for Immune Intervention in Immunoterapy: Mucosal allery Vaccines. *Immunol Allergy Clin N Am* 2006; 26; 283-306
161. Wilson DR, Lima MT, Durham SR. Sublingual Immunoterapy for allergic rhinitis: systematic review and meta-analysis. *Allergy* 2006; 61:185-90.
162. Calamita Z, Saconato H, Pela AB, et al. Efficacy of sublingual immunoterapy in asthma: systematic review of randomized-clinical trials using the Cochrane Callaboration method. *Allergy* 2006; 61:1162-72.
163. Bousquet J, Scheinmann P, Guinnepain MT, et al. Sublingual- swallow immunoteraphy in patients with asthma due to house dust mite: a double-blind, placebo-controlled study. *Allergy* 1999; 54:249-60.
164. La Rosa M, Ranno C, Andre C, et al. Double- blind placebo- controlled evaluation of sublingual swallow immunoterapy wiyh standardized

- Parietaria judaica extract in children with allergic rhinoconjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104:425-32.
165. Clavel R, Bousquet J, Andre C, Clinical efficacy of sublingual immunotherapy: a double blind, placebo- controlled trial of a standardized five-grass-polen extract in rhinitis. *Allergy* 1998; 53: 493-8.
 166. Vourdas D, Syrigou E, Potamiannou P, et al. Double-blind, placebo-controlled evaluation of sublingual immunotherapy with standardized olive pollen extract in pediatric patients with allergic rhinoconjunctivitis and mild asthma due to olive pollen sensitization. *Allergy* 1998; 53:662-72.
 167. Marcucci F, Sensi L, Frati F, et al. Sublingual tryptase and ECP in children treated with grass pollen sublingual immunotherapy. Safety and immunologic implications. *Allergy* 2001; 56:1091-5.
 168. Passlacqua G, Albano M, Fregonese L, et al. Randomised controlled trial of local allergoid immunotherapy on allergic inflammation in mite-induced rhinoconjunctivitis. *Lancet* 1998; 351:629-32.
 169. Marcucci F, Sensi L, Frati F, et al. Effects on inflammation parameters of a double- blind, placebo controlled one-year course of SLIT in children monosensitized to mites. *Allergy* 2003; 58:657-62.
 170. Silvestri M, Spallarossa D, Battistini E, et al. Changes in inflammatory and clinical parameters and in bronchial hyperactivity asthmatic children sensitized to house dust mites following sublingual immunotherapy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2002; 12:52-9.
 171. Bousquet J, Lockey R, Malling HJ, editors. World Health Organization Position Paper. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic disease. *Allergy* 1998; 53 (suppl 54):S3-4
 172. Toshiyuki Koya, MD, PhD, Hiroyuki Matsuda, MD, PhD, Katsuyuki Takeda, MD, PhD, Shigeki Matsubara, PhD, Nobuaki Miyahara, MD, PhD, Annette Balhorn, BS, Azzeddine Dakhama, PhD, and Erwin W. Gelfand, MD. IL-10-treated dendritic cells decrease airway

- hyperresponsiveness and airway inflammation in mice. *J. Allergy Clin Immunol* 2007; 119:1241-50.
173. Natalija Novak, MD. Targeting Dendritic Cells in Allergen Immunotherapy. *Immunol Allergy Clin. N. Am.* 2006; 26:307-319.
 174. Bellinghausen I, Sudowe S, Köng B, Reske-Kunz AB, Knop J, Salogo J. Interleukin-10-treated dendritic cell do not inhibit Th2 Immune responses in ovalbumin/alum-sensitized mice. *Int.Arch Allergy Immunol* 2006;141(1):61-9.
 175. Bohle B, Kinaciyan T, Gerstmayr M, Radokovics A, John-Schmid B, Ebner C. Sublingual Immunotherapy induced IL-10 producing T regulatory cells, Allergen-specific T-cell tolerance and immun deviation. *J. Allergy Clin Immunol.* 2007;120(3):707-13.
 176. Akdis CA, Barlan IB, Bahçeciler N, Akdis M. Immunological mechanisms of sublingual immunotherapy. *Allergy* 2006;81:11-4.
 177. Alvarez- Cuesta E, Bousquet J, Canonica GW, Durham SR, Malling HJ, Valovirta E; EAACI, Immunotherapy Task Force. Standart for practical allergen-specific immunotherapy. *Allergen.* 2006;61 Supply 52:1-20.
 178. Jacobsen L, Niggemann B, Dreborg S, Ferdousi Ha, Halken S, Host A, Koivikko A, Norberg LA, Valovirta E, Wahn U, Möller C; (The PAT investigator group). Spesific immunotherapy has long-term preventive effect of seasenol and perennial asthma:10-year follow-up on the PAT study. *Allergy.* 2007 Aug;62(8):943-8.
 179. Mortemousque B, Bertel F, De Casamayor J, Verin P, Colin J. House-dust mite sublingual-swallow immunotherapy in parennial conjunctivitis: a double-blind, placebo-controlled study. *Clin Exp Allergy.* 2003 Apr; 33 (4):464-9.
 180. Bousquet J, Van Cauwenberge P, Khaltaev N: Bousquet J, Van Cauwenberge P, Khaltaev N; Aria Workshop Group; World Healty Organization. Allergic rhinitis and its impact on asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108 (5 Suppl):S147-S334.

9- ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Zonguldak'ta doğdum. Liseyi 2000 yılında Samsun Tülay Başaran Anadolu Lisesinde tamamladım. Marmara Üniversitesi Atatürk Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği bölümünden 2006 yılında mezun oldum. Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Allerji-İmmünoloji Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime 2006-2007 Güz yarıyılında başladım. XIV. ve XV. Allerji-Astım kongresine ve XIX. İmmünoloji Kongresine katıldım. 2006 Mart ayında düzenlenen Laboratuardan Kliniğe İmmünoloji ve Transplantasyon kursuna katıldım.