

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

**EPSTEIN BARR VİRÜS ARACILI B LENFOSİT TRANSFORMASYON
SÜRECİNDE PERİFERİK KAN MONONÜKLEER HÜCRELERİNİN
NEOPTERİN YANITI**

DOKTORA TEZİ

Dr. Arzu ARAL

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Ayşegül ATAĞ

ANKARA
Ocak 2010

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

**EPSTEIN BARR VİRÜS ARACILI B LENFOSİT TRANSFORMASYON
SÜRECİNDE PERİFERİK KAN MONONÜKLEER HÜCRELERİNİN
NEOPTERİN YANITI**

DOKTORA TEZİ

Dr. Arzu ARAL

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Ayşegül ATAK

Bu tez, SBAG-HD-285 (107S445) proje numarası ile TÜBİTAK tarafından Hızlı Destek Projesi kapsamında desteklenmiştir.

ANKARA
Ocak 2010

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**İmmünoloji Ana Bilim Dalı Doktora Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.**

Tez Savunma Tarihi : 08/02/2010

**Prof.Dr.Vedat BULUT
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı**

**Prof.Dr.Haluk ATAÖĞLU
Ankara Üniversitesi**

**Prof.Dr.Cemalettin AYBAY
Gazi Üniversitesi**

**Doç.Dr.Kayhan ÇAĞLAR
Gazi Üniversitesi**

**Doç.Dr.Ayşegöl ATAK
Gazi Üniversitesi**

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Şekiller	IV
Tablolar	VIII
Semboller, Kısaltmalar	IX
Önsöz	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Neopterin	2
2.2. Epstein Barr Virüs (EBV)	4
EBV'nin İmmün Sistem Üzerindeki Etkileri	4
2.3. B95-8	10
2.4. Hücre Kültürü	12
2.5. Diğer Sitokinler	14
2.5.1. Tümör Nekroze Edici Faktör- α	14
2.5.2. İnterferon- γ	16
2.5.3. İnterlökin-6	16
3. GEREÇ ve YÖNTEM	18
3.1. Kullanılan Cihaz Listesi	18
3.2. Kullanılan Gereç Listesi	19
3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	20
3.4. Hazırlanan Solüsyonlar	20
3.5. Kullanılan Kitler	20
3.6. Yöntemler	21
3.6.1. EBV Üreten B95-8 Hücre Dizisinin Kültürü	21
3.6.2. Örneklerin Toplanması	22
3.6.3. İmmünofloresan Yöntemi ile EBV Antikorlarının Tespiti	23

3.6.4. Hücre Kültür Süpernatantlarında Sitokin Ölçümü	25
3.7. İstatistiksel Analiz	29
4. BULGULAR	30
4.1. İmmünofloresan Yöntemi ile Saptanan EBV Antikorları	30
4.2. Hücre Kültür Süpernatantlarında Neopterin Düzeyleri	30
4.3. Hücre Kültür Süpernatantlarında TNF- α Düzeyleri	33
4.4. Hücre Kültür Süpernatantlarında IFN- γ Düzeyleri	33
4.5. Hücre Kültür Süpernatantlarında IL-6 Düzeyleri	34
5. TARTIŞMA	54
6. SONUÇ	63
7. ÖZET	64
8. SUMMARY	66
9. KAYNAKLAR	68
10. EKLER	75
11. ÖZGEÇMİŞ	76

ŞEKİLLER

Şekil 1 : 48 çukurlu hücre kültürü plaklarına dağıtılan hücrelere ve uyarılara ait konfigürasyon (İmmüfloresan mikroskop, 40X). (s.28)

Şekil 2 : Hücre kültür plaklarından alınan örneklerin 96 çukurlu plaklara dağıtılmasına ait konfigürasyon (İmmüfloresan mikroskop, 40X). (s.28)

Şekil 3 : Anti-VCA IgG (+) bir serum örneğinin immüfloresan mikroskop görüntüsü (VCA: *Viral Capsid Antigen*) (İmmüfloresan mikroskop, 40X). (s.36)

Şekil 4 : Anti-VCA IgG (-) bir serum örneğinin immüfloresan mikroskop görüntüsü (VCA: *Viral Capsid Antigen*) (İmmüfloresan mikroskop, 40X). (s.36)

Şekil 5 : Anti-VCA IgG avidite (+++++) bir serum örneğinin immüfloresan mikroskop görüntüsü (VCA: *Viral Capsid Antigen*) (İmmüfloresan mikroskop, 40X). (s.37)

Şekil 6 : Anti-EA IgG (-) bir serum örneğinin immüfloresan mikroskop görüntüsü (EA: *Early Antigen*) (İmmüfloresan mikroskop, 40X). (s.37)

Şekil 7 : Anti-EBNA IgG (-) bir serum örneğinin immünfloresan mikroskop görüntüsü (EBNA: *Epstein Barr Virus-Nuclear Antigen*) (İmmünfloresan mikroskop, 40X). (s.38)

Şekil 8 : Anti-EBNA IgG (+) bir serum örneğinin immünfloresan mikroskop görüntüsü (EBNA: *Epstein Barr Virus-Nuclear Antigen*) (İmmünfloresan mikroskop, 40X). (s.38)

Şekil 9-a : Kontrol grubundaki hücrelerin zamana bağlı morfolojik değişimleri (a. 24. saat, b. 1. hafta) (Inverted mikroskop, 40X). (s.39)

Şekil 9-b : Kontrol grubundaki hücrelerin zamana bağlı morfolojik değişimleri (c. 2. hafta, Inverted mikroskop, 40X), (d. 3. hafta, Inverted mikroskop, 20X). (s.40)

Şekil 10 : EBV virionu salgılayan B95-8 hücre süpernatanı ile uyarılan gruptaki hücrelerin 24. saatteki morfolojik görüntüsü (Inverted mikroskop, 40X). (s.41)

Şekil 11 : EBV virionu salgılayan B95-8 hücre süpernatanı ile uyarılan gruptaki hücrelerin 48. saatteki morfolojik görüntüsü (Inverted mikroskop, 40X). (s.42)

Şekil 12 : EBV virionu salgılayan B95-8 hücre süpernatanı ile uyarılan gruptaki hücrelerin 72. saatteki morfolojik görüntüsü (Inverted mikroskop, 40X). (s.43)

Şekil 13 : EBV virionu salgılayan B95-8 hücre süpernatanı ile uyarılan gruptaki hücrelerin 1. haftadaki morfolojik görüntüsü (Inverted mikroskop, 40X). (s.44)

Şekil 14 : EBV virionu salgılayan B95-8 hücre süpernatanı ile uyarılan gruptaki hücrelerin 2. haftadaki morfolojik görüntüsü (Inverted mikroskop, 40X). (s.45)

Şekil 15 : EBV virionu salgılayan B95-8 hücre süpernatanı ile uyarılan gruptaki hücrelerin 3. haftadaki morfolojik görüntüsü (Inverted mikroskop, 40X). (s.46)

Şekil 16 : %10 FBS içeren kültür ortamında çeşitli uyaranlara bağlı olarak yükselen neopterin düzeylerinin zamana bağlı değişimi (PHA: fitohemaglütinin, LPS: lipopolisakkarit, EBV: Epstein Barr Virüs) (Sonuçlar 'ortalama $\pm$ standart hata' olarak ifade edilmiştir). (s.47)

Şekil 17 : %2 AB Rh(+) serum içeren kültür ortamında çeşitli uyaranlara bağlı olarak yükselen neopterin düzeylerinin zamana bağlı değişimi (PHA: fitohemaglütinin, LPS: Lipopolisakkarit, EBV: Epstein Barr Virüs) (Sonuçlar 'ortalama $\pm$ standart hata' olarak ifade edilmiştir). (s.48)

Şekil 18 : %2 AB Rh(+) serum içeren kültür ortamında çeşitli uyarılara bağlı olarak yükselen neopterin düzeylerinin 0. saatte pozitif bulunan düzeyler çıkartılarak düzeltildikten sonraki değerleri (PHA: fitohemaglütinin, LPS: Lipopolisakkarit, EBV: Epstein Barr Virüs) (Sonuçlar 'ortalama $\pm$ standart hata' olarak ifade edilmiştir). (s.49)

Şekil 19 : %2 AB Rh(+) serum içeren kültür ortamında çeşitli uyarılara bağlı olarak yükselen TNF- α düzeylerinin zamana bağlı değişimi (PHA: fitohemaglütinin, LPS: lipopolisakkarit, EBV: Epstein Barr Virüs) (Sonuçlar 'ortalama $\pm$ standart hata' olarak ifade edilmiştir). (s.50)

Şekil 20 : %2 AB Rh(+) serum içeren kültür ortamında çeşitli uyarılara bağlı olarak yükselen IFN- γ düzeylerinin zamana bağlı değişimi (PHA: fitohemaglütinin, LPS: lipopolisakkarit, EBV: Epstein Barr Virüs) (Sonuçlar 'ortalama $\pm$ standart hata' olarak ifade edilmiştir). (s.51)

Şekil 21 : %2 AB Rh(+) serum içeren kültür ortamında EBV ile uyarılmış hücre gruplarında IL-6 düzeylerinin zamana bağlı değişimi (Sonuçlar 'ortalama $\pm$ standart hata' olarak ifade edilmiştir). (s.52)

TABLÖLAR

Tablo 1 : B95-8 hücre dizisinin özellikleri (s.11)

Tablo 2 : Çalışmaya katılan sağlıklı gönüllülerde immünofloresan yöntemi ile saptanan EBV antijenlerine karşı gelişen antikorların pozitiflik oranı (s.53)

SEMBOLLER / KISALTMALAR

ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i> (Varyans analizi)
CD	: <i>Cluster of Differentiation</i> (Farklılaşma kümesi)
CMV	: Sitomegalovirüs
CSF	: Koloni Stimüle Edici Faktör
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EA	: <i>Early Antigen</i> (EBV erken antijeni)
EBNA	: Epstein Barr Virüs Nükleer Antijeni
EBV	: Epstein Barr Virüs
EIA	: <i>Enzyme Immunoassay</i>
ELISA	: <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FBS	: Fetal Sığır Serum
g	: <i>Gravity</i> (Yer çekimi)
GM-CSF	: Granülosit-Monosit Koloni Stimüle Edici Faktör
GTP	: Guanozintrifosfat
HIV	: <i>Human Immunodeficiency Virus</i> (İnsan immün yetmezlik virüsü)
HRP	: <i>Horseradish Peroxidase</i>
IF	: İmmünofloresan
IFN	: İnterferon
Ig	: İmmünoglobulin
IL	: İnterlökin
IM	: İnfeksiyöz mononükleoz
JAK	: <i>Janus</i> kinaz
LMP	: Latent membran proteini
LPS	: Lipopolisakkarit
NK	: Doğal öldürücü hücre (<i>Natural Killer</i>)
PBS	: <i>Phosphate Buffered Saline</i> (Fosfatlanmış Tampon solüsyonu)
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PHA	: Fitohemaglutinin
RNA	: Ribonükleik asit
RPMI	: <i>Royal Park Memorial Institute</i> (culture medium)
rpm	: <i>Revolutions Per Minute</i> (Dakikadaki dönüş sayısı)
STAT	: <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i> (Sinyal iletilici ve transkripsiyon aktive edici)
Th	: Yardımcı T hücre (<i>T helper</i>)
TMB	: Tetra metil benzidin
TNF	: Tümör Nekroze Edici Faktör
TRAF	: Tümör Nekroze Edici Faktör Reseptör İlişkili Faktör
VCA	: Viral Kapsid Antijeni

ÖNSÖZ

Epstein Barr Virüse (EBV) karşı gelişen immün yanıt, virüse karşı gelişen nötralizan antikorların yanı sıra T lenfositler ile doğal öldürücü hücreleri de kapsayan hücresel bir savunma mekanizmasını da içermektedir. Literatürdeki pek çok çalışmada, interferon (IFN)- γ 'nın enfeksiyon ve pek çok farklı patolojik durumda organizmada artan neopterin düzeyinin temel uyarıcı olduğu gösterilmiştir.

Bu projede sağlıklı gönüllülerden alınan periferik kan örneklerinden mononükleer hücreler izole edilmiştir. Hücrelerin bir kısmı özgül olmayan mitojen olarak fitohemagglütinin (PHA) ve lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılmış, diğer bir grup hücrenin ise yüksek titrede transforme edici EBV salgılama özelliğine sahip B95-8 hücre dizisi süpernatantında bulunan virionlar ile transforme olması sağlanmıştır. Ardından periferik kan mononükleer hücrelerinden kültür ortamında elde edilen süpernatantlarda ELISA yöntemi ile neopterin, tümör nekroze edici faktör (TNF)- α , IFN- γ ve interleukin (IL)-6 düzeyleri ölçülmüştür. Böylece enfeksiyona bağlı olarak monositlerin erken ve geç dönemde verdikleri sitokin yanıtı neopterin düzeyleri ile birlikte değerlendirilmiştir. *In vitro* ortamda EBV'ye bağlı transformasyona neopterin yanıtını değerlendiren ilk çalışma olması nedeniyle, çalışmamız literatüre ve bu konuda bundan sonra yapılacak diğer çalışmalara kaynak oluşturacak niteliktedir.

Bu çalışma, **30.01.2008** tarihli ve **B.02.1.TBT.0.06.03.02-160-168.649** sayılı karar ve **SBAG-HD-285 (107S445)** proje numarası ile TÜBİTAK tarafından Hızlı Destek Projesi kapsamında desteklenmiştir.

1. GİRİŞ

EBV'ye karşı gelişen immün yanıt mekanizmaları, virüse karşı gelişen nötralizan antikorların yanı sıra T lenfositler ile doğal öldürücü hücreleri de kapsayan hücrel bir savunma mekanizmasını da içermektedir. Enfeksiyon ve pek çok farklı patolojik durumda organizmada artan neopterin düzeyinin temel uyarıcı IFN- γ 'dır. IFN düzeyleri viral enfeksiyonlarda artmakla birlikte; bazı çalışmalarda salıverildikleri hücrelerin farklılıklarına bağlı olarak IFN- α ve IFN- γ 'nın değişik oranlarda arttığı gösterilmiştir. *In vitro* ortamda IFN- α 'nın da neopterin üretimini uyardığı; ancak bunun için gereken IFN- α dozunun, IFN- γ dozunun yaklaşık 1000 katı kadar olduğu bilinmektedir.

Neopterin düzeyleri, hücrel immün aktivitenin bir göstergesi olarak kullanılabilir. Viral enfeksiyonlar sırasında artmış neopterin düzeyi hastalığın şiddeti ile doğru orantılıdır; inkübasyonun sonunda artar, virüse özgül antikorlar belirlenebilir olmadan hemen önce en yüksek düzeye ulaşır, serokonversiyon halinde ise azalır ve normale döner.

In vitro ortamda EBV'ye yanıt olarak salıverilen sitokinler erken ve geç dönemde ölçülmüş olmakla birlikte, literatürde B lenfositlerin EBV ile transforme olmasının ardından *in vitro* ortama salıverilen neopterin değerlendiren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma ile viral enfeksiyonlarda arttığı bilinen neopterin 3 hafta süresince periferik kan mononükleer hücre kültüründe zamana bağlı olarak ne oranda yükseldiği ve bunun EBV enfeksiyonuna bağlı B hücre transformasyonu sırasında ve sonrasında latent enfeksiyon gelişimi açısından önemli bir yere sahip olan IFN- γ , TNF- α ve IL-6 ile birlikteliği değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Neopterin

Neopterin, bir pürin nükleotidi olan guanozintrifosfattan (GTP), GTP siklohidrolaz-I aracılığı ile sentezlenen bir pteridin molekülüdür. IFN- γ , GTP siklohidrolaz-I'in ana stimülatörü olup, asıl olarak monosit/makrofajlardan neopterin sentezini uyarır. *In vitro* ortamda IFN- α da bu enzimi uyarmakla birlikte stimülasyon için ihtiyaç duyulan doz IFN- γ dozunun yaklaşık 1000 katı kadardır¹. Makrofaj aktivitesini indükleyen diğer potent maddelerin (örneğin zimosan, forbol ester, granülosit monosit-koloni stimüle edici faktör (GM-CSF), CSF, IFN- β), neopterin salgılanmasını etkilemedikleri gösterilmiştir². Monosit/makrofajlar dışında umbilikal ven endotel hücreleri veya kültür ortamındaki böbrek epitel hücrelerinin de uyarılmaya bağlı olarak neopterin salgıladıkları gösterilmiş olsa da, bunun makrofajlara oranla çok düşük düzeylerde gerçekleştiği bilinmektedir³. Bazı hastalarda yapılan çalışmalarda ise IL-2'nin T lenfositlerden IFN- γ salgılanmasını uyarak⁴, GM-CSF'in⁵ ise, büyük olasılıkla monosit/makrofaj sayısını artırarak⁶ neopterin sentezini dolaylı yoldan uyardıkları bildirilmiştir. T *helper* (Th)-1 tipi sitokin ailesi içinde yer alan IL-2'nin ve özellikle de IFN- γ 'nın T hücrelerinden salgılanarak sitotoksik T lenfosit aracılı hücrel immün yanıtı düzenlemeleri, neopterin düzeylerinin ölçülmesinin hücrel immün aktivitenin bir göstergesi olarak kullanılabileceğini göstermiştir⁶. Buna ek olarak, viral enfeksiyonlar gibi, hücrel immünitenin baskın olduğu bazı hastalıklarda gösterilen artmış neopterin düzeyleri de bu yargıyı desteklemektedir⁷. Akut bakteriyel enfeksiyonda orta düzeyde bir neopterin artışı saptanmasının nedeni, bu durumda Th2 tipi immün yanıtın aktive olması ve bunun sonucunda salgılanan IL-4, 5, 6, 9, 10 ve 13'ün hücrel immün yanıtı tetiklemeleridir⁸. Neopterin ve ürünleri, immün aktivasyona bağlı oksidatif stres durumunda da artmış oranda bulunurlar. Yapılan çalışmalar neopterin düzeylerinin Romatoid Artrit, İnsülin Bağımlı Diabetes Mellitus, Multipl Skleroz, Çölyak

hastalığı ve romatizmal ateşte de hastalığın şiddeti ile orantılı olarak yükseldiğini göstermiştir⁹.

Yapılan pek çok çalışmada akut viral hepatit, EBV, sitomegalo virüs (CMV) enfeksiyonları ile kızamık, kızamıkçık, kabakulak, su çiçeği ve infuenzada yüksek neopterin düzeyleri saptandığı gösterilmiştir. Viral enfeksiyonlar sırasında artmış olan neopterin düzeyleri, hastalığın şiddeti ile doğru orantılıdır. Neopterin düzeyi, inkübasyon periyodunun sonunda, klinik semptomlar henüz ortaya çıkmadan artar, virüse özgül antikorlar belirlenebilir olmadan hemen önce en yüksek düzeye ulaşır, serokonversiyon halinde ise giderek azalır ve normale döner. İnsan immün yetmezlik virüsü (*Human immunodeficiency virus*, HIV) gibi bazı kronik viral enfeksiyonlarda serokonversiyon sonrasında azalan neopterin konsantrasyonlarının normale dönmedikleri bildirilmiştir⁶. Neopterin düzeyleri, enfeksiyonlar dışında, allograft alıcılarında gelişen immün yanıtın derecesini belirlemek, HIV ile enfekte erişkinler ve malign hastalığı olan kişilerde prognozu değerlendirmek amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca bazı nörolojik ve kardiyovasküler hastalıklarda da artmış neopterin düzeylerine rastlanılmıştır. Bu tip hastalıklarda neopterin düzeylerinin izlenmesi patogenezin daha iyi anlaşılmasına yardımcı olabilir⁶.

Neopterin ve TNF- α 'nın sentezleri ve salgılanmaları arasında bazı benzerlikler bulunmaktadır. TNF- α , IFN- γ 'nın neopterin sentezi üzerindeki etkilerini artırır⁹, buna karşılık neopterin de lipopolisakkarit (LPS), IFN- γ ya da IL-2 tarafından uyarılan periferik kan mononükleer hücrelerinden TNF- α salınmasını artırır¹⁰. Neopterinin hematopoetik hücreler dışında damar düz kas hücrelerinde de TNF- α gen ekspresyonunu ve TNF- α proteini salıverilmesini artırdığı gösterilmiştir¹¹.

2.2. Epstein-Barr Virüs (EBV)

EBV, insan B lenfositlerini latent olarak enfekte edebilen ve bu hücreleri transforme ederek ölümsüz kılan bir herpesvirustur¹². Çocuklukta asemptomatik geçen EBV enfeksiyonu, adölesan dönemde kendi kendini sınırlayabilen bir lenfoproliferatif bir hastalık olan İnfeksiyöz Mononükleoz'a (IM) neden olabilmektedir¹³. Virüs aynı zamanda genetik, iatrojenik ya da enfeksiyöz bir nedenle immün yetmezliği bulunan kişilerde Burkitt lenfoma, nazofaringeal kanser ya da immünoblastom gibi malignitelere de yol açabilmektedir¹⁴. Tüm dünyadaki insanların yaklaşık %95'inin hayatlarının herhangi bir döneminde EBV ile karşılaştıkları ve EBV'nin yıllar boyunca persistan enfeksiyona neden olabildiği bilinmektedir¹⁵.

EBV'nin İmmün Sistem Üzerindeki Etkileri

EBV'nin immün sistem üzerindeki etkilerini incelemek için yapılmış pek çok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde EBV'ye karşı hücrelerin verdikleri yanıt incelenmiştir¹⁶; TNF- α , TNF- β , IL-2, IFN- γ , IL-6 ve GM-CSF düzeyleri ve birbirleri ile olan ilişkileri araştırılmıştır. Sağlıklı gönüllülerden alınan kandan ayrıştırılan periferik kan mononükleer hücrelerinden elde edilen kültür ortamında B lenfositlerin transforme edilmesinin ardından değişik zamanlarda alınan örneklerde ve enfekte olmayan kontrol grubunda herhangi bir zamanda TNF- α ve - β 'ya rastlanmamıştır. EBV ile enfekte olan örneklerde IL-2'nin 48. saatte, IFN- γ 'nın 1. haftada, IL-6'nın 2. haftada ve GM-CSF'nin ise 4. haftada saptanabilir düzeye ulaştığı gösterilmiştir. IL-6 ve GM-CSF ise sırasıyla 2. ve 2 ile 4. haftalarda yüksek düzeyde saptanmıştır. Ayrıca bu iki sitokinin düzeylerinin, özellikle non-aderan hücrelerin bulunduğu flasklarda yükseldikleri de yine bu çalışmanın sonuçları arasındadır¹⁶.

1996 yılında yayınlanan diğer bir çalışmada ise HIV ve EBV ile enfekte hastalar karşılaştırılmış, CD4+ hücreler ile birlikte başta IL-2, TNF- α , 5'-neopterin ve β -2 mikroglobulin düzeylerinin akut HIV-1 enfeksiyonu geçiren hastalarda EBV (+) hastalara göre daha düşük oranda olduğu gösterilmiştir¹⁷. 1990 yılında yapılmış olan bir çalışmada, EBV'nin ölümsüz olduğu dönemi koruması için otokrin büyüme faktörlerinin önem taşıdığı, çünkü EBV ile ölümsüz kılınmış hücre dizilerinin hücreden yoksun süpernatantlarının otolog hücrelerin proliferasyonun destekledikleri ve düşük dansitede bile büyümelerine olanak verdikleri vurgulanmıştır¹⁸. Süpernatantlardan molekül ağırlıklarına göre izole edilen iki büyüme faktöründen; molekül ağırlığı düşük olanın tespit edilememesine karşılık, yüksek molekül ağırlıklı molekülün IL-6 olduğu gösterilmiştir. 1990 yılında yapılmış olan diğer bir çalışmada ise *in situ* hibridizasyon analizleri uygulanarak, EBV ile transforme edilmiş hücrelerin yüzeylerinde, IL-6 mRNA ifadenmesi gösterilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları da IL-6'nın EBV ile transforme olmuş B hücrelerinin otokrin bir büyüme faktörü olarak IL-6 salgıladıklarını desteklemektedir¹⁹.

EBV ile ilişkili hastalıkların farklı formları olan akut- kendini sınırlayan IM, kronik aktif IM ve X-e bağlı lenfoproliferatif sendroma yakalanmış olan hastalarda yapılan bir başka çalışmada ise akut tip enfeksiyonu olan hastaların hemen hepsinde neopterin, IFN- γ ve IL-6 düzeylerinin yüksek olduğu saptanmış, diğer formlarda ise özellikle IL-6 yüksekliğinin akut enfeksiyon kadar belirgin olmadığı belirtilmiştir²⁰. Yine aynı şekilde akut EBV enfeksiyonu ile kronik yorgunluk sendromu arasında karşılaştırma yapan diğer bir çalışmada, akut enfeksiyon sırasında T lenfosit aktivasyonunu gösteren IL-2 düzeyleri ve CD8⁺ molekülleri ile monosit aktivasyonunu gösteren neopterin düzeylerinin arttığı; IL-1 β , IL-6 ve IFN- α düzeylerinde her iki durumda da herhangi bir değişiklik olmazken, IFN- γ düzeylerinin enfeksiyöz mononükleozun

özellikle akut fazında artmış olduğu gösterilmiştir²¹.

EBV'nin insanda depolandığı başlıca hücre tipi B lenfositlerdir. EBV, B lenfositlere virüsün başlıca glikoproteinleri olan gp350/220'nin kompleman reseptörü CR2/CD21 ile etkileşmesi sonrasında girer. Viral genomun çekirdeğe transferinin ardından latent genlerin ekspresyonu başlar. EBV'nin latent fazı sırasında en az 11 gen eksprese olabilmektedir. Bu genlerden bazıları transformasyonda rol oynar. Transformasyonda görev alan proteinler EBV nükleer antijeni (EBNA)-2, EBNA-3 ailesi ve latent membran proteini (LMP)-1'dir. EBNA-1 replikasyon için gereklidir, LMP-2 ise viral latentliğin sürdürülmesinde görev alır. *In vitro* koşullarda B lenfosit transformasyonu için gerekli olmayan EBNA- öncü protein (*leader protein*, LP), transforme B hücresinin uzun dönemdeki büyümesinden sorumludur²².

EBNA-1 geni DNA bağlayıcı bir proteini kodlar; bu protein virüsün enfekte hücre içinde replikasyonunda görev alır. Bu gen, latent fazın sürdürülebilmesi için gerekli olduğundan her tip latent fazda bulunmaktadır. EBNA-1, başta Burkitt lenfoma olmak üzere, EBV ile ilişkili malignitelerin viral patogenezinde de görev alır²³.

EBNA-2'nin transformasyonda görev aldığını gösteren ilk çalışmalar, EBV ile enfekte Burkitt lenfoma hücre dizisi olan P3HR-1 ile yapılmıştır. Bu dizide virüsün transformasyona yol açmamasının nedeni EBNA-2 kodlayan gen bölgelerindeki delesyondur. Böylece EBNA-2, transformasyonda mutlaka gerekli olmasının yanı sıra; CD23, CD21, LMP-1 ve LMP-2'nin B lenfosit yüzeyindeki ekspresyonlarını da artırmaktadır²³.

EBNA-3 ailesi içerisinde 3A, 3B ve 3C olarak adlandırılan alt tipler bulunmaktadır. Bunlardan 3B, EBV transformasyonu için gerekli değildir. EBNA-3 proteinleri bir lösin zincir motifi taşırlar, bu motif pek çok memeli transkripsiyon faktörü ile homoloji göstermektedir, ancak bu proteinlerin kesin görevleri henüz net olarak tanımlanamamıştır²³.

EBNA-LP ve EBNA-2, B hücrelerinin enfekte olmasının ardından eksprese olan ilk proteinler olup birlikte siklin D2 sentezini aktive ederek B lenfositlerin hücre siklusunda G1 fazına girmelerini sağlarlar. BNA-LP'nin, retinoblastom proteini ve p53 tümör baskılayıcı protein ile aynı lokalizasyonda bulunduğu g sterilmiştir²³.

LMP-1 ise pleiotropik etkilere sahip olan; eksprese olduğu hücrede yüzey moleküllerinin sentezini artıran, antiapoptotik proteinleri uyaran ve IL-6 ile IL-8'in sentezlerini stimüle eden transforme edici bir major molek ld r²⁴. Yapılan bazı  alışmalar, LMP-1'in tümör nekroze edici faktör reseptörü (TNFR) s peraillesinin bir  yesi olarak aktive olduğunda pek çok sinyalizasyon yolağını, liganddan bağımsız bir şekilde tetiklediğini, g stermektedir^{25,26}. LMP-2'nin ise *in vitro* koşullarda B hücre transformasyonu için gerekli olmadığı g sterilmiştir²⁴.

Latent genlerin ekspresyonu, çeşitli dokularda farklılaşmanın derecesine ve tümör tipine bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Bu bilgi viral latent fazın üç farklı şekilde incelenmesini sağlamıştır. Her üç fazda bulunan EBV proteinleri ve bu fazların özelliklerini taşıyan tümör tipleri birbirinden farklıdır. Buna göre 1. tip latent faz özelliği (*latency I*) gösteren Burkitt lenfomada EBNA-1 proteini eksprese olurken, 2. tip latent fazda EBNA-1 ile birlikte LMP-1 ve LMP-2 proteinleri eksprese olmaktadır. Bu latent faz paternini gösteren tümörler;

diferansiye olmayan nazofaringeal karsinom, Hodgkin lenfoması ve T hücreli lenfomadır. EBNA-1, EBNA-2, EBNA-LP, EBNA-3A/3B/3C, LMP-1 ve LMP-2 proteinleri ise immünoblastik lenfoma ve post-transplant lenfomada gözlenen 3. tip latent fazda bulunurlar²².

LMP-1 ekspresyonu, primer B hücresinde EBV enfeksiyonu ve aktivasyonu ile ilişkili pek çok değişikliğe neden olur. Bu değişiklikler arasında kümelenme (*clumping*), CD23, CD39, CD40 ve CD44 yüzey moleküllerinin ekspresyonunda artış ile CD10 ekspresyonunda azalma sayılabilir. Bunun yanı sıra artmış LMP-1 ekspresyonu bcl-2, MCL-1 ve A20 gibi anti-apoptotik proteinleri indükleyerek B hücrelerini apoptozise karşı korumaktadır. LMP-1; IL-6 ve IL-10 üretimini de uyarak EBV enfeksiyonuna karşı enflamatuvar ve immün yanıtların gelişimini destekler²³.

Kis ve arkadaşları²⁷, *in vitro* ortamda EBV ile enfekte edilen ve yalnızca EBNA-1 eksprese eden Hodgkin lenfoma kaynaklı hücre dizisinde, CD40 ligand ve IL-4 uygulamasının ardından LMP-1'in indüklendiğini göstermişler, bunun ardından yaptıkları diğer bir çalışmada ise farklı hücre dizilerinde EBNA-2 yokluğunda hem insan hem de EBV tarafından kodlanan IL-10'un da LMP-1'i indükleyebildiğini belirtmişlerdir. IL-10'un, östrojen yokluğunda EBNA-2'nin baskılandığı lenfoblastoid hücre dizisi olan ER/EB2-5'te LMP-1'i indüklediği, ayrıca transforme olmamış ve EBNA-2'den yoksun EBV suşu olan P3HR-1'in de LMP ekspresyonunu indüklediği, EBV pozitif NK lenfoma hücre dizisinde ise LMP-1 ekspresyonunu artırdığı bildirilmiştir²⁷. Yapılan başka bir çalışmada ise Burkitt lenfoma hücre dizisinde ve transforme olmamış B hücrelerinde EBNA-2'nin, IL-18 reseptörünün 2 ayrı zincirini indüklediği gösterilmiştir²⁸.

In vitro ortamda farklı hücre dizilerinden oluşan B hücre panelinde yapılan bir çalışmada, hücrelerin bir kısmı farklı EBV suşları ile enfekte edilmiş ya da transformasyon ile ilişkili viral genle transfeksiyon sağlanmıştır. Daha sonra polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile yapılan incelemede, EBNA-2 geni defektif olan bir virus suşu taşıdığı bilinen Daudi hücre serisi dışında tüm EBV pozitif Burkitt lenfoma hücre serileri ile lenfoblastoid hücre serilerinde insan IL-10 mRNA'sı saptanmıştır. Bu çalışma sonuçları, daha önceki çalışmalarda elde edilen LMP-1'in EBV tarafından indüklenen B lenfosit transformasyonunda görev alan hücresel transaktivasyonda rol oynadığına ilişkin bulguları desteklemektedir²⁹. Eliopoulos ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer çalışmada da³⁰ karsinom hücre dizilerinde ve SV40-transforme keratinositlerde, CD40 ligasyonuna benzer bir şekilde LMP-1 ekspresyonu sonrasında IL-6 oluşumunun indüklendiği gösterilmiştir. IL-6'nın epitelial hücre büyümesini desteklediğini gösteren çeşitli çalışmalardan sonra, IL-6 sekresyonunun CD40 ligasyonu ve LMP-1 ekspresyonu sırasında benzer şekilde tümör nekroze edici faktör reseptör ilişkili faktör (TRAF) proteinleri aracılığı ile kontrol edilebilmesi de, normal ve transforme epitelial hücrelerin büyüme sürecinde önemli olabileceği sonucunu desteklemektedir³⁰.

Sitokinlerin hastalığın evresine bağlı olarak gösterdikleri farklı yanıtlar, konak ile EBV aracılı lenfoblastik transformasyon süreci arasındaki ilişkinin pek çok farklı parametreye bağlı olduğunu ortaya koymaktadır. Sitokin salınması, akut ve kronik enfeksiyon sırasında değişebildiği gibi, transformasyon sürecinde de transformasyonun tipine, eksprese olan proteine ya da gelişen tümöre göre farklılıklar göstermektedir.

2.3. B95-8

B95-8; lenfoblast ve fibroblast morfolojisinde, tamarin cinsi maymun periferik kan lenfosit dizisidir. Yüksek titrede transforme edici virion şeklinde EBV salgılama özelliğine sahiptir³¹.

IFN- α 'nın transformasyon üzerindeki inhibe edici etkisini inceleyen bir çalışmada, B95-8 hücre dizisi ile klinik olarak elde edilmiş EBV izolatları arasında inhibisyon açısından herhangi bir fark saptanmamıştır³². Transformasyon özelliği hücrenin elde edildiği diziye bağlı olup; B95-8 ile birlikte farklı bir seri olan P3HR-1 kullanılarak yapılan bir çalışmada, virüsü salgılayan P3HR-1 dizisi, sahip olduğu küçük bir delesyon nedeniyle transformasyonu sağlayamamaktadır³³. Ayrıca yine aynı çalışmada B95-8 ile inkübasyon sonrasında şiddetli bir IL-1 ve TNF- α üretimi gözlenmekte, buna karşılık P3HR-1 dizisinde bu etkiyle karşılaşılmamaktadır.

Tablo 1 : B95-8 hücre dizisinin özellikleri³⁴

Profil	EBV üreten maymun (tamarin) lenfosit hücre dizisi
Üretildiği kaynak	<i>Cotton-top tamarin</i>
Bilimsel adı	<i>Saguinas oedipus</i>
Vaka öyküsü	Lökositler
Sınıflama	Transforme hücre
Hazırlandığı doku tipi	Kan
Besiyeri	%10 oranında ısı ile inaktive edilmiş fetal sığır serumu içeren RPMI1640
Pasaj metodu	Basit dilüsyon
CO₂ Konsantrasyonu	%5
Yaşam süresi	Sonsuz
Morfoloji	Lenfosit benzeri
Özellikleri	EBV ile transforme olmuş lenfosit hücre dizisi; hücreler EBV (herpesvirus 4) salgıyıyor
Tepit edilen virüs DNA'sı	CMV(-), EBV(+), HHV6(-), HHV7(-), BKJ(-), JCV(-), ADV1(-), parvoB19(-), HBV(-), HTLV1(-), HTLV2(-), HIV1(-), HIV2(-)
Özel not	B95-8 hücre dizisi, EBV kaynağı olarak kullanılmaktadır. EBV'nin insan B lenfositlerini enfekte etme yeteneği bilindiğinden B95-8 hücre dizisi Biyogüvenlik Tip 2 Laboratuvarlarda çalışılmalıdır

2.4. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, prokaryotik ya da ökaryotik hücrelerin kontrol edilebilen şartlar altında üretilmesi tekniğidir. Hücre kültürü çalışmaları aracılığı ile metabolizma ile ilişkili mekanizmaların yanısıra, sinyal transdüksiyonu ve gen ekspresyonunun regülasyonu ile ilgili bilgilere de ulaşabilmek mümkün hale gelmiştir.

Bir organizmanın dokularından *in vitro* hücre çoğalması olmaksızın hazırlanan kültüre “primer kültür” denir. Kültür ortamından alınıp çoğaltılan hücrelerden oluşan kültür ise “sekonder hücre kültürü” olarak tanımlanır. Bazı tümörlerden elde edilen hücreler dışında primer hücre kültürlerinin pek çoğu sınırlı bir yaşam süresine sahiptir. Belirli sayıdaki bölünmenin ardından hücreler yaşamayı sürdürdükleri halde, yaşlanarak bölünme özelliklerini kaybedebilirler. Transformasyon sonrasında hücreler ölümsüzlük özelliği kazanabildikleri gibi, tümöral dokulardan elde edilen sürekli hücre serileri de yine ölümsüz karaktere sahip olabilir.

Tek bir hücre tipi hakkında elde edilebilecek en iyi bilgi, o hücrenin dokudaki diğer hücre tiplerinden ayrıldıktan sonra üretilmesi ile sağlanabilmektedir. Farklı hücre türlerini ayırmak için değişik yöntemler uygulanabilir. Kültür ortamındaki hücrelerden bazıları sıvı ortamda üreyebildikleri gibi “*adherent hücreler*” olarak tanımlanan bir grup hücre de katı ortama tutunarak ürerler. Kültür ortamında bu hücrelerin büyüebilmeleri ve bölünerek çoğalabilmeleri için mutlaka yeterli miktarda alan ve besiyeri bulunması gerekmektedir. Bu nedenle kültürler günlük olarak kontrol edilmeli, ortama düzenli olarak besiyeri eklenmeli ve ölü hücreler uzaklaştırılmalıdır. Kültürdeki hücreler önce “sessiz evre (lag fazı)” denilen bir döneme girerler. Bunun ardından yüksek metabolik

aktivitenin gözleendiği “logaritmik artış (üreme) dönemi” başlar. Hücreler, hücre sayısının sabit kaldığı bir durağan evreye girdiklerinde besiyerinden alınmaları gerekmektedir. Yoğunluğun arttığı kültür ortamlarında, hücre-hücre temasının “kontakt inhibisyon” adı verilen bir mekanizma sonucunda büyümenin durmasına neden olduğu ve aynı zamanda hücresel farklılaşmayı da tetikleyebildiği bilinmektedir.

Hücre kültürü çalışmalarında en sık yaşanan problemlerin başında kontaminasyon gelmektedir. Bu nedenle başarılı bir hücre kültürü için ortamın, kullanılan besiyerleri ve diğer maddelerin mutlaka steril olması gereklidir. Genellikle kontaminasyonun başlıca nedeni farklı kişilerce kullanılan ortak stok solüsyonlarıdır. Komplet bir kültür ortamında hücrelerin beslenmesi için, besi ortamına serum, L-glutamin ve tercihe bağlı olarak antibiyotik eklenmesi gerekmektedir. Serum olarak en sık kullanılan fetal sığır serumudur (*fetal bovine serum*, FBS), bunun dışında at serumu ya da insan serumu da kullanılabilir. Kullanılan FBS'nin mikoplazma açısından temiz ve endotoksin miktarının düşük/yok olduğu üretici tarafından doğrulanmış olmalıdır. Hücre kültürlerinde önlem olarak antibiyotik kullanılması mutlaka gerekli olmamakla birlikte, kontaminasyonların önlenilmesi açısından, özellikle tecrübesiz araştırmacılar için, önerilen bir yöntemdir. En sık kullanılan antibiyotikler penisilin ve streptomisindir. Primer hücre kültürlerinde ise doku izolasyon tekniklerinin yarattığı riskler göz önünde bulundurularak rutin olarak antibiyotik kullanılması önerilmektedir. Özellikle primer kültür hücreleri ve immortalize hücreler üredikleri ortamın pH'sına karşı oldukça duyarlıdır. Besiyerleri pH indikatörü olarak sıklıkla fenol kırmızısı içermektedirler. Besiyerinin renginin kırmızıdan giderek mor bir renge dönüşmesi, kullanıcı için, var olanın yerine taze bir besiyeri hazırlamak gerekliliği açısından uyarıcı olmaktadır³⁵.

EBV'nin en belirgin özelliklerinden bir tanesi hücrelerde neden olduğu transformasyondur. Yabancı bir DNA'nın hücre içine girerek konak DNA'sının bir parçası haline gelmesi ve DNA'daki genlerin ifadelenmesi sonucunda hücrenin değişime uğraması "transformasyon" olarak tanımlanmaktadır³⁶. Doku kültüründeki hücrelerin transformasyonu, "transfeksiyon" olarak da ifade edilmektedir.

Transforme olan hücreler diğer hücrelerden belirgin bazı farklılıklar göstermektedir. Transformasyona bağlı değişiklikler, virüsün CD21 molekülü aracılığı ile hücreye bağlanmasını takiben saatler içerisinde gelişmeye başlar, ancak 3-4. günden sonra belirgin hale gelir. Aktif olarak büyüyen bir hücre kültüründe gelişen transformasyonun en belirgin morfolojik bulgusu, flask zemininde oluşan hücre kümeleridir (clumping); hücre kümeleri büyümekte olan bir hücre kültüründe çıplak gözle görülebilen ilk değişiklik olarak kabul edilmektedir. Tam bir transforme hücre kültürü oluşması için 6-8 hafta kadar bir süre geçmesi gerekmektedir. Transforme olan hücrelerde üreme tarzındaki, hücre yüzeyindeki değişiklikler ile birlikte birtakım biyokimyasal farklılaşmalar ile tümörogenisite ve kromozomal farklılaşmaların yanısıra çeşitli morfolojik değişiklikler de meydana gelmektedir. Hücreler, temas inhibisyonunun kaybolması sonucunda üst üste üreyerek kalın tabakalar meydana getirirler. Ayrıca transforme hücrelerin katı yüzeye tutunma yetenekleri de azalır.

2.5. Diğer Sitokinler

2.5.1. Tümör Nekroze Edici Faktör- α

TNF- α , gram negatif bakteriler ve diğer enfeksiyöz ajanlara karşı gelişen akut enflamatuvar yanıttan sorumlu primer sitokindir, ayrıca ağır enfeksiyonlarda görülen pek çok sistemik komplikasyonun

gelişmesinde de sorumludur. Başlıca salıverildiği kaynak, aktive olmuş mononükleer fagositer hücreler olmakla birlikte TNF- α , antijen ile uyarılmış T lenfositlerden, doğal öldürücü hücrelerden (*natural killer*, NK) ve mast hücrelerinden de salıverilebilir. TNF- α 'nın en güçlü uyarıcı LPS'dir. T lenfositler ve NK hücrelerinden salıverilen IFN- γ , LPS ile uyarılan makrofajlardan TNF sentezini artırmaktadır³⁷.

TNF- α 'nın 55 kD ve 75 kD molekül ağırlığında iki reseptörü bulunmaktadır (TNF-RI ve TNF-II); her iki reseptör de pek çok farklı hücre yüzeyinde yer almaktadır. *Knockout* fareler ile yapılan çalışmalar, sitokin fonksiyonu açısından en önemli reseptörün TNF-RI olduğunu ortaya koymaktadır. TNF reseptör ailesinin üyeleri gen ekspresyonunu ya da apoptozisi indükleyebildikleri gibi bazı aile üyeleri her ikisini de uyaramaktadırlar³⁷.

TNF- α 'nın temel fizyolojik fonksiyonu, enfeksiyon bölgesine nötrofil ve monositlerin toplanmasını sağlamak ve bu hücreleri mikropların eradikasyonunu sağlamak üzere aktive etmektir. TNF- α bu işlevleri, vasküler endotel hücreleri ile lökositler üzerindeki çeşitli etkileri yolu ile sağlamaktadır. Bu da özellikle lokal enflamatuvar yanıt gelişimi açısından önem taşımaktadır. Düşük miktarlarda salıverilen TNF- α , endotel hücrelerinde adezyon molekülleri ile IL-1 ve kemokin üretimini tetikleyerek lokal inflamasyonu düzenlerken; orta miktarda TNF- α salıverilmesi beyni etkileyerek ateşe, karaciğerden akut faz proteinlerinin salgılanmasına ve kemik iliğinde lökosit üretimini tetikleyerek sistemik etkilerin ortaya çıkmasına yol açar. Yüksek düzeylerde salıverilen TNF- α ise kaşeksi gelişimini tetikler, miyokardiyal kontraktile ile vasküler düz kas tonusunu inhibe eder ve karaciğerde hipoglisemiye neden olarak şok tablosunun ortaya çıkmasına neden olur. TNF- α düzeylerinin ölçülebilmesi, LPS ile

indüklenmiş TNF- α ve diğer bazı sitokinlerin üretimi sonucunda gram negatif bakterilere karşı gelişen septik şok sendromunda hastalığın prognozu açısından prediktif bir değere sahiptir³⁷.

2.5.2. İnterferon- γ

Tip II interferon olarak da bilinen IFN- γ , hem doğal hem de kazanılmış immün yanıtta makrofajları aktive eden bir sitokindir. Başlıca kaynağı CD8⁺ T hücreler, Th1 tipi hücreler, NK ve NKT hücreleri, $\gamma\delta$ -T hücreleri, B lenfositler, dendritik hücreler ve aktive makrofajlardır. IFN- γ , CD4⁺ T lenfositlerin Th1 tipine farklılaşmasını sağlar. NK hücre yanıtında artışa neden olan IFN- γ , Th2 alt tipindeki hücreleri ise inhibe eder. Çeşitli hücrelerde antijen sunumunu ve opsonizasyonu tetikleyen IFN- γ , makrofaj ve endotel hücrelerini aktive eder, CD8⁺ T lenfositlerin oluşumuna katkıda bulunur, makrofaj ve endotel hücrelerini uyarır, B hücre proliferasyonuna ve farklılaşmasına neden olur. IFN- γ , yüzey reseptörlerinde artışa yol açar, nitrik oksit ve süperoksit sentezini tetikler, lenfosit ve monosit kemotaksisini indükler, kaşeksi oluşumuna neden olur ve antiviral etkinliği artırır. IFN- γ , inflamasyon sırasında makrofaj ve dendritik hücreleri aktive ederek, doğal ve kazanılmış immün yanıt arasında bir köprü oluşturur³⁸.

2.5.3. İnterlökin-6 (IL-6)

IL-6, hem doğal hem de kazanılmış immün yanıtta rol oynayan bir sitokindir. Mononükleer fagositer hücrelerden, vasküler endotelden, fibroblastlardan ve diğer bazı hücrelerden, mikropalara ve özellikle IL-1 ve TNF gibi diğer sitokinlere yanıt olarak salıverilmektedir; aynı zamanda bazı aktive T lenfositlerin de IL-6 sentezledikleri bilinmektedir. IL-6'nın fonksiyonel formu homodimer yapıdadır. IL-6 reseptörü her biri Tip-1 sitokin reseptör ailesine dahil olan bir sitokin bağlayıcı protein ile sinyal iletilici alt üniteden oluşur. 130 kD'luk moleküler

ağırlığa sahip sinyal iletici alt ünite, aynı zamanda “gp130” olarak adlandırılır ve diğer sitokin reseptörlerinin de sinyal komponentleri arasında yer almaktadır. IL-6 tarafından uyarılan başlıca sinyal yolu JAK1 ve STAT3 moleküllerini içermekte olup, aktivasyonu çeşitli genlerin transkripsiyonuna yol açmaktadır³⁷.

IL-6 temel olarak B lenfositlerin immünoglobulin yapımını indükler, T lenfositleri uyarak IL-2 yapımını tetikler, hematopoetik koloni stimülasyonunu sağlar, glukokortikoid sentezini artırır, osteoklast aktivasyonuna katkıda bulunur, keratinositlerin büyümesini uyarır, enfeksiyonlara karşı özgül olmayan direnç sağlar. Ateş oluşumunda da rol oynayan IL-6, IL-1 ve TNF ile sinerjistik etkiye sahip bir sitokindir³⁸.

Doğal bağışıklıkta akut faz proteinlerinin sentezini tetikleyen IL-6, CSF'ler ile birlikte çalışarak nötrofil üretimini artırır. Kazanılmış immün yanıtta ise, IL-6 antikor üreten hücreler haline gelmiş olan B lenfositlerin büyümelerini tetikler. Benzer şekilde neoplastik plazma hücreleri (miyelomalar) için de büyüme faktörü olarak görev yapan IL-6, aynı zamanda miyeloma hücrelerinden de otokrin bir büyüme faktörü olarak salıverilmektedir. Bunlara ek olarak IL-6, miyelomalardan köken alan monoklonal antikor üreten hibridoma hücrelerinin de büyümelerini tetiklemektedir. Ayrıca IL-6, IL-17 gibi çeşitli proenflamatuvar sitokinlerin üretimini artırarak ve düzenleyici T hücrelerin (Treg) aktivasyonlarını baskılayarak hücre aracılı immün yanıtı da düzenlemektedir³⁷.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihaz Listesi

ELISA okuyucu (Sunrise Remote/Touch Screen, Tecan Austria GmbH, Grödig, Avusturya)

ELISA yıkayıcı (Columbus Plus, Tecan, Tecan Austria GmbH, Grödig, Avusturya)

Santrifüjler (3K15 ve 6K15, Sigma, Osterode am Herz, Almanya)

Sıvı azot tankı (AirLiquid, Fransa)

Derin dondurucu (Sanyo, MDF-U51865, Japonya)

%5 CO₂'li su ceketli inkübatör (Sanyo MCO-18AIC, Gunma-Ken, Japonya)

Laminar akımlı güvenlik kabini (NUAIRE Biological Safety Cabinets, Class II A/B3, Model No: NU-425-400, Plymouth, ABD)

Inverted mikroskop (Leica DM IL, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Almanya)

Hassas terazi (Shimadzu, AY120,SPM, Japonya)

Su banyosu (Termostatlı, ısıtmalı, rotorlu) (Heto Holten A/S OBN 18, Heto HMT 200, Allerød, Danimarka)

Distile su cihazı (Millipore, Q-GardR 1 kartuşlu, Milli-QR Synthesis A 10 TM, Molsheim, Fransa)

Dairesel Hareketli Çalkalayıcı (*Orbital shaker*) (Biosan OS-20, Medical – Biological Research & Technologies, Litvanya)

Yatay Çalkalayıcı (*Horizontal Shaker*) (Biosan, Medical–Biological Res. & Tech., Litvanya)

Vorteks (Labnet International, Woodbridge, ABD)

Microstat bilgisayar tabanlı istatistik programı

MS Excel, Office XP

SPSS v.10.0 for Windows bilgisayar tabanlı istatistik programı

3.2. Kullanılan Gereç Listesi

250 mL'lik, 75 cm²; *DNAse RNAse free*, steril, nonpirojenik hücre kültür şişeleri (Cell culture flask, CellStarR, Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Almanya)

Konik tabanlı, kapaklı 50 ml'lik steril polipropilen tüp (Greiner, Bio-one GmbH, Almanya)

Konik tabanlı, kapaklı 15 ml'lik steril polipropilen tüp (Greiner, Bio-one GmbH, Almanya)

1,5 ml'lik eppendorf tüp (LP, SPA, İtalya)

1 ml'lik steril enjektör (Hayat Tıbbi Aletler, İstanbul, Türkiye)

5 ml'lik steril enjektör (Hayat Tıbbi Aletler, İstanbul, Türkiye)

10 ml'lik steril enjektör (Hayat Tıbbi Aletler, İstanbul, Türkiye)

20 ml'lik steril enjektör (Hayat Tıbbi Aletler, İstanbul, Türkiye)

50 ml'lik steril enjektör (Hayat Tıbbi Aletler, İstanbul, Türkiye)

Thoma lamı (Marienfeld GmbH&Co.KG, Almanya)

48 çukurlu hücre kültür plağı (Greiner bio-one CELLSTAR, TC-Plate No.677180, Almanya)

96 çukurlu düz tabanlı mikropalak (Greiner Bio-one CELLSTAR, Almanya)

0,2 µ'luk enjektör filtresi (Orange Scientific, Gyro Disc CA, Katalog No. 1520012, Belçika)

3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Fetal sığır serumu (*fetal bovine serum*) (BiochromAG, Katalog No. S0115, Almanya)

RPMI-1640 (2.0 g/l NaHCO₃, stabil glutamin içeren, düşük endotoksinli) (Biochrom AG, Katalog No. FG1215, Almanya)

%0,9 izotonik sodyum klorür (NaCl) solüsyonu (İ.E.Ulagay İlaç Sanayii, Türkiye)

Heparin (Nevaparin, 5000 IU/ml; Mustafa Nevzat İlaç Sanayii, İstanbul)

Ficoll-Hypaque (Histopaque-1077, Sigma Aldrich Co., Katalog No. 1077-1, St. Louis, MO, ABD)

Tripan mavisi (Applichem, C.I. 23850, CAS No. 72-57-1, Darmstadt, Almanya)

Fitohemaglütinin (PHA-L) (Sigma Aldrich Co., Ürün No. L2769, St. Louis, MO, ABD)

LPS (Sigma Aldrich Co., Ürün No. L-3755, St. Louis, MO, ABD)

3.4. Hazırlanan Solüsyonlar

PBS (*phosphate buffered saline*, 10mM, pH 7,4)

3.5. Kullanılan Kitler

Biochip Sequence EBV (EBV kapsid antikorlarının tespiti için immünofloresan kiti) Euroimmun Medizinische Labordiagnostica AG, Almanya)

Neopterin ELISA kiti (96 testlik) (Katalog No. DE 65101, Demeditec Diagnostics GmbH, Almanya)

İnsan TNF- α ELISA kiti (96 testlik) (Katalog No. KHC3014, BioSource International Inc., ABD)

İnsan IFN- γ ELISA kiti (96 testlik) (Katalog No. KHC4021BioSource International Inc., ABD)

İnsan IL-6 ELISA kiti (96 testlik) (Katalog No. KHC0061, BioSource International Inc., ABD)

3.6. Yöntemler

3.6.1. EBV Üreten B95-8 Hücre Dizisinin Kültürü

Çalışmada EBV kaynağı olarak kullanılan B95-8 hücre dizisi, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Cemalettin Aybay'ın hücre bankasından temin edildi. Sıvı azot içinde muhafaza edilen hücre dizisi, çalışmada kullanılmak üzere 37°C'de Coligan ve arkadaşlarının³⁹ tanımladığı şekilde çözöldü ve 15 ml PBS içinde 1200 rpm'de (300 x g) 10 dakika santirfuj edildi. Üstte yer alan süpernatant, biyo-güvenlik kabini içinde atıklar için kullanılan %10'luk hipoklorit dolu kaba aktarıldıktan sonra, çöktirideki (pellet) hücreler 10 ml PBS içinde tekrar homojenize edildi ve bir kez daha 1200 rpm'de (300 x g) 10 dakika santirfuj edildi. Çalışmanın sonraki basamaklarında da EBV içeren bütün atıklar, atılmadan önce 10 dakika %10'luk hipoklorit çözeltisi içinde tutuldu. Üstte yer alan süpernatant -yukarıda anlatıldığı şekilde- atıldıktan sonra, hücre pelleti daha önceden 37°C'ye getirilmiş, %10 FBS ile zenginleştirilmiş 20 ml RPMI-1640 besiyeri içinde homojenize edilerek 75 cm²'lik hücre kültür flaskına aktarıldı. Flask 37°C, %5 CO₂ konsantrasyona ayarlanmış su ceketli etüv içerisine konuldu. Hücrelerin yeterli yoğunluğa ulaşmaları için kültür flaskları 3 gün boyunca etüvde inkübe edildi.

3.6.2. Örneklerin Toplanması

Bu çalışma için Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan 22 Ekim 2007 tarih ve 354 sayılı karar ile izin alınmıştır.

Çalışmanın birinci basamağına Bilgilendirilmiş Olur Formu imzalamış 20 sağlıklı gönüllü katıldı. Aşağıda anlatıldığı şekilde EBV IgM açısından seronegatif olduğu gösterilen her bir gönüllüden sağ koldan *antecubital* venden 20 ml periferik venöz kan alındı. Periferik kan mononükleer hücre izolasyonu⁴⁰ ve transformasyon⁴¹, Coligan ve arkadaşlarının tanımladığı yöntem modifiye edilerek gerçekleştirildi. Alınan kan örnekleri 50 ml'lik steril konik tabanlı polipropilen tüpler içerisinde 20 ml kan, 20 ml %0,9 izotonik sodyum klorür solüsyonu (serum fizyolojik, SF) ve 200 µl heparin olacak şekilde karıştırıldı. 20 ml'lik iki ayrı enjektöre çekilen bu karışım, 7,5 ml Ficoll-Hypaque üzerine, karışmaları engellenerek damla damla olacak şekilde yayıldı. 1500 rpm'de (400 x g) 30 dakika santrifüj edildikten sonra, her iki tüpten elde edilen periferik kan mononükleer hücreleri (*buffy coat*) steril pastör pipeti ile toplanarak 10-15 ml arasında değişen miktarlarda tek bir steril 50 ml'lik konik tabanlı tüpe aktarıldı. Elde edilen *buffy coat*'ın üzeri toplam 40 ml olacak şekilde SF ile tamamlandıktan sonra 2000 rpm'de (800 x g) 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant atıldı, pellet içerisindeki hücreler homojenize edildi ve üzerine 40 ml SF eklenerek 1800 rpm'de (700 x g) 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üst kısım atıldı, pellet homojenize edildi ve üzerine 40 ml SF eklenerek 1800 rpm'de 10 dakika daha santrifüj edildi. Elde edilen pellet 3 ml SF ile homojenize edildikten sonra hücreler %0,04 Tripan mavisi ile 1:1 oranında karıştırıldıktan sonra Thoma lamında sayıldı. 500.000 hücre/çukur olacak şekilde %10 FBS içeren RPMI-1640 ile dilüe edildikten sonra 48 çukurlu hücre kültür plaklarına 10'ar µl %10 FBS içeren RPMI-1640; SF içerisinde hazırlanmış 1mg/ml konsantrasyonda PHA (final konsantrasyonu 10 µg/ml), SF içerisinde

hazırlanmış 2mg/ml konsantrasyonda LPS (final konsantrasyonu 20 µg/ml) ile birlikte 10 ve 100 µl B95-8 süpernatanı eklenmiş çukurlar üzerine 1'er ml olacak şekilde dağıtıldı. İlgili plaklardan 0., 12., 24., 48. ve 72 saatler ile 1., 2., ve 3. hafta toplanan örnekler 300 µl/çukur olacak şekilde 96 çukurlu düz tabanlı mikropaklara dağıtıldı ve çalışma zamanına kadar -80°C'de saklandı (şekil 1, 2).

%10 FBS içeren süpernatantlar ile yapılan ön deneyler sonrasında, FBS'nin özgül olmadan neopterin sentezini uyardığı düşünülerek kültür ortamında FBS yerine AB Rh(+) insan serumu kullanılmasına karar verildi. Bu amaçla 42 yaşında sağlıklı, kan grubu AB Rh (+) olan bir erkek gönüllüden alınan 50 ml periferik venöz kan örneğinden elde edilen serum 56°C'de inaktive edildikten sonra 0,2 µ'luk filtreden geçirildi ve RPMI-1640 içerisine %2 konsantrasyonda olacak şekilde ilave edildi.

Dördü kadın, dördü erkek 8 sağlıklı gönüllüden yeniden alınan kan örneklerinden yukarıda anlatılan şekilde izole edilen periferik kan mononükleer hücreleri; bu defa kontrol grubu, PHA ile uyarılmış grup, LPS ile uyarılmış grup ve 10 µl/ukur B95-8 süpernatanı ilave edilmiş grup olmak üzere 48 çukurlu hücre kültür plağına dağıtıldı. 0., 12., 24., 48. ve 72 saatler ile 1., 2., ve 3. hafta toplanan hücre kültür süpernatanı örnekleri, 300 µl/çukur olacak şekilde 96 çukurlu düz tabanlı mikropaklara dağıtılarak çalışma zamanına kadar -80°C'de saklandı.

3.6.3. İmmünofloresan Yöntemi ile EBV Antikorlarının Saptanması

Gönüllülerden alınan kanlardan ayrılan serum örnekleri, öncelikle EBV kapsid antijenlerine karşı oluşan antikorların tespit

edilmesinde altın standart⁴² olan immünofloresan yöntemi ile değerlendirildi (Biochip Sequence EBV, Euroimmun Medizinische Labordiagnostica AG, Almanya). Farklı EBV antijenleri ile kaplı slaytlarda viral kapsid antijenine (VCA) karşı gelişen IgG ve IgM tipi antikorların yanısıra 'Early Antigen' (EA) ve Nükleer Antijene (EBNA) karşı gelişen antikorların varlığı araştırıldı, ayrıca aynı testte anti-VCA IgG aviditesi de değerlendirildi. Anti-VCA IgM varlığı açısından değerlendirilecek olan serum örnekleri, EUROSORB ile solüsyonu 1:10 oranında dilüe edilerek IgG sınıfındaki antikorların ortamdaki uzaklaştırılması sağlandı. BIOCHIP slaytı üzerindeki ilgili bölgelere 25'er µl serum örneklerinin eklenmesinin ardından 1 saat inkübe edilen slayt, 1 litre distile su içerisinde çözölmüş 1 paket PBS tuzu (pH 7,2) içerisinde eklenen 2 ml Tween 20 solüsyonu ile yıkandı. Aviditenin değerlendirileceği bölgeye 20 µl üre, nükleer antijenin değerlendirileceği bölgeye 20 µl kompleman, diğer bölgelere ise 20'şer µl PBS-Tween eklendi ve slaytlar 30 dakika inkübe edildi. Bu sürenin sonunda PBS-Tween solüsyonu ile yıkanan slaytlardaki her bir bölgeye bu defa 20 µl işaretli antikor eklendi, 30 dakikalık inkübasyon süresinin ardından gömücü ortam (*embedding medium*) aracılığı ile uygun lamalar slaytlar üzerine kapatıldı ve görüntüler immünofloresan mikroskopta değerlendirildi.

3.6.4. Hücre Kültür Süpernatantlarında Sitokin Ölçümü

37°C'lik %5CO₂ etüvünde bekletilen uyarılmış ve uyarılmamış hücre kültür süpernatantlarında 12., 24. 48. ve 72. saatlerde ve 1., 2., 3. haftalarda neopterin ile birlikte IFN-γ, TNF-α düzeyleri ticari enzim immunoassay (EIA) kitleri kullanılarak ölçöldü. IL-6 düzeyleri neopterin sonuçlarına dayanarak EBV salgılayan B95-8 süpernatantı ile uyarılmış gruplarda ve TNF-α ile IFN-γ'nın belirgin şekilde yükselmeye başladığı 12. saatte hücre kültürlerinden alınan süpernatant örneklerinde ticari EIA kitleri ile üretici firma talimatları doğrultusunda çalışılarak ölçöldü.

Neopterin ölçümü için kullanıma hazır ticari bir neopterin *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) kiti kullanıldı (Neopterin ELISA, Demeditec Diagnostics GmbH, Almanya). Kompetitif ELISA yöntemi ile çalışan bu testte, süpernatant örnekleri ve standartlar 25 µl/çukur olacak şekilde poliklonal anti-neopterin antikoru ile kaplı plağa eklendi. Örneklerin üzerine 100 µl/çukur olacak şekilde 1:100 oranında neopterin-enzim diluent'i ile dilüe edilmiş neopterin-*horseradish* peroksidaz (HRP) konjugat eklendikten sonra plak ışıkla maruziyetinin engellenmesi için siyah adeziv film ile kaplandı ve oda sıcaklığında *horizontal shaker* üzerinde 200 rpm'de 90 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda plak 3 kez yıkandı ve her bir çukura 100 µl substrat (tetra metil benzidin, TMB) eklendi. Plak, karanlıkta ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildikten sonra, reaksiyon 100 µl/çukur asidik durdurucu solüsyonla durduruldu ve oluşan renk değişikliklerine bağlı optik dansiteler (OD) 450 nm'lik filtre kullanılarak otomatik ELISA okuyucusunda spektrofotometrik olarak değerlendirildi.

TNF-α ölçümü için kullanıma hazır ticari bir ELISA kiti kullanıldı (TNF-α ELISA, BioSource International Inc., ABD). Monoklonal anti-TNF-α antikoru kaplı plaklara her bir çukura 50 µl inkübasyon solüsyonu konulmasının ardından ilgili çukurlara 200 µl kalibratör/kontrol/süpernatant örneği eklendi ve plak adeziv film ile kapatılarak oda sıcaklığında *orbital shaker* üzerinde (700 rpm) 2 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda 3 defa yıkanan plağa 100 µl/çukur kalibratör-0 ve 50 µl/çukur anti-TNF-α-HRP konjugat eklendi ve oda sıcaklığında *orbital shaker* üzerinde (700 rpm) 2 saat inkübe edildi. 3 kez yıkanan plağa 200 µl/çukur substrat (TMB) eklendi, oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübasyonun ardından reaksiyon 50 µl/çukur durdurucu solüsyon (H₂SO₄, 1,8N) eklenerek durduruldu ve oluşan renk

değişikliklerine bağlı optik dansiteler 450 nm'lik filtre kullanılarak otomatik ELISA okuyucusunda spektrofotometrik olarak değerlendirildi.

IFN- γ ölçümü için kullanıma hazır ticari bir ELISA kiti kullanıldı (IFN- γ ELISA, BioSource International Inc., ABD). Monoklonal anti-IFN- γ antikoru kaplı plaklara, her bir çukura önce 50 μ l kalibratör/kontrol/süpernatant örneği eklendi, ardından tüm çukurlara 50 μ l anti-IFN- γ -HRP konjugat ilave edildi ve plak adeziv film ile kapatılarak oda sıcaklığında *orbital shaker* üzerinde (700 rpm) 2 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda 3 defa yıkanan plağa 200 μ l/çukur substrat (TMB) eklendi, oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 dakika inkübasyonun ardından, reaksiyon 50 μ l/çukur durdurucu solüsyon (H_2SO_4 , 1,8N) eklenerek durduruldu ve oluşan renk değişikliklerine bağlı optik dansiteler 450 nm'lik filtre kullanılarak otomatik ELISA okuyucusunda spektrofotometrik olarak değerlendirildi.

IL-6 ölçümü için kullanıma hazır ticari bir ELISA kiti kullanıldı (IL-6 ELISA, BioSource International Inc., ABD). Monoklonal anti-IL-6 antikoru kaplı plaklara, her bir çukura önce 100 μ l kalibratör/kontrol/süpernatant örneği eklendi, ardından tüm çukurlara 50 μ l biotin-anti-IL-6 konjugat ilave edildi ve plak adeziv film ile kapatılarak oda sıcaklığında *orbital shaker* üzerinde (700 rpm) 2 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda 4 defa yıkanan plağa 100 μ l/çukur streptavidin-HRP eklenerek oda sıcaklığında *orbital shaker* üzerinde (700 rpm) 30 dakika inkübe edildi. 4 kez yıkanan plağa 100 μ l/çukur substrat (TMB) eklendi, oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübasyonun ardından reaksiyon 100 μ l/çukur durdurucu solüsyon eklenerek durduruldu ve oluşan renk değişikliklerine bağlı optik dansiteler 450 nm'lik filtre kullanılarak otomatik ELISA okuyucusunda spektrofotometrik olarak

değerlendirildi. Konsantrasyonu 500 pg/ml'nin üzerinde çıkan çukurlardaki örnekler, kit içerisinde sağlanan örnek çözücü ile 1:5 oranında dilue edildikten sonra optik dansiteleri yeniden okutuldu ve bulunan değerler dilüsyon faktörü olan 5 ile çarpılarak gerçek konsantrasyonlar hesaplandı.

0. saat	12. saat	24. saat	48. saat	72. saat	1. hafta	2. hafta	3. hafta
Kontrol	Kontrol	Kontrol	Kontrol	Kontrol	Kontrol	Kontrol	Kontrol
PHA	PHA	PHA	PHA	PHA	PHA	PHA	PHA
LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS
EBV	EBV	EBV	EBV	EBV	EBV	EBV	EBV

Şekil 1 : 48 çukurlu hücre kültürü plaklarına dağıtılan hücrelere ve uyarılara ait konfigürasyon.

0. saat	12. saat	24. saat	48. saat	72. saat	1. hafta	2. hafta	3. hafta
Kontrol	Kontrol	Kontrol	Kontrol	Kontrol	Kontrol	Kontrol	Kontrol
PHA	PHA	PHA	PHA	PHA	PHA	PHA	PHA
LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS
EBV	EBV	EBV	EBV	EBV	EBV	EBV	EBV
0. saat	12. saat	24. saat	48. saat	72. saat	1. hafta	2. hafta	3. hafta
Kontrol	Kontrol	Kontrol	Kontrol	Kontrol	Kontrol	Kontrol	Kontrol
PHA	PHA	PHA	PHA	PHA	PHA	PHA	PHA
LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS
EBV	EBV	EBV	EBV	EBV	EBV	EBV	EBV

Şekil 2 : Hücre kültür plaklarından alınan örneklerin 96 çukurlu plaklara dağıtılmasına ait konfigürasyon.

3.7. İstatistiksel Analiz

EIA çalışmalarının sonucunda örnekler ait neopterin ve sitokin miktarlarının hesaplanmasında bir bilgisayar istatistik programı olan Microstat kullanıldı ve konsantrasyonları bilinen standartlardan elde edilen OD değerlerinden yararlanılarak örnekler ait OD değerleri regresyon-korelasyon analizine tabi tutularak örneklerdeki konsantrasyonlar hesaplandı.

Çalışmanın istatistiksel analizinde bilgisayar tabanlı bir istatistik programı olan SPSS (versiyon 10.0) kullanıldı. Çalışma sonucunda grup ortalamaları arasındaki fark tek yönlü multivaryans analiz (ANOVA) ile değerlendirildi. Değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunması halinde, Bonferroni düzeltmesi uygulandı ve farkın hangi gruplardan kaynaklandığı tespit edildi. Ortalamaların standart hataları yine SPSS ile hesaplandı ve sütun grafikler üzerinde standart hata çubukları ile ifade edildi. Anlamlılık değeri olarak $p < 0.05$ seçildi (Şekil 1-15'te; şekli karmaşık hale getirerek anlaşılabilirliğini bozmamak adına anlamlılık işaretleri şekil üzerine yerleştirilmemiştir. Bulgular metin içinde verilmiştir).

4. BULGULAR

4.1. İmmünofloresan Yöntemi ile Saptanan EBV antikorları

Çalışmaya katılmayı kabul eden sağlıklı gönüllüler ilk olarak EBV antijenlerine karşı gelişen antikor varlığı açısından değerlendirildiler. İmmünofloresan mikroskopi yöntemi ile yapılan değerlendirme sonucunda, gönüllülerin hiçbirinin akut EBV enfeksiyonu geçirmediği gösterildi (Tablo 2): Tümünde anti-VCA IgM negatif olarak bulundu. Gönüllülerin tümünde anti-VCA IgG pozitif (Şekil 3), anti-VCA (IgG)-aviditeler de daha önce geçirilmiş enfeksiyona işaret etmek üzere yüksekti (Şekil 5). Üre ile inkübe edilen ve edilmeyen serumların floresan yoğunluklarına göre değerlendirilen avidite, artan floresan yoğunluğu ile doğru orantılı olacak şekilde 0 ile 5 arasında değerlendirildi. Her iki serum arasındaki yoğunluk skoru farkı 2'den fazla ise avidite düşük, 2'den fazla ise yüksek olarak kabul edildi.) Anti-EA (IgG) 16 örnekten birinde pozitif, diğerlerinde negatif olarak saptanırken (Şekil 6), iki örnekte anti-EBNA (IgG) negatif (Şekil 7), diğer örneklerde ise pozitif (Şekil 8).

4.2. Hücre Kültür Süpernatantlarında Neopterin Düzeyleri

Çalışmanın birinci kısmında 20 sağlıklı gönüllüden alınan periferik venöz kan örneklerinden elde edilen mononükleer hücreler kullanıldı. Kültür ortamında 12. saatten itibaren tek hücre katmanı (*monolayer*) oluşturarak flask zeminine tutunan hücrelerin EBV ile enfekte olan grubunun, 1. haftadan itibaren diğerlerinden daha belirgin hücre kümeleri oluşturdukları gözlemlendi (Şekil 9-15). Hücre kültüründe *in vitro* ortamda %10 FBS içeren RPMI içerisinde 0. saatte ölçülemeyen neopterin düzeyleri, kontrol grubu dahil olmak üzere her dört grupta da 1. haftadan sonra artarak 3. haftanın sonunda kontrol grubunda 40,41 nmol/l'ye, PHA ile uyarılan grupta 34,26 nmol/l'ye, LPS ile uyarılan grupta 23,03 nmol/l'ye ve EBV ile transforme edilen grupta 42,42 nmol/l'ye ulaştı (Şekil 16).

FBS'nin hücreler üzerindeki uyarıcı etkisi nedeni ile hücrelerin neopterin salgılamış olabilecekleri düşünülerek, 8 sağlıklı gönüllüden oluşturulan ve %2 AB Rh(+) serum içeren hücre kültürlerinden elde edilen örneklerde de neopterin düzeyleri benzer şekilde, dört grupta da zamana bağlı artarak, 3 haftanın sonunda kontrol grubunda 40,53 nmol/l'ye, PHA ile uyarılan grupta 63,79 nmol/l'ye, LPS ile uyarılan grupta 48,20 nmol/l'ye ve EBV ile transforme edilen grupta 65,34 nmol/l'ye ulaştı (Şekil 17). Neopterin ortalamalarının istatistiksel olarak karşılaştırılması sonucunda elde edilen farkın ($p<0,05$), neopterin düzeylerinin %10 FBS eklenmiş çalışma grubunda 0. saatte ölçülememesine karşılık; %2 AB Rh(+) serum eklenen çalışma grubunda yüksek olmasından (0. saat için ortalama 5,78 nmol/l) kaynaklandığı düşünüldü. EBV ile transforme edilen grupta belirgin neopterin artışının gerçekleştiği 1., 2. ve 3. haftaların ortalamaları arasındaki farkın istatistiksel açıdan anlamlı olmaması nedeni ile, çalışmaya AB Rh(+) serum içeren çalışma grubundaki hücreler ile devam edildi.

Başlangıç neopterin düzeyleri, 1., 2., ve 3. hafta neopterin düzeyleri ile karşılaştırıldığında kontrol grubunda 0. saat düzeylerinin her üç hafta sonuçlarından istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı olduğu ($p<0,05$) gösterildi. PHA ve LPS ile uyarılan grupta neopterin artışı 48. saatten itibaren anlamlı bulundu ($p<0,05$) ve PHA ile uyarılan grupta 48. saat değeri olarak 26,61 nmol/l, LPS ile uyarılan grupta ise 17,16 nmol/l bulundu. Her uyaran için 0. saat ile her üç haftanın değerleri karşılaştırıldığında ortalamalar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardı, ancak haftalar kendi aralarında değerlendirildiğinde fark anlamlı değildi ($p>0,05$). Transforme edilen grupta ise giderek artan neopterin düzeylerinin 48. saatte başlangıç düzeyi ile anlamlı fark yaratan 17,08 nmol/l'ye ulaştığı, ayrıca istatistiksel olarak 0. saat neopterin düzeyleri ile 1. haftada 58,27 nmol/l, 2. haftada 67,21 nmol/l ve 3. haftada 65,34 nmol/l

olan değerler arasında anlamlı fark bulunduğu gösterildi ($p<0,05$); haftalar kendi ilerinde değerlendirildiklerinde 1. hafta ile 2 ve 3. haftalar arasındaki fark anlamlı iken ($p<0,05$), 2 ve 3. haftalar arasındaki farkın anlamlı olmadığı gösterildi ($p>0,05$).

Gerçek neopterin artışı saptayabilmek ve daha açık şekilde gösterebilmek üzere yeni bir garfik (ekil 18) hazırlandı; bu grafikte %2 AB Rh(+) serum kullanılan çalışma grubunda, 0. saatte llebilir olan bazal neopterin düzeyleri, 12.saatten itibaren elde edilen değerlerden çıkartıldı. Bu uygulama ile; otomatik ELISA okuyucuların veri değerlendirme ve hesaplama programlarındaki *blank* (kr) ukurlardaki *background* (arkaplan) kirliliğine ait OD değerlerinin örnek değerlerinden çıkartılmasında olduğu gibi, bir düzeltme yapılması sağlanmış oldu. Hazırlanan yeni grafikte hücre kültür spernatanlarında gözlenen neopterin artışının aynı ortamlarda llen IFN- artışı ile birliktelik gösterdiği saptandı. 1, 2 ve 3. haftalar için yapılan korelasyon analizinde IFN- ve neopterin düzeyleri arasında 1. ve 3. haftada anlamlı bir ilişki gösterildi (sırasıyla $p<0,001$, Pearson katsayısı=0,720; $p<0,05$, Pearson katsayısı=0,733), ancak 2. haftada ölçülen değerler arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p>0,05$). İstatistiksel analiz sonrasında ise, EBV ile transforme edilmiş olan grupta, transformasyonun olduğu 1., 2. ve 3. haftadaki neopterin ortalamasının diğer zamanlardan anlamlı olarak farklı olduğu ($p<0,05$), ancak haftalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlendi ($p>0,05$).

Neopterin düzeyleri her bir uyaran açısından zamana bağlı olarak karşılaştırıldığında, kontrol grubu ile diğer tüm gruplar arasında tüm zamanlarda istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,05$). 1., 2. ve 3. haftalarda ise EBV ile uyarılmış hücrelerin salgıladığı neopterin düzeyleri

arasındaki fark kontrol grubu ve LPS ile uyarılmış grupta istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$), buna karşılık PHA ile uyarılmış grupta anlamsız olarak saptandı ($p>0,05$).

4.3. Hücre Kültür Süpernatantlarında TNF- α Düzeyleri

TNF- α düzeylerinin kontrol grubunda ölçülemez düzeylerde olduğu, buna karşılık PHA ve LPS ile uyarılan hücre gruplarında 12. saatten itibaren en yüksek düzeye ulaştığı (sırasıyla 749,26 pg/ml ve 701,43 pg/ml), LPS içeren grupta 24. saatten, PHA içeren grupta ise 48. saatten itibaren azaldığı gösterildi (Şekil 19). İstatistiksel olarak 0. saat ile 12, 24, 48 ve 72. saatler arasında bulunan anlamlı fark, 1. haftadan sonra anlamlı değildi, yine haftalar kendi aralarında karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0,05$). Buna karşılık EBV içeren kültürlerde 72. saatten itibaren yükselmeye başlayan TNF- α düzeylerinin 1. haftadan itibaren yükselerek (386,94pg/ml) 2. haftada en yüksek düzeye ulaştığı (397,18 pg/ml) ve 3. haftada yeniden azaldığı saptandı (310,91 pg/ml) (Şekil 19), ancak her üç hafta düzeyleri kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gösterilemedi ($p>0,05$). TNF- α düzeyleri, B95-8 eklenen kültürlerde, diğer nonspesifik uyarıların ilave edildiği hücre kültürlerinden farklı olarak, EBV transformasyonuna bağlı hücre kümelerinin belirgin hale geldiği 1., 2. ve 3. haftalarda bariz olarak yükseldi, bu da transforme hücrelerin diğer hücrelerden farklı bir sitokin yanıt profili çizdiklerini ortaya koydu.

4.4. Hücre Kültür Süpernatantlarında IFN- γ Düzeyleri

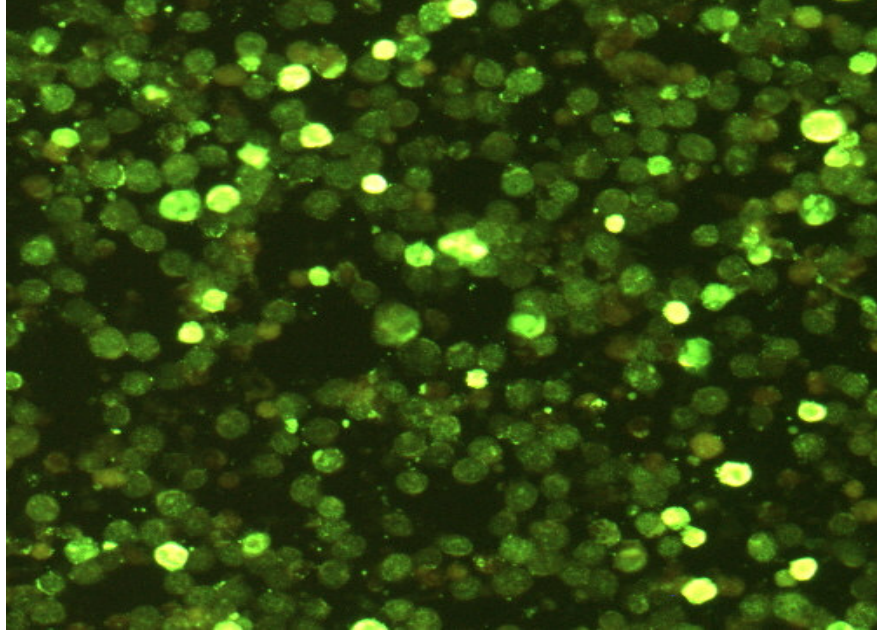
Kültür ortamında IFN- γ düzeylerinin zamana bağlı değişimi incelendiğinde, 0. saatte tespit edilemeyen IFN- γ 'nın zamanla arttığı, PHA içeren grupta 72. saatte (1932,00 pg/ml), LPS içeren grupta ise 1. haftada

maksimum düzeylerine ulaştığı (681,67 pg/ml) ve daha sonra her iki grupta da azaldığı, buna karşılık EBV ile uyarılan hücre grubunda ise 72. saatten itibaren saptanan IFN düzeylerinin (18,11 pg/ml) 2. haftada maksimum değerine ulaştıktan sonra (1345,46 pg/ml) 3. haftada benzer şekilde azaldığı gösterildi (795,50 pg/ml) (Şekil 20). TNF- α ölçümünde gözlenen farklı yanıt profiline benzer şekilde; IFN- γ düzeyleri de, B95-8 eklenen kültürlerde, diğer nonspesifik uyarıların ilave edildiği hücre kültürlerinden farklı olarak, EBV transformasyonuna bağlı hücre kümelerinin belirgin hale geldiği 1., 2. ve 3. haftalarda bariz olarak yükseldi. Ortalamalar ANOVA ile karşılaştırıldığında, PHA ile uyarılan grupta ve EBV ile transforme edilen grupta anlamlı bir fark olduğu ($p<0,05$), LPS ile uyarılan grupta ise farkın istatistiksel olarak anlamsız olduğu gösterildi ($p>0,05$). Bonferroni düzeltmesi ile ortalamalar tekrar değerlendirildiğinde; PHA ile uyarılan grupta 12. saatte artan IFN- γ düzeylerinin ortalamasının 24. saatteki ortalamadan farksız olduğu ($p>0,05$), 12. saat ortalaması ile 48. saat, 72. saat ve 1. haftalar arasında anlamlı bir fark bulunduğu ($p<0,05$), haftalar arası ortalamaların ise birbirlerinden farksız oldukları gösterildi ($p>0,05$). LPS ile uyarılan grupta herhangi bir zamanda anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$). EBV ile uyarılan grupta ölçülen IFN- γ düzeylerinin ise 72. saate kadar anlamlı bir fark göstermediği ($p>0,05$), bu saatlerde elde edilen ortalamaların her üç hafta sonunda elde edilen ortalamalardan anlamlı olarak farklı olduğu ($p<0,05$), buna karşılık 1., 2. ve 3. hafta değerlerinin kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark taşımadıkları saptandı ($p>0,05$).

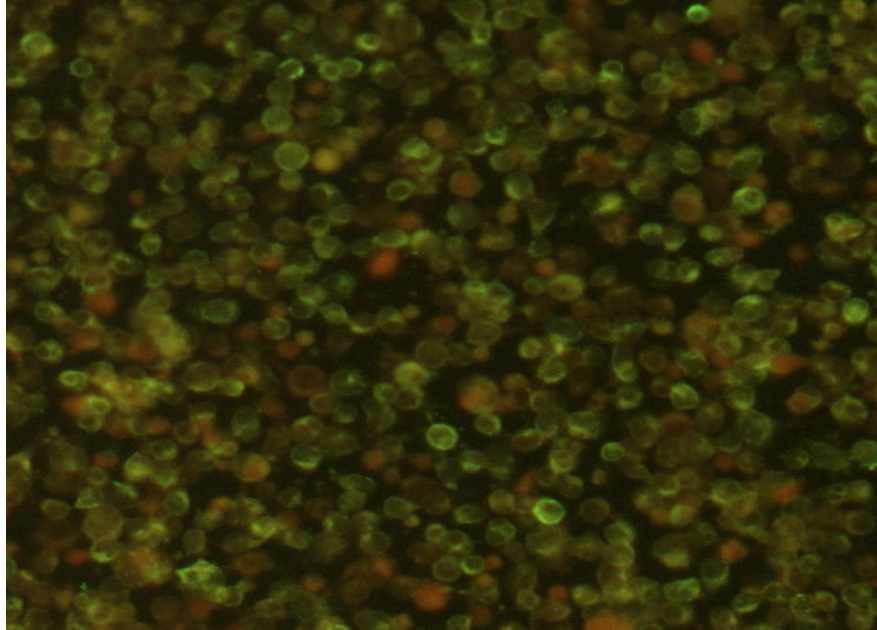
4.5. Hücre Kültür Süpernatantlarında IL-6 Düzeyleri

EBV ile uyarılmış hücre gruplarında ölçülen IL-6 düzeylerinin zamana bağlı olarak artarak 3. haftada 646,07 pg/ml'ye ulaştığı saptandı (Şekil 21). 0. saatte ölçülen ortalama IL-6 düzeyleri, 24. saat ve

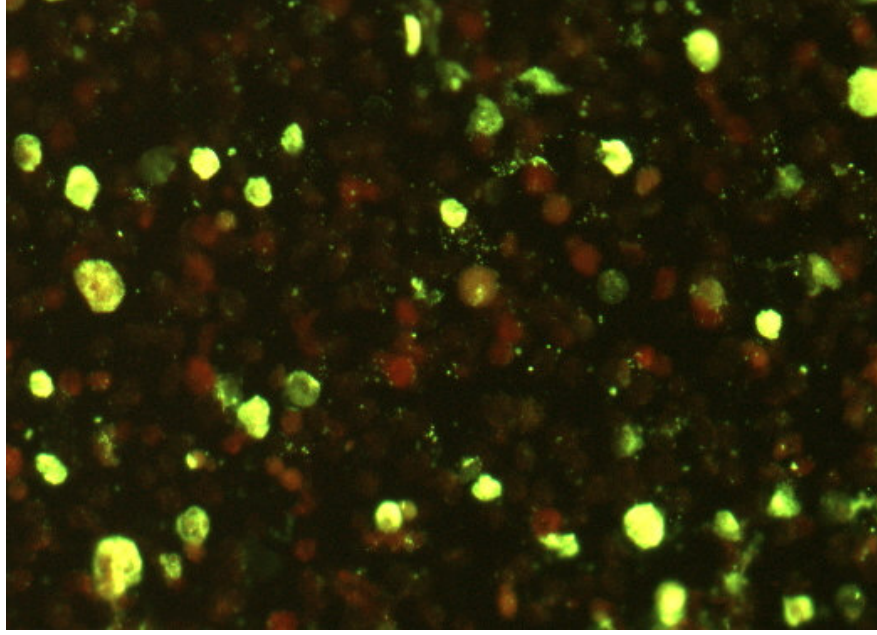
sonrasında ölçülen düzeylerden istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde farklı bulundu ($p<0,05$). 72. saatte ölçülen IL-6 düzeyi, 1. hafta sonundaki IL-6 düzeyi ile anlamlı şekilde farklıydı ($p<0,05$), ancak haftalar kendi aralarında karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$). 12. saat sonunda kontrol grubu ve diğer uyaranların eklendiği hücre kuyucuklarından elde edilen süpernatantlarda ölçülen IL-6 düzeyleri karşılaştırıldığında; kontrol grubunda elde edilen ortalamanın diğer tüm gruplardan farklı olduğu ($p<0,05$), PHA ve LPS ile uyarılan gruplar arasında fark bulunmadığı ($p>0,05$), EBV ile transforme edilen hücre süpernatantlarında ölçülen IL-6 düzeyi ortalamasının ise kontrol grubunun yanısıra LPS ve PHA ile uyarılan grupların ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde farklı olduğu saptandı ($p<0,05$).



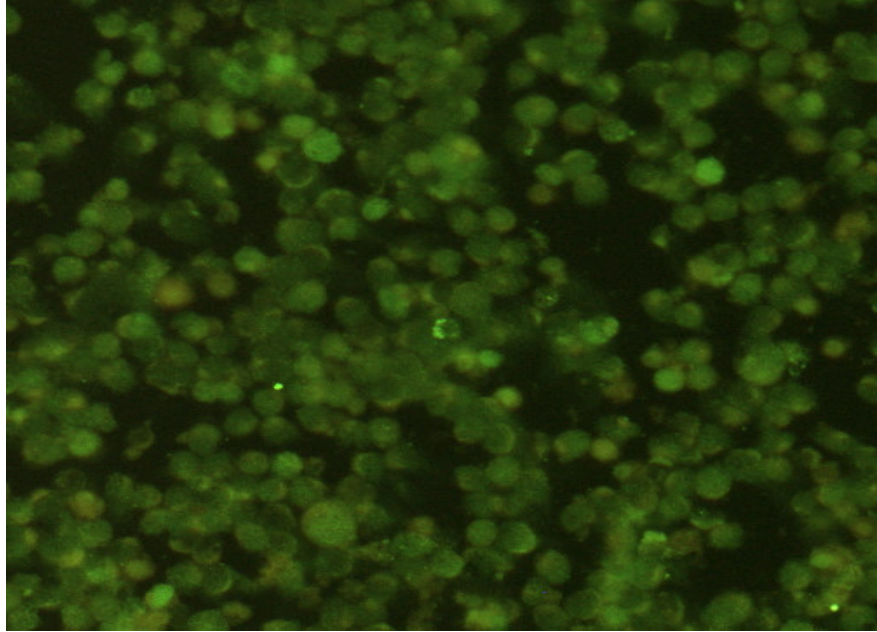
Şekil 3 : Anti-VCA IgG (+) bir serum örneğinin immünfloresan mikroskop görüntüsü (VCA: Viral Capsid Antigen) (İmmünfloresan mikroskop, 40x).



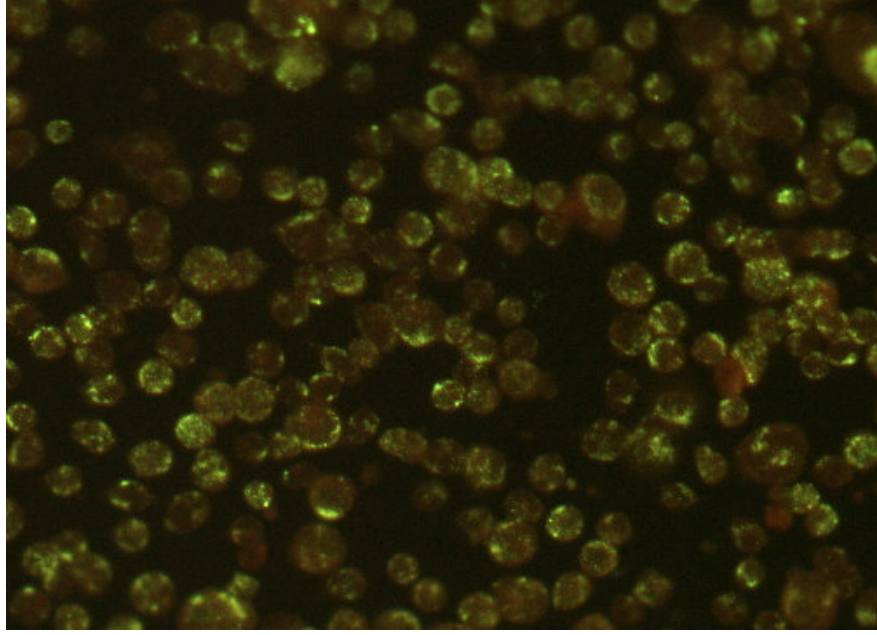
Şekil 4 : Anti-VCA IgG (-) bir serum örneğinin immünfloresan mikroskop görüntüsü (VCA: Viral Capsid Antigen) (İmmünfloresan mikroskop, 40x).



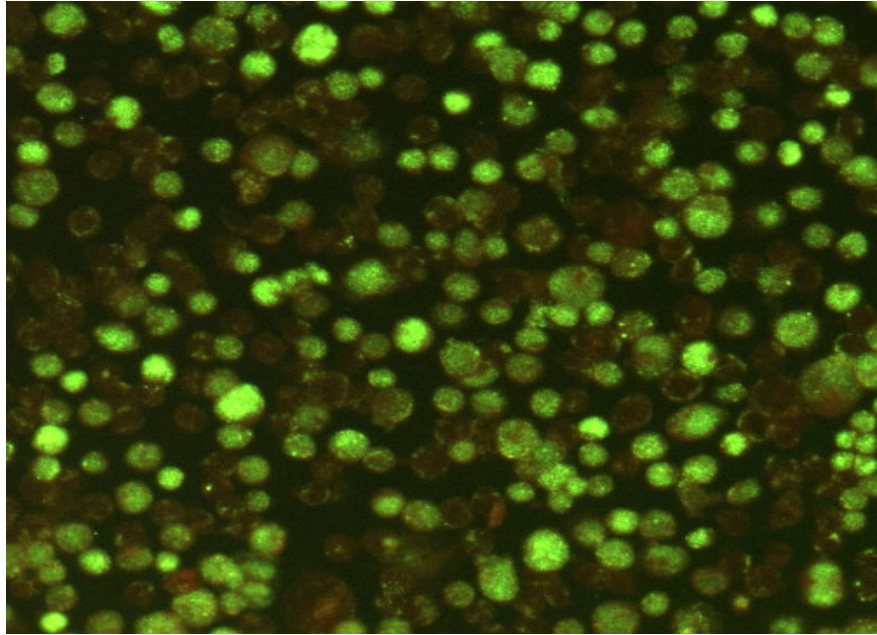
Şekil 5 : Anti-VCA IgG avidite (++++) bir serum örneğinin immünfloresan mikroskop görüntüsü (VCA: Viral Capsid Antigen) (İmmünfloresan mikroskop, 40x).



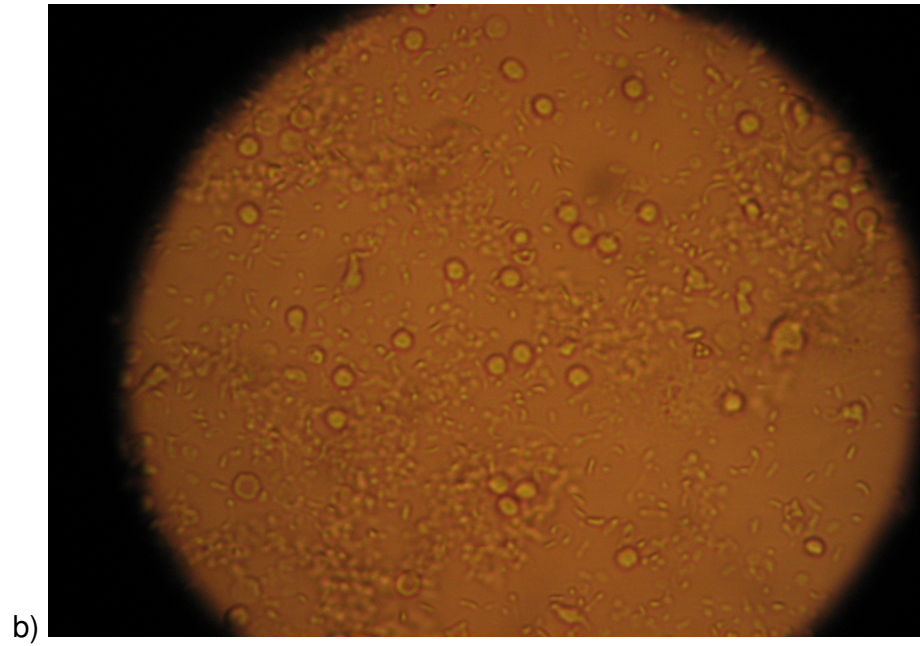
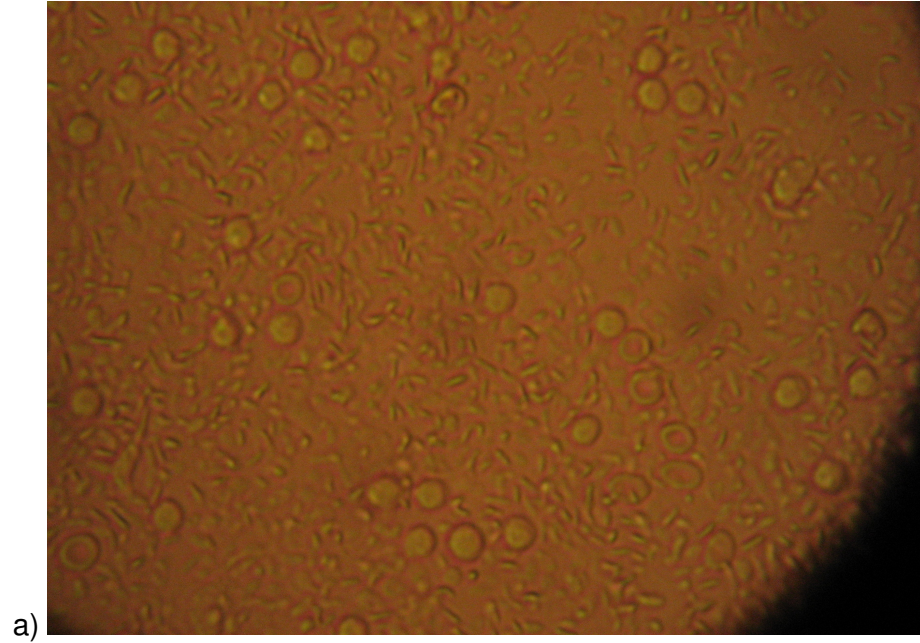
Şekil 6 : Anti-EA IgG (-) bir serum örneğinin immünfloresan mikroskop görüntüsü (EA: Early Antigen) (İmmünfloresan mikroskop, 40x).



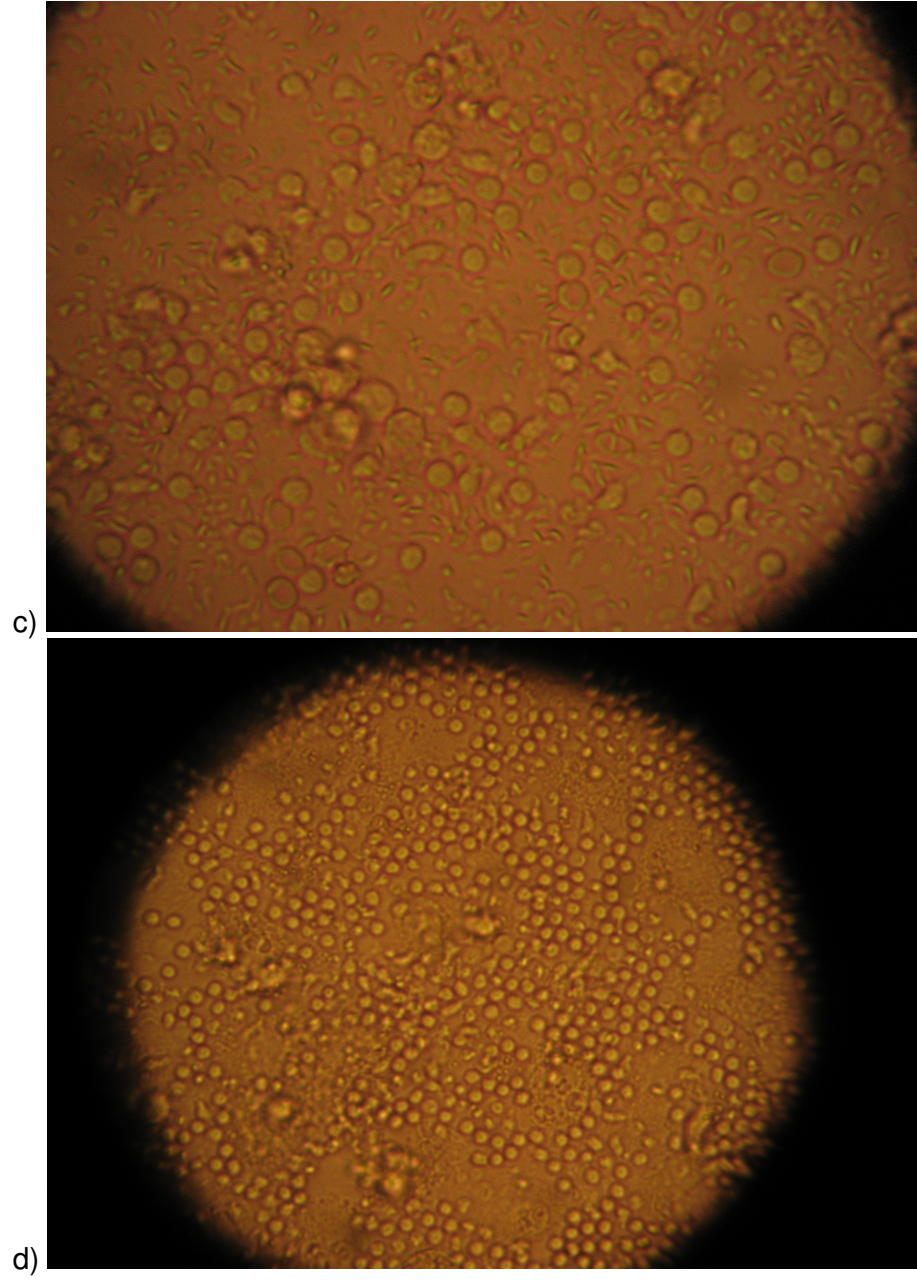
Şekil 7 : Anti-EBNA IgG (-) bir serum örneğinin immünfloresan mikroskop görüntüsü (EBNA: Epstein Barr Virus-Nuclear Antigen) (İmmünfloresan mikroskop, 40x).



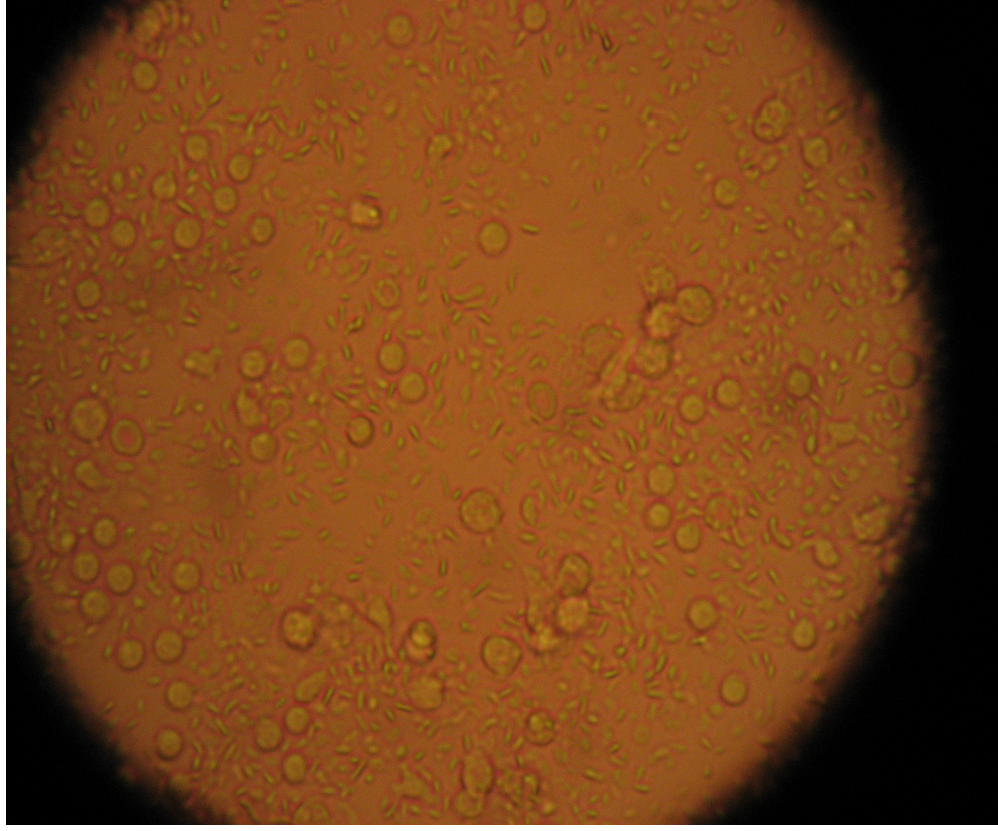
Şekil 8 : Anti-EBNA IgG (+) bir serum örneğinin immünfloresan mikroskop görüntüsü (EBNA: Epstein Barr Virus-Nuclear Antigen) (İmmünfloresan mikroskop, 40x).



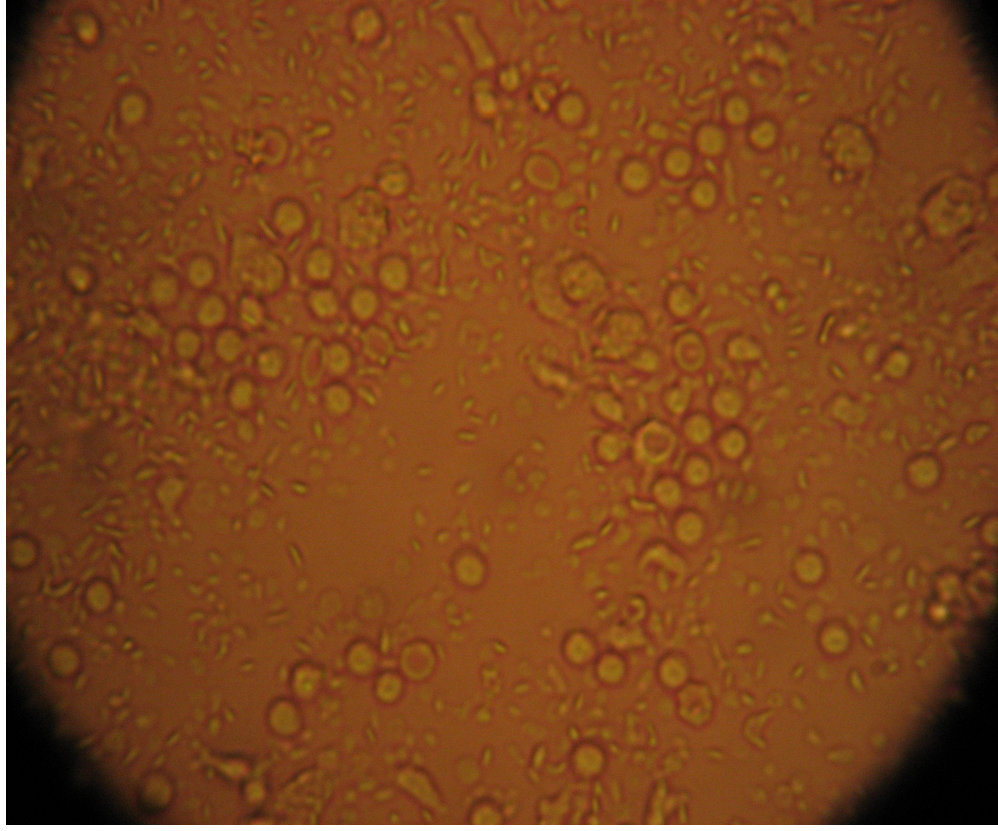
Şekil 9-a : Kontrol grubundaki hücrelerin zamana bağlı morfolojik değişimleri
(a. 24. saat, b. 1. hafta) (Inverted mikroskop, 40X).



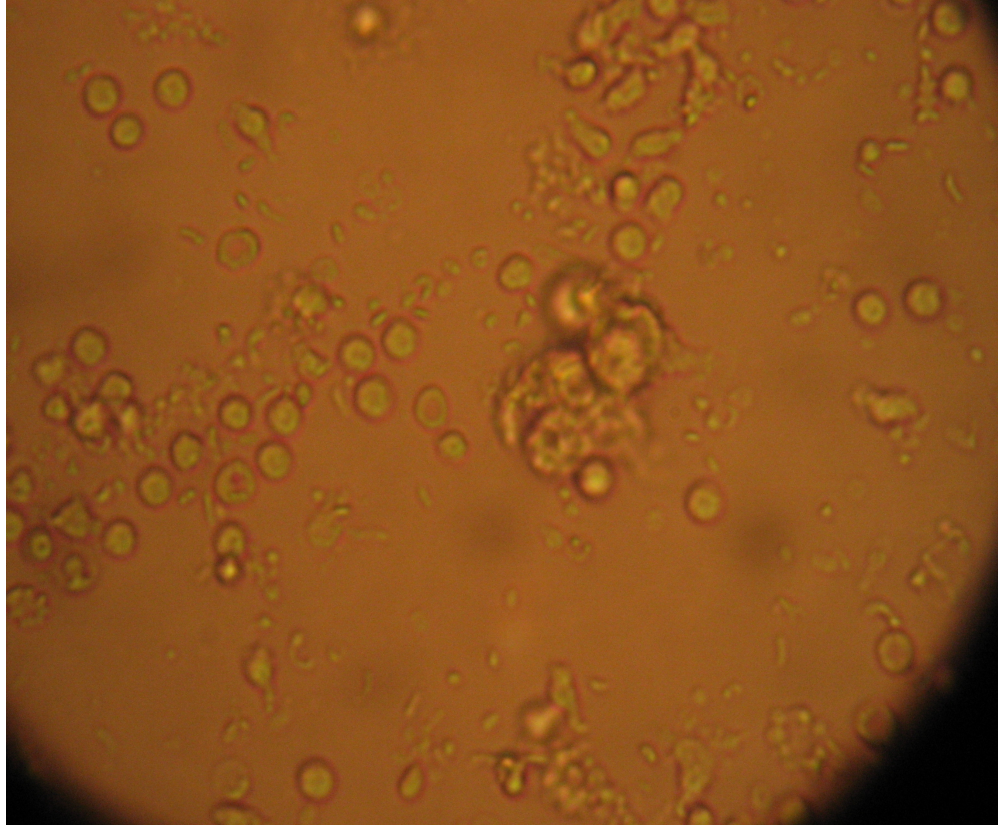
Şekil 9-b. Kontrol grubundaki hücrelerin zamana bağlı morfolojik değişimleri
(c. 2. hafta, inverted mikroskop, 40X), (d. 3. hafta, inverted mikroskop, 20X).



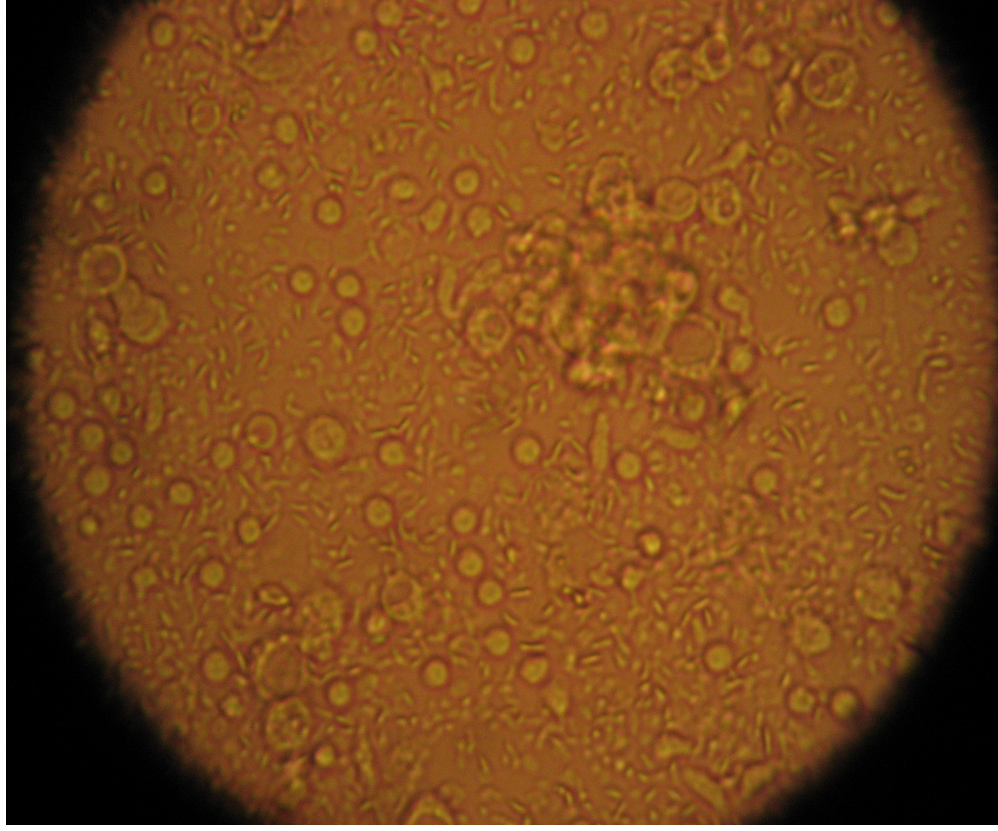
Şekil 10: EBV virionu salgılayan B95-8 hücre süpernatanı ile uyarılan gruptaki hücrelerin 24. saatteki morfolojik görüntüsü (Inverted mikroskop, 40X).



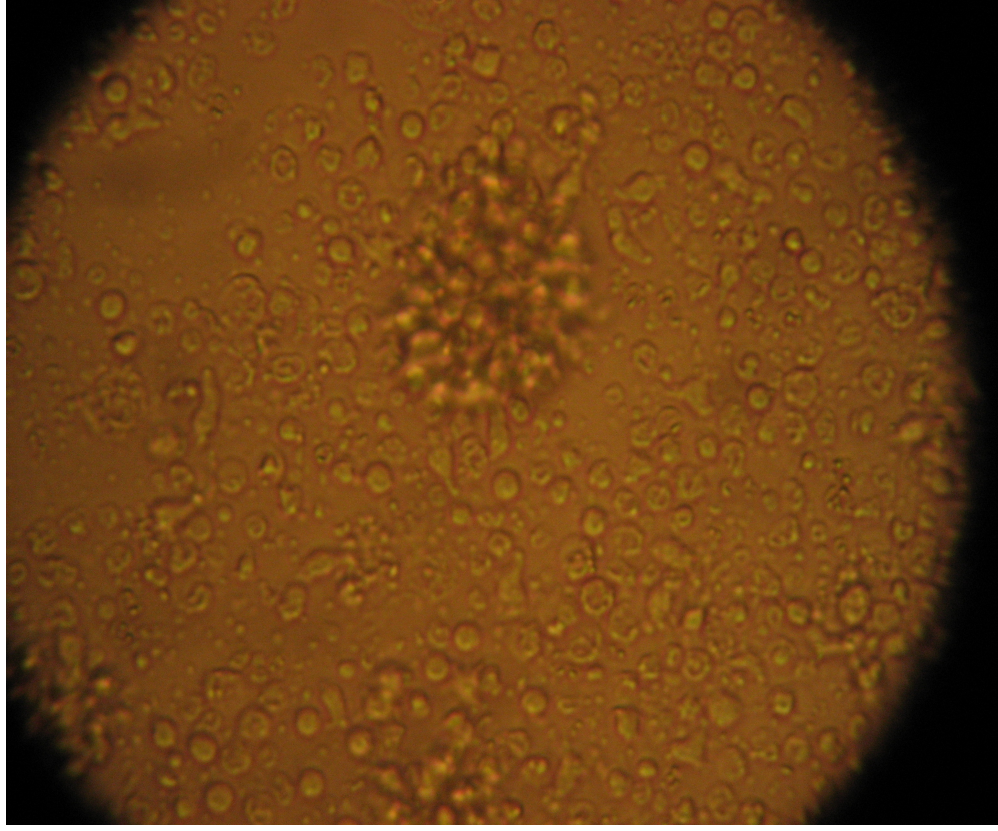
Şekil 11 : EBV virionu salgılayan B95-8 hücre süpernatanı ile uyarılan gruptaki hücrelerin 48. saatteki morfolojik görüntüsü (Inverted mikroskop, 40X).



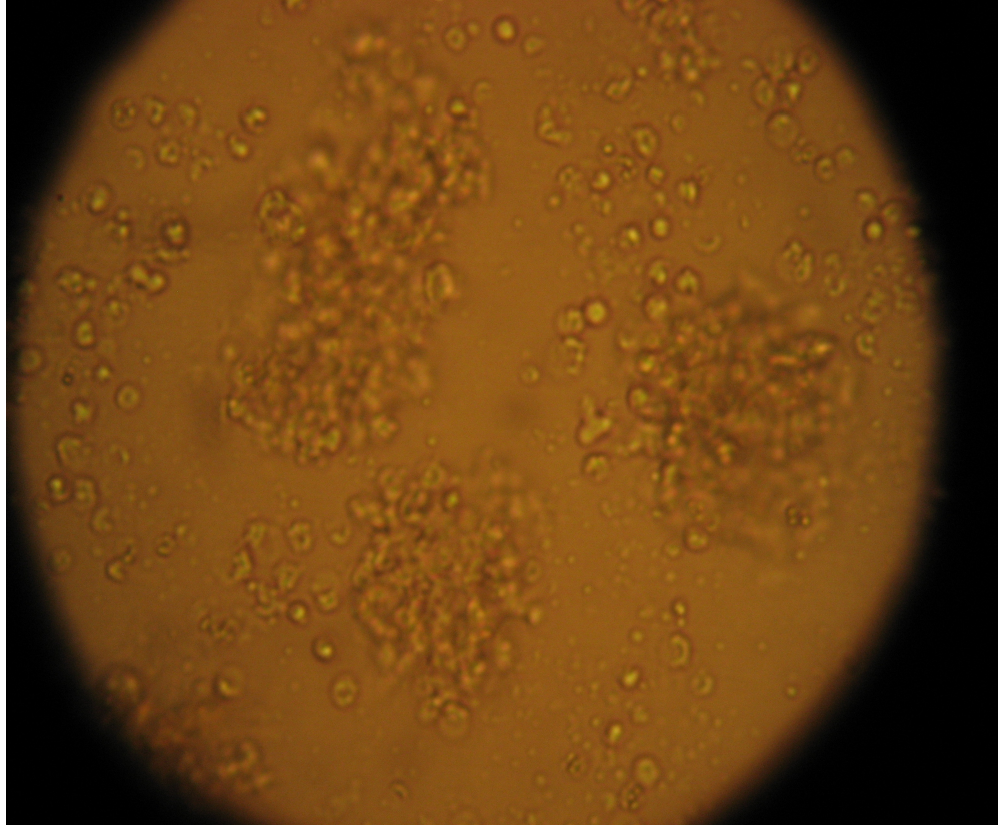
Şekil 12 : EBV virionu salgılayan B95-8 hücre süpernatanı ile uyarılan gruptaki hücrelerin 72. saatteki morfolojik görüntüsü (Inverted mikroskop, 40X).



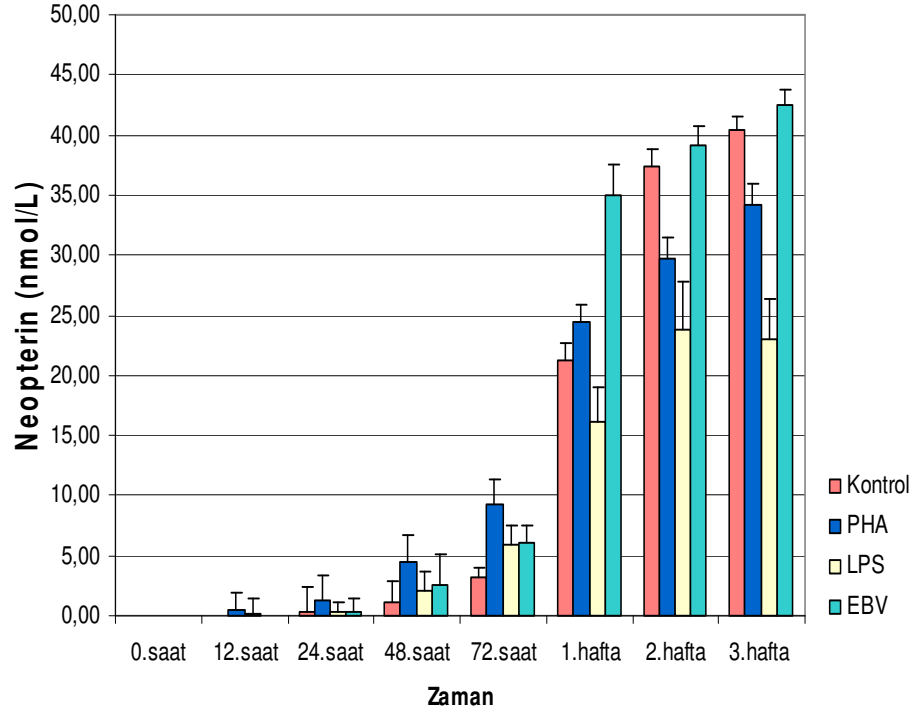
Şekil 13 : EBV virionu salgılayan B95-8 hücre süpernatanı ile uyarılan gruptaki hücrelerin 1. haftadaki morfolojik görüntüsü (Inverted mikroskop, 40X).



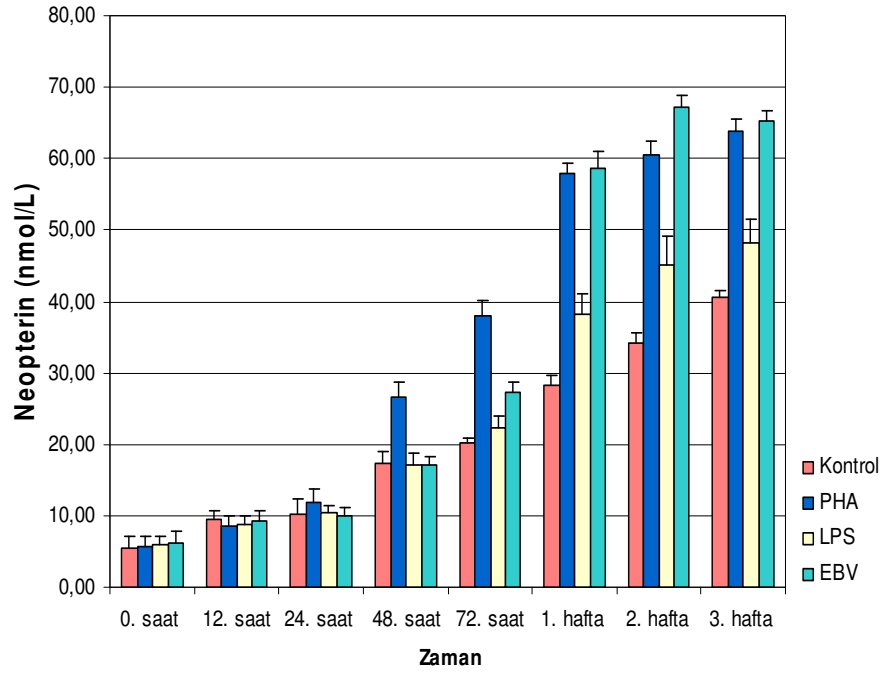
Şekil 14 : EBV virionu salgılayan B95-8 hücre süpernatanı ile uyarılan gruptaki hücrelerin 2. haftadaki morfolojik görüntüsü (Inverted mikroskop, 40X).



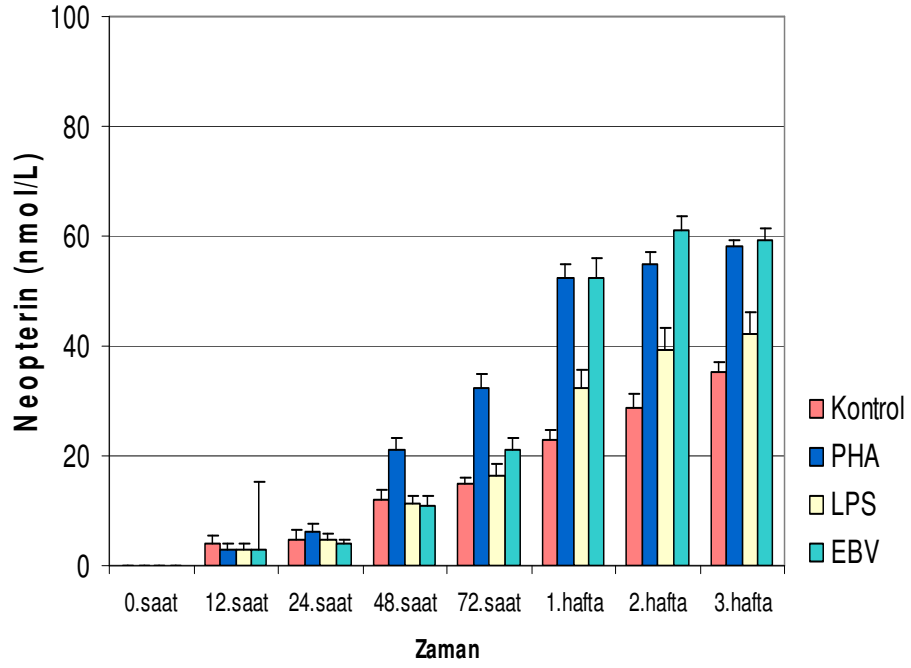
Şekil 15 : EBV virionu salgılayan B95-8 hücre süpernatanı ile uyarılan gruptaki hücrelerin 3. haftadaki morfolojik görüntüsü (Inverted mikroskop, 40X).



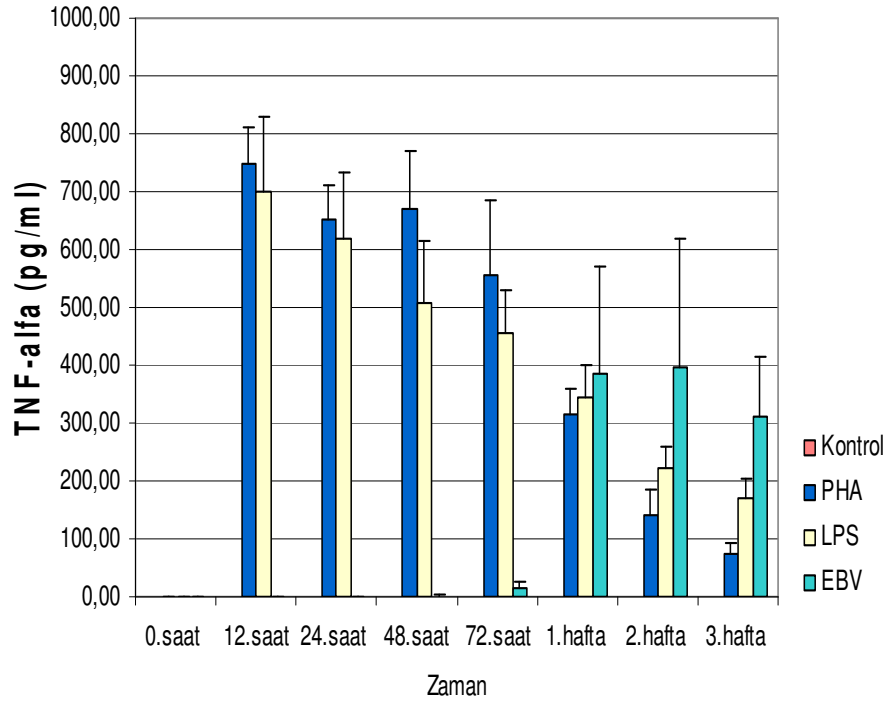
Şekil 16 : %10 FBS içeren kültür ortamında çeşitli uyaranlara bağlı olarak yükselen neopterin düzeylerinin zamana bağlı değişimi (PHA: fitohemaglütinin, LPS: lipopolisakkarit, EBV: Epstein Barr Virüs) (Sonuçlar 'ortalama ± standart hata' olarak ifade edilmiştir).



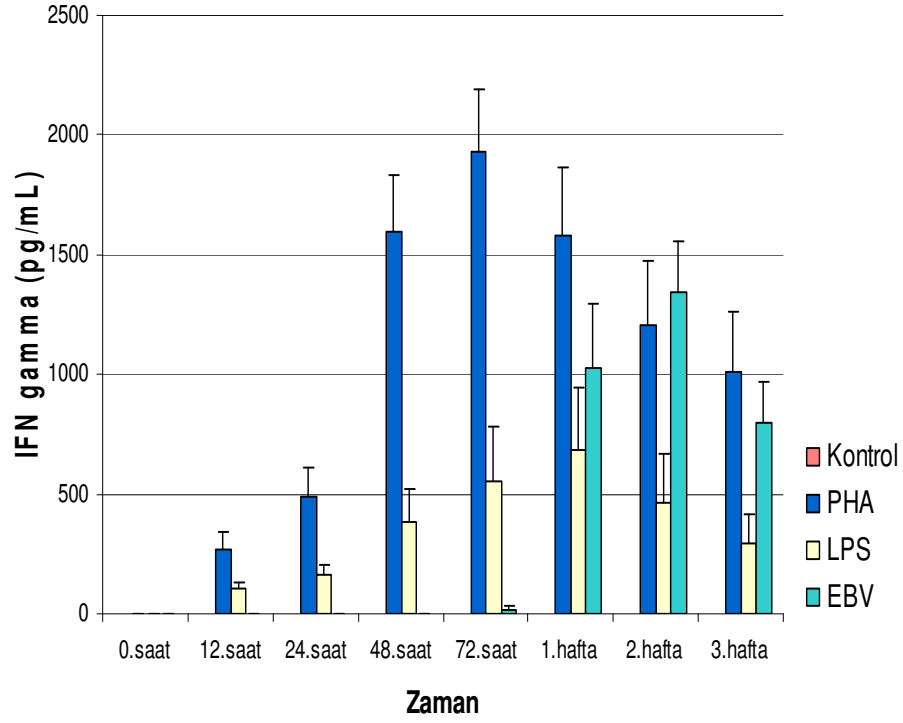
Şekil 17 : %2 AB Rh(+) serum içeren kültür ortamında çeşitli uyarılara bağlı olarak yükselen neopterin düzeylerinin zamana bağlı değişimi (PHA: fitohemagglütinin, LPS: Lipopolisakkarit, EBV: Epstein Barr Virüs) (Sonuçlar 'ortalama $\pm$ standart hata' olarak ifade edilmiştir).



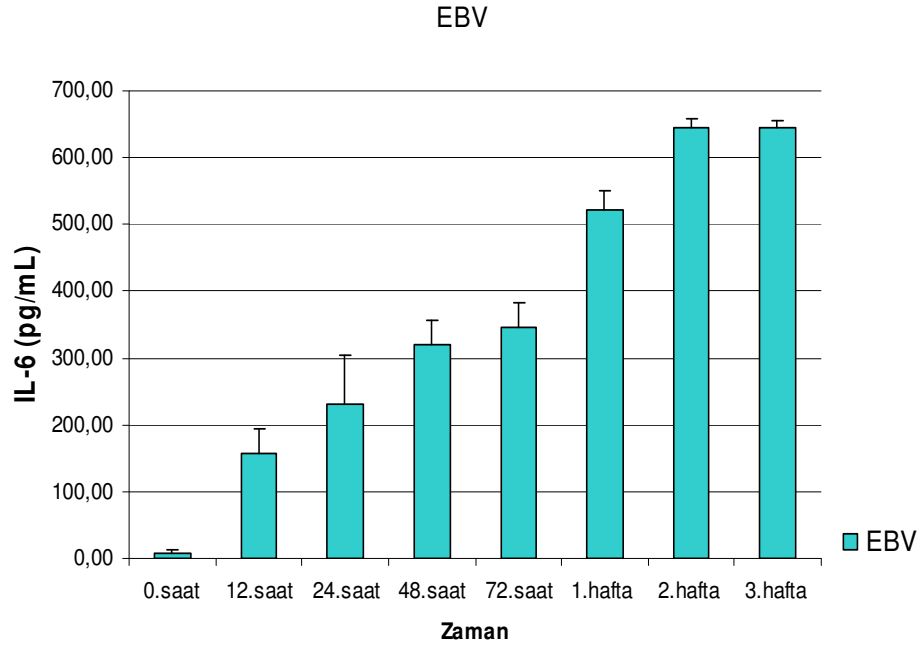
Şekil 18 : %2 AB Rh(+) serum içeren kültür ortamında çeşitli uyaranlara bağlı olarak yükselen neopterin düzeylerinin 0. saatte pozitif bulunan düzeyler çıkartılarak düzeltildikten sonraki değerleri (PHA: fitohemagglütinin, LPS: Lipopolisakkarit, EBV: Epstein Barr Virüs) (Sonuçlar 'ortalama $\pm$ standart hata' olarak ifade edilmiştir).



Şekil 19 : %2 AB Rh(+) serum içeren kültür ortamında çeşitli uyaranlara bağlı olarak yükselen TNF- α düzeylerinin zamana bağlı değişimi (PHA: fitohemagglütinin, LPS: lipopolisakkarit, EBV: Epstein Barr Virüs) (Sonuçlar 'ortalama $\pm$ standart hata' olarak ifade edilmiştir).



Şekil 20 : %2 AB Rh(+) serum içeren kültür ortamında çeşitli uyaranlara bağlı olarak yükselen IFN- γ düzeylerinin zamana bağlı değişimi (PHA: fitohemagglütinin, LPS: lipopolisakkarit, EBV: Epstein Barr Virüs) (Sonuçlar 'ortalama $\pm$ standart hata' olarak ifade edilmiştir).



Şekil 21 : %2 AB Rh(+) serum içeren kültür ortamında EBV ile uyarılmış hücre gruplarında IL-6 düzeylerinin zamana bağlı değişimi (Sonuçlar 'ortalama ± standart hata' olarak ifade edilmiştir).

Tablo 2 : Çalışmaya katılan sağlıklı gönüllülerde immünofloresan yöntemi ile saptanan EBV antijenlerine karşı gelişen antikorların pozitiflik oranı

Hasta No	POZİTİFLİK DERECELERİ				
	Anti-VCA (IgG)	Anti-VCA (IgG) - avidite	Anti-VCA (IgM)	Anti-EA (IgG)	Anti-EBNA (IgG)
1	++++	++++	-	-	++++
2	++++	+++	-	-	+++
3	+++	++	-	-	+++
4	++++	++++	-	+	-
5	++++	++++	-	-	++++
6	++++	++++	-	-	++
7	+++++	+++++	-	-	+++
8	+++++	+++++	-	-	+++
9	+++	+++	-	-	+
10	++++	++++	-	-	++
11	++++	++++	-	-	++++
12	++++	+++	-	-	+++
13	++++	+++	-	-	+++
14	++++	+++	-	-	+++
15	++++	++++	-	-	++++
16	++++	++++	-	-	-

5. TARTIŞMA

Literatürde periferik kan mononükleer hücrelerinin EBV'ye karşı verdiği neopterin yanıtını *in vitro* koşullarda inceleyen bir çalışmaya rastlanılmamıştır. *In vivo* ortamda ise EBV'nin, özellikle kronik dönemde, çeşitli maligniteler de dahil olmak üzere ciddi patolojilere yol açtığı bilinmektedir. Bu nedenle, çalışmamızda hücre kültürlerinin 3 haftaya kadar uzatılmış bir süre içinde incelenmiş olmaları, kronik dönemde virüse karşı gelişen yanıtı değerlendirmek açısından önem taşımaktadır.

EBV'nin en belirgin özelliklerinden birisi hücrelerde neden olduğu transformasyondur. Hücre transformasyonlarını göstermek amacıyla, kültür ortamında fokus formasyonu, agara bağımsızlık ve serum gereksiniminde azalma değerlendirilebilir⁴³. Bunların dışında hücrelerin mikroskop altındaki görüntüleri kullanılarak da transformasyon gelişimi izlenebilmektedir. Zerbini ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada⁴⁴, EBV'nin *in vitro* ortamda kordon kanından elde edilen B lenfositlerin tümünü enfekte edip edemediklerini incelemişler, bu amaçla enfeksiyonun ardından 2. günde indüklenen EBNA düzeylerini değerlendirmişlerdir. EBNA lenfosit enfeksiyonundan sonraki 10-25. saatlerde belirir ve bunu takiben yaklaşık 40. saatte hücresel DNA sentezinin uyarılmasının ardından hücre büyümesi gerçekleşmeye başlar. Sonuç olarak bu çalışmada daha önce erişkin B lenfositlerde elde edilen sonuçlara benzer şekilde⁴⁵, kordon kanı hücrelerinde de B lenfositlerin büyük çoğunluğunun EBV ile enfekte oldukları belirtilmiştir⁴⁴.

B lenfositlerin EBV ile *in vitro* enfeksiyonunun, B lenfoblastoid hücre serilerinin (*Lymphoblastoid Cell Line*, LCL) oluşumuna neden olduğu bilinmektedir⁴⁶. T hücrelerinin fiziksel olarak uzaklaştırıldığı veya fonksiyonel olarak inaktive edildikleri ortamda B lenfositlerin

transformasyonu daha verimli olarak gerçekleşmektedir. Transformasyonun LCL proliferasyonu ile değerlendirildiği bir çalışmada, EBV ile transforme olan hücrelerin ilk 12 günde hem giderek büyüyen çapta kümeler oluşturdıkları hem de granülaritelerinin arttığı gösterilmiştir⁴⁶. Bizim çalışmamızda da 12. saatten itibaren tek hücre katmanı (monolayer) oluşturarak flask zeminine tutunan hücrelerin EBV ile enfekte olan grubunun 1. haftadan itibaren diğerlerinden daha belirgin hücre kümeleri oluşturdıkları gözlenmiştir (Şekil 1-11). Sitokin yanıtları karşılaştırıldığında da EBV ile enfekte edilen hücre kültürlerinin diğer özgün olmayan uyaranlara göre farklı karakterde yanıtlar gösterdikleri saptanmıştır.

Bir T hücre aktivasyon belirteci olarak kabul edilen neopterin özellikle viral enfeksiyonlara ve malignitelere bağlı artış gösterdiği bilinmektedir⁶. Bizim çalışmamızda başlangıçta %10 FBS içeren hücre kültürü kullanılmış, yapılan ölçümlerde kontrol grubu da dahil olmak üzere dört grupta da neopterin miktarının uyarandan bağımsız, ancak zamana bağımlı bir şekilde arttığı bulunmuştur (Şekil 12). Bunun sonucunda artışın FBS'den kaynaklanmış olabileceği düşünülerek neopterin ölçümü, %10 FBS yerine %2 AB Rh(+) serum kullanarak tekrar edilmiştir. Ancak ölçümler sonucunda %10 FBS ve %2 AB Rh (+) serum (Şekil 13) arasında neopterin düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir fark saptanmaması üzerine deneylere AB Rh (+) serum kullanılan çalışma grubu ile devam edilmiştir. Literatürde, periferik kan mononükleer hücre kültürü ile yapılan pek çok çalışmada besiyerine FBS eklenmiştir^{18,19,47,48}. Whittingham ve arkadaşlarının 1993'te yayınladıkları bir çalışmada da¹⁶, FBS ve AB Rh (+) serum kullanarak yapılan ön deneylerde sitokin yanıtları açısından herhangi bir fark saptanmadığı ve bu nedenle çalışmaya FBS ile devam edildiği belirtilmiştir.

Çalışmamızda, kontrol grubunda FBS'li grup ile AB Rh (+) serum kullanılan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Çeşitli uyaranlara bağlı olarak yükseldiği bilinen neopterin, sağlıklı insanların serumlarında da bir miktar bulunabilmekte ve ısıyla inaktive olmamaktadır. Bu da AB Rh (+) serum eklediğimiz çalışma grubunda kontrol grubu da dahil olmak üzere 0. saatte saptadığımız bir miktar neopterin varlığını açıklamaktadır (Şekil 13). Burada anlamlı olarak bulunan istatistiksel farkın, ilerleyen haftalarda artan neopterin düzeyi ile değil, başlangıçta pozitif olan neopterin miktarı ile ilişkili olduğu Bonferroni düzeltilmeli tek yönlü varyans analizi ile de doğrulanmıştır.

Gerçek neopterin artışını saptayabilmek üzere %2 AB Rh(+) serum kullanılan çalışma grubunda, 0. saatte ölçülebilir olan bazal neopterin düzeylerinin, 12.saatten itibaren elde edilen değerlerden çıkartılması şeklinde yapılan düzeltme sonrasında (Şekil 18); 1., 2. ve 3. haftalar arasında anlamlı bir fark bulunmaması, var olan neopterin artışının zamana bağlı olarak gerçekleştiğini ortaya koymuştur. Düzeltme öncesinde 1. hafta neopterin düzeyleri ile 2. ve 3. hafta değerleri arasında anlamlı bir fark saptanmış, ancak düzeltme sonrasında, TNF- α ve IFN- γ sonuçlarına benzer şekilde, haftalar arasındaki fark ortadan kalkmıştır. Bu da EBV ile transforme olan hücrelerin her üç sitokin için benzer, ancak transforme olmayan hücrelere göre farklı bir yanıt geliştirdiklerini ortaya koymuştur. Transforme olan ve olmayan her üç grupta gelişen neopterin yanıtı, farklı uyaranlara karşı değişiklik göstermediği halde zamana bağlı olarak değişmiştir. Bu da kültür süresi içinde neopterin düzeylerini etkileyen farklı bir faktör olabileceğini akla getirmektedir.

Hücre kültürleri *in vivo* ortamda çeşitli moleküler yolların işleyişleri hakkında yol gösterici bilgiler vermekle birlikte, bu ortamdaki

hücrelerin çok çeşitli açılardan organizmadaki hücrelerden farklı davranabilmeleri bir dezavantaj oluşturmaktadır⁴⁹. Primer hücre kültürlerinin diğer bir dezavantajı da “kültür şoku” adı verilen kavramdır. İzolasyonun ardından yabancı bir ortama aktarılan hücrelerin yaklaşık %1-10'unun canlılıklarını sürdürebildikleri, geri kalanının ise izolasyon prosedürünün yarattığı stres ve yabancı bir ortama uyum sağlayamamak nedenleri ile öldükleri bildirilmiştir⁵⁰. Kültür şoku, hücreleri çeşitli yollar aracılığı ile uyarabilmektedir; bu yolların başında oksidatif stres gelmektedir. Oksidatif stres, hücre içerisindeki reaktif oksijen ürünleri ile antioksidan mekanizmalar arasındaki dengesizliği tanımlamaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda bu ürünlerin toksik etkiler oluşturduklarını, ancak hücrelerin reaktif oksijen metabolitlerine (ROS) vereceği yanıtın hücre tipine ve ROS miktarına göre değiştiği gösterilmiştir⁴⁹. Hücrelerin ROS aracılığıyla hasara gösterdikleri direnç, hücrelerin kültür ortamına sağlamış oldukları uyum ile doğru orantılı olarak değişiklik göstermektedir⁴⁹.

Yapılan çalışmalar neopterinin sadece bir T hücre aktivasyon belirteci olmadığını, düzeylerinin hücresel savunma mekanizmalarına ait çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmaların aktivasyonu ile de arttığını ortaya koymaktadır. Savunma reaksiyonları sırasında monosit makrofaj aktivasyonunun artması, reaktif oksijen ve nitrojen ürünlerinin (ROS/RNS) üretimini tetiklemektedir. Bu aşamada neopterinin bir etkisi ROS ve RNS'nin hasar verici patojenlere karşı olan sitotoksik etkilerini artırmak şeklindedir. Aktive monosit/makrofajlardan salıverilen neopterin miktarı, bu hücrelerce üretilen hidrojen peroksid ile doğru orantılıdır¹¹. THP-1 hücrelerinde neopterinin hücre içi kalsiyum düzeylerini artırması, reaktif ürünlerin üretiminde neopterinin doğrudan bir rolü olduğunu ortaya koymaktadır⁵¹. İndirgenmemiş bir pteridin molekülü olan neopterin, serbest radikaller için bir “çöpçü” (*scavenger*) olmamakla birlikte, ksantinoksidazın

nonkompetitif bir inhibitörü olarak görev yapmakta ve diğer taraftan hidrojen peroksid ile kloraminin etkilerini artırarak onların mikroorganizmalar üzerindeki toksik etkilerine katkıda bulunmaktadır⁵². 7,8 dihidroneopterin bir “çöpçü” olarak görev yapmasına karşılık, neopterin H_2O_2 , HOCl ve peroksinitritler gibi çeşitli potent reaktif moleküllerin düzeylerini artırması, neopterin “aktive makrofajların sitotoksik etkilerini düzenleyen endojen bir regülatör” olarak tanımlanmasına neden olmuştur⁵³. Bizim çalışmamızda hücre kültür ortamına, ilerleyen dönemde besiyeri eklenmemiş, hücreler pasajlanmamıştır. Bu nedenle özellikle 1. haftadan sonra gerçekleşen neopterin artışının, hücrelerin yaşamakta oldukları giderek artan oksidatif strese bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Schuster ve arkadaşları²⁰; EBV'nin neden olduğu akut IM, kronik IM ve X'e bağlı lenfoproliferatif sendromu olan üç ayrı grupta yaptıkları bir çalışmada, akut enfeksiyon geçirmekte olan çocukların tümünde neopterin ve IFN- γ düzeylerinin yükseldiğini göstermişler, bunun da büyüyen EBV ile enfekte B lenfosit havuzuna karşı aktive olan T lenfosit yanıtının bir göstergesi olduğunu belirtmişlerdir. Buna karşılık akut dönemde yüksek düzeylerde saptanan IL-6'nın kronik dönemde ölçülebilir düzeyin altına iniyor olması, hücresel immün yanıtın ilerleyen dönemlerde ölümsüz B lenfositleri elimine ettiğini ortaya koymaktadır. Yine aynı çalışmada, akut dönemde yüksek olan neopterin düzeyleri, kronik IM'li çocukların bir tanesinde ölçülebilir düzeyin üzerinde, diğer ikisinde ise altında olarak tespit edilmiştir. Neopterin düzeyi artmış çocukta aynı zamanda IFN- γ düzeyinin de diğer iki çocuğa göre oldukça yüksek olması, artan neopterin düzeyinin kronik dönemdeki transformasyona değil, indirekt olarak IFN- γ 'nın neopterin üzerindeki sitmüle edici etkisine bağlı olabileceğini ifade etmektedir. Yine bu çalışmaya göre, XLP'li dört çocukta neopterin düzeylerinin IFN- γ ile doğru orantılı olarak yüksek olması, buna

karşılık transformasyonun bir göstergesi olan IL-6'nın ise ölçülebilir düzeylerin altında olması, neopterinin en potent aktivatörü olan IFN- γ ile olan ilişkisini açıklamaktadır. Bizim çalışmamızda hücre kültürünün 3. haftasında hala yüksek olan IL-6 düzeyleri saptanmıştır. Bu da 3 haftanın kronik enfeksiyonu tanımlayabilme açısından yetersiz bir süre olabileceğini düşündürmektedir. Buna karşılık oksidatif strese bağlı gerçekleşen hücre ölümüne hücre tipinin de etki ettiği varsayıldığında, ortamdaki T lenfositlerin bundan öncelikli olarak etkilendikleri ve monosit/makrofaj aktivitesine rağmen hücresel immün yanıtın ortadan kalktığı ve buna bağlı olarak IL-6 düzeylerinin azalmadığı düşünülebilir.

EBV enfeksiyonu geçiren hastalarda IFN- γ ve neopterin düzeylerinin ölçüldüğü bir çalışmada, hem neopterin hem de IFN- γ düzeylerinin akut, kendini sınırlayan enfeksiyöz mononükleoz geçiren çocuklarda erken dönemde arttığı, bunun da büyüyen EBV ile ölümsüz B lenfosit havuzuna karşı gelişen bir yanıt olduğu belirtilmektedir²⁰. *In vitro* ortamda yapılan diğer bir çalışmada ise IFN- γ düzeylerinin enfeksiyonun 3. gününden itibaren ölçülebilir düzeylere ulaştığı, 5. ile 8. günler arasında ise en yüksek seviyelerde olduğu gösterilmiştir⁴⁸. Yine bu çalışmada enfeksiyonun ardından salıverilen IFN- γ 'nın başlıca kaynağının T lenfositler olduğu, monositlerin ve NK hücrelerinin bu dönemde buna direkt katkıda bulunmadıkları belirtilmiştir⁴⁸. Diğer pek çok enfeksiyonda T lenfositler hem IFN- α hem de IFN- γ için kaynak hücre iken, EBV enfeksiyonunun ardından T lenfositlerin sadece IFN- γ üretimine katkıda bulundukları bildirilmektedir. Bunun temel nedeni olarak EBV'nin yalnızca B lenfositleri enfekte ettiği bildirilse de, sonraki yıllarda yapılan çalışmalar EBV'nin B lenfositlerin yanı sıra immatür kortikal timositler ile NK hücrelerini de enfekte ettiğini ortaya koymaktadır⁵⁴. Değişken sayıda T lenfositin CD21 eksprese ettiği bilinmekle birlikte, EBV'nin T lenfosit ve NK enfeksiyonu için hangi mekanizmayı kullandığı henüz tam olarak açıklığa

kavuşmamıştır. T lenfositlerin siklosporin A kullanılarak ortamdan elimine edildiği bir çalışmada EBV aracılı B lenfosit transformasyonunun daha başarılı olduğunu gösteren çalışmalar bulunmakla birlikte⁴⁶, bizim çalışmamızda B lenfosit transformasyonuna karşı gelişen diğer sitokin yanıtları da incelendiğinden B lenfosit izolasyonu yapılmamıştır. Whittingham ve arkadaşlarının bir çalışmasında¹⁶, IFN- γ düzeylerinin hücrelerin EBV ile enfekte edilmelerinin ardından 1. haftada yükselerek 26 ± 35 U/ml'ye ulaştığı, daha sonra ise giderek azaldığı gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda ise IFN- γ düzeyleri 1. haftada tespit edilebilir düzeyde artmış 2. haftanın sonunda maksimum düzeylere ulaşmış, 3. haftadan itibaren ise giderek azalmaya başlamıştır. Nonspesifik uyarıcı olarak kullanılan PHA-L'nin bir T hücre mitojeni olması, buna karşılık diğer uyarıcı olan LPS'nin primer olarak B lenfositleri uyarması nedeniyle IFN- γ düzeyleri PHA ile uyarılan grupta belirgin olarak daha yüksektir.

IL-6'nın EBV ile transforme olmuş B hücrelerinin otokrin bir büyüme faktörü olarak IL-6 salgılattığını destekleyen bulgulara¹⁹ benzer şekilde, bizim çalışmamızda da IL-6 düzeylerinin EBV ile uyarılmış gruplarda 12. haftadan itibaren yükseldiği; bunun yanı sıra özgül olmayan uyarıcıların kullanıldığı kültürlerde IL-6'nın belirgin artış gösterdiği; aynı kültürlerde kontrol grubunda 12. saatte alınan örneklerde de IL-6'nın negatif olduğu, buna karşılık PHA ve LPS ile uyarma sonucunda pozitifleştiği gösterilmiştir (Şekil 16). Whittingham ve arkadaşlarının çalışmasında¹⁶ ise enfekte hücre kültürlerinde IL-6 düzeyleri; 48. saatte 83 ± 195 U/ml olarak bulunmuş, 2. haftanın sonunda maksimum düzey olan 250 ± 149 U/ml düzeyine ulaşmış, 3. haftadan itibaren ise azalmaya başlamıştır.

In vitro bir çalışmada EBV ile enfekte olan ve olmayan kültürlerde herhangi bir zamanda ölçülebilir TNF- α düzeylerine rastlanmadığı belirtilmiştir¹⁶. Bu çalışmada EBV'nin TNF- α üzerinde direkt inhibitör bir etkiye sahip olabileceği, ancak EBV'nin TNF- α ile sinerjistik etki gösteren IL-1 β üzerinde böyle bir etkisi olmadığı bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada ise EBV ile enfekte hücre kültürlerinde 48. saatte TNF- α düzeylerinin ölçülemez düzeyde olduğu gösterilmiş, bunun nedeni olarak da EBV'nin TNF- α üzerinde gen transkripsiyonu düzeyindeki inhibitör etkisi vurgulanmıştır⁵⁵. Bizim çalışmamızda TNF- α düzeylerinin EBV ile enfekte grupta 72. saatten itibaren yükseldiği, 1., 2., ve 3. haftalar arasında bir fark saptanmamakla birlikte 3. haftada bir miktar azaldığı gösterilmiştir (Şekil 14). Jochems ve arkadaşlarının⁵⁶ *in vitro* EBV ile transforme edilen B lenfositlerin büyüme ve Ig üretimlerini optimize etmek amacıyla yaptıkları bir araştırmada, altı farklı monoklonal EBV B hücre dizisinden oluşan bir panel kullanılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda farklı hücre dizileri ile transforme edilen hücrelerden salıverilen sitokinlerin ve benzer şekilde bu hücrelerin ortama eklenen sitokinlere gösterdikleri yanıtların farklı olduğu belirtilmiştir⁵⁶. Bizim çalışmamızdan farklı olarak Whittingham ve arkadaşlarının yayınladıkları çalışmada¹⁶, transforme edici hücre dizisi olarak QIMR-WIL lenfoblastoid hücre dizisi kullanılmıştır. İki çalışma arasında TNF- α düzeylerinde gözlenen farklılık, kullanılan transforme edici hücre dizilerinin farklılığından ileri gelebileceği düşünülmüştür. TNF- α düzeyleri, nonspesifik uyaran olarak kullanılan LPS ve PHA-L'ye yanıt olarak belirgin düzeyde artmış, 12. saatte en yüksek düzeye ulaşmış, daha sonra azalarak 3. haftanın sonunda en düşük değerlere gelmiştir. Proenflamatuvar sitokinler olarak bilinen IFN- γ , TNF- α ve IL-6'nın oksidatif strese karşı bir cevap olarak yükseldiği yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda gösterilmiştir. Hem IFN- γ 'nın hem de TNF- α belirli bir süre sonrasında azalıyor olmasının nedenleri arasında sitokin salıverilmesine neden olan uyarının sürekli olmaması, ortamda zamanla ölü hücrelerin

birikmesi ve sitokinlerin protein yapılarından kaynaklanan kısa yarı ömürleri sayılabilir.

6. SONUÇ

Sonuç olarak; bu çalışmada neopterin düzeylerinin, EBV transformasyonundan bağımsız olarak, özgül olmayan uyaranlara verilen yanıtı benzer bir şekilde, zamana bağımlı olarak yükseldiği görülmüştür. Bunun nedeninin hızlı bir şekilde üremeye devam eden hücrelerin kültür ortamında yetersiz besiyeri ve ortam nedeni ile girdikleri oksidatif stres ve yaşadıkları kültür şoku olduğu düşünüldüğünden, ilerleyen dönemde logaritmik fazda üretilen hücrelerde aynı deneyin tekrarlanması planlanabilir. Bu sonuçlara dayanarak neopterin, EBV'ye bağlı gelişebilecek kanserler öncesinde transformasyonu değerlendirmek amacı ile değil, ancak daha çok virüse karşı gelişen akut yanıtların değerlendirilmesinde kullanılabilecek bir belirteç olduğu öne sürülebilir.

7. ÖZET

Epstein Barr Virüs Aracılı B Lenfosit Transformasyon Sürecinde Periferik Kan Mononükleer Hücrelerinin Neopterin Yanıtı

Amaç: Epstein-Barr Virüs (EBV), insan B lenfositlerini latent olarak enfekte edebilen, transformasyon yeteneğine sahip bir herpesvirustur. Çocuklukta asemptomatik geçen enfeksiyon, adölesanlarda İnfeksiyöz Mononükleoz'a (IM) neden olabilmekte; immün yetmezliği bulunan kişilerde ise çeşitli malignitelere yol açabilmektedir. Dünyadaki insanların yaklaşık %95'i hayatlarının herhangi bir döneminde EBV ile karşılaşmaktadır. Bu çalışmada hücresel immün aktivitenin bir göstergesi olarak kullanılabilen neopterinin in vitro EBV transformasyonu ile ilişkisi ve buna eşlik eden sitokin cevaplarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Metod: Sağlıklı gönüllülerden alınan periferik venöz kandan izole edilen mononükleer hücrelerin, kültür ortamında virion salgıladığı bilinen B95-8 hücre kültür süpernatanı eklenerek, EBV ile transforme edilmesinin ardından elde edilen kültür süpernatantlarında, neopterin ile buna eşlik eden IFN- γ , IL-6 ve TNF- α düzeyleri ELISA aracılığı ile ölçülmüştür.

Bulgular: Çalışma sonunda neopterin yanıtının EBV transformasyonundan bağımsız bir şekilde, zaman bağımlı olarak arttığı gösterilmiştir. Buna karşılık EBV içeren kültürlerde 72. saatten itibaren yükselmeye başlayan TNF- α düzeylerinin 1. haftada en yüksek düzeye ulaştığı ve 3. haftada yeniden azaldığı saptanmış, ancak bu haftaların düzeyleri kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. EBV ile uyarılan hücre grubunda 1. haftadan itibaren saptanan IFN- γ düzeylerinin 3. haftada benzer şekilde azaldığı gösterilmiştir. EBV ile uyarılmış hücre gruplarında ölçülen IL-6 düzeylerinin zamana bağlı olarak artarak 3. haftada en yüksek düzeye ulaştığı saptanmıştır.

Sonuç: Bu bulgulara dayanarak; uyarandan bağımsız, zamana bağımlı artan neopterin, EBV'ye bağlı gelişebilecek kanserler öncesinde transformasyonu değerlendirmek amacıyla değil, daha çok virüse karşı gelişen akut yanıtın değerlendirilmesinde kullanılabilecek bir belirteç olduğu öne sürülebilir.

Anahtar Kelimeler: EBV, in vitro, neopterin, IFN- γ , IL-6, TNF- α , B lenfosit.

8. SUMMARY

The Neopterin Response of Peripheral Blood Mononuclear Cells to *in vitro* EBV Transformation Process of B Lymphocytes

Objective: Epstein Barr Virus (EBV) is a human herpesvirus, which infects human B lymphocytes latently and immortalizes the cells due to transformation. EBV infection is asymptomatic in childhood while it may cause a self-limiting lymphoproliferative disorder called infectious mononucleosis (IM) in adolescence. More than 95% of world population has been infected with EBV. In this study it has been aimed to show the interaction between *in vitro* EBV transformation and neopterin which is a marker for cellular immune activity and accompanying different cytokine responses.

Method: In order to analyze the influences with neopterin release and other cytokines, mononuclear cells have been isolated from peripheral blood samples of healthy donors and transformed via EBV. Neopterin, IFN- γ , TNF- α and IL-6 levels have been measured with EIA kits in culture supernatants.

Results: Neopterin levels have increased dependent on time and independent from EBV transformation. In EBV transformed cell culture TNF- α level increased beginning from the 72nd hour and reached to their peaks at the 1st week and decreased again at the 3rd week; however there were no significant differences among the levels between three weeks. Similar to TNF α , IFN- γ levels also increased at the 1st week and started to decrease at the 3rd week. IL-6 reached to its maximum levels at the 3rd week.

Conclusion: According to these results, neopterin levels which increased dependent on time and independent from EBV transformation may be a

helpful marker for evaluating the acute response to viral infection, but not for B lymphocyte transformation.

Keywords: EBV, *in vitro*, neopterin, IFN- γ , IL-6, TNF- α , B lymphocyte.

9. KAYNAKLAR

1. Huber C, Batchelor JR, Fuchs D, Hausen A, Lang A, Niederwieser D, et al. Immune response-associated production of neopterin. Release from macrophages primarily under control of interferon- γ . J Exp Med 1984; 160(1): 310-6.
2. Nathan CF. Peroxide and pteridine: a hypothesis on the regulation of macrophage antimicrobial activity by interferon gamma. Interferon 1986; 7: 125-43.
3. Moutabarrik A, Takahara S, Nakanishi I, Kokado Y, Takano Y, Kameoka H, et al. Interferon- γ stimulates neopterin release from cultured kidney epithelial cells. Scand J Immunol 1994; 39(1): 27-30.
4. Brown RR, Lee CM, Kohler PC, Hank JA, Storer BE, Sondel PM. Altered tryptophan and neopterin metabolism in cancer patients treated with recombinant interleukin 2. Cancer Res 1989; 49 (17): 4941-4.
5. Marth C, Weiss G, Koza A, Reibnegger G, Daxenbichler G, Zeimet AG, et al. Increased production of immune activation marker neopterin by colony-stimulating factors in gynecological cancer patients. Int J Cancer 1994; 58 (1): 20-3.
6. Murr C, Widner B, Wirleitner B, Fuchs D. Neopterin as a marker for immune system activation. Curr Drug Metab 2002; 3 (2): 175-87.
7. Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Werner ER, Dierich MP, Wachter H. Neopterin as a marker for activated cell-mediated immunity: application in HIV infection. Immunol Today 1988; 9 (5): 150-5.
8. Denz H, Fuchs D, Hausen A, Huber H, Nachbaur D, Reibnegger G, et al. Value of urinary neopterin in the differential diagnosis of bacterial and viral infections. Klin Wochenschr 1990; 68 (4): 218-22.

9. Hoffmann G, Wirleitner B, Fuchs D. Potential role of immune system activation-associated production of neopterin derivatives in humans. *Inflamm Res* 2003; 52 (8):313-21.
10. Barak M, Gruener N. Neopterin augmentation of tumor necrosis factor production. *Immunol Lett* 1991; 30 (1): 101-6.
11. Hoffmann G, Frede S, Kenn S, Smolny M, Wachter H, Fuchs D, et al. Neopterin-induced tumor necrosis factor- α synthesis in vascular smooth muscle cells in vitro. *Int Arch Allergy Immunol* 1998; 116 (3): 240-5.
12. Henle W, Diehl V, Kohn G, Zur Hausen H, Henle G. Herpes-type virus and chromosome marker in normal leukocytes after growth with irradiated Burkitt cells. *Science* 1967, 157 (792); 1064-5.
13. Henle W. Evidence for viruses in acute leukemia and Burkitt's tumor. *Cancer* 1968; 21(4): 580-6.
14. Ehlin-Henriksson B, Mowafi F, Klein G, Nilsson A. Epstein-Barr virus infection negatively impacts the CXCR4-dependent migration of tonsillar B cells. *Immunology* 2006; 117 (3): 379-85.
15. Ehlin-Henriksson B, Gordon J, Klein G. B-lymphocyte subpopulations are equally susceptible to Epstein-Barr Virus infection, irrespective of immunoglobulin isotype expression. *Immunology* 2003;108 (4): 427-30.
16. Whittingham S, Naselli G, Harrison LC, Boyd AW, Cebon J, Jack I. Cytokine production in response to Epstein-Barr virus infection of peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Immunol Cell Biol* 1993; 71 (Pt 4):259-64.
17. Biglino A, Sinicco A, Forno B, Pollono AM, Sciandra M, Martini C, et al. Serum cytokine profiles in acute primary HIV-1 infection and in infectious mononucleosis. *Clin Immunol Immunopathol* 1996; 78 (1): 61-9.

18. Tosato G, Tanner J, Jones KD, Revel M, Pike SE. Identification of interleukin-6 as an autocrine growth factor for Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *J Virol* 1990; 64 (6): 3033-41.
19. Yokoi T, Miyawaki T, Yachie A, Kato K, Kasahara Y, Taniguchi N. Epstein-Barr virus-immortalized B cells produce IL-6 as an autocrine growth factor. *Immunology* 1990; 70 (1): 100-5.
20. Schuster V, Herold M, Wachter H, Reibnegger G. Serum concentrations of interferon γ , interleukin-6 and neopterin in patients with infectious mononucleosis and other Epstein-Barr virus-related lymphoproliferative diseases. *Infection* 1993; 21 (4): 210-3.
21. Linde A, Andersson B, Svenson SB, Ahrne H, Carlsson M, Forsberg P, et al. Serum levels of lymphokines and soluble cellular receptors in primary Epstein-Barr virus infection and in patients with chronic fatigue syndrome. *J Infect Dis* 1992; 165 (6): 994-1000.
22. Lopes V, Young LS, Murray PG. Epstein-Barr Virus-associated cancers: aetiology and treatment. *Herpes* 2003; 10 (3): 78-82.
23. Baumforth KR, Young LS, Flavell KJ, Constandinou C, Murray PG. The Epstein-Barr virus and its association with human cancers. *Mol Pathol* 1999; 52 (6): 307-22.
24. Young LS, Murray PG. Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene* 2003; 22 (33): 5108-21.
25. Gires O, Zimmer-Strobl U, Gonnella R, Ueffing M, Marschall G, Zeidler R, et al. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *EMBO J* 1997; 16 (20): 6131-40.

- 26.** Kilger E, Kieser A, Baumann M, Hammerschmidt W. Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *EMBO J* 1998; 17 (6): 1700-9.
- 27.** Kis LL, Takahara M, Nagy N, Klein G, Klein E. IL-10 can induce the expression of EBV-encoded latent membrane protein-1 (LMP-1) in the absence of EBNA-2 in B-lymphocytes and in Burkitt lymphoma- and NK lymphoma- derived cell lines. *Blood* 2006; 107 (7): 2938-35.
- 28.** Pagès F, Galon J, Karaschuk G, Dudziak D, Camus M, Lazar V, et al. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 induces interleukin-18 receptor expression in B cells. *Blood* 2005; 105 (4): 1632-9.
- 29.** Nakagomi H, Dolcetti R, Bejarano MT, Pisa P, Kiessling R, Masucci MG. The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP-1) induces intyerleukin-10 production in Burkitt lymphoma lines. *Int J Cancer* 1994; 57 (2): 240-4.
- 30.** Eliopoulos AG, Stack M, Dawson CW, Kaye KM, Hodgkin L, Sihota S, et al. Epstein-Barr virus encoded LMP-1 and CD40 mediate IL-6 production in epithelial cells via an NF-kappaB pathway involving TNF receptor associated factors. *Oncogene* 1997; 14 (24): 2899-916.
- 31.** B95-8 (online). 2002 (cited 2008 Nov 15). Available from URL: <http://www.biotech.ist.unige.it/cldb/totcl369.html>
- 32.** Garner JG, Hirsch MS, Schooley RT. Prevention of Epstein-Barr virus-induced B-cell outgrowth by interferon-alpha. *Infect Immun* 1984; 43 (3): 920-4.
- 33.** Häupl T, Burmester GR, Hahn G, Feige U, Rordorf-Adam C, Kalden JR. Differential immunological response of patients with rheumatoid arthritis towards two different Epstein-Barr virus strains: inhibition of

interleukin-1 release by the B95-8, but not the P3HR-1 virus strain. Rheumatol Int 1989; 9 (3-5): 153-60.

34. B95-8 (online) (cited 2009 Jan 13). Available from URL: <http://cellbank.nibio.go.jp/celldata/jcrb9123.html>
35. Helgason CD. Culture of Primary Adherent Cells and a Continuously Growing Nonadherent Cell Line. In: Helgason CD, Miller CL, editors. Methods in Molecular Biology: Basic Cell Culture Protocols. 3rd ed. Totowa, NJ: Humana Press Inc. 2005. p. 1-12.
36. Chen I, Dubnau D. DNA uptake during bacterial transformation. Nat Rev Microbiol 2004; 2 (3): 241-9.
37. Cytokines. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, editors. Cellular and Molecular Immunology. 6th ed. PA, ABD: Saunders, Elsevier; 2008. p. 267-302.
38. Kılıçturgay K. İmmünoloji. 3. baskı. Bursa: Nobel&Güneş Tıp Kitabevi; 2003. p. 113-134.
39. Coligan J. Cryopreservation of cells. In: Coligan J and friends, editors. Current Protocols in Immunology (Volume 1). ABD: John Wiley & Sons, Inc; 1994. p. 3.14 (a).
40. Coligan J., Preparation of human mononuclear cell populations and subpopulations. In: Coligan J and friends, editors. Current Protocols in Immunology (Volume 1). ABD: John Wiley & Sons, Inc; 1994. p. 7.1 (b).
41. Coligan J., Generation of Epstein Barr Virus (EBV)-immortalized B-cell lines. In: In: Coligan J and friends, editors. Current Protocols in Immunology (Volume 1). ABD: John Wiley & Sons, Inc; 1994.p. 7.22 (c).
42. Hu B, Hong G, Li Z, Xu J, Zhu Z, Li L. Expression of VCA (viral capsid antigen) and EBNA1 (Epstein-Barr-virus-encoded nuclear

antigen 1) genes of Epstein-Barr virus in *Pichia pastoris* and application of the products in a screening test for patients with nasopharyngeal carcinoma, *Biotechnol Appl Biochem* 2007; 47 (Pt 1): 59-69.

43. Hurlin PJ, Fry DG, Maher VM, McCormick JJ. Morphological Transformation, Focus Formation, and Anchorage Independence Induced in Diploid Human Fibroblasts by Expression of a Transfected H-ras Oncogene 1. *Cancer Res* 1987; 47 (21): 5752-7.
44. Zerbini M, Ernberg I. Can Epstein-Barr Virus infect and transform all the B-lymphocytes of human cord blood? *J Gen Virol* 1983; 64 (Pt 3): 539-47.
45. Moss DJ, Rickinson AB, Wallace LE, Epstein MA. Sequential appearance of Epstein-Barr Virus nuclear and lymphocyte detected membrane antigens in B cell transformation. *Nature* 1981; 291 (5817): 664-6.
46. Mello AS, Burin MG, Michellin K, Viapiana M, Giugliani R, Coelho JC, et al. Epstein-Barr virus-induced transformation of B cells for the diagnosis of genetic metabolic disorders-enumerative conditions for cryopreservation. *Cell Prolif* 2006; 39(1): 29-36.
47. Callard RE, Lau YL, Shields JG, Smith SH, Cairns J, Flores-Romo L, et al. The marmoset B-lymphoblastoid cell line (B95-8) produces and responds to B-cell growth and differentiation factors: role of shed CD23 (sCD23). *Immunology* 1988; 65 (3): 379-84.
48. Lotz M, Tsoukas CD, Fong S, Dinarello CA, Carson DA, Vaughan JH. Release of lymphokines after infection with Epstein Barr Virus in vitro: II. A monocyte- dependent inhibitor of interleukin1 downregulates the production of interleukin2 and interferon- γ in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 1986; 136 (10): 3643-8.

- 49.** Halliwell B. Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem? *FEBS Lett* 2003; 540 (1-3): 3-6.
- 50.** Wright WE, Shay JW. Historical claims and current interpretations of replicative aging. *Nat Biotechnol* 2002; 20 (7): 682-8.
- 51.** Wöll E, Weiss G, Fuchs D, Lang F, Wachter H. Effect of pteridine derivatives on intracellular calcium concentration in human monocytic cells. *FEBS Lett* 1993; 318 (3): 249-52.
- 52.** Weiss G, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Werner ER, Werner-Felmayer G, et al. Neopterin modulates toxicity mediated by reactive oxygen and chloride species. *FEBS Lett* 1993; 321 (1): 89-92.
- 53.** Fuchs D, Baier-Bitterlich G, Wede I, Wachter H. Reactive oxygene and apoptosis: In: *Oxidative stres and the molecular biology of antioxidant defenses*. Scandalios J, ed. Cold Spring Harbor Laboratory Pres, NY, 1966: 139-67.
- 54.** Dolcetti R, Masucci MG. Epstein-Barr Virus: Induction and control of cell transformation. *J Cell Physiol* 2003; 196 (2): 207-18.
- 55.** Gosselin J, Menezes J, Mercier G, Lamoureux G, Oth D. Inhibition of tumor necrosis factor- α transcription by Epstein-Barr virus. *Eur J Immunol* 1991; 21: 203-8.
- 56.** Jochems GJ, Klein MR, Jordens R, Pascual-Salcedo D, van Boxtel-Oosterhof F, van Lier RA, et al. Heterogeneity in both cytokine production and responsiveness of a panel of monoclonal human Epstein-Barr virus-transformed B-cell lines. *Hum Antibodies Hybridomas* 1991; 2(2): 57-64.

10. EKLER

ETİK KURUL ONAYI



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ YEREL ETİK KURULU
RESEARCH ETHICS COMMITTEE OF MEDICAL FACULTY, GAZİ UNİVERSTY
ANKARA-TÜRKİYE
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI
İLAÇ DIŞI KLİNİK ÇALIŞMALAR

	PROTOKOL ADI	"Periferik kan mononükleer hücre kültüründe epstein barr virüs enfeksiyonuna karşı gelişen neopterin yanıtı ve bunun çeşitli sitokinler ile ilişkisi"	
BAŞVURU BİLGİLERİ	SORUMLU ARAŞTIRICI UNVANI, / ADI	Prof.Dr.Cemalettin Aybay	
	Belge Adı	Tarihi / değişiklik No.su	Dili Türkçe
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 354 Tarih : 22 Ekim 2007 Üniversitemiz Tıp Fakültesinde 18.06.2007 tarih ve 232 sayı ile Etik Kurul onayı alan, yukarıda künyede kayıtlı olan araştırma bir doktora tez çalışması olup, tez danışmanı olarak Yrd.Doç.Dr.Ayşegül Yücel'in belirlenmesinden dolayı yeni proje yürütücüsü olarak Yrd.Doç.Dr.Ayşegül Yücel'in sorumluluğunda aynı çalışmanın tekrar değerlendirilme talebi, Etik Kurulda incelenerek bilgi edinilmiş ve uygun bulunmuştur.		
ETİK KURUL BİLGİLERİ			
ÇALIŞMA ESASI	İYİ KLİNİK UYGULAMALAR KILAVUZU, HELSİNKİ BELGESİ, BİYOEETİK SÖZLEŞMESİ		
ÜYELER			
Unvanı / Adı / Soyadı Ek Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti
Prof.Dr.Türkiz GURSEL BAŞKAN	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji	G.Ü.T.F Çocuk Sağ.ve Hast.A.D.	K
Prof.Dr.Leyla MEMİŞ ÜYE	Patoloji	G.Ü.T.F Patoloji A.D.	K
Prof.Dr.Ceyda KARADENİZ ÜYE	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Onkoloji	G.Ü.T.F Çocuk Sağ.ve Hast.A.D.	K
Prof.Dr.Aysel ARICIOĞLU ÜYE	Tıbbi Biyokimya	G.Ü.T.F Tıbbi Biyokimya A.D.	K
Prof.Dr.Ayşe GÜLEKON ÜYE	Dermatoloji	G.Ü.T.F Dermatoloji A.D.	K
Prof.Dr.Fatma AKAR ÜYE	Ecz.Fak. Farmakoloji	G.Ü.E.F Ecz.Fak. Farmakoloji	K
Prof.Dr.Candan TUNCER ÜYE	Gastroenteroloji	G.Ü.T.F İç Hast. A.D.	K
Prof.Dr.Reha KURUOĞLU ÜYE	Nöroloji	G.Ü.T.F Nöroloji A.D.	E
Prof.Dr.E.Ferda PERÇİN ÜYE	Tıbbi Genetik	G.Ü.T.F Tıbbi Genetik A.D.	K
Doç.Dr.Canar ULUOĞLU ÜYE	Tıbbi Farmakoloji	G.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D.	K
Doç.Dr.Nesrin ÇOBANOĞLU ÜYE	Tıp Etiği ve Tıp Tarihi	G.Ü.T.F Tıp Etiği ve Tıp tarihi A.D.	K
Doç.Dr.Kenan HİZEL ÜYE	Enfeksiyon	G.Ü.T.F Enfeksiyon Hast. A.D.	E
Yrd.Doç.Dr.Birol DEMİREL ÜYE	Adli Tıp	G.Ü.T.F Adli Tıp A.D.	E
Hukuk Müşaviri Adem GELİR ÜYE	Hukuk Müşaviri	G.Ü.Rektörlük Hukuk Müşavirliği	E

* Araştırma ile ilişkili
** Toplantıda Bulunma

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı : Arzu

Soyadı : Aral

Doğum Yeri ve Tarihi : Ankara, 1977

Eğitimi : 2005- , Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri
Enstitüsü İmmünoloji AbD.
1995-2002 , Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
1990-1995 , Ankara Anadolu Lisesi
1989-1990 , Deutsche Schule Den Haag,
Hollanda
1988-1989 , Ankara Anadolu Lisesi
1983-1988 , Rauf Orbay İlkokulu

Yabancı Dili : İngilizce, Almanca

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Ankara Tabip Odası (2004'ten beri)

Türk Tabipleri Birliği (2004'ten beri)

Türk İmmünoloji Derneği (2007'ten beri)

International Society for Chronobiology (2007'ten beri)

International Society for Analytical Cytology (2007'ten beri)

Kronobiyoloji Derneği, Türkiye (2008'ten beri)

Türkiye Ulusal Allerji ve Klinik İmmünoloji Derneği (2008'ten beri)

Beyin ve Sinir Araştırmalar Derneği (2009'dan beri)

International Brain Research Organisation (IBRO) (2009'dan beri)

Federation of European Neuroscience Society (FENS) (2009'dan
beri)

Bilimsel Etkinlikleri

Yayınlar

1) SCI ve SCI-E Tarafından Taranan Bilimsel Dergilerde Yer Alan Yayınlar

1. Ayerden Ebinc F, Ebinç H, Derici U, **Aral A**, Aybay C, Taçoş G, Koç E, Mutluay R, Altok Reis K, Erten Y, Arinsoy T, Sindel S. The relationship between adiponectin levels and proinflammatory cytokines and left ventricular mass in dialysis patients. J Nephrol. 2009;22(2):216-23.
2. Adisen E, **Aral A**, Aybay C, Gürer MA. Salivary epidermal growth factor levels in Behçet's disease and recurrent aphthous stomatitis. Dermatology. 2008;217(3):235-40. Epub 2008 Jul 25.
3. Cevik M, Beyazova U, **Aral AL**, Duyan Camurdan A, Ozkan S, Sahin F, Aybay C. Seroprevalence of IgG antibodies against Bordetella pertussis in healthy individuals aged 4-24 years in Turkey. Clin Microbiol Infect. 2008;14(4):388-90.
4. Karakus R, **Aral AL**, Kanat DO, Hizel K, Caglar K, Sindel S, Yetkin I, Aybay C. Determinants of protection against diphtheria in adult hemodialysis patients. Ren Fail. 2007;29(7):829-34.
5. Yucel A, **Aral AL**, Basturk B, Karakus R, Aybay C, Aybay C. Investigation of the functional characteristics of antibodies to therapeutic anti-human tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody. Immunol Lett. 2007;111(2):84-91.
6. **Aral A**, Onder M, Gurer MA. A case of Behçet's disease with pathergy reaction at interferon injection site. Adv Exp Med Biol. 2003;528:541-3.
7. Onder M, Oztas M, **Aral A**. Is Behçet's disease a Kobner positive disorder? Adv Exp Med Biol. 2003;528:333-5.

II) Ulusal Hakemli Dergilerde Yer Alan Yayınlar

1. Basturk B, Aral A, Karakayali H, Dalgic A. Effects of anti-endothelial cell antibodies on acute rejection in renal transplant patients. Gazi Medical Journal. 2009;20(1):26-9.

Katıldığı Sertifikalı Kurslar

1. Tanısal Moleküler Mikrobiyoloji Teorik ve Uygulamalı Kursu. 18-20 Aralık 2009, Ankara.
2. 9th Course of the European School of Neuroimmunology (ESNI), 1-4 September 2009, İstanbul.
3. V. Ege Biennial International Neuroscience Graduate Summer School (BINGSS). 29 June-4 July 2009, İzmir.
4. Hücre Füzyonu Yöntemi ile Monoklonal Antikor Üretimi Uygulamalı Eğitim Programı. TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, 2-6 Haziran 2008, Kocaeli.
5. Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Kursu. 20 Kasım 2008, Ankara.
6. Transplantasyon İmmünolojisi ve Genetiği Derneği A'dan Z'ye HLA Kursu. 1 Mayıs 2008, Kıbrıs.
7. GÜDAM Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu. 11-13 Nisan 2007, Ankara.
8. İstanbul Üniversitesi DETAE XIII. Uygulamalı Flow Sitometri Eğitimi. 11-15 Haziran 2007, İstanbul.
9. MEDTEK BC Nefelometre Cihazı Kullanıcı Eğitimi. 24 Ekim 2007, Ankara.
10. Beckman Coulter FC500 Flow Cytometry Kullanıcı Eğitimi. 13-16 Eylül 2005, Ankara.

11. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi *Helicobacter pylori* Uygulamalı Moleküler Tanı Kursu. 9-11 Kasım 2005, Ankara

Katıldığı Kongre ve Bilimsel Toplantılar

1. 2nd European Congress of Immunology. 13-16 September 2009, Berlin, Germany.
2. Gazi Üniversitesi Nöropsikiyatri Merkezi, Nörofelsefe Sempozyumu IV. 11-12 Aralık 2009, Ankara.
3. Türk İmmünoloji Derneği Bölge Toplantıları VII. 16-18 Nisan 2009, Antakya.
4. Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkolojide Güncel Gelişmeler Sempozyumu. 23 Mayıs 2009, Ankara.
5. 2nd Mediterranean Clinical Immunology Meeting. 4-7 October 2008, Antalya.
6. 1. Ulusal Transplantasyon İmmünolojisi ve Genetiği Kongresi. 1-4 Mayıs 2008, Kıbrıs.
7. The Second International Congress of Applied Chronobiology and Chronomedicine (ICACC). 23-28 March 2007, Tunis, Tunisia.
8. XIX. Ulusal İmmünoloji Kongresi (Uluslararası katılımı). 21-24 Kasım 2007, Antalya.
9. Gazi Üniversitesi II. Ankara Etik Günleri Sempozyumu. 28 Aralık 2007, Ankara.
10. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Günümüzde Elektroforez Uygulamaları ve Klinik Önemi Sempozyumu. 6-7 Nisan 2006, Ankara.
11. Ulusal Afinite Teknikleri Kongresi. 7-10 Haziran 2006, Zonguldak.

12. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi V. HLA Sistemi ve Transplantasyon Sempozyumu. 1-2 Kasım 2006, Ankara.
13. XVIII. Ulusal İmmünoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı). 7-10 Eylül 2005, Bursa.
14. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi *Helicobacter pylori* Sempozyumu. 9-11 Kasım 2005, Ankara.
15. Türk İmmünoloji Derneği Bölge Toplantıları IV. 25-26 Kasım 2005, Afyonkarahisar.
16. Leiden International Medical Students Congress. 16-17 March Leiden, The Netherlands.
17. Pediatrik Metabolizma Günleri. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğrenci Araştırma Grubu. Ankara, 24-25 Nisan 2000, Ankara.
18. Hematoloji Öğrenci Sempozyumu. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğrenci Araştırma Grubu. Ankara, 3-4 Mayıs 1998, Ankara.

Kongre Bildirileri

1. **Aral A**, Atak A. The neopterin response of peripheral blood mononuclear cells to in vitro transformation process of B lymphocytes via Epstein Barr Virus. Poster, PA15/28; 2nd European Congress of Immunology. European Journal of Immunology Supplement 1/09, p. 127. 13-16 September 2009, Berlin, Germany.
2. Baştürk B, Akıncı E, **Aral A**, Uyar Y, Bodur H. Kırım kongo kanamalı ateşi hastalarında AEHA ve VEGF düzeyleri ile bu parametrelerin prognoz üzerine etkileri. Poster, P16. XX. Ulusal İmmünoloji Kongresi. Kongre Özet Kitabı, s. 88; 19-22 Kasım 2009, Girne, KKTC.

3. Baştürk B, Akıncı E, Falay M, **Aral A**, zet G, Bodur H. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi hastalarında HLA-G düzeyleri. Poster, P18. XX. Ulusal İmmünoloji Kongresi. Kongre zet Kitabı, s. 89; 19-22 Kasım 2009, Girne, KKTC.
4. Baştürk B, Sarı S, Eğritaş , **Aral A**, Dalgıç B. Türkiye’de IgA eksikliği prevalansı. Poster, P21. XX. Ulusal İmmünoloji Kongresi. Kongre zet Kitabı, s. 90; 19-22 Kasım 2009, Girne, KKTC.
5. Atak A, Dinçer S, **Aral A**, Buyrukçu BA, zgn OD, Ergun MA. Açıklanamayan infertilite, gebelik kayıpları ve IVF başarısızlığında çeşitli immn parametrelerin rolnn araştırılması. Poster, P43. XX. Ulusal İmmünoloji Kongresi. Kongre zet Kitabı, s. 98; 19-22 Kasım 2009, Girne, KKTC.
6. Basturk B, Bodur H, Akinci E, Aral A, Uyar Y, Carhan A. Elevated plasma levels of HLA-G in patients with Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. Poster, P28. Third International Congress of Molecular Medicine; IUBMB LIFE Vol. 61, Issue 3, p. 331-2; 5-8 May 2009, İstanbul.
7. **Aral A**, Adisen E, Altay S, Basturk B, Gurer MA. Autoantibodies in Psoriatic Patients Treated with Anti-TNF α . Poster, P8. 2nd Mediterranean Clinical Immunology Meeting. Abstract Book, p. 73; 4-7 October 2008, Antalya, Türkiye.
8. **Aral A**, Altay S, Basturk B. Neopterin Levels in Patients with Anti-nuclear Antibody and Anti-endothelial Cell Antibody Positivity. Poster, P34. 2nd Mediterranean Clinical Immunology Meeting. Abstract Book, p. 82; 4-7 October 2008, Antalya, Türkiye.
9. **Aral A**, Basturk B, Bozalioğlu S, Akin M, Kurukahvecioğlu O, Taneri F. Plasma HLA-G Levels in Patients with Breast and Thyroid Cancer. Poster, P72. 2nd Mediterranean Clinical Immunology Meeting. Abstract Book, p. 95; 4-7 October 2008, Antalya, Türkiye.

10. Baştürk B, **Aral A**, Karakayalı H, Dalgıç A. Akut Rejeksiyon Atağında Endotel Hücre Antikorlarının Rolü. Poster. I. Ulusal Transplantasyon İmmünolojisi ve Genetiği Kongresi. Kongre Özet Kitabı, s. 48. 1-4 Mayıs 2008, Girne, KKTC.
11. Baştürk B, Haberal A, **Aral A**, Karakayalı H. Böbrek Nakli Olan Hastalarda sHLA-G ve Sitokin Gen Polimorfizm İlişkisinin Araştırılması. Poster. I. Ulusal Transplantasyon İmmünolojisi ve Genetiği Kongresi. Kongre Özet Kitabı, s. 59. 1-4 Mayıs 2008, Girne, KKTC.
12. **Aral LA**, Karakucuk EH, Adisen E, Onder M, Aybay C, Zengil H. Lack of Circadian Variation in Epidermal Growth Factor Levels in Psoriasis and Effect of Methotrexate Therapy: A Preliminary Study. Poster, P38. The Second International Congress Applied Chronobiology and Chronomedicine (ICACC). Abstract Book, p. 135. 23-28 March 2007, Tunis, Tunisia.
13. **Aral LA**, Baştürk B, Kurukahvecioğlu O, Yamaç D. Meme Kanseri Olan Hastalarda Antiendoteliyal Hücre Antikoru Varlığının ve Metastazla İlişkisinin Araştırılması. Sözlü Sunum, S14. XIX. Ulusal İmmünoloji Kongresi. Kongre Özet Kitabı, s. 180; 21-24 Kasım 2007, Antalya.
14. **Aral LA**, Karakuş R, Yücel A, Baştürk B, Aybay C. İmmünoafinite Kromatografi Yöntemi ile Plazmadan Elde Edilen HBV Yüzey Antijeninin Aşı Modeli Olarak Kullanımı. Sözlü Sunum, S4; II. Ulusal Afinitite Teknikleri Kongresi. Kongre Özet Kitabı, s. 4. 7-10 Haziran 2006, Zonguldak.
15. **Aral LA**, Önder M, Gurer MA. A Case of Behcet's Disease With Pathergy Reaction at Interferon Injection Site. Poster, P170; 10th International Conference on Behcet's Disease. Abstract Book, p. 99. 27-29 June 2002, Berlin, Germany.

16. Onder M, Oztas MO, **Aral LA**. Is Behcet's Disease Koebner positive? Oral Presentation, O82; 10th International Conference on Behcet's Disease. Abstract Book, p. 77. 27-29 June 2002, Berlin, Germany.
17. **Aral LA**, Onder M, Gurer MA. The Clinical Features of Behcet's Disease and Evaluation of Acute Phase Reaction. Poster. Leiden International Medical Students Congress. 16-17 March Leiden, The Netherlands.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince, bana olan katkılarından ötürü başta tez danışmanım Doç. Dr. Ayşegül Atak ve Prof. Dr. Cemalettin Aybay olmak üzere İmmünoloji Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyelerine ve sağladıkları teknik destek ile kit desteği için Euroimmun Medizinische Labordiagnostica AG, Türkiye'ye en içten teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Arzu Aral