



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



***Cistus creticus* EKSTRAKTININ TAVUK KORONA
VİRÜSÜ (IBV) İLE ENFEKTE EDİLMİŞ
BRONKOALVEOLER KARSİNOM HÜCRELERİNDE
POTANSİYEL ANTİVİRAL ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Fulya ÜNALP

Biyomühendislik Anabilim Dalı

İzmir

2021

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

***Cistus creticus* EKSTRAKTININ TAVUK KORONA
VİRÜSÜ (IBV) İLE ENFEKTE EDİLMİŞ
BRONKOALVEOLER KARSİNOM
HÜCRELERİNDE POTANSİYEL ANTİVİRAL
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Fulya ÜNALP

Danışman : Prof. Dr. Ayşe NALBANTSOY

Biyomühendislik Anabilim Dalı
Biyomühendislik Yüksek Lisans Programı

İzmir
2021

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Cistus creticus* Tavuk Korona Virüsü (IBV) ile Enfekte Edilmiş Bronkoalveoler Karsinom Hücrelerinde Potansiyel Antiviral Etkisinin Araştırılması” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

06/09/2021

İmzası

Fulya ÜNALP

ÖZET

***Cistus creticus* EKSTRAKTININ TAVUK KORONA VİRÜSÜ (IBV) İLE ENFEKTE EDİLMİŞ BRONKOALVEOLER KARSİNOM HÜCRELERİNDE POTANSİYEL ANTİVİRAL ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

ÜNALP, Fulya

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ayşe NALBANTSOY

Temmuz 2021, 73 sayfa

Enfeksiyöz bronşitis virüsü (IBV), kanatlı hayvanlar arasında oldukça fazla bulaşıcılığa sahip bir akut viral solunum yolu hastalığı olan enfeksiyöz bronşitten sorumludur. SARS-CoV-2, IBV ile aynı virüs ailesinden gelmektedir ve iki virüs arasında birçok ortak özellik bulunmaktadır. Bu nedenle, zoonotik IBV modeli ile antiviral ajan çalışmaları SARS-CoV-2 enfeksiyonu sitokin fırtına modelleri için kritik potansiyele sahiptir. Halk arasında laden gülü olarak da bilinen *Cistus creticus* türlerinin antiviral etkinliğinin olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada, *C. creticus* ekstraktının antiviral potansiyeli araştırılmış ve IBV'ye karşı antiviral özellik gösterdiği belirlenmiştir. Mezenkimal kök hücrelerin (MKH) anti-enflamatuar etkisinden dolayı klinik tedaviler için umut verici bir adaydır. IBV ile enfekte bronkoalveoler karsinom hücre hattı (CRL-5807) kültürlenmiş ve THP-1 hücrelerinin makrofaja farklılaşması sağlanmış, akciğer enfeksiyonu direkt ko-kültür modeli oluşturulmuştur. IBV enfeksiyonunda süpernatantlardan virüs titresi Doku Kültürü Enfektif Dozu %50 (DKID₅₀) yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. Dental pulpa mezenkimal kök hücrelerinin anti-enflamatuar aktivitesi, üçlü ko-kültür akciğer enfeksiyonu ve *C. creticus* ekstraktı-dental pulpa MKH kombinasyonu uygulanmış gruplardan toplanan süpernatantlardaki IL-1 β , TNF- α ve IL-6 sitokin seviyeleri ELISA yöntemi ile ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlarda, dental pulpa MKH bulunan gruplarda pro-enflamatuar IL-1 β 'nin azaldığı ($P \leq 0.01$), IL-6 ve TNF- α sitokin seviyelerinin arttığı bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Cistus creticus*, Mezenkimal Kök Hücreler, İmmünomodülasyon, üçlü ko-kültür, SARS-CoV-2 enfeksiyon modeli, sitokin fırtınası



ABSTRACT**INVESTIGATION OF POTENTIAL ANTIVIRAL EFFECT OF *Cistus creticus* EXTRACT ON BRONCHOALVEOLAR CARCINOMA CELLS INFECTED WITH CHICKEN CORONA VIRUS (IBV)**

ÜNALP, Fulya

Master of Science Thesis, Bioengineering Department

Supervisor: Prof. Dr. Ayşe NALBANTSOY

July 2021, 73 pages

Chicken coronavirus is responsible for infectious bronchitis virus (IBV) in chickens, a highly contagious acute viral respiratory disease. SARS-CoV-2 comes from the same family as the IBV and has many common characteristics. Therefore, antiviral effect studies with safer and accessible zoonotic IBV human lung infection model have critique potential for SARS-CoV-2 infection and cytokine storm modeling. In this study, the antiviral activity potential of *Cistus creticus* extract, commonly known as rock rose investigated. Recent mesenchymal stem cell (MSC) studies claimed MSC's are promising candidates for clinical treatment of inflammatory reactions as an immunological regulator during acute viral infection. Lung tissue infection model created by IBV infected alveolar bronchoalveolar carcinoma and epithelial cell line (CRL-5807) and THP-1 monocyte cells differentiated into M0 macrophages. Antiviral activity of *C. creticus* extract added triple co-culture supernatant virus titers calculated by using Tissue Culture Infectious Dose 50% (TCID₅₀) method. Results of TCID₅₀ showed promising antiviral potential against IBV infection. Also anti-inflammatory and antiviral activity of dental pulp MSCs and *C. creticus* extract combinations (concentrations of 10 µg/ml, 1 µg/ml ve 0,1 µg/ml) determined by the production of pro-inflammatory cytokine IL-1β levels. ELISA results of supernatants collected from triple co-culture dental pulp MSCs added groups and *C. creticus* extract-dental pulp MSC combination added groups showed lower IL-1β cytokine levels ($P \leq 0.01$) when IL-6 and TNF-α cytokine levels increased.

Keywords: *Cistus creticus*, Mesenchymal Stem Cells, Immunomodulation, tri-culture, SARS-CoV-2 infection model, cytokine storm.



ÖNSÖZ

Günümüzde dünya genelinde SARS-CoV-2 virüsünün neden olduğu COVID-19 hastalığına karşı tedavi ve ilaç geliştirme çalışmaları hızla sürmektedir. Bu tedavi yöntemleri arasında mezenkimal kök hücrelerin büyük ölçekte üretimi ve hastalara verilmesine dayanan klinik çalışmalar mevcuttur. Aynı zamanda pandemi sürecinde, antiviral etken maddelerine ve antiviral doğal ürünlere dünya çapında büyük bir ihtiyaç bulunmaktadır.

Tez çalışmamda, yukarıda bahsettiğim tedavi ve antiviral tedavi araştırmalarına katkıda bulunmayı hedeflenmiştir. Halk arasında laden gülü olarak bilinen *C. creticus* bitkisinin antiviral aktivitesi ile laboratuvarımızda bulunan diş pulpası mezenkimal kök hücrelerinin viral enfeksiyon sırasında ortaya çıkan sitokin fırtınasını önlemede ve durdurmadaki potansiyel immünomodülatör aktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır.



İÇİNDEKİLERSayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
İÇİNDEKİLER	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
TABLolar DİZİNİ	xix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxi
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR	2
2.1 Koronavirüsler	2
2.1.1 SARS-CoV-2 yapısı ve patogenezi	3
2.1.2 Enfeksiyöz bronşitis virüsü	6
2.2 İnflamasyon ve Sitokin Fırtınası	10
2.3 Monositler ve Makrofajlar	11
2.4 Alveolar Makrofajlar	12
2.5 Mezenkimal Kök Hücre	13

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.5.1 Mezenkimal kök hücrelerin SARS-CoV-2 enfeksiyonunda immünomodülatör özellikleri.....	14
2.5.2 Dental pulpa kök hücreleri.....	17
2.5.3 <i>C. Creticus</i> (Laden Güllü).....	17
3. MATERYAL VE METOT.....	19
3.1 Materyal.....	19
3.1.1 Virüs.....	19
3.1.2 Hücre kültüründe kullanılan materyaller	19
3.1.3 <i>C. creticus</i> ekstraktı	19
3.2 Metot.....	20
3.2.1 Embriyolu yumurta sisteminde virüsün çoğaltılması	20
3.2.2 Hücre kültürü	20
3.2.3 <i>Cistus creticus</i> ekstraktının CRL-5807 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi ve IC50 değerinin hesaplanması.....	21
3.2.4 Akciğer hücrelerinde enfektif IBV titresinin belirlenmesi (DKID50: Yüzde elli doku kültürü enfektif dozu)	22
3.2.5 THP-1 Hücrelerinin makrofaja farklılaştırılması.....	23
3.2.6 IBV ile enfekte edilmiş akciğer hücreleri, makrofaj hücreleri ve diş pulpası mezenkimal kök hücreleri ile üçlü ko-kültür modelinin hazırlanması	23

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.2.7 IBV ile enfekte edilmiş akciğer hücrelerinde <i>C. creticus</i> ekstraktının potansiyel antiviral etkisinin DKID ₅₀ değerinin belirlenmesi	24
3.2.8 Hemaglutinasyon (HA) testi ile süpernatantlarındaki virüs titresinin belirlenmesi	24
3.2.9 MTT ile üçlü ko-kültür modelindeki hücrelerin canlılığının belirlenmesi.	25
3.2.10 ELISA ile üçlü ko-kültür süpernatantlarındaki sitokin miktarlarının belirlenmesi	25
3.2.11 Akış sitometri ile THP-1 hücrelerinin M0 makrofajlara farklılaşma analizi..	26
3.2.12 Verilerin istatistiksel analizi	27
4. BULGULAR.....	27
4.1.1 <i>C. creticus</i> ekstraktının akciğer hücresi ve THP-1 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi ve IC ₅₀ değeri	27
4.1.2 Akciğer ve hücrelerinde enfektif IBV titresinin belirlenmesi (DKID ₅₀ : Yüzde elli doku kültürü enfektif dozu).....	29
4.1.3 IBV ile enfekte edilmiş akciğer hücreleri, makrofaj hücreleri ve dış pulpası mezenkimal kök hücreleri ile üçlü ko-kültür modeli.....	31
4.1.4 HA hesti ile süpernatantlarındaki virüs titresinin belirlenmesi	35
4.1.5 Üçlü ko-kültür modelinde <i>C. creticus</i> ekstraktının antiviral etkisinin DKID ₅₀ değerlerinin hesaplanması sitopatik etki oluşumunun gözlemlenmesi.....	36

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

4.1.6 Üçlü ko-kültür modelinde IL-1 β ve TNF- α 'nın tespiti ve DPMKH'lerin immünomodülatör aktivitesinin belirlenmesi	39
4.1.7 Akış sitometri ile THP-1 hücrelerinin M0 makrofajlara farklılaşma analizi..	44
5. TARTIŞMA.....	47
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	51
KAYNAKLAR DİZİNİ	52
TEŞEKKÜR.....	71
ÖZGEÇMİŞ	72

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil

Sayfa

Şekil 2.1. SARS-CoV-2 yapısının şematik gösterimi (Çizimlerde Biorender programı kullanılmıştır).....	4
Şekil 2.2. SARS-CoV-2 hücre içerisine girişi ve viral enfeksiyon oluşumu (Çizimlerde Biorender programı kullanılmıştır).....	5
Şekil 2.3. IBV virionu yapısı (Çizimlerde Biorender programı kullanılmıştır).	7
Şekil 2.4. IBV hücre içerisine girişi ve viral enfeksiyon oluşumu (Çizimlerde Biorender programı kullanılmıştır).....	8
Şekil 2.5. Farklı hücre tiplerinden salgılanan sitokinler (Çizimlerde Biorender programı kullanılmıştır).....	11
Şekil 2.6. SARS-CoV-2 enfeksiyonu sırasında akciğerlerde bulunan alveolar Tip 2 hücreler ve alveoler makrofajlar (Çizimlerde Biorender programı kullanılmıştır).	13
Şekil 2.7. MKH'lerin bağışıklık hücreleri üzerindeki immünomodülatör etkileri (Çizimlerde Biorender programı kullanılmıştır).....	15
Şekil 3.1. DKID ₅₀ değeri hesaplanırken 96 gözlü pleyt.....	22
Şekil 4.1. <i>C. creticus</i> bitki ekstraktının CRL-5807 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi tespit edilmemiştir.....	28
Şekil 4.2 <i>C. creticus</i> bitki ekstraktının THP-1 hücre hattı üzerine etkisi.	29
Şekil 4.3. DKID ₅₀ hesaplanması için, boyama işleminin ardından pleytin görüntüsü.	30

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

Şekil 4.4. Üçlü ko-kültür akciğer enfeksiyonu modelinin kuruluş şeması (Çizimlerde Biorender programı kullanılmıştır).	32
Şekil 4.5. Deney gruplarının açıklamaları ve IL-1 β sitokin seviyeleri.	41
Şekil 4.6. Deney gruplarının açıklamaları ve TNF- α sitokin seviyeleri.	42
Şekil 4.7. Deney gruplarının açıklamaları ve IL-6 sitokin seviyeleri.	44
Şekil 4.8. THP-1 hücreleri ve farklılaştırılmış THP-1 M0 hücrelerinin CD80 antikor ekspresyonu tespiti için gerçekleştirilmiş akış sitometri analizleri.	44
Şekil 4.9. THP-1 hücreleri ve farklılaştırılmış THP-1 M0 hücrelerinin CD11b antikor ekspresyonu tespiti için gerçekleştirilmiş akış sitometri analizleri.	45
Şekil 4.10. THP-1 hücreleri ve farklılaştırılmış THP-1 M0 hücrelerinin CD163 antikor ekspresyonu tespiti için gerçekleştirilmiş akış sitometri analizleri.	45
Şekil 4.11. THP-1 ve THP-1 M0 hücrelerinin CD80, CD11b, CD163 markörleri ile işaretlenmiş akış sitometri analizi.	46

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 3.1. Deneylerde oluşturulmuş gruplar.	24
Tablo 4.1. Fiksasyon ve boyama işlemlerinden önce pleyt şablonu.	30
Tablo 4.2. CRL-5807 kontrol ve IBV D274 ile enfekte edilmiş CRL-5807 hücreleri fotoğrafları, 10x büyütme.	31
Tablo 4.3. Deney gruplarının (kontrol ve üçlü ko-kültür olarak) kuyucukları, 10X büyütme ve ölçek çubuğu 100 µm.....	33
Tablo 4.4. Deney gruplarının (kontrol ve üçlü ko-kültür olarak) kuyucuklarının fotoğrafları 20X ve 40X büyütmede.....	34
Tablo 4.5. Deney grubu numaraları, açıklamaları.	35
Tablo 4.6. V tabanlı pleytlerde HA testi görüntüleri.	36
Tablo 4.7. Deney gruplarının hesaplanmış DKID ₅₀ değerleri.	37
Tablo 4.8. Deney gruplarının süpernatantları ile yapılan DKID ₅₀ testinde pleytlerin 72. saatte 10X büyütmede çekilmiş fotoğrafları.....	38
Tablo 4.9. DKID ₅₀ pleytlerinin boyandıktan sonraki görüntüleri.....	39
Tablo 4.10. IL-1β sitokin seviyeleri verilmiştir.....	40
Tablo 4.11. TNF-α sitokin seviyeleri.....	42
Tablo 4.12. IL-6 sitokin seviyeleri.	43



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler Açıklama

ml	Mililitre
nm	Nanometre
α	Alfa
β	Beta
γ	Gamma
μg	Mikrogram
pg	Pikogram
μl	Mikrolitre
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat

Kısaltmalar

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ACE2	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim 2
ARDS	Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu
ATCC	American Type Culture Collection
BSL-2	Biyogüvenlik Seviye 2
DAPI	Diamidino-2-Fenilindol dihidroklorür
DKID ₅₀	Yüzde Elli Doku Kültürü Enfektif Dozu
DMEM/F12	Dulbecco Modified Eagle Medium F-12
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DPMKH	Dental Pulpa Kök Hücreleri

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Kısaltmalar

EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ER	Endoplazmik Retikulum
FBS	Fetal Sığır serumu
FTS	Fizyolojik Tuzlu Su
HA	Hemaglutinasyon
HIV	İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
HRP	Horseraddish Peroxidase
HS	Heparan Sülfat
IB	Enfeksiyöz Bronşit Hastalığı
IBV	Enfeksiyöz Bronşit Virüsü
IDO	İnhibisyonu İndolamin-pirol 2,3-dioksijenaz
IFN	İnterferon
IL	İnterlökin
KGF	Keratinocyte growth factor
VEGF	Vascular endothelial growth factor
HGF	Hepatocyte growth factor
MEM	Modified Eagle Medium
MKH	Mezenkimal Kök Hücre

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)Kısaltmalar

MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
NK	Doğal Öldürücü Hücre
PBS	Fosfat tampon tuz çözeltisi
PEG2	Prostaglandin E2
RNA	Ribonükleik Asid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SPE	Sitopatik Etki
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TMPRSS2	Transmembrane protease, serine 2
TNF	Tümör Nekroz Faktörü



1. GİRİŞ

2019 yılının sonunda, şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2 (SARS-CoV-2) olarak adlandırılmış virüsün neden olduğu Koronavirüs 2 hastalığına (COVID-19) sebep olan SARS-CoV-2 virüsü ortaya çıkarak, yüksek bulaşıcılığı nedeniyle, dünya çapında hızla yayılmıştır, birkaç ay içinde ise bir pandemik hastalık haline gelmiştir (Wu et al., 2020). Bu hastalığın yeniliğinden dolayı, konakçı canlılarda gerçekleşen SARS-CoV-2 enfeksiyon sürecini anlamada eksiklik vardır. IBV, tek iplikçikli bir RNA genomu içeren koronavirüstür ve günümüzde COVID-19 pandemisinden sorumlu olan SARS-CoV-2 virüsü ile aynı virüs ailesinden gelmektedir. Bu nedenle tez kapsamında IBV ile yürütülecek çalışmalar patojenitesi yüksek SARS-CoV-2 virüsüne karşı yapılacak çalışmalara model sistemler olma potansiyeline sahiptir (Cook et al., 2012).

Tavuk korona virüsü olarak bilinen (IBV), tavuklarda oldukça bulaşıcı, akut viral solunum yolu hastalığı olan enfeksiyöz bronşit hastalığından sorumludur. IBV vakaları günümüzde dünyanın her yerinden birçok araştırmacı tarafından rapor edilmektedir (Wu et al., 2020; Sjaak De Wit et al., 2019). Tavuk korona virüsü, kümes hayvanı endüstrisinde yüksek ölüm oranı, düşük yumurta kalitesi ve verimsiz et üretiminden dolayı ciddi kayıplara yol açmıştır. Aşılar farklı IBV serotipleri arasında zayıf koruma sağladığından dolayı IBV enfeksiyonunu önlemek ve kontrol etmek zordur. Bu nedenle, etkili bir antiviral tedavinin geliştirilmesi, IBV enfeksiyonunun tedavisi için önemli bir strateji oluşturmaktadır (Habibi et al., 2017). SARS-CoV-2 virüsü ile bu tez çalışmasında kullanılacak IB virüsü ile aynı aileden gelmekte ve birçok ortak karakteristik özellik taşımaktadır. Bu nedenle zoonoz IB virüsü ile yapılacak antiviral ajan çalışmaları SARS-CoV-2 virüsü için bir modelleme niteliğindedir (Bru et al., 2017).

2. LİTERATÜR

2.1 Koronavirüsler

Koronavirüsler zarflı, pozitif yönde tek iplikçikli RNA virüslerinden oluşan bir ailedir. Çiftlik hayvanları ve evcil hayvanlar da dahil olmak üzere insanları, diğer memelileri ve kuş türlerini enfekte ederler ve bu nedenle yalnızca halk sağlığı için değil, aynı zamanda veterinerler ve kümes hayvanları yetiştiricileri için de ekonomik açıdan sorun oluşturmaktadırlar. Coronaviridae ailesi Orthocoronavirinae virüs ailesi içinde belirtilmektedir ve alfakoronavirüs, betakoronavirüs, gammakoronavirüs ve deltakoronavirüs olarak dört farklı grupta incelenmektedirler (Viruses, 2020). Alfakoronavirüsler ve betakoronavirüsler yalnızca memeli türlerini enfekte ederken, gammakoronavirüsler ve deltakoronavirüsler kanatlı türlerini de içeren geniş bir konakçı canlı kitlesine sahiptir (V'kovski et al., 2021).

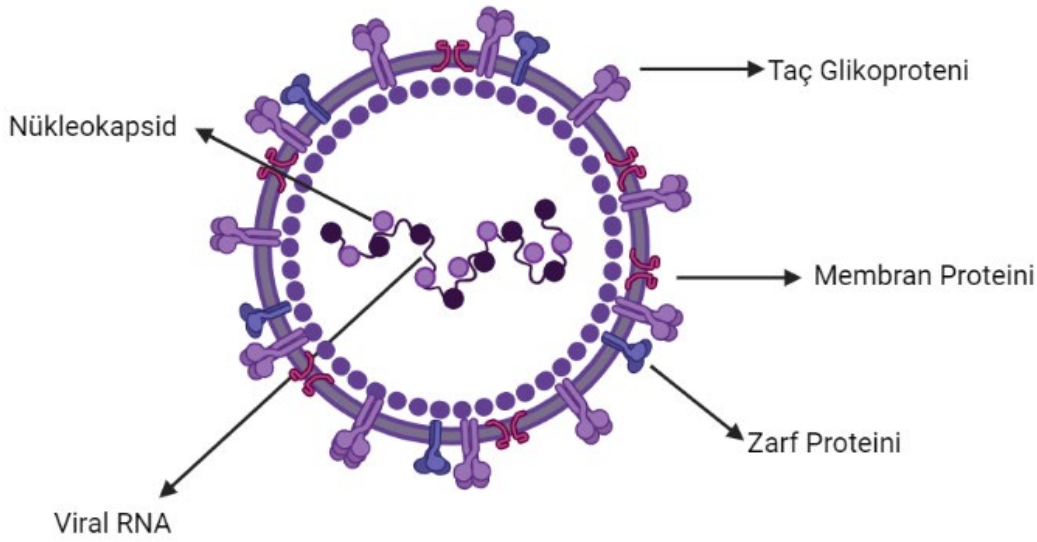
Geçtiğimiz 20 yılda insan popülasyonunda ortaya çıkan şiddetli akut solunum sendromu koronavirüsü (SARS-CoV), Orta Doğu solunum sendromu koronavirüsü (MERS-CoV) ve SARS-CoV-2 oldukça patojeniktir (Tao & Tong, 2019). SARS-CoV, MERS-CoV ve SARS-CoV-2 enfeksiyonları insanlarda bronşiyal epitel hücrelerini, pnömositleri ve üst solunum yolu hücrelerini enfekte ederek ciddi derecede yaşamı tehdit eden solunum yolu patolojilerine neden olmaktadır (Drosten et al., 2003). Bu enfeksiyonlar terapötik tedavisi olmayan akciğer yaralanmalarına dönüşebilir, günümüzde de görülen SARS-CoV-2 solunum yolu patolojileri bunu kanıtlar niteliktedir (Zaki et al., 2012).

İnsanlarda koronavirüs enfeksiyonlarının ilk adımı, koronavirüs spike (S) proteininin, aminopeptidaz anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2) içeren hücresel giriş reseptörüne spesifik olarak bağlanması ile gerçekleşir. Giriş reseptörlerinin ekspresyonu ve farklı dokulardaki dağılımı viral tropizmi ve patojeniteyi etkilemektedir (Letko et al., 2020).

2.1.1 SARS-CoV-2 yapısı ve patogenezi

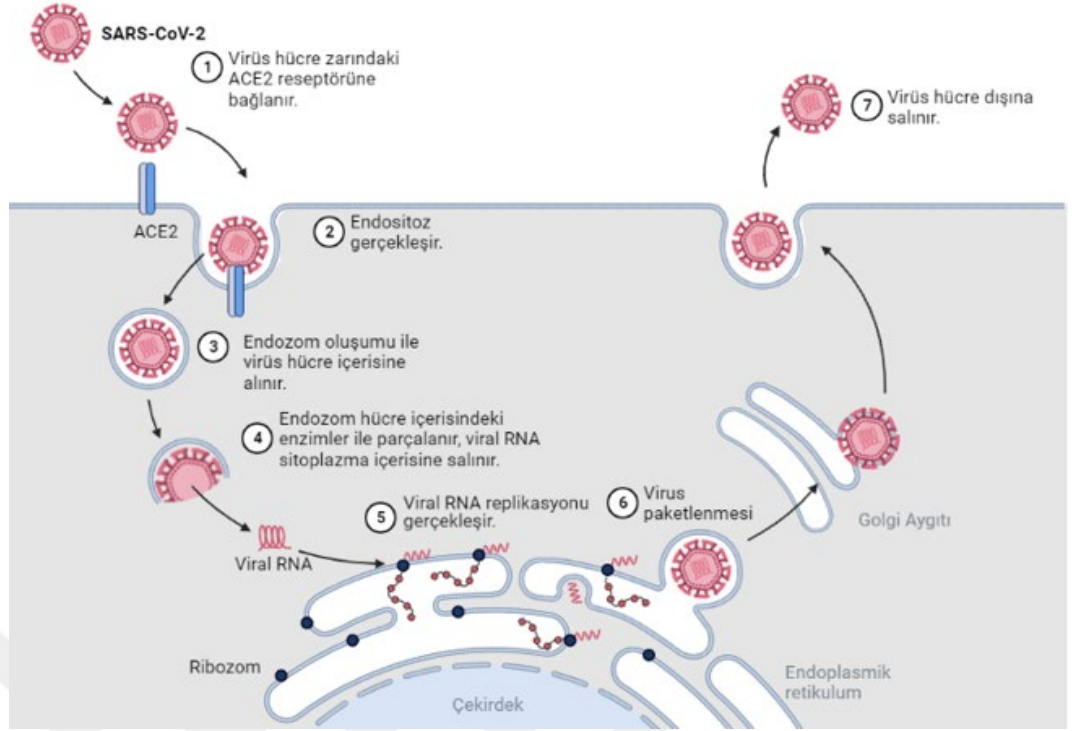
SARS-CoV-2 olarak adlandırılmış virüsün neden olduğu Koronavirüs COVID-19, dünya geneline yayılmış ve pandemi olarak ilan edilmiştir (Cevik et al., 2020). Dünya çapında uygulanan salgın yönetimi, aşılama ve karantina önlemlerine rağmen, COVID-19 insidansları yeni dolaşıma giren varyantlar ile günümüzde de artmaya devam etmektedir. COVID-19'dan etkilenen hastaların klinik semptomları, hafif üst solunum yolu semptomlarından şiddetli pnömoni ve hatta akut solunum sıkıntısı sendromuna (ARDS) veya ölüme kadar değişen heterojendir (Cevik et al., 2020). SARS-CoV-2 enfeksiyonuna bağlı sistemik immün aşırı aktivasyonu, özellikle COVID-19'lu ağır hastalarda sitokin fırtınasına neden olur (Song et al., 2020). Mevcut çalışmalardan elde edilen kanıtlar, sitokin fırtınasının hastalığın ilerlemesinde önemli bir faktör olabileceğini, hatta çoklu organ yetmezliğine ve ölüme yol açabileceğini göstermiştir (Cevik et al., 2020; Peiris et al., 2003).

SARS-CoV-2, SARS-CoV ve MERS-CoV'a neden olan koronavirüslerle yakından ilişkili zoonotik bir insan koronavirüsüdür (Rabaan et al., 2020). Koronavirüsler, insan RNA virüsleri arasında en büyük genoma sahip ve muhtemelen eski bir kökene sahip, bir koronaya benzeyen başak proteini yapıları nedeniyle bu şekilde adlandırılan, pozitif anlamda, tek iplikçikli bir RNA virüsü grubudur (Deshmukh et al., 2020). SARS-CoV-2, betakoronavirüs cinsine aittir ve SARS-CoV'a benzer bir genetik sekansa ve viral zarfa sahiptir. Viral zarf IBV'de olduğu gibi spike (S) glikoproteini ile kaplıdır, zarf (E) ve zar (M) proteinleri dahil olmak üzere dört ana yapısal protein içeren zarflı, pozitif anlamda bir RNA virüsüdür (Florindo et al., 2020), Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. SARS-CoV-2 yapısının şematik gösterimi (Çizimlerde Biorender programı kullanılmıştır).

Virüsün konakçı hücreye bağlanma ve girişine S proteini aracılık eder. Enfeksiyondaki ilk adım, hedef reseptör aracılığıyla konakçı hücreye virüsün bağlanmasıdır. S proteininin S1 alt birimi, insanlardaki ACE 2 reseptörüne bağlamayı sağlayan grubu içerir (M.-Y. Wang et al., 2020). SARS-CoV-2'de S2 alt birimi yüksek oranda mutasyona kapalıdır ve potansiyel bir antiviral hedef olarak kabul edilir. Viral spike proteini, ACE2'ye bağlanır, TMPRSS2 aracılı giriş veya endozom salınımı ile viral RNA, kısmi ve tam genom kopyaları olarak çoğaltılır. Yeni SARS-CoV-2 virionlarının oluşturması için endoplazmik retikulumda (ER) translasyon gerçekleşir. Başak proteininin furin tarafından işlenir ve hücre dışı ortama yeni virüsler salınır. Virüs yapısı ve replikasyon döngüsü Şekil 2.2'de açıklanmıştır.



Şekil 2.2. SARS-CoV-2 hücre içerisine girişi ve viral enfeksiyon oluşumu (Çizimlerde Biorender programı kullanılmıştır).

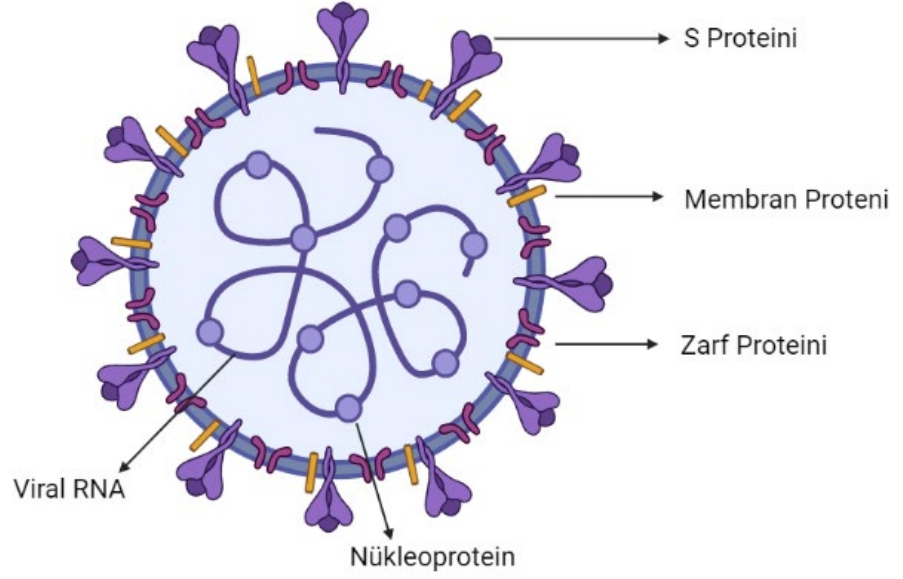
Epitelyal kök hücrelerin (Alveolar epitel hücreler, Alveolar tip 2 hücreler, Basal alveolar kök hücreler) ACE2 ve diğer SARS-CoV-2 giriş faktörlerini ifade ettiği ve bu hücrelerin SARS-CoV-2 enfeksiyonunun olası hedefleri olduğu tespit edilmiştir. Literatürdeki çalışmalardan elde edilen sekans sonuçlarında, hücre farklılaşmasında ACE2 proteininin ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir (M.-Y. Li et al., 2020; Sungnak et al., 2020).

Virüsün hücre içersine girişini takiben ilk inflamatuvar yanıt, T hücrelerini enfeksiyon bölgesine çeker ve burada virüs yayılmadan önce enfekte olmuş hücreler elimine edilir (Blanco-Melo et al., 2020). Hastalığı şiddetli geçiren hastalarda, SARS-CoV- 2, anormal bir konakçı bağışıklık tepkisi ortaya çıkarır. Örneğin, COVID-19'dan ölen hastaların akciğer dokularının ölüm sonrası histolojisi, alveolar hasar, hiyalin membran oluşumu, interstisyel mononükleer inflamatuvar özellikler gösterir ve meydana gelen hasarın inflamatuvar yanıtta kaynaklandığı günümüzde doğrulanmıştır (P. P. Liu et al., 2020). COVID-19'un ayırt edici bir diğer özelliği ise, genç erişkin hastalarda bile solunum yollarında fibröz eksüdatların oluşumudur (Song et al., 2020).

Meydana gelen akciğer dokusu hasarının akciğerlerde biriken pro-inflamatuvar sitokinlerin aşırı üretiminden kaynaklandığı ve bunun sonucunda akciğer parankimine zarar verdiği tespit edilmiştir (Cevik et al., 2020). Akut akciğer hasarı, akciğer dokusunda sitokin fırtınasının yaygın bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (J. Liu et al., 2020). Alveolar kavitede çok çekirdekli dev hücreler ve pulmoner mezenşimde lenfositlerin inflamatuvar infiltrasyonu gösterilmiştir (Xu et al., 2020). Patolojik sonuçlar, periferik kandaki CD4+ T ve CD8+ T hücrelerinin sayısının azaldığını ancak bu hücrelerin aşırı aktif olduğunu doğrulamıştır. Artışı kanıtlanan CCR4+/CCR6+Th17 hücreleri yüksek proinflamatuvar etkilere sahip olabilir ve CD8+ T hücreleri, hastalarda ciddi immün hasara neden olan, başta perforin ve granzim olmak üzere yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik salgılar içerir (Zhu et al., 2020).

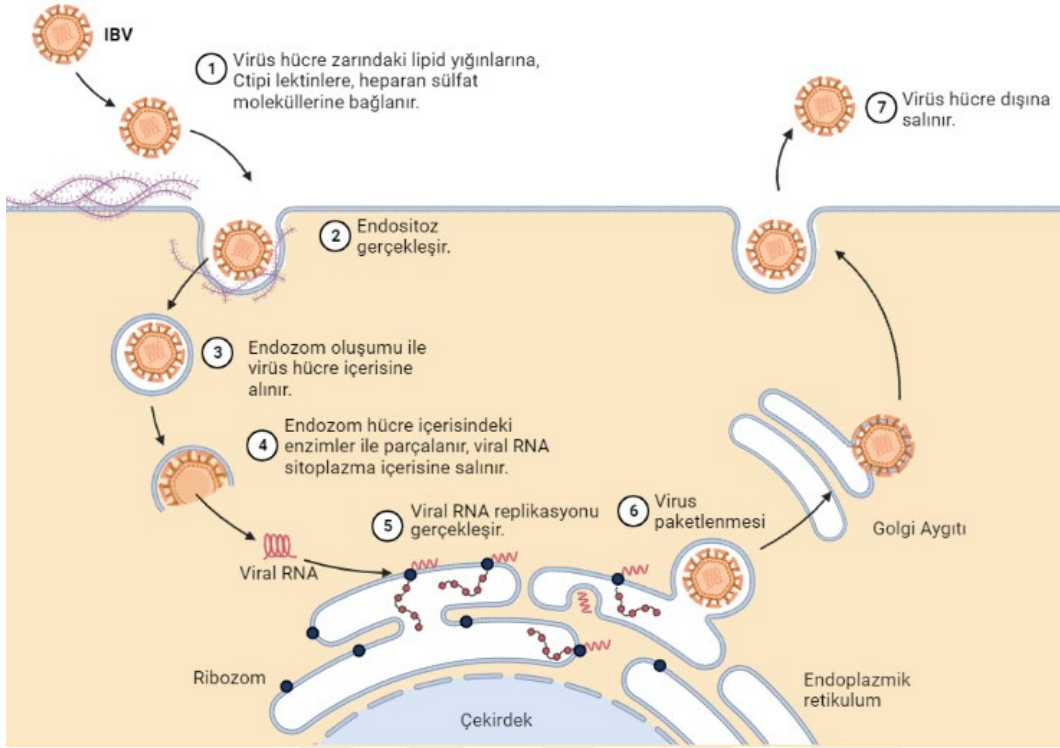
2.1.2 Enfeksiyöz bronşitis virüsü

Enfeksiyöz bronşitis virüsü (IBV), tek iplikçikli RNA molekülünü genetik materyal olarak taşımaktadır (Abdel-Moneim, 2017). Virüs, genellikle 100 ila 160 nm çapında ve virüs yüzeyinde uzun, başak şekilli uçları bulunan yuvarlak bir protein yapısı gözlemlenmektedir (González et al., 2003). Koronavirüs kaynaklıdır ve tüm koronavirüsler gibi spike (S) glikoprotein, membran (M) ve nükleokapsid (N) proteinleri bulunur (Cook et al., 2012) (Şekil 2.1). Bir Gammacoronavirus olan IBV, evcil kümes hayvanlarını enfekte ederek, kanatlılarda düşük kiloya ve düşük yumurta üretimine neden olur ve bu nedenle dünya çapında kümes hayvanı endüstrisi için ekonomik öneme sahiptir (Matthijs et al., 2003), oldukça bulaşıcı bir solunum yolu hastalığı olan enfeksiyöz bronşitis hastalığına (IB) neden olmaktadır (Bande et al., 2015). IBV virionunun yapısında tek iplikçikli, pozitif anlamlı lineer bir RNA genomu bulunur. Pozitif iplikçikli RNA genomlu hayvan virüsleri için sıklıkla görülmeyen sarmal nükleokapsid (N), uzun petal şekilli sivri glikoprotein (S) içeren bir lipoprotein zarfı ile çevrilidir; lipid çift tabakasını üç kez kaplayan bir integral membran glikoproteini (M) ve viral zarf proteinlerinden çok daha az miktarda da zarf veya küçük zar (E) proteini bulunur (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. IBV virionu yapısı (Çizimlerde Biorender programı kullanılmıştır).

IBV'nin hücrelere girişi, virion yüzeyindeki glikoprotein, S1 ve S2 alt birimlerinden oluşan S proteini tarafından sağlanmaktadır (Stevenson-Leggett et al., 2020). Hücrelere tutunmada büyük önemi olan başak proteini iki yapıda (S1 ve S2) olarak görülmektedir (Cavanagh 2007). IBV'nin hücrelere girişini sağlayan protein reseptörü henüz belirlenememiştir (Han et al., 2007), ancak IBV'nin M41 ve Beaudette, suşları için bağlanma faktörü olarak sialik asidin kullandığı literatürdeki çalışmalarda gösterilmiştir (Wickramasinghe et al., 2011; Winter et al., 2008). Bunun yanında C-tipi lektinlerin IBV'nin hücre içerisine girişini desteklediği gösterilmiştir (Zhang et al., 2012). IBV Beaudette suşu için heparan sülfat (HS) molekülleri bağlanma bölgesi olarak tanımlanmıştır (Yoshiyuki and Liu, 2009) ve HS moleküllerinin, virüsün konakçı hücrelere girişinde bir kofaktör olarak rol oynayabileceğini göstermiştir (Stevenson-Leggett et al., 2020).



Şekil 2.4. IBV hücre içerisine girişi ve viral enfeksiyon oluşumu (Çizimlerde Biorender programı kullanılmıştır).

Laboratuvarda, çoğu IBV suşu, *ex vivo* organ kültürlerinde veya *in ovo*'da replikasyonla çoğaltılabilmektedir ve hücre kültüründe replikasyonu sınırlıdır, bu da temel viroloji çalışmalarını zorlaştırır (Valastro et al., 2016). Memeli hücre kültüründe IBV ve hücreler arasındaki etkileşimlerin anlaşılması için yapılan çalışmalarda, IBV'nin Beaudette ve Holte suşlarının hücrelere adaptasyondan sonra Vero ve BHK-21 hücre hatlarında çoğaldığı gösterilmiştir (Fang et al., 2005). IBV suşlarının, insan rahim ağzı kanseri hücre hattı olan, HeLa hücrelerinde çoğaltılabildiği gösterilmiştir (H. Y. Chen et al., 2007). Literatürdeki çalışmalarda ise insan hücrelerinde yüksek miktarda hücreSEL furin üretiminin, IBV enfeksiyonu ve virüs propagasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. IBV başak proteininin furin tarafından bölünmesi, IBV enfeksiyonuna katkıda bulunabilmektedir (Tay et al., 2012).

IBV, Orthocoronavirinae ailesinin bir üyesidir, Alphacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus ve Deltacoronavirus olarak adlandırılan dört cinsi vardır ve hepsi hem insanlarda hem de hayvanlarda hastalıklara neden olarak

konakçıları enfekte ettiği bilinmektedir (Lai & Cavanagh, 1997; Rota et al., 2003). Bu ailenin en bilinen üyeleri Betakoronavirüsler şiddetli akut solunum sendromu koronavirüsü (SARS-CoV), Orta Doğu solunum sendromu koronavirüsü (MERS-CoV) ve 2019 yılının sonunda ortaya çıkan SARS-CoV-2'dir (Zaki et al., 2012; Zhu et al., 2020). IBV, çeşitli doku ve organ kaynaklı çok sayıda insan ve hayvan hücresini verimli bir şekilde enfekte edebilmekte ve koronavirüs patogenezinin *in vitro* ortamda incelenmesi için yararlı bir model sistem sağlamaktadır (Örd et al., 2020).

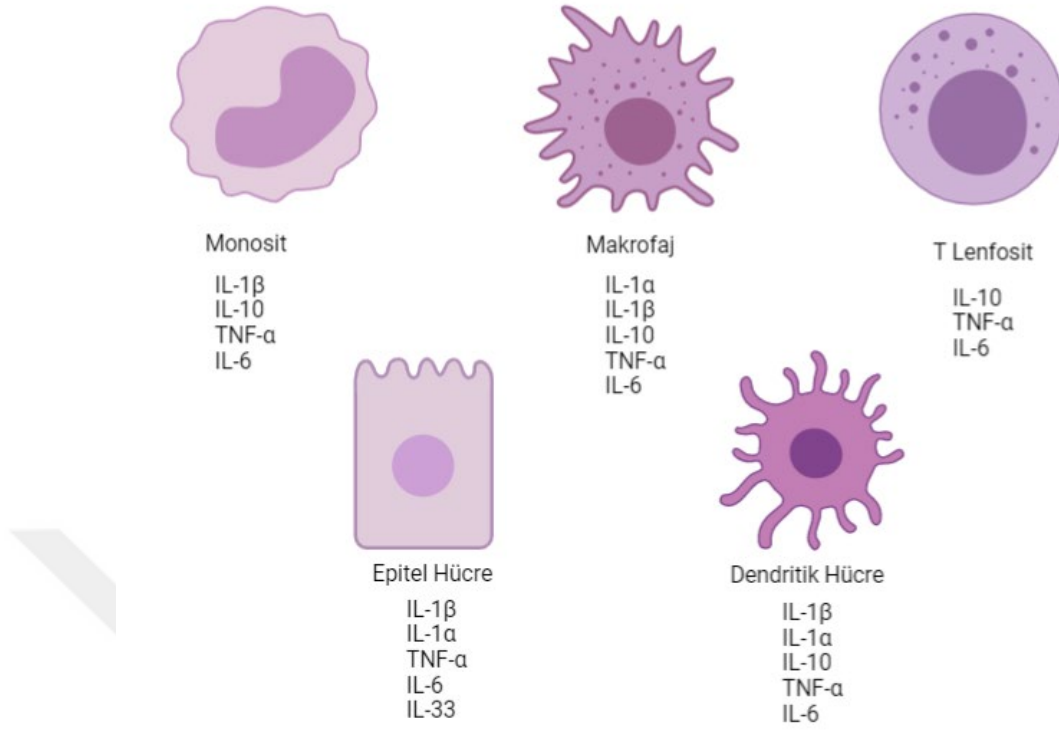
Literatürdeki bir çalışmada, IBV'ye duyarlı ve IBV'ye dirençli tavuk cinsleri karşılaştırılmış, IBV ile enfeksiyondan sonra gruplarda erken bağışıklık tepkisi gözlemlenmiştir. Enfeksiyondan önce, doğuştan gelen bağışıklık tepkisi ile ilgili spesifik genlerin bulunduğu tavuk cinslerinde diğer gruplara kıyasla ilgili genlerin farklı seviyelerde eksprese edildiği bulunmuştur. Bu farklılıklara rağmen, her iki tavuk cinsinin trakeal örneklerindeki viral yükler birbirine yakın olarak hesaplanmıştır. Bu bilgiler ışığında IBV'ye verilen immün cevabın konakçı canlının virüse karşı nasıl tepki verdiği ile ilişkili olabileceği kanıtlanmaktadır (Beach & Schalm, 1936).

Doğal immün yanıt, enfeksiyonlara karşı konakçı canlı savunmasının ilk savunma hattıdır. Bir RNA virüsü ile enfeksiyon sırasında, doğuştan gelen bağışıklık tepkilerinin aktivasyonu, endozomla ilişkili TLR3 ve TLR7 etkileşimine bağlıdır. TLR3 ve TLR7 sırasıyla çift iplikçikli RNA veya tek iplikçikli RNA ile etkileşime girer ve TLR3 ve TLR7 için uygun aktivasyon yollarının başlatılması ile proinflamatuvar sitokinlerin (IL1 β ve IL6) üretimini sağlar. Pro-inflamatuvar sitokinlerin IBV patojenitesi üzerindeki rolü araştırılmış, IBV'nin M41 suşu ile enfekte kanatlıların trakeal mukozasında TGF- β ekspresyonu enfeksiyondan 24 saat sonra pik yaptığı, ardından IL6, IL-1 β ve IFN- γ salgılanmasının arttığı bulunmuştur. Artan proinflamatuvar sitokin seviyeleri, enfeksiyondan sonra 3. günde en yüksek seviyeye ulaşmıştır ve bu yükselme viral yük artışı ile ilişkilendirilmiştir.

2.2 İnflamasyon ve Sitokin Fırtınası

Sitokin fırtınası, çeşitli doku ve hücrelerden (esas olarak bağışıklık hücrelerinden) birçok biyolojik aktiviteye sahip inflamatuvar sitokinlerin aşırı üretimi sonucunda gerçekleşir. Viral enfeksiyon gerçekleştiğinde, alveolar epitel hücreleri, makrofajlar ve kanda dolaşan monositler, virüs tarafından reseptörler aracılığıyla aktive edilir ve daha fazla bağışıklık hücrelerini çeken yüksek miktarda inflamatuvar sitokin ve kemokin üretir (Xu et al., 2020). Özellikle monositler ve T hücreleri, aşırı sitokin üretimi sonucunda akciğer iltihabına neden olmaktadır. Enfeksiyonun başında sitokinlerin salgılanmasıyla bağışıklık hücreleri enfeksiyona dair geri bildirim sağlar ve iltihaplanma bölgelerine immün sistem hücrelerini yönlendirmeye devam eder, uzun süreli iltihaplanma sitokinlerin aşırı salgılanmasına ve organ hasarının katlanarak büyümesine neden olur (Fara et al., 2021). Sitokin fırtınası, otoimmün sistemin durmaksızın aşırı aktivasyonundan kaynaklanır ve sonucunda enfeksiyon bölgesi immün hücreleri tarafından durmaksızın saldırı altındadır.

İnflamasyon ile ilgili ana sitokinler, interleokinler (IL), interferonlar (IFN), tümör nekroz faktörü (TNF) ve kemokinlerdir (Rabaan et al., 2021). Proinflamatuvar özellik gösteren sitokinler IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α ve IFN- γ , bunun yanında anti-inflamatuvar özellik gösteren sitokinler IL-4, IL-10, IL-13, ve TGF- β olarak belirlenmiştir (Song et al., 2020) (Şekil 2.5). Anti-inflamatuvar sitokinler, proinflamatuvar sitokin yanıtını kontrol eden bir dizi immün düzenleyici moleküldür. Sitokinler, insan bağışıklık tepkisini düzenlemek için spesifik sitokin inhibitörleri ve çözünür sitokin reseptörleri ile uyum içinde hareket eder. Sitokinlerin enflamasyondaki fizyolojik rolleri ve sistemik enflamatuvar durumlardaki patolojik rolleri giderek daha fazla tanınmaktadır. Anti-inflamatuvar sitokinler, IL-1 reseptör antagonisti, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11 ve IL-13'ü içerir. IL-1, TNF- α ve IL-18 için spesifik sitokin reseptörleri ayrıca proinflamatuvar sitokin inhibitörleri olarak işlev görür (Opal & DePalo, 2000).



Şekil 2.5. Farklı hücre tiplerinden salgılanan sitokinler (Çizimlerde Biorender programı kullanılmıştır).

2.3 Monositler ve Makrofajlar

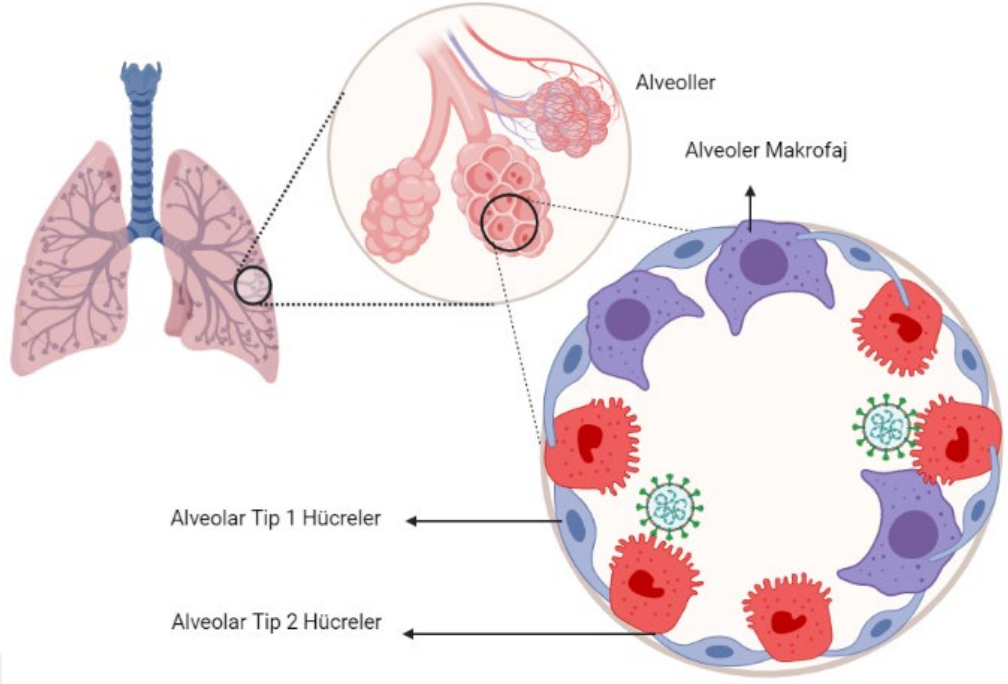
Monositler, yabancı mikroorganizmalara karşı savunmada ön safta yer alır ve enfeksiyon sırasında ilk virüs-hücre temasını sağlarlar (Nikitina et al., 2018). Monositler, yüzeylerinde bir çok reseptöre sahiptir ve virüsler tarafından istila edilmiş hücrelere karşı yüksek fagositik aktiviteye sahiptirler aynı zamanda antijen sunan hücrelerdir (Tauber, 2003). Monositler enfeksiyon sırasında konakçı üzerinde savunucu olarak görev yapmaktadır, ancak bu sırada monositler, farklılaşmaya uğrayarak uzun ömürlü makrofajlara dönüşürler. Enfekte hücrelerin bulunduğu dokuya göçü destekleyerek salgılanan sitokin/kemokin modellerini değiştirirler (Rulli et al., 2009). İnflamatuar süreç genellikle sıkı bir şekilde düzenlenir ve hem inflamasyonu başlatan ve sürdüren sinyalleri hem de süreci sona erdiren sinyalleri içerir. İki sinyal arasındaki bir dengesizlik, inflamasyonu kontrolsüz bırakarak hücre ve doku hasarına neden olur (Fujiwara & Kobayashi, 2005). Makrofajlar, periferik kan monositleri ve doku makrofajları dahil olmak üzere kemik iliği kaynaklı hücrelerden oluşan mononükleer fagosit sisteminin

önemli bir bileşenidir (Tauber, 2003). İnflamasyon sırasında kandaki monositler çeşitli dokulara göç eder ve makrofajlara dönüşür.

İnflamasyonda makrofajların, çeşitli sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin üretimi yoluyla antijen sunumu, fagositoz ve immünomodülasyon olmak üzere üç ana işlevi vardır. Makrofajlar, inflamasyonun başlatılması, sürdürülmesi ve çözülmesinde kritik bir rol oynar. Enflamatuvar süreçte aktive edilirler ve devre dışı bırakılırlar (Gordon et al., 2014). Aktivasyon sinyalleri olarak sitokinler (IFN- γ , granülosit-monosit koloni uyarıcı faktör ve TNF- α), bakteriyel lipopolisakkaritler, hücre dışı matris proteinleri ve diğer kimyasal araçları görev almaktadır (Ivanova & Orekhov, 2016). Aktive edilmiş makrofajlar, anti-inflamatuvar sitokinler ve makrofajlar tarafından üretilen sitokin antagonistleri tarafından inaktive edilir. Makrofajlar, inflamatuvar süreçte otoregülasyon döngüsüne katılır (Gratchev et al., 2001). Makrofajlar, iltihaplanmada hem yararlı hem de zararlı sonuçlara yol açabilen biyolojik olarak aktif moleküller ürettiğinden, makrofajları hedef alan terapötik müdahaleler ve enflamatuvar hastalıkları kontrol etmek için yeni yaklaşımlar geliştirilmektedir (Fujiwara & Kobayashi, 2005).

2.4 Alveolar Makrofajlar

Alveolar makrofaj, alveol-kan ara yüzünün koruyucusu olarak bulunur ve solunum patojenlerine karşı hücresel savunmanın ön hattı olarak hizmet eder. Alveolar makrofajlar, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin birincil fagositleridir. Mukosiliyer taşıma sistemi gibi solunum yollarının mekanik savunmalarından kaçan enfeksiyöz, toksik veya alerjik partiküllerin hava boşluklarını temizler (Sibille & Reynolds, 1990). SARS-CoV-2 enfeksiyonu sırasında akciğerlerde bulunan alveolar Tip 2 hücreler enfekte olur, alveolar makrofajlar enfeksiyonun gerçekleştiği bölgeye göç ederek fagositoz ve sitokin sekresyonuna başlarlar (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. SARS-CoV-2 enfeksiyonu sırasında akciğerlerde bulunan alveolar Tip 2 hücreler ve alveolar makrofajlar (Çizimlerde Biorender programı kullanılmıştır).

Alveolar makrofajlar, oksijen metabolitleri, lizozim, antimikrobiyal peptitler ve proteazlar salgılayarak ve fagositoz ve hücre içi öldürme süreçleri yoluyla normal konakçıda günlük olarak aspire edilen tipik mikroorganizmaları düşük miktarda elimine edebilir (Rubins, 2003). Alveolar makrofajlar ayrıca solunum yolu enfeksiyonuna karşı doğuştan gelen alveolar savunmanın düzenleyicileri olarak işlev görür. Alveolar makrofajlar, çok sayıda enfeksiyöz partikül veya virüs ile karşı karşıya kaldıklarında, geniş bir dizi sitokin (interlökinler-1, -6 ve tümör nekroz faktörü- α dahil), kemokinler (interlökin-8) salgırlar (Schagat et al., 2001). Hücreler arası sinyalleri kullanan alveolar makrofajlar, inflamatuvar yanıtları başlatır ve aktive nötrofilleri alveolar boşluklara toplar.

2.5 Mezenkimal Kök Hücre

MKH'ler kemik iliğinde ve çoğu organın bağ dokusunda farklılaşma kapasitesine sahip hematopoietik olmayan hücrelerdir. Farklılaşma özelliklerine ek olarak, MKH'ler geniş immüno-düzenleyici özelliklere sahiptir (Griffin et al., 2013). Farklılaşma ve immünolojik düzenleyici işlev görebilme potansiyelleri, MKH'leri inflamasyon reaksiyonların klinik tedavisinde kullanılabilecek bir aday haline getirmiştir (Spaggiari & Moretta, 2013). MKH'lerin hem hücre temasına

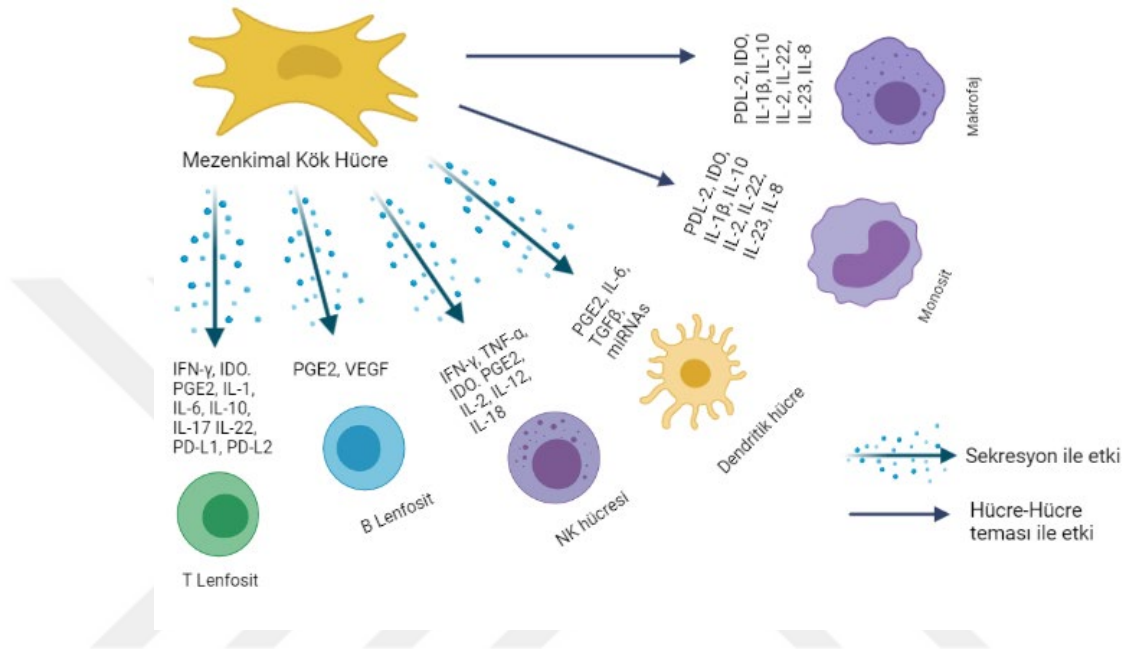
bağlı mekanizmalar hem de çözünür faktörler yoluyla adaptif ve doğuştan gelen immünite üzerinde etkileri olabileceği daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Cipriani et al., 2015).

Adaptif immünitede, MKH'lerin çeşitli immün hücre popülasyonları tarafından inflamatuvar sitokinlerin sekresyonunu azalttığı, anti-enflamatuvar etki gösterdiği bildirilmiştir (Aggarwal & Pittenger, 2005). MKH'ler, *in vitro* olarak T hücre proliferasyonunu güçlü bir şekilde inhibe etmekte ve T hücre bölünmesini durdurmaktadır (Di Nicola et al., 2002; Glennie et al., 2005). Aynı zamanda, MKH'lerin sadece Th1 ile değil, çözünür ve hücreye bağlı faktörler yolu ile Th17 aktivasyonu ve proliferasyonunu da baskıladığı gösterilmiştir (Asari et al., 2009). Bunun yanında, MKH'ler, B hücresi terminal farklılaşmasını ve plazma hücresi immünoglobulin üretimini baskılayarak B hücresi fonksiyonlarını modüle etmektedir (Kim & Hematti, 2009; Rafei et al., 2008). Doğuştan gelen bağışıklıkta ise, MKH'lerin doğal öldürücü hücre (NK) proliferasyonunu, sitotoksitesini ve indolamin 2,3-dioksijenaz ve prostaglandin E2 yoluyla sitokin üretimini inhibe ettiği belirlenmiştir (Spaggiari & Moretta, 2013). MKH'ler, antijen sunan hücrelerin esas olan dendritik hücrelerin oluşumunu ve fonksiyonunu azaltmakta ve T hücresi yanıtını indüklemektedir (Beyth et al., 2005). Birçok çalışmada, MKH'lerin M2 polarizasyonu teşvik edildiğinde, M1 makrofaj fenotipinin elde edildiği görülmüştür (Kim and Hematti, 2009).

2.5.1 Mezenkimal kök hücrelerin SARS-CoV-2 enfeksiyonunda immünomodülatör özellikleri

SARS-CoV-2 enfeksiyonunda bağışıklık hücreleri arasındaki etkileşim, düzensiz bağışıklık tepkilerine ve çoklu organ işlev bozukluğu riskinin artmasına neden olur. SARS-CoV-2 ile enfekte kişilerde, pro-inflamatuvar sitokinler ve önemli ölçüde artarak organ yetmezliğine neden olmaktadır. Artan sitokin ve kemokin seviyesi, çeşitli bağışıklık hücrelerini, özellikle T lenfositleri ve monositleri, dolaşım sisteminden enfekte dokuya çeker. MKH'ler, rejeneratif tıpta en yararlı araç olarak kabul edilir çünkü bu hücreler, farklılaşma yoluyla hasarlı dokuları ve organları iyileştirebilir ve birçok tipte kemokin, sitokin ve büyüme faktörü üretebilir (Gao et al., 2016; Krampera et al., 2006). MKH'lerin immünomodülatör

etkileri, B lenfosit T-hücreleri, NK hücreleri proliferasyonunun baskılanmasını, düzenleyici T hücrelerinin (Treg) indüklenmesini, NK hücre fonksiyonunun inhibisyonunu ve dendritik hücre olgunlaşmasını ve aktivasyonunu inhibe etmektedir. MKH'ler immünosupresif etkilerini, çözünür faktörler ve hücre-hücre teması ile sağlamaktadır (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. MKH'lerin bağışıklık hücreleri üzerindeki immünomodülatör etkileri (Çizimlerde Biorender programı kullanılmıştır).

MKH'ler farklı seviyelerde bağışıklık tepkisini modüle edebilen değerli ve çok yönlü bir hücre platformunu temsil etmektedir. Bununla birlikte, MKH'ler ile bağışıklık sisteminin çeşitli unsurları arasındaki etkileşim tam olarak anlaşılmamıştır (Wecht & Rojas, 2016). MKH'ler kaynaklarına, hedef hücrelere ve mikro çevreye bağlı olarak tartışmalı sonuçlara yol açabilir. Konak dokulara graft edilme özelliği göstermedikleri için malign transformasyon olmaması ile MKH'lerin yüksek güvenlik profili kanıtlanmıştır.

MKH'ler, hemostazı sürdürmek için akciğerin spesifik yaralanmalarına doğru hedef alarak hasarlı akciğer dokusunu iyileştirebilir, inflamasyonun hafifletilmesi için ve doku rejenerasyonu sağlamak için çözünür faktörler ile birlikte eksozomlar salgılanmaktadır (Uccelli et al., 2008). Literatürde, MKH-eksozomlarının akut akciğer hasarı ve sepsis modellerinde sitokin fırtınası gibi bağışıklık tepkilerini modüle edebildiği gösterilmiştir. MKH-eksozomlarının uygulaması, domuz

modelinde influenza virüsü replikasyonunu baskılayarak influenza virüsünün neden olduğu akut akciğer hasarını zayıflatmıştır (Khatrı et al., 2018). MKH tedavisi, kemokinlerin ve proinflamatuvar sitokinlerin düzeyini azaltmanın yanı sıra inflamatuvar hücrelerin akciğerlere infiltrasyonunu azaltarak farelerde kuşlarda H₉N₂ kaynaklı akut akciğer hasarını önemli ölçüde önler (Y. Li et al., 2016). SARS-CoV-2 virüs enfeksiyonunda MKH-eksozomlarının terapötik rolleri, pro-inflamatuvar sitokinlerin inhibe edilmesini, PEG2 iletilerek M2 makrofajlarının indüklenmesini, IL-10 gibi anti-enflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını, artırılmasını ve KGF, VEGF ve HGF üreterek hasarlı dokunun yenilenmesini sağlayabilmektedir (Chan et al., 2016).

Literatürdeki bir başka çalışmada ise, mezenkimal kök hücrelerin ve salgıladıkları eksozomların COVID-19 hastalığı üzerinde potansiyel bir tedavi olabileceği anlatılmaktadır (Afarid & Sanie-Jahromi, 2021). MKH'lerden salgılanan eksozomların hastalık ile ilişkili komorbiditeleri hafifletmedeki güvenliği ve etkinliği belirtilmektedir (Muraca et al., 2020). Etki mekanizmalarına bakıldığında, belirli organ hücrelerine farklılaşmalarına değil, daha çok, doku homeostazını yeniden kurmada hem yerleşik hem de bağışıklık hücrelerine yardım ettikleri için “quasi niş” adı verilen mikro ortamın yaratılmasını sağlamaktadır. Son olarak, yakın zamanda insan MKH'lerinin, yüzeylerindeki düşük ACE2 ve TMPRSS2 ekspresyonu nedeniyle SARS-CoV-2 enfeksiyonuna dirençli olduğu ve SARS-CoV-2 varlığındaIDO-1 üretim kapasitelerini korudukları bulunmuştur. Bu nedenle MKH'ler SARS-CoV-2'ye karşı immunomodülatör terapi için en güçlü adaylardan biridir (Leng et al., 2020).

Günümüzde MKH'lerin kullanıldığı beş farklı klinik çalışmada COVID-19 hastalığı için potansiyel tedaviler denenmektedir. Uygulama yolu olarak ekstraselüler veziküllerin infüzyonu veya ekstraselüler veziküllerin inhalasyonu yöntemleri kullanılmaktadır (Mansourabadi et al., 2020). 14 günlük bir takip döneminden sonra, MKH ekstraselüler veziküllerinin güvenliği onaylanmış ve herhangi bir ciddi yan etki belgelenmemiştir. Klinik belirtiler hastaların yaklaşık %80'inde düzelmiştir (Liang et al., 2020).

2.5.2 Dental pulpa kök hücreleri

Literatürdeki çalışmalarda insan dental pulpa kök hücreleri (DPMKH'ler), sağlıklı diş pulpasından izole edilmiştir. Gerçekleştirilen deneylerde DPMKH'lerin makrofaj fonksiyonları üzerine etkileri ve immünomodülatör etki mekanizmaları araştırılmıştır (Zhou et al., 2020). DPMKH'lerin *in vitro* koşullar altında koloni oluşturma etkinliği ve adipojenik ve osteo dentinojenik farklılaşma kapasitesine sahip olduğu bulunmuştur (Grossi et al., 2004). Literatürdeki çalışmalarda THP-1 hücre hattının lipopolisakkarit veya nigerisin ile uyarılmaya yanıt olarak TNF- α salgılaması sağlanmış ve DPMKH'lerin bulunduğu kültür ortamında TNF- α salgılanmasının bastırıldığı bulunmuştur (Lee et al., 2016; H. Liu et al., 2000). Bununla birlikte, makrofajlar tarafından TNF- α salgılanmasının DPMKH bulunan kültür ortamında inhibisyonu indolamin-pirol 2,3-dioksijenaz (IDO) inhibitörü olan 1-metil-D-triptofan ile muamele ile edilmiş ve IDO etkisi ortadan kaldırılmıştır (P. Wang, 2021). Bu deney sonucunda IDO'nun DPMKH'lerin immünomodülatör etkisi için önemli bir molekül olduğu tespit edilmiştir. IDO ekspresyonunun, iltihaplı insan pulpa dokularındaki makrofajlarda ve mezenkimal stromal hücrelerde önemli ölçüde arttığı bulunmuştur (Zhou et al., 2020). DPMKH'lerin kök hücre özelliklerine sahip olduğu ve TNF- α ve IDO etkisi aracılığıyla makrofaj fonksiyonlarını baskıladığı kanıtlanmıştır. DPMKH'lerin diş pulpasındaki doğal immünomodülatör aktiviteleri ile diş pulpası onarımını sağladığı da tespit edilmiştir (Newman et al., 2009).

2.5.3 *C. Creticus* (Laden Güllü)

Halk dilinde laden güllü olarak da bilinen *C. creticus* türleri birçok Akdeniz ülkesinde geleneksel halk tıbbında cilt hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Barrajón-Catalán et al., 2010). *Cistus* bitkisi türleri aynı zamanda anti-enflamatuar, anti-ülserojenik, yara iyileştirici, antimikrobiyal (Demetzos et al., 2001), antifungal, antikanser, sitotoksik ve antiviral (Zalegh et al., 2021) olarak pek çok fonksiyona sahiptir. Farklı türleri üzerinde yapılan fitokimyasal araştırmalar, labdane diterpenler, polifenolik glikozitler gibi bazı flavonoid bileşiğinin varlığını ortaya çıkarmıştır (Santagati et al., 2008). *Cistus* türlerinin uçucu yağ bileşimi üzerine yapılan çalışmalar, oksijenli monoterpenlerin,

seskiterpenlerin, aromatiklerin, oksijenli seskiterpenlerin ve karbonil bileşiklerinin izlerinin varlığını ortaya çıkarmıştır (Maggi et al., 2016). Ayrıca tüm *Cistus* türlerinin yaprakları, esas olarak terpenoidlerden oluşan reçine ve uçucu yağ salgılayan bezlerle kaplıdır (Mastino et al., 2017).

Virüs enfeksiyonlarının tedavisi için onaylanmış ve klinik uygulamalarda güvenli bitkisel ürünler, yeni antiviral aktivitelerinin belirlenmesi oldukça önemlidir. Literatürde *Cistus* türleri ile yapılmış çalışmalarda ekstraktlarının *in vitro* olarak insan immün yetmezlik virüsü (HIV) enfeksiyonlarını engellediği gösterilmiştir. Ekstrakt, klinik HIV-1 ve HIV-2 izolatlarını ve ilaç direncine sahip izole edilmiş virüs varyantlarını inhibe ettiği bulunmuş ve anti-HIV aktivitesi doğrulanmıştır. Antiviral aktivite, virüs partiküllerinde seçici olarak gerçekleşmiştir. Virüsün hücre yüzeyine birincil bağlanmasını ve viral zarf proteinlerinin heparine bağlanmasını engellediği tespit edilmiştir. *Cistus* türlerine ait ekstraktların çok sayıda antiviral bileşik içerdiği ve bu nedenle virüs direncini inhibe edici eğilime sahip olduğu gösterilmiştir. *C. creticus* ekstraktının, insanlarda yaşamı tehdit edici hastalıklara neden olan virüslere karşı güçlü *in vitro* antiviral aktivite gösterdiği ve virüs partiküllerini hedefleyen bir antiviral ajan olduğu kanıtlanmıştır (Rebensburg et al., 2016).

Antiviral aktivitesinin yanında, *C. creticus* bitkisi günümüzde Anadolu'da geleneksel olarak hemostatik ajan olarak kullanılmaktadır. Literatürdeki çalışmalarda hayvan deneylerinde kullanılmak üzere jeller ekstrakt ile hazırlanarak Wistar albino sıçanlarda *in vivo* kuyruk ucu amputasyon modeli kullanılarak hemostatik aktivite değerlendirmesi yapılmıştır. %2,5 ekstrakt ile hazırlanan jel hem kanama süresi hem de kanama miktarı üzerinde daha etkili bulunmuştur. Hemostatik etki ile ilgili olarak hiperositinin kan pıhtılaşması özelliğine sahip olduğu bildirilmiştir. *C. creticus* bitki özütü yüksek flavonoid ve yüksek antioksidan kapasitesine sahiptir ve buna göre çeşitli biyolojik aktiviteler sergilemektedir (Karadağ et al., 2020).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Virüs

Bu tez çalışmasında kullanılmış olan D274 virüsü suşu Doç. Dr. Fethiye ÇÖVEN tarafından araştırma grubumuza temin edilmiştir. Virüs aşısı suşu olup zoonoz özelliğe sahip olmadığından laboratuvar koşullarımızda çalışılmıştır.

3.1.2 Hücre kültüründe kullanılan materyaller

Bu tez çalışmasında *in vitro* hücre kültüründe kullanılan Dulbecco Modified Eagle Medium F-12 (DMEM/F12) (Gibco, ABD), Tripsin-EDTA (Gibco, ABD), penisilin/streptomisin (Gibco, ABD), fetal sığır serumu (FBS) Gibco (ABD), 4',6-Diamidino-2-Fenilindol dihidroklorür (DAPI) (Sigma Aldrich, ABD), Doxorubicin (Sigma Aldrich, ABD), 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT) (Sigma Aldrich, ABD), dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma Aldrich, ABD) ve Fosfat tamponu tuz çözeltisi (PBS) (Gibco, ABD) firmasından temin edilmiştir. T-flasklar (25 cm², 75 cm², 175 cm²), 96 gözlü pleytler, 6 gözlü pleytler (Corning, ABD) firmasından satın alınmıştır. 2 ml, 5ml, 10 ml'lik serolojik pipetler, 15 ml ve 50ml'lik santrifüj tüpleri, tek kullanımlık pipet uçları, 2 ml'lik, 1,5 ml'lik eppendorflar gibi laboratuvar sarf malzemeleri (Kirgen, ABD) firmasından satın alınmıştır.

3.1.3 *C. creticus* ekstraktı

Bu çalışmada kullanılmış *C. creticus* bitkisi ekstraktı, NPRO Danışmanlık Doğal ve Bitkisel Biyoteknoloji Ürünleri Kozmetik San ve Tic. Ltd. Şti. firmasından temin edilmiştir. Elde edilen ekstrakt %70 etanol ve %30 su kullanılarak hazırlanmıştır, kullanıma kadar liyofilize toz halde +4°C'de saklanmıştır.

3.2 Metot

3.2.1 Embriyolu yumurta sisteminde virüsün çoğaltılması

Bu çalışmada, zoonoz olmadığı bilinen ve hemaglutinasyon özelliği bulunan D274 virüs suşu kullanılmıştır. IBV D274 suşu BSL-2 laboratuvar şartlarında çalışma için uygun olduğu bilinmektedir. Laboratuvarımızdaki çalışmalarda BSL-2 şartlarında embriyolu yumurta sisteminde virüs inokulasyonu ve virüs çoğaltma işlemi gerçekleştirilmiştir. İnokulasyon yapılmış yumurtalardan allontoik sıvı toplama işlemi klas IIA güvenlik kabininde yapılacaktır. Virüslerin çoğaltılması için yapılan işlemlerde 8-10 günlük, canlılık gösteren ve fertil embriyolu tavuk yumurtaları kullanılmıştır. Yumurta kabuğu sterilize edilmesi için tentürdiyot ile silinmiştir ve biyogüvenlik kabinine alınmıştır. İnokulasyon bölgesinin tespit edilmesi için yumurta ışık kaynağı altında incelenmiş ve hava kesesi boşluğunun altında bulunan allantoik boşluğun damarsız tarafı işaretlenmiştir. İşaretlenmiş bölge insülin enjektörü ucunun yardımıyla 45 ° 'lık bir açıyla yumurta kabuğu delinerek korio-allantoik boşluğa enjeksiyon ile 100 µl IBV ile inokulasyon yapılmıştır. Yumurtaların inokulasyon yeri yapıştırıcı ile kapatılmış ve kuluçka makinesinde 2 gün daha inkübe edilmiştir, 3. Günde +4°C'de 24 saat bekletilmiştir. Her 24 saatte bir yumurtaların üzerinden ışık tutularak içerisindeki embriyoların hareketleri gözlemlenmiştir, canlılıkları kontrol edilmiş ve ölü yumurtalar ayrılmıştır. 2. günün sonunda yumurta kabuğu açılarak allontoik sıvı toplanmıştır. Allontoik sıvı kandan ayrılması için 10 dakika 5000 rpm'de santrifüjlenmiştir ve 0.22 µm filtreden geçirilmiştir, -86 °C'de stoklanmıştır (Guy et al., 2015; Brauer et al., 2015). Çalışmalar sonucunda tüm yumurta atıkları kurallara uygun şekilde imha edilmiştir.

3.2.2 Hücre kültürü

Bu çalışmada virüs ile enfekte edilmek için, CRL-5807 bronkoalveoler karsinom hücre hattı ATCC'den temin edilmiştir ve laboratuvarımızda stokları mevcuttur. CRL-5807 hücreleri, DMEM/F-12 besi ortamına %10 FBS, %0.1 penisilin /streptomisin eklenerek 37°C'de deki %5 CO₂'li inkübatörde kültürlenmiştir. Hücreler tutundukları yüzeyde %80 konfluent olarak gözlemlendiğinde haftada en fazla üç defa pasajlanmış ve çoğaltılmıştır.

Logaritmik fazda olduğu bilinen ve aktif olarak çoğalabilen akciğer hücreleri deneylerde kullanılmıştır. Bu çalışmada laboratuvarımızda çalışılmış doktora tezi sonucunda karakterize edilmiş diş pulpasından izole edilmiş mezenkimal kök hücreler (MKH) Alpha-MEM besi ortamı içerisinde %10 FBS, %0.1 penisilin /streptomisin eklenerek 37°C'lik, %5 CO₂'li inkübatörde kültürlennmiştir. Logaritmik fazda ve aktif olarak çoğaldığı gözlemlenen hücreler deneylerde kullanılmıştır.

3.2.3 *Cistus creticus* ekstraktının CRL-5807 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi ve IC₅₀ değerinin hesaplanması

C. creticus ekstraktının akciğer hücresi ve THP-1 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi amacıyla MTT testi yapılmıştır. Hücreler flaskta %80 konfluent yoğunluğa ulaştığında tripsinizasyon ile flask yüzeyinden kaldırılarak sayım yapılmıştır. Sayılan hücrelerden, 96 gözlü pleytlerde her bir kuyucuğa akciğer hücreleri için DMEM-F12 içerisinde, THP-1 hücreleri RPMI 90 µl 1 x 10⁵ hücre/ml konsantrasyonunda ekim yapılmıştır. 24 saat inkübasyon sonunda kuyucuklara son konsantrasyonları 50 µg/ml, 6 µg/ml, 5 µg/ml, 3 µg/ml, 1 µg/ml ve 0,5 µg/ml olacak şekilde DMSO'da homojen olarak özünmüş *C. creticus* ekstraktı eklenmiştir. Madde eklendikten 48 saat sonra her kuyucuğa 20 µl FTS solüsyonunda çözölmüş %2.5 g/L MTT eklenmiştir. THP-1 hücresi süspanse hücre kültürü özelliği gösterdiğinden 4 saat inkübasyon sonunda oluşan kristaller kuyucukların içerisinde kalacak şekilde ortam uzaklaştırılmıştır (THP-1 süspanse olarak kültür edilen hücre özelliği gösterdiğinden bu aşamada 96 gözlü pleyt 5 dakika 1000 rpm'de santrifölenerek kristaller kuyucuğun dibine öktürölmüştür ve daha sonra ortam dökölerek uzaklaştırılmıştır). Kuyucuklardaki formazan kristallerinin çözünmesi için 150 µl DMSO eklenmiştir. Ardından pleytin absorbands değerleri her bir kuyucuk için 570 nm dalga boyunda spektrofotometre ile öölölmüştür. Hiçbir uygulamaya maruz bırakılmayan, sadece aynı konsantrasyonda çözgen madde DMSO kullanılan hücreler (kör kuyucuklar) baz alınarak ekstrakt uygulanan hücrelerin yüzde canlılığı hesaplanmıştır. GraphPad Prism programı kullanılarak ekstrakt konsantrasyonları ve yüzde canlılık değerleri girilerek *C. creticus* ekstraktının IC₅₀ değeri hesaplanmıştır.

3.2.4 Akciğer hücrelerinde enfektif IBV titresinin belirlenmesi (DKID₅₀: Yüzde elli doku kültürü enfektif dozu)

Çalışmada akciğer hücre hattı IBV ile enfekte edilmiş DKID₅₀ değeri hesaplanmıştır. İlk olarak 96 gözlü pleyte 90 µl 1x10⁵ hücre/ml konsantrasyonunda hücre süspansiyonu ekilmiş ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 96 gözlü pleyte 10 µl stok virüsten eklenerek seri olarak 10 katlı dilüsyon yapılmıştır, son iki sıra virüssüz kontrol olarak aşağıdaki şablonda belirtildiği gibi kullanılmıştır (Şekil 3.1).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹²
2	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹²
3	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹²
4	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹²
5												
6												
7								Kontrol				
8								Kontrol				

Şekil 3.1. DKID₅₀ değeri hesaplanırken 96 gözlü pleyt.

7 gün inkübasyonun sonunda pleytteki ortam uzaklaştırılıp 100 µl -20 derecede bekletilmiş %75 metanol ilave edilmiş, 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. %75 metanol uzaklaştırılıp, pleyte 100 µl -20 derecede bekletilmiş %100 metanol eklenerek tekrar 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Kuyucuklardaki metanol çekilerek 100 µl %20'lik etanol içerisinde hazırlanmış %1'lik kristal viyole solüsyonu eklenmiş, 30 dakika inkübe edilmiştir. Boyamadan sonra sitopatik etkiler (SPE'ler) ters ışık mikroskobu ile gözlemlenmiştir. DKID₅₀ (Yüzde elli doku kültürü enfektif dozu) Spearman -

Karber Metodu kullanılarak aşağıda verilen formülde yerine koyularak hesaplanmıştır (Tay F et al, 2012, Chen et al, 2007).

A: %100 sitopatik etki görülen dilüsyonun en yükseği

B: pleytte sitopatik etki görülen toplam kuyucuk sayısı

C: dilüsyon başına düşen tekrar sayısı

D: virüs inokulum hacmi

$$\log ID_{50} = \log A + 0,5 - \frac{B}{C}$$

$$\frac{TCID_{50}}{ml} = \frac{1/\log ID_{50}}{D}$$

3.2.5 THP-1 Hücrelerinin makrofaja farklılaştırılması

Bu çalışmada ATCC'den temin edilmiş laboratuvarımızda bulunan THP-1 (insan monosit hücreleri) RPMI 1640 besi ortamı içersine %10 FBS, %0.1 penisilin /streptomisin eklenerek kullanılmıştır ve, 37 °C'lik, %5 CO₂'li inkübatörde kültür edilmiştir. Hücreler yüzeyde %80 konfluent olarak gözlemlendiğinde haftada 3 defa pasajlanmıştır. Logaritmik fazda büyümekte olan ve aktif olarak çoğaldığı gözlemlenen hücreler deneylerde kullanılmıştır. THP-1 monosit hücrelerinin, M0-THP-1 makrofajlarına farklılaşması için 24 saat süresince 15 ng/ml porbol 12-miristat 13-asetat (PMA, Sigma, ABD) ile kültürlenmiştir (Rahal et al., 2017).

3.2.6 IBV ile enfekte edilmiş akciğer hücreleri, makrofaj hücreleri ve dış pulpası mezenkimal kök hücreleri ile üçlü ko-kültür modelinin hazırlanması

CRL-5807 hücreleri 6 gözlü pleytlere 1×10^6 hücre/kuyucuk olarak ekilmiştir, hücreler pelytin yüzeyine tutunduğunda 0,5 TCID₅₀/ml değerinde IBV ile enfekte edilmiştir, 24 saat sonrasında PMA ile makrofaja farklılaştırılmış THP-1 hücreleri 5×10^6 hücre/kuyucuk ve diş pulpası kök hücreleri 1.7×10^4 hücre/kuyucuk DMEM F12 besi ortamı içerisine %4 FBS, %0,1 penisilin /streptomisin eklenerek hazırlanan ortamda ekilmiştir, 37°C'deki %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat kültüre edilmiştir. Süpernatantlar ELISA yöntemi ile sitokin analizinde kullanılmak üzere -86 °C' ye kaldırılmıştır.

Tablo 3.1. Deneylerde oluşturulmuş gruplar.

Örnek No / Deney Grubu No	Açıklama
1	CRL-5807
2	THP-1 M0
3	MKH
4	CRL-5807 + IBV
5	CRL-5807 + IBV + THP-1 M0
6	CRL-5807 + IBV + THP-1 M0 + MKH
7	CRL-5807 + IBV + THP-1 M0 + MKH + Laden 10 µg / ml
8	CRL-5807 + IBV + THP-1 M0 + MKH + Laden 1 µg / ml
9	CRL-5807 + IBV + THP-1 M0 + MKH + Laden 0,1 µg / ml

3.2.7 IBV ile enfekte edilmiş akciğer hücrelerinde *C. creticus* ekstraktının potansiyel antiviral etkisinin DKID₅₀ değerinin belirlenmesi

Hazırlanan üçlü ko-kültür modeline *C. creticus* ekstraktı son konsantrasyonları 10 µg/ml, 1 µg/ml ve 0,1 µg/ml konsantrasyonlarında pleytlere eklenmiş ve 24 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda antiviral etkinliğin belirlenmesi için süpernatant toplanmış ve DKID₅₀ değeri 3.2.4.'teki protokol takip edilerek 1.2.4.'te verilen fomül ile hesaplanmıştır.

3.2.8 Hemaglutinasyon (HA) testi ile süpernatantlarındaki virüs titresinin belirlenmesi

Deney gruplarından toplanan süpernatantların virüs titresinin belirlenmesi için HA testi yapılmış, her örnek için HA değerleri aşağıda verilmiş formüle göre hesaplanmıştır. HA testi için V tabanlı 96 gözlü pleytlere önce 50 µl fizyolojik tuzlu su (FTS) ardından, 1. sütundaki gözlere 50 µl örnek eklenmiş ve 2 katlı seyreltme işlemi yapılmıştır, ardından 50 µl FTS her kuyucuğa eklenmiş, son olarak 50 µl %0,1 konsantrasyonunda olacak şekilde seyreltilmiş tavuk eritrositi eklenmiştir. Pleytler 40 dakika inkübasyona bırakılmıştır, sonuçlar kuyucukların dibinde çökme olduğu zaman HA (-), çökme olmadığı zaman HA (+) olarak değerlendirilmiş, hesaplamalar pozitif kuyucuklara göre yapılmıştır.

3.2.9 MTT ile üçlü ko-kültür modelindeki hücrelerin canlılığının belirlenmesi

Deney gruplarında bulunan hücrelerin %Canlılık değerlerinin hesaplanması için süpernatantlar toplandıktan sonra hücrelerin üzerine 200 µl MTT eklenmiştir. 4 saat inkübasyonun ardından pleytin yüzeyindeki kristallere zarar verilmeden MTT boyası mikropipet ile toplanmıştır. Pleytlerin her 500 µl gözüne DMSO eklenmiştir ve pleyt hafifçe çalkalanmıştır. Ardından 570nm’de spektrofotometre ile absorbans değerleri ölçülmüştür.

3.2.10 ELISA ile üçlü ko-kültür süpernatantlarındaki sitokin miktarlarının belirlenmesi

TNF- α , IL-1 β , ve IL-6 sitokinlerinin tespiti için her sitokine özel ELISA kiti satın alınmıştır. Kitlerin protokollerinde belirtilen adımlar takip edilerek standart eğrisi çizimi için ELISA pleytlere TNF- α , IL-1 β , ve IL-6 standartları 800 pg/ml ve 25 pg/ml konsantrasyonları aralığında 25 µl her kuyucuğa eklenmiştir. Diğer kuyucuklara ise deney gruplarından toplanan süpernatantlar 25’er µl eklenmiştir. Biotinlenmiş anti-TNF- α , IL-1 β , ve IL-6 solüsyonları 25’er µl eklenmiş ve karanlık ortamda 4 saat boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun sonunda pleyt ters çevirilip dökülerek gözlerdeki sıvı uzaklaştırılmıştır. Her göze 200 µl taze hazırlanmış Wash Buffer eklenip dökülerek 3 kere yıkama işlemi yapılmıştır. Gözlerdeki sıvı tamamen uzaklaştırıldıktan sonra 100’er µl Streptavidin-HRP eklenmiş ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki sıvı uzaklaştırılarak 200 µl wash buffer ile 3 kere daha yıkama ve dökme işlemleri gerçekleştirilmiştir. Son olarak, TMB solüsyonu her kuyucuğa 100 µl eklenmiş ve ışık almayacak şekilde 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda her kuyucuğa 100 µl stop solüsyonu eklenmiş, absorbans değerleri 450 nm’ de spektrofotometre ile ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerleri ile standart eğrisi oluşturularak deney gruplarından elde edilen süpernatantlardaki sitokin miktarları hesaplanmıştır.

3.2.11 Akış sitometri ile THP-1 hücrelerinin M0 makrofajlara farklılaşma analizi

THP-1 makrofaj hücreleri karşılaştıkları tümör mikroçevresi veya enflamatuar ortama bağlı olarak yüzey reseptörlerinde farklı genler eksprese etmektedirler. PE-CD80, FITC-CD163 ve FITC-CD11b makörleri ile konjuge antikorlar boyamada kullanılarak akış sitometri cihazı ile analiz edilmiştir. Markörler seçilirken M1 makrofaj polarizasyonunun belirlenmesi için literatüre benzer olarak (Bertani et al., 2017) CD80 markörü kullanılmıştır. M2 makrofaj polarizasyonunun analizinde literatüre uygun olarak CD163 markörü ve M0 makrofajlarına polarizasyonun gösterilmesi için literatüre uygun olarak CD11b markörü kullanılmıştır (Bertani et al., 2017; Schmid et al., 2018).

THP-1 hücreleri 48 saat boyunca PMA ile muamele edildikten sonra süspanse hücreden flaskın yüzeyine tutunma özelliği göstermiştir. Flaskın yüzeyine tutunmuş hücrelere tripsin EDTA eklenmiş, 5 dakika inkübe edilerek flaksın yüzeyinden kaldırılmıştır. Üzerine tripsinin nötralizasyonu için hücre kültürü ortamı eklenmiş ve +4°C’ de 1000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant dökülerek pellet kırılmış ve içerisine 1ml PBS solüsyonu eklenmiştir, bu işlem yıkama amacıyla iki kez tekrar edilmiştir. 2. Santrifüjün sonunda süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet üzerine temas edecek şekilde mikropipet ile 1 µl PE anti-human CD80, FITC anti-human CD163 ve FITC anti-human CD11b antikorları ile boyama yapılmıştır. Boya ile 40 dakika inkübasyonun sonunda pelletlerin üzerine 300 µl PBS ilave edilmiş ve BD Accuri Flow Cytometer BD Accuri cihazı ile analiz edilmiştir.

3.2.12 Verilerin istatistiksel analizi

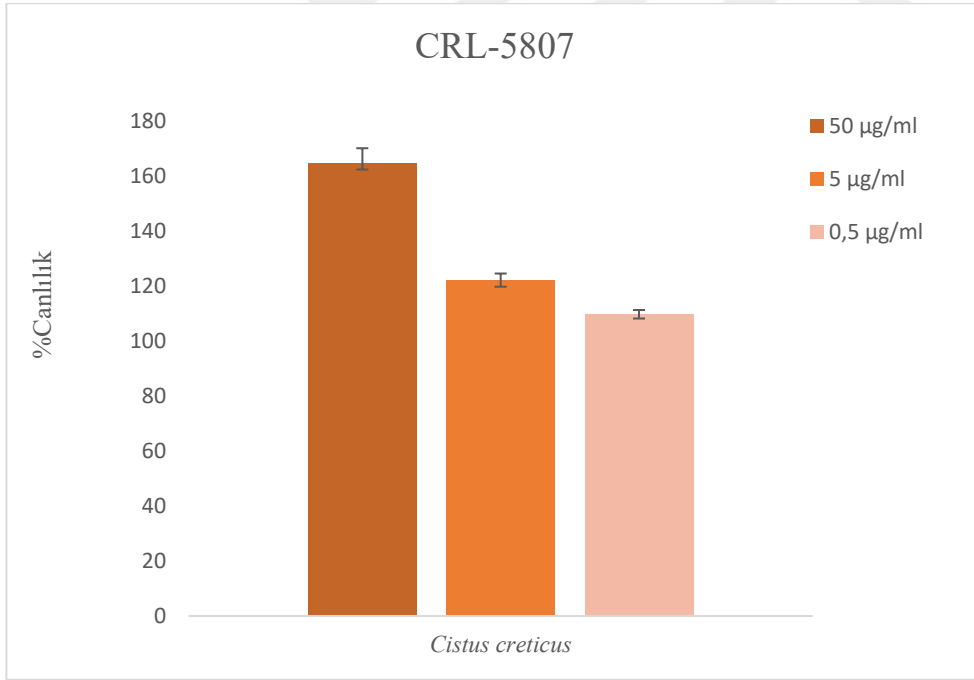
Deneyler sonucunda elde edilen veriler GraphPad Prism programı kullanılarak %95 güven aralığında, t testi analizleri yapılmıştır.



4. BULGULAR

4.1.1 C. creticus ekstraktının akciğer hücresi ve THP-1 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi ve IC₅₀ değeri

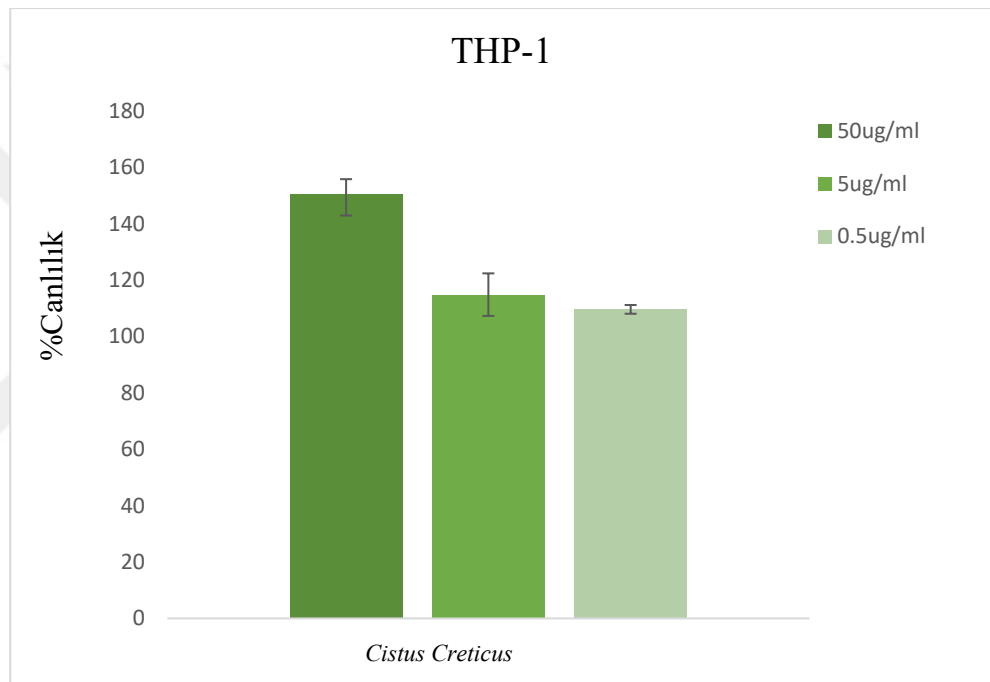
C. creticus bitkisi ekstraktı son konsantrasyonu en fazla %10 DMSO içerecek şekilde hazırlanmıştır. CRL-5807 hücre hattı üzerinde gerçekleştirilen MTT testi ilk olarak 6 µg/ml, 3 µg/ml ve 1 µg/ml konsantrasyonlarında denenmiştir. 6 µg/ml, 3 µg/ml ve 1 µg/ml konsantrasyonlarında CRL-5807 hücre hattı üzerinde herhangi bir sitotoksik etkiye rastlanmamıştır. Bunun üzerine MTT testi ekstrakt konsantrasyonları yükselterek 50 µg/ml, 5 µg/ml ve 0,5 µg/ml konsantrasyonlarında tekrar denenmiştir. Ede edilen absorbans değerleri ile 3.2.3'te belirtilen % canlılık formülü kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucunda aşağıdaki grafik oluşturulmuştur (Şekil 4.1). 50 µg/ml, 5 µg/ml ve 0,5 µg/ml konsantrasyonlarında da CRL-5807 hücre hattı üzerinde herhangi bir sitotoksik etkiye rastlanmamıştır. Bunun yanında ekstrakt konsantrasyonu arttıkça CRL-5807 hücre hattı için proliferatif etkiye rastlanmıştır, ekstrakt ile 48 saat muameleden sonra % hücre canlılıkları 50 µg/ml için %163, 5 µg/ml için %127 ve 0,5 µg/ml için %113 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.1. *C. creticus* bitki ekstraktının CRL-5807 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi tespit edilmemiştir.

C. creticus ekstraktı THP-1 hücre hattı üzerinde gerçekleştirilen MTT testi ilk olarak 6 µg/ml, 3 µg/ml ve 1 µg/ml konsantrasyonlarında denenmiştir. 6 µg/ml, 3 µg/ml ve 1 µg/ml konsantrasyonlarında THP hücre hattı üzerinde herhangi bir sitotoksik etkiye rastlanmamıştır. Bunun üzerine MTT testi ekstrakt

konsantrasyonları yükselttilerek 50 µg/ml, 5 µg/ml ve 0,5 µg/ml konsantrasyonlarında tekrar denenmiştir. Ede edilen absorbands değerleri ile 3.2.3'te belirtilen % canlılık formülü kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucunda aşağıdaki grafik oluşturulmuştur (Şekil 4.2). 50 µg/ml, 5 µg/ml ve 0,5 µg/ml konsantrasyonlarında da THP-1 hücre hattı üzerinde herhangi bir sitotoksik etkiye rastlanmamıştır. Bunun yanında ekstrakt konsantrasyonu arttıkça THP-1 hücre hattı için proliferatif etkiye rastlanmıştır, ekstrakt ile 48 saat muameleden sonra % hücre canlılıkları 50 µg/ml için %157, 5 µg/ml için %116 ve 0,5 µg/ml için %109 olarak belirlenmiştir.



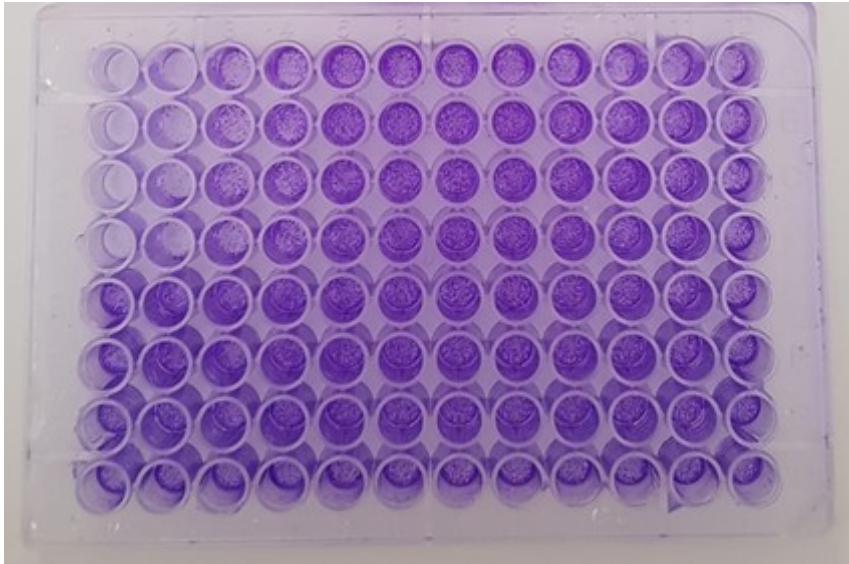
Şekil 4.2 *C. creticus* bitki ekstraktının THP-1 hücre hattı üzerine etkisi.

4.1.2 Akciğer ve hücrelerinde enfektif IBV titresinin belirlenmesi (DKID₅₀: Yüzde elli doku kültürü enfektif dozu)

IBV D-274 suşu ile enfekte edilen CRL-5807 hücre hattının $DKID_{50}/ml$ değerleri fiksasyon ve kristal viyole ile boyama işlemlerinin ardından pleytin gözlemlerindeki sitopatik etkinin pozitif veya negatif gözlemine göre kuyucuklar gözlemlenmiştir. Spearman & Karber Metodu'na göre, değeri $DKID_{50} /ml = 10^{2,83}$ olarak hesaplanmıştır.

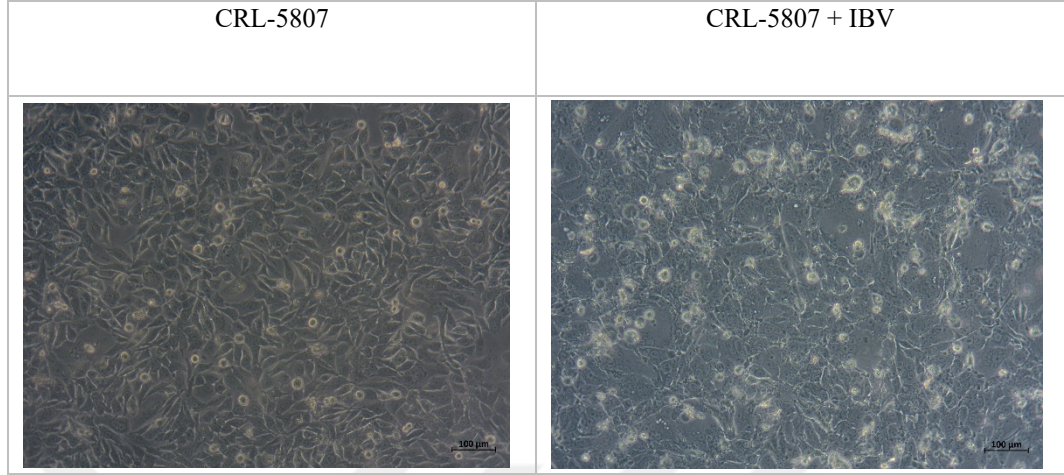
Tablo 4.1. Fiksasyon ve boyama işlemlerinden önce pleyt şablonu.

Dilüsyon	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-11}	10^{-12}
IBV-D274	+	+	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-
IBV-D274	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IBV-D274	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IBV-D274	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kontrol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



Şekil 4.3. $DKID_{50}$ hesaplanması için, boyama işleminin ardından pleytin görüntüsü.

Tablo 4.2. CRL-5807 kontrol ve IBV D274 ile enfekte edilmiş CRL-5807 hücreleri fotoğrafları, 10x büyütme.



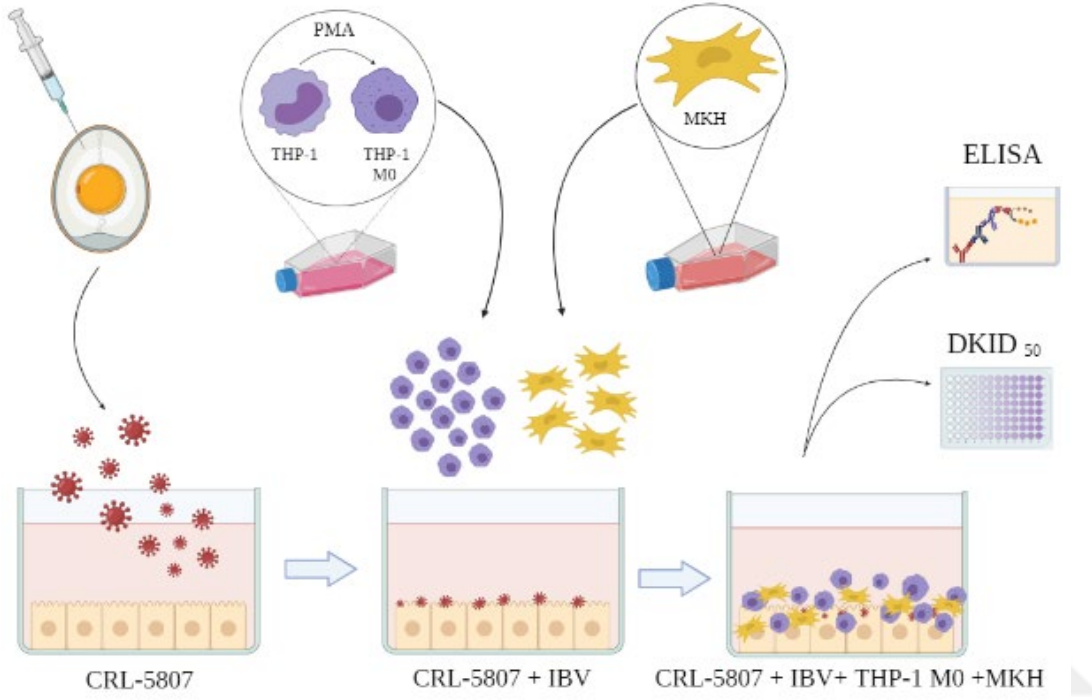
4.1.3 IBV ile enfekte edilmiş akciğer hücreleri, makrofaj hücreleri ve dış pulpası mezenkimal kök hücreleri ile üçlü ko-kültür modeli

IBV D274 suşu ile inokule edilen embriyolu tavuk yumurtaları 72 saat virus çoğaldıktan sonra yumurtalardan korioallontoik sıvı pastor pipeti yardımıyla toplanmıştır. Toplanan korioallontoik sıvının virus titresinin belirlenmesi için HA testi yapılmıştır. Kullanılan stok virüslerimizde HA testi sonucu 1024 olduğundan virus titresinin deneylerimizde kullanılmaya uygun olduğu kanıtlanmıştır.

CRL-5807 hücreleri 6 gözlü pleytlere 1×10^6 hücre/kuyucuk olarak ekilmiştir, 1 gün hücrelerin pleyt yüzeyine tutunması için beklenerek 2. gün 0,5 DKID₅₀/ml değerinde IBV stoğu ile 500 µl enfekte edilmiştir. 3. Günde 48 saat boyunca PMA'ye maruz bırakılan THP-1 hücreleri makrofaja farklılaştırılmış ve 5×10^6 hücre/kuyucuk konsantrasyonunda DMEM F12 besi ortamı içerisine %4 FBS, %0,1 penisilin /streptomisin eklenerek hazırlanan ortamda ekilmiştir ekilmiştir. Aynı günde dış pulpası kök hücreleri de 1.7×10^4 hücre/kuyucuk konsantrasyonunda DMEM F12 besi ortamı içerisine %4 FBS, %0,1 penisilin /streptomisin içeren ortamda ekilmiştir.

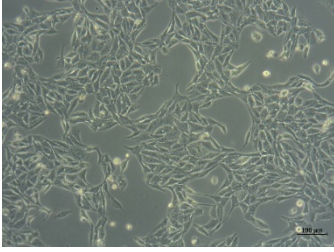
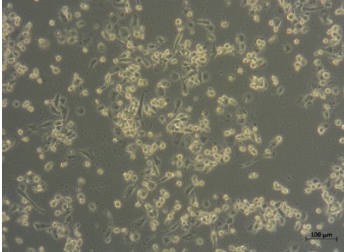
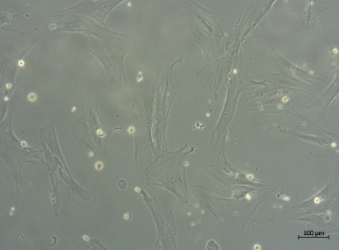
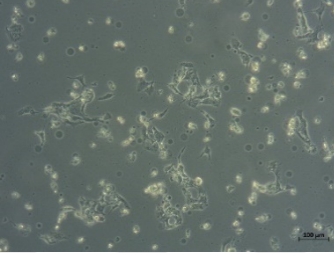
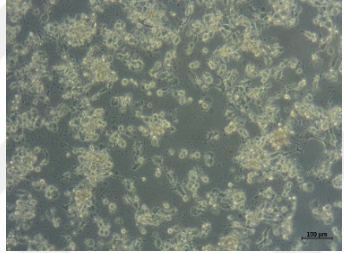
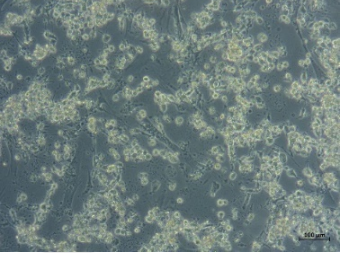
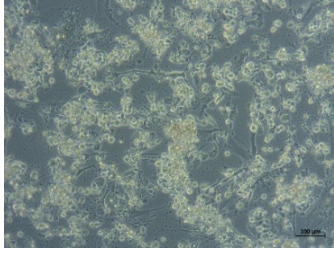
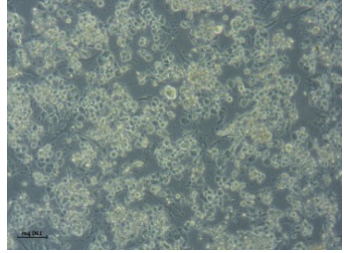
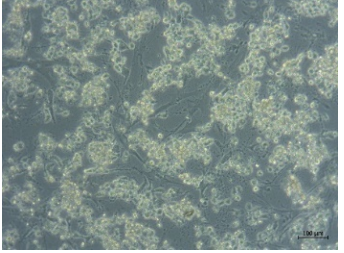
Deneyde üçlü ko-kültürün kuruluş şeması Şekil 4.4'te verilmiştir. Akciğer enfeksiyonu modeli kurulduktan sonra (THP-1 M0 ve MKH'ler 6 gözlü pleytlere

eklendiğinde) ilgili gözlere 10 μg / ml, 1 μg / ml ve 0,1 μg / ml konsantrasyonlarında *C. creticus* ekstrtı eklenmiştir, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

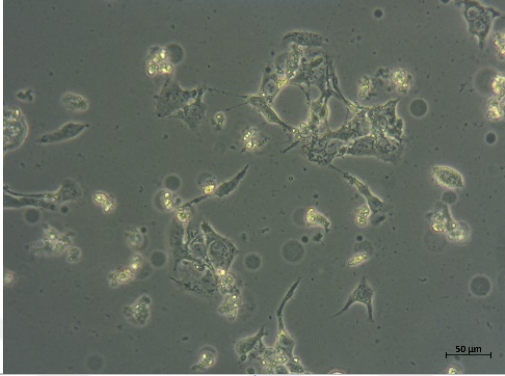
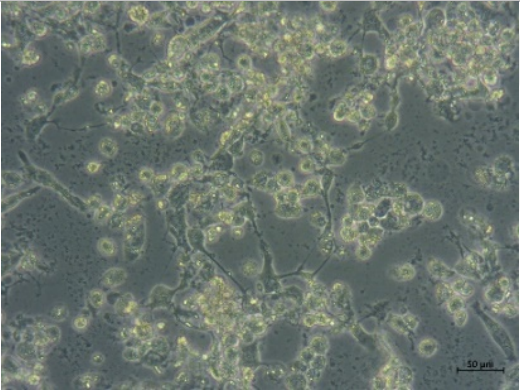
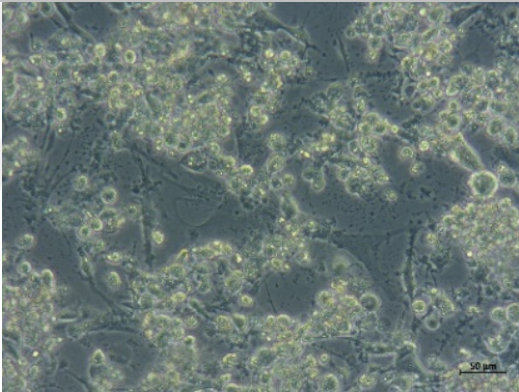
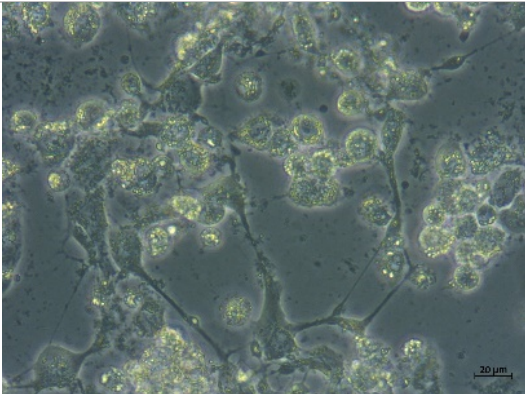
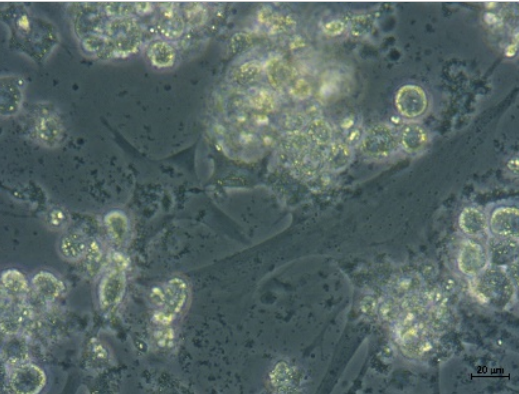


Şekil 4.4. Üçlü ko-kültür akciğer enfeksiyonu modelinin kuruluş şeması (Çizimlerde Biorender programı kullanılmıştır).

Tablo 4.3. Deney gruplarının (kontrol ve üçlü ko-kültür olarak) kuyucukları, 10X büyütme ve ölçek çubuğu 100 µm.

CRL-5807	THP-1 M0	MKH
		
CRL-5807 + IBV	CRL-5807 + IBV + THP-1 M0	CRL-5807 + IBV + THP-1 M0 + MKH
		
CRL-5807 + IBV + THP-1 M0 + MKH + <i>C. creticus</i> 10 µg / ml	CRL-5807 + IBV + THP-1 M0 + MKH + <i>C. creticus</i> 1 µg / ml	CRL-5807 + IBV + THP-1 M0 + MKH + <i>C. creticus</i> 0,1 µg / ml
		

Tablo 4.4. Deney gruplarının (kontrol ve üçlü ko-kültür olarak) kuyucuklarının fotoğrafları 20X ve 40X büyütmede.

CRL-5807 + IBV 20x	
	
CRL-5807 + IBV + THP-1 M0 20x	CRL-5807 + IBV + THP-1 M0 + MKH 20x
	
CRL-5807 + IBV + THP-1 M0 40x	CRL-5807 + IBV + THP-1 M0 + MKH 40x
	

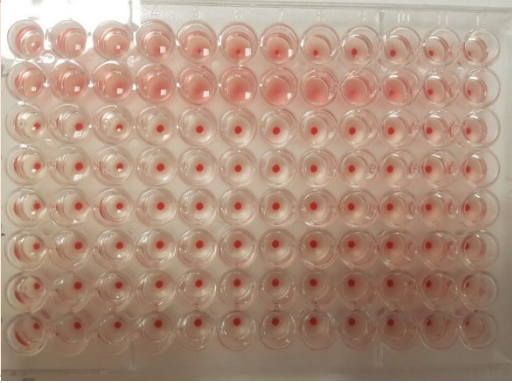
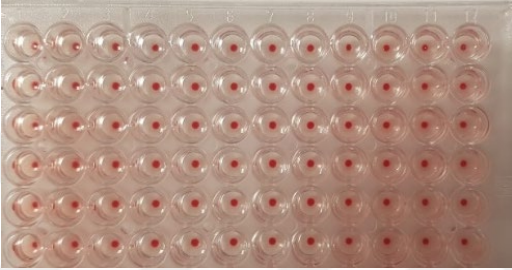
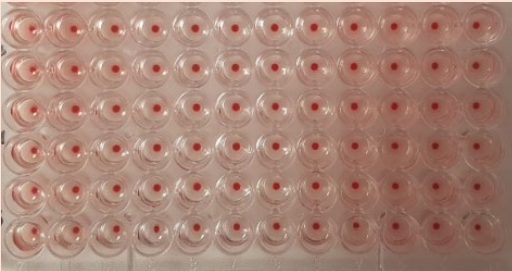
4.1.4 HA hesti ile süpernatantlarındaki virüs titresinin belirlenmesi

Deney gruplarından toplanan süpernatantlar ile her gruptaki virus titresinin belirlenmesi için HA testi gerçekleştirilmiştir. HA testinin sonucunda gruptaki virus titreleri, grup numaraları ve grupların açıklamaları aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 4.5). pleytlerinin 40 dakika inkübasyondan sonraki görüntüleri tabloda verilmiştir. Eritrositlerin çökmesi HA (-), eritrositlerin pleytin dibine çökmemesi HA (+) kuyucuklar olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 4.5. Deney grubu numaraları, açıklamaları.

Örnek	Açıklama	HA Değeri
Pozitif Kontrol	Stok Virüs	
0	Stok virüs ile 1 saat inkübasyon sonrasında toplanan süpernatant	
1	CRL-5807	0
2	THP-1 M0	0
3	MKH	0
4	CRL-5807 + IBV	
5	CRL-5807 + IBV + THP-1 M0	
6	CRL-5807 + IBV + THP-1 M0 + MKH	
7	CRL-5807 + IBV + THP-1 M0 + MKH + Laden 10 µg / ml	
8	CRL-5807 + IBV + THP-1 M0 + MKH + Laden 1 µg / ml	
9	CRL-5807 + IBV + THP-1 M0 + MKH + Laden 0,1 µg / ml	

Tablo 4.6. V tabanlı pleytlerde HA testi görüntüleri.

	HA Pleytleri	
0		Stok Virüs
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		

4.1.5 Üçlü ko-kültür modelinde *C. creticus* ekstraktının antiviral etkisinin DKID₅₀ değerlerinin hesaplanması sitopatik etki oluşumunun gözlemlenmesi

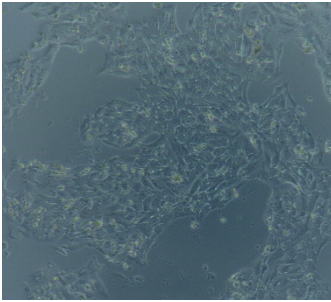
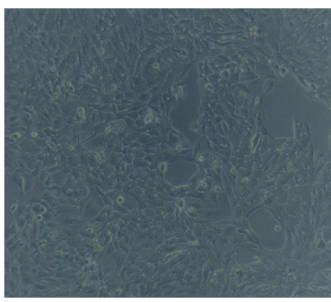
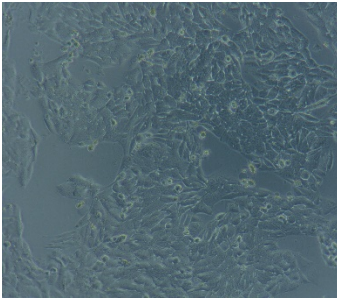
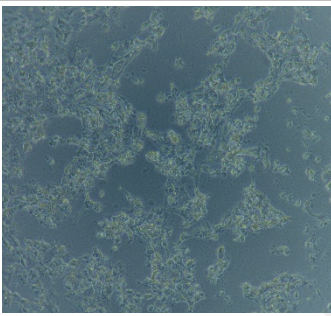
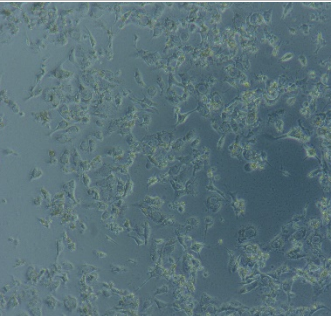
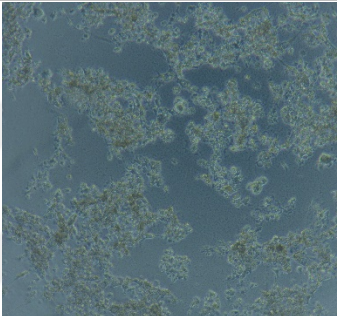
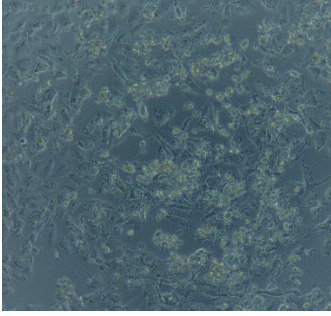
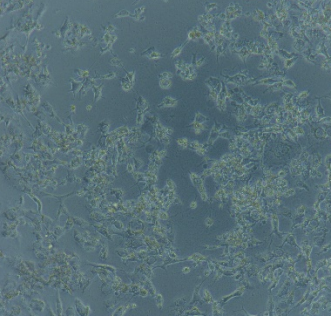
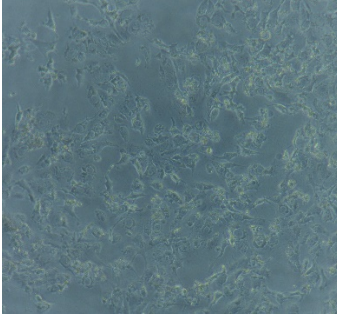
Deney gruplarından toplanan süpernatantlar ile virus titresinin belirlenmesi için DKID₅₀ testi gerçekleştirilmiştir. DKID₅₀ testinin sonucunda gruplardaki virus titreleri, grup numaraları ve grupların açıklamaları aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 4.7). Elde edilen sonuçlarda enfekte akciğer hücrelerinin virus titresi $10^{2,29}$ olarak hesaplanırken *C. creticus* ekstraktı eklenmiş grupların virus titreleri $10 \mu\text{g} /$

ml konsantrasyonunda ekstrakt için 10, 1 μg / ml ve 0.1 μg / ml konsantrasyonlarında ekstrakt için $10^{1,87}$ olarak hesaplanmıştır.

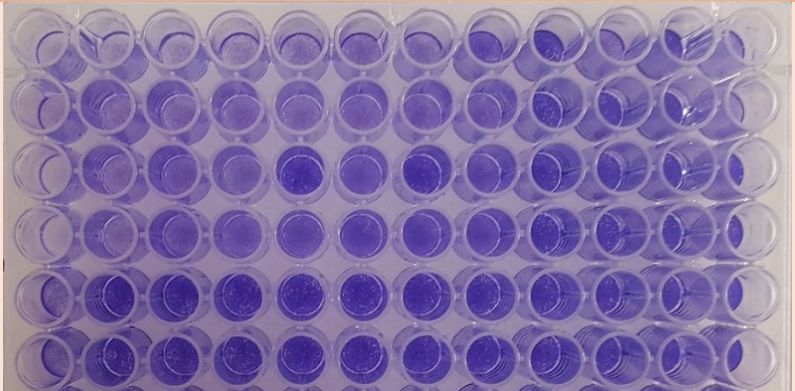
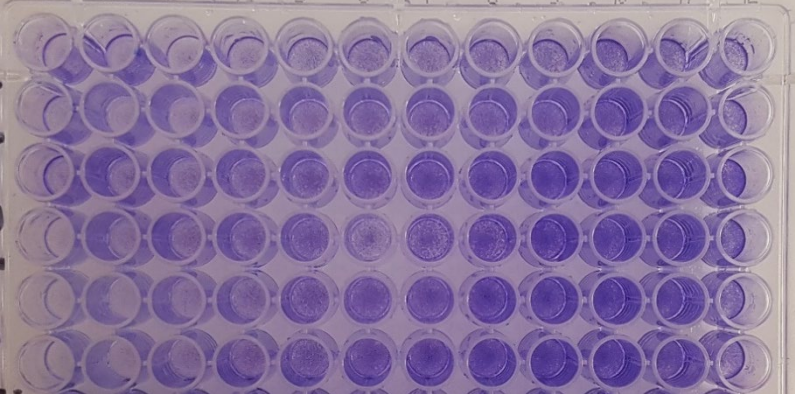
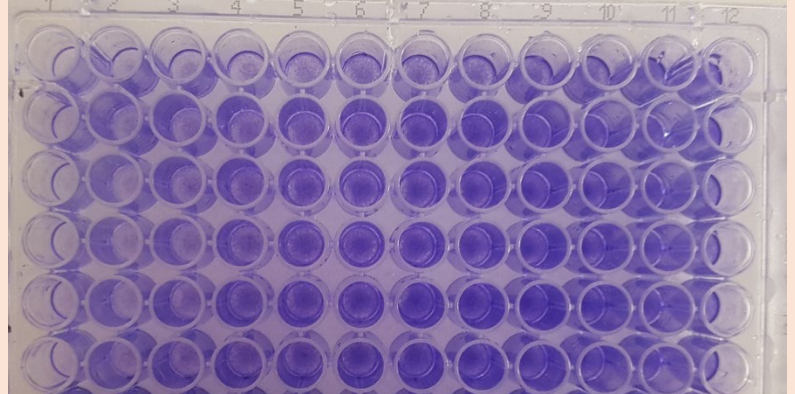
Tablo 4.7. Deney gruplarının hesaplanmış DKID₅₀ değerleri.

Örnek	Açıklama	DKID ₅₀ / ml Değeri
1	CRL-5807	0
2	THP-1 M0	$10^{1,82}$
3	MKH	0
4	CRL-5807 + IBV	$10^{2,57}$
5	CRL-5807 + IBV + THP-1 M0	$10^{2,13}$
6	CRL-5807 + IBV + THP-1 M0 + MKH	$10^{2,11}$
7	CRL-5807 + IBV + THP-1 M0 + MKH + Laden 10 μg / ml	$10^{1,69}$
8	CRL-5807 + IBV + THP-1 M0 + MKH + Laden 1 μg / ml	$10^{1,87}$
9	CRL-5807 + IBV + THP-1 M0 + MKH + Laden 0,1 μg / ml	$10^{1,87}$

Tablo 4.8. Deney gruplarının süpernatantları ile yapılan DKID₅₀ testinde pleytlerin 72. saatte 10X büyütmede çekilmiş fotoğrafları.

CRL-5807	THP-1 M0	MKH
		
CRL-5807 + IBV	CRL-5807 + IBV + THP-1 M0	CRL-5807 + IBV + THP-1 M0 + MKH
		
CRL-5807 + IBV + THP-1 M0 + MKH + <i>C. creticus</i> 10 µg / ml	CRL-5807 + IBV + THP-1 M0 + MKH + <i>C. creticus</i> 1 µg / ml	CRL-5807 + IBV + THP-1 M0 + MKH + <i>C. creticus</i> 0,1 µg / ml
		

Tablo 4.9. DKID₅₀ pleytlerinin boyandıktan sonraki görüntüleri.

	DKID ₅₀ Pleytleri
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	

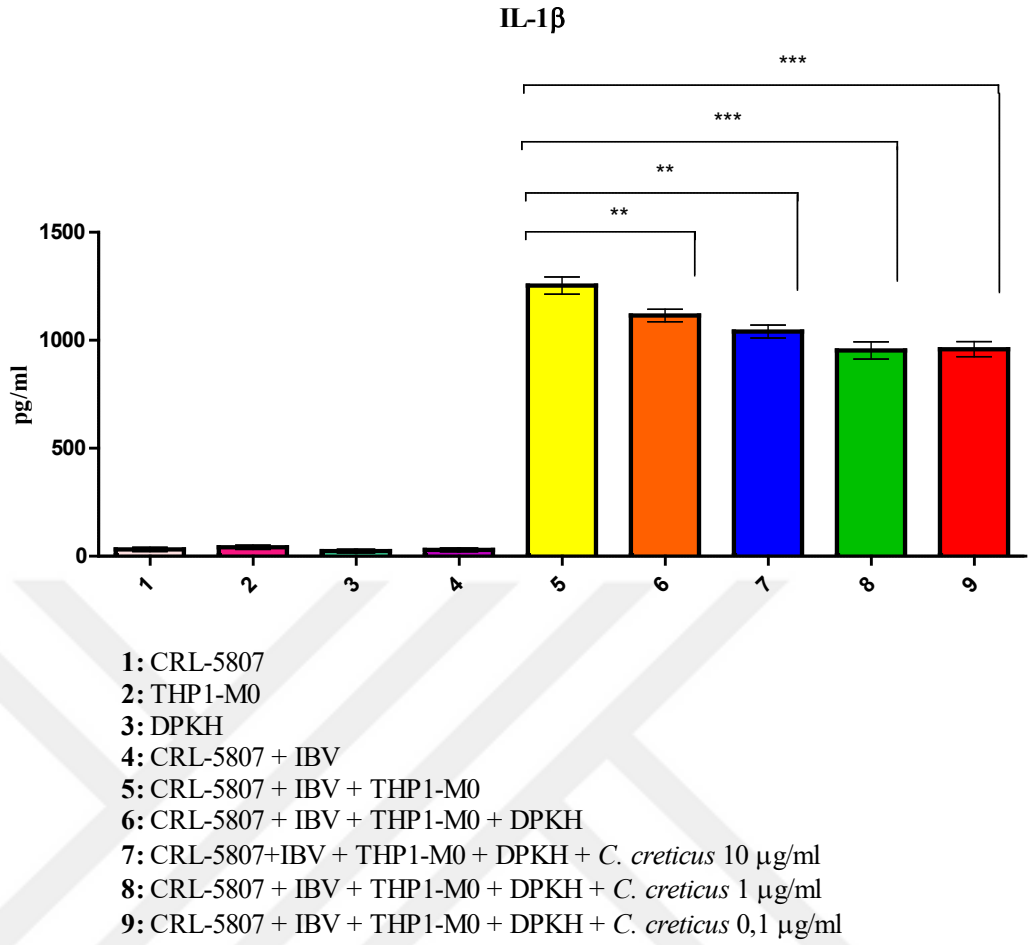
4.1.6 Üçlü ko-kültür modelinde IL-1 β ve TNF- α 'nın tespiti ve DPMKH'lerin immünomodülatör aktivitesinin belirlenmesi

IL-1 β ve TNF- α sitokin seviyelerinin tespiti için ELISA testleri gerçekleştirilmiştir, sonuçlar pg/ml cinsinden hesaplanmış, istatistiksel analizleri t testi ile GraphPad program kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlarda IL-1 β için CRL-5807 + IBV + THP-1 M0 bulunan grubun değeri ile CRL-5807 + IBV + THP-1 M0 + MKH

bulunan grubun değeri karşılaştırıldığında CRL-5807 + IBV + THP-1 M0 + MKH için anlamlı bir sitokin azalışı ($P \leq 0.01$), CRL-5807 + IBV + THP-1 M0 + MKH + *C. creticus* ekstraktı eklenmiş gruplar arasında konsantrasyona bağımlı olarak anlamlı bir sitokin azalması tespit edilmiştir ($P \leq 0.01$) (Şekil 4.5, Tablo 4.10).

Tablo 4.10. IL-1 β sitokin seviyeleri verilmiştir.

Deney Grubu	Sitokin Seviyeleri (pg / ml)
1	31,29 $\pm$ 10,01
2	41,29 $\pm$ 10,01
3	23,57 $\pm$ 2,50
4	29,46 $\pm$ 2,00
5	1253,29 $\pm$ 40,40
6	1114,68 $\pm$ 29,26
7	1040,84 $\pm$ 30,03
8	952,70 $\pm$ 40,27
9	958,76 $\pm$ 35,13

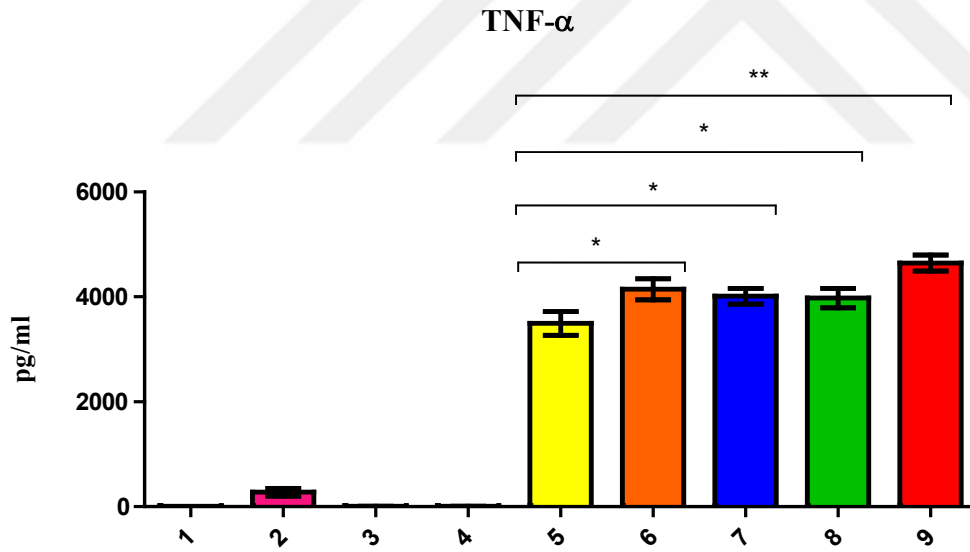


Şekil 4.5. Deney gruplarının açıklamaları ve IL-1 β sitokin seviyeleri.

TNF- α sitokini ölçümlerinde, CRL-5807 + IBV + THP-1 M0 bulunan grubun değeri ile CRL-5807 + IBV + THP-1 M0 + MKH bulunan grubun değeri kıyaslandığında CRL-5807 + IBV + THP-1 M0 + MKH için anlamlı bir sitokin artışı tespit edilmiş ($P \leq 0.05$), CRL-5807 + IBV + THP-1 M0 + MKH *C. creticus* ekstraktı eklenmiş gruplar arasında anlamlı bir sitokin artması tespit edilmiştir ($P \leq 0.01$) (Şekil 4.6, Tablo 4.11).

Tablo 4.11. TNF- α sitokin seviyeleri.

Deney Grubu	Sitokin Seviyeleri (pg / ml)
1	8,02 $\pm$ 1,00
2	274,85 $\pm$ 75,00
3	5,49 $\pm$ 1,50
4	6,14 $\pm$ 1,55
5	3490,88 $\pm$ 226,67
6	4141,40 $\pm$ 200,55
7	4008,92 $\pm$ 150,79
8	3974,45 $\pm$ 185,90
9	4640,43 $\pm$ 150,91



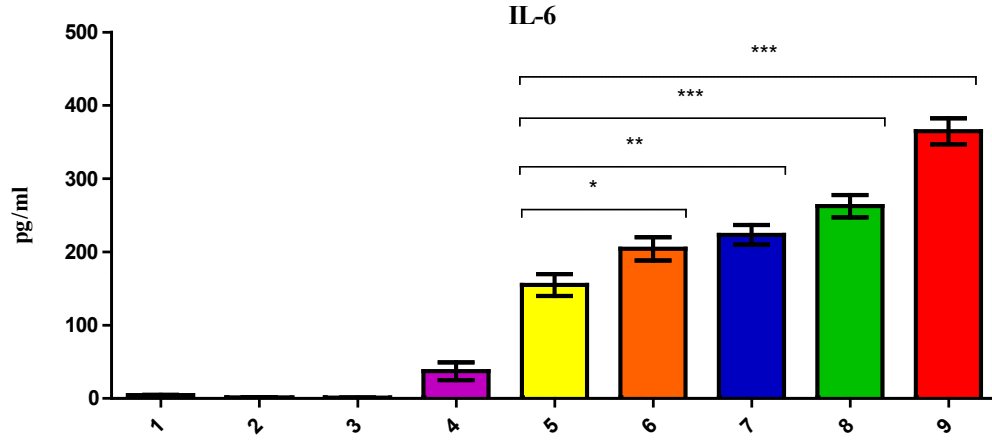
- 1: CRL-5807
 2: THP1-M0
 3: DPKH
 4: CRL-5807 + IBV
 5: CRL-5807 + IBV + THP1-M0
 6: CRL-5807 + IBV + THP1-M0 + DPKH
 7: CRL-5807+IBV + THP1-M0 + DPKH + *C. creticus* 10 μ g/ml
 8: CRL-5807 + IBV + THP1-M0 + DPKH + *C. creticus* 1 μ g/ml
 9: CRL-5807 + IBV + THP1-M0 + DPKH + *C. creticus* 0,1 μ g/ml

Şekil 4.6. Deney gruplarının açıklamaları ve TNF- α sitokin seviyeleri.

IL-6 sitokin ölçümlerinde, CRL-5807 + IBV + THP-1 M0 bulunan grubun değeri ile CRL-5807 + IBV + THP-1 M0 + MKH bulunan grubun değeri için anlamlı bir sitokin artışı tespit edilmiştir. CRL-5807 + IBV + THP-1 M0 + MKH *C. creticus* ekstraktı eklenmiş gruplar arasında anlamlı ve doz artışı ile ters orantılı sititokin seviyesi azalması tespit edilmiştir ($P \leq 0.001$) (Şekil 4.7, Tablo 4.12).

Tablo 4.12. IL-6 sitokin seviyeleri.

Deney Grubu	Sitokin Seviyeleri (pg / ml)
1	4,58 ± 0,45
2	1,47 ± 0,25
3	1,01 ± 0,10
4	37,16 ± 12,00
5	154,83 ± 15,00
6	204,23 ± 15,79
7	223,32 ± 13,42
8	262,54 ± 15,23
9	364,71 ± 17,91

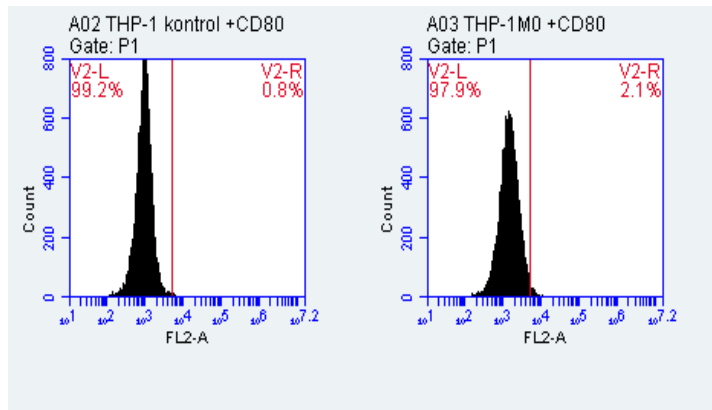


- 1: CRL-5807
 2: THP1-M0
 3: DPKH
 4: CRL-5807 + IBV
 5: CRL-5807 + IBV + THP1-M0
 6: CRL-5807 + IBV + THP1-M0 + DPKH
 7: CRL-5807+IBV + THP1-M0 + DPKH + *C. creticus* 10 µg/ml
 8: CRL-5807 + IBV + THP1-M0 + DPKH + *C. creticus* 1 µg/ml
 9: CRL-5807 + IBV + THP1-M0 + DPKH + *C. creticus* 0,1 µg/ml

Şekil 4.7. Deney gruplarının açıklamaları ve IL-6 sitokin seviyeleri.

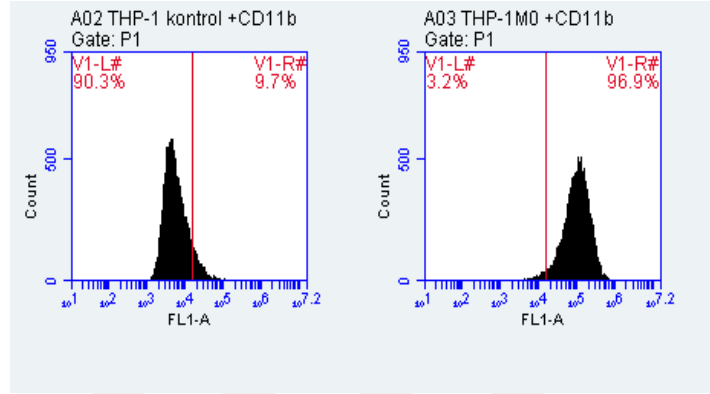
4.1.7 Akış sitometri ile THP-1 hücrelerinin M0 makrofajlara farklılaşma analizi

CD80 antikoruna ile boyanmamış ve PMA ile muamele edilmemiş THP-1 kontrol olarak kullanılan hücreler cihazda okutulmuştur. CD80 antikoruna oranı %0.8 olarak bulunmuştur. PMA ile muamele edilmiş ve CD80 antikoruna ile boyanmış hücreler cihazda okutulduğunda boyanma oranları %2.1 olarak bulunmuştur (Şekil 4.8).



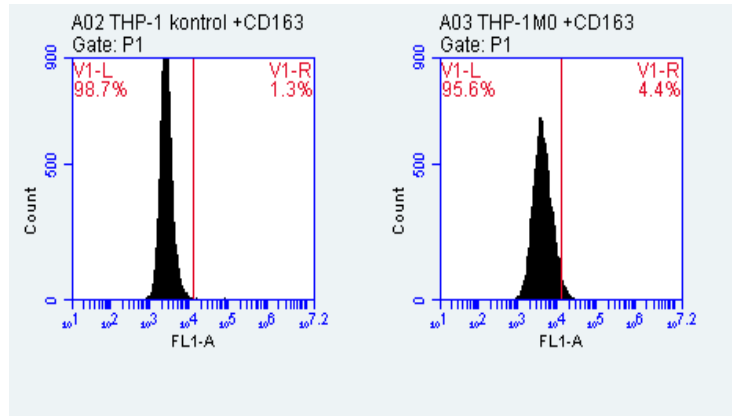
Şekil 4.8. THP-1 hücreleri ve farklılaştırılmış THP-1 M0 hücrelerinin CD80 antikoruna ekspresyonu tespiti için gerçekleştirilmiş akış sitometri analizleri.

PMA ile muamele edilmemiş THP-1 kontrol olarak kullanılan hücreler cihazda okutulmuştur. CD11b antikoru oranı %9.7 olarak bulunmuştur. PMA ile muamele edilmiş ve CD11b antikoru ile boyanmış hücreler cihazda okutulduğunda boyanma oranları %96.9 olarak bulunmuştur (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. THP-1 hücreleri ve farklılaştırılmış THP-1 M0 hücrelerinin CD11b antikoru ekspresyonu tespiti için gerçekleştirilmiş akış sitometri analizleri.

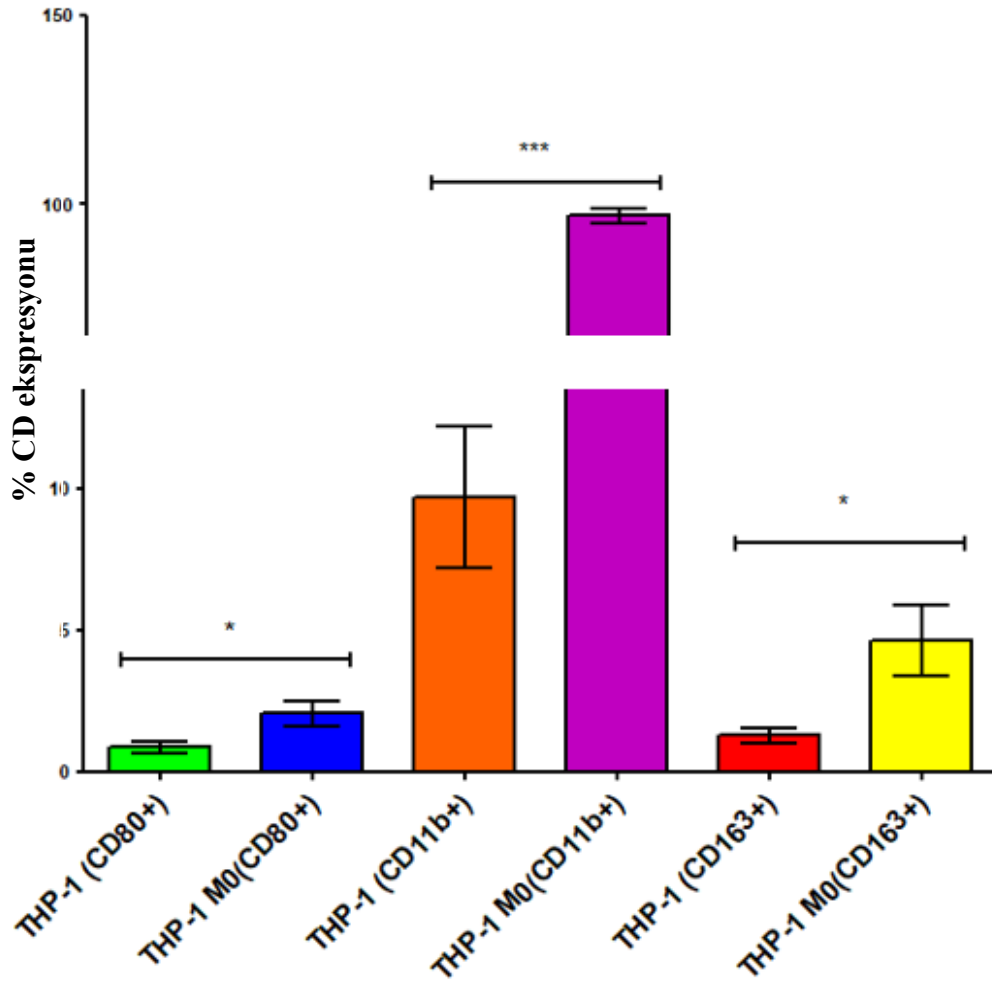
PMA ile muamele edilmemiş THP-1 kontrol olarak kullanılan hücreler cihazda okutulmuştur. CD163 antikoru ekspresyon oranı %1.3 olarak bulunmuştur. PMA ile muamele edilmiş ve CD163 antikoru ile boyanmış hücreler cihazda okutulduğunda boyanma oranları %96.9 olarak bulunmuştur (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. THP-1 hücreleri ve farklılaştırılmış THP-1 M0 hücrelerinin CD163 antikoru ekspresyonu tespiti için gerçekleştirilmiş akış sitometri analizleri.

Akış sitometri analizinden elde edilen sonuçlarda THP-1 hücreleri ile PMA ile muamele edilmiş THP-1 M0 makrofaj hücreleri karşılaştırıldığında CD80 yüzey markörü ekspresyon seviyeleri iki grup arasında sırasıyla $0,8 \pm 0,17$ ve $2,1 \pm 0,37$

olarak hesaplanmıştır ($p \leq 0,05$). THP-1 hücreleri ile PMA ile muamele edilmiş THP-1 M0 hücrelerinin CD11b yüzey markörü ekspresyonu seviyeleri karşılaştırıldığında sırasıyla $9,7 \pm 2,04$ ve $96,9 \pm 1,63$ olarak hesaplanmıştır ($p \leq 0,001$). THP-1 hücreleri ile PMA ile muamele edilmiş THP-1 M0 hücrelerinin CD163 yüzey markörü ekspresyonu $1,28 \pm 0,22$ ve $4,63 \pm 1,03$ olarak hesaplanmıştır ($p \leq 0,05$) (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. THP-1 ve THP-1 M0 hücrelerinin CD80, CD11b, CD163 markörleri ile işaretlenmiş akış sitometri analizi.

5. TARTIŞMA

DPMKH'lerin doku onarım/rejenerasyon potansiyeli ve büyük ölçekte üretiminin kolay olması gibi klinik avantajları sayesinde immunoterapi için aday olarak önerilmiştir (Sharma & Zhao, 2021; Zayed & Iohara, 2020). Mevcut bilgiler, hem hücresel hem de sekresyon düzeyinde inflamatuvar ortamdaki DPMKH'lerin diğer hücreler ile arasında güçlü bir etkileşim olduğunu göstermektedir (English, 2013; Yamada et al., 2019). Bu etkileşim, bir yandan immün hücrelerinin proliferasyon potansiyelini, hücre migrasyonunu, farklılaşmasını ve DPMKH'lerin gösterdiği inflamatuvar yanıtı belirler aynı zamanda da inflamatuvar mikroçevrenin modülasyonunu sağlar (Shi et al., 2020). Özellikle, anti-enflamatuvar ve pro-inflamatuvar etkiler dahil olmak üzere MKH'lerin çift yönlü modülasyon özelliği sayesinde sadece periodontal hastalıklarda değil, aynı zamanda çeşitli sistemik immünolojik hastalıklarda inflamatuvar dengenin korunmasında yeni doğal modülatör tedavi adayı yapar (Lan et al., 2019). Bu tez çalışması MKH'lerin anti-enflamatuvar etkilerinin daha derinden anlaşılması, antiviral ajanların ve MKH'lerin kombinasyonu ile potansiyel bir klinik tedavinin oluşturulmasının yolunu açabilecek niteliktedir. Bu çalışmada, proinflamatuvar sitokin olan TNF- α ve IL-1 β 'nın, oluşturulmuş model sistemde viral enfeksiyon sırasında ortaya çıkan inflamatuvar ortamda DPMKH'lerin anti-enflamatuvar etkileri gözlemlenmiştir.

Yakın zamanda yayınlanan çalışmalarda, MKH ile indüklenmiş monositlerin ve makrofajların polarizasyonu için sitokin sinyallerinden bağımsız bir yol ortaya çıkarılmıştır (Krasnodembskaya et al., 2012). Fare astım modelinde, MKH'ler akciğer makrofajları tarafından fagositoza uğramış, M2 immünosupresif makrofajların fenotipine dönüşmüştür (English et al., 2008). Kemik iliği kaynaklı MKH'lerin intravenöz uygulamasında, PBS kontrol grubuna kıyasla periferik kan monositlerinde artan fagositik aktivite görülmüştür, bununla birlikte M1 makrofaj polarizasyonunu kanıtlanmıştır (Weiss & Dahlke, 2019).

Enfeksiyon bölgesinde IL-6 salgılanması, doku hasarı onarımının gerçekleşmesi ve ayrıca immünosupresif ve pro-enflamatuvar aktiviteyi sağlamaktadır (K. Chen et al., 2010). Literatürde IL-1 β 'nin hem otokrin hem de parakrin yol ile, MKH'ler tarafından IL-6 üretiminin ana düzenleyisi olduğu

bildirilmiştir (K. Chen et al., 2010). Bunun yanında daha önceki çalışmalarda TNF- α üretiminin periferik kan mononükleer hücreleri üzerinde IL-1 β tarafından kontrol edildiği, IL-1 β üretiminin ise IL-6 salgılanmasını indüklediği gösterilmiştir (X. Li et al., 2015; Tsukihara et al., 2004). Daha önce literatürde gerçekleştirilen çalışmalarda MKH'lerin 5 ng/mL ve 10 ng/mL TNF- α bulunan ortamda IL-10 salgılanmasını anlamlı olarak artırdığı rapor edilmiştir, bu veri düşük dozda TNF- α ile uyarılmanın (5 ng/mL), MKH'lerin anti-enflamatuar sitokin sekresyonunu desteklediğini kanıtlar niteliktedir. Ortamda bulunan yüksek TNF- α konsantrasyonu, MKH sinyallerinin gen ekspresyonu seviyesinde regülasyonuna neden olmaktadır ve TNF- α ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand-reseptör 2 (TRAIL-R2) yolu ile apoptotozu indüklemektedir (Putra et al., 2018). Benzer bir çalışmada, TNF- α 'nın TRAIL-R2 yolu yoluyla apoptozu indükleyebileceği bildirmiştir (Z. Liu et al., 2017). TRAIL-R2, MKH'lerde eksprese edilen TNF reseptör ailesine ait spesifik bir hücre yüzeyi reseptörüdür (Screaton et al., 1997). Bu çalışmadaki TNF- α konsantrasyonu, çalışma hacmi ve enfekte akciğer hücresi, THP-1 M0 ve DPMKH hücrelerinin sayıları göz önüne alındığında literatürdeki çalışmalara göre daha yüksek seviyede TNF- α bulunması mümkündür, IL-6 ELISA sonuçlarındaki artışın bu nedenle gerçekleşmesi mümkündür.

IL-1 β pro inflammatuar bir sitokin olduğundan ELISA sonuçlarındaki DPMKH bulunan deney gruplarında sitokin miktarında azalma ölçülmüştür, buna bağlı olarak bu hücrelerin anti-enflamatuar ve immünomodülatör etkisi görülmektedir. Hücre kültüründe viral enfeksiyon koşulları altında IL-1 β sitokin seviyelerinin azalması *C. creticus* ekstraktının antiviral aktivitesini gösterir niteliktedir. *Cistus* bitkilerinden elde edilen ekstraktların antiviral aktivitesinin literatürde daha önceden belirtilmiş ve bu çalışmada sunulan sonuçlara dayanarak *C. creticus* ekstraktının antiviral ajan olarak kullanılmasında büyük potansiyele sahiptir. *C. creticus* ekstraktının *in vivo* antiviral terapötik uygulamalar için potansiyelinin değerlendirilmesi, gelecekte hücre hattı ve virüs cinsi açısından kapsamlı araştırmalar gerektirecektir. Bu yönde önemli bir adım, bu tez çalışmasında *C. creticus* ekstraktının IBV gibi dünya çapında geniş aktivitesi olan bir virüse karşı antiviral ajan olarak tanımlanmasıdır. Bunun yanında *C. creticus* özütünün insan akciğer kanseri üzerinde sitotoksik bir etki göstermediği bulunmuştur

Çalışmada, *C. creticus* ekstraktı IBV ile enfekte CRL-5807 hücrelerinin bulunduğu gruplar ile kıyaslandığında DKID₅₀ değerlerini önemli ölçüde azaltmıştır bu nedenle yeni antiviral ajanların keşfi için bir potansiyele sahiptir. Günümüzde doğal ürünler, sentetik ilaçlar ile karşılaştırıldığında sınırlı kimyasal çeşitlilik kısıtlamalarının üstesinden geldikleri için ilaç keşfi için yeniden popülerlik kazanmaktadır (Vorotilin & Loevskiï, 1986). Ayrıca, doğal ürünler geçmişte ilaç geliştirme çalışmaları için çok başarılı yol göstericiler olduklarını kanıtlamış ve onaylanan ilaçların büyük kısmı doğal ürünlere dayalı yada doğal ürünlerden türetilmiştir (Martinez et al., 2015).

Doğal bağışıklık hücrelerinin MKH'ler tarafından modülasyonuna hücre zarında bulunan reseptörler ve hücre-hücre etkileşimleri aracılık etmektedir. CD54, MKH'lerde en yüksek düzeyde eksprese edilen adhezyon molekülüdür ve ekspresyonu inflamatuvar moleküller tarafından arttırılmaktadır (Ren et al., 2010). Birkaç çalışma, CD54'ün, CD54-LFA-1 etkileşimi yoluyla makrofaj polarizasyonunu değiştirdiğini göstermiştir. Fare ko-kültür sisteminde, Takizawa ve ark. MKH'ler ve makrofajlar arasındaki CD54-LFA1 etkileşiminin hipoksik koşullar altında M2-makrofajların farklılaşmasını ve çoğalmasını indüklediğini göstermiştir (Takizawa et al., 2017). MKH'ler CD54 yoluyla fonksiyonel etkileşim sağlamak ve M2 makrofajları aktive etmektedir. MKH'ler, enfeksiyon alanında bulunan makrofajlar ile direkt ko-kültürlendiğinde fonksiyonlarını değiştirmekte ve immünosupresif kapasitelerini arttırmaktadır (Espagnolle et al., 2017). Bu çalışmada ise literatürdeki makrofaj ve kök hücre temasının sitokin ekspresyonu seviyelerinde neden olabileceği etkiler göz önünde bulundurulmuştur. Bu bilgilere bilgilere dayanılarak direkt üçlü ko-kültür modeli oluşturulmuştur.

Akış sitometri sonuçlarından elde edilen verilere göre THP-1 M0 hücreleri literatüre uygun olarak CD80 ve CD163 antikörlerini yüzeylerinde eksprese etmemiştir. Bunun yanında CD11b antikoru literature uygun olarak hücre yüzeylerinde tespit edilmiştir ($P \leq 0,001$). Akış sitometrisi ile yapılan analizler sonucunda PMA ile muamelede THP-1 hücrelerinin monosit fenotipinden M0 makrofaj fenotipine başarılı bir şekilde farklılaştığı kanıtlanmıştır ($P \leq 0,001$).

Deney gruplarının mikroskop fotoğrafları incelendiğinde enfekte akciğer hücrelerinin üzerine ve yakınına tutunmakta olan makrofajlar gözlemlenmiştir. Bu gözleme ve akış sitometri sonuçlarına dayanarak makrofajların fiziksel olarak gerçeğe uygun şekilde davrandığı sonucuna ulaşılabilir, enfekte hücrelerin üzerine eklenen THP-1 M0 makrofajlarının olduğu gruplarda virüs titresinin azalması da bu tespiti kanıtar niteliktedir. Bunun yanında, MKH'lerin ko-kültür ortamına eklendikten 24 saat sonra çekilen fotoğraflarda literatüre uygun olarak sitopatik etki veya sinsityum benzeri herhangi bir enfeksiyon morfolojisi ile karşılaşılmamıştır.

Embriyolu yumurta, bir embriyo ve onun destekleyici zarlarından (koryoallantoik, amniyotik, yumurta sarısı) oluşan karmaşık bir yapıdır. Gelişmekte olan embriyo ve zarları, çok çeşitli farklı virüslerin başarılı bir şekilde kopyalanması için ihtiyaç duyulan hücre tiplerinin çeşitliliğini sağlar. Coronaviridae ailesi içinde embriyonlu yumurta, IBV için konakçı sistem olarak kullanılmıştır (Guy, 2008), ancak sülün koronavirüsü için de uygun olduğu gösterilmiştir. IBV, aşılama yolundan bağımsız olarak embriyonlu tavuk yumurtasında iyi çoğalır; bununla birlikte, virüs koryoallantoik membranda geniş ölçüde çoğaldığından ve allantoik sıvıda yüksek titreler bulunduğundan allantoik yol tercih edilir (Chomiak et al., 1958). Embriyolu yumurtalar ayrıca diğer yeni koronavirüs türlerini tanımlamayı amaçlayan çalışmalar için potansiyel bir konak sistemi sağlar. Bu tez çalışmasında embriyolu yumurtalarda IBV D-274 suşu başarılı bir şekilde çoğaltılmıştır. Çoğaltılan virüsün sitopatik etki oluşturma özelliği ve seri pasajlama işlemi ile memeli hücre kültürüne adaptasyon özelliği bulunmaktadır. IBV D-274 suşunun CRL-5807 insan alveolar tip 2 hücreli akciğer kanseri hücre hattı üzerinde enfeksiyon oluşturabildiği kanıtlanmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, *C. creticus* ekstraktı yeni antiviral ajanların keşfi için bir potansiyele sahiptir. Günümüzde doğal ürünler, sentetik ilaçlar ile karşılaştırıldığında sınırlı kimyasal çeşitlilik kısıtlamalarının üstesinden geldikleri için ilaç keşfi için yeniden popülerlik kazanmaktadır (Vorotilin & Loevskii, 1986). Ayrıca, doğal ürünler geçmişte ilaç geliştirme için çok başarılı yol göstericiler olduklarını kanıtlamış ve onaylanan ilaçların büyük kısmı doğal ürünlere dayalı yada doğal ürünlerden türetilmiştir (Martinez et al., 2015). Bu çalışmada kullanılan *C. creticus* ekstraktının antiviral özelliği ile umut verici bir antiviral doğal ürün adayı olduğu kanıtlanmıştır.

MKH'lerin de rol oynadığı klinik tedaviler, halihazırda viral enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde uygulanmaktadır. Bunun yanısıra günümüzde birçok insanın hayatını kaybetmesine neden olan COVID-19 solunum yolu sıkıntısı, sitokin fırtınası ve diğer solunum yolu viral enfeksiyonları için umut verici bir terapötik strateji olabilme potansiyeline sahiptir. MKH ve virüs arasındaki etkileşim ve MKH'lerin ve viral enfeksiyonlardaki patolojinin ve hastalık seyrinin saptanmasında klinik bilgiler büyük ölçüde bilinmediğinden, enfeksiyon ortamındaki davranışları ele alan daha fazla modelleme çalışması yapılmalıdır, gelecekteki çalışmalar bu alandaki bilinmeyen mekanizmaları daha iyi açıklayacaktır. MKH'ler ve virüs arasındaki etkileşimin daha iyi anlaşılması, ve kök hücrelerin tedavi olarak kullanımının güvenliğini ve etkinliğini açıkça ortaya koyacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdel-Moneim, A. S.** (2017). *Coronaviridae: Infectious Bronchitis Virus BT - Emerging and Re-emerging Infectious Diseases of Livestock* (J. Bayry (ed.); pp. 133–166). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47426-7_5
- Afarid, M., & Sanie-Jahromi, F.** (2021). Mesenchymal Stem Cells and COVID-19: Cure, Prevention, and Vaccination. *Stem Cells International*, 2021, 6666370. <https://doi.org/10.1155/2021/6666370>
- Aggarwal, S., & Pittenger, M. F.** (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 105(4), 1815–1822. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1559>
- Asari, S., Itakura, S., Ferreri, K., Liu, C.-P., Kuroda, Y., Kandeel, F., & Mullen, Y.** (2009). Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation. *Experimental Hematology*, 37(5), 604–615. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2009.01.005>
- Bande, F., Arshad, S. S., Bejo, M. H., Moeini, H., & Omar, A. R.** (2015). Progress and challenges toward the development of vaccines against avian infectious bronchitis. *Journal of Immunology Research*, 2015, 424860. <https://doi.org/10.1155/2015/424860>
- Barrajón-Catalán, Enrique & Fernández Arroyo, Salvador & Roldán-Segura, Cristina & Guillén, Emilio & Saura, Domingo & Segura Carretero, Antonio & Micol, Vicente.** (2011). A Systematic Study of the Polyphenolic Composition of Aqueous Extracts Deriving from Several Cistus Genus Species: Evolutionary Relationship. *Phytochemical analysis : PCA*. 22. 303-12. [10.1002/pca.1281](https://doi.org/10.1002/pca.1281).
- Beach, J. R., & Schalm, O. W.** (1936). A Filterable Virus, Distinct from that of Laryngotracheitis, the Cause of a Respiratory Disease of Chicks1. *Poultry Science*, 15(3), 199–206. <https://doi.org/https://doi.org/10.3382/ps.0150199>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Beyth, S., Borovsky, Z., Mevorach, D., Liebergall, M., Gazit, Z., Aslan, H., Galun, E., & Rachmilewitz, J.** (2005). Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood*, 105(5), 2214–2219. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-07-2921>
- Blanco-Melo, D., Nilsson-Payant, B. E., Liu, W.-C., Uhl, S., Hoagland, D., Möller, R., Jordan, T. X., Oishi, K., Panis, M., Sachs, D., Wang, T. T., Schwartz, R. E., Lim, J. K., Albrecht, R. A., & tenOever, B. R.** (2020). Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell*, 181(5), 1036-1045.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.026>
- Bertani, F. R., Mozetic, P., Fioramonti, M., Iuliani, M., Ribelli, G., Pantano, F., Santini, D., Tonini, G., Trombetta, M., Businaro, L., Selci, S., & Rainer, A.** (2017). Classification of M1/M2-polarized human macrophages by label-free hyperspectral reflectance confocal microscopy and multivariate analysis. *Scientific reports*, 7(1), 8965. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08121-8>
- Brauer R, Chen P.** Influenza virus propagation in embryonated chicken eggs. *J Vis Exp*. 2015 Mar 19;(97):52421. doi: 10.3791/52421. PMID: 25867050; PMCID: PMC4401370.
- Bru T, Vila R, Cabana M, Geerligs HJ.** Protection of chickens vaccinated with combinations of commercial live infectious bronchitis vaccines containing Massachusetts, Dutch and QX-like serotypes against challenge with virulent infectious bronchitis viruses 793B and IS/1494/06 Israel variant 2. *Avian Pathol*. 2017 Feb;46(1):52-58. doi: 10.1080/03079457.2016.1203393. Epub 2016 Oct 17. PMID: 27400065.
- Cavanagh D.** Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Vet Res*. 2007 Mar-Apr;38(2):281-97. doi: 10.1051/vetres:2006055. Epub 2007 Feb 13. PMID: 17296157.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cevik, Kuppalli, K., Kindrachuk, J., & Peiris, M. (2020). Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2. *BMJ*, 371. <https://doi.org/10.1136/bmj.m3862>
- Chan, M. C. W., Kuok, D. I. T., Leung, C. Y. H., Hui, K. P. Y., Valkenburg, S. A., Lau, E. H. Y., Nicholls, J. M., Fang, X., Guan, Y., Lee, J. W., Chan, R. W. Y., Webster, R. G., Matthay, M. A., & Peiris, J. S. M. (2016). Human mesenchymal stromal cells reduce influenza A H5N1-associated acute lung injury in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(13), 3621–3626. <https://doi.org/10.1073/pnas.1601911113>
- Chen, H. Y., Guo, A. Z., Peng, B., Zhang, M. F., Guo, H. Y., & Chen, H. C. (2007). Infection of HeLa cells by avian infectious bronchitis virus is dependent on cell status. *Avian Pathology*, 36(4), 269–274. <https://doi.org/10.1080/03079450701447291>
- Chen, K., Wang, D., Du, W. T., Han, Z.-B., Ren, H., Chi, Y., Yang, S. G., Zhu, D., Bayard, F., & Han, Z. C. (2010). Human umbilical cord mesenchymal stem cells hUC-MSCs exert immunosuppressive activities through a PGE2-dependent mechanism. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, 135(3), 448–458. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2010.01.015>
- Chomiak, T. W., Luginbuhl, R. E., & Jungherr, E. L. (1958). The Propagation and Cytopathogenic Effect of an Egg-Adapted Strain of Infectious Bronchitis Virus in Tissue Culture. *Avian Diseases*, 2(4), 456–465. <https://doi.org/10.2307/1587486>
- Cipriani, P., Ruscitti, P., Di Benedetto, P., Carubbi, F., Liakouli, V., Berardicurti, O., Ciccia, F., Triolo, G., & Giacomelli, R. (2015). Mesenchymal stromal cells and rheumatic diseases: new tools from pathogenesis to regenerative therapies. *Cytotherapy*, 17(7), 832–849. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.12.006>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cook, J. K. A., Jackwood, M., & Jones, R. C.** (2012). The long view: 40 years of infectious bronchitis research. *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A*, 41(3), 239–250. <https://doi.org/10.1080/03079457.2012.680432>
- Deshmukh, V., Tripathi, S. C., Pandey, A., Deshmukh, V., Vykoukal, J., Patil, A., & Sontakke, B.** (2020). COVID-19: a conundrum to decipher. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 24(10), 5830–5841. https://doi.org/10.26355/eurev_202005_21378
- Demetzos C, Dimas K, Hatziantoniou S, Anastasaki T, Angelopoulou D.** Cytotoxic and anti-inflammatory activity of labdane and cis-clerodane type diterpenes. *Planta Med.* 2001 Oct;67(7):614-8. doi: 10.1055/s-2001-17362. PMID: 11582537.
- Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanesi, M., Longoni, P. D., Matteucci, P., Grisanti, S., & Gianni, A. M.** (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 99(10), 3838–3843. <https://doi.org/10.1182/blood.v99.10.3838>
- Drosten, C., Günther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H.-R., Becker, S., Rabenau, H., Panning, M., Kolesnikova, L., Fouchier, R. A. M., Berger, A., Burguière, A.-M., Cinatl, J., Eickmann, M., Escriou, N., Grywna, K., Kramme, S., Manuguerra, J.-C., Müller, S., ... Doerr, H. W.** (2003). Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 348(20), 1967–1976. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030747>
- English, K.** (2013). Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunology and Cell Biology*, 91(1), 19–26. <https://doi.org/10.1038/icb.2012.56>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Espagnolle, N., Balguerie, A., Arnaud, E., Sensebé, L., & Varin, A. (2017).** CD54-Mediated Interaction with Pro-inflammatory Macrophages Increases the Immunosuppressive Function of Human Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cell Reports*, 8(4), 961–976. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.02.008>
- Fang, S. G., Shen, S., Tay, F. P. L., & Liu, D. X. (2005).** Selection of and recombination between minor variants lead to the adaptation of an avian coronavirus to primate cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 336(2), 417–423. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.105>
- Fara, A., Mitrev, Z., Rosalia, R. A., & Assas, B. M. (2021).** Cytokine storm and COVID-19: a chronicle of pro-inflammatory cytokines. *Open Biology*, 10(9), 200160. <https://doi.org/10.1098/rsob.200160>
- Florindo, H. F., Kleiner, R., Vaskovich-Koubi, D., Acúrcio, R. C., Carreira, B., Yeini, E., Tiram, G., Liubomirski, Y., & Satchi-Fainaro, R. (2020).** Immune-mediated approaches against COVID-19. *Nature Nanotechnology*, 15(8), 630–645. <https://doi.org/10.1038/s41565-020-0732-3>
- Fujiwara, N., & Kobayashi, K. (2005).** Macrophages in inflammation. *Current Drug Targets. Inflammation and Allergy*, 4(3), 281–286. <https://doi.org/10.2174/1568010054022024>
- Gao, F., Chiu, S. M., Motan, D. A. L., Zhang, Z., Chen, L., Ji, H.-L., Tse, H.-F., Fu, Q.-L., & Lian, Q. (2016).** Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death & Disease*, 7(1), e2062–e2062. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.327>
- Glennie, S., Soeiro, I., Dyson, P. J., Lam, E. W.-F., & Dazzi, F. (2005).** Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*, 105(7), 2821–2827. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3696>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- González, J. M., Gomez-Puertas, P., Cavanagh, D., Gorbalenya, A. E., & Enjuanes, L.** (2003). A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family Coronaviridae. *Archives of Virology*, 148(11), 2207–2235. <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0162-1>
- Gordon, S., Plüddemann, A., & Martinez Estrada, F.** (2014). Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunological Reviews*, 262(1), 36–55. <https://doi.org/10.1111/imr.12223>
- Gratchev, A., Schledzewski, K., Guillot, P., & Goerdts, S.** (2001). Alternatively activated antigen-presenting cells: molecular repertoire, immune regulation, and healing. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, 14(5), 272–279. <https://doi.org/10.1159/000056357>
- Griffin, M. D., Elliman, S. J., Cahill, E., English, K., Ceredig, R., & Ritter, T.** (2013). Concise review: adult mesenchymal stromal cell therapy for inflammatory diseases: how well are we joining the dots? *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 31(10), 2033–2041. <https://doi.org/10.1002/stem.1452>
- Grossi, A., Pierdomenico, L., Bonsi, L., Marchionni, C., Alviano, F., Fossati, V., Becchetti, E., Calvitti, M., Arpinati, M., Chirubolo, G., Bagnara, G., & Rondelli, D.** (2004). Differentiation and Immunoregulatory Activity of Dental Pulp-Derived Mesenchymal Cells. *Blood*, 104, 4245. <https://doi.org/10.1182/blood.V104.11.4245.4245>
- Guy, J. S.** (2008). Isolation and propagation of coronaviruses in embryonated eggs. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 454, 109–117. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-181-9_10
- Habibi M, Karimi V, Langeroudi AG, Ghafouri SA, Hashemzadeh M, Farahani RK, Maghsoudloo H, Abdollahi H, Seifouri P.** Combination of H120 and 1/96 avian infectious bronchitis virus vaccine strains protect chickens against challenge with IS/1494/06 (variant 2)-like infectious bronchitis virus. *Acta Virol.* 2017;61(2):150-160. doi: 10.4149/av_2017_02_04. PMID: 28523921.

- Han, D. P., Lohani, M., & Cho, M. W.** (2007). Specific asparagine-linked glycosylation sites are critical for DC-SIGN- and L-SIGN-mediated severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Journal of Virology*, 81(21), 12029–12039. <https://doi.org/10.1128/JVI.00315-07>
- Ivanova, E. A., & Orekhov, A. N.** (2016). Monocyte Activation in Immunopathology: Cellular Test for Development of Diagnostics and Therapy. *Journal of Immunology Research*, 2016, 4789279. <https://doi.org/10.1155/2016/4789279>
- Karadağ, A. E., Çaşkurlu, A., Okur, M. E., Guzelmeric, E., Okur, N. Ü., Tosun, F., Yesilada, E., & Demirci, F.** (2020). Hemostatic Activity of Cistus creticus Extract in Wistar Albino Rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 30(6), 844–847. <https://doi.org/10.1007/s43450-020-00120-7>
- Khatri, M., Richardson, L. A., & Meulia, T.** (2018). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles attenuate influenza virus-induced acute lung injury in a pig model. *Stem Cell Research & Therapy*, 9(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0774-8>
- Kim, J., & Hematti, P.** (2009). Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Experimental Hematology*, 37(12), 1445–1453. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2009.09.004>
- Krampera, M., Cosmi, L., Angeli, R., Pasini, A., Liotta, F., Andreini, A., Santarlasci, V., Mazzinghi, B., Pizzolo, G., Vinante, F., Romagnani, P., Maggi, E., Romagnani, S., & Annunziato, F.** (2006). Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 24(2), 386–398. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0008>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Krasnodembskaya, A., Samarani, G., Song, Y., Zhuo, H., Su, X., Lee, J.-W., Gupta, N., Petrini, M., & Matthay, M. A.** (2012). Human mesenchymal stem

cells reduce mortality and bacteremia in gram-negative sepsis in mice in part by enhancing the phagocytic activity of blood monocytes. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 302(10), L1003–L1013. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00180.2011>

Lai, M. M., & Cavanagh, D. (1997). The molecular biology of coronaviruses. *Advances in Virus Research*, 48, 1–100. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)60286-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60286-9)

Lan, X., Sun, Z., Chu, C., Boltze, J., & Li, S. (2019). Dental Pulp Stem Cells: An Attractive Alternative for Cell Therapy in Ischemic Stroke. *Frontiers in Neurology*, 10, 824. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00824>

Lee, S., Zhang, Q. Z., Karabucak, B., & Le, A. D. (2016). DPSCs from Inflamed Pulp Modulate Macrophage Function via the TNF- α /IDO Axis. *Journal of Dental Research*, 95(11), 1274–1281. <https://doi.org/10.1177/0022034516657817>

Leng, Z., Zhu, R., Hou, W., Feng, Y., Yang, Y., Han, Q., Shan, G., Meng, F., Du, D., Wang, S., Fan, J., Wang, W., Deng, L., Shi, H., Li, H., Hu, Z., Zhang, F., Gao, J., Liu, H., ... Zhao, R. C. (2020). Transplantation of ACE2(-) Mesenchymal Stem Cells Improves the Outcome of Patients with COVID-19 Pneumonia. *Aging and Disease*, 11(2), 216–228. <https://doi.org/10.14336/AD.2020.0228>

Letko, M., Marzi, A., & Munster, V. (2020). Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nature Microbiology*, 5(4), 562–569. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0688-y>

Li, M.-Y., Li, L., Zhang, Y., & Wang, X.-S. (2020). Expression of the SARS-CoV-2 cell receptor gene ACE2 in a wide variety of human tissues. *Infectious Diseases of Poverty*, 9(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s40249-020-00662-x>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Li, X., Du, W., Ma, F. X., Feng, X., Bayard, F., & Han, Z. C. (2015). High Concentrations of TNF- α Induce Cell Death during Interactions between Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells and Peripheral Blood

Mononuclear Cells. *PLOS ONE*, 10(5), e0128647.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128647>

Li, Y., Xu, J., Shi, W., Chen, C., Shao, Y., Zhu, L., Lu, W., & Han, X. (2016). Mesenchymal stromal cell treatment prevents H9N2 avian influenza virus-induced acute lung injury in mice. *Stem Cell Research & Therapy*, 7(1), 159.
<https://doi.org/10.1186/s13287-016-0395-z>

Liang, B., Chen, J., Li, T., Wu, H., Yang, W., Li, Y., Li, J., Yu, C., Nie, F., Ma, Z., Yang, M., Xiao, M., Nie, P., Gao, Y., Qian, C., & Hu, M. (2020). Clinical remission of a critically ill COVID-19 patient treated by human umbilical cord mesenchymal stem cells: A case report. *Medicine*, 99(31), e21429–e21429.
<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000021429>

Liu, H., Sidiropoulos, P., Song, G., Pagliari, L. J., Birrer, M. J., Stein, B., Anrather, J., & Pope, R. M. (2000). TNF-alpha gene expression in macrophages: regulation by NF-kappa B is independent of c-Jun or C/EBP beta. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 164(8), 4277–4285.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.8.4277>

Liu, J., Zheng, X., Tong, Q., Li, W., Wang, B., Sutter, K., Trilling, M., Lu, M., Dittmer, U., & Yang, D. (2020). Overlapping and discrete aspects of the pathology and pathogenesis of the emerging human pathogenic coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and 2019-nCoV. *Journal of Medical Virology*, 92(5), 491–494. <https://doi.org/10.1002/jmv.25709>

Liu, P. P., Blet, A., Smyth, D., & Li, H. (2020). The Science Underlying COVID-19: Implications for the Cardiovascular System. *Circulation*, 142(1), 68–78.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047549>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Liu, Z., Gao, L., Wang, P., Xie, Z., Cen, S., Li, Y., Wu, X., Wang, L., Su, H., Deng, W., Wang, S., Li, D., Li, J., Ouyang, Y., Wu, Y., & Shen, H. (2017). TNF- α Induced the Enhanced Apoptosis of Mesenchymal Stem Cells in

Ankylosing Spondylitis by Overexpressing TRAIL-R2. *Stem Cells International*, 2017, 4521324. <https://doi.org/10.1155/2017/4521324>

Maggi, F., Lucarini, D., Papa, F., Peron, G., & Dall'Acqua, S. (2016). Phytochemical analysis of the labdanum-poor *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus* (Viv.) Greuter et Burdet growing in central Italy. *Biochemical Systematics and Ecology*, 66, 50-57.

Mansourabadi, A. H., Sadeghalvad, M., Mohammadi-Motlagh, H.-R., & Rezaei, N. (2020). The immune system as a target for therapy of SARS-CoV-2: A systematic review of the current immunotherapies for COVID-19. *Life Sciences*, 258, 118185. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118185>

Martinez, J. P., Sasse, F., Brönstrup, M., Diez, J., & Meyerhans, A. (2015). Antiviral drug discovery: broad-spectrum drugs from nature. *Nat. Prod. Rep.*, 32(1), 29–48. <https://doi.org/10.1039/C4NP00085D>

Mastino, Patrizia & Marchetti, Mauro & Costa, Jean & Juliano, Claudia. (2018). Analysis And Potential Antimicrobial Activity Of Phenolic Compounds In Extracts Of *Cistus Creticus* Subspecies From Sardinia. *The Natural Products Journal*. 08. 10.2174/2210315508666180327151318.

Matthijs, M. G. R., van Eck, J. H. H., Landman, W. J. M., & Stegeman, J. A. (2003). Ability of Massachusetts-type infectious bronchitis virus to increase colibacillosis susceptibility in commercial broilers: a comparison between vaccine and virulent field virus. *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A.*, 32(5), 473–481. <https://doi.org/10.1080/0307945031000154062>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Muraca, M., Pessina, A., Pozzobon, M., Dominici, M., Galderisi, U., Lazzari, L., Parolini, O., Lucarelli, E., Perilongo, G., & Baraldi, E. (2020).** Mesenchymal stromal cells and their secreted extracellular vesicles as therapeutic tools for COVID-19 pneumonia? *Journal of Controlled Release*, 325, 135–140. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.06.036>
- Newman, R. E., Yoo, D., LeRoux, M. A., & Danilkovitch-Miagkova, A. (2009).** Treatment of inflammatory diseases with mesenchymal stem cells. *Inflammation & Allergy Drug Targets*, 8(2), 110–123. <https://doi.org/10.2174/187152809788462635>
- Nikitina, E., Larionova, I., Choinzonov, E., & Kzhyshkowska, J. (2018).** Monocytes and Macrophages as Viral Targets and Reservoirs. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 2821. <https://doi.org/10.3390/ijms19092821>
- Opal, S. M., & DePalo, V. A. (2000).** Anti-inflammatory cytokines. *Chest*, 117(4), 1162–1172. <https://doi.org/10.1378/chest.117.4.1162>
- Örd, M., Faustova, I., & Loog, M. (2020).** The sequence at Spike S1/S2 site enables cleavage by furin and phospho-regulation in SARS-CoV2 but not in SARS-CoV1 or MERS-CoV. *Scientific Reports*, 10(1), 16944. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74101-0>
- Peiris, J. S. M., Chu, C. M., Cheng, V. C. C., Chan, K. S., Hung, I. F. N., Poon, L. L. M., Law, K. I., Tang, B. S. F., Hon, T. Y. W., Chan, C. S., Chan, K. H., Ng, J. S. C., Zheng, B. J., Ng, W. L., Lai, R. W. M., Guan, Y., & Yuen, K. Y. (2003).** Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *Lancet (London, England)*, 361(9371), 1767–1772. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(03\)13412-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)13412-5)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Putra, A., Ridwan, F. B., Putridewi, A. I., Kustiyah, A. R., Wirastuti, K., Sadyah, N. A. C., Rosdiana, I., & Munir, D.** (2018). The Role of TNF- α induced MSCs on Suppressive Inflammation by Increasing TGF- β and IL-10. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 6(10), 1779–1783. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2018.404>
- Rabaan, A. A., Al-Ahmed, S. H., Haque, S., Sah, R., Tiwari, R., Malik, Y. S., Dhama, K., Yatoo, M. I., Bonilla-Aldana, D. K., & Rodriguez-Morales, A. J.** (2020). SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-COV: A comparative overview. *Le Infezioni in Medicina*, 28(2), 174–184.
- Rabaan, A. A., Al-Ahmed, S. H., Muhammad, J., Khan, A., Sule, A. A., Tirupathi, R., Mutair, A. Al, Alhumaid, S., Al-Omari, A., Dhawan, M., Tiwari, R., Sharun, K., Mohapatra, R. K., Mitra, S., Bilal, M., Alyami, S. A., Emran, T. Bin, Moni, M. A., & Dhama, K.** (2021). Role of Inflammatory Cytokines in COVID-19 Patients: A Review on Molecular Mechanisms, Immune Functions, Immunopathology and Immunomodulatory Drugs to Counter Cytokine Storm. *Vaccines*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/vaccines9050436>
- Rafei, M., Hsieh, J., Fortier, S., Li, M., Yuan, S., Birman, E., Forner, K., Boivin, M.-N., Doody, K., Tremblay, M., Annabi, B., & Galipeau, J.** (2008). Mesenchymal stromal cell-derived CCL2 suppresses plasma cell immunoglobulin production via STAT3 inactivation and PAX5 induction. *Blood*, 112(13), 4991–4998. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-166892>
- Rahal OM, Wolfe AR, Mandal PK, Larson R, Tin S, Jimenez C, Zhang D, Horton J, Reuben JM, McMurray JS, Woodward WA.** Blocking Interleukin (IL)4- and IL13-Mediated Phosphorylation of STAT6 (Tyr641) Decreases M2 Polarization of Macrophages and Protects Against Macrophage-Mediated Radioresistance of Inflammatory Breast Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2018 Mar 15;100(4):1034-1043. doi: 10.1016/j.ijrobp.2017.11.043. Epub 2017 Dec 7. PMID: 29485045.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rebensburg, S., Helfer, M., Schneider, M., Koppensteiner, H., Eberle, J., Schindler, M., Gürtler, L., & Brack-Werner, R.** (2016). Potent in vitro antiviral activity of *Cistus incanus* extract against HIV and Filoviruses targets viral envelope proteins. *Scientific Reports*, 6(1), 20394. <https://doi.org/10.1038/srep20394>
- Ren, G., Zhao, X., Zhang, L., Zhang, J., Huillier, A., Ling, W., Roberts, A. I., Le, A. D., Shi, S., Shao, C., & Shi, Y.** (2010). Inflammatory Cytokine-Induced Intercellular Adhesion Molecule-1 and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Mesenchymal Stem Cells Are Critical for Immunosuppression. *The Journal of Immunology*, 184(5), 2321–2328. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902023>
- Rota, P. A., Oberste, M. S., Monroe, S. S., Nix, W. A., Campagnoli, R., Icenogle, J. P., Peñaranda, S., Bankamp, B., Maher, K., Chen, M.-H., Tong, S., Tamin, A., Lowe, L., Frace, M., DeRisi, J. L., Chen, Q., Wang, D., Erdman, D. D., Peret, T. C. T., Bellini, W. J.** (2003). Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science (New York, N.Y.)*, 300(5624), 1394–1399. <https://doi.org/10.1126/science.1085952>
- Rubins, J. B.** (2003). Alveolar Macrophages. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 167(2), 103–104. <https://doi.org/10.1164/rccm.2210007>
- Rulli, N. E., Guglielmotti, A., Mangano, G., Rolph, M. S., Apicella, C., Zaid, A., Suhrbier, A., & Mahalingam, S.** (2009). Amelioration of alphavirus-induced arthritis and myositis in a mouse model by treatment with bindarit, an inhibitor of monocyte chemotactic proteins. *Arthritis and Rheumatism*, 60(8), 2513–2523. <https://doi.org/10.1002/art.24682>
- Santagati NA, Salerno L, Attaguile G, Savoca F, Ronsisvalle G.** Simultaneous determination of catechins, rutin, and gallic acid in *Cistus* species extracts by HPLC with diode array detection. *J Chromatogr Sci*. 2008 Feb;46(2):150-6. doi: 10.1093/chromsci/46.2.150. PMID: 18366875.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Schagat, T. L., Wofford, J. A., & Wright, J. R.** (2001). Surfactant Protein A Enhances Alveolar Macrophage Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils. *The Journal of Immunology*, 166(4), 2727 LP – 2733. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.4.2727>
- Schmid, M.C., Khan, S.Q., Kaneda, M.M. et al.** Integrin CD11b activation drives anti-tumor innate immunity. *Nat Commun* 9, 5379 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07387-4>
- Screaton, G. R., Mongkolsapaya, J., Xu, X. N., Cowper, A. E., McMichael, A. J., & Bell, J. I.** (1997). TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. *Current Biology : CB*, 7(9), 693–696. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(06\)00297-1](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(06)00297-1)
- Sharma, D., & Zhao, F.** (2021). Updates on clinical trials evaluating the regenerative potential of allogenic mesenchymal stem cells in COVID-19. *Npj Regenerative Medicine*, 6(1), 37. <https://doi.org/10.1038/s41536-021-00147-x>
- Shi, X., Mao, J., & Liu, Y.** (2020). Pulp stem cells derived from human permanent and deciduous teeth: Biological characteristics and therapeutic applications. *Stem Cells Translational Medicine*, 9(4), 445–464. <https://doi.org/10.1002/sctm.19-0398>
- Sibille, Y., & Reynolds, H. Y.** (1990). Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *The American Review of Respiratory Disease*, 141(2), 471–501. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/141.2.471>
- Sjaak de Wit, Malo A, Cook JKA.** Induction of IBV strain-specific neutralizing antibodies and broad spectrum protection in layer pullets primed with IBV Massachusetts (Mass) and 793B vaccines prior to injection of inactivated vaccine containing Mass antigen. *Avian Pathol.* 2019 Apr;48(2):135-147. doi: 10.1080/03079457.2018.1556778. Epub 2019 Jan 4. PMID: 30518248.
- Song, P., Li, W., Xie, J., Hou, Y., & You, C.** (2020). Cytokine storm induced by SARS-CoV-2. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 509, 280–287. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.06.017>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Spaggiari, G. M., & Moretta, L.** (2013). Cellular and molecular interactions of mesenchymal stem cells in innate immunity. *Immunology and Cell Biology*, 91(1), 27–31. <https://doi.org/10.1038/icb.2012.62>
- Stevenson-Leggett, P., Keep, S., & Bickerton, E.** (2020). Treatment with Exogenous Trypsin Expands In Vitro Cellular Tropism of the Avian Coronavirus Infectious Bronchitis Virus. *Viruses*, 12(10). <https://doi.org/10.3390/v12101102>
- Sungnak, W., Huang, N., Bécavin, C., Berg, M., Queen, R., Litvinukova, M., Talavera-López, C., Maatz, H., Reichart, D., Sampaziotis, F., Worlock, K. B., Yoshida, M., Barnes, J. L., Banovich, N. E., Barbry, P., Brazma, A., Collin, J., Desai, T. J., Duong, T. E., ... Network, H. C. A. L. B.** (2020). SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. *Nature Medicine*, 26(5), 681–687. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0868-6>
- Takizawa, N., Okubo, N., Kamo, M., Chosa, N., Mikami, T., Suzuki, K., Yokota, S., Ibi, M., Ohtsuka, M., Taira, M., Yaegashi, T., Ishisaki, A., & Kyakumoto, S.** (2017). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells propagate immunosuppressive/anti-inflammatory macrophages in cell-to-cell contact-independent and -dependent manners under hypoxic culture. *Experimental Cell Research*, 358(2), 411–420. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.07.014>
- Tao, Y., & Tong, S.** (2019). Complete Genome Sequence of a Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus from Kenyan Bats. *Microbiology Resource Announcements*, 8(28). <https://doi.org/10.1128/MRA.00548-19>
- Tauber, A. I.** (2003). Metchnikoff and the phagocytosis theory. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4(11), 897–901. <https://doi.org/10.1038/nrm1244>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tay, F. P. L., Huang, M., Wang, L., Yamada, Y., & Liu, D. X.** (2012). Characterization of cellular furin content as a potential factor determining the susceptibility of cultured human and animal cells to coronavirus infectious bronchitis virus infection. *Virology*, 433(2), 421–430. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.08.037>
- Tsukihara, S., Harada, T., Deura, I., Mitsunari, M., Yoshida, S., Iwabe, T., & Terakawa, N.** (2004). Interleukin-1beta-induced expression of IL-6 and production of human chorionic gonadotropin in human trophoblast cells via nuclear factor-kappaB activation. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y. : 1989)*, 52(3), 218–223. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2004.00209.x>
- Uccelli, A., Moretta, L., & Pistoia, V.** (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature Reviews. Immunology*, 8(9), 726–736. <https://doi.org/10.1038/nri2395>
- V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., & Thiel, V.** (2021). Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology*, 19(3), 155–170. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>
- Valastro, V., Holmes, E. C., Britton, P., Fusaro, A., Jackwood, M. W., Cattoli, G., & Monne, I.** (2016). S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: An attempt to harmonize virus classification. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 39, 349–364. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.02.015>
- Viruses, C. S. G. of the I. C. on T. of.** (2020). The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*, 5(4), 536–544. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vorotilin, A. M., & Loevskiĭ, M. M.** (1986). [Effect of 1,2-propandiol and glycerin on erythrocyte survival in hypothermia]. *Gematologĭia i transfuziologĭia*, 31(5), 49–51.
- Wang, M.-Y., Zhao, R., Gao, L.-J., Gao, X.-F., Wang, D.-P., & Cao, J.-M.** (2020). SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 724. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.587269>
- Wang, P.** (2021). Natural and Synthetic Saponins as Vaccine Adjuvants. *Vaccines*, 9(3), 222. <https://doi.org/10.3390/vaccines9030222>
- Wecht, S., & Rojas, M.** (2016). Mesenchymal stem cells in the treatment of chronic lung disease. *Respirology*, 21(8), 1366–1375. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/resp.12911>
- Weiss, A. R. R., & Dahlke, M. H.** (2019). Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of Action of Living, Apoptotic, and Dead MSCs. *Frontiers in Immunology*, 10, 1191. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01191>
- Wickramasinghe, I. N. A., de Vries, R. P., Gröne, A., de Haan, C. A. M., & Verheije, M. H.** (2011). Binding of avian coronavirus spike proteins to host factors reflects virus tropism and pathogenicity. *Journal of Virology*, 85(17), 8903–8912. <https://doi.org/10.1128/JVI.05112-11>
- Winter, C., Herrler, G., & Neumann, U.** (2008). Infection of the tracheal epithelium by infectious bronchitis virus is sialic acid dependent. *Microbes and Infection*, 10(4), 367–373. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.12.009>
- Wu, F., Zhao, S., Yu, B. et al.** (2020) A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* **579**, 265–269. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Xu, Z., Shi, L., Wang, Y., Zhang, J., Huang, L., Zhang, C., Liu, S., Zhao, P., Liu, H., Zhu, L., Tai, Y., Bai, C., Gao, T., Song, J., Xia, P., Dong, J., Zhao, J., & Wang, F.-S.** (2020). Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. In *The Lancet. Respiratory medicine* (Vol. 8, Issue 4, pp. 420–422). [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30076-X](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30076-X)
- Yamada, X.** (2009). Proteolytic activation of the spike protein at a novel RRRR/S motif is implicated in furin-dependent entry, syncytium formation, and infectivity of coronavirus infectious bronchitis virus in cultured cells. *Journal of Virology*, 83(17), 8744–8758. <https://doi.org/10.1128/JVI.00613-09>
- Zaki, A. M., van Boheemen, S., Bestebroer, T. M., Osterhaus, A. D. M. E., & Fouchier, R. A. M.** (2012). Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *The New England Journal of Medicine*, 367(19), 1814–1820. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1211721>
- Zalegh, I.; Akssira, M.; Bourhia, M.; Mellouki, F.; Rhallabi, N.; Salamatullah, A.M.; Alkaltham, M.S.; Khalil Alyahya, H.; Mhand, R.A.** A Review on *Cistus* sp.: Phytochemical and Antimicrobial Activities. *Plants* **2021**, 10, 1214. <https://doi.org/10.3390/plants10061214>
- Zayed, M., & Iohara, K.** (2020). Immunomodulation and Regeneration Properties of Dental Pulp Stem Cells: A Potential Therapy to Treat Coronavirus Disease 2019. *Cell Transplantation*, 29, 963689720952089–963689720952089. <https://doi.org/10.1177/0963689720952089>
- Zhang, Y., Buckles, E., & Whittaker, G. R.** (2012). Expression of the C-type lectins DC-SIGN or L-SIGN alters host cell susceptibility for the avian coronavirus, infectious bronchitis virus. *Veterinary Microbiology*, 157(3–4), 285–293. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.01.011>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Zhou, L., Liu, W., Wu, Y., Sun, W., Dörfer, C. E., & Fawzy El-Sayed, K. M.** (2020). Oral Mesenchymal Stem/Progenitor Cells: The Immunomodulatory Masters. *Stem Cells International*, 2020, 1327405. <https://doi.org/10.1155/2020/1327405>
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G. F., & Tan, W.** (2020). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *The New England Journal of Medicine*, 382(8), 727–733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca tecrübesi ve bilgi birikimiyle çalışmalarına yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ayşe NALBANTSOY'a,

Bu tez çalışmasında kullanılmış olan virüsün teminini sağlayan ve çalışmamda her zaman destek olan ve Doç. Dr. Fethiye ÇÖVEN'e

Bu çalışmada kullanılmış *Cistus creticus* bitkisi ekstraktının temini için NPRO Danışmanlık Doğal ve Bitkisel Biyoteknoloji Ürünleri Kozmetik San ve Tic. Ltd. Şti. Firmasına ve Feyruz BOZOĞLAN'a.

Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen aileme,

Fulya İŞEN, Seray GÜR, Gizem GÜNGÖR, Batuhan ORMAN, Yiğit ŞAHİN, Karrar Ali Mohammed Hasan ALSAKINI ve Furkan Ozan ÇÖVEN başta olmak üzere çalışmalarında bana her zaman destek olan immünobiyoteknoloji ve biyoaktivite tarama laboratuvarında yüksek lisans ve doktarasını yapmakta olan değerli çalışma arkadaşlarıma,

Selin OKTAY, Aziz Umut DURAK, Hande UĞRAŞ, Ceren BÜLBÜL ve Halil Uğur ERCAN başta olmak üzere bu süreçte her zaman yanımda olan değerli arkadaşlarıma,

En içten duygularıyla teşekkür ederim.

Fulya ÜNALP

ÖZGEÇMİŞ

Eğitim

Dalı	Yüksek Lisans	2019-2021
	Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Ana Bilim	
	Biyomühendislik Tezli Yüksek Lisans Programı	
	Lisans	2015-2019
	Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi	
	Biyomühendislik Bölümü	
	Erasmus+ Öğrenim Hareketliliği	2017-2018
	Czestochowa University of Technology	

Tezler ve Projeler

- **TÜBİTAK 2209-A Üniversite Öğrencileri Yurt İçi Araştırma Projeleri Destek Programı (2019)**
3 Boyutlu Hücre Kültüründe Kullanılmak Üzere Polisülfon Membranların Geliştirilmesi
- **Lisans Tezi (2018 - 2019)**
Development of Polymeric Based Platforms For Spheroid Formation

Deneyimler

Erasmus+ Staj Hareketliliği **2018**
Karlsruhe Institute of Technology, Institute of Toxicology and Genetics
Biyofonksiyonel Polimerler Araştırma Laboratuvarı

Çalışma Konusu: High Throughput Screening, Biyofonksiyonel peptidler içeren çeşitli hidrojel kombinasyonları ile 3 boyutlu tümör sferoidlerinin enkapsülasyonu.

Yüksek Lisans Bursiyeri **2021**
Ege Üniversitesi Sanayi İşbirlikli Bilimsel Araştırma Projesi - Pilot Ölçekte Biyobenzer Folikül Stimüle Edici (FSH) Hormonu Üretimi

Uluslararası Kongrelerde Yer Alan Posterler

Investigation of Immunomodulation Potential of Dental Pulp Stem Cells on Infectious Bronchitis Virus Infected Lung Alveolar Epithelial Cells, 6. Avrupa İmmünoloji Kongresi 2021.

Cytotoxic Effects of Selected Cyclic Peptides Based on Venom Mimetics on Glioblastoma (U87MG) Cells, 1. International Congress of the European Venom Network, 2021.

Katıldığı Kongreler

1. International Congress of the European Venom Network, 2021.

6. Avrupa İmmünoloji Kongresi 04 2021

International Symposium of Cellular Therapies and Cancer, 19.05.2021-20.05.2021

International Symposium of Cellular Therapies and Regenerative Medicine, 21.05.2021 - 22.05.2021

25. Ulusal İmmünoloji Kongresi 20.11.2020 - 22.11.2020

Diller

Anadil: Türkçe

Yabancı Diller: İngilizce (Okuma : İleri, Yazma: İleri, Dinleme: İleri, Konuşma: İleri)

Almanca (Başlangıç)