
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

MYCOBACTERİUM TUBERCULOSİS MAN-LAM ANTİJENİNİN FİBROBLAST - MAKROFAJ KOKÜLTÜR MODELİNDE MAKROFAJ POLARİZASYONUNA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

NURHAN ALBAYRAK

DOKTORA TEZİ

İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HAZİRAN 2014

Nurhan ALBAYRAK tarafından hazırlanan "*Mycobacterium tuberculosis* Man-LAM antijeninin fibroblast - makrofaj kokültür modelinde makrofaj polarizasyonuna etkisinin araştırılması" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / ~~oy çokluğu~~ ile Gazi Üniversitesi İmmünoloji Anabilim Dalında doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Emin Ümit BAĞRIAÇIK
İmmünoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak doktora tezi olduğunu onaylıyorum. .....

Başkan: Prof. Dr. Vedat BULUT
İmmünoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak doktora tezi olduğunu onaylıyorum. .....

Üye: Prof. Dr. Hüseyin TUTKAK
İmmünoloji ve Allerji Bilim Dalı, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak doktora tezi olduğunu onaylıyorum. .....

Üye: Prof. Dr. Ayşegül ATAK YÜCEL
İmmünoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak doktora tezi olduğunu onaylıyorum. .....

Üye: Doç. Dr. Resul KARAKUŞ
İmmünoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak doktora tezi olduğunu onaylıyorum. .....

Tez Savunma Tarihi: 13/6/2014

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin doktora tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....
Prof. Dr. Mustafa KEREM
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Nurhan ALBAYRAK

26.05.2014

MYCOBACTERİUM TUBERCULOSİS MAN-LAM ANTİJENİNİN FİBROBLAST - MAKROFAJ KOKÜLTÜR MODELİNDE MAKROFAJ POLARİZASYONUNA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

(Doktora Tezi)

Nurhan ALBAYAK

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2014

ÖZET

Makrofajlar *Mycobacterium tuberculosis* enfeksiyonuna karşı korunmada ana bileşendir. *M. tuberculosis* mannoz-kaplı lipoarabinomannanı (Man-LAM) ile makrofaj reseptörlerinin etkileşimi, makrofaj işlevini düzenlemektedir. Bu çalışmada, granülom formasyonunda enfeksiyonu sınırlama işlevi olan fibroblastların Man-LAM ile uyarımı takiben makrofaj polarizasyonuna etkisinin kokültür modelinde araştırılması amaçlanmıştır. Man-LAM *M. tuberculosis* H37Rv standart suşundan izole edildi. 3T3 fare fibroblast ve J774.1 fare makrofaj hücre dizinleri kokültür çalışmalarında kullanıldı. 3T3 ve J774.1 hücreleri üç farklı şekilde Man-LAM ile uyarıldı; tek başlarına, temas halinde ve 0,4 µm por çaplı naylon membran filtre ile temassız olarak. Ayrıca hücreler tüm bu üç konfigürasyonda TLR-2 antagonistleri ile bloklandı. İnkübasyonun 18'inci saatinde süpernatant sitokin analizi için toplandı. Yirmidördüncü saatte toplanan hücrelerden akım sitometri ile CD11b, CD80, CD86, MHC sınıf II, CD103, CD44, CD62L, CD107b yüzey molekül ekspresyonlarınının analizi yapıldı. Man-LAM ile uyarılan makrofajların, fibroblast varlığında M1 makrofaj fenotipi ile ilişkili İL-12 ve TNF-α sitokinlerini oluşturduğu gözlendi. Bu etkinin tümüyle hücre – hücre temasına bağlı olmadığı saptandı. Ayrıca Man-LAM ile uyarımın M2 makrofaj fenotipi ile ilişkili TGF-β ve İL-10 üretiminde azalmaya neden olduğu saptandı. Ek olarak, immün düzenleyici sitokin İL-33 üretiminin fibroblast ve makrofaj kokültür modellerinde arttığı tespit edildi. Akım sitometri analizi için makrofaj hücreleri ilk önce CD11b ile karakterize edildi. Man-LAM ile uyarımı takiben CD11b+ makrofaj hücrelerinin MHC sınıf II ve CD86 ekspresyonlarının fibroblast varlığında devam ettiği gösterildi. Bulgular, fibroblastların Man-LAM ile uyarılması sonucu makrofajların M1 fenotipine farklılaştığını ve fibroblastın makrofajı aktive ederek yanıt verdiğini gösterdi. Ayrıca bu etkinin TLR-2'nin bloklanmasından sonra arttığı saptandı. Fibroblastların granülom formasyonunda makrofajların polarizasyonunu ve aktivasyonunu etkileyerek immünolojik olarak aktif rol aldığı, TLR-2'nin Man-LAM ile uyarımı takiben immün modülatör etkiye sahip olduğu kanısına varılmıştır.

Bilim Kodu: 1039.2
Anahtar Kelimeler: Fibroblast, Kokültür, Makrofaj, Man-LAM, *M. tuberculosis*
Sayfa Adedi: 162
Danışman: Prof. Dr. Emin Ümit BAĞRIAÇIK

INVESTIGATION THE EFFECT OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* MAN-LAM ANTIGEN ON FIBROBLAST – MACROPHAGE COCULTURE MODEL TO THE MACROPHAGE POLARISATION

(Ph.D. Thesis)

Nurhan ALBAYAK

GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF MEDICAL SCIENCE
June 2014

ABSTRACT

Macrophages play an essantial role in protection to *Mycobacterium tuberculosis* infection. Interactions between *M. tuberculosis* mannose-capped lipoarabinomannan (Man-LAM) and macrophage receptors modulate macrophage functions. In this study, we aimed to evaluate the effect of the fibroblast, the cells play restrictive function in granuloma formation, effects on the macrophage polarisation in a coculture model after stimulation with Man-LAM. Man-LAM were isolated from *M. tuberculosis* H37Rv standart strain. 3T3 mouse fibroblast cell line and J774.1 mouse macrophage cell line were used in the coculture studies. The cells treated with Man-LAM in three different conditions; alone, together and together with an 0.4 µm pore size nylon membrane filter. And, cells also treated with TLR-2 antagonist in all conditions with and without Man-LAM. After 18 hour incubation, supernatant collected for cytokine analysis, and after 24 hour incubation the cells measured for CD11b, CD80, CD86, MHC class II, CD103, CD44, CD62L, CD107b cell surface receptor with flow cytometry. Macrophages incubated with Man-LAM in the presence of fibroblast after a period of cell incubation produced IL-12 and TNF-α cytokines that are the markers of the M1 macrophages. This effect is not fully in a cell contact dependent manner. Also the M2 macrophage marker TGF-β decreased after stimulation of the coculters induced by Man-LAM in both coculture situation. In addition, the immonomodulatory cytokine IL-33 increased in the coculture models after treatment with Man-LAM. After treatment with Man-LAM, CD11b+ macrophage cells MHC class II and CD86 expression were maintained in the presence of fibroblast. The results demonstrated that, the fibroblasts had an effect on the macrophage M1 polarization and macrophage activation. And also the proinflamatory effect of Man-LAM increased after blocking the TLR-2. It is suggested that, fibroblasts had a very important and immunologically active role in the granuloma formation by leading the macropage polarisation, and activation and TLR-2 had an immunomodularory function on macrophages after stimulation of fibroblast and macrophages with Man-LAM.

Science Code: 1039.2
Key Words: Coculture, Fibroblast, Macrophage, Man-LAM, *M. tuberculosis*
Page Number: 162
Supervisor: Prof. Dr. Emin Ümit BAĞRIAÇIK

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, kıymetli tecrübelerinden faydalandığım danışmanım Prof. Dr. Emin Ümit BAĞRIAÇIK'a, ayrıca laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan doktora öğrencileri Melek YAMAN, Süheyla HASGÜR ve Nihan ÖRÜKLÜ'ye ve tüm çalışma arkadaşlarıma, manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan çok değerli aileme ve arkadaşım Handan AKSOY'a teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET vi

ABSTRACT v

TEŞEKKÜR vi

İÇİNDEKİLER vii

ÇİZELGELERİN LİSTESİ xi

ŞEKİLLERİN LİSTESİ xii

SEMBOLLER, KISALTMALAR xv

1 GİRİŞ 1

2 KAVRAMSAL ÇERÇEVE VE İLGİLİ ARAŞTIRMALAR 5

2.1. *Mycobacterium tuberculosis* Epidemiyolojisi 5

2.2. *Mycobacterium tuberculosis* Enfeksiyonu 7

2.2.1. Primer enfeksiyon 8

2.2.2. Latent tüberküloz enfeksiyonu (LTBE) 13

2.2.3. Reaktivasyon 14

2.3. *Mycobacterium tuberculosis'*in Yapısı 15

2.3.1. Mikolik asit 16

2.3.2. Lipoglikanlar 17

2.3.3. Arabinogalaktan (WaxD) 21

2.3.4. Peptidoglikan 21

2.3.5. Diğer hücre duvar bileşenleri 21

2.4. *Mycobacterium tuberculosis'e* Karşı İmmün Yanıt 22

2.4.1. Hücreye giriş mekanizmaları 23

2.4.2. Doğal immün yanıt 29

2.4.3. Kazanılmış immün yanıt 44

2.4.4. Sitokin ve kemokin yanıtı 50

2.4.5. Apoptoz 64

Sayfa

2.5. *Mycobacterium tuberculosis*'in Konak İmmün Yanıtından Kaçış Mekanizmaları 65
2.5.1. Makrofaj fagozom-lizozom füzyonunun bozulması 65
2.5.2. Lizozomun asidik ortamına direnç 65
2.5.3. MHC sınıf II moleküllerin ekspresyonunun baskılanması 66
2.5.4. Proinflamatuvar sitokinlerin baskılanması 66
2.6. *Mycobacterium tuberculosis*'e Karşı Korunma 67
3. YÖNTEM 69
3.1. Araç-Gereçler 69
3.1.1. Standart suş ve hücreler 69
3.1.2. Kitler 69
3.1.3. Kimyasallar 70
3.1.4. Cihazlar 70
3.1.5. Sarf Malzemeler 71
3.2. *Mycobacterium tuberculosis* Man-LAM Antijeninin Elde Edilmesi 72
3.2.1. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv'nin çoğaltılması 72
3.2.2. Man-LAM antijeninin ekstraksiyonu 72
3.2.3. Westernblot ile Man-LAM antijeninin kontrolü 74
3.2.4. Antijen dozunun belirlenmesi 77
3.3. Hücre Kültürü 77
3.3.1. Fibroblast hücre kültürü 77
3.3.2. Makrofaj hücre kültürü 78
3.3.3. Fibroblast-makrofaj hücre kokültür modelleri 78
3.4. Uyarım Deneyleri 79
3.4.1. Hücrelerin LPS ve Man-LAM antijenleri ile uyarlması 79
3.4.2. TLR-2 yolağının bloklanması 79
3.5. Uyarımın Değerlendirilmesi 81
3.5.1. Nitrik oksit yanıtı 81
3.5.2. ELİSA ile sitokin yanıtı ölçümü 81
3.5.3. Akım sitometri 82

Sayfa

4. BULGULAR ve YORUM 83

4.1. *Mycobacterium tuberculosis* Man-LAM Antijeni 83

4.1.1. Man-LAM antijen izolasyonu 83

4.1.2. Man-LAM antijeninin optimal uyarım dozunun belirlenmesi 84

4.2. Fibroblast-Makrofaj Kokültür Modelinde Man-LAM ve LPS ile Uyarım 85

4.2.1. Kokültür modelinde Man-LAM ile uyarımın proinflamatuvar yanıta etkisinin belirlenmesi 85

4.2.2. Kokültür modelinde Man-LAM ile uyarımın anti-inflamatuvar yanıta etkisinin belirlenmesi 91

4.2.3. Kokültür modelinde Man-LAM ile uyarımın İL-33 yanıtına etkisinin belirlenmesi 94

4.2.4. Kokültür modelinde diğer sitokinlerin varlığı 94

4.2.5. Akım sitometride J774.1 makrofaj hücrelerin karakterizasyonu 95

4.2.6. Kokültür modelinde Man-LAM ile uyarımın, makrofaj M1 fenotipine farklılaşmasına etkisinin belirlenmesi 98

4.2.7. Kokültür modelinde Man-LAM ile uyarımın makrofaj aktivasyonuna etkisinin belirlenmesi 102

4.2.8. J44.1 makrofajlarda CD103 ekspresyonu 106

4.3. Kokültür Modelinde TLR-2 Yolağının Bloklanması Durumunda Man-LAM ile Uyarım 107

4.3.1. Kokültür modelinde Man-LAM'ın neden olduğu proinflamatuvar yanıtına TLR-2 antagonistinin etkisinin belirlenmesi 107

4.3.2. Kokültür modelinde Man-LAM'ın neden olduğu İL-33 yanıtına TLR-2 antagonistinin etkisinin belirlenmesi 108

4.3.3. Kokültür modelinde diğer sitokinlerin varlığı 108

4.3.4. Kokültür modelinde Man-LAM ile uyarımın neden olduğu M1 fenotipine TLR-2 antagonistinin etkisinin belirlenmesi 110

4.3.5. Temaslı kokültür modelinde Man-LAM ile uyarımın neden olduğu makrofaj aktivasyonuna TLR-2 antagonistinin etkisinin belirlenmesi 113

4.3.6. J774.1 makrofajlarda CD103 ve CD153 ekspresyonu 117

Sayfa

5. TARTIŞMA 119
6. SONUÇ ve ÖNERİLER 133
KAYNAKLAR 137
ÖZGEÇMİŞ 151

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge		**Sayfa**
Çizelge 2.1.	Akciğer epitel hücresinden salınan moleküller ve mikobakteriye karşı konak savunmasındaki işlevleri	30
Çizelge 3.1.	Standart suş ve hücreler	69
Çizelge 3.2.	Kitler	69
Çizelge 3.3.	Kimyasallar	70
Çizelge 3.4.	Cihazlar	70
Çizelge 3.5.	Sarf malzemeler	71
Çizelge 4.1.	Anti-CD86-PE ile boyanmış hücrelerin GX-mean değerleri	100
Çizelge 4.2.	Anti-CD44-FITC ile boyanmış hücrelerin GX-mean değerleri	104
Çizelge 4.3.	Anti-CD44-FITC ile boyanmış hücrelerin GX-mean değerleri	115

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil		Sayfa
Şekil 2.1.	*Mycobacterium tuberculosis* ile enfeksiyon sırasında ve sonrasında oluşabilecek durumlar	7
Şekil 2.2.	*Mycobacterium tuberculosis* enfeksiyonu sonucu gelişebilecek granülom formasyonları	12
Şekil 2.3.	*Mycobacterium tuberculosis'*in hücre duvar yapısının temel bileşenlerinin şematik gösterimi	16
Şekil 2.4.	*Mycobacterium tuberculosis'*in hücre duvar yapısında bulunan Man-LAM'ın genel yapısı ve PIM, LM ve LAM arasındaki ilişki	19
Şekil 2.5.	Polarize makrofajın genel özellikleri	37
Şekil 2.6.	*Mycobacterium tuberculosis* enfeksiyonunun kontrolünde rol alan başlıca sitokinler ve etkileri	50
Şekil 2.7.	İL-12'nin ana immünolojik işlevleri	52
Şekil 3.1.	Hücre – hücre temassız (transwell'li) kokültür modeli	78
Şekil 3.2.	6 kuyucuklu plakta çalışma konfigürasyonu	79
Şekil 3.3.	6 kuyucuklu plakta TLR-2 ile bloklamalı çalışma konfigürasyonu	80
Şekil 4.1.	SDS-PAGE'de 85 kDa'luk Man-LAM bandı	83
Şekil 4.2.	Man-LAM antijen dozunun belirlenmesi	84
Şekil 4.3.	Fibroblast-makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına hücrelerin NO yanıtı	85
Şekil 4.4.	Fibroblast-makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına hücrelerin İL-12 yanıtı	86
Şekil 4.5.	Fibroblast-makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına hücrelerin TNF-α yanıtı	87
Şekil 4.6.	Fibroblast-makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına hücrelerin İL-6 yanıtı	88
Şekil 4.7.	Fibroblast-makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına hücrelerin İL-10 yanıtı	90
Şekil 4.8.	Fibroblast-makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına hücrelerin TGF-β yanıtı	91

Şekil		**Sayfa**
Şekil 4.9.	Fibroblast-makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına hücrelerin İL-33 yanıtı	93
Şekil 4.10.	Akım sitometri analizinde izotip kontroller	94
Şekil 4.11.	Anti-CD11b-PE ile boyanmış J774.1 makrofajlar	95
Şekil 4.12.	Anti-F4/80-PE ile boyanmış J774.1 makrofajlar	96
Şekil 4.13.	Fibroblast-makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına hücrelerin MHC sınıf II ekspresyonu	97
Şekil 4.14.	Fibroblast-makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına hücrelerin CD80 ekspresyonu	98
Şekil 4.15.	Fibroblast-makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına hücrelerin CD86 ekspresyonu	99
Şekil 4.16.	Fibroblast-makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına hücrelerin CD62L ekspresyonu	101
Şekil 4.17.	Fibroblast-makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına hücrelerin CD107b ekspresyonu	102
Şekil 4.18.	Fibroblast-makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına hücrelerin CD44 ekspresyonu	103
Şekil 4.19.	Fibroblast-makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına hücrelerin CD103 ekspresyonu	105
Şekil 4.20.	Fibroblast-makrofaj kokültür modelinde Man-LAM ile uyarımın TLR-2 ile bloklanması durumunda hücrelerin İL-12 yanıtı	106
Şekil 4.21.	Fibroblast-makrofaj kokültür modelinde Man-LAM ile uyarımın TLR-2 ile bloklanması durumunda hücrelerin İL-33 yanıtı	107
Şekil 4.22.	Fibroblast-makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına TLR-2 ile bloklanan hücrelerin MHC sınıf II molekül ekspresyonu	109
Şekil 4.23.	Fibroblast-makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına TLR-2 ile bloklanan hücrelerin CD80 ekspresyonu	110
Şekil 4.24.	Fibroblast-makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına TLR-2 ile bloklanan hücrelerin CD62L ekspresyonu	112
Şekil 4.25.	Fibroblast-makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına TLR-2 ile bloklanan hücrelerin CD107b ekspresyonu	113

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.26. Fibroblast-makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına TLR-2 ile bloklanan hücrelerin CD44 ekspresyonu 114

Şekil 4.27. Fibroblast-makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına TLR-2 ile bloklanan hücrelerin CD103 ekspresyonu 116

Şekil 4.28. Fibroblast-makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına TLR-2 ile bloklanan hücrelerin CD153 ekspresyonu 117

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simge	Açıklama
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
CO_2	Karbon dioksit
dk	Dakika
g	Gram
kDa	Kilo dalton
µg	Mikrogram
µm	Mikrometre
mL	Mililitre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
nm	Nanometre
pg	Pikogram

Kısaltma	Açıklama
3T3 + J774.1	Fibroblast hücresi ve makrofaj hücre temaslı kokültür modeli
3T3 / J774.1	Fibroblast hücresi ve makrofaj hücre temassız kokültür modeli
AG	Arabinogalaktan
ARA-LAM	Arabinofuranozil-sonlu Lipoarabinomannan
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
CD	"Cluster of difference"
CO	Karbon monoksit
CR	Kompleman reseptörü
DC-SİGN	"Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin"
DH	Dendritik hücre
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
ELİSA	"Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay"

FBS	Fetal bovin serum
FITC	“Fluorescein isothiocyanate”
HCl	Hidroklorik asit
HKV	Hücre kültür vasatı
İFN	İnterferon
İL	İnterlökin
imDH	İmmatür dendritik hücre
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
İRF5	İnterferon regülatuvar faktör 5
LAM	Lipoarabinomannan
LM	Lipomannan
LPS	Lipopolisakkarit
LTBI	Latent tüberküloz enfeksiyonu
M1 (KAM)	Klasik aktive makrofaj
M2 (AAM)	Alternatif aktive makrofaj
Man-LAM	Mannoz-kaplı lipoarabinomannan “Mannoz-capped lipoarabinomannan”
MAP	Mitojen ile aktive edilen protein “Mitogen-activated protein”
MB	Middlebrook
MDP	Muramil dipeptid
MEM-NEAA	“Minimum essential medium non esansiyel aminoasit”
MHC	Majör doku uygunluk antijeni “Major histocompatibility complex”
MİNCLE	Makrofaj ile indüklenebilir C tip lektin
MR	Mannoz reseptörü
Mtb	*Mycobacterium tuberculosis*
MyD88	“Myeloid differentiation primary response protein 88”
NamH	N-asetil muramik asit hidroksilaz
NFκB	Nükleer transkripsiyon faktörü κB “Nuclear transcription factor κB”
NK	Doğal öldürücü hücre “Naturel Killer”
NOD	Nükleotid oligomerizasyon domain
NOS2	NO sentaz 2
NLR	Nod benzeri reseptör “Nod-like receptor”

NO	Nitrik oksit
NOD	Nükleotid oligomerizasyon domain
NRLP	“Nacht Leucine-rich repeat protein”
OADC	Oleik asit, albümin, dekstroz, katalaz
PAMP	Patojenle ilişkili moleküler yapılar “Pathogen associated molecular patterns”
PBS	Fosfat buffer salin
PE	Fikoeritrin
PG	Peptidoglikan
Pİ-LAM	Fosfotidil innositol-kaplı lipoarabinomannnan
PİM	Fosfatidil-*myo*-innositol mannozid
PPD	Pürifiye protein derivesi
PRR	Patern tanıma reseptörü “Pattern Recognition Receptors”
RNI	Reaktif nitrojen aracıları
ROI	Reaktif oksijen aracıları
RPM	“Revolutions per minute”
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SR	Çöpçü reseptör “Scavenger receptors”
STAT	“Signal transducer and activator of transcription”
STh	Sitotoksik T hücre
TB	Tüberküloz
TCT	Tüberkülin cilt testi
TEMED	Tetrametiletilendiamin
TLR	Toll-benzeri reseptör “Toll-like receptor”
TGF	Transforme edici büyüme faktörü “Transforming growth factor”
TNF	Tümör nekroz edici faktör “Tumour necrosis factor”

1. GİRİŞ

Tüberkuloz (TB)'un etkeni *Mycobacterium tuberculosis* tüm dünyada yaşayan popülasyonun üçte birini enfekte etmesi ve ölümlere yol açması nedeniyle halen önemini koruyan bulaşıcı bir enfeksiyon ajanıdır. *M. tuberculosis* (Mtb) ile enfekte olan bireylerde enfeksiyon; konağın immün durumu veya risk faktörlerinin varlığına göre asemptomatik enfeksiyon, aktif hastalık ya da latent enfeksiyon durumlarından biri ile sonuçlanabilmektedir (Briken, Porcelli, Besra, ve Kremer, 2004; Fenton ve Vermeulen, 1996; Kleinnijenhuis, Oosting, Joosten, Netea, ve Van Crevel, 2011).

İmmün yanıt fagositer hücreler üzerindeki patern tanıma reseptörlerinin Mtb yapılarını tanıması ile başlamaktadır. Alveolar makrofajlar basilin konağa alınmasına ve sistemik yayılımına neden olmaktadır. Makrofajların dokuya geçişi, hücrelerin enfeksiyon alanına göçüne neden olan lokal inflamatuvar yanıtın oluşumunu uyarmaktadır. Enfeksiyon alanına göç eden hücreler, TB'nin karakteristik özelliği olan granülomu oluşturmaktadır (Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011; Russell, Barry, ve Flynn, 2010; Torrado ve Cooper, 2013). Granülom formasyonu, TB basilini kalan akciğer dokusundan ayırmakta, bakteriyel yayılımı sınırlandırmakta ve makrofajların diğer immün hücreler ve bunların oluşturduğu sitokinler ile etkileştiği bir mikroçevre oluşturmaktadır (Ahmad, 2011). Granülom formasyonu enfeksiyonu sınırlandırırken aynı zamanda latent TB enfeksiyonu ile basilin varlığının devamına da neden olmaktadır (Flynn, Chan, ve Lin, 2011; Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011). İmmün gözetimin latent enfeksiyonda kaybolması, reaktivasyonla sonuçlanmaktadır (Ahmad, 2011).

Mikobakteri enfeksiyonu sırasında farklı işlevlere sahip bir dizi makrofaj alt tipleri görülmektedir. Bunlardan Mtb ile ilk karşılaşan alveolar makrofajlar, immün baskılayıcı ve zayıf antijen sunumu yeteneğine sahiptir. Makrofajlar mikroçevre etkisine bağlı olarak klasik ve alternatif fenotipteki makrofajlara farklılaşmakta ve esas olarak reseptör, sitokin ve kemokin ekspresyonları ve efektör işlevleri ile birbirlerinden ayrılmaktadır. Makrofaj farklılaşması Mtb'nin elimine edilip edilemeyeceğini, enfeksiyonun nasıl sonuçlanacağını belirlemektedir (Benoit, Desnues, ve Mege, 2008; Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011). Mtb

enfeksiyonunda M1 ve M2 makrofaj dengesi, basili sınırlayan granülom oluşumu için kritiktir (Flynn ve diğerleri, 2011).

Mikrobiyal ürünler veya İFN-γ etkisi ile meydana gelen klasik aktive makrofaj (M1), mikrobisidal etki, enfeksiyon patogenezi ve inflamasyon ile ilişkilidir ve proinflamatuvar sitokin ve kemokinlerin salınımına neden olmaktadır. TNF-α, İL-6, İL-12, İL-1β gibi sitokinler, İL-7R ve İL-15RA gibi sitokin reseptörleri, CCL2, CCL5 ve CXCL8 gibi kemokinler, CCR7 gibi kemokin reseptörleri, makrofaj mikrobisidal aktivitede etkili NO sentaz 2 (NOS2) ve CD80 ve CD86 gibi kostimüatör molleküllerin ekspresyonu artmaktadır (Benoit ve diğerleri, 2008; Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011).

Alternatif aktive makrofaj (M2), daha çok immün modülatör ve zayıf mikobisidal etki ile karakterize üç alt tipten oluşmaktadır. M2 makrofajlar immün düzenleyici veya zayıf mikrobisidal etkilidir. İL-12 oluşumu yoktur, antijen sunum kapasitesi düşüktür ve İL-10 ve TGF-β oluşumu ile immün yanıtı baskılayabilmektedir (Benoit ve diğerleri, 2008; Flynn ve diğerleri, 2011; Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011).

M1 makrofajlar bakterinin öldürülmesi, proinflamatuvar medyatörlerin oluşumu, T hücrenin uyarımı ve enfeksiyon alanına göç için gereklidir. M1'in bu etkileri doku hasarına ve zayıf granülom rezolüsyonuna neden olmaktadır. M1 ve M2 dengesi, enfeksiyonun ve doku hasarının kontrolünü sağlamaktadır (Flynn ve diğerleri, 2011).

Mtb, granülom içerisinde fagositer hücrelere ek olarak fibroblast gibi immün olmayan hücreleri de enfekte etmekte ve fibroblast içerisinde çoğalabilmektedir (Mariotti ve diğerleri, 2013). Mtb enfeksiyonunda makrofaj ve fibroblastın etkileşimine ilişkin çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu çalışmalarda, Mtb ile uyarılan makrofajlardan salınan çözünür faktörlerin etkisi ile fibroblastlardan salınan matriks metalloproteinazların (MMP) doku yıkımına neden olduğu (Green ve diğerleri, 2011), 120 saat gibi Mtb ile uzun süreli makrofaj uyarımından elde edilen çözünür faktörlerin fibroblastlardan salınan kemokinleri, granülom oluşumunda etkili CXCL8 yanıtını belirgin olarak arttırdığı gösterilmiştir (O'Kane, Boyle, Horncastle, Elkington, ve Friedland, 2007). Ayrıca Mtb ile enfekte fibroblastlardan salınan çözünür faktörlerin, makrofajların Mtb enfeksiyonunu daha iyi kontrol etmesine

neden olduğu in vitro hücre kültürü çalışmasında gösterilmiş ve fibroblast – makrofaj etkileşiminin mikobakteriye karşı konak yanıtın düzenlenmesinde rol aldığı belirtilmiştir (Rastogi, Labrousse, ve de Sousa, 1992). Mtb enfeksiyonunda fibroblastların makrofaja etkisine dair Rastogi ve arkadaşlaının çalışması dışında çalışma bulunmamaktadır. Ancak mikobakteri haricinde farklı modellerde fibroblastların immün düzenleyici etkisi çalışılmıştır. Örneğin kanser mikroçevresinde fibroblastların çeşitli sitokin, kemokin ve matriks molekülleri üretimi ile T hücresi üzerine immün düzenleyici etkisi olduğu gösterilmiştir (Barnas, Simpson-Abelson, Yokota, Kelleher, ve Bankert, 2010).

Mtb hücre duvar yapısı, lipit, glikolipit ve proteinlerden oluşan karmaşık bir yapıya sahiptir. Yüksek lipit içerikli hücre duvar yapısı nedeniyle Mtb, makrofaj içerisinde yaşamaya devam edebilmekte ve konak immün yanıtından kaçabilmektedir (Briken ve diğerleri, 2004; Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011). Mannoz-kaplı lipoarabinomannnan (Man-LAM), Mtb hücre duvarında duvarın dışına doğru uzanan, virülans ile ilişkili bileşendir ve basile konak savunma yanıtını baskılayan bir takım özellikler kazandırmaktadır (Briken ve diğerleri, 2004; Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011). Man-LAM, konak hücre proinflamatuvar etkisini baskılamakta ve fagositoz, apoptoz, makrofaja İFN-γ sinyal iletimi, makrofaj ve dendritik hücrelerden İL-12 ve NO üretimini engellemektir (Briken ve diğerleri, 2004). Çalışmalar mikobakteirinin lipomannan (LM) / lipoarabinomannan (LAM) yapısındaki değişimlerin hücre bütünlüğüne önemli etkisi olduğunu göstermiştir. LAM yapısındaki bozulma veya azalma Mtb'nin virülansında azalma ve makrofajlar tarafından öldürülmede artma ile sonuçlanmış ve araştırmacılar LAM'ın önemli bir tedavi hedefi olduğunu vurgulamıştır (Fukuda ve diğerleri, 2013).

Mtb enfeksiyonununda doğal immün yanıt, toll-benzeri reseptörler (TLR) ile bakteri paternlerinin tanınması ile başlamaktadır (Saiga, Shimada, ve Takeda, 2011). TLR ile Mtb'nin etkileşimi sinyal yolaklarını uyarmakta ve proinflamatuvar sitokin üretimine neden olmaktadır (Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011). Mikobakteri hücre duvarında mannoz başlığı olmayan LAM, LM ve PİM ve 19-kDa lipoprotein TLR-2 tarafından tanınmakta ve makrofajın aktivasyonuna neden olmaktadır (Saiga ve diğerleri, 2011). TLR-2 ile etkileşim doğal antimikrobiyal immün ve proinflamatuvar yanıtı başlatmaktadır (Torrado ve Cooper, 2013). TLR-2, makrofajlardan TNF-α ve İL-12 salınımına neden olmaktadır (Dao ve diğerleri, 2004;

van Crevel, Ottenhoff, ve van der Meer, 2003). Ayrıca TLR-2 yokluğu bozuk granülom formasyonu, Mtb enfeksiyonuna duyarlılıklarının artması ve kronik enfeksiyonun kontrolünde bozulma ile sonuçlanmaktadır. Ek olarak TLR-2'nin yokluğu İFN-γ, TNF-α ve İL-12 üretiminde artışa neden olmuş, TLR-2'nin immün düzenlemede gerekli olduğu kanısına varılmıştır (Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011; Li, Du, Deng, ve Xie, 2012).

Tüberkülozda yanıtın nasıl sonuçlanacağı, risk faktörleri varlığında esas olarak immün hücreler arasındaki denge sonucunda belirlenmektedir. Etkenin sınırlandırılmasında TB'nin önemli bir belirteci olan granülom formasyonunun oluşumu ve buradaki makrofajların katkısı büyüktür. Yine granülomu çevreleyen fibroblastlar, dokunun dolayısıyla etkenin sınırlandırılmasına katkıda bulunmaktadır (Ahmad, 2011; Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011). Bu çalışmada, immün baskılayıcı özelliği daha önceki çalışmalar ile gösterilmiş olan Mtb H37Rv suşu Man-LAM'ı ile, Mtb enfeksiyonunda etken ile ilk karşılaşan hücre olan makrofaj ve çok fazla çalışma bulunmayan ve granülomda basilin sınırlandırılmasında önemli olan fibroblastlar kokültür modelinde uyarıldı. Bu uyarım sonucunda Man-LAM'ın fibroblast varlığında makrofaj farklılaşmasına etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca çalışmamızda Man-LAM ile uyarılan hücrelerde oluşan etkinin, Mtb ile etkileşimde ve immün yaıtın yönlendirilmesinde önemli rolü olan TLR-2'nin işlevinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmalar ile fibroblast - makrofaj etkileşim mekanizmasının ortaya konulması, bu etkileşime TLR-2'nin katkısının anlaşılması ve çalışmalar sonucunda elde edilecek bilgilerin tedavi ve aşı ile korumada hedef noktalar olarak araştırmalara ışık tutması hedeflenmektedir. Bu tezde Man-LAM ile uyarılan fibroblastların, fibroblast – makrofaj kokültür modelinde makrofajın farklılaşmasını ve aktivasyonunu etkilediği öne sürülmüştür.

Çalışmamızda fibroblast ve makrofaj etkisini araştırmak için fare hücre dizinleri kullanılmıştır. Fare kaynaklı olması ve sonsuz çoğalma özelliğine sahip hücre dizinlerinin kullanılması, insan kaynaklı ve sınırlı çoğalma kapasitesindeki hücrelerden farklı yanıtlara neden olmuş olabilmekle birlikte, yanıtlarda görülen değişimlerin hücreler arasındaki ilişkiyi göstermesi açısından önemli olduğu kanısına varılmıştır.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE VE İLGİLİ ARAŞTIRMALAR

2.1. *Mycobacterium tuberculosis* Epidemiyolojisi

Mtb 1882'de Robert Koch tarafından TB'a neden olan etken olarak tanımlanmış, konak hücresinde varlığını devam ettirme noktasında oldukça başarılı bir hücre içi patojendir (Briken ve diğerleri, 2004; Fenton ve Vermeulen, 1996). Ancak arkeolojik çalışmalar binlerce yıl önce insanların bu etken ile karşılaştığını ve Mtb'nin çağlar boyu insanlarda TB hastalığına neden olduğunu göstermiştir (Fenton ve Vermeulen, 1996).

Mtb enfeksiyonu tüm dünyada yaygın olarak görülen ve halen önemini koruyan bir enfeksiyon hastalığıdır (WHO, 2013). Ondokuzuncu ve yirminci yüzyıllarda tüm dünyada TB epidemileri görülmüş, tüberkülozdan ölüm tüm ölüm vakalarının %30'unu oluşturmuştur (Nicod, 2007). Sosyoekonomik durumda düzelme, korunma önlemleri ve tedavi olanaklarının artması ile yüzyılın son çeyreğine doğru hastalık insidansında azalma saptanmıştır. Ancak HIV (insan immünyetmezlik virusu) enfeksiyonlarının dünyada yaygınlığının artması ile 20. yüzyılın son on yılında TB hastalığı da tekrar artma eğilimine girmiştir. Ayrıca immünsüpresif tedavi gibi immün baskılama yapan durumların artması ve TB ilaç direnci sorununun ortaya çıkması nedeniyle hastalığın önemi 20. yüzyılın sonlarında tekrar gündeme gelmiştir (Fenton ve Vermeulen, 1996; Nicod, 2007). Artan HIV insidansı nedeniyle TB ile mücadele güçleşmiş ve ilaca dirençli vakalar ortaya çıkmıştır (Ahmad, 2011). Bu nedenle Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) TB ile mücadeleye önem vermeye başlamıştır. DSÖ tüm dünyadan topladığı verilerle yıllık analizler yapmakta ve yıllık raporlar "Global Tuberculosis Report" halinde yayınlamaktadır (WHO, 2013).

DSÖ'nün raporuna göre, her yıl tüm dünyada yaklaşık olarak 9 milyon insan Mtb ile enfekte olmakta ve yaklaşık 2 milyon hasta TB enfeksiyonu nedeniyle yıllık olarak kaybedilmektedir. DSÖ'nün 2012 yılı tahminlerine göre, 8,6 milyon insan TB hastalığı geliştirmekte ve 320 000'i HIV pozitif olan toplam 1,3 milyon hasta da bu nedenle kaybedilmektedir (WHO, 2013). Dünyada TB insidansı her 100 000 nüfusa 139'dur. Ayrıca, TB hastalarının yaklaşık %55'i Asya, %31'i Afrika'da bulunmaktadır. Afrika'da hastalığın insidansı HIV ile enfekte bireyler nedeniyle dünya ortalamasının yaklaşık 3 katıdır (100 000 nüfusa 363

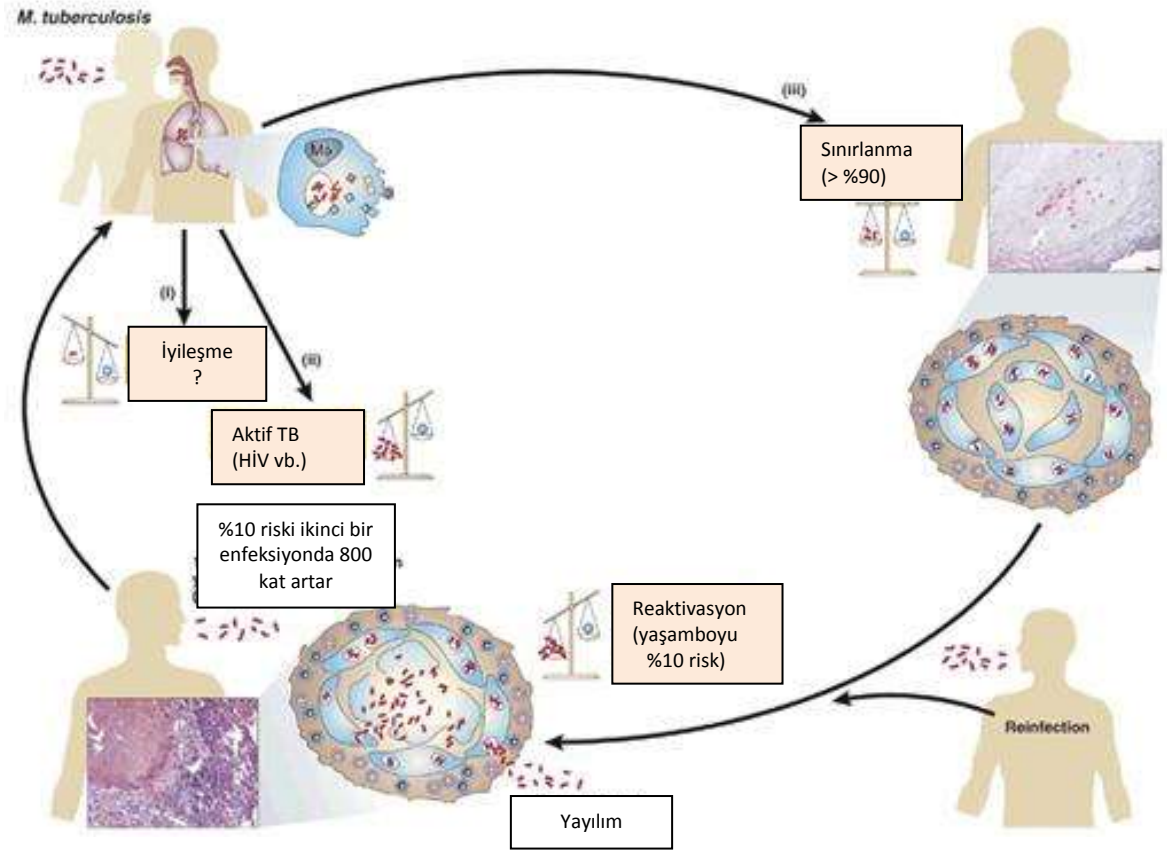
hasta) ve tüm TB vakalarının yaklaşık %50'si bu bölgede yer almaktadır (Ahmad, 2011; WHO, 2013).

TB basili ile enfekte olmuş ancak hastalık gelişmemiş olan latent TB enfeksiyonlu (LTBE) bireyler, dünya popülasyonunun üçte birini oluşturmaktadır. LTBE'li normal bireylerin yaşamlarının bir sürecinde aktif TB geliştirme ihtimali %5-10 iken HIV+ bireylerde bu risk yılda %8'e çıkmaktadır (Ahmad, 2011; Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011; Nicod, 2007). LTBE'li bazı bireylerin neden aktif hastalık geliştirdiği yeterince anlaşılmamıştır, ancak sıklıkla bozulmuş veya eksik immünite ile ilişkilendirilmiş ve azalmış immün yanıt en büyük risk faktörü olarak tanımlanmıştır (Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011; Nicod, 2007). Ayrıca çocuklar ve yaşlılar hem aktif TB gelişimi, hem de yaygın hastalık oluşumu için en yüksek riske sahiptir (Nicod, 2007).

TB gelişimi ile ilişkilendirilmiş olan diğer risk faktörleri erkek cinsiyet, bekar-tek başına yaşam, sigara içme, astım, ailede TB öyküsüdür. Mikobakteri enfeksiyonuna yatkınlık ile ilişkilendirilmiş genler de mevcuttur. Bu genler; İL-12Rβ1, İL-12p40, İFN-γR1, İFN-γR2 ve STAT-1 (signal transducer and activator of transcription-1)'dir (Berrington ve Hawn, 2007).

2.2. *Mycobacterium tuberculosis* Enfeksiyonu

Bireyler Mtb ile enfekte olduktan sonra, bu enfeksiyon konağın immün durumu, risk faktörlerinin varlığı ve etkene maruziyet yoğunluğuna göre farklı şekillerde sonuçlanmaktadır. (1) Spontan iyileşme (asemptomatik enfeksiyon), (2) immün yetersizlik durumunda aktif TB gelişimi, veya (3) enfeksiyonun kendi kendini sınırlaması durumlarından birisi gelişebilmektedir (Şekil 2.1). Kendi kendini sınırlama; primer enfeksiyonu takiben basilin dormant halde kaldığı LTBE'nin gelişimi ile karakterizedir. LTBE, risk faktörlerinin varlığında reaktivasyonla sonuçlanabilmektedir (Müller ve diğerleri, 2006). Primer enfeksiyon sırasında akciğerde hastalık oluşumu veya hematojen yayılım, enfekte bireylerin çok az bir kısmında meydana gelebilmektedir (Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011).



Şekil 2.1. *Mycobacterium tuberculosis* ile enfeksiyon sırasında ve sonrasında oluşabilecek durumlar (Kaufmann ve McMichael, 2005'den alınmıştır)

2.2.1. Primer enfeksiyon

Aktif akciğer tutulumlu bireyler, tüberkülozun ana kaynağını oluşturmaktadır. Mtb konağa solunum yollarından enfekte aerosoller (damlacık çekirdeği) aracılığı ile girmektedir. Damlacık çekirdeği aktif hasta bireylerin öksürmesi ile ortama bulaşmakta, birkaç dakika ile saatler arasında havada asılı kalmaktadır. 1-5 µm çaplı damlacık çekirdeği havayollarına girebilecek kadar küçüktür ve birkaç saat içerisinde atmosferden solunan damlacık çekirdeği bronşlardan kaçarak terminal alveollere ulaşmakta ve burada kümelenmektedir. Bir tek Mtb basili bile infektif olabilmektedir. Terminal alveollerde basiller ilk kez alveolar makrofajlar ile karşılaşmakta, miyeloid hücreler (makrofaj ve dendritik hücre) tarafından fagosite edilmektedir. TLR, C-tip lektinler (mannoz reseptör, DC-SİGN, Dektin-1), kompleman reseptörü (CR) gibi çeşitli hücre içi ve hücre yüzeyi reseptörleri aracılığı ile makrofajlar tarafından konağa alınmakta, alttaki epitel tabakayı makrofajar aracılığı ile geçmekte ve sistemik yayılıma neden olmaktadır. Ayrıca basil mukozalardaki M hücreleri, alveolar tip I ve II epitel hücrelerini enfekte etmektedir. Makrofajlarca alınıp dokuya göç, komşu damarlardan mononükleer hücrelerin göçüne neden olan lokal inflamatuvar yanıtın oluşumunu indüklemektedir. Enfeksiyon alanına göç eden hücreler, TB'nin karakteristik patolojik özelliği olan granülom formasyonunu oluşturmaktadır (Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011; Russell ve diğerleri, 2010; Torrado ve Cooper, 2013).

Makrofajlar tarafından alınan basil başlangıçta hücre içi yıkımdan kaçabilmekte, hücre içerisinde çoğalabilmekte ve makrofajı harap edebilmektedir. Hücre içinde bir yandan çoğalan bakteri eş zamanlı olarak hem akciğer lenf düğümlerine hem de akciğer dışı diğer alanlara yayılabilmektedir. Makrofajlardan akciğerde enfeksiyon ortamına monositleri ve diğer inflamatuvar hücreleri çağıran kemokin salınımı gerçekleşmektedir. İnflamatuar monositler, basili alan ancak tümüyle yıkamayan makrofajlara farklılaşmaktadır. Enfeksiyonun bu döneminde basil logaritmik olarak çoğalmakta, kan kaynaklı makrofajlar alanda birikmekte ancak doku hasarı çok az oluşmaktadır. Enfeksiyonu takip eden iki-üçüncü haftada T hücre yanıtı gelişmekte ve antijene özgü T hücreleri enfeksiyon alanına gelmektedir. T hücreleri erken lezyon alanında çoğalmakta ve İFN-γ gibi proinflamatuvar sitokinler salınmaktadır. İFN-γ, makrofajı içerisine almış olduğu basili öldürmek üzere aktive etmektedir. İFN-γ oluşturan T hücrelerinin enfeksiyon alanında varlığı ile

mikroorganizmanın çoğalması sınırlandırılmakta ve mikobakterinin erken logaritmik çoğalması durmaktadır. Enfekte bireylerin çoğunda etkin bir hücresel immün yanıt 2-8 hafta içerisinde gelişmekte ve bakterinin çoğalmasını durdurmaktadır. Aktive T lenfositler, makrofajlar ve diğer immün hücreler granülom oluşumuna neden olmakta, basilin çoğalmasını ve yayılımını sınırlandırmaktadır. Ardından primer lezyon veya granülomda merkezi nekroz meydana gelmektedir. Nekroz ortamı mikobakterinin hücre dışı çoğalmasını durdurmakta, böylelikle hastalığın ilerlemesi sonlandırılmakta ve mikobakteri sabit faza (dormant hale) geçmektedir (LTBE; Latent TB Enfeksiyonu) (Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011; Russell ve diğerleri, 2010; Torrado ve Cooper, 2013). LTBE'li bireylerde enfeksiyon, primer infeksyon aşamasında sınırlı kalmıştır (Nicod, 2007).

Granülom formasyonu

TB enfeksiyonunun kronik doğası süregen uyarıma, bu uyarım sonucunda da granülamatöz yapının oluşmasına neden olmaktadır. Aktif, latent ve reaktivasyon TB durumlarının hepsinde granülom oluşumu görülebilmektedir. Granülomatöz yapı enfeksiyonun hem sınırlandırılmasına, hem de yayılımın devam etmesine neden olmaktadır. Granülomun oluş mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Makrofaj hücreleri ve sitokinler bu yapının oluşmasında ve devamında esas bileşen olarak işlev görmektedir. Ayrıca bu yapıyı oluşturan sitokinler, koruyucu immünite gelişimi ve doku patolojisinin meydana gelmesinden de sorumludur (Flynn ve diğerleri, 2011; Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011; Torrado ve Cooper, 2013).

Mtb'nin girişinden sonra, alveolar makrofajlar inflamatuvar sitokin ve kemokin oluşumuna neden olmakta; nötrofil, monosit ve lenfositler enfeksiyon alanına çağrılmaktadır. Granülom; makrofaj, monosit ve nötrofillerden oluşan şekilsiz bir yapıdır. Ancak bu hücreler basili öldürmede yeterince etkin değildir ve basil bu aşamada makrofajın bakterisidal mekanizmalarına fagozom - lizozom füzyonunu engelleyerek karşı koymakta, fagozom içinde çoğalmakta ve makrofaj nekrozuna neden olmaktadır. Basil ile mücadelede yetersiz kalan makrofajlar, çok çekirdekli dev hücreler (giant cell), foamy makrofaj ve epiteloid makrofaj gibi özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşmaktadır. Hücre ölümü ile ortama salınan basiller hücre dışı ortamda çoğalmaya devam etmekte ve Mtb'yi kontrol etmede

yetersiz başka makrofajlarca fagosite edilmekte ve aynı şekilde nekroza uğramaktadır (Ahmad, 2011; Russell ve diğerleri, 2010).

Bu süreç içerisinde basili almış olan dendritik hücreler olgunlaşmakta, bölgesel lenf düğümlerine göç etmekte ve CD4 ve CD8 T hücrelerini mikobakteriyel antijenlere karşı uyarıma hazır hale getirmektedir. Kazanılmış immün yanıtın olaya dahil olması ile birlikte, enfekte hücrelerden salınan kemokinlerin etkisiyle enfeksiyon alanına doğru yönlenen uyarılmış lenfositlerin katılımı ile granülom daha organize hal almaktadır. Makrofaj, T hücre, dendritik hücre, fibroblast, endotelial hücre ve stromal hücreler enfeksiyon alanında granülom formasyonunun oluşumuna yol açmaktadır. Makrofajdan zengin merkez, fibröz kılıf ile sarılı lenfosit örtü ile çevrelenmektedir. Bu dönemde granülom oldukça fazla vaskülarizedir ve hücreler enfeksiyon alanına göç etmektedirler. Hastalığın ilerlemesi ile birlikte fibröz kılıf daha da belirginleşir, damarlanma ve kazeöz debristen sorumlu olan foamy (köpüksü) makrofajlar azalır (Flynn ve diğerleri, 2011; Russell, Cardona, Kim, Allain, ve Altare, 2009).

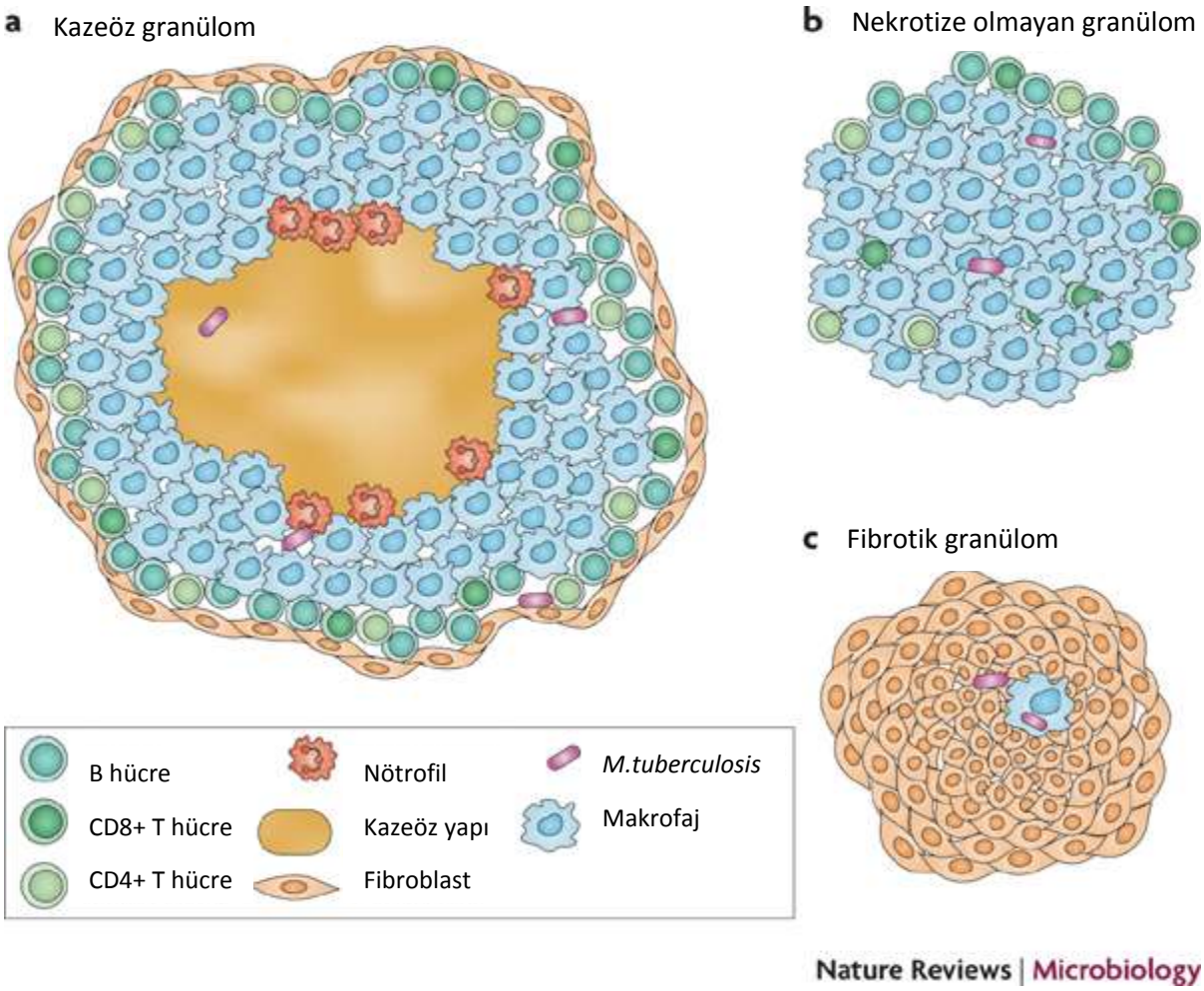
M. tuberculosis'i taşıyan damlacık çekirdeği alveolar makrofajlar ile alındıktan sonra oluşan inflamatuvar yanıt enfekte hücrelerin epiteli geçmesine, monositlerin dolaşımdan alana göç etmesine ve enfeksiyon alanında yeniden damarlanmaya neden olur. Granülomdaki makrofajlar epiteloid hücrelere, çok çekirdekli dev hücrelere ve lipit damlacıklar içeren foam (köpük) hücrelerine dönüşür. Granülom daha sonra hücre dışı matriks materyalinden fibröz kılıfın oluşumu ile katmanlara ayrılır. Fibröz kılıf, makrofaj tabakanın hemen üst kısmında oluşur. Lenfositler bu periferik alanda sınırlı görülürler. Bazı granülomlar bu denge durumunda sabit kalırlar, ancak hastalık sırasında ilerleme damarlanmanın azalması, nekrozun artması ve granülom merkezinde kazeum birikimi ile karakterizedir. Sıklıkla granülom kaviter hale geldiğinde ve söndüğünde enfeksiyöz basil havayollarına saçılmaktadır (Russell ve diğerleri, 2010).

Makrofajlar NO (nitrik oksit) ve RNI (reaktif nitrojen aracıları) oluşumu ile basil üzerine antimikobakteriyel etki göstermektedir. NO ve RNI basil üzerine toksik etki oluşturarak ve basili içeren fagozomun lizozom ile füzyonunu uyararak bakterisidal etki göstermektedir. T hücre kaynaklı İFN-γ ve TNF-α sitokinleri, makrofajları NO ve RNI oluşturmak üzere

uyarmaktadır. Bu aşamada hızlı bakteriyel çoğalma sona erer ve bakterinin göreceli olarak sabit sayıda kaldığı sınırlandırma fazına geçilir. Son safhada, granülomun kazeöz kısmı bakteri çoğalmasının olmadığı hipoksik hale gelir (Ahmad, 2011; Russell ve diğerleri, 2010).

Mtb enfeksiyonu sonucu farklı granülom formasyonları aynı anda bir bireyde gelişebilmektedir. Bu formasyonlar; kazeöz granülom, nekrotik olmayan granülom ve fibrotik granülomdur. Kazeöz granülom, klasik TB granülomudur ve hem aktif hem de latent enfeksiyonda görülebilmektedir. Epitelyal makrofajlar, nötrofiller, CD4 ve CD8 T hücreler ve B hücrelerden oluşan kılıf ve bazen de periferik fibrozis ile çevrelenmiştir. Bu tip granülomların merkezi peynir gibidir (caseous), ölü makrofaj ve diğer hücrelerden oluşan bir nekrotik alandır. Hipoksik merkezde mikobakteri makrofajlar içerisinde bulunabilir. Nekrotik olmayan granülom esas olarak aktif hastalık durumunda görülmektedir. Ana bileşenleri makrofajlar ve bazı lenfositlerdir. Bu lezyonlarda Mtb basilleri makrofaj içerisinde bulunmaktadır. Fibrotik lezyon ise sıklıkla latent enfeksiyon sırasında görülmekle birlikte aktif hastalık sırasında da görülebilmektdir. Lezyon neredeyse tümüyle fibroblastlardan oluşmakta, çok az sayıda makrofaj içermektedir. Bu tür lezyonlarda basilin nerede bulunduğu tam olarak anlaşılmamıştır (Şekil 2.2) (Barry ve diğerleri, 2009).

Granülom formasyonu, TB basilini kalan akciğer dokusundan ayırmakta, bakteriyel yayılımı sınırlandırmakta ve makrofajların diğer immün hücreler ve bunların oluşturduğu sitokinler ile etkileştiği bir mikroçevre oluşumuna neden olmaktadır (Ahmad, 2011). Ancak aktif granülom hastalarda aynı zamanda ciddi patolojiye de neden olabilmektedir (Russell ve diğerleri, 2010).



Şekil 2.2. *Mycobacterium tuberculosis* enfeksiyonu sonucu gelişebilecek granülom formasyonları. (a) Kazeöz granülom, (b) nekrotik olmayan granülom ve (c) fibrotik granülom (Barry ve diğerleri, 2009'den alınmıştır)

2.2.2. Latent TB enfeksiyonu (LTBE)

“Latent TB enfeksiyonu” terimi ilk olarak Koch’un tüberkülin antijenini kullanarak tüberkülin cilt testini (TCT) yapan Clemens von Pirquet tarafından tanımlanmıştır. Pirquet, pozitif cilt testi olan ancak TB açısından bulguları olmayan bir çocukta bu tanımı kullanmıştır. LTBE’li bireyler, aktif TB’li hastaların aksine bulaştırıcı değildir; radyolojik ve klinik olarak herhangi bir anormal belirti taşımamaktadır (Druszczyńska, Kowalewicz-Kulbat, Fol, Włodarczyk, ve Rudnicka, 2012).

LTBE, primer lezyon veya granülomda Mtb’nin hücre dışı çoğalmasının durduğu, enfeksiyonun sınırlandırıldığı, hastalığın ilerlemediği ve basilin sabit hale (dormant) geçtiği fazdır (Nicod, 2007; Russell ve diğerleri, 2010). Latentlik, milyonlarca insanda asemptomatik olarak varlığını sürdürebilen Mtb’nin tercih ettiği bir durumdur (Deretic ve diğerleri, 2009).

LTBE, Mtb’nin hipoksik ve besinden yoksun durumda varlığını “dormant” halde sürdürdüğü, alternatif enerji katabolizması ve hücre duvarının incelmesi ile karakterizedir ve farklı gen bölgeleri uyuyan faz ile ilişkilendirilmiştir. Granülomun hipoksik, düşük pH, NO ve CO vb. bileşenlerden oluşan mikroçevresi, Mtb’nin uyku fazı ile ilişkili olan çeşitli genlerin ekspresyonunun artmasına neden olmaktadır. Dormant basil, konakta tüm yaşamı boyunca granülom içinde varlığını sürdürebilmekte, fakat herhangi bir lokal immün baskılanma durumunda yeniden canlanabilme (reaktivasyon) ihtimali de bulunmaktadır. Ancak Mtb’nin yeniden canlanması sonucu reaktivasyonuna ilişkin mekanizmalar halen tam olarak anlaşılamamıştır (Ahmad, 2011; Müller ve diğerleri, 2006).

2.2.3. Reaktivasyon

Reaktivasyon, dormant haldeki basilin sınırlandırıldığı alandan çıkıp aktif hastalık oluşturmasıdır. Enfekte bireyde reaktivasyon tüm yaşamı boyunca %5-10 ihtimalle meydana gelebilmektedir. Reaktivasyon sıklıkla yaşlanma, kortikosteroid kullanımı, malnütrisyon ve diğer nedenlerle bağışıklığın baskılandığı durumlarda gerçekleşebilmektedir. Reaktivasyonda çok önemli bir faktör, HIV ile koenfeksiyondur. Bu durumda aktif hastalık gelişme riski 100 kat artmaktadır (Müller ve diğerleri, 2006).

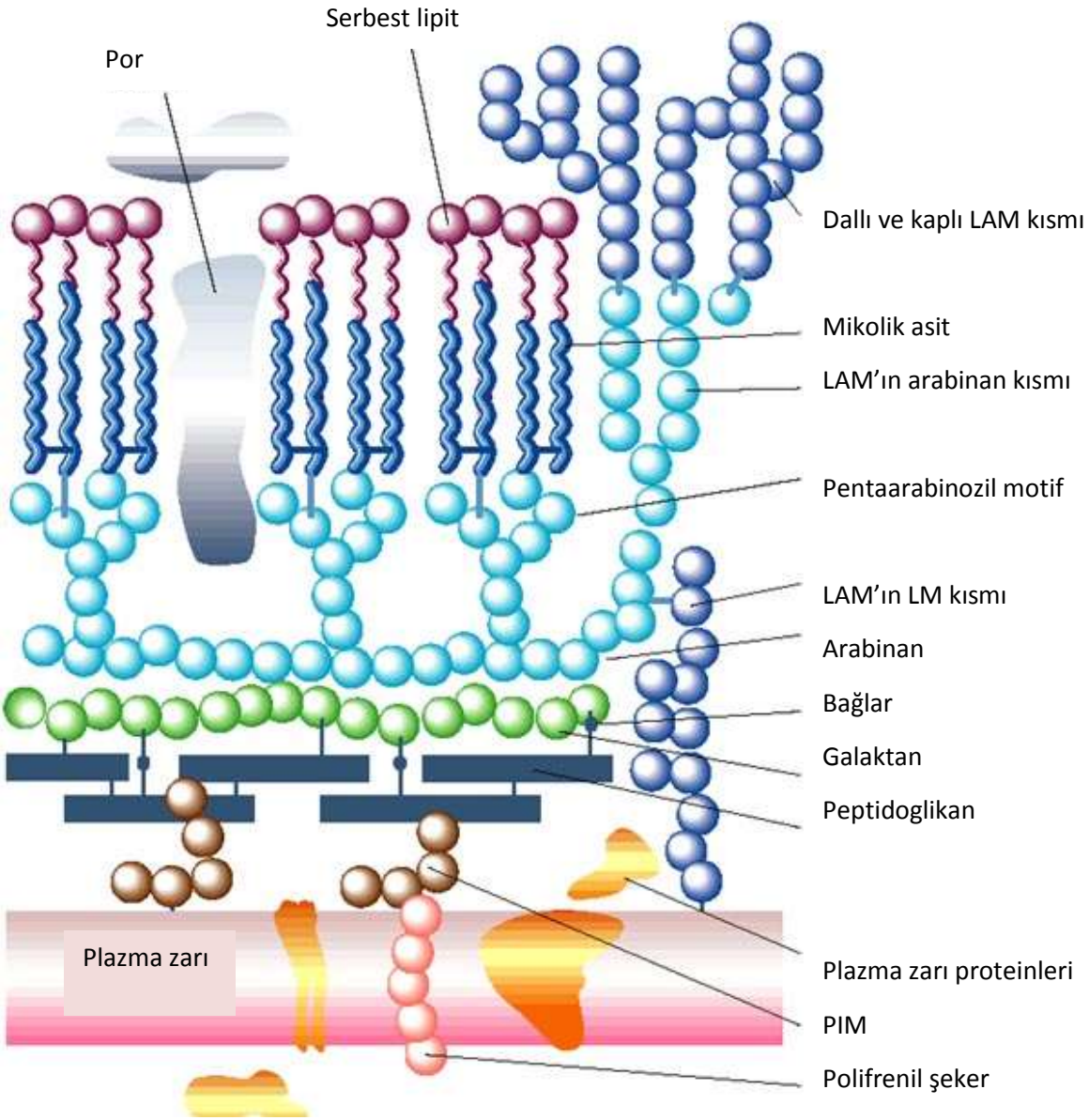
LTBE, immün gözetimin ortadan kalkması, hücresel immün sistemde meydana gelecek bir bozulma durumunda ilk enfeksiyondan aylar hatta yıllar sonra bile dormant basilin yeniden aktifleşmesine ve hastalığın ortaya çıkmasına, reaktivasyona neden olabilmektedir. Granülom rüptüre olduğunda, merkezi kazeöz nekrotik doku, kaviteye ve binlerce canlı, enfeksiyöz basilin solunum yollarına yayılımına neden olmaktadır. Rüptür, prodüktif öksürüğe neden olarak basilin daha çok yayılmasına neden olmaktadır. Nötrofiller bu aşamada doku hasarına ve bakterinin yayılmasına katkıda bulunmaktadır (Ahmad, 2011; Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011; Russell ve diğerleri, 2010).

Mtb enfeksiyonunda lokal inflamatuvar yanıt (i) koruyucu immünite, (ii) düşük doku hasarlı dengelenmiş inflamasyon, veya (iii) granülomun nekrozu sonucu endobronşiyal yayılıma neden olmaktadır (Ehlers ve Schaible, 2012).

2.3. *Mycobacterium tuberculosis'*in Yapısı

Lipit, glikolipit ve proteinlerden oluşan karmaşık bir yapıya sahip mikobakteri hücre duvarı yapısının, konak ile ilk temas noktası olması ve immün hücreler tarafından tanınması nedeniyle bilinmesi önem arz etmektedir (Şekil 2.3). Mtb hücre duvar yapısı nedeniyle konak makrofajında hücre içi olarak yaşamaya devam edebilmekte, konak yanıtından kaçabilmekte ve yavaş olarak çoğalmaktadır (Briken ve diğerleri, 2004; Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011). Mtb lipit ve polisakkaritlerden oluşan balmumu yapısında ve yüksek miktarda mikolik asit içeriği ile karakterize kalın bir hücre duvarına sahiptir. Mikobakteri yüzeyi fizikokimyasal yapısı, bakterinin konak hücresinde yaşamını devam ettirmesini, hücresel yanıttan kaçmasını sağlamaktadır (Fenton ve Vermeulen, 1996). Ayrıca bazı hücre duvar bileşenleri konağın immün yanıtını uyarmakta ve inflamatuvar süreci tetiklemektedir. Bu hücre duvar bileşenlerinin TLR ile etkileşimi, makrofajlardan NFκB uyarımı sonucunda TNF-α, İL-1, İL-12, çeşitli kemokinler ve NO oluşumuna neden olmakta ve inflamatuvar süreci başlatmaktadır. Diğer bir kısım duvar bileşenleri ise etkenin konak immün yanıtından kaçmasına yardım eden bir sürece neden olmaktadır (Ahmad, 2011; Briken ve diğerleri, 2004).

Mtb'nin yapısal değişikliklerinin farklı immün yanıtlara neden olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca Mtb'nin farklı coğrafik bölgelerde çeşitli yapısal özellikler gösterdiği ve bu farklı soylarının virülansla ilişkili olduğu düşünülmüş, Vietnam, Doğu Asya/Beijing ve Hint Okyanusu soyları dissemine tüberkülozla ilişkili bulunmuştur. Doğu Asya/Beijing ve Hint Okyanusu soylarının ayrıca makrofaj ve DH'den daha fazla TNF-α ve İL-1β salımına ve proinflamatuvar yanıta neden olduğu gösterilmiştir. Bu farklılığın soya özgü hücre duvar yapısı ile ilişkili olduğu varsayılmıştır. Bu soyların hepsinde total lipit ekstraktları yüksek derecede TNF-α üretimine neden olmuştur. Bakterinin lipitleri fraksiyonlarına ayrılıp değerlendirildiğinde fenolik lipitlerin hipervirülan fenotipe neden olduğu saptanmıştır (Krishnan ve diğerleri, 2011).



Şekil 2.3. *Mycobacterium tuberculosis'*in hücre duvar yapısının temel bileşenlerinin şematik gösterimi. (i) İç tabaka peptidoglikan ile kaplı, (ii) pepditdoglikan kovalen olarak arabinogalaktan tabaya bağlı, (iii) dış kısım mikolik asitleri, mannoz kaplı lipoarabinomannanları içerir (Park ve Bendelac, 2000'den alınmıştır)

2.3.1. Mikolik asit

Mikolik asit, 60-90 karbonlu dallanmış yağ asitleri olup arabinogalaktanın dış kısmına tutunmaktadır (Fenton ve Vermeulen, 1996). Hücre duvarının dış kısmında bulunmakta ve bakterinin kuru ağırlığının %50'sini oluşturmaktadır. Mikolik asit bakterinin basit boyalarla boyanmamasına, özel koşullarda aside dirençli olarak boyanmasına da neden olmaktadır. Mikolik asitten oluşan kalın hücre duvar yapısı besinlerin geçişini zorlaştırmakta, bakterinin

yavaş çoğalmasına ve lizozomal enzimlerce yavaş degredasyonuna yol açmaktadır (Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011).

2.3.2. Lipoglikanlar

Lipomannan (LM), fosfatidil-*myo*-innositol mannozid (PİM) ve lipoarabinomannan (LAM) mikobakteri hücre duvarında yer alan ve immün düzenleyici etkisi olan lipoglikanlardır (Briken ve diğerleri, 2004; Pitarque ve diğerleri, 2008).

Fosfatidil-*myo*-innositol mannozid (PİM)

PİM LM'nin öncü molekülüdür. PİM, hücre zarına fosfatidil-*myo*-innositol (Pİ) zinciri ile kovalen olmayan bir şekilde tutunmaktadır (Şekil 2.4). Korunmuş mannozil fosfotidİL-*myo*-innositol (MPİ) domaini içermektedir (Şekil 2.4) (Briken ve diğerleri, 2004; Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011). PİM, iki-dört yağ asidi zinciri taşımaktadır ve bu yağ asitleri Pİ'nin mannan kor yapısındaki mannozu ile açile durumdadır. Mtb'nin $PİM_2$'si ilave yağ açilasyonuna sahiptir (Chatterjee ve Khoo, 1998).

GDP mannoz donörlerden alınan ek Man*p* (polifrenil monofosfomannoz)'ler ile $PİM_2$ (ve muhtemelen $PİM_3$ ve $PİM_4$) uzatılarak lineer LM oluşturulmaktadır. $PİM_6$* direkt olarak LAM'ın oluşumuna katılmamakta, ancak son ürün olarak işlev görmektedir (Chatterjee ve Khoo, 1998).

Lipomannan (LM)

LM, LAM'ın öncü molekülüdür. LM ve LAM, PİM'in çoklu glikozile formudur. Her üçü de korunmuş mannozil fosfotidil-*myo*-innositol (MPİ) domainini paylaşmaktadır (Şekil 2.4) (Briken ve diğerleri, 2004; Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011).

* M'nin altındaki sayılar, mannoz kalıntılarının sayısını göstermektedir.

Lipoarabinomannan (LAM)

Mikobakteri hücre duvarında arabinan ve mannan içeren serolojik olarak aktif polisakkaritler ilk olarak 1930'larda tespit edilmiştir (Chatterjee ve Khoo, 1998). LAM, hücre duvarı boyunca mikolik asitin dışına uzanmakta ve hücre duvarının dış kısmını oluşturmaktadır. LAM, olgun LM'nin arabinan ile glikozillenmiş formudur (Briken ve diğerleri, 2004; Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011). LAM, tek kaynaktan elde edilmiş olsa bile boyut, dallanma paterni, açillenme ve hem arabinan hem de mannan parçasında fosforilasyon açısından heterojen bir profil sergileyebilmektedir (Chatterjee ve Khoo, 1998).

Arabinan

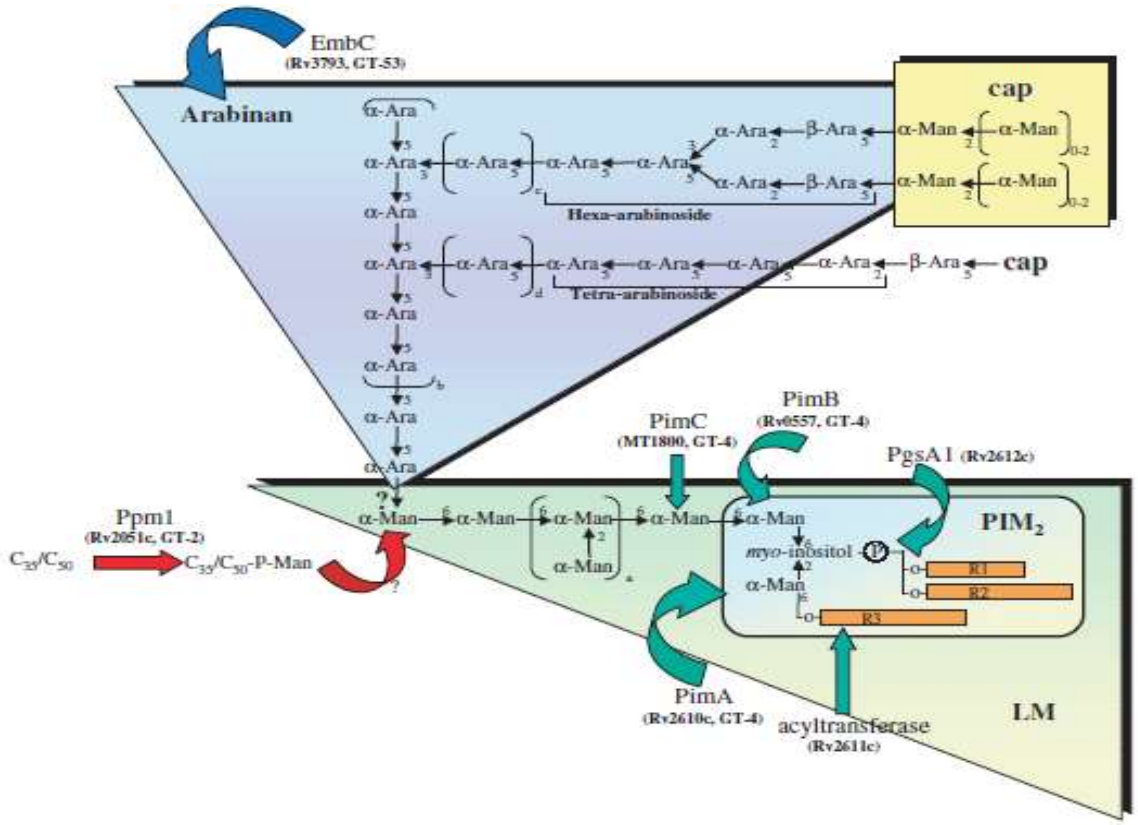
Mikobakteri hücre duvarında iki farklı formda arabinan bulunmaktadır. Biri heteropolisakkarit olan arabinogalaktan (AG)'da, diğeri LAM'da yer almaktadır. LAM'da yer alan arabinan domaini doğrusal α(1-5)-Ara*f* (arabinofuranozil) omurga, β-D-Ara*f*-(1-2)-α-D-Ara*f*-(1-) ile sonlanan doğrusal tetra-arabinofuranozid (Ara4) ve hekza-arabinofuranozid (Ara6) ile yer değiştirmiştir. Hem arabinogalaktan hem de LAM da bulunması nedeniyle mikobakteri duvarındaki arabinan, antiTB tedavi için önemli bir hedefi olarak görülmektedir (Briken ve diğerleri, 2004).

Mannoz-kaplı lipoarabinomannnan (Man-LAM)

LAM ya mannoz (Man-LAM) ile ya da fosfotidil inositol (Pİ-LAM) ile kaplıdır. Mtb ve *Mycobacterium bovis* BCG suşunda, LAM'ın arabinan ucu ilave mannoz kalıntıları (Man-LAM) ile kaplanmış durumdadır (Şekil 2.4). Man-LAM karmaşık yapıda bir lipoglikandır; karbonhidrat kor, mannozil fosfotidil-*myo*-innositol (MPİ) ziniciri ve çeşitli mannoz kaplı yapılardan oluşmaktadır. Man-LAM ve PİM, MPİ domainini paylaşmakta ve bu yapı ile stoplazmik zara tutunmaktadır (Briken ve diğerleri, 2004; Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011). Man-LAM'daki mannoz başlıklar mono-, di- ve trimer α-D-mannoz ile direkt olarak terminal β-d-Araf'ın 5. karbonuna bağlanmıştır (Chatterjee ve Khoo, 1998).

Man-LAM, hücre duvarında mannanın en yoğun olarak bulunduğu hücre duvar bileşenidir ve Mtb'nin önemli bir virülans faktörüdür. Man-LAM, Mtb'nin konakta fagositik hücrelere

C-lektin aracılığı ile girişi için bir ligandır. Mannoz kaplı yapılar tüm patojen mikobakteriler için karakteristiktir ve büyüme sırasında salınmaktadır (Briken ve diğerleri, 2004; Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011; Pitarque ve diğerleri, 2008). Başlangıçta mannoz başlığın patojenik olmayan mikobakterilerde bulunmadığı düşünülmüş olsa da, atenüe BCG suşunda dahi %40-70 oranında Man-LAM bulunduğu gösterilmiştir (Chatterjee ve Khoo, 1998).



Şekil 2.4. *Mycobacterium tuberculosis'*in hücre duvar yapısında bulunan Man-LAM'ın genel yapısı ve PİM, LM ve LAM arasındaki ilişki. Yüksek derecede glikolize LM'nin öncülü $PİM_2$, arabinan domaini ile uzayarak LAM'ı oluşturur. LAM ve LM, mannan kor yapısı α1-6 bağlı omurgadan temel alır (Briken ve diğerleri, 2004'den alınmıştır)

Saflaştırılmış Man-LAM, Mtb'ye konak savunma yanıtını baskılayan bir takım özellikler kazandırmakta ve bu nedenle ana virülans faktörü olarak değerlendirilmektedir (Briken ve diğerleri, 2004; Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011; Pitarque ve diğerleri, 2008). Man-LAM konak hücre proinflamatuvar etkisininin baskılanmasına neden olmaktadır. Bu özellikleri; fagositoz, apoptoz, makrofaja İFN-γ sinyal iletimi, makrofaj ve DH'den İL-12 ve NO üretimini engellemektir. Fagositozu, fagozom – lizozom füzyonunu ve fagozom

olgunlaşması bozarak engellemektedir. Ayrıca mannozun enzimatik olarak uzaklaştırlması ile bu etkilerin kaybolduğu gösterilmiştir (Briken ve diğerleri, 2004).

Antitüberküloz tedavide kullanılan etambutol, Mtb Man-LAM'ının mannoz başlıklarının uzamasını engellemektedir. Mannoz, bakterinin hücreye tutunmasında ve devamında meydana gelen immünpatogenezde ana yapısal eleman olduğundan bu yapının bloklanması direkt olarak Man-LAM ile ilişkili biyolojik fonksiyonları etkilemektedir (Briken ve diğerleri, 2004).

Fosfotidil innositol-kaplı lipoarabinomannnan (Pİ-LAM)

Hızlı büyüyen ve patojenik olmayan mikobakterilerde LAM'da ilave inositol fosfat (Pİ-LAM) vardır (Briken ve diğerleri, 2004; Fenton ve Vermeulen, 1996; Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011). Man-LAM'ın aksine Pİ-LAM ve LM doğal immün yanıtı uyarmaktadır (Pitarque ve diğerleri, 2008). Patojenik olmayan mikobakterilerde bulunan Pİ-LAM, makrofaj ve DH'de proinflamatuvar etkinin oluşmasına neden olmaktadır. Pİ-LAM ile uyarılan hücrelerden İL-8, İL-12 ve TNF-α salınımının arttığı ve apoptozin uyarıldığı gösterilmiştir. Ayrıca bu proinflamatuvar etkinin TLR-2 aracılığı ile gerçekleştiği gösterilmiştir. Pİ-LAM'ın proinflamatuvar etkisi fosfo-*myo*-inositol başlıklar ile ilişkilendirilmiştir. LM ise hangi türden izole edildiğine bakılmaksızın güçlü proinflamatuvar etkiye yol açmaktadır. LM ile uyarılmış makrofajların CD40 ve CD86 yüzey molekül ekspresyonlarında artış olduğu tepit edilmiştir (Briken ve diğerleri, 2004).

Arabinofuranozil-sonlu lipoarabinomannan (Ara-LAM)

Mikobakterilerde, özellikle hızlı üreyen mikobakterilerde tanımlanmış ve arabinan ucunda mannoz ve fosfotidil inositol başlığı bulunmayan bir diğer LAM, Ara-LAM'dır (Şekil 2.7). İki farklı sonlanma ucu gösterilmiştir; doğrusal Ara_4 ve dallı Ara_6. Ara-LAM'ın proinflamatuvar etkisi gösterilmemiştir (Briken ve diğerleri, 2004; Chatterjee ve Khoo, 1998).

2.3.3. Arabinogalaktan (WaxD)

Hücre duvarının iç kısmıda yer alan arabinogalaktan (AG), arabinoz ve galaktozdan oluşmuş bir polimerdir (Şekil 2.3) (Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011). Bu heteropolisakkaritte yer alan arabinan mikolik asit ile esterleşmiştir, mikolik asitin hidroksil grubundaki hidrojen atomu arabinanın organik grubu ile yer değiştirmiştir (Briken ve diğerleri, 2004).

2.3.4. Peptidoglikan (PG)

Mtb, çift katlı lipit stoplazmik zar ve zarın dışında rijit PG tabaka ile sarılı durumdadır. Stoplazma zarı ile PG tabaka arasında immünojenik özellik taşıyan bir dizi proteinler bulunmaktadır. PG, fosfodiester bağları ile kovalan olarak arabinogalaktana tutunmaktadır (Şekil 2.3) (Fenton ve Vermeulen, 1996; Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011). PG, AG ve disakkarit trehalozun (kord faktör) mikolatlarından oluşan kompleks, hücre duvar iskeleti ile ilişkilidir.

2.3.5. Diğer hücre duvar bileşenleri

Palmitat ve tüberkülostearat yağ asitleri diaçilgliserol formunda oluşmakta ve dallanmış arabinan ve mannan taşıyan polisakkaritlere PİM aracılığı ile bağlanmaktadır (Briken ve diğerleri, 2004). Palmitat (C16:0) ve 10-metiloktadekanoat (tüberkülostearat, C19) esas yağ asitlerini oluşturmakta, C14:0, C17:0, metİL-C17:0 ve C18:0 daha az oranda bulunmaktadır. Bu yapı «makromoleküler lipopolisakkariti» oluşturmaktadır. LAM'ın yağ asilasyonu (aminoaistlere yağ asitlerinin eklenmesi), hücre duvarının işlevsel bütünlüğü için gereklidir (Chatterjee ve Khoo, 1998).

Diğer bir önemli hücre duvarı bileşeni, açillenmiş trahaloz-2 sülfat olup bakteri virülansı ile ilişkilidir. Bu asidik sülfolipitler makrofaj fagolizozom füzyonunu engellemektedir (Fenton ve Vermeulen, 1996).

2.4. *Mycobacterium tuberculosis'e* Karşı İmmün Yanıt

1880'de Robert Koch, aktif TB'li hastalarda mikobakteri ekstraktlarına karşı gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonunu tanımladı. 1934'te Seifert, Mtb proteinlerinden elde edilen ekstraktı saflaştırdı (PPD ; pürifiye protein derivesi). PPD daha sonra tüberkülin cilt testinde kullanılmaya başlandı. Bu ekstraklar, mikobakteri ile karşılaşmış duyarlı bireylerde gecikmiş tipte aşırı duyarlılık reaksiyonu ile LTBE'nin göstergesi olarak kullanılmaktadır (Nicod, 2007).

Mtb enfekiyonuna karşı immün yanıtta ilk basamak mikobakterinin konak tarafından patojen olarak algılanması ve tanınmasıdır. Tanınmanın ardından doğal immün yanıt oluşmakta ve bunu kazanılmış immün yanıtın devreye girmesi takip etmektedir (Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011). Naif CD4 T hücresi, makrofaj veya DH'den salınan İL-12 etkisi ile İFN-γ salan TH1 fenotipine farklılaşmaktadır. Mtb'ye karşı immün yanıt, esas olarak TH1 yanıtı (İFN-γ ve İL-12) ve TNF-α oluşumu ile ilişkilidir. TH1 hücreleri İFN-γ salınımı ile makrofaj, NK ve CD8 T hücrelerini aktive etmektedir. İFN-γ makrofajın fagositik kapasitesini arttırmakta böylelikle makrofaj ve T hücrelerinin etkileşimi ile Mtb ile mücadele edilmektedir (Ahmad, 2011).

TB'ye karşı koruyucu immün yanıt T hücre aracılıdır ve İFN-γ, TNF-α ve İL-12 salınımını ve reaktif nitrojen aracılarının oluşumunu gerektirmektedir. Başarılı bir aktivasyon için MyD88 aracılı sinyal oluşumuna ihtiyaç vardır (Serbina, Jia, Hohl, ve Pamer, 2008).

2.4.1. Hücreye giriş mekanizmaları

Doğal immün yanıtın aktivasyonunda ilk basamak mikobakteriyel yapıların, patojenle ilişkili moleküler yapılar "Pathogen associated molecular patterns" (PAMP)'ları tanıyan reseptörler tarafından tanınması ile başlamaktadır. PAMP'ların tanınması, esas olarak immün sistemin hücrelerinde ifade edilen germ-line (genetik olarak) kodlanan patern tanıma reseptörleri "Pattern Recognition Receptors" (PRR) ile gerçekleşmektedir (Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011)

Mtb'ye özel PAMP'lar konakta TLR, NOD (nükleotid oligomerizasyon domain)-benzeri reseptör (NLR), C-tip lektinler, CR gibi çeşitli hücre içi ve hücre yüzeyi PRR'ler aracılığı ile konak hücresi ile etkileşmekte ve konak doğal immün yanıtının başlatılması ve yönlendirilmesinde en önemli unsurlardan birini oluşturmaktadır (Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011; Torrado ve Cooper, 2013). Basilin farklı reseptörler ile hücre içerisine alınması yanıtın da farklı olmasına yol açmaktadır. TLR, NLR ve C-tip lektinler gibi daha çok immün tanıma ile ilişkili reseptörlerle etkileşim sıklıkla enfeksiyonun kontrolü ile sonuçlanan yanıtı uyarmaktadır (Torrado ve Cooper, 2013). Fagositoz ile ilgili reseptörler; CR, mannoz reseptörü (MR) ve scavenger reseptörü (SR) Mtb'nin fagositozunda rol almaktadır. CR opsonik, MR ve SR opsonik olmayan fagositozda işlev görmektedir (van Crevel ve diğerleri, 2003).

Toll-benzeri reseptörler (TLR)

TLR hayvanlarda tanımlanmış olan 13, insanlarda tanımlanmış olan 10 üyeden oluşan PRR'lerdir. TLR-1-10'nun herbiri farklı PAMP'ı tanımakta ve etkili bir immün yanıt oluşturmak üzere transkripsiyon faktörlerini uyarmakta ve ilgili sitokin salınımına neden olmaktadır. TLR'ler makrofaj, DH, B lenfosit, monosit ve NK hücresi gibi immün hücrelerin hücre zarı veya endositik veziküllerinin yüzeyinde ifade edilmektedir. Mtb yapılarının tanınması ile ilişkili TLR'ler; TLR-2, TLR-4, TLR-9 ve muhtemelen TLR-8'dir (Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011; Li ve diğerleri, 2012).

TLR ile Mtb'nin etkileşimi sinyal yolaklarını uyarmakta ve sitokin üretimine neden olmaktadır. TLR'ler sadece hücre yüzeyinde değil, aynı zamanda fagozom üzerinde de

bulunmaktadır. Bu nedenle Mtb ile TLR etkileşimi fagosit aktivasyonuna da yol açmakta, ancak bu etkileşim tek başına basilin hızlı alımınına neden olmaktadır (Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011). Mtb'nin özgül yapıları ile etkileşimden sonra sinyal yolakları aktive olmaktadır. Bu yolakta adaptör molekül olarak MyD88 "Myeloid differentiation primary response protein 88" önemli bir rol amaktadır. Takiben IRAK "İL-1 receptor-associated kinases", TRAF 6 "TNF receptor-associated factor 6", TAK1 "TGF-β-activated protein kinase 1" ve MAP "Mitogen-activated protein" kinaz bir dizi sinyal kaskadlarının uyarılmasına ve sonuçta bir nükleer translokasyon faktörü olan NFκB "Nuclear transcription factor κB"nin aktivasyonuna yol açmaktadır (Şekil 2.10) (Li ve diğerleri, 2012; van Crevel ve diğerleri, 2003). Bu transkripsiyon faktörleri TNF-α, İL-1β ve İL-12 gibi proinflamatuvar sitokinler ve NO gibi başlıca konak doğal immün yanıtı ile ilişkili genlerin transkripsiyonuna neden olmakta ve inflamatuvar süreci başlatmaktadır (Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011).

MyD88, Mtb'ye karşı doğal immün yanıtın aktivasyonunda önemli bir aracıdır. Konakta Mtb enfeksiyonuna karşı TLR aracılı sinyalizasyonun önemi, MyD88 yoksun farelerde gösterilmiştir. MyD88-yoksun fareler Mtb solunum yolu enfeksiyonuna yüksek derecede duyarlı olarak saptanmıştır (Li ve diğerleri, 2012; Saiga ve diğerleri, 2011).

MyD88'nin aksine, sadece TLR'lerde eksikliği olan farelerde Mtb enfeksiyonuna duyarlılık çok belirgin artmamıştır. Ayrıca TLR-2 yoksun farelerde Mtb enfeksiyonuna duyarlılık görülürken TLR-4 yoksun farelerde duyarlılık görülmemiştir. TLR-2 ve TLR-9 yoksun farelerde bu duyarlılık daha da artmıştır. Bu sonuç, Mtb'nin tanınmasında birden çok TLR'nin rol aldığını göstermiştir (Saiga ve diğerleri, 2011).

MyD88 haricinde, TLR-4 ile uyarılan ve adaptör molekülü TRIF "Toll/İL-1R (TIR) domain-containing adapter inducing interferon β" olan ikinci bir sinyal yolağının varlığı da bilinmektedir. TRIF ilişkili TLR-4 sinyal yolağı, konak hücresinde fagozom-lizozom füzyonunda önemli bir rol alan otofaji mekanizmasını başlatmakta ve Mtb'ye karşı konak doğal yanıtında görev almaktadır (Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011).

Mtb'nin hücre duvarında yer alan çeşitli moleküler paternlerini tanıma ile ilişkili TLR sinyal yolakları mevcuttur. Triaçile veya diaçile proteinler esas olarak TLR-1, TLR-2, TLR-6 ve TLR-4

tarafından tanınırken CpG DNA endozomal TLR-9 tarafından tanınmaktadır. TLR sinyalizasyonunda NFκB ve AP-1 transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna neden olan MyD88 ana bileşendir. TRIF adaptör molekülü ile sinyal iletimi ise IRF-3 transkripsiyon faktörünü uyarmaktadır (Zuñiga ve diğerleri, 2012).

Genetik ilişkilendirme çalışmaları, çeştili TLR polimorfizm durumlarında tüberküloza yatkınlığın arttığını göstermiştir. TLR polimorfizmi, mikobakteriyel lipopeptitlere karşı doğal immün yanıtı ve hastalığa yatkınlığı düzenlemektedir (Li ve diğerleri, 2012).

TLR-2

Mikobakteri hücre duvarı çeşitli glikolipitlerden oluşmaktadır. Bunlardan mannoz başlığı olmayan LAM, LM ve PİM ve 19-kDa lipoprotein TLR-2 tarafından tanınmaktadır ve makrofajın aktivasyonuna neden olmaktadır (Saiga ve diğerleri, 2011).

TLR-2, TLR-1 veya TLR-6 ile heterodimer oluşturmakta ve mikobakteri hücre duvarında bulunan Pİ-LAM, LM, 38 kDa glikolipitler, 19 kDa'luk glikoprotein, PİM, triaçilli ve diaçilli lipoproteinlerin tanınmasında rol almaktadır (Dao ve diğerleri, 2004; Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011). Triaçilli lipoproteinler (lipoarabinomannan) TLR-2/TLR-1 heterodimeri ile, diaçilli lipoproteinler ve 19-kDa'luk lipoprotein TLR-2/TLR-6 heterodimeri ile etkileşmektedir (Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011). Bu etkileşim doğal antimikrobiyal immün ve proinflamatuvar yanıtı başlatmaktadır (Torrado ve Cooper, 2013). TLR-2'nin, makrofajlardan TNF-α üretimini uyararak konak hücre doğal savunmasının başlatılmasında önemli olduğuna inanılmaktadır. Buna ilave olarak TLR-2 ve TLR-6'nın, İL-1β'nın uyarılmasında da etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca TLR-2 makrofajlardan İL-12 salınımında da rol almaktadır (Dao ve diğerleri, 2004; van Crevel ve diğerleri, 2003).

TLR-2 yoksun farelerin bozuk granülom formasyonu geliştirdiği, Mtb enfeksiyonuna duyarlılıklarının artmış olduğu ve kronik enfeksiyonun kontrolünde bozulma olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu farelerde İFN-γ, TNF-α ve İL-12'nin arttğı, ancak yanıtın fareyi korumaya yetmediği tespit edilmiştir (Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011; Li ve diğerleri, 2012). TLR-2 ve TLR-9 her ikisi de yoksun farelerin düşük doz Mtb ile bile erken dönemde öldükleri gösterilmiştir (Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011; Pitarque ve diğerleri, 2008).

TLR-4

Bazı mikobakteri hücre duvar bileşenleri TLR-4 tarafından tanınmaktadır. TLR-4, Mtb türlerinin bazıları tarafından salınan bir protein olan hsp60/65 “heat shock protein 60/65” ile aktive olmaktadır (Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011). Bu etkileşim sonucunda doğal immün ve proinflamatuvar yanıt uyarılmaktadır (Torrado ve Cooper, 2013). TLR-4 yoksun farelerin TNF-α üretiminde azalma olduğu, ancak tümüyle yok olmadığı gösterilmiştir (Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011; Li ve diğerleri, 2012; Saiga ve diğerleri, 2011; van Crevel ve diğerleri, 2003).

TLR 8 ve TLR-9

TLR-9, bakteri DNA’sındaki metile olmamış CpG motifini tanımaktadır. İn vitro çalışmalarda DH İL-12 salınımının TLR-9 ilişkili olduğu gösterilmiştir. TLR-9’un ayrıca NK hücre aktivitesini arttırdığı ve dalak hücrelerinden ve periferik kan mononükleer hücrelerinden tip I IFN salınımını arttırdığı gösterilmiştir. İn vivo çalışmalarda, TLR-9 yoksun farelerin yüksek doz Mtb enfeksiyonunda sağlam farelere göre daha erken dönemde öldükleri gösterilmiştir (Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011; 2012; Saiga ve diğerleri, 2011; van Crevel ve diğerleri, 2003). TLR-8 ise tek zincirli RNA’yı tanımaktadır (Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011).

TLR ile indüklenen proinflamatuvar sinyalin sınırlandırılması, doku hasarına neden olabilecek abartılı inflamasyona karşı koruyucu bir mekanizma sergilemektedir. Tirozin kinaz reseptör ailesi üyesi olan Tyro3/Axl/Mer (TAM) hem TLR ilişkili hem de sitokin kaynaklı proinflamatuvar immün yanıta karşı etki oluşturmaktadır. Bu Mtb’nin devamı için bir avantaj haline dönmektedir (Ahmad, 2011).

<u>NOD benzeri reseptörler (NLR)</u>

NOD (nükleotid oligomerizasyon domaini)-benzeri reseptörler mikobakterinin tanınmasında rol almaktadır. NOD2, bakteri peptidoglikanının temel bileşeni olan muramil dipeptidi (MDP) tanıyan stoplazmik bir NRL’dir. Bu yapı Mtb’de N-asetil muramik asit hidroksilaz (NamH)’dır ve yine NOD2 tarafından tanınmaktadır (Saiga ve diğerleri, 2011).

NOD2'den yoksun farelerde makrofajlar, Mtb enfeksiyonunu takiben bozulmuş sitokin yanıtına neden olmaktadır. NOD2 aracılı sinyal yolağı canlı mikobakteri ile uyarılmakta, fakat ısı ile inaktive edilmiş mikobakteri ile uyarılmamaktadır. Makrofaj içerisindeki fagozoma yerleşen canlı Mtb, fagozom zarına etki ederek sitozolik NOD2'yi uyarmaktadır (Saiga ve diğerleri, 2011).

NLRP (nacht leucine-rich repeat protein) 1, NLRP3 ve IPAF gibi NLR ailesinin bazı üyeleri Mtb ile enfeksiyon sonrası infalamazomun oluşmasına, kaspaz-1 bağımlı olarak İL-1β ve İL-18 salınımında artışa neden olmaktadır (Saiga ve diğerleri, 2011).

C-tip lektinler

Mtb'nin TLR ile etkileşimi konak yararına olan proinflamatuvar bir yanıtın başlatılmasına neden olmaktadır ancak, basil kendi yararına olarak konak doğal immün yanıtını bastıran veya düzenleyen bir sinyal oluşumuna neden olan stratejiler geliştirmektedir. MR, DC-SİGN ve Dektin-1 gibi C-tip lektinlere bağlanma inflamatuvar sinyalin kaybolmasına neden olurken NLR gibi sitozolik reseptörler ile etkileşim konağın patojene yanıtı ile sonuçlanmaktadır (Ahmad, 2011). Mannoz reseptörü (MR, CD207) gibi C-tip lektinler, mikobakterinin fagositozuna aracılık etmektedir (Saiga ve diğerleri, 2011).

DC-SİGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin), mikobakterinin LAM, lipomannan, arabinomannanını ve 19kDa'luk prtoteini tanıyan bir C-tip lektindir. DC-SİGN ekspresyonu hem DH'de hem de alveolar makrofajlarda gerçekleşmektedir. DH şlevinin düzenlenmesinde rol almaktadır (Berrington ve Hawn, 2007; Saiga ve diğerleri, 2011). Ayrıca Man-LAM ve DC-SİGN arasındaki etkileşimin DH olgunlaşmasına etkisi incelenmiş, DC-SİGN'nın tek başına inhibisyonu LPS ile aktive DH'de olgunlaşma ve immünolojik işlevi etkilememiştir. Man-LAM ile uyarılan DH'de yüzey reseptörlerinin ekspresyonu aşağı çekilmiş ve İL-10 üretimi artmıştır. T hücresi ile DH kokültüründe Man-LAM uyarımını takiben İFN-γ düzeyinin düştüğü gösterilmiştir (Wu ve diğerleri, 2011).

Dektin-1, miyeloid seri hücrelerin üzerinde eksprese olmaktadır. İlk olarak β-glukanı tanıması nedeniyle fungal PRR olarak tanımlanmıştır. TLR-2 ile etkileşimi kolaylaştırarak

sitokin üretimine neden olmaktadır. Mikobakterinin dektin-1 ile tanınması TNF-α, İL-6 ve İL-12 gen ekspresyonunda uyarım ile sonuçlanmaktadır (Li ve diğerleri, 2012; Saiga ve diğerleri, 2011).

Mincle (makrofaj ile indüklenebilir C-tip lektin), FcRγ ile ilişkili C-tip lektindir. Mtb'nin immünstimülatör bir bileşeni olan trehaloz 6-6 dimikolatı (kord faktör) tanımakta ve makrofajın aktivasyonuna neden olmaktadır. Uyarı CARD9 sinyal yolağının aktivasyonu aracılığı ile gerçekleşmektedir (Saiga ve diğerleri, 2011).

Diğer reseptörler

Diğer muhtemel reseptörler kompleman reseptörleri, çöpçü (scavenger) reseptörleri (SR), sürfaktan protein A reseptörü ve kolesterol reseptörleridir. TLR gibi bu reseptörlerin bir kısmı hem DH, makrofaj, T ve B lenfositlerinde hem de epitel hücre ve fibroblastlarda ifade edilmektedir. SR ve CR, daha çok fagositoz ile ilişkili reseptörlerdir (Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011).

2.4.2. Doğal immün yanıt

Doğal immün yanıt, konağın mikroorganizmaya karşı ilk giriş savunmasıdır. Doğal immünetinin bileşenleri, memeli hücresinde var olmayan patojene ait yapıları tanıyarak yanıtı başlatır. Makrofaj ve NK hücreleri, sitokin salınımı ile fagositleri aktive eder ve doğal immünitenin hücrelerini uyarır, inflamasyona neden olur (Abbas, 2007).

Doğal immün yanıt antimikobakteriyel konak savunmasının önemli bir koludur. Konağa enfekte aerosoller yolu ile giren Mtb ilk olarak alveolar makrofajlar ve epitel hücre ile karşılaşır. Doğal immün yanıt Mtb'nin hızla tanınması ve kontrol altına alınmasında önemli rol üstlenmektedir. Mtb'nin en sık giriş yolu olan akciğerin mikroçevresi, patern tanıyan moleküllerin iç içe girdiği karmaşık bir yapıya sahiptir. Bu yapı solunan mikobakteriye karşı konak yanıtının yönlendirilmesindeki ilk basamağı oluşturmaktadır. Mtb'nin konağın farklı PRR'leri ile etkileşimin enfeksiyonun seyrini etkilediği düşünülmektedir (Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011; Li ve diğerleri, 2012).

Epitel hücresi

Mikobakterinin konağa en sık ve en önemli giriş yolu akciğer mukozal alanıdır. Akciğerler, çeşitli tipte epitel hücreleri ile döşenmiş farklı anatomik alanlardan oluşmaktadır. Akciğer epiteli başlangıçta karmaşık bir fiziksel bariyer olarak solunan Mtb'ye karşı koymaktadır. Buna ek olarak yapılan çalışmalar, akciğer epitelinin mikroorganizmaya karşı konak immün yanıtını başlatmada ve arttırmada kritik rol üstendiğini göstermektedir. Ayrıca epitel hücresi sadece doğal immün yanıtın düzenlenmesinde değil, fonksiyonel molekül sentezine neden olarak aynı zamanda immün sistemin hücreleri ile temasa geçmekte ve kazanılmış immün yanıtı uyarma, doğal immün yanıt ile kazanılmış immün yanıt arasında köprü kurma yeteneğine de sahiptir. Akciğer epitel hücresi ve makrofajlar doğal immün yanıtın başlatılmasında ve kazanılmış immün yanıtın yönlendirilmesinde önemli rol oynayan hücrelerdir. Bu hücreler immün yanıtın oluşturulmasını, hücre - hücre etkileşimleri ve hücrelerden inflamatuvar aracıların salınımı ile gerçekleştirmektedir. Epitel hücresinden salınan molekül ve peptidler ve işlevleri Çizelge 2.1'de verilmiştir (Li ve diğerleri, 2012; Torrado ve Cooper, 2013).

Çizelge 2.1. Akciğer epitel hücresinden salınan moleküller ve mikobakteriye karşı konak savunmasındaki işlevleri

Molekül / peptid	İşlevi
Müsin	Mikroorganizmayı öldürme mekanizmasına katılır
Reaktif oksijen aracıları	Mikroorganizmayı öldürme mekanizmasına katılır
Nitrik oksit	Mikroorganizmayı öldürme mekanizmasına katılır
Proinflamatuvar sitokinler (TNF-α, İFN-γ, İL-1, İL-18, İL-27)	Fagositlerin aktivasyonuna neden olur
Kemokinler • İL-8 (CXCL8) • İnterferon-indüklenir protein-10 (IP-10, CXCL10) • Monosit kemoatraktan protein (MCP-1) • Monokin indüklenen İFN-γ (MIG, CXCL9)	Fagositlerin enfeksiyon alanına göçünü uyarır
Büyüme faktörleri	Fagositik hücre aktivasyonu ve göçünü uyarır
Matriks metalloproteinaz (MMP9)	Makrofaj göçünü arttırır Granülom formasyonu oluşumuna katkıda bulunur
İnsan β-defensin-2	CCR6 aracılığı ile olgunlaşmamış dendritik hücrelerin ve bellek T hücrelerin enfeksiyon alanına göçünü uyarır
Hepsidin	Antimikobakteriyel etki
Katelisidin (LL-37)	Antimikobakteriyel etki

Mtb oldukça tehlikeli bir patojendir ve doğal immün yanıtın hücrelerinden (hem makrofaj, hem de epitel hücre) kaçabilme yeteneğine sahiptir. Epitel hücre, Mtb ile ilk karşılaşan ve temas eden hücrelerden biri olmasına rağmen, Mtb'ye karşı epitel hücre aracılı konak yanıtı tam olarak anlaşılamamıştır (Li ve diğerleri, 2012).

Akciğer epitel hücresi TLR eksprese etmektedir. TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6 ve TLR-10 bronş epitel hücresinin apikal zarında; TLR-9 da stoplazmik kopartmanında bulunmaktadır. Kolumnar olmayan ve alveolar epitel hücrsinde ise baskın olarak TLR-2, daha az olarak da TLR-4 eksprese edilmektedir. Mtb enfeksiyonu sırasında bakteri hücre duvar yapıları epitel hücre TLR, sürfaktan proteinleri veya diğer PRR'ler tarafından tanınmaktadır. Bu tanıma sonucunda epitel hücresi, diğer immün hücreler henüz havayoluna gelmeden önce sinyalizasyonu başlatmaktadır (Li ve diğerleri, 2012).

Akciğer epitel hücresinin TLR-2 aracılığı ile Mtb'yi tanıması, proinflamatuvar sitokin İL-8 ve insan β-defensin-2 (HBD-2)'nin oluşumuna neden olmaktadır. Alveolar tip II epitel hücreleri TLR-2 bağımlı olarak dektin-1 ekspresyonu yapmakta, ROI ve İL-12 üretimini uyararak proinflamatuvar etki oluşturmaktadır (Li ve diğerleri, 2012).

Akciğer epitel hücresinin mikobakteriyi sınırlamaya yönelik katkılarının aksine, bakterinin yayılmasına neden olduğu etkileri de mevcuttur. Alveolar epitel hücresinin esas ölüm mekanizması nekrozdur. Alveolar epitel hücresi, primer enfeksiyon sırasında hücresel nekroza uğrayıp bakterinin salınmasına neden olarak mikobakterinin yayılımına ciddi katkıda bulunmaktadır. Ayrıca Mtb enfeksiyonu sırasında, enfekte alveolar epitel hücrelerin apoptozu engellenmektedir. Nekroz, mikobakterinin çoğalması veya proinflamatuvar ürünler ile ilişkilendirilememiştir. Ancak artmış geçirgenlik nedeniyle olabileceği varsayılmaktadır (Li ve diğerleri, 2012).

Akciğer epitel hücresi PRR'ler aracılığı ile patojeni tanımakta ve konak doğal immün yanıtını havayollarında uyarmaktadır. Aktive olmuş doğal yanıt fagositlerin, antijen sunan hücrelerin, T ve B hücrelerin enfeksiyon alanına göçüne neden olmaktadır. Bu göç, profesyonel olmayan immün hücreler (epitel hücresi) ile profesyonel immün hücreler arasında bağlantı kurulmakta ve antijenin tanınması ve kazanılmış immün yanıt güçlendirilmektedir (Li ve diğerleri, 2012).

Polimorfonükleer lökositler (PMN; nötrofil)

Nötrofiller, kan dolaşımında dolanan en yoğun beyaz hücrelerdir ve inflamatuvar yanıtın ilk fazını yönlendirmektedir. Stoplazmalarında iki çeşit granül içermektedir; lizozim, kollajenaz ve elastaz gibi enimleri tanımlayan spesifik granül ve defensin ve katelisidin gibi mikrobisidal bileşenleri içeren azürofilik granül. Nötrofiller kemoatraktanların etkisi ile göç ettiği enfeksiyon alanında, patojene karşı bu granüller ile etkisini göstermektedir (Abbas, 2007).

Mtb enfeksiyonunda nötrofillerin rolü ile ilgili in vivo ve in vitro çalışmalar çelişkiler göstermektedir. PMN, mikobakterinin bulunduğu enfeksiyon alanına ilk göç eden hücrelerdir. Burada çeşitli reseptörler eksprese eder ve antimikrobiyal moleküller salar. PMN ile ilgili yapılan çalışmaların çoğu, nötrofillerin Mtb enfeksiyonunda aktive olduğunu ve bakteriyi in vitro olarak sınırlama yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir. Nötrofiller bu etkilerini insan nötrofil peptidi 1–3, katelisidin, ve lipokalin-2 oluşturarak göstermektedir. Ayrıca apoptotik nötrofiller, granüler proteinlerini ve ısı şoku proteinlerini salarak makrofajı

aktive etmektedir. Diğer yandan PMN'nin Mtb enfeksiyon alanında kümelenmesinin bakterinin çoğalmasına bir etkisi olmadığı, aktif hastalıkta koruma yerine patolojik rol aldığı gösterilmiştir (Dheda, Schwander, Zhu, van Zyl-Smit, ve Zhang, 2010).

Doğal Öldürücü "Natural Killer" (NK) hücreler

NK hücreleri, enfekte ve stres altındaki hücreleri tanıyan ve onları direkt olarak öldürerek ve proinflamatuvar sitokin salarak yanıt veren hücrelerdir. NK hücreleri enfeksiyon sırasında oluşan İFN-γ'nın önemli bir kaynağıdır (Abbas, 2007).

Mikobakteri enfeksiyonunda makrofajın yeterli aktivasyonu için en önemli sitokin İFN-γ'dır. NK hücreleri, mikobakteri enfeksiyonunda İFN-γ salınımı ile makrofajı aktive etmekte, bakterinin öldürülmesine fagozomal olgunlaşma ve RNI üretimi ile fagositoza katkıda bulunmaktadır. Aktif TB'de NK hücreleri azalmış sitotoksik etki ve artmış İFN-γ üretimi sergilemektedir. Bu daha çok seçilmiş NK altgruplarının aktifleşmesi ile ilişkilendirilmiştir. NK hücreleri Mtb ile enfekte monosit ve makrofajlarca uyarılabilmekte ve apoptozu indüklemektedir. Ayrıca NK hücresi, Mtb'ye karşı T hücre yanıtını da düzenlemektedir (Culley, 2009; Dheda ve diğerleri, 2010; Nicod, 2007).

NK hücresini aktive ve inhibe eden potansiyel etkileşimler bulunmkaktadır. NK hücresinin akciğerdeki işlevi hem hücre teması hem de çözünür faktörlerden etkilenmektedir (Culley, 2009). NK hücreleri ayrıca mikobakteriye karşı bakterisidal etki de göstermektedir. Bu hücreler antijen sunan hücre yokken bile yabancı antijen varlığında aktive olmakta ve mikobakteri ile enfekte hücreyi öldürmektedir (Nicod, 2007).

CD-1d sınırlı NKT hücrelerinin fare modelinde Mtb enfeksiyonuna karşı korunmada rol aldğı gösterilmiştir. Ayrıca NKT hücrelerinin Mtb enfeksiyonunda patolojiden sorumlu Th17 hücrelerinin gelişimini de baskıladığı gösterilmiştir (Dheda ve diğerleri, 2010).

Dendritik hücre (DH)

Dendritik hücre (DH), T hücrelerine antijen sunma için özelleşmiş immün sistem hücreleridir. En güçlü profesyonel antijen sunan hücrelerdir. Bu işlevleri ile enfeksiyona karşı doğal immün yanıtta ve doğal ve kazanılmış yanıtın ilişkilendirilmesinde önemli bir rol almaktadır. Yüksek MHC sınıf II ve CD80, CD86 ve CD40 yüzey kostimülatör molekül ekspresyon özellikleri antijen sunma kapasitesine katkıda bulunmaktadır. Geniş hücre yüzeyi, fagositik yeteneği ve dokularda yaygın dağılıma sahiptir. Bazı dokularda dağılımı seyrek olmakla birlikte, deri, trakea ve barsaklarda ağ yapısında bir dağılım özelliği sergilemektedir. Mikrobiyal antijenleri yakalayıp işledikten sonra T hücrelerine sunma işlevleri, kazanılmış immün yanıtın gelişimi açısından kritiktir (Abbas, 2007; Martino, 2008). Ancak Mtb ile yapılan çalışmalarda akciğer miyeloid DH'nin, akciğerde antijen sunumunda optimal olmayıp antijene özgül T hücrelerinden sitokin salınımını uyarmada yeterince etkin uyarıcılar olmadıkları gösterilmiştir (Cooper, 2009).

Havayollarında Mtb ile enfekte olmuş imDH, olgunlaşma programlarını uyarmaktadır. Monosit öncüllerinden imDH'ye, imDH'den uyaranlar varlığında olgun DH'ye dönüşüm gerçekleşmektedir (Aquino ve diğerleri, 2011). DH'nin mikobakteri ile enfeksiyonu sonucunda mikobakteri imDH'yi enfekte eder, olgunlaşır ve T hücre çoğalmasına neden olur, ancak alana yeni göç eden DH öncülü enfekte monositler, olgun DH'ye dönüşmede ve T hücresini uyarmada yetkin değildir (Marrow ve diğerleri, 2008). Olgunlaşan DH torasik lenf düğümlerine göç etmekte ve burada T hücre yanıtını başlatmaktadır. Bu yanıt TH1 yönünde gerçekleşir. Ancak, süreç mikobakteri enfeksiyonlarında oldukça yavaştır ve 12-21 günden önce T hücre yanıtı başlatmamaktadır (Flynn ve diğerleri, 2011; Martino, 2008).

Lenf düğümüne mikobakteriyi taşıyan imDH düşük seviyede MHC sınıf II ve kostimülatör molekül eksprese etmektedir. İn vitro çalışmalar mikobakterinin alımını takiben DH işlevini ve fenotipini değiştirdiğini göstermiştir. Ayrıca DH, mikobakterinin varlığını devam ettirdiği bir ortam da sağlamakta ve lenf düğümüne bakterinin göçüne yardımcı olmaktadır. Lenf düğümünde aktive olan DH, yüksek miktarda MHC sınıf I ve II molekülü, CD80 ve CD86 gibi kostimülatör moleküller eksprese etmektedir. Ayrıca İL-12, İL-18 ve İL-23 gibi çözünür

maddeler salmaktadır. Mtb, dendritik hücreye DC-SİGN aracılığı ile girmektedir. LAM, DC-SİGN'nın ana ligandı gibi görünmektedir (Martino, 2008; Nicod, 2007).

Makrofaj

Makrofajların köken aldığı mononükleer fagositler, esas işlevi fagositoz olan hücreler olmakla birlikte doğal ve kazanılmış immün yanıtta merkezi bir rol de üstlenmiştir. Mononükleer fagositler kemik iliğinden köken almıştır, kan dolaşımında sirküle etmektedir ve bazı dokularda aktive olup olgunlaşmaktadırlar. Kemik iliğinden kan dolaşımına ilk karışan hücre monosittir. Bu hücreler dokuya göç edip olgunlaştığında makrofaj olarak adlandırılmaktadır. Makrofajlar doğal immün yanıtın geç döneminin ana efektör hücreleridir (Abbas, 2007).

Solunum yolu mukozası mikobakteri için önemli bir giriş yeri oluşturmaktadır. Monosit serisi hücreler bu dokunun immün savunması ve sürveyansında önemli role sahiptir. Solunum yolu ve akciğerler konumları ve eksprese ettikleri yüzey molekülleri ile birbirinden ayrılabilen yerli (resident) makrofaj ve DH alt gruplarını içermektedir. Alveolar ve akciğer makrofajları CD11c+CD11b−CX3CR1− yüzey fenotipine sahip iken DH CD11c+CD11b+CX3CR1+ yüzey fenotipi sergilemektedir. Mtb ile enfekte dokuya göç eden inflamatuvar monositler CD11b, CCR2 ve farede F4/80 ile karakterizedir (Serbina ve diğerleri, 2008).

Foamy (köpüksü) makrofaj oluşumu

Granülom formasyonunda görülen ve yağ cisimcikleri içeren paketlere sahip foamy makrofajlar, kronik proinflamatuvar uyarı ile ilişkilendirilmiştir. Enfeksiyonda bu proinflamatuvar etkili makrofajların oluşumu, TLR aktivasyonu ve TNF-α ve monosit kemotaktik protein-1 (MCP) gibi proinflamatuvar sinyal varlığına bağlı olarak gelişmektedir. Köpük hücrelere dönüşüm, hücre içi Mtb'nin lipit ürünlerinin aşırı üretimi ile oluşmaktadır. Lipitler, özellikle trehaloz dimikolat, hücre içi vesiküllerde birikmekte, çok veziküllü cisimcikler meydana gelmektedir (Russell ve diğerleri, 2009).

Foamy makrofajların kazeöz granülomu oluşturması; hücre içinde Mtb'nin sentezlediği ve hücre dışına saldığı lipitler makrofajın veziküllerinde birikir. Hücre dışına salınan veziküller hem enfekte, hem de enfekte olmayan makrofajlar tarafından alınır ve köpüksü hücreler oluşur. Bu hücreler inflamatuvar nekrotik bir süreç ile ölür ve lipit damlacıklarını granülom içerisinde dış ortama bırakır. Granülomun sınırlandırıcı fibrotik kapsülü nedeniyle kazeöz yapı ve nekrotik debris birikir (Russell ve diğerleri, 2009).

Foamy makrofajlar mikobakteriyi çoğalmayan bir fazda tutmaktadır. Köpüksü hücrelerin varlığı ile granülomun kazeöz bir yapı sergilemesi ilişki göstermektedir. Diğer yandan granülomdaki makrofajların lipomannan etkisi ile TLR-2 bağımlı bir şekilde çok çekirdekli dev hücrelere dönüştüğü de gösterilmiştir (Russell ve diğerleri, 2009).

Granülom formasyonunda makrofaj

Havayollarında mikobakteri ve makrofajın karşılaşmasını takiben, enfekte makrofaj başlangıçta hücre nekrozu ve akciğerin distaline göç ederek basilin yayılmasını kolaylaştırmaktadır. Parankime geçen makrofaj, yavaş inflamatuvar süreci başlatmakta ve granülomu oluşturmak üzere enfekte olmayan makrofajları ve diğer immün hücreleri alana çağırmaktadır. Granülom oluşumu, kronik antijenik uyarıma makrofaj aracılı faktörler ile verilen, organize ve yapılandırılmış bir yanıttır. Bu yanıtta pek çok hücre tipi görülmekle birlikte, yapının ana bileşeni ve başlatıcısı makrofajdır. Granülom formasyonunda farklı makrofaj tipleri görülmekle birlikte bunların ana işlevleri; antimikobakteriyel efektör mekanizmalar, pro ve anti-inflamatuvar sitokin oluşumu, kemokin ve doku onarımı ile ilişkili proteinlerin salınımıdır (Flynn ve diğerleri, 2011). Granülom bakterinin sınırlandırılmasına katkıda bulunmakla birlikte, Mtb'nin enfekte organda makrofaj içerisinde varlığını yıllarca devam ettirmesine olanak sağlamaktadır (Russell ve diğerleri, 2009).

Makrofaj polarizasyonu

Mikobakteri enfeksiyonu sırasında farklı işlevlere sahip bir dizi makrofaj alt tipleri görülmektedir. Bunlardan Mtb ile ilk karşılaşan alveolar makrofajlar, immün baskılayıcı ve zayıf antijen sunumu yeteneğine sahiptir. Esas olarak iki tip makrofaj tanımlanmıştır; klasik

ve alternatif fenotipteki makrofajlar. M1 ve M2 makrofajlar esas olarak reseptör, sitokin ve kemokin ekspresyonları ve efektör işlevleri ile birbirlerinden ayrılmaktadır (Şekil 2.5). Makrofajın bu alt tiplere polarizasyonu mikroçevreden etkilenmekte; bu mikobakteriye karşı konak yanıtının proinflamatuvar mı, yoksa anti-inflamatuvar yönde mi gelişeceğini ve sonucunda Mtb'nin yok edilip edilemeyeceğini belirlemektedir. Aslında yapılan son çalışmalar göstermiştir ki, makrofaj aktivasyonu plastitise göstermekte, hızlı ve geri dönüşümlüdür. Bu da makrofaj popülasyonunun dinamik olduğunu, başlangıçta inflamasyona neden olurken sonradan inflamasyonun çözülmesini sağladığını düşündürmektedir (Benoit ve diğerleri, 2008; Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011).

Klasik aktive makrofaj (M1, KAM)

Klasik aktive makrofaj (M1), esas olarak mikrobisidal etki, enfeksiyon sonrası patogenez ve inflamasyon ile ilişkilidir. Mikrobiyal ürünler veya İFN-γ etkisi ile meydana gelen farklılaşmasının klasik yolu, antimikrobiyal etkinin oluşmasına ve proinflamatuvar sitokin ve kemokinlerin salınımına neden olmaktadır. M1 polarizasyon ile ilişkili genler; TNF-α, İL-6, İL-12, İL-1β gibi sitokinler, İL-7R ve İL-15RA gibi sitokin reseptörleri, CCL2, CCL5 ve CXCL8 gibi kemokinler, CCR7 gibi kemokin reseptörleri, makrofaj mikrobisidal aktivitede etkili NO sentaz 2 (NOS2) ve CD80 ve CD86 gibi kostimüatör molleküllerdir (Şekil 2.5) (Benoit ve diğerleri, 2008; Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011).

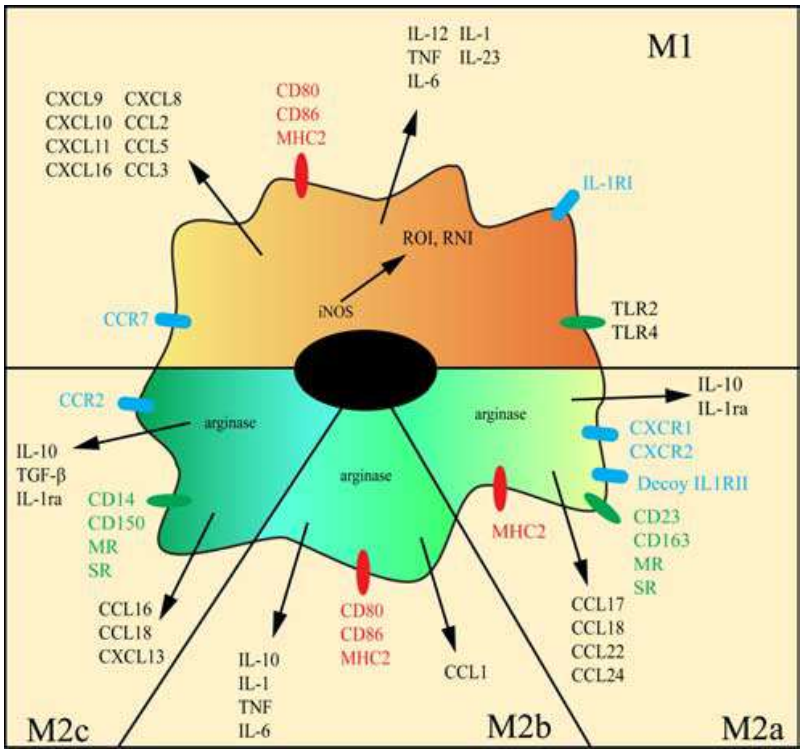
M1 polarizasyona neden olan klasik aktivasyonda esas olarak İFN-γ gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınmasına neden olan NF-κB transkripsiyon faktörleri uyarılmaktadır. İnterferon regülatuvar faktör 5 (IRF5) de M1'yi düzenleyen bir transkripsiyon faktörü olarak tanımlanmıştır. IRF5, İL-12 ve İL-23 proinflamatuvar sitokinlerin gen ekspresyonunda rol almaktadır (Tomioka ve diğerleri, 2012).

Mtb ile enfekte edilen fare makrofajlarının aktif TB'li hastalarınkine benzer şekilde enfeksiyonun erken döneminde M1 yönünde polarize olduğu gösterilmiştir. Ancak antibiyotik tedavisi alan bazı hastaların M2 fenotipi gösterdiği de yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir. *M. bovis* BCG suşunun fagozoma NOS2 göçünü ve bunun sonucunda NO

salınımını engellediği gösterilmiştir. Mikobakteri virülans faktörlerinin salınımı ile M1 polarizsyonunu engellemektedir (Benoit ve diğerleri, 2008).

Alternatif aktive makrofaj (M2,AAM)

Alternatif aktive makrofaj (M2), daha çok immün düzenleyici ve zayıf mikobisidal etki ile karakterize üç alt tipten oluşmaktadır (M2a, M2b ve M2c). M2a, İL-4 ve İL-13; M2b, immün kompleks; M2c de, İL-10 ve glükokortikoidler ile uyarımaktadır. M2a ve M2c immün düzenleyici etki gösterirken M2b zayıf mikrobisidal etkilidir. Bu alt tiplerde antimikrobiyal aktivite ve İL-12 oluşumu yoktur. Antijen sunum kapasitesi düşüktür ve İL-10 ve TGF-β oluşumu ile immün yanıtı baskılayabilmektedir (Benoit ve diğerleri, 2008; Flynn ve diğerleri, 2011). M2'nin en önemli belirteci iNOS ile yarışan arjinazdır. Arjinazın mikobakteri ile uyarılması, makrofajlardan TLR ile indüklenen İL-6, İL-10 ve G-CSF oluşumuna neden olmaktadır. Bu fenotip mikobakterinin öldürülmesinde bozukluk ile ilişkili bulunmuştur (Şekil 2.5) (Flynn ve diğerleri, 2011).



Şekil 2.5. Polarize makrofajın genel özellikleri. Klasik aktive makrofaj (M1) LPS veya mikrobiyal ürüner ile uyarılır, proinflamatuvar medyatörlerin ve reaktif nitorjen aracıların salınımı ile karakterizedir. Alternatif aktive makrofaj (M2) üç sınfa ayrılır (Benoit ve diğerleri, 2008'den alınmıştır)

M2 polarizasyonunda, makrofaj hücre zarında eksprese olan c-Maf (lösin zipper transkripsiyon faktörü) ve galaktin-3 (karbonhidrat bağlı lektin) önemli rol almaktadır. Ek olarak, IκB kinaz β (IKKβ) STAT-1 (signal transducer and activator of transcription)'i engelleyerek M1 makrofaj fenotipini inhibe etmektedir (Tomioka ve diğerleri, 2012).

Enfeksiyon hastalıklarının kronikleşmesi makrofajların M2 fenotipine yeniden programlanması ile ilişkilidir. M2 makrofajların varlığı, mikobakteri enfeksiyonlarının kronik yanıtı açısından kritiktir (Benoit ve diğerleri, 2008; Flynn ve diğerleri, 2011).

M1-M2 makrofaj dengesi

Makrofajlar sitokin etkisi, T hücresi ile hücre-hücre teması, B hücreleri ve mikrobiyal faktörlere göre farklılaşmaktadır. Mtb enfeksiyonunda M1 ve M2 makrofaj dengesi, basili sınırlayan bir granülom oluşumu için kritiktir (Flynn ve diğerleri, 2011). Aktif TB durumunda granülomda M1 ve M2 makrofajların dengede olduğu yüksek bakteri yüklü aktif granülom oluşabildiği gibi, M2 makrofajların yeterince bulunmadığı Treg'i artmış aktif granülom veya M1 makrofajlar çok arttığı düşük basil yüklü aktif granülom da görülebilmektedir. Latent enfeksiyonda ise M1 ve M2 makrofajların dengede olduğu veya M1 ve M2 makrofajların dengede olduğu ancak Treg'in arttığı granülomlar görülebilmektedir (Flynn ve diğerleri, 2011).

M1 makrofajları bakterinin öldürülmesi, proinflamatuvar medyatörlerin oluşumu, T hücrenin uyarımı ve enfeksiyon alanına göçü için gereklidir. M1 makrofajların bu etkileri doku hasarına ve zayıf granülom rezolüsyonuna neden olmaktadır. M1 ve M2 dengesi, enfeksiyonun ve doku hasarının kontrolünü sağlamaktadır (Flynn ve diğerleri, 2011).

Fagositoz

Makrofajın Mtb'ye karşı mikrobisidal kapasitesi ile ilgili bilinenler oldukça azdır. Bilinen antibakteriyel yapılar; reaktif oksijen ve nitrojen ürünlerinin üretimi gibi, fagozomun asidifikasyonu ve fagozomun lizozom ile füzyonu ile bakterilerin yıkım mekanizmaları mikobakterilere karşı yeterince etki göstermemektedir (Deretic ve diğerleri, 2009; Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011).

Mtb'nin fagositozu birkaç basamaktan oluşan bir süreçtir ve makrofajın basili tanıması ile başlamaktadır. Mtb'nin fagositozunda, SR, MR ve CR gibi pek çok reseptör yer almaktadır (Deretic ve diğerleri, 2006; Jordao ve Vieira, 2011; Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011). Mtb yapılarının PRR'ler tarafından tanınması, aktin iskelet yapısının ve hücre zarının yeniden yapılanmasına neden olan sinyal kaskadını uyarmakta, böylelikle Mtb hücre içerisine alınmaktadır. Fagozom içerisinde hücreye alınan Mtb, fagozom ile lizozomun füzyonu sonucu fagolizozom içerisinde kalmaktadır. Fagolizozom normalde mikroorganizmanın eliminasyonunu sağlayan, asidik pH'lı, yüksek miktarda hidrolazlar ve toksik oksidatif özelliği olan bileşenler yapabilen defensinleri içermektedir. Ancak Mtb, bu mekanizmalardan kaçma kapasitesi nedeniyle öldürülmekten korunmakta ve enfeksiyona neden olabilmektedir (Jordao ve Vieira, 2011).

Fagositoz; kompleman bileşenleri ile opsonize olmuş veya olmamış mikobakterinin fagositer hücre tarafından alınması ile başlamaktadır. İn vitro çalışmalar, kompleman ile opsonize olmuş Mtb'nin %80'nin CR3 aracılığı ile fagozite edildiğini göstermiştir. Opsonin aracılığı ile olmayan fagositoz, alveolar boşlukta kompleman bileşenleri bulunmadığından akciğerdeki primer enfeksiyon sırasında önemli bir süreç teşkil etmektedir (Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011).

Nitrik oksit (NO) oluşumu

Makrofaj içerisindeki hücre içi mikroorganizmaya karşı ilk mikrobisidal etki solunum patlamasıdır. Bu, mikroorganizma tarafından tetiklenen ve yüksek derecede ROI ve RNI oluşumu ile ilişkili özgül olmayan bir konak savunmasıdır. Yapılan çalışmalar Mtb'nin hidrojen peroksit ve hikroksil radikalleri gibi ROI'lere oldukça dirençli olduğunu göstermiştir (Jordao ve Vieira, 2011).

Makrofajlar mikrobiyal ürünlere yanıtta ROI'lere ek olarak sitozolik enzim indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) etkisi ile RNI, özellikle de NO oluşturmaktadır. iNOS, arjininin sitrüline dönüşümünü katalize etmekte, bu sırada Mtb'nin duyarlı olduğu serbest gaz olan NO açığa çıkmaktadır. Lipopolisakkarit (LPS) gibi bakteri ürünleri ve İFN-γ ve TNF-α gibi proinflamatuvar sitokinler NO oluşumunu arttırmaktadır. Fagolizozomda NO, hidrojen

peroksit veya süperoksit ile birleşmekte, yüksek derecede reaktif peroksinitrit radikalleri oluşmakta ve mikroorganizmayı öldürmektedir (Abbas, 2007; Jordao ve Vieira, 2011).

Makrofajlardan NO oluşumunu in vitro göstermek oldukça güçtür. Buna rağmen Mtb lipoproteinlerine karşı insan monositlerinden in vitro ve aktif TB'li hastaların akciğerlerlerinde in vivo iNOS ekspresyonu gösterilmiştir. İnsan TB'de RNI yolağın işlev gördüğü, ancak monosit ve makrofajlarda RNI-bağımsız mikobakteri öldürme mekanizmalarının da var olduğu rapor edilmektedir. İnsan monositleri Mtb'yi TLR-bağımlı, NO-bağımsız yoldan da öldürebilmektedir (Serbina ve diğerleri, 2008). Ayrıca mikobakterinin öldürülmesi için iNOS tarafından oluşturulan NO varlığı önemli gibi görünmektedir (Jordao ve Vieira, 2011).

Otofaji

Hücre içi mikobakterinin akibetini etkileyen mekanizmalardan biri otofajidir. Otofaji, organel ve mikobakteriyi içeren stoplazmik bileşenlerin çift zar bağlı otofagozom ile ayrıştırıldığı ve yıkım için lizozoma taşındığı özelleşmiş hücresel bir süreçtir. Bu süreç, hücre içi mikroorganizmayı ve istenmeyen hasarlı dokuların sindirilmesine neden olmaktadır. Otofajinin aktivasyonu fagozom olgunlaşmasına ve mikobakterinin makrofaj içerisinde ölümüne yol açmaktadır (Deretic ve diğerleri, 2006; Harris, Hope, ve Lavelle, 2009; Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011).

"The art of self eating" -kendini yeme sanatı- olarak tanımlanan otofaji, hücresel homeostazis için kritik bir süreçtir ve hücreye kendi sitozolüne ait parçaları etkin bir şekilde alma ve sindirme fırsatı vermektedir. Otofaji, orta düzeyde gerçekleştiği zaman hücrenin hayatta kalımı için kritik bir mekanizmadır. Buna rağmen, yüksek düzeyde kronik aktivasyon apoptoza neden olabilmektedir (Deretic ve diğerleri, 2006; Jordao ve Vieira, 2011).

Mtb enfeksiyonunda otofajinin ilaçlarla veya açlık ile başladığı gösterilmiştir. Ayrıca mikobakteri hücre duvarındaki PI'nin otofaji için ana hedef olduğu saptanmıştır. Ek olarak, Mtb enfeksiyonunda otofajinin doğal ve kazanılmış immmün yanıtı ilişkilendirdiğine dair kanıtlar da mevcuttur. Otofaji, mikobakterinin fagozom olgunlaşmasını bloklamasına

rağmen makrofajın mikobakteri ile baş etme mekanizmasıdır (Harris ve diğerleri, 2009; Jordao ve Vieira, 2011).

Otofaji, sitokin ve ligandlar etkisi ile düzenlenmektedir. TH1/TH2 polarizasyonunda etkili sitokinler İFN-γ, İL-4 ve İL-13 otofajiyi etkilemektedir. TH1'den salınan İFN-γ otofajiyi uyarırken TH2 sitokinleri İL-4 ve İL-13 otofajiye antagonistik etki göstermektedir. Ayrıca TNF-α, NF-κB'nin inhibe edildiği durumda otofajiyi etkilemektedir. LPS'nin TLR-4 ile bağlanması da otofajiyi uyarmaktadır (Deretic ve diğerleri, 2006; Harris ve diğerleri, 2009).

Mikobakteri enfeksiyonunda otofaji; granülomdaki alveolar makrofajlar, mkobakterinin neden olduğu fagozom olgunlaşmasının bloklanmasını engelleme yeteneğine sahip değildir ve apoptoza giderler. Mikobakteri proteinleri ve glikolipitlerini taşıyan apoptotik veziküller DH'ye taşınır ve İFN-γ oluşturan MHC sınıf I ve CD1-sınırlı T hücresini uyarır. İFN-γ makrofajda otofajiyi uyarır ve hücre içi mikobakteri yıkımı meydana gelir. MHC sınıf II ile T hücre uyarılır ve granülom formasyonu oluşumuna katkıda bulunur. Enfekte makrofajlardan otokrin İL-4 ve İL-13 salınımı ile süreç durur (Harris ve diğerleri, 2009).

Antijen sunumu

Antijen sunan hücreler (ASH), immün yanıtta ilk savunma hattı uyarımı için merkezi rol oynamaktadır. Mikrobiyal ürünler ile uyarılan ASH (makrofaj, DH) farklılaşmaları, doku dağılımları ve uyarana yanıtları açısından çeşitlilk sergileyebilmektedir (Benoit ve diğerleri, 2008).

Mikobakteriyel proteinler, glikolipit, lipitler ve fosfoligandlar MHC sınıf I, MHC sınıf II ve CD1 sınırlı proteinler aracılığı ile T hücrelerine sunulmaktadır. ESAT-6, CFP-10, Ag85, Mtb32a, Mtb9.8, Mtb8.4, TB10.4 ve 19-kDa ve 38-kDa'luk lipoproteinler Mtb'nin antijen sunumunda rol alan esas antijenlerini oluşturmaktadır. Makrofaj veya DH fagozomunda çoğu mikobakteriyel antijenler MHC sınıf II moleküller ile eksprese olmakta ve CD4 T hücrelerine sunulmaktadır. Fagozomal membran ayrıca MHC sınıf I moleküllerine de sahiptir. Mtb'nin, lipit ve glikolipitlerinin sunumunda rol almaktadırlar (Baena ve Porcelli, 2009).

Mtb ile enfekte makrofajların apoptozu nedeniyle oluşan ve Man-LAM ve lipopeptit gibi basil antijeni içeren veziküller DH tarafından alınmakta ve MHC sınıf I molekülleri ve CD1 molekülleri tarafından T hücrelerine sunulmaktadır (çapraz sunum) (Behar, Martin, Nunes-Alves, Divangahi, ve Remold, 2011).

TB'de antijen sunumunda, mikobakteri proteinleri MHC sınıf II molekülleri ile sunulmakta ve CD4 T hücre uyarımına neden olmaktadır. Fosfoligandlar antijen sunumu olmadan γδ T hücrelerini uyarır. Proteinlerin MHC sınıf I molekülleri ve glikolipitlerin CD1 ile sunulması muhtemelen çapraz sunuma neden olur. Bakteriyi taşıyan makrofajların apoptozu sonucunda antijen taşıyan veziküllerin DH tarafından sunulması ile gerçekleşir (Kaufmann, 2002).

B7.1 (CD86) ve B7.2 (CD80), antijen sunan hücre yüzeyinde eksprese olan kostimülatör moleküllerdir. Bu moleküllerin T hücre yüzeyindeki CD28 ve CTLA-4 ile etkileşimi, T hücre aktivasyonunun önemli bir basamağını oluşturmaktadır. Mtb enfeksiyonunda B7.1 ve B7.2 ekspresyonunun her ikisinin birlikte yokluğu, konak yanıtında azalma ile sonuçlanmıştır. B7.1 ve B7.2'nin tek başına yokluğunda, fare deneylerinde bakteri yükünün sınırlandırılması, akciğere immün hücrelerin göçü, TH1 yanıtının oluşumu, ya da granülomatöz yanıtın oluşumu gerçekleşmemektedir. Sonuçlar B7.1 ve B7.2 moleküllerin Mtb'ye karşı konak yanıtında eşit etkisinin olduğunu göstermiştir (Bhatt, Kim, Kim, Mathur, ve Salgame, 2013).

Fibroblast

Konak immün yanıtı primer TB enfeksiyonu sırasında Mtb'nin yayılımını sınırlandırmakta, ancak tüm basilleri yok edemediğinden ve latent enfeksiyona neden olduğundan reaktivasyondan sorumlu olmaktadır. Mtb granülom içerisinde fagositer hücrelerde ve ek olarak fibroblast gibi immün olmayan hücrelerde de bulunmaktadır. Fibroblastlar, latent Mtb enfeksiyonunda granülom formasyonuna katılmakta ve basil ile enfekte olmaktadır (Mariotti ve diğerleri, 2013). Granülom oluşumunda önemli bir kemokin olan CXCL8, Mtb ile enfekte makrofajlardan salınan çözünür maddelerin etkisi ile fibroblastlar tarafından oluşturulmaktadır (O'Kane ve diğerleri, 2007). Ayrıca fibroblastların Mtb ile enfeksiyonu,

bu hücrelerde İFN-γ ile indüklenen MHC sınıf II molekül ekspresyonunu inhibe etmektedir. Fibroblastlar ayrıca T hücrelerine ısı ile inaktive edilmiş Mtb'den antijen sunma kapasitesine sahiptir ve canlı mikobakteriden sunma kapasiteleri İFN-γ ile uyarımdan sonra gösterilmiştir. Ancak bu kapasite Mtb ile enfekte fibroblastlarda kaybolmuştur (Mariotti ve diğerleri, 2013). Ek olarak, Mtb infeksiyounda görülen karakteristik doku hasarında MMP önemli rol almaktadır. Mtb ile enfekte fibroblastlar ve lökositler tarafından üretilen MMP-1 ve MMP-13, akciğer doku gerilme gücünü azaltmakta ve doku daha kolay yıkıma uğramaktadır (González-Avila ve diğerleri, 2009; O'Kane ve diğerleri, 2010).

Mikobakteri enfeksiyonunda basil ile mücadelede İFN-γ önemli bir yer tutmaktadır. İFN-γ üretmek üzere uyarılan 3T3 fibroblastlar, rekombinant İFN-γ (rİFN-γ) ile *Mycobacterium avium* kompleks (MAC) enfeksiyonundan korunma açısından farede çalışılmış, 3T3-İFN-γ hücreleri verilen farelerde bakteri yükü daha belirgin olarak azalmıştır. Ayrıca 3T3-İFN-γ hücreleri ile immünizasyon daha yüksek sitotoksik etki ve NO oluşumuna neden olmuştur. İFN-γ üreten fibroblastların immünoterapide kullanılabileceği vurgulanmıştır (Kim, Chung, Kang, Choe, ve Hwang, 2000). Ayrıca İL-12'nin 3T3 fibroblast hücrelerinde parakrin salınımın, MAC enfeksiyonuna karşı korunmadaki rolü yine farelerde çalışılmıştır. Rekombinant İL-12 (rİL-12)'nin MAC enfeksiyonuna karşı korunmadaki rolü karşılaştırılmıştır. 3T3-İL-12 hücreleri intranazal olarak verilen farelerde bakteri yükü daha belirgin olarak azalmış, enfeksiyona karşı daha güçlü bir yanıt alınmıştır (Kang ve diğerleri, 1999).

Ek olarak Mtb ile enfekte fibroblastlarda salınan çözünür faktörlerin makrofajların Mtb enfeksiyonunu daha iyi kontrol ettiği in vitro hücre kültürü çalışmasında gösterilmiş ve fibroblast – makrofaj etkileşiminin mikobakteriye karşı konak yanıtın düzenlenmesinde rol aldığı söylenmiştir (Rastogi ve diğerleri, 1992).

Mtb enfeksiyonunda fibroblastların etkisine dair çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Farklı modellerde fibroblastın immün düzenleyici etkisi çalışılmıştır. Kanser mikroçevresinde fibroblastların immün düzenleyici etkisi çeşitli sitokin, kemokin ve matriks molekülleri üretimi ile gösterilmiştir. Bu etkiler sonucunda fibroblastların T hücresiyle etkileştiği ve T hücre trafiğini ve aktivasyonunu sağladığı gösterilmiştir (Barnas ve diğerleri, 2010).

2.4.3. Kazanılmış immün yanıt

Hücre içi mikroorganizmalara karşı kazanılış immün yanıtın ana bileşeni hücresel, yani T hücre aracılı immünitedir. Bu tip bir immünite duyarlı bireylere lenfoid hücreler ile aktarılabilir, ancak serum ile aktarılamaz. T hücre aracılı immünite, mikroba karşı iki şekilde etki göstermektedir. Birincisi, fagositlerde fagozom içerisinde bulunan mikroorganizmaya karşı CD4 T hücre (TH1) aracılığı ile kazanılmış immün yanıt gelişmektedir. TH1, ASH ile sunulan mikrobiyal antijenleri tanımakta ve fagositleri içerdikleri mikrobu parçalamak üzere aktive etmektedir. İkincisi de, farklı fagositer olmayan hücre sitoplazmaları içerisinde çoğalan mikroorganizmalara CD8 sitotoksik T hücre (STh) aracılığı ile etkilidir. STh, enfekte hücreleri öldürmekte ve böylelikle enfeksiyonun kaynağını yok etmektedir. T hücre aracılı makrofaj aktivasyonu ve inflamasyon normal dokulara da hasar verebilmektedir. Bu reaksiyon "gecikmiş tip aşırı duyarlılık" olarak tanımlanmaktadır (Abbas, 2007).

İnsanda Mtb'ye karşı gelişen kazanılmış immün yanıt, diğer etkenlerle karşılaştırıldığında gecikmiştir. Klasik çalışmalar Mtb maruziyetini takiben TCT reaktivitesinin ortalama 42. günde geliştiğini göstermektedir. Bu etki sıklıkla basilin T hücrelerine sunulacağı torasik, mediastinal veya pulmoner lenf düğümlerine göçü ile ilişkilendirilmiştir (Urdahl, Shafiani, ve Ernst, 2011).

T hücresi

Mtb enfeksiyonunda koruyucu immün yanıt T hücresi ile aktive makrofajlar aracılığı ile gerçekleşmektedir. Mtb'ye karşı konak savunmasında fagositer hücrelerin aktivasyonu Mtb'nin çoğalmasını sınırlayan granülom formasyonunun oluşmasında önemlidir. Ancak fagositlerin etkin aktivasyonu için hücresel yanıtın bileşenlerine ihtiyaç vardır (Cooper, 2009; Nicod, 2007). CD4 ve CD8 αβ T hücreleri, CD1 sınırlı T hücreler, γδ T hücreleri ve sitotoksik T hücreleri ve bu hücrelerden salınan sitokinler bu yanıtın oluşumunda önemli yer tutmaktadır (Ahmad, 2011). Bu hücreler arasında İFN-γ salan TH1 hücreler, mikobakteri enfeksiyonunun kotrolünde kritik bir role sahiptir. Ancak TH1 yanıtının baskınlığı tek başına bakterinin temizlenmesi ile ilişkili değildir. Fagositer hücrelerin yokluğunda T hücreleri tek başına konağı korumada yeterli işlev görememektedir (Ahmad, 2011; Cooper, 2009). TH17

ve Treg hücreler de Mtb enfeksiyonu sırasında uyarılmaktadır. Fakat bunların koruyucu immünitedeki rolleri hala araştırma halindedir (Ahmad, 2011; Torrado ve Cooper, 2013).

Lenf düğümünde uyarıldıktan sonra bellek CD4 ve CD8 T hücreleri, kazanılmış immün yanıtın merkezi bileşenleri olmaktadır. CD4 ve CD8 hücrelerin hücre içi mikobakteriyi öldürme yeteneği, enfekte hücreye etki etme ve de sitolitik ve antimikrobiyal efektör molekül salma gücüne bağlıdır (Nicod, 2007).

Mikobakteri enfeksiyonuna T hücre yanıtının yavaş olması dışında T hücresinin varlığını devam ettirmesi noktasında diğer etkenler ile gelişen enfeksiyonlardan bir farklılık vardır. Patojen ile enfeksiyonu takiben T hücreleri tipik olarak kısa yaşam süreli hücrelerdir. Yoğun antijen kaynaklı çoğalmanın ardından ölür. Antijene özgül, uzun ömürlü bellek T hücreleri ancak antijen temizlendikten sonra oluşur. Bellek T hücreleri, yavaş fakat sürekli var olacak kadar az miktarda antijene bağlı olmayan bir çoğalma ile varlığını idame ettirmektedir. Ancak mikobakteri enfeksiyonlarında, persistan enfeksiyon sırasında yüksek miktarda antijene özgül yanıt verebilen T hücreleri mevcuttur. Antijene özgül T hücreleri Mtb enfeksiyonundan sonra diğer mikroorganizmalarda görülen efektör T hücre kaybı, takiben anerjik hale gelme ve ölme durumunu sergilememektedir. Ek olarak bu özgül T hücrelerin idamesi, timustan yeni hücrelerin oluşumunu da gerektirmemektedir (Urdahl ve diğerleri, 2011).

Farklı sitokinlerin, T hücre gruplarının farklılaşmasına neden olduğu varsayılmaktadır. İL-12, İL-18 ve İFN-γ TH1 gelişimini; İL-4, İL-5 ve İL-13 TH2 gelişimini; İL-23, İL-6, İL-21 ve düşük konsantrasyon TGF-β TH17 farklılaşmasını; İL-2 ve yüksek konsantrasyon TGF-β Treg farklılaşmasını uyarmaktadır (Dheda ve diğerleri, 2010).

CD4 T hücresi (TH1 ve TH2)

TH1, IFN üretimi ile hücresel immün yanıtı dolayısıyla makrofaj, NK hücresi ve CD8 T hücresini yönlendiren yardımcı T hücresidir. TH2 ise antikor oluşumuna neden olarak hümoral immün yanıtı yönlendirmektedir. TH1, daha çok Mtb gibi hücre içi patojenle mücadelede rol alırken TH2 hücre dışı patojenden korunmada işlev görmektedir (Abebe ve Bjune, 2009).

Mtb antijenleri sunulan naif CD4 T hücresi, makrofaj veya DH'den salınan İL-12 etkisi ile İFN-γ salan TH1 fenotipine farklılaşmaktadır. Mtb'ye karşı immün yanıt, esas olarak TH1 yanıtı (İFN-γ ve İL-12) ve TNF-α oluşumu ile ilişkilidir. TH1 hücreleri İFN-γ salınımı ile makrofaj, NK ve CD8 T hücrelerini aktive etmektedir. İFN-γ makrofajın fagositik kapasitesini arttırmakta böylelikle makrofaj ve T hücrelerinin etkileşimi ile Mtb ile mücadele edilmektedir (Cooper, 2009; Nicod, 2007).

İFN-γ oluşturan CD4 T hücreler, Mtb antijenlerini sunan enfekte makrofajları tanımakta ve bunları öldürmektedir. Enfeksiyonun ilerlemesi genel olarak durdurulmakta ancak, bazı dirençli basiller konak savunmasının oluşturduğu baskıdan kurtulmakta ve uyku fazına geçmekte ve immün sistemin yok etmesine karşı kalıcı bir hale dönüşmektedir. Bireysel immün duruma bağlı olarak bazı granülamatöz lezyonların bir kısmı mikroçevrede Mtb'nin varlığını sürdürmesine izin verirken bir kısmı da immün yanıtı tamamen baskılamaktadır (Ahmad, 2011).

CD4 T hücreler ile birlikte CD8 T hücreler ve NK hücreler İFN-γ'nın esas kaynağını oluşturmakla birlikte, CD4 hücreler enfeksiyon ile mücadelede bu sitokinin ve makrofaj aktivasyonunun erken oluşumundan sorumludur. Ayrıca, CD4 T hücreler Mtb'nin hücre içi çoğalmasını İFN-γ'dan bağımsız, NO bağımlı bir mekanizma ile de kontrol etmektedir (Ahmad, 2011).

CD4 T hücreler, ayrıca İFN-γ üretiminden bağımsız olarak da enfeksiyona karşı savunmada rol almaktadır. CD4 T hücreler, granülom formasyonunda enfeksiyonun sınırlandırılmasında önemli birkaç fonksiyon üstlenmiştir. Enfekte makrofajların Fas-Fas ligand (FasL) aracılığı ile apoptoza uğratılması ve enfeksiyon ile mücadelede görev alan İL-2 ve TNF-α gibi diğer bazı sitokinlerin üretilmesinde yer almaktadır. CD4 T hücreler ayrıca, makrofaj ve DH yüzey CD40 ligandları (CD40L) araclığı ile aktive etmektedir. Ayrıca makrofaj ve DH gibi diğer immün hücrelerin İL-10, İL-12 ve İL-15 gibi immün düzenleyici sitokin üretmek üzere uyarılması ve makrofajların direkt CD40L aracılığı ile uyarılması işleminde de yer almaktadır. FasL ekspresyonu ve diğer sitolitik efektör moleküller aracılığı ile de enfekte hücrelerin sitotosisitesine aracılık etmektedir. CD8 T hücrelerinin İL-15 aracılığı ile yönlendirilen sitotoksik görevinin yerine getirilmesinde de kritik bir role sahiptir (Baena ve Porcelli, 2009).

CD8 T hücresi

CD8 T hücreler, İFN-γ ve İL-15 ve İL-18 gibi monokinler üreterek T hücre yanıtının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Yanı sıra, Mtb ile enfekte makrofajlara karşı sitotoksik etki göstermekte ve böylece TB'ye karşı konak yanıtında önemli bir rol almaktadır. CD8 T hücre, Mtb ile enfekte makrofajı etkileyen CCL5 gibi kemokinler salmakta, enfekte makrofaj CD8 T hücre granzim ve perforin ekspresyonunu başlatmaktadır. Por oluşturan bir protein olan perforin ile granzim proteazı ile direkt olarak basili öldürmekte ve hem akut hem de kronik enfeksiyonun kontrolünü kolaylaştırmaktadır. CD8'in enfekte hücreyi öldürmede diğer bir mekanizması Fas-FasL etkileşimini arttrmasıdır (Baena ve Porcelli, 2009; Nicod, 2007).

LTBE'de, Mtb'ye özgül CD8 T hücrelerin yüksek miktarlardaki varlığı, bu hücrelerin latent enfeksiyonun kontolünde rolü olduğunu düşündürmektedir. Bu düşünce, Cornell modelinde CD8 T hücrelerin tükenmesi ile latent enfeksiyonun reaktivasyon ile sonuçlanması ile doğrulanmıştır (Ahmad, 2011).

TH17

TH17 hücreleri, yardımcı T hücrelerinin farklı bir grubudur. İL-17, İL-17F, İL-21 ve İL-22 gibi kendine özel bazı sitokinler salmaktadır. Bu sitokinler defensinleri uyarmakta, nötrofil, monosit ve diğer immün hücrelerin enfeksiyon alanına göçü ile inflamasyona sebep olmaktadır. Böylelikle konak savunmasının erken döneminde işlev görmektedir. TH1, TH2 ve TH17 hücreleri T regülatuvar hücreler tarafından düzenlenmektedir (Dheda ve diğerleri, 2010).

T regülatuvar hücre (Treg)

The CD4CD25+FoxP3+ doğal regülatuvar T hücreleri (Treg), İL-10 ve TGF-β oluşumu ile karakterizedir. TGF-β CD4 T hücre efektör işlevini azaltmaktadır. CD4 Treg hücrelerin yanı sıra T hücre proliferasyonu ve sitokin salınımını inhibe eden CD8 Treg hücreler de tanımlanmıştır (Dheda ve diğerleri, 2010).

TB enfeksiyonu sırasında Treg hücrelerin arttığı, bunların bellek İFN-γ üreten γδ T hücrelerini inhibe ettiği gözlenmiştir. CD4 T hücre işlevindeki azalma ile Mtb'nin yaygınlaşmasına ve hastalığın alevlenmesine neden olmaktadır. Treg hücrelerin deneysel Mtb enfeksiyonu sırasında akciğerde bakteri kontrolünün kaybolduğu durumda arttığı görülmüştür. Ayrıca aktif TB vakalarında kanda yüksek oranda CD4(+)CD25(high)CD39(+) Treg hücrelere rastlanmıştır (Dheda ve diğerleri, 2010).

İnsanda TCT pozitif bireylerin Man-LAM uyarımına CD4CD25+FoxP3+ T hücrede artma ile yanıt verdiği, bu yanıtın TCT negatif bireylerde oluşmadığı gösterilmiştir. İnsanda Treg artışı NK hücre aktivasyonu ile sınırlandırılmaktadır. İlginç olarak mikobakteriyel hastalığı olan AIDS vakalarının antiretroviral terapisi sırasında hem efektör T hücreleri hem de Treg'leri artmaktadır (Cooper, 2009).

Diğer T hücreler

CD1 sınırlı ve γδ T hücreleri gibi konvansiyonel olmayan T hücreleri de TB'nin kontrolünde erken immün yanıta katılarak yer almaktadır. CD1 sınırlı T hücreleri mikobakteri duvarında bol miktarda bulunan LAM gibi glikolipitleri tanırken γδ T hücreleri fosfoligandlar gibi fosfat içeren (fosfoantijenler) küçük metabolitleri tanımaktadır (Ahmad, 2011; Martino, 2008).

γδ T hücreleri Mtb enfeksiyonunu takiben hızlıca akciğere göç etmekte ve İFN-γ salınımına neden olmaktadır. Bu hücreler, ayrıca enfekte hücrelere NK hücre benzeri sitotoksik etki de gösterebilmektedir. Fosfomonoester antijenler MHC molekülüne ihtiyaç duymadan direkt olarak Vγ9Vδ2 T hücrelerini TCR (T hücre reseptörü) ile aktive edebilmektedir. Yapılan çalışmalarda, bu grup T hücreler TB'li hastaların kanlarında yüksek miktarlarda tespit edilmiştir (Dheda ve diğerleri, 2010; Martino, 2008).

CD-1 sınırlı T hücreler mikobakteri glikolipitleri ile aktive olmaktadır. Bu hücreler aktivasyon sonucunda ve İFN-γ salınımına ve sitolitik etkiye neden olmaktadır (Dheda ve diğerleri, 2010).

B hücresi

İmmün yanıtta B hücreleri, profesyonel antijen sunumu, antikor üretimi, T hücre farklılaşmasının düzenlenmesi ve hücre aracılı immün yanıtın gelişiminde rol almaktadır. B hücreleri T hücrelerinin çoğalması, idamesi ve farklılaşmasını uyarabilmektedir. Aktive B hücreler çok farklı sitokinler salabilmektedir. Efektör B1 hücreler, İFN-γ ve İL-12 salarken B2 hücreler İL-4 salabilmektedir. Ayrıca İL-10 oluşumuna da neden olabilmektedir. Böylelikle B hücreleri T hücre polarizasyonunda, dolayısıyla immün yanıtın yönlendirilmesinde de rol almaktadır (Abebe ve Bjune, 2009).

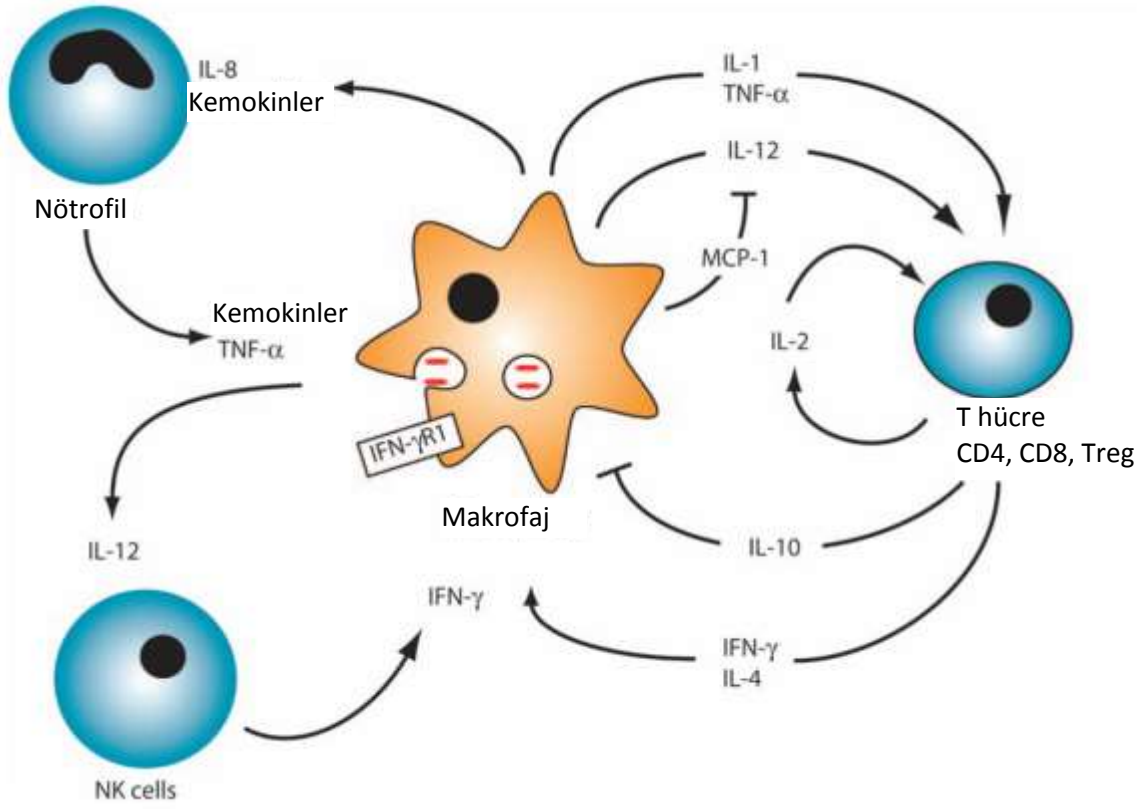
Enfeksiyonla mücadelede B hücrelerinin önemli diğer bir işlevi antikor oluşumudur. Antikor oluşumu patojenin çoğalmasını engellemekte, patojeni veya toksinini nötralize etmekte, antikor aracılı hücresel sitotoksisiteyi başlatmakta opsonin olarak işlev görmekte ve kompleman kaskadına katılmaktadır (Abebe ve Bjune, 2009).

TB enfeksiyonundan korunmada, B hücreleri esas olarak önemli bir role sahip değildir. Ancak son zamanlarda yapılan fare deneyleri göstermiştir ki Mtb enfeksiyonundan korunmanın optimal olabilmesi için B hücrelerinin hücresel yanıt ile ve de kompleman sistemi ile etkileşimi gerekmektedir (Dheda ve diğerleri, 2010).

Mtb'ye karşı gelişen antikorların tüberküloza karşı immünitenin aktarımını sağlamadığı, bunların opsonin olarak fagositozun güçlendirilmesinde veya STh'lerin sitotoksik etkisinde işlev gördüğü gösterilmiştir. Özgül antikor ile kaplı mikobakterilerin daha etkin olarak işlendiği ve DH tarafından sunulduğu gösterilmiştir (Abebe ve Bjune, 2009; Nicod, 2007).

2.4.4. Sitokin ve kemokin yanıtı

Mtb'nin yapısal bileşenlerinin konak hücre doğal immün yanıt hücrelerinde yer alan PRR'ler tarafından tanınması sonucunda çeşitli sitokin ve kemokinler salınmaktadır. Doğal sitokin yanıtı, granüloma formasyonunun oluşumunda, kazanılmış immün yanıtı ve hücrelerini yönlendirmede ve böylelikle enfeksiyonu erken dönemde kontrol altına almada kritik role sahiptir (Şekil 2.6) (Harris ve diğerleri, 2009; Torrado ve Cooper, 2013). Mikobakteriyel bileşenlerin farklı PRR ile tanınması, enfeksiyonun erken kontrolünü sağlayan sitokin yanıtını uyarmaktadır (Torrado ve Cooper, 2013). TB'ye karşı immün yanıt, İFN-γ, İL-12 ve TNF-α'nın üretildiği TH1 aracılı yanıtla ilişkilendirilmektedir. İL-12 ve İFN-γ reseptörlerindeki genetik bozukluklar ilerleyici mikobakteriyel hastalıklara yol açmaktadır. Ayrıca inflamatuvar hastalıkaların tedavisinde kullanılan TNF-α antagonistlerinin kullanımı da LTBE'nin aktivasyonuna neden olmaktadır (Harris ve diğerleri, 2009).



Şekil 2.6. *Mycobacterium tuberculosis* enfeksiyonunun kontrolünde rol alan başlıca sitokinler ve etkileri (Berrington ve Hawn, 2007'den alınmıştır)

T hücre kaynaklı sitokinler, İFN-γ ve TNF-α esas olarak İL-12 etkisi altında TH1'e farklılaşan aktive CD4 T hücreleri tarafından oluşturulmaktadır. İFN-γ ve TNF-α, makrofajı aktive eder ve makrofajın NO oluşumunu ve fagozom-lizozom füzyonunu uyarır (Cooper ve Khader, 2008).

İnterlökin 12 (İL-12) ve İL-12 ailesi sitokinler

İL-12 ailesi sitokinler; İL-12p40 homodimeri (İL-12(p40)2), İL-12p70 (İL-12; İL-12p40 ile kovalent bağlı İL-12p35 alt ünitesi), İL-23 (İL-12p40 ile kovalent bağlı İL-23p19 alt ünitesi) ve İL-27 (İL-27p28 kovalent bağlı olmayan heterodimeri ve Epstein-Barr virus induced gene 3 (EBI3))'dir. Ayrıca yeni tanmlanan İL-35 de bu ailede yer almaktadır. Reseptör olarak İL-12 İL-12Rβ1/İL-12Rβ2 kompleksi, İL-23 İL-12Rβ1/İL-23R kompleksini ve İL-27 de gp130/İL-27Rα kompleksi ile sinyal iletimine neden olmaktadır (Cooper, Solache, ve Khader, 2007; Hamza, Barnett, ve Li, 2010).

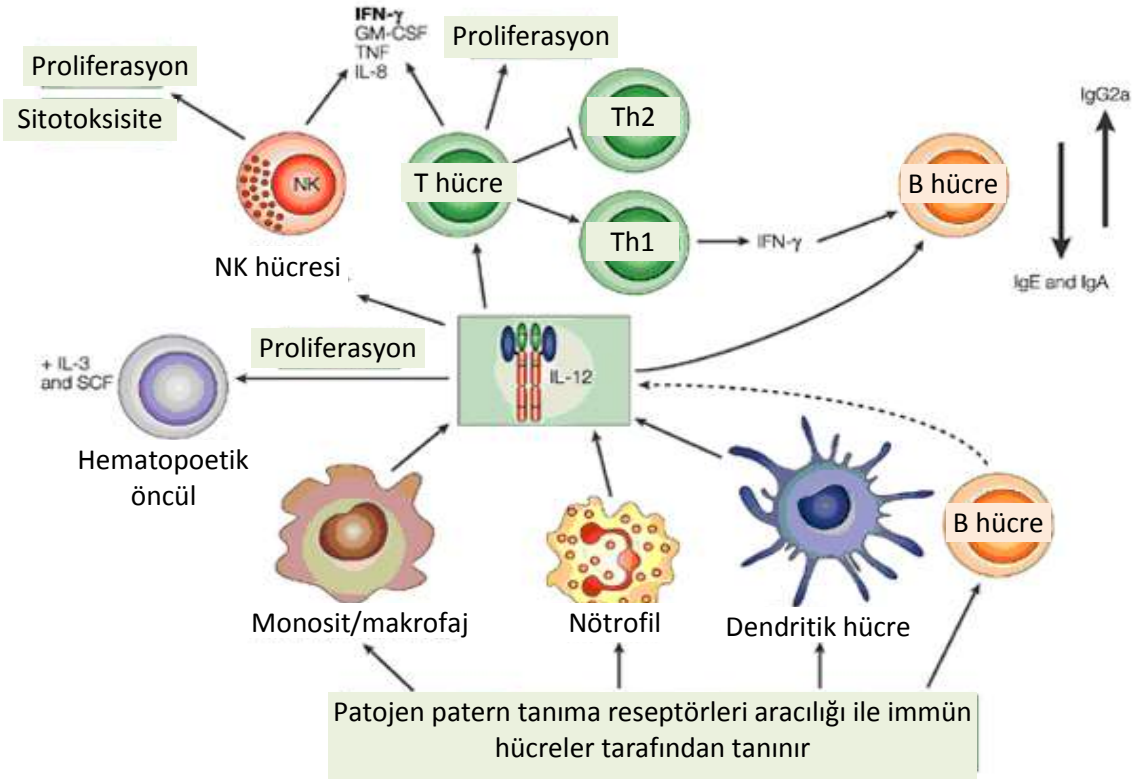
TB kronik enfeksiyona neden olmaktadır. Bu nedenle koruyucu ve hasarlandırıcı hücresel yanıtın dengesi kritiktir. İL-12, İL-23 ve İL-27 arasındaki dengenin, koruyucu hücresel yanıt ile minimum doku hasarını belirlediği varsayılmaktadır. Kronik TB'de İL-12, akciğerde TH1 hücrelerin uzun süreli idamesi için, İL-23 ise TH17 hücrelerin varlığı ve idamesi için gerekmektedir. TH1 hücrelerinden salınan İFN-γ, TH17'yi negatif olarak etkilerken İL-27 TH1 hücrelerinden İFN-γ üretimini uyarmakta ve inflamasyonu sınırlandırmaktadır. İL-23, TH17'den İL-17 salınımına neden olarak nötrofillerin göçünü uyarmakta ve inflamsyona katkıda bulunmaktadır (Cooper ve diğerleri, 2007).

İL-12

İL-12 hücre içi mikroorganizmalara karşı erken immün yanıtın oluşturulmasında bir aracı ve kazanılmış immün yanıtın başlatılmasında anahtar moleküldür. Esas işlevi; NK hücre aktivasyonu ve İFN-γ uyarımı sonucu TH1 polarizasyonuna katkıdır (Abbas, 2007). İL-12 Mtb enfeksiyonuna karşı dirençte gereklidir. Mtb ile enfeksiyonu takiben hem hematopoetik hücreler hem de hematopoetik olmayan hücreler İL-12p40 üretimine neden olmaktadır. Ancak çalışmalar göstermiştir ki hematopoetik hücreler tarafından oluşturulan İL-12 basili

kontrol altına almada yeterli iken hematopoetik olmayan hücrelerde yeterli değildir (Reeme, Miller, ve Robinson, 2013).

İL-12'nin tüberkülozdaki önemi, İL-12p40 veya İL-12 reseptöründe eksiklik olması durumunda ciddi aktif TB enfeksiyonlarının gelişimi ile daha artmıştır. İL-12 etkisi altında, T hücre kaynaklı İFN-γ ve TNF-α sitokinleri CD4 T hücrelerinden yüksek miktarlarda oluşmaktadır. Ayrıca İFN-γ ve TNF-α'nın fagositik hücreleri güçlendirme etkisi İL-12 varlığında gözlenmektedir (Şekil 2.7) (Cooper ve diğerleri, 2007).



Şekil 2.7. İL-12'nin ana immünolojik işlevleri. Naif CD4 T hücrelerini TH1'e farklılaştırır, NK, T hücre, dendritk hücre ve makroajdn İFN-γ oluşumunu uyarır, B7/CD28 kostimülatör moleküller ile kooperasyona girer, makrofajın antimikrobiyal etkisini arttırır, dendritik hücreyi daha fazla İL-12 üretmek üzere aktifleştirir (Hamza ve diğerleri, 2010'dan alınmıştır)

İFN-γ yardımı ile makrofaj aktivasyonu Mtb'yi öldürmenin birincil mekanizmasıdır. Ancak İFN-γ oluşumu TB hastalarında baskılanmaktadır. TB hastalarında İFN-γ oluşumu ve klinik seyri etkileyen faktörler incelenmiş ve hastalık seyrinden bağımsız olarak İL-12'nin İFN-γ üretimini etkilediği saptanmıştır (Yu ve diğerleri, 2011). Mtb enfeksiyonuna karşı koruyucu

İFN-γ yanıtının oluşumunda İL-12p40'ın kesinlikle gerekli olduğu, ancak İL-12p35'in olmadığı insan ve hayvan çalışmalarında gösterilmiştir. İL-12, uzamış hücresel İFN-γ yanıtı ve insanda bu hücrelerin idamesi için gerekli gözükmektedir. Ayrıca Mtb ile aktive akciğer DH İL-12p40 oluşturmakta ve CCL19 ve CCL21 kemokinlerine duyarlı hale gelerek akciğer lenf düğümlerine göç etmektedir (Cooper ve diğerleri, 2007). TB'ye karşı koruyucu immünite de rol alan İL-12'nin Man-LAM ile uyarım sonucunda salınımının azaldığı gösterilmiştir (Wojtas ve diğerleri, 2011).

İL-23

İL-23, İL-12 ile p40 altünitesini paylaşan proinflamatuvar bir sitokindir. Esas olarak ASH tarafından oluşturulmakta ve TH17'nin uyarılmasında işlev görmektedir. Ayrıca bellek T hücrelerin çoğalmasına neden olmaktadır (Hamza ve diğerleri, 2010). Mtb enfeksiyonunda İL-12p35'in yokluğunda İL-23'ün İFN-γ yanıtının başlamasında etkili olduğu, ancak idamesinde yeterli olmadığı ve bu nedenle enfeksiyonla tam olarak baş edilemediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Cooper ve diğerleri, 2007).

İL-27

İL-12 ailesinin bir diğer heterodimerik sitokini İL-27, fagositer hücreler tarafından oluşturulmaktadır. İL-27, TH1 yanıtının erken başlangıcı için gerekli, ancak idamesi için gerekli değildir. Naif T hücre çoğalmasına katkıda bulunurken bellek T hücre çoğalmasına katkısı yoktur. İFN-γ üretimi için İL-12 ile sinerjik etki göstermektedir (Hamza ve diğerleri, 2010).

İL-35

İL-12 ailesinin son tanımlanan üyesi İL-35'dir. P35 alt ünitesi ve p40 ile ilişkili EBi3'den oluşan bir heterodimerdir. İL-27 ve İL-12'nin reseptörlerini kullandığı düşünülmektedir. İL-35, CD4 T hücreleri içerisinde hem aktif hem de dinlenme halindeki (resting) Treg tarafından oluşturulmakta ve T hücre çoğalması baskılanmaktadır. İL-35'de azalma immün baskılamanın düşüşüne neden olmaktadır (Hamza ve diğerleri, 2010).

İnterferon gama (İFN-γ) ailesi sitokinler

IFN ailesi sitokinler Tip I ve Tip II olarak ayrılmakta; Tip II İFN-γ'dan oluşmaktadır. İFN-γ, esas makrofaj aktive eden sitokindir ve doğal ve kazanılmış yanıt arasında kritik bir işlev görmektedir. Ayrıca İFN-γ, diğer hücre içi mikroorganizmalara karşı yanıtta olduğu gibi mikobakterilere karşı immün yanıtta önemli aracılar olarak rol almaktadır. Başlıca işlevleri; makrofaj aktivasyonu, naif CD4 T hücrelerin TH1'e farklılaşmasına yardım, MHC sınıf I ve II moleküllerin ve kostimülatör moleküllerin ekspresyonunun arttırılmasıdır (Abbas, 2007).

İFN-γ

İFN-γ, makrofaj ve DH'den salınan İL-12 ve İL-18 etkisi ile NK, CD4 ve CD8 T hücreleri tarafından oluşturulmaktadır. Antijene özgül CD4 T hücreleri, in vivo olarak İFN-γ'nın en önemli kaynağını oluşturmaktadır (Torrado ve Cooper, 2013).

İFN ailesi sitokinler mikobakterilere karşı immün yanıtta önemli aracılar olarak rol almaktadır. İFN-γ, makrofajlarda 200'den fazla genin transkripsiyonuna neden olmakta ve Mtb'ye karşı koruyucu immün yanıtın oluşumunda kilit sitokin olarak rol almaktadır. Fagositik hücrelerin mikobakterileri öldürmek üzere uyarılmasında temel teşkil etmektedir. Fagositoz, İFN-γ'nın TNF-α ile etkileşerek makrofajlardan RNI, ROI ve NO gibi antimikrobiyal efektörlerin oluşumuna neden olması ve fagozom-lizozom füzyonunu kolaylaştırması sonucunda makrofajların aktive olması ve basili öldürmesi ile gerçekleşmektedir. Ayrıca, makrofajarın MHC sınıf II molekül ifadelenmesini, dolayısıyla T hücresine antijen sunumunu arttırmakta, CD4 ve CD8 T hücrelerinin enfeksiyon alanına göçüne neden olmakta ve bu hücrelerin mikobakterileri öldürmesine katkıda bulunmaktadır. Ek olarak İFN-γ, bellek T hücrelerinin tükenmesini engellemektedir (Ahmad, 2011; Dheda ve diğerleri, 2010; Torrado ve Cooper, 2013).

İFN-γ, fare modelinde akciğer stromal hücrelerinde İL-17 aracılı immünpatolojinin düzenlenmesinde rol almaktadır. Bunu direkt olarak İL-17 oluşturan hücre farklılaşmasını etkileyerek ve dolaylı olarak hematopoetik olmayan hücrelerden indolamin-2,3-dioksijenaz aktivasyonunu etkileyerek gerçekleştirmektedir (Torrado ve Cooper, 2013).

Mikobakteri enfeksiyonu sırasında T hücre yanıtında İFN-γ düzenleyici rol oynamaktadır. İnsanlarda İFN-γ reseptör 1 bağlanma zincirinde işlevsel eksiklik durumunda CD4 T hücrelerde FasL ekspresyonu azalmakta ve apoptoza duyarlılık da azalmakta, mikobakteri ile enfekte hücreleri öldürme kapasitesi de düşmektedir (Cooper, 2009). İFN-γ yoksun farelerle yapılan çalışmalarda, Mtb enfeksiyonu sonucunda granülom formasyonunun oluştuğu, ancak NO üretiminin azaldığı ve bakterinin çoğalmasının granülomda sınırlanamadığı gösterilmiştir (Harris ve diğerleri, 2009).

Tümör Nekroz Edici Faktör alfa (TNF-α)

TNF-α, akut inflamatuvar yanıtın ana medyatörüdür ve esas kaynağı aktive mononükleer fagositlerdir. Esas işlevi; nötrofillerin ve monositlerin mikroorganizmayı yok etmek üzere enfeksiyon alanına göçü ve şiddetli enfeksiyonlarda FasL aracılığı ile apotozu uyarmasıdır (Abbas, 2007).

Mtb ile mücadelede konak açısından koruyucu etki gösteren önemli diğer bir sitokin makrofaj, DH ve T hücreleri tarafından oluşturulan TNF-α'dır. TNF-α paradoksal olarak TB ile ilişkili immünpatolojinin gelişmesine de ciddi oranda katkıda bulunmakta, hem immün hem de immün düzenleyici yanıtta rol almaktadır (Ahmad, 2011; Roca ve Ramakrishnan, 2013).

TNF-α mikobakterinin kontrolünde başlangıçta rol almaktadır ve İFN-γ ile sinerjik etki göstererek RNI'leri aktive etmektedir (Cavalcanti, Brelaz, Neves, Ferraz, ve Pereira, 2012). TNF-α'nın fazlalığı, enfekte makrofajlarda mitokondriyal ROI üretimini uyarır. Bu uyarım başlangıçta mikrobiyal etkiyi arttırır, ancak ROI hızla hücre nekrozuna ve mikobakterinin hücre dışı ortama yayılımına neden olur (Roca ve Ramakrishnan, 2013).

TNF-α, makrofaj ve T hücre aktivasyonu için ikinci sinyal olarak işlev görmektedir. TNF-α hücre göçünü ve basili ve çoğalmasını sınırlandırmada önemli bir mekanizma olan granülom formasyonunu başlatmakta, TNF-α yanıtının bozulması mikobakterilerin çoğalmasına neden olmaktadır. Enfekte makrofajlardan salınan TNF-α, immün hücrelerin enfeksiyon alanına göçünü sağlayan İL-8, MCP-1 ve RANTES gibi kemokinlerin ekspresyonunu indükleyerek granülom oluşumunu sağlamaktadır. Ayrıca TNF-α, İFN-γ ile

birlikte makrofajların iNOS ekspresyonunu ve fagositik kapasitesini güçlendirmektedir (Ahmad, 2011; Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011; Nicod, 2007). Mtb enfeksiyonunda makrofajları aktive eden anahtar sitokin İFN-γ ve TNF-α'dır. Bu iki sitokinin farklı kaynak hücreler tarafından oluşturulması, enfeksiyon sonucunu belirleyen farklı makrofaj aktivasyon kinetiklerinin olduğunu düşündürmektedir (Ray, Wang, Chan, ve Kirschner, 2008).

TNF-α, latent enfeksiyonun kontrol altında tutulması için gerekmektedir. TNF-α veya TNF-α reseptörü eksikliğinde mikobakteriyel enfeksiyonlara yatkınlık artmakta, kronik fazında TNF-α'da eksiklik, granülomun harabiyetine ve proinflamatuvar yanıtın artmasına neden olmaktadır. Ayrıca TNF-α'daki eksiklik, fagositik aktivite ve kemokin ekspresyonundaki azalma soncunda bakterinin sınırlandırılamaması nedeniyle konağın ölümüne sebep olmaktadır. Ayrıca Mtb enfeksiyonuna karşı yeterli ve kalıcı konak savunmasının oluşabilmesi için hem T hücre, hem de makrofaj kaynaklı TNF-α oluşumu gerekmektedir (Ahmad, 2011; Cooper, Mayer-Barber, ve Sher, 2011; Cooper, 2009; Dheda ve diğerleri, 2010).

Apoptoz TB'de etkin bir konak savunma stratejisi olarak işlev görmektedir. TNF-α, ayrıca enfekte makrofajların apoptozunda TNFR1 ve TNFR2 hücre yüzey reseptörleri aracılığı ile işlev görmektedir. Mtb ile enfekte alveolar makrofajlarda erken dönemde (3 ve 7. günde) yüksek düzeyde TNFR1 ekspresyonu saptanmıştır. Ayrıca TNFR1 yoksun farelerde apoptozun azaldığı da gösterilmiştir (Rodrigues ve diğerleri, 2013).

<u>İnterlökin 1 (İL-1) ailesi</u>

İL-1 ailesi; İL-1α, İL-1β, İL-18 ve İL-33'ten oluşan ve inflamasyon ve immün yanıtın düzenlenmesinde güçlü fakat karmaşık etkileri olan büyük bir sitokin ailesidir. İL-1 ailesi sitokinlerin reseptörleri, çoğunlukla TLR'lerin de adaptör molekülü olan MyD88'i paylaşmaktadır (Cooper ve diğerleri, 2011).

İL-1ß

İL-1β, yüksek derecede piyojenik bir sitokidir ve Mtb ile enfekte makrofaj ve DH tarafından NLRP3-inflamazom aracılı kaspaz 1 aktivasyonu yolu ile oluşturulmaktadır. İL-1β ile ilşikili sinyaller mikobakteri enfeksiyonuna karşı konak savunmasında önemli bir yere sahiptir. İL-1 reseptörünün yokluğu İFN-γ üretiminde azalma, bozuk granülom formasyonu ve azalmış yaşam ile ilişkili bulunmuştur (Berrington ve Hawn, 2007; Cooper ve diğerleri, 2011).

İL-33

İL-33, 2005'te İL-1 ailesi sitokini olarak tanımlanmış yeni bir sitokindir. Ailenin diğer üyeleri proteolitik kesimden sonra işlevsel hale gelirken İL-33 aktif sitokin olarak salınmakta ve TH2 sitokini olarak işlev görmektedir. Ailenin diğer üyelerinden bir farkı da epitel, endotel ve kemik iliği kaynaklı mast hücrelerinin çekirdeğinde lokalize olmasıdır. İL-33 sinyali, İL-1R benzeri molekül T1/ST2 ile iletilmektedir. ST2 reseptörü, İL-1R1 ve İL-18Rα ile yakından ilişkilidir. İL-33, TH2 hücreleri ve mast hücreleri tarafından oluşturulmakta, İL-13 ve İL-5'i uyarırken İFN-γ'nın azalmasına neden olmaktadır (Oboki, Ohno, Kajiwara, Saito, ve Nakae, 2010; Saenz, Taylor, ve Artis, 2008). İL-33, ayrıca hem fibroblast hem de makrofajlar tarafından oluşturulmaktadır. Makrofajlarda TLR-2'ye bakteri yapılarının bağlanması, İL-33 düzenlenmesi ile ilişkilendirilmiştir. TH2 sitokin aracılı inflamasyondan sorumludur. Fibroblastların İL-33 üretimi, İL-1β veya TNF-α ile uyarımı takiben görülmüştür (Nomura ve diğerleri, 2012; Polumuri ve diğerleri, 2012).

İL-33 bir dizi immün aracılı hastalık ile ilişkilendirilmiştir. Deri inflamasyonu modelinde İL-33, birçok hücreyi etkilemekte ve TH2 yanıtını güçlendirerek hasar ile ilişkili moleküler patern olarak etki etmektdir. Fibroblastlarda TNF-α ve İL-1β en güçlü uyaranlardır. İFN-γ ise İL-33 uyarımını düzenlemektedir. CD4+ T hücreler İL-33'e yanıt vermektedir. İL-12 ile birlikte İL-33 T hücre reseptör uyarımı artmaktadır (Seltmann, Werfel, ve Wittmann, 2013).

Daha çok TH2 yanıtı ile ilişkili olan İL-33'ün mikobakteri enfeksiyonuna karşı korunmada sınırlı bir rolü olduğu varsayılmaktadır. ST2 yoksun farelerde yapılan çalışmalarda Mtb enfeksiyonunu takiben İFN-γ üretiminde artış olduğu, farenin hayatta kalımı, bakteri miktarı, granülom formasyonu ve akciğer inflamasyonunda değişim gözlenmiştir (Cooper

ve diğerleri, 2011; Oboki ve diğerleri, 2010). Yapılan çalışmalarda İL-33'ün, Mtb enfeksiyonundaki en önemli sitokinlerden biri olan İFN-γ'nın oluşumunu uyardığı ve TB plörazili hastaların plevral efüzyonlarında İL-33'nın arttığı, bu artışın İFN-γ artışı ile uyum gösterdiği saptanmıştır (Lee ve diğerleri, 2013). Ayrıca İL-33 reseptörü ST2 yoksun fareler Mtb ile enfekte edildiğinde, İFN-γ üretiminde artış ve akciğere lenfosit göçünde artış saptanmıştır. Akciğerdeki erken enfeksiyon kronik faz enfeksiyon bulgularını göstermiştir (Wieland, van der Windt, Florquin, McKenzie, ve van der Poll, 2009).

İnterlökin 6 (İL-6)

İL-6 işlevleri açısından çeşitlilik gösteren bir sitokindir. Hem proinflamatuvar hem de anti-inflamatuvar etki gösterebilmekle birlikte erken inflamatuvar yanıtta kritik bir role sahiptir. İL-6'nın Mtb enfeksiyonundaki rolü, maruziyetin şekline göre farklılıklar göstermektedir. Düşük doz aerosol modelinde, İL-6'daki yokluk İFN-γ ekspresyonunda gecikme ve bakteri yükünde ortalama bir artış ile sonuçlanmıştır. Yüksek doz bakteri varlığında İL-6'nın yanıtı güçlendirmede kritik bir rolü olduğu gösterilmiştir. Ayrıca T hücre gelişimin optimal olabilmesi için de İL-6 varlığı gerekli bulunmuştur. Ek olarak yüksek doz bakteri varlığında İL-6'nın TH17'yi uyardığı saptanmıştır. Görece İL-6 ve TGF-β düzeyi, inflamasyon alanında Treg / TH17 dengesini belirlemekte, dolayısıyla kronik süreçte inflamatuvar ve koruyucu yanıtı etkilemektedir (Cooper ve diğerleri, 2011; Zuñiga ve diğerleri, 2012). İL-6 ayrıca Mtb enfeksiyonunda kazanılmış immün yanıt için kritiktir, tip I interferon sinyalini bloklayarak hastalığın ilerlemesini inhibe etmektedir (Martinez, Mehra, ve Kaushal, 2013).

İL-6, Mtb enfeksiyonunda İL-27 ile ilişkili bir sitokindir. Her ikisi de gp130 reseptör aracılığı ile sinyal iletimine neden olmaktadır. İL-6, İL-10 ile beraber mikobakteriye karşı yanıtı düzenlemektedir (Cooper ve diğerleri, 2011).

İnterlökin 17 (İL-17)

Diğer kronik hastalıklarda olduğu gibi TB'de de İL-17 ve İL-23 önemli rol oynamaktadır. İL-23, tüberkülozun kontrolünde İL-17 oluşturan TH17'yi uyarmaktadır. Ayrıca İL-17 yanıtı, TGF-β'ya da bağlıdır. İL-17 kemokin oluşumu, nötrofil ve monositlerin akciğerde enfeksiyon alanına göçü ve kümelenmesi sonucunda inflamasyon ile ilişkilidir. Ancak bu inflamasyon,

konakta persistan halde kalan mikobakteri için tam bir koruyucu işlev görmemekle birlikte inflamasyonun düzenlenmesinde rol almaktadır (Aujla, Dubin, ve Kolls, 2007; Khader ve Cooper, 2008).

Anti-inflamatuvar sitokinler

TH1 hücre aracılı sitokinler antimikrobiyal etkiyi arttırmasına rağmen, TH2 ve diğer bazı immün baskılayıcı sitokinler mikobakteri enfeksiyonuna karşı konak direncine etki etmektedir. TH2 sitokinler, genel olarak TH1 sitokinlerin oluşumunu azaltmaktadır. İmmün baskılayıcı sitokinler (İL-10 ve TGF-β), TH2 hücreleri ve enfekte makrofajlar tarafından oluşturulmaktadır. Böylelikle makrofajlar üzerine otokrin ve parakrin yoldan etki ederek RNI ve ROI'lerin oluşumunu azaltarak makrofajın INF-γ ve TNF-α'ya yanıtsız hale gelmesine neden olmaktadır (Saenz ve diğerleri, 2008).

Mikobakteri enfeksiyonun ileri evresinde ciddi olarak baskılanmış hücresel immüniteye neden olmaktadır. İnsanda ve deney hayvanlarında persistan ve ilerleyici mikobakteri enfeksiyonu sırasında immün baskılayıcı makrofajların oluşumuna sıklıkla rastlanmaktadır. TB hastalarının kan mononükleer hücrelerinin düşük tüberkülin yanıtı (anerji) verdiği, makrofaj topluluğunun PPD'ye T hücre yanıtında belirgin azalmaya neden olan baskılayıcı tipte olduğu gösterilmiştir (Saenz ve diğerleri, 2008).

İnterlökin 4 (İL-4)

İL-4 CD4 T hücresinden TH2'nin oluşumu için esas uyarandır. İL-4, TH2 hücreleri, NKT hücreleri CD19+/B220+ B hücreleri ve nötrofiller tarafından oluşturulmaktadır. Hem İL-4 hem de İL-10 M2a tip alternatif makrofaj oluşumunu uyarmaktadır. TH2 sitokinleri (İL-4 ve İL-13), ayrıca makrofajlarda otofaji ve otofaji aracılı Mtb ölümünü ortadan kaldırmakta ve bakterinin yok edilme mekanizmalarına engel olmaktadır (Abbas, 2007; Dheda ve diğerleri, 2010; Saenz ve diğerleri, 2008).

İL-4 ve diğer immün baskılayıcı sitokinler, uzamış TH1 yanıtının engellenmesi ve patolojik etkinin azaltılması için gerekli bir sitokin olmakla birlikte, yapılan çalışmalar bu sitokinlerin TB'de olumsuz etkilerini de göstermştir. TH2 hücreleri, kaviter tüberkülozlu hastaların

akciğer dokularında kaviter olmayan hastalık ile kıyaslandığında belirgin olarak fazla saptanmıştır. Bu aynı zamanda yüksek düzeyde İL-4 salınımı ile de uyum göstermiştir ve İL-4 hastalığın şiddetlenmesinin bir göstergesi olarak ön görülmüştür (Harris ve diğerleri, 2009).

İnterlökin 10 (İL-10)

Mtb enfeksiyonunda immün sınırlandırıcı mekanizmalardan biri İL-10 üretimidir. İL-10 inhibitör bir sitokindir ve inflamatuvar ve immünpatolojik süreçler arasındaki dengeyi sağlamaktadır. İL-10'nun esas fonksiyonu, Mtb'nin yakalanması, kontrolü ve konak immün yanıtının başlaması için gerekli olan makrofaj ve DH işlevini baskılamaktır. Böylece İL-10 Mtb'nin immün yanıttan kaçışında ve akciğerde uzun süreli enfeksiyon oluşumu ile ilişkilendirilmektedir. İL-10, düzeyindeki artış mikobakterinin konakta varlığını devam ettirmesi ile sonuçlanmaktadır (Cavalcanti ve diğerleri, 2012; Redford, Murray, ve O'Garra, 2011).

İL-10, AAM, DH, B hücre ve Treg hücre tarafından oluşturulan proinflamatuvar yanıtı baskılayan, Mtb immünitesini kontrol eden düzenleyici bir sitokindir. İL-10 üretimi, TH1 yanıtını ve hastalığın şiddetlenmesini sınırlandırmaktadır (Berrington ve Hawn, 2007; Cooper, 2009). İL-10, TNF-α ve İL-12p40 ekspresyonunu azaltmakta, alveolar makrofajlarda fagozom maturasyonunu bozmaktadır. Hastalıktan korunmada rol almamakla birlikte uzun dönemde kronik inflamasyonun şiddetini kontrol altına almaktadır (Cooper ve diğerleri, 2011).

İL-10, TH2 hücreleri ve makrofajlar tarafından oluşturulmakta ve naif T hücrelerin TH1'e farklılaşmasını direkt olarak veya makrofajlardan İL-12 oluşumunu engelleyerek indirekt olarak azaltmaktadır. Ayrıca İL-10, mikobakteri enfeksiyonu sırasında TH1 sitokinleri tarafından NK ve makrofaj hücrelerinden de salınabilmekte ve M2c immün düzenleyici makrofajların da bir uyaranı olmaktadır (Saenz ve diğerleri, 2008). İL-10 makrofaj aktivasyon düzeyini düzenlemek ve doku hasarından korunmak için gereklidir (Cilfone, Perry, Kirschner, ve Linderman, 2013).

İL-10 Mtb enfeksiyonunda TNF-α'ya zıt hareket etmektedir. İL-10 ve TNF-α, uzun dönemde enfeksiyonun sonucunu belirlemektedir. Bu dengenin granülom çevresini etkilediği ve hem konak hem de bakteri yararına sonuçlandığı gösterilmiştir. Ancak bu dengenin altüst edilmesinin enfeksiyonun sonucunu etkileyecek yeni tedavi stratejileri oluşturabileceği düşünülmektedir (Cilfone ve diğerleri, 2013).

Transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF-β)

TB TGF-β'nın aşırı üretimi ve biyoaktivasyonu ile karakterizedir (Wu, Aung, Hirsch, ve Toossi, 2012). TGF-β, lenfosit ve lökositlerin aktivasyon ve çoğalmasını engellemektedir. TGF-β, anti-inflamatuvar bir sitokin olmakla birlikte ortamda bulunma süresi ve miktarına bağlı olarak proinflamatuvar etki de gösterebilmektedir. M2c makrofajlar, İL-10 ve TGF-β üretimi ile T hücre ve makrofaj işlevini azaltmaktadır (Abbas, 2007; Saenz ve diğerleri, 2008).

Kemokinler ve kemokin reseptörleri

Mtb enfeksiyonunu takiben basili ilk olarak alan alveolar makrofajlar ve epitel hücresi ve fibroblast gibi immün olmayan diğer hücreler kemokin üretmektedir. Bu kemokin kaskadı, CCR2/5 ve CXCR1/CXCR2 reseptörleri yolu ile nötrofil ve monosit gibi immün hücrelerin erken göçü ile sonuçlanmaktadır. Ayrıca Mtb'yi taşıyan akciğer DH, CCR7 ekspresyonunu arttırmakta ve T hücresini sitokin oluşturan hücreye polarize etmek üzere lenf düğümüne göç etmektedir. Lenf düğümünde aktive olan B ve T lenfositler CXCR3, CCR5 ve CCR6 reseptörlerini arttırmakta ve bu hücreler bakteriye yanıt vermek ve orada kümelenmek üzere akciğere göç etmektedir. Akciğerde immün hücreler kümelendikten sonra CXCL13 ve CCL19 gibi kemokinler bu hücrelerin granülomdaki doğru lokalizasyonunu yönlendirmektedir. Dolayısıyla granülomun oluşumunda ve basilin sınırlandırılmasında önemli rolleri bulunmaktadır (Slight ve Khader, 2013).

CCR2 kemokin reseptörleri

Monosit kemoatraktan proteinler (MCP; CCL2, 7, 8, 12, 13, 16) monosit, DH, bellek T hücre ve NK hücrelerin infamasyon alanına göçü için güçlü kemoatraktan proteinlerdir. MCP-1

(CCL2), Mtb ile enfekte insan akciğeri ve nötrofilleri tarafından oluşturulmaktadır. Bunun reseptörü CCR2 ise yine nötrofiller, T hücreleri ve NK hücrelerinde bulunmaktadır (Slight ve Khader, 2013).

CCR4 kemokin reseptörleri

CCR4, TH2, Treg hücreleri, TH1 ve Th17 üzerinde bulunmaktadır. CCL22 ve CCL17 CCR4'ün ligandlarıdır (Slight ve Khader, 2013).

CCR5 kemokin reseptörleri

CCR5, makrofaj, imDH, nötrofil ve CD4 ve CD8 T hücreleri tarafından eksprese edilmektedir. CCL3, CCL4, CCL5 ve CCL8 CCR5'in ligandlarıdır (Slight ve Khader, 2013). CCL5, makrofaj, fibroblast, eozinofil, endotel hücreleri ve trombositler tarafından oluşturulmaktadır (Zuñiga ve diğerleri, 2012).

CCR6 kemokin reseptörleri

CCR6, efektör ve bellek T hücreleri, miyeloid DH ve B hücreleri tarafından eksprese edilmektedir. CCL20'nin ligandıdır (Slight ve Khader, 2013).

CCR7 kemokin reseptörleri

CCR7, lenfoid doku stromal hücreleri tarafından eksprese edilmektedir. CCL19 ve CCL21'in ligandıdır. T hücrelerin lenfoid doku parakortikal T hücre zonuna göçünü sağlamaktadır. CCR7 ayrıca santral bellek T hücreleri ve DH'ler tarafından da eksprese edilmekte ve bu hücrelerin göçüne de neden olmaktadır (Slight ve Khader, 2013).

CXCR1 ve 2 kemokin reseptörleri

CXCR1 ve 2, esas olarak nötrofiller, NK ve T hücreleri tarafından eksprese edilmektedir. TB hastaların monositlerinde de eksprese edildiği gösterilmiştir. Nötrofillerde CXCL1-3 ve CXCL5-8'in ligandıdır. CXCL8 (İL-8) ve CXCL6 hem CXCR1 hem de CXCR2'ye yanıt verirken diğer ligandlar sadece CXCR2'ye yanıt vermektedir. İnsan granülomunda bulunan

fibroblastlar, monositler ve epitel hücreleri CXCL8 oluşumu ile lökosit kümelenmesine neden olmaktadır (Slight ve Khader, 2013).

CXCR3 kemokin reseptörleri

İnflamatuvar bir kemokin reseptörü olan CXCR3, naif T hücreleri tarafından eksprese edilmekte ve TH1 ve sitotoksik T hücre aktivasyonuna neden olmaktadır. CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 ve CXCL11/ITAC'ın ligandıdır (Slight ve Khader, 2013).

CXCR5 kemokin reseptörleri

Homeostatik kemokin reseptörü CXCR5, yapısal olarak sekonder lenfoid organdan, foliküler DH ve stromal hücreler tarafından eksprese edilmektedir. Granüloma komşu dokudaki B hücre içeren lenfoid foliküller tarafından oluşturulan CXCL13'ün ligandıdır (Slight ve Khader, 2013).

2.4.5. Apoptoz

Apoptoz, hücrenin programlanmış ölüm mekanizmasıdır. Hücrede kromatin yoğunlaşması, çekirdekcikte bozulma, stoplazmik büzüşme ve zarın tomurcuklanması ile karakterizedir. Apoptoz sonucu ortama salınan apoptotik cisimcikler, herhangi bir uyarım ve inflamasyona neden olmadan doku makrofajları tarafından alınır ve yok edilir. Apoptoz esas olarak iki mekanizma ile gerçekleşmektedir. Mitokondriyal (intrinsik) yol kaspaz-9 aracılığı ile, ölüm reseptörleri (ekstrinik) yolu TNF reseptör ailesinin uyarılması soncu kaspaz-8 aracılığı ile gerçekleşmektedir (Abbas, 2007).

TB'de makrofajların ölüm mekanizmasına ilişkin veriler, konağın bundan yarar görüp görmediği noktasında çelişki göstermektedir. Apoptoz esas olarak koruyucu bir yanıt olarak görülürken nekroz inflamasyon ve hastalığın ilerlemesi olarak düşünülmektedir. Mtb'nin, konak yararına olan apoptozu bloke ettiğine dair yayınlar mevcuttur. Apoptozun durudurulması, bakteri temizlenmesine engel olmakta ve bakterinin yayılımını kolaylaştırmaktadır. TB lezyonu bakteri yükü ile paralellik sergilemektedir. Bu yüksek bakteri sayısının hasar ve inflamasyonla ilişkili olduğunu göstermiştir (Russell ve diğerleri, 2009).

Hücre nekrozu, Mtb'nin dışarı kaçmasına ve akciğer dışına yayılımına izin veren konak hücre zarının bozulması ile karakterizedir. Apoptozda ise Mtb makrofaj içerisinde öldürülmekte ve kazanılmış immün yanıtı uyarmaktadır. Bu nedenle makrofajın apoptozu Mtb enfeksiyonuna karşı korunmada yeni bir mekanizma olarak tanımlanmıştır (Jordao ve Vieira, 2011).

Çalışmalar Mtb enfeksiyonunu sınırlayan granülom dokusunun apoptotik hücrelerden zengin olduğunu ve apoptotik kapasitenin azalmasının Mtb'yi kontrol etme yeteneğinin azaldığını göstermiştir. TNF-α, granüloma monosit göçünü ve TNF-α aracılı apoptozu kontrol eden en güçlü faktördür. TNF-α, Fas-FasL üzerine etki ederek kaspaz-8'i aktive etmekte ve apoptoza neden olmaktadır. Ayrıca apoptozun İL-4 müdahalesi ile in vivo olarak azaldığı gösterilmiştir (Abebe ve diğerleri, 2011).

2.5. *Mycobacterium tuberculosis*'in Konak İmmün Yanıtından Kaçış Mekanizmaları

Mtb'nin konak immün yanıtından kaçışı karmaşık mekanizmalar ile gerçekleşmektedir. Bu kaçma, saptırma ve bozma şeklinde meydana gelebilmektedir. Mtb, konakta işlev gören bir immün sistemin varlığına rağmen uzun süre dormant halde bulunabilmektedir. Mtb yanıtı TH1 - aracılı yanıt olmasına rağmen kronik enfeksiyon ve latentlik engellenememektedir. Mtb'nin immün sistemden en önemli kaçış mekanizması makrofajlar içerisinde basili elimine edememesidir (Zuñiga ve diğerleri, 2012).

Mtb, fagozom-lizozom füzyonunu özel bazı mekanizmalar ile bozarak, lizozomun asidik ortamına direnç göstererek, iNOS'un fagozom civarına etki etmesini bozarak ve lipitten zengin zarın bileşenleri ile oksidanlara karşı direnç göstererek makrofaj içerisinde persistan kalmaktadır (Deretic ve diğerleri, 2009).

2.5.1. Makrofaj fagozom-lizozom füzyonunun bozulması

Mtb Man-LAM antijeni konak hücresinde MR ile tanınmaktadır. Basilin makrofajlar tarafından MR aracılığı ile fagosite edilmesi, Man-LAM'ın mannoz reseptörü aracılığı ile İL-12'yi inhibe etmesine ve fagozom ile lizozom füzyonunu sınırlandırarak fagolizozom olgunlaşmasının engellenmesine, böylelike anti-inflamatuvar bir yanıtın oluşmasına neden olmaktadır. Makrofajlarda meydana gelen bu baskılanma sonucunda basil makrofaj içerisinde canlılılığı sürdürebilmekte ve enfeksiyona yol açabilmektedir (Kleinnijenhuis ve diğerleri, 2011; Zuñiga ve diğerleri, 2012).

Fagozomal olgunlaşma bozulduğunda mikroorganizma ölümden kurtularak enfeksiyona neden olmaktadır. Ayrıca Mtb sitozole kaçmakta, enfeksiyonun ikinci gününde basil fagolizozomdan sitozole geçmektedir. Atenüe suşların sitozole geçişi daha yavaş olmaktadır (Jordao ve Vieira, 2011; Zuñiga ve diğerleri, 2012).

2.5.2. Lizozomun asidik ortamına direnç

NO ve RNI, makrofajlar tarafından oluşturulan güçlü antimikrobiyal maddelerdir. Mtb RNI toksisitesinden kaçmak için çeşitli stratejiler geliştirmiştir. Basil iNOS'un fagozoma

yönlendirilmesini inhibe etmektedir. Ayrıca basilin 19 kDa'lık lipoprotein gibi bazı yüzey bileşenleri, bir dizi İFN-γ yanıt genlerin transkripsiyonunu bloke ederek makrofajların İFN-γ'ya yanıtını zayıflatmaktadır (Ahmad, 2011; Zuñiga ve diğerleri, 2012).

2.5.3. MHC sınıf II molekülerin ekspresyonunun baskılanması

Konaktan Mtb'nin bir diğer kaçış mekanizması, MHC moleküllerinin sunumunu azaltarak antijen sunan hücrelerin (makrofaj ve DH) T hücreleri tarafından tanınmasının engellenmesidir (Zuñiga ve diğerleri, 2012).

Man-LAM, trehaloz 6-6' dimikolat (kord faktör) ve 19 kDa'lık lipoprotein; MHC sınıf II antijen sunumunu indükleyen IFN genlerininin transkripsiyonunu azaltmaktadır. 19 kDa'luk lipoprotein, TLR-2 agonistidir ve doğal immünite ve ASH işlevini yönlendirmektedir. Lipoproteinler ile uzamış TLR-2 sinyali, MHC sınıf II ekspresyonunu ve antijenlerin makrofajlarca işlenmesini azaltmaktadır. Düşük ASH işlevi gösteren makrofaj topluluğu, basili CD4 T hücrelere sunamamakta ve efektör T hücrelerin uyarılmasında bir yetersizliğe neden olmaktadır. Bu yetersizlik basilin immün gözetimden kaçmasına, makrofaj içerisinde varlığını sürdürmesine ve varlığını devam ettirebildiği bir bölgede sürekli kaim olmasına neden olmaktadır (Zuñiga ve diğerleri, 2012).

Ayrıca Mtb, dendritik hücrenin aktivasyonunu bozarak T hücre uyarımını engellemektedir. Enfekte miyeloid DH, T hücre uyarımını yapma yeterliliğine sahip olamamakta, yani olgunlaşamamaktadır. Dolayısıyla MHC ekspresyonu da yapamamakta ve T hücresini uyaramamaktadır (Baena ve Porcelli, 2009; Behar ve diğerleri, 2011).

2.5.4. Proinflamatuvar sitokinlerin baskılanması

Yüksek derecede virülan Mtb suşu (W-Beijing ailesi), hücre duvarında önemli bir virülans faktörü olan fenolik glikolipit içermektedir. Etken bakteri söz konusu glikolipitleri ile TNF-α, İL-6 ve İL-12 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımını engellemektedir (Ahmad, 2011).

2.6. *Mycobacterium tuberculosis*'e Karşı Korunma

Mtb enfeksiyonuna karşı korunma ancak, BCG suşu gibi atenüe basil ile enfeksiyon veya Mtb'nin kendisi ile enfeksiyon sonrası bir miktar sekonder enfeksiyondan olmaktadır. Mtb'ye karşı immünite, immün serum ile aktarılamamakta, lenfoid hücrelerin transferini gerektirmektedir (Nicod, 2007).

BCG (Bacille Calmette-Guerin), günümüzde tek onaylı TB aşısıdır. Bakteri ile mücadelede en yaygın olarak kullanılmakla birlikte bu aşının etkinliği yeterince güçlü değildir. Çalışmalar BCG'nin koruyuculuğunun çocuklarda %0-80 arasında değiştiğini ve ancak TB menenjiti gibi komplikasyonlara karşı koruyucu olduğunu göstermektedir. Bu nedenle TB etkenine karşı daha güçlü bağışıklama sağlayacak aşıların geliştirilmesine ihtiyaç vardır (Ahmad, 2011; WHO, 2012). BCG, çocukluk çağı TB'a karşı korunma sağlamasına rağmen erişkinde yeterli korunma sağlamamaktadır. Bu BCG'nin uzun süreli korunma sağlamadığının bir göstergesidir. Bu nedenle uzun süreli bellek oluşumuna neden olan alternatif aşılama stratejilerine ihtiyaç vardır. DH aşıları ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Ayrıca, Mtb aşıları farelere İL-1+İL-6+TNF-α (IM-1.6.α) ve İL-7+İL-15 (IM-7.15) ile birlikte verildiğinde uzun süreli koruma sağladığı gösterilmiştir (Singh ve diğerleri, 2011).

Doğal patojeni içeren subünite aşılar özgül ve etkin bir immün yanıt oluşturmada yeterli olmamaktadır. Atenüe aşılar da yeterince koruyucu bulunmamıştır. DNA aşıları farelerde etkili bulunurken bu etki insanda saptanamamıştır. Retroviral vektör ile mikobakteri 85A antijeni yüklenmiş DH ile aşılama farelerde başarılı sonuçlar vermiştir (Nicod, 2007).

Bazı aşılarda başarılı fare sonuçları elde edilmiş olmakla birlikte, insan çalışmalarında istenilen etkinliğe halen ulaşılamamıştır.

3. YÖNTEM

3.1. Araç-Gereçler

3.1.1. Standart suş ve hücreler

Çalışmalar sırasında kullanılan standart suş ve standart hücreler Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Standart suş ve hücreler

Sıra No	Kitin adı	Kitin markası ve üretim yeri
1	*M.tuberculosis* H37Rv	ATCC, USA
2	Fare J774.1 hücresi	ATCC, USA
3	Fare 3T3 fibroblast hücresi	ATCC, USA

3.1.2. Kitler

Çalışmalar sırasında kullanılan kitler Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Kitler

Sıra No	Kitin adı	Kitin markası ve üretim yeri
1	Fare İL-1β ELISA kiti	eBioscience, USA
2	Fare İL-4 ELISA kiti	eBioscience, USA
3	Fare İL-6 ELISA kiti	eBioscience, USA
4	Fare İL-10 ELISA kiti	eBioscience, USA
5	Fare İL-12 ELISA kiti	eBioscience, USA
6	Fare İL-33 ELISA kiti	eBioscience, USA
7	Fare İL-İFN-γ ELISA kiti	eBioscience, USA
8	Fare İL-TGF-β ELISA kiti	eBioscience, USA
9	Fare İL-TNF-α ELISA kiti	eBioscience, USA
10	Fare anti-CD11b antikoru	Biolegend, USA
11	Fare anti-F4/80 antikoru	Biolegend, USA
12	Fare anti-CD80 antikoru	Biolegend, USA
13	Fare anti-CD86 antikoru	Biolegend, USA
14	Fare anti-CD62L antikoru	Biolegend, USA
15	Fare anti-CD44 antikoru	Biolegend, USA
16	Fare anti-CD103 antikoru	Biolegend, USA
17	Fare anti-CD107b antikoru	Biolegend, USA
18	Fare anti-CD153 antikoru	Biolegend, USA
19	Fare anti-MHC sınıf II antikoru	Biolegend, USA
20	Fare TLR-2 antagonisti	Biolegend, USA
21	Silver Reagent	Thermo Scientific, USA

3.1.3. Kimyasallar

Çalışmalar sırasında kullanılan kimyasallar Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Kimyasallar

Sıra No	Kimyasalın adı	Kimyasalın markası ve üretim yeri
1	RPMI 1640	Gibco 31870, USA
2	Fetal bovine serum	Gibco 16000, USA
3	Trypsin EDTA	Gibco, USA
4	Penisilin-streptomisin	Gibco 15140, USA
5	L-glutamine	Gibco 25030, USA
6	MEM-NEAA	Gibco 11140, USA
7	Sodium pyruvate	Gibco 11360, USA
8	β-mercaptoethanol	Gibco 21985-023, USA
9	PBS	Gibco, USA
10	Löwenstein Jensen	Beckton Dickinsen, USA
11	Middlebrook 7H9 Broth	Difco, USA
12	OADC	Beckton Dickinsen, USA
13	Kloroform	Applichem, Germany
14	Metanol	Applichem, Germany
15	Etanol	Applichem, Germany
16	Triton X-100	Sigma, USA
17	Triton X-114	Sigma, USA
18	Ultra pure water	Biochrom KG, Germany
19	Fenol	Applichem, Germany
20	Tripsin	Applichem, Germany
21	Amilaz	Qiagen, Germany
22	RNAse A	Qiagen, Germany
23	DNAse I	Qiagen, Germany
24	Proteinaz K	Qiagen, Germany

3.1.4. Cihazlar

Çalışmalar sırasında kullanılan cihazlar Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.4. Cihazlar

Sıra No	Cihazın adı	Cihazın markası ve üretim yeri
1	Akım sitometri	Beckman Coulter, USA
2	Santrifüj	Sigma, Almanya
3	Sonikatör	Elmasonic, S30; Singen, Almanya
4	Otoklav	Sanyo, USA
5	Elektroferez tankı	Biorad, USA

3.1.5. Sarf Malzemeler

Çalışmalar sırasında kullanılan sarf malzemeler Çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.5. Sarf malzemeler

Sıra No	Malzemenin adı	Malzemenin markası ve üretim yeri
1	0,4 µm por çaplı, naylon membran	Millipore, Germany
2	Steril hücre kültür flaskı, 50 ml	TPP, Sweetzerland
3	Steril hücre kültür flaskı, 250 ml	TPP, Sweetzerland
4	Steril hücre kültür plağı, 6 kuyulu	TPP, Sweetzerland
5	Steril hücre kültür plağı, 24 kuyulu	TPP, Sweetzerland
6	Konik seril santrifüj tüpü, 15 ml	Greiner, Germany
7	Konik seril santrifüj tüpü, 50 ml	Greiner, Germany
8	Steril pipet, 1 ml	Greiner, Germany
9	Steril pipet, 5 ml	Greiner, Germany
10	Steril pipet, 10 ml	Greiner, Germany
11	Steril pipet, 25 ml	Greiner, Germany
12	Steril pastör pipeti, 3 ml	Greiner, Germany
13	Steril cryovial tüp, DNAse RNAse free	Greiner, Germany
14	Steril ependorf, DNAse RNAse free	Greiner, Germany
15	Steril filtreli pipet ucu, 1-10 µl	Greiner, Germany
16	Steril filtreli pipet ucu, 20 µl	Greiner, Germany
17	Steril filtreli pipet ucu, 200 µl	Greiner, Germany
18	Steril filtreli pipet ucu, 1000 µl	Greiner, Germany
19	3.5 kDa'lık diyaliz membran	Spectrapor 132725, USA

3.2. *Mycobacterium tuberculosis* Man-LAM Antijeninin Elde Edilmesi

3.2.1. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv'nin çoğaltılması

Man-LAM antijeni eldesi için *M. tuberculosis* H37Rv suşu Löwenstein Jensen (LJ) besiyerinde (5 tüp) 35^{o}C'lik etüvde 21 gün süre ile çoğaltıldı. Logaritmik fazdaki bakteriler OADC (oleik asit, albümin, dekstroz, katalaz) eklenmiş gliserollü Middlebrook (MB) 7H9 broth besiyerine aktarıldı ve 35^{o}C'lik etüvde sıvı besiyerinde 500'er ml'lik şişeler içerisinde 14 gün süre ile çoğaltıldı. Sıvı besiyeri tarif edildiği şekilde hazırlandı. Özetle; 4,7 gr MB 7H9, 2 ml gliserol, 900 ml distile su karıştırıldı ve otoklavlandı. Soğuduktan sonra 100 ml OADC eklendi (Gilleron, Bala, Brando, Vercellone, ve Puzo, 2000; Torrelles, Azad, ve Schlesinger, 2006).

3.2.2. Man-LAM antijeninin ekstraksiyonu

500 ml canlı bakteri içeren besiyerinden bakteri pelleti santrifügasyon ile toplandı. Bakteriler 95^{o}C'de 1 saat süre ile inaktive edildi. İnaktive edilen bakteri pelleti 3000 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek toplandı. PBS ile 3000 rpm'de 15 dk yıkandı ve pellet kurutuldu.

Kloroform / metanol / su yöntemi ile Man-LAM eldesi aşağıdaki basamaklar dahilinde gerçekleştirildi (Gilleron ve diğerleri, 2000; Torrelles ve diğerleri, 2006).

<u>Delipidizasyon</u>

Man-LAM eldesi için delipidizasyon işlemine 2 gr bakteri çökeltisi ile başlandı. Çökelti ilk önce 2 kez kloroform / metanol ile bunun ardından da bir kez kloroform / metanol / su ile muamele edilerek ekstrakte edildi. Özetle; 2 gr bakteri 50 ml kloroform / metanol (2:1 oranında) ile 37^{o}C'de 12 saat muamele edildi. 3000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi, süpernatant döküldü. Pellet 50 ml ek kloroform / metanol / su (10:10:3 oranında) ile 37^{o}C'de tekrar 12 saat muamele edildi. 3000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi, süpernatant döküldü. Pellet PBS ile 3000 rpm'de 15 dk yıkandı ve gece boyunca kurumaya bırakıldı (Gilleron ve diğerleri, 2000; Torrelles ve diğerleri, 2006).

Total lipit fraksiyonu, pelletin 4 katı -20^{O}C'de soğutulmuş aseton ile polipropilen tüpte karıştırıldı, 1 dk süre ile vortekslendi ve gece boyunca -20^{O}C'de çöktürüldü. Gecelik inkübasyonun ardından pellet 5000 rpm'de 30 dk santrifüj edilerek çöktürüldü. Asetonun uçması için oda sıcaklığında 30 dk tüpün kapağı açık olarak kurumaya bırakıldı (Gilleron ve diğerleri, 2000; Torrelles ve diğerleri, 2006).

Etanol / su ile lipoglikan eldesi

Lipit kısmından lipoglikan elde edilmesi aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi. Özetle; pelletin üzerine 1'e 2 oranında %50'lik etanol ilave edildi. 65^{O}C'de 8 saat muamele edildi. 3000 rpm'de 30 dk santrifüj edildi, süpernatant döküldü. Pelletten %50'lik etanol ile ekstraksiyon işlemi 5 kez daha tekrar edildi. 6 kez ekstraksiyondan sonra pellet 3000 rpm'de 15 dk PBS ile yıkandı. Sonikatörde 20 kHz, 600 watt'da buz içerisinde 15 dk (10 kez 1 dk uyarı, 30 sn bekleme şeklinde) muamele edildi. Hücrelerin üzerine cam boncuk ilave edildi ve 2 dk süre ile vortekslendi. Parçalanan hücreler etanol / su ile tekrar muamele edildi. 3000 rpm'de 30 dk santrifüj edildi, süpernatant döküldü. Pellet (hücresel kısım) 3000 rpm'de 15 dk PBS ile 2 kez yıkandı ve kurumaya bırakıldı (Gilleron ve diğerleri, 2000; Nigou ve diğerleri, 1997; Nigou, Gilleron, ve Puzo, 2003; Pitarque ve diğerleri, 2008; Torrelles ve diğerleri, 2006).

Etanol / su (parietal) kısımdan lipoglikan ekstraksiyonu için PBS ile yıkanmış ve kurumaya bırakılmış pelletten işleme devam edildi. Çözünmenin sağlanması için 2 kat hacimde %2'lik triton X-100 ile muamele edildi ve vortekslendi. Triton-X'e karşı 3,5 kDa'lık diyaliz membran kullanılarak gece boyunca diyaliz yapıldı, üç kez sıvısı değiştirildi. 2 kat hacimde kloroform / metanol / su (2:1:1) ile karıştırılarak triton-X uzaklaştırıldı. 3000 rpm'de 30 dk santrifüj edildi. Pellet PBS ile 3000 rpm'de 15 dk yıkandı, kurumaya bırakıldı (Nigou ve diğerleri, 1997).

Hücresel proteinlerin yıkımı

Kurutulan çökelti; 1 ml tripsin (%0,5), 10 µl amilaz (1U), 17,5 µl RNAse A (25 U/ml), 33 µl DNAse I (10 U/ml) 3,94 ml PBS içerisinde 37^{O}C'de 1 saat muamele edildi. Tüpün içerisine cam boncuk ilave edildi ve 2 dk vortekslendi. Partiküller 3000 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek uzaklaştırıldı. Süpernatantın üzerine %80'lik sıcak fenol ilave edildi. Yavaşça

çalkalandı. 70^{o}C'de 1 saat muamele edildi. Bir gece soğukta bekletildi. 3000 rpm'de 30 dk santrifüj edildi, santrifügasyon ile gece boyunca yukarı çıkanlar çöktürüldü. Hem fenolün üstü hem de presipitat tekrar PBS ile yıkandı. %80'lik fenol ile tekrar 70^{o}C'de 1 saat muamele edildi. Bir gece soğukta bekletildi. Fenolün üzerindeki sıvı faz alındı, proteinler fenolün içerisinde atıldı. Gece boyunca 3,5 kDa'luk diyaliz membranı ile suya karşı 3 gece diyaliz yapıldı. Su 3 kez değiştirildi (Mahon ve diğerleri, 2012; Nigou ve diğerleri, 1997; Torrelles ve diğerleri, 2006).

Triton-X ile faz ayrışması

Diyaliz edilen hücreler biyolojik su ile toplandı. %8'lik triton X-114 lize edilen hücrelere 1:1 oranında buz içerisinde ilave edildi. Triton X-114 biyolojik su ile hazırlandı. +4^{o}C'de gece boyunca karıştırıldı. 20.000g'de +4^{o}C'de 1 saat santrifüjgasyon ile hücre bileşenleri uzaklaştırıldı. Süpernatant bifazik ayrışma için 37^{o}C'de 30 dk inkübe edildi. 37^{o}C'de 30 dk inkübasyon işlemi ayrılmanın daha net olması için tekrarlandı. Üst sıvı (aquoz kısım) ve hücre debrisi (hücresel kısım) ayrı ayrı alındı. Tüpün dibinde yer alan deterjan faz atıldı (Nigou ve diğerleri, 1997; Torrelles ve diğerleri, 2004; Torrelles ve diğerleri, 2009).

Lipoglikanlar, 9 kat %95'lik soğuk etanol ilavesi ile gece boyunca -20^{o}C'de çöktürüldü. 20.000g'de 20 dk santrifüj edildi, süpernatant atıldı. Çökelti 1 mg/ml proteinaz K ile 2 saat 60^{o}C'de muamele edildi. Solüsyon 3 gece boyunca diyaliz edildi, sıvı 3 kez değiştirildi. Ürün liyofilize edilip tartıldı ve 1 mg/ml olacak şekilde PBS ile hazırlandı ve tüplere bölünüp -80^{o}C'ye kaldırıldı (Nigou ve diğerleri, 1997; Torrelles ve diğerleri, 2004; Torrelles ve diğerleri, 2009).

3.2.3. Westernblot ile Man-LAM antijeninin kontrolü

PBS içerisinde çözünmüş antijen, %15'lik SDS-PAGE'de tris base - glisin içeren SDS (sodyum dodesil sülfat) tampon solüsyonuda 200 voltta 60 dk süresince yürütüldükten sonra asit-gümüş boyama ile boyandı ve 85 kDa'luk saf bant izlendi (Şekil 4.1) (Torrelles ve diğerleri, 2006).

Westernblot çözeltilerinin hazırlanması

Western blotta kullanılan akrilamid / bis akrilamid, SDS, tris HCl, sample buffer, running buffer ve %10'luk amonyum persülfat çözeltileri deney öncesinde taze olarak hazırlandı.

Akrilamid / bis akrilamidin hazırlanması için 14,6 gr akrilamid ve 0,4 gr bisakrilamid tartıldı. Distile su ile 50 mL'ye tamamlandı. 45 µm'lik membran filtreden geçirildi. 2 saat süre ile gazı çıkarıldı.

SDS'in hazırlanması için 10 gr SDS tartıldı. Distile su ile 100 mL'ye tamamlandı. Köpürtmeden çözünene kadar karıştırıldı.

Tris HCl (1,5 M, pH 8,8) hazırlanması için 9,075 gr trizma base tartıldı. Distile su ile 30 mL'ye tamamlandı. Damla damla %25'lik HCl eklenerek pH ayarlandı. Distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

Tris HCl (0,5 M, pH 6,8) hazırlanması için 6 gr trizma base tartıldı. Distile su ile 60 mL'ye tamamlandı. Damla damla %25'lik HCl eklenerek pH ayarlandı. Distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Sample bufferı hazırlamak için 50 µL 2 merkaptoetanol, 950 µL laemmli sample buffer ile karıştırıldı.

Running buffer (pH 8,3)'ın hazırlanması için 30,3 gr tris base, 144 gr glisin tartıldı. Distile su ile 600 mL'ye tamamlandı. 45^{O}C'de çözüldü. 10 gr SDS eklendi. Köpürtmeden manyetik balıkla karıştırıldı. HCl ile damla damla pH ayarlandı. Distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı (10x). Kullanım sırasında 10x'ten 100 mL alınıp distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı (1x).

Jelin hazırlanması

Jel çift tabaka olarak hazırlandı. %15'lik resolving jelin hazırlanması için 2,4 mL distile su, 5 mL akrilamid / bisakrilamid, 2,5 mL 1.5 M tris HCl, 0,1 mL SDS karıştırıldı. Son olarak 50 µL amonyum persülfat ve 15 µL tetrametiletilendiamin (TEMED) eklendi. Nazikçe karıştırıldı,

donmadan jel tutucuya döküldü. 30 dk jelin donması beklendi. Üzerine stocking jel ilave edildi.

Stocking jelin hazırlanması için 6,1 mL distile su, 1,3 mL akrilamid / bisakrilamid, 2,5 mL 0,5 M Tris HCl, 0,1 mL SDS karıştırıldı. Son olarak 50 µL anonyum persülfat ve 15 µL TEMED eklendi. Nazikçe karıştırıldı, donmadan jel tutucuda resolving jelin üzerine döküldü. Tarak yerleştirildi ve 30 dk jelin donması beklendi.

Örneklerin hazırlanması

25 µL örnek, 50 µL sample buffer ile sulandırıldı. 95^{o}C'de 5 dk kaynatıldı. Spin edildi ve yüklemeye hazırlandı.

Jele yükleme ve jelde yürütme

Jel tutucu tanka yerleştirildi. Üzerine running buffer tarağı kapatacak kadar ilave edildi. Jelin altında kalan balonlar patlatıldı. Tarak kaldırıldı. Önce belirteç, sonra örnekler 20'er µL yüklendi. 200 voltta 50-60 dk yürütüldü.

Gümüş boyama

Gümüş boyama kit prosedürüne uygun olarak yapıldı. Özetle; jelin fiksasyonu için jel %50 etanol, %5 asetik asit ve %45 distile su çözeltisinde bir gece fikse edildi. Sabah 4 kez 30'ar dk ultrapure su ile yıkandı.

İlk önce silver working solüsyonu ile boyandı. 10 mL silver reagent, 140 mL distile su ile karıştırıldı. Jelin üzerine dökülüp 30 dk beklendi. Distile su ile 2 kez yıkandı. Reduction reagent ile boya giderme işlemi için 10 mL reducer aldehid, 10 mL reducer base ve 130 mL distile su ile karıştırıldı. Jelin üzerine dökülüp 3-5 dk beklendi. Distile su ile 2 kez yıkandı. Stabilizer reagent ile boya sabitlenmesi için 5 mL stabilizer reagent, 245 mL distile su ile karıştırıldı. Jelin üzerine dökülüp 30 dk beklendi.

3.2.4. Antijen dozunun belirlenmesi

Makrofaj hücre kültürü

Prof. Dr. Vedat Bulut'tan alınan fare makrofaj hücre kültürü J774.1 hücre dizini %10 FBS, %2 L-glutamin, %1 penisilin – streptomisin, %1 sodyum piruvat, %1 MEM-NEAA (minimal essential medium-nonesansiyel aminoasit) ve %0,1 β-merkaptoetanol içeren RPMI besiyerinde (hücre kültür vasatı; HKV) 75 cm^2'lik hücre kültürü şişelerinde 37^oC ve %5 CO_2'li inkübatörde çoğaltıldı. Çoğalan hücreler tripan mavisi ile boyandı ve hemasitometrede boya almayan hücreler sayıldı ve doz belirleme deneyi için ml'de 1x10^6 canlı hücre olacak şekilde HKV içerisinde sulandırıldı (Albayrak, Biriken, ve Ozenci, 2006; Salin, Albayrak, Yildiz, ve Ozenci, 2009).

Doz Belirleme Deneyi

Makrofaj hücrelerinin ve Man-LAM'ın farklı dozları çapraz olarak çalışıldı. 5x10^6 / ml, 1x10^6 / ml, 5x10^5 / ml ve 1x10^5 / ml J774.1 hücresi, farklı dozlardaki (100 µg, 10 µg, 1 µg, 100 ng, 10 ng, 1 ng ve 100pg) Man-LAM ile 24 kuyucuklu plaklarda 37^oC ve %5 CO_2'li inkübatörde 24 saat süre ile inkübe edildi. Uyarımın değerlendirilmesi Griess yöntemi ile NO miktarı saptanarak yapıldı. 40 ng Man-LAM'ın uyarımı için uygun doz olarak belirlendi (Ellis, Adatia, Yazdanpanah, ve Makela, 1998; Guevara ve diğerleri, 1998).

3.3. Hücre Kültürü

3.3.1. Fibroblast hücre kültürü

Fare fibroblast hücre dizini (3T3; ATCC, CRL1658) HKV içerisinde hazırlandı. 75 cm^2'lik hücre kültürü şişelerinde %90 kaplamış olan hücreler deney için taze olarak kullanıldı. Hücreler deney öncesinde %0,05 tripsin / EDTA (etilendiamintetraasetik asit) ile kaldırıldı ve kaldırılan hücreler HKV ilave edildikten sonra 1200 rpm'de 5 dakika +4^oC'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası hücre pelleti HKV ile süspanse edilerek %0,5'lik tripan mavisi ile boyandı. Boyanmayan canlı hücreler hemasitometrede sayılarak ml'de 5x10^5 canlı hücre olacak

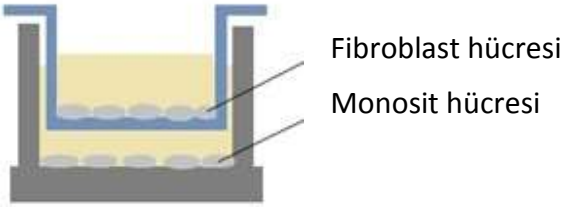
şekilde HKV ile sulandırım gerçekleştirildi (Albayrak ve diğerleri, 2006; Salin ve diğerleri, 2009).

3.3.2. Makrofaj hücre kültürü

Uyarım deneyleri için 75 cm^2'lik hücre kültürü şişelerinde %5 CO_2'li etüvde çoğaltılan fare J774.1 makrofaj hücreleri deney için taze olarak kullanılmak üzere 1200 rpm'de 5 dakika +4^oC'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası hücre pelleti HKV ile süspanse edilerek tripan mavisi ile boyandı ve canlı hücreler hemasitometrede sayıldıktan sonra ml'de $5x10^5$ canlı hücre olacak şekilde HKV ile sulandırım gerçekleştirildi (Albayrak ve diğerleri, 2006; Salin ve diğerleri, 2009).

3.3.3. Fibroblast - makrofaj hücre kokültür modelleri

3T3 fibroblast hücreleri ve J774.1 makrofaj hücreleri yukarıda bahsedildiği gibi ml'de $5x10^5$ hücre olacak şekilde hazırlandıktan sonra 6 kuyucuklu pleytlere 3 ayrı çalışma konfigürasyonunda ilave edildi. Fibroblast ve makrofaj hücreleri ayrı kuyucuklarda, hücreler aynı kuyucukta temas eder vaziyette ve hücreler aynı kuyucukta ancak 0,4 µm por çaplı naylon membran ile ayrılmış olarak konuldu (Şekil 3.1). Fibroblast ya da makrofaj hücre dizinlerinin tek başına konulduğu kuyucuklara hücreler ml'de $5x10^5$ olacak şekilde 5'er ml olarak dağıtıldı. Fibroblast ve makrofaj hücre dizinlerinin birlikte konulduğu kuyucuklara hücreler ml'de $5x10^5$ olacak şekilde 2.5'şer ml olarak dağıtıldı. Uyarım deneyi için 6 kuyucuklu plaklarda çalışma konfigürasyonları Şekil 3.2'de verilmiştir. Herbir konfigürasyon için ikişer kuyucuk hazırlandı ve antijen ile uyarımdan önce 3 saat 37^oC ve %5 CO2'li etüvde bekletildi (Albayrak ve diğerleri, 2006; Salin ve diğerleri, 2009).



Şekil 3.1. Hücre – hücre temassız (transwell'li) kokültür modeli

3.4. Uyarım Deneyleri

3.4.1. Hücrelerin LPS ve Man-LAM antijenleri ile uyarlması

3 saatlik inkübasyonun ardından hücrelerin üzerine, hücrelere dokunulmadan dikkatlice 40 ng/mL olacak şekilde Man-LAM, 10 ng / mL olacak şekilde LPS antijen süspansiyonu ilave edildi ve %5 CO_2 içeren 37^{o}C etüvde inkübe edildi. Kontrol olarak uyarımsız hücreler kullanıldı (Şekil 3.2).

NO ve sitokin ELİSA ölçümleri için 18 saat sonra herbir kuyucuktan 1'er mL HDK ayrı ayrı toplandı ve 3000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant çalışma yapılıncaya kadar -80^{o}C'de saklandı. Akım sitometri deneyleri için plakların 24 saat süresince inkübasyonuna devam edildi.

Plak 1.			
	Kontrol	LPS	Man-LAM
3T3	3T3 (+) HKV	3T3 (+) LPS	3T3 (+) Man-LAM
J774.1	J774.1 (+) HKV	J774.1 (+) LPS	J774.1 (+) Man-LAM
Plak 2.			
	Kontrol	LPS	Man-LAM
3T3 + J774.1[†]	3T3+J774.1 (+) HKV	3T3+J774.1 (+) LPS	3T3+J774.1 (+) Man-LAM
3T3 / J774.1[‡]	3T3 / J774.1 (+) HKV	3T3 / J774.1 (+) LPS	3T3 / J774.1 (+) Man-LAM

Şekil 3.2. 6 kuyucuklu plakta çalışma konfigürasyonu

3.4.2. TLR-2 yolağın bloklanması

M. tuberculosis Man-LAM antijenleri ile uyarılan fibroblast hücrelerinin makrofaj farklılaşmasına olan etkisine TLR-2'nin katkısının değerlendirilmesi için, J774.1 makrofaj hücreleri anti-TLR-2 ile bloklandıktan sonra makrofaj farklılaşması hem ELİSA hem de akım sitometrik olarak tekrar değerlendirildi (Esin ve diğerleri, 2013).

3T3 ve J774.1 hücreleri tek başına, temaslı ve temassız olarak birarada üç ayrı konfigürasyonda 6 kuyucuklu plaklara 5x10^{5}/mL hücre olacak şekilde 5'er mL dağıtıldı (Şekil

[†] 3T3 + J774.1; fibroblast hücresi ve makrofaj hücre temaslı kokültür modeli
[‡] 3T3 / J774.1; fibroblast hücresi ve makrofaj hücre temassız (transwell'li) kokültür modeli

3). Plaklar %5 CO_2 içeren 37^{o}C etüvde 3 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda hücrelerin üzerlerine 40 ng/mL Man-LAM ve 1 µg/mL anti-TLR-2 eş zamanlı olarak ilave edildi. Kontrol olarak uyarımsız hücreler kullanıldı (Şekil 3.3). Herbir konfügürasyon için çift kuyucuk çalışıldı (Esin ve diğerleri, 2013).

Man-LAM; 1 mg/mL stok antijenden dilüsyon yapılması için 10 µL antijen 990 HDK ile karıştırıldı (10^{-2} dilüsyonu). 10^{-2} dilüsyondan 500 µL alındı, üzerine 5,5 mL HDK ilave edildi (20x; 800 ng/mL). 2,5 mL 20x'in üzerine 2,5 mL HDK ilave edildi (10x; 400 ng/mL).

Sadece Man-LAM ile uyarılacak olan kuyucuklara 500'er µL 10x'den ilave edildi. Man-LAM ve anti-TLR-2 ile eş zamanlı olarak uyarılacak olan kuyucuklara 250'şer µL 20x'den ilave edildi. Anti-TLR-2; 1 mg/mL stok antikordan 50 µL antikor alındı, 2450 µL HDK ilave edildi (20x; 20 µg/mL). Man-LAM ve anti-TLR-2 ile eş zamanlı olarak uyarılacak olan kuyucuklara 250'şer µL 20x'den ilave edildi. Plaklar, antijen ile hücrelerin karışması için hafifçe çalkalandı ve %5 CO_2 içeren 37^{o}C etüvde inkübe edildi.

18. saatin sonunda NO ve sitokin yanıtının değerlendirilmesi için süpernatant toplandı, santrifüj edildi ve üst sıvısı çalışılıncaya kadar -80^{o}C'de saklandı. 24. saatin sonunda hücreler akım sitometri analizi için kaldırıldı.

Plak 1.			
	Kontrol	Man-LAM	Man-LAM (ML) (+) Anti-TLR-2
3T3	3T3 (+) HKV	3T3 (+) Man-LAM	3T3 (+) ML (+) Anti-TLR-2
J774.1	J774.1 (+) HKV	J774.1 (+) Man-LAM	J774.1 (+) ML (+) Anti-TLR-2
Plak 2.			
	Kontrol	Man-LAM	Man-LAM (ML) (+) Anti-TLR-2
3T3 + J774.1[§]	3T3+J774.1 (+) HKV	3T3+J774.1 (+) Man-LAM	3T3+J774.1 (+) ML (+) Anti-TLR-2
3T3 / J774.1[**]	3T3 / J774.1 (+) HKV	3T3/J774.1 (+) Man-LAM	3T3/J774.1 (+) ML (+) Anti-TLR-2

Şekil 3.3. 6 kuyucuklu plakta TLR-2 ile bloklamalı çalışma konfigürasyonu

[§] 3T3 + J774.1; fibroblast hücresi ve makrofaj hücre temaslı kokültür modeli
[**] 3T3 / J774.1; fibroblast hücresi ve makrofaj hücre temassız (transwell'li) kokültür modeli

3.5. Uyarımın Değerlendirilmesi

3.5.1. Nitrik oksit yanıtı

Griess yöntemi nitritin asidik ortamda primer bir aromatik amin ile (sülfanilamit) diazotizasyonu ve NEDD ile mor renkli bir azo ürünü oluşturması esasına göre yapıldı (Ellis ve diğerleri, 1998; Guevara ve diğerleri, 1998).

Griess A ayıracının hazırlanması; 0,1 gr NEDD, 100 mL distile su içerisinde çözündü. Çalışma yapılana kadar +4^{o}C'de karanlıkta saklandı. Griess B ayıracının hazırlanması; %85'lik fosforik asit, 3 mL olacak şekilde distile su içerinde hazırlandı. %5'lik ortofosforik asit, 47 mL olacak şekilde distile su içerinde hazırlandı. 0,5 gr sülfanilamid ilave edilerek tüm ayıraçlar karıştırıldı. Çalışma yapılana kadar +4^{o}C'de karanlıkta saklandı. Nitrat standardı; 10mM nitrat stok standart olarak hazırlandı (Ellis ve diğerleri, 1998; Guevara ve diğerleri, 1998).

Çalışma öncesinde; Griess A ve B ayıraçları birebir oranında karıştırıldı. 100 µl stok nitrat standardı, 10 mL distile su içerisine konuldu. 96 kuyucuklu plakta bire bir oranında distile su ile seri sulandırımı yapıldı. Her bir sulandırım çift olarak çalışıldı ve 7 sulandırım yapıldı. Negatif kontrol olarak iki kuyucuğa distile su konuldu. 96 kuyucuklu plaklara toplanan süpernatanttan herbir kuyucuk için çift olacak şekilde 100'er µL dağıtıldı. Standartların, negatif kontrolün ve örneklerin üzerine eşit hacimde Griess ayıracı konuldu ve karışması için hafifçe çalkalandı. 30 dk oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi. 530 ve 630 nm'de mikroplak okuyucusunda absorbansları belirlendi. Süpernatanttlardaki nitrit miktarı 7 standart ile oluşturulan eğriden yararlanarak hesaplandı (Ellis ve diğerleri, 1998; Guevara ve diğerleri, 1998).

3.5.2. ELİSA ile sitokin yanıtı ölçümü

18 saatlik inkübasyonun ardından toplanan hücre süpernatantları sitokin çalışmaları gerçekleştirilene kadar -80^{o}C derin dondurucuda saklandı. İL-1β, İL-2, İL-4, İL-6, İL-10, İL-12, İL-33, TNFα, TGF-β ve IFNγ sitokin düzeyleri ticari ELİSA yöntemleri ile kit prosedürüne uygun olarak çalışıldı.

3.5.3. Akım sitometri

Makrofaj farklılaşması ve aktivasyonu uyarımın 24. saatinde akım sitometrisi ile yüzey F4/80, CD11b, MHC sınıf II, CD80, CD86, CD62L, CD107b, CD44, CD103, CD153 yüzey belirteçlerindeki değişimleri ile belirlendi.

Uyarılmış J774.1 ve 3T3 hücreleri hücre kazıyıcısı ile plaklardan nazikçe kazındı. Her bir kuyucuk içeriği, 15 mL'lik steril falkon tüplerine ayrı ayrı pastör pipet yardımı ile aktarıldı. Hücreler 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek çöktürüldü. Üst sıvı döküldü ve PBS ile hücreler sulandırıldı. Bir kez daha 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek yıkandı. Üst sıvı döküldü ve kaplama tamponu (staining buffer) ile sulandırıldı. Kaplama tamponu; 50 mL Dulbeccos PBS, %0,2 EDTA, %0,5 FBS karıştırılarak hazırlandı.

Tripan mavisi ile boyanarak hemasitometrede hücre miktarı sayıldı. Mililitrede $5x10^6$ hücre olacak şekilde kaplama tamponu ile sulandırıldı. Akım sitometri çalışması için 96'lık plaklara herbir antikorla boyama için 100 µl ($5x10^5$) hücre konuldu. Üzerlerine 1 µl blokan antikor eklendi. 10 dk oda ısısında bekletildi. 5 µL antikor ilave edildi ve hafifçe çalkalandı. 30 dk oda ısısında ve karanlıkta boyama için bekletildi, 10 dk'da bir hafifçe çalkalandı. Plak 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Üstteki besiyeri çok kanallı pipet yardımı ile hücreye dokunulmadan çekildi ve yeni kaplama tamponu eklendi. Hücreler tekrar 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek yıkandı. Üzerlerine 200 µL kaplama tamponu ilave edilerek akım sitometri tüplerine aktarıldı. Aktarımdan sonra 200'er µL daha kaplama tamponu ilave edilerek akım sitometri cihazında değerlendirmeleri yapıldı.

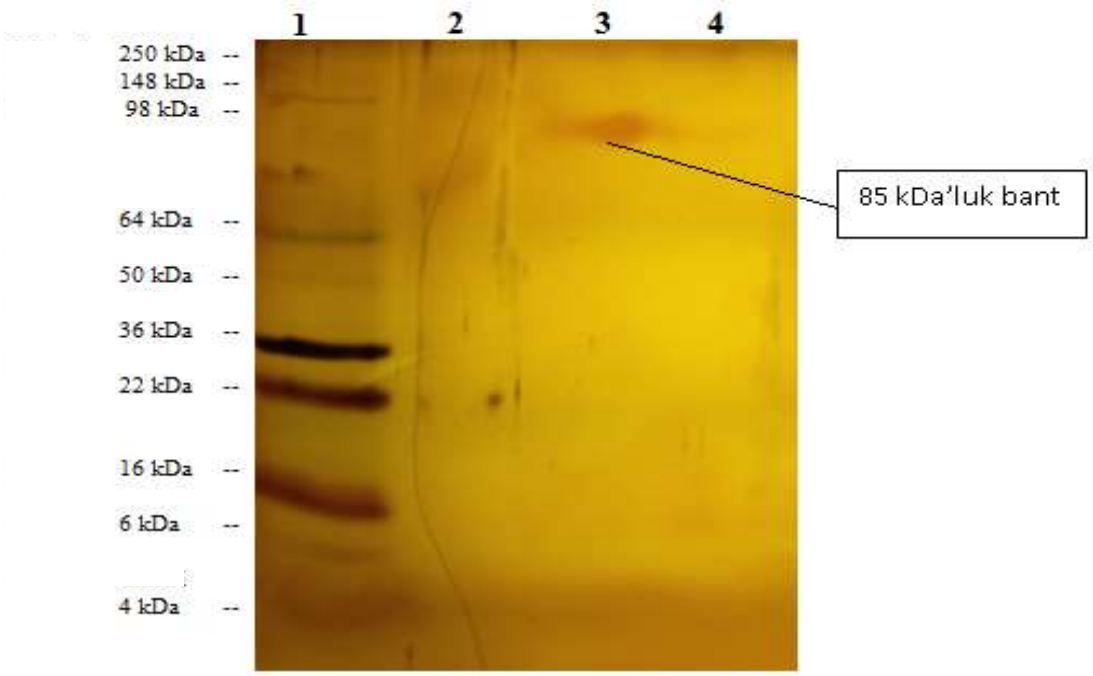
Akım sitometri değerlendirmesi; izotip kontrol ve tüm antikor ile boyanmış hücreler için yapıldı. Her bir parametre için en az 50 000 hücre saydırılarak değerlendirme yapıldı.

4. BULGULAR ve YORUM

4.1. *Mycobacterium tuberculosis* Man-LAM Antijeni

4.1.1. Man-LAM antijen izolasyonu

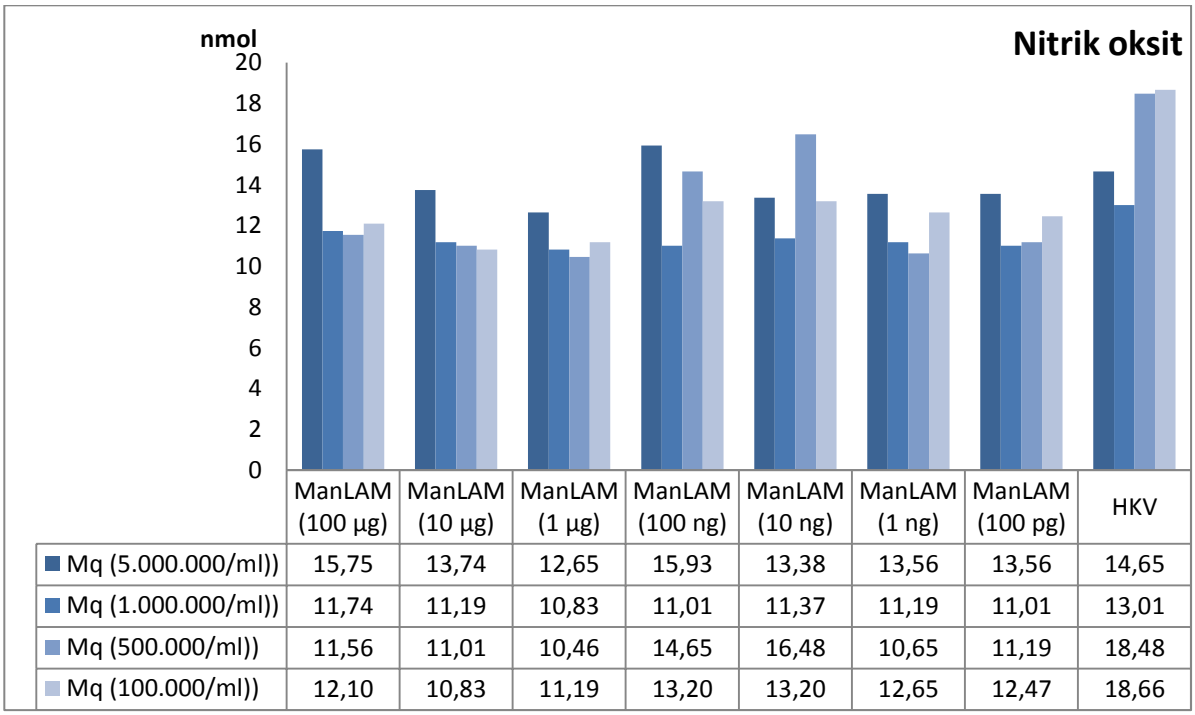
Man-LAM antijeni ticari olarak mevcut değildir. Bu nedenle, araştırmalarımızda test etmek için kullanılan Man-LAM antijeni, virülan özellik gösteren *M. tuberculosis* H37Rv suşundan izole edildi. LJ katı besiyerinde üretilen ve sonra MB 7H9 sıvı besiyerinde logaritmik faza getirilen *M. tuberculosis* H37Rv suşu, Man-LAM antijeni izolasyonu için yöntemler kısmında ayrıntısıyla açıklandığı gibi, kloroform / metanol / su yöntemi ile delipidizasyon, etanol / su ile lipoglikan eldesi, hücresel proteinlerin yıkımı ve triton-X ile faz ayrışması basamaklarından geçirildikten sonra izolasyon ve saflaştırma işlemi tamamlandı. İzole edilen Man-LAM antijeni, Western blot sonrası asit-gümüş boyama yöntemi kullanılarak görüntülendi. İzole edilen Man-LAM antijeni, 85 kDa'luk saf bant olarak görüntülendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. SDS-PAGE'de 85 kDa'luk Man-LAM bandı. (1) %15Lik SDS-PAGE'de belirteç, (2) negatif kontrol, (3) izole edilen ürün sample buffer ile kaynatıldıktan sonra ve (4) izole edilen ürün sample buffer ile kaynatılmadan yüklenmiş ve 200 voltta 60 dk yürütülmüştür

4.1.2. Man-LAM antijeninin optimal uyarım dozunun belirlenmesi

Man-LAM antijeninin uygun, optimal uyarım dozunun ve bu dozun uygulanabileceği optimal makrofaj hücre miktarının belirlenmesi için, farklı sayılardaki makrofajlar antijenlerin farklı dozları ile uyarılmak üzere, çapraz olarak çalışıldı. $5x10^6$ / ml, $1x10^6$ / ml, $5x10^5$ / ml ve $1x10^5$ / ml J774.1 hücresi, farklı dozlardaki (100 µg, 10 µg, 1 µg, 100 ng, 10 ng, 1 ng ve 100pg) Man-LAM ile 24 kuyucuklu plaklarda 37°C ve %5 CO_2'li inkübatörde 24 saat süre ile inkübe edildi. Yirmi dördüncü saat sonunda süpernatant toplandı. Uyarımın değerlendirilmesi Griess yöntemi ile NO miktarı saptanarak yapıldı. Şekilde görüldüğü gibi, $5x10^5$ / ml J774.1 makrofaj hücresi ve bu hücre miktarında 100 ng ve 10 ng Man-LAM uyarımının kontrollere yakın etki göstermesi ve literatürde diğer araştırmacılar tarafından kullanılan doz olması nedeniyle, 40 ng Man-LAM uygun doz olarak belirlendi (Şekil 4.2) (Torrelles ve diğerleri, 2006; Torrelles ve diğerleri, 2009).



	ManLAM (100 µg)	ManLAM (10 µg)	ManLAM (1 µg)	ManLAM (100 ng)	ManLAM (10 ng)	ManLAM (1 ng)	ManLAM (100 pg)	HKV
Mq (5.000.000/ml))	15,75	13,74	12,65	15,93	13,38	13,56	13,56	14,65
Mq (1.000.000/ml))	11,74	11,19	10,83	11,01	11,37	11,19	11,01	13,01
Mq (500.000/ml))	11,56	11,01	10,46	14,65	16,48	10,65	11,19	18,48
Mq (100.000/ml))	12,10	10,83	11,19	13,20	13,20	12,65	12,47	18,66

Şekil 4.2. Man-LAM optimal antijen uyarım dozunun belirlenmesi

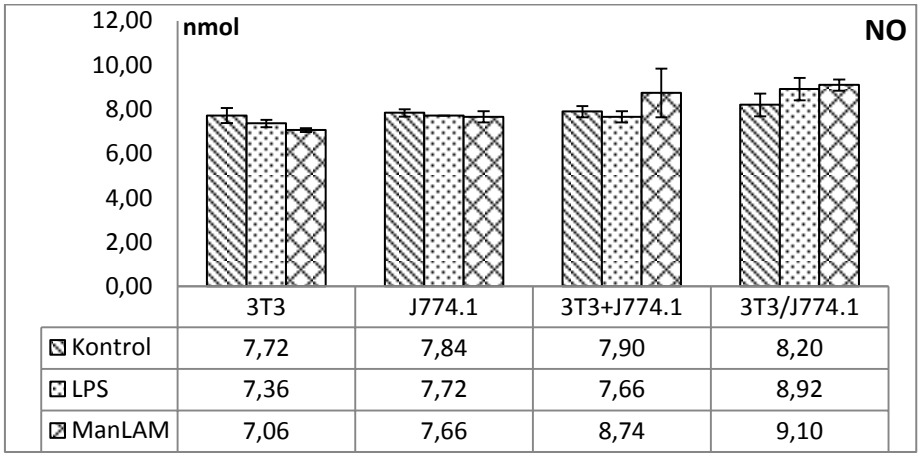
4.2. Fibroblast - makrofaj Kokültür Modelinde Man-LAM ve LPS ile Uyarım

%90 kaplamış olan fibroblast ve makrofaj hücreleri 6 kuyucuklu plaklarda üç farklı konfigürasyonda çalışıldı; (1) hücreler tek başlarına, (2) aynı kuyucukta fibroblast ve makrofaj hücreleri temas eder vaziyette ve (3) fibroblast ve makrofaj hücreleri aynı kuyucukta ancak 0,4 µm por çaplı naylon membran ile ayrılmış olarak uyarıldı. Hücreler her üç konfigürasyonda da dağıtıldıktan sonra 3 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından hücrelerin üzerine, 40 ng/mL ManLAM uyarım için, 10 ng/mL LPS antijen süspansiyonu pozitif kontrol olarak ve HKV negatif kontrol olarak ilave edildi. 18. saat sonunda toplanan süpernatanttan NO ve sitokin ELİSA ölçümleri, 24. saat sonunda antikor ile boyanan hücrelerden akım sitometri analizleri yapıldı.

4.2.1. Kokültür modelinde Man-LAM ile uyarımın proinflamatuvar yanıta etkisinin belirlenmesi

<u>NO yanıtı</u>

Man-LAM ve LPS ile farklı şekillerde uyarılan hücrelerde, fibroblast ve makrofaj hücrelerinin temas halinde bir arada olduğu durumda NO yanıtının 1,1 kat arttığı gözlendi (Şekil 4.3). Man-LAM ile uyarım, hücrelerin temas etmediği durumda ise NO yanıtında 1,2 kat artışa neden oldu.

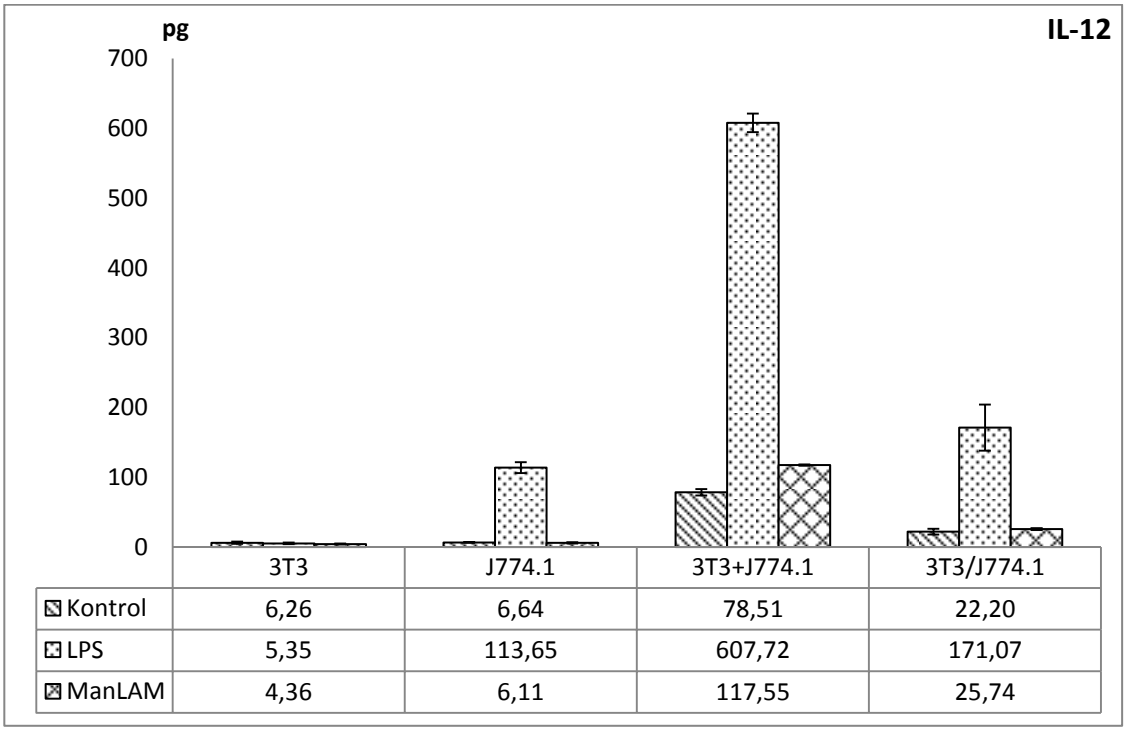


	3T3	J774.1	3T3+J774.1	3T3/J774.1
Kontrol	7,72	7,84	7,90	8,20
LPS	7,36	7,72	7,66	8,92
ManLAM	7,06	7,66	8,74	9,10

Şekil 4.3. Fibroblast - makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına hücrelerin NO yanıtı

İL-12 yanıtı

Fibroblast ve makrofajın tek başına bulundukları durumda Man-LAM ile uyarıma İL-12 üretimi ile yanıt vermediği, ancak hücreler arası temasın olduğu durumlarda İL-12 yanıtının arttığı görüldü. Fibroblast ve makrofaj temas halinde iken Man-LAM ile uyarılmış hücrelerden İL-12 üretiminin daha yüksek olduğu saptandı (Şekil 4.4). Man-LAM ile uyarılmış temaslı fibroblast - makrofaj kokültür modelinin İL-12 üretiminin, makrofajın tek başına uyarımından yaklaşık 20 kat daha fazla olduğu tespit edildi. Bu artış temassız kokültür modelinde 4,25 kat olarak belirlendi. LPS ile uyarılan temaslı kokültür modelinde İL-12 yanıtında yaklaşık 5,3 kat, temassız kokütür modelinde 1,5 kat artış tespit edildi. Hem Man-LAM hem de LPS ile uyarım sonucunda hücreler arasında temas varlığında İL-12 üretiminin çok daha yüksek olduğu gösterildi (Şekil 4.4).



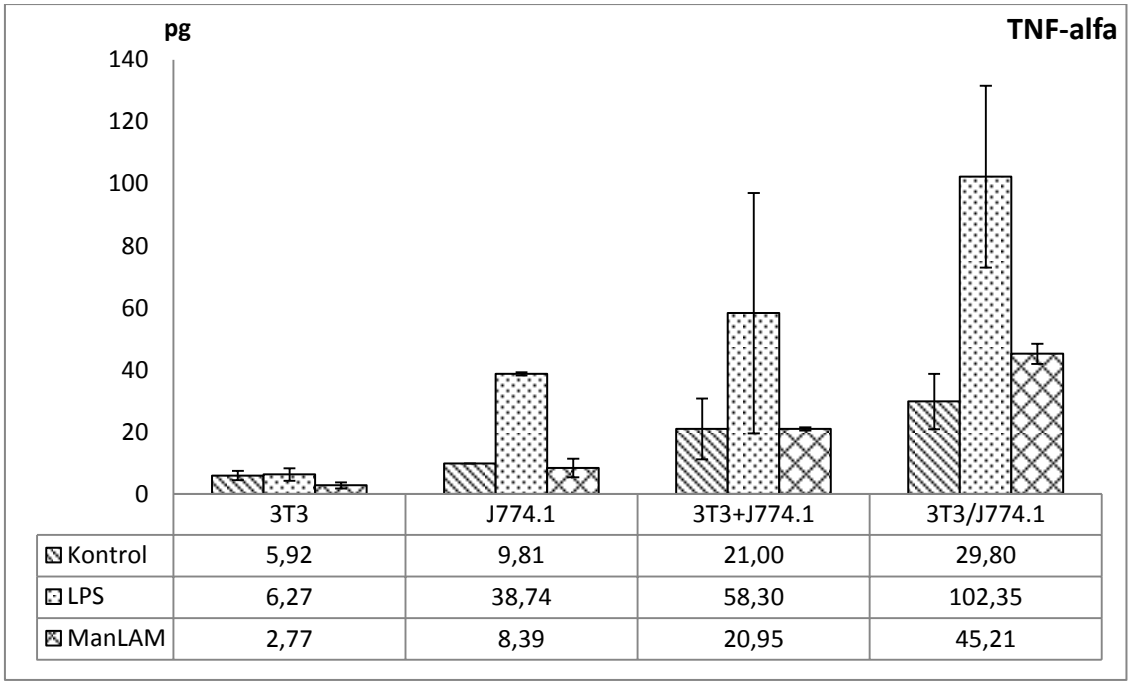
	3T3	J774.1	3T3+J774.1	3T3/J774.1
Kontrol	6,26	6,64	78,51	22,20
LPS	5,35	113,65	607,72	171,07
ManLAM	4,36	6,11	117,55	25,74

Şekil 4.4. Fibroblast - makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına hücrelerin İL-12 yanıtı

LPS her iki kokültür modelinde de İL-12 üretiminde belirgin artışa neden olurken Man-LAM'ın sadece hücreler arasında temasın olduğu durumda proinflamatuvar sitokin olan İL-12 üretiminin daha belirgin olduğu saptanmıştır. Man-LAM'ın İL-12 üretimine etkisinin hücre-hücre temasına bağlı olduğu gösterilmiştir.

TNF-α yanıtı

Man-LAM ile tek hücre halinde uyarılan fibroblast ve makrofajın uyarımsız kontrollere göre daha az miktarda TNF-α üretimine neden olduğu belirlendi. Ancak hücrelerin bir arada olduğu kokültür modellerinde Man-LAM uyarımını takiben TNF-α yanıtının belirgin olarak arttığı gözlendi (Şekil 4.5). Temaslı kokültür modelinde 2,5 kat, temassız kokültür modelinde 5,3 kat TNF-α üretiminde artış tespit edildi. LPS ile uyarımı takiben ise makrofajın hem tek başına hem de kokültür modellerinde belirgin olarak TNF-α salınımına neden olduğu belirlendi. LPS uyarımı TNF-α üretiminde makrofajda 4 kat, temaslı kokültür modelinde 1,5 kat ve temassız kokültür modelinde 2,7 kat artışa neden oldu (Şekil 4.5).



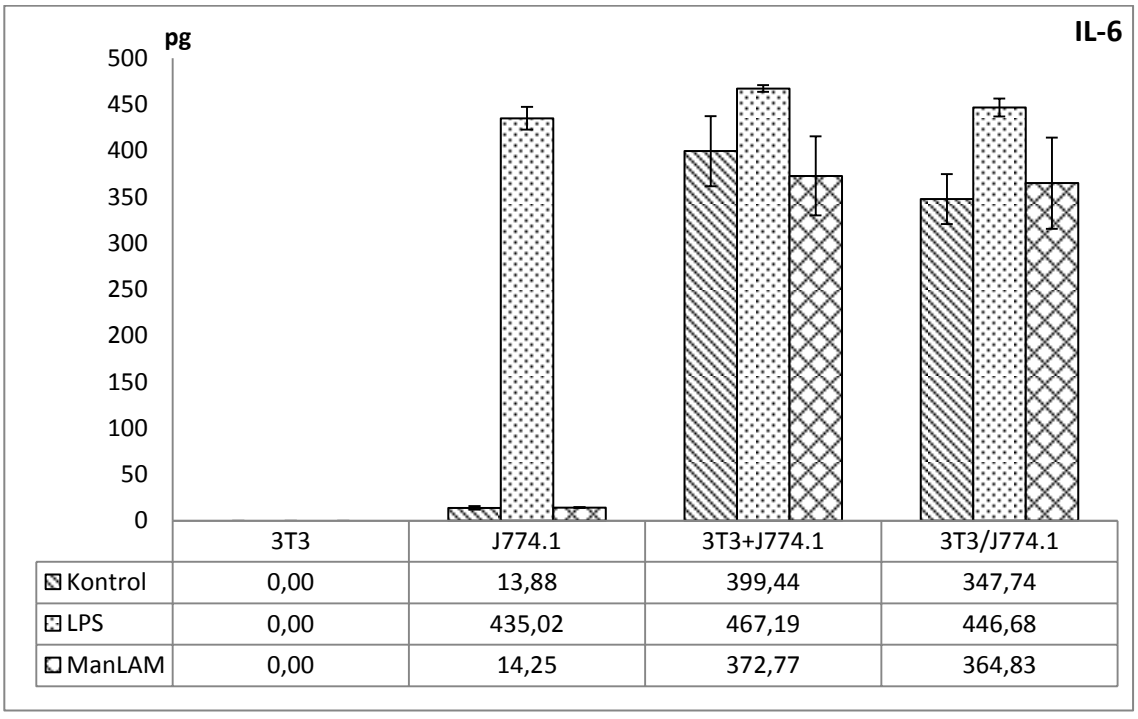
	3T3	J774.1	3T3+J774.1	3T3/J774.1
Kontrol	5,92	9,81	21,00	29,80
LPS	6,27	38,74	58,30	102,35
ManLAM	2,77	8,39	20,95	45,21

Şekil 4.5. Fibroblast - makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına hücrelerin TNF-α yanıtı

LPS her iki kokültür modelinde de TNF-α üretiminde belirgin artışa neden olurken Man-LAM'ın sadece hücreler arasında temasın olmadığı, temassız kokültür modelinde proinflamatuvar sitokin olan TNF-α üretiminde belirgin bir artışa neden olduğu saptanmıştır. Man-LAM ile uyarımın TNF-α'ya etkisinin hücre-hücre temasına bağlı olmadığı gösterilmiştir.

İL-6 yanıtı

Fibroblast ve makrofajın Man-LAM ile uyarımı tekli hücre kültürlerinde İL-6 salınımına neden olmazken kokültür modellerin her ikisinde de İL-6 üretiminde belirgin artış tespit edildi (Şekil 4.6). Man-LAM ile uyarım, temaslı kokültür modelinde 26 kat, temassız kokültür modelinde 25 kat artışa neden oldu. LPS ile uyarımı takiben makrofajın hem tek başına hem de kokültür modellerinde kontrol gruplarına göre İL-6 salınımında artışa neden olduğu tespit edildi. Bu artış makrofajın tek başına olduğu durumda 31 kat artış olduğu, tek başına makrofaja göre temaslı ve temassız kokültür modelinde artış olmadığı saptandı. Ayrıca, kokültür modellerinde uyarımsız olarak da İL-6 yanıtında artış meydana geldiği belirlendi (Şekil 4.6).



	3T3	J774.1	3T3+J774.1	3T3/J774.1
Kontrol	0,00	13,88	399,44	347,74
LPS	0,00	435,02	467,19	446,68
ManLAM	0,00	14,25	372,77	364,83

Şekil 4.6. Fibroblast - makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına hücrelerin İL-6 yanıtı

Fibroblast ve makrofajın bir arada olduğu her iki kokültür modelinde uyarım olmadan da İL-6 üretiminde belirgin artış meydana gelmiştir. Man-LAM ile uyarım kontrollere göre İL-6 üretiminde farklılığa neden olmazken LPS ile uyarım kokültür modellerinde artış ile sonuçlanmıştır.

Yorum

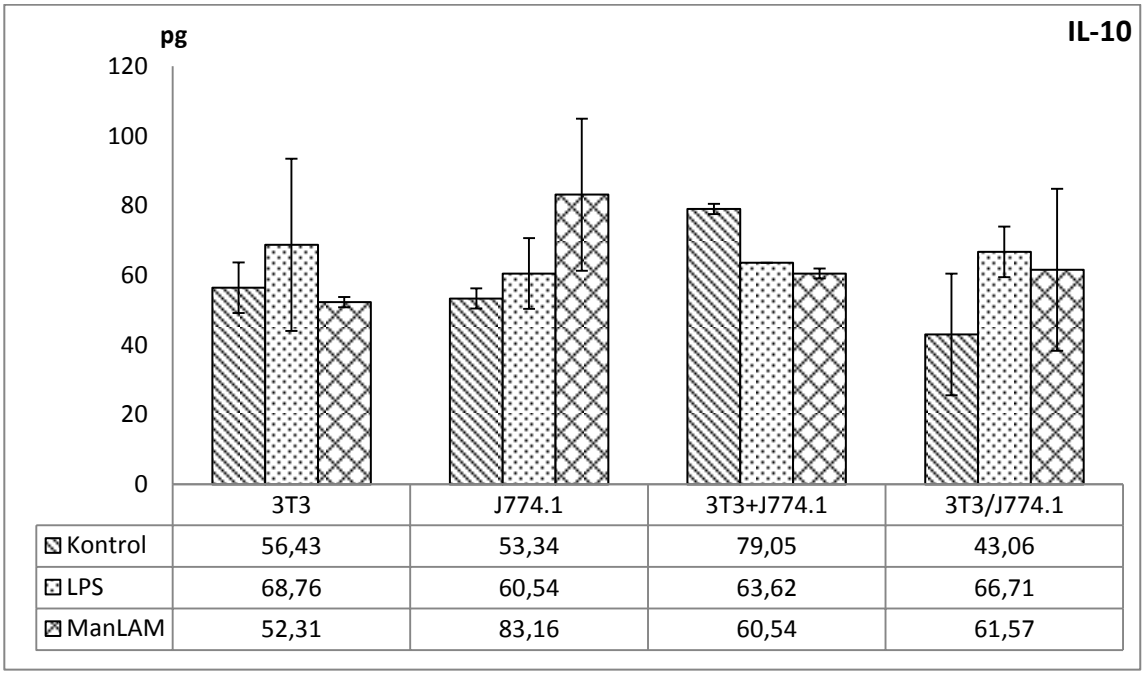
Çalışmamızda Man-LAM ile uyarılan makrofajların, fibroblast varlığında proinflamatuvar yanıtlarındaki değişim, kokültür modelinde LPS ile kıyaslanarak çalışılmıştır. Bu çalışma sonucunda makrofajların proinflamatuvar yanıtlarının (NO, İL-12, TNF-α ve İL-6) fibroblast varlığında arttığı tespit edilmiştir. Man-LAM ile uyarım, fibroblast – makrofaj kokültür modellerinde LPS ile uyarılan makrofaj hücrelerinin oluşturduğu yanıta benzer şekilde proinflamatuvar yanıtta artışa neden olmuştur. Man-LAM ile uyarım, fibroblast ve makrofaj hücrelerinin teması halinde İL-12 üretiminde artışa neden olurken hücre temasına bağlı olmadan NO ve TNF-α üretiminde artışa neden olmuştur.

Sonuç olarak kokültür modelinde Man-LAM ile uyarım, hem hücre - hücre teması etkisi ile hem de hücreler tarafından oluşturulan çözünür faktörlerin etkisi ile proinflamatuvar yanıtta artmaya, immün yanıtın güçlenmesine neden olmuştur.

4.2.2. Kokültür modelinde Man-LAM ile uyarımın anti-inflamatuvar yanıta etkisinin belirlenmesi

İL-10 yanıtı

Fibroblast, makrofaj ve kokültür modellerin her ikisinde de yapısal olarak İL-10 salındığı, yapısal salınımın hücre temasının olduğu kokültür modelinde daha yüksek olduğu saptandı (1,5 kat artış). Man-LAM ile uyarım makrofaj hücrelerinde ve hücre-hücre temassız kokültür modelinde İL-10 salınımında artışa neden olurken hücre temasının olduğu kokültür modelinde kontrole göre 1,3 kat azalma ile sonuçlandı. LPS ile uyarım temassız kokültür modelinde İL-10 üretiminde artışa neden olurken temaslı kokültür modelinde kontrole göre 1,25 kat azalmaya sebep oldu (Şekil 4.7).



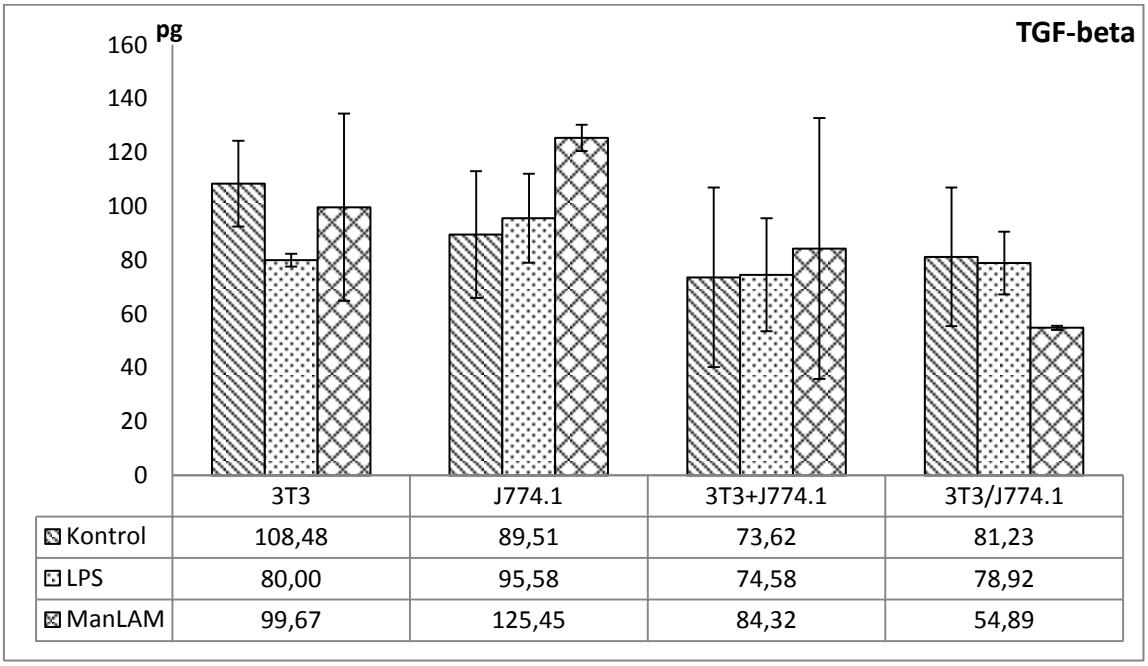
	3T3	J774.1	3T3+J774.1	3T3/J774.1
Kontrol	56,43	53,34	79,05	43,06
LPS	68,76	60,54	63,62	66,71
ManLAM	52,31	83,16	60,54	61,57

Şekil 4.7. Fibroblast - makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına hücrelerin İL-10 yanıtı

Fibroblast ve makrofajdan yapısal olarak salınan anti-inflamatuvar sitokin olan İL-10, hücre-hücre teması durumunda hem Man-LAM hem de LPS ile uyarım sonucunda azalmaya neden olmuştur. Bu etkinin hücre-hücre temasına bağlı olduğu gösterilmiştir.

TGF-β yanıtı

Fibroblast, makrofaj ve kokültür modellerin yapısal olarak TGF-β ürettiği saptandı ve yapısal salınımın kokültür modellerinde azalmaya neden olduğu tespit edildi. Man-LAM ile uyarım makrofaj hücrelerinde ve hücre - hücre temasının olduğu kokültür modelinde TGF-β salınımında artışa neden olurken kokültür modellerinde tek makrofaj hücresine göre azalma ile sonuçlandı. Man-LAM ile uyarım sonucu temaslı kokültür modelinde yaklaşık 1,5 kat, temassız kokültür modelinde 2,3 kat azalmış TGF-β salınmına yol açtı. LPS ile uyarım fibroblastın TGF-β üretiminde azalmaya neden olurken diğer hücre konfigürasyonarında uyarımsız kontrole göre TGF-β üretiminde değişiklik saptanmadı. Ancak makrofajın tek başına TGF-β üretimine göre kokültür modellerinde üretimin azaldığı görüldü (Şekil 4.8).



	3T3	J774.1	3T3+J774.1	3T3/J774.1
Kontrol	108,48	89,51	73,62	81,23
LPS	80,00	95,58	74,58	78,92
ManLAM	99,67	125,45	84,32	54,89

Şekil 4.8. Fibroblast - makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına hücrelerin TGF-β yanıtı

Man-LAM ile uyarılan makrofajın TGF-β üretimi LPS ile uyarılandan daha yüksek bulunmuştur. Ancak kokültür modellerinde anti-inflamatuvar bir sitokin olan TGF-β artışının Man-LAM ile uyarımı takiben belirgin olarak azaldığı tespit edilmiştir.

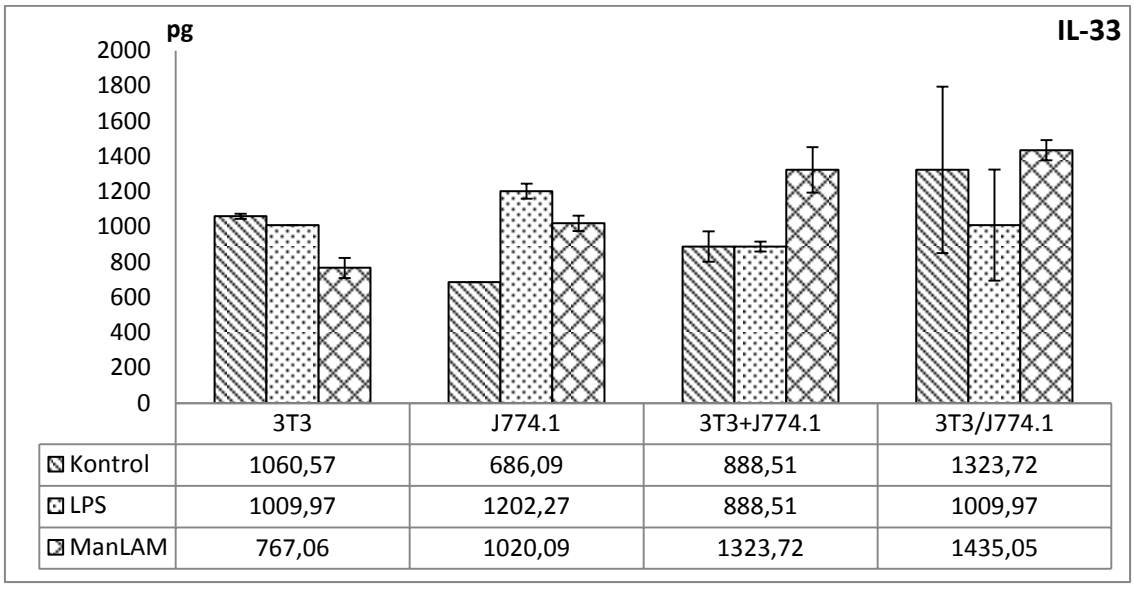
Yorum

Çalışmamızda Man-LAM ile uyarılan makrofajların, fibroblast varlığında anti-inflamatuvar yanıtlarındaki değişim, kokültür modelinde LPS ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir. Çalışmalar sonucunda makrofajların yapısal olarak oluşturduğu anti-inflamatuvar yanıtlarının (İL-10 ve TGF-β) fibroblast varlığında azaldığı saptanmıştır. Man-LAM ile uyarım, fibroblast – makrofaj kokültür modellerinde anti-inflamatuvar yanıtta azalmaya neden olmuştur. Man-LAM ile uyarım, fibroblast ve makrofaj hücrelerinin teması halinde İL-10 üretiminde azalmaya neden olurken hücre temasına bağlı olmadan TGF-β üretiminde azalmaya neden olmuştur.

Sonuç olarak kokültür modelinde Man-LAM ile uyarım, hem hücre hücre teması etkisi ile hem de hücreler tarafından oluşturulan çözünür faktörlerin etkisi ile anti-inflamatuvar yanıtta azalmaya, immün regülasyonun azalmasına neden olmuştur.

4.2.3. Kokültür modelinde Man-LAM ile uyarımın İL-33 yanıtına etkisinin belirlenmesi

Man-LAM ve LPS ile farklı konfigürasyonlarda uyarılan hücrelerin İL-33 üretimi birbirinden farklılıklar göstermiştir. Fibroblastların uyarım olmayan kontrol kuyucuğunda bile önemli derecede İL-33 ürettiği, makrofajların Man-LAM ile uyarım durumunda İL-33 üretiminin arttığı tespit edildi. Hücrelerin bir arada birbiriyle temas halinde olduğu durumda Man-LAM ile uyarımın İL-33 üretiminde 1,3 kat artışa neden olduğu, hücrelerin temas halinde bulunmadığı 1,4 kat artışa neden olduğu saptandı. Ayrıca, Man-LAM ile uyarımın LPS ile uyarımdan daha yüksek bir İL-33 oluşumuna neden olduğu tespit edildi (Şekil 4.9).



	3T3	J774.1	3T3+J774.1	3T3/J774.1
Kontrol	1060,57	686,09	888,51	1323,72
LPS	1009,97	1202,27	888,51	1009,97
ManLAM	767,06	1020,09	1323,72	1435,05

Şekil 4.9. Fibroblast - makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına hücrelerin İL-33 yanıtı

Man-LAM ile uyarılan makrofajın İL-33 üretimi fibroblast varlığında ve fibroblast ile temas durumunda belirgin olarak artmıştır.

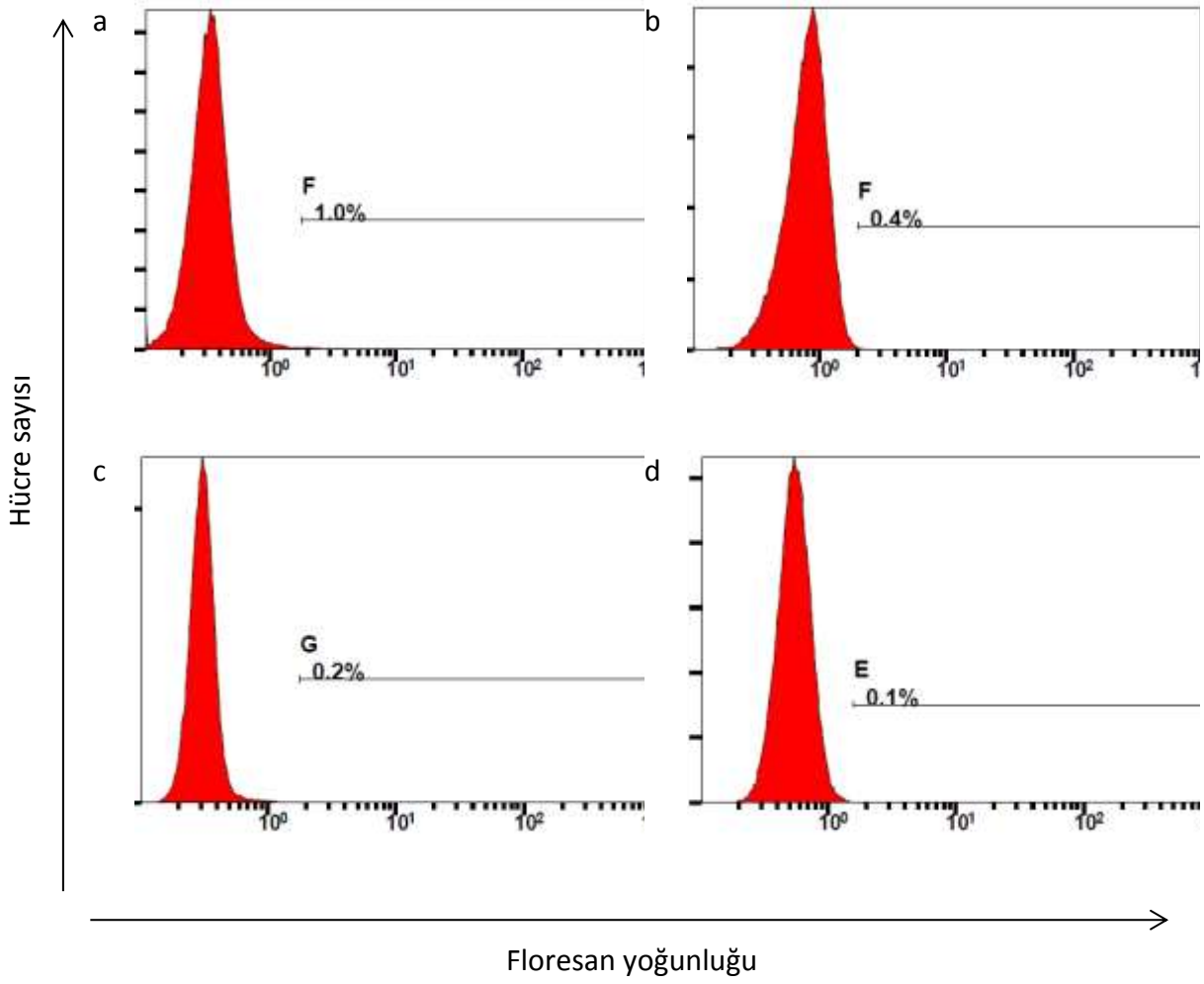
4.2.4. Kokültür modelinde diğer sitokinlerin varlığı

Man-LAM ve LPS ile farklı şekillerde uyarılan hücrelerde, İL-1β, İL-2, İL-4, IFNγ yanıtı uyarımın 18. saatinde toplanan süpernatanttan çalışılmıştır. Fibroblast ve makrofajların hiçbir deney konfigürasyonunda bu sitokinleri ürettiği tespit edilmemiştir.

4.2.5. Akım sitometride J774.1 makrofaj hücrelerin karakterizasyonu

Akım sitometri analizi için uyarılmış hücreler mL'de $5x10^6$ hücre olacak şekilde kaplama tamponu ile sulandırıldı. 96'lık plaklara herbir antikorla boyama için 100 µl ($5x10^5$) hücre, 1 µl blokan antikor, 5 µl özgül antikor ile boyama yapıldı. Her bir parametre için 400 µl hücre akım sitometri cihazına yüklendi ve en az 50 000 hücre saydırılarak değerlendirme yapıldı.

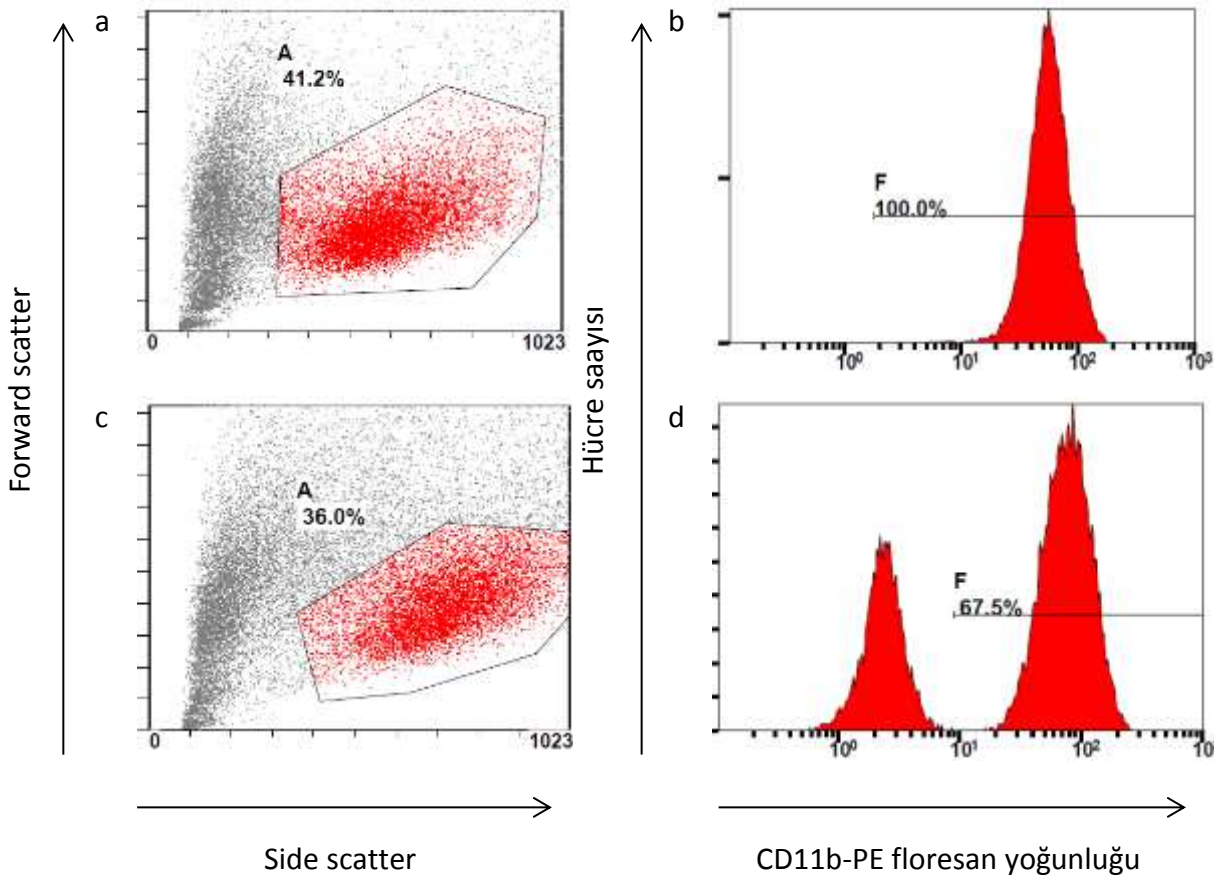
Hücre yüzey reseptör ekspresyonları değerlendirilmeden önce izotip kontrollerde ışıma olup olmadığı değerlendirildi. Işıma olmadığı saptandıktan sonra antikor boyamalarının analizi yapıldı (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Akım sitometri analizinde izotip kontroller. (a) J774.1 hücrelerinde PE izotip kontrolü, (b) J774.1 ve fibroblast temaslı kokültür modelinde PE izotip kontrolü, (c) J774.1 hücrelerinde FITC izotip kontrolü, (d) J774.1 ve fibroblast temaslı kokültür modelinde FITC izotip kontrolü

J774.1 hücrelerinin CD11b ekspresyonu

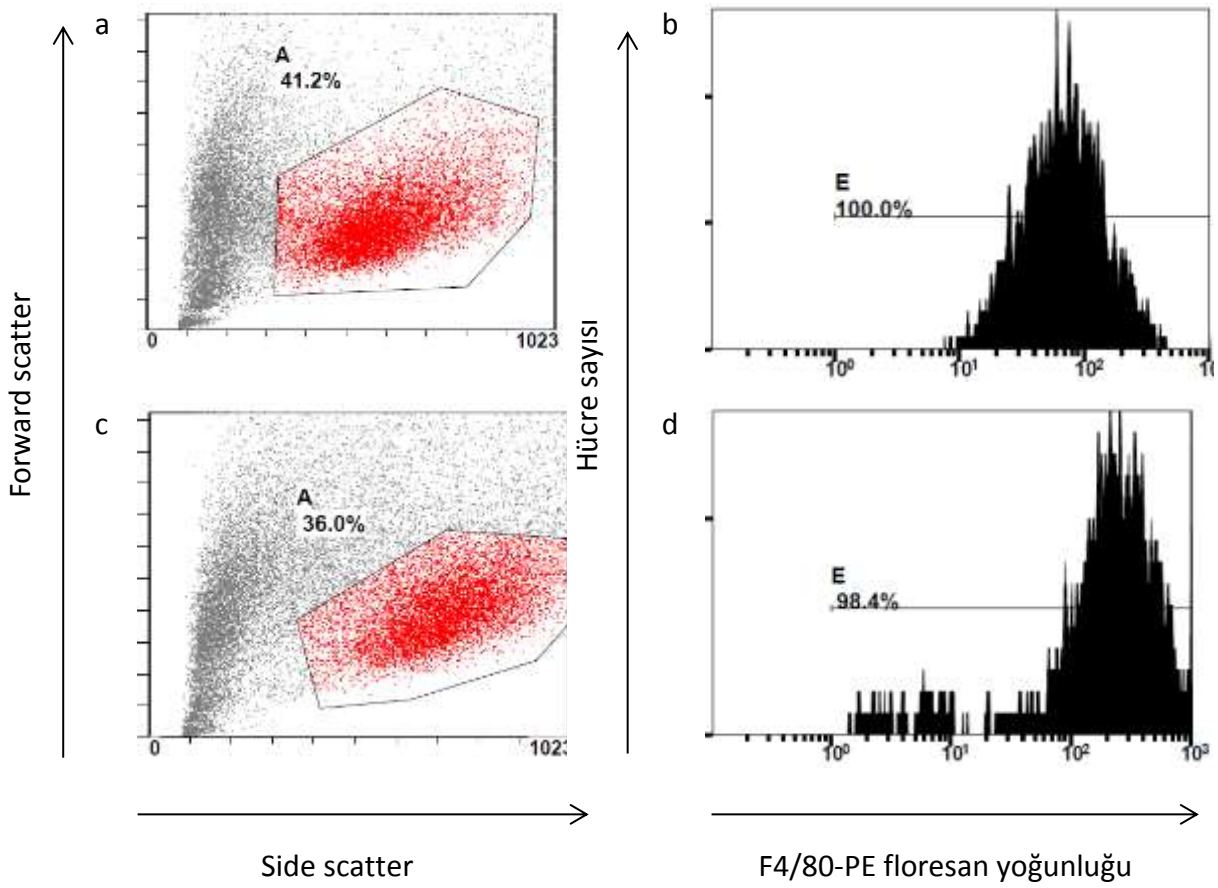
J774.1 makrofaj hücreleri üzerinde yer alan ve miyeloid seri hücrelerin belirteci olan CD11b, anti-CD11b-PE ile boyandı ve akım sitometride makrofajları tanımlamak için kullanıldı. J774.1 hücrelerinin tümüyle CD11b eksprese ettiği tespit edildi (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Anti-CD11b-PE ile boyanmış J774.1 makrofajlar. (a) makrofajların akım sitometri dağılımı, (b) makrofajların histogram görüntüsü, (c) fibroblast - makrofaj kokültür modelinde makrofajların akım sitometri dağılımı, (d) fibroblast - makrofaj kokültür modelinde makrofajların histogram görüntüsü

J774.1 hücrelerinin F4/80 ekspresyonu

J774.1 makrofaj hücreleri üzerinde yer alan ve fare makrofaj hücre belirteci olan F4/80, anti-F4/80-PE ile boyandı ve akım sitometride makrofajları tanımlamak için kullanıldı. J774.1 hücrelerinin tümüyle F4/80 eksprese ettiği tespit edildi (Şekil 4.12).

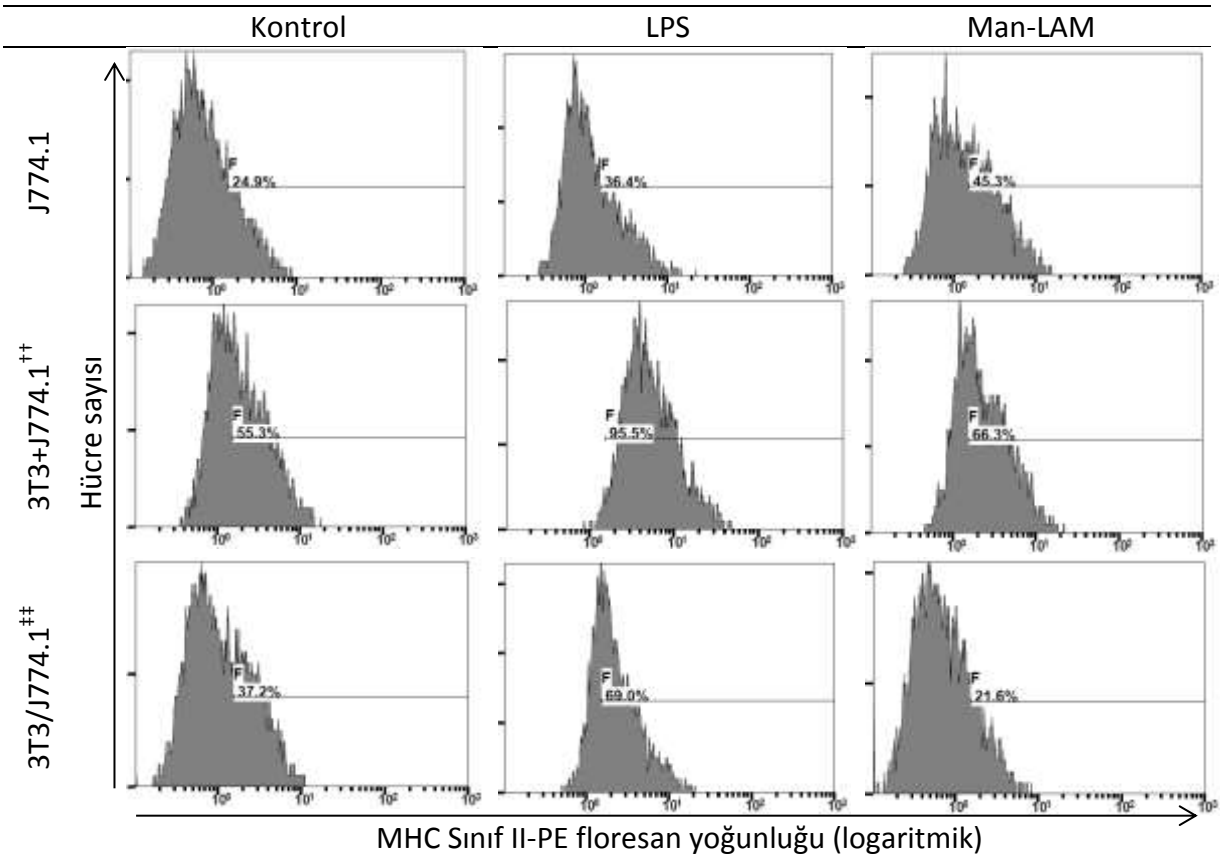


Şekil 4.12. Anti-F4/80-PE ile boyanmış J774.1 makrofajlar. (a) makrofajların akım sitometri dağılımı, (b) makrofajların histogram görüntüsü, (c) fibroblast - makrofaj kokültür modelinde makrofajların akım sitometri dağılımı, (d) fibroblast - makrofaj kokültür modelinde makrofajların histogram görüntüsü

4.2.6. Kokültür modelinde Man-LAM ile uyarımın, makrofaj M1 fenotipine farklılaşmasına etkisinin belirlenmesi

J774.1 hücrelerin MHC Sınıf II molekül ekspresyonu

Makrofajın yapısal olarak ve Man-LAM ile uyarım durumunda MHC sınıf II molekülü eksprese ettiği, bu ekspresyonun Man-LAM ile uyarım durumunda ve temaslı kokültür modelinde arttığı tespit edildi. Man-LAM ile uyarım temassız kokültür modelinde MHC sınıf II molekül ekspresyonunda azalma ile sonuçlandı. LPS ile uyarılan makrofaj ve temaslı ve temassız kokültür modellerinde MHC sınıf II ekspresyonunun belirgin olarak arttığı, bu artışın temas varlığında çok daha yüksek olduğu tespit edildi (Şekil 4.13).

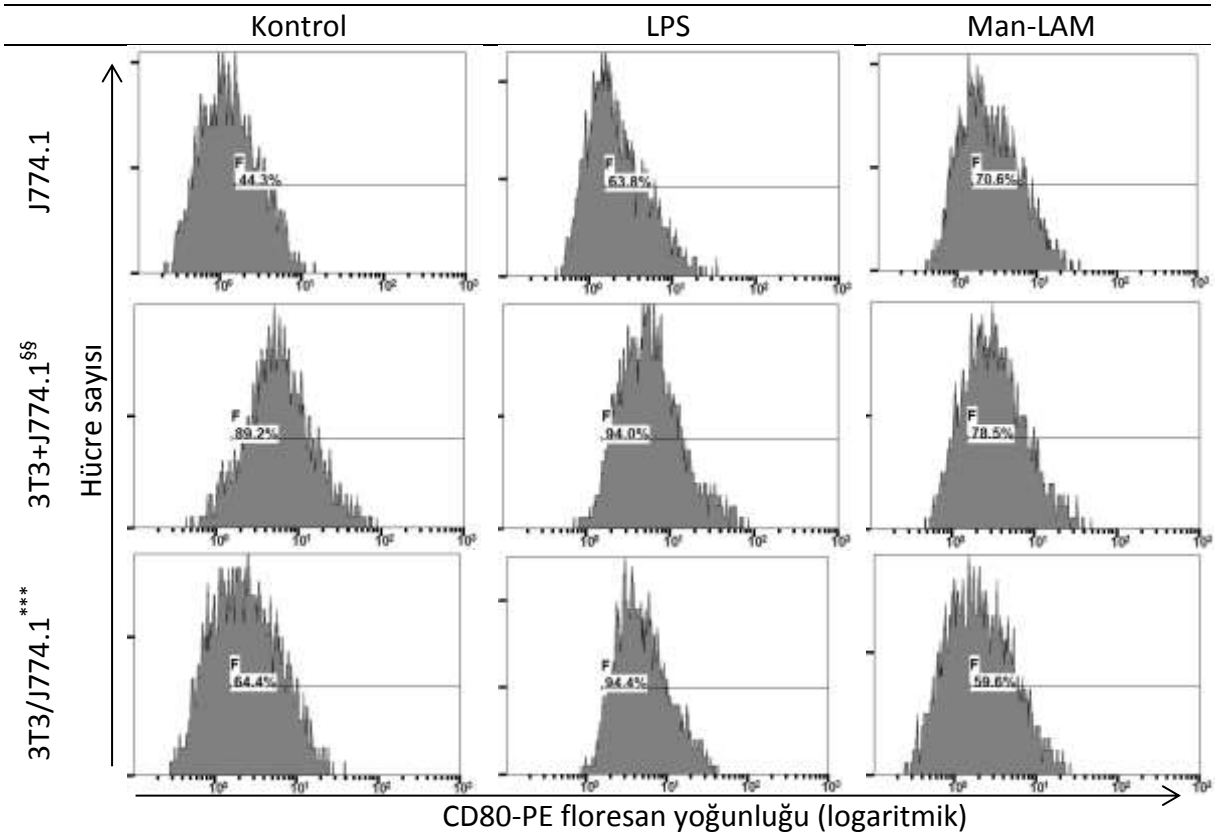


Şekil 4.13. Fibroblast - makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına hücrelerin MHC sınıf II ekspresyonu. Anti-MHC sınıf II-PE ile boyanmış makrofaj, fibroblast, temaslı ve temassız olarak makrofaj ve fibroblast bir arada olan hücrelerin kontrol, LPS ve Man-LAM ile uyarılmış olarak pozitif sinyal verme yüzdeleri

†† 3T3+J774.1; fibroblast hücresi ve makrofaj hücre-hücre temaslı kokültür modeli
‡‡ 3T3/J774.1; fibroblast hücresi ve makrofaj hücre-hücre temassız (transwell'li) kokültür modeli

J774.1 hücrelerin CD80 molekül ekspresyonu

T hücre uyarımında kostimülatör olan CD80 ekspresyonu, makrofajlarda yapısal olarak, LPS ve Man-LAM ile uyarım durumunda tespit edildi. Bu ekspresyonun Man-LAM ile uyarım durumunda makrofajlarda arttığı tespit edildi, ancak Man-LAM'ı ile uyarım kokültür modellerinde CD80 ekspresyonunda kontrole göre bir azalmaya neden olduğu saptandı. LPS ile uyarım durumunda ise temaslı ve temassız kokültür modellerin CD80 ekspresyonunda artış saptandı, LPS ile uyarım hücreler arasında temas yokluğunda daha yüksek olarak tespit edildi (Şekil 4.14).



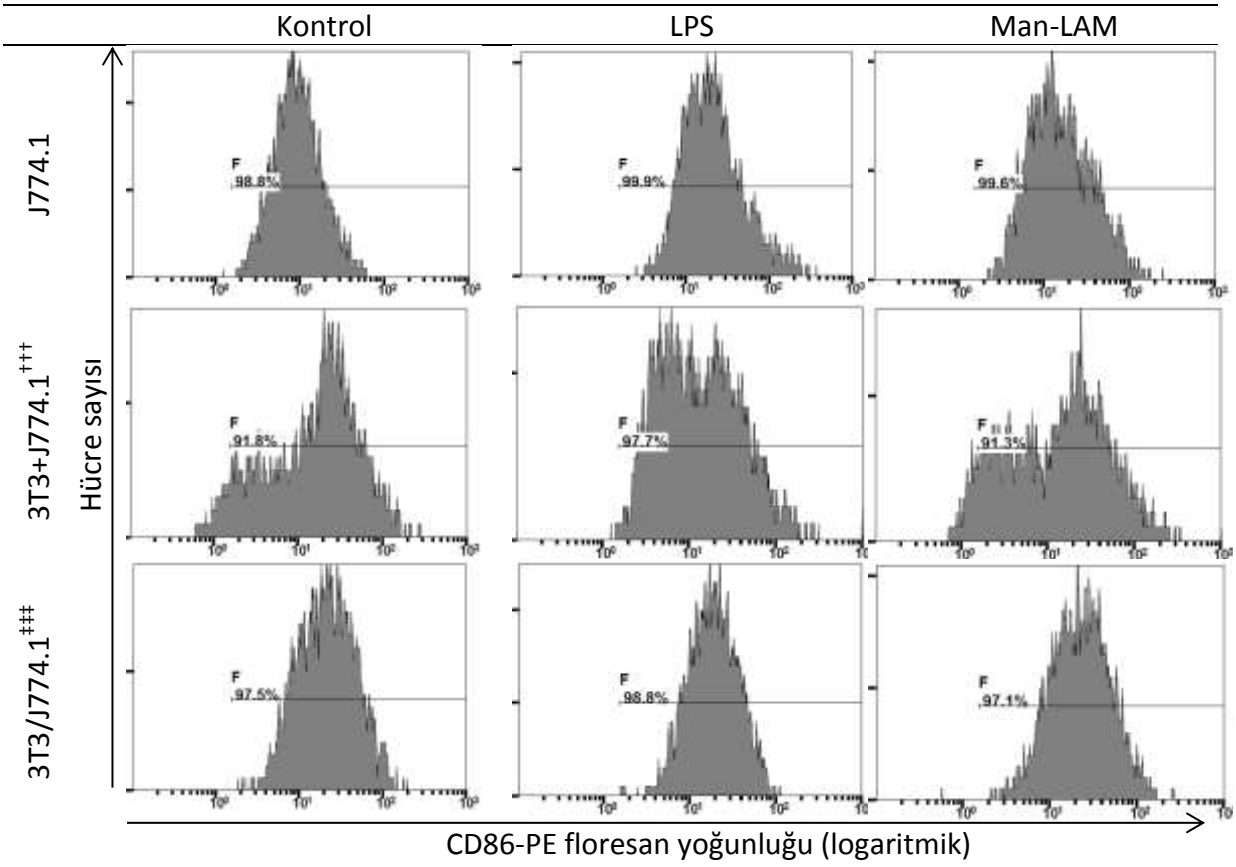
Şekil 4.14. Fibroblast - makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına hücrelerin CD80 ekspresyonu. Anti-CD80-PE ile boyanmış makrofaj, temaslı ve temassız olarak makrofaj ve fibroblast bir arada olan hücrelerin kontrol, LPS ve Man-LAM ile uyarılmış olarak pozitif sinyal verme yüzdeleri

§§ 3T3+J774.1; fibroblast hücresi ve makrofaj hücre-hücre temaslı kokültür modeli

*** 3T3/J774.1; fibroblast hücresi ve makrofaj hücre-hücre temassız (transwell'li) kokültür modeli

J774.1 hücrelerin CD86 molekül ekspresyonu

T hücre uyarımındaki diğer bir kostimülatör olan CD86 ekspresyonu kontrol gruplarında ve uyarım deneylerinde %100'e yakın olarak tespit edildir (Şekil 4.15). Deney gruplarının CD86 ekspresyonlarındaki değişim GX-mean değerleri üzerinden değerlendirildi (Çizelge 4.1). Man-LAM ile uyarım durumunda makrofajlarda ve kokültür modellerinde CD86 ekspresyonunda artışa neden olduğu saptandı. LPS ile uyarım durumunda da benzer şekilde makrofajın CD86 ekspresyonunda artış saptanırken kokültür modellerinde değişikliğe neden olmadı.



Şekil 4.15. Fibroblast - makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına hücrelerin CD86 ekspresyonu. Anti-CD86-PE ile boyanmış makrofaj, temaslı ve temassız olarak makrofaj ve fibroblast bir arada olan hücrelerin kontrol, LPS ve Man-LAM ile uyarılmış olarak pozitif sinyal verme yüzdeleri

††† 3T3+J774.1; fibroblast hücresi ve makrofaj hücre-hücre temaslı kokültür modeli
‡‡‡ 3T3/J774.1; fibroblast hücresi ve makrofaj hücre-hücre temassız (transwell'li) kokültür modeli

Çizelge 4.1. Anti-CD86-PE ile boyanmış hücrelerin GX-mean değerleri

	Kontrol	LPS	Man-LAM
J774.1	13.4	44.5	29.5
3T3+J774.1	38.8	37.4	44.5
3T3/J774.1	33.2	25.2	38

Yorum

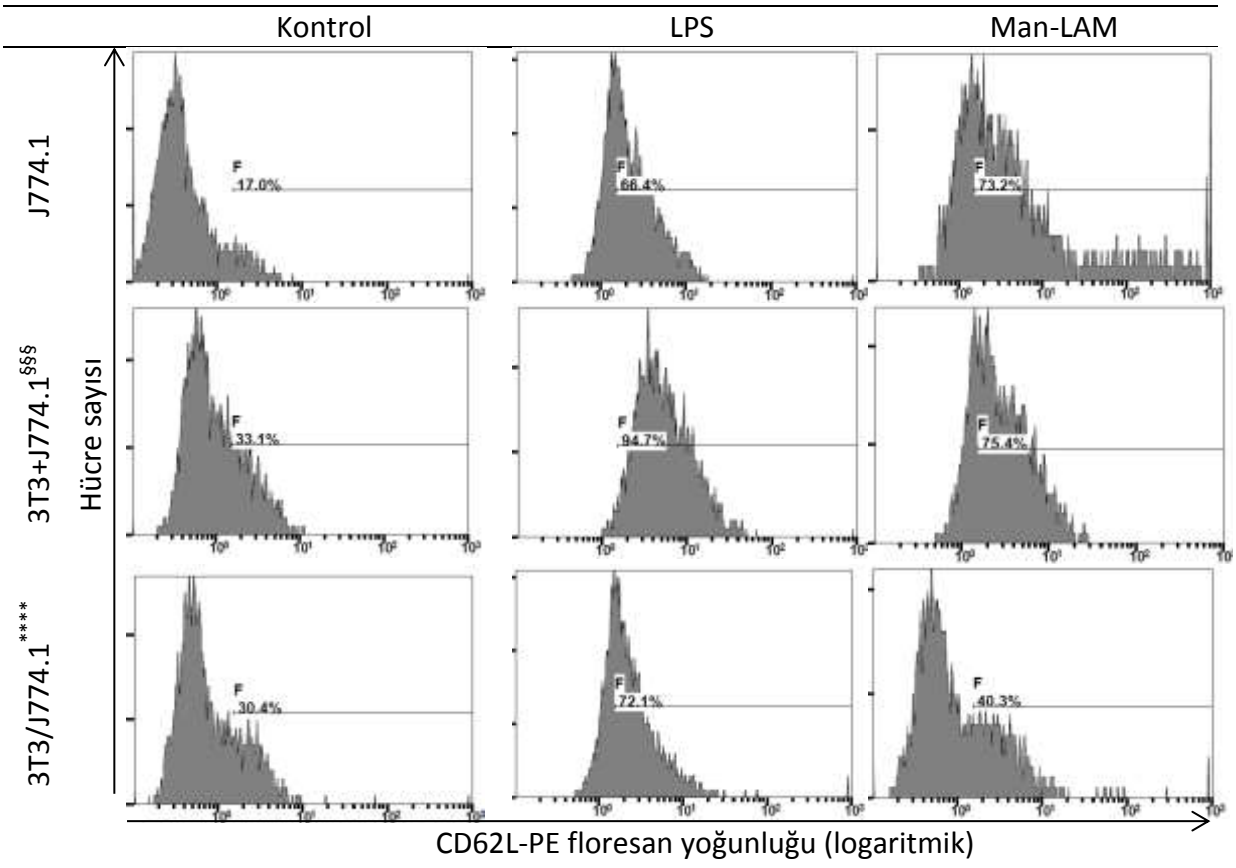
Çalışmamızda Man-LAM ile uyarılan makrofajların, fibroblast varlığında fenotipinde meydana gelen değişim, kokültür modelinde LPS ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir. Çalışmalar sonucunda Man-LAM ile uyarılan makrofajların hem tek başlarına hem de fibroblast ile temas durumunda MHC sınıf II molekülü ve CD86 ekspresyonu yaptığı tespit edilmiştir. Ancak CD80 molekül ekspresyonunun fibroblast varlığında azaldığı saptanmıştır.

Sonuç olarak kokültür modelinde Man-LAM ile uyarım, makrofajlarda M1 fenotipine neden olurken, fibroblast varlığında bu fenotipte belirgin bir değişiklik saptanmamıştır.

4.2.7. Kokültür modelinde Man-LAM ile uyarımın makrofaj aktivasyonuna etkisinin belirlenmesi

J774.1 hücrelerin CD62L molekül ekspresyonu

Makrofaj aktivasyonunun belirteçlerinden biri olan CD62L ekspresyonunun makrofajlarda LPS ve Man-LAM ile uyarım durumunda arttığı tespit edildi. Man-LAM ile uyarımın temaslı kokültür modelinde, LPS ile uyarımın her iki kokültür modelinde de CD62L ekspresyonunda artışa neden olduğu saptandı. Man-LAM temassız modelde de ekspresyon artışına neden oldu, ancak LPS ile uyarım temaslı kokültür modelinde daha yüksek olarak tespit edildi (Şekil 4.16).



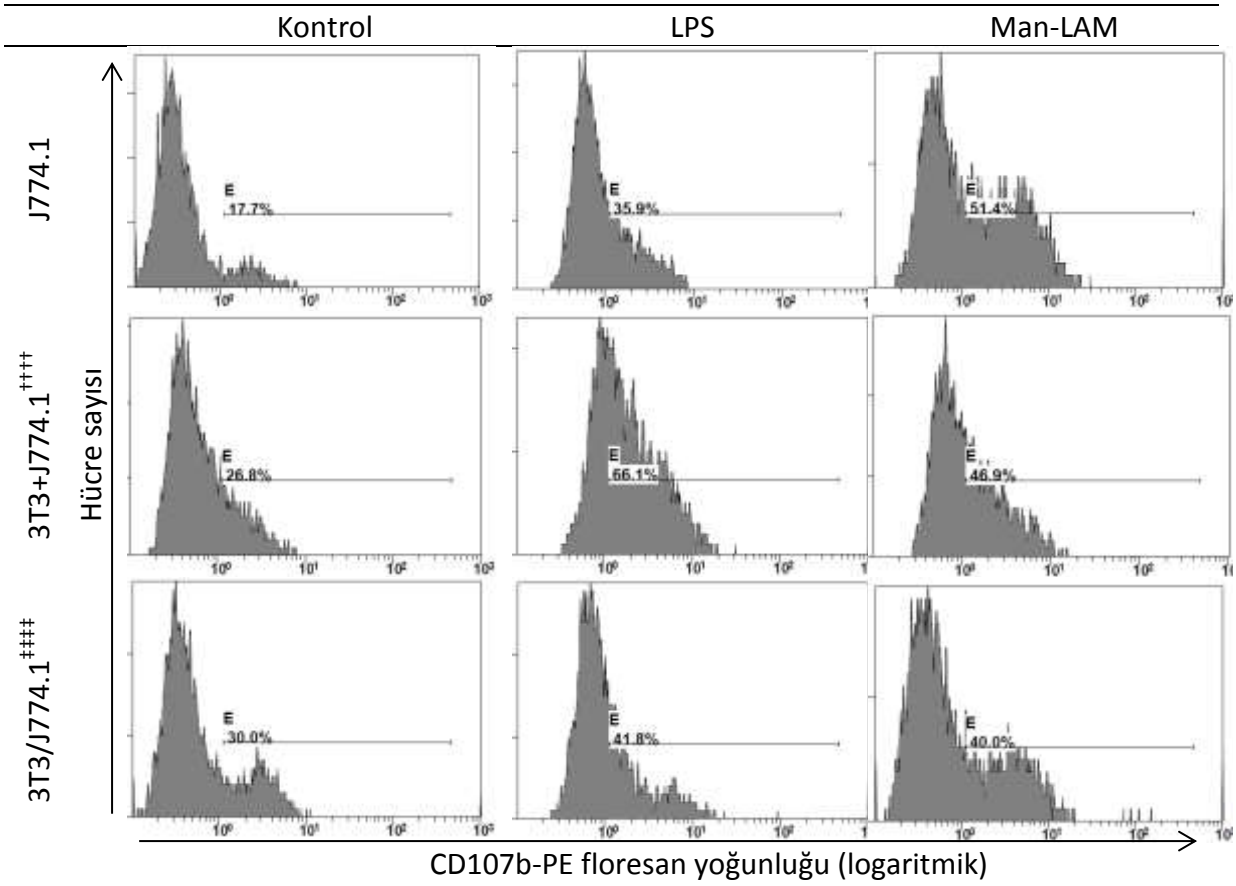
Şekil 4.16. Fibroblast - makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına hücrelerin CD62L ekspresyonu. Anti-CD62L-PE ile boyanmış makrofaj, temaslı ve temassız olarak makrofaj ve fibroblast bir arada olan hücrelerin kontrol, LPS ve Man-LAM ile uyarılmış olarak pozitif sinyal verme yüzdeleri

§§§ 3T3+J774.1; fibroblast hücresi ve makrofaj hücre-hücre temaslı kokültür modeli

**** 3T3/J774.1; fibroblast hücresi ve makrofaj hücre-hücre temassız (transwell'li) kokültür modeli

J774.1 hücrelerin CD107b molekül ekspresyonu

Lizozomun işlev görmesinde etkili olan CD107b'nin ekspresyonundaki artış, makrofajın tek başına olduğu ve kokültür modellerin her ikisinde de Man-LAM ile uyarım sonrasında artmış olarak tespit edildi. Ayrıca LPS ile uyarımın her üç durumda da CD107b ekspresyonunda artışa neden olduğu, makrofajın tek başına olduğu ve temaslı kokültür modelinde artışa neden olduğu tespit edildi (Şekil 4.17).

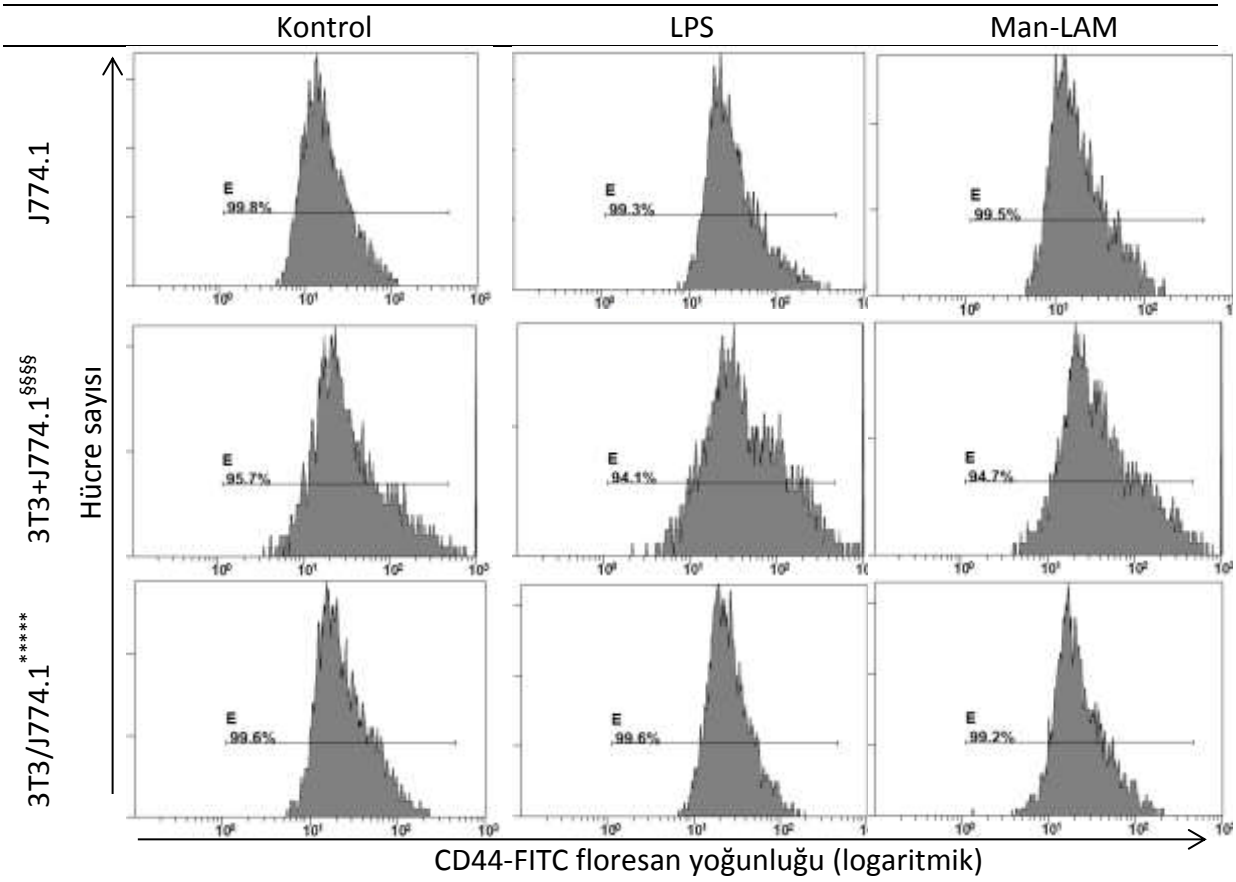


Şekil 4.17. Fibroblast - makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına hücrelerin CD107b ekspresyonu. Anti-CD107b-PE ile boyanmış makrofaj, temaslı ve temassız olarak makrofaj ve fibroblast bir arada olan hücrelerin kontrol, LPS ve Man-LAM ile uyarılmış olarak pozitif sinyal verme yüzdeleri

†††† 3T3+J774.1; fibroblast hücresi ve makrofaj hücre-hücre temaslı kokültür modeli
‡‡‡‡ 3T3/J774.1; fibroblast hücresi ve makrofaj hücre-hücre temassız (transwell'li) kokültür modeli

J774.1 hücrelerin CD44 molekül ekspresyonu

Makrofajlarda Mtb için bir bağlanma bölgesi olan CD44 ekspresyonu makrofaj ve kokültür kontrol gruplarında ve uyarı deneylerinde %100'e yakın olarak eksprese edildi (Şekil 4.18). Deney gruplarının GX-mean değerleri değişimi Çizelge 4.2'de verilmiştir. Man-LAM ile uyarım, LPS ile benzer şekilde durumunda makrofajlarda ve temaslı kokültür modelinde CD44 floresan yoğunluğunun arttığı tespit edildi.



Şekil 4.18. Fibroblast - makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına hücrelerin CD44 ekspresyonu. Anti-CD44-FITC ile boyanmış makrofaj, temaslı ve temassız olarak makrofaj ve fibroblast bir arada olan hücrelerin kontrol, LPS ve Man-LAM ile uyarılmış olarak pozitif sinyal verme yüzdeleri

§§§§ 3T3+J774.1; fibroblast hücresi ve makrofaj hücre-hücre temaslı kokültür modeli

***** 3T3/J774.1; fibroblast hücresi ve makrofaj hücre-hücre temassız (transwell'li) kokültür modeli

Çizelge 4.2. Anti-CD44-FITC ile boyanmış hücrelerin GX-mean değerleri

	Kontrol	LPS	Man-LAM
J774.1	24.5	50.4	31.4
3T3+J774.1	58.3	73.2	68.2
3T3/J774.1	38.1	34.4	34.2

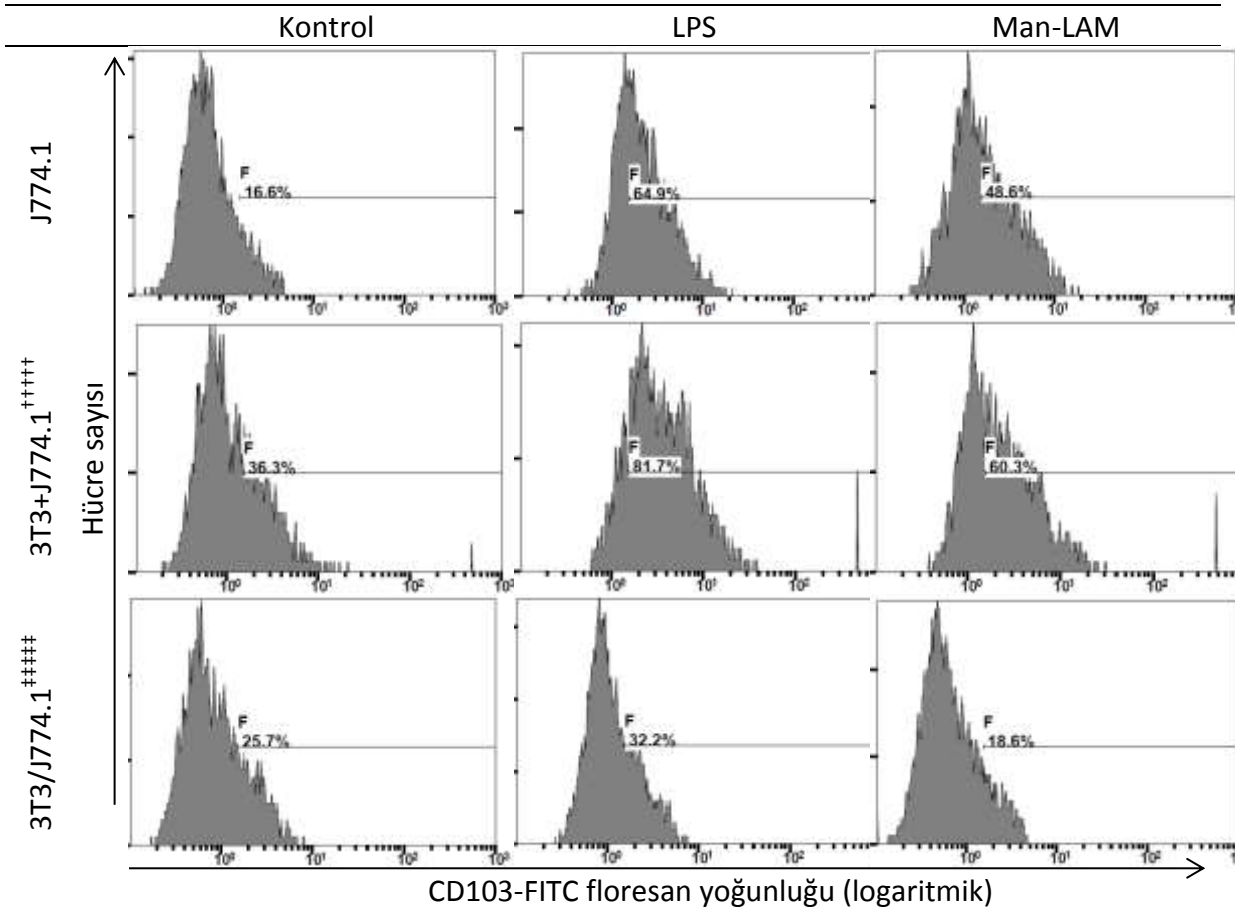
Yorum

Çalışmamızda Man-LAM ile uyarılan makrofajların aktivasyonundaki değişim, fibroblast varlığında kokültür modelinde LPS ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir. LPS ile uyarım tüm modellerde CD62L ekspresyonunda artmaya neden olurken Man-LAM ile uyarım, makrofajlar ve temaslı kokültür modelinde CD62L ekspresyonunda artışa neden olmuştur. Man-LAM ve LPS ile uyarım tüm hücre konfigürasyonlarında CD107b ekspresyonunda artışa neden olurken Man-LAM ile uyarım, temaslı kokültür modelinde LPS'den daha belirgin olarak arttığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak kokültür modelinde Man-LAM ile uyarım, makrofajlarda aktivasyona neden olurken, fibroblast varlığında bu fenotipte belirgin bir değişiklik saptanmamıştır.

4.2.8. J744.1 makrofajlarda CD103 ekspresyonu

CD103 ekspresyonu Man-LAM ile uyarım durumunda makrofajın tek başına olduğu durumda ve temaslı kokültür modelinde artmış olarak tespit edildi. LPS ile uyarımın da benzer şekilde hem temaslı kokültür modelinde hem de makrofajlar tek başına iken CD103 ekspresyonunda artışa neden olduğu saptandı. Ayrıca LPS'nin temaslı kokültür modelinde ekspresyon artışına neden olduğu tespit edildi (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. Fibroblast - makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına hücrelerin CD103 ekspresyonu. Anti-CD103-FITC ile boyanmış makrofaj, temaslı ve temassız olarak makrofaj ve fibroblast bir arada olan hücrelerin kontrol, LPS ve Man-LAM ile uyarılmış olarak pozitif sinyal verme yüzdeleri

Man-LAM ile uyarım, LPS ile benzer şekilde makrofajlarda ve temasa bağlı olarak kokültür modelinde CD103 ekspresyonunda artışa neden olmuştur.

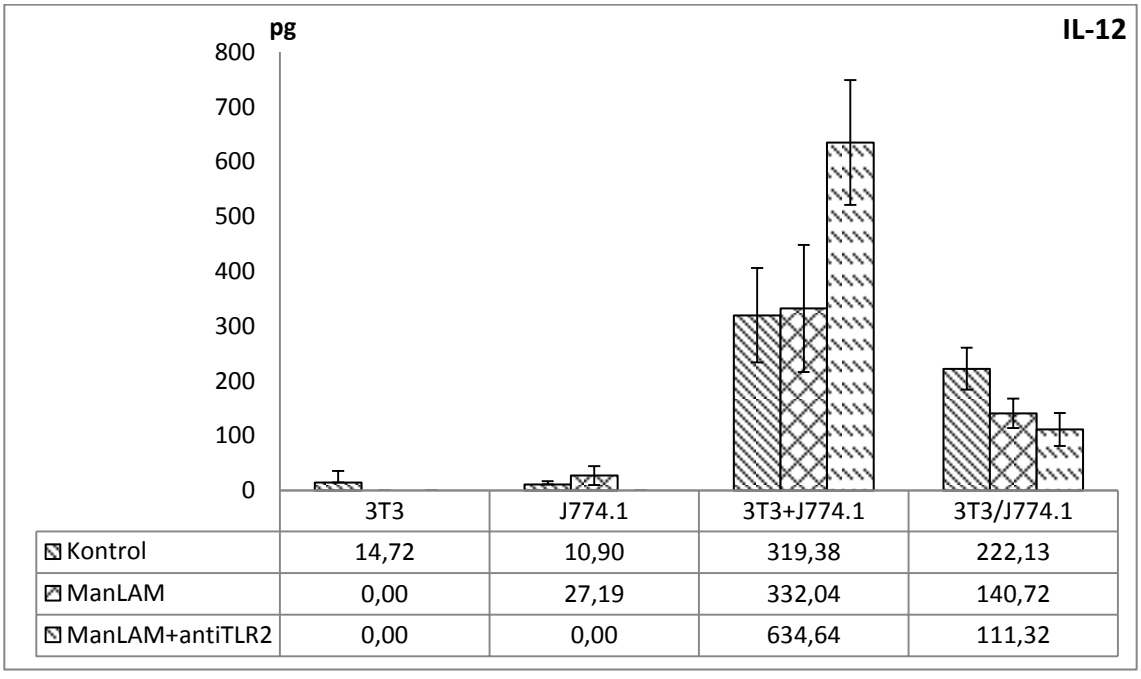
††††† 3T3+J774.1; fibroblast hücresi ve makrofaj hücre-hücre temaslı kokültür modeli
‡‡‡‡‡ 3T3/J774.1; fibroblast hücresi ve makrofaj hücre-hücre temassız (transwell'li) kokültür modeli

4.3. Kokültür Modelinde TLR-2 Yolağının Bloklanması Durumunda Man-LAM ile Uyarım

Fibroblast ve monosit hücreleri, 40 ng/mL ManLAM ile 1 µg/mL anti-TLR-2 ile bloklandıktan sonra ve bloklanmadan uyarıldı, 18. saat sonunda toplanan süpernatanttan sitokin ELİSA ölçümleri, 24. saat sonunda antikor ile boyanan hücrelerden akım sitometri analizleri yapıldı.

4.3.1. Kokültür modelinde Man-LAM'ın neden olduğu proinflamatuvar yanıtına TLR-2 antagonistinin etkisinin belirlenmesi

Fibroblast ve makrofajların farklı durumlarda Man-LAM ile uyarımının TLR-2 ile bloklanması hücrelerden İL-12 üretiminde değişime neden oldu. Makrofajın tek başına Man-LAM ile uyarımının TLR-2 antagonisti ile bloklanması İL-12 üretiminin tümüyle bloklanmasına, buna karşılık temaslı kokültür modelinde Man-LAM ve TLR-2 antagonisti ile eş zamanlı uyarım İL-12 üretiminde artma ile sonuçlandı. Hücrelerin transwell'li kokültür modelinde temas etmedikleri durumda Man-LAM ve TLR-2 antagonisti ile uyarımı ise İL-12 üretiminde azalmaya neden olduğu saptandı (Şekil 4.20).

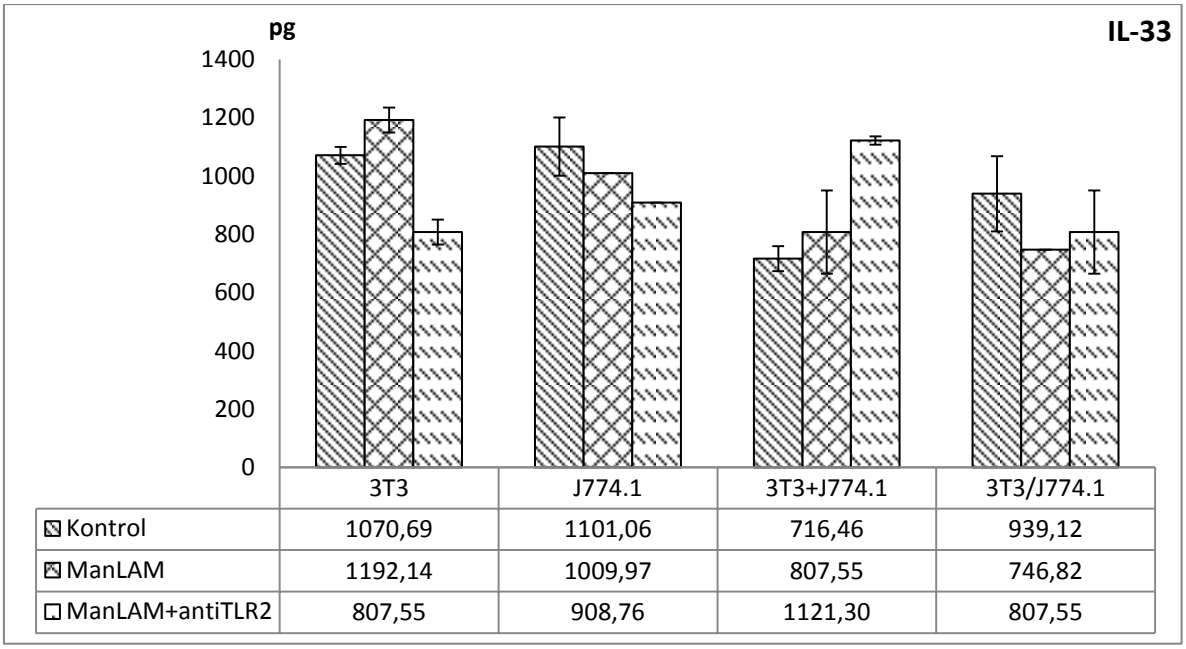


	3T3	J774.1	3T3+J774.1	3T3/J774.1
Kontrol	14,72	10,90	319,38	222,13
ManLAM	0,00	27,19	332,04	140,72
ManLAM+antiTLR2	0,00	0,00	634,64	111,32

Şekil 4.20. Fibroblast - makrofaj kokültür modelinde Man-LAM ile uyarımın TLR-2 ile bloklanması durumunda hücrelerin İL-12 yanıtı

4.3.2. Kokültür modelinde Man-LAM'ın neden olduğu İL-33 yanıtına TLR-2 antagonistinin etkisinin belirlenmesi

Fibroblast ve makrofajların farklı durumlarda Man-LAM ile uyarımının TLR-2 ile bloklanması hücrelerden İL-33 üretiminde değişime neden oldu. Fibroblast ve makrofajların tek başlarına Man-LAM ve TLR-2 antagonisti ile uyarılması İL-33 oluşumunda azalmaya neden olduğu belirlendi. Buna karşılık, fibroblast ve makrofajların temaslı kokültür modelinde Man-LAM ve TLR-2 antagonisti ile eş zamanlı uyarılması İL-33 üretiminde artma ile sonuçlandı. Hücrelerin transwell'li kokültür modelinde temas etmedikleri durumda Man-LAM ve TLR-2 antagonisti ile uyarımı ise kontrole göre İL-33 üretiminde azalmaya neden olurken Man-LAM ile uyarıma göre arttığı tespit edildi (Şekil 4.21).



	3T3	J774.1	3T3+J774.1	3T3/J774.1
Kontrol	1070,69	1101,06	716,46	939,12
ManLAM	1192,14	1009,97	807,55	746,82
ManLAM+antiTLR2	807,55	908,76	1121,30	807,55

Şekil 4.21. Fibroblast - makrofaj kokültür modelinde Man-LAM ile uyarımın TLR-2 ile bloklanması durumunda hücrelerin İL-33 yanıtı

4.3.3. Kokültür modelinde diğer sitokinlerin varlığı

Man-LAM ve LPS ile farklı şekillerde uyarılan hücrelerde, İL-1β, İL-4 ve IFNγ yanıtı uyarımın 18. saatinde toplanan süpernatanttan çalışılmıştır. Fibroblast ve makrofajların bu sitokinleri üretmediği görüldü. İL-10 üretimi yapısal olarak düşük miktarda tespit edildi, ancak deney konfigürasyonlarında değişiklik izlenmedi.

Yorum

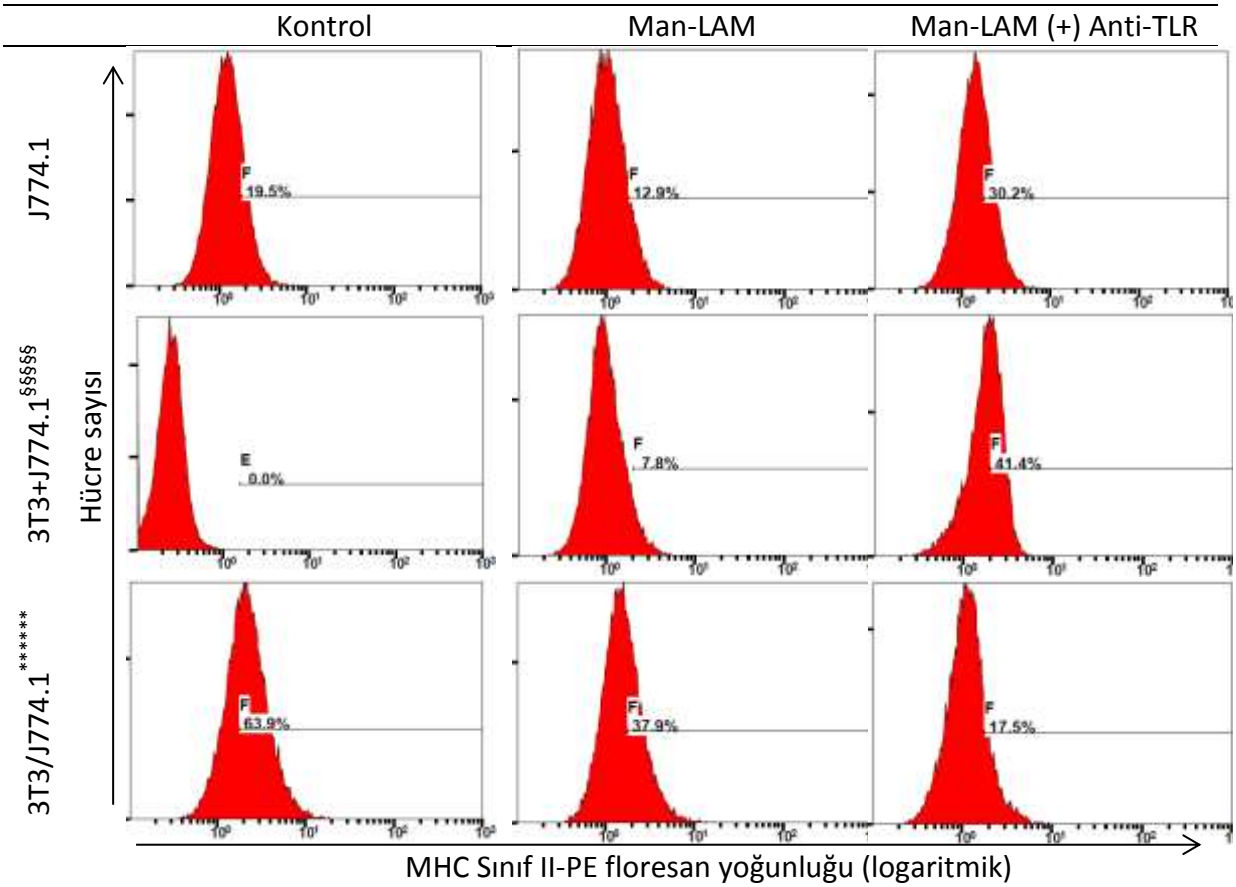
Çalışmamızda Man-LAM ile uyarımın TLR-2 ile ilişkisinin değerlendirilmesi için uyarımlar TLR-2 antagoisti varlığında tekrarlanmıştır. TLR-2'nin bloklanması makrofajların proinflamatuvar (İL-12) ve İL-33 yanıtının fibroblast varlığında ve temasa bağlı olarak artmasına neden olmuştur.

Sonuç olarak kokültür modelinde Man-LAM ile uyarımın TLR-2 ile bloklanması, TLR-2'nin neden olduğu immün regülasyonun kaybolmasına neden olmuş ve Man-LAM'ın etkisinin TLR-2 üzerinden olduğu kanısına varılmıştır.

4.3.4. Kokültür modelinde Man-LAM ile uyarımın neden olduğu M1 fenotipine TLR-2 antagonistinin etkisinin belirlenmesi

J774.1 hücrelerin MHC Sınıf II molekül ekspresyonu

Man-LAM etkisinin anti-TLR-2 ile bloklanması, makrofajın tek başına olduğu durumda ve temaslı kokültür modelinde MHC sınıf II molekül ekspresyonunda artışa neden oldu. Temassız modelde Man-LAM ile uyarımın MHC sınıf II molekül ekspresyonuna etkisinin TLR-2 antagonisti ile azaldığı saptandı (Şekil 4.22).



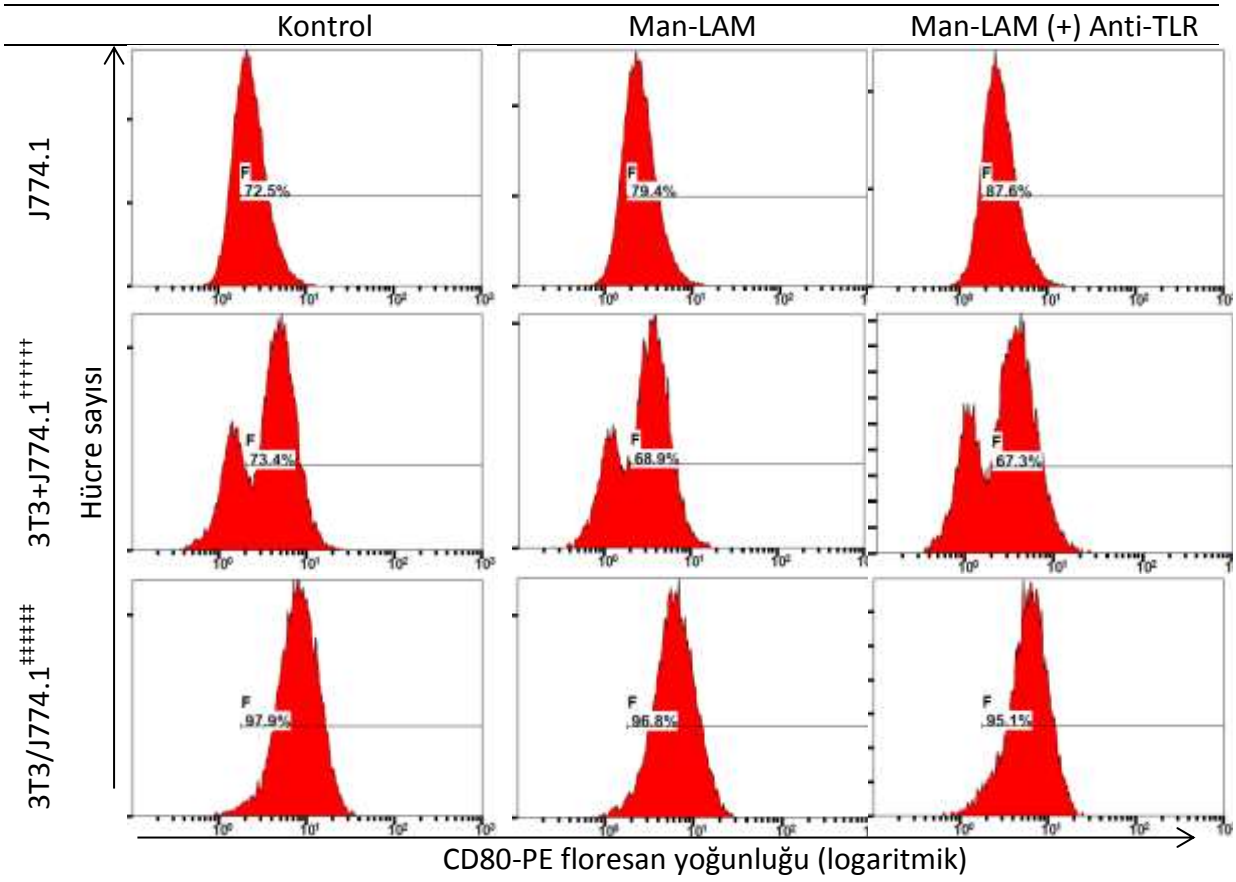
Şekil 4.22. Fibroblast - makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına TLR-2 ile bloklanan hücrelerin MHC sınıf II molekül ekspresyonu. Anti-MHC sınıf II-PE ile boyanmış makrofaj, temaslı ve temassız olarak makrofaj ve fibroblast bir arada olan hücrelerin kontrol, Man-LAM ve Man-LAM(+)Anti-TLR-2 ile uyarılmış olarak pozitif sinyal verme yüzdeleri

§§§§§ 3T3+J774.1; fibroblast hücresi ve makrofaj hücre-hücre temaslı kokültür modeli

****** 3T3/J774.1; fibroblast hücresi ve makrofaj hücre-hücre temassız (transwell'li) kokültür modeli

J774.1 hücrelerin CD80 molekül ekspresyonu

Man-LAM etkisinin anti-TLR-2 ile bloklanması, makrofajın tek başına olduğu durumda CD80 ekspresyonunda artışa neden oldu. Temassız ve temaslı kokültür modelinde Man-LAM ile uyarımın CD80 ekspresyonuna etkisinin TLR-2 antagonisti ile ilişkili olmadığı gösterildi (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. Fibroblast - makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına TLR-2 ile bloklanan hücrelerin CD80 ekspresyonu. Anti-CD80-PE ile boyanmış makrofaj, temaslı ve temassız olarak makrofaj ve fibroblast bir arada olan hücrelerin kontrol, Man-LAM ve Man-LAM(+)Anti-TLR-2 ile uyarılmış olarak pozitif sinyal verme yüzdeleri

†††††† 3T3+J774.1; fibroblast hücresi ve makrofaj hücre-hücre temaslı kokültür modeli
‡‡‡‡‡‡ 3T3/J774.1; fibroblast hücresi ve makrofaj hücre-hücre temassız (transwell'li) kokültür modeli

Yorum

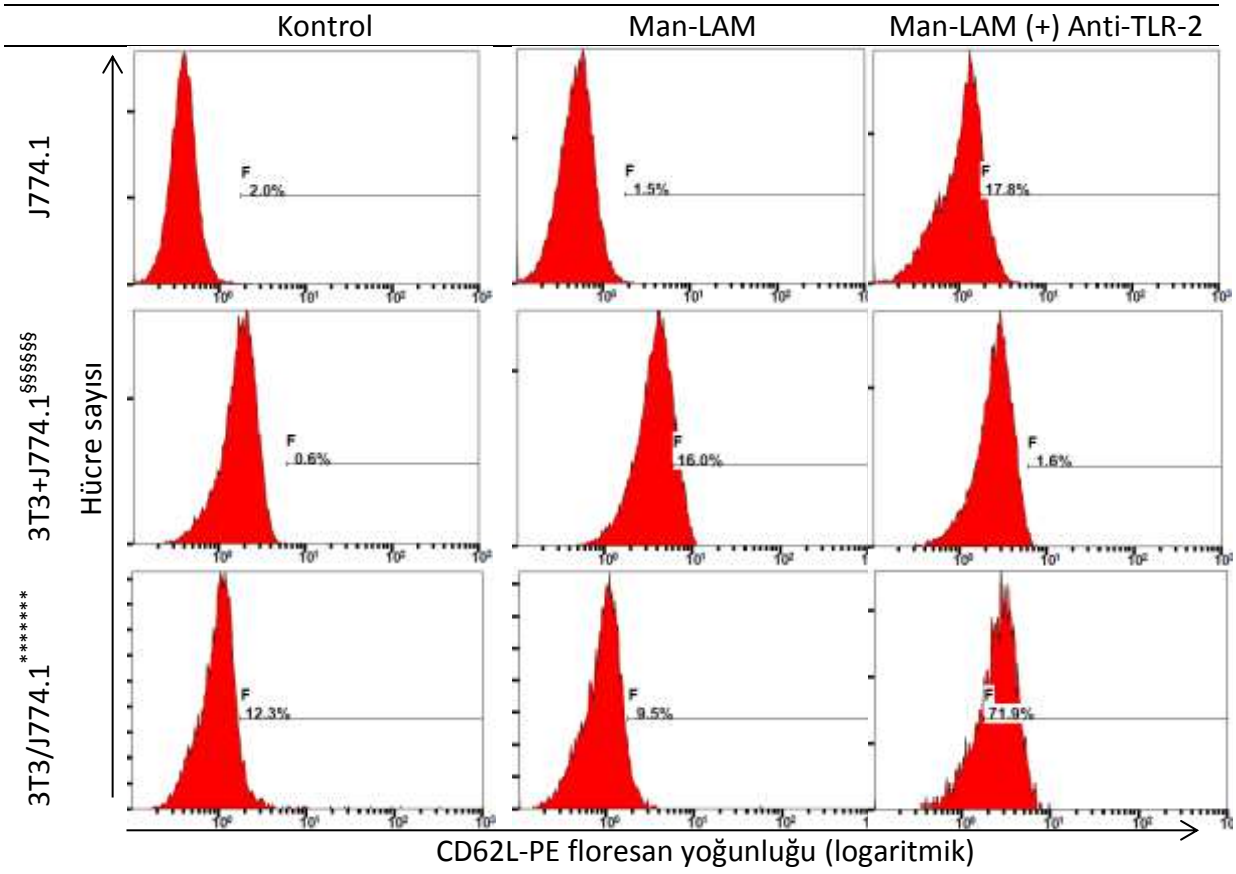
Çalışmamızda Man-LAM ile uyarımın TLR-2 antagonisti ile bloklanmasının makrofajların yüzey molekül ekspresyonlarındaki etkisi değerlendirilmiştir. Man-LAM ile uyarımın TLR-2 antagonisti ile bloklanması makrofajlarda tek başına ve fibroblast ile temas halinde iken MHC sınıf II ekspresyonunda artmaya neden olmuştur. Ayrıca Man-LAM ile uyarım makrofajlarda CD80 ekspresyonunda artmaya neden olurken, bu uyarımın TLR-2 antagonisti ile bloklandığında daha da arttığı saptanmıştır.

Sonuç olarak kokültür modelinde Man-LAM ile uyarımın TLR-2 ile bloklanması, TLR-2'nin neden olduğu immün regülasyonun kaybolmasına ve makrofaj yanıtının artmasına neden olmuştur. Kokültür modelinde Man-LAM ile uyarımın neden olduğu M1 fenotipi, TLR-2 antagonisti varlığında temasa bağlı olarak artmıştır.

4.3.5. Temaslı kokültür modelinde Man-LAM ile uyarımın neden olduğu makrofaj aktivasyonuna TLR-2 antagonistinin etkisinin belirlenmesi

J774.1 hücrelerin CD62L molekül ekspresyonu

Man-LAM etkisinin anti-TLR-2 ile bloklanması, makrofajın tek başına olduğu durumda ve temassız kokültür modelinde CD62L ekspresyonunda artışa neden oldu. Temaslı kokültür modelinde ise Man-LAM ile uyarımın CD62L ekspresyonuna etkisinin TLR-2 antagonisti ile geri döndüğü saptandı (Şekil 4.24).



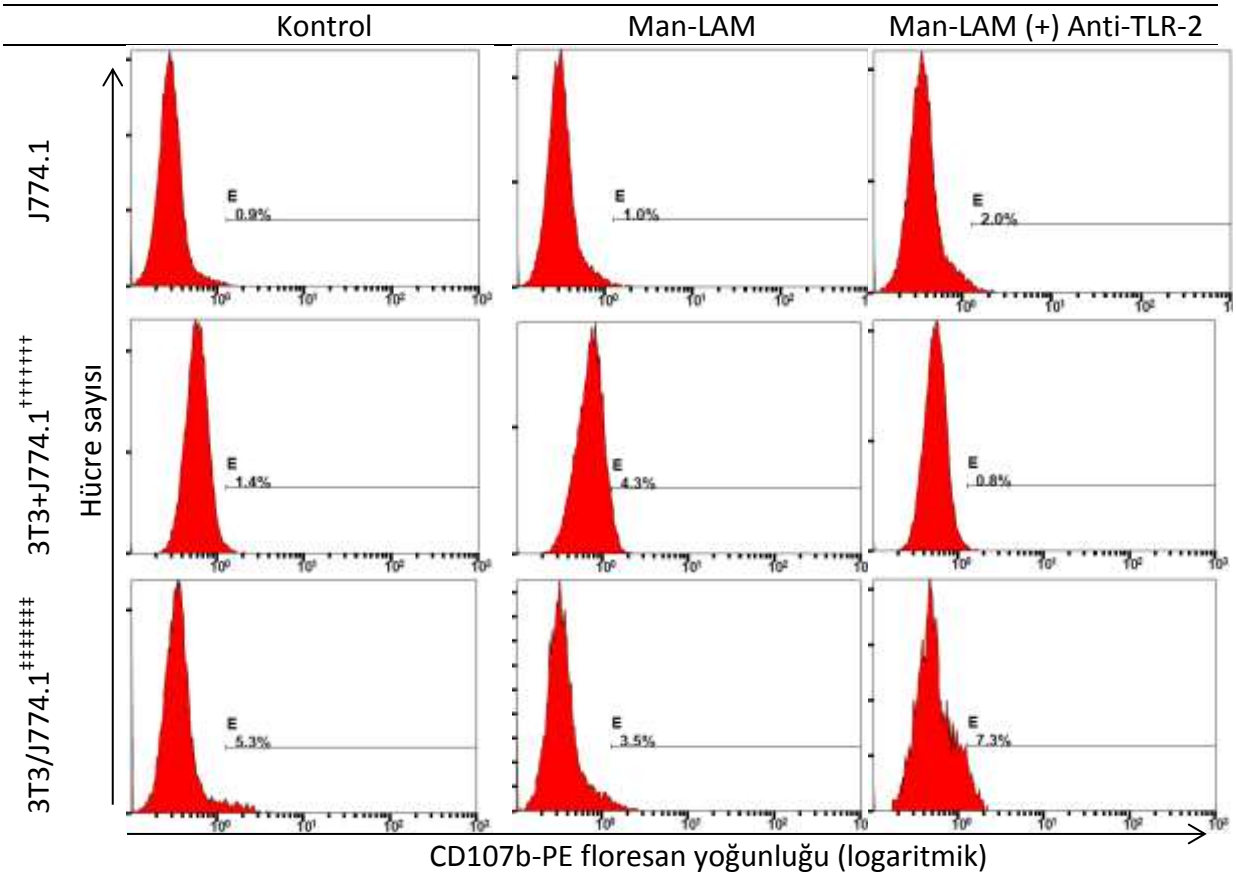
Şekil 4.24. Fibroblast - makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına TLR-2 ile bloklanan hücrelerin CD62L ekspresyonu. Anti-CD62L-PE ile boyanmış makrofaj, temaslı ve temassız olarak makrofaj ve fibroblast bir arada olan hücrelerin kontrol, Man-LAM ve Man-LAM(+)Anti-TLR-2 ile uyarılmış olarak pozitif sinyal verme yüzdeleri

§§§§§§ 3T3+J774.1; fibroblast hücresi ve makrofaj hücre-hücre temaslı kokültür modeli

******* 3T3/J774.1; fibroblast hücresi ve makrofaj hücre-hücre temassız (transwell'li) kokültür modeli

J774.1 hücrelerin CD107b molekül ekspresyonu

Man-LAM etkisinin anti-TLR-2 ile bloklanması, makrofajın tek başına olduğu durumda ve temassız kokültür modelinde CD107b ekspresyonunda artışa neden oldu. Temaslı modelde ise Man-LAM ile uyarımın CD107b ekspresyonuna etkisinin TLR-2 antagonisti ile geri döndüğü saptandı (Şekil 4.25).



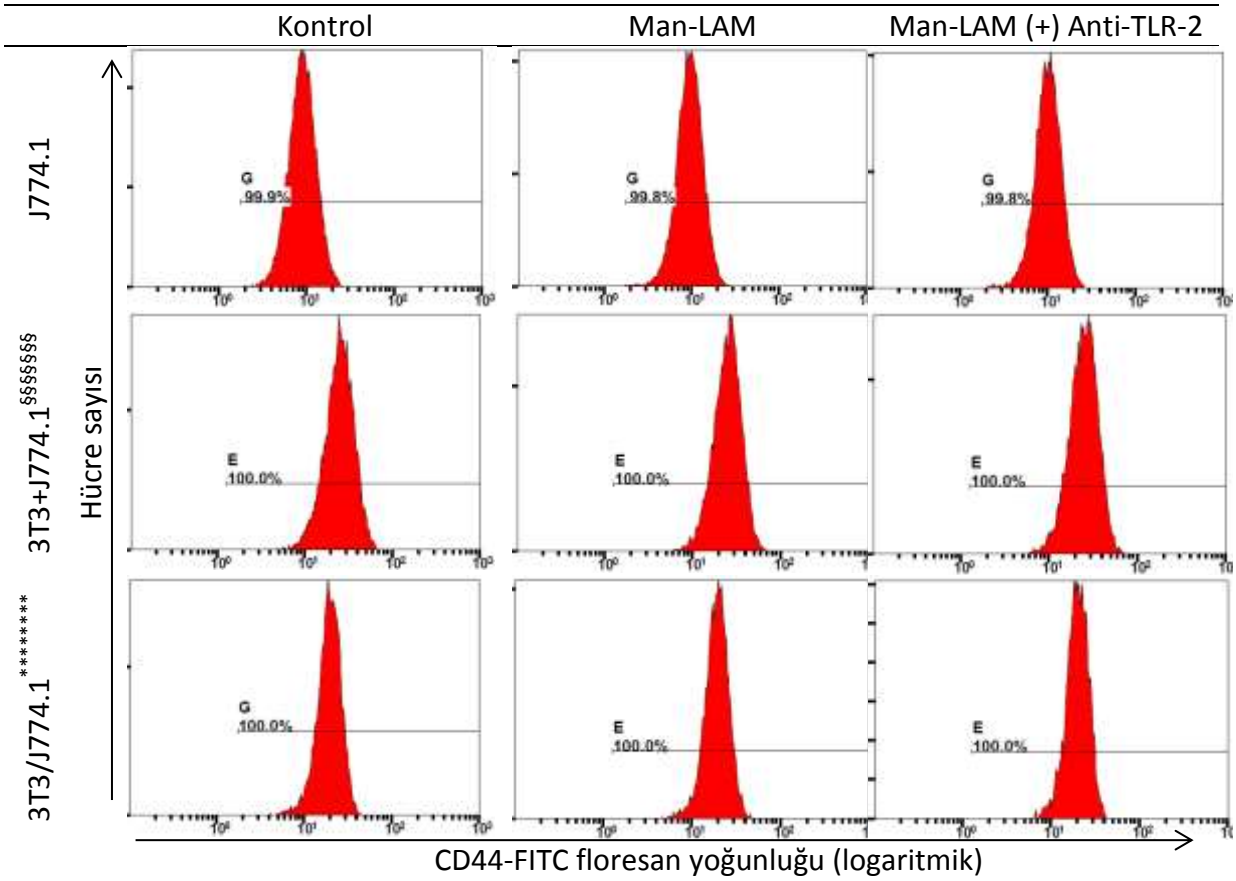
Şekil 4.25. Fibroblast - makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına TLR-2 ile bloklanan hücrelerin CD107b ekspresyonu. Anti-107b-PE ile boyanmış makrofaj, temaslı ve temassız olarak makrofaj ve fibroblast bir arada olan hücrelerin kontrol, Man-LAM ve Man-LAM(+)Anti-TLR-2 ile uyarılmış olarak pozitif sinyal verme yüzdeleri

††††††† 3T3+J774.1; fibroblast hücresi ve makrofaj hücre-hücre temaslı kokültür modeli

‡‡‡‡‡‡‡ 3T3/J774.1; fibroblast hücresi ve makrofaj hücre-hücre temassız (transwell'li) kokültür modeli

J774.1 hücrelerin CD44 molekül ekspresyonu

Makrofajlarda Mtb için bir bağlanma bölgesi olan CD44 ekspresyonu kontrol, Man-LAM ile uyarım ve TLR-2 antagonisti ile bloklandığı tüm durumlarda %100'e yakın olarak eksprese edildi (Şekil 4.26). Deney gruplarının değişimini değerlendirmek için GX-mean değerleri kontrol edildi. Man-LAM ile uyarım ve TLR-2 antagonisti ile bloklama durumunda makrofajlarda ve kokültür modellerinde CD44 floresan yoğunluğunun çok değişmediği tespit edildi (Çizelge 4.3).



Şekil 4.26. Fibroblast - makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına TLR-2 ile bloklanan hücrelerin CD44 ekspresyonu. Anti-CD44-FITC ile boyanmış makrofaj, temaslı ve temassız olarak makrofaj ve fibroblast bir arada olan hücrelerin kontrol, Man-LAM ve Man-LAM(+)Anti-TLR-2 ile uyarılmış olarak pozitif sinyal verme yüzdeleri

§§§§§§ 3T3+J774.1; fibroblast hücresi ve makrofaj hücre-hücre temaslı kokültür modeli

******** 3T3/J774.1; fibroblast hücresi ve makrofaj hücre-hücre temassız (transwell'li) kokültür modeli

Çizelge 4.3. Anti-CD44-FITC ile boyanmış hücrelerin GX-mean değerleri

	Kontrol	Man-LAM	Man-LAM(+)Anti-TLR-2
J774.1	9,49	10	10,6
3T3+J774.1	26,2	26,2	26
3T3/J774.1	20,1	20	20,6

Yorum

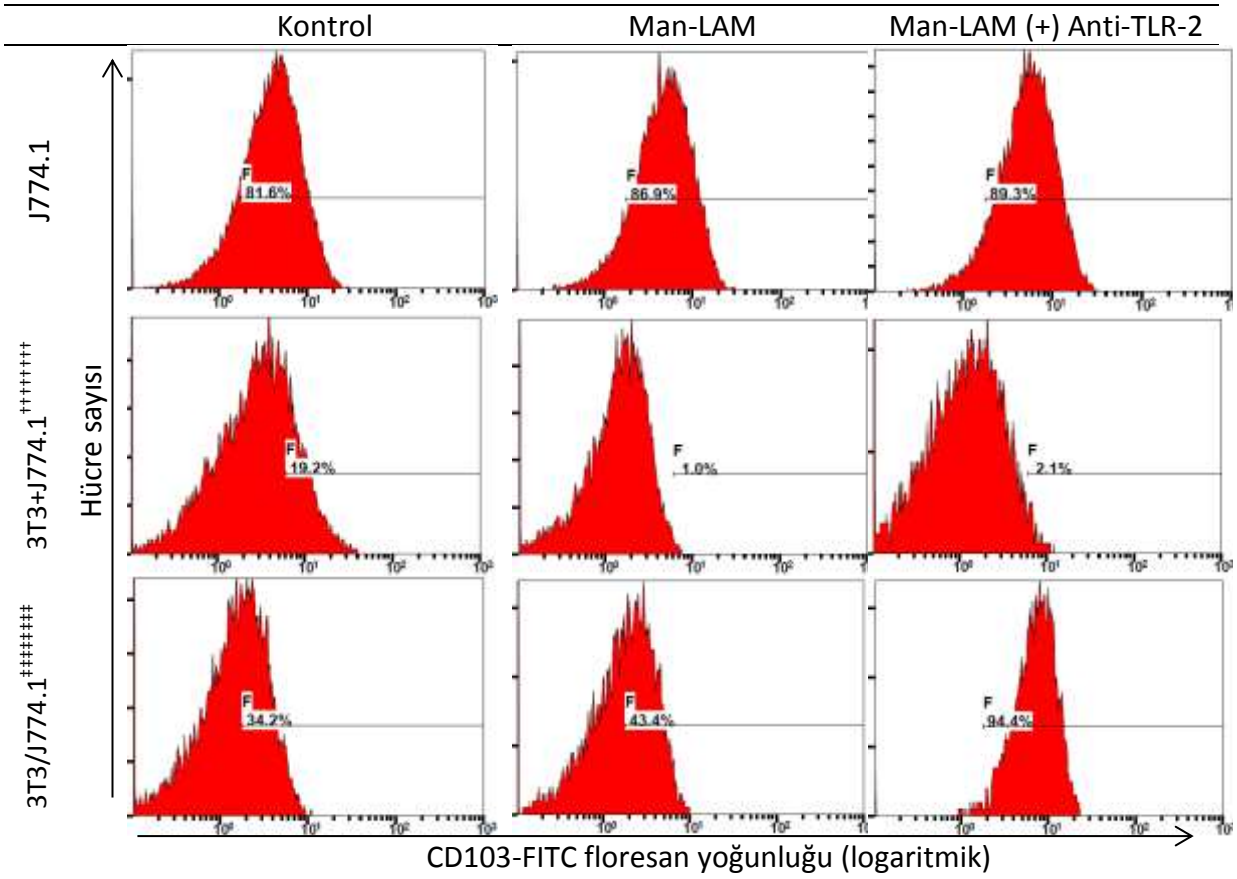
Çalışmamızda Man-LAM ile uyarımın TLR-2 antagonisti ile bloklanmasının makrofajların aktivasyonu ile ilgili yüzey molekül ekspresyonlarındaki etkisi değerlendirilmiştir. Man-LAM ile uyarımın TLR-2 antagonisti ile bloklanması, makrofajlarda tek başına ve fibroblast ile temassız kokültür modelinde CD62L ve CD107b ekspresyonunun artmasına neden olmuştur. CD44 ekspresyonunda belirgin bir değişiklik olmamıştır.

Sonuç olarak kokültür modelinde Man-LAM ile uyarımın TLR-2 ile bloklanması, makrofajın fibroblast ile temas etmediği durumda daha da fazla aktive olmasına neden olmuştur. Temaslı kokültür modelinde Man-LAM ile uyarımın neden olduğu makrofaj aktivasyonu, TLR-2 antagonisti ile geri dönmüştür.

4.3.6. J774.1 makrofajlarda CD103 ve CD153 ekspresyonu

J774.1 hücrelerin CD103 molekül ekspresyonu

Man-LAM'ın anti-TLR-2 ile bloklanması, makrofajın tek başına olduğu durumda ve temassız kokültür modelinde CD103 ekspresyonunda artışa neden oldu. Temaslı modelde Man-LAM ile uyarımın CD103 ekspresyonuna etkisi TLR-2 antagonisti ile etkilenmedi (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. Fibroblast - makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına TLR-2 ile bloklanan hücrelerin CD103 ekspresyonu. Anti-103-FITC ile boyanmış makrofaj, temaslı ve temassız olarak makrofaj ve fibroblast bir arada olan hücrelerin kontrol, Man-LAM ve Man-LAM(+)Anti-TLR-2 ile uyarılmış olarak pozitif sinyal verme yüzdeleri

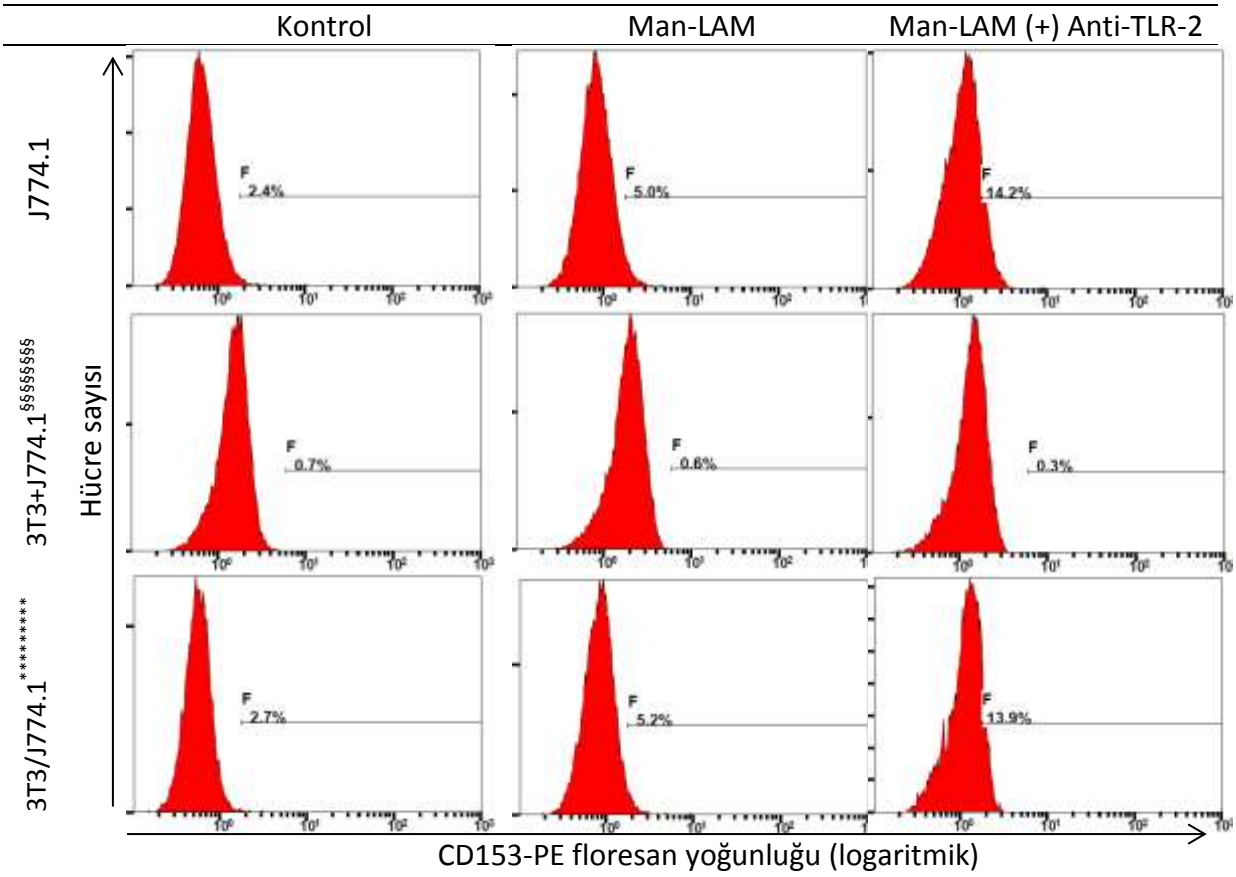
Man-LAM ile uyarım temaslı kokültür modelinde CD103 ekspresyonunda artmaya neden olurken, bu uyarım TLR-2 antagonisti ile bloklandığında temas varlığında daha da artmıştır.

†††††††† 3T3+J774.1; fibroblast hücresi ve makrofaj hücre-hücre temaslı kokültür modeli

‡‡‡‡‡‡‡‡ 3T3/J774.1; fibroblast hücresi ve makrofaj hücre-hücre temassız (transwell'li) kokültür modeli

J774.1 hücrelerin CD153 molekül ekspresyonu

Man-LAM ile uyarım makrofajlarda ve temassız kokültür modelinde CD153 ekspresyonunda artmaya neden oldu. Bu artış hücrelerin anti-TLR-2 ile bloklandığı durumda makrofaj ve temassız kokültür modelinde CD153 ekspresyonu daha da fazla yükseldi. Temaslı modelde, bloklama ile ekspresyonun azaldığı gözlendi (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. Fibroblast - makrofaj kokültür modelinde Man-LAM uyarımına TLR-2 ile bloklanan hücrelerin CD153 ekspresyonu. Anti-CD153-PE ile boyanmış makrofaj, temaslı ve temassız olarak makrofaj ve fibroblast bir arada olan hücrelerin kontrol, Man-LAM ve Man-LAM(+)Anti-TLR-2 ile uyarılmış olarak pozitif sinyal verme yüzdeleri

Man-LAM ile uyarım temaslı kokültür modelinde CD153 ekspresyonunda artmaya neden olurken, bu uyarım TLR-2 antagonisti ile bloklandığında daha da artmıştır. Ancak temassız modelde bir miktar azalma görülmüştür.

§§§§§§§ 3T3+J774.1; fibroblast hücresi ve makrofaj hücre-hücre temaslı kokültür modeli

********* 3T3/J774.1; fibroblast hücresi ve makrofaj hücre-hücre temassız (transwell'li) kokültür modeli

5. TARTIŞMA

Dünya nüfusunun üçte biri, tüberkülozun etkeni Mtb ile enfektedir. Mikobakterinin glikolipitleri ve diğer hücre duvar bileşenleri, basile karşı konak yanıtını yönlendirmektedir. Mtb'nin ana hücre duvar bileşeni Man-LAM, bakterinin virülansında önemli bir yer tutmaktadır (Afonso-Barroso ve diğerleri, 2012; Yang ve diğerleri, 2013). Man-LAM, tüberkülozda görülen immünpatolojiden sorumludur. MR aracılığı ile fagositoza neden olur (Torrelles ve diğerleri, 2011). MR'ye bağlanan Man-LAM, makrofajda fagozom olgunlaşmasını bloklayarak Mtb'nin makrofaj içerisinde yaşamını devam ettirmesini sağlar (Kang ve diğerleri, 2005). Ayrıca Mtb'nin Man-LAM aracılığı ile dendrtik hücre DC-SİGN'a tutunması, DH olgunlaşmasını bozar ve fagositoz sonucunda koruyucu immünitenin baskılanmasına neden olan sitokinlerin salınmasına yol açar (Ehlers, 2010; Maeda ve diğerleri, 2003). Man-LAM'ın Mtb'nin virülansına etkisi ile ilgili in vivo olarak çelişkiler mevcuttur. Ancak bu çelişkili sonuçların Man-LAM'ın yapısı ile ilgili olduğunu belirten çalışmalar da mevcuttur. Farklı fenotipteki Mtb klinik izolatlarının konak yanıtını farklı yönlerde etkilediği yapılan çalışmalarda göstermiştir (Torrelles ve diğerleri, 2008). Mtb'nin çoğrafik bölgelerle ilişkili farklı soylarının virülansı etkilediği, bu farklılığın soya özgü hücre duvar yapısı ile ilişkili olduğu varsayılmıştır (Krishnan ve diğerleri, 2011). Ayrıca Man-LAM dallanması fazla olan izolatların makrofajın fagositozunda bozulmaya neden olduğu gösterilmiştir (Torrelles ve diğerleri, 2008). Çalışmalar Man-LAM'ın makrofaj ve DH proinflamatuvar yanıtını baskıladığını gösterilmiştir (Guo ve diğerleri, 2012; Wu ve diğerleri, 2011). Çalışmamızda, immün baskılayıcı özelliği daha önceki çalışmalar ile gösterilmiş olan Mtb H37Rv suşunun Man-LAM'ı ekstrakte edilmiş ve Man-LAM makrofaj – fibroblast kokültür modelinde uyarım için kullanılmıştır (Pan ve diğerleri, 2014). Çalışmamızda Man-LAM uyarımının, fibroblast varlığında makrofaj farklılaşmasına etkisi değerlendirilmiştir.

İnsan tüberkülozunun karakteristik yapısı olan granülom formasyonunun ana bileşeni Mtb'yi içinde hapseden makrofajlardır. Fibroblastlar, Mtb'yi içeren makrofajları ve alana göç eden diğer immün hücreleri granülomun içerisinde sınırlandırmaktadır (Mariotti ve diğerleri, 2013). Mtb enfeksiyonunda bu iki hücrenin etkileşimine ilişkin çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu çalışmalarda, Mtb ile uyarılan makrofajlardan salınan çözünür faktörlerin etkisi ile fibroblastlardan salınan MMP'lerin doku yıkımına neden olduğu gösterilmiştir (Green ve

diğerleri, 2011). Mtb ile 120 saat gibi uzun süreli makrofaj uyarımından elde edilen çözünür faktörlerin fibroblastlardan salınan kemokinleri, granülom oluşumunda etkili CXCL8 yanıtını belirgin olarak arttırdığı gösterilmiştir (O'Kane ve diğerleri, 2007).

Mtb enfeksiyonunda fibroblastın makrofajlar üzerine etkisi ile ilgili Rastogi ve arkadaşlarının 1992 yılında yaptığı çalışma dışında herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Mtb ile enfekte fibroblastlardan salınan çözünür faktörlerin, makrofajların Mtb enfeksiyonunu daha iyi kontrol ettiği in vitro hücre kültürü çalışmasında gösterilmiş ve fibroblast – makrofaj etkileşiminin mikobakteriye karşı konak yanıtın düzenlenmesinde rol aldığı söylenmiştir (Rastogi ve diğerleri, 1992). Fibroblastların makrofaj üzerine etkileri farklı hastalık modellerinde çalışılmıştır. İnflamasyonda fibroblastın makrofaj üzerine etkisi, yara iyileşmesi modellerinde çalışılmıştır. Fibroblast – makrofaj kokültür modelinde hücrelerin tek başına bulunduğu hücrelere göre TNF-α, İL-1β, İL-12 ve İL-10 sitokin salınımında belirgin artış olduğu, yara fibroblastını içeren kokültür modelinde ise proinflamatuvar yanıtta (İL-1β ve İL-12) azalma olduğu, düzenleyici bir yanıt olduğu gösterilmiştir. Çalışma sonucunda araştırmacılar, fibroblastların yara yerinde makrofajları farklı şekilde etkileyecek aracılar saldığını ortaya koymuşlardır (King, Chen, Jetté, ve Thibeault, 2013). Ek olarak tümör çalışmalarında da makrofaj aktivitesinin mikroçevreden etkilendiği, fibroblastların makrofajın farklılaşmasını ve proinflamatuvar yanıt oluşumunu etkilediği gösterilmiştir (Rama, Esendagli, ve Guc, 2011). Bizim çalışmamız, Mtb'nin en önemli virülans faktörlerinden Man-LAM ile uyarımının fibroblast - makrofaj kokültür modelinde, makrofaj farklılaşmasına etkisinin değerlendirildiği ilk çalışmadır.

Mtb granülomda fagositer hücrelerce sınırlandırılmaktadır. Fibroblast gibi immün olmayan hücreler de granülom formasyonuna katılır ve latent enfeksiyonda enfekte olurlar. Mariotti ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada fibroblast hücreleri Mtb ile enfekte edilmiştir. Bu enfeksiyonun fibroblastlarda İFN-γ ile indüklenen MHC sınıf II molekül ekspresyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir (Mariotti ve diğerleri, 2013). Çalışmamızda Man-LAM ile uyarılan 3T3 fibroblast hücrelerinin İL-10 ve TGF-β gibi immün düzenleyici sitokinleri oluşturduğu, ancak İL-12, TNF-α ve İL-6 gibi proinflamatuvar sitokinleri oluşturmadığı veya çok az oluşturduğu gösterilmiştir. Fibroblast hücreleri, tek başlarına bulundukları durumda Man-LAM ile uyarıma immün düzenleyici bir yanıt vermiştir.

NO, nitrik oksit sentaz aktivitesi ile oluşan makrofajlarda RNI oluşumu ile mikobakterilere karşı mücadelede koruyucu bir rol almaktadır. İnsan makrofajlarının canlı Mtb ile enfeksiyonu NOS ekspresyonunda ve NO üretiminde artış ile sonuçlanmıştır. İFN-γ ile uyarım ise bu ekspresyonu arttırmıştır. Ancak oluşan NO'nun Mtb'yi öldürme kapasitesinin yeterli olmadığı tespit edilmiştir (Jung ve diğerleri, 2013). Bizim çalışmamızda Man-LAM ile uyarım farklı olarak makrofajlardan NO salınımında belirgin bir artışa neden olmamıştır. NO salınımı için gerekli olan İFN-γ'nın yokluğu bu uyarımın oluşmamasının nedeni olarak değerlendirilmiştir.

Alveolar makrofajlar Mtb ile ilk karşılaşan hücreledir. Primer enfeksiyon sıklıkla mikroorganizmanın konakta latent kalması ile sonuçlanmaktadır. Bu bireyler, daha sonra hayatlarının immün sistemin bozulduğu bir döneminde aktif TB geliştirebilmektedir. Makrofajlar bu süreçte, enfeksiyonun evresine ve ortamına bağlı olarak muazzam bir fenotipik değişkenlik ve işlevsel farklılık gösterebilmekte ve enfeksiyonun farklı sonuçlarına yol açabilmektedir (Duque ve diğerleri, 2014; Guirado, Schlesinger, ve Kaplan, 2013).

Makrofajlarla Mtb'nin etkileşiminde bir dizi sitokin rol almaktadır. Singh ve arkadaşlarının çalışmasında canlı virülan H37Rv Mtb ile enfekte edilmiş fare peritoneal makrofajlarının İL-6 yanıtının inaktif bakteriye göre 4-5 kat arttığı tespit edilmiştir. İL-1, İL-10, İL-12 p40 ve İL-12 p70 seviyelerinde bu fark saptanmamştır (Prati Pal Singh ve Goyal, 2013). Ayrıca Mtb H37Rv ile yapılan fare peritoneal makrofajlarının in vitro fagositoz deneyleri makrofajların canlı basili alma yeteneklerinin daha yüksek olduğunu göstermiştir. İL-12p40, TNF-α ve İFN-γ yanıtının hem canlı hem de inaktif H37Rv ile uyarımı takiben artmadığı hem ELİSA hem de revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile gösterilmiştir. Ayrıca NO oluşumu da gösterilememiştir (He, Du, ve Du, 2013). Bizim çalışmamızda, yapılan çalışmalarla benzer şekilde makrofajların tek başına Man-LAM ile 24 saatlik uyarımını takiben İL-12, TNF-α ve İL-6 sitokinlerini oluşturmadığı, ancak İL-10, TGF-β ve İL-33 gibi immün düzenleyici sitokinlerin üretiminde artış olduğu saptanmıştır.

Mtb enfeksiyonun sonucu, esas olarak konağın basile nasıl yanıt verdiği ve basilin bu yanıtı nasıl manüple ettiği ile ilişkilidir. Bu süreç Mtb ile konağın etkileşimine bağlı olarak bakterinin varlığını devam ettirmesine neden olabilmektedir (Rapanoel, Mazandu, ve

Mulder, 2013). Mtb enfeksiyonu sırasında monositlerin enfeksiyonu proinflamatuvar yanıtın baskılandığı kronik sürece neden olmaktadır. Bu süreçte İL-12p70, TNF-α, İL-10, İL-6 ve İL-1β üretimi azalmıştır (Castaño, Barrera, ve Rojas, 2011). Mtb makrofajları enfekte ettiğinde, makrofajlarda konak hücre yanıtından kaçmasına yardımcı olan CCR5 reseptörü ekspresyonuna ve bunun sonucunda İL-10 uyarımınının artmasına neden olmuştur (Das ve diğerleri, 2014). H37Rv Man-LAM'ı makrofajın proinflamatuvar İL-12 ve TNF-α salınımı azaltmıştır (Wojtas ve diğerleri, 2011). Ayrıca Mtb'yi öldürmenin birincil mekanizması İFN-γ yardımı ile makrofaj aktivasyonu olmasına rağmen, İL-12 etkisi ile oluşan İFN-γ oluşumu TB hastalarında baskılanmıştır (Yu ve diğerleri, 2011). Tüm bu çalışmalara ters olarak Mazurek ve arkadaşlarının H37Rv Man-LAM'ı ile yaptıkları çalışmada, 10 µg/mL Man-LAM ile 12 saat dendritik hücrelerin uyarımını takiben proinflamatuvar sitokinlerde (TNF, İL-12 ve İL-6) artış olduğu gösterilmiştir (Mazurek ve diğerleri, 2012). Bizim çalışmamızda ise 40 ng/mL Man-LAM ile 18 saatlik uyarım sonucunda çoğu makrofaj çalışmasında olduğu gibi fibroblast ve makrofaların tek başına İL-12 üretimine neden olmadığı, buna karşılık fibroblast ve makrofajın bir arada olduğu durumda İL-12 üretiminin arttığı, bu artışın hücre – hücre teması varlığında daha yüksek olduğu saptanmıştır. Man-LAM, fibroblast ile makrofajın temas halinde bulunduğu kokültür modelinde LPS gibi proinflamatuvar sitokin İL-12'nin üretiminde artışa neden olmuştur (Şekil 4.4).

Mtb'nin alveolar makrofajları enfeksiyonunu takiben, proinflamatuvar yanıt olarak TNF-α oluşmaktadır. TNF-α, İFN-γ ile sinerjik etki göstererek mikobakterinin kontrolünde başlangıçta rol almaktadır (Cavalcanti ve diğerleri, 2012). Bu iki sitokinin farklı hücreler tarafından oluşturulması, enfeksiyon sonucunu belirleyen farklı makrofaj aktivasyon kinetiklerinin olduğunu düşündürmektedir. İFN-γ ve TNF-α birlikteliğinin makrofaj çevresindeki mikobakteriyi öldürmek için gerekli olduğu gösterilmiştir (Ray ve diğerleri, 2008). TNF-α, RNI'leri aktive etmekte, ayrıca immün hücreleri enfeksiyon alanına çağırarak hastalığın ilerlemesini sınırlayan granülom oluşumuna katkıda bulunmaktadır (Cavalcanti ve diğerleri, 2012). TNF-α'nın fazlalığı, enfekte makrofajlarda mitokondriyal ROI üretimini uyarır. Bu uyarım başlangıçta mikrobiyal etkiyi arttırır, ancak ROI hızla hücre nekrozuna ve mikobakterinin hücre dışı ortama yayılımına neden olur (Roca ve Ramakrishnan, 2013). Ayrıca TNF-α, TB'de etkin bir konak savunma stratejisi olarak işlev gören makrofajların apoptozu uyarmaktadır (Rodrigues ve diğerleri, 2013). Bizim çalışmamızda Man-LAM ile

uyarım fibroblast ve makrofajda TNF-α üretimine neden olmazken hücrelerin bir arada olduğu kokültür modellerinde TNF-α yanıtının arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.5). Bu yanıt temassız kokültür modelinde daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda Man-LAM ile uyarımın, temasa bağlı olmadan fibrolast – makrofaj kokültür modelinde TNF-α üretiminde artışa neden olduğu gösterilmiştir.

İL-6, Mtb enfeksiyonunda kazanılmış immün yanıt için kritiktir. İL-6 siRNA (small interfering) ile İL-6 ekspresyonu silinen makrofajların Mtb ile enfeksiyonu inteferon ile indüklenen genlerin, özellikle de tip I interferon ekspresyonunda artış ile sonuçlanmıştır. İL-6'nın, tip I interferon sinyalini bloklayarak hastalığın ilerlemesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Martinez ve diğerleri, 2013). Çalışmamızda fibroblast ve makrofajın Man-LAM ile uyarıma tekli hücre kültürü modellerinde İL-6 üretimi ile yanıt vermedikleri, ancak hem temaslı hem de temassız kokültür modelinde İL-6 yanıtının arttığı gösterilmiştir. LPS ile uyarımı takiben makrofajın hem tek başına hem de kokültür modellerinde kontrol gruplarına göre İL-6 salınımında artış saptanmıştır (Şekil 4.6). Ancak fibroblast ve makrofajın uyarımsız olarak bir arada olduğu her iki kokültür modelinde de İL-6 üretiminde belirgin artış meydana gelmiştir ve Man-LAM ile uyarım İL-6 üretiminde kontrollere göre farklılık göstermemiştir. İL-6 üretimi uyarandan bağımsız olarak hücre birlikteliğinde tespit edilmiştir.

İL-10 ve TNF-α, Mtb enfeksiyonunda birbirine zıt hareket eden sitokinlerdir. İL-10 makrofaj aktivasyon düzeyini düzenlemek ve doku hasarından korunma için gereklidir. İL-10 ve TNF-α, uzun dönemde enfeksiyonun sonucunu belirlemektedir. Bu dengenin granülom çevresini etkilediği ve hem konak hem de bakteri yararına sonuçlandığı gösterilmiştir (Cilfone ve diğerleri, 2013). İL-10, inhibitör bir sitokindir ve inflamatuvar ve immünpatolojik süreçler arasındaki dengeyi sağlamaktadır. TB konak makrofajlarının ciddi immün baskılanması sonucu koruyucu immünitenin kaybı ile karakterizedir. İL-10 düzeyindeki artış, mikobakterinin konakta varlığını devam ettirmesi ile sonuçlanmaktadır. Mtb enfeksiyonu sırasında etken İL-10 üretimine neden olmaktadır. İL-10'nun esas fonksiyonu, Mtb'nin yakalanması, kontrolü ve konak immün yanıtının başlaması için gerekli olan makrofaj ve DH işlevini baskılamaktır. İL-10, MHC sınıf II moleküllerin ekspresyonunda azalma ile sonuçlanmaktadır. Böylece İL-10, Mtb'nin immün yanıttan kaçışında ve akciğerde uzun süreli enfeksiyon oluşumu ile ilişkilendirilmektedir. Ayrıca İL-10 üretimi CCR5 ile

ilişkilendirilmiştir. Makrofajın CCR5'e özgül siRNA ile muamelesi İL-10 üretimini azaltmakta ve MHC sınıf II ekspresyonu geri dönmektedir (Cavalcanti ve diğerleri, 2012; Das ve diğerleri, 2014; Redford ve diğerleri, 2011). Ek olarak İL-10'nun makrofajda bloklanması, Mtb H37Rv ile enfekte makrofajda fagozomun olgunlaşmasına neden olmuştur. Hücre vasatına İL-10 eklenmesi ile de Mtb makrofaj içerisinde yaşamaya devam etmiştir. Sitokinlerin patojenin varlığını devam ettirmesine katkısı olduğu gösterilmiştir (O'Leary, O'Sullivan, ve Keane, 2011). Çalışmamızda fibroblast ve makrofajların yapısal olarak ve Man-LAM'a yanıtta İL-10 saldığı, ancak bu üretimin fibroblast ve makrofajın temas halinde bulunduğu kokültür modelinde azaldığı saptanmıştır (Şekil 4.7). Man-LAM'ın fibroblast ve makrofajdan salınan anti-inflamatuvar sitokin İL-10'un uyarımında, hücre-hücre temasına bağlı olarak azalmaya neden olduğu gösterilmiştir.

TB TGF-β'nın aşırı üretimi ve biyoaktivasyonu ile karakterizedir (Wu ve diğerleri, 2012). Çalışmamızda İL-10 ile benzer şekilde fibroblast ve makrofajın yapısal olarak ve Man-LAM ile uyarım sonucunda TGF-β ürettiği, ancak bu üretimin kokültür modellerinde azaldığı gösterilmiştir. Bu baskılanma temassız kokültür modelinde daha fazla gözlenmiştir (Şekil 4.8). Man-LAM ile uyarılan makrofaj TGF-β üretimine neden olurken, bu immün düzenlenme fibroblast varlığında temasa bağlı olmadan azalmıştır.

Çalışmamızda ayrıca makrofaj farklılaşması ile ilişkili İL-1β, İL-2, İL-4, IFNγ gibi diğer bazı sitokinler de değerlendirilmiş, ancak fibroblast ve makrofajların hiçbir deney konfigürasyonunda bu sitokinleri ürettiği tespit edilmemiştir.

İL-33 bir dizi immün aracılı hastalık ile ilişkilendirilmiştir. Deri inflamasyonu modelinde İL-33, birçok hücreyi etkilemekte ve TH2 yanıtını güçlendirerek hasar ile ilişkili moleküler patern olarak etki etmektdir. Fibroblastlarda TNF-α ve İL-1β en güçlü uyaranlardır. İFN-γ ise İL-33 uyarımını düzenlemektedir. CD4 T hücreler İL-33'e yanıt vermektedir. İL-12 ile birlikte İL-33 T hücre reseptör uyarımı artmaktadır (Seltmann ve diğerleri, 2013). İL-33, Mtb enfeksiyonundaki en önemli sitokinlerden biri olan İFN-γ'nın oluşumunu uyarmaktadır. TB plörozili hastaların plevral efüzyonlarında İL-33'nın arttığı, bu artışın İFN-γ artışı ile korelasyon gösterdiği saptanmıştır (Lee ve diğerleri, 2013). İL-33 reseptörü ST2 yoksun fareler Mtb ile enfekte edildiğinde, İFN-γ üretiminde ve akciğere lenfosit göçünde artış

saptanmış ve akciğerdeki erken enfeksiyon, kronik faz enfeksiyon bulgularını göstermiştir (Wieland ve diğerleri, 2009). Ayrıca İL-33, fibroblastlar tarafından da oluşturulmakta ve TH2 sitokin aracılı inflamasyondan sorumlu tutulmaktadır. Fibroblastların İL-33 üretimi, İL-1β veya TNF-α ile uyarımı takiben görülmüştür (Nomura ve diğerleri, 2012). Alternatif aktive makrofaj tip 2 immün yanıtta kritik rol oynamaktadır. ST2 yoksun farelerin tip 2 immün yanıtı bozulmuştur. İL-33, havayolu inflamasyonu sırasında alveolar makrofajlarda, MR, İL-4, CCL24 ve CCL17 eksprese eden alternatif aktive makrofaj tipine farklılaşmaya neden olmuştur (Kurowska-Stolarska ve diğerleri, 2009). Bizim çalışmamızda, Man-LAM ile uyarım farklı konfigürasyonlardaki hücrelerin İL-33 üretimi açısından farklılıklar göstermiştir. Fibroblastların ve makrofajların Man-LAM ile uyarım durumunda İL-33 ürettiği, hücrelerin birbiriyle temas halinde ve temas olmadan bir arada olduğu durumda Man-LAM ile uyarımın İL-33 üretiminde artışa neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, Man-LAM ile uyarımın LPS ile uyarımdan daha yüksek bir İL-33 oluşumuna neden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.9). Fibroblast – makrofaj birlikteliğinin proinflamatuvar yanıtla korele olarak arttığı saptanmıştır. Çalışmamızda fibroblast - makrofaj kokültür modelinde Man-LAM ile uyarım proinflamatuvar yanıtta artış, antinflamatuvar yanıtta azalma ve İL-33 yanıtında artmaya neden olmuştur.

Granülomda makrofajlar antimikobakteriyel efektörlerdir. Buradaki makrofajların yapısal farklılığı ve granülomdaki işlevi tam olarak anlaşılamıştır (Mattila ve diğerleri, 2013). İnsan monositlerinin Mtb ile enfeksiyonu, monositin makrofaja farklılaşmasını etkilemektedir. Enfekte monositlerde MHC sınıf II, CD68, CD86 ve CD36 ekspresyonu azalmıştır (Castaño ve diğerleri, 2011). Yine enfekte makrofajlardan salınan İL-10, MHC sınıf II moleküllerin ekspresyonunun azalması ile ilişkilidir (Das ve diğerleri, 2014). Mtb kaynaklı mikobakteriyel ürünler ile tüm bakterinin immün sistem üzerindeki etkisi farklıdır. Man-LAM enfekte antijen sunan hücreler tarafından salınan ve DC-SİGN ile etkileşen bakteri bileşenidir. Man-LAM, dendritik hücre olgunlaşmasında ve işlevinde LPS ile karşılaştırıldığında orta düzeyde olgunlaşma fenotipi göstermiştir. MHC sınıf I ve II molekülü, CD83, CD86 ve CCR7 ekspresyonu düşük olarak tespit edilmiştir. Ayrıca Man-LAM ile aktive DH'nin fagositik aktivitesi ve naif T hücreyi uyarma yeteneği de daha düşük bulunmuştur. Dulphy ve arkadaşlarıın yaptığı bu çalışmalar, Man-LAM'ın dendritik hücre olgunlaşmasını tam olarak gerçekleştiremediğini göstermiştir (Dulphy ve diğerleri, 2007). Ayrıca TB hastalarının

balgamlarından elde edilen hücrelerin MHC sınıf II molekülü, CD86 ve CD28 ekspresyonu düşük bulunmuştur. Bu bulgular aktif TB'de, Mtb'nin T hücre tarafından tanınmasının daha zayıf olduğunu göstermiştir (Flores-Batista ve diğerleri, 2007). Farklı olarak dendritik hücreler ile Mazurek ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 10 µg/ml H37Rv Man-LAM'ı ile 48 saatlik uyarım sonrasında CD80 ve CD86 kostimülatör molekülleri ve MHC sınıf II molekülleri ekspresoynuda artış olduğu gösterilmiştir (Mazurek ve diğerleri, 2012). Bizim çalışmamızda Man-LAM ile uyarımın 24. saatinde makrofajların MHC sınıf II molekül, CD80 ve CD86 kostimülatör molekül ekspresyonu yaptığı gösterilmiştir. MHC sınıf II molekül ekspresyonun makrofaj ile fibroblastın temas halinde bulunduğu kokültür modelinde değişmediği, ancak hücrelerin temas halinde bulunmadığı durumda azaldığı gösterilmiştir (Şekil 4.13). Man-LAM, makrofaj ve kokültür modelinde temasa bağlı olarak LPS gibi MHC sınıf II molekül ekspresyonunda artışa neden olmuştur. Kokültür modellerinde CD80 ekspresyonunda artış görülmezken CD86 ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir. Kokültür modelinde Man-LAM ile uyarım, makrofajlarda M1 fenotipine farklılaşmaya neden olmuştur.

Monositler dokulara göç ettikten sonra makrofaj veya DH'ye farklılaşma kapasitesine sahiptir. Subkutanöz injeksiyonu takiben aktive monositlerin CCR7 bağımlı bir mekanizma ile lenf düğümlerine göç ettiği ilk kez Leiriao ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Bu göçte rol alan CD62L'yi yüksek düzeyde eksprese eden aktive monositlerin LPS antijenlerini çapraz sunarak CD8 T hücreleri uyardıkları gösterilmiştir (Leirião, del Fresno, ve Ardavín, 2012). Çalışmamızda monosit aktivasyonunun göstergelerinden biri olan CD62L ekspresyonunun makrofajlarda LPS ve Man-LAM ile uyarım durumunda ve kokültür modellerinde arttığı saptanmıştır (Şekil 4.16). Man-LAM ile uyarım, monositlerin dokulara göç eden aktif formuna dönüşmesine neden olmuştur.

CD107b (lizozom ilişkili membran proteini), yüksek derecede glikozile transmembran proteinindir ve lizozomal bir belirteçtir. CD107b, lizozomun korunmasında ve devamında rol aldığı gibi otofajide de işlev görmektedir. Makrofajlarda CD107b ile uyarım, LPS ile indüklenen İL-8 uyarımını arttırmıştır (Min, Suk, ve Lee, 2013). Bizim çaışmamızda Man-LAM ile uyarımın makrofajın tek başına olduğu ve kokültür modellerin her ikisinde de CD107b ekspresyonunda artışa neden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.17). Man-LAM ile

uyarım, fibroblastın makrofaj ile temas halinde bulunduğu kokültür modelinde LPS'den daha belirgin olarak artışa neden olmuştur. Lizozomun devamı ve matürasyonu için gerekli olan CD107b'nin fibroblast varlığında arttığı saptanmıştır.

Mtb'nin hücreye direkt olarak tutunabildiği CD44 adezyon molekülü, inflamatuvar yanıt ile ilişkilidir ve hücre iskeletinin yeniden reorganizasyonunda, fagositozunda rol alır. Mtb ile enfekte edilen CD44 yoksun farelerin makrofajlarının akciğere göçünün bozulduğu, T hücre yoğunluğu ve İFN-γ üretiminin azaldığı gösterilmiştir (Leemans ve diğerleri, 2003). Çalışmamızda Man-LAM ile uyarım makrofajlarda ve temaslı kokültür modelinde CD44 ekspresyonunda artmaya neden olmuştur. Kokültür modelinde Man-LAM ile uyarım, makrofajın aktivasyonuna neden olmuştur.

Çalışmamızda ayrıca Man-LAM ile uyarımın makrofajlardan ve temaslı kokültür modelinde CD103 ekspresyonuna neden olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.19). CD103+ dendritik hücreler mukozalarda, özellikle de barsak mukozasında gözlenmektedir. Retinoik asit ve TGF-β varlığında, barsak sub mukozasında CD103+ dendritik hücreler Treg (CD4+, CD25+ ve Foxp3) hücre farklılaşmasını desteklemektedir (Bağrıaçık, 2013). Bu nedenle özellikle oral toleransın yapılandırılması işleminde çok önemli rol aldıkları düşünülmektedir. TGF salgısını arttırma özelliğinde olan Man-LAM antijeni, akciğer mukozasında CD103 bağımlı anti-inflamatuvar özelliklerin açığa çıkmasında benzer mekanizmaları etkileme özelliğine sahip olabilir. Nitekim akciğer mukozasında ve çevresindeki lenf düğümlerinde CD103+ dendritik hücrelerin TH2 tipi immün yanıtın gelişmesine yol açtıkları rapor edilmiştir (Nakano ve diğerleri, 2012). Bu durumun anlaşılması için, ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

Mikobakteriyel bileşenlerin farklı patern tanıma reseptörleri ile tanınması, enfeksiyonun erken kontrolünü sağlayan sitokin yanıtını uyarmaktadır (Torrado ve Cooper, 2013). Mtb fagolizozomun yıkımından kaçma, fagosit içerisinde yaşama ve çoğalma kapasitesine sahiptir. Önceki çalışmalar virülan Mtb'nin fapolizozomdan sitozole kaçabildiğini göstermiştir. Virülan suş H37Rv'nin TLR-2 - MyD88 sinyal yolağı ile etkileşerek sitozole geçtiği, sitozole kaçışta bu yolağın önemli olduğu gösterilmiştir (Rahman, Sobia, Gupta, Kaer, ve Das, 2014). Ayrıca virülan Mtb H37Rv'nin TLR-2 - MyD88 sinyal yolağı yoksun farelerde fagozomdan sitozole geçebildiği gösterilmiştir. Bu nedenle TLR-2-MyD88

yolağının makrofajlarda Mtb'nin fagolizozomda sınırlandırılmasında önemli rolü olduğu düşünülmektedir (Rahman ve diğerleri, 2014). Mtb'nin doğal immün sistem tarafından tanınması kazanılmış immün yanıtın gelişimi için gereklidir. Mikobakteri hücre duvar bileşenleri makrofajları TLR-2 aracılığı ile aktive etmektedir. Canlı Mtb ile enfeksiyonu takiben, TLR-2 yoksun farelerin bakteri temizlenmesinde azalma, bozulmuş granülamatöz yanıt ve kronik pnömoniye neden olduğu saptanmıştır. Ayrıca TLR-2 yoksun farelerde İFN-γ, TNF-α ve İL-12p40 seviyesinin arttığı, CD4 ve CD8 T hücre sayısının ve TH1 yanıtının yükseldiği de tespit edilmiştir. Ancak bu yanıtın koruyucu olmadığı, TLR-2'nin inflamasyonun düzenlenmesinde rol aldığı, yokluğunun abartılı inflamatuvar yanıt ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Drennan ve diğerleri, 2004). Çalışmamızda Man-LAM'ın fibroblast varlığında veya yokluğunda makrofaj üzerine etkisinin TLR-2 ile ilgisini ortaya koyabilmek için, tüm hücre modelleri TLR-2 antagonisti ile bloklanmış ve sitokin yanıtları ve yüzey molekül ekspresyonları bu şekilde tekrar değerlendirilmiştir.

TLR-2 makrofaj, DH ve solunum yolu epitel hücre yüzeylerinde bol miktarda bulunan bir PRR'dir ve Mtb'ye karşı immün yanıtta kritik role sahiptir. TLR-2, DH olgunlaşması, TH1, TH2 ve TH17 hücre yanıtının düzenlenmesi, makrofaj aktivasyonu ve sitokin sekresyonunun düzenlenmesi gibi çoklu işlevlere sahiptir. Mtb ise TLR-2 yanıtını çalmakta ve makrofajın İFN-γ yanıtını azaltarak, antijen işlenmesi ve sunumunu baskılayarak konak yanıtını ters yöne çevirmektedir. TLR-2 agonistlerinin TB aşılarında kullanılma potansiyeli vardır (Yu, Zeng, ve Xie, 2014). Mtb hücre duvar lipitleri, mikobakterinin en önemli patojen ile ilişkili ligandlarıdır. Hipervirülan Beijing genotipinin lipit fraksiyonları, makrofajları yüksek miktarda TNF-α ve İL-10 salmak üzere uyarmıştır. Ancak TLR-2, TLR-4 ve MHC sınıf II molekül ekspresyonu azalmıştır. Buna karşılık az virülan *M. tuberculosis* Canetti suşu düşük düzeyde TNF-α ve İL-10 uyarımına, TLR-2, TLR-4 ve MHC sınıf II molekül ekspresyonunda artmaya neden olmuştur. Bu sonuçlar virülan suşların TLR ve MHC ekspresyonunu negatif etkileyerek proinflamatuvar sitokin üretimini azalttığını ve immün yanıttan kaçtığını göstermiştir (Rocha-Ramírez ve diğerleri, 2008). TB hastarının periferik kan mononükleer hücrelerinde TLR-2 ekspresyonu sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. TLR-2 ekspresyonu, İL-6, İL-10, TNF-α ve İFN-γ üretimi ve hasta kliniği ve hastalığın sonucu ile ilişkili bulunmuştur. Ayrıca TLR-2 ekspresyonunun, kültür pozitifliği devam eden hastalar hariç, antitüberküloz tedavinin 2. ayında azaldığı görülmüştür.

Oransal tehlike regresyon (proportional hazards regression) analizi sonuçları TLR-2 ekspresyonu ve İL-10 plazma düzeyinin kısa hayatta kalım ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Bu çalışma ile TLR-2'nin TB'nin gidişatında önemli bir rol aldığı gösterilmiştir (Wang ve diğerleri, 2012). Ayrıca Mtb'nin 19 kDA'luk lipoproteini ve peptidoglikanının makrofajlarda TLR-2'ye bağlandıktan sonra İFN-γ'ya yanıtında kayıp olduğu gösterilmiştir (Singh, LeMaire, Tan, Zeng, ve Schorey, 2011). Mtb H37Rv suşuna karşı yanıtta monosit kaynaklı DH tarafından uyarılan TLR-2, İL-12'nin inhibisyonuna neden olurken İL-23'ün artışına neden olmuştur. İFN-γ ile indüklenmiş dendritik hücre ise İL-12 uyarımına neden olurken İL-23'de azalma ile sonuçlanmıştır (Gerosa ve diğerleri, 2008). Bizim çalışmamızda Man-LAM ile uyarımının TLR-2 ile bloklanması makrofajın tek başına bulunduğu durumda İL-12 üretiminin tümüyle kaybolmasına neden olurken, makrofajın fibroblast ile temas halinde bulunduğu kokültür modelinde İL-12 üretiminde artma ile sonuçlanmıştır (Şekil 4.20). TLR-2'nin bloklanması makrofajda proinflamatuvar yanıtın baskılanmasına neden olurken, fibroblast varlığında TLR-2'nin bloklanması immün modülatör etkinin ortadan kalkması ve proinflamatuvar yanıtın abartılması ile sonuçlanmıştır.

İL-33 hem fibroblast hem de makrofajlar tarafından oluşturulmaktadır. Makrofajlarda TLR-2'ye bakteri yapılarının bağlanması, İL-33 regülasyonu ile ilişkilendirilmiştir (Polumuri ve diğerleri, 2012). Bizim çalışmamızda fibroblast ve makrofajların Man-LAM ile uyarımının TLR-2 ile bloklanması hücrelerin tek başlarına bulunduğu durumda İL-33 oluşumunda azalmaya neden olmuştur. Buna karşılık, fibroblast ve makrofajların temaslı kokültür modelinde Man-LAM ve TLR-2 antagonisti ile eş zamanlı uyarılması İL-33 üretiminde artma ile sonuçlanmıştır (Şekil 4.21). TLR-2'nin bloklanması, fibroblast varlığında immün düzenleyici yanıtın kaybı ile sonuçlanmıştır.

Antijen sunan hücreler MHC sınf II molekül aracılığı ile CD4 T hücreleriyle etkileşir. Mtb enfeksiyonunda TLR-2, MHC sınıf II molekülünün ve antijen sunumunun inhibisyonuna neden olmaktadır. Bu negatif geri dönüş, aşırı T hücre aktivasyonundan konağı korumaktadır (Harding ve Boom, 2010). Ayrıca Mtb'ye uzamış maruziyetin MHC sınıf II molekül ekspresyonunu ve antijn sunumunu baskıladığı da yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Mtb 19-kDa lipoproteini, 16 saatlik maruziyeti takiben İFN-γ ile aktive makrofajda, TLR-2 - MyD88 aracılığı ile MHC sınıf I alternatif antijen işlenmesini inhibe

etmiştir. Ancak MHC sınıf I molekül ekspresyonunda baskılanma görülmemiştir (Tobian ve diğerleri, 2003). Bir başka çalışmada Mtb 19-kDa lipoproteininin makrofajda MHC sınıf II molekül ekspresyonunu ve antijen işlenmesini TLR-2 aracılığı ile TLR-4'den bağımsız olarak inhibe ettiği saptanmıştır. Bunun bakterinin T hücre tarafından tanınmasını azalttığı, bakterinin kazanılmış yanıttan kaçışına ve kronik enfeksiyonun meydana gelmesine neden olduğu gösterilmiştir (Noss ve diğerleri, 2001). Bizim çalışmamızda Man-LAM etkisinin anti-TLR-2 ile bloklanması, makrofajın tek başına olduğu durumda ve temaslı kokültür modelinde MHC sınıf II molekül ekspresyonunda artışa neden olmuştur (Şekil 4.22). TLR-2'nin bloklanması, fibroblast varlığından bağımsız olarak Man-LAM ile uyarıma abartılmış yanıt ile sonuçlanmıştır. Ayrıca Man-LAM etkisinin anti-TLR-2 ile bloklanmasının CD80 kostimülatör molekül üzerine etkisi de değerlendirilmiş, TLR-2 ile bloklamanın makrofajın tek başına olduğu durumda CD80 ekspresyonunda artışa neden olduğu ancak kokültür modellerinde etkisiz olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.23). Kokültür modelinde Man-LAM ile uyarımın neden olduğu M1 fenotipine ait özelliklerin, TLR-2 antagonisti varlığında temasa bağlı olarak arttığı saptanmıştır.

Çalışmamızda Man-LAM etkisinin anti-TLR-2 ile bloklanması durumunda, makrofajın tek başına olduğu durumda ve temassız kokültür modelinde CD62L ekspresyonunda abartılı bir artış olduğu, bunun fibroblast ile temas varlığında gerçekleşmediği saptanmıştır (Şekil 4.24). Man-LAM ile uyarım temaslı kokültür modelinde CD62L ekspresyonunda artmaya neden olurken, bu uyarım TLR-2 antagonisti ile bloklandığında geri dönmüştür. CD107b ekspresyonu benzer şekilde temaslı modelde Man-LAM ile uyarımın etkisinin TLR-2 antagonisti ile geri döndüğü saptanmıştır (Şekil 4.25). CD44 ekspresyonu ise Man-LAM ile uyarım ve TLR-2 antagonisti ile bloklama durumunda, makrofajlarda ve kokültür modellerinde CD44 floresan yoğunluğunun çok değişmediği tespit edilmiştir (Çizelge 4.3).

Ek olarak Man-LAM ile uyarım makrofajlarda ve temassız kokültür modelinde CD153 ekspresyonunda artmaya neden olmuştur. Bu artış hücrelerin anti-TLR-2 ile bloklandığı durumda makrofaj ve temassız kokültür modelinde CD153 ekspresyonunda daha da yükselmiştir. Temaslı modelde, bloklama ile ekspresyonun azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.28).

Araştırmalarımızda elde edilen bulgular ve yukarıdaki açıklamalardan da anlaşılabileceği gibi, Mtb'ye karşı gelişen makrofaj ve diğer immün yanıtların daha doğru ve in vivo araştırmalara yakın anlamlı sonuçların elde edilerek değerlendirilmesi için in vitro çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. In vitro çalışmalar bir çok deneysel manüplasyon için daha uygun olmaktadır. Bu açıdan bakıldığında mekanizmaya yönelik daha fazla cevabın elde edilmesini sağlamaktadır. Ancak daha doğru ve anlamlı sonuçların elde edilmesi için in vitro deney sistemlerinin koşullarının tasarlanarak uygulanması gereklidir. Hücrelerin tek başına kültür edildiği in vitro deney sistemlerinin yanı sıra, birlikte kültüre edildiği Mtb çalışmaları açısından daha uygun ve anlamlı sonuçlar verebildiği gösterilmiştir. Bu teze konu teşkil eden deneysel çalışmalar, makrofaj ve fibroblast kokültür sistemlerinin, makrofaj yanıtlarının mekanizmalarının anlaşılmasında daha duyarlı bir deneysel sistem olabileceğini göstermiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Man-LAM'ın Mtb'nin virülansındaki rolü ile ilgili in vivo çalışmalarda çelişkili sonuçlar mevcuttur. Farklı sonuçların Man-LAM'ın yapısı, dozu ve maruziyet süresi ile ilişkili olduğunu ifade eden çalışmalar bulunmaktadır. Bizim çalışmamızda Man-LAM'ın makrofaj üzerine etkisinin, tüberkülozun karakteristik özelliği olan granülom formasyonunu sınırlandıran fibroblastların varlığında nasıl değiştiği araştırılmıştır. Bu çalışma Man-LAM'ın makrofaj farklılaşmasına etkisinin fibroblast - makrofaj kokültür modelinde incelendiği ilk çalışmadır. Çalışmamız sonucunda, makrofajların tek başına Man-LAM ile uyarımının immün düzenleyici etkiye neden olduğu gözlenirken bu etkinin fibroblast varlığında proinflamatuvar yanıt yönüne değiştiği tespit edilmiştir. Çalışmamız Man-LAM ile uyarımın fibroblast varlığında, fibroblast ile temas ve çözünür faktörlerin etkisi ile makrofajın aktivasyoundaki değişimin gösterildiği ilk araştırma olması nedeniyle önemlidir.

Man-LAM ile makrofajların uyarım sonuçlarımız, H37Rv suşu Man-LAM'ı ile benzer sürede uyarım yapılan çalışmalar ile benzerlik göstermiştir ve Man-LAM'ın makrofajlarda immün düzenleyici yanıta neden olduğu saptanmıştır. Fibroblast varlığında Man-LAM ile uyarıma dair herhangi bir çalışma bulunamamıştır. Fibroblast - makrofaj kokültürü çalışmaları yara ve tümör modellerinde çalışılmış, bu çalışmalarda da fibroblastların varlığının immün yanıtı arttırdığı gösterilmiştir.

Çalışmamızda Man-LAM ile uyarımın fibroblast ile temas ve çözünür faktörlerin etkisi ile makrofaj aktivasyonunda artış ile sonuçlandığı gösterilmiştir. Bu tüberkülozda hastalığın sınırlandırılmasında önemli bir işlev gören granülom formasyonunda fibroblastların aktif bir rol oynadığı anlamına da gelmektedir. Bu nedenle bu hücrelerin aşı ve tedavi uygulamaları için hedef olabileceği kanısına varılmıştır. Böylelikle çalışmamızın aşı ve tedavi çalışmalarına da yeni bir bakış getirme ihtimali vardır.

Tüberkülozda makrofaj ve diğer hücreler tarafından meydana getirilen immün yanıtların daha doğru ve in vivo araştırmalara yakın anlamlı sonuçların elde edilerek değerlendirilmesi için in vitro çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. İn vitro çalışmamız, bir çok deneysel manüplasyon için uygunluk ve mekanizmaya yönelik daha fazla yanıtın elde

edilmesini sağlamıştır. Özellikle Mtb çalışmaları açısından hücrelerin tek başına kültür edildiği in vitro deney sistemlerinin yanı sıra, birlikte kültür edildiği kokültürlerin daha uygun ve anlamlı sonuçlar verebildiği, makrofaj ve fibroblast kokültür sistemlerinin, makrofaj yanıtlarının mekanizmalarının anlaşılmasında daha duyarlı bir deneysel sistem olabileceği gösterilmiştir.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar:

- Man-LAM uyarımının, fibroblast varlığında makrofaj farklılaşmasına etkisi ilk kez değerlendirilmiştir.
- 3T3 fibroblast hücreleri ve J774.1 makrofaj hücreleri tek başlarına Man-LAM ile uyarıma immün düzenleyici yant vermiştir.
- Kokültür modelinde fibroblast ve makrofaj hücreleri Man-LAM ile uyarıma proinflamatuvar yanıtta artış, anti-inflamatuvar yanıtta azalma ve makrofaj aktivasyonnda artış ile yanıt vermiştir.
- Man-LAM ile uyarımın makrofajlardan ve temaslı kokültür modelinde CD103 ekspresyonuna neden olduğu gösterilmiştir.
- TLR-2 ‘nin bloklanması, Man-LAM ile uyarımın abartılı inflamatuvar yanıt oluşturmasına neden olmuştur. TLR-2’nin Man-LAM’a yanıtta inflamasyonun düzenlenmesinde işlev gördüğü kanısına varılmıştır.

Bundan sonra yapılması gerekenler:

- Çalışmamızda sitokin analizleri yapılmış, kemokin değişimlerinin analizinin yapılması bu değişimin diğer hücreleri nasıl etkileyeceğinin anlaşılması açısından yararlı olabilecektir.
- Çalışmamız fare hücre dizininde in vitro olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın in vivo fare modelinde ve insan dokusundaki durumunun analiz edilmesine ihtiyaç vardır.
- Man-LAM’ın etkisinin TLR-2 ile birlikte TLR-4 yolağının birlikte bloklanması durumunda tekrar değerlendirilebilir. Böylelikle TLR-2 bloklanması durumunda

oluşan etkinin alternatif olarak TLR-4'ün aktivasyonu ile ilişkili olup olmadığı anlaşılabilir.

- Ayrıca in vivo TLR-2 yoksun farelerde çalışma yolağın etkisinin anlaşılması için çalışılabilir.
- Fibroblast, Man-LAM ve TLR-2'nin in vivo olarak tedavi ve aşı hedefi olarak kullanım çalışmaları gerçekleştirilebilir.
- CD103 oral toleransın yapılandırılması işleminde çok önemli rol aldıkları düşünülmektedir. ManLAM'ın CD103 ekspresyonuna etkisinin daha ayrıntılı çalışılması, akciğer mukozasında CD103 bağımlı anti-inflamatuvar özelliklerin açığa çıkmasındaki mekanizmaları etkileme özelliği ortaya konulabilir.

KAYNAKLAR

Abbas AK, Lichtman HA ve Pillai S (Ed). (2007). *Cellular and Molecular Immunology*, Philadelphia: Saunders an Elsevier, 6th ed., 19-374.

Abebe, F., ve Bjune, G. (2009). The protective role of antibody responses during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clinical and Experimental Immunology*, *157*(2), 235–243.

Abebe, M., Kim, L., Rook, G., Aseffa, A., Wassie, L., Zewdie, M., … Doherty, T. M. (2011). Modulation of cell death by *M. tuberculosis* as a strategy for pathogen survival. *Clinical & Developmental Immunology*, 2011, 678570.

Afonso-Barroso, A., Clark, S. O., Williams, A., Rosa, G. T., Nóbrega, C., Silva-Gomes, S., … Appelberg, R. (2012). Lipoarabinomannan mannose caps do not affect mycobacterial virulence or the induction of protective immunity in experimental animal models of infection and have minimal impact on in vitro inflammatory responses. *Cellular Microbiology*.

Ahmad, S. (2011). Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clinical ve Developmental Immunology*, *2011*, 814943.

Albayrak, N., Biriken, D., ve Ozenci, H. (2006). Investigation of the bactericidal effect of urinary epithelial cells against different doses of *Escherichia coli*. *Mikrobiyoloji bülteni*, *40*(3), 195–200.

Aquino, A., Graziani, G., Franzese, O., Prete, S. P., Bonmassar, E., Bonmassar, L., ve D'Atri, S. (2011). Exogenous control of the expression of Group I CD1 molecules competent for presentation of microbial nonpeptide antigens to human T lymphocytes. *Clinical & Developmental Immunology*, *2011*, 790460.

Aujla, S. J., Dubin, P. J., ve Kolls, J. K. (2007). Th17 cells and mucosal host defense. *Seminars in Immunology*, *19*(6), 377–382.

Baena, A., ve Porcelli, S. A. (2009). Evasion and subversion of antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tissue Antigens*, *74*(3), 189–204.

Bağrıaçık, E.Ü. (2013). Besin allerjilerinin immün mekanizmaları. *Türkiye Klinikleri İmmünoloji Allerji,* 6(1), 1-9.

Barnas, J. L., Simpson-Abelson, M. R., Yokota, S. J., Kelleher, R. J., ve Bankert, R. B. (2010). T cells and stromal fibroblasts in human tumor microenvironments represent potential therapeutic targets. *Cancer Microenvironment: Official Journal of the International Cancer Microenvironment Society*, *3*(1), 29–47.

Barry, C. E., 3rd, Boshoff, H. I., Dartois, V., Dick, T., Ehrt, S., Flynn, J., … Young, D. (2009). The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. *Nature Reviews. Microbiology*, *7*(12), 845–855.

Behar, S. M., Martin, C. J., Nunes-Alves, C., Divangahi, M., ve Remold, H. G. (2011). Lipids, apoptosis, and cross-presentation: links in the chain of host defense against *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, *13*(8-9), 749–756.

Benoit, M., Desnues, B., ve Mege, J.-L. (2008). Macrophage polarization in bacterial infections. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *181*(6), 3733–3739.

Berrington, W. R., ve Hawn, T. R. (2007). *Mycobacterium tuberculosis*, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter? *Immunological Reviews*, *219*, 167–186.

Bhatt, K., Kim, A., Kim, A., Mathur, S., ve Salgame, P. (2013). Equivalent functions for B7.1 and B7.2 costimulation in mediating host resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *Cellular Immunology*, *285*(1-2), 69–75.

Briken, V., Porcelli, S. A., Besra, G. S., ve Kremer, L. (2004). Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Molecular Microbiology*, *53*(2), 391–403.

Castaño, D., Barrera, L. F., ve Rojas, M. (2011). *Mycobacterium tuberculosis* alters the differentiation of monocytes into macrophages in vitro. *Cellular Immunology*, *268*(2), 60–67.

Cavalcanti, Y. V. N., Brelaz, M. C. A., Neves, J. K. de A. L., Ferraz, J. C., ve Pereira, V. R. A. (2012). Role of TNF-Alpha, IFN-Gamma, and IL-10 in the Development of Pulmonary Tuberculosis. *Pulmonary Medicine*, *2012*, 745483.

Chatterjee, D., ve Khoo, K. H. (1998). Mycobacterial lipoarabinomannan: an extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effects. *Glycobiology*, *8*(2), 113–120.

Cilfone, N. A., Perry, C. R., Kirschner, D. E., ve Linderman, J. J. (2013). Multi-scale modeling predicts a balance of tumor necrosis factor-α and interleukin-10 controls the granuloma environment during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *PloS One*, *8*(7), e68680.

Cooper, A. M. (2009). T cells in mycobacterial infection and disease. *Current Opinion in Immunology*, *21*(4), 378–384.

Cooper, A. M., ve Khader, S. A. (2008). The role of cytokines in the initiation, expansion, and control of cellular immunity to tuberculosis. *Immunological Reviews*, *226*, 191–204.

Cooper, A. M., Mayer-Barber, K. D., ve Sher, A. (2011). Role of innate cytokines in mycobacterial infection. *Mucosal Immunology*, *4*(3), 252–260.

Cooper, A. M., Solache, A., ve Khader, S. A. (2007). Interleukin-12 and tuberculosis: an old story revisited. *Current Opinion in Immunology*, *19*(4), 441–447.

Culley, F. J. (2009). Natural killer cells in infection and inflammation of the lung. *Immunology*, *128*(2), 151–163.

Dao, D. N., Kremer, L., Guérardel, Y., Molano, A., Jacobs, W. R., Jr, Porcelli, S. A., ve Briken, V. (2004). *Mycobacterium tuberculosis* lipomannan induces apoptosis and interleukin-12 production in macrophages. *Infection and Immunity*, *72*(4), 2067–2074.

Das, S., Banerjee, S., Majumder, S., Paul Chowdhury, B., Goswami, A., Halder, K., … Majumdar, S. (2014). Immune subversion by *Mycobacterium tuberculosis* through CCR5 mediated signaling: involvement of IL-10. *PloS One*, *9*(4), e92477.

Deretic, V. (2012). Autophagy as an innate immunity paradigm: expanding the scope and repertoire of pattern recognition receptors. *Current Opinion in Immunology*, *24*(1), 21–31.

Deretic, V., Delgado, M., Vergne, I., Master, S., De Haro, S., Ponpuak, M., ve Singh, S. (2009). Autophagy in immunity against *Mycobacterium tuberculosis:* a model system to dissect immunological roles of autophagy. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, *335*, 169–188.

Deretic, V., Singh, S., Master, S., Harris, J., Roberts, E., Kyei, G., … Vergne, I. (2006). *Mycobacterium tuberculosis* inhibition of phagolysosome biogenesis and autophagy as a host defence mechanism. *Cellular Microbiology*, *8*(5), 719–727.

Dheda, K., Schwander, S. K., Zhu, B., van Zyl-Smit, R. N., ve Zhang, Y. (2010). The immunology of tuberculosis: from bench to bedside. *Respirology (Carlton, Vic.)*, *15*(3), 433–450.

Drennan, M. B., Nicolle, D., Quesniaux, V. J. F., Jacobs, M., Allie, N., Mpagi, J., … Ryffel, B. (2004). Toll-like receptor 2-deficient mice succumb to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *The American Journal of Pathology*, *164*(1), 49–57.

Druszczyńska, M., Kowalewicz-Kulbat, M., Fol, M., Włodarczyk, M., ve Rudnicka, W. (2012). Latent *M. tuberculosis* infection--pathogenesis, diagnosis, treatment and prevention

strategies. *Polish Journal of Microbiology / Polskie Towarzystwo Mikrobiologów = The Polish Society of Microbiologists*, *61*(1), 3–10.

Dulphy, N., Herrmann, J.-L., Nigou, J., Réa, D., Boissel, N., Puzo, G., … Toubert, A. (2007). Intermediate maturation of *Mycobacterium tuberculosis* LAM-activated human dendritic cells. *Cellular Microbiology*, *9*(6), 1412–1425.

Duque, C., Arroyo, L., Ortega, H., Montúfar, F., Ortíz, B., Rojas, M., ve Barrera, L. F. (2014). Different responses of human mononuclear phagocyte populations to *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, *94*(2), 111–122. doi:10.1016/j.tube.2013.11.001

Ehlers, S. (2010). DC-SIGN and mannosylated surface structures of *Mycobacterium tuberculosis*: a deceptive liaison. *European Journal of Cell Biology*, *89*(1), 95–101.

Ehlers, S., ve Schaible, U. E. (2012). The granuloma in tuberculosis: dynamics of a host-pathogen collusion. *Frontiers in Immunology*, *3*, 411.

Ellis, G., Adatia, I., Yazdanpanah, M., ve Makela, S. K. (1998). Nitrite and nitrate analyses: a clinical biochemistry perspective. *Clinical Biochemistry*, *31*(4), 195–220.

Esin, S., Counoupas, C., Aulicino, A., Brancatisano, F. L., Maisetta, G., Bottai, D., … Batoni, G. (2013). Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* cell wall components with the human natural killer cell receptors NKp44 and Toll-like receptor 2. *Scandinavian Journal of Immunology*, *77*(6), 460–469.

Fenton, M. J., ve Vermeulen, M. W. (1996). Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infection and Immunity*, *64*(3), 683–690.

Flores-Batista, V. C. S., Boechat, N., Lago, P. M., Lazzarini, L. C., Pessanha, L. R., Almeida, A. S., … Lapa-e-Silva, J. R. (2007). Low expression of antigen-presenting and costimulatory molecules by lung cells from tuberculosis patients. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et Al.]*, *40*(12), 1671–1679.

Flynn, J. L., Chan, J., ve Lin, P. L. (2011). Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis. *Mucosal Immunology*, *4*(3), 271–278.

Fukuda, T., Matsumura, T., Ato, M., Hamasaki, M., Nishiuchi, Y., Murakami, Y., … Morita, Y. S. (2013). Critical roles for lipomannan and lipoarabinomannan in cell wall integrity of mycobacteria and pathogenesis of tuberculosis. *mBio*, *4*(1), e00472–00412.

Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Lyakh, L. A., Batoni, G., Esin, S., Winkler-Pickett, R. T., … Trinchieri, G. (2008). Differential regulation of interleukin 12 and interleukin 23

production in human dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *205*(6), 1447–1461.

Gilleron, M., Bala, L., Brando, T., Vercellone, A., ve Puzo, G. (2000). *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv parietal and cellular lipoarabinomannans. Characterization of the acyl- and glyco-forms. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(1), 677–684.

Gómez-Sintes, R., Hernández, F., Lucas, J. J., ve Avila, J. (2011). GSK-3 Mouse Models to Study Neuronal Apoptosis and Neurodegeneration. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *4*, 45.

González-Avila, G., Sandoval, C., Herrera, M. T., Ruiz, V., Sommer, B., Sada, E., … Sarabia, M. C. (2009). *Mycobacterium tuberculosis* effects on fibroblast collagen metabolism. *Respiration; International Review of Thoracic Diseases*, *77*(2), 195–202.

Green, J. A., Dholakia, S., Janczar, K., Ong, C. W., Moores, R., Fry, J., … Friedland, J. S. (2011). *Mycobacterium tuberculosis*-infected human monocytes down-regulate microglial MMP-2 secretion in CNS tuberculosis via TNFα, NFκB, p38 and caspase 8 dependent pathways. *Journal of Neuroinflammation*, *8*, 46.

Guevara, I., Iwanejko, J., Dembińska-Kieć, A., Pankiewicz, J., Wanat, A., Anna, P., … Szczudlik, A. (1998). Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, *274*(2), 177–188.

Guirado, E., Schlesinger, L. S., ve Kaplan, G. (2013). Macrophages in tuberculosis: friend or foe. *Seminars in Immunopathology*, *35*(5), 563–583.

Guo, S., Xue, R., Li, Y., Wang, S. M., Ren, L., ve Xu, J. J. (2012). The CFP10/ESAT6 complex of *Mycobacterium tuberculosis* may function as a regulator of macrophage cell death at different stages of tuberculosis infection. *Medical Hypotheses*, *78*(3), 389–392.

Hamza, T., Barnett, J. B., ve Li, B. (2010). Interleukin 12 a key immunoregulatory cytokine in infection applications. *International Journal of Molecular Sciences*, *11*(3), 789–806.

Harding, C. V., ve Boom, W. H. (2010). Regulation of antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*: a role for Toll-like receptors. *Nature Reviews. Microbiology*, *8*(4), 296–307.

Harris, J., Hope, J. C., ve Lavelle, E. C. (2009). Autophagy and the immune response to TB. *Transboundary and Emerging Diseases*, *56*(6-7), 248–254.

Harris, J., Master, S. S., De Haro, S. A., Delgado, M., Roberts, E. A., Hope, J. C., … Deretic, V. (2009). Th1-Th2 polarisation and autophagy in the control of intracellular

mycobacteria by macrophages. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *128*(1-3), 37–43.

He, Z.-L., Du, F.-W., ve Du, X.-Z. (2013). The viable *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra strain induces a stronger mouse macrophage response compared to the heat-inactivated H37Rv strain. *Molecular Medicine Reports*, *7*(5), 1597–1602.

Jordao, L., ve Vieira, O. V. (2011). Tuberculosis: new aspects of an old disease. *International Journal of Cell Biology*, *2011*, 403623. doi:10.1155/2011/403623

Jung, J.-Y., Madan-Lala, R., Georgieva, M., Rengarajan, J., Sohaskey, C. D., Bange, F.-C., ve Robinson, C. M. (2013). The intracellular environment of human macrophages that produce nitric oxide promotes growth of mycobacteria. *Infection and Immunity*, *81*(9), 3198–3209.

Kang, B. Y., Chung, S. W., Lim, Y. S., Kim, E. J., Kim, S. H., Hwang, S. Y., ve Kim, T. S. (1999). Interleukin-12-secreting fibroblasts are more efficient than free recombinant interleukin-12 in inducing the persistent resistance to *Mycobacterium avium* complex infection. *Immunology*, *97*(3), 474–480.

Kang, P. B., Azad, A. K., Torrelles, J. B., Kaufman, T. M., Beharka, A., Tibesar, E., … Schlesinger, L. S. (2005). The human macrophage mannose receptor directs *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *The Journal of Experimental Medicine*, *202*(7), 987–999.

Kaufmann, S. H. E. (2002). Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *61 Suppl 2*, ii54–58.

Khader, S. A., ve Cooper, A. M. (2008). IL-23 and IL-17 in tuberculosis. *Cytokine*, *41*(2), 79–83.

Kim, T. S., Chung, S. W., Kang, B. Y., Choe, Y. Y., ve Hwang, S. Y. (2000). Induction of in vivo persistent anti-mycobacterial activity by interferon-gamma-secreting fibroblasts. *Vaccine*, *18*(11-12), 1067–1073.

King, S. N., Chen, F., Jetté, M. E., ve Thibeault, S. L. (2013). Vocal fold fibroblasts immunoregulate activated macrophage phenotype. *Cytokine*, *61*(1), 228–236.

Kleinnijenhuis, J., Oosting, M., Joosten, L. A. B., Netea, M. G., ve Van Crevel, R. (2011). Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis. Clinical & Developmental Immunology*, *2011*, 405310.

Krishnan, N., Malaga, W., Constant, P., Caws, M., Tran, T. H. C., Salmons, J., … Thwaites, G. E. (2011). *Mycobacterium tuberculosis* lineage influences innate immune response

and virulence and is associated with distinct cell envelope lipid profiles. *PloS One*, *6*(9), e23870.

Kurowska-Stolarska, M., Stolarski, B., Kewin, P., Murphy, G., Corrigan, C. J., Ying, S., … Liew, F. Y. (2009). IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *183*(10), 6469–6477.

Lee, K.-S., Kim, H.-R., Kwak, S., Choi, K.-H., Cho, J.-H., Lee, Y.-J., … Park, D.-S. (2013). Association between elevated pleural interleukin-33 levels and tuberculous pleurisy. *Annals of Laboratory Medicine*, *33*(1), 45–51.

Leemans, J. C., Florquin, S., Heikens, M., Pals, S. T., van der Neut, R., ve Van Der Poll, T. (2003). CD44 is a macrophage binding site for *Mycobacterium tuberculosis* that mediates macrophage recruitment and protective immunity against tuberculosis. *The Journal of Clinical Investigation*, *111*(5), 681–689.

Lehrer, R. I. (2004). Primate defensins. *Nature Reviews. Microbiology*, *2*(9), 727–738.

Leirião, P., del Fresno, C., ve Ardavín, C. (2012). Monocytes as effector cells: activated Ly-6C(high) mouse monocytes migrate to the lymph nodes through the lymph and cross-present antigens to CD8+ T cells. *European Journal of Immunology*, *42*(8), 2042–2051.

Li, C., Du, Q., Deng, W., ve Xie, J. (2012). The biology of Mycobacterium cord factor and roles in pathogen-host interaction. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, *22*(4), 289–297.

Maeda, N., Nigou, J., Herrmann, J.-L., Jackson, M., Amara, A., Lagrange, P. H., … Neyrolles, O. (2003). The cell surface receptor DC-SIGN discriminates between *Mycobacterium species* through selective recognition of the mannose caps on lipoarabinomannan. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(8), 5513–5516.

Mahon, R. N., Sande, O. J., Rojas, R. E., Levine, A. D., Harding, C. V., ve Boom, W. H. (2012). *Mycobacterium tuberculosis* ManLAM inhibits T-cell-receptor signaling by interference with ZAP-70, Lck and LAT phosphorylation. *Cellular Immunology*, *275*(1-2), 98–105.

Mariotti, S., Sargentini, V., Pardini, M., Giannoni, F., De Spirito, M., Gagliardi, M. C., … Nisini, R. (2013). *Mycobacterium tuberculosis* may escape helper T cell recognition by infecting human fibroblasts. *Human Immunology*, *74*(6), 722–729.

Martinez, A. N., Mehra, S., ve Kaushal, D. (2013). Role of interleukin 6 in innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *The Journal of Infectious Diseases*, *207*(8), 1253–1261.

Martino, A. (2008). Mycobacteria and innate cells: critical encounter for immunogenicity. *Journal of Biosciences*, *33*(1), 137–144.

Mattila, J. T., Ojo, O. O., Kepka-Lenhart, D., Marino, S., Kim, J. H., Eum, S. Y., … Flynn, J. L. (2013). Microenvironments in tuberculous granulomas are delineated by distinct populations of macrophage subsets and expression of nitric oxide synthase and arginase isoforms. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *191*(2), 773–784.

Mazurek, J., Ignatowicz, L., Kallenius, G., Svenson, S. B., Pawlowski, A., ve Hamasur, B. (2012). Divergent effects of mycobacterial cell wall glycolipids on maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells. *PloS One*, *7*(8), e42515.

Min, B.-K., Suk, K., ve Lee, W.-H. (2013). Stimulation of CD107 affects LPS-induced cytokine secretion and cellular adhesion through the ERK signaling pathway in the human macrophage-like cell line, THP-1. *Cellular Immunology*, *281*(2), 122–128.

Müller, L. L., Bennet, R., Gaines, H., Zedenius, I., & Berggren, I. (2008). Complexity in estimating recent tuberculosis transmission among predominantly immigrant school children in Stockholm, Sweden 2006. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases,* 40(9), 709–714.

Nakano, H., Free, M. E., Whitehead, G. S., Maruoka, S., Wilson, R. H., Nakano, K., ve Cook, D. N. (2012). Pulmonary CD103(+) dendritic cells prime Th2 responses to inhaled allergens. *Mucosal Immunology*, *5*(1), 53–65.

Nicod, L. P. (2007). Immunology of tuberculosis. *Swiss Medical Weekly*, *137*(25-26), 357–362.

Nigou, J., Gilleron, M., Cahuzac, B., Bounéry, J. D., Herold, M., Thurnher, M., ve Puzo, G. (1997). The phosphatidyl-myo-inositol anchor of the lipoarabinomannans from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guérin. Heterogeneity, structure, and role in the regulation of cytokine secretion. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*(37), 23094–23103.

Nigou, J., Gilleron, M., ve Puzo, G. (2003). Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis. *Biochimie*, *85*(1-2), 153–166.

Nomura, K., Kojima, T., Fuchimoto, J., Obata, K., Keira, T., Himi, T., ve Sawada, N. (2012). Regulation of interleukin-33 and thymic stromal lymphopoietin in human nasal fibroblasts by proinflammatory cytokines. *The Laryngoscope*, *122*(6), 1185–1192.

Noss, E. H., Pai, R. K., Sellati, T. J., Radolf, J. D., Belisle, J., Golenbock, D. T., … Harding, C. V. (2001). Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *167*(2), 910–918.

O'Kane, C. M., Boyle, J. J., Horncastle, D. E., Elkington, P. T., ve Friedland, J. S. (2007). Monocyte-dependent fibroblast CXCL8 secretion occurs in tuberculosis and limits survival of mycobacteria within macrophages. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *178*(6), 3767–3776.

O'Kane, C. M., Elkington, P. T., Jones, M. D., Caviedes, L., Tovar, M., Gilman, R. H., … Friedland, J. S. (2010). STAT3, p38 MAPK, and NF-kappaB drive unopposed monocyte-dependent fibroblast MMP-1 secretion in tuberculosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *43*(4), 465–474.

O'Leary, S., O'Sullivan, M. P., ve Keane, J. (2011). IL-10 blocks phagosome maturation in mycobacterium tuberculosis-infected human macrophages. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *45*(1), 172–180.

Oboki, K., Ohno, T., Kajiwara, N., Saito, H., ve Nakae, S. (2010). IL-33 and IL-33 receptors in host defense and diseases. *Allergology International: Official Journal of the Japanese Society of Allergology*, *59*(2), 143–160.

Pan, Q., Wang, Q., Sun, X., Xia, X., Wu, S., Luo, F., ve Zhang, X.-L. (2014). Aptamer Against Mannose-capped Lipoarabinomannan Inhibits Virulent *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Mice and Rhesus Monkeys. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, *22*(5), 940–951.

Park, S. H., ve Bendelac, A. (2000). CD1-restricted T-cell responses and microbial infection. *Nature*, *406*(6797), 788–792.

Pitarque, S., Larrouy-Maumus, G., Payré, B., Jackson, M., Puzo, G., ve Nigou, J. (2008). The immunomodulatory lipoglycans, lipoarabinomannan and lipomannan, are exposed at the mycobacterial cell surface. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, *88*(6), 560–565.

Polumuri, S. K., Jayakar, G. G., Shirey, K. A., Roberts, Z. J., Perkins, D. J., Pitha, P. M., ve Vogel, S. N. (2012). Transcriptional regulation of murine IL-33 by TLR and non-TLR agonists. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *189*(1), 50–60.

Rahman, A., Sobia, P., Gupta, N., Kaer, L. V., ve Das, G. (2014). *Mycobacterium tuberculosis* subverts the TLR-2-MyD88 pathway to facilitate its translocation into the cytosol. *PloS One*, *9*(1), e86886.

Rama, D., Esendagli, G., ve Guc, D. (2011). Expression of chemokine-like receptor 1 (CMKLR1) on J774A.1 macrophages co-cultured with fibroblast and/or tumor cells: modeling the influence of microenvironment. *Cellular Immunology*, *271*(1), 134–140.

Ramakrishnan, L. (2012). Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nature Reviews. Immunology*, *12*(5), 352–366.

Rapanoel, H. A., Mazandu, G. K., ve Mulder, N. J. (2013). Predicting and analyzing interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and its human host. *PloS One*, *8*(7), e67472.

Rastogi, N., Labrousse, V., ve de Sousa, J. P. (1992). Mycobacterial growth and ultrastructure in mouse L-929 fibroblasts and bone marrow-derived macrophages: evidence that infected fibroblasts secrete mediators capable of modulating bacterial growth in macrophages. *Current Microbiology*, *25*(4), 203–213.

Ray, J. C. J., Wang, J., Chan, J., ve Kirschner, D. E. (2008). The timing of TNF and IFN-gamma signaling affects macrophage activation strategies during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Journal of Theoretical Biology*, *252*(1), 24–38.

Redford, P. S., Murray, P. J., ve O'Garra, A. (2011). The role of IL-10 in immune regulation during *M. tuberculosis* infection. *Mucosal Immunology*, *4*(3), 261–270.

Reeme, A. E., Miller, H. E., ve Robinson, R. T. (2013). IL12B expression is sustained by a heterogenous population of myeloid lineages during tuberculosis. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, *93*(3), 343–356.

Roca, F. J., ve Ramakrishnan, L. (2013). TNF dually mediates resistance and susceptibility to mycobacteria via mitochondrial reactive oxygen species. *Cell*, *153*(3), 521–534.

Rocha-Ramírez, L. M., Estrada-García, I., López-Marín, L. M., Segura-Salinas, E., Méndez-Aragón, P., Van Soolingen, D., … Isibasi, A. (2008). *Mycobacterium tuberculosis* lipids regulate cytokines, TLR-2/4 and MHC class II expression in human macrophages. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, *88*(3), 212–220.

Rodrigues, M. F., Alves, C. C. S., Figueiredo, B. B. M., Rezende, A. B., Wohlres-Viana, S., Silva, V. L. da, … Teixeira, H. C. (2013). Tumour necrosis factor receptors and apoptosis of alveolar macrophages during early infection with attenuated and virulent *Mycobacterium bovis*. *Immunology*, *139*(4), 503–512.

Russell, D. G., Barry, C. E., 3rd, ve Flynn, J. L. (2010). Tuberculosis: what we don't know can, and does, hurt us. *Science (New York, N.Y.)*, *328*(5980), 852–856.

Russell, D. G., Cardona, P.-J., Kim, M.-J., Allain, S., ve Altare, F. (2009). Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nature Immunology*, *10*(9), 943–948.

Saenz, S. A., Taylor, B. C., ve Artis, D. (2008). Welcome to the neighborhood: epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites. *Immunological Reviews*, *226*, 172–190.

Saiga, H., Shimada, Y., ve Takeda, K. (2011). Innate immune effectors in mycobacterial infection. *Clinical & Developmental Immunology*, *2011*, 347594.

Salin, D. B., Albayrak, N., Yildiz, S., ve Ozenci, H. (2009). Investigation of bactericidal effect and nitric oxide responses of Caco-2 epithelial cells and THP-1 macrophage cells against *Streptococcus pyogenes* and *Escherichia coli*. *Mikrobiyoloji bülteni*, *43*(3), 373–381.

Seltmann, J., Werfel, T., ve Wittmann, M. (2013). Evidence for a regulatory loop between IFN-γ and IL-33 in skin inflammation. *Experimental Dermatology*, *22*(2), 102–107.

Serbina, N. V., Jia, T., Hohl, T. M., ve Pamer, E. G. (2008). Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annual Review of Immunology*, *26*, 421–452.

Singh, P. P., ve Goyal, A. (2013). Interleukin-6: a potent biomarker of mycobacterial infection. *SpringerPlus*, *2*, 686.

Singh, P. P., LeMaire, C., Tan, J. C., Zeng, E., ve Schorey, J. S. (2011). Exosomes released from *M. tuberculosis* infected cells can suppress IFN-γ mediated activation of naïve macrophages. *PloS One*, *6*(4), e18564.

Singh, V., Jain, S., Gowthaman, U., Parihar, P., Gupta, P., Gupta, U. D., ve Agrewala, J. N. (2011). Co-administration of IL-1+IL-6+TNF-α with *Mycobacterium tuberculosis* infected macrophages vaccine induces better protective T cell memory than BCG. *PloS One*, *6*(1), e16097.

Slight, S. R., ve Khader, S. A. (2013). Chemokines shape the immune responses to tuberculosis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *24*(2), 105–113.

Tobian, A. A. R., Potter, N. S., Ramachandra, L., Pai, R. K., Convery, M., Boom, W. H., ve Harding, C. V. (2003). Alternate class I MHC antigen processing is inhibited by Toll-like receptor signaling pathogen-associated molecular patterns: *Mycobacterium tuberculosis* 19-kDa lipoprotein, CpG DNA, and lipopolysaccharide. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *171*(3), 1413–1422.

Tomioka, H., Tatano, Y., Maw, W. W., Sano, C., Kanehiro, Y., ve Shimizu, T. (2012). Characteristics of suppressor macrophages induced by mycobacterial and protozoal infections in relation to alternatively activated M2 macrophages. *Clinical & Developmental Immunology*, *2012*, 635451.

Torrado, E., ve Cooper, A. M. (2013). Cytokines in the balance of protection and pathology during mycobacterial infections. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *783*, 121–140.

Torrelles, J. B., Azad, A. K., ve Schlesinger, L. S. (2006). Fine discrimination in the recognition of individual species of phosphatidyl-myo-inositol mannosides from *Mycobacterium tuberculosis* by C-type lectin pattern recognition receptors. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *177*(3), 1805–1816.

Torrelles, J. B., DesJardin, L. E., MacNeil, J., Kaufman, T. M., Kutzbach, B., Knaup, R., … Schlesinger, L. S. (2009). Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* mannosyltransferase PİMB reduces the cell wall lipoarabinomannan and lipomannan content and increases the rate of bacterial-induced human macrophage cell death. *Glycobiology*, *19*(7), 743–755.

Torrelles, J. B., Khoo, K.-H., Sieling, P. A., Modlin, R. L., Zhang, N., Marques, A. M., … Chatterjee, D. (2004). Truncated structural variants of lipoarabinomannan in *Mycobacterium leprae* and an ethambutol-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(39), 41227–41239.

Torrelles, J. B., Knaup, R., Kolareth, A., Slepushkina, T., Kaufman, T. M., Kang, P., … Schlesinger, L. S. (2008). Identification of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates with altered phagocytosis by human macrophages due to a truncated lipoarabinomannan. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(46), 31417–31428.

Torrelles, J. B., Sieling, P. A., Arcos, J., Knaup, R., Bartling, C., Rajaram, M. V. S., … Schlesinger, L. S. (2011). Structural differences in lipomannans from pathogenic and nonpathogenic mycobacteria that impact CD1b-restricted T cell responses. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(41), 35438–35446.

Tufariello, J. M., Chan, J., ve Flynn, J. L. (2003). Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. *The Lancet Infectious Diseases*, *3*(9), 578–590.

Urdahl, K. B., Shafiani, S., ve Ernst, J. D. (2011). Initiation and regulation of T-cell responses in tuberculosis. *Mucosal Immunology*, *4*(3), 288–293.

Van Crevel, R., Ottenhoff, T. H. M., ve van der Meer, J. W. M. (2003). Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *531*, 241–247.

Wang, J.-Y., Chang, H.-C., Liu, J.-L., Shu, C.-C., Lee, C.-H., Wang, J.-T., ve Lee, L.-N. (2012). Expression of toll-like receptor 2 and plasma level of interleukin-10 are associated with outcome in tuberculosis. *European Journal of Clinical Microbiology ve Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, *31*(9), 2327–2333.

World Health Organization. (2012). Global Tuberculosis Report, 2012. Minimum graphics, 2012. France.

World Health Organization. (2013). Global Tuberculosis Report, 2013. Minimum graphics, 2013. France.

Wieland, C. W., van der Windt, G. J. W., Florquin, S., McKenzie, A. N. J., ve van der Poll, T. (2009). ST2 deficient mice display a normal host defense against pulmonary infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, *11*(4), 524–530.

Wojtas, B., Fijalkowska, B., Wlodarczyk, A., Schollenberger, A., Niemialtowski, M., Hamasur, B., … Krzyzowska, M. (2011). Mannosylated lipoarabinomannan balances apoptosis and inflammatory state in mycobacteria-infected and uninfected bystander macrophages. *Microbial Pathogenesis*, *51*(1-2), 9–21.

Wu, M., Aung, H., Hirsch, C. S., ve Toossi, Z. (2012). Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis*-induced signalling by transforming growth factor-β in human mononuclear phagocytes. *Scandinavian Journal of Immunology*, *75*(3), 301–304.

Wu, T., Guo, S., Wang, J., Li, L., Xu, L., Liu, P., … Luo, Y. (2011). Interaction between mannosylated lipoarabinomannan and dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing nonintegrin influences dendritic cells maturation and T cell immunity. *Cellular Immunology*, *272*(1), 94–101.

Yang, L., Sinha, T., Carlson, T. K., Keiser, T. L., Torrelles, J. B., ve Schlesinger, L. S. (2013). Changes in the major cell envelope components of *Mycobacterium tuberculosis* during in vitro growth. *Glycobiology*, *23*(8), 926–934.

Yu, C.-C., Liu, Y.-C., Chu, C.-M., Chuang, D.-Y., Wu, W.-C., ve Wu, H.-P. (2011). Factors associated with in vitro interferon-gamma production in tuberculosis. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan Yi Zhi*, *110*(4), 239–246.

Yu, X., Zeng, J., ve Xie, J. (2014). Navigating through the maze of TLR2 mediated signaling network for better mycobacterium infection control. *Biochimie*. 2014.02.012

Zuñiga, J., Torres-García, D., Santos-Mendoza, T., Rodriguez-Reyna, T. S., Granados, J., ve Yunis, E. J. (2012). Cellular and humoral mechanisms involved in the control of tuberculosis. *Clinical & Developmental Immunology*, *2012*, 193923.



ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı: ALBAYRAK Nurhan

Uyruğu: T.C.

Doğum Tarihi ve Yeri: 12.01.1973 / Almanya-Aalen

Medeni Hali: Evli

Telefon numarası: 0533 2178045 / 0312 5655328

e-posta: nurhanalbayrak@yahoo.com

Öğrenim Durumu:

Lisans-Yüksek Lisans;	Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi	1991-1997
Tıpta Uzmanlık;	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji	2001-2006
Doktora;	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Temel İmmünoloji	2008-2014

Tıpta Uzmanlık Tezi Başlığı:

İnsan ağız epitel hücresi ve insan ağız epitel hücre dizininin (KB) farklı miktarlardaki *Streptococcus pyogenes*'e karşı bakterisidal etkisinin ve sitokin yanıtlarının araştırılması

Görevler:

Ar. Görevlisi	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi	2001-2006
Uzm. Doktor	Çankırı Devlet Hastanesi	2006-2008
Uzm. Doktor	Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi, Ulusal İnfluenza Merkezi	2008-2010
Uzm. Doktor	Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi, Ulusal Tüberküloz Lab.	2010-2012
Uzm. Doktor	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Tüberküloz Ref. Lab.	2012-2013
Doç. Doktor	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Tüberküloz Ref. Lab.	2013-2014

Yabancı Dil

- İngilizce; ÜDS; 82,5 (2010), KPDS; 72 (2010)

ALES

- Eşit Ağırlık; 85 (2009)

Projelerde Yaptığı Görevler:

1. RSHMB Projesi, 2011: *Mycobacterium tuberculosis* hızlı tanısı için kullanılan farklı real-time PCR sistemlerin duyarlılığının konvansiyonel yöntemlerle karşılaştırılması. Proje Yürütücüsü
2. Gazi Üniversitesi BAP Projesi, 2011: Caco-2 Epitel Hücre ve THP-1 Monosit Hücrelerinin Kokültür Modelinde *Mycobacterium tuberculosis* Man-LAM ve 19kDa Lipoprotein Antijenleri ile Uyarımın Hücre Sitokin ve NO Yanıtlarına Etkisinin Araştırılması. Sorumlu Araştırmacı
3. RSHMB BAP Projesi, 2011: Akciğer ve akciğer dışı tüberkülozlu olgularda antitüberküloz ilaç direnci izlemi. Sorumlu Araştırmacı

4. RSHMB BAP Projesi, 2011: Tularemi tonsillofarenjitli olgularda sitokin yanıtının araştırılması. Sorumlu Araştırmacı
5. Dünya Bankası Projesi; Kuş Gribi kapsamında Ulusal Influenza Merkezi laboratuarının alt yapı güçlendirme projesi. Yardımcı Araştırmacı
6. Ankara Üniversitesi BAP Projesi, 2005-0809225. Caco2 epitel hücresi ve THP-1 makrofaj hücrelerinin *S.pyogenes* ve *E.coli*'ye karşı bakterisidal etkisinin araştırılması. Yardımcı Araştırmacı
7. Ankara Üniversitesi BAP Projesi, 2004-0809176. Ağız epitel hücre dizininin *S.pyogenes*'in farklı dozlarına karşı antibakteriyel etki ve sitokin yanıtının araştırılması. Sorumlu Araştırmacı
8. Ankara Üniversitesi BAP Projesi, 2003-0809109. Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH) veya Bronşektazi hastalarının bronşiyal epitel hücrelerinin antibakteriyel etkilerinin araştırılması. Yardımcı Araştırmacı

İdari Görevler:

1. Mart 2012 - halen; Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı, Merkez Laboratuvar Sorumlusu
2. Haziran – Temmuz 2008; Şabanözü İlçe Hastanesi, Çankırı; Kurucu Başhekimlik

Ödüller:

1. 'Ankara ilinde akciğer tüberkülozunda ilaç direnci taraması, 2011 yılı ilk altı aylık veriler' başlıklı çalışma ile Türk Toraks Derneği 15. Yıllık Kongresi Tüberküloz Çalışma Grubu Bildiri Ödülü. 11-15 Nisan 2012, Antalya.
2. 'Direnç Genlerinin Moleküler Yöntemlerle Araştırılması ve Sekanslama' eğitim ve öğretim başlığı ile 'Yetiştirilmek Amacıyla Yurtdışına Gönderilecek Devlet Memurları Yönetmeliği' uyarınca 2011 Yılında Yurtdışına Gönderilecek Personel olma hakkı.
3. 'Tüberküloz Laboratuvarları'nın İzoniyazid ve Rifampisin için İlaç Duyarlılık Testi Uyum Düzeyleri' başlıklı bildiri ile XXVI. Ulusal Tüberküloz ve Göğüs Hastalıkları Kongresi Sözel Bildiri İkincilik Ödülü. 23-26 Mart 2011, Adana.
4. '2005-2010 yıllarında Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı'nda Akciğer örneklerinden izole edilen *M. tuberculosis* kompleks suşlarının Çoklu ve Yaygın İlaç Direnci Oranları' başlıklı bildiri ile XXVI. Ulusal Tüberküloz ve Göğüs Hastalıkları Kongresi Poster Bildiri İkincilik Ödülü. 23-26 Mart 2011, Adana.
5. 'Pandemik H1N1' tanısında gösterilen başarılı çalışmalar için Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Takdirnamesi.
6. Tübitak kitap çeviri ödülü; Albayrak N., İmmün Yanıtta Tek Çekirdekli Fagositler. Male D, Brostoff M, Roth DB, Roitt I. Immunology, 7. basımdan çeviri, Ed Turgut Imir, Palme, Ankara 2008.
7. Genç Araştımacı İkincilik Ödülü. Investıgatıon of Oral Epithelial Cells Bactericidal Effect and Cytokine Response Against Different Doses of *Streptococcus pyogenes*. 14 Mart 2006. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara, Türkiye.

8. Genç Araştırmacı Birincilik Ödülü. Antibacterial capacity of oral (epithelial) cells from healty donors and patients with Behçet's disease. 14 Mart 2004. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara, Türkiye.

ESERLER

A. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler :

1. **N. Albayrak,** B. Çelebi, S. Kavas, H. Şimşek, S. Kılıç, F. Sezen, A. Arslantürk, "Investigation of the Presence of *Mycobacterium tuberculosis* in the Lymph Node Aspirates of the Suspected Tularemia Lymphadenitis Cases", Bulletin of Microbiology, 129-134 pp., 2014.
2. I. Ceyhan, H. Simsek, A. Arslanturk, N. Albayrak, F. Sezen and G. Tarhan, "Extensively Drug-resistant Tuberculosis Strains in National Tuberculosis Reference Laboratory Between 2005 And 2010, Turkey", Clinical Microbiology (3), 136-139 pp., 2014.
3. **N. Albayrak**, H. Simsek, F. Sezen, A. Arslantürk, G. Tarhan, İ. Ceyhan, "Evaluation of the Distribution of Non-tuberculous Mycobacteria Strains Isolated in National Tuberculosis Reference Laboratory in 2009-2010, Turkey", Bulletin of Microbiology, 560-567 pp., 2012.
4. C. Özcan, M. Toyran, E. Civelek, M. Erkoçoğlu, A.B. Altaş, **N. Albayrak**, G. Korukluoğlu, C.N. Kocabaş, "Evaluation of Respiratory Viral Pathogens in Acute Asthma Exacerbations during Childhood", Journal of Asthma, 888-93 pp., 2011.
5. F. Sevencan, M.M. Ertem, N. Özçullu, V. Dorman, A. Ormanlı, N.K. Kubat, **N. Albayrak**, A.B. Altaş, "Retrospective evaluation of laboratory-confirmed and recovered cases of Influenza A(H1N1)v", Turkisk Journal of Medical Sciences, 647-656 pp., 2011.
6. **N. Albayrak**, M.A. Cıblak, A.B. Altas, M. Kanturvardar, Y. Odabas, B. Sucaklı, G. Korukluoglu, S. Badur, M. Ertek, "Influenza Surveillance Results During 2008-2009 Season in Turkey", Journal of Public Health and Epidemiology, 199-203 pp., 2010.
7. M. Ertek, R. Durmaz, D. Güldemir, A.B. Altaş, **N. Albayrak**, G. Korukluoğlu, "Epidemiological, Demographic and Molecular Characteristics of Laboratory Confirmed Pandemic Influenza A (H1N1) Virus infection in Turkey, May 15-November 30, 2009", Japanese Journal of Infectious Disease, 239-45 pp., 2010.
8. S.S. Yalçın, M. Kondolot, **N. Albayrak**, A.B. Altaş, Y. Karacan, B. Kuşkonmaz, S. Aksu, M. Çetin, H. Göker, K. Yurdakök, D. Uçkan, "Serological Response to Influenza Vaccine After Hematopoetic Stem Cell Transplantation", Annals Hematology, 913-918 pp., 2010.
9. Y. Uyar, A. Çarhan, **N. Albayrak**, A.B. Altaş, "Evaluation of PCR and ELISA-IgM Results in the Laboratory Diagnosis of Crimean-Congo Haemorrhagic Fever Cases in 2008 in Turkey", Bulletin of Microbiology, 57-64 pp., 2010.
10. M. Cıblak, **N. Albayrak**, Y. Odabaş, A.B. Altaş, M. Kanturvardar, B. Sucaklı, G. Korukluoğlu, M. Ertek, S. Badur, "Cases of Influenza A (H1N1)v reported in Turkey, May-July 2009", Eurosurveillance, 13 August pp., 2009.

11. D. Biriken, **N. Albayrak**, H. Özenci, "Investigation of Bactericidal Effect and Nitric Oxide Responses of Caco-2 Epithelial cells and THP-1 Macrophage Cells against *Streptococcus pyogenes* and *Escherichia coli*", Bulletin of Microbiology, 373-81 pp., 2009.
12. A. Çarhan, A.B. Altaş,**N. Albayrak**, Y. Uyar, "Influenza Surveillance Results in 2007-2008 Winter Season in Nine Provinces of Turkey", Bulletin of Microbiology, 235-241 pp., 2009.
13. **N. Albayrak**, D. Biriken, H. Özenci, "Investigation of the bactericidal effect of urinary epithelial cells against different doses of *Escherichia coli*", Bulletin of Microbiology, 195-200 pp., 2006.
14. **N. Albayrak**, D. Biriken, H. Özenci, "Investigation of bactericidal effect and cytokine response of the oral epithelial cells against different antigenic doses of *Streptococcus pyogenes*", Bulletin of Microbiology, 29-37 pp., 2006.
15. I. Dolapçı, N. Albayrak, A. Boyvat, H. Özenci, "Antibacterial Capacity of Oral (Epithelial) Cells from Healty Donors and Patients with Behçet's Disease", Archieve of Dermatological Research, 124-126 pp., 2003.

B. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (*Proceedings*) basılan bildiriler :

1. **N. Albayrak**, A. Karagöz, F. Sezen, H. Şimşek, A. Arslantürk, Ş. Özkara, A. Alp, R. Durmaz, İ. Ceyhan, M. Ertek, Antituberculosis Drug Resistance Survey Study Group, 33rd Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology konferansı dahilinde "Scientific Program including Abstracts" bildiri kitapçığındaki "Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated during 2011 in Ankara, Turkey", 54-55 pp., Brasov, Romania, Temmuz 2012.
2. H. Şimşek, A. Arslantürk, **N. Albayrak**, F. Sezen, İ. Ceyhan, 33rd Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology konferansı dahilinde "Scientific Program including Abstracts" bildiri kitapçığındaki "Comparison of drug susceptibility of *M. tuberculosis* complex by the Sensititre MycoTB Plate MIC tests and conventional proportion method on Lowenstein Jensen", 62-63 pp., Brasov, Romania, Temmuz 2012.
3. H. Şimşek, Ö. Kısa, A. Arslantürk, **N. Albayrak**, A. Albay, İ. Ceyhan, 33rd Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology konferansı dahilinde "Scientific Program including Abstracts" bildiri kitapçığındaki "Comparative evaluation of 2% Ogawa culture technique and the Bactec MGIT 960 system for the isolation of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimen", 74-75 pp., Brasov, Romania, Temmuz 2012.
4. İ. Ceyhan, H. Şimşek, **N. Albayrak**, A. Arslantürk, G. Tarhan, F. Sezen, R. Durmaz, M. Ertek, 32nd Annual Congress of European Society of Mycobacteriology konferansı dahilinde "32nd Annual Congress of European Society of Mycobacteriology Book" bildiri kitapçığındaki "Multi Drug Resistant ratios of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates obtained from pulmonary samples between 2003 and 2010 by Turkish National Tuberculosis Reference Laboratory", 98-99 pp., Lübeck, Germany, Haziran 2011.

5. E. Bagriacik, **N. Albayrak**, K. Uslu, M. Ertek, 98th Annual Meeting of American Association of Immunologists konferansı dahilinde "The Journal of Immunology" bildiri kitapçığındaki "Detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus glycoprotein antigens", 38.19 pp., California, USA, Mayıs 2010.
6. M. Cıblak, **N. Albayrak**, Y. Odabaş, A.B. Altaş, M. Kanturvardar, B. Sucaklı, G. Korukluoğlu, M. Ertek, S. Badur, 12th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology konferansı dahilinde "Journal of Clinical Virology" bildiri kitapçığındaki "Pandemic (H1N1) 2009 virus Infections in Turkey", 4 pp., İstanbul, Türkiye, Eylül 2009.
7. **N. Albayrak**, M. Cıblak, Y. Odabaş, A.B. Altaş, M. Kanturvardar, B. Sucaklı, G. Korukluoğlu, S. Badur, M. Ertek, 12th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology konferansı dahilinde "Journal of Clinical Virology" bildiri kitapçığındaki "Turkey's Influenza Surveillance Results in 2008-2009 Winter Season", 19 pp., İstanbul, Türkiye, Eylül 2009.
8. A.B. Altas, **N. Albayrak**, A. Carhan, 12th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology konferansı dahilinde "Journal of Clinical Virology" bildiri kitapçığındaki "Viral Pathogens of Respiratory Tract Infections in Ankara Turkey", 24 pp., İstanbul, Türkiye, Eylül 2009.
9. A. Çarhan, **N. Albayrak**, A.B. Altaş, Y. Uyar, 12th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology konferansı dahilinde "Journal of Clinical Virology" bildiri kitapçığındaki "Detection of Oseltamivir Resistant Influenza A (H1N1) viruses with H274Y mutation during 2007-2008 Influenza Season from Central and Eastern Part of Turkey", 26 pp., İstanbul, Türkiye, Eylül 2009.
10. **N. Albayrak**, D.Y. Çağlayık, G. Korukluoğlu, 12th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology konferansı dahilinde "Journal of Clinical Virology" bildiri kitapçığındaki "Waterborne Outbreaks of Acute Gastroenteritis in January-May 2009, Turkey", 40 pp., İstanbul, Türkiye, Eylül 2009.
11. D.Y. Çağlayık, Y. Uyar, **N. Albayrak**, A. Çarhan, G. Korukluoğlu, 12th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology konferansı dahilinde "Journal of Clinical Virology" bildiri kitapçığındaki "Laboratory Diagnosis of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever during January-June 2009, Turkey", 58 pp., İstanbul, Türkiye, Eylül 2009.
12. A. Çarhan, A.B. Altaş, **N. Albayrak**, Y. Uyar, International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance Symposium konferansı dahilinde "International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance Symposium Book" bildiri kitapçığındaki "Influenza Surveillance Results in 2007- 2008 Winter Season in Turkey", 185 pp., Vienna, Austria, Şubat 2009.
13. D. Biriken, **N. Albayrak**, H. Özenci, 1st Congress of the Society of Innate Immunity konferansı dahilinde "Experimental and Clinical Transplantation" bildiri kitapçığındaki "Induction of Human Monocyte THP-1 Leukemia cells by Phorbol 12-myristate 13-acetate", 23 pp., Ankara, Türkiye, 2007.
14. D. Biriken, **N. Albayrak**, H. Özenci, 1st Congress of the Society of Innate Immunity konferansı dahilinde "Experimental and Clinical Transplantation" bildiri kitapçığındaki "Evaluation of Bactericidal effect and nitric oxide response of CaCo2 epithelial and

THP-1 macrophage cell lines against different microorganisms", 23 pp., Ankara, Türkiye, 2007.

15. **N. Albayrak**, D. Biriken, H. Özenci, 16th European Congress of Immunology Congress konferansı dahilinde "16th European Congress of Immunology Congress Book" bildiri kitapçığındaki "Investigation of Oral Epithelial Cells Bactericidal Effect and Cytokine Response Against Different Doses of *Streptococcus pyogenes*", 552 pp., Paris, France, Eylül 2006.
16. G.I. Dolapçı, **N. Albayrak**, A. Boyvat, H. Özenci, 11th International Congress of Mucosal Immunology Congress konferansı dahilinde "11th International Congress of Mucosal Immunology Congress Book" bildiri kitapçığındaki "Antibacterial capacity of oral epithelial cells from healthy donors and Behçet's disease patients", 6001 pp., USA, Haziran 2002.
17. **N. Albayrak**, D. Biriken, H. Özenci,, 4th Balkan Congress of Immunology konferansı dahilinde "Turkish Journal of Immunology" bildiri kitapçığındaki "Investigation of Bacterisidal effects of Human Oral and Uroepithelial cells", 179 pp., İstanbul Türkiye, Eylül 2004.

C. Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler :

1. Duru, Y. Köker, Ç. Uyanusta, N. Şencan, B. Altaş, **N. Albayrak**, S. Ardıç, "İnfluenza A (H1N1) Virus Enfeksiyonlu Hastaların Klinik Analizi", Türk Toraks Dergisi, 45-49 pp., 2012.
2. A. Çarhan, **N. Albayrak**, A.B. Altaş, Y. Uyar, E. Özkaya, "Türkiye'de 2007 – 2008 İnfluenza Sezonunda Oseltamivir Dirençli İnfluenza A (H1N1) Virüslerinin H274Y Mutasyonu ile Saptanması", Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 1-6 pp., 2012.
3. M. Ertem, F. Sevencan, V. Dorman, N. Özçullu, V. Ormanlı, N.K. Kubat, **N. Albayrak**, A.B. Altas, "Pandemic (H1N1) influenza in Diyarbakır, 2009", Turkish Journal of Public Health, 86-95 pp., 2011.
4. **N. Albayrak**, D.Y. Caglayik, A.B. Altas, G. Korukluoglu, M. Ertek, "Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Viroloji Laboratuvarı, 2009 Yılı Akut Viral Gastroenterit Verilerinin Değerlendirilmesi", Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 9-15 pp., 2011.
5. **N. Albayrak**, S. Kaya, "Çeşitli klinik örneklerden izole edilen Escherichia coli ve Klebsiella pneumoniae suşlarının Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz üretimleri ve antibiyotik direnç oranları", Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 16-21 pp., 2009.
6. **N. Albayrak**, D. Biriken, H. Özenci, "İnsan ağız ve üriner sistem epitel hücrelerinin farklı Escherichia coli suşlarına karşı bakterisidal etkisinin araştırılması", Mikrobiyoloji Bülteni, 161-167 pp., 2005.

D. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

1. İ. Ceyhan, H. Şimşek, A. Karagöz, **N. Albayrak**, A. Arslantürk, F. Sezen, G. Tarhan, R. Durmaz, 7. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi konferansı dahilinde "Kongre Kitabı" bildiri kitapçığındaki "Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı'nda

2008 - 2010 yılları arasında tespit edilen Çoklu İlaç Dirençli *M. tuberculosis* suşlarında Beijing Genotipi", 262 pp., Ankara, Türkiye, Haziran 2012.

2. F. Sezen, **N. Albayrak**, H. Şimşek, Ş. Özkara, M. Atasever, A. Alp, T. Müderris, C. Deprem, H. İnanç, Y. Kocaman, E. Kibaroğlu, F.D. Ağca, A.İ. Süer, T. Sağıroğlu, B. Çakar, Ö. Turunç, Y. Tanrıkulu, D. Gülmez, D. Gerçeker, Ö. Kısa, Ö.K. Azap, E. Evren, Z. Dansuk, N. Çelikbilek, U. Önde, Ş. Özkan, H.S. Oskovi, Ş. Kurşun, B. Kaçmaz, H. Bozkurt, A. Arslantürk, R. Durmaz, İ. Ceyhan, M. Ertek, 15. Türk Toraks Derneği Kongresi konferansı dahilinde "15. Türk Toraks Derneği Kongresi Kongre Kitapçığı" bildiri kitapçığındaki "Ankara ilinde akciğer tüberkülozunda ilaç direnci taraması, 2011 yılı ilk altı aylık veriler", 33 pp., Antalya, Türkiye, Nisan 2012.

3. D. Biriken, N. Yazihan, **N. Albayrak**, Ş. Yilmaz, H. Ozenci, Turkish FEPS – Physiology Congress konferansı dahilinde "Turkish FEPS – Physiology Congress Book" bildiri kitapçığındaki "Induction of Cultured Human Monocytic THP-1 Leukemia Cells by Phorbol-12 –myristate-13-acetate (pma): Midkine may be a new marker of differentiation", W19 pp., İstanbul, Türkiye, Mayıs 2011.

4. **N. Albayrak**, B. Çelebi, S. Kavas, H. Şimşek, S. Kılıç, F. Sezen, A. Arslantürk, İ. Ceyhan, M. Ertek, 1. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi konferansı dahilinde "1. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi Kongre Kitapçığı" bildiri kitapçığındaki "Tularemi lenfadeniti şüphesi ile alınan lenf aspiratı örneklerinde *M. tuberculosis* kompleks sıklığının araştırılması", 227 pp., Antalya, İstanbul, Kasım 2011.

5. H. Şimşek, **N. Albayrak**, K. Murat, A. Arslantürk, F. Sezen, İ. Ceyhan, M. Ertek, 1. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi konferansı dahilinde "1. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi Kongre Kitapçığı" bildiri kitapçığındaki "Çoklu İlaç Dirençli Tüberkülozun tespitinde kullanılan Hızlı İlaç Direnci Testlerinin duyarlılığının konvansiyonel yöntemler ile karşılaştırılması", 225 pp., Antalya, İstanbul, Kasım 2011.

6. **N. Albayrak**, E.Ü. Bağrıaçık, A.B. Altaş, M. Ertek, 21. Ulusal İmmünoloji Kongresi konferansı dahilinde "Turkish Journal of Immunology" bildiri kitapçığındaki "Pandemik influenza A H1N1 pozitif olgularda IL-6 sitokin yanıtının araştırılması", 108 pp., Muğla, Türkiye, Nisan 2011.

7. S. Hasgür, E. Yavuz, **N. Albayrak**, E.Ü. Bağrıaçık, 21. Ulusal İmmünoloji Kongresi konferansı dahilinde "Turkish Journal of Immunology" bildiri kitapçığındaki "Toxoplasma gondii ile infekte edilen insan monositlerinin IL-6 sekresyonu", 112 pp., Muğla, Türkiye, Nisan 2011.

8. F. Sezen, **N. Albayrak**, H. Şimşek, A. Arslantürk, İ. Ceyhan, XXVI. Ulusal Tüberküloz ve Göğüs Hastalıkları Kongresi konferansı dahilinde "XXVI. Ulusal Tüberküloz ve Göğüs Hastalıkları Kongresi Kongre Kitabı" bildiri kitapçığındaki "Tüberküloz Laboratuvarlarının İzoniyazid ve Rifampisin için İlaç Duyarlılık Testi Uyum Düzeyleri", 25 pp., Adana, Türkiye, Mart 2011.

9. H. Bozkurt, İ. Ceyhan, S.N. Uçarman, C. Deprem, S. Musaonbaşıoğlu, **N. Albayrak**, F. Sezen, A. Yıldırım, M.H. Türkkanı, XXVI. Ulusal Tüberküloz ve Göğüs Hastalıkları Kongresi konferansı dahilinde "XXVI. Ulusal Tüberküloz ve Göğüs Hastalıkları Kongresi Kongre Kitabı" bildiri kitapçığındaki "Ülkemizdeki tüberküloz tanı laboratuarlarının durumu", 29 pp., Adana, Türkiye, Mart 2011.

10. İ. Ceyhan, H. Şimşek, G. Tarhan, A. Arslantürk, **N. Albayrak**, F. Sezen, R. Durmaz, M. Ertek, XXVI. Ulusal Tüberküloz ve Göğüs Hastalıkları Kongresi konferansı dahilinde "XXVI. Ulusal Tüberküloz ve Göğüs Hastalıkları Kongresi Kongre Kitabı" bildiri kitapçığındaki "Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuarı'nda Akciğer Örneklerinden 2005-2010 Yılları Arasında Tespit Edilen *M. tuberculosis* kompleks Çoklu ve Yaygın İlaç Direnci Oranları", 35 pp., Adana, Türkiye, Mart 2011
11. **N. Albayrak**, A. Karagöz, A. Arslantürk, H. Şimşek, İ. Ceyhan, R. Durmaz, XXVI. Ulusal Tüberküloz ve Göğüs Hastalıkları Kongresi konferansı dahilinde "XXVI. Ulusal Tüberküloz ve Göğüs Hastalıkları Kongresi Kongre Kitabı" bildiri kitapçığındaki "Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı'nda 2010 Yılında Tespit edilen Çoklu İlaç Direnci *M. tuberculosis* Suşlarının Spoligotiplendirme Sonuçları", 40-41 pp., Adana, Türkiye, Mart 2011.
12. C. Özcan, A.B. Altas, M. Toyran, **N. Albayrak**, E. Civelek, G. Korukluoglu, M. Erkoçoğlu, C.N. Kocabaş, XVIII. Ulusal Allerji ve Klinik İmmünoloji Kongresi konferansı dahilinde "XVIII. Ulusal Allerji ve Klinik İmmünoloji Kongresi Kongre Kitapcığı" bildiri kitapçığındaki "Akut astım alevlenmelerinde viral patojenlerin incelenmesi", 129 pp., Antalya, Türkiye, Kasım 2010.
13. **N. Albayrak**, A.B. Altas, G. Korukluoglu, Z. Unal, D. Pekmezci, S. Basturk, D.Y. Caglayik, Y. Uyar, T. Yalcinkaya, A. Guvenli, F. Sezen, İ. Ceyhan, M Ertek. ., 34. Türk Mikrobiyoloji Kongresi konferansı dahilinde "34. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kongre Kitabı" bildiri kitapçığındaki "Bir Pandemi Hikayesi: Pandemik Influenza A (H1N1) 2009, Türkiye", 334-335 pp., Kuzey Kıbrıs, Ekim 2010.
14. A.B. Altas, **N. Albayrak**, G. Korukluoglu, F. Sezen, M. Ertek, 34. Türk Mikrobiyoloji Kongresi konferansı dahilinde "34. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kongre Kitabı" bildiri kitapçığındaki "Pandemik A H1N1 2009 gölgesinde 2009-2010 Ulusal İnfluenza Sürveyansı, Türkiye", 340-341 pp., Kuzey Kıbrıs, Ekim 2010.
15. **N. Albayrak**, A.B. Altaş, G. Korukluoğlu, M. Ertek, VI. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi konferansı dahilinde "VI. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi Kongre Kitapçığı" bildiri kitapçığındaki "Pandemik Influenza 2009 virusunun tespitinde kullanılan real-time PCR sistemlerinin karşılaştırılması", 178 pp., Ankara, Türkiye, Haziran 2010.
16. **N. Albayrak**, A.B. Altaş, G. Korukluoğlu, M. Ertek, VI. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi konferansı dahilinde "VI. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi Kongre Kitapçığı" bildiri kitapçığındaki "Solunum yolları viruslerinin tespitinde kullanılan PCR sistemlerinin karşılaştırılması", 194 pp., Ankara, Türkiye, Haziran 2010.
17. Y. Uyar, A. Çarhan, **N. Albayrak**, A.B. Altaş., 14. KLIMIK Kongresi konferansı dahilinde "14. KLIMIK Kongresi Kongre Kitabı" bildiri kitapçığındaki "KKKA'da laboratuvar tanı ve sürveyans sistemi", 171 pp., Antalya, Türkiye, Mart 2009.
18. **N. Albayrak**, S. Kaya, 33. Türk Mikrobiyoloji Kongresi konferansı dahilinde "33. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kongre Kitabı" bildiri kitapçığındaki "Farklı Klinik Örneklerden izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarının Genişlemiş Spektrumlu Beta Lactamaz Üretimi", 673 pp., Bodrum, Türkiye, Ekim 2008.

19. **N. Albayrak**, S. Ekici, 23. ANKEM Kongresi konferansı dahilinde "23. ANKEM Kongresi Kongre Kitabı" bildiri kitapçığındaki "Üriner sistem infeksiyonu patojenleri ve antibiyotik duyarlılık sonuçları", x pp., Aydın, Türkiye, Mayıs 2008.
20. **N. Albayrak**, D. Biriken, H. Özenci, 18. Ulusal İmmünoloji Kongresi konferansı dahilinde "18. Ulusal İmmünoloji Kongresi Bildiri ve Özet Kitabı" bildiri kitapçığındaki "KOAH ve Bronşektazi hastalarında bronşial epitel hücrelerinin antibakteriyel etkinliği", pp., Bursa, Türkiye, Eylül 2005.
21. **N. Albayrak**, D. Biriken, H. Özenci, 1. Ulusal Cinsel Yolla Bulaşan Hastalıklar Sempozyumu konferansı dahilinde "1. Ulusal Cinsel Yolla Bulaşan Hastalıklar Sempozyumu Sempozyum Kitabı" bildiri kitapçığındaki "Üriner epitel hücrelerinin farklı dozlardaki *Eschericha coli*'ye karşı antibakteriyel etkisinin araştırılması", 85 pp., Aydın, Türkiye, Nisan 2004.

E. Kitap bölümü;

1. **N. Albayrak.** Ed. grubu; **N. Albayrak**, G. Aslan, İ. Ceyhan, A. Özkütük, N. Özkütük, D. Şatana, N. Uçarman. Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 935, Ankara, Ofset, 2014.

2. **N. Albayrak**, Male D, Brostoff M, Roth DB, Roitt I. Çev (ed) Turgut Imir, Immunology, 7. basımdan çeviri (İmmün Yanıtta Tek Çekirdekli Fagositler), 181-202 pp., Ankara, Palme, 2008.

F. Dergi ekinde çıkan yazılar;

1. A. B. Altaş, **N. Albayrak,** "Ulusal İnfluenza Laboratuvarı 2007-2008 Sezonu İnfluenza Sonuçları", Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi-Epidemiyoloji Raporu, 11-12 pp., 2009.

PROFESYONEL ETKİNLİKLER

G. Konferans / Kongre / Eğitim sunumları;

1. TB sempozyumu
2. **Albayrak N..** Tüberküloz Sürveyansında Neredeyiz? 2. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Uzmanları Derneği Kongresi. *12 Kasım 2013,* Antalya, Türkiye.
3. **Albayrak N..** Ulusal Antitüberküloz İlaç Direnci Laboratuvar Sürveyansı Uygulamalı Eğitimi. *15-19 Nisan 2013,* Ankara, Türkiye.
4. **Albayrak N..** Ulusal Antitüberküloz İlaç Direnci Laboratuvar Sürveyansı Uygulamalı Eğitimi. *18-22 Mart 2013,* Ankara, Türkiye.
5. **Albayrak N..** Tüberküloz Laboratuvarlarında sonuçlar ve sorunlar. Türk Toraks Derneği Bölge Toplantısı. *26 Ocak 2013,* Adana, Türkiye.
6. **Albayrak N..** Tüberküloz İmmünolojisi ve Tüberküloz Laboratuvarlarında Tanı. Hekimlere Yönelik Verem Savaşı Sertifikalı Eğitim Programı. *05-10 Kasım, 26 Kasım-1 Aralık, 03-08 Aralık, 10-15 Aralık 2012,* Ankara, Türkiye.

7. **Albayrak N..** Mikobakteriyoloji'de Klinik Örneklere Yaklaşım. KLİMUD Sürekli Tıp Eğitimi / Sürekli Mesleki Gelişim Etkinlikleri. 31 Ekim 2012, Ankara, Türkiye.
8. **Albayrak N..** Tüberküloz Laboratuvarlarında Biyogüvenlik Uygulamaları. Tüberkülozda Temel Laboratuvar Teknikleri Eğitimi. *8-12 Ekim 2012*, Ankara, Türkiye.
9. **Albayrak N..** Tüberküloz Laboratuvarlarında Biyogüvenlik Uygulamaları. Tüberkülozda Temel Laboratuvar Teknikleri Eğitimi. *24-28 Eylül 2012*, Ankara, Türkiye.
10. **Albayrak N..** Tüberküloz Laboratuvarlarında Biyogüvenlik Uygulamaları. Tüberkülozda Temel Laboratuvar Teknikleri Eğitimi. *11-15 Haziran 2012*, Ankara, Türkiye.
11. **Albayrak N..** Tüberküloz Laboratuvarlarında Biyogüvenlik Uygulamaları. Tüberkülozda Temel Laboratuvar Teknikleri Eğitimi. *19-23 Eylül 2011,* Ankara, Türkiye.
12. **Albayrak N..** Tüberküloz Laboratuvarlarında Biyogüvenlik Uygulamaları. Tüberkülozda Temel Laboratuvar Teknikleri Eğitimi. *6-10 Haziran 2011,* Ankara, Türkiye.
13. **Albayrak N..** Tüberküloz İmmünolojisi ve Tüberküloz Laboratuvarlarında Tanı. Hekimlere Yönelik Verem Savaşı Sertifikalı Eğitim Programı. *30 Mayıs – 4 Haziran 2011,* Ankara, Türkiye.
14. **Albayrak N..** Tüberküloz Laboratuvarlarında Biyogüvenlik Uygulamaları. Tüberkülozda Temel Laboratuvar Teknikleri Eğitimi. *11-15 Nisan 2011,* Ankara, Türkiye.
15. **Albayrak N..** RSV İnfeksiyonlarında Laboratuvar Tanı. Yenidoğanlarda RSV infeksiyonları, Türk Neonatoloji Derneği Yerel Toplantısı. *16 Ekim 2009,* Ankara, Türkiye.

H. Kurs Katılımları;

1. Klinik Mikrobiyoloji'de Pyrosekans Uygulama Kursu. *23-24 Ekim 2010,* Ankara, Türkiye.
2. Klonlama Kursu. *20-24 Eylül 2010,* Aydın, Türkiye.
3. Solunum Yolu Epitel Hücre Kültür Modelleri Kursu. *11-12 Haziran 2010,* Gaziantep, Türkiye.
4. İmmünoloji'de Yenilikler Sempozyumu ve Uygulamalı Otoimmünite Kursu. *13-16 Mayıs 2010,* Elazığ, Türkiye.
5. Temel Onkoloji Kursu. *20 Kasım 2008,* Ankara, Türkiye.
6. Ulusal Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji Kursu. *1-5 Temmuz 2008,* Kapadokya, Türkiye.
7. Temel İmmünoloji Kursu. *20-23 Nisan 2005,* Bolu, Türkiye.
8. Temel İmmünoloji Kursu. *5-8 Mayıs 2002,* Denizli, Türkiye.

I. Eğitim-Toplantı Katılımları;

1. Ulusal Mikrobiyoloji Standartları Çalıştayı. *16-20 Aralık 2013,* Ankara, Türkiye.
2. 4th Annual Meeting of European Reference Laboratory Network for TB. *October 7-11, 2013,* Kopenhag, Danimarka.
3. Laboratuvar Değerlendirme Aracı Pilot Uygulama Çalıştayı. *24-26 Haziran 2013,* Ankara, Türkiye.

4. Biyogüvenlik Rehberi Hazırlık Çalıştayı. *17-21 Haziran 2013,* Ankara, Türkiye.

5. Ulusal Tüberküloz Tanı Standartları Hazırlık Çalıştayı. *8-10 Mayıs 2013,* Ankara, Türkiye.

6. Bulaşıcı Hastalıkların İhbarıve Bildirim Sistemleri Değerlendirme Çalıştayı. *18-20 Mart 2013,* Ankara, Türkiye.

7. Kısa Eğitim Kurslarının Tasarımı, Uygulanması ve Değerlendirilmesi Çalıştayı. *20-22 Şubat 2013,* Ankara, Türkiye.

8. Proje Yönetimi Eğitimi. *16 Ocak 2013,* Ankara, Türkiye.

9. Ölçüm Belirsizliği Metod Validasyonu ve Verifikasyonu Eğitimi. *26-28 Kasım 2012*, Ankara, Türkiye.

10. EN 14644, EN 1822, EN 12469, NSF/ANSI 49, EN 13408-6, EN 14175 Standartları Eğitimi. 19-28 Mart 2012, Ankara, Türkiye.

11. Laboratuvar Değerlendirme Aracı (LAT) Uygulama Eğitimi. *27-29 Haziran 2011*. Ankara, Türkiye.

12. Second Annual Meeting of European Reference Laboratory Network for TB. January *31-February 4 2011,* London, United Kingdom.

13. Yetişkin Eğitim Programı. *2-4 Şubat 2009,* Ankara, Türkiye.

14. Temel Laboratuvar Yönetim Eğitimi. *7-9 Mayıs 2007,* Ankara, Türkiye.

15. Bilimsel Çalışma Yöntemleri Hakkında Bilgilendirme ve Eğitim Programı. *7-9 Mart 2002,* Ankara, Türkiye.

J. Kongre-Sempozyum-Konferans Katılımları;

1. 34th European Society of Mycobacteriology. *July 1-3, 2013,* Floransa, İtalya.
2. Saha Epidemiyolojisi Ulusal Konferansı. *6-7 Şubat 2013*, Ankara, Türkiye
3. Türk Toraks Derneği 15. Yıllık Kongresi. *11-15 Nisan 2012,* Antalya, Türkiye.
4. 42nd Union World Conference on Lung Health. *26-30 October, 2011,* Lille, France.
5. 21. Ulusal İmmünoloji Kongresi. *6-9 Nisan 2011,* Muğla, Türkiye.
6. XXVI. Göğüs Hastalıkları Kongresi. *23-26 Mart 2011*, Adana, Türkiye.
7. XXXIV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi. *7-11 Kasım 2010,* Girne, KKTC.
8. 6. Ulusal Tanısal ve Moleküler Mikrobiyoloji Kongresi. 15-19 Haziran 2010, Ankara, Türkiye.
9. 20. Ulusal İmmünoloji Kongresi. *19-22 Kasım 2009,* Girne, KKTC.
10. Klinik (Tıbbi) Mikrobiyoloji Uzmanlığı ve Laboratuar Uygulamaları Sempozyumu. *23-24 Ekim 2009,* Ankara, Türkiye.
11. Ulusal Aşı Sempozyumu. *29 Eylül – 3 Ekim 2009,* Ankara, Türkiye.
12. 12th Annual ESCV Meeting. 27-30 September 2009, İstanbul, Türkiye.
13. Sand Fly Sempozyumu. *28 Nisan 2009,* Ankara, Türkiye.

14. Türk İmmünoloji Derneği Bölge Toplantısı. *16-18 Nisan 2009,* Hatay, Türkiye.
15. 14. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi. *25-29 Mart 2009*, Antalya, Türkiye.
16. IMED 2009. *13-16 February 2009*, Vienna, Austria.
17. 3. Ulusal Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu. *27-28 Kasım 2008,* Ankara, Türkiye.
18. XXXIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi. *21-25 Ekim 2008,* Bodrum, Türkiye.
19. 5. Ulusal Tanısal ve Moleküler Mikrobiyoloji Kongresi. *25-28 Haziran 2008,* Ankara, Türkiye.
20. XIX. Ulusal İmmünoloji Kongresi. *21-24 Kasım 2007,* Antalya, Türkiye.
21. 1st Congress of the Society of Innate Immunity. *13-16 May 2007,* Ankara, Türkiye.
22. 2. Ulusal Cinsel Yolla Bulaşan Hastalıklar ve 3. Ulusal HIV/AIDS Sempozyumu. *1-5 Aralık 2006,* Ankara, Türkiye.
23. 16th European Congress of Immunology. 6-9 September 2006, Paris, France.
24. XVIII. Ulusal İmmünoloji Kongresi. *7-10 Eylül 2005,* Bursa, Türkiye.
25. 1. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji Eğitim Semineri. *14-17 Haziran 2005,* Ankara, Türkiye.
26. Otoimmünite ve Otoimmün Hastalıklar Sempozyumu. *13-15 Nisan 2005,* Ankara, Türkiye.
27. II. Ulusal HPLC ve diğer Seperasyon Teknikleri Sempozyumu. *7-9 Ekim 2004,* Ankara, Türkiye.
28. 4th Balkan Congress of Immunology. *5-8 September 2004,* İstanbul, Türkiye.
29. 3. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi. *28 Haziran – 1 Temmuz 2004,* Ankara, Türkiye.
30. 1. Cinsel Yolla Bulaşan Hastalıklar Sempozyumu. *1-4 Nisan 2004,* Aydın, Türkiye.
31. VI. Ulusal Viral Hepatit Sempozyumu. *31 Ekim – 2 Kasım 2002,* Ankara, Türkiye.

K. Sertifikalar

1. Genotyping methods for *M. tuberculosis* strains. *16th October – 15th November, 2011,* Milan, Italy.
2. Certificate of Participation 10-days BSL-3 Course and Hands-on Training*. January 11-24, 2009,* Ankara, Türkiye.
3. Laboartuvar Hayvanları Kullanım Kursu. *30-31 Mart 2005,* Ankara, Türkiye.

L. Dergi Hakemliği ve Editör Yardımcılığı

1. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, Dergi Hakemliği
2. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, Editör Yardımcılığı



GAZİ GELECEKTİR...