

**HAVA YOLU EPİTEL HÜCRELERİNDE DEKTİN-1
RESEPTÖRLERİN ROLÜ**

**THE ROLE OF DECTIN-1 RECEPTOR IN AIRWAY
EPITHELIAL CELL**

MURAT YOLU

DOÇ. DR. İBRAHİM ÇAĞATAY KARAASLAN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2021

Biricik aileme...

ÖZET

HAVA YOLU EPİTEL HÜCRELERİNDE DEKTİN-1 RESEPTÖRLERİN ROLÜ

MURAT YOLU

Yüksek Lisans, BİYOLOJİ Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. İbrahim Çağatay KARAASLAN

Nisan 2021, 68 sayfa

Astım, çocukluk çağında daha sık görülmekle beraber her yaştan ve cinsiyetten kişileri etkileyen hava yolunun kronik inflamatuvar hastalığıdır. Sanayinin ve kentleşmenin hızla arttığı çağımızda, astım prevalansı artış göstermektedir. Hastalığın başlangıcında ve gelişmesinde genetik ve çevresel faktörler görev almaktadır. Sigara dumanı, beslenme alışkanlıkları, hava kirliliği gibi alerjen olmayan çevresel faktörlerin yanı sıra, ev tozu akarı, polenler ve mantarlar gibi alerjik faktörler, bu tür alerjenlere hassasiyet gösteren bireylerde astımın başlangıcı, gelişimi ve şiddetiyle ilişkilendirilmiştir.

Doğal çevremizde sıklıkla karşılaştığımız ve özellikle sıcaklık değişikliklerine karşı dayanıklı olan mantarlar, mantar hassasiyeti olan bireylerde ciddi solunum yolu rahatsızlıklarına sebep olabilmektedir. Isı değişikliğine dirençli (termotolerant) mantarlar arasında yüksek patojenite özelliği taşıyan *Aspergillus fumigatus* türü mantarların, mantar duyarlı şiddetli astım (SAFS) ve alerjik bronkopulmoner aspergillosis (ABPA) hastalıklarında birincil rol oynadığı yapılan klinik çalışmalarda gösterilmiştir. Küçük sporları vasıtasıyla solunum yollarına yerleşen bu mantar türü, salgıladığı proteaz enzimleri ile epitel hücre hasarı ve inflamasyon oluşumuna katkı yapmaktadır. Bu mantarların proteaz aktiviteleri haricinde, hücre duvarında bulunan β -glukan, kitin gibi yapılarının da inflamasyonda etkili olduğuna dair literatür bilgileri mevcuttur. Mantar hücre duvarının temel bileşeni olan β -glukan

scavenger reseptörleri ve komplementer reseptör 3 tarafından tanınsa da ana reseptörü Dektin-1'dir. C-tipi lektin benzeri reseptör ailesinin Tip II membran proteini grubunda olan Dektin-1 reseptörü, ilk olarak fare dendritik hücrelerinde keşfedilmiştir. Daha sonrasında yapılan çalışmalarda ise bu reseptörün lökosit, makrofaj, nötrofil ve T hücreleri gibi inflamatuvar hücrelerin yanı sıra epitel hücreler gibi yapısal hücrelerde de bulunduğu gösterilmiştir. Tez çalışması kapsamında *Aspergillus fumigatus* türünden elde edilen β -glukan ile uyarılan BEAS-2B hücrelerinde Dektin -1 reseptörü ifadesi RNA ve protein düzeyinde incelenmiştir. Th2 tip sitokin (IL4 + IL13) varlığında β -glukan uyarımının Dektin-1 ifadesi üzerine etkisi araştırılmıştır.

Ayrıca çalışmamızda β -glukan ile uyarılan hücrelerde meydana gelen proinflamatuvar ve anti inflamatuvar sitokin ve kemokin profilinin belirlenmesi için; *IL-6*, *IL-8*, *Rantes*, *IL-25*, *IL-33* ve *TSLP* sitokin ve kemokinlerinin ifadeleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile RNA düzeyinde incelenmiştir.

Tez çalışmasında *Aspergillus fumigatus*'tan elde ettiğimiz β -glukan ile uyarılan hücrelerde Dektin-1 ifadesinin arttığı bulunmuştur Ayrıca Th2 sitokinler olan IL-4 ve IL-13 varlığında bu artışın daha da yükseldiği tespit edilmiştir. Protein düzeyinde hem Western Blot hem de immünofloresan boyama sonuçlarında Th2 tip sitokinler ile olan uyarımda Dektin-1 varlığının arttığı gösterilmiştir. β -glukan ile uyarım sonucunda kontrol grubuna göre *IL-6* ve *IL-25* gen ifadelerinde artış, *IL-8* gen ifadelerinde ise azalış tespit edilmiştir. Yüksek doz β -glukan ile karşılaşmanın RANTES ifadesini arttırdığı bulunmuştur

Anahtar Kelimeler: Astım, alerji, *Aspergillus fumigatus*, BEAS-2B, β -glukan, Dektin-1

ABSTRACT

THE ROLE OF DECTIN-1 RECEPTOR IN AIRWAY EPITHELIAL CELL

MURAT YOLU

Master of Science, Department of MOLECULAR BIOLOGY

Supervisor: Assos. Prof. İbrahim Çağatay KARASLAN

April 2021, 68 pages

Asthma is a chronic inflammatory disease of the airway that affects people of all ages and genders, although it is more common in childhood. In our era, when industry and urbanization are rapidly increasing, the asthma prevalence is rising. Genetic and environmental factors play a role in the initiation and development of the disease. Non-allergenic environmental factors such as cigarette smoke, dietary habits, air pollution, as well as allergic factors such as house dust mites, pollens, and fungi have been associated with the onset, development, and severity of asthma in individuals sensitive to such allergens.

Fungi, which we frequently encounter in our natural environment and are especially resistant to climate changes, can cause severe respiratory disorders in individuals with fungal sensitivity. It has been shown in clinical studies that *Aspergillus fumigatus* species of fungi, which are among the temperature-resistant fungi (thermotolerant) and have high pathogenicity, play a primary role in Severe Asthma with Fungal Sensitization (SAFS) and Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis (ABPA) diseases. This species of fungus, which locates in the respiratory tract through its tiny spores, contributes to epithelial cell damage and inflammation with the protease enzymes it secretes. Except for the protease activities of these fungi, there is literature information that their structures, such as β -glucan and

chitin in the cell wall, are also effective in inflammation. Although β -glucan, which is the main component of the fungal cell wall, is recognized by scavenger receptors and complementary receptor 3, its main receptor is Dectin-1. The Dectin-1 receptor, in the Type II membrane protein group of the C-type lectin-like receptor family, was first discovered in murine dendritic cells. In later studies, it was shown that this receptor is found in inflammatory cells such as leukocytes, macrophages, neutrophils and T cells as well as structural cells such as epithelial cells. Within the scope of the thesis study, Dectin-1 receptor expression in BEAS-2B cells stimulated with β -glucan obtained from *Aspergillus fumigatus* species was investigated at the level of RNA and protein. The effect of β -glucan stimulation on Dectin-1 expression in the presence of Th2 type cytokine (IL4+IL13) was investigated. Additionally, to determine the pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine and chemokine profile in cells stimulated by β -glucan in our study, expressions of *IL-6*, *IL-8*, *Rantes*, *IL-25*, *IL-33*, and *TSLP* cytokines and chemokines were investigated at the RNA level by Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) method.

In the thesis study, it was found that Dectin-1 expression increased in cells stimulated with β -glucan extracted from *Aspergillus fumigatus*. Besides, it was detected that this increase was further increased in the presence of IL-4 and IL-13, which are Th2 type cytokines. It was observed that the presence of Dectin-1 increased in stimulation with Th2 type cytokines in both Western Blot and immunofluorescent stain results at the protein level. In the thesis study, changes in the expression of epithelial cell-derived cytokines were investigated in the presence of only β -glucan. As a result of stimulation with β -glucan, an increase in *IL-6* and *IL-25* gene expressions and decreased *IL-8* gene expression were found compared to the control group. It has been found that exposure to high doses of β -glucan increases *RANTES* expression.

Key Words: Asthma, allergy, *Aspergillus fumigatus*, BEAS-2B, β -glucan, Dectin-1

TEŞEKKÜR

Bilim uzmanlığı eğitimim süresince gerek göstermiş olduğu sabır gerekse paylaşmış olduğu tecrübelerle beni bir sonraki aşamalar için hazırlayan danışman hocam Sayın Doç. Dr. İbrahim Çağatay KARAASLAN'a,

Bu tezin tamamlanmasında FYL-2019-18097 numaralı proje ile destek sağlayan Hacettepe Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Geçirmiş olduğum zorlu dönemlerde ilgi ve alakalarını eksik etmeyen Sayın Prof. Dr. Hatice MERGEN'e, Sayın Prof. Dr. Sibel SÜMER'e, ve Sayın Öğr. Grv. Hasan ÜNAL' a,

Biyoteknoloji çalışmalarımda desteğini esirgemeyen Dr. Yusuf Doruk ARACAGÖK'e, laboratuvar çalışmalarımda ve tez yazım sürecinde yardımlarıyla katkıda bulunan Dr. Hayriye AKEL BİLGİÇ, Arş. Grv. Başak Ezgi SARAÇ, Selcan GENÇ, Seçil SUBAŞI, Sema TUNCER ve diğer ECRG laboratuvar arkadaşlarıma,

Zorlu süreçlerde dostluklarını her daim hissettiğim Yasemin KARACA, Yavuz ERDOĞAN, Ekrem YILMAZ, Abdullah Zübeyir CEYLAN ve Ahmet Aşkın YILMAZ'a,

Destekleriyle güç veren dostlarım Serhat ERTUĞRUL ve Tuğçe ÇİMEN'e

Çalışma arkadaşlarım Vildan TORUN, Beyzanur SARIOĞLU ve Cenan ÖZTÜRK'e,

Tüm eğitim hayatım boyunca eğitimlerimi almama vesile olan ve emeğini hiçbir zaman ödeyemeyeceğim anneannem Emine DÜZYOL'a,

Desteklerini her daim hissettiğim biricik teyzelerim Zekiye DENİZLİ, Fatma OTHAN ve Nahiye TUNALI'ya ve ablalarım Hale OTHAN ve Sevgim TUNALI'ya,

İyi bir insan olmanın elde edilebilecek en güçlü sıfat olduğu öğretisiyle beni yetiştiren tanıdığım en güçlü kadınlardan biri olan ANNEM'e ve BABAM'a,

Ve son olarak, bizlere bağımsız bir ülke armağan eden Gazi Mustafa Kemal ATATÜRK ve silah arkadaşlarına,

En samimi duygularıyla teşekkürü bir borç bilirim.

Murat YOLU

Mayıs 2021, Ankara

İÇİNDEKİLER

ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Astım Tanımı.....	4
2.2 Astım İnsidansı ve Epidemiyolojisi	4
2.3 Astım Türleri.....	6
2.3.1 Astım Fenotipleri ve Astım Patogenezi	6
2.3.1.1 Eozinofilik Astım	7
2.3.1.2 Nötrofilik Astım	8
2.3.1.3 Karışık Granülositik Astım.....	9
2.3.1.4 Paucigranülositik Astım (PGA).....	9
2.4 Astımın Etiyolojisi ve Risk Faktörleri.....	10
2.4.1 Genetik Faktörler.....	10
2.4.1.1 Ailevi Kümelenme ve İkiz Çalışmaları	11
2.4.1.2. Ayrışma Analizleri.....	11
2.4.1.3. Genom Boyu Bağlantı Analizleri.....	11
2.4.1.4 Aday Gen İlişkilendirme Çalışmaları	11
2.4.2 Epigenetik ve Çevresel Faktörler	12
2.4.2.1 Epigenetik Faktörler	12
2.4.2.2 Çevresel Faktörler	13
2.5 Astım ve Mantar İlişkisi	13
2.5.1 Mantarlar.....	13
2.5.2 Mantar Hücre Duvarı.....	14
2.5.2.1 Hücre Duvarı Polisakkaritleri.....	15
2.5.2.2 Melanin	17
2.5.2.3 Hücre Duvarı Proteinleri.....	17

2.5.3 <i>Aspergillus fumigatus</i>	17
2.5.3.1 <i>Aspergillus fumigatus</i> ' un β - Glukan İskeletli Hücre Duvarı	18
2.5.3.2 <i>Aspergillus fumigatus</i> ve Havayolu Hastalıkları	18
2.5.3.3 <i>Aspergillus</i> , ABPA ve SAFS	19
2.6 Astım ve Havayolu Epiteli.....	20
2.7 Patern Tanıma Reseptörleri (PRR).....	20
2.7.1. Sitoplazmik Patern Tanıma Reseptörleri.....	21
2.7.1.1 NOD Benzeri Reseptörler (NLR).....	21
2.7.1.2 RIG Benzeri Reseptörler	21
2.7.1.3 AIM2- Benzeri Reseptörler	21
2.7.2 Transmembran Patern Tanıma Reseptörleri.....	22
2.7.2.1 Toll Benzeri Reseptörler	22
2.7.2.2 C- Tipi Lektin Reseptörleri (CLR).....	23
2.7.3. Dektin-1.....	23
2.7.3.1 Dektin-1 'in Moleküler Yapısı ve İfadesi	24
2.7.3.2 Ana β -Glukan Reseptörü Olarak Dektin-1	24
2.7.3.3 Hava Yolu Hastalıklarında Dektin-1 Reseptörünün Rolü	25
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	27
3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler	27
3.2. <i>Aspergillus fumigatus</i> Fresenius Suşunun Kültürasyonu	28
3.2.1 <i>Aspergillus fumigatus</i> Kültürünün Canlandırılması	28
3.2.2 Sıvı Besi Yerinde Üreme	28
3.3. β -glukan Ekstraksiyonu	28
3.4 β -glukanın ATR-FTIR ile Kimyasal Karakterizasyonu.....	29
3.5 Hücre Kültürü Çalışmaları.....	29
3.5.1 BEAS-2B Hücrelerinin Çoğaltılması.....	29
3.5.2. Hücre Canlılık ve Sitotoksosite Deneyleri	30
3.5.2.1 Canlı/Ölü Hücrelerin Boyanması	30
3.5.2.2. Sitotoksosite Deneyleri.....	30
3.5.3. β -glukan Uyarımı	31
3.5.3.1 BEAS-2B Hücrelerinin β -glukan ile Uyarımı	31
3.5.3.2 BEAS-2B Hücrelerinin Th2 sitokinler ve β -glukan ile Uyarımı	32
3.6 RNA İzolasyonu.....	32
3.7. Komplementer DNA (cDNA) Eldesi.....	33
3.8. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	34
3.9 β -glukan ile Uyarılan BEAS-2B Hücrelerinde Dektin-1 Proteinin İfadesi	35

3.9.1 Hücre Lizatından Toplam Protein Eldesi.....	35
3.9.2 Proteinlerin Bradford Metodu ile Spektroskopik Olarak Ölçülmesi.....	35
3.9.3 Western Blot Yöntemi ile Dektin-1 Proteininin İfadesi	36
3.9.4 İmmüno Floresan Boyama Yöntemi ile Dektin-1 İfadesinin Gösterilmesi	36
3.10 İstatistiksel Analiz	37
4.TARTIŞMA VE SONUÇ	38
4.1. <i>A. fumigatus</i> ' tan Ekstrakte Edilen β -glukan'ın Doğrulanması.....	38
4.2 Bronş Epitel Hücrelerinde β -glukan Alerjeni ile Uyarımın Hücre Canlılığına ve Sitotoksisiteye Etkisi	39
4.2.1 β -glukan Uyarımı Sonrasında Canlı ve Ölü Hücrelerin Floresan Mikroskobu ile Görüntülenmesi	40
4.2.2 β -glukan Uyarımının Hücre Canlılığına Etkisi.....	40
4.3 Gerçek Zamanlı PZR Çalışmaları ile Dektin-1 Geni ve Sitokin ve Kemokinlerin İfadesinin İncelenmesi	42
4.3.1 BEAS-2B Hücrelerinde Dektin-1 Geninin İfadesi	42
4.3.2 Th2 Sitokinler Varlığında BEAS-2B Hücrelerinin β -glukan ile Uyarımı Sonrasında Sitokin Profillerinin İncelenmesi.....	44
4.4 Western Blot Yöntemi ile Dektin-1 Proteininin İfadesinin İncelenmesi.....	48
4.5 İmmüno Floresan Boyama ile Dektin-1 Proteininin İfadesinin Belirlenmesi	50
5. YORUM	51
6. KAYNAKLAR	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. 18-45 yaş arasındaki bireyleri kapsayan dünya genelindeki prevalans haritası.....	5
Şekil 2. 2. Yaş ve Cinsiyete Göre Astım Prevelansı.....	5
Şekil 2. 3. Astım patolojisinin karakteristik özellikleri. Özellikler, eozinofilik (alerjik ve alerjik olmayan), eozinofilik olmayan (nötrofilik tip 1 ve tip 17 ve paucigranülositik) ve karışık granülositik inflamasyon olarak üçe ayrılır. IL, interlökin; TH, T yardımcı hücre [25].....	7
Şekil 2. 4. Eozinofilik Astım Patogenezi.....	8
Şekil 2. 5. Karmaşık hastalıklarda genetik faktörlerin araştırılması için izlenen yol.....	10
Şekil 2. 6. Mantarların Hayat Döngüsü.....	14
Şekil 2. 7. Mantar Türlerinin Hücre Duvar Yapıları.....	15
Şekil 2. 8. a) Suda çözünmeyen dallı β -glukan yapısı b) Suda çözünen lineer β -glukan yapısı.....	17
Şekil 2. 9. Patern Tanıma Reseptörleri.....	21
Şekil 2. 10. Fare ve İnsan Dektin-1 Reseptörlerinin Genel Yapısı.....	24
Şekil 3. 1. BEAS-2B hücrelerinin β -glukan ile uyarımı.....	32
Şekil 3. 2. BEAS-2B hücrelerinin Th2 sitokinler + β -glukan ile uyarımı.....	32
Şekil 4. 1. FTIR %Transmittans Grafiği.....	39
Şekil 4. 2. BEAS-2B hücreleri β -glukan ile; Uyarılmamış Koşul (UK) (A), 0,1 μ g/mL (B), 1 μ g/mL (C), 10 μ g/mL (D), 100 μ g/mL (E) konsantrasyonlarda uyarılmış koşullarının canlı (yeşil) /ölü (kırmızı) hücre boyama fotoğrafları; 20 X, bar 125 μ m.....	40
Şekil 4. 3. Bronş epitel hücrelerin farklı konsantrasyondaki β -glukan ile uyarılması sonrasında elde edilen MTT sonuçları; n=3; **** p<0.0001. Hata çubukları SEM'i göstermektedir.	41
Şekil 4. 4. BEAS-2B hücre hatlarında Dektin-1 reseptörünün ifadesinin incelenmesi *** p<0,001; **** p<0.0001 Hata çubukları SEM'i göstermektedir.	43
Şekil 4. 5. BEAS-2B hücrelerinin β -glukan ile uyarımı sonrası sitokin ifadelerindeki değişim ** p<0,01 *** p<0,001 ****p<0,0001.	45
Şekil 4. 6 Yalnızca β -glukan ile uyarılan BEAS-2B hücreleri. A: Dektin-1 Protein İfadesini, B: β -aktin Kontrol grubunu, C: Protein ifadesindeki kat artışını göstermektedir.....	48
Şekil 4. 7. IL-4 + IL-13 ve β -glukan ile uyarılan BEAS-2B hücreleri. A: Dektin-1 Protein İfadesini, B: β -aktin Kontrol grubunu C: Protein ifadesindeki kat artışını göstermektedir.....	49
Şekil 4. 8. BEAS-2B hücrelerinin 24 saat boyunca Th2 sitokinler ile uyarılması sonucu oluşan Dektin-1 protein ifadesi A: Negatif Kontrol B: Uyarılmamış Koşul C: IL-4 +IL-13 Sitokinler ile uyarılmış koşul. Negatif kontrolde boyama yapılmamıştır. Çekirdek boyaması 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) ile yapılmıştır (mavi). Dektin-1 boyaması ise Alexa Fluor® 594 ile gerçekleşmiştir (kırmızı).....	50

TABLÖLAR

- Tablo 1.** β -glukan Ekstraksiyonu
- Tablo 2.** Primer Dizileri.....
- Tablo 3.** Gerçek zamanlı PZR Reaksiyon ve Döngü Koşulları
- Tablo 4.** Transmittans grafiğine göre dalga sayısı ve karşılık geldiği fonksiyonel bölgeler
- Tablo 5.:** Sitokin/ Kemokinlerin 24 Saatlik konsantrasyona bağlı ifade değişiklikleri.

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	Derece Santigrat
Kda	Kilo Dalton
Ex/Em	Uyarma/Emisyon
Rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
pH	Hidrojen Gücü
mM	Milimolar
µM	Mikromolar
mL	Mililitre
µL	Mikrolite
nm	Nanometre
µg	Mikrogram
cm ⁻¹	1/santimetre

Kısaltmalar

ADAM33	Disintegrin ve metalloproteinaz
AHR	Havayolu aşırı duyarlılık düzeyleri
ABPA	Bronkopulmoner aspergillozis
ALR	AIM-2 Benzeri Reseptörler
ABPM	Alerjik Bronkopulmoner Mikozun
AFTOL	Mantar Yaşam Ağacı Birleştirme Projesi
ANOVA	Tek Yönlü Varyans Analizi
BEAS2B	Sağlıklı Bronş Epitel Hücre Hattı
BSA	Sığır Serum Albümini
BC1 10	B hücreli lenfoma / lösemi 10
CLR	C Tipi Lektin Reseptörleri
CARD	Kaspaz Alım Alanı

CRD	Karbonhidrat Tanıma Bölgeleri
CTLD	C Tipi Lektin Benzeri Bölge
cDNA	Komplementer DNA
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DC-SIGN	Dendritik Hücreye Özgü ICAM3 Kapıcı Non-integrin
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DHN	1,8-dihidroksinafitalin
DOPA	3,4-dihidroksifenilalamin
DAMP	Hasarlı Hücrelerden Salınan Hasara Bağlı Moleküler Paternleri
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
eNO	Nitrik Oksit
FEV1	Solunum Fonksiyon Testi 1
GWAS	Genom Çapında İlişkilendirme Çalışmaları
GINA	Küresel Astım Girişimi
HDM	Ev Tozu Akarı
Ig	İmmünoglobulin
IL	Interlökin
IFN	İnterferon
IRF	İnterferon Düzenleyici Faktör
ITAM	İmmünoreseptör Tirozin Aktivasyon Motifi
ISAAC	Uluslararası Çocukluk Çağı Astım ve Alerjiler Çalışması
MBL	Mannoz Bağlayıcı Lektinler
NE	Nötrofil Elastaz
MMP	Matriks Metaloproteinaz
MTT	2,5-diphenyltetrazolium bromide
MYD88	Miyeloid farklılaşma birincil yanıtı 88
NF-κB	Nükleer Faktör κB
ORDML3	Sfingolipid ile Biyosentez Regülatörü 3
PRR	Patern Tanıma Reseptörleri

PAMP	Patojen İlişkili Moleküler Patern
PYD	Pirin Alanı
PPIA	Peptidilpropil İzomeraz A
PZR	Polimer Zincir Reaksiyonu
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
RNA	Ribonükleik Asit
RIG	Retinoik Asitle İndüklenebilir Gen
SAFS	Mantar Duyarlı Şiddetli Astım
SNP	Tek Nükleotid Değişimi
SyK	Dalak Tirozin Kinaz
TLR	Toll Benzeri Reseptörler
TH	T Yardımcı Hücre

1. GİRİŞ

Astım, çocukluk çağında daha sık görülmekle beraber her yaş gurubundan bireyi etkileyebilen ve hastaların hayat kalitelerini azaltan kronik bir solunum yolu hastalığıdır. Hava yolu daralması, öksürük nöbetleri, hırıltılı solunum, göğüste tıkanıklık ve sıkışma hissi gibi semptomlar ile karakterize olan bu hastalığın prevalansı, toplumdan topluma değişmekle beraber dünya nüfusunun en az %4-5'ini etkisi altına almaktadır.

Astım başlangıcı ve şiddetinde genetik ve çevresel faktörlerin etkili olduğu bilinmektedir. Çevresel faktörler içerisinde hava kaynaklı alerjen maruziyeti önemli bir faktördür. Hava yolu alerjenleri başlıca ev tozu akarı, polenler, evcil hayvan tüyleri ve mantar bileşenleri olup bu alerjenlerle gün içerisinde sıklıkla karşılaşmaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda mantar kaynaklı hastalıkların sıklığında artış olduğu gösterilmiştir. Bununla beraber astımlı hastaların üçte ikisinin mantar kaynaklı alerjenlerden etkilendiği bildirilmiştir. Çevremiz, sağlığımızı etkileyen ve sıklıkla karşılaşabildiğimiz termotolerant mantarlarla çevrilidir. Termotolerant mantarlar arasında en sık karşılaşılan mantar türlerinden birisi *Aspergillus fumigatus*'tur. Oluşturdukları küçük sporlar ile alt ve üst solunum yollarına yerleşen bu mantar türü, yerleştikleri bölgelerde çimlenerek, mantar duyarlı şiddetli astım (SAFS) ve alerjik bronkopulmoner aspergilozis (ABPA) gibi ciddi solunum yolları hastalıklarına sebebiyet vermektedir.

Mantar kaynaklı alerjenlerin başında proteaz alerjenler gelmektedir. Alerjen proteazlar dışında mantar yapısında yer alan kitin, mannoz, β -glukan yapıları da fungal alerjenlerin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Bu alerjenler, doğal bağışıklığın önemli bir parçası olan patern tanıma reseptörleri (PRR) tarafından tanınmaktadır. Mikroorganizmanın yapısına ve bileşimine bağlı olarak, farklı PRR kombinasyonları aktive edilir, bu da spesifik sinyal yollarını indükleyerek dışarıdan gelen ajanlara özel yanıtların verilmesini sağlar. Toll Benzeri Reseptörler (TLR), C-tipi Lektin Benzeri Reseptörler (CLR), Nükleotid Bağlayıcı Oligomerizasyon Alanı Benzeri Reseptörler (NOD Like Reseptörler NLR), Retinoik Asitle İndüklenebilir Gen (RIG)-1 Benzeri Reseptörler (RLR) ve AIM-2 Benzeri Reseptörler (ALR) olmak üzere 5 çeşit PRR tanımlanmıştır. Bu 5 PRR içerisinde TLR ve CLR'ler transmembran proteinleri iken NLR, RLR ve ALR sitoplazmik proteinlerdir.

CLR'ler, fagositoz, kompleman aktivasyonu, doğuştan gelen bağışıklık ve diğer fonksiyonlarına göre on yedi gruba ayrılan ve binden fazla üyesi olan, karbohidratları,

proteinleri ve lipitleri tanıyan büyük bir protein ailesidir. Başlangıçta sadece mantar alerjenlerini tanıdığı düşünülen bu reseptörlerin virüs, bakteri, parazit, ev tozu akarı alerjenlerine karşı da reseptör olarak görev alan alt sınıfları olduğu bulunmuştur. CLR'ler yapılarındaki karbonhidrat tanıma bölgelerine (CRD) göre Tip I membran proteinleri, Tip II membran proteinleri ve çözünebilir lektinler olarak 3 ayrı şekilde sınıflandırılır. Tip I membran proteinlerine örnek olarak Dec205 ve Mannoze Reseptörleri verilebilir. Bunların CRD'leri 8-10 domainden oluşmaktadır. Tip II membran proteinleri ise tipik olarak tek bir CRD içermektedir. Başlıca Tip II membran proteinleri Dektin-1, Dektin-2, DC-SIGN, Mincle ve DNGR-I olarak bilinmektedir. Çözünür lektinler içerisinde ise Mannoze Bağlayıcı Lektinler (MBL) ve sürfektan proteinler yer almaktadır.

Tip II membran proteinleri içerisinde yer alan Dektin-1 reseptörü, diğer CLR'in aksine Ca^{+2} bağımlı değildir. Bu protein, mantar hücre duvarının temel bileşeni olan β -glukanın ana reseptörüdür. Dektin-1 reseptörü tipik olarak, membrana bağlı bir sap bölgesi, hücre dışına uzanan bir CRD yapısı ve sitoplazma içerisine uzanan bir immünoreseptör tirozin aktivasyon motifi (ITAM) içeren sitoplazmik bir kuyruğa sahiptir. Dektin-1 reseptörünün, mantar hücre duvarı bileşenlerinden biri olan β -glukanı tanımasıyla beraber, hücrenel bir sinyal yolağı başlar ve mantar alerjenine karşı bir cevap oluşturulur.

Literatür çalışmaları Dektin-1 reseptörünün başlıca miyeloid ve dendritik hücreler, monositler, makrofajlar ve B hücreleri olmak üzere epitel hücrelerde de ifade olduğunu göstermektedir. Bununla beraber Dektin-1'in ana β -glukan reseptörü olduğu ve mantar maruziyetine karşı doğal bağışıklık sisteminde rol aldığı bilinmektedir. Buna karşın hava yolu epitel hücrelerinde β -glukan ve Dektin-1 reseptörünü ilişkilendiren çalışmalarda genellikle mantarın kendisi veya spor ve konidyaları canlı ve/veya ölü olarak kullanılmıştır. Bu da direkt olarak β -glukan ve Dektin-1 ilişkisini açıklamakta yeterli değildir. Ayrıca mantarlar arasında hücre duvar yapılarının farklılık göstermesi, oluşan immünolojik yanıtların farklı olmasına neden olabilmektedir.

Tez çalışmasında *Aspergillus fumigatus*'un hücre duvar yapısında yer alan β -glukanlar saflaştırılarak hava yolu epitel hücrelerinin uyarılmasında kullanılmıştır. β -glukan varlığında hava yolu epitel hücrelerinde Dektin-1 reseptörünün ifadesi RNA ve protein düzeyinde incelenmiştir. Ayrıca, astım gibi Th2 sitokin yanıtının arttığı koşullarda β -glukan uyarımının Dektin-1 ifadesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Son olarak tez çalışması kapsamında β -glukan ile uyarımın inflamatuvar süreçteki olası rolünü ortaya

koymak amacıyla epitel hücre kökenli sitokin ve kemokinlerin ifadeleri RNA düzeyinde incelenmiştir.

Hava yolu epitel hücreleri başta olmak üzere inflamatuvar süreçte görev alan hücreler üzerinde patojen mantarların etki mekanizmasının anlaşılmasının yenilikçi tedavi yaklaşımları için önemli olduğunu düşünmekteyiz. Tez çalışması gerek β -glukan saflaştırılması, gerekse *Aspergillus fumigatus* kaynaklı β -glukanların hava yolu epitel hücrelerindeki etkileri baz alındığında gelecek çalışmalar için yol gösterici olacaktır. Bu tez çalışmasının sonuçlarının literatüre katkı sağlayacağı ve yeni projelere temel oluşturacağı inancına sahibiz.

2. GENEL BİLGİLER

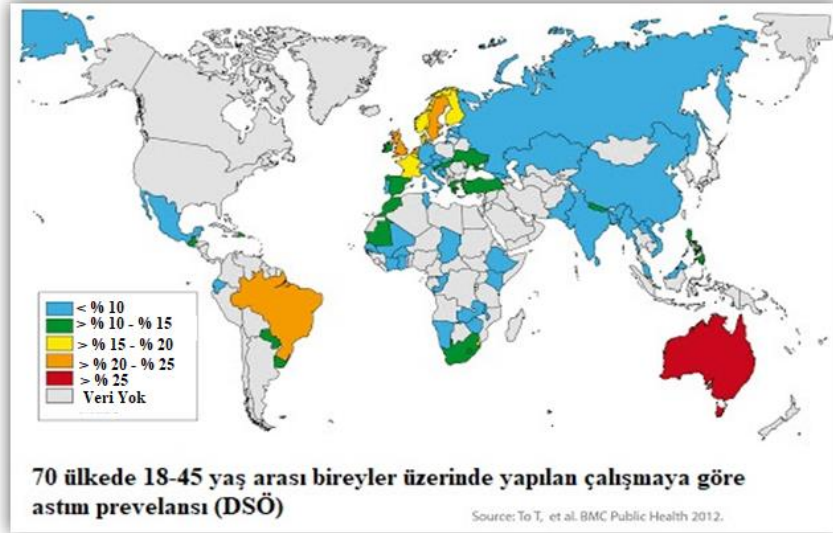
2.1. Astım Tanımı

Kelime kökü olarak Yunanca “aazein” kelimesinden türemiş olan astım, “nefes-nefese” anlamına gelmektedir [1]. Orta Çağ’dan beri varlığı bilinen ve birçok kişiyi etkisi altına almış olan bu hastalık, 19. yüzyılın sonlarına doğru İngiliz Doktor Henry Hyde Salter’ın yayınlamış olduğu “On Asthma and its Treatment” (Astım ve Tedavisi Hakkında) isimli bilimsel çalışmasıyla beraber tıp literatüründeki yerini almıştır. Bu yayınında Henry Hyde Salter, astımı, “sağlıklı solunum arasında karakteristik özellikleriyle ortaya çıkan solunum krizi” şeklinde tanımlamıştır [1, 2].

Günümüzde ise astımın epidemiyolojik ve patolojik yönden çeşitli tanımları yapılmaktadır [3, 4]. Bununla beraber Küresel Astım Girişimi (GINA, 2019) raporuna göre astım, kronik hava yolu inflamasyonunu takiben hırıltılı solunum, göğüste sıkışma hissi, nefes darlığı, öksürük gibi belirtilerle ortaya çıkan heterojen bir hastalık olarak tanımlanmaktadır [5].

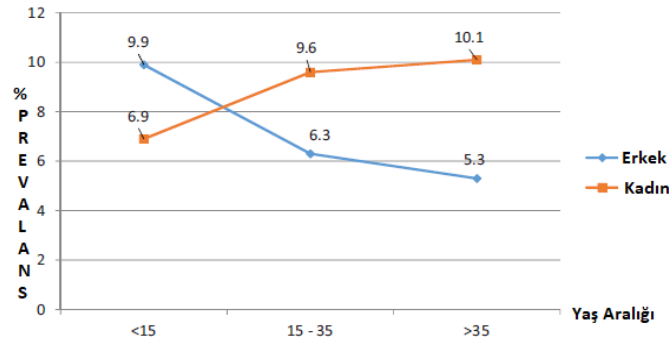
2.2 Astım İnsidansı ve Epidemiyolojisi

Etkilediği bireylerin hayat kalitelerini düşüren ve ileri boyutlarda ölümle sonuçlanabilen astım, dünya genelinde 330 milyondan fazla bireyi etkisi altına almaktadır ve bu sayının önümüzdeki 5 yıl içerisinde (2020-2025 yılları arası) 100 milyondan fazla artış yapacağı düşünülmektedir [6, 7]. Uluslararası Çocukluk Çağı Astım ve Alerjiler Çalışması (ISAAC) kapsamında, 2000-2003 yılları arasında 97 ülkede ve 233 şehirde 13-14 yaş arasındaki çocuklarda detaylı bir anket çalışması yapmıştır. Bu çalışma sonucunda astım prevalansının bölgeden bölgeye çeşitlilik gösterdiği, özellikle sanayileşmiş ve şehirleşmenin olduğu bölgelerde astım vakalarının yüksek prevalanslarda (\geq %20) olduğu gözlemlenmiştir. 2002-2003 yıllarında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)’nün 70 ülkede, 18-45 yaş aralığındaki 177.496 erişkin bireyde yaptığı anket çalışmasının ISAAC verilerini desteklediği görülmüştür (Şekil 2.1.) [6]. ISAAC ve DSÖ’nün yapmış olduğu detaylı anketler haricinde bölgesel çalışmalar da astım sıklığı ve şiddetinin çocukluk döneminde, erişkin dönemine kıyasla daha fazla olduğunu göstermektedir [8].



Şekil 2. 1. 18-45 yaş arasındaki bireyleri kapsayan dünya genelindeki prevalans haritası [6].

Tüm bunlarla beraber epidemiyolojik bulgular, cinsiyetler arasında astım prevalansı ve şiddeti arasında da farklar olduğunu göstermiştir. 0-14 yaş aralığındaki çocukluk dönemindeki vakalar incelendiğinde, erkek çocukları arasındaki astım vakalarının (%11,5) kız çocukları arasındaki astım vakalarına (%9,9) kıyasla daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Ancak erişkin döneme geçildikçe astımın kadınlar arasındaki yaygınlığının erkekler arasındaki yaygınlığından daha fazla olduğu bildirilmiştir (Şekil 2.2.) [9-13].



Şekil 2. 2. Yaş ve Cinsiyete Göre Astım Prevalansı [12].

Ülkemizde, 2009 yılında Türk Toraks Derneği Astım ve Alerji Çalışma Grubu'nun yönettiği, 14 şehirden toplamda 25843 kişinin katıldığı anket çalışmasında astım prevalansı, kırsal bölgede yaşayan erkekler arasında %8,5; kırsal bölgede yaşayan kadınlar

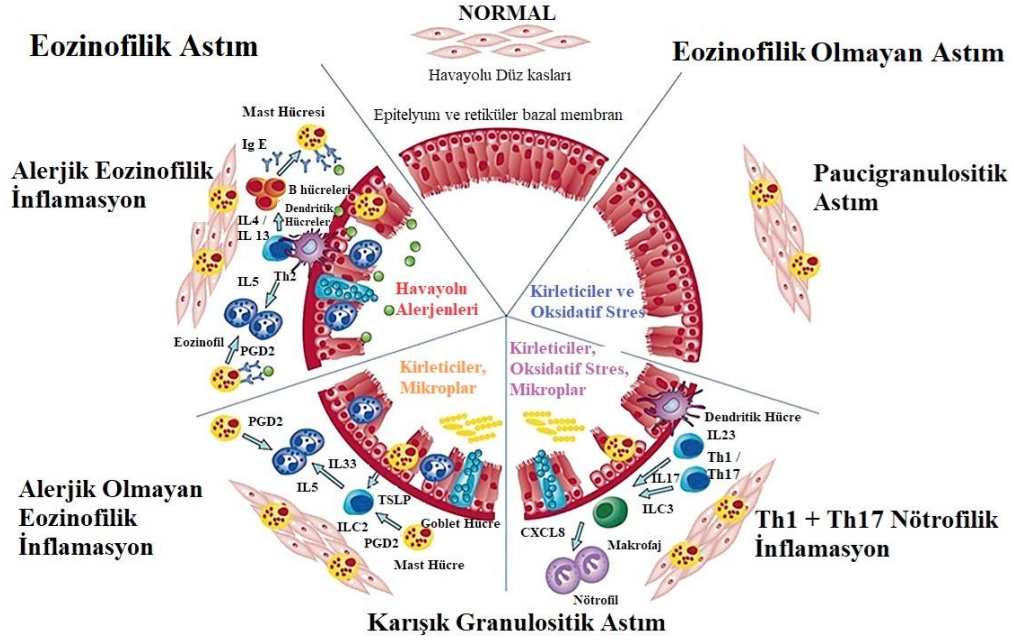
arasında % 11,2; şehirde yaşayan erkekler arasında % 6,2; şehirde yaşayan kadınlar arasında ise % 7,5 olarak bulunmuştur [14].

2.3 Astım Türleri

Astımın bir hastalıktan ziyade bir sendrom olması, astımın tedavisini güçleştirmekte ve kişiden kişiye farklılık göstermesine neden olmaktadır. Doğru tanının koyularak doğru tedavinin yapılabilmesi için, astım çeşitli fenotip ve endotiplere ayrılmıştır. Fenotip terimi, bir hastalıkta doğrudan bir patofizyolojik etki olmaksızın, o hastalığın klinik olarak gözlenebilen özelliklerini tanımlarken; endotip, hastalık sonucunda farklı patofizyolojik süreçlerin olduğunu anlatan bir terimdir [15].

2.3.1 Astım Fenotipleri ve Astım Patogenezi

Astım fenotipleri hastanın yaşı, hastalığın şiddeti, sıklığı, atopik veya non-atopik oluşu ve meydana gelen semptomlar gibi birçok özellik göz önüne alınarak oluşturulmuştur. [15]. Astımlı bireylerden alınan bronkoalveolar sıvı örnekleriyle yapılan ilk çalışmalar astım fenotiplerini, alerjik ve alerjik olmayan astım şeklinde iki ana gruba ayırmıştır [16]. Alerjik astım, havayolu alerjenlerinin solunmasını takiben şiddetlenen bir astım türü olup alerjik olmayan astıma göre tedaviye karşı daha duyarlıdır. Buna karşın alerjik olmayan astım türünde, bireyler herhangi bir havayolu alerjenine maruz kalmaksızın -aşırı spor yapımı, obezite gibi sebeplerden dolayı- astım semptomu gösterebilmektedirler [15]. Günümüzde ise astım fenotiplerini tanımlamak için, çok sayıda klinik olarak gözlemlenebilir özellik kullanılmış ve tanımlanmış olan birçok fenotip, epidemiyolojik verilere, oluşan semptomlara, atopik duruma ve bronş tıkanıklığı gibi özelliklere dayandırılmıştır [15, 17, 18]. Tüm bunlarla beraber, indüklenmiş balgamda granülosit infiltrasyonunun araştırılması sonucunda 4 fenotip; eozinofilik, nötrofilik, karışık granülositik ve paucigranülositik önerilmiştir [19-21]. Balgamda incelenen granülositlere göre; eozinofilik astımda balgamda tespit edilen eozinofil oranı >%3, nötrofilik astımda balgamda gözlenen nötrofil oranı >%61, karışık granülositik astımda balgamda hem nötrofil hem de eozinofil artışı gözlenmiştir, paucigranülositik astım da ise eozinofil ve nötrofil düzeyleri normal miktardadır [22-24]. Şekil 2.3.'de gösterildiği gibi, süreç genellikle havayolu epitelinin bir uyarana karşı maruziyeti ile başlar ve sonrasında oluşan havayolu inflamasyonunun ve klinik belirtilerin çerçevesinde farklı yolaklar izler [25].



Şekil 2. 3. Astım patolojisinin karakteristik özellikleri. Özellikler, eozinofilik (alerjik ve alerjik olmayan), eozinofilik olmayan (nötrofilik tip 1 ve tip 17 ve paucigranülositik) ve karışık granülositik inflamasyon olarak üçe ayrılır. IL, interlökin; TH, T yardımcı hücre [25].

2.3.1.1 Eozinofilik Astım

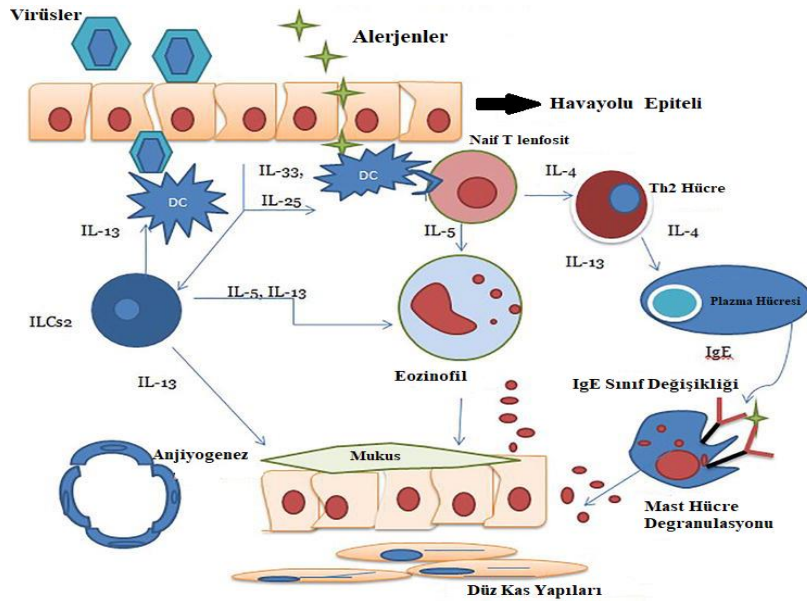
Eozinofilik astım, havayolu mukozasında bazal membran inflamasyonu, kanda ve balgamda yüksek eozinofil seviyeleri ile tanımlanan astım fenotipidir [26-28]. Genel olarak alerjik duyarlılaşma ve baskın Th2 inflamatuvar yanıt ile ilişkilendirilen eozinofilik astım, sıklıkla kortikosterooid tedavisine cevap vermektedir [29]. Eozinofilik astım kendi içerisinde 3 kısma ayrılmaktadır;

- 1- *Alerjen hassasiyetiyle ortaya çıkan eozinofilik astım:* Bu tür eozinofilik astımda hastalar, alerjik rinitle beraber alerjen maruziyetinde şiddetli semptomlar gösterirler. Genç yaşta başlayan astım durumunda gözlenmektedir.
- 2- *İdiyopatik eozinofilik astım:* Bu türdeki hastalar non-atopik olup, genellikle ileri yaşlardaki bireylerde görülür. Tipik eozinofilik patolojiyi yansıtır.
- 3- *Aspirin ile alevlenen astım:* Bu astım çeşidinde bireylerde aspirin duyarlılığı söz konusudur. Hastalar, nazal polipler ve aspirin duyarlılığı ile ciddi rinosinüzit semptomları gösterirler. İdiyopatik eozinofilik astımda olduğu gibi, bu tür astımda genellikle non-atopik ve erişkin bireylerde görülür. [28]

Eozinofilik astım bir dizi immünolojik ve pro-inflamatuvar mekanizmalar sonucu gelişir. Temel olarak, adaptif bağışıklık sisteminin bir üyesi olan ve IL-4, IL-5 ve IL-13

sitokinlerinin salınımında rol alan Th2 hücreler tarafından yönlendirilirler [28, 30, 31]. Bunun yanı sıra, Th2 aracılı hava yolu eozinofili, dendritik hücreler, bronşiyal epitel hücreleri ve doğal lenfoid hücrelerden oluşan hücreler arası bağlantıya dayanan doğal bağışıklık ile de bağlantılı olabilir [28]. Sonuç olarak, hava yolu eozinofili, eozinofilik alerjik ve alerjik olmayan astımda tip-2 inflamasyonun patojenik sürecine kritik olarak katılan hem Th2 hem de tip 2 doğal lenfoid (ILC2) hücrelerinin biyolojik aktivitesinden kaynaklanmaktadır. Bu mekanizmalar ise artan IgE ifadesiyle ilişkilidir [32].

Alerjik duyarlılaşma sırasında solunan alerjenler, hava yolundaki antijen sunan dendritik hücreler tarafından alınır ve T hücrelerine sunulur. Sitokin çevresi ise, T yardımcı hücrelerinin farklılaşmasına ve IL-4, IL-5 ve IL-13 üretimine yol açarak immünoglobulin (Ig) E sınıf değişimine, mukus üretimine ve havayolu aşırı duyarlılığı ile havayollarının yeniden şekillenmesine neden olur (Şekil 2.4.) [29].



Şekil 2. 4. Eozinofilik Astım Patogenezi [28].

2.3.1.2 Nötrofilik Astım

Nötrofilik astım, balgamda %40-76 arasında değişen yüksek nötrofil ile karakterizedir. Nötrofilik astım sabit havayolu obstrüksiyonu, 1 saniyede çok düşük zorlu ekspirasyon hacmi (very low forced expired volume in 1 second = FEV1) ve bronkodilatör sonrası FEV1 ile ilişkilendirilmiştir [33]. Nötrofilik astım, Th2 tip astımdan farklı olarak, kortikosteroidlere karşı çok daha düşük cevap vermektedir. Nötrofilik astımın

kortikosteroidlere karşı dirençli olması, bu tür astımdan muzdarip kişilerin hastaneye yatış sıklığının ve buna bağlı ölüm oranlarının artışı ile sonuçlanmaktadır. Bu durum ise nötrofilik astımda “ağır astım” vakalarının daha çok olmasını açıklar [33-35]. Nötrofilik astımın patofizyolojisi eozinofilik astıma göre daha az anlaşılmıştır. Nötrofilik astımın virüs, bakteri ve mantar kaynaklı oluşan solunum yolu enfeksiyonları, rinosinüzit, obezite, gastro-özofagal reflü, uyku apneleri gibi dış etkiler ile şiddetlendiği bilinmektedir. Mantarlar arasında *Aspergillus fumigatus*, mantar duyarlı şiddetli astımda (SAFS) tanımlanmıştır ve nötrofilik bir cevap oluşturmuştur [36]. Nötrofillerin astımdaki rolleri tam olarak açıklanamamıştır ancak granüllerinin salınması, bronşiyal hiper reaktivite ve havayollarının yeniden yapılanmasına neden olabileceği öne sürülmüştür. Nötrofilik astımlı hastaların balgamlarında, eozinofilik astımlıların balgamına kıyasla daha yüksek seviyelerde total matriks metaloproteinaz-9 (MMP-9) ve nötrofil elastaz (NE) enzimleri bildirilmiştir [37]. Bu enzimler havayolu yapısal hasarına neden olup aynı zamanda CXCL-8 (IL-8) gibi güçlü kemokinlerin aşırı salgılanmasına sebep olurlar [36]. Yapılan birçok çalışmada IL-17A sitokininin güçlü bir nötrofilik astım medyatörü olduğu ve salgılanması sonucunda ortama nötrofil akışının olduğu gösterilmiştir [38, 39]. Primer bronş epitel hücrelerinde yapılan deneysel çalışmada IL-17A'nın salınımı sonrası, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL8/IL-8, IL-6 ve IL-19 proteinlerinin indüksiyonu bildirilmiştir. Tüm bu çıktılar doğrultusunda nötrofilik astımda en önemli medyatörlerin başında IL-17A geldiği düşünülmektedir [40].

2.3.1.3 Karışık Granülositik Astım

Karışık granülosit astım, şiddetli astımın nadir görülen bir türüdür. Bu alt tipe sahip kişilerde hem eozinofilik hem de nötrofilik inflamasyon vardır. [22, 23, 41]. Yapılan klinik çalışmalarda eozinofilik olmayan (nötrofilik, karışık granülositik ve az granülositik) astım türlerinde hetorejenlikler görülmüştür. Havayolu aşırı duyarlılık düzeyleri (AHR) ve dışarıya verilen nitrik oksit (eNO) miktarları incelendiğinde ise, karışık granülositik tip astımda eozinofilik astıma benzer eNO ve AHR seviyeleri tespit edilmiştir [22].

2.3.1.4 Paucigranülositik Astım (PGA)

Literatürde paucigranülositik astım olarak geçen bu astım türünde, balgamda ve kanda yüksek sayıda eozinofil veya nötrofile rastlanmaz ve ayrıca anti-inflamatuar tedaviler yanıtız kalır. Bu astım türü yeterince araştırılmamış olmasına rağmen hafif astımlı bireyler arasında karşılaşılan en yaygın astım fenotipidir [19, 22-24]. Bu tür, inflamatuvar olmayan

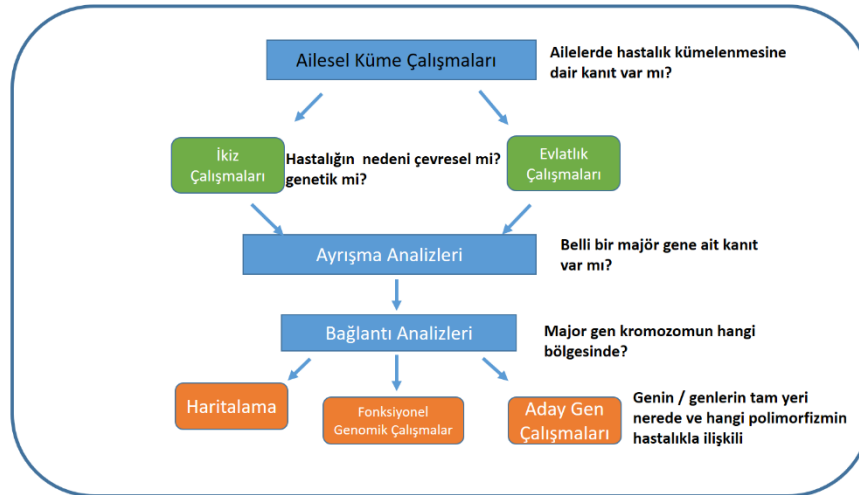
astım olarak da adlandırılmaktadır. Diğer eozinofilik olmayan türlerde olduğu gibi bu türde kortikosteroid dirençli olarak bilinmektedir [19].

2.4 Astımın Etiyolojisi ve Risk Faktörleri

Dünya genelinde insidansı giderek artan astım, diğer birçok hastalığın aksine gelişmiş ülkelerde daha sık görülür. Bunun temel nedeni olarak ise farklı çevresel faktörler gösterilmektedir. Sanayileşmeye bağlı artan hava kirliliği, polen, hayvan tüyleri, mantarlar gibi solunabilen alerjenler ve besin ile aldığımız alerjenler çevresel faktörlere birer örnektir. Bunun yanı sıra, ailede görülen astımın genellikle diğer aile bireylerinde de görülebilmesi astımın genetik yönünü göstermektedir. Bu bilgiler ışığında astımın hem çevresel hem de genetik faktörlerle ilişkisi olduğu söylenebilir [42].

2.4.1 Genetik Faktörler

Astımda genetik faktörlerin etkisinin %35-95 arasında olduğu belirtilmektedir [43, 44]. Astımlı bireylerde yapılan aile çalışmaları, tek yumurta ve çift yumurta ikizi çalışmaları astımın genetik yönünü desteklemektedir. Bununla birlikte astımın nesiller boyunca aktarımı poligeniktir ve birden fazla kalıtsal bileşeni vardır [45]. Astımda olduğu gibi kalıtımında birden fazla genin rol üstlendiği hastalıklarda, genetik faktörlerinin araştırılması bir takım temel genetik çalışmalarla ilerler (Şekil 2.5.).



Şekil 2. 5. Karmaşık hastalıklarda genetik faktörlerin araştırılması için izlenen yol [46].

2.4.1.1 Ailevi Kümelenme ve İkiz Çalışmaları

Ailesel kümelenme ve ikiz çalışmaları, karakteristik bir özelliğin ölçülebilir bir genetik bileşene sahip olup olmadığını belirlemede kullanılan ilk adımdır. Yapılan aile çalışmalarında genetik bileşenlerin astım hastalığının kalıtımında önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir [46, 47]. Bununla birlikte, tek yumurta ikizlerinin, çift yumurta ikizlerine kıyasla astımda daha yüksek uyumluluğa sahip olduğu görülmüştür [42].

2.4.1.2. Ayırışma Analizleri

Ayrışma analizleri, genetik karakterin nasıl kalıtıldığı (baskın – çekinik), hangi gen veya genler ile ilişkili olduğu gibi sorulara cevap bulabilmek için yapılan çalışmalardır [42]. Literatürde astım vakalarında ayrışma analizleri yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda sıklıkla IgE konsantrasyonlarının ayrışma analizleri yapılmıştır. Bu çalışmaların çoğu IgE seviyelerinin yüksek oranda kalıtsal olduğunu bildirmiştir [48-50].

2.4.1.3. Genom Boyu Bağlantı Analizleri

Genom çapında bağlantı analizleri, genetik hastalıkla ilişkili olan genlerin belirlenebilmesi için yapılan çalışmalardır. Çalışma sırasında belirlenen popülasyonlar üzerinde geniş bir genetik analiz yapılarak hastalık ile ilişkili ortak genler tespit edilir. Eğer bir hastalık, belirli belirteçlerle birlikte gelecek nesillere aktarılırsa, hastalığa sebep olan genlerin kromozomlardaki konumunun bu belirteçler ile yakın olduğu düşünülür. Böylece, astım ve alerji gibi birçok gen tarafından düzenlenen genetik hastalıkların daha kolay genetik analizinin yapılması sağlanır [45]. 11 farklı popülasyonda yapılan Genom Boyu Bağlantı Analizi Çalışmaları ve vaka kontrol çalışmaları kapsamında, astım ve alerjiyle ilgili 18 genomik bölgeyle beraber 100'den fazla gen ilişkilendirilmiştir [51, 52]. Örneğin, birçok çalışmada atopik hastalıklarla bağlantılı olan 5q31-32 bölgesi, T hücre aktivitesi ve cilt morfogenezi ile ilişkili olan IL4, IL13, CD14 ve SPINK5 genlerini taşır [53]. Bağlantı analizlerinde daha spesifik bölgeleri bulabilmek için daha yoğun işaret eşlemesi (ince haritalama) yapılmaktadır.

2.4.1.4 Aday Gen İlişkilendirme Çalışmaları

Bağlantı analizlerinin genellikle aileler arasında veya belirli popülasyonlarda yapılmasına karşın, aday gen ilişkilendirme çalışmaları hem aile içerisinde hem de akraba olmayan hasta ve sağlıklı bireyler arasında yapılabilmektedir [46]. Bu yaklaşımda, sağlıklı bireyler

ve hasta bireyler arasındaki genler karşılaştırılarak hastalıkla ilişkili olası polimorfizimler belirlenmeye çalışılır [45].

Pozisyonel klonlama metoduyla belirlenen astımla ilişkili ilk aday gen, bir disintegrin ve metalloproteinaz olan *ADAM33* genidir. Bronş düz kas hücreleri ve fibroblastlar tarafından sentezlenmekte olan bu genin, akciğer fonksiyonları ve havayollarının yeniden şekillenmesi ile ilgili olduğu düşünülmektedir [54]. İnsan genom projesinin tamamlanmasıyla beraber tek nükleotid değişimlerinin (single nucleotide polymorphism-SNP) incelenmesi kolaylaşmıştır ve farklı popülasyonlarda farklı genler üzerinde çok sayıda çalışma tamamlanmıştır. Çok sayıda SNP Çalışması, Yapılan Genom Boyu İlişkilendirme Çalışmaları'nda (Genome Wide Association Studies-GWAS) 1000'yakın aday gen belirlenmiştir fakat bu aday gen çalışmalarının sonuçlarının tekrarlanabilirliği genellikle düşüktür. Bununla beraber, 17. kromozomda bulunan ve ilk keşfedilen GWAS geni olma özelliği taşıyan *ORMDL3* geni, birden fazla aday gen çalışmasında tanımlanmıştır. [51, 55, 56]. Buna ek olarak 2. kromozomda *IL1RL1/IL18R1*, 6. kromozomda *HLA-DQ* 9. kromozomda *IL33*, 15. kromozomda *SMAD3* ve 22. kromozomda *IL2RB* genleri astımla ilişkilendirilen genlerdir. Bu genler arasında *ORDML3* geni özellikle çocukluk çağı astım ile ilişkiliyken, *HLA-DQ* geç dönem astım ile ilişkilidir. *ORMDL3*, *IL1RL1/IL18R1*, *IL33*, *SMAD3* ve *HLA-DQ* genleri birçok çalışmada çocukluk çağı astımı ile ilişkilendirilmişlerdir. [45, 57]

2.4.2 Epigenetik ve Çevresel Faktörler

Genetik faktörler astım hastalığında önemli bir yer edinse de tek başına gerekli veya yeterli değildir. Yapılan çeşitli epidemiyolojik çalışmalarda ve hayvan çalışmalarında aynı genetik değişkenliğin farklı çevrelerde, farklı klinik fenotiplerle karakterize olduğu gösterilmiştir [58].

2.4.2.1 Epigenetik Faktörler

Epigenetik, DNA dizisinde doğrudan değişiklik olmaksızın, gen ifadesindeki değişikliklerin incelenmesidir. Bu değişiklikler arasında DNA'nın metilasyonu, fosforilasyonu, asetilasyonu, ubikitilasyonu görülebilmektedir [59]. DNA dizisini değiştirmeden meydana gelen bu etkiler, hücre yaşamının geri kalanı boyunca hücre bölünmeleri yoluyla kalabilir ve bunun yanı sıra birden fazla nesil boyunca da sürdürülebilir [60]. Anormal DNA metilasyonu, değiştirilmiş histon modifikasyonu, spesifik mikro-RNA ifadeleri ve kromozomlarda gerçekleşen diğer değişiklikler T hücre, dendritik hücre, marofaj gibi

inflamatuar hücrelerin yanı sıra epitel hücre gibi yapısal hücrelerin yeniden yapılanmasında görev alırlar. Ayrıca, dendritik hücre işlevi, makrofaj aktivasyonu ve havayolu epitel bariyerinin bozulması gibi etkilere sebep olabilmektedirler [60]. Son 20-30 yılda astım ve alerjinin görülme sıklığındaki ciddi artışlar genetik dizide değişikliğe neden olmadan gen ifadesi üzerinde etkili olan epigenetik faktörlerin de önemli bir rol oynadığını göstermektedir [61-63].

2.4.2.2 Çevresel Faktörler

Astımın ortaya çıkışını tetikleyen çeşitli çevresel faktörler mevcuttur. Bunların arasında mikrobiyal ve viral patojenler, egzoz dumanları, polenler, *Aspergillus fumigatus* gibi dış ortam küfleri, soğuk ve nemli hava gibi ev dışında maruz kalınan çeşitli etkenlerin astımı tetiklediği ve şiddetini arttırdığı gösterilmiştir [64]. Bununla birlikte ev tozu akarları, hamamböcekleri, fareler, evcil hayvan tüyleri, ev küfleri kaynaklı moleküller, farmasötik ilaçlar, gibi iç ortam alerjenleri de astım tetikleyicileridir [59]. Yapılan çalışmalar, benzer popülasyonlarda görülen astım sıklığındaki önemli farkların farklı dış ortam ve iç ortam şartları, çalışma ortamı ve farklı beslenme alışkanlıklarına bağlı olarak tüketilen besinler (Omega-6 çoklu doymamış yağ asitleri, C ve D vitaminleri, β -karoten, magnezyum, selenyum vb. mineraller) tarafından da kaynaklanabileceğini göstermektedir [42].

2.5 Astım ve Mantar İlişkisi

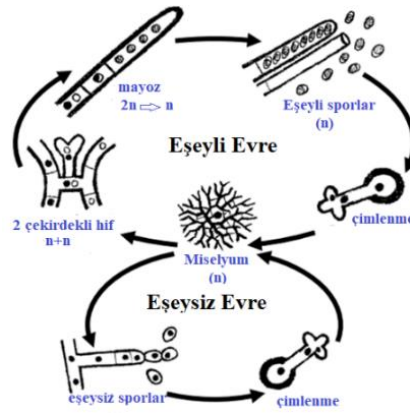
Astımın şiddeti, kişiden kişiye değişiklik gösterir ve bununla birlikte, astımlıların üçte ikisinin yaygın alerjenlere karşı reaksiyon gösterdiği bilinmektedir [65]. Astım şiddetinin artmasındaki en önemli ve yaygın alerjenler, ev tozu akarı (house dust mite = HDM), evcil hayvanlardan kaynaklanan hayvan tüyleri, polenler ve mantarlardır [66-68]. Mantarların insan sağlığını etkilediği uzun yıllardır bilinmekte ve etkileri araştırılmaktadır [65, 69].

2.5.1 Mantarlar

Mantarlar alemi, küfler, mayalar, mantarlar, braket mantarları gibi çeşitli ökaryotik organizmaları içeren geniş bir alemdir [70]. Mantar Yaşam Ağacı Birleştirme (AFTOL) projesine göre, mantarlar alemi 8-10 filuma bölünebilir. Bunlar arasında, Ascomycota ve Basidiomycota grupları, tanımlanan mantar türlerinin yaklaşık %98'ini temsil eden Dikarya'yı oluşturur [71, 72]. Mantarların tamamı zararlı olmasa da içerisinde insan sağlığını birçok yönden olumsuz etkileyebilen türleri barındırmaktadır. Mantarlar, konaklarına yüzeysel deri enfeksiyonlardan, hayatı tehdit eden invazif mikozlara kadar

değişen enfeksiyon yoluyla, toksinler üreterek veya alerjik reaksiyonları indükleyerek zarar verebilirler [73]. Mantarlar, hayvanlardan ve bitkilerden farklı olan karmaşık bir metabolizmaya sahiptir. Çevrelerine enzimler salgırlar ve enzim faaliyetinin parçalanma ürünlerini emerler [74]. *Penicilium*, *Aspergillus* türlerinin yanı sıra *Candida albicans* gibi mayaların da dahil olduğu bazı mantar türleri, mantar kaynaklı akciğer enfeksiyonlarının en önemli nedenini oluşturur [73, 75, 76].

Mantarlar, maya gibi tek hücreli olabilir, ancak tipik olarak çapı 2 ila 10 mm arasında değişen, hiflerden oluşan, iplik benzeri veya tüp benzeri bir gövdeye sahiptir. Hifler mantarların uçlarında büyür ve sıklıkla dallanır ve bu da miselyum adı verilen birbirine bağlı bir hif ağının oluşumuna neden olur [77, 78]. Mantarlar, çoğu havada dağılmaya uyarlanmış sporlar üreterek çoğalırlar. Sporlar, mayoz veya mitozla çoğalabilir. Mayoz bölünme ile üretilen sporlar, eşeyli üreme ile ilişkilidir ve her bir fungal filumun özelliği olan çeşitli yapılarda üretilir. Alerjenik mantarlar arasında, mitoz bölünme ile üretilen sporların çoğu, farklılaşmış hifler veya konidiyoforlar üzerinde oluşur ve bunlara konidya adı verilir. Bunlar, yaşam döngüsünün eşeysiz çoğalma aşamasıyla ilişkilidir (Şekil 2.6.) [79].

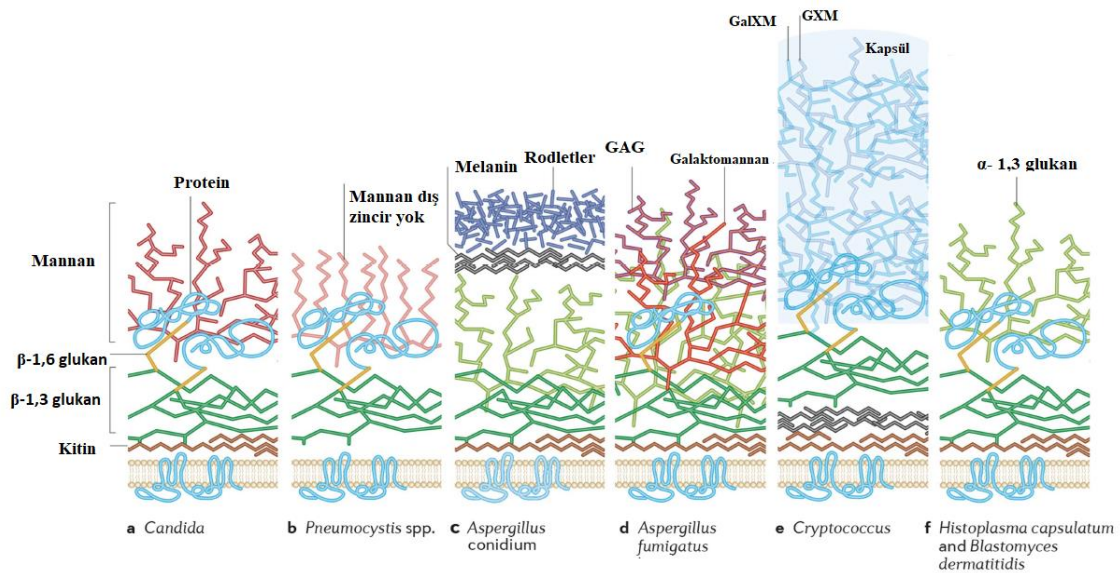


Şekil 2. 6. Mantarların Hayat Döngüsü [80].

2.5.2 Mantar Hücre Duvarı

Temel olarak, mantar hücre duvarlarının tümü benzer şekilde tasarlanmıştır. Duvar yapısı, duvarın işlevini doğrudan etkiler ve çevreyle iletişim halindedir. Lifli ve jel benzeri karbonhidrat polimerler, çeşitli proteinler ve diğer yapılar ile güçlü fakat esnek bir haldedir. Hücre zarının hemen üzerinde yer alan sert bir kitin yapısı hücre duvarının ana tabakasını oluşturmaktadır. Kitin tabakasının hemen üzerinde ise heterojen bir halde β -1,3

glukan yapısı ve bu yapıya bağlı dallanmış bir β -1,6 glukan yapısı bulunmaktadır. Bu çekirdek yapısı sayesinde, selüloz ve β -1,3; β -1,4 glukan yapısı içeren bitki çeperinden ayrılmaktadır. Bu yapı hücre duvarının suda çözünürlüğünü azaltarak, hücre duvarının suda çözünmeyen bir hal almasını sağlar. Kitin ve β -glukan yapısından oluşan iskelet üzerinde çeşitli bağlı proteinler ve karbonhidrat yapıları bulunmaktadır. Bu yapılar; mannanlar, mannoproteinler ve galaktomannanlardır. Kitin, β -glukan ve mannozlardan oluşan bu heterokompleks yapı haricinde, mantar türleri arasında değişkenlik gösteren melanin, α -1,3 glukan gibi ikincil yapılar da bulunmaktadır. Mantar hücre duvarı, doğuştan gelen bağışıklık sistemini uyarabilecek çeşitli bileşenlere sahiptir. (Şekil 2.7.) [74, 79, 81].



Şekil 2. 7. Mantar Türlerinin Hücre Duvar Yapıları [82].

2.5.2.1 Hücre Duvarı Polisakkaritleri

Kitin ve glukan gibi polisakkaritler, transmembran enzimatik kompleksler tarafından hücre zarında sentezlenir [82]. Kitin ve glukan sentezinde rol alan ana sentazlar hücre zarında bulunur ve substrat olarak urasil di-fosfat (UDP) şekerini kullanırlar. Bu polisakkaritler (kitin ve glukan), kendi aralarında ve diğer moleküller ile (mannan, glikoproteinler) çapraz bağlar oluşturarak hücre duvarının sağlamlığını türden türe değiştirirler [81, 82].

Mantar hücre duvarının, hücre zarına bağlı ilk kısmı olan kitin, hücre duvarı bileşenleri arasındaki en polimorfik bileşendir [83]. 1,3- β -Glukan yapısı ile beraber mantar hücre duvarının çekirdeğini oluştururlar [82]. Kristal yapısından dolayı direnç ve sertlik

kazandırır. Ayrıca, fitopatogenik mantarlarda enfeksiyonla ilişkili morfogenezde anahtar rollere sahiptir [84].

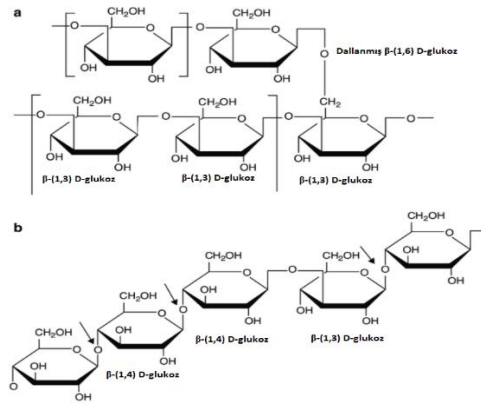
β -glukanlar, yulaf ve arpa gibi bitkilerin yanı sıra; bakteri, mantar, maya, yosun ve liken gibi organizmaların hücre duvarlarında bulunan glikoz polimerleridir. Bitkilerde bulunan β -glukan yapısı 1,3-1,4 glukoz bağları ile karakterize iken, bu yapı birkaç istisna haricinde maya ve mantarlarda 1,3-1,6 glukoz bağlarıyla karakterizedir (Şekil 2.8.). Bu bağlanma farklılığı nedeniyle, maya ve mantardan elde edilen β -glukan yapısı, suda çözünmez bir özellik kazanır ve ayrıca 1,3-1,4 β -glukan yapısına kıyasla daha fazla biyolojik aktiviteye sahip olduğu iddia edilmektedir [82, 85, 86]. β -glukanların suda çözünürlük, moleküler kütle ağırlığı, dallanma derecesi ve konformasyon gibi fiziksel özelliklerine bağlı olarak çeşitli biyolojik ve immünofarmakolojik aktivitelere sahip oldukları gösterilmiştir [87].

Mantar hücre duvarının kuru ağırlığının yaklaşık %50-60 kadarını oluşturan bu karbonhidrat polimeri, makrofajlar ve diğer beyaz kan hücrelerindeki reseptörlerin (komplementer reseptör 3, çöpçü reseptörler) yanı sıra epitel hücrelerde bulunan reseptörlere de bağlanarak, bağışıklık sistemi üzerinde anti-tümör ve pro-inflamatuar aktiviteyi güçlü bir şekilde uyarır [88, 89].

Glukan sentezini ve bileşimini inceleyen çalışmalar, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Candida albicans*'ta yapılmıştır ve bu çalışmalarda maya hücre duvarının ana yapısı olarak β -1,3-1,6 glukan içerdiği gösterilmiştir [90]. Buna karşın, yakın zamanda yapılan araştırmalar ise *Neurospora crassa*, *A. fumigatus* dahi birçok filamentli mantarın, hücre duvarı ana bileşenlerinde β -1,6 glukan yapısının ana bileşen olmadığı gösterilmiştir [91, 92].

Mantar hücre duvarını oluşturan bir polisakkarit olan mannanlar, proteinlere bağlanan kısa dekorasyon mannanları ve uzun temel mannanlar olarak iki şekilde bulunurlar. Mannanların sentezleri mayalarda ve küflerde benzer yolları izler ve kısa dekorasyon mantarlarının varlığı hem mayaların hem de *A. fumigatus*'un hücre duvar yapısının oluşumunda oldukça önemlidir [93]. Buna karşın mayalar ve ipliksi mantarlar arasındaki en büyük farklardan birisi hücre duvarı uzun mannanlarının yapısal organizasyonudur. *S. cerevisiae* ve *C. albicans* gibi mayalarda, yüksek oranda dallanmış N-bağlantılı mannanlar proteinlere bağlanır ve molekül başına 100'den fazla mannosil kalıntısı içerir. Bu mannanlar hücre duvarının yüzeyini kaplar ve hücre duvarının polisakkarit çekirdeğine kovalent olarak bağlanmazlar. İpliksi mantar *A. fumigatus*'ta uzun mannanlar (zincir başına

ortalama 50 mannoz), glukan-kitin çekirdeğine kovalent olarak bağlandıklarından hücre duvarının ayrılmaz bir parçasıdır [94].



Şekil 2. 8. a) Suda çözünmeyen dallı β - glukan yapısı b) Suda çözünen lineer β - glukan yapısı [95].

2.5.2.2 Melanin

Melaninler, polimerize fenolik ve / veya indolik bileşiklerden oluşan, yüksek moleküler ağırlıklı, negatif yüklü hidrofobik pigmentlerdir [82]. Melaninlerin işlevleri tam olarak bilinmemekle beraber mantar hücre duvarlarında iki tip melanin bulunur. Bunlar *Aspergillus* türlerinde bulunan 1,8-dihidroksinafitalin (DHN)-melanin ve *Wangiella dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, gibi siyah renkli patojenlerde ve *Cryptococcus neoformans* türlerinde bulunan 3,4-dihidroksifenilalamin (DOPA)-melanindir [82].

Bitki patojenik mantarları üzerine yapılan çalışmalara dayanarak, melaninin insan mantar patojenlerinde yapısal rolünün hücre duvarı sertliğini arttırdığı, *W. dermatitidis* gibi siyah mantarların hiflerinin konak dokulara ve *Aspergillus* türlerinin kondiyalarına renk verdiği söylenebilir [82, 96].

2.5.2.3 Hücre Duvarı Proteinleri

Mantarların hücre duvarında, farklı işlevlerde ve bazen türe özgü çok sayıda protein sınıfı bulunur. Yüzeyle yapışarak duvarın özelliklerini değiştirmede ve mantarın dış ortama adaptasyonunda veya fagositlerden gizlenmesinde görev yapabilirler [82].

2.5.3 *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus ailesi içerisinde 250'den fazla tür olup, çoğu toprakta bulunur ve gıda bozulmasının ana etkenleri arasındadır [97]. *Aspergillus* ailesi içerisinde özellikle 4 tür; *A. nidulans*, *A. niger*, *A. terreus* ve *A. fumigatus* insan ve hayvan hastalıklarının yaygın

ajanlarıdır. Bu 4 tür içerisinde *A. fumigatus*, dış çevrede en çok karşılaşılan ve fırsatçı mantar patojeni olarak solunum yolu hastalıklarına neden olmaktadır [98, 99].

2.5.3.1 *Aspergillus fumigatus*' un β - Glukan İskeletli Hücre Duvarı

Mantar hücre duvarının fiziksel ve biyolojik özellikleri, yapısal polisakkaritlerin bileşimi, bağlanma şekilleri ve konumu ile belirlenir. Mantar hücre duvarı polimerleri temel olarak sıcak alkalide çözünürlüklerine göre iki gruba ayrılırlar. Yakın dönemde yapılan bir çalışmadaki kimyasal analizler sonucunda *A. fumigatus* hücre duvarının tespit edilen özellikleri: i) β -1,6 glukanın merkezi yapıda olmaması ve ii) diğer mantarlarda tanımlanamayan doğrusal bir β -1,3 β -1,4 glukanın varlığıdır. Aynı çalışmada *A. fumigatus* türünün alkali çözünmeyen fraksiyonlarının galaktomannan, kitin ve β -1,3 glukana yapıları içerdiği görülmüştür. Kitin, galaktomannan ve lineer β -1,3- β -1,4 glukana, β -1,3 glukana yan zincirlerinin indirgeyici olmayan ucuna kovalent olarak eklenmiştir. Mayalarda olduğu gibi, kitin, β -1,4 bağı yoluyla β -1,3 glukana bağlanır. Bu veriler, β -1,3-glukanın dallanmasının hücre duvarı yapısında erken bir olay olduğunu ve kitinin galaktomannan ve doğrusal β -1,3 - β -1,4 glukana için potansiyel reseptör bölgelerinde bir artışa yol açtığını göstermektedir [92, 100, 101]

2.5.3.2 *Aspergillus fumigatus* ve Havayolu Hastalıkları

Fungusların hava yolu alerjisi olduğu uzun yıllardır bilinmektedir. Hava yolu fungal alerjenleri arasında en sık karşılaşılanları *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium*, mayalar ve *Aspergillus*'tur [69, 102]. Mantarlar optimum geliştikleri ortam sıcaklıklarına göre 3 sınıfa ayrılabilirler:

1. **Mezofilik (Ilıman Ortam Seven) Mantarlar:** 18°C ile 22°C sıcaklıklarda optimum gelişim gösteren mantarlardır. Mezofilik mantarlar 37 °C'de yüksek aktivite gösteremedikleri için insanlarda patojen olma özellikleri sınırlıdır [103].
2. **Termofilik (Sıcaklık Seven) Mantarlar:** Yüksek sıcaklıklarda gelişebilen bu mantarlar vücut sıcaklığında da rahatlıkla gelişebilirler. Fakat bu mantarlar 20°C'nin altında büyüyemezler. Bu nedenle genellikle dış çevrede bulunamazlar ve nadiren insan enfeksiyonları ile ilişkilidirler [103]
3. **Termotolerant (Sıcaklık Değişimlerine Toleranslı) Mantarlar:** Çevresel şartlara yüksek uyumluluğu olan, ani sıcaklık değişikliklerine karşı uyum sağlayabilen mantarlar, hem dış çevrede yoğun bir şekilde bulunurlar hem de vücut sıcaklığı olan 37°C'de aktivitelerini devam ettirebilirler. Bu mantarlar, başta alerjik

havayolu enfeksiyonları olmak üzere birçok hastalık ile ilişkilendirilmişlerdir [103].

Aspergillus cinsi mantarlar, termotolerant özellikte olup, sıcaklık değişikliklerine karşı toleranslıdır. Dış çevrede sıklıkla karşılaşılan *Aspergillus* cinsi mantarlar, ürettikleri küçük sporlar vasıtasıyla alt ve üst solunum yollarında kolayca kolonize olabilirler [103, 104]. Solunum yollarına yerleşen bu sporlar çimlenmeye başlar. Solunum yollarında gelişen bu sporlar hastalığa yatkın kişilerde bronkopulmoner aspergillozis (ABPA) gelişimine sebep olur ve fungal duyarlılığa sahip şiddetli astım (SAFS) ile ilişkilendirilirler [105].

2.5.3.3 *Aspergillus*, ABPA ve SAFS

Aspergillus cinsi mantarlar, kişilerin *Aspergillus* sporlarını soluması, bronşiyal astımı olanların *Aspergillus* hassasiyeti ve ABPA ile beraber astım alevlenmesi gibi farklı şekillerde astımın başlangıcı ve şiddetlenmesinde rol oynarlar [65, 106].

ABPA, Alerjik Bronkopulmoner Mikozun (ABPM) en yaygın şeklidir. T yardımcı hücrelerinin alt gruplarından olan Th2 hücrelerinin infiltrasyonu, pulmoner sistemdeki ve periferik kandaki yüksek eozinofili ile karakterize bir akciğer hastalığıdır. Bununla beraber, kan serumunda *Aspergillus fumigatus*'a özgü IgE ve IgG1 antikorları da yüksek miktarda bulunmaktadır [107].

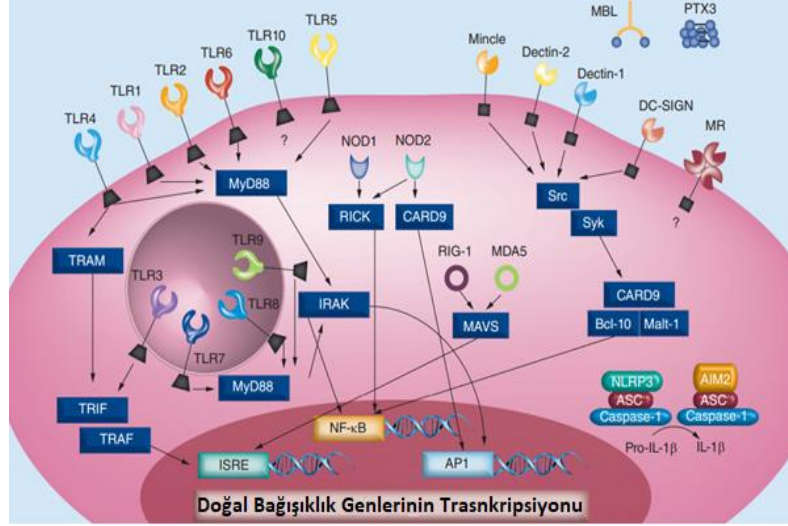
SAFS, son yıllarda fungal alerjenlere duyarlı olan astım hastalarında tanımlanmış yeni bir astım fenotipidir. Çalışmalar doğrultusunda ABPA ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir. Genetik yatkınlığın da etkili olduğu SAFS ve ABPA, astımlı hastalarda birbirinden farklı klinik özellikler göstermektedirler. Yapılan çalışmalarda nazal polip, rinit, saman nezlesi ve bronhektazi gibi klinik bulguların SAFS hastalarında ABPA hastalarına oranla daha fazla görüldüğü tespit edilmiştir. Buna ek, olarak total IgE (tIgE) ve *Aspergillus fumigatus*'a spesifik IgE (sIgE) serum konsantrasyonları, ABPA hastalarında SAFS hastalarına göre daha yüksek oranlardadır [108]. Astım hastalarına SAFS tanısı koyulurken ABPA ile farkının ayırt edilmesi büyük önem taşımaktadır. ABPA genellikle *Aspergillus* duyarlılığının ileri boyuta varmasından kaynaklanır ancak *Aspergillus* duyarlılığı olan her astım hastası ABPA'nın tüm klinik bulgularını taşımayabilir. Araştırmalar, ABPA prevalansının, *Aspergillus* duyarlılığı olan bronşiyal astım hastalarında %40 oranında olduğunu göstermektedir [106].

2.6 Astım ve Havayolu Epiteli

Solunum yolu boyunca bulunan havayolu epitel hücreleri, dışarıdan solunan alerjenlere, mikroorganizmalara ve çeşitli kimyasal ajanlara karşı bariyer görevi görür [109]. Havayolu epitel hücreleri, yüzeylerinde bulundurdukları Patern Tanıma Reseptörleri (PRR) ise dışarıdan gelen molekülleri tanır ve bağışıklık sistemi hücrelerinin uyarımını sağlayacak olan sinyal basamaklarını aktive eder [110].

2.7 Patern Tanıma Reseptörleri (PRR)

İnsan vücudu sürekli olarak bakteri, mantar, virüs, parazit ve protozoa gibi zararlılara maruz kalmaktadır. Bu istilacılara karşı, doğal bağışıklık sistemi epitel hücrelerle beraber ilk savunma hattını oluştururlar [111]. Bağışıklık sistemi, yabancı molekülleri tanıyabilmek için özelleşmiş reseptörlerle donatılmıştır. Bu reseptörler, dendritik hücreler ve makrofajlar başta olmak üzere immün sistemin diğer hücrelerinde de bulunan PRR'lerdir [112]. PRR'ler, patojenler üzerinde bulunan spesifik patojenle ilişkili moleküler paternleri (PAMP) ve hasarlı hücrelerden salınan hasara bağlı moleküler paternleri (DAMP) tanırlar [113, 114]. Bazı Nükleotid Bağlayıcı Oligomerizasyon Alanı Benzeri Reseptör (NLR)'ler haricinde, PAMP'ların veya DAMP'ların PRR'ler tarafından algılanması, inflamatuvar yanıtı oluşturan genlerin transkripsiyonunu düzenler. Bu genler, proinflamatuvar sitokinleri, tip I interferonları (IFNs), kemokinleri, antimikrobiyal proteinleri ve PRR sinyalleşmesinin modülasyonunda yer alan proteinleri ve birçok karakterize edilmemiş proteini kodlar. Bu genlerin ifadesi, aktive edilmiş PRR'ler arasında farklılık gösterir [113]. Hem membran hem de sitoplazmada bulunan PRR'ler 5 reseptör ailesinden oluşur. Bunlardan, Toll Benzeri Reseptörler (TLR) ve C Tipi Lektin Reseptörleri (CLR), transmembran proteinleriyken, Nükleotid Bağlayıcı Oligomerizasyon Alanı Benzeri Reseptörler (NLR), Retinoik Asitle İndüklenebilir Gen (RIG) 1 benzeri reseptörler (RLR) ve AIM2 (Eksik Melanoma 2) Benzeri Reseptörler (ALR) sitoplazmik proteinlerdir (Şekil 2.9.) [111, 115, 116].



Şekil 2. 9. Patern Tanıma Reseptörleri [111].

2.7.1. Sitoplazmik Patern Tanıma Reseptörleri

2.7.1.1 NOD Benzeri Reseptörler (NLR)

NLR'ler, konakçının doğal immün tepkisinin düzenlenmesinde kritik bir rol oynayan özel bir hücre içi protein grubudur. Genellikle bakterileri tanırlar [117]. Nükleer faktör- κ B ve mitojenle aktive olan protein (MAP) kinaz sinyal yollarını tetikleyen ve inflamatuvar kaspazların aktivasyonunu kontrol eden sinyal yollarını bir araya getiren yapı iskelesi proteinleri olarak işlev görür. NLR'ler, immün hücreler ve epitel hücreleri dahil birçok hücre tipinde ifade edilmesine rağmen, esas olarak makrofajlar ve nötrofiller dahil olmak üzere fagositlerde ifade edilirler [118]. Kaspaz alım alanı (CARD), pirin alanı (PYD), asidik alan, bakulovirüs inhibitör tekrarları (BIRs) gibi, aktivasyon için kritik olan ve NOD ile PAMP'leri algılayan bir çok bölgeden oluşan kompleks proteinlerdir [119].

2.7.1.2 RIG Benzeri Reseptörler

TLR'ler, dendritik hücreler ve makrofajlar gibi spesifik hücrelerdeki viral bileşenleri tespit ederken, RLR'ler enfekte virüsleri algılar [120]. RLR'lerin viral RNA'yı algılamasıyla beraber tip 1 interferon (IFN) ve inflamatuvar sitokinlerin üretimi başlayarak immünolojik bir cevap oluşturulur [121].

2.7.1.3 AIM2- Benzeri Reseptörler

Yeni karakterize edilmiş bir patern tanıma reseptörüdür. AIM2 benzeri reseptörler, Konakçı kaynaklı apoptotik hücrelerden, bakterilerden ve virüslerden gelen DNA'ları

doğrudan sitozolik DNA'ya bağlayarak inflamazomu birleştirebilen bir ALR üyesidir. [122]. ALR ailesinin diğer üyelerinin de inflamasyonu aktive ettiği gösterilmiştir [123].

2.7.2 Transmembran Patern Tanıma Reseptörleri

2.7.2.1 Toll Benzeri Reseptörler

Bir transmembran protein olan TLR'ler doğal bağışıklık sistemimizin öncül reseptörleridir ve istilacı bakteri, mantar veya virüslere karşı bağışıklık gösterilmesinde rol alırlar. Spesifik adaptör moleküllerinin görevlendirilmesi yoluyla sinyal verirler ve doğuştan gelen bağışıklık yanıtlarının sonucunu belirleyen transkripsiyon faktörleri Nükleer Faktör κ B (NF- κ B) ve İnterferon Düzenleyici Faktör (IRF) lerin aktivasyonuna yol açar [124].

Yapılan çalışmalar sonucunda 13 çeşit TLR tanımlanmıştır. TLR1 ve TLR9'a kadar olanlar insan ve farelerde bulunurken; TLR10 sadece insanlarda, TLR11, TLR12 ve TLR 13 ise sadece farelerde bulunmaktadır [125].

Toll benzeri reseptörler membran boyunca uzanmış bir transmembran bölgesi, katalitik olmayan yapısında at nalı şeklinde bir ligand bağlanma bölgesi ve transmembran bölgeye bağlı bir sinyal kuyruğu içeren yapıya sahip tip 1 transmembran reseptörleri olarak bilinmektedirler [113].

Toll benzeri reseptörler işlevlerine göre alt gruplara ayrılırlar ve hücrel lokalizasyonları, işlevleri ile doğrudan ilişkilidir. Örneğin, bakteri ve mantar hücre duvarlarını tanıyan üyeler genellikle hücre yüzeyinde bulunarak hücre duvarı bileşenlerini tanıırken; hücre içi vakuollerde bulunan üyeleri ise bakteriyel veya viral nükleik asitleri tanımladıkları. TLR'lar aracılığıyla alınan sinyaller sayesinde doğuştan gelen ve beraberinde de sonradan kazanılan immün yanıtları oluşturulmaktadır. Bunun sonucunda sitokin ve kemokin salınımları tetiklenerek inflamatuvar cevap oluşturulması sağlanmaktadır. Bu işleyişte genel olarak TLR yolaklı sinyaller NF- κ B ve Mitojenle aktifleşen protein kinaz (MAP kinaz)' ların aktivasyonu indüklenerek ilgili genlerin düzenlenmesi ve üretimi gerçekleşmektedir. Bu aktivasyon yolağında ana adaptör, NF- κ B fosforilasyonunu TIR (Toll interlökin-1 reseptör) bölgesine bağlanarak regüle eden Miyeloid farklılaşma birincil yanıtı 88 (MyD88)'dir. TLR3 dışındaki tüm Toll benzeri reseptörlerle etkileşime giren MyD88 sinyal spesifikliğini de sağlar [125, 126].

2.7.2.2 C- Tipi Lektin Reseptörleri (CLR)

PRR'lerin diğeri bir üyesi olan CLR'ler hücre yapışmasında, fagositozda, kompleman aktivasyonunda ve doğal bağışıklık sisteminde çeşitli işlevlere sahip 17 grup halinde organize edilmiş 1000'den fazla üyeden oluşan geniş bir membran protein ailesidir [36]. Bu proteinler baş bölgelerinde bulundukları C tipi lektin benzeri bölge (CTLD)'ler ile mantar, bakteri, virüs, parazit ve ev tozu akarı kaynaklı PAMP'leri ve DAMP'leri tanıyabilirler [107]. Çoğunlukla hücre dışı ligandları tanıyan bu reseptör ailesi içerisinde endojen hücre içi ligandları tanıyan üyeleri de vardır.

Tanıma, spesifik amino asit motifleri, kalsiyum iyonları ve karbonhidrat yapısı tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir. Reseptörün tanıma bölgesinin ilgili ligandlar ile birleşmesiyle, dalak tirozin kinaza (Syk) bağlı hücre içi sinyal yolları indüklenir. Bu aşamadan sonra, Syk, Protein Kinaz C-delta (PKC- δ) gibi bir dizi molekülü fosforile eder ve bu da CARD-9'u fosforile ederek CARD-9, mukoza ile ilişkili lenfoid doku lenfoma translokasyon proteini 1(Malt-1), B hücreli lenfoma / lösemi 10 (Bcl10) 'dan oluşan bir kompleks oluşmasını sağlar. Bu, NF- κ B 'nin aktivasyonuna, hem doğal hem de adaptif yanıtları yönlendiren anti-mikrobiyal yanıtların aktivasyonuna ve sitokin üretimi dahil olmak üzere inflamatuvar yanıtların indüksiyonuna yol açar [107].

C-tipi lektin reseptörleri, molekül yapılarına ve çözülebilirliklerine göre gruplandırılabilirler. Antijen alımında önemli olan DEC-205 ve Makrofaj Mannoza Reseptörü (MMR) taşıdıkları birçok CRD bölgesi ile tip I transmembran proteinleri içerisindedir. Buna karşın, tipik olarak tek bir CRD alanı taşıyan Dektin-1, Dektin-2, Makrofajla İndüklenebilir C tipi Lektin (Mincle), Dendritik Hücreye Özgü ICAM3 kapıcı non-integrin (DC-SIGN) ve DC NK lektin grup reseptör-1 (DNDR-1), tip II transmembran proteinleri içerisindedir. Ayrıca, çözünür CLR'ler, patojen yüzeyler üzerinde bir dizi karbonhidrat modeline bağlanan oligomerik bir protein olan MBL'yi içerir [127].

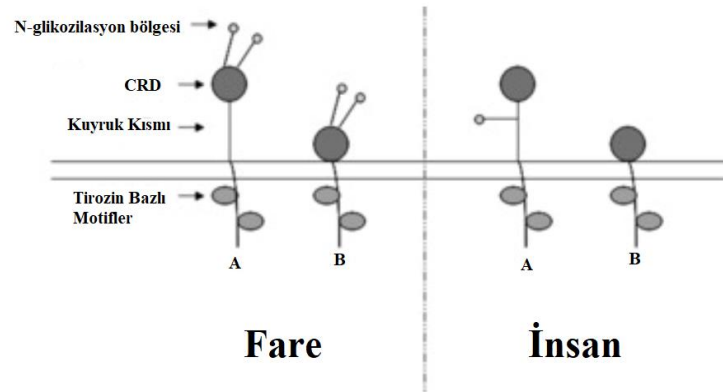
2.7.3. Dektin-1

CLR üyesi olan Dektin-1 reseptörü bitki, maya ve mantarların hücre duvar yapısında bulunan β -glukanı tanır [128, 129]. Dektin-1 tarafından β -glukanın tanınması, patojenik mantarları öldürmek için fagositoz dahil olmak üzere diğer inflamatuvar yanıtları tetikler. Bu nedenle enfeksiyona karşı önemli bir rol oynar [129].

2.7.3.1 Dektin-1 'in Moleküler Yapısı ve İfadesi

Dektin-1 geni (*Clec7a*) farelerde kromozom 6f3, insanlarda ise kromozom 12p13.2'de bulunmaktadır [129]. Karaciğer, akciğer, timus, mide, dalak, ince barsak, böbrekler ve kalp gibi dokularda ve immün sistemin birçok hücresinde ifade edildiği gösterilmiştir [130].

Fare dektin-1'leri (fdektin-1) 28 kDa'luk kütleleri ile tip II transmembran proteinleridir, izoform A ve izoform B olmak üzere iki izoform halinde üretilebilirler. Yapısal olarak, izoform A, CRD bölgesi ile ilişkili iki N-glikosilasyon bölgesi, kısa bir sap ve sitoplazma içerisine uzanan immünoresseptör tirozin bazlı aktivasyon motifi (ITAM) içeren bir kuyruk bölgesine sahipken, izoform B, CRD bölgesini hücre zarına bağlayan bir sap kısmı yoktur. İnsan dektin-1'leri (idektin-1) ise 33 kDa'luk bir ağılığa sahiptir, fdektin-1'lerin aksine CRD ile ilişkili N-glikosilasyon bölgesi içermezler, sadece idektin-1'in A izoformunda tek bir N-glikosilasyon bölgesi CRD'yi hücre zarına bağlayan sap kısmında bulunur (Şekil 2.10.) [129]. İnsan dektin-1'lerinde bu iki ana izoform β -glukanı tanımaktadır fakat buna karşın, idektin-1'leri içerisinde β -glukanı tanımayan 6 izoform daha tanımlanmıştır [131].



Şekil 2. 10. Fare ve İnsan Dektin-1 Reseptörlerinin Genel Yapısı [129].

2.7.3.2 Ana β -Glukan Reseptörü Olarak Dektin-1

Bağışıklık sisteminin zayıflaması bireyi parazit, bakteri, virüs ve mantar enfeksiyonlarına karşı açık hale getirir. *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* ve *Pneumocystis carinii* gibi patojenler insanlarda ciddi hastalıklara neden olan tipik fırsatçı patojenlerdir. Bu fırsatçılara karşı doğuştan gelen bağışıklık savunmaları önemli ölçüde farklılık göstermektedir [129].

Dektin-1, çözümlü ve partiküler β -glukanın tanınmasında önemli bir rol oynar. Bununla birlikte, çözümlü β -glukan, sinyali uyarmadan bloke edici ligand görevi görürken, partiküler β -glukan, dektin-1 için reseptör agonisti olarak işlev görür [132]. Fungal patojenlere karşı etkili bir koruma için iyi bir tanıma mekanizması gereklidir. Dektin-1 tarafından mantar hücre duvarı bileşeni olan β -glukanın tanınması, mantar enfeksiyonunun kontrolü ve immün yanıtın oluşması için gereklidir. Fakat mantarların bu tanınmadan kaçabildiği durumlar vardır. α -(1,3)-glukanın Dektin-1 aracılı yolu ile β -glukanın tanınmasını engellediği gösterilmiştir [133].

2.7.3.3 Hava Yolu Hastalıklarında Dektin-1 Reseptörünün Rolü

Yakın zamanda, çöpçü reseptörler, komplaman reseptör 3 ve laktosilseramidinin yanı sıra β -glukan için Dektin-1 reseptörü en önemli reseptör olarak tanımlanmıştır. Dektin-1 ile β -glukanın tanınması sonucunda fagositoz dahil olmak üzere, reaktif oksijen üretimi, sitokin ve kemokinlerin salınımı gibi çeşitli immünolojik cevap oluşturulur [129].

Mantarlara karşı olan hassasiyetin astım şiddetini arttırdığına dair elde edilen kanıtların artmasıyla beraber, Dektin-1'in hava yolu hastalıklarındaki rolünün açıklanması için çeşitli deneysel çalışmalar yapılmıştır [128]. Brown ve arkadaşları Dektin-1 geni susturulmuş fareler üzerinde bir dizi çalışma yapmıştır. Bu çalışmalarda, Dektin-1 geni susturulan farelere *Aspergillus fumigatus* sporları solutulmuş ve hava yolu inflamasyonunda meydana gelen farklılıklar incelenmiştir. Yapılan çalışmalarda, Dektin-1 geni susturulan farelerin akciğerlerindeki IL-17A üretiminin önemli miktarda azaldığı, *Aspergillus* maruziyeti sonrasında nötrofillerin Dektin-1 ve IL-23'e bağlı olarak IL-17A üretimini arttırdığı ve Dektin-1'in IL-22 üretimi yoluyla bir mantar alerjisi modelinde immünopatogeneze katkıda bulunduğunu gösterilmiştir [134-137]. Buna karşın 2012 yılında Rachael ve arkadaşları hem *Aspergillus versicolor* hem de *Cladosporium cladosporioides* türleriyle *in vivo* bir çalışma gerçekleştirmiştir. Bu deneyde mantarların farelerde farklı inflamasyon tiplerini indüklediği bildirilmiştir. Yapılan çalışmada *C. cladosporioides*'in ağırlıklı olarak Th2 yanıtı ve eozinofilik inflamasyonla beraber güçlü bir hava yolu aşırı duyarlılığı (AHR) oluşturduğu, buna karşın *A. versicolor*'un güçlü bir Th17 yanıtı ve nötrofilik inflamasyonla beraber çok hafif AHR oluşturduğu bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada, Dektin-1 geni susturulan farelerin *A. versicolor* maruziyeti yabancı tip farelere kıyasla daha düşük IL-17A yanıtı oluştururken, *C. cladosporioides* maruziyeti sonucu oluşan eozinofilik inflamasyonun Dektin-1'den bağımsız olarak indüklendiği bildirilmiştir [138]. Bu

bulgular, mantarın neden olduğu alerjik reaksiyona hem Dektin-1 bağımlı hem de bağımsız yolların aracılık ettiğini göstermektedir [128].

Konidya ve hiflerle yapılan çalışmaların yanı sıra Dektin-1'in alerjik etkileri saflaştırılmış β -glukan kullanılarak da incelenmiştir. Zhang ve arkadaşları HDM β -glukanını fare deneylerinde kullanmışlardır. Çalışmada fareler hem *A. versicolor* mantarına hem de HDM β -glukanına maruz bırakılmıştır. İkili maruziyetin güçlü bir Th2 yanıtla beraber daha şiddetli bir AHR oluşturduğu bildirilmiştir. Ayrıca AHR artışındaki temel sebebin mantarın kendisinin değil, mantar hücre duvarı bileşeni olan β -glukan ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bunların yanı sıra yapılan çalışmada, mantar maruziyetinin şiddetli alerjik astım gelişimine katkı sağladığı ve Th17 cevabının indüksiyonu ile kortikosteroidlere karşı daha dirençli hale getirdiği bildirilmiştir [139]. 2017 yılında başka bir çalışma ise Dektin-1 geni susturulan farelerde HDM kaynaklı alerjik inflamasyonun ve Th17 tip immün yanıtların azaldığı gösterilmiştir [140].

Th17 hücrelerini indüklemeye potansiyelinin yanı sıra Dektin-1 aktivasyonunun eşzamanlı olarak IL-13 ve IL-17A üreten efektör CD4 + T hücrelerini arttırdığı gösterilmiştir [139]. Steroide dirençli şiddetli astımı olan hastalarda bronkoalveolar lavaj sıvısında IL-13 / IL-17A ve Th2 / Th17 hücrelerinin yüksek sıklıkta bulunduğu bulgusu ile tutarlı olarak, Dektin-1 aktivasyonunun devam eden alerjik hava yolu inflamasyonunu deksametazon tedavisine dirençli hale getirdiği gösterilmiştir [141].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler

- *Aspergillus fumigatus* Fresenius suşu Türkiye Cumhuriyeti Halk Sağlığı Laboratuvarları'ndan liyofilize olarak satın alındı.
- Mantar kültürü için Sabouraud %4 Dekstroz Agar (500 g, katalog no:105438) ve Malt Ekstrakt Broth (500 g, katalog no:105397) Merck firmasından (ABD) ticari olarak satın alındı.
- Mantarların kültürasyonu için Mikrotest (Türkiye) 120 L çalkalamalı etüv kullanıldı.
- β -glukan polimerini çözülebilir hale getirebilmek için gerekli olan zimolaz enzimi (katalog numarası E1004) Zymoresarch firmasından (ABD) satın alındı.
- Elde edilen β -glukanın kimyasal karakterizasyonu Nicolet TM ISTM 50 spektrometre (Thermo Fisher Scientific, ABD) cihazı kullanılarak Zayıflatılmış Toplam Yansıtma Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi (ATR-FTIR) yöntemi ile yapıldı.
- Hücre kültürü çalışmaları sırasında kullanılan RPMI-1640 büyüme ortamı Sigma (ABD), Tripsin/EDTA çözeltisi, tripsin nötralizasyon çözeltisi Gibco (ABD), ve penisilin/streptomisin çözeltisi Lonza (İsviçre) firmalarından temin edildi. Hücre canlılığının tespiti için kullanılan MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)- difeniltetrazolyum bromür) Sigma ve etidyum bromür/kalsein boyası BioVision (ABD) firmalarından temin edildi.
- MTT analizleri için Perkin Elmer Multimode Plate Reader (İngiltere) cihazı kullanıldı.
- Floresan boyama analizleri için Life Technologies Evos (ABD) marka mikroskop kullanıldı.
- Hücrelerde Th2 yanıt oluşturmak üzere IL-4 ve IL-13 insan sitokinleri (Katalog numaraları sırasıyla; 200-4 ve 200-13) PeproTech şirketinden (İngiltere) satın alındı.
- Hücrelerden RNA elde etmek için kullanılan E.Z.N.A Total RNA izolasyon kit OMEGA BIO-TEK (Avustralya), komplementer DNA (cDNA) sentezi ve gerçek zamanlı PZR deneyleri için kullanılan kitler Thermo Fisher (ABD) firmalarından temin

edildi. Gerçek zamanlı PZR deneylerinin analizleri boyunca Applied Biosystems marka 7500 Fast RT-PCR cihazı (ABD) kullanıldı.

- Protein deneyleri sırasında kullanılan antikorlar; anti-Dektin-1 Primer Antikoru (Katalog no: ab40039), Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 594) Sekonder Antikoru (ab150080) Abcam (İngiltere) firmasından temin edildi. Western Blot görüntülemesi için Biorad Chemidoc – MP (ABD) cihazı kullanıldı. İmmunofloresan görüntülemesi için Life Technologies Evos (ABD) marka mikroskop kullanıldı.

3.2. *Aspergillus fumigatus* Fresenius Suşunun Kültürasyonu

3.2.1 *Aspergillus fumigatus* Kültürünün Canlandırılması

Türkiye Cumhuriyeti Halk Sağlığı Laboratuvarları'ndan temin edilen liyofilize hücreler, distile suda çözülerek stok oluşturmak üzere %4'lük sabouraud agar üzerine ekildi ve 25 °C'de 1 hafta boyunca çimlenmeye bırakıldı. İnkübasyon sonrasında çimlenen *A. fumigatus* hücreleri üretilmek üzere sıvı besi yerine alındı.

3.2.2 Sıvı Besi Yerinde Üreme

Ticari olarak satın alınan Malt Ekstraktı %3 olacak şekilde hazırlandı ve otaklavlanarak steril hale getirildi. Katı besi yerinde çimlendirilen *A. fumigatus* suşları bir öze yardımıyla çeker ocak içerisinde steril olarak ekildi. Katı besi yerinden sıvı besi yerine ekilen fungus 25 °C'de çalkalamalı etüv içerisinde 2-3 gün süresince inkübe edildi. Sıvı besi yerlerinde üretilen hücreler filtreli kâğıt vasıtasıyla süzüldü, besi yeri uzaklaştırıldı ve yaş biyo-kütle elde edildi. Elde edilen yaş biyo-kütleler 55°C sıcaklıkta 2 gün boyunca kurutuldu ve bir öğütücü vasıtasıyla küçük parçalara ayrıldı.

3.3. β -glukan Ekstraksiyonu

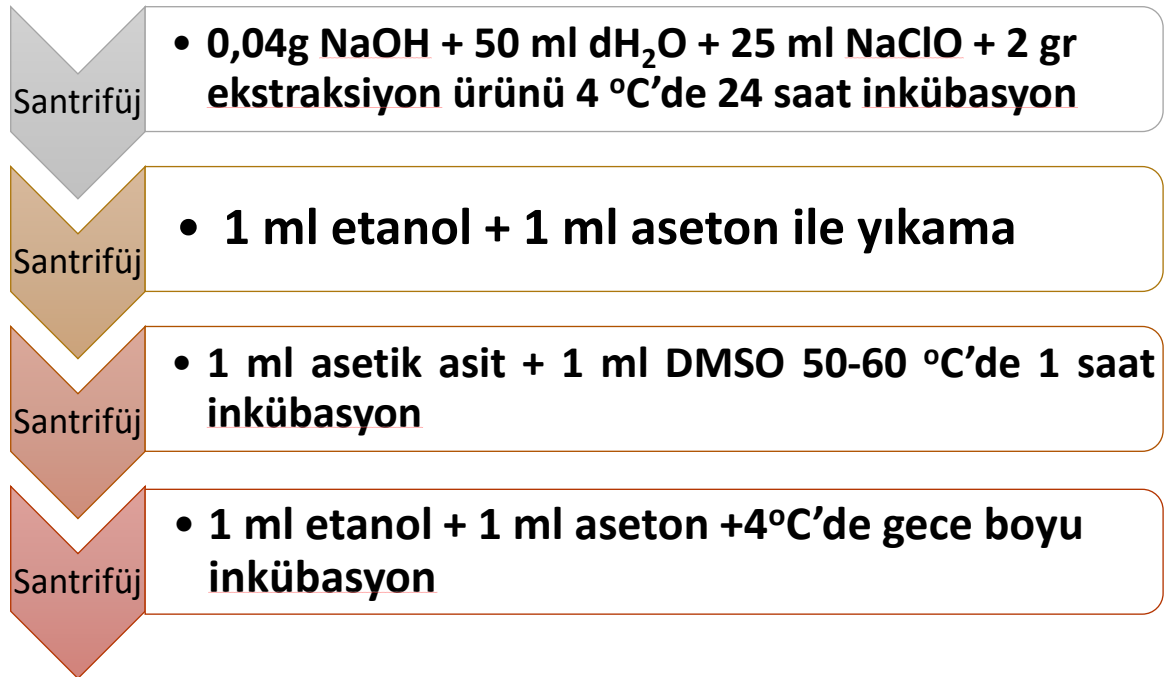
β -glukan ekstraksiyonu için, Nisan 2020 yılında Fatemeh Sadeghi ve arkadaşlarının yayınlamış olduğu makale temel alınarak optimize edildi (Çizelge 1) [142].

Yönteme göre kısaca;

- 2 gr ekstraksiyon ürünü, 0,04 g NaOH, 50 mL distile su ve 25 mL NaClO maddelerinden oluşan karışımı içerisinde 24 saat boyunca +4 °C'de inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında örnekler santrifüj edildi ve üst faz atıldı.
- Kalan alt faz 1'er mL'lik alkol ve aseton karışımı ile yıkandı.

- Alkol ve aseton yıkamalarından sonra örnekler santrifüj edilerek üst faz atıldı.
- Santrifüj işlemi sonrasında geriye kalan kısım 1 mL'lik asetik asit ve 1 mL'lik DMSO çözeltileri içerisinde 50-60 °C'de 1 saat boyunca karıştırılarak inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında örnekler santrifüj edildi ve üst faz atıldı.
- Kalan kısım tekrardan 1'er mL'lik alkol ve aseton çözeltileri içerisinde gece boyu inkübe edildi. Elde edilen molekülün FT-IR analizi yapıldı.

Tablo 1. β -glukan Ekstraksiyonu [142].



3.4 β -glukanın ATR-FTIR ile Kimyasal Karakterizasyonu

Ekstraksiyon sonrasında β -glukan varlığı ATR-FTIR yöntemi kullanılarak belirlendi. Ölçümde Nicolet TM ISTM 50 marka spektrometri kullanıldı. Spektrumlar 4000 ile 600 cm⁻¹ arasında 4 çözünürlük ve 16 tarama hızı ile gerçekleştirildi [143].

3.5 Hücre Kültürü Çalışmaları

3.5.1 BEAS-2B Hücrelerinin Çoğaltılması

Hücre kültürü deneyleri sırasında sağlıklı bronş epitel hücre hattı (BEAS-2B) kullanıldı. Hücreler 75 cm² lik flasklarda çoğaltıldı. Bronş epitel hücreleri 100 U/mL penisilin ve

5% FBS içeren RPMI-1640 besi yerinde 2-3 gün süreyle inkübe edildi. Hücrelerin flaskı kaplama oranı %70-80'e ulaştığında tripsinize edildi.

3.5.2. Hücre Canlılık ve Sitotoksosite Deneyleri

BEAS-2B hücrelerinin *Aspergillus fumigatus*'tan ekstrakte edilen β -glukan ile uyarılacak optimum dozun bulunabilmesi için etidyum homodimer-1 ve kalsein-AM floresan boyama ve MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromit) boyama yöntemleri kullanıldı.

3.5.2.1 Canlı/Ölü Hücrelerin Boyanması

Aspergillus fumigatus'tan ekstrakte edilen β -glukan ile farklı konsantrasyonlarda uyarılan BEAS-2B hücrelerinde, canlı/ölü hücre boyaması etidyum homodimer-III ve kalsein-AM boyaları ile yapıldı. Flaskta büyütülen hücreler tripsin ile kaldırıldıktan sonra hücre canlılığı deneyleri için 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekildi. Ekilen hücreler kuyucukları %70-80 kapladığında β -glukan ile, aşağıda belirlenen konsantrasyonlarda 24 saat boyunca uyarıldı [144].

I. Koşul: US (uyarılmamış hücre)

II. Koşul: 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$

III. Koşul: 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$

IV. Koşul: 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

V. Koşul: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

24. saat sonunda 1 mL PBS içinde 0,5 μL kalsein-AM (4 mM) ve 2 μL (2mM) etidyum homodimer-1 karıştırılarak her kuyuya 50 μL olacak şekilde paylaştırıldı. 30 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletildikten sonra kırmızı ve yeşil ışık dalgalarında (Ex/Em = 485- 495/530-635 nm) floresan mikroskop ile görüntüleme yapıldı. Canlı hücreler yeşil renkte, ölü hücreler ise kırmızı renkte görüntülendi [145].

3.5.2.2. Sitotoksosite Deneyleri

BEAS-2B hücre hatlarının bölüm 3.5.2.1'de belirtilen koşullarda, β -glukan alerjeni ile uyarımı sonrasında hücrelerdeki sitotoksosite ölçümü MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil 3 5 tetrazolyum bromit) yöntemi ile gerçekleştirildi. Bu yöntem ile canlı hücre oranı nicel olarak kolorimetrik yöntem kullanılarak saptandı. Tripsin ile kaldırılan

hücreler 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekildi. Ekilen hücreler kuyucukları %70-80 kapladığında uyarımlar 24 saat boyunca yapıldı. 24 saat sonra MTT testi ile hücre canlılığı [146].

Kısaca;

- Kuyulardaki besi yeri çekilip atıldı.
- Kuyulara 100 μ L yeni besi yeri eklendi.
- Yeni besi yeri eklenmiş kuyular üzerine 13 μ L MTT (5 mg/mL) damlatıldı.
- Plaka 37 °C etüvde 3 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında besi yeri tekrardan çekilerek kuyuların içerisine 150 μ l DMSO ilave edildi.
- Örneklerin 570 nm'deki absorbans değerleri Perkin Elmer Multimode Plate Reader cihazı ile okundu.

3.5.3. β -glukan Uyarımı

Floresan boyama ve MTT boyama sonuçları doğrultusunda hücrelerin β -glukan ile 24 saatlik uyarımda kullanılacak konsantrasyonları 0,1 μ g/mL ve 1 μ g/mL olarak belirlendi.

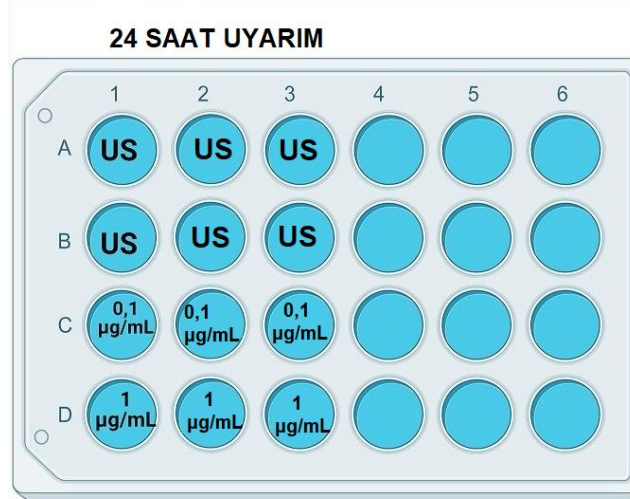
Tez çalışması kapsamında hem uyarılmamış hem de Th2 sitokinleri ile uyarılmış BEAS-2B hücreleri β -glukan ile 24 saat boyunca stimüle edildi.

Hücreler uyarılmadan önce elde edilen β -glukan zimolaz enzimi ile aşağıda tarif edildiği gibi parçalandı:

- 50 mM PBS pH:7,5 ve 10 mM 2-merkaptoetanol karışımı 1 mL'de hazırlandı ve içerisine 1 mg numune eklendi.
- Karışım içerisine 5 U/ μ L zimolaz enzimi eklendi.
- 35 °C'de 2 gün boyunca inkübe edildi.
- Enzimin litik aktivitesinin bozulması için inkübasyon sonrası sıcaklık 60 °C'ye çıkarılmış ve 5 dakika bu sıcaklıkta inkübe edildi.

3.5.3.1 BEAS-2B Hücrelerinin β -glukan ile Uyarımı

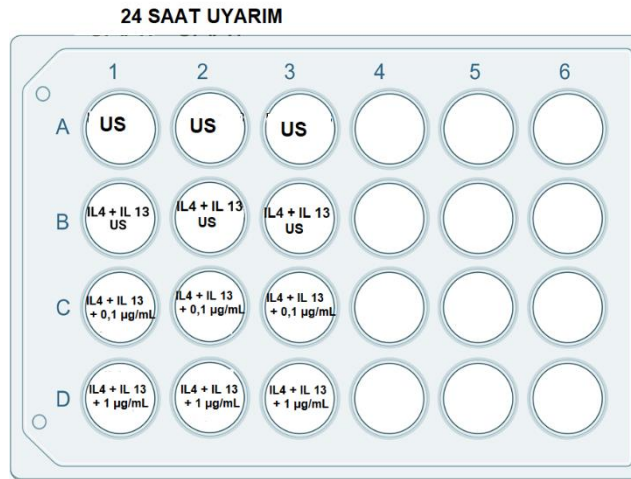
BEAS-2B hücreleri T25 flasklarda 100 U/mL penisilin ve 5% FBS içeren RPMI-1640 besi yerinde inkübe edildi ve hücreler %70-80 oranında flaskı kapladıklarında tripsinize edilerek 24 kuyulu plakalara alındı ve Şekil 3.1'de gösterildiği gibi uyarıldı.



Şekil 3. 1. BEAS-2B hücrelerinin β -glukan ile uyarımı

3.5.3.2 BEAS-2B Hücrelerinin Th2 sitokinler ve β -glukan ile Uyarımı

Th2 tip sitokin varlığında β -glukan etkisini görmek amacıyla hücreler Th2 sitokinler ve β -glukanla beraber uyarıldı. Uyarımda, IL-4 ve IL-13 konsantrasyonu 20 ng/mg [147] olacak şekilde 0,1 μ g/mL ve 1 μ g/mL β -glukan içerisinde hazırlandı ve hücreler 24 saat boyunca uyarıldı. Deney koşulları Şekil 3.2’de verildi.



Şekil 3. 2. BEAS-2B hücrelerinin Th2 sitokinler + β -glukan ile uyarımı

3.6 RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu kullanım klavuzuna uygun olarak gerçekleştirildi. Kısaca; hücreler %1 β -Merkaptoetanol ilave edilen lizis tamponu ile pipetaj yapılarak parçalandı.

Parçalanmış hücreler üzerine 300 µL %70 etanol eklenerek 2 mL'lik toplama tüpü üzerine yerleştirilen kolon üzerine pipetlendi. Tüpler 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve kolon üzerine 700 µL Wash Buffer I (yıkama tamponu) ilave edildi. Tüpler 10.000 rpm de 15 saniye santrifüj edildi. Kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi ve üzerine 500 µL Wash Buffer II (yıkama tamponu II) solüsyonu ilave edildi. 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı boşaltıldı ve üzerine yine 500 µL Wash Buffer II solüsyonu ilave edildi. Tüpler 12000 rpm de 15 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı boşaltıldı ve üzerine hiçbir şey ilave edilmeden yine 12.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolon steril 1.5 mL ependorf tüp üzerine alındı ve üzerine 50 µL RNaz içermeyen su ilave edilerek oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi. Tüpler 12000 rpm de 2 dakika santrifüj edildi. Elde edilen örneklerdeki RNA miktarı Q5000 UV-Vis Spektrometre cihazı ile ölçüldü ve kullanılıncaya kadar -80 °C' de saklandı.

3.7. Komplementer DNA (cDNA) Eldesi

Gerçek zamanlı PZR'da kullanılmak gen ifadelerinin görülebilmesi için, RNA'dan cDNA eldesi tedarikçi firmanın ve önceki örnek yayımlarda tarif edildiği gibi yapıldı [148].

1 µg ile 5 µg toplam RNA veya 1 µg ile 500 ng poli (A) + RNA'nın tek iplikçikli DNA'ya dönüştürülmesi için tasarlandı. cDNA aşamasında daha spesifik bir sentez gerçekleştirilmesi amacıyla oligo (dT)18 primer kullanıldı. Kullanmadan önce her bileşen iyice karıştırıldı ve santrifüjlendi. 0,2' mL 'lik PCR tüplerine 1 µL Oligo (dT)18 Primer (100 µM) eklendi. Toplam hacmi 12 µL'ye tamamlamak için konsantrasyonu 1µg olan total RNA'dan hesaplanan miktarda eklendi. Üzerine toplam miktarı 12µl ye tamamlayacak kadar ddH₂O ilave edildi. 65 °C'de 5 dakika PCR' da inkübe edildi ve ardından 1 dakika buz üstünde bekletildi. Sonrasında, 4 µL 5x Reaction Buffer, 1 µL RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µL), 2 µL 10 mM dNTP Mix, 1 µL RevertAid MMuLV RT (200 U/µL) eklendi. Her RNA / primer karışımına 8 µL cDNA sentez karışımı eklendi, hafifçe karıştırıldı. Son olarak 42 °C'de 60 dakika PZR'de inkübe edildi. Böylece elde edilen cDNA'lar gerçek zamanlı PZR'de kullanılmak üzere -80 °C'de saklandı.

3.8. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RNA izolasyonu yapılan ve cDNA sentezi gerçekleştirilen hücrelerde Dektin-1 ifadesi ve sitokin profilleri için Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile incelendi. Gerçek zamanlı PZR de kullanılacak olan Dektin-1, IL-6, IL-8, IL-25, IL-33, TSLP, RANTES genlerinin ileri ve geri primerleri Tablo 2.'de verildi. İnternal kontrol olarak Peptidylprolyl Isomerase A (PPIA) kullanıldı. Reaksiyon için kullanılan malzemeler ve polimeraz zincir reaksiyon koşulları Tablo. 3'de verildi [149].

Tablo 2. Primer Dizileri

Genler	İleri Primer (5'-3')	Ters Primer (5'-3')
Dektin-1	TTTAGAAAATTTGGATGAAGATGGA	ATATGAGGGGCACACTACACAGTTG
Rantes	CCTGCTGCTTTGCCTACATTGC	ACACACTTGGCGGTTCTTTTCGG
IL-6	GCAGATGAGTACAAAAGTCCTGA	TTCTGTGCCTGCAGCTTC
IL-8	GAGTATTTCTACACCAGTGGCA	GACTCTCCATCCTAGCCTCATCT
IL-25	GGCGTTGGTACAGGTCCT	CTCCCCTAGACCTGCTA
IL-33	CTGGTCTGGCAGTGGTTT	CAACACCCCTCAAATGAATCAG
TSLP	CCAGAGCCTAACCTTCAATCC	CCTCTTCTTCATTGCCTGAGTAG
PPIA	TCTTTCACCTTTGCCAAACACC	CATCCTAAAGCATAACGGGTCC

Tablo 3. Gerçek zamanlı PZR Reaksiyon ve Döngü Koşulları

	Malzeme	Miktarı	
Reaksiyon Koşulları	2X SYBR Green PCR Master Mix	12,5 µL	
	İleri Primer (10 µM)	0,1 µL	
	Ters Primer (10 µM)	0,1 µL	
	Kalıp (50 ng)	1 µL	
	Nükleazsız su	11,5 µL	
	Döngü aşaması	Sıcaklık	Süre
Döngü Koşulları	Isıyla aktivasyon	95 °C	5 dk
	Denaturasyon *	95 °C	10 s
	Primer yapışma/uzama *	60 °C	30 s

* : Aşama, 40 döngüde tamamlanmıştır.

3.9 β-glukan ile Uyarılan BEAS-2B Hücrelerinde Dektin-1 Proteinin İfadesi

Protein düzeyinde Dektin-1, ifadesi Western Blot ve immünohistokimya yöntemleri kullanılarak incelendi.

3.9.1 Hücre Lizatından Toplam Protein Eldesi

Hücreler 24 saat boyunca belirtilen koşullarda uyarılmıştır; uyarılmamış koşul, IL-4 +IL-13 uyarım, 0,1 µg/mL β-glukan ile uyarım, 1 µg/mL β-glukan ile uyarım, IL-4 + IL-13 + 0,1 µg/mL β-glukan ile uyarım ve IL-4 + IL-13 + 1 µg/mL β-glukan ile uyarım. Uyarım sonrasında protein izolasyonları yapıldı [149].

Kısaca;

- Hücre kültüründe kuyucuklar üzerindeki besi yeri çekilerek uzaklaştırıldı.
- Kuyular 500 µL soğuk PBS ile 2 kez yıkandı.
- 1x Proteaz inhibitör kokteyl ve 9x Ripa Tamponundan hazırlanan karışımdan 60'ar µL kuyulara eklendi.
- Kuyular bir pipet yardımıyla kazındı.
- Kuyulardan alınan hücreler 1,5 mL'lik ependorf tüplere aktarıldı ve 15 dakika boyunca +4 °C 10000 g'de santrifüj edildi.
- Elde edilen örnekler alikolanarak -80 °C'de saklandı.

3.9.2 Proteinlerin Bradford Metodu ile Spektroskopik Olarak Ölçülmesi

Protein izolasyonu yapıldıktan sonra elde edilen örnekler Bradford yöntemi ile tayin edildi [150].

- PBS ve Bradford ajanı 5:1 oranında karıştırıldı.

- Protein konsantrasyonunu belirlemek için sığır serum albümini (BSA) 2 mg/mL konsantrasyonda stok olarak hazırlanıp seyreltildi (0-0.2-0.4-0.8-1.2-1.6-2.0 mg/mL).
- Ölçülecek proteinler 96 kuyulu plakalara 10'ar µL eklendi.
- Örneklerin üzerine 200 µL Bradford çözeltisi ilave edildi ve 5 dakika beklendi.
- Bekleme sonrasında örneklerin 595 nm'deki absorbans değerleri Perkin Elmer Multimode Plate Reader cihazı ile okundu.

3.9.3 Western Blot Yöntemi ile Dektin-1 Proteininin İfadesi

Protein konsantrasyonları belirlendikten sonra Western Blot analizi ile protein ifadeleri incelendi [149].

- Örnekler Leammli tamponu içerisinde hazırlandı.
- 95 °C'de 5 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında örnekler yürütme jeline 10'ar µL olarak yüklendi.
- Yürütme işlemi ilk olarak 60 V 15 dakika, sonrasında ise 100 V 75 dakika boyunca gerçekleştirildi.
- Yürütme işleminden sonra jelde yürüyen örnekler daha sonra yarı kuru transfer yöntemi ile nitroselüloz membrana transfer edildi. Transfer işlemi 20 V 90 dakika boyunca yapıldı.
- Transfer işleminden sonra membran %5'lik süt tozu ile 160 rpm'de 1,5 saat boyunca bloklandı ve sonrasında TBST ile 3 kez yıkandı.
- Membran yıkandıktan sonra %0.5 kuru süt ve 1/1.000 oranında insan Dektin-1 antikorunu içeren TBST ile +4 °C ve 160 rpm'de gece boyu inkübe edildi ve inkübasyon sonrasında membran TBST ile 3 er kez yıkandı.
- Yıkama işleminin ardından membran, %0.5 kuru süt ve 1/10.000 oranında sekonder rabbit dektin-1 antikorunu ile 1,5 saat inkübe edildi ve inkübasyondan sonra 3 kere TBST ile yıkandı.
- Membran Biorad Chemidoc – MP cihazı ile görüntülendi

3.9.4 İmmunofloresan Boyama Yöntemi ile Dektin-1 İfadesinin Gösterilmesi

Th2 tip sitokin ve β-glukan ile uyarılan hücrelerde Dektin-1 ifadesindeki değişiklik immünohistokimya yöntemi ile tespit edildi.

- Hücreler 24 kuyulu plakalar içinde yuvarlak lamel üzerinde 150.000 hücre olacak şekilde ekildi
- Lameller %70-80 kaplandığında besi yeri uzaklaştırıldı ve 24 kuyulu plakalar içinde 1 kere 150 µL PBS ile yıkandı.
- Fiksasyon aşaması için lamellerin üzerine 150 µL %10 Formalin solüsyonu (NBF) eklendi. +4°C’de 10 dakika boyunca inkübe edildi.
- NBF lamellerden uzaklaştırıldı ve 3 kez 150 µL PBS ile yıkandı.
- Permeabilizasyon için 150 µL % 0,2 Triton X-100 + PBS lamellerin üzerine eklendi ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Triton X-100 lamellerden uzaklaştırıldı ve 150 ul %1 BSA (PBS içinde hazırlanmış) lamellerin üzerine eklenir. 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- BSA lamellerden uzaklaştırıldı ve lameller 3 kere 150 µL % 0,2 Triton X-100 ile yıkandı.
- Western Blot tekniğinde kullanılan primer antikor %1 BSA ile seyreltildi ve 150 µL lamellere eklendi. 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi
- Primer antikor uzaklaştırıldı ve lamellerin etrafı hidrofobik kalem (PAP Pen) ile çizildi. Sonrasında lameller 4 kere 150 µL PBS + %0,2 Triton X-100 ile yıkandı.
- Sekonder antikor %1 BSA ile seyreltilir ve 150 µL lamellere eklendi. 1 saat oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi.
- Sekonder antikor uzaklaştırıldı ve lameller 4 kere 150 µL PBS + % 0,2 Triton X-100 ile yıkandı.
- Mounting medium lamellere damlatılır ve üzeri lamel ile kapatılıp Life Technologies Evos (ABD) marka mikroskop kullanıldı.

3.10 İstatistiksel Analiz

Tez çalışmasında tüm istatistiksel analizler Graph Pad Prism 9.0 programı kullanılarak yapıldı. Veriler, \pm ortalama standart hata ile gösterildi. Genler arasındaki ifade farklılıklarını tespit etmek amacıyla tek yönlü ANOVA yapıldı. $p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.

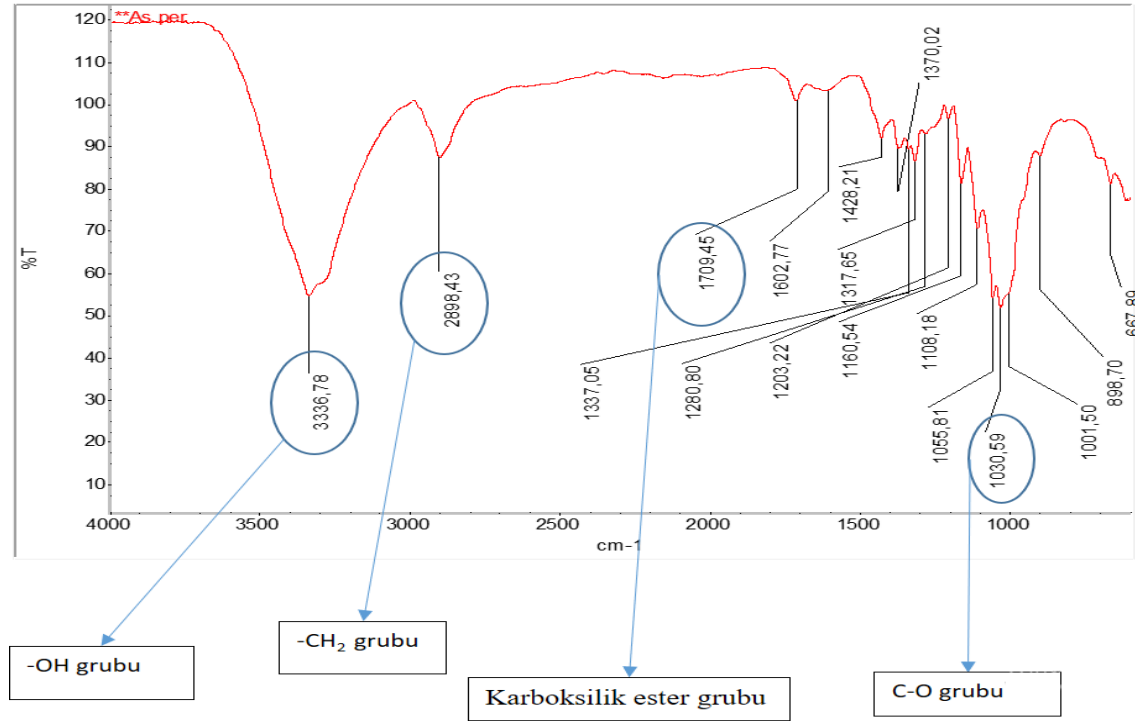
4.TARTIŞMA VE SONUÇ

Tez çalışmasının ilk aşaması *A. fumigatus* türü mantarlardan β -glukan izolasyonunu kapsamaktadır. Bu amaçla, *A. fumigatus* türü mantarlar öncelikli olarak kültüre edildi ve hücre duvarından asit-baz ekstraksiyon yöntemiyle β -glukan saflaştırması yapıldı. Elde edilen ekstraktın varlığı ve saflığı ATR-FTIR analiz yöntemiyle gerçekleştirildi. Doğrulamalar sonrasında elde edilen ekstraksiyon ürünü zimolaz enzimi ile parçalanarak hücre kültüründe kullanılabilir hale getirildi. β -glukan, enzim ile suda çözünebilir hale getirildikten sonra enzim aktivasyonunu durdurmak için 60 °C'de 5 dakika örnekler ısıtıldı. Tezin ikinci aşamasında, BEAS-2B epitel hücreleri T25 flasklarda çoğaltıldı ve tripsinaz yöntemi ile kaldırılarak 96 kuyulu plakalara ekildi. 96 kuyulu plakalarda büyütülen hücrelerde uygun uyarım koşullarını doğrulamak için, BEAS-2B hücreleri β -glukan ile farklı konsantrasyon ve sürelerde uyarıldı. Sonrasında MTT ve floresan boyama ile canlılık/sitotoksosite, deneyleri yapılarak uyarım koşulları belirlendi. Tezin üçüncü aşamasında, gerçek zamanlı PZR yöntemi ile gen ifadeleri RNA düzeyinde incelendi. Gen ifadelerinin incelenmesi için sırasıyla; 1- BEAS-2B hücreleri Th2 sitokinler ile uyarıldı ve Dektin-1 reseptörünün gen ifadesi incelendi. 2- Th2 sitokinlerle uyarılan BEAS-2B hücreleri *A. fumigatus* 'tan elde edilen β -glukan ile uyarıldı. Uyarımlar sonrasında ilk önce RNA izolasyonu yapıldı daha sonrasında ise elde edilen RNA'lar ile komplementer DNA (cDNA) elde edilerek gerçek zamanlı PZR yapıldı. Gerçek zamanlı PZR yöntemi ile; 1- Sadece β -glukan varlığında *Dektin-1* reseptörünün gen ifadesi incelendi. 2- Th2 tip sitokinler varlığında *Dektin-1* ifadesi ve sitokin profilleri incelendi. Tezin dördüncü aşamasında gen ifadelerinin proteine yansıyor yansımadığını görebilmek için Western Blot ve immünofloresan boyama yöntemleri kullanıldı. İlk olarak BEAS-2B hücreleri ve Th2 sitokinlerle uyarıldı ve *Dektin-1* ifadesi Western Blot tekniği ile protein düzeyinde incelendi. Sonrasında Th2 sitokin varlığında β -glukan ile uyarılan BEAS-2B hücrelerinde *Dektin-1* ifadesi Western Blot tekniği ile incelendi. *Dektin-1* İfadesinin BEAS-2B hücrelerindeki yerini görebilmek için hücreler β -glukan ile uyarıldı ve immünofloresan boyama yöntemiyle *Dektin-1* proteininin ifadesi incelendi. Son olarak elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

4.1. *A. fumigatus*' tan Ekstrakte Edilen β -glukan'ın Doğrulanması

β -glukan'ın izolasyonu için Fatemeh Sadeghi ve arkadaşlarının 2020 yılında *Candida albicans* 'tan β -glukan elde etmek için uyguladıkları yöntem optimize edilerek kullanıldı [142]. Bu yöntem ile elde edilen ürünler ATR-FTIR 4000 ile 600 cm^{-1} spektrumlar

arasında 4 çözünürlük ve 16 tarama hızı ile analiz edildi. Elde edilen ATR-FTIR sonuçları Şekil 4.1 ve Tablo 4’de gösterilmiştir.



Şekil 4. 1. FTIR %Transmittans Grafiği.

Mavi daireler içerisinde gösterilen gruplar sırasıyla; -OH grubu, -CH₂ grubu, Karboksilik ester grubu ve C-O grubunu göstermektedir. ATR-FTIR analizi sonucunda elde edilen veriler literatürdeki β-glukan FTIR sonuçları ile uyumludur [151-153].

Tablo 4. Transmittans grafiğine göre dalga sayısı ve karşılık geldiği fonksiyonel bölgeler

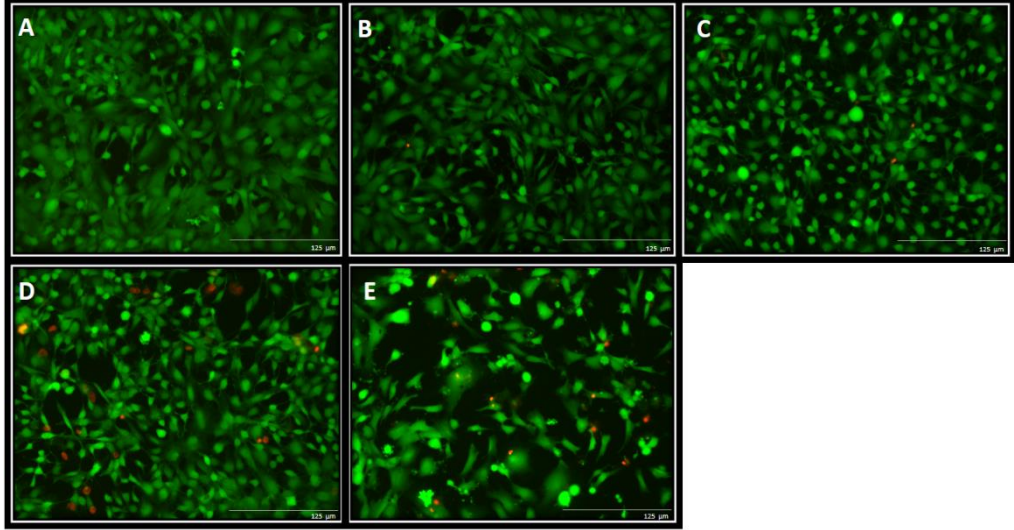
Dalga Sayısı	Fonksiyonel Bölge
3334,84 cm ⁻¹	-OH bölgesi
2898,43 cm ⁻¹	-CH bölgesi
1715,27 cm ⁻¹	-C=O bölgesi
1030,59	CO, CC bölgesi

4.2 Bronş Epitel Hücrelerinde β-glukan Alerjeni ile Uyarımın Hücre Canlılığına ve Sitotoksisiteye Etkisi

Bronş epitel hücre hattı olan BEAS-2B hücreleri, β-glukan ile artan dozlarda uyarıldı. Uyarım sonrasında hücre canlılığı etidyum homodimer-1 ve kalsein- AM floresan boyama ile incelendi. Sitotoksisite analizi ise MTT deneyi ile gerçekleştirildi.

4.2.1 β -glukan Uyarımı Sonrasında Canlı ve Ölü Hücrelerin Floresan Mikroskobu ile Görüntülenmesi

Bronş epitel hücrelerin β -glukan ile artan konsantrasyonlarda uyarımı sonrasında canlı/ölu hücre boyaması gerçekleştirildi. Hücreler β -glukan ile 0,1 μ g/mL, 1 μ g/mL, 10 μ g/mL ve 100 μ g/mL konsantrasyonlarda 24 saat boyunca uyarıldı. Uyarım sonrasında elde edilen floresan boyama görüntüleri Şekil 4.2.'de verilmiştir.



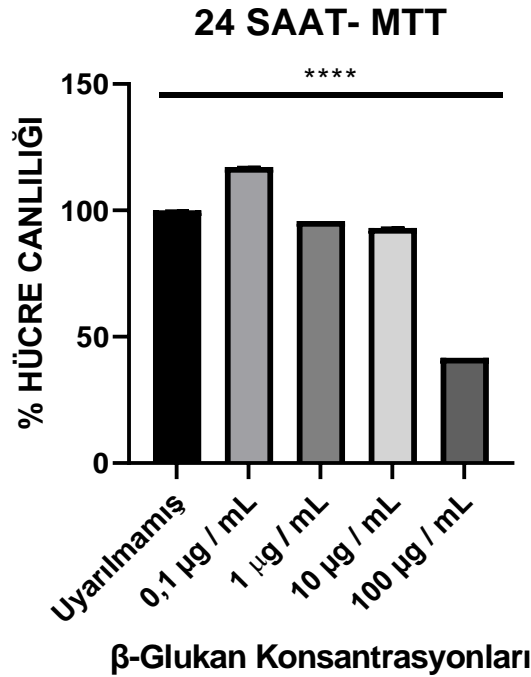
Şekil 4. 2. BEAS-2B hücreleri β -glukan ile; Uyarılmamış Koşul (UK) (A), 0,1 μ g/mL (B), 1 μ g/mL (C), 10 μ g/mL (D), 100 μ g/mL (E) konsantrasyonlarda uyarılmış koşullarının canlı (yeşil) /ölu (kırmızı) hücre boyama fotoğrafları; 20 X, bar 125 μ m

Literatürdeki çalışmalar 6 μ g/mL β -glukan (lentinan) ile uyarılan koşullarda hücre canlılığının azaldığını göstermektedir [144]. RPMI-2650 nasal epitel hücrelerinin 10 ve 100 μ g/mL *A. fumigatus* kaynaklı β -glukan ile uyarımının BEAS-2B hücrelerindeki sonuçlara uyumlu olarak, hücre canlılığını azalttığı bulunmuştur (Laboratuvarımızın sonuçları – yayınlanmamış). Boyama sonuçlarımız literatür bilgileri ile benzer sonuçlar vermiştir [144, 154]. 10 μ g/mL itibariyle hücre morfolojisinde değişiklikler görülmekle beraber hücre canlılığında azalma başlamış ve 100 μ g/mL de hücre canlılığı önemli miktarda düşmüştür.

4.2.2 β -glukan Uyarımının Hücre Canlılığına Etkisi

Çalışmada bronş epitel hücrelere uygulanan β -glukan ekstraktının hücre canlılığına etkisini belirlemek amacıyla MTT ölçümü gerçekleştirildi. BEAS-2B hücrelerinin 0,1 μ g/mL, 1

$\mu\text{g/mL}$, $10 \mu\text{g/mL}$ ve $100 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda β -glukan ile 24 saat uyarımları sonrasında elde edilen MTT sonuçları Şekil 4.3.'de verildi.



Şekil 4. 3. Bronş epitel hücrelerin farklı konsantrasyondaki β -glukan ile uyarılması sonrasında elde edilen MTT sonuçları; $n=3$; **** $p<0.0001$. Hata çubukları SEM'i göstermektedir.

BEAS-2B hücrelerinin $0,1\mu\text{g/mL}$, $1 \mu\text{g/mL}$, $10 \mu\text{g/mL}$ ve $100 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda 3 tekrar ile yapılan uyarımları sonucunda kontrol grubunun hücre canlılığı %100 olarak kabul edildi. Yapılan analiz sonucunda hücre canlılığının $100 \mu\text{g/mL}$ 'de önemli oranda azaldığı görüldü. $0,1 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyon ile uyarılan gruplarda ortalama hücre canlılığı %117.24, $1 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyon ile uyarılan gruplarda ortalama hücre canlılığı %95.76, $10 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyon ile uyarılan gruplarda ortalama hücre canlılığı %93.075 ve $100 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyon ile uyarılan gruplarda ise ortalama hücre canlılığı % 41.71 olarak hesaplandı.

Boyama sonuçlarından farklı olarak MTT sonuçlarında $10 \mu\text{g/mL}$ 'de önemli bir değişiklik görülmedi. İki yöntemden elde edilen sonuçlar arasında gözlenen bu farkın yöntemlerin çalışma prensipleri ile ilgili olabileceği düşünüldü. MTT deneyi mitokondriyal aktivitenin ölçülmesi prensibine dayalı bir yöntemdir [155]. $10 \mu\text{g/mL}$ ile uyarılan hücreler ışık

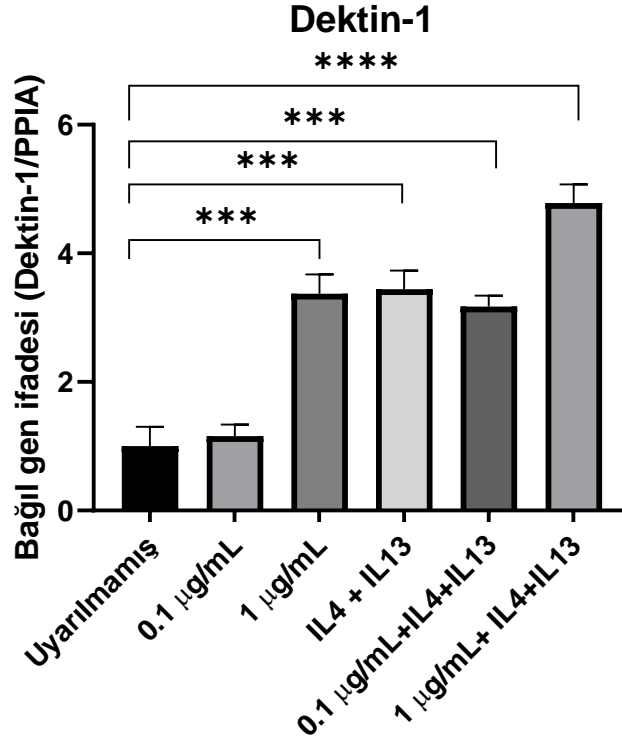
mikroskobu ile morfolojik olarak incelendiğinde hücre morfolojilerinin değiştiği görüldü. Buna karşın MTT sonuçlarına göre hala yüksek bir mitokondriyal aktivitelerinin olduğu anlaşıldı. Bu durumun ise bir grup hücrenin uyarana karşı direnç gösterip mitokondriyal aktivitelerinin yüksek olabileceği ile ilişkili olduğu düşünüldü. MTT yönteminden farklı olarak floresan boyama yönteminde canlı/ölü hücreler boyanmaktadır. Kalsein-AM hücre zarından geçerek sitoplazmaya girebilen ve sitoplazmadaki esterazlar tarafından parçalanarak yeşil renk oluşturan bir substrattır. Kalsein-AM sitoplazma aktivitesini gösterdiği için canlı hücrelerin yeşil renkte görülmesini sağlar. Buna karşın Et/Br homodimer III ajanı membrandan geçemeyen ve DNA'ya bağlanan bir ajandır. Bu ajan canlı olmayan (membran yapılarını kaybetmiş) hücrelerin çekirdeklerine bağlanarak kırmızı renkte bir ışımaya oluşmasını sağlar. Floresan boyama yöntemi canlı ve ölü hücreleri göstermekte iken MTT yöntemi hücre içi metabolik aktivitenin bir göstergesidir. Bunlara ek olarak literatürde 2010 yılında DDL-1 mide kanseri hücreleri ile yapılan bir çalışmada ticari bir β -glukan olan laminarinin farklı konsantrasyonları (0-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) kullanılmış ve 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyon itibarıyla hücre ölümlerinin gerçekleştiği bildirilmiştir [144]. Başka bir çalışmada ise A549 hücreleri farklı lipositlerle kapsüllenmiş β -glukan formları ile 5, 10, 15, 20 ve $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonlarda 24 saat uyarılmış ve hücre canlılığını ölçmek için ise MTT analizi yapılmış ve artan konsantrasyonlarda hücre canlılığında azalma izlenmiştir [154].

Floresan boyama ve MTT verileri bir arada değerlendirildiğinde, gen ve protein ifadesi ölçüm deneyleri için hücre ölümüne yol açmayan 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ve 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ β -glukan konsantrasyonları seçildi.

4.3 Gerçek Zamanlı PZR Çalışmaları ile Dektin-1 Geni ve Sitokin ve Kemokinlerin İfadesinin İncelenmesi

4.3.1 BEAS-2B Hücrelerinde Dektin-1 Geninin İfadesi

PZR çalışmalarında BEAS-2B hücreleri IL-4, IL-13 ve β -glukan ile uyarıldı. BEAS-2B hücrelerindeki Dektin-1 reseptörünün gen ifadesi, bir housekeeping gen olan Peptidil İzomeraz A (PPIA)'a karşı incelendi (Şekil.4.4).



Şekil 4. 4. BEAS-2B hücre hatlarında Dektin-1 reseptörünün ifadesinin incelenmesi *** p<0,001; **** p<0.0001 Hata çubukları SEM'i göstermektedir.

Gerçek zamanlı PZR sonuçlarına göre; β -glukanın artan konsantrasyonları ile uyarılan BEAS-2B hücrelerinde Dektin-1 reseptörünün ifadesi konsantrasyona bağlı olarak artmıştır. 0,1 μ g/mL Dektin -1 ile uyarım sonrasında uyarılmamış koşula göre anlamlı bir artış olmamasına karşın; 1 μ g/mL konsantrasyonda uyarım sonrasında ise 3,5 katlık bir artış tespit edildi. Ayrıca yalnızca Th2 tip sitokinler olan IL-4 + IL-13 ile uyarılan BEAS-2B hücrelerinde de Dektin-1 ifadesinin 3,5 kat arttığı gözlemlendi. Buna ek olarak β -glukanın Th2 tip sitokinler olan IL-4 ve IL-13 ile beraber uyarımı sonrasında BEAS-2B hücrelerinde Dektin-1 ifadesi 5,5 kat artmıştır.

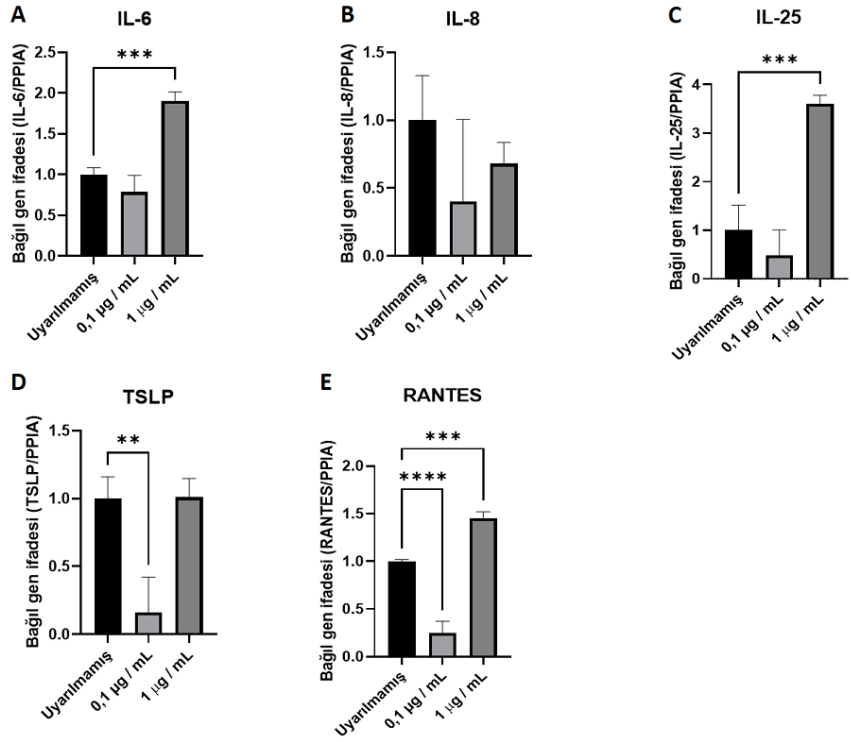
Dektin-1 reseptörü temel olarak miyeloid hücrelerde, makrofajlarda ve nötrofillerde ifade edilir [156]. Bununla beraber Dektin-1 reseptörünün dendritik hücrelerde ve akciğer epitelinde de ifade edildiği gösterilmiştir [157, 158]. Ayrıca Dektin-1'in hem Th2 tip sitokinler varlığında hem de Th17 sitokinler varlığında ifadesinin arttığı gösterilmiştir [128, 159, 160].

2003 yılında Janet ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada *Dektin-1* ifadesinin IL-4 + IL-13 varlığında 4 saatlik uyarımların 24 saatlik uyarımlara kıyasla daha yüksek olduğu bildirilmiştir [160]. Fareler üzerinde Dektin-1 reseptörünün rolünü araştıran bir çalışmada lenfosit hücreleri *S. cerevisiae* β -glukanı ile 24 saat ve 48 saat boyunca uyarılmıştır. Bu uyarımlar sonucunda ise bir Th2 tip sitokin olan IL-4'ün arttığı gözlenmiştir [161].

Literatürde paylaşılan bulgular değerlendirildiğinde β -glukanın Dektin-1 aracılı Th2 yanıt oluşturduğu görülmektedir. Tüm bu veriler birlikte değerlendirildiğinde Dektin -1 ifadesinde patojen kaynaklı β -glukan ve Th2 tip hücre mikro çevresinin önemli olduğu sonucunu çıkarmaktayız.

4.3.2 Th2 Sitokinler Varlığında BEAS-2B Hücrelerinin β -glukan ile Uyarımı Sonrasında Sitokin Profillerinin İncelenmesi

Tez çalışması kapsamında 24 saat süresince β -glukan ile uyarılan BEAS-2B hücrelerinde IL-6, IL-8, IL-25, IL-33, TSLP ve RANTES sitokin ve kemokinlerinin ifadeleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar sırasıyla Şekil 4.5.'de, artış ve azalışları Tablo 5'de verildi.



Şekil 4. 5. BEAS-2B hücrelerinin β -glukan ile uyarımı sonrası sitokin ifadelerindeki değişim ** $p<0,01$ *** $p<0,001$ **** $p<0,0001$.

IL-6 ifadesindeki değişim: 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ile 24 saat boyunca uyarılan BEAS-2B hücrelerinin IL-6 ifadesinde uyarılmamış koşula kıyasla anlamlı bir farklılık görülmedi. Buna karşın β -glukan konsantrasyonu 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'ye çıkarıldığında IL-6 miktarında 2 katlık bir artış gözlemlendi ($p < 0.01$).

IL-8 ifadesindeki değişim: Hem 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hem de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ile 24 saat boyunca gerçekleştirilen uyarımlar sonucunda IL-8 seviyesinde azalma gözlemlendi. Fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

IL-25 ifadesindeki değişim: 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ile 24 saat boyunca uyarılan BEAS-2B hücrelerinin IL-25 ifadesinde uyarılmamış koşula kıyasla anlamlı bir farklılık görülmedi. Buna karşın β -glukan konsantrasyonu 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'ye çıkarıldığında IL-25 miktarında yaklaşık 3,5 katlık bir artış gözlemlendi.

IL-33 ifadesindeki değişim: IL-33 ile 3 tekrarlı yapılan gerçek zamanlı PZR sonuçlarının CT değerleri 35'in üzerinde bulundu.

TSLP ifadesindeki değişim: 0,1 µg/mL ile uyarılan hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı 2 katlık bir azalma görölmüşken, 1 µg/mL ile uyarılan hücrelerde anlamlı bir fark görülemedi.

RANTES ifadesindeki değişim: 0,1 µg/mL ile uyarılan hücrelerde RANTES ifadesine 2 kattan fazla bir azalma görölmüşken; 1 µg/mL ile uyarılan hücrelerdeki RANTES ifadesinde 1,5 katlık bir artış izlendi.

Literatürde *Aspergillus fumigatus*'a ait spor ve hiflerinin BEAS-2B epitel hücreleri üzerindeki inflamatuvar etkilerini araştıran bir çalışmada; sporlar ile yapılan uyarımda *IL-6* artışı gözlenmezken hif ile uyarımda *IL-6* artışı gözlenmiştir. Yine aynı çalışmada *IL-8* ifadesine bakılmış ve *IL-6* ile benzer bir profil bulunmuştur [162]. Romani ve arkadaşları kullandıkları fare modeli çalışmasında *IL-6* geni susturulmuş farelerde *C. albicans*'a duyarlılığın arttığını bildirmişlerdir [163]. *IL-6*'nın fagositozda rol alması, eksikliğinde fungal duyarlılığın artması gibi sebeplerden dolayı mantar savunmasında önemli bir sitokin olduğu ifade edilmiştir [163, 164]. Bu bilgiler ışığında *Aspergillus fumigatus*'tan elde edilmiş β-glukan ile uyarımda *IL-6* sitokinin ifadesindeki artış literatür ile uyumludur ($p < 0.005$). CXC kemokin ailesinin bir üyesi olan *IL-8*, özellikle nötrofiller için önemli bir aktivatördür [165]. Literatürde *A.fumigatus* ve *P.chrysoeenum* hif ve konidyaları ile 6 saat boyunca uyarılan BEAS-2B hücrelerinde *IL-8* ifadesinin arttığı gözlenmiştir. Literatürden farklı elde edilen gen ifade profilleri arasındaki farklılıkların nedeni; fungal substratlarla karşılaşma zamanı ve farklı fungal substratlarla (konidya ve hif) uyarımın gerçekleştirilmesi olabilir. . *IL-8* sitokini, hücrel uyarılara karşı erken dönem cevap verme potansiyeline sahip bir sitokindir [162] ve birçok hücre tipi tarafından salgılanan ve hem bir kemoatraktan hem de güçlü bir anjiyonik faktör olan *IL-8*, *IL-6* ya benzer metabolik özelliklere sahip olmakla birlikte, *IL-6* ya kıyasla daha kısa bir yarı ömre sahiptir [166]. Birçok çalışma *IL-8*'in erken dönem belirteci olduğunu göstermektedir [166, 167].

IL-17 ailesine bir üyesi olan *IL-25*, *IL-17E* adıyla da bilinmektedir [168]. Bu sitokin temel olarak Th2 tip sitokinlerin sentezinde görev almaktadır ve alerjenle karşılaşma sonrasında erken evrede aktive olmaktadır [169]. 2018 yılında yayınlanmış bir makalede fare akciğer epitel hücreleri, *Aspergillus fumigatus*'tan toplanan hem canlı hem de ısıyla inaktive edilmiş konidyalar ile 6-24 ve 48 saat boyunca uyarılmıştır. Isı ile öldürülen konidyalara yapılan uyarımda *IL-25* seviyeleri 6. saatte en yüksek olmak üzere zamanla

azalmış fakat ortamdaki varlığını korumuştur. Yine aynı çalışmada canlı konidyalar ile uyarım yapıldığında 6. saatte en az, 24. saate en fazla, 48. saatte ise 6. saatten fazla 24. saatten az olacak şekilde bir profil oluşturmuştur [170]. Tez çalışmasında literatürdeki verilerle uyumlu olarak *IL-25* ifadesi 24. saat sonunda kontrol grubuna kıyasla 4 kata yakın bir artış göstermiştir ($p<0.005$).

IL-1 protein ailesinin bir üyesi olan *IL-33*, *IL-25* gibi Th2 sitokinlerinin aktivasyonunda görev alan bir sitokindir [171]. Canlı konidya ve ısıtılmış konidyalar ile uyarılan farelerin akciğer epitel hücrelerinde 6, 24 ve 48 saat sürelerle sonucunda *IL-33* ifadesinin kontrol grubuna göre arttığı gösterilmiştir [170]. Buna karşın bizim sonuçlarımızda *IL-33*'ün CT değerleri oldukça düşük ($CT>35$) çıktı ve *IL-33* ifadesi tespit edilemedi. Bunun temel sebebi *IL-33* geninin uyarımın erken evrelerinde transkribe olması olabilir. Ayrıca literatürdeki çalışmalarda kullanılan konidyalar β -glukan haricinde diğer hücre duvarı yapılarını da içermektedir. *IL-33* ifadesinin 24. saat sonrasında da görülmesinin sebebi β -glukan harici alerjenlerin etkisi olabilir. Buna karşın HDM ile uyarılan hava yolu epitel hücrelerinde *IL-33* ifadesinin en yüksek 2. saatte görüldüğü, 6. saatte azalmaya başladığı ve 24. saatte kontrol grubuna kıyasla daha düşük seviyede olduğu literatürde gösterilmiştir [172].

2014 yılında yapılan bir çalışmada *Aspergillus fumigatus* hifleri parçalanarak kitinaz ve glukanaz enzimleri ile ayrı ayrı muamele edilmiş ve farelere nazal olarak verilmiştir. Bu çalışmada fare epitel hücrelerinde *TSLP* ifadesinin erken (6 saat) ve geç (72 saat) dönemdeki ifadeleri incelenmiştir. 72. saatteki *TSLP* ifadesinin 6. saatteki *TSLP* ifadesine kıyasla daha yüksek olduğu görülmüştür [173]. Başka bir çalışmada ise fare akciğer epitel hücreleri ısıtılmış ve canlı konidyalar ile uyarılmış ısıyla inhibe edilen konidyalarda uyarımın yapıldığı koşullarda *TSLP* ifadesinde artış saptanmış; ancak canlı konidyalarda uyarılan koşullarda kontrole göre fark bulunamamıştır [170]. Bizim sonuçlarımızda ise 0,1 $\mu\text{g/mL}$ ile uyarılan hücrelerde kontrole göre bir azalma görülmüşken ($p<0.01$), 1 $\mu\text{g/mL}$ uyarımlarda kontrole benzer bir profil görüldü. Son olarak ise *RANTES* ifadesinin konsantrasyona bağlı olarak arttığı tespit edilmiş olmasına karşın literatürde β -glukan ile uyarımın *RANTES* ifadesi üzerine olan etkileri hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır.

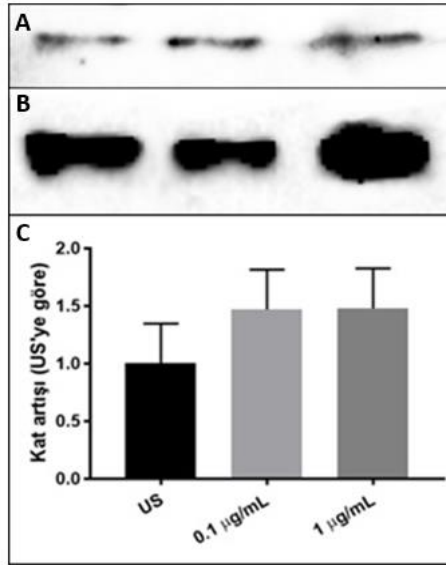
Tablo 5.: Sitokin/ Kemokinlerin 24 Saatlik konsantrasyona bağlı ifade değişiklikleri.

Sitokin / Kemokin	0,1 µg/mL	1 µg/mL
IL-6	◇	+
IL-8	-	-
IL-25	-	+
IL-33	o	o
TSLP	-	◇

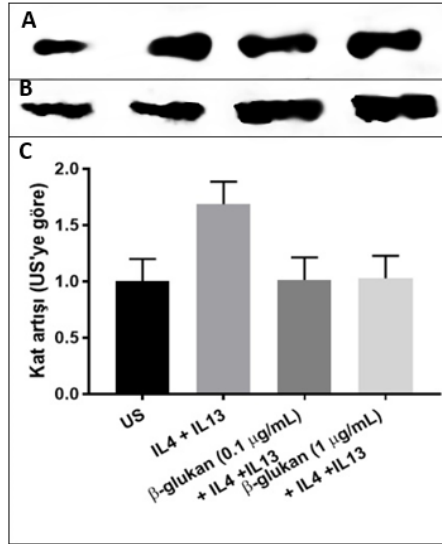
[◇] DEĞİŞİM YOK; [-] AZALIŞ; [+] ARTIŞ; [o] CT >35

4.4 Western Blot Yöntemi ile Dektin-1 Proteininin İfadesinin İncelenmesi

BEAS-2B hücrelerinde β-glukanla uyarımın Dektin-1 üzerine etkilerinin protein düzeyinde incelenmesi amacıyla Western Blot yöntemi kullanıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.6. ve 4.7.'de verildi.



Şekil 4. 6 Yalnızca β-glukan ile uyarılan BEAS-2B hücreleri. A: Dektin-1 Protein İfadesini, B: β-aktin Kontrol grubunu, C: Protein ifadesindeki kat artışını göstermektedir.



Şekil 4. 7. IL-4 + IL-13 ve β -glukan ile uyarılan BEAS-2B hücreleri. A: Dektin-1 Protein İfadesini, B: β -aktin Kontrol grubunu C: Protein ifadesindeki kat artışını göstermektedir.

Şekil 4.6. 'da yalnızca β -glukan ile uyarılan hücrelerde Dektin-1 protein ifadesinde 1.5 katlık bir artış gözlenmesine karşın fark istatistiksel anlamlılığa ulaşmadı. Şekil 4.7.'de yalnızca IL-4 ve IL-13 ile uyarılan hücrelerde Dektin-1 protein ifadesinde 1,8 kat arttığı gösterildi. Buna karşın hem IL-4 + IL-13 hem de β -glukan ile uyarılan koşullarda protein düzeyinde bir değişiklik tespit edilmedi.

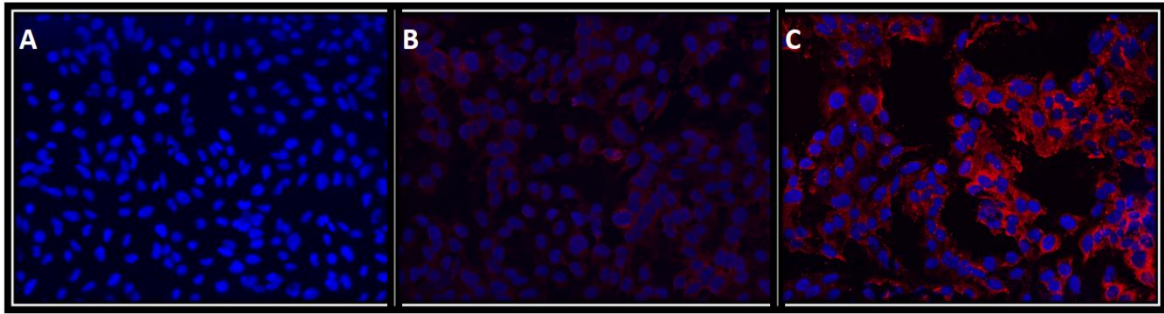
Literatürde Dektin-1 protein ifadesiyle ilgili Western Blot çalışmaları kısıtlıdır. Makrofajlarda otofajide β -glukanın rolünü araştıran bir çalışmada makrofaj hücreleri β -glukan ile uyarılmış ve 24 saatin sonunda kontrol grubuna göre Dektin-1 protein ifadesinde 1,5 katlık bir artış gösterdiği tespit edilmiştir [174]. Bunun yanı sıra insan kornea epitel hücrelerinde yapılan bir diğer çalışmada, uyarıcı olarak hem curdolan (*Agrobacterium* β -glukanı) hem de *Aspergillus fumigatus* hifleri kullanılmıştır. Bu deneyde hücreler sırasıyla; uyarılmamış, curdolan ile uyarılmış, hif ile uyarılmış ve curdolan + hif ile uyarılmış şeklinde 4 gruba ayrılmıştır. 24 saat süren uyarım sonunda, Dektin-1 protein ifadeleri incelendiğinde ise yalnız curdolan ve hif ile uyarılan gruplarda uyarılmamış koşula göre anlamlı bir değişiklik gözlenmemişken, hem curdolan hem de hif ile uyarım yapılan hücrelerde 24. saat sonunda Dektin-1 protein ifadesinde 1,5 katlık artış gözlenmiştir [175]. Fare korneası üzerine yapılan başka bir çalışmada fare kornealarında *Aspergillus fumigatus* kaynaklı β -glukanın Dektin-1 proteini ifadesi üzerine etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada kornea hücrelerine *Aspergillus fumigatus* hifleri enjekte edilmiş ve 10 saat uyarılmış ve Western Blot yöntemiyle Dektin-1 protein düzeyi incelenmiştir. *Aspergillus fumigatus*

hifleri ile uyarılan hücrelerde Dektin-1 protein miktarında bir değişiklik saptanmamıştır [176].

IL-4 + IL-13 ile birlikte β -glukan uyarım sonucu RNA düzeyinde gözlenen ancak protein düzeyinde tespit edilemeyen farkın açıklanabilmesi amacıyla 36 ve 48 saatlerde ko-stimülasyonun yapılması planlanmıştır.

4.5 İmmüno Floresan Boyama ile Dektin-1 Proteininin İfadesinin Belirlenmesi

Protein ifadesinin gösterilebilmesi için Western Blot yöntemine ek olarak immüno sitokimya yapılmıştır. BEAS-2B hücrelerinin Th2 sitokinlerle uyarımı sonrası elde edilen immüno sitokimya sonuçları Şekil: 4.8. 'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 8. BEAS-2B hücrelerinin 24 saat boyunca Th2 sitokinler ile uyarılması sonucu oluşan Dektin-1 protein ifadesi A: Negatif Kontrol B: Uyarılmamış Koşul C: IL-4 +IL-13 Sitokinler ile uyarılmış koşul. Negatif kontrolde boyama yapılmamıştır. Çekirdek boyaması 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) ile yapılmıştır (mavi). Dektin-1 boyaması ise Alexa Fluor® 594 ile gerçekleştirilmiştir (kırmızı).

Gerçek zamanlı PZR sonuçlarında Th2 sitokinler varlığında Dektin-1 ifadesinin arttığını tespit edilmiştir. Western blot yöntemine ek olarak, immüno floresan boyama yöntemi ile Dektin-1 protein ifadesini incelediğimizde uyarılmamış koşula kıyasla Th2 tip sitokin ile uyarılan hücrelerde Dektin-1 protein ifadesinde belirgin bir artış gözlemlenmiştir.

5. YORUM

Astım, dünya çapında her yaştan ve cinsiyetten bireyi etkisi altına alabilen ve etkilediği kişilerin yaşam kalitelerini olumsuz yönde etkileyen bir solunum yolu hastalığıdır. Astımın başlangıcı ve şiddetin hem genetik faktörlerin hem de çevresel faktörlerin rol alması astımın tedavisini güçleştirmektedir. Astım tedavilerinde daha kesin çözümler bulabilmek için bilim adamları astımı çeşitli fenotip ve endotiplere ayırmıştır.

Astım başlangıcında ve alevlenmesinde en önemli etmenlerden birisi de dış ortamdan soluduğumuz hava yolu alerjenleridir. Hava yolu alerjenleri içerisinde polenler, hayvan tüyleri, tozlar, ev tozu akarları ve mantarlar yer almaktadır. Mantarlar birçok çevresel koşula adapte olabilmeleri ve fırsatçı patojen olmaları nedeniyle ayrı bir öneme sahiptir. Fırsatçı patojenler arasında sıklıkla karşılaşılan türler; *Candida sp.*, *Alternari sp.*, *Penicillium sp.* ve *Aspergillus sp.*'dir. Bu türler içerisinde *Aspergillus* türleri yüksek patojenite ve termotolerant özellikleriyle dikkat çekmektedir. Bu mantar türü hem ürettikleri sporlar vasıtasıyla solunum yollarına kolonize olarak, hem de gövdelerinde kopan parçalarla alerjik etki oluşturarak mantar duyarlı bireylerde astım şiddetini arttırabilmektedirler.

Tez çalışması kapsamında, hava yolu patojeni olan *Aspergillus fumigatus* türünün hücre duvar bileşenlerinden β -glukan ekstrakte edildi. Saflaştırılan β -glukan, bronş epitel hücre hattı olan BEAS-2B hücrelerine uygulanarak *Dektin-1* reseptörünün mRNA ve protein düzeyinde ifadesi incelendi. Ayrıca β -glukan ile uyarılan hücrelerde temel sitokinlerin ve kemokinlerin ifadeleri mRNA düzeyinde incelendi.

Literatürde β -glukan saflaştırmayı tarif eden çeşitli yöntemler bulunmaktadır [177-179]. Saflaştırma yöntemi optimize edilirken, birçok maya ve mantarda başarılı olan farklı yöntemler denendi. Çalışmalarımızda kullandığımız ve literatürde tarif edilen klasik yöntemlerin *Aspergillus fumigatus* türü mantarlarda başarılı olmadığını gözlemledik. İleri çalışmalarımızda ise Fatemeh Sadeghi ve arkadaşlarının uygulamış oldukları yöntem optimize edilerek *Aspergillus fumigatus* kökenli β -glukan yapısı başarıyla saflaştırıldı . Birçok maya ve mantarda başarılı olarak çalıştığı literatürde belirtilen yöntemlerin bizim çalışmamızda başarılı olmamasının nedenlerinden birisinin *Aspergillus fumigatus*'un istisnai hücre duvar yapısı olması muhtemeldir. Genel olarak mantar hücre duvarında bulunan α -glukan yapısı %1-%10 arasında değişmektedir. Fakat bu durum *Aspergillus*

türlerinde farklılık göstererek hücre duvarının %10'dan fazlasını α -glukan yapısı oluşturmaktadır. Bunun yanı sıra, mantar hücre duvarı iskeletlerinin %60'ı β -(1,3)-(1,6) halkasal glukan yapısı içermektedir. Fakat *Aspergillus fumigatus* türü mantarlarda hücre duvarı iskeleti bitkilerinkine benzer bir şekilde β -(1,3)-(1,4) doğrusal glukan yapısı şeklinde bulunmaktadır [92]. B-glukanın halkasal ve doğrusal yapıları arasındaki farklar göz önüne alındığında saflaştırmadaki bu zorluğun hücre duvar yapısındaki farklılık olduğu düşünüldü.

β -glukan saflaştırma işleminden sonra, β -glukanın kimyasal karakterizasyonunun yapılabilmesi için ATR-FTIR analizi yapıldı. Analizdeki transmittans ve absorbans değerleri baz alındığında, elde edilen ekstraktın β -glukana ait tanımlanmış fonksiyonel bölgeleri içerdiği görüldü.

Saflaştırılan ürününün β -glukan olduğu doğrulandıktan sonra, β -glukanın uygun konsantrasyonlarının bulunabilmesi için hücrelerde sitotoksosite ve canlılık testleri yapıldı. Bunun için BEAS-2B hücreleri 96 kuyulu plakalar ekildi ve 0.1, 1, 10 ve 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonlarda β -glukan ile 24 saat boyunca uyarıldı. Sitotoksosite için MTT, hücre canlılığı için EtBr/Kalsein boyama yöntemleri kullanıldı. Bu deneylerden elde edilen sonuçlar ve literatürdeki önceki bilgiler beraber kıyaslandığında uygulanacak dozlar 0.1 ve 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olarak belirlendi.

BEAS-2B hücrelerinde *Dektin-1* ifadesinin incelenmesi için öncelikle BEAS-2B hücreleri Th2 tip sitokinler olan IL-4 ve IL-13 ile uyarıldı. Th2 tip sitokinler varlığında *Dektin-1* gen ifadesinin 3,5 kat arttığı tespit edildi. Bir β -glukan reseptörü olan *Dektin-1*'in β -glukan ile karşılaşan BEAS-2B hücrelerinde ifadesinin değişip değişmeyeceğini görmek için hücreler β -glukan ile belirlenen dozlarda uyarıldı. Bunun sonucunda, BEAS-2B hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak *Dektin-1* ifadesinin arttığı ve 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonda 3,5 katlık bir gen ifadesi artışı sağladığı görüldü. Tüm bunlara ek olarak, BEAS-2B hücrelerinin Th2 tip sitokinler ve β -glukan ile beraber uyarımlarının *Dektin-1* ifadesini yaklaşık 5,5 kat arttırdığı görüldü. Elde ettiğimiz veriler, patojen kaynaklı β -glukan ile karşılaşma durumunda Th2 tip inflamasyonun olduğu bir ortamda, *Dektin-1* ifadesindeki artışa bağlı olarak bu reseptör bağlı yollardaki değişikliklerin detaylı olarak araştırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Th2 tip sitokinler ve β -glukan varlığında *Dektin-1* protein düzeyindeki değişiklikler incelendiğinde Th2 tip sitokinlerin olduğu ortamda *Dektin-1* ifadesinde artış gözlenmesine

karşın RNA düzeyinde gözlenen farklı olarak β -glukan ile uyarım koşullarında Dektin-1 protein ifadesinde artış tespit edilememiştir. Sitokin bağımlı yolaklar ile β -glukan bağımlı yolaklar arasındaki farklılıkların, RNA-protein paternlerinde görülen farkın kaynağı olabileceğini düşünmekteyiz. Farklı uyarım sürelerinde protein deneyleri tekrarlanarak β -glukan uyarımının Dektin-1 proteini üzerindeki etkilerinin araştırılması planlanmıştır.

Pro- ve anti-inflamatuar özellikteki IL-6 'nın ifadesindeki artışa paralel olarak epitel kökenli sitokinler olan alarmin IL-25 ve TSLP'nin ifadesindeki artış, epitel hasarla ilişkili bir inflamasyonun da göstergesidir. Literatürde TSLP'nin geç dönemde (72 saat) erken döneme kıyasla (6 saat) daha yüksek ifade edildiği gösterilmiştir. Ayrıca fungal konidyalarla yapılan bir çalışmada ısıyla muamele edilen konidyalardan TSLP ifadesini arttırdığı buna karşın canlı konidyalardan TSLP ifadesini değiştirmediği belirtilmiştir. Bunlara ek olarak bizim çalışmamızda TSLP ifadesi düşük konsantrasyonda kontrolden düşük bir profil sergilerken yüksek konsantrasyonda kontrol ile benzer profil göstermiştir. 1 μ g/mL konsantrasyonda kontrole benzer bir profil görülmesinin nedeni TSLP'nin geç dönemde ortaya çıkması olabilir.

Sonuç olarak;

1. Hava yolu epitel hücrelerinde Th2 sitokinler varlığında *Dektin-1* ifadesinin arttığı tespit edildi.
2. *Aspergillus fumigatus* türünden elde edilen β -glukanın hava yolu epitel hücrelerinde *Dektin-1* ifadesini arttırdığı görüldü.

Tez çalışmasında, uyarı zamanı olarak tek zaman seçilmiştir. Ancak erken ve geç dönem β -glukan uyarımının epitel hücrede Dektin-1 ve inflammatuar sitokinler üzerine etkilerinin ortaya konması β -glukan temelli *Aspergillus fumigatus* enfeksiyonunun etki mekanizmasının anlaşılması açısından önemlidir. Epitel kökenli sitokinlerin uyarı sonrası ifade profillerinin ortaya konması β -glukan temelli inflamasyonun açıklanmasında önemli bir rol oynayacaktır.

Dektin-1 ifadesinin hava yolu inflamasyonundaki rolünü detaylandırabilmek adına *Alternaria sp.*, *Cladosporium sp.*, *Penicillium sp.* gibi için fırsatçı patojenlere ait β -glukanlar ekstrakte edilip farklı mantar türlerinin hava yolu inflamasyonunda oluşturduğu etkiler gözlenebilir. Bunlara ek olarak çalışmamızda hava yolu epitel hücresi olarak sadece BEAS-2B epitel hücre hattı kullanıldı. Mantarların üst ve alt solunum yollarına kolonize

olup inflamasyona sebebiyet verdiği göz önüne alınırsa BEAS-2B hücre hattına ek olarak bir nazal epitel hücre hattı olan RPMI-2650 hücre hattında β -glukan kaynaklı meydana gelen Dektin-1 ifadesi ve sitokin ve kemokin profillerinin incelenmesi hava yolu inflamasyonda Dektin-1 rolünün incelenmesine yönelik detaylı bir anlayış sağlayacaktır.

Tez çalışması *Aspergillus fumigatus*'tan β -glukanın ekstrakte edilip uygulanması yönüyle literatürdeki benzer çalışmalardan ayrılmaktadır. Bu çalışma ile beraber, ekstrakte edilmiş saf β -glukanın (proteaz aktivitesi devam eden konidyalardan veya kitin, mannan gibi diğer hücre duvarı elemanlarını içeren bileşik yapılardan farklı olarak) hava yolu epitel hücrelerindeki Dektin-1 reseptörü üzerine olan etkisi gösterilmiş, sitokin ve kemokin profilleri oluşturularak literatüre katkı sağlanmıştır. Bu bağlamda tez çalışması gelecek çalışmalara öncülük edebilecek niteliktedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] S.T. Holgate, A brief history of asthma and its mechanisms to modern concepts of disease pathogenesis, *Allergy, asthma & immunology research* 2(3) (2010) 165-171.
- [2] R. Owen, J. Simon, T. Bell, T.H. Huxley, Henry Hyde Salter (1823-71): biographical sketch, *Thorax* 40 (1985) 887-8.
- [3] S.T. Holgate, S. Wenzel, D.S. Postma, S.T. Weiss, H. Renz, P.D. Sly, Asthma. *Nature Reviews Disease Primers* 1, Nature Publishing Group, 2015.
- [4] M. Kudo, Y. Ishigatsubo, I. Aoki, Pathology of asthma, *Frontiers in microbiology* 4 (2013) 263.
- [5] Global Initiative for Asthma. *Global strategy for asthma management and prevention*, 2019.
- [6] *The Global Asthma Report*, (2018).
- [7] M. Masoli, D. Fabian, S. Holt, R. Beasley, G.I.f.A. Program, The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report, *Allergy* 59(5) (2004) 469-478.
- [8] T. Alfvén, C. Braun-Fahrlander, B. Brunekreef, E. Von Mutius, J. Riedler, A. Scheynius, M. Van Hage, M. Wickman, M. Benz, J. Budde, Allergic diseases and atopic sensitization in children related to farming and anthroposophic lifestyle—the PARSIFAL study, *Allergy* 61(4) (2006) 414-421.
- [9] J.G. Zein, S.C. Erzurum, Asthma is different in women, *Current allergy and asthma reports* 15(6) (2015) 28.
- [10] C.M. Moreno, A. López-Viña, M.G.-S. Martín, C.C. Serrano, J.J. Esteban, M.T.R. Prieto, N.A. Group, Factors related with the higher percentage of hospitalizations due to asthma amongst women: the FRIAM study, *Archivos De Bronconeumología (English Edition)* 48(7) (2012) 234-239.
- [11] K. Tomita, H. Sano, T. Iwanaga, K. Ishihara, M. Ichinose, I. Kawase, H. Kimura, K. Hirata, M. Fujimura, M. Mishima, Association between episodes of upper respiratory infection and exacerbations in adult patients with asthma, *Journal of Asthma* 49(3) (2012) 253-259.
- [12] F. Pignataro, M. Bonini, A. Forgiione, S. Melandri, O. Usmani, Asthma and gender: The female lung, *Pharmacological research* 119 (2017) 384-390.
- [13] K.M.H. P.M. Barnes, G. Freeman, Early Release Program 2020. <http://www.cdc.gov/nchs/nhis.htm>. 2020).(Erişim tarihi: 5 Ocak 2021)
- [14] E. Kurt, S. Metintas, I. Basyigit, I. Bulut, E. Coskun, S. Dabak, F. Deveci, F. Fidan, H. Kaynar, E.K. Uzaslan, Prevalence and risk factors of allergies in Turkey (PARFAIT): results of a multicentre cross-sectional study in adults, *European Respiratory Journal* 33(4) (2009) 724-733.

- [15] I. Agache, C. Akdis, M. Jutel, J. Virchow, Untangling asthma phenotypes and endotypes, *Allergy* 67(7) (2012) 835-846.
- [16] K. BLASER, J.-C. VIRCHOW JR, Allergic and Nonallergic Asthmatics Have Distinct Patterns of T-Cell Activation and Cytokine Production in Peripheral Blood and Bronchoalveolar Lavage1• 2, *AM REV RESPIR DIS* 148 (1992) 1011-115.
- [17] M. Hirose, T. Horiguchi, Asthma phenotypes, *Journal of general and family medicine* 18(5) (2017) 189-194.
- [18] I.O. Agache, From phenotypes to endotypes to asthma treatment, *Current opinion in allergy and clinical immunology* 13(3) (2013) 249-56.
- [19] O. Tliba, R.A. Panettieri Jr, Paucigranulocytic asthma: uncoupling of airway obstruction from inflammation, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 143(4) (2019) 1287-1294.
- [20] R.H. Green, C.E. Brightling, G. Woltmann, D. Parker, A.J. Wardlaw, I.D. Pavord, Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids, *Thorax* 57(10) (2002) 875-879.
- [21] S.L. Taylor, L.E. Leong, J.M. Choo, S. Wesselinh, I.A. Yang, J.W. Upham, P.N. Reynolds, S. Hodge, A.L. James, C. Jenkins, Inflammatory phenotypes in patients with severe asthma are associated with distinct airway microbiology, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 141(1) (2018) 94-103. e15.
- [22] C. Porsbjerg, T.K. Lund, L. Pedersen, V. Backer, Inflammatory subtypes in asthma are related to airway hyperresponsiveness to mannitol and exhaled NO, *Journal of asthma* 46(6) (2009) 606-612.
- [23] J.L. Simpson, R. Scott, M.J. Boyle, P.G. Gibson, Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum, *Respirology* 11(1) (2006) 54-61.
- [24] T.F. Carr, A.A. Zeki, M. Kraft, Eosinophilic and noneosinophilic asthma, *American journal of respiratory and critical care medicine* 197(1) (2018) 22-37.
- [25] W.W. Busse, Biological treatments for severe asthma: a major advance in asthma care, *Allergology International* 68(2) (2019) 158-166.
- [26] J. Bousquet, P. Chanaz, J.Y. Lacoste, G. Barnéon, N. Ghavanian, I. Enander, P. Venge, S. Ahlstedt, J. Simony-Lafontaine, P. Godard, Eosinophilic inflammation in asthma, *New England Journal of Medicine* 323(15) (1990) 1033-1039.
- [27] M. Berry, A. Morgan, D.E. Shaw, D. Parker, R. Green, C. Brightling, P. Bradding, A.J. Wardlaw, I.D. Pavord, Pathological features and inhaled corticosteroid response of eosinophilic and non-eosinophilic asthma, *Thorax* 62(12) (2007) 1043-1049.
- [28] B. Mubarak, H. Shakoor, F. Masood, Eosinophilic Asthma, *Asthma-Biological Evidences*, IntechOpen2019.
- [29] H.H. Walford, T.A. Doherty, Diagnosis and management of eosinophilic asthma: a US perspective, *Journal of asthma and allergy* 7 (2014) 53.

- [30] S.E. Wenzel, Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches, *Nature medicine* 18(5) (2012) 716.
- [31] B.N. Lambrecht, H. Hammad, The role of dendritic and epithelial cells as master regulators of allergic airway inflammation, *The Lancet* 376(9743) (2010) 835-843.
- [32] S. Yu, H.Y. Kim, Y.-J. Chang, R.H. DeKruyff, D.T. Umetsu, Innate lymphoid cells and asthma, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 133(4) (2014) 943-950.
- [33] N. Syabbalo, Neutrophilic asthma: a complex phenotype of severe asthma, *Journal of Lung, Pulmonary & Respiratory Research* 7(1) (2020) 18-24.
- [34] J.V. Fahy, Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma: insights from clinical studies, *Proceedings of the American Thoracic Society* 6(3) (2009) 256-259.
- [35] S.E. Wenzel, L.B. Schwartz, E.L. Langmack, J.L. Halliday, J.B. Trudeau, R.L. Gibbs, H.W. Chu, Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics, *American journal of respiratory and critical care medicine* 160(3) (1999) 1001-1008.
- [36] G.D. Brown, Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes, *Annual review of immunology* 29 (2011) 1-21.
- [37] S.F. Seys, R. Lokwani, J.L. Simpson, D.M. Bullens, New insights in neutrophilic asthma, *Current opinion in pulmonary medicine* 25(1) (2019) 113-120.
- [38] P. Schwarzenberger, V. La Russa, A. Miller, P. Ye, W. Huang, A. Zieske, S. Nelson, G.J. Bagby, D. Stoltz, R.L. Mynatt, IL-17 stimulates granulopoiesis in mice: use of an alternate, novel gene therapy-derived method for in vivo evaluation of cytokines, *The Journal of Immunology* 161(11) (1998) 6383-6389.
- [39] P.W. Hellings, A. Kasran, Z. Liu, P. Vandekerckhove, A. Wuyts, L. Overbergh, C. Mathieu, J.L. Ceuppens, Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma, *American journal of respiratory cell and molecular biology* 28(1) (2003) 42-50.
- [40] J. Chesné, F. Braza, G. Mahay, S. Brouard, M. Aronica, A. Magnan, IL-17 in severe asthma. Where do we stand?, *American journal of respiratory and critical care medicine* 190(10) (2014) 1094-1101.
- [41] I. Esteban-Gorgojo, D. Antolín-Amérigo, J. Domínguez-Ortega, S. Quirce, Non-eosinophilic asthma: current perspectives, *Journal of asthma and allergy* 11 (2018) 267.
- [42] M. Bijanzadeh, P.A. Mahesh, N.B. Ramachandra, An understanding of the genetic basis of asthma, *The Indian journal of medical research* 134(2) (2011) 149.
- [43] W. Burke, M. Fesinmeyer, K. Reed, L. Hampson, C. Carlsten, Family history as a predictor of asthma risk, *American journal of preventive medicine* 24(2) (2003) 160-169.
- [44] J.W. Mims, *Asthma: definitions and pathophysiology*, *International forum of allergy & rhinology*, Wiley Online Library, 2015, pp. S2-S6.

- [45] S.F. Thomsen, Genetics of asthma: an introduction for the clinician, *European clinical respiratory journal* 2(1) (2015) 246-43.
- [46] D.G. Wiesch, D.A. Meyers, E.R. Bleecker, Genetics of asthma, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 104(5) (1999) 895-901.
- [47] G. Willemsen, T.C. Van Beijsterveldt, C.G. Van Baal, D. Postma, D.I. Boomsma, Heritability of self-reported asthma and allergy: a study in adult Dutch twins, siblings and parents, *Twin Research and Human Genetics* 11(2) (2008) 132-142.
- [48] D. Meyers, D. Postma, C. Panhuysen, J. Xu, P. Amelung, R. Levitt, E. Bleecker, Evidence for a locus regulating total serum IgE levels mapping to chromosome 5, *Genomics* 23(2) (1994) 464-470.
- [49] L.J. Palmer, W.O. Cookson, A.L. James, A.W. Musk, P.R. Burton, Gibbs sampling-based segregation analysis of asthma-associated quantitative traits in a population-based sample of nuclear families, *Genetic Epidemiology: The Official Publication of the International Genetic Epidemiology Society* 20(3) (2001) 356-372.
- [50] J. Xu, R. Levitt, C. Panhuysen, D. Postma, E. Taylor, P. Amelung, K. Holroyd, E. Bleecker, D. Meyers, Evidence for two unlinked loci regulating total serum IgE levels, *American journal of human genetics* 57(2) (1995) 425.
- [51] C. Ober, S. Hoffjan, Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery, *Genes & Immunity* 7(2) (2006) 95-100.
- [52] M.F. Moffatt, M. Kabesch, L. Liang, A.L. Dixon, D. Strachan, S. Heath, M. Depner, A. von Berg, A. Bufe, E. Rietschel, Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma, *Nature* 448(7152) (2007) 470-473.
- [53] D. Vercelli, Discovering susceptibility genes for asthma and allergy, *Nature reviews immunology* 8(3) (2008) 169-182.
- [54] P.D.Ç. KARAASLAN, Astımda Genetik Faktörler ve Gen-Çevre Etkileşimi, *Klinik Tıp Pediatri Dergisi* 9(2) 48-62.
- [55] J. Galanter, S. Choudhry, C. Eng, S. Nazario, J.R. Rodríguez-Santana, J. Casal, A. Torres-Palacios, J. Salas, R. Chapela, H.G. Watson, ORMDL3 gene is associated with asthma in three ethnically diverse populations, *American journal of respiratory and critical care medicine* 177(11) (2008) 1194-1200.
- [56] R. Tavendale, D.F. Macgregor, S. Mukhopadhyay, C.N. Palmer, A polymorphism controlling ORMDL3 expression is associated with asthma that is poorly controlled by current medications, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 121(4) (2008) 860-863.
- [57] http://www.bio.miami.edu/dana/160/160S19_18.html. (12 Ocak 2021)
- [58] E. Bouzigon, E. Corda, H. Aschard, M.-H. Dizier, A. Boland, J. Bousquet, N. Chateigner, F. Gormand, J. Just, N. Le Moual, Effect of 17q21 variants and smoking exposure in early-onset asthma, *New England journal of medicine* 359(19) (2008) 1985-1994.

- [59] S.-M. Ho, Environmental epigenetics of asthma: an update, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 126(3) (2010) 453-465.
- [60] M.N. Blumenthal, Genetic, epigenetic, and environmental factors in asthma and allergy, *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 108(2) (2012) 69-73.
- [61] R.L. Jirtle, M.K. Skinner, Environmental epigenomics and disease susceptibility, *Nature reviews genetics* 8(4) (2007) 253-262.
- [62] R. Jaenisch, A. Bird, Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals, *Nature genetics* 33(3) (2003) 245-254.
- [63] A. DeVries, D. Vercelli, Epigenetic mechanisms in asthma, *Annals of the American Thoracic Society* 13(Supplement 1) (2016) S48-S50.
- [64] E. Von Mutius, Gene-environment interactions in asthma, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 123(1) (2009) 3-11.
- [65] R. Agarwal, D. Gupta, Severe asthma and fungi: current evidence, *Medical mycology* 49(Supplement_1) (2011) S150-S157.
- [66] J. Miles, R. Cayton, J. Ayres, Atopic status in patients with brittle and non-brittle asthma: a case-control study, *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 25(11) (1995) 1074.
- [67] S.J. Langley, S. Goldthorpe, M. Craven, J. Morris, A. Woodcock, A. Custovic, Exposure and sensitization to indoor allergens: association with lung function, bronchial reactivity, and exhaled nitric oxide measures in asthma, *Journal of allergy and clinical immunology* 112(2) (2003) 362-368.
- [68] A. Woodcock, L. Forster, E. Matthews, J. Martin, L. Letley, M. Vickers, J. Britton, D. Strachan, P. Howarth, D. Altmann, Control of exposure to mite allergen and allergen-impermeable bed covers for adults with asthma, *New England Journal of Medicine* 349(3) (2003) 225-236.
- [69] D. Denning, B. O'driscoll, C. Hogaboam, P. Bowyer, R. Niven, The link between fungi and severe asthma: a summary of the evidence, *European Respiratory Journal* 27(3) (2006) 615-626.
- [70] E.-M. Rick, K. Woolnough, C.H. Pashley, A.J. Wardlaw, Allergic fungal airway disease, *J Investig Allergol Clin Immunol* 26(6) (2016) 344-354.
- [71] T.Y. James, F. Kauff, C.L. Schoch, P.B. Matheny, V. Hofstetter, C.J. Cox, G. Celio, C. Gueidan, E. Fraker, J. Miadlikowska, Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny, *Nature* 443(7113) (2006) 818-822.
- [72] J. Miadlikowska, F. Kauff, F. Högnabba, J.C. Oliver, K. Molnár, E. Fraker, E. Gaya, J. Hafellner, V. Hofstetter, C. Gueidan, A multigene phylogenetic synthesis for the class Lecanoromycetes (Ascomycota): 1307 fungi representing 1139 infrageneric taxa, 317 genera and 66 families, *Molecular phylogenetics and evolution* 79 (2014) 132-168.
- [73] A. Luong, B.F. Marple, Update on allergic fungal rhinosinusitis, *Current Fungal Infection Reports* 1(1) (2007) 12-18.

- [74] R. Cramer, S. Zeller, A.G. Glaser, M. Vilhelmsson, C. Rhyner, Cross-reactivity among fungal allergens: a clinically relevant phenomenon?, *Mycoses* 52(2) (2009) 99-106.
- [75] W. Horner, A. Helbling, J. Salvaggio, S. Lehrer, Fungal allergens, *Clinical microbiology reviews* 8(2) (1995) 161-179.
- [76] A.P. Knutsen, R.K. Bush, J.G. Demain, D.W. Denning, A. Dixit, A. Fairs, P.A. Greenberger, B. Kariuki, H. Kita, V.P. Kurup, Fungi and allergic lower respiratory tract diseases, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 129(2) (2012) 280-291.
- [77] D.S. Hibbett, M. Binder, J.F. Bischoff, M. Blackwell, P.F. Cannon, O.E. Eriksson, S. Huhndorf, T. James, P.M. Kirk, R. Lücking, A higher-level phylogenetic classification of the Fungi, *Mycological research* 111(5) (2007) 509-547.
- [78] D.J. McLaughlin, D.S. Hibbett, F. Lutzoni, J.W. Spatafora, R. Vilgalys, The search for the fungal tree of life, *Trends in microbiology* 17(11) (2009) 488-497.
- [79] J. Taylor, D. Jacobson, M. Fisher, The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation and classification, *Annual review of phytopathology* 37(1) (1999) 197-246.
- [80] Overview of the Fungal Life Cycle, NOVEMBER 7, 2016.
<https://www.fungusfactfriday.com/009-overview-of-the-fungal-life-cycle/>. (17 Ocak 2021)
- [81] X. Sem, G.T. Le, A.S. Tan, G. Tso, M. Yurieva, W.W. Liao, J. Lum, K.G. Srinivasan, M. Poidinger, F. Zolezzi, β -glucan exposure on the fungal cell wall tightly correlates with competitive fitness of *Candida* species in the mouse gastrointestinal tract, *Frontiers in cellular and infection microbiology* 6 (2016) 186.
- [82] N.A. Gow, J.-P. Latge, C.A. Munro, The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function, *The fungal kingdom* (2017) 267-292.
- [83] X. Kang, A. Kirui, A. Muszynski, M. Widanage, A. Chen, P. Azadi, P. Wang, F. Mentink-Vigier, T. Wang, Molecular architecture of fungal cell walls revealed by solid-state NMR. *Nat Commun* 9: 2747, 2018.
- [84] I. Geoghegan, G. Steinberg, S. Gurr, The role of the fungal cell wall in the infection of plants, *Trends in microbiology* 25(12) (2017) 957-967.
- [85] M.S. Buckeridge, C. Rayon, B. Urbanowicz, M.A.S. Tiné, N.C. Carpita, Mixed linkage (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)- β -D-glucans of grasses, *Cereal Chemistry* 81(1) (2004) 115-127.
- [86] S. Rahar, G. Swami, N. Nagpal, M.A. Nagpal, G.S. Singh, Preparation, characterization, and biological properties of β -glucans, *Journal of advanced pharmaceutical technology & research* 2(2) (2011) 94.
- [87] A. Mueller, J. Raptis, P.J. Rice, J.H. Kalbfleisch, R.D. Stout, H.E. Ensley, W. Browder, D.L. Williams, The influence of glucan polymer structure and solution conformation on binding to (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan receptors in a human monocyte-like cell line, *Glycobiology* 10(4) (2000) 339-346.
- [88] P.H. Fesel, A. Zuccaro, β -glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants, *Fungal Genetics and Biology* 90 (2016) 53-60.

- [89] G. Ross, J. Cain, P. Lachmann, Membrane complement receptor type three (CR3) has lectin-like properties analogous to bovine conglutinin as functions as a receptor for zymosan and rabbit erythrocytes as well as a receptor for iC3b, *The Journal of Immunology* 134(5) (1985) 3307-3315.
- [90] E. Cabib, B. Bowers, A. Sburlati, S. Silverman, Fungal cell wall synthesis: the construction of a biological structure, *Microbiological sciences* 5(12) (1988) 370.
- [91] K.A. Borkovich, L.A. Alex, O. Yarden, M. Freitag, G.E. Turner, N.D. Read, S. Seiler, D. Bell-Pedersen, J. Paietta, N. Plesofsky, Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism, *Microbiology and molecular biology reviews* 68(1) (2004) 1-108.
- [92] T. Fontaine, C. Simenel, G. Dubreucq, O. Adam, M. Delepierre, J. Lemoine, C.E. Vorgias, M. Diaquin, J.-P. Latgé, Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall, *Journal of Biological Chemistry* 275(36) (2000) 27594-27607.
- [93] C. Henry, T. Fontaine, C. Heddergott, P. Robinet, V. Aimanianda, R. Beau, A. Beauvais, I. Mouyna, M.C. Prevost, A. Fekkar, Biosynthesis of cell wall mannan in the conidium and the mycelium of *Aspergillus fumigatus*, *Cellular microbiology* 18(12) (2016) 1881-1891.
- [94] W. Morelle, M. Bernard, J.-P. Debeaupuis, M. Buitrago, M. Tabouret, J.-P. Latgé, Galactomannoproteins of *Aspergillus fumigatus*, *Eukaryotic Cell* 4(7) (2005) 1308-1316.
- [95] C.I. Abuajah, *Functional Components and Medicinal Properties of Food*, (2017).
- [96] K. Langfelder, M. Streibel, B. Jahn, G. Haase, A.A. Brakhage, Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi, *Fungal genetics and biology* 38(2) (2003) 143-158.
- [97] D.M. Geiser, M. Klich, J.C. Frisvad, S. Peterson, J. Varga, R.A. Samson, The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*, *Studies in mycology* 59 (2007) 1-10.
- [98] E. Levetin, W.E. Horner, J.A. Scott, C. Barnes, S. Baxi, G.L. Chew, C. Grimes, K. Kennedy, D. Larenas-Linnemann, J.D. Miller, Taxonomy of allergenic fungi, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* 4(3) (2016) 375-385. e1.
- [99] R.A. Cramer, A. Rivera, T.M. Hohl, Immune responses against *Aspergillus fumigatus*: what have we learned?, *Current opinion in infectious diseases* 24(4) (2011) 315.
- [100] A. Gastebois, C. Clavaud, V. Aimanianda, J.-P. Latgé, *Aspergillus fumigatus*: cell wall polysaccharides, their biosynthesis and organization, *Future microbiology* 4(5) (2009) 583-595.
- [101] S.M. Bowman, S.J. Free, The structure and synthesis of the fungal cell wall, *Bioessays* 28(8) (2006) 799-808.
- [102] S. Chowdary, L. Prasanna, V. Sangram, S. Rani, V. Kumar, Role of Fungi (molds) in allergic airway disease-An Analysis in a South Indian Otolaryngology center, *Indian J Allergy Asthma Immunol* 25(2) (2011) 67-78.

- [103] K. Woolnough, A. Fairs, C.H. Pashley, A.J. Wardlaw, Allergic fungal airway disease: pathophysiologic and diagnostic considerations, *Current opinion in pulmonary medicine* 21(1) (2015) 39-47.
- [104] R. Amitani, R. Kawanami, Interaction of *Aspergillus* with human respiratory mucosa: a study with organ culture model, *Medical Mycology* 47(Supplement_1) (2009) S127-S131.
- [105] M. Moghtaderi, S. Farjadian, S.H. Teshnizi, M. Hadibarhaghtalab, Allergic bronchopulmonary aspergillosis and severe asthma with fungal sensitization in patients with uncontrolled asthma: An experience from Southwestern Iran, *Medical journal of the Islamic Republic of Iran* 33 (2019) 95.
- [106] R. Agarwal, Severe asthma with fungal sensitization, *Current allergy and asthma reports* 11(5) (2011) 403.
- [107] S. Hadebe, F. Brombacher, G.D. Brown, C-type lectin receptors in asthma, *Frontiers in Immunology* 9 (2018) 733.
- [108] L. Chishimba, R. Niven, D. Denning, C. Moore, G. Holtappels, C. Bachert, Severe Asthma With Fungal Sensitisation (safs) And Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis (abpa) Are Phenotypically Different, A93. IMMUNOLOGIC AND GENETIC BIOMARKERS OF INFLAMMATORY LUNG DISEASE, *American Thoracic Society* 2014, pp. A2177-A2177.
- [109] B.N. Lambrecht, H. Hammad, The airway epithelium in asthma, *Nature medicine* 18(5) (2012) 684.
- [110] R.P. Schleimer, A. Kato, R. Kern, D. Kuperman, P.C. Avila, Epithelium: at the interface of innate and adaptive immune responses, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120(6) (2007) 1279-1284.
- [111] M. Jaeger, M.H. Stappers, L.A. Joosten, I.C. Gyssens, M.G. Netea, Genetic variation in pattern recognition receptors: functional consequences and susceptibility to infectious disease, *Future microbiology* 10(6) (2015) 989-1008.
- [112] T. Kawai, S. Akira, The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors, *Nature immunology* 11(5) (2010) 373.
- [113] O. Takeuchi, S. Akira, Pattern recognition receptors and inflammation, *Cell* 140(6) (2010) 805-820.
- [114] D. Hwang, Dietary modulation of inflammation, *Encyclopedia of Human Nutrition* (2013).
- [115] R. Zaru, Pattern recognition receptors ligands, *BiteSized Immunology (Receptors and Molecules)*.
- [116] B. Wang, Y. Tian, Q. Yin, AIM2 inflammasome assembly and signaling, *Structural immunology* (2019) 143-155.
- [117] N. Inohara, M. Chamaillard, C. McDonald, G. Nunez, NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease, *Annu. Rev. Biochem.* 74 (2005) 355-383.

- [118] L. Franchi, N. Warner, K. Viani, G. Nuñez, Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense, *Immunological reviews* 227(1) (2009) 106-128.
- [119] P.I. Hanson, S.W. Whiteheart, AAA+ proteins: have engine, will work, *Nature reviews Molecular cell biology* 6(7) (2005) 519-529.
- [120] M. Yoneyama, T. Fujita, Structural mechanism of RNA recognition by the RIG-I-like receptors, *Immunity* 29(2) (2008) 178-181.
- [121] M. Yoneyama, M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, S. Akira, T. Fujita, The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses, *Nature immunology* 5(7) (2004) 730-737.
- [122] V. Caneparo, S. Landolfo, M. Gariglio, M. De Andrea, The absent in melanoma 2-like receptor IFN-inducible protein 16 as an inflammasome regulator in systemic lupus erythematosus: the dark side of sensing microbes, *Frontiers in immunology* 9 (2018) 1180.
- [123] K. Schroder, J. Tschopp, The inflammasomes, *cell* 140(6) (2010) 821-832.
- [124] T. Kawasaki, T. Kawai, Toll-like receptor signaling pathways, *Frontiers in immunology* 5 (2014) 461.
- [125] A. Plato, J.A. Willment, G.D. Brown, C-type lectin-like receptors of the dectin-1 cluster: ligands and signaling pathways, *International reviews of immunology* 32(2) (2013) 134-156.
- [126] H. Kumar, T. Kawai, S. Akira, Toll-like receptors and innate immunity, *Biochemical and biophysical research communications* 388(4) (2009) 621-625.
- [127] C-type Lectin Receptors - CLRs, 2012. <https://www.invivogen.com/review-clr>. 2012). (17 Ocak 2021)
- [128] K. Hirose, T. Ito, H. Nakajima, Roles of dectin-1 in allergic airway inflammation, *Critical Reviews™ in Immunology* 37(1) (2017).
- [129] L. Sun, Y. Zhao, The biological role of dectin-1 in immune response, *International reviews of immunology* 26(5-6) (2007) 349-364.
- [130] G.D. Brown, S. Gordon, A new receptor for β -glucans, *Nature* 413(6851) (2001) 36-37.
- [131] S.E. Heinsbroek, P.R. Taylor, M. Rosas, J.A. Willment, D.L. Williams, S. Gordon, G.D. Brown, Expression of functionally different dectin-1 isoforms by murine macrophages, *The Journal of Immunology* 176(9) (2006) 5513-5518.
- [132] B.N. Gantner, R.M. Simmons, D.M. Underhill, Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments, *The EMBO journal* 24(6) (2005) 1277-1286.
- [133] Y. Chan, I. Miguel-Aliaga, C. Franks, Y. Chan, I. Miguel-Aliaga, C. Franks, G. Alexander, K. Erwin, N. Byers, J. Deitch, *Proc Natl Acad Sci, Amyotrophic Lateral Sclerosis* 6(sup1) (2005) 91-103.
- [134] L.M. Lilly, M.A. Gessner, C.W. Dunaway, A.E. Metz, L. Schwiebert, C.T. Weaver, G.D. Brown, C. Steele, The β -glucan receptor dectin-1 promotes lung immunopathology during fungal allergy via IL-22, *The Journal of Immunology* 189(7) (2012) 3653-3660.

- [135] J.L. Werner, A.E. Metz, D. Horn, T.R. Schoeb, M.M. Hewitt, L.M. Schwiebert, I. Faro-Trindade, G.D. Brown, C. Steele, Requisite role for the dectin-1 β -glucan receptor in pulmonary defense against *Aspergillus fumigatus*, *The Journal of Immunology* 182(8) (2009) 4938-4946.
- [136] J.L. Werner, M.A. Gessner, L.M. Lilly, M.P. Nelson, A.E. Metz, D. Horn, C.W. Dunaway, J. Deshane, D.D. Chaplin, C.T. Weaver, Neutrophils produce interleukin 17A (IL-17A) in a dectin-1- and IL-23-dependent manner during invasive fungal infection, *Infection and immunity* 79(10) (2011) 3966-3977.
- [137] M.A. Gessner, J.L. Werner, L.M. Lilly, M.P. Nelson, A.E. Metz, C.W. Dunaway, Y.R. Chan, W. Ouyang, G.D. Brown, C.T. Weaver, Dectin-1-dependent interleukin-22 contributes to early innate lung defense against *Aspergillus fumigatus*, *Infection and immunity* 80(1) (2012) 410-417.
- [138] R.A. Mintz-Cole, A.M. Gibson, S.A. Bass, A.L. Budelsky, T. Reponen, G.K.K. Hershey, Dectin-1 and IL-17A suppress murine asthma induced by *Aspergillus versicolor* but not *Cladosporium cladosporioides* due to differences in β -glucan surface exposure, *The Journal of Immunology* 189(7) (2012) 3609-3617.
- [139] Z. Zhang, J.M.B. Myers, E.B. Brandt, P.H. Ryan, M. Lindsey, R.A. Mintz-Cole, T. Reponen, S.J. Vesper, F. Forde, B. Ruff, β -Glucan exacerbates allergic asthma independent of fungal sensitization and promotes steroid-resistant TH2/TH17 responses, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 139(1) (2017) 54-65. e8.
- [140] T. Ito, K. Hirose, A. Norimoto, T. Tamachi, M. Yokota, A. Saku, H. Takatori, S. Saijo, Y. Iwakura, H. Nakajima, Dectin-1 plays an important role in house dust mite-induced allergic airway inflammation through the activation of CD11b+ dendritic cells, *The Journal of Immunology* 198(1) (2017) 61-70.
- [141] C. Irvin, I. Zafar, J. Good, D. Rollins, C. Christianson, M.M. Gorska, R.J. Martin, R. Alam, Increased frequency of dual-positive TH2/TH17 cells in bronchoalveolar lavage fluid characterizes a population of patients with severe asthma, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 134(5) (2014) 1175-1186. e7.
- [142] F. Sadeghi, F. Peymaeei, M. Falahati, E. Safari, S. Farahyar, S.R. Mohammadi, M. Roudbary, The effect of *Candida* cell wall beta-glucan on treatment-resistant LL/2 cancer cell line: in vitro evaluation, *Molecular biology reports* 47(5) (2020) 3653-3661.
- [143] Y.T. Yaman, O. Akbal, S. Abaci, Development of clay-protein based composite nanoparticles modified single-used sensor platform for electrochemical cytosensing application, *Biosensors and Bioelectronics* 132 (2019) 230-237.
- [144] K. Sreenivasulu, M. Vijayalakshmi, K.R. Sambasivarao, Regulation studies of telomerase gene in cancer cells by lentinan, *Avicenna journal of medical biotechnology* 2(4) (2010) 181.
- [145] L.W. Wood, N.I. Cox, C.A. Phelps, S.-C. Lai, A. Poddar, C. Talbot, D. Mu, Thyroid transcription factor 1 reprograms Angiogenic activities of Secretome, *Scientific reports* 6(1) (2016) 1-14.

- [146] N. Vallabani, S. Mittal, R.K. Shukla, A.K. Pandey, S.R. Dhakate, R. Pasricha, A. Dhawan, Toxicity of graphene in normal human lung cells (BEAS-2B), *Journal of biomedical nanotechnology* 7(1) (2011) 106-107.
- [147] A.D. Sobkowicz, M.E. Gallagher, C.J. Reid, D. Crean, S.D. Carrington, J.A. Irwin, Modulation of expression in BEAS-2B airway epithelial cells of α -L-fucosidase A1 and A2 by Th1 and Th2 cytokines, and overexpression of α -L-fucosidase 2, *Molecular and cellular biochemistry* 390(1) (2014) 101-113.
- [148] C. Garcia-Canton, E. Minet, A. Anadon, C. Meredith, Metabolic characterization of cell systems used in in vitro toxicology testing: lung cell system BEAS-2B as a working example, *Toxicology in Vitro* 27(6) (2013) 1719-1727.
- [149] G. Vales, L. Rubio, R. Marcos, Long-term exposures to low doses of titanium dioxide nanoparticles induce cell transformation, but not genotoxic damage in BEAS-2B cells, *Nanotoxicology* 9(5) (2015) 568-578.
- [150] Y.-h. Park, D. Kim, J. Dai, Z. Zhang, Human bronchial epithelial BEAS-2B cells, an appropriate in vitro model to study heavy metals induced carcinogenesis, *Toxicology and applied pharmacology* 287(3) (2015) 240-245.
- [151] X. Song, M.A. Hubbe, Cationization of oat β -D glucan as a drystrength additive for paper, *TAPPI J* 13(7) (2014) 57-64.
- [152] E. Baeva, R. Bleha, E. Lavrova, L. Sushytskyi, J. Čopíková, I. Jablonsky, P. Klouček, A. Synytsya, Polysaccharides from basidiocarps of cultivating mushroom *Pleurotus ostreatus*: isolation and structural characterization, *Molecules* 24(15) (2019) 2740.
- [153] S. El-Sonbaty, A. Ismail, A. Nabeel, Irradiated [Beta]-glucan enhances immune response to bacterial infection through CD4 and CD8 T-lymphocytes, *International Journal of Radiation Research* 11(1) (2013) 35.
- [154] M. Halwani, Z. Hossain, M.A. Khyami, A. Omri, Liposomal β -glucan: preparation, characterization and anticancer activities, *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology* 6(5) (2015) 7.
- [155] P. Kumar, A. Nagarajan, P.D. Uchil, Analysis of cell viability by the MTT assay, *Cold Spring Harbor Protocols* 2018(6) (2018) pdb. prot095505.
- [156] P.R. Taylor, G.D. Brown, D.M. Reid, J.A. Willment, L. Martinez-Pomares, S. Gordon, S.Y. Wong, The β -glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages, *The Journal of immunology* 169(7) (2002) 3876-3882.
- [157] H.-M. Lee, J.-M. Yuk, D.-M. Shin, E.-K. Jo, Dectin-1 is inducible and plays an essential role for mycobacteria-induced innate immune responses in airway epithelial cells, *Journal of clinical immunology* 29(6) (2009) 795-805.

- [158] A.T. Nathan, E.A. Peterson, J. Chakir, M. Wills-Karp, Innate immune responses of airway epithelium to house dust mite are mediated through β -glucan-dependent pathways, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 123(3) (2009) 612-618.
- [159] Y. Zhao, X. Chu, J. Chen, Y. Wang, S. Gao, Y. Jiang, X. Zhu, G. Tan, W. Zhao, H. Yi, Dectin-1-activated dendritic cells trigger potent antitumour immunity through the induction of Th9 cells, *Nature communications* 7(1) (2016) 1-12.
- [160] J.A. Willment, H.-H. Lin, D.M. Reid, P.R. Taylor, D.L. Williams, S.Y. Wong, S. Gordon, G.D. Brown, Dectin-1 expression and function are enhanced on alternatively activated and GM-CSF-treated macrophages and are negatively regulated by IL-10, dexamethasone, and lipopolysaccharide, *The Journal of Immunology* 171(9) (2003) 4569-4573.
- [161] Y. Chen, L. Dong, D. Weng, F. Liu, L. Song, C. Li, W. Tang, J. Chen, 1, 3- β -Glucan affects the balance of Th1/Th2 cytokines by promoting secretion of anti-inflammatory cytokines in vitro, *Molecular medicine reports* 8(2) (2013) 708-712.
- [162] E. Øya, R. Becher, L. Ekeren, A.K. Afanou, J. Øvrevik, J.A. Holme, Pro-inflammatory responses in human bronchial epithelial cells induced by spores and hyphal fragments of common damp indoor molds, *International journal of environmental research and public health* 16(6) (2019) 1085.
- [163] L. Romani, A. Mencacci, E. Cenci, R. Spaccapelo, C. Toniatti, P. Puccetti, F. Bistoni, V. Poli, Impaired neutrophil response and CD4⁺ T helper cell 1 development in interleukin 6-deficient mice infected with *Candida albicans*, *The Journal of experimental medicine* 183(4) (1996) 1345-1355.
- [164] F. Meyer-Wentrup, C.G. Figdor, M. Ansems, P. Brossart, M.D. Wright, G.J. Adema, A.B. van Spruiel, Dectin-1 interaction with tetraspanin CD37 inhibits IL-6 production, *The Journal of Immunology* 178(1) (2007) 154-162.
- [165] K.A. Roebuck, Regulation of interleukin-8 gene expression, *Journal of interferon & cytokine research* 19(5) (1999) 429-438.
- [166] N. Bishara, The use of biomarkers for detection of early-and late-onset neonatal sepsis, *Hematology, Immunology and Infectious Disease: Neonatology Questions and Controversies: Expert Consult-Online and Print* 303 (2012).
- [167] S. Fotopoulos, A. Mouchtouri, G. Xanthou, N. Lipsou, E. Petrakou, M. Xanthou, Inflammatory chemokine expression in the peripheral blood of neonates with perinatal asphyxia and perinatal or nosocomial infections, *Acta Pædiatrica* 94(6) (2005) 800-806.
- [168] A. Valizadeh, A. Khosravi, L.J. Zadeh, E.G. Parizad, Role of IL-25 in Immunity, *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR* 9(4) (2015) OE01.
- [169] P. Licona-Limón, L.K. Kim, N.W. Palm, R.A. Flavell, T H 2, allergy and group 2 innate lymphoid cells, *Nature immunology* 14(6) (2013) 536.

- [170] A. Khosravi, H. Shokri, S.H. Al-Heidary, F. Ghafarifar, Evaluation of murine lung epithelial cells (TC-1 JHU-1) line to develop Th2-promoting cytokines IL-25/IL-33/TSLP and genes Tlr2/Tlr4 in response to *Aspergillus fumigatus*, *Journal de mycologie medicale* 28(2) (2018) 349-354.
- [171] M. Kurowska-Stolarska, P. Kewin, G. Murphy, R.C. Russo, B. Stolarski, C.C. Garcia, M. Komai-Koma, N. Pitman, Y. Li, A.N. McKenzie, IL-33 induces antigen-specific IL-5+ T cells and promotes allergic-induced airway inflammation independent of IL-4, *The Journal of Immunology* 181(7) (2008) 4780-4790.
- [172] L. Yi, D. Cheng, K. Zhang, X. Huo, Y. Mo, H. Shi, H. Di, Y. Zou, H. Zhang, J. Zhao, Intelectin contributes to allergen-induced IL-25, IL-33, and TSLP expression and type 2 response in asthma and atopic dermatitis, *Mucosal immunology* 10(6) (2017) 1491-1503.
- [173] L.K. Dubey, J.B. Moeller, A. Schlosser, G.L. Sorensen, U. Holmskov, Induction of innate immunity by *Aspergillus fumigatus* cell wall polysaccharides is enhanced by the composite presentation of chitin and beta-glucan, *Immunobiology* 219(3) (2014) 179-188.
- [174] X. Li, H. Luo, Y. Ye, X. Chen, Y. Zou, J. Duan, D. Xiang, betaglucan, a dectin1 ligand, promotes macrophage M1 polarization via NFkappaB/autophagy pathway, *Int. J. Oncol.* 54(1) (2019) 271-282.
- [175] C.C. Zhu, G.Q. Zhao, J. Lin, L.T. Hu, Q. Xu, X.D. Peng, X. Wang, S. Qiu, Dectin-1 agonist curdlan modulates innate immunity to *Aspergillus fumigatus* in human corneal epithelial cells, *Int J Ophthalmol* 8(4) (2015) 690-6.
- [176] S.M. Leal Jr, S. Cowden, Y.-C. Hsia, M.A. Ghannoum, M. Momany, E. Pearlman, Distinct roles for Dectin-1 and TLR4 in the pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* keratitis, *PLoS Pathog* 6(7) (2010) e1000976.
- [177] E. Maekawa, Isolation and fractionation of water-soluble polysaccharides from bamboo shoot, *Agricultural and Biological Chemistry* 39(12) (1975) 2281-2289.
- [178] A. Beauvais, R. Drake, K. Ng, M. Diaquin, J. Latgé, Characterization of the 1, 3- β -glucan synthase of *Aspergillus fumigatus*, *Microbiology* 139(12) (1993) 3071-3078.
- [179] M. Yoshida, R.I. Roth, C. Grunfeld, K.R. Feingold, J. Levin, Soluble (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan purified from *Candida albicans*: Biologic effects and distribution in blood and organs in rabbits, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 128(1) (1996) 103-114.

