





**DER P 6 VE CUP A 1 ALERJENLERİNE MARUZİYET  
SONUCUNDA NAZAL VE BRONŞİYAL EPİTEL HÜCRE  
CEVABI VE EOZİNOFİLLERİN BU CEVABA KATKISI**

**NASAL AND BRONCHIAL EPITHELIAL CELL  
RESPONSES TO DER P 6 AND CUP A 1 ALLERGENS  
AND THE CONTRIBUTION OF EOSINOPHILS TO THIS  
PARTICULAR RESPONSE**

**EMİNE BEYZA DOĞAN**

**PROF. DR. İBRAHİM ÇAĞATAY KARAASLAN**  
**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü  
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2023



Canım aileme ve hayat arkadaşım Berker'e,



## ÖZET

### DER P 6 VE CUP A 1 ALERJENLERINE MARUZİYET SONUCUNDA NAZAL VE BRONŞİYAL EPİTEL HÜCRE CEVABI VE EOZİNOFİLLERİN BU CEVABA KATKISI

**Emine Beyza DOĞAN**

**Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. İbrahim Çağatay KARAASLAN**

**Haziran 2023, 143 sayfa**

Günümüzde alerjik hastalıkların prevalansı giderek artmakta ve yirmibirinci yüzyılın salgını olarak değerlendirilmektedir. Özellikle dünya çapında 300 milyon insanı etkileyen astım ve 400 milyon insanda görülen alerjik rinit bu hastalıkların başında gelmektedir. Astım hastası olan bireylerin bir çoğunda alerjik rinit gözlemlenmekte olup bu iki hastalık birbiri ile ilişkilidir. Moleküler mekanizmalarının yanı sıra hastalığı tetikleyen çevresel etmenler de benzerlik göstermektedir. Alt ve üst solunum yollarındaki ilk savunma hattı olan epitel hücrelerinin en sık maruz kaldığı aeroalerjenler polenler ve ev tozu akarlarıdır. Dışsal aeroalerjenler sınıfına dahil olan polenler mevsimsel alerjiye sebep olmakla birlikte peyzaj amaçlı doğal habitat dışına ekilen bitkiler hastalarda alerjiyi tetikleyebilmektedir. Özellikle Türkiye’de ve Akdeniz ülkelerinde park, bahçe ve yol kenarlarına süs bitkisi olarak ekilen Arizona servisi 123 milyar polen üretebilme kapasitesine sahip olmaktadır ve major alerjeni Cup a1 olarak tanımlanmaktadır. Evsel aeroalerjenlerden olan ev tozu akarına ise sürekli maruz kalınmakta ve proteaz aktiviteye sahip alerjenleri ile epitel hücrelerde hasara sebep olmaktadır. Yapılan çalışmalarda en sık rastlanılan ev tozu akarı türünden biri *Dermatophagoides ptenoysinuss* olarak belirlenmiştir. Der p1 ve Der p2 bu akarın major alerjenleri olarak bilinmesine rağmen bazı çalışmalar ile serin proteaz aktiviteye sahip Der p6 alerjeninin de major olabileceği belirtilmektedir.

Çevresel alerjenlere maruz kalan nazal ve bronşiyal epitel hücrelerde hem hücre ölümü görülebilmekte hem de hücreler epitel karakterlerini kaybederek mezenkimal karakter kazanabilmektedir. Hem alerjik astım hem de alerjik rinit hastalıklarının patofizyolojilerinde önemli rol oynayan eozinofiller ise inflamasyon bölgesine göç edip aktifleştiklerinde hücre cevaplarını etkileyebilmektedir.

Yapılan tez çalışması kapsamında literatürde kısıtlı bilgi bulunan Cup a1 ve Der p6 alerjenleri ile nazal ve bronşiyal epitel hücreleri uyarılmış ve hücre cevapları gen ifadesi düzeyinde kaspaz bağımlı & bağımsız (apoptoz, anoikis, nekroptoz, partanatoz) hücre ölüm yolları ve epitelyal mezenkimal dönüşüm (EMT) süreci üzerinden incelenmiştir. Deneyleri ilk aşaması tek tabaka kültüründe yapılmış ve uygun konsantrasyon&saat belirlenmiştir. Daha sonrasında epitel hücreler ALI-kültür süreci ile büyütülerek aktifleştirilen eozinofiller ile ko-kültüre alınmıştır. ALI-kültür süreci sonunda oluşturulan mono ve ko-kültür grupları uygun alerjen koşulları ile uyarılmış ve hücre cevapları yeniden ölüm yolları ve EMT üzerinden araştırılmıştır. Ayrı ayrı ve birlikte alerjen uyarımları yapılarak alerjenlerin hücreler üzerindeki sinerjik etkileri tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde bronş epitel hücrelerinde nazal epitel hücrelere kıyasla alerjen uyarımları sonrasında daha fazla ölüm gözlemlendiği ve bronş epitel hücrelerin hücre cevaplarını daha geç oluşturdukları tespit edilmiştir. Der p6 alerjeninin bronş epitel hücrelerde programlanmış ölüm yollarını tetiklediği fakat yüksek doz Cup a1 alerjeninin hücrede nekroza neden olduğu saptanmıştır. Nazal epitel hücrelerinde ise iki alerjene karşı da oluşturulan hücre cevabının programlanmış ölüm yolları üzerinden olduğu gözlemlenmiştir. Tek tabaka kültür uyarımlarında farklı köklerdeki epitel hücrelerin alerjenlere farklı yanıtlar verdiği anlaşılmıştır. Mono ve ko-kültürden elde edilen gen ifade sonuçları karşılaştırıldığında ise eozinofillerin hücre cevabını etkilediği tespit edilmiştir. Cup a1 ve Der p6 alerjenleri ile elde edilen sonuçlar hem literature katkı sağlayacak hem de yapılacak diğer çalışmalar için öncü niteliği taşıyacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Alerjik Rinit, Astım, Cup a 1, Der p 6, EMT, Eozinofil, Hücre Ölümü



## **ABSTRACT**

### **NASAL AND BRONCHIAL EPITHELIAL CELL RESPONSES TO DER P 6 AND CUP A 1 ALLERGENS AND THE CONTRIBUTION OF EOSINOPHILS TO THIS PARTICULAR RESPONSE**

**Emine Beyza DOĞAN**

**Master of Science, Department of Biology**

**Supervisor: Prof. Dr. İbrahim Çağatay KARAASLAN**

**June 2023, 143 pages**

Nowadays, the prevalence of allergic diseases is increasing and it is considered as the epidemic of the twenty-first century. Especially asthma, which affects 300 million people worldwide, and allergic rhinitis, which is seen in 400 million people, are among these diseases. Allergic rhinitis is observed in most individuals with asthma, and these two diseases are related to each other. In addition to its molecular mechanisms, it shows similarity in environmental factors that trigger the disease. Pollens and house dust mites are the most common aeroallergens to which epithelial cells, the first line of defense in the lower and upper respiratory tracts, are exposed. Pollens, which are included in the class of exogenous aeroallergens, cause seasonal allergies, but plants planted outside the natural habitat for landscaping can trigger allergies in patients. Especially in Turkey and Mediterranean countries, the Arizona cypress planted as an ornamental plant in parks, gardens and roadsides has the capacity to produce 123 billion pollen and its major allergen is defined as Cup a1. House dust mite, which is one of the household aeroallergens, is constantly exposed to and causes damage to epithelial cells with its allergens with protease activity. *Dermatophagoides pteronyssinus* is one of the most common house dust mite species in studies. Although Der p1 and Der p2 are known as major allergens of this mite, it has been reported that Der p6 allergen, which has serine protease activity, may be major in some studies.

In nasal and bronchial epithelial cells exposed to environmental allergens, both cell death can be observed, and cells can lose their epithelial character and gain mesenchymal character. Eosinophils, which play an important role in the pathophysiology of both allergic asthma and allergic rhinitis, can affect cell responses when they migrate to the inflammation area and become activated.

Within the scope of the thesis study, nasal and bronchial epithelial cells were stimulated by Cup a1 and Der p6 allergens, which have limited information in the literature, and cell responses were determined by caspase-dependent & independent (apoptosis, anoikis, necroptosis, parthanatos) cell death pathways and epithelial mesenchymal transformation (EMT) at the level of gene expression. The first stage of the experiments was carried out in monolayer culture and the appropriate concentration & time was determined. Afterwards, epithelial cells were grown by the ALI-culture process and co-cultured with activated eosinophils. Mono and co-culture groups formed at the end of the ALI-culture process were stimulated with appropriate allergen conditions and cell responses were investigated again through death pathways and EMT. The synergistic effects of allergens on cells were determined by performing allergen stimulations separately and together.

When the results obtained were evaluated, it was determined that more death was observed in bronchial epithelial cells compared to nasal epithelial cells after allergen stimulation and bronchial epithelial cells formed cell responses later. It was determined that Der p6 allergen triggered programmed death pathways in bronchial epithelial cells, but high dose Cup a1 allergen caused necrosis in the cell. In nasal epithelial cells, it was observed that the cell response to both allergens was through programmed death pathways. It was understood that epithelial cells of different origins gave different responses to allergens in monolayer culture stimulation. When the gene expression results obtained from mono and co-culture were compared, it was determined that eosinophils affected the cell response. The results obtained with Cup a1 and Der p6 allergens will contribute to the literature and will be a pioneer for further studies.

**Keywords:** Allergic Rhinitis, Asthma, Cell Death, Cup a 1, Der p 6, EMT, Eosinophils

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim dönemimde bana birçok projede yer alma fırsatı sağlayarak gelişmeme öncü olan, tez sürecimde bilgi ve deneyimlerinden sıklıkla yararlandığım değerli danışmanım **Prof. Dr. İbrahim Çağatay KARAASLAN**'a,

Tez çalışmamın tamamlanmasına maddi destek sağlayan **FHD-2021-19712** numaralı proje ile **HÜ Bilimsel Araştırma Birimi**'ne ve 21234 numaralı proje ile **Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı**'na (TÜSEB), eğitim sürecinde bana maddi destek sağlayan **TÜBİTAK Bilim İnsanları Destek Programı Başkanlığı**'na (BİDEB),

Tez sürecim boyunca benden desteğini hiç esirgemeyen, söylediğim her fikri önemseyerek dinleyen ve bilim heyecanımı daha da körükleyen değerli mentorlarımdan **Araş. Gör. Dr. Hayriye AKEL BİLGİÇ**'e, bu dönemde hep yanımda olan, her sıkıştığımda yanına koştuğum, kendisini tanımaktan ve birlikte projelerde yer almaktan büyük mutluluk duyduğum ilk mentorum **Araş. Gör. Başak Ezgi SARAÇ**'a, görüş ve önerileriyle bana yardımcı olan **Araş. Gör. Dilara KARAGÜZEL**'e, birlikte bu serüvene başladığım, kader ortağım olan, yanlışları doğruları birlikte keşfettiğimiz, yeni fikirlerin heyecanlarını birlikte yaşadığımız, bütün bu süreçte ne olursun olsun yanımda ve destek olan canım arkadaşım **Berfin Doğa KOÇKAYA**'ya, kader ortaklığımıza dahil olan ve tezin birçok zorlu sürecinde bizi yalnız bırakmayan **Gökhan ARIK**'a, laboratuvarımızın en yeni üyesi olarak desteğini hiç esirgemeyen **Göksu CANİTEZ**'e,

Eğitimime ve hayatıma farklı perspektifler katarak maddi ve manevi yönden her zaman desteğini hissettiğim **Gülay KURTDARCAN**'a, **Ali Haydar KURTDARCAN**'a ve **Ekin KURTDARCAN**'a, yürüdüğüm bu yolda hep yanımda olan, desteğini benden hiç esirgemeyen ve asla düşmeme izin vermeyen hayat arkadaşım ve can yoldaşım **Berker KÖŞLÜ**'ye, güçlü bir kadın olmamı sağlayan ve verdiğim her kararda sorgusuz arkamda duran canım annem **Yeliz DOĞAN**'a, babam **Derviş DOĞAN**'a, biricik kardeşlerim **Enes DOĞAN** ve **Nur YAY**'a, bu süreçte bütün kahrımı çeken biricik dostlarım **Büşra İrem TÜRKPENÇESİ**'ne, **Özlem BOZDEMİR**'e ve **Sena SEVİNDİ**'ye

Sonsuz Teşekkürler .....

# İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xviii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Astım.....	3
2.1.1. Astım Patofizyolojisi ve Fenotipleri.....	3
2.1.2. Alerjik Astımın Moleküler Mekanizması.....	4
2.1.3. Epitel Hücrelerin Alerjik Astımdaki Rolü.....	6
2.1.4. Eozinofillerin Alerjik Astımdaki Rolü.....	9
2.2. Alerjik Rinit.....	10
2.2.1. Alerjik Rinit Patofizyolojisi ve Moleküler Mekanizması.....	10
2.2.2. Epitel Hücrelerin Alerjik Rinitteki Rolü.....	12
2.2.3. Eozinofillerin Alerjik Rinitteki Rolü.....	13
2.3. Alerjenler.....	13
2.3.1. Ev Tozu Akarları.....	15
2.3.1.1. Dermatophagoides Pteronyssinus.....	17
2.3.2. Polenler.....	19
2.4. Ölüm Yolakları.....	22
2.4.1. Kaspaz Bağımlı Ölüm Yolakları.....	22
2.4.1.1. Apoptoz.....	23
2.4.1.1.1. İçsel (Intrinsic) Apoptoz Yolağı.....	24
2.4.1.1.2. Dışsal (Extrinsic) Apoptoz Yolağı.....	25
2.4.1.2. Anoikis.....	26
2.4.1.2.1. İçsel (Intrinsic) Anoikis Yolağı.....	27
2.4.1.2.2. Dışsal (Extrinsic) Anoikis Yolağı.....	27
2.4.2. Kaspaz Bağımsız Ölüm Yolakları.....	29

2.4.2.1. Partanatoz.....	29
2.4.2.2. Nekroptoz.....	31
2.4.3. Alerjik Astım ve Alerjik Rinit Koşullarında Hücre Ölümü.....	33
2.5. Epitelyal Mezenkimal Dönüşüm (EMT).....	35
2.5.1. EMT'nin Moleküler Mekanizması.....	35
2.5.2. EMT'nin Alerjik Astım ve Rinitteki Rolü.....	37
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	39
3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler.....	39
3.2. Alerjenlerin Safılık ve Proteaz Aktivite Tayini.....	40
3.2.1. Qubit DNA ve RNA Test Kiti.....	41
3.2.2. Pierce Floresan Proteaz Test Kiti.....	41
3.3. Hücre Canlılığı ve Sitotoksosite Analizi.....	43
3.3.1. BEAS-2B ve RPMI-2650 Hücre Hatlarının Büyütülmesi.....	43
3.3.2. MTT Hücre Canlılık Testi.....	43
3.3.3. LDH Testi.....	44
3.3.4. Etidyum Bromür / Kalsein (EtBr/Kalsein) İkili Floresan Boyama.....	45
3.4. Monokültürde Artan Doz ve Sürede Alerjen ile Hücrelerin Uyarılması, Ölüm Yolakları ve EMT Yolağının İncelenmesi.....	46
3.4.1. Hücrelerin Belirlenen Doz ve Sürede Alerjenler ile Uyarılması.....	46
3.4.2. RNA İzolasyonu.....	46
3.4.3. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi.....	47
3.4.4. Gerçek Zamanlı PZR.....	47
3.4.5. Anoikis Ölçümü.....	49
3.5. Air Liquid Interface (ALI) Kültürü Yöntemiyle Akciğer Bronş Epitel Hücre Hattının (BEAS- 2B) ve Nazal Epitel Hücre Hattının (RPMI-2650) Büyütülmesi.....	49
3.5.1. Transepitelyal Elektriksel Direnç Ölçümü (TEER).....	50
3.6. Eozinofil Hücre Hattının (EoL-1) Büyütülmesi, Farklılaştırılması ve Karakterizasyonu.....	51
3.6.1. Eozinofilik Katyonik Protein (ECP) ELISA Kiti ile EoL-1 Karakterizasyonu.....	52
3.7. Epitel Hücreler ile Eozinofillerin Ko-kültüre Alınması, Alerjen Uyarımlarının Yapılması ve Hücre Cevabının İncelenmesi.....	52
3.7.1. ELISA (Enzim Bağlı İmmunosorbent Analiz) Yöntemi.....	53

3.8. İstatistiksel Analiz.....	54
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	55
4.1 Ticari Olarak Satın Alınan Der p6 ve Cup a1 Alerjenlerinin Saflık ve Proteaz Aktivite Testlerinin Yapılması.....	56
4.1.1. Qubit ile Alerjenlerin Saflık Tayininin Yapılması.....	56
4.1.2. Alerjenlerin Proteaz Aktivitelerinin Tespiti.....	57
4.2. BEAS-2B Hücre Hattında Artan Doz ve Zamanlarda Cup a1 ve Der p6 Alerjen Uyarımının Hücre Canlılığına ve Sitotoksitesine Etkisi.....	58
4.2.1. Alerjenler ile Uyarılan BEAS-2B Hücrelerinin Canlılığının MTT ile Tespiti.....	59
4.2.2. Alerjenler ile Uyarılan BEAS-2B Hücrelerinin Sitotoksiste Ölçümlerinin LDH testi ile Tespiti.....	61
4.2.3. Alerjenler ile Uyarılan BEAS-2B Hücrelerinde Canlı/Ölü Hücrelerin EtBr/Kalsein Boyaması ile Floresan Mikroskopta Görüntülenmesi.....	64
4.3. RPMI-2650 Hücre Hattında Artan Doz ve Zamanlarda Cup a1 ve Der p6 Alerjen Uyarımının Hücre Canlılığına ve Sitotoksitesine Etkisi.....	71
4.3.1. Alerjenler ile Uyarılan RPMI-2650 Hücrelerinin Canlılığının MTT ile Tespiti.....	71
4.3.2. Alerjenler ile Uyarılan RPMI-2650 Hücrelerinin Sitotoksiste Ölçümlerinin LDH testi ile Tespiti.....	73
4.3.3. Alerjenler ile Uyarılan RPMI-2650 Hücrelerinde Canlı/Ölü Hücrelerin EtBr/Kalsein Boyaması ile Floresan Mikroskopta Görüntülenmesi.....	75
4.4. BEAS-2B ve RPMI-2650 Hücre Hatlarında Artan Doz ve Zamanlarda Cup a1 ve Der p6 Alerjen Uyarımının Anoikis Yolağı Üzerine Etkisi.....	82
4.5. BEAS-2B Hücre Hattında Artan Doz ve Zamanlarda Cup a1 ve Der p6 Alerjen Uyarımının Ölüm Yolakları ve EMT Süreci Üzerine Etkisi.....	85
4.5.1. Alerjen Uyarımı Sonrasında Apoptoz Yolağının Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi.....	85
4.5.2. Alerjen Uyarımı Sonrasında Anoikis Yolağının Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi.....	88
4.5.3. Alerjen Uyarımı Sonrasında Nekroptoz Yolağının Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi.....	89

4.5.4. Alerjen Uyarımı Sonrasında Partanatoz Yolağının Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi.....	91
4.5.5. Alerjen Uyarımı Sonrasında EMT Sürecinin Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi.....	92
4.6. RPMI-2650 Hücre Hattında Artan Doz ve Zamanlarda Cup a1 ve Der p6 Alerjen Uyarımının Ölüm Yolakları ve EMT Mekanizması Üzerine Etkisi.....	94
4.6.1. Alerjen Uyarımı Sonrasında Apoptoz Yolağının Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi.....	95
4.6.2. Alerjen Uyarımı Sonrasında Anoikis Yolağının Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi.....	96
4.6.3. Alerjen Uyarımı Sonrasında Nekroptoz Yolağının Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi.....	98
4.6.4. Alerjen Uyarımı Sonrasında Partanatoz Yolağının Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi.....	99
4.6.5. Alerjen Uyarımı Sonrasında EMT Sürecinin Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi.....	100
4.7. BEAS-2B veya RPMI-2650 Hücre Hatlarının EoL-1 Hücreleriyle Ko-kültür Sistemine Alınması.....	102
4.7.1. BEAS-2B ve RPMI-2650 Hücrelerinin TEER Sonuçları.....	102
4.7.2. BA ile Aktifleştirilen EoL-1 Hücre Hattının Karakterizasyonu.....	104
4.8. BEAS-2B/EoL-1 Ko-kültür Sisteminde Belirlenen Doz ve Zamanlarda Cup a1 ve Der p6 Alerjen Uyarımının Ölüm Yolakları ve EMT Mekanizması Üzerine Etkisi...	105
4.8.1. Alerjen Uyarımı Sonrasında Apoptoz Yolağının Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi.....	105
4.8.2. Alerjen Uyarımı Sonrasında Anoikis Yolağının Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi.....	107
4.8.3. Alerjen Uyarımı Sonrasında Nekroptoz Yolağının Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi.....	108
4.8.4. Alerjen Uyarımı Sonrasında Partanatoz Yolağının Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi.....	109
4.8.5. Alerjen Uyarımı Sonrasında EMT Yolağının Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi.....	109

4.9. RPMI-2650/EoL-1 Ko-kültür Sisteminde Belirlenen Doz ve Zamanlarda Cup a1 ve Der p6 Alerjen Uyarımının Ölüm Yolakları ve EMT Mekanizması Üzerine Etkisi...	111
4.9.1. Alerjen Uyarımı Sonrasında Apoptoz Yolağının Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi.....	112
4.9.2. Alerjen Uyarımı Sonrasında Anoikis Yolağının Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi.....	113
4.9.3. Alerjen Uyarımı Sonrasında Nekroptoz Yolağının Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi.....	114
4.9.4. Alerjen Uyarımı Sonrasında Partanatoz Yolağının Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi.....	115
4.10. Alerjen Uyarımı Sonrasında Süpernatana Salınan Sitokin Seviyesinin ELISA ile İncelenmesi.....	117
4.10.1. BEAS-2B Hücre Hattının Alerjen Uyarımı Sonrası Süpernatana Salınan Sitokin Profili.....	117
4.10.2. RPMI-2650 Hücre Hattının Alerjen Uyarımı Sonrası Süpernatana Salınan Sitokin Profili.....	120
5. YORUM.....	122
6. KAYNAKLAR.....	129
EKLER.....	141
EK 1 – Tezden Türetilmiş Bildiriler.....	141
EK 2 – Tez orjinallik raporu.....	142
ÖZGEÇMİŞ.....	143



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1:	Alerjik astımın duyarlılaşma ve efektör fazlarının moleküler mekanizması.....6
Şekil 2.2:	Epitel hücreler arasındaki sıkı bağlantı proteinleri.....8
Şekil 2.3:	Epitel bariyer bütünlüğünün bozulmasına sebep olan etkenler ve sonrasında epitelden salınan moleküller.....9
Şekil 2.4:	Alerjik Rinitin moleküler ve immünolojik mekanizması.....12
Şekil 2.5:	Vücuda giriş yollarına göre sınıflandırılan alerjenler.....14
Şekil 2.6:	Ev tozu akarı türlerinin taksonomisi.....16
Şekil 2.7:	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> ve dışkısının görüntüsü.....17
Şekil 2.8:	Polenin elektron mikroskop görüntüsü ve yapısı.....20
Şekil 2.9:	Arizona Servisi ( <i>Cupressus Arizonica</i> ).....21
Şekil 2.10:	İnsandaki kaspazların domain yapıları.....23
Şekil 2.11:	İçsel apoptoz yolağının mekanizması.....25
Şekil 2.12:	Dışsal apoptoz yolağı.....26
Şekil 2.13:	Anoikis ölüm yolağının moleküler mekanizması.....28
Şekil 2.14:	Partanatoz ölüm yolağı mekanizması.....31
Şekil 2.15:	Nekroptoz ölüm yolağının moleküler mekanizması.....33
Şekil 2.16:	Alerjen maruziyeti sonrasında EMT mekanizması ve biyobelirteçler.....37
Şekil 3.1:	Pierce proteaz aktivite testinin çalışma prensibi.....42
Şekil 3.2:	MTT testi çalışma prensibi.....44
Şekil 3.3:	LDH testi çalışma mekanizması.....45
Şekil 3.4:	Hava-sıvı arayüz yöntemi ile epitel hücrelerin kültürlenmesi.....50
Şekil 3.5:	Transepitelyal elektriksel rezistans ölçüm protokolü.....51
Şekil 3.7:	Epitel-Eozinofil ko-kültür aşaması ve uyarımı.....53
Şekil 4.1.	Qubit DNA standartlarının tespit aralığının grafiği.....56
Şekil 4.2.	Qubit RNA standartlarının tespit aralığının grafiği.....57
Şekil 4.3.	Proteaz aktivite test kitinin standartlarından elde edilen standart grafik.....58
Şekil 4.4.	BEAS-2B hücrelerinin artan konsantrasyonda ve farklı zamanlarda Der p6 alerjeni ile uyarılması sonucunda elde edilen MTT sonuçları; n=3; *p<0,05.....59

Şekil 4.5.	BEAS-2B hücrelerinin artan konsantrasyonda ve farklı zamanlarda Cup a1 alerjini ile uyarılması sonucunda elde edilen MTT sonuçları; n=3; *p<0,05.....	60
Şekil 4.6.	BEAS-2B hücrelerinin artan konsantrasyonda ve farklı zamanlarda Der p6 alerjini ile uyarılması sonucunda elde edilen LDH sonuçları.....	62
Şekil 4.7.	BEAS-2B hücrelerinin artan konsantrasyonda ve farklı zamanlarda Cup a1 alerjini ile uyarılması sonucunda elde edilen LDH sonuçları.....	63
Şekil 4.8.	BEAS-2B hücrelerinin 8 saatte artan konsantrasyonda Der p6 alerjini ile uyarılması sonucunda elde edilen canlı/ölü hücre boyama görüntüleri (20X, bar 100 µm).....	65
Şekil 4.9.	BEAS-2B hücrelerinin 24 saatte artan konsantrasyonda Der p6 alerjini ile uyarılması sonucunda elde edilen canlı/ölü hücre boyama görüntüleri (20X, bar 100 µm).....	66
Şekil 4.10.	BEAS-2B hücrelerinin 72 saatte artan konsantrasyonda Der p6 alerjini ile uyarılması sonucunda elde edilen canlı/ölü hücre boyama görüntüleri (20X, bar 100 µm).....	67
Şekil 4.11.	BEAS-2B hücrelerinin 8 saatte artan konsantrasyonda Cup a1 alerjini ile uyarılması sonucunda elde edilen canlı/ölü hücre boyama görüntüleri (20X, bar 100 µm).....	68
Şekil 4.12.	BEAS-2B hücrelerinin 24 saatte artan konsantrasyonda Cup a1 alerjini ile uyarılması sonucunda elde edilen canlı/ölü hücre boyama görüntüleri (20X, bar 100 µm).....	69
Şekil 4.13.	BEAS-2B hücrelerinin 72 saatte artan konsantrasyonda Cup a1 alerjini ile uyarılması sonucunda elde edilen canlı/ölü hücre boyama görüntüleri (20X, bar 100 µm).....	70
Şekil 4.14.	RPMI-2650 hücrelerinin artan konsantrasyonlarda ve farklı zamanlarda Der p6 alerjini ile uyarılması sonucunda elde edilen MTT sonuçları; n=3; *p<0,05....	71
Şekil 4.15.	RPMI-2650 hücrelerinin artan konsantrasyonlarda ve farklı zamanlarda Cup a1 alerjini ile uyarılması sonucunda elde edilen MTT sonuçları; n=3; **p<0,005 ***p<0,0005 ****p<0,0001.....	72
Şekil 4.16.	RPMI-2650 hücrelerinin artan konsantrasyonlarda ve farklı zamanlarda Der p6 alerjini ile uyarılması sonucunda elde edilen LDH sonuçları; n=3; *p<0,01 **p<0,005.....	73

Şekil 4.17.	RPMI-2650 hücrelerinin artan konsantrasyonlarda ve farklı zamanlarda Cup a1 alerjeni ile uyarılması sonucunda elde edilen LDH sonuçları; n=3; **p<0,005, ****p<0,0001.....	74
Şekil 4.18.	RPMI-2650 hücrelerinin 8 saatte artan konsantrasyonlarda Der p6 alerjeni ile uyarılması sonucunda elde edilen canlı/ölü hücre boyama görüntüleri (20X, bar 100 µm) (yeşil:canlı; kırmızı:ölü).....	75
Şekil 4.19.	RPMI-2650 hücrelerinin 24 saatte artan konsantrasyonlarda Der p6 alerjeni ile uyarılması sonucunda elde edilen canlı/ölü hücre boyama görüntüleri (20X, bar 100 µm).....	76
Şekil 4.20.	RPMI-2650 hücrelerinin 72 saatte artan konsantrasyonlarda Der p6 alerjeni ile uyarılması sonucunda elde edilen canlı/ölü hücre boyama görüntüleri (20X, bar 100 µm).....	77
Şekil 4.21.	RPMI-2650 hücrelerinin 8 saatte artan konsantrasyonlarda Cup a1 alerjeni ile uyarılması sonucunda elde edilen canlı/ölü hücre boyama görüntüleri (20X, bar 100 µm) (yeşil:canlı; kırmızı:ölü).....	78
Şekil 4.22.	RPMI-2650 hücrelerinin 24 saatte artan konsantrasyonlarda Cup a1 alerjeni ile uyarılması sonucunda elde edilen canlı/ölü hücre boyama görüntüleri (20X, bar 100 µm) (yeşil:canlı; kırmızı:ölü).....	79
Şekil 4.23.	RPMI-2650 hücrelerinin 72 saatte artan konsantrasyonlarda Cup a1 alerjeni ile uyarılması sonucunda elde edilen canlı/ölü hücre boyama görüntüleri (20X, bar 100 µm) (yeşil:canlı; kırmızı:ölü).....	80
Şekil 4.24.	Uygun konsantrasyondaki alerjenler ile uyarılan BEAS-2B hücrelerinin 8 saat (A), 24 saat (B) ve 72 saat (C) RFU oranları ve kontrol koşullarının floresan mikroskop (D) görüntüleri (20X, bar 100 µm).....	83
Şekil 4.25.	Uygun konsantrasyondaki alerjenler ile uyarılan RPMI-2650 hücrelerinin 8 saat (A), 24 saat (B) ve 72 saat (C) RFU oranları ve kontrol koşullarının floresan mikroskop (D) görüntüleri (20X, bar 100 µm).....	84
Şekil 4.26.	<i>CAS3</i> (A), <i>CAS9</i> (B), <i>CAS8</i> (C) ve <i>BCL2</i> (D) gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR analizi; n=3; *p<0,01 **p<0,005 ***p<0,0005 ****p<0,0001..	86
Şekil 4.27.	<i>BMF</i> (A) ve <i>PTRH2</i> (B) gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR analizi; n=3; *p<0,01 **p<0,005 ***p<0,0005 ****p<0,0001.....	88
Şekil 4.28.	<i>RIPK3</i> (A) ve <i>MLKL</i> (B) gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR analizi; n=3; *p<0,01 **p<0,005 ***p<0,0005 ****p<0,0001.....	90

Şekil 4.29.	<i>AIF</i> (A) ve <i>PARP1</i> (B) gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR analizi; n=3; *p<0,01 ***p<0,0005 ****p<0,0001.....	91
Şekil 4.30.	<i>CDH1</i> (A), <i>CDH2</i> (B) ve <i>SNAI1</i> (C) gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR analizi; n=3; *p<0,01 **p<0,005 ***p<0,0005 ****p<0,0001.....	93
Şekil 4.31.	<i>CAS3</i> (A), <i>CAS8</i> (B), <i>CAS9</i> (C) ve <i>BCL2</i> (D) gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR analizi; n=3; *p<0,01 **p<0,005 ***p<0,0005 ****p<0,0001...	95
Şekil 4.32.	<i>BMF</i> (A) ve <i>PTRH2</i> (B) gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR analizi; n=3; *p<0,01 **p<0,005 ***p<0,0005 ****p<0,0001.....	97
Şekil 4.33.	<i>RIPK3</i> (A) ve <i>MLKL</i> (B) gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR analizi; n=3; ***p<0,0005 ****p<0,0001.....	98
Şekil 4.34.	<i>AIF</i> (A) ve <i>PARP1</i> (B) gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR analizi; n=3; *p<0,01 ***p<0,0005 ****p<0,0001.....	99
Şekil 4.35.	<i>CDH1</i> (A), <i>CDH2</i> (B) ve <i>SNAI1</i> (C) gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR analizi; n=3; *p<0,01 **p<0,005 ***p<0,0005 ****p<0,0001.....	101
Şekil 4.36.	ALI-kültür süreci boyunca BEAS-2B (A) ve RPMI-2650 (B) hücrelerinin TEER değerleri; n=3; *p<0,01 **p<0,005 ****p<0,0001.....	103
Şekil 4.37.	EoL-1 hücre hattından 2, 5 ve 7 gün boyunca süpernatana salınan ECP miktarı; n=3; **p<0,005 ***p<0,0005 ****p<0,0001.....	104
Şekil 4.38.	72 saat uyarım sonrasında mono-kültür ve ko-kültür sisteminde <i>CAS3</i> (A), <i>CAS8</i> (B) ve <i>CAS9</i> (C) ve <i>BCL2</i> (D) gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR analizi; n=3; *p<0,01 **p<0,005 ***p<0,0005 ****p<0,0001.....	106
Şekil 4.39.	72 saat uyarım sonrasında mono-kültür ve ko-kültür sisteminde <i>BMF</i> (A) ve <i>PTRH2</i> (B) gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR analizi; n=3; *p<0,01 **p<0,005 ***p<0,0005 ****p<0,0001.....	107
Şekil 4.40.	72 saat uyarım sonrasında mono-kültür ve ko-kültür sisteminde <i>MLKL</i> (A) ve <i>RIPK3</i> (B) gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR analizi; n=3; *p<0,01 **p<0,005 ***p<0,0005 ****p<0,0001.....	108
Şekil 4.41.	72 saat uyarım sonrasında mono-kültür ve ko-kültür sisteminde <i>PARP1</i> (A) ve <i>AIF</i> (B) gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR analizi; n=3; *p<0,01 ****p<0,0001.....	109
Şekil 4.42.	72 saat uyarım sonrasında mono-kültür ve ko-kültür sisteminde <i>CDH1</i> (A), <i>CDH2</i> (B) ve <i>SNAI1</i> (C) gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR analizi; n=3; ***p<0,0005 ****p<0,0001.....	110

Şekil 4.43.	10 µg/ml Der p6 ve 10 µg/ml Cup a1 uyarımları sonrasında mono-kültür ve ko-kültür sisteminde <i>CAS3</i> (A), <i>CAS8</i> (B), <i>CAS9</i> (C) ve <i>BCL2</i> (D) gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR analizi; n=3; *p<0,01 **p<0,005 ***p<0,0005 ****p<0,0001.....	112
Şekil 4.44.	10 µg/ml Der p6 ve 10 µg/ml Cup a1 uyarımları sonrasında mono-kültür ve ko-kültür sisteminde <i>BMF</i> (A) ve <i>PTRH2</i> (B) gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR analizi; n=3; *p<0,01 **p<0,005 ***p<0,0005 ****p<0,0001.....	114
Şekil 4.45.	10 µg/ml Der p6 ve 10 µg/ml Cup a1 uyarımları sonrasında mono-kültür ve ko-kültür sisteminde <i>MLKL</i> (A) ve <i>RIPK3</i> (B) gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR analizi; n=3; *p<0,01 **p<0,005 ***p<0,0005 ****p<0,0001..	114
Şekil 4.46.	10 µg/ml Der p6 ve 10 µg/ml Cup a1 uyarımları sonrasında mono-kültür ve ko-kültür sisteminde <i>PARP1</i> (A) ve <i>AIF</i> (B) gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR analizi; n=3; *p<0,01 **p<0,005 ***p<0,0005.....	115
Şekil 4.47.	Tek tabaka kültürde tespit edilen gen ifadesi değişiklikleri.....	116
Şekil 4.48.	Mono-kültür ve ko-kültürde tespit edilen gen ifadesi değişiklikleri.....	117
Şekil 4.49:	72 saat alerjen uyarımları sonrasında BEAS-2B hücre hattından üst (A) ve alt (B) süpernatantlara salınan MMP9 miktarı; n=3; *p<0,01 **p<0,005 ***p<0,0005.....	118
Şekil 4.50:	72 saat alerjen uyarımları sonrasında BEAS-2B hücre hattından üst (A) ve alt (B) süpernatantlara salınan GM-CSF miktarı; n=3; *p<0,01 **p<0,005.....	119
Şekil 4.51:	72 saat alerjen uyarımları sonrasında BEAS-2B hücre hattından üst (A) ve alt (B) süpernatantlara salınan TGF-B miktarı; n=3.....	120
Şekil 4.52:	10 µg/ml Der p6 ve 10 µg/ml Cup a1 alerjen uyarımları sonrasında RPMI-2650 hücre hattından üst (A) ve alt (B) süpernatantlara salınan TGF-B miktarı; n=3.....	121
Şekil 5.1.	Deney akış şeması.....	123

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1: <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> alerjenleri ve biyokimyasal isimleri.....	18
Çizelge 2.2: Apoptoz ve Kaspaz Bağımsız Ölüm Yolakları Arasındaki Benzerlik ve Farklılıklar.....	29
Çizelge 3.1: Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan malzemeler.....	39
Çizelge 3.2: Alerjen uyarımı sonrasında yapılan deneylerde kullanılan malzemeler.....	40
Çizelge 3.3: Gerçek zamanlı PZR döngü koşulları.....	48
Çizelge 3.4: Gerçek zamanlı PZR ile gen ifadesine bakılacak genlerin primer sekansları...48	
Çizelge 4.1. Canlılık ve sitotoksosite testleri sonucunda belirlenen dozlar.....	81

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta

### Kısaltmalar

AA	Alerjik Astım
ABPA	Alerjik Bronkopulmoner Aspergillozis
AIF	Apoptoz İndükleyici Faktör
APAF1	Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1
AR	Alerjik Rinit
Bak	Bcl-2 Homolog Antagonist Öldürücü Protein
Bax	Bcl-2 ile ilişkili X proteini
BEAS-2B	İnsan Bronş Epitel Hücre Hattı
Bit-1	Mitokondriyal Bcl-2 Transkripsiyon 1 İnhibitörü
Bmf	Bcl-2 Değişirme Faktörü
BMP	Kemik Morfogenetik Proteini
cysLT	Sisteinil Lökotrien
DAMP	Tehlikeyle İlişkili Moleküler Modeller
Der p	Dermatophagoides pteronyssinus
DISC	Ölümü İndükleyen Sinyal Kompleksi
ECM	Hücre Dışı Matris
ECP	Eozinofilik Katyonik Protein
EDN	Eozinofil Kaynaklı Nörotoksin
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EMT	Epitelyal Mezenkimal Dönüşüm
EoL-1	Eozinofil Hücre Hattı
EPO	Eozinofil Peroksidaz
FADD	Fas İle İlişkili Ölüm Domain Proteini
FBS	Fetal Bovin Serum
Fc $\epsilon$ RI	Yüksek Afiniteli IgE Reseptörü
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü

GM-CSF	Granulosit-Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
HBEC	İnsan Bronş Epitel Hücre
HDM	Ev Tozu Akarı
HIF-1 $\alpha$	Hipoksi İndüklenebilir Faktör-1 $\alpha$
IgE	İmmünoglobulin E
IL	İnterlökin
ILC2	Tip 2 naif Lenfoid Hücreler
JAM	Bağlantı Adezyon Molekülleri
MBP	Majör Bazik Protein
MIF	Makrofaj Göçü Önleyici Faktör
MLKL	Psödokinaz Karışık-Soy Kinaz Domain Benzeri
MNNG	Nmetil N'-Nitrosoguanidin
NAD+	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
OMM	Dış Mitokondriyal Membran
PAMP	Patojenle İlişkili Moleküler Modeller
PARP1	Poli (ADP-riboz) PAR Polimeraz 1
PBS	Fosfat Tamponlu Salın
PDGF	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
RIPK	Reseptör Etkileşimli Protein Kinaz
ROS	Radikal Oksijen Türleri
RPMI-2650	İnsan Nazal Epitel Hücre Hattı
TFH	Foliküler Yardımcı T Hücreleri
TGF- $\beta$	Tümör Büyüme Faktörü $\beta$
Th	T-yardımcı Hücreler
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
TNFR1	Tümör Nekroz Faktör Reseptörü 1
TNS	Tripsin Nötralize Edici Solüsyon
TRAIL	TNF ile İlişkili Apoptozu İndükleyen Ligand
TSLP	Timik stromal lenfopoietin
ZO-1	Zonula Okludens 1



# 1. GİRİŞ

Gelişmiş ülkelerde nüfusun yaklaşık %25'ini etkisi altına alan alerjik hastalıklar, bazı bilim insanları tarafından “yirmi birinci yüzyılın salgını” olarak adlandırılmaktadır. Özellikle alerjik rinit ve alerjik astım günümüzde en sık rastlanılan alerjik hastalıklardandır. İki hastalık birbiriyle ilişkidir ve hastalıkları tetikleyen faktörler de benzerlik göstermektedir. Bu nedenle bu iki hastalığın patogeneğinde hücresel bazda benzerlikler bulunmaktadır. Epitel hücreler iki hastalığın patolojisinde de önemli rol oynayan yapısal hücrelerdir ve ilk savunma hattı olarak görev almaktadırlar. Hasar gören epitel hücreler, hastalığın ilerleyen safhalarında epitel bariyer bütünlüğünün bozulmasına sebebiyet vermektedir. Bozulan bariyer bütünlüğü epitel permeabilitenin artışı ve alerjenlerin epitel hücre altına geçişini kolaylaştırarak inflamasyonu ve şiddetini artırmaktadır. Yapılan çalışmalar, alerjik rinit ve astımda inflamasyon durumunda eozinofillerin sayısının ortamda hızlıca arttığını göstermektedir. Eozinofiller inflamatuvar bölgede aktifleşirken majör bazik protein ve eozinofilik katyonik protein gibi birçok toksik proteini salgılamaktadır. Bu proteinler epitel hücreler ve epitel altı dokular üzerinde yıkıcı etkiye sahiptir. Alerjik astımda komorbidite ve ağır semptomların gözlenmesinde başlıca rol oynayan bu immün hücreler, aynı zamanda alerjik rinitin geç faz tepkilerinden sonra ortaya çıkan ağır semptomlarda da başlıca rol oynamaktadır. İki hastalığı da tetikleyebilen çeşitli faktörler ile eozinofillerin aktifleştiği ve degranüle olabildiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, epitel-eozinofil ko-kültür çalışmalarının bazılarında eozinofillerin salgıladığı proteinler nedeniyle epitel hücrelerin epitelyal mezenkimal dönüşüme uğradığı da gözlemlenmiştir.

Genetik faktörlerin yanı sıra çevresel faktörlerin de bu iki hastalık için önemli tetikleyici faktörler olduğu bilinmektedir. Çevresel faktörler içerisinde aeroalerjenlerin bu hastalıkların patofizyolojilerinde rol oynadıkları gösterilmiştir. Aeroalerjenler iç ortam ve dış ortam alerjenleri olarak sınıflandırılabilen ve solunma sonucunda Th2 bağımlılık tepkilerine neden olmaktadır. İç ortam aeroalerjenlerinden olan ev tozu akarı ve dış ortam aeroalerjenlerinden olan polenler alerjik rinit ve astımı tetikleyen en önemli alerjenlerdir. Ev tozu akarları ile yapılan çalışmalarda, akar içeriğinde birden fazla alerjene rastlanmış ve bazı alerjenlerin proteaz aktiviteleri olduğu gösterilmiştir. D. pteronyssinus‘in dışkısı Der p1 ve Der p2 gibi majör proteinlerden oluşmasına karşın, yakın zamanlı yayınlanan bir çalışma Der p6’nın da bu

dışkıdaki majör alerjenlerden biri olabileceğini öne sürmektedir. Der p6 serin proteaz alerjisi ile ilgili bilgiler son derece kısıtlıdır ve bu alerjen proteazın epitel ve eozinofil hücreleri üzerindeki etkileri neredeyse hiç bilinmemektedir. Coğrafyaya ve mevsime göre değişkenlik gösteren polenler, yatkınlığı olan bireyler için önemli bir alerjen kaynağı sayılmaktadır. Bu alerjen kaynaklarından birisi ülkemizde de geniş bir yayılıma sahip olmakla birlikte parklarda, bahçelerde ve yol kenarlarında sıklıkla süs bitkisi olarak kullanılan *Cupressus arizonica*'dır. Arizona servisi olarak da bilinen bu ağaç yaklaşık 123 milyar polen üretebilmektedir. Literatürde *Cupressus arizonica* ile ilgili alerjik potansiyeline dair klinik çalışmalar bulunmasına karşın *Cupressus arizonica*'nın başlıca alerjisi Cup a1 alerjisinin etkilerinin hava yolu epitel ve eozinofil hücrelerindeki etkisi ile ilgili çalışma bulunmamaktadır.

HDM ve polenlere maruz kalındığında bağışıklık sisteminde ilk savunma hattı olarak görev yapan epitel hücreler farklı alerjenlere karşı epitelyal hücre döküntüsü, hava yolu yeniden yapılanması ve apoptoz gibi farklı yanıtlar verebilmektedir. Bu alerjenlerle karşılaşma, sıkı bağlantı molekülleri üzerinde yıkıcı etki oluşturmakla birlikte inflamatuvar süreçte rol oynayan sitokin ve kemokinlerin de ifade profillerinde değişikliğe yol açabilmektedir. Uyarım yapılan alerjenlerin konsantrasyonu ve zamanına bağlı olarak epitel hücrelerde döküntü/ölüm rapor edilmiştir. Epitel hücrede gerçekleşen ölüm, apoptoz yolu ile kaspaz bağımlı yollar üzerinden gerçekleşebilirken bazı durumlarda ise kaspaz bağımsız olan nekroz, partanatoz ve anoikis gibi ölüm yolları üzerinden de gerçekleşebilmektedir. Hücre ölümünün yanı sıra epitel hücreler alerjen uyarımı sonrasında epitel karakterlerini kaybederek mezenkimal karaktere dönüşebilmektedir. EMT olarak adlandırılan bu süreç alerjik rinit ve alerjik astım durumlarında epitel hücrelerde görülebilirken, özellikle astım durumunun karakteristik özelliği olan hava yolu yeniden yapılandırılmasında önemli bir rol oynamaktadır.

Gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında, nazal ve bronşiyal epitel hücrelerin Cup a1 ve Der p6 alerjenlerine karşı oluşturdukları hücre cevaplarının kaspaz bağımlı&bağımsız hücre ölüm yolları ve EMT süreci üzerinden incelenmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda oluşturulan ko-kültür sistemi ile eozinofillerin farklı kökenli epitel hücrelerin cevabına katkısı araştırılmıştır. Cup a1 ve Der p6 alerjenleri ile yapılan bu tez hem literatüre alerjik hastalıkların moleküler patolojisi alanında katkı sağlayacaktır hem de günlük hayatta her iki alerjene de aynı anda maruz kalma durumu göz önünde bulundurulduğunda alerjenlerin ayrı ayrı ve birlikte etkisinin gösterilmesi ile alerjenlerin epitel hücreler üzerinde sinerjetik etkisi aydınlatılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Astım

Astım, kronik hava yolu inflamasyonu ile karakterize edilen heterojen bir hastalıktır. Değişken ekspiratuar hava akımı sınırlaması ile zaman içinde yoğunluğu değişen hırıltı, nefes darlığı, göğüste sıkışma ve öksürük gibi solunum semptomları ile tanımlanmaktadır. Astım farklı ülkelerde nüfusun %1-18'ini etkilemektedir. Astım durumunda gözlemlenen semptomlar ve hava akımı sınırlaması zamana ve farklı koşullara göre değişebilmektedir. Bu değişimler genellikle egzersiz, alerjen veya tahriş edici maddelere maruz kalma, viral solunum yolu enfeksiyonları gibi faktörler tarafından tetiklenmektedir. Semptomlar ve hava akımı kısıtlaması, kendiliğinden veya ilaca bağlı olarak iyileşebilmektedir. Bu iyileşme ile hastadaki astım atakları birkaç hafta veya ay boyunca önlenebilmektedir [1]. Yetersiz tedavi sonucunda ise astım hastaları uyku bozukluğu, gün içinde yorgunluk ve konsantrasyon güçlüğü çekmektedir. Astım hastaları ve aileleri okulu ve işi kaçırabilmekte, bu da aile ve daha geniş toplum üzerinde mali etki yaratabilmektedir. Semptomlar şiddetliyse, astımlı kişilerin acil sağlık hizmeti alması ve tedavi ya da izleme amaçlı hastaneye yatışı gerekirken tedavinin gecikmesi durumunda şiddetli astım atakları ölüme yol açmaktadır [2].

#### 2.1.1. Astım Patofizyolojisi, Fenotipleri ve Endotipleri

Astım dünya çapında önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Klinik olarak tekrarlayan, değişken, epizodik nefes darlığı, öksürük ve hırıltı atakları ile kendini göstermektedir. Klinik olarak, hastalık, yaygın çevresel alerjenlere karşı immunoglobulin E (IgE) antikorlarının varlığı veya yokluğu ile ayırt edilen, alerjik ve alerjik olmayan astım olarak ikiye ayrılmaktadır. Bununla birlikte, hastalığın her iki formunda da hava yolunda, ağırlıklı olarak interlökin (IL)-4, IL-5 ve IL-13 gibi karakteristik sitokinleri salgılayan T-yardımcı (Th) hücreleri bulunmaktadır. Bu sitokinler mast hücrelerini uyarmakta, eozinofil sayısının artmasına neden olmakta ve lökositlerin göçünü teşvik etmektedir. Sonrasında B-hücrelerinde IgE üretimi artmaktadır. Bununla birlikte, bir bireyin astımlı bir fenotip geliştirmesi için hem uygun uyaranlara maruz kalması hem de genetik yatkınlığının büyük ölçüde bulunması gerektiği gözlemlenmektedir.

Astım için uzun süredir devam eden bir yaklaşım, hastaları klinik, biyolojik ve fizyolojik özelliklerin gözlemlenebilir kombinasyonlarına dayalı olarak **fenotipler** kategorisinde gruplandırmaktır. Fenotipler "kalıtsal ve çevresel etkilerin bir kombinasyonundan kaynaklanan gözlemlenebilir özellikler" olarak tanımlanmaktadır. Astım **endotipleri** ise, bu farklı patofizyolojik mekanizmaları hücresel ve moleküler düzeyde tanımlamaktadır. Benzer klinik semptomlara rağmen, hastalar aynı terapötik müdahalelere çok farklı tepkiler verebilmektedir.

Astım hastalığında tanımlanmış en yaygın klinik fenotiplerden bazıları şunlardır:

**Alerjik astım:** Sıklıkla çocuklukta başlayan ve egzama, alerjik rinit veya gıda/ilaç alerjisi gibi ailede alerjik hastalık öyküsü ile ilişkili olan ve kolay tespit edilebilen astım fenotipi olarak tanımlanmaktadır. Bu fenotipine sahip hastalar genellikle inhale kortikosteroid (ICS) tedavisine yanıt vermektedirler [3].

**Alerjik olmayan astım:** Bazı hastalarda alerjik olmayan astım bulunmaktadır. Bu hastaların balgamlarındaki hücresel profil nötrofilik veya eozinofilik olabilmektedir. Alerjik olmayan astım fenotipine sahip olan hastalar genellikle inhale kortikosteroidde daha kısa sürede yanıt gösterirler [4].

**Erişkin başlangıçlı (geç başlangıçlı) astım:** Bazı yetişkinler, erişkin yaşamda ilk defa astım hastalığı ile karşılaşmaktadır. Bu hastalar genelde alerjik olmama eğilimindedir ve tedavileri sıklıkla daha yüksek dozlarda ICS gerektirmektedir [5].

### 2.2.2. Alerjik Astımın Moleküler Mekanizması

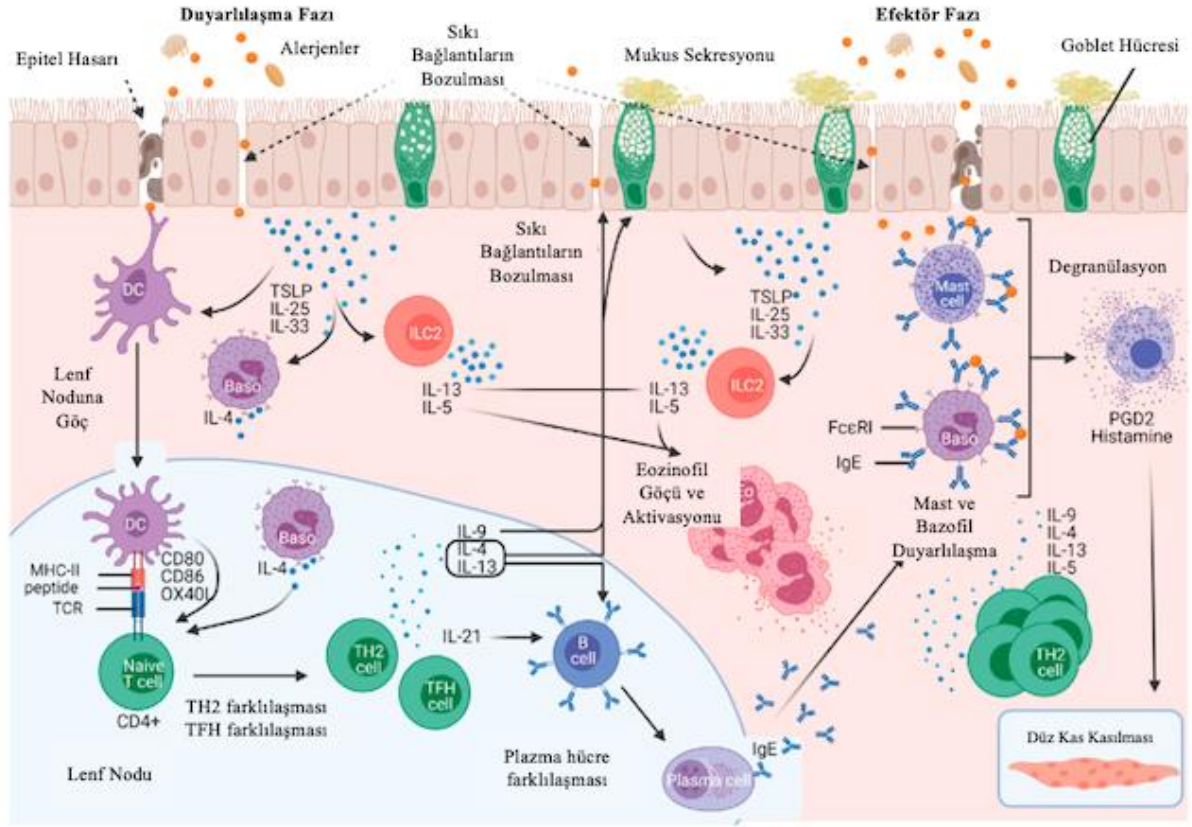
Alerjik astım Th2 tip immün yanıt ile tanımlanmaktadır. Alerjik astımın moleküler mekanizması alerjen maruziyeti sonrasında erken duyarlılaşma fazı (early sensitization phase) ve hastalığın etkisini gösterdiği efektör faz olmak üzere iki fazda incelenmektedir (Şekil 2.1) [6]. Erken duyarlılaşma fazındaki temel iki durum gerçekleşmektedir;

1. Epitel hücrelerin hasar alması ve aktivasyonu sonucunda alarminlerin salınması,
2. Doku mikro çevresinde tip 2 bağışıklık tepkisinin gelişmesi.

Hava yolu epitel bariyer bütünlüğü, epitel hücre hasarı ve ölümü ya da hücreler arası bağlantı komplekslerinin bozulması yoluyla kaybedilmektedir. Sıkı bağlantılar (tight junction),

hücreler arasında güçlü bir bağlantı oluşturan okludin, klaudin ve zonula okludens 1 (ZO-1) gibi proteinlerden oluşmaktadır. Bu moleküller epitel bariyer bütünlüğündeki hücreler arası bağlanmaya aracılık etmektedir. Proteolitik enzimler ile sıkı bağlantı proteinleri parçalanabilmekte ve bariyerin bozulmasına sebep olabilmektedir. Solunan birçok alerjenik madde de proteaz aktivitesine sahip olmakta ve bu sayede bariyer bütünlüğünü bozarak alerjenlerin dokuya geçmesi sağlamaktadır. Alerjen maruziyeti ile birlikte epitelyal hücre kaynaklı alarminler salınmakta ve tip 2 doğuştan gelen lenfoid hücrelerin (ILC2'ler) sitokin üretimini indüklemektedir. Antijen sunan hücreler alerjeni alarak lenf düğümlerine göç etmekte ve alerjenin antijenik bileşenlerini naif T hücrelerine sunmaktadır. Bu durum naif T hücrelerinin tip 2 T yardımcı (Th2) veya foliküler yardımcı T (TFH) hücrelerine farklılaşmasını indüklemektedir. Farklılaşan T hücreleri, B hücreleri ile etkileşime girmektedir. Bu etkileşim B hücrelerinin plazma hücrelerine dönüşerek alerjene özgü IgE salınımını sağlamaktadır. İnterlökin-4 (IL-4) ve interlökin-13 (IL-13) B hücre farklılaşması ve olgunlaşması sürecinde önemli rol oynamaktadır. Vücutta uzun zaman aralığında canlılığını sürdürebilen plazma hücreleri, alerjene özgü IgE salgısını on yıllar boyunca koruyabilmektedir.

Efektör fazda ise, Tip 2 bağışıklığın ana düzenleyicisi olan Th2 hücreleri, lenf düğümlerinden mukozaya geri göç etmekte ve iltihabı daha da güçlenmesine sebebiyet vermektedir. Bu fazda, dokuda yerleşik olarak bulunan mast hücrelerinin sayısı artmakta ve mast hücreleri yüksek afiniteli IgE reseptörlerini (FcεRI) kullanarak alerjene özgü üretilen spesifik IgE'ye bağlanmaktadır. Bazofil granülositler ise akciğer dokusuna alınarak spesifik IgE ile kaplanmaktadır. Duyarlı bir bireyde alerjenle tekrar karşılaşma, mast hücrelerinin ve bazofillerin hücresel yüzeyinde IgE moleküllerinin çapraz bağlanması yoluyla ani bir tepkiye neden olmaktadır. Ani tepki sırasında bazofillerden ve mast hücrelerinde birçok mediyatör salınmaktadır. Mediyatörlerin hızlı salınımı vazodilatasyon, ödem, mukus hipersekresyonu ve bronkokonstriksiyona neden olmaktadır. Bir diğer immün hücre olan eozinofiller bu fazda alerjik iltihaplanma bölgelerine çağırılmaktadır. IL-5 gibi çeşitli sitokinler ile inflamasyon bölgesine çağırılan ve aktifleşen eozinofillerden majör bazik protein (MBP) veya eozinofilik katyonik protein (ECP) gibi bazı toksik proteinler salgılanmaktadır. Salınan bu toksik proteinler ise doku hasarına neden olmakta ya da var olan doku hasarının şiddetlenmesini sağlamaktadır [6].



Şekil 2.1: Alerjik astımın duyarılma ve efektör fazlarının moleküler mekanizması [6]

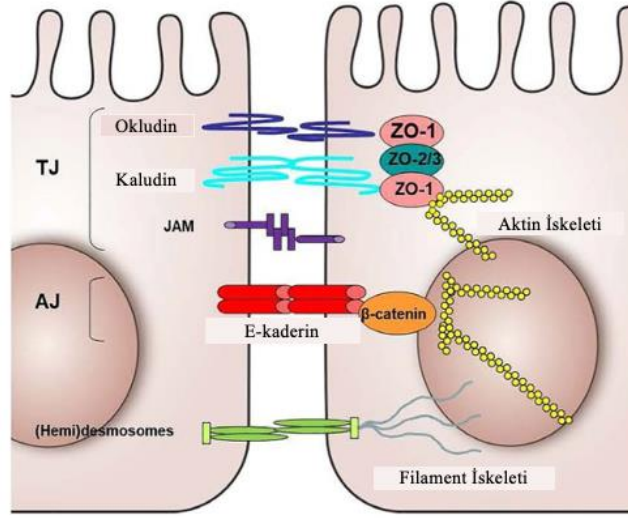
### 2.2.3. Epitel Hücrelerin Alerjik Astımdaki Rolü

Epitel hücreler bağlantı proteinleri sayesinde oluşturdukları bariyer ile, çevresel tehditlere karşı ilk fiziksel ve immünolojik savunma hattını sağlamaktadır. Bağlantı proteinleri, apikalde yer alan sıkı bağlantılardan (tight junction), bazolateralde yerleştirilmiş olan yapışık bağlantılardan (adheren junction) ve hemidezmozomlardan oluşmaktadır (Şekil 2.2). Hava yollarında bulunan siliyer epitel hücreler; mikroorganizmalar, partikül maddeler, dizel egzozu, ozon, sigara dumanı gibi hava kirleticilere sürekli olarak maruz kalmaktadırlar. Bu kirleticilere maruz kalan epitel hücrelerde hücre ölümü meydana geldiği ya da sıkı bağlantı proteinleri zarar gördüğü için epitel bariyer bütünlüğü bozulmaktadır. Yapışık bağlantıların ana bileşeni olarak transmembran protein E-kaderin sayılmaktadır. Hücre dışı alanı homotipik olarak komşu hücrelere bağlanırken, hücre içi alan, p120-katenin,  $\beta$ -katenin ve  $\alpha$ -katenin proteinlerinden oluşan bir mikrotübül ağı ile aktin hücre iskeletine bağlanmaktadır. E-kaderin hücreye hem mekanik destek sağlamakta hem de hücre içi sinyalizasyonda görev almaktadır. E-kaderinin, diğer hücre bağlantılarının oluşumu için önemli olduğu bilinmekte ve proteinde oluşabilecek

bozukluk, diğerk sıkı bağılantı proteinlerinin delokalizasyonu ile sonuçlanabilmektedir. Sıkı bağılantı proteinleri ise ZO-1, okludin, klaudin ve bağılantı adezyon molekülleri (JAM) gibi transmembran proteinlerden oluşmaktadır. Bu proteinler epitel geçirgenliğinin ana düzenleyicileri sayılmaktadır [7]. Yapılan çalışmalarda, astım hastalarının hava yolu epitelinde E-kaderin,  $\beta$ -katenin, ZO-1 ve okludin ekspresyonunda azalma gözlenmiştir [8, 9]. Bu durumun bariyer fonksiyonunda bozulmaya yol açtığı da bilinmektedir. Ev tozu akarı (HDM) ile eozinofilik, nötrofilik ve karışık granülosit astım murin modeli oluşturulan bir çalışmada ise, üç modelde de ZO-1, E-kaderin, okludin ve klaudin-5,-8,-18 ve -23 bağılantı proteinlerinin azaldığı gösterilmiştir [10].

E-kaderinin ekspresyonu, yalnızca sağlam bir epitel bariyer oluşumu için değil, aynı zamanda E-kaderinin aşağı regülasyonu hücrelerin epitelyal fenotiplerini kaybetmesine ve mezenkimal özellikler kazanmasına neden olduğundan dolayı, epitelyal plastisite için de oldukça önem taşımaktadır. Epitel karakterin kaybedilmesi ile mezenkimal karaktere geçiş, epitelyal mezenkimal dönüşüm (EMT) olarak adlandırılmaktadır. Hücreler arasındaki E-kaderin bağlantısının kopması,  $\beta$ -katenin proteininin sitoplazmaya salınmasına neden olmaktadır. Sitoplazmaya salınarak aktif hale geçen  $\beta$ -katenin ise sinyal yolları aracılığı ile epitel karakter genlerin baskılanmasını ve mezenkimal karakter genlerinin indüklenmesini sağlamaktadır. Astım hastalığında sıkça gözlemlenen hava yolu yeniden yapılandırılmasında EMT mekanizması etkili olmaktadır [7].

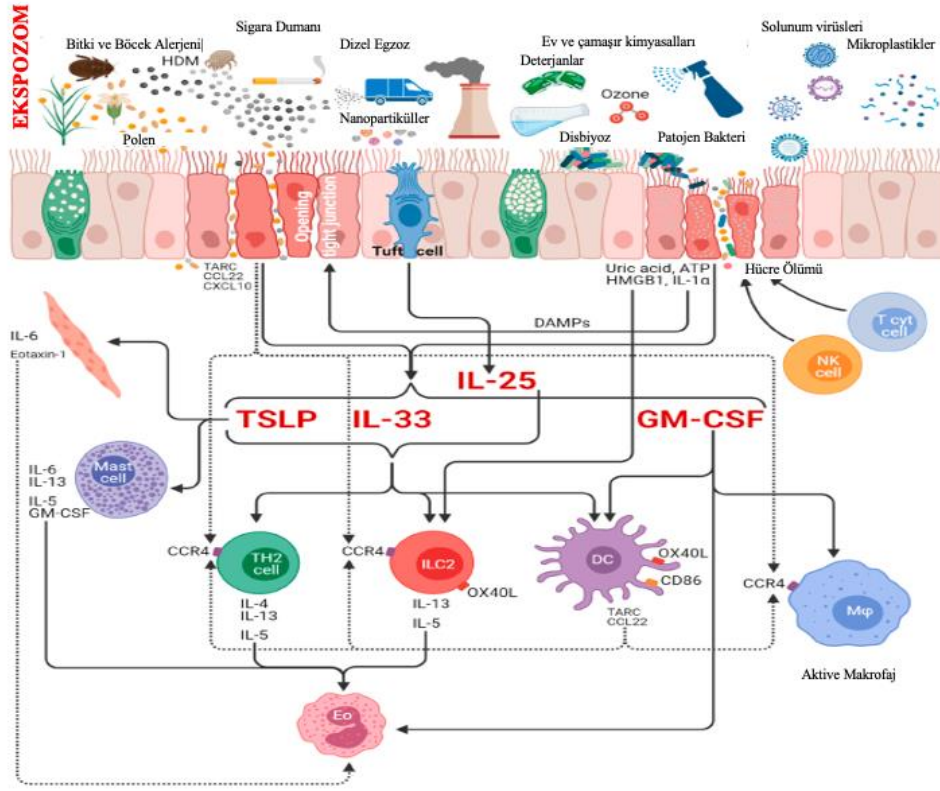
Epitel bariyerin açılması, mukus üretimi, öksürük, siliyer hareket ve epitel hücre ölümünün artması ile birlikte, immün hücrelerin dokudan göç etmesine neden olmaktadır [6]. Astım hastalığında çevre kirliliğinin şiddetlenmesine paralel olarak epitel bariyer bütünlüğünün bozulmasında artış gözlemlenmiştir [8].



Şekil 2.2: Epitel hücreler arasındaki sıkı bağlantı proteinleri [7]

Epitel hücreler yüzeylerinde, eksojen patojenle ilişkili moleküler modeller (PAMP) ve endojen tehlikeyle ilişkili moleküler modeller (DAMP) tarafından tetiklenebilen, toll benzeri reseptörler gibi çok çeşitli pattern tanıma reseptörlerini (PRR) eksprese etmektedir. Epitel hücreler bu reseptörler aracılığıyla aktive olup, alarminler, sitokinler, kemokinler ve lipid aracılı moleküllerin salgılanmasını indüklemektedirler (Şekil 2.3) [6]. Alerjenler, sigara dumanı ya da çeşitli patojen bakteriler bu reseptörlere bağlanarak, epitel hücrelerden TSLP, IL-33 ve IL-25 gibi sitokinlerin salınımını tetiklemektedir. Bu sitokinler aracılığıyla immün hücreler aktifleştirilebilmekte ya da inflamasyon bölgesine çağırılabilir.





Şekil 2.3: Epitel bariyer bütünlüğünün bozulmasına sebep olan etkenler ve sonrasında epitelden salınan moleküller [6]

#### 2.2.4. Eozinofillerin Alerjik Astımdaki Rolü

Eozinofiller astımın şiddetlenmesinde önemli bir rol oynar. Yapılan çalışmalar, balgam ve kandaki eozinofil sayılarının astım alevlenmesini öngörmeye önemli faktörler olduğunu ileri sürmektedir [11]. Eozinofiller; MBP, radikal oksijen türleri (ROS), granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), IL-8, lipid mediyatörler ve sitokinler gibi spesifik granül proteinleri dahil olmak üzere bir dizi aracıyı inflamasyon bölgesinde serbest bırakmaktadır. MBP gibi eozinofil türevli granül ürünler epitel hücre hasarına aracılık etmekte ve böylece hava yolu aşırı duyarlılığını indüklemektedir. Eozinofiller alerjik astım koşullarında toksik proteinler salarak doku hasarına neden olmakla birlikte, epitel hücreler ile etkileşime giren mediyatörler salarak hava yolu yeniden yapılandırılmasında da rol oynamaktadırlar [12]. Eozinofiller, hava yolu fibrozunun oluşmasına katkı sağlayan ve EMT için önemli bir faktör olan TGF- $\beta$  üretmektedir [13]. 2013 yılında yapılan bir çalışmada, BEAS-2B (insan bronş epitel) hücre hattı ile EoL-1 (eozinofil) hücre hattı ko-kültüre alınmış ve bu deney sonucunda eozinofillerin epitel hücredeki TGF- $\beta$  protein seviyesinde artışa neden olduğu gözlemlenmiştir [14]. Bunun yanı sıra,

ezinofiller, mevsimsel alerjik astımı veya aspirinle alevlenen solunum hastalığı olan bireylerin hava yollarında cysLT'lerin ana hücresele kaynağı olabilmekte ve bu da hava yolunun yeniden şekillenmesine katkıda bulunmaktadır [15].

## **2.2. Alerjik Rinit**

Alerjik rinit (AR), hapşırma, burun tıkanıklığı, kaşıntısı ve akıntısı ile karakterize edilen ve solunan alerjenlere karşı IgE aracılı immün yanıt oluşturulan alerjik bir hastalıktır. AR hastalığının genetik yatkınlık ile birlikte çevresel uyaranlara maruziyet sonucunda oluştuğu düşünülmektedir. Aynı zamanda bu hastalık sıklıkla astım ya da konjonktivit hastalıkları ile birlikte görülmektedir. Yaygın olarak gözlemlenen alerjik hastalıklardan birisi olan AR hastalığının prevalansı bazı ülkelerde %50'ye ulaşmaktadır. AR hastalarında iş ve okul hayatlarında aksamlar ve uyku sorunları gibi çeşitli günlük hayatı etkileyen problemler gözlemlenmektedir [16]. Avrupa Birliği tarafından yapılan bir araştırmada, bu hastalıktan mustarip olan çalışanların iş verimliliğinde azalma gözlemlendiği tespit edilmiştir. İş verimliliğindeki bu azalmanın Avrupa Birliği'nde yılda 30 milyar ila 50 milyar avroya mal olduğu tahmin edilmektedir [17]. Küresel bir sağlık sorunu olan AR hem bireylere hem de ülkelere maddi anlamda zorluklar yaşatmaktadır.

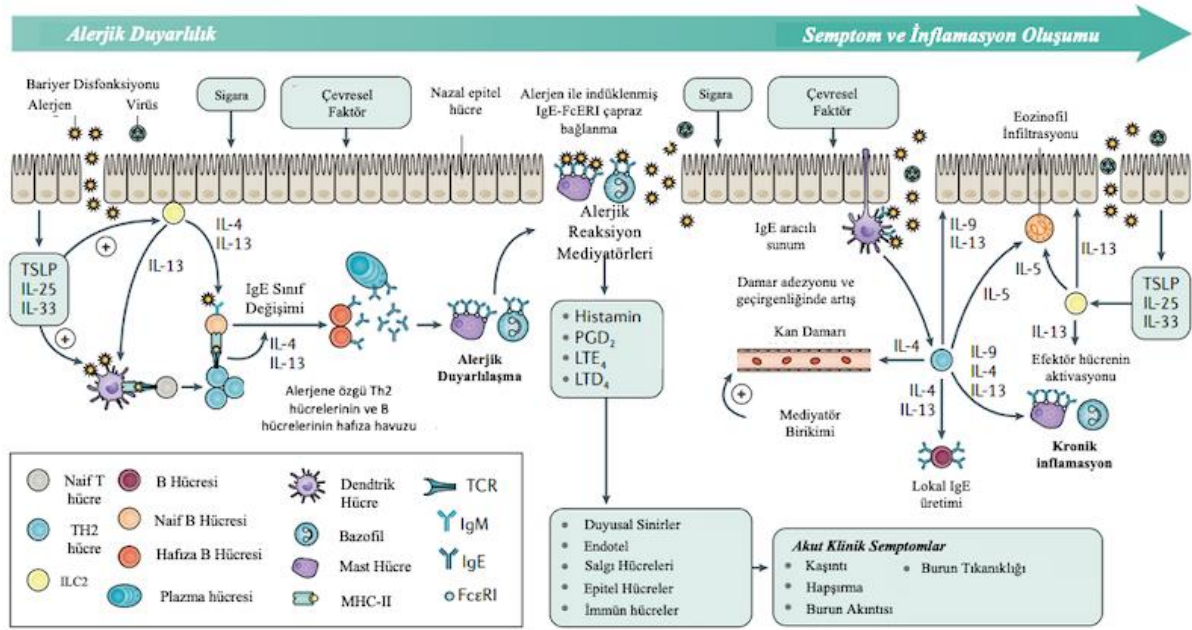
AR hastalığını tetikleyen alerjenler arasında polenler, ev tozu akarları, hayvan alerjenleri ve küfler sayılmaktadır. Bu alerjenlerden bazılarının dağılımı coğrafi olarak hem ülke içinde hem de ülkeler arasında farklılık gösterebilmektedir. Bu hastalığın oluşması için sıralanan risk faktörleri arasında antibiyotik kullanımı, çiftlik hayvanlarına maruz kalma, bireyin yaşadığı ortamdaki hava kirliliği, kedilere veya köpeklere maruz kalma, şiddetli fiziksel aktivite veya anne ve babanın sigara içmesi sayılmaktadır [16]. Yapılan araştırmalar özellikle artan hava kirliliğine maruziyetin AR şiddeti ile ilişkili olabileceğini ortaya koymaktadır [18]. Benzer risk faktörlerinin astım ve atopik dermatit hastalıklarında da yer alması dikkat çekmektedir.

### **2.2.1. Alerjik Rinit Patofizyolojisi ve Moleküler Mekanizması**

AR hastalığının patofizyolojisi, immünolojik kaskadlarda birden fazla kimyasal mediyatör veya antikor içerdiğinden oldukça karmaşıktır. AR, böcekler, bazı küfler, ev tozu akarları veya polenler gibi alerjenler ile tetiklenerek oluşturulan tip 1 aşırı duyarlılık reaksiyonudur [19]. Alerjik rinitin moleküler mekanizması antijen sunumu/duyarlılaşma ve

semptom oluşumu/inflamasyon olmak üzere iki aşamadan oluşmaktadır. Alerjik immün yanıt, hasta klinik semptomlar yaşamadan önce alerjene ilk kez maruz kaldığında oluşan duyarlılık evresi ile başlamaktadır. Bu aşamada, nazal mukozadaki dendritik hücreler alerjeni alarak işlemektedir. Daha sonrasında dendritik hücreler işlenmiş alerjeni lenf noduna taşımaktadır. Burada alerjen naif CD4+ T hücrelerine sunulmakta ve böylelikle, naif CD4+ T hücreleri aktive olarak alerjene özgü Th2 hücrelere farklılaşmaktadır. Th2 hücreleri B hücrelerinin aktivasyonunu ve IgE sınıf geçişini (class switching) indüklemektedir. Sonrasında IgE dolaşıma katılmakta ve mast hücreleri ya da bazofil hücreleri gibi efektör hücrelerin yüzeyindeki yüksek afiniteli IgE reseptörüne (FcεRI) bağlanmaktadır. Bu aşama antijen sunumu ve duyarlılaşma olarak adlandırılmaktadır. Bu süreçte hafızada alerjene özgü Th2 hücreleri ve B hücreleri oluşumu sağlanmaktadır. Bu durum alerji gelişiminde ilk adımı oluştursa da mukozanın kronik veya mevsimsel olarak çeşitli alerjenlere maruz kalması sebebiyle devam eden bir süreç olmaktadır.

İkinci aşama ise semptom oluşumu ve inflamasyonun başlangıcını içermektedir. AR semptomlarına, alerjik reaksiyon sırasında burun dokusunda salınan biyokimyasal ürünler neden olmaktadır. Alerjene maruz kalarak ilk aşamadaki duyarlılaşma sürecini tamamlayan bir hasta, aynı alerjen ile tekrar karşılaştığında nazal mukozada bulunan mast hücrelerinin üzerindeki alerjene özgü IgE'ye bağlanmaktadır. Bu durum da IgE ve FcεRI reseptörünün çapraz bağlanmasına ve ardından mast hücre aktivasyonu ve degranülasyonu ile sonuçlanmaktadır. Mast hücrelerin aktivasyonu ve degranülasyonu ise histamin, sülfidopeptid lökotrienler (lökotrien C4 ve lökotrien D4), prostaglandin D2 ve diğer moleküller dahil olmak üzere hücrede önceden depolanmış veya yeni sentezlenmiş aracılardan salınmasına yol açmaktadır. Bu aracılardan, nazal duyu sinirleri, damar sistemi ve salgı bezleriyle etkileşime girerek akut AR semptomlarına neden olmaktadır [16].



Şekil 2.4: Alerjik rinitin moleküler ve immünolojik mekanizması [16]

Akut semptomlara ek olarak, bir alerjik rinit hastasının nazal yollardan alerjene maruz kalması, eozinofil, nötrofil ve bazofil gibi immün hücrelerin bölgeye göçünü ve böylelikle ani inflamasyon belirteçlerinin artmasını sağlamaktadır. Yapılan çalışmalarda, IL-4, IL-5 ve IL-13 gibi klasik tip 2 sitokinlerine, alerjene maruz kaldıktan birkaç saat sonra burun salgılarında rastlanmıştır. Alerjen maruziyeti sonrasında alerjene özgü aktifleşmiş olan Th2 hücreleri fazla miktarda IL-4, IL-5 ve IL-13 üretir;

- Vasküler geçirgenliğe,
- Eozinofillerin ve diğer inflamatuvar hücrelerin burun mukozasına infiltrasyonuna,
- Lokal IgE üretimine,
- Mukus üretiminin artmasına,
- Damar sızıntısı ve genişlemesine ve,
- Th2 hücrelerinin farklı alt kümelerinin aktivasyonu ve farklılaşmasına

neden olmaktadır [16].

## 2.2.2. Epitel Hücrelerin Alerjik Rinitteki Rolü

Nazal mukoza, solunum yolunun ilk basamağıdır ve hava yoluyla bulaşan alerjenlere karşı ilk savunma hattını oluşturmaktadır. Bu sebep ile nazal epitel hücrelerin, epitel bütünlüğünü koruması veya hasara uğramış noktalarda epitel bütünlüğü yeniden sağlaması ve

alerjen ile karşılaştığı durumlarda bağışıklık tepkilerini başlatması gerekmektedir. Mukozal/epitel bütünlüğü bozan koşulların veya faktörlerin varlığında, epitel hücrelerden alarminler (TSLP, IL-25 ve IL-33) ve diğer hasarla ilişkili moleküler patternler salınmaktadır. Salınan moleküller epitel bütünlüğün korunması için onarım mekanizmasını harekete geçirmektedir. Alarminler, hızlı bir şekilde tip 2 sitokinler (IL-5, IL-13 ve IL-4) üreten grup 2 doğal lenfoid hücreleri (ILC2'ler) aktive edebilmektedir. Bu sebeple alarminler, IgE sınıf geçişi ve mukozal inflamasyon gibi tip 2 adaptif immün yanıtların başlatılmasında ve sürdürülmesinde önemli rol oynamaktadır [16].

### **2.2.3. Eozinofillerin Alerjik Rinitteki Rolü**

Nazal mukozadaki eozinofilik inflamasyon, alerjik rinitin karakteristik bir özelliğidir. Büyük miktarlarda eozinofil, nötrofil, mononükleer hücre ve bazofil, geç fazlı bir nazal alerjik reaksiyon sırasında nazal mukozaya göç etmektedir. İmmün hücrelerin inflamasyondaki yanıtları, hastalığın kronikleşmesi için önemli kabul edilmektedir. Eozinofiller, majör bazik protein (MBP), eozinofil katyon proteini (ECP), eozinofil kaynaklı nörotoksin (EDN) ve eozinofil peroksidaz (EPO) dahil olmak üzere çeşitli oksijen radikalleri ve proteinleri, inflamasyon koşullarında serbest bırakmaktadır. Bu proteinlerin nazal epitel hasarı, subepitelyal fibroz ve aşırı duyarlılık ile ilişkili olduğu bilinmektedir [20].

Yang ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, ev tozu akarına hassasiyeti olan alerjik rinit hastalarından toplanan kan örnekleri incelenmiş ve yüksek seviyelerde aktifleşen eozinofillerin orta ve şiddetli alerjik rinitin bir özelliği olduğu ve periferik kanda eozinofillerden salınan ECP ve EPO gibi proteinlerin daha yüksek seviyelerde bulunduğu saptanmıştır [21]. Yapılan bu çalışma ile eozinofillerin alerjik rinitte önemli bir rolü olduğu gösterilmektedir. Nazal eozinofil düzeyinin ölçümü, alerjik rinitli hastalarda eozinofilik inflamasyonu ve hastalığın şiddetini değerlendirmek için yararlı bir strateji olarak önerilmektedir [20]. Alerjik rinit hastalarında eozinofillerden salınan ECP toksik proteininin epitel hücrelerde hasara sebebiyet verdiği gösterilmiştir [22].

### **2.3. Alerjenler**

Alerjenler; küf, gluten, ev tozu akarı veya polen gibi genellikle zararsız maddelerdir. Bazı durumlarda kişinin bağışıklık sistemi, alerjenleri yabancı veya tehlikeli maddeler olarak tanımlamaktadır. Bağışıklık sistemi, alerjene karşı savaşmak için IgE olarak bilinen bir tür

antikor üretmek tepki vermektedir. Bu eylem alerjik reaksiyona yol açmaktadır. Alerjenler canlı vücuduna giriş yollarına göre 4 sınıfa ayrılabilir (Şekil 2.5). Çeşitli ilaçlar ve arılar gibi bazı böcekler enjeksiyon yolu ile alerjiye sebep olabilmektedir. Lateks eldivenler, kimyasal temizlik malzemeleri ve bazı zehirli bitkiler deri teması ile canlılarda alerjik reaksiyon başlatırken, bal, süt ya da narenciye gibi bazı besin maddeleri sindirim yoluyla alerjiyi başlatmaktadır. Bunların yanında en sık karşılaşılan alerjenler inhalasyon yolu ile maruz kalınanlardır. Polenler, evcil hayvanların tüyleri ya da ev tozu akarları hava yolu ile maruz kalınan alerjen türlerine örnektir.



Şekil 2.5: Vücuda giriş yollarına göre sınıflandırılan alerjenler

Birçok alerji türü bulunmakla birlikte bunlardan bazı alerjiler mevsimsel olup bazıları ise yıl boyunca devam etmektedir. Hatta bazı alerjiler ömür boyu sürebilmektedir. İlaç, besin, böcek, lateks, küf, hayvan, polen ve akar alerjenleri bazı alerjen türlerindedir.

**İlaç alerjisi** yalnızca az sayıda insanda görülmektedir. Çoğu ilaç reaksiyonu alerjik değildir, ancak ilacın özelliklerinin yan etkilerinden kaynaklanmaktadır. İlaça verilen reaksiyonun nedeninin teşhisi genellikle hastanın geçmişine ve semptomlarına dayanmaktadır. Bazen ilaç alerjisi için deri testi de yapılmaktadır [23].

**Gıda alerjisi** günümüzde sıklıkla karşılaşılan alerji türlerindedir. Gıdalara karşı farklı alerjik reaksiyon türleri vardır. IgE aracılı reaksiyonlar, IgE aracılı olmayan reaksiyonlar ve gıda intoleransları arasında farklılıklar bulunmaktadır [24].

**Böcek alerjisinde** arılar, eşek arıları ve ateş karıncaları alerjik reaksiyona neden olan en yaygın sokan böcek türlerindedir. Bunun yanısıra, sokmayan böcekler de alerjik reaksiyonlara neden olabilmektedir. Bunların en yaygın olanları hamamböceği ve böcek benzeri toz akarlarıdır. Bu iki canlıya karşı oluşan alerjiler, yıl boyunca alerji ve astımın en yaygın nedeni olabilmektedir [25].

**Lateks alerjisi**, kişinin doğal kauçuk latekse karşı geliştirdiği alerjik bir reaksiyon sonucu oluşmaktadır. Eldivenler, prezervatifler ve balonlar gibi doğal kauçuk lateks içeren ürünler ciddi bir sağlık riski oluşturabilmektedir [26].

**Mantar alerjisi**, kişinin küfe karşı immün sistemi ile alerjik bir yanıt oluşturması sonucunda ortaya çıkmaktadır. Mantarlar hem iç hem de dış mekanlarda pek çok yerde bulunabildiği için sadece mevsimlik olarak değil yıl boyunca alerjik reaksiyonlar meydana getirebilmektedir [27].

**Polen**, özellikle mevsimsel alerjilerin en yaygın tetikleyicilerinden biridir. Günümüzde birçok insan polen alerjisini “saman nezlesi” diye adlandırırsa da, uzmanlar bu durumu genellikle “mevsimsel alerjik rinit” olarak tanımlamaktadır [28].

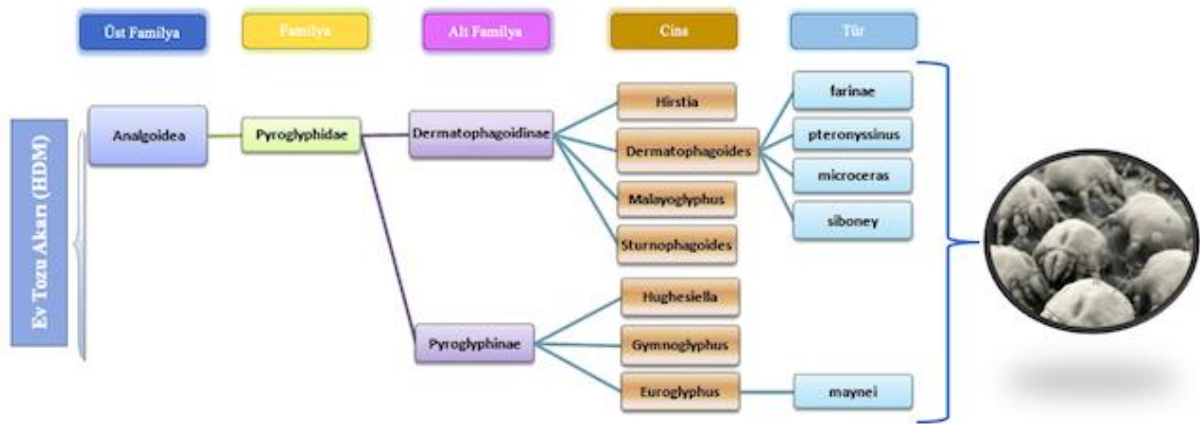
### **2.3.1. Ev Tozu Akarları (HDM)**

Ev tozu akarları, evdeki tozlar içerisinde bulunan ve Pyroglyphidae familyasına ait olan çeşitli akariform akar türlerinden oluşmaktadır. Astım ve rinit gibi alerjik hastalıkların, en yaygın tetikleyicilerden biri ev tozu akarlarıdır (HDM). Sıcak ve nemli ev koşullarında gelişen HDM'ler, eklembacaklılar arasında sınıflandırılmakta ve hayvanlar aleminin çok çeşitli bir sınıfını oluşturmaktadırlar (Şekil 2.6). Akarlar, bitkilerde ve hayvanlarda çok çeşitli patolojik ve parazitik koşullarla ilişkilendirilirken, bazı bireylerde ciddi alerjik belirtilere yol açabilen tip I aşırı duyarlılık reaksiyonunu tetikleyebildikleri için oldukça önemli alerjenlerden sayılmaktadır. Ev tozu akarları yaklaşık 0,2 ve 0,4 mm boyutunda mikroskobik canlılardır. HDM'ler cilt hücreleri ya da küflerin ortamdaki varlıklarında ve nemli, rutubetli ortamlarda kolayca çoğalabilmektedir. Bu organizmalar cilt ve saç ile beslenebildikleri için yatak



malzemelerinde yüksek HDM içeriği tespit edilebilmektedir. Böylelikle insanlar uyurken bu alerjeni büyük hacimlerde solumaktadırlar [29].

Ilıman bölgelerde, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* ve *Euroglyphus maynei* (Pyroglyphidae ailesine ait) en yaygın bulunan HDM türlerinden sayılmaktadır. Tropikal ve subtropikal bölgelerde ise, *Blomia tropicalis* (Glycyphagidae ailesine ait) ve *D. pteronyssinus* en sık görülen türlerden iken, *D. farinae* bu bölgelerde nadiren bulunmaktadır. Acaridae (*Acarus siro* ve *Tyrophagus putrescentiae*) ve Glycyphagidae (*Lepidoglyphus destructor* ve *Blomia tropicalis*) familyalarında olan ve depolama akarları olan adlandırılan bu türler, genellikle bir miktar nem içeren (<%10) kuru gıda maddelerinde bulunmaktadır. Kuru gıdalar bu türler için optimum üreme alanı sağlamaktadırlar. *D. pteronyssinus*, *D. farinae* ve *Euroglyphus maynei* gibi HDM türleri, esas olarak insan derisi pullarıyla beslenirken, depolama akarları (en yaygın olarak *A. siro*, *L. destructor*, *Glycyphagus domesticus* ve *B. tropicalis*) esas olarak bitki materyali, mantarlar ve organik bozunma ürünleriyle beslenmektedir [30].



Şekil 2.6: Ev tozu akarı türlerinin taksonomisi [31]

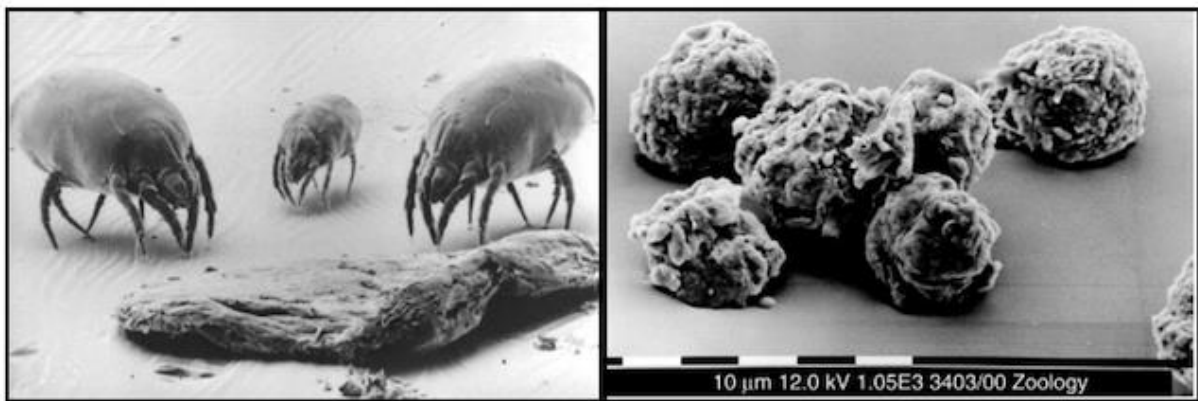
HDM alerjisi olan hastaların çoğunun, *D. pteronyssinus* veya *D. farinae*'ye karşı duyarlı oldukları görülmektedir. Her iki türden alerjenler de normal olarak ılıman bölgelerin çoğundan alınan herhangi bir ev tozu örneğinde bulunmaktadır. Farklı metodolojiler kullanan birkaç araştırmacı, *D. pteronyssinus* ve *D. farinae* kültürlerinden elde edilen yaygın alerjenik özüt bileşenlerini tanımlamıştır [30, 32]. Günümüzdeki alerji araştırmalarına hem moleküler biyoloji tekniğinin hem de yüksek verimli omik yaklaşımlarının dahil edilmesi, 30'dan fazla HDM



alerjeninin tanımlanmasına izin vermiştir [33]. HDM alerjenlerini, akarların bağırsaklarında bulunan sindirime yardımcı enzimleri oluşturmaktadır. Bu enzimler akarların dışkıları ile havaya karışmaktadır. Genellikle proteolitik aktiviteye sahip olan bu alerjenler, insanlar tarafından solunum yoluyla alınmakta ve alerjik reaksiyon başlatmaktadır [34].

### 2.3.1.1. *Dermatophagoides pteronyssinus*

1964 yılında, *Dermatophagoides pteronyssinus* alerjeninin ana ev tozu alerjisi olduğu keşfedilmiştir [35]. Bu keşif akar biyolojisi-alerjik hastalıklar arasındaki ilişki ve maruziyeti azaltma yöntemleri hakkında kapsamlı araştırmaların başlangıcı olmuştur. *D. pteronyssinus* akarları yaklaşık 0,3 mm uzunluğundadır ve bu nedenle çıplak gözle görülemez (Şekil 2.7). *D. pteronyssinus* türünün sekiz bacağı vardır ve belirgin bir kafaları bulunmamaktadır. Optimal laboratuvar koşulları altında, yetişkinler yaklaşık 6 hafta yaşamakta ve bu süre zarfında bir dişi 40-80 yumurta üretebilmektedir. İnsan derisi pulları, mantarlar, bakteriler ve çeşitli organik döküntülerle beslenmektedirler. Peritrofik bir zarla çevrili küresel dışkı topları üreten gelişmiş bir sindirim sistemine sahiptirler. Laboratuvar çalışmalarında yetişkin akarların günde ortalama 20 dışkı peleti biriktirdiği gözlemlenmiştir ancak bu, yabancı popülasyonlarda ne kadar dışkı biriktiğini tam olarak yansıtmayabilmektedir. Bu dışkı topları genellikle 20-40 µm çapındadır ve çok sayıda alerjen içermektedir (Şekil 2.7). *D. pteronyssinus* solunumları kutanözdür, cilt gaz ve su buharı değişimi için bir bariyer görevi görmektedir [35].



Şekil 2.7: *Dermatophagoides pteronyssinus* ve dışkısının görüntüsü [35]

*Dermatophagoides pteronyssinus* dışkısında bulunan birçok alerjen ve sahip oldukları özellikler tanımlanmıştır (Çizelge 2.1) [33]. Bazı alerjenler peptidaz, proteaz, transferaz ve

glukozidaz gibi enzim aktivitelere sahiptirler. Bu alerjenlerin solunması, solunum mukozasındaki bağışıklık sistemini uyarmakta ve spesifik IgE'nin aracılık ettiği ilk alerjik duyarlılaşmaya neden olmaktadır. Alerjenlerle daha sonra temas eden hastalar, esas olarak mast hücrelerinden türetilen araçlar ile tepki göstererek bronşiyal mukozada vazodilatasyon, ödem, mukus sekresyonu ve bronkospazma neden olarak akut inflamatuvar ataklara yol açmaktadır [36].

Çizelge 2.1: *Dermatophagoides pteronyssinus* alerjenleri ve biyokimyasal isimleri

<i>Alerjenin Adı</i>	<i>Biyokimyasal İsmi</i>	<i>Alerjenin Adı</i>	<i>Biyokimyasal İsmi</i>
<b>Der p1</b>	Sistein proteaz	<b>Der p21</b>	-----
<b>Der p2</b>	NPC2 ailesi	<b>Der p23</b>	Peritrofin benzeri protein domaini (PF01607)
<b>Der p3</b>	Tripsin	<b>Der p24</b>	Ubiquinol-sitokrom c redüktaz bağlayıcı protein
<b>Der p4</b>	Alfa-amilaz	<b>Der p25</b>	Triozfosfat izomeraz
<b>Der p5</b>	-----	<b>Der p26</b>	Miyozin hafif zincir
<b>Der p6</b>	kimotripsin / serin proteaz	<b>Der p28</b>	Isı Şoku Proteini 70
<b>Der p7</b>	Bakterisidal geçirgenliği artırıcı protein	<b>Der p29</b>	Siklofilin
<b>Der p8</b>	Glutasyon S-transferaz	<b>Der p30</b>	Ferritin
<b>Der p9</b>	Kollajenolitik serin proteaz	<b>Der p31</b>	Kofilin
<b>Der p10</b>	Tropomiyozin	<b>Der p32</b>	İnorganik Pirofosfotaz
<b>Der p11</b>	Paramiyozin	<b>Der p33</b>	Alfa-tübülin
<b>Der p13</b>	Sitozolik Yağ Asidi Bağlayıcı Protein	<b>Der p36</b>	
<b>Der p14</b>	Apolipoforin	<b>Der p37</b>	Peritrophin-A domaini içeren protein
<b>Der p15</b>	Kitinaz benzeri protein	<b>Der p38</b>	Bakteriyolitik enzim
<b>Der p18</b>	Kitin benzeri protein	<b>Der p39</b>	Troponin C
<b>Der p20</b>	Arginin kinaz	<b>Der p40</b>	Tioredoxin benzeri protein

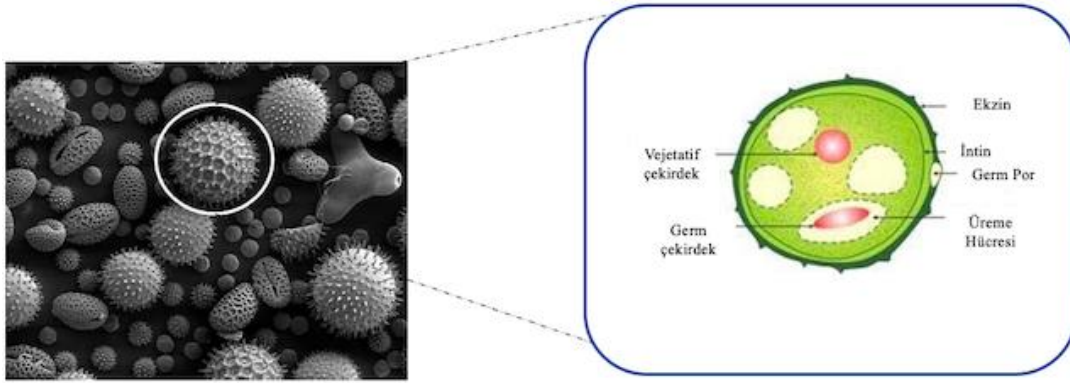
*Dermatophagoides pteronyssinus* 1/2 (Der p1/Der p2), HDM ekstraktlarının ana bileşenleridir ve en önemli HDM alerjenleri olarak kabul edilmektedir. Der p1, 25 kDa'lık bir proteindir ve bir sistein proteaz olarak enzimatik aktiviteye sahiptir. Der p1 esas olarak

akarların dışkısında bulunduğundan sindirim sistemi enzimi olarak sınıflandırılmaktadır [37]. Yapılan bazı çalışmalarda, Der p1'in proteaz aktivitesi yoluyla hava yolu epitel hücrelerinin geçirgenliğini arttırdığı gözlemlenmiştir [38]. Aynı zamanda literatürdeki yayınlar, Der p1 alerjeninin epitel hücre döküntüsü, sitokin salınımı ve epitel hücre katmanı boyunca alerjenlerin taşınmasının kolaylaşmasına yol açtığını göstermiştir [39-41]. Der p2 ise, dışkıdan ziyade akarların vücudunda bulunan 14 kDa'lık bir proteindir [37]. Der p 2'nin lipopolisakkarit ile aktive olan Toll benzeri reseptör (TLR) 4 sinyalini ve Th2 polarizasyonunu desteklediği gösterilmiştir [42]. Wang ve arkadaşlarının yaptıkları bir klinik çalışmada, proteaz aktivitesi olmayan Der p2'nin, ev tozu akarına alerjisi olan bireylerde IgE seviyesini arttırdığı tespit edilmiş ve bu proteininde alerjiye sebep olduğu gösterilmiştir [43].

*D. pteronyssinus*'in dışkısı Der p1 ve Der p2 gibi majör proteinlerden oluşmasına rağmen, yakın zamanlı yayınlanan bir çalışmada Der p6'nın da bu dışkıdaki majör alerjenlerden biri olabileceği öne sürülmüştür [44]. Der p6 serin proteaz aktivitesine sahip 25 kDa büyüklüğünde bir proteindir. 2021 yılında yayınlanan bir çalışmada bronş epitel hücre hattı kullanılmış ve Der p6 alerjeninin epitel geçirgenliği arttırdığı gösterilmiştir. Yapılan bu çalışmada aynı zamanda Der p6 uyarımının epitel hücrelerdeki matriks metalloproteaz-9 (MMP-9) protein seviyesinde artışa neden olduğu bulunmuştur [45].

### **2.3.2. Polenler**

Polenler çiçekli bitki yaşam döngüsünün bir parçasıdır ve çiçekli bitkinin erkek gametlerini barındıran özel bir yapıya sahiplerdir. Polenin biyolojik işlevi dişi gametofiti döllenektir. Doğada polenler çoğunlukla küre şeklinde olmakla birlikte farklı şekillerde de olabilmektedir. 12 ila 300 µm arasında farklı çaplardaki polenlere rastlanılabilmektedir. Polen taneleri genellikle üç farklı bölümden oluşmaktadır. Merkezi sitoplazmik kısım, döllenmeden sorumlu çekirdeklerin bulunduğu kısımdan oluşmaktadır. Polenin duvarını oluşturan diğer kısımlar ise, bir iç tabaka (intin) ve bir dış tabakadan (ekzin) oluşmaktadır. İntin, selüloz veya hemiselülozdan oluşmaktadır. Dış ve en dayanıklı katman olan ekzin, parçalanmaya karşı oldukça dirençlidir. Yoğun ısı, güçlü asitler veya güçlü bazlarla muamelenin polen üzerindeki etkisi çok azdır. Ekzinin bileşenleri sporopolleninler olarak adlandırılmıştır. Polen tanesinin iç kısımları kolayca parçalanırken, ekzin tabakası ve dolayısıyla polen tanesinin genel formu çeşitli tortu türlerinde kolayca korunabilmektedir ve polenin korunma süresi farklı ortamlara göre değişebilmektedir [28].



Şekil 2.8: Polenin elektron mikroskop görüntüsü ve yapısı

Polen alerjenleri, suda çözünebilen proteinler veya glikoproteinlerden oluşmaktadır. Bu yapıda onları biyolojik olarak kolay erişilebilir kılmaktadır. Polen alerjenleri saniyeler içinde bir IgE antikor aracılı alerjik reaksiyonu başlatma yeteneğine sahiptirler. Alerjenler, iki farklı mekanizma ile polen sitoplazmasından atılabilirler.

- İlk mekanizmada, polen tanesi izotonik bir ortamda mukoza ile doğrudan temas halinde olduğunda alerjenler hızla yayılır ve konjonktiva veya burun gibi erişilebilir mukoza yüzeylerinde ani alerjik semptomlara yol açar.
- İkinci mekanizmada ise, yağmur suyu gibi hipotonik bir ortam polen tanesinin hızlı hidrasyonuna izin verir. Sonrasında ise küçük boyuttaki alerjenler alt solunum yollarına ulaşır ve alerjik reaksiyonu indükler. Bu nedenle polen tanelerinden alerjen salınımı, duyarlı bireylerde etkisini göstermesi için bir ön koşuldur.

Polen tanesinden alerjen salınımı iki ayrı bölmede de meydana gelebilir; polen maruziyetini takiben üst solunum yolu mukozasının yüzeyinde ve organizmanın dışındaki ortam havasında. Bu nedenle, ev tozu akarı alerjenlerinden farklı olarak, polen alerjen duyarlılığı riski, bir dış çevresel seviye sayımına dayalı olarak tahmin edilemeyebilir [28].

Mevsimsel polenlerin sebep olduğu alerjik hastalıkların prevalansı son on yılda artmış olmakla birlikte günümüzde bu durum küresel sağlık sorunlarından biri haline gelmiştir [46]. Japon çamı (*Cryptomeria japonica*), küt yapraklı yalancı servi (*Chamaecyparis obtusa*) ve sarı çam (*Pinus sylvestris*) gibi bazı ağaçların polenlerinin proteaz aktivitesine sahip olduğu ve alerjiye sebebiyet vermekle birlikte epitel hücreler arasındaki sıkı bağlantı moleküllerine zarar verebildiği de yapılan çalışmalarla gösterilmektedir [47, 48]. Türkiye’de mevsimsel olarak

maruz kalınan polen türleri değişmektedir. Fakat en fazla çam (Pinus), servi (Cupressus) ve meşe (Quercus) ağaçlarının polenlerine maruz kalınmaktadır [49]. Bu türler arasında Arizona servisi (Cupressus arizonica) özellikle Akdeniz ülkelerinde sıklıkla yol kenarlarında ve parklarda süs bitkisi olarak kullanılmaktadır (Şekil 2.9). Cupressus arizonica ağacı yaklaşık 123 milyar polen üretebilmektedir. Servi ağacının polenleri alerjik rinit ve alerjik astım gibi mevsimsel solunum alerjilerinin en önemli tetikleyicilerinden sayılmaktadır [50]. Arizona servisinin polen ekstraktının en az altı farklı alerjen içerdiği gösterilmiş olup bugüne kadar bunlardan dördü tanımlanarak karakterize edilmiş ve bu alerjenler içinde Cup a1 major alerjen olarak gösterilmiştir [51].



Şekil 2.9: Arizona Servisi (*Cupressus arizonica*)

Arizona servisine ait polenlerin alerjiye sebep olduğu ve Cup a1 alerjeninin bu bitkinin başlıca alerjenlerinden olduğu bilinmektedir [52, 53]. Cup a1 ile yapılan klinik çalışmalarda alerjiyi tetiklediğini tespit etmelerine rağmen, bu alerjenle uyarılan epitel hücrenin verdikleri yanıt incelenmemiştir [54]. Yapılan bazı çalışmalarda Timothy otunun polen ekstraktına maruz bırakılmış bronşiyal epitel hücrelerden IL-6, CXCL-8, GM-CSF ve TGF- $\beta$  gibi proteinlerin salındığı gözlenmiştir [55]. TGF- $\beta$ 'nın epitel karakterin mezenkimale dönüşmesinde önemli bir rol oynadığı bilinmekle birlikte epitelyal mezenkimal dönüşümün (EMT) hava yolu yeniden yapılandırılmasına neden olduğu da literatürde gösterilmiştir [56]. Bu sonuçlar polen uyarımı

sonucunda epitel hücre ilişkili yanıtların hava yolu yeniden yapılandırılmasına katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir.

## 2.4. Ölüm Yolakları

Hücre ölümü, hücresel bütünlüğün kaybıyla sonuçlanan hayati hücresel fonksiyonların geri dönüşü olmayan dejenerasyonu olarak tanımlanabilir. Hücre ölümü canlıların gelişiminde önemli bir süreçtir. Canlı vücudundaki hücreler virüs ile enfekte olmuşsa, radyasyon veya çeşitli toksinler tarafından hasara uğratılmışsa ya da gelişimin belirli aşamalarında bazı hücrelere gereksinim kalmamışsa hücrelerin ölmesi gerekmektedir. Hücre ölümleri nekroz gibi programlanmamış ölüm yolakları ile de apoptoz, partanatoz gibi programlanmış ölüm yolakları ile de gerçekleşebilmektedir. Tarihi süreçte, morfolojik kriterlere dayalı olarak üç farklı hücre ölümü programı tanınmıştır;

- Tip I (nükleer dejenerasyon/apoptoz),
- Tip II (sitoplazmik vakuolizasyon/otofajik hücre ölümü) ve
- Tip III dejenerasyon (hücre yırtılması/nekroz).

Hücre ölümü üzerine yapılan bilimsel çalışmalar, hücre kaybına aracılık edebilecek daha birçok ölüm yolağı olduğunu ortaya çıkarmıştır. Yukarıda listelenen üç programa ek olarak, ferroptoz, piroptoz, nekroptoz, partanatoz, entoz, mitokondriyal geçirgenlik geçişi kaynaklı nekroz, lizozom bağımlı hücre ölümü, NETotik hücre ölümü, oksitoz ve mitotik felaket (mitotic catastrophe) gibi ölüm yolakları günümüzde tanımlanmıştır [57]. Hücre ölüm yolakları kaspaz bağımlı ve kaspaz bağımsız olarak sınıflandırılabilir.

### 2.4.1. Kaspaz Bağımlı Ölüm Yolakları

Kaspazlar, hücre ölümü ve inflamasyonunu düzenleyerek homeostazı sürdürmek için önemli olan bir gen ailesidir. Kaspazlar, kaspaz aktif bölgesindeki katalitik sistein kalıntılarına bağlı bir reaksiyonda peptid bağlarını hidrolize eden endoproteazlardır. Spesifik sistein proteaz aktivitesine sahip olmaları sebebiyle kaspaz olarak adlandırılmaktadırlar. Kaspaz aracılı süreçler substrat inaktivasyonu ile sonuçlanmasına rağmen, bazı durumlarda apoptoz ve inflamasyon gibi düzenli süreçlerde yer alan aktif sinyal molekülleri de üretebilmektedirler. Bu sebeple kaspazlar, apoptozda (memelilerde kaspaz-3, -6, -7, -8 ve -9) ve inflamasyonda (insanda kaspaz-1, -4, -5, -12, farede kaspaz -1, -11 ve -12) bilinen rollerine göre geniş bir şekilde sınıflandırılabilir. Kaspaz-2, -10 ve -14'ün işlevleri daha az bilindiği için onları

sınıflandırmak daha zordur. Apoptoza dahil olan kaspazlar, etki mekanizmalarına göre başlatıcı kaspaz (initiator caspase/kaspaz -8 ve -9) ve efektör kaspaz (executioner caspase/kaspaz -3, -6 ve -7) olmak üzere alt sınıflara ayrılmaktadır (Şekil 2.10) [58].



Şekil 2.10: İnsandaki kaspazların domain yapıları [59]

Tüm kaspazlar hücrelerde katalitik olarak aktif olmayan zimojenler olarak sentezlenmektedir ve proteaz özelliklerini kazanmak için bir aktivasyon sürecinden geçmeleri gerekmektedir. Kaspaz-3 veya -7 gibi bir efektör kaspazın aktivasyonu, başlatıcı kaspazlardan olan kaspaz-9 tarafından gerçekleştirilmektedir. Bunun yanı sıra, bir başlatıcı kaspaz, apoptotik koşullar altında uyarılar ile otomatik olarak etkinleştirilebilmektedir [60]. Kaspaz aktivasyonu ile gerçekleşen ölüm yolları ise '**kaspaz bağımlı ölüm yolları**' olarak adlandırılmaktadır.

#### 2.4.1.1. Apoptoz

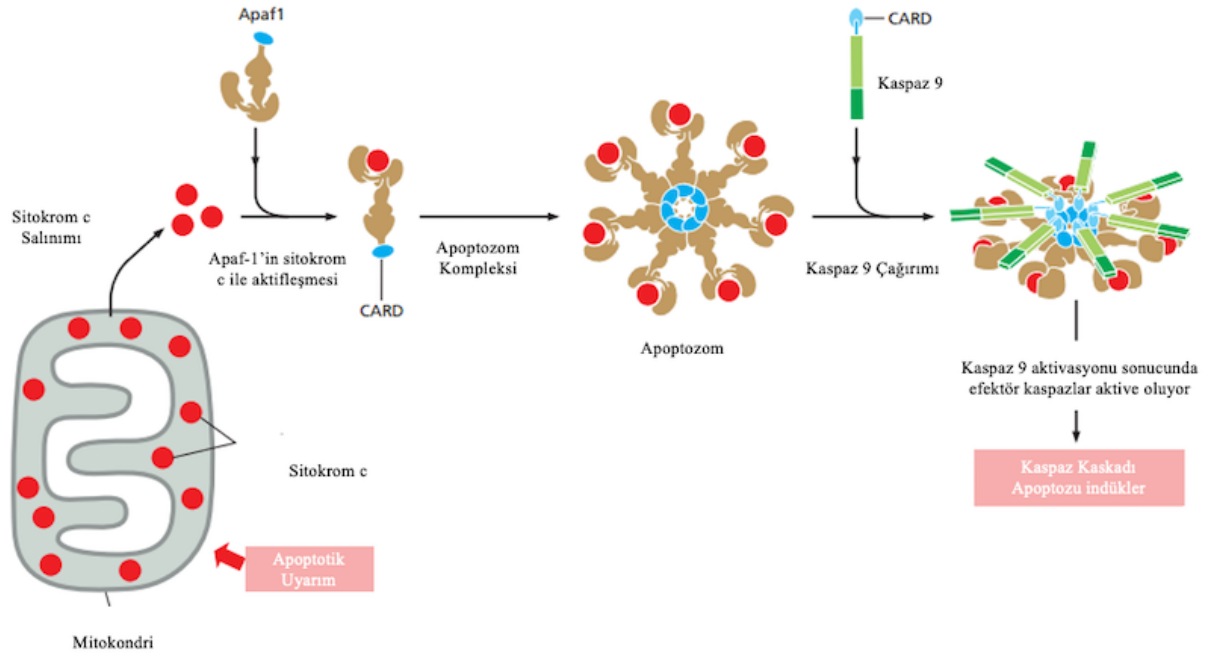
Apoptoz, hücre ölümünün en hızlı şekilde gerçekleştiği bir programlanmış hücre ölüm yolağıdır. Kaspazlar tarafından indüklenen proteolitik kaskad, apoptozun temel biyokimyasal özelliği olmaktadır. Kaspazlar hücre içinde aktif olmayan bir proenzim formunda eksprese edilmektedir. Çeşitli içsel ya da dışsal sinyal molekülleriyle aktive olduktan hemen sonra, proteolitik aktivitelerine bağlı olarak diğer bazı pro-kaspazlar aktive edilir ve bir proteaz kaskadı başlatılır. Bu proteolitik kaskad, apoptotik yolağı harekete geçirir ve bu durum hızlı ve geri dönüşü olmayan hücre ölümünü meydana getirir [61]. Nematod *Caenorhabditis elegans*

gibi model hayvanlar kullanılarak, ölüm yolağının temel bileşenleri mutasyon analiz yoluyla tanımlandığı için günümüzde en iyi anlaşılan hücre ölüm yolağı apoptoz sayılmaktadır. Ayrıca, TUNEL (DNA fragmentasyonu) ve Annexin V boyaması (fosfatidilserin eksternalizasyonu) gibi oldukça hassas ve güvenilir testlerin mevcudiyeti, apoptotik hücrelerin hem *in vitro* hem de *in vivo* deneylerde kolayca tespit edilebilmesine olanak sağlamaktadır [57]. Apoptoza uğrayan hücrelerin belirgin morfolojik değişiklikleri sırayla; hücrenin büzülmesi, kromatinin aşırı yoğunlaşması, kromozomların nükleozomal parçalara bölünmesi, plazma zarının şiddetli kabarması ve hücre içeriğinin "apoptotik cisimler" olarak adlandırılan zarla çevrili veziküllere paketlenmesi ile karakterize edilebilmektedir [60]. Bu apoptotik cisimler daha sonra çevreleyen hücreler tarafından fagosite edilir. Apoptozun moleküler mekanizması dışsal apoptoz yolağı ve içsel apoptoz yolağı olmak üzere iki ana yolağa ayrılmaktadır [61].

#### **2.4.1.1.1. İçsel (Intrinsic) Apoptoz Yolağı**

Stres, DNA hasarı veya bazı gelişimsel sinyal molekülleri içsel apoptoz yolağını tetiklemektedir. İçsel yolaktaki önemli protein, mitokondriyal elektron taşıma zincirinin suda çözünür bir bileşeni olan sitokrom c'dir. Bir apoptotik uyaran içsel yolu tetiklediğinde, proapoptotik efektör Bcl2 ailesinin proteinleri (Bcl-2 ile ilişkili X proteini (Bax) ve Bcl-2 homolog antagonist öldürücü (Bak)) aktive olmakta ve mitokondriyal dış zarda oligomerler oluşturmak üzere toplanmaktadır. Mitokondri zarında oluşan bu oligomerden sitozole sitokrom c ve diğer zarlar arası proteinlerin salınımı gerçekleşmektedir. Memeli hücrelerinde Bax ve Bak, Bcl2 ailesinin proteinleridir ve apoptozun içsel yolağının aktifleşmesi için bunlardan en az biri gerekmektedir. Bak proteini, apoptotik bir sinyalin yokluğunda bile mitokondriyal dış zara bağlıyken, Bax proteini esas olarak sitozolde bulunur ve ancak bir apoptotik sinyal bu proteini aktive ettikten sonra mitokondriye transloke olmaktadır. Bax/Bak oligomerinde sitozole salınan sitokrom c, apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (APAF1) adaptör proteinine bağlanmaktadır. Bu bağlanma sonrasında APAF1 apoptozom adı verilen tekerlek benzeri bir heptamer yapısı kazanmaktadır. Apoptozomdaki APAF1 proteinleri daha sonra başlatıcı kaspaz-9 proteinlerini çağırır. Apoptozoma bağlanarak aktive edilmiş kaspaz-9 proteinleri ise apoptozu indüklemek için aşağı yolaktaki efektör kaspazları aktive etmektedir (Şekil 2.11). Efektör kaspazlarının katalitik aktivitesi, hücre ölümünü hızlandırmakta ve DNA parçalanmasına, fosfatidilserinlerin membran dışına çıkarılmasına ve apoptotik cisimlerin oluşumuna sebep olmaktadır [62].

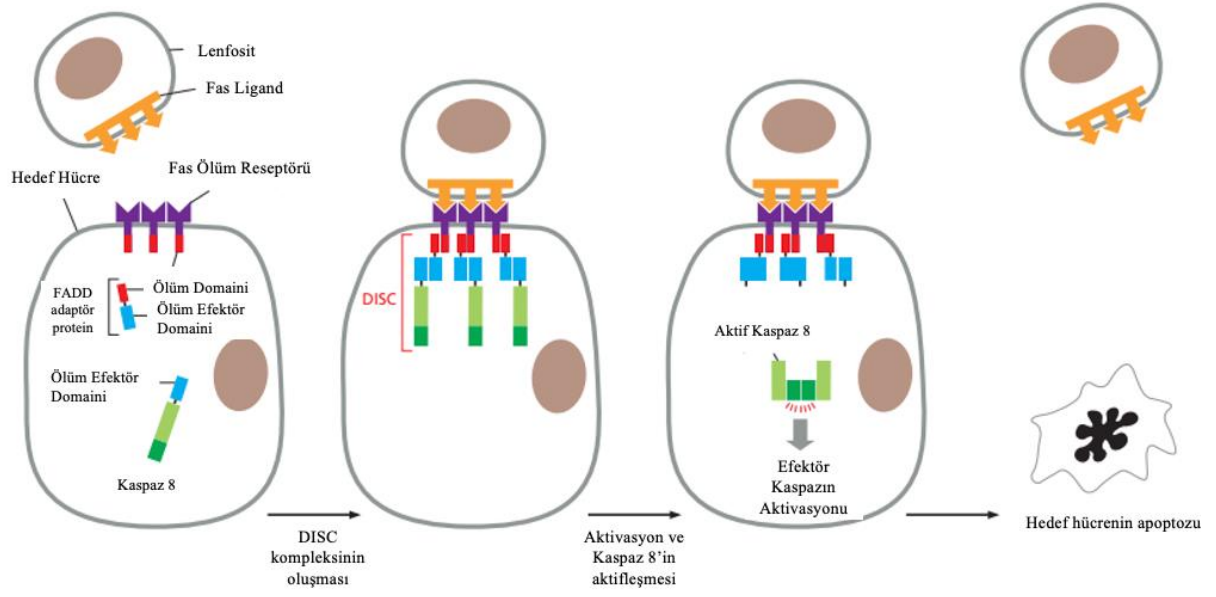




Şekil 2.11: İçsel apoptoz yolağının mekanizması

#### 2.4.1.1.2. Dışsal (Extrinsic) Apoptoz Yolağı

Hücre membranındaki ölüm reseptörlerine bağlanan hücre dışı sinyal molekülleri, dışsal apoptoz yolağını tetiklemektedir. Hücre membranındaki bu ölüm reseptörleri hücre dışı bir ligand bağlama alanı, tek bir transmembran alanı ve hücre içi ölüm alanı içeren transmembran proteinlerdir. Bu reseptörler homotrimerlerdir ve tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör ailesine aittirler. Ölüm reseptörlerini aktive eden ligandlar da homotrimerlerdir. Bunlar yapısal olarak birbirleriyle ilişkilidir ve bu sinyal molekülleri TNF ailesine aittir. Fas ligandının bağlanmasıyla aktive edilen Fas ölüm reseptörlerinin, sitozolik kısımlarında bulunan ölüm alanları, hücre içi adaptör proteinlerini bağlar ve sonrasında sırayla başlatıcı kaspazları (öncelikle kaspaz-8) bağlayarak ölümü indükleyen bir sinyal kompleksi (DISC) oluşturmaktadır. Dimerize ve aktive olan DISC üzerindeki başlatıcı kaspazlardan olan kaspaz 8 aktive hale gelmektedir. Aktif kaspaz 8 aşağı yolaktaki efektör kaspazları keserek aktifleştirmekte ve dışsal apoptoz yolağını başlatmaktadır (Şekil 2.12).



Şekil 2.12: Dışsal apoptoz yolağı

#### 2.4.1.2. Anoikis

Hücrelerin diğer hücrelerle tutunması ve hücre dışı matris (ECM) ile etkileşimleri, büyümesi ve hayatta kalması için zorunludur. ECM; doku oluşumu, büyümesi, farklılaşması ve homeostazı için gerekli kritik biyokimyasal ve mekanik sinyalleri sağlayan üç boyutlu bir yapı iskelesidir. Bu iskele ise glikozaminoglikanlar, proteoglikanlar ve lifli proteinler gibi çeşitli biyomoleküllerden oluşmaktadır. İntegrin, kaderin ve selektin gibi hücre membranında bulunan reseptörler, hücrelerin ECM'ye bağlanmasına aracılık etmektedir. ECM'de meydana gelen bazı bozukluklar hem mikroskobik seviyede hem de organizma seviyesinde sıklıkla ciddi işlev bozukluğuna ve hatta ölüme yol açabilmektedir [63].

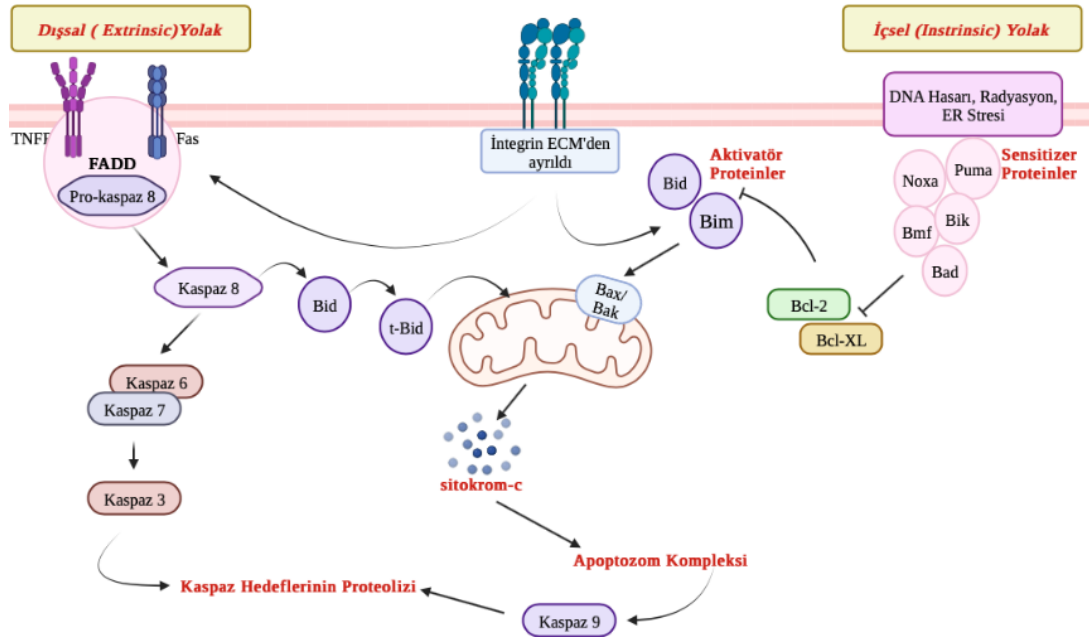
Hücre-hücre bağlanması veya hücre-ECM bağlanmasındaki bozulma, “**anoikis**” olarak adlandırılan bir tür apoptotik hücre ölümlüne yol açmaktadır. Anoikis, fizyolojik veya patolojik koşullar altında yanlış konumlanmış veya ECM'den ayrılmış hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlayan bir hücre ölümlük yolağıdır. Bu yolak doku homeostazının korunmasında görev almaktadır. Anoikis, apoptotik bir mekanizmadır ve bu programlanmış ölümlük yolağında hem içsel hem de dışsal yolaklar bulunmaktadır [63]. Anoikis yolağının başlatılması, mitokondrinin bozulması (içsel yolak) veya hücre yüzeyi ölümlük reseptörlerinin tetiklenmesi (dışsal yolak) olmak üzere iki apoptotik yolun etkileşimi ile gerçekleşmektedir.

#### **2.4.1.2.1. İçsel (Intrinsic) Anoikis Ölüm Yolağı**

İçsel yolak, DNA hasarı ve endoplazmik retikulum stresi dahil olmak üzere çeşitli hücre içi sinyallere yanıt olarak tetiklenmektedir. Ölüm sinyallerine yanıt olarak, pro-apoptotik protein Bax ve Bak, sitozolden dış mitokondriyal membrana (OMM) transloke olmakta ve Bax/Bak oligomerizasyonu OMM'de por oluşumuna sebep olmaktadır. Oluşturulan bu por mitokondriyal geçirgenliğe ve sitokrom c salınımına neden olmaktadır. Sitokrom c'nin salınması, kaspaz-9, APAF1 ve sitokrom c'den oluşan "apoptozom" adı verilen kompleksin oluşumuna yol açmaktadır. Bu kompleks efektör kaspazlardan olan kaspaz-3'ün aktivasyonuna ve hücre ölüm sürecinin başlamasına sebep olmaktadır. İçsel yolağın bu kısmı apoptoz yolağı ile benzerlik göstermektedir fakat pro-apoptotik BH3-only proteinler, anoikis programının içsel yolağı sırasında kritik bir rol almaktadır. Pro-apoptotik BH3-only proteinler, aktivatör ve hassaslaştırıcı (sensitizer) olmak üzere iki sınıfta incelemektedir. Aktivatör olarak sınıflandırılan Bid ve Bim proteinleri, hücrelerin ECM'den ayrılması sonucunda sitozole salınarak mitokondri içerisinde birikmekte ve Bax/Bak oligomerizasyonunu direkt aktifleştirmektedir. Hassaslaştırıcı proteinler ise (Hrf, Puma, Noxa, Bad, Bmf ve Bik) direkt olarak Bax/Bak oligomerizasyonunda görev almamaktadır. Bu proteinler anti-apoptotik Bcl-2 proteinini inhibe ederek hücre ölüm yolağına katkı sağlamaktadır (Şekil 2.13). Anoikis yolağında kullanılan hassaslaştırıcı (sensitizer) proteinler hücre histotipine göre farklılık göstermektedir. Örneğin fibroblastlarda gerçekleşen anoikis yolağında Noxa ve Puma proteinleri görev alırken, epitel hücrelerde gözlemlenen anoikis yolağında Bmf proteini görev almaktadır [64].

#### **2.4.1.2.2. Dışsal (Extrinsic) Anoikis Ölüm Yolağı**

Dışsal yolak, tümör nekroz faktör reseptörü ailesindeki Fas reseptörü, TNFR1 ve TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL) reseptör-1/-2 gibi ölüm reseptörlerine ligand bağlanmasıyla başlamaktadır. Ölüm sinyalinin reseptöre bağlanmasıyla ölüme neden olan sinyal kompleksi (DISC) oluşmaktadır. DISC, Fas ile ilişkili ölüm domain proteini (FADD) ve pro-kaspaz 8'den oluşmaktadır. DISC'in oluşumu pro-kaspaz 8 enzimini çağırmakta ve onların kesilerek aktifleşmesine sebep olmaktadır. Aktif kaspaz-8 daha sonra sitoplazmaya salınmakta ve burada kaspaz-6 ve -7 gibi efektör kaspazları parçalayıp aktive etmektedir. Aktif efektör kaspazlar ise hücre ölümüne sebep olmaktadır (Şekil 2.13).



Şekil 2.13: Anoikis ölüm yolağının moleküler mekanizması (Çizimler Biorender uygulaması kullanılarak yapılmıştır.)

Anoikis mekanizmasında dışsal ve içsel yolağın kesiştiği bir basamak bulunmaktadır. DISC oluşumu ile aktifleşen kaspaz-8 enzimleri pro-apoptotik BH3-only proteinlerinden olan Bid'in kesilmesini ve aktifleşmesini sağlamaktadır. Aktifleşen Bid proteinleri t-Bid'e dönüşerek mitokondriden sitokrom c salınımını indüklemektedir. Bu sayede dışsal yolağın başlangıcı ile başlayan anoikis mekanizması bu aşamadan itibaren apoptozom kompleksini oluşturarak içsel yolağın hücreyi ölüme götürmektedir (Şekil 2.13).

Yapılan yeni çalışmalar, ECM'den hücre ayrılması üzerine, Bcl2 transkripsiyon 1 inhibitörü (Bit-1) adlı bir mitokondriyal proteinin sitoplazmaya salındığını ve bunun sonucunda kaspazdan bağımsız bir ölüm yolağının indüklenebildiğini ortaya koymaktadır. Ruoslahti ve arkadaşları 2004 yılında, mitokondriyal Bit-1 proteininin aracılık ettiği yeni bir integrin bağımlı apoptotik yol tanımladılar [65]. İntegrin aracılı hücre tutunmasının bozulmasını takiben, Bit-1 proteini sitoplazmaya salınmakta ve transkripsiyonel ko-regülatör bölünmüş Amino-terminal arttırıcı (AES) ile bir kompleks oluşturmaktadır. Sonrasında bu yolağın kaspazdan bağımsız bir apoptoz modunu indüklemektedir. Bcl-2, Bcl-xl, Akt gibi bilinen birkaç anti-apoptotik faktör, Bit-1 apoptozunu bloke etmede etkisiz olsa da integrin aracılı hücre tutunması, Bit-1 apoptoz fonksiyonunu baskılayabilen tek anti-apoptotik yoldur [64].

## 2.4.2. Kaspaz Bağımsız Ölüm Yolakları

Apoptoz ölüm yolağı keşfedildiğinden beri, yapılan sayısız araştırma, apoptozun ayrılmaz bir şekilde kaspaz aktivitesi ile bağlantılı olduğunu göstermiştir. Apoptotik yollar, bir hücrenin düzenli ölümünü sağlamak için kaspaz fonksiyonunu indüklemektedir. Kaspazdan bağımsız hücre ölüm yollarını, normalde apoptozu indükleyen bir sinyalin kaspazları aktive edememesi sonucu ortaya çıkan ölüm olarak tanımlanmaktadır. Buna rağmen, kaspaz bağımsız ölüm yolları ile apoptotik hücre ölümü arasında ortak özellikler vardır (Çizelge 2.2) [66].

Çizelge 2.2: Apoptoz ve Kaspaz Bağımsız Ölüm Yolları Arasındaki Benzerlik ve Farklılıklar

	<i>Apoptoz</i>	<i>Kaspaz Bağımsız Ölüm Yolağı</i>
<i>Nükleus</i>	Kaspaz tarafından hedefinin bölünmesi	Nükleer membran çevresinde kromatin marjinalizasyonu
	DNA kırıkları	DNA kırıklarının oluşmaması
	Nükleer fragmentasyon	Fragmentasyon olmadan nükleer büzülme
	Kromatin yoğunlaşması	Kısmi kromatin yoğunlaşması
<i>Mitokondria</i>	Dış zar permeabilizasyonu	Dış zar permeabilizasyonu
	Kaspaz tarafından hedefinin bölünmesi	Şişkin krista
	Hızlı membran potansiyel kaybı	Membran potansiyelinin kademeli kaybı
	Fisyon aktivasyonu/füzyon inhibisyonu	Fisyon aktivasyonu/füzyon inhibisyonu
<i>Sitoplazma</i>	Kaspaz tarafından hedefinin bölünmesi	Bol otofagozomlar
	Kalsiyum konsantrasyonunda artış	Ribozom Agregasyonu
	Yoğunlaşma	Vakuollü
<i>Plazma Membranı</i>	Membran-fosfolipid asimetrisinin kaybı	Düzensiz membran
	Annexin V-pozitif	Annexin V-negatif
<i>Hücre</i>	Proliferasyon kaybı	Proliferasyon kaybı
	Matristen Ayrılma	Genellikle matrise bağlı kalma
	Ölen hücrenin fagositozu	Ölü hücrelerin uzaklaştırılması

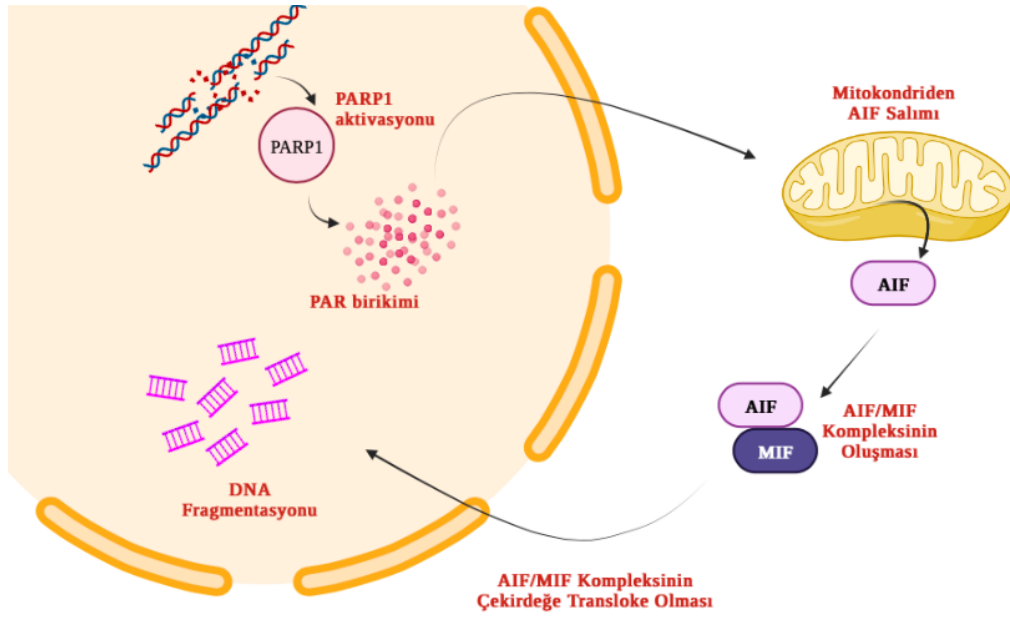
### 2.4.2.1. Partanatoz

Apoptotik olmayan hücre ölümünün bir başka türü olan poli (ADP-riboz) (PAR) polimeraz 1 (PARP1) bağımlı partanatoz, hastalık tedavileri için yeni hedef ölüm yolağı olarak tanımlanmıştır. Partanatoz, beyin iskemisi veya miyokard enfarktüsü sonrası iskemi-reperfüzyon hasarı, septik şok, parkinson hastalığı ve alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklar da dahil olmak üzere birçok kritik patolojik süreçte yer almaktadır. Partanatoz, PARP1 enziminin aktivasyonuna bağlıdır ve kaspaz bağımsız hücre ölüm yolağı olarak karakterize edilmektedir. Bir ADP-ribosil transferaz olarak da bilinen PARP proteinleri, ADP-riboz birimlerini nikotinamid adenin dinükleotidden (NAD<sup>+</sup>), histonlar, DNA polimerazlar, topoizomerazlar, DNA ligaz-2, transkripsiyon faktörleri ve PARP'ın kendisini içeren alıcı

proteinlere aktarmaktadır [67]. PARP'lar çok çeşitli hücrel süreçleri kontrol edebilmektedir. Farklı uyaranlar ile tetiklenen partanatoz ölüm yolağı;

- 1) PARP1'in aktivasyonu,
- 2) Apoptoz indükleyici faktörün (AIF) translokasyonu ve
- 3) DNA fragmantasyonu ve hücre ölümü

olmak üzere esas olarak üç sinyal transdüksiyonu fazından oluşmaktadır. Genel olarak, insan hücrelerinde PARP ailesinden olan PARP1, ultraviyole ışık, reaktif oksijen türleri (ROS) veya Nmetil N'-nitrosoguanidin (MNNG) gibi alkilleyici ajanlar tarafından indüklenen DNA hasarı ile aktive edilebilmektedir. Aktif hale gelen PARP1, alıcı proteinleri veya kendisini PARilasyonlar ve böylelikle DNA onarımı için gerekli efektör proteinlerin alımını kolaylaştırmaya yardımcı olarak DNA onarımına katkıda bulunur. Fakat, PARP1 aktivasyonunun sonuçları aslında DNA'ya zarar veren uyaranların yoğunluğuna bağlıdır. Hafif DNA hasarı, hasarlı DNA'yı onarmak için PARP1 aktivasyonunu indüklerken, ağır DNA hasarı sonucu, PARP1'in aşırı aktivasyonu ve yüksek PARilasyon aktivitesi, partanatoz ölüm yolağını indüklemektedir. Ağır DNA hasarı sonrasında aşırı aktive olan PARP1, çekirdek içerisinde PAR birikmesine ve biriken PAR'ın sitozole salınmasına neden olmaktadır. Sitozole salınan PAR mitokondriyi etkileyerek AIF mitokondriden sitozole salınmasını sağlar. AIF, PARP1 aracılı hücre ölüm yolağında görev alan önemli bir efektör proteindir. AIF, solunum kompleksi I'in toplanması ve mitokondriyal enerji üreten süreçler için hayati önem taşıyan mitokondriyal olarak lokalize bir flavoproteindir. Sitozole salınan AIF makrofaj göçü önleyici faktör (MIF) ile bağlanır ve sonuç olarak AIF/MIF kompleksini oluşturur. Sitoplazmada oluşan AIF/MIF kompleksi çekirdeğe transloke olur. MIF proteini nükleaz aktiviteye sahiptir ve çekirdek içerisinde DNA'nın parçalanmasını sağlar. DNA parçalanması ve kromatin yoğunlaşması sonucunda hücre ölümü meydana gelmektedir (Şekil 2.14) [67].



Şekil 2.14: Partanatoz ölüm yolağı mekanizması (Çizimler Biorender uygulaması kullanılarak yapılmıştır.)

Yapılan araştırmalarda, MIF proteininin partanatozda önemli bir rol oynayan bir AIF bağlayıcı protein olduğunu ortaya konulmaktadır. AIF proteini DNA'yı parçalamak için spesifik bir nükleaz aktivitesine sahip değildir, MIF ise DNA parçalanmasında işlev gören hem 3' eksonükleaz hem de endonükleaz aktivitelere sahiptir. Bunun yanı sıra AIF deplesyonu, çekirdeğe MIF translokasyonunun azalmasıyla sonuçlanırken, MIF deplesyonu, AIF'nin çekirdeğe translokasyonunu engellememektedir. Bu durum *in vivo* koşullarda MIF translokasyonu için AIF'nin gerekli olduğunu göstermektedir [68, 69]. Genel olarak bakıldığında, partanatozun temel özellikleri arasında hızlı PARP-1 aktivasyonu, erken PAR birikimi, hücrel NAD<sup>+</sup> ve ATP tükenmesi, mitokondriyal depolarizasyon, mitokondriden AIF salınımı, MIF alımı, AIF/MIF kompleksinin nükleer translokasyonu ve DNA hasarına yanıt olarak DNA parçalanması görülmektedir.

#### 2.4.2.2. Nekroptoz

Nekroptoz, ölüm reseptörlerinin aracılık ettiği programlanmış bir nekroz olarak tanımlanmaktadır. Nekroz ve apoptoz ölüm yollarına benzerliği sebebiyle bu iki ölüm yolağının hibriti olarak kabul edilmekte ve adını ikisinden almaktadır. Poksvirüsler gibi bazı virüsler, spesifik enzimler ile konak hücre içerisindeki kaspazları parçalayabilmekte ya da

aktivitelerini inhibe edebilmektedir. Bu durumda konak hücre ölmek için apoptoz mekanizmasını kullanamamakta, nekroptoz ile hücre ölümü gerçekleşmektedir [70].

Bu ölüm yolağı hücrelerin morfolojisinde meydana gelen değişiklik açısından nekroza benzemektedir. Hücrenin şişmesi, membran hasarı ve nükleer yoğunlaşma her iki ölüm yolağında da gözlemlenen ortak morfolojik özelliklerdendir. Nekroptozun nekrozdaki farkı ise sinyal yolları aracılığıyla programlanmış bir hücre ölüm türü olmasıdır. Bu açıdan apoptoz ile benzerliğe sahip olmasına rağmen sinyal yolağında kaspazların yer almaması iki ölüm yolağını birbirinden ayırmaktadır. Mekanizmasında kaspaz kullanılmadığı için bu ölüm yolağı kaspaz bağımsız ölüm yolağı olarak sınıflandırılmaktadır.

Nekroptozun sinyal yolağı apoptozun dışsal yolağına benzemektedir. Nekroptoz, TNF ailesi reseptörleri, toll benzeri reseptörler (TLR3 ve TLR4) ve interferon reseptörleri tarafından başlatılabilirken, tümör nekroz faktörü reseptör 1 (TNFR1) aracılı nekroptoz mekanizması günümüzde daha iyi karakterize edilmiştir. Tetikleyici faktörlere göre, nekroptoz üç kategoride sınıflandırılabilir:

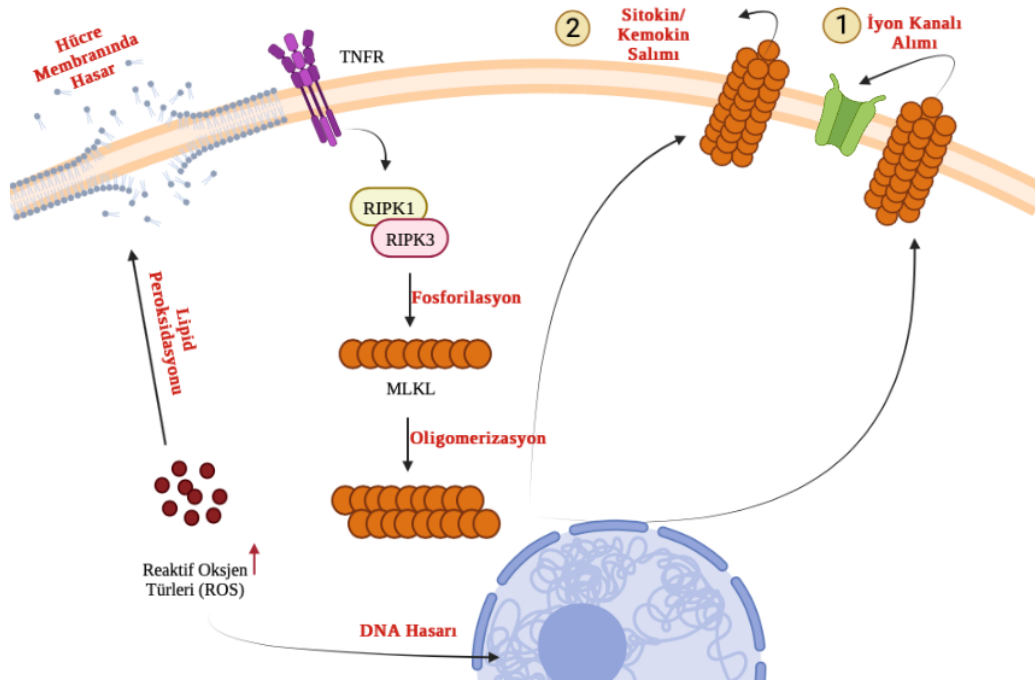
- (1) TNF- $\alpha$  tarafından uyarılan ekstrinsik (dışsal) nekroptoz,
- (2) ROS tarafından uyarılan içsel nekroptoz,
- (3) İskemi aracılı içsel nekroptoz.

Sinyal molekülleri ile tetiklenen bu yolda, hücre dışındaki ölüm sinyalleri TNFR'a bağlanır. Daha sonrasında TNFR, reseptör etkileşimli protein kinaz 3 (RIPK3) ve reseptör etkileşimli protein kinaz 1 (RIPK1) enzimlerinden oluşan kompleksin aktifleşmesini sağlar ve aktifleşen bu kompleksteki RIPK3, psödokinaz karışık-soy kinaz domain benzeri (MLKL) proteinin fosforilasyonunu sağlar. Fosforile MLKL proteini bir diğer MLKL proteinleri ile oligomer bir yapı oluşturur. Oluşan bu oligomer yapı hücre membranına entegre olur. Oligomer MLKL iki şekilde etki edebilir:

(1) Na<sup>+</sup> iyonu veya Ca<sup>++</sup> kanallarının membrana alımı için hücre membranında bir platform görevi görür ya da,

(2) fosfotidil inositol fosfatın amino terminali ile etkileşerek plazma zarında por oluşumunu sağlar. Bu sayede çeşitli sitokinler veya kemokinler hücre dışına salınırken, membrandaki iyon kanallarından bazı iyonlar hücre içerisine girer. Bu durum hücre içinde ROS miktarının artmasına sebebiyet verir. Artan ROS, hem lipit peroksidasyonuna neden olarak hücre membranında hasar yaratır hem de DNA hasarına sebep olur (Şekil 2.15) [71].





Şekil 2.15: Nekroptoz ölüm yolağının moleküler mekanizması (Çizimler Biorender uygulaması kullanılarak yapılmıştır.)

### 2.4.3. Alerjik Astım ve Alerjik Rinit Koşullarında Hücre Ölümü

Alerjik astım ve rinit koşullarında immün hücrelerden salgılanan çeşitli toksik proteinlerle ya da alerjenlerin başlatmış olduğu çeşitli sinyal yolları ile hücrede farklı ölüm türleri tetiklenmektedir. Literatürde, uyarım yapılan alerjenlerin konsantrasyonu ve zamanına bağlı olarak epitel hücrelerde döküntü/ölüm rapor edilmiştir[72]. Epitel hücrede gerçekleşen ölüm, apoptoz yolu ile kaspaz bağımlı yollar üzerinden gerçekleşebilirken bazı durumlarda ise kaspaz bağımsız olan nekroz, partanatoz ve anoikis gibi ölüm yolları üzerinden de gerçekleşebilmektedir. Alerjenlere maruz kalma sebebiyle epitel hücrelerde ölüm gözlenmesi, epitel bariyer bütünlüğüne zarar verebilir. Bu durum alerjik yanıtın artmasına ve inflamasyonun şiddetlenmesine neden olabilir.

2009 yılında Chun-Yu ve arkadaşları tarafından yayınlanan bir çalışmada, BEAS-2B (bronş epitel hücre hattı) eozinofiller ile ko-kültüre alınmış ve Der p1 ile uyarılmıştır. 0,5 µg/mL doz ile 24 saat boyu Der p1 uyarımına maruz kalan epitel hücrelerde akış sitometrisi deneyi ile apoptoz gözlemlenmiştir [73]. Sidra ve arkadaşları tarafından 2013 yılında yapılan

bir başka çalışmada ise, primer bronş ve nazal epiteller 25 µg/mL HDM ile 72 saat boyunca uyarılmıştır. Bu uyarım sonucunda her iki hücrede kaspaz-3 protein seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlenmiş ve HDM uyarımı sonrası epitel hücrelerin apoptoza uğrayabileceği düşünülmüştür [74]. *Olea europaea* polen ekstraktı ile 2007 yılında yapılan bir başka çalışmada ise uyarılan BALB/c farelerin akciğer dokusunda apoptoza rastlanmıştır [75].

Florian ve arkadaşları tarafından 2018 yılında yapılan bir çalışmada, *Aspergillus fumigatus*'un virülans faktörü olan gliotoxin ile BEAS-2B hücreleri uyarılmıştır. *Aspergillus fumigatus*, immün yetmezliği olan ve genellikle astım hastası olan bazı insanlarda alerjik bronkopulmoner aspergillozis (ABPA) hastalığına sebep olmaktadır. Şiddetli semptomlar ile kendini gösteren bu hastalığın patofizyolojisinde epitel bariyer bütünlüğünün bozulduğu bilinmektedir. Çalışma sonucunda virülans faktör ile uyarımın bronş epitel hücreleri anoikis ölüm yolağına sürüklediği gözlemlenmiştir [72].

Partanatoz, poly(ADP-riboz) polimeraz 1'in (PARP-1) hızlı aktivasyonu, PAR polimerinin sentezi ve birikmesi, mitokondriyal depolarizasyon, nükleer AIF translokasyonu gibi biyokimyasal olaylarla ilişkilidir. Yapılan bazı çalışmalar, insanlarda astım ve alerjik rinit ile PARP'ların genetik bir korelasyonu olduğunu göstermiştir [76]. PARP izoenzimlerinden biri (PARP1) ile ilgili yapılan bir çalışmada, 122 Türk astım hastası ve aynı coğrafi bölgeden gelen 180 normal kontrol karşılaştırılarak analiz edilmiştir. Ek olarak polimeraz zincir reaksiyonu bazlı restriksiyon analizleri yapılarak bu iki grup arasındaki PARP1 polimorfizmi tanımlanmıştır. Yapılan çalışmanın sonucunda ise, yabancı tip PARP1 762 V aleli ile astım geliştirme riski arasında pozitif bir korelasyon olduğu gösterilmiştir [77]. Başka bir çalışmada ise, 110 alerjik rinit hastası ve 130 sağlıklı kontrol kullanılarak PARP1 gen promotörünün tek nükleotid polimorfizminin hastalık ile ilişkili olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda, polimorfizm promotörünün heterozigot genotipinin, alerjik rinite duyarlılık ile önemli ölçüde ilişkili olduğu görülmüştür [78]. Zaffini ve arkadaşlarının 2016 yılında yayınladıkları başka bir çalışmada ise, HDM ile indükledikleri kronik astım modelinde PARP-1 enzimi inhibe edilmiş ve bunun sonucunda hava yolu yeniden yapılandırılma sürecinin etkilendiği gözlemlenmiştir [79].

Epitelyal hücre ölümünün düzenlenmesi, bariyer yüzeylerinde immün homeostazi kontrol eden kilit bir mekanizmadır. Nekroptoz, farklı dokularda inflamatuvar yanıtla neden olduğu gösterilen RIPK3 tarafından indüklenen bir tür düzenlenmiş nekrotik hücre ölümüdür.

Nikos ve arkadaşlarının 2021 yılında HDM kaynaklı astımlı fare modeli ile yaptıkları bir çalışmada, hava yolu epitel hücrelerinde gerçekleşen nekroptozun hava yolu alerjik inflamasyonunu şiddetlendirdiği tespit edilmiştir. Aynı çalışmada araştırmacılar epitel hücre nekroptozunun, solunum yolu virüsü enfeksiyonlarının neden olduğu astım alevlenmelerine de katkıda bulunabileceğini savunmuşlardır [80].

## **2.5. Epitelyal Mezenkimal Dönüşüm (EMT)**

Epitel hücrelerinin epitelyal özelliklerini aşağı regüle edebildiği ve mezenkimal özellikler kazanabildiği fikri, 1980'lerin başında Elizabeth Hay tarafından ortaya atılmıştır. Cıvciv embriyolarında yapılan incelemeler sonucunda bazı epitel hücrelerin mezenkimal karaktere geçiş yapabildiği gözlemlenmiştir [81]. Epitel hücrelerin, epitelyal özelliklerinin aşağı regülasyonunu takiben mezenkimal bir karakter kazandığı bu geri dönüşümlü hücre sel sürece epitelyal mezenkimal dönüşüm (EMT) adı verilmektedir. EMT, hücrelerin mikro-ortamlarından aldığı sinyallere yanıt olarak tetiklenmektedir. Bu süreçte gen ekspresyonu ve translasyonu sonrası regülasyon mekanizmalarındaki değişiklikler, epitelyal özelliklerin baskılanmasına ve mezenkimal özelliklerin kazanılmasına yol açmaktadır. EMT'de hücreler fibroblast benzeri morfoloji kazanırken aynı zamanda hücrelerin göç kapasitesinde artış meydana gelmektedir. Ayrıca, artık göç eden bu hücreler sıklıkla istilacı özellikler kazanmaktadır [82]. EMT'nin, çeşitli morfogenetik olayları mümkün kılmak için erken embriyonik gelişim sırasında ve yetişkinlerde yara iyileşmesi sırasında normal olarak meydana geldiği yaygın olarak kabul edilmektedir. Bunun yanı sıra, EMT'nin kanser patogenezi ve doku fibrozu sırasında aktive olduğu da bilinmektedir [83].

### **2.5.1. EMT'nin Moleküler Mekanizması**

Epitel hücreler apikal-bazal polarite göstermekle birlikte, hücreler arası bağlantılar sayesinde birbirlerine bağlanmakta ve iletişim kurmaktadır. Bu hücreler arası bağlantılar epitel hücrelerin bazal bir membran üzerine konumlanmasını sağlamaktadır. Hücreler arası bağlantılar; sıkı bağlantılar, adheren bağlantılar, desmozomlar ve oluklu bağlantılardan (gap junction) oluşmaktadır (Şekil 2.2). EMT sürecinin başlangıcında bu bağlantıların yapısı bozulmaktadır ve yapısı bozulan bağlantı proteinleri ise yeniden lokalize olabilmekte veya proteinler tamamen kaybedilebilmektedir [84]. Genel olarak EMT sürecindeki önemli olaylar;

- Epitelyal hücre-hücre bağlantılarının bozulması,

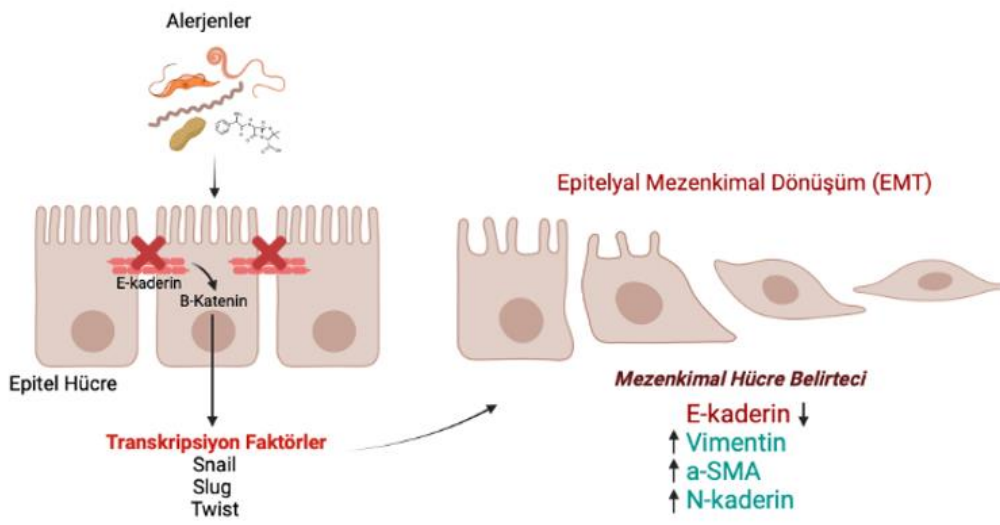
- Apikal-bazal polaritenin kaybedilmesi,
- Hücre iskeleti yapısının yeniden düzenlenmesi ve hücre şeklinde değişiklik meydana gelmesi,
- Epitelyal belirteçlerin aşağı regülasyonu ve mezenkimal fenotipin tanımlanmasına yardımcı olan genlerin aktivasyonu,
- Hücre çıkıntılarının ve hareketliliğinin artması,
- Hücrelerin istilacı davranışı etkinleştirmek için hücre dışı matris (ECM) proteinlerini parçalama yeteneği kazanmasıdır.

EMT'nin ayırt edici özelliği, adheren bağlantıların destabilizasyonunu sağlamak için E-kadherinin gen ekspresyonunun azalmasıdır. Bunu yanı sıra, kludin, okludin, desmoplakin ve plakofilin proteinlerini kodlayan genlerin baskılanması, apikal sıkı bağlantıların ve desmozomların bozulmasını sağlamaktadır. Gen ekspresyonundaki bu değişiklikler epitelyal hücre-hücre bağlantılarının de novo oluşumunu engellemekte ve epitelyal bariyer fonksiyonunun kaybıyla sonuçlanmaktadır. Bu süreçte, epitel hücre bağlantı proteinlerini kodlayan genlerin baskılanması ile birlikte mezenkimal fenotipe ait olan genlerin ekspresyonları artmaya başlamaktadır. Spesifik olarak, E-kadherinin aşağı regülasyonu N-kadherinin ekspresyonunun artmasıyla dengelenir ve bu durum 'kaderin dönüşümü' (cadherin switch) olarak adlandırılmaktadır. Bu dönüşüm sayesinde, EMT sürecine girmiş olan epitel hücreler diğer epitel hücreleriyle olan bağlantılarını kaybetmekte ve N-kadherin etkileşimi yoluyla mezenkimal hücreler için bir afinite kazanmaktadır. N-kadherin etkileşimi, E-kadherin etkileşimlerinden daha zayıf olduğu için hücrenin göçü ve istilasını da kolaylaştırmış olur [84].

Hücre iskeletini ve polaritesini sağlayan proteinlerini kodlayan genlerin ifadesindeki değişiklikler de EMT'ye katkıda bulunmaktadır. Ara filament bileşimi, sitokeratinin baskılanması ve vimentin ifadesinin aktivasyonu ile değişmektedir. Keratin ve vimentin filamentlerinin, ortak özellikleri organellerin ve zarla ilişkili proteinlerin taşınmasını düzenlemek olsa da hücre zarında hedefledikleri proteinler farklılık göstermektedir. Bu sebeple ara filament bileşimindeki değişiklikler, büyük olasılıkla vimentinin motor proteinlerle etkileşimi aracılığıyla hücre hareketliliğini sağlamaktadır [84].

EMT'yi indükleyen transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu ve aktivasyonu, dönüştürücü büyüme faktörü  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), kemik morfogenetik proteini (BMP), epidermal büyüme faktörü (EGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü

(PDGF), Wnt, Sonic Hedgehog, Notch ve intergin sinyali gibi çeşitli sinyal yollarına yanıt olarak meydana gelmektedir [85]. Bu yollar, EMT ile ilişkili genlerin ekspresyonunu aktive eden transkripsiyon faktörlerini indüklemek için hücre içi kinaz basamakları aracılığıyla sinyal vermektedir. Farklı alerjenlere maruz kalındığında epitel hücreler arasındaki sıkı bağlantı molekülleri parçalanabilir ve bu durumda  $\beta$ -katenin sitozole salınarak sinyal yollarını aktive eder (Şekil 2.16). Aktive olan yollar sonucunda Snail, Slug, Twist gibi transkripsiyon faktörlerinin ifadesi artar ve bu faktörler mezenkimal hücrenin biyobelirteçlerinin (N-kaderin, vimentin,  $\alpha$ -SMA) ifadesinin artmasını sağlar [86].



Şekil 2.16: Alerjen maruziyeti sonrasında EMT mekanizması ve biyobelirteçler (Çizimler Biorender uygulaması kullanılarak yapılmıştır.)

### 2.5.2. EMT'nin Alerjik Astımdaki ve Alerjik Rinitteki Rolü

EMT'nin en önemli uyarıcısı olan büyüme faktörü TGF- $\beta$ , astımlı hastaların bronkoalveolar lavaj sıvısında yüksek miktarda tespit edilmiştir [87]. Elde edilen bu bilgiler epitel hücrelerin astım hastalığı durumunda mezenkimal karaktere dönüşebildiğini göstermekle birlikte, EMT'nin hastalığın ilerlemesinde rol oynayabileceği de düşünülmektedir [88]. HBEC (insan bronş epitel hücre hattı) kullanılarak yapılan bir çalışmada, 72 saat HDM/TGF- $\beta$  uyarımı sonucunda hücrelerde E-kaderin protein seviyesinin azaldığı ve fibroblast spesifik protein 1 (FSP1) seviyesinin arttığı tespit edilmiştir. Bu sonuç 72 saat sonunda hücrelerin mezenkimal karaktere sahip olmaya başladığını göstermektedir [89]. 2010 yılında Irene ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışma da yapılan bu çalışmayı destekler sonuçlar göstermektedir

[90]. 2011 yılında yapılan bir başka çalışmada ise fareler HDM ile uyarılmış ve hava yolu epitel hücrelerinde TGF- $\beta$ 1 seviyesinin arttığı, E-kaderin ve okludin seviyesinin ise azaldığı tespit edilmiştir. Uyarım sonucunda epitel biyobelirteçler azalırken ve mezenkimal proteinlerden vimentin,  $\alpha$ -SMA ve pro-kolajen ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir. Aynı zamanda HDM'ye maruz kalan farelerin solunum yolu epitel hücrelerinde, E-kaderinin transkripsiyonel bir baskılayıcısı ve güçlü bir EMT indükleyicisi olan Snail1'in ekspresyonunun ve nükleer translokasyonunun da arttığını bulunmuştur [91].

Alerjik rinit hastalarının, nazal mukoza dokularında epitel hücre biyobelirteci olan E-kaderin ifadesinde azalmaya karşın, mezenkimal hücre biyobelirteci vimentin ve  $\alpha$ -SMA ifadelerinde artış tespit edilmiştir. Aynı çalışmada alerjik rinit hastalarında TGF- $\beta$  ekspresyonunun sağlıklı bireylere göre daha fazla olduğu gözlemlenmiştir [92]. TGF- $\beta$  ve hipoksi indüklenebilir faktör-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )'nın alerjik rinit patogenezinde önemli bir rol oynadığı düşünülmekte ve bunların bir EMT indükleyicisi olduğu bilinmektedir [93]. Fakat EMT'nin alerjik rinit patogenezindeki rolü astıma göre daha az çalışılmıştır ve detaylı bir araştırmaya literatürde rastlanmamıştır [88].

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan BEAS-2B (insan sağlıklı bronş epitel) hücre hattı (katalog numarası: CRL-9609) ve RPMI-2650 (insan nazal epitel) hücre hattı (katalog numarası: CCL-30) American Type Cultural Collection (ABD) firmasından ticari olarak satın alınmıştır. Ko-kültür deneylerinde kullanılacak eozinofil hücre hattı EoL-1 DSMZ (katalog numarası: ACC386, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Rekombinant Cup a1 (katalog numarası: MBS1353993) ve Der p6 (katalog numarası: MBS1061377) alerjenleri MyBiosource (San Diego, ABD) firmasından temin edilmiştir. Kontaminasyon testleri için kullanılan Qubit dsDNA HS Assay Kiti (katalog numarası: Q32851) ve Qubit RNA HS Assay Kiti (katalog numarası: Q32852) ThermoFisher (Massachusetts, ABD) firmasından satın alınmıştır. Alerjenlerin proteaz aktivite ölçümleri için kullanılan Pierce Fluorescent Protease Assay Kiti (katalog numarası: 23267) Thermofisher (Massachusetts, ABD) firmasından temin edilmiştir.

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan malzemelerin bilgileri Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1: Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan malzemeler

	Ürün	Firma	Katalog Numarası
Besiyerleri	BEGM	Lonza, İsviçre	CC-3170
	MEM	Sigma, Almanya	M4655
	DMEM	Gibco, ABD	41965
	RPMI-1640	Sigma, Almanya	R8758
Takviye	BEGM Bullet Kit	Lonza, İsviçre	CC-4175
	FBS	Biowest, Fransa	S181H-500
	Penisilin/Streptomisin	Capricorn Scientific, Almanya	PS-B
	Retinoik asit	Sigma, ABD	R2625
	Bütirik asit	Sigma, ABD	B103500
	Tripsin	ThermoFisher, ABD	25200-056
	TNS	Gibco, ABD	CC5002
	Tripan Mavisi	ThermoFisher, ABD	15250061
	PBS	AppliChem, Almanya	A9162

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan 384, 96, 24 kuyucuklu ve 25 ve 75 cm<sup>2</sup>'lik hücre kültür kapları ile floresan ölçümler için kullanılan siyah altı şeffaf 96 kuyucuklu plakalar ise Greiner (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Canlılık/sitotoksikite testleri için

kullanılan MTT (katalog numarası: M2128) Sigma (Almanya) firmasından, LDH test kiti (katalog numarası: 426401) BioLegend (Kaliforniya, ABD) firmasından ve EtBr/Calcein boyası (katalog numarası: 30002-T) Biotium (Kaliforniya, ABD) firmasından satın alınmıştır. Bu deneyler için kullanılan DMSO (katalog numarası: A3672) AppliChem (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

Alerjen ile uyarılan hücrelerde incelenen yanıtlar için kullanılan malzemeler Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2: Alerjen uyarımı sonrasında yapılan deneylerde kullanılan malzemeler

	Ürün	Firma	Katalog Numarası
1	Anoikis Test Kiti	BioVision, ABD	K694
2	RNA İzolasyon Kiti	Thermofisher, ABD	12183018A
3	cDNA Sentez Kiti	Thermofisher, ABD	K1622
4	Power SYBR Green	Thermofisher, ABD	4367659
5	Transwell insert	Corning, ABD	3470
6	ECP ELISA Kiti	BTLab, Çin	E1391Hu
7	MMP9 ELISA Kiti	R&D Systems, ABD	DY902
8	GM-CSF ELISA Kiti	R&D Systems, ABD	DY216-05
9	TNF-a ELISA Kiti	R&D Systems, ABD	DY210-05
10	TGF-B ELISA Kiti	R&D Systems, ABD	DY240-05
11	ELISA DuoSet	R&D Systems, ABD	DY007B

DNA/RNA Fluorometrik ölçümler için Qubit 3.0 Fluorometre cihazı kullanılmıştır. Spektrofotometrik ve floresan ölçümler için Perkin Elmer firmasının (ABD) Multimode Plate Reader cihazı kullanılmıştır. Floresan görüntülerini elde etmek için ise Thermo Fisher firmasının EVOS Flouid floresan mikroskobu kullanılmıştır. cDNA sentezi için GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystem, Massachusetts, ABD) cihazı kullanılmıştır. Gerçek zamanlı PZR, deneylerinin analizleri boyunca Applied Biosystems marka 7500 Fast RT-PCR cihazı kullanılmıştır.

### 3.2. Alerjenlerin Safılık ve Proteaz Aktivite Tayini



### 3.2.1. Qubit DNA ve RNA Test Kiti

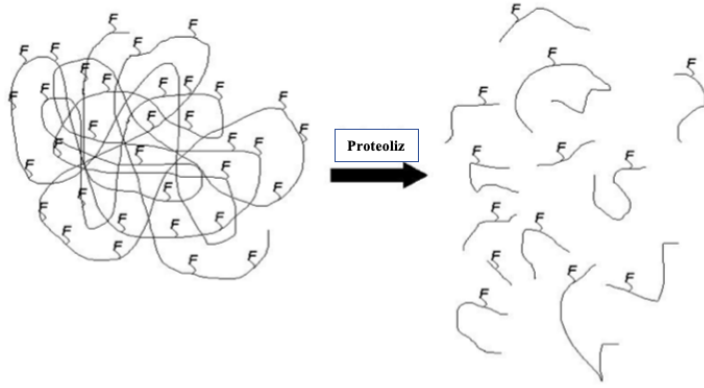
Satın alınan rekombinant Cup a1 ve Der p6 alerjenlerinin içinde DNA veya RNA kontaminasyonu olmadığına emin olmak için alerjenler Qubit 3.0 Fluorometer ile ölçülmüştür. Qubit dsDNA HS (Yüksek Duyarlılık) Test Kiti (ThermoFisher, Q32851), Qubit Fluorometer ile birlikte kullanıldığında, hassas DNA örneklerinin incelenmesi için doğru ve seçici bir yöntem sağlamaktadır. Numune hacmine bağlı olarak, test kiti 0,005 ila 120 ng/μL'lik başlangıç DNA numunesi konsantrasyonları için doğru olacak şekilde tasarlanmıştır ve 0,1–120 ng'lik bir saptama aralığına sahiptir. Qubit RNA HS (Yüksek Duyarlılık) Test Kiti (ThermoFisher, Q32852), Qubit Fluorometer ile birlikte kullanıldığında, düşük konsantrasyondaki RNA örneklerinin incelenmesi için doğru ve seçici bir yöntem sağlamaktadır. Numune hacmine bağlı olarak, test kiti 0,2 ila 200 ng/μL'lik başlangıç RNA örnek konsantrasyonları için doğru olacak şekilde tasarlanmıştır ve 4–200 ng'lik bir saptama aralığı sağlamaktadır. Ölçümler Qubit dsDNA HS Assay Kit ve Qubit RNA HS Assay Kit protokollerine uygun olarak aşağıda belirtildiği şekilde yapılmıştır [94, 95].

1. Örnek ve standartları hazırlamadan önce kit içeriğinde bulunan çalışma solüsyonu 1/200 oranında Qubit tampon ve çalışma reaktifi (working reagent) ile hazırlanmıştır.
2. Kitin içindeki iki standart, 10 μl standart ve 190 μl çalışma solüsyonu içerecek şekilde hazırlanmıştır.
3. Der p6 ve Cup a1 alerjenleri ise, kitin protokolüne uygun olarak 2 μl alerjen ve 198 μl çalışma solüsyonu içerek şekilde hazırlanmıştır.
4. Örnek ve standart içeren tüpler baloncuk oluşturulmadan yaklaşık 3 saniye vortekslenmiştir.
5. Tüpler 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiş, sonrasında sırasıyla standartlar ve örnekler Qubit cihazında ölçülmüştür.

### 3.2.2. Pierce Floresan Proteaz Test Kiti

Satın alınan rekombinant Cup a1 ve Der p6 alerjenleri için proteaz aktivite testi yapılmıştır. Pierce Floresan Proteaz Test Kiti (ThermoFisher, 23267), proteaz aktivitesini değerlendirmek için substrat olarak floresan işaretli bir kazein içermektedir. Bu substratın floresan rezonans enerji transferi (FRET) standart bir fluorometre ile tespit edilebilmektedir. FITC-Kazein, floresan izotiyosiyanat (FITC) kullanılarak etiketlenmiş doğal kazeindir. Bu ağır etiketli,

bozulmamış protein substratının floresan özellikleri, proteazlar tarafından sindirildikten sonra önemli ölçüde değişir ve ölçülebilir bir proteoliz göstergesi ile sonuçlanır. Bu sayede alerjenlerin proteaz aktiviteleri tespit edilebilmektedir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Pierce proteaz aktivite testinin çalışma prensibi [96]

Deney Pierce Fluorescent Protease Assay Kit (Thermofisher, 23267) protokolüne uygun olarak aşağıda belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir [97].

1. Kitin içerisinde bulunan tripsin stok solüsyonu kullanılarak testte kullanılacak standartlar (5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 1,25 µg/ml, 0,625 µg/ml, 0,312 µg/ml, 0,156 µg/ml, 0,078 µg/ml ve kör) PBS içerisinde hazırlanmıştır.
2. 2 µg/ml konsantrasyonunda Der p6 ve Cup a1 alerjenleri PBS kullanılarak hazırlanmıştır.
3. FITC-Casein stok solüsyonu (5 mg/ml) 1/500 oranında PBS ile seyreltilmiştir.
4. Örnekler ve standartlar iki tekrarlı olacak şekilde 384 kuyucuklu plaka içerisine 37,5 µl eklenmiştir.
5. Örnek ve standartların üzerine 37,5 µl FITC-Casein çalışma solüsyonu ilave edilmiştir.
6. Plaka çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir.
7. İnkübasyon süresinin sonunda mikropilaka okuyucu eksitasyon (Ex): 485 nm/Emisyon: 538 nm'ye ayarlanarak ölçüm alınmıştır.

### **3.3. Hücre Canlılığı ve Sitotoksosite Analizi**

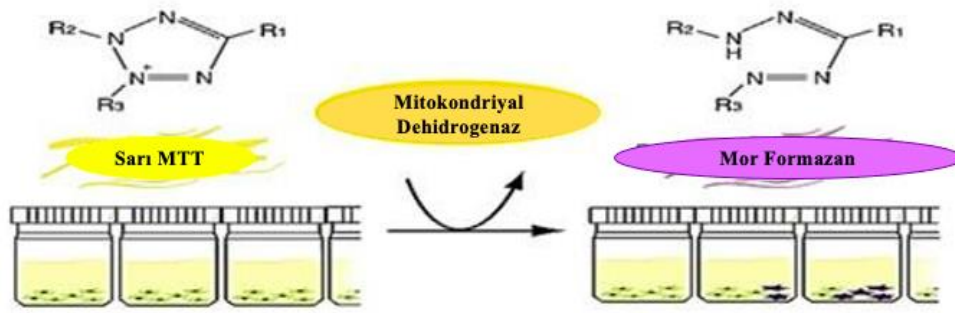
#### **3.3.1. BEAS-2B ve RPMI-2650 Hücre Hatlarının Büyütülmesi**

BEAS-2B, bronş epitel büyüme besiyerine (BEGM), hidrokortizon (0,5 mg/mL), insülin (5 mg/mL), transferrin (10 mg/mL), epinefrin (0,5 mg/mL), triiodotironin (6,5 mg/mL), gentamisin (50 mg/mL), amfoterisin-B (50 mg/ mL), retinoik asit (0,1 ng/mL) ve EGF (epidermal growth factor) ilave edilmiş ve hücre hattı bu besiyeri içinde T25 flaskta %5 CO<sub>2</sub> atmosferinde 37°C'de inkübatörde büyütülmüştür [98]. RPMI-2650, minimum temel ortam besiyerine (MEM), %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin ilave edilmiş ve hücre hattı bu besiyeri içinde T25 flaskta %5 CO<sub>2</sub> atmosferinde 37°C'de inkübatörde büyütülmüştür [99]. Kullanılan hücre hatları ile yapılan deneyler 3. ve 8. pasajlar arasındaki hücreler kullanılarak yapılmıştır.

Canlılık deneylerinde kullanılmak üzere %80 konfluente ulaşan hücrelerin üzerinden eski besiyeri çekilip uzaklaştırılmış ve flask PBS ile bir kere yıkandıktan sonra tripsin enzimi ile 5 dakika inkübatörde bekletilmiştir. Sonrasında tripsinin etkisi tripsin nötralize edici solüsyon (TNS) kullanılarak durdurulmuş ve 1500 rpmde 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti uygun besiyerleri ile çözülmüştür. Tripin mavisi boyama yöntemi kullanılarak hücreler thoma lamında sayılmıştır [99]. Sonrasında yeterli sayıda hücre, canlılık deneyleri için 96-kuyucuklu plakaya, immünofloresan ve gerçek zamanlı PZR deneyleri için ise 24-kuyucuklu plakaya ekilmiştir.

#### **3.3.2. MTT Hücre Canlılık Testi**

MTT testi, hücre canlılığının, çoğalmasının ve sitotoksitenin bir göstergesi olarak hücre metabolik aktiviteyi ölçmek için kullanılmaktadır. Kolorimetrik sonuç veren bu test, metabolik olarak aktif hücreler tarafından sarı bir tetrazolyum tuzunun (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür veya MTT) mor formazan kristallerine dönüştürülmesi prensibine dayanmaktadır. Canlı hücreler, MTT'yi formazana indirgeyen NAD(P)H'a bağlı mitokondriyal dehidrogenaz enzimleri içerirler ve bu sayede canlı hücreleri fazla olan koşullarda daha fazla çökmüş mor formazan kristaline rastlanır [100]. Çözünmeyen formazan kristalleri, DMSO'da çözülür ve elde edilen renkli solüsyon, spektrofotometre kullanılarak 570 nm absorbansta ölçülür (Şekil 3.2).



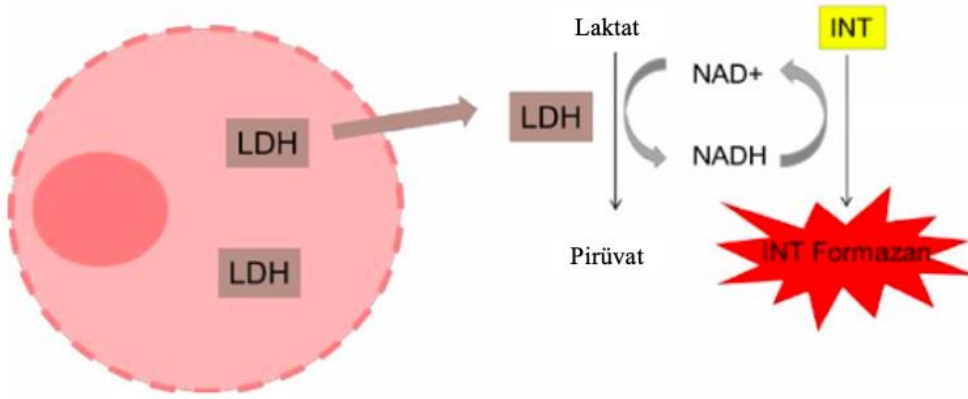
Şekil 3.2: MTT testi çalışma prensibi [101]

RPMI-2650 (#4) ve BEAS-2B (#3) hücre hatları %80 konflüente ulaştıktan sonra MTT hücre canlılık deneyi aşağıdaki protokolda belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir [102].

1. Kuyucuklardan eski besiyeri uzaklaştırılmıştır.
2. Hücreler 2 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml ile 8, 24 ve 72 saat uyarılmıştır.
3. Uyarım süresi bittiğinde kuyucuklardan eski besiyeri uzaklaştırılmıştır.
4. 100 µl yeni hazırlanan besiyeri kuyucuklara eklenmiştir.
5. 13 µl MTT solüsyonu (5 mg/mL) kuyucuklara eklenmiştir.
6. Plaka etüvde 2 saat boyunca inkübe edilmiştir.
7. Kuyucuklardan solüsyon uzaklaştırılmış ve 150 µl DMSO eklenerek oluşan çökeltili çözülmüştür.
8. 570 nm'de plaka okuyucuda ölçüm alınmıştır.

### 3.3.3. LDH Testi

LDH-Cytox Assay™ Kiti, hasarlı hücrelerden salınan laktat dehidrogenaz (LDH) aktivitesini ölçerek sitotoksisiteyi belirleme prensibi ile çalışan bir kittir. Laktat dehidrogenaz normal koşullarda sitoplazmada bulunan bir enzimdir ve hücre hasar aldığı/nekroza gittiği durumlarda dışarı salınır. LDH, laktatın piruvata dehidrogenazını katalize ederek NAD<sup>+</sup> molekülünü NADH'ye indirir [103]. NADH, turuncu bir formazan boyası üretmek için bir elektron aracısının varlığında suda çözünür tetrazolyum tuzunu indirir. Nekroza uğrayan hücrelerde turuncu formazan boyası daha fazla olmakta ve hücrenin sitotoksisitesi belirlenebilmektedir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: LDH testinin çalışma mekanizması [104]

RPMI-2650 (#4) ve BEAS-2B (#3) hücre hatları %80 kaplama oranına ulaştıktan sonra deney başlatılmıştır. Deney Biolegend LDH Assay Kit (BioLegend, Katalog numarası: 426401) protokolüne uygun olarak aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir [105].

1. Kuyucuklardan eski besiyeri uzaklaştırılmıştır.
2. Hücreler 2 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml ile 8, 24 ve 72 saat uyarılmıştır.
3. Uyarım süresi bitmeden hemen önce kontrol kuyucuklarından birine lizis tamponu eklenmiş ve 20 dakika etüvde inkübe edilmiştir.
4. Süpernatantlardan 50 µl alınıp 96 kuyucuklu plakaya eklenmiştir.
5. Üzerine 50 µl çalışma solüsyonu (working solution) eklenmiş ve karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir.
6. Süre bitiminde kuyucukların üzerine 25 µl durdurma solüsyonu (stop solution) eklenmiştir.
7. Plaka 490 nm’de plaka okuyucuda okutulmuştur.

### 3.3.4. Etidyum Bromür / Kalsein (EtBr/Calcein) İkili Floresan Boyama

EtBr/Calcein ikili boyama testinde, canlı hücrelerde hücre içi esteraz aktivitesini ve ölü hücrelerde bozulan plazma zarı bütünlüğünü saptayan iki prob kullanılmaktadır. Esteraz substratı kalsein AM canlı hücreleri yeşil boyarken, canlı hücrelerde zardan geçemeyen DNA boyası etidyum homodimer III (EthD-III) ölü hücreleri kırmızı boyamaktadır [106]. Canlı yeşil renkli hücreler ve ölü kırmızı renkli hücreler floresan mikroskobu kullanılarak tespit edilmektedir. RPMI-2650 (#4) ve BEAS-2B (#3) hücre hatları %80 konflüente ulaştıktan sonra

ikili boyama deneyi başlatılmıştır. Hücreler 2 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml ile 8, 24 ve 72 saat uyarılmış ve Etidyum Bromür / Kalsein İkili Floresan Boyama aşağıdaki protokol uygulanarak gerçekleştirilmiştir [107].

1. Uyarım süresi bitmeden EtBr/Calcein boyası hazırlanmıştır. Bunun için 500 µl PBS içerisine 0,25 µl Calcein ve 1 µl EtBr eklenmiştir.
2. Uyarım süresi bittiğinde hücreler PBS ile 1 kere yıkanmıştır.
3. Kuyucuk başına 50 µl boya karışımından eklenmiş ve plaka oda sıcaklığında karanlıkta 2 dakika inkübe edilmiştir.
4. Floresan mikroskop kullanılarak görüntüleme yapılmıştır. Her kuyucuktan bütün kuyucuğu yansıtacak şekilde en az 4 görüntü alınmıştır.

### **3.4. Monokültürde Artan Doz ve Sürede Alerjen ile Hücrelerin Uyarılması, Ölüm Yolakları ve EMT Yolağının İncelenmesi**

#### **3.4.1. Hücrelerin Belirlenen Doz ve Sürede Alerjenler ile Uyarılması**

BEAS-2B ve RPMI-2650 hücreler %80 konfluente ulaşıncaya kadar T25 flaskta büyütülmüştür. RPMI-2650 (#5) hücresi kuyucuk başına 100.000 hücre, BEAS-2B (#3) hücresi ise kuyucuk başına 30.000 hücre olacak şekilde 48-kuyucuklu plakaya ekim yapılmıştır. Hücreler %80 kaplama oranına ulaştıklarında canlılık/sitotoksisite testleri sonucunda belirlenmiş uygun doz ve saatlerde alerjen ile uyarılmıştır. Uyarım süresinde sonunda hücre süpernatantları ELISA deneyi için -80°C’de saklanmış, uyarılan hücrelerden ise gen ifadesinin tespiti için RNA izolasyonu yapılmıştır.

#### **3.4.2. RNA İzolasyonu**

RPMI-2650 ve BEAS-2B hücre hatları %80 konfluente ulaştıktan sonra deney başlatılmıştır. Hücreler belirlenen doz ve sürelerde alerjen ile uyarılmıştır. RNA izolasyonu PureLink RNA Mini (12183018A) kitin protokolüne uygun olarak yapılmıştır [108].

1. Kuyucuklardan süpernatant uzaklaştırılmış ve bir kere PBS ile yıkanmıştır.
2. Kuyucuk başına 200 µl lizis tamponu eklenmiş ve pipetaj yapıp eppendorfa aktarılmıştır.
3. Eppendorflara 200 µl soğuk etanol eklenmiştir. Pipetaj ile karışmaları sağlanıp solüsyon kolona aktarılmıştır.
4. Kolon santrifüjlenmiş ve altta kalan solüyon uzaklaştırılmıştır.

5. 500 µl yıkama solüsyonu 1 (wash buffer I) kolona eklenmiş, kolon santrifüjlenmiş ve altta kalan solüyon uzaklaştırılmıştır.
6. 500 µl yıkama solüsyonu 2 (wash buffer II) kolona eklenmiş, kolon santrifüjlenmiş ve altta kalan solüyon uzaklaştırılmıştır.
7. Altıncı aşama tekrarlanmış ve sonrasında kolon steril bir eppendorfun içine alınarak 50 µl elüsyon solüsyonu (elution buffer) eklenmiş ve santrifüjlenmiştir.
8. İzole edilen RNA örnekleri nanodrop kullanılarak ölçülmüştür.

### 3.4.3. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

cDNA, enzim reverse transkriptaz (RTase) tarafından katalize edilen bir reaksiyonda, RNA şablonundan sentezlenir. cDNA sentezi, gerçek zamanlı PCR metodu kullanılan gen ekspresyon çalışmaları gibi birçok moleküler biyoloji tekniğinin ilk adımıdır. cDNA sentezi için Thermo Fisher-RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kiti (K1622) kullanılmıştır [109]. İzole edilen RNA örnekleri gerçek zamanlı PZR'de kullanılmak için cDNA'ye çevrilmiştir.

1. İzole edilen RNA'ların konsantrasyonlarına göre hesaplama yapılmış ve belirlenen miktar PZR tüplerine eklenmiştir.
2. RNA örneklerinin konulduğu PZR tüplerine hesaplanan miktarda distile su ve 1 µl OligodT ilave edilmiştir.
3. PZR cihazı 65°C 5 dakikaya ayarlanmış ve örnekler 5 dakika boyunca PZR cihazında tutulmuştur.
4. Süre bitiminde PZR tüplerine reaksiyon tamponu, dNTP, reverse transkriptaz ve ribolock RI eklenmiştir.
5. PZR cihazı 42°C 60 dakika, 70°C'de 5 dakikaya ayarlanmış ve 1 döngüde tutulmuştur.
6. Sentezlenen cDNA örnekleri nanodrop kullanılarak ölçülmüştür.

### 3.4.4. Gerçek Zamanlı PZR

Gerçek zamanlı PZR için Power SYBR Green PCR (4367659) kiti kullanılmış ve ABI 7500 fast cihazı ile deney gerçekleştirilmiştir [110]. Sentezlenen cDNA örnekleri konsantrasyonlarına göre hesaplanmış ve steril su ile seyreltilerek deneyde kullanılmıştır. Kaspaz bağımlı/bağımsız ölüm yollarına ait *Cas3*, *Cas8*, *Cas9*, *Bcl-2*, *Bmf*, *Bit-1*, *AIF*, *PARP1*, *RIPK3*, *MLKL*, EMT yolağına ait *E-kaderin*, *Vimentin*, *a-SMA* ve kontrol olarak

kullanılacak peptidylprolyl izomeraz A (*PPIA*) ve  $\beta$ 2-mikroglobulin (*B2M*) genlerine gerçek zamanlı PZR kullanılarak bakılmıştır.

1. Uygun oranda seyreltilen cDNA örneklerinden 3  $\mu$ l 96 kuyucuklu gerçek zamanlı PZR plakasına eklenmiştir.
2. SYBR Green, ileri primer (forward), geri primer (reverse) ve steril su içeren karışımdan kuyucuk başına 7  $\mu$ l eklenmiştir.
3. Gerçek zamanlı PZR cihazı denatürasyon ve primer bağlanma/uzama aşamaları 40 döngüye Çizelge 3.3'teki koşullar ile ayarlanmış ve sonuçlar delta-delta Ct metodu ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) ile analiz edilmiştir.
4. Deneyde ifadesi incelenen genler için tasarlanan primerler Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.3: Gerçek zamanlı PZR döngü koşulları

<i>Aşama</i>	<i>Sıcaklık</i>	<i>Zaman</i>
Isı Aktivasyonu	95°C	10 dakika
Denatürasyon	95°C	15 saniye
Primer Bağlanması/Uzama	60°C	1 dakika

Çizelge 3.4: Gerçek zamanlı PZR ile gen ifadesine bakılacak genlerin primer sekansları

<i>Gen</i>	<i>İleri Primer (5'-3')</i>	<i>Geri Primer (5'-3')</i>
<i>CAS3</i>	CCTCAGAGAGACATTCATG	GCAGTAGTCGCCTCTCTGA
<i>CAS8</i>	AGAGTCTGTGCCCAAATCAC	GCTGCTTCTCTCTTTGCTGAA
<i>CAS9</i>	AGCCAGATGCTGTCCCATAC	CAGGAGACAAAACCTGGGAA
<i>BCL2</i>	GTGGTGGAGGAACTCTTCAG	GTTCCACAAAGGCATCCCAG
<i>BMF</i>	TGCCTTGTGGGGTGA CTGA	TGGGCAAGACTGCTGGGAA
<i>PTRH2</i>	ATGCCCTCAAATCCTTGGT	CATGCCACAAGCAACTCCAA
<i>AIF</i>	AAGCACGCTCTAACATCTGG	TTCTCCAGCCAATCTTCCAC
<i>PARP1</i>	AGAGTATGCCAAGTCCAACAG	TCAATCATGCCTAGCTGTGG
<i>RIPK3</i>	GCTACTTGGCCCCAGAACT	CAGCAAGCACTGCCACAT
<i>MLKL</i>	AGATTGGACGCACACCCT	CCGTTTGTGGATGACCTGG
<i>PPIA</i>	TCTTTCAC TTTGCCAAACACC	CATCCTAAAGCATACGGGTCC
<i>B2M</i>	GGCATTCTGAAGCTGACAG	TGGATGACGTGAGTAAACCTG



<i>CDH1</i>	ACCGCTCGAGCCCAGGAGTT	CCGCAAGCTTACAGGTGGT
<i>CDH2</i>	AGTGCGGAGATCCTACTG	ACAGTAAGGACAAACATCCTAT
<i>SNAIL</i>	GCGAGCTGCAGGACTCTAA	GAGGATCTCCGGAGGTGG

### 3.4.5. Anoikis Ölçümü

Anoikis, hücrelerin hücre dışı matris (ECM) ile olan bağlantılarının kopmasından kaynaklanan bir hücrel apoptoz şeklidir. Hücrelerin yanlış ECM bağlanması veya ECM'den kopması, normal hücrelerde hücre büyümesini ve farklılaşmasını etkileyebilmektedir [111]. Anoikis test kiti (Katalog numarası: K694), fluorometrik (Calcein AM) reaktifleri içeren ve anoikis koşullarını taklit eden bir kittir. 96 kuyucuklu plakanın tabanını kaplayarak, uyarım sonrası ECM bağlantısı kopan hücrelerin belirlenmesini sağlamaktadır. Anoikis testi için Anoikis Assay Kiti (BioVision, K694) kullanılmıştır [112]. RPMI-2650 ve BEAS-2B hücre hattı T25 flaskta %80 kaplama oranına ulaşana kadar büyütülmüş ve hücre kültür yönteminde belirtildiği gibi hücreler kaldırıp sayılmış, kitin önerdiği hücre sayısı ile hücreler anoikis chamber ekilmiştir. Deney kitin protokolüne uygun olarak aşağıda belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

1. Belirlenen doz ve zamanlarda hücreler alerjenler ile uyarılmıştır.
2. Uyarım süresi bittiğinde kuyucuk başına 2 µl Calcein AM boyası ilave edilmiştir.
3. Plaka etüvde 30-60 dakika aralığında inkübe edilmiştir.
4. Süre bitiminde floresan mikroskopta görüntü alınmış ve plaka, plaka okuyucuda okutulmuştur.

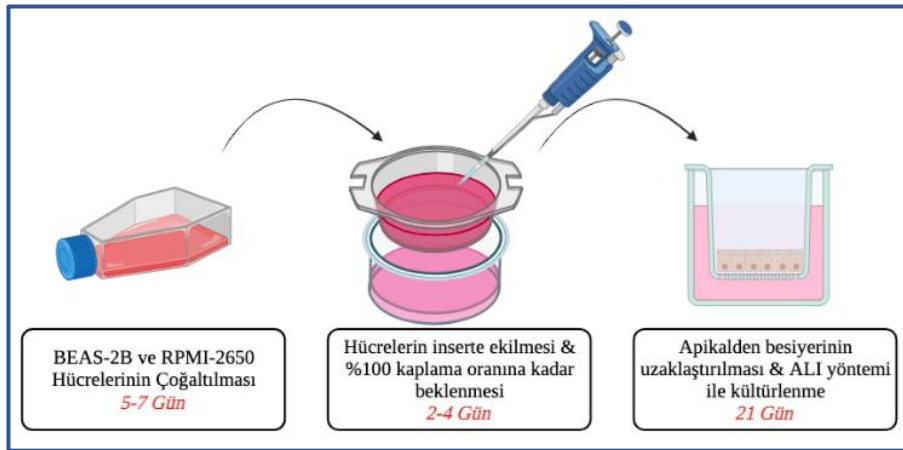
### 3.5. Air Liquid Interface (ALI) Kültürü Yöntemiyle Akciğer Bronş Epitel Hücre Hattının (BEAS-2B) ve Nazal Epitel Hücre Hattının (RPMI-2650) Büyütülmesi

Hava-sıvı arayüz (ALI) kültür yöntemi *in vitro* solunum yolu epiteli hücrelerini taklit etmek için kullanılmakta olan bir yöntemdir [113]. ALI kültürü oluşturmak için epitel hücreler, gözenekli membranların üzerine ekilir. İlk çoğalma periyodundan sonra, kültür ortamı, hücreleri çevreleyen havaya maruz bırakarak epitelin apikal tarafından uzaklaştırılır. Sonrasında, hücrelere besin tedariği yalnızca hücrelerin bazolateral tarafından yapılır. Bu koşullar, epitel hücreler farklılaşmasını ve bazo-apikal polariteyi yeniden kazanmasını sağlamaktadır. Bazı epitel hücre türleri air liquid interface (ALI) kültürde, apikal sıvı veya mukus üretebilmektedir [113]. ALI kültür yöntemi için T25 flasklarda büyütülen BEAS-2B ve RPMI-2650 hücreleri %80 konfluente ulaştıktan sonra hücre kültür yöntemindeki protokole

uygun olarak kaldırılmış, sayılmış ve her bir insert için  $1 \times 10^5$  hücre transwell insertlere ekilmiştir. 2-4 gün boyunca hücreler mikroskopta gözlemlenmiş ve transwelli tümüyle kaplayan hücrelerin üst kısmındaki besiyeri uzaklaştırılmıştır. Bu aşamadan sonra ALI-kültür yöntemi için farklı besiyerleri kullanılmıştır.

- BEAS-2B hücre hattı için 50 nM retinoik asit içeren 1:1 oranında BEGM:DMEM besiyeri hazırlanmış ve 21 gün boyunca hücreler bazolateral kısımdan bu besiyeri ile beslenmiştir. 2 günde bir besiyeri değiştirilmiştir [114].
- RPMI-2650 hücre hattı için MEM besiyeri %10 FBS ve %1 penisilin besiyeri hazırlanmış ve 21 gün boyunca hücreler bazolateral kısımdan bu besiyeri ile beslenmiştir. 2 günde bir besiyeri değiştirilmiştir [115].

Uygulanan olan bu protokol Şekil 3.4'te gösterilmiştir.



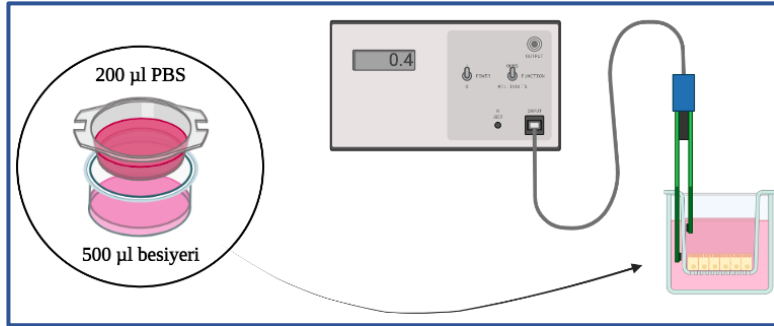
Şekil 3.4: Hava-sıvı arayüz yöntemi ile epitel hücrelerin kültürlenmesi (Çizimle Biorender programı kullanılarak çizilmiştir.)

### 3.5.1. Transepitelyal Elektriksel Direnç Ölçümü (TEER)

Transepitelyal/transendotelyal elektrik direnci (TEER), endotelyal ve epitelyal tek tabakaların hücre kültürü modellerinde sıkı bağlantı dinamiklerinin bütünlüğünü ölçmek için yaygın olarak kabul edilen nicel bir tekniktir. TEER değerleri, hücresel bariyer bütünlüğünün oluşturulduğunun güçlü bir göstergesidir. TEER ölçümleri, hücre hasarı olmadan gerçek zamanlı olarak gerçekleştirilebilir ve genellikle omik direncin veya empedansın ölçülmesine dayanır [116]. Hücre tabakasının bütünlüğünü değerlendirmek için transepitelyal elektriksel

direnç ölçümü kullanılmıştır. Transepitelyal elektrik direnci (TEER) değeri, Millicell ERS-2 volt-ohmmetre kullanılarak kültürün 0, 7, 14 ve 21 günlerinde ölçülmüştür. TEER ölçümü için uygulanan olan protokol Şekil 3.5'te gösterilmiştir ve aşağıdaki protokol takip edilmiştir [117].

1. Ölçüm yapılmadan önce hücrelerin besiyerleri ve PBS, su banyosunda 37 °C'ye ısıtılmıştır.
2. Transwell insert içerisine ekilmiş hücrelerin üzerine 200 µl ısınmış PBS eklenmiştir.
3. Transwellin alt kısmına 500 µl besiyeri eklenmiştir. Plaka etüve kaldırılarak 5 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
4. İnkübe süresi bittiğinde şekil 3.6'da gösterildiği gibi ölçüm cihazının kısa ucu insert içerisindeki PBS'in içine yerleştirilmiştir.
5. Ölçüm cihazının uzun ucu ise transwellin alt kısmındaki besiyerinin içine yerleştirilmiştir.
6. Cihazda görülen ölçüm sonucu not edilmiş ve insert kısmından PBS, alt kısımdan besiyeri uzaklaştırılmıştır.
7. Alt kısma yeni besiyeri konulup uyarım için plaka etüve kaldırılmıştır.



Şekil 3.5: Transepitelyal elektriksel rezistans ölçüm protokolü (Çizimler Biorender programı kullanılarak çizilmiştir.)

### 3.6. Eozinofil Hücre Hattının (EoL-1) Büyütülmesi, Farklaştırılması ve Karakterizasyonu

İnsan eozinofil hücre hattı (EoL-1) kültürlenmek için RPMI-1640 besiyerine %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin ilave edilmiştir. EoL-1 hücre hattı T25 flaskta hazırlanan besiyeri içerisinde %5 CO<sub>2</sub> atmosferinde 37°C'de inkübatörde büyütülmüştür [118]. Süspans halde

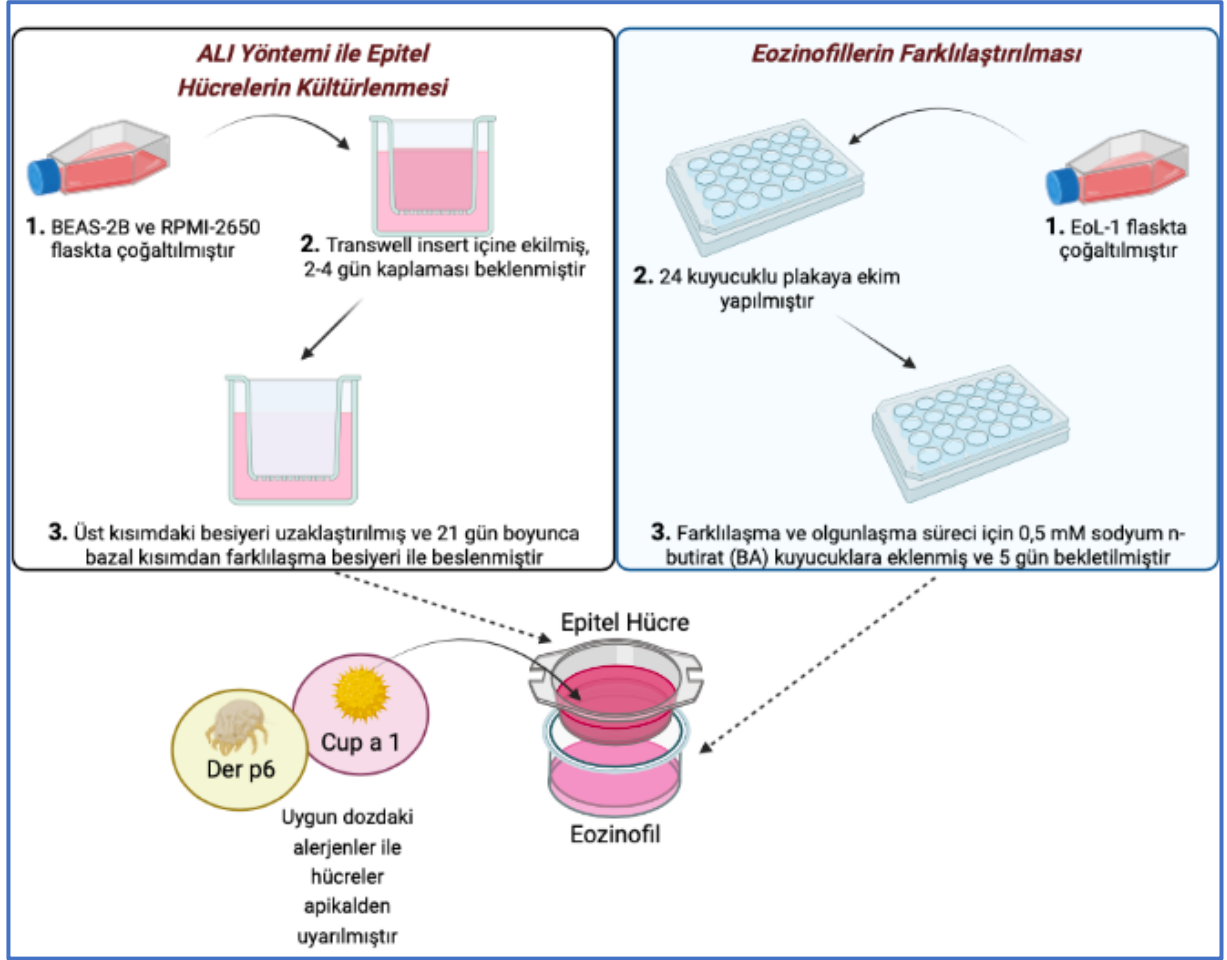
bulunan bu hücre hattı  $4 \times 10^6$  hücre sayısına ulaştığında T25 flastaki besiyeri toplanmış ve 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre pelleti uygun besiyeri ile çözülmüştür. Tripkan mavisi kullanılarak hücreler thoma lamında sayılmıştır. Her kuyucukta  $5 \times 10^5$  EoL-1 hücresi olacak şekilde 24 kuyucuklu plaka hazırlanmıştır. Farklılaşma ve olgunlaşma süreci için 0,1 mM ve 0,5 mM sodyum n-butirat (BA) kuyucuklara eklenmiş ve 2, 5 ve 7 gün boyunca %5 CO<sub>2</sub> atmosferinde 37°C'de etüvde inkübe edilmiştir [119].

### **3.6.1. Eozinofilik Katyonik Protein (ECP) ELISA Kiti ile EoL-1 Karakterizasyonu**

Literatürde EoL-1 hücre hattının farklılaşmasını kontrol etmek amacıyla aktif eozinofillerden salınan ya da üretimi artan eozinofilik katyonik protein (ECP), majör bazik protein (MBP) ya da eozinofil kaynaklı nörotoksin (EDN) gibi proteinlerin gerçek zamanlı PZR yöntemiyle gen ifadeleri ya da ELISA yöntemi ile protein miktarları tespit edilmiştir [119, 120]. Gerçekleştirilen tez kapsamında EoL-1 farklılaşmasını göstermek için uyarım sürelerinin sonunda hücrelerden süpernatant toplanmış ve ECP miktarı İnsan ECP ELISA Kiti (BTLab, E1391Hu-96T) kullanılarak ölçülmüştür. ELISA deneyi kitin protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. 37,5 ng/ml - 600 ng/ml konsantrasyon aralığındaki ECP standartları hazırlanmıştır. Her bir standart üç tekrarlı olacak şekilde kuyucuk başına 50 µl eklenmiştir. Örneklerden ise kuyucuk başına 40 µl eklenmiş ve üzerine 10 µl insan ECP antikoru konulmuştur. Sonrasında 50 µl streptavidin-HRP solüsyonu örnek ve standartların üzerine eklenmiş ve 1 saat boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda plaka 5 kere yıkanmıştır. Kuyucukların üzerine 100 µl Solüsyon A ve Solüsyon B karışımından eklenmiş ve 10 dakika boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Sonrasında kuyucuk başına 50 µl durdurma solüsyonu eklenmiş ve mikropłaka okuyucuda 450 nm'de ölçüm alınmıştır.

### **3.7. Epitel Hücreler ile Eozinofillerin Ko-kültüre Alınması, Alerjen Uyarımlarının Yapılması ve Hücre Cevabının İncelenmesi**

Epitel hücre kültür süresi tamamlandığında, epitel hücreleri içeren transwell-insertler EoL-1 hücre hatlarının üzerine Şekil 3.6'daki gibi yerleştirilmiş ve uygun doz ve zamanda uyarım yapılmıştır.



Şekil 3.6: Epitel-Eozinofil ko-kültür aşaması ve uyarımı (Çizimler Biorender programı kullanılarak çizilmiştir.)

Uyarım süresinin sonunda alt ve üst süpernatantlar ELISA ile inflamatuvar proteinlerin seviyesini tespit etmek için toplanmış ve  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. Epitel hücrelerden RNA izolasyonu yapılarak gerçek zamanlı PZR ile gen düzeyinde ölüm yolları ve EMT yolağı incelenmiştir.

### 3.7.1. ELISA (Enzim Bağlı İmmunosorbent Analiz) Yöntemi

Enzim bağlı immünosorbent analiz (ELISA), karışık bir solüsyondaki belirli bir proteini tespit etmek ve ölçmek için kullanılan yaygın ve doğru sonuç veren bir yöntemdir. İlk olarak Engvall ve Perlmann (1971) tarafından açıklanan bu yöntem, spesifik antikolar kullanılarak mikropilaka kuyularında immobilize edilmiş protein örneklerinin analizini sağlamaktadır [121]. İnflamatuvar koşullarda salınan epitel kaynaklı TNF- $\alpha$  (R&D Systems, DY210-05), MMP9 (R&D Systems, DY902), TGF- $\beta$  (R&D Systems, DY240-05) ve GM-CSF (R&D Systems,

DY215-05) proteinlerin seviyeleri toplanan süpernatantlardan ELISA yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir [122]. ELISA yöntemi için aşağıdaki protokol uygulanmıştır [123].

1. Bir gece önceden yakalama antikoru 96 kuyucuklu plakaya kuyucuk başına 100 µl olacak şekilde dağıtılmıştır. Plaka bir gece boyunca bekletilmiştir.
2. Sonrasında yıkama solüsyonu ile plaka üç kere yıkanmış ve kuyucuk başına 300 µl bloklama solüsyonu eklenmiştir. 1,5 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
3. Yıkama solüsyonu ile plaka üç kere yıkanmıştır.
4. Örnekler önerilen oranda seyreltilerek kuyucuk başına 100 µl olacak şekilde dağıtılmıştır ve plaka 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
5. Yıkama solüsyonu ile plaka üç kere yıkanmıştır.
6. Her kuyucuğa 100 µl belirleme solüsyonu eklenmiş ve plaka oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilmiştir.
7. Yıkama solüsyonu ile plaka üç kere yıkanmıştır.
8. Streptavidin-HRP solüsyonundan her kuyucuğa 100 µl konulmuştur. Plaka 20 dakika inkübe edilmiştir.
9. Yıkama solüsyonu ile plaka üç kere yıkanmıştır.
10. Renk reaktifi A ve renk reaktifi B, 1:1 oranında karıştırılmış ve her kuyucuğa 100 µl eklenmiştir.
11. Yaklaşık 10-20 dakika arası beklenmiş ve sonrasında 50 µl durdurma solüsyonu kuyucuklara konulmuştur.
12. Plakalar 450 nm ve 540 nm değerlerine ayarlanan mikroparka okuyucu kullanılarak ölçülmüştür.

### 3.8. İstatistiksel Analiz

Tüm deneyler üçlü tekrarlar şeklinde gerçekleştirilmiştir. Veriler ortalama olarak standart sapma ile birlikte verilmiş ve her deney grubundan elde edilen sonuçlar uygun istatistiksel analiz metodu ile GraphPad Prism 9 kullanılarak değerlendirilmiştir. Veri dağılımına bağlı olarak, ikili grupların karşılaştırılmasında Student t-testi veya Mann-Whitney U testi (normal dağılıma uymayan veriler için); üç grubun karşılaştırılmasında ise One-way ANOVA veya Kruskal-Wallis (normal dağılıma uymayan veriler için) testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Zaman ve dozun birlikte etkisinin değerlendirileceği deneylerde Two-way ANOVA kullanılmıştır. İstatistiksel testlerden elde edilen  $p < 0,05$  değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

#### 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tez çalışması kapsamında, BEAS-2B ve RPMI-2650 hücrelerinin Cup a1 ve Der p6 alerjenleri ile uyarılması sonrasında hücre yanıtlarının ölüm yolları (apoptoz, anoikis, partanatoz ve nekroptoz) ve EMT yolağı üzerinden incelenmesi amaçlanmıştır. Tezin ilk aşamasında ticari olarak satın alınan alerjenlerin saflığı ve proteaz aktivitesi test edilmiştir. Sonrasında BEAS-2B ve RPMI-2650 hücre hatları artan doz ve zamanlarda Cup a1 ve Der p6 alerjenleri ile uyarılmış, ardından iki farklı alerjenin, hücrelerin canlılığı ve sitotoksitesi üzerine olan etkileri tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçların istatistiksel analizleri yapılmış ve hücreler için uygun alerjen konsantrasyonu ve uygulama süresi belirlenmiştir. Monokültür deneylerinde kullanılmak üzere seçilmiş olan uygun dozlar Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Hücreler bu dozlarda 8, 24 ve 72 saat boyunca 48-kuyucuklu plaka içerisinde uyarılmış ve sonrasında gen ifadeleri tespit edilmiştir.

Gerçek zamanlı PZR sonucuna göre gen ifadesinde değişim görülen uygun doz ve süre ko-kültür deneylerinde kullanılmak için belirlenmiştir. Bronş ve nazal epitel hücrelerin alerjenlere verdikleri yanıt farklı olması sebebiyle hücre hatları için farklı doz ve zamanlar belirlenmiştir. BEAS-2B hücre hattı için 72 saat uyarımın gen ifadesinde değişikliklere sebebiyet verdiği gözlemlenirken, Der p6 alerjeni için uygun doz 10 µg/ml ve 20 µg/ml olarak seçilmiş, Cup a1 alerjeni için ise 2 µg/ml ve 5 µg/ml konsantrasyonlarının uygulanmasına karar verilmiştir. RPMI-2650 hücre hattında ise gen ifadesindeki değişimlere neden olan uygulama süresinin 8 ve 24 saat olduğu gözlemlenmiş, Der p6 ve Cup a1 alerjen konsantrasyonlarının ise 10 µg/ml uygulanmasına karar verilmiştir.

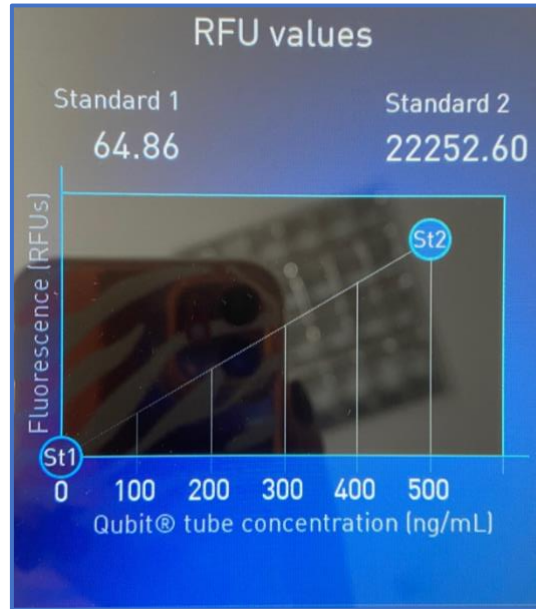
Ko-kültür sistemini kurabilmek için nazal ve bronş epitel hücreler 21 gün boyunca ALI-kültür yöntemi kullanılarak büyütülmüş ve bariyer yapısı oluşumunun kontrolü için 0, 7, 14 ve 21. günlerde TEER değerleri ölçülmüştür. Bu süreç içerisinde ko-kültür sisteminin diğer bileşeni olan EoL-1 hücre hattının aktifleşmesi için 2, 5 ve 7 gün boyunca 100 µM ve 500 µM bütirik asit uyarımları denenmiştir. EoL-1 hücre hattının aktifleşmesinin kontrolü ECP ELISA kiti kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen deney sonucunda 2 gün 500 µM uyarımın EoL-1 aktifleşmesi için uygun olduğu tespit edilmiştir. Epitel hücrelerin ALI-kültür sürelerinin tamamlanmasından 2 gün önce EoL-1 hücrelerinin aktifleştirilme süreci başlatılmış ve sonrasında epitel hücreler ile EoL-1 ko-kültüre alınmıştır. Hücreler belirlenen doz ve sürede Cup a1 ve Der p6 alerjenleri ile uyarılmıştır. Uyarım süresi tamamlandığında ölüm yolları ve

EMT ilişkili genlerin ifadelerindeki değişimi gözlemlemek için hücrelerden RNA izole edilmiş ve sonrasında gerçek zamanlı PZR deneyi yapılmıştır. Uyarımdan sonra hücrelerin üst ve alt süpernatantları değişen sitokin ifadelerinin ELISA ile tespiti için toplanmıştır.

#### 4.1 Ticari Olarak Satın Alınan Der p6 ve Cup a1 Alerjenlerinin Saflık ve Proteaz Aktivite Testlerinin Yapılması

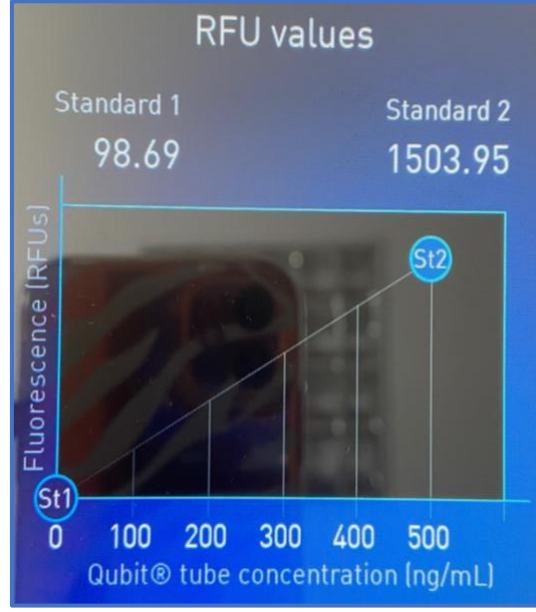
##### 4.1.1. Qubit ile Alerjenlerin Saflık Tayininin Yapılması

Der p6 ve Cup a1 alerjenlerinin saflık analizleri için Qubit cihazı kullanılarak alerjenlerin içeriğindeki RNA ve DNA seviyeleri ölçülmüştür. Hassas DNA kitinin tespit aralığının grafiği Şekil 4.1’de, hassas RNA kitinin tespit aralığının grafiği ise Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Qubit DNA standartlarının tespit aralık grafiği



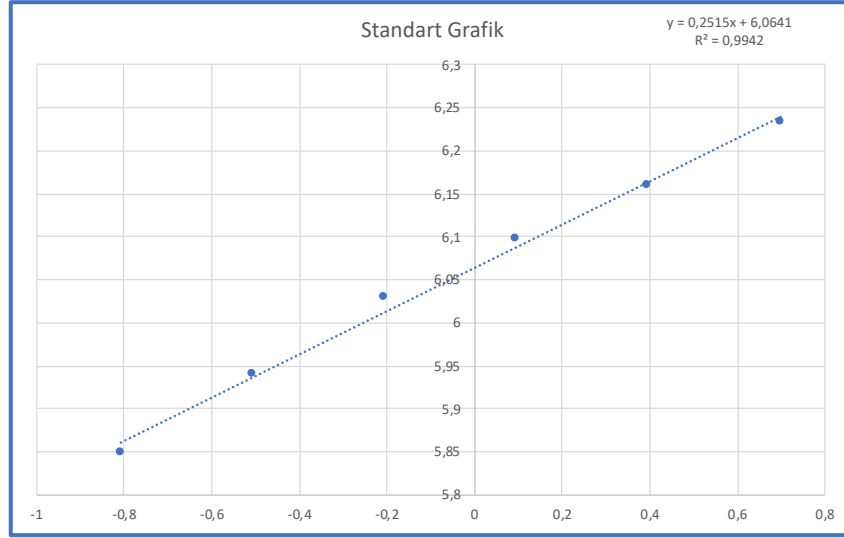


Şekil 4.2. Qubit RNA standartlarının tespit aralık grafiği

Hassas DNA kitinin tespit aralığının 64,86 ng/ml ile 22252,60 ng/ml arasında (Şekil 4.1); RNA kiti için ise bu değerlerin 98,69 ng/ml ile 1503,95 ng/ml aralığında (Şekil 4.2) olduğu saptanmıştır. Deney sonucunda iki alerjenin de içerisindeki DNA ve RNA miktarının tespit aralığının dışında kaldığı gözlemlenmiştir.

#### 4.1.2. Alerjenlerin Proteaz Aktivitelerinin Tespiti

Der p6 alerjeninin serin proteaz aktivitesine sahip olduğu literatürde bilinmektedir [98]. Cup a1 alerjeninin ise pektat liyaz aktivitesine sahip olduğu bilinirken [124], proteaz aktivitesi ile ilgili literatürde bir bulguya rastlanmamıştır. Bu nedenle kullanılacak olan alerjenlerin proteaz aktivitelerinin tespit edilebilmesi amacıyla Pierce floresan proteaz test kiti kullanılmıştır. Bu kit, substrat olarak floresan işaretli kazein kullanarak örneklerin standart grafiğe göre proteaz aktivitelerini ölçen bir prensip ile çalışmaktadır. Standart grafiğin oluşturulması için kullanılacak olan tripsin, kitin tespit aralığı 5 µg/ml ile 0,078 µg/ml arasında olacak şekilde seyreltilmiştir. Yapılan analiz sonucunda elde edilen standart grafik, R<sup>2</sup> değeri ve grafiğin denklemi Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Proteaz aktivite test kitinin standartlarından elde edilen standart grafik

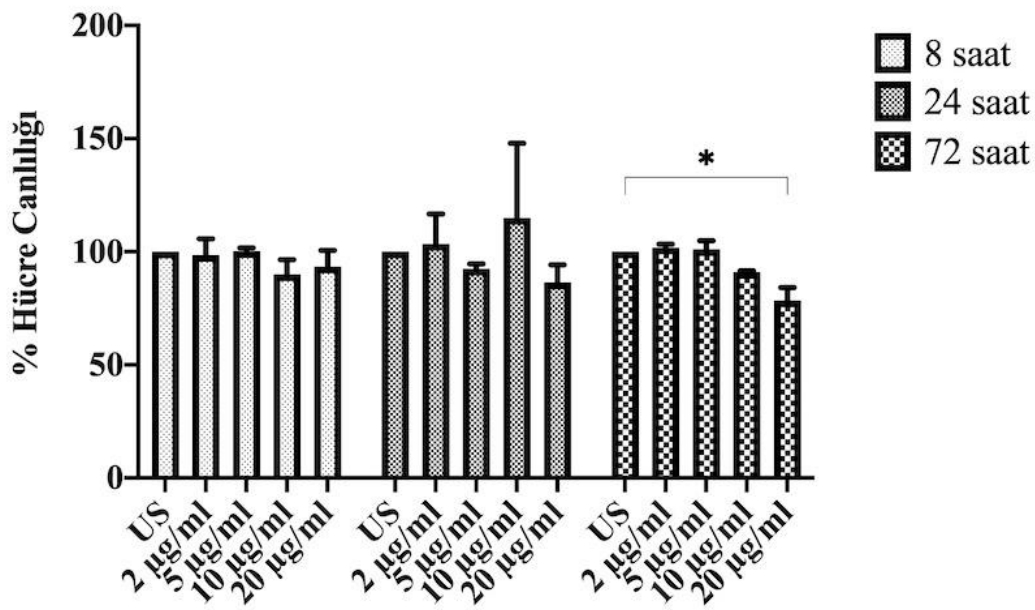
Standart grafik, tripsin standart konsantrasyonlarının ve karşılığindeki floresan okumaların logaritması baz alınarak çizilmiştir. Cup a1 ve Der p6 alerjenleri distile su içerisinde konsantrasyonları 2 µg/ml olacak şekilde stoktan (100 µg/ml) seyreltilmiştir. Ölçüm sonucunda alerjenler için bulunan floresan okuma değerlerinin logaritması alınarak denkleme yerleştirilmiş ve sonrasında bulunan sonucun anti-logaritması alınmıştır. Yapılan işlemler sonucunda 2 µg/ml konsantrasyondaki Der p6'nın proteaz aktivitesi 0,293 µg/ml olarak bulunmuştur. Serin proteaz aktivitesine sahip olduğu bilinen bu alerjenin proteaz aktivite test sonucu literatür ile uyumludur [44]. Hesaplamalar sonucunda 2 µg/ml konsantrasyondaki Cup a1'in proteaz aktivitesi 0,358 µg/ml olarak bulunmuştur. Pektat liyaz aktivitesine sahip olduğu bilinen Cup a1 alerjeninin yapılan testte proteaz aktivitesine de sahip olduğu tespit edilmiştir.

#### 4.2. BEAS-2B Hücre Hattında Artan Doz ve Zamanlarda Cup a1 ve Der p6 Alerjen Uyarımının Hücre Canlılığına ve Sitotoksitesine Etkisi

Alerjenler için uygun doz ve zamanı belirleyebilmek için, BEAS-2B hücre hattı 8, 24 ve 72 saatlerde 2 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml konsantrasyonlarındaki Cup a1 ve Der p6 alerjenleri ile uyarılmıştır. Hücre canlılığının tespiti için kantitatif bir yöntem olan MTT testi ve kalitatif bir yöntem olan etidyum bromür/kalsein canlı/ölü hücre boyaması yapılmıştır. Sitotoksite analizi için ise nekrotik ölüm sonrasında hücre dışına salınan laktat dehidrogenaz enziminin substratı parçalaması prensibi ile çalışan LDH testi gerçekleştirilmiştir.

#### 4.2.1. Alerjenler ile Uyarılan BEAS-2B Hücrelerinin Canlılığının MTT ile Tespiti

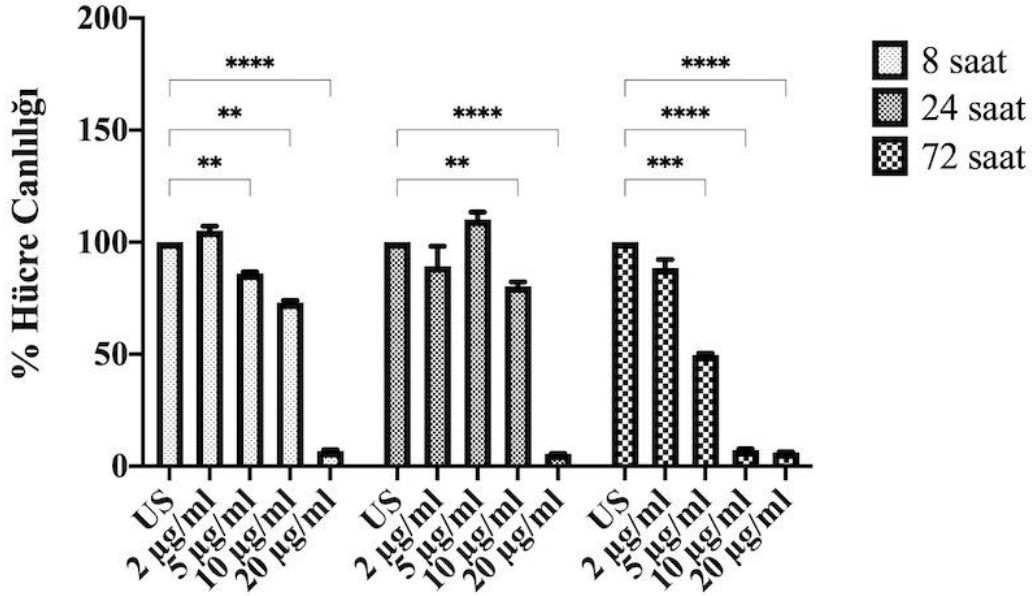
Gerçekleştirilen tez kapsamında Der p6 ve Cup a1 alerjenlerinin toksik etkiye sahip olduğu doz ve çalışmanın devamında kullanılacak uygun dozun belirlenebilmesi için BEAS-2B hücreleri belirlenen konsantrasyon ve saatlerde uyarılmıştır. Uyarım sonunda hücre canlılığını belirlemek için MTT testi yapılmıştır. Der p6 alerjeni ile uyarım sonrasında elde edilen MTT sonuçları Şekil 4.4'te, Cup a1 alerjeni ile uyarım sonrasında elde edilen sonuçlar ise Şekil 4.5'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4. BEAS-2B hücrelerinin artan konsantrasyonda ve farklı zamanlarda Der p6 alerjeni ile uyarılması sonucunda elde edilen MTT sonuçları; n=3; \*p<0,01 \*\*p<0,005 \*\*\*p<0,0005 \*\*\*\*p<0,0001

Der p6 uyarımının hücre canlılığı üzerine olan etkisini değerlendirmek için ‘‘Two-way ANOVA’’ istatistik testi kullanılmış ve sonuçlar uyarılmamış (US) koşul ile karşılaştırılmıştır. 8 saatlik Der p6 uyarımı sonrası düşük dozlarda (2 µg/ml ve 5 µg/ml) hücre canlılığında düşüş gözlemlenmezken, 10 µg/ml uyarımda hücre canlılığının %89’a, 20 µg/ml uyarımda ise %92’ye düştüğü tespit edilmiştir. 24 saat 20 µg/ml alerjen uyarımı sonrasında ise hücre canlılığı %82’ye düşmüştür. Bu saatler arasında en düşük hücre canlılığı 72 saat uyarımın 20 µg/ml dozunda gözlemlenmiştir. 10 µg/ml Der p6 alerjeni ile uyarım sonrasında %90’a düşen canlılık değerinin, 20 µg/ml Der p6 uyarımı ile birlikte %77’ye düştüğü görülmüştür. Hücre canlılığının

20 µg/ml Der p6 uyarım dozunda azalması istatistiksel analizler sonucunda da anlamlı bulunmuştur. Laboratuvarımızda gerçekleştirilen bir başka çalışmada; BEAS-2B hücre hattı, Der p6 ile 2 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml ve 40 µg/ml dozlarda 24 saat boyunca uyarılmış ve hücre canlılığının, 20 µg/ml uyarımda yaklaşık %80, en yüksek dozda ise yaklaşık %60 değerlerinde olduğu görülmüştür [98].



Şekil 4.5. BEAS-2B hücrelerinin artan konsantrasyonda ve farklı zamanlarda Cup a1 alerjini ile uyarılması sonucunda elde edilen MTT sonuçları; n=3; \*p<0,01 \*\*p<0,005 \*\*\*p<0,0005 \*\*\*\*p<0,0001

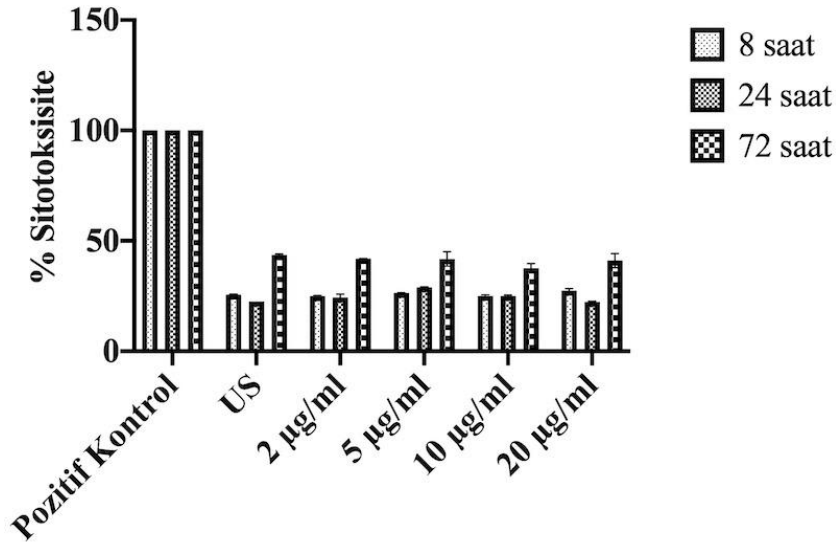
BEAS-2B hücrelerinin Cup a1 ile uyarımı sonrası hücre canlılığının değerlendirilmesi için ‘‘Two-way ANOVA’’ istatistik testi kullanılmış ve sonuçlar uyarılmamış (US) koşul ile karşılaştırılmıştır. 8 saatlik Cup a1 uyarımında 2 µg/ml alerjen dozunun hücre canlılığını US koşuluna göre arttırdığı gözlemlenirken, diğer dozlarda artan konsantrasyon ile doğru orantılı olarak hücre canlılığında düşüş tespit edilmiştir. 5 µg/ml Cup a1 ile uyarım sonucunda hücre canlılığının %85 olduğu, 10 µg/ml uyarım sonucunda canlılığın %71 olduğu ve en yüksek dozun canlılığı yaklaşık %1’e düşürdüğü gözlemlenmiştir. Doz artışına bağlı azalan hücre canlılığının istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. 24 saatlik Cup a1 uyarımında ise BEAS-2B hücrelerinin canlılığı 2 µg/ml dozunda %90 olarak belirlenmiştir. 10 µg/ml ve 20 µg/ml alerjen ile uyarım sonucunda ise sırasıyla hücre canlılığının %80 ve %5’e düştüğü gözlemlenmiştir. Bu dozlardaki hücre canlılığı düşüşü yapılan istatistik testi sonucunda anlamlı

bulunmuştur. 72 saatlik uyarım sonrasında anlamlı bir şekilde doza bağlı olarak hücre canlılığı değerinde azalış gözlemlenmiştir. 2 µg/ml Cup a1 ile uyarılan BEAS-2B hücrelerinin canlılığı %87 iken, 5 µg/ml doz ile uyarılan hücrelerin canlılığı %46 olarak bulunmuştur. Bu sonuçların yanı sıra, 10 µg/ml alerjen uyarımının hücre canlılığını %1'e düşürdüğü, en yüksek dozda ise hücre canlılığının yaklaşık %0,6'ya düştüğü tespit edilmiştir. Yapılan istatistik testi sonucunda artan doza bağlı olarak azalan hücre canlılığı değerlerinin anlamlı olduğu gözlemlenmiştir. Literatürde farklı ağaçların polenlerindeki major alerjenler ile yapılan MTT testi bulunmasına rağmen [55], Arizona servisi (*Cupressus arizonica*) poleninin major alerjeni olan Cup a1 ile yapılan ve hücre canlılığını araştıran bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

İki farklı alerjen ile uyarım sonrasında elde edilen MTT sonuçları Cup a1 ve Der p6 alerjenlerinin aynı doz uyarımlarının hücre canlılığını farklı etkileyebildiğini göstermektedir. 20 µg/ml Cup a1 uyarımı bütün saatlerde hücre canlılığını yaklaşık %1'e düşürürken, 72 saat 20 µg/ml Der p6 uyarımının hücre canlılığını sadece %77'ye kadar düşürebildiği gözlemlenmektedir. Elde edilen bu sonuçlar *Cupressus arizonica* bitkisinin majör alerjeni olan Cup a1'in BEAS-2B hücreleri üzerinde diğer alerjene kıyasla daha fazla hasara neden olduğunu göstermektedir.

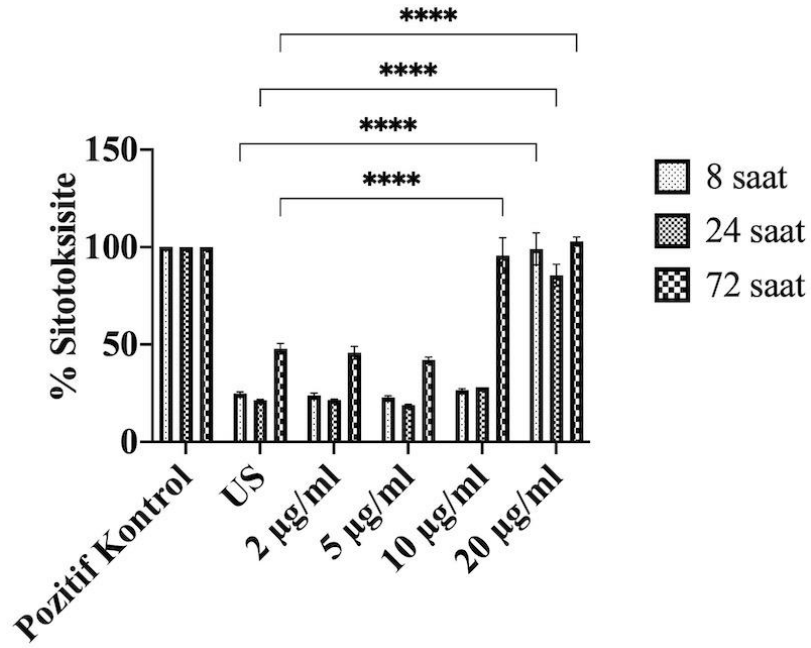
#### **4.2.2. Alerjenler ile Uyarılan BEAS-2B Hücrelerinin Sitotoksosite Ölçümlerinin LDH testi ile Tespiti**

Tez kapsamında belirlenen doz ve zamanlarda Cup a1 ve Der p6 ile uyarılan BEAS-2B hücrelerinde, sitotoksosite ölçümü LDH testi ile yapılmıştır. Der p6 uyarımı sonrasında yapılan sitotoksosite testinin sonuçları Şekil 4.6'da Cup a1 uyarımı sonrasında yapılan sitotoksosite testinin sonuçları ise Şekil 4.7'de verilmiştir.



Şekil 4.6. BEAS-2B hücrelerinin artan konsantrasyonda ve farklı zamanlarda Der p6 alerjisi ile uyarılması sonucunda elde edilen LDH sonuçları; n=3; \*p<0,01 \*\*p<0,005 \*\*\*p<0,0005 \*\*\*\*p<0,0001

Der p6 uyarımlarının LDH sonuçları için ‘‘Dunnet Çoklu Karşılaştırma’’ istatistik testi kullanılmış ve sonuçlar uyarılmamış (US) koşul ile karşılaştırılmıştır. 8 saatlik Der p6 uyarımı sonrasında gerçekleştirilmiş olan LDH testinde sitotoksosite yüzdesinin US, 2 µg/ml, 5 µg/ml ve 10 µg/ml koşullarında yaklaşık %25 değerinde olduğu gözlemlenmiştir. En yüksek 20 µg/ml dozunda ise sitotoksosite değeri %27 olarak bulunmuştur. Uyarımlar sonrasında hesaplanan yüzde sitotoksosite değerlerinin US ile benzer olduğu ve bu sebeple gerçekleşmiş olan yaklaşık %25 nekrozun alerjenlerden kaynaklanmadığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde, 24 saatlik Der p6 uyarımındaki bazı dozların (2 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml) yüzde sitotoksosite değerinin yaklaşık %23 olduğu ve US değeri ile benzerlik gösterdiği gözlemlenmiştir. 5 µg/ml alerjen uyarımının ise 24 saatlik sürede en yüksek sitotoksosite değerine ulaştığı (%29) hesaplanmış olmasına rağmen bu değer de US yüzde sitotoksosite değerine yakın olduğu görülmüştür. 8 saatlik uyarımda olduğu gibi 24 saatlik uyarım sonrasında tespit edilmiş olan yaklaşık %23’lük sitotoksosite değerinin alerjen kaynaklı olmadığı düşünülmüştür. 72 saat Der p6 alerjen uyarımı sonrasında ise yüzde sitotoksosite değerleri; US koşulunda %43,2 µg/ml dozunda %42,5 µg/ml dozunda %41,10 µg/ml dozunda %37 ve 20 µg/ml dozunda %40 olarak hesaplanmıştır. Literatür taraması sonucunda ise Der p6 alerjisi ile LDH testi yapan bir çalışmaya rastlanamamıştır.



Şekil 4.7. BEAS-2B hücrelerinin artan konsantrasyonda ve farklı zamanlarda Cup a1 alerjeni ile uyarılması sonucunda elde edilen LDH sonuçları; n=3; \*p<0,01 \*\*p<0,005 \*\*\*p<0,0005 \*\*\*\*p<0,0001

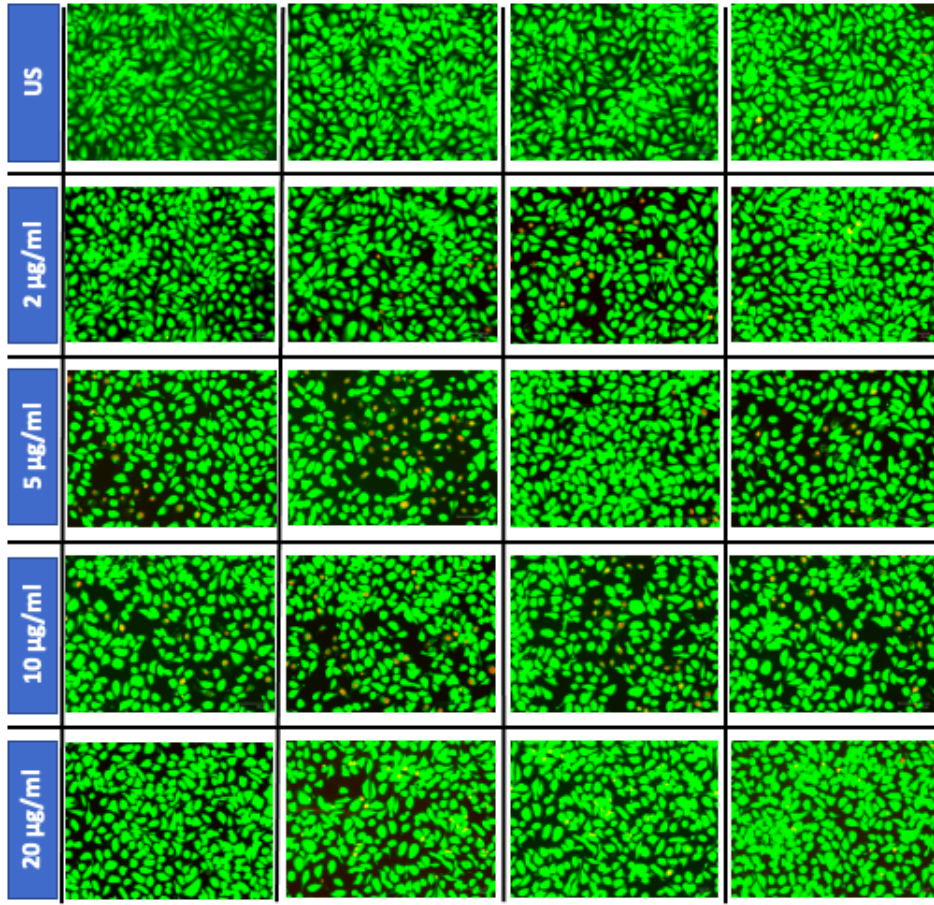
Cup a1 uyarımını takiben gerçekleştirilen LDH testi sonuçları için “Dunnet Çoklu Karşılaştırma” istatistik testi kullanılmış ve sonuçlar uyarılmamış (US) koşul ile karşılaştırılmıştır. Cup a1 alerjeni ile 8 saat boyunca uyarılan BEAS-2B hücre hattında US koşulundaki sitotoksosite değeri %24, 2 µg/ml dozunda %23, 5 µg/ml dozundaki değeri %22 ve 10 µg/ml dozundaki değeri ise %29 olarak hesaplanmıştır. 8 saat boyunca yapılmış olan en yüksek doz uyarımında ise sitotoksosite değeri %98’dir. 8 saatlik 20 µg/ml Cup a1 uyarımı sonrasında hücre canlılığının %1 olduğu da göz önünde bulundurulduğunda yapılmış olan sitotoksosite sonucu ile MTT sonucunun benzer olduğu saptanmıştır (Şekil 4.5). 8 saatlik uyarım süresince 2 µg/ml, 5 µg/ml ve 10 µg/ml doz koşullarının sitotoksosite değerlerinin US ile benzer olduğu ve bu doz/saatte gözlemlenen LDH salınımının uyarıma bağlı olmadığı görülmüştür. 20 µg/ml uyarımındaki sitotoksosite yüzdesi ile US koşulu kıyaslandığında nekrotik ölümün benzer olmadığı ve bu sebeple bu doz/zamanda gerçekleşen hücre ölümünün nekroz kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. 24 saatlik Cup a1 uyarımındaki sitotoksosite değerleri ile 8 saatlik uyarım benzerlik göstermektedir. US koşulunda ve 2 µg/ml dozunda sitotoksosite değeri %21,5 µg/ml dozunda %19 ve 10 µg/ml dozunda %28 olarak hesaplanmıştır. Alerjen uyarımındaki sitotoksosite değerleri US koşulundaki değere yakın

olduğu için uyarıma bağlı bir nekroz görüldüğü düşünülmemektedir. Fakat 20 µg/ml uyarımdaki yüzde sitotoksosite değeri %85'tir ve bu değer US ile kıyaslandığında uyarıma bağlı olarak daha fazla LDH'nin hücre dışına salındığı ve hücre ölümünün nekroz kaynaklı olabileceği tespit edilmiştir. Benzer şekilde, 10 µg/ml uyarımda hesaplanan %95 sitotoksosite değeri ve 20 µg/ml uyarımda herhangi bir hücre canlılığının tespit edilmemesi, 72 saat ve bu dozlardaki hücre ölümünün nekroz sebebiyle olduğunu düşündürmektedir. Tüm saatlerdeki 20 µg/ml Cup a1 uyarımının BEAS-2B hücreleri için toksik olduğu, yapılan LDH ve MTT testleri ile gösterilmiştir (Şekil 4.5 ve Şekil 4.7). Literatür taraması sonucunda ise Cup a1 alerjisi ile LDH testi yapan bir çalışmaya rastlanamamıştır.

#### **4.2.3. Alerjenler ile Uyarılan BEAS-2B Hücrelerinde Canlı/Ölü Hücrelerin EtBr/Kalsein Boyaması ile Floresan Mikroskopta Görüntülenmesi**

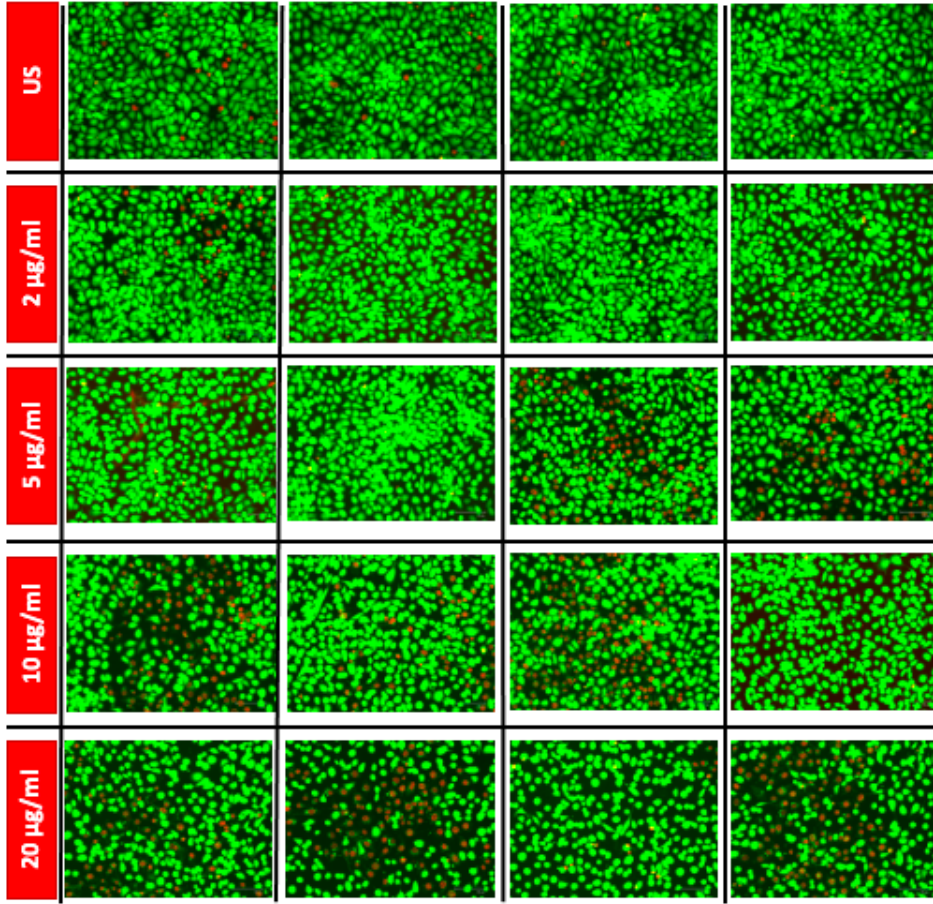
2 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml dozlar ile 8, 24 ve 72 saat uyarılan BEAS-2B hücrelerinde hücre canlılığının tespiti için EtBr/Kalsein boyaları kullanılarak floresan boyama yapılmış ve sonuçlar EVOS Floid floresan mikroskobu ile gözlemlenmiştir. Bu deney sonucunda canlı olan hücreler yeşil renkte, ölü hücreler ise kırmızı renkte gözlemlenmesi gerekmektedir. 3. pasaj BEAS-2B hücre hattı kullanılarak yapılan bu deneyde, floresan mikroskopta görüntü alınırken kuyucuğun tamamını kapsayacak şekilde 4 görüntü çekilmiştir. 8, 24 ve 72 saatlik Der p6 uyarımı sonucunda elde edilen görüntüler Şekil 4.8, Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da gösterilmiştir. 8, 24 ve 72 saatlik Cup a1 uyarımı sonucunda elde edilen görüntüler ise Şekil 4.11, Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'te verilmiştir.





**Şekil 4.8.** BEAS-2B hücrelerinin 8 saatte artan konsantrasyonda Der p6 alerjeni ile uyarılması sonucunda elde edilen canlı/ölü hücre boyama görüntüleri (20X, bar 100 µm) (yeşil:canlı; kırmızı:ölü)

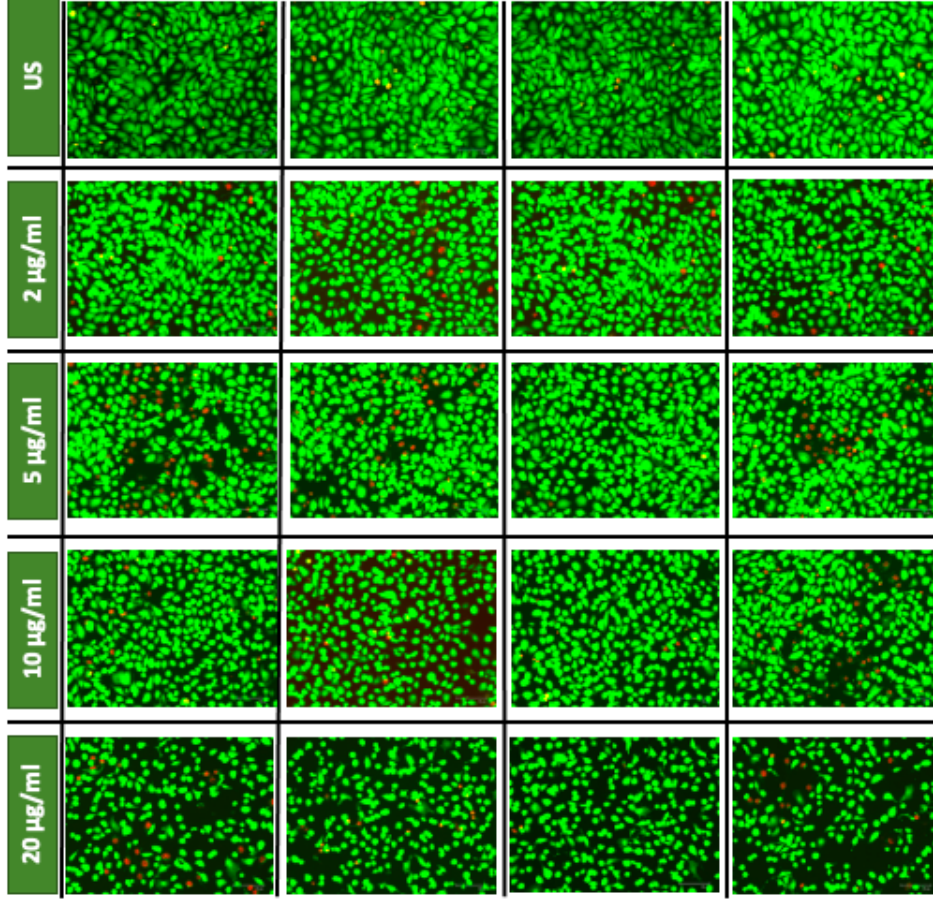
BEAS-2B hücrelerinin 8 saatlik artan konsantrasyonlarda Der p6 uyarımı sonrasında EtBr/Kalsein boyama sonuçları incelendiğinde, 8 saat uyarımın hücre morfolojisinde de önemli bir değişikliğe sebep olmadığı gözlemlenmiştir. Literatürde 8 saatte Der p6 alerjeni ile epitel hücreyi uyararak başka bir çalışma bulunamamıştır. Elde edilen bu sonuçların, LDH ve MTT deney sonuçları ile uyumlu oldukları da gözlemlenmiştir (Şekil 4.4 ve Şekil 4.6).



**Şekil 4.9.** BEAS-2B hücrelerinin 24 saatte artan konsantrasyonda Der p6 alerjeni ile uyarılması sonucunda elde edilen canlı/ölü hücre boyama görüntüleri (20X, bar 100 µm) (yeşil:canlı; kırmızı:ölü)

24 saat Der p6 (2 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml) alerjeni ile uyarılan BEAS-2B hücrelerinin EtBr/Kalsein boyama sonuçlarında US ve 2 µg/ml koşullarının görüntüleri benzer görünürken, 5 µg/ml ve sonraki dozlarda uyarıma bağlı olarak hücre ölümünde artış gözlemlenmiştir. 5 µg/ml alerjen uyarımında ölü hücreler US koşuluna kıyasla artmış fakat hücre morfolojilerinde değişiklik gözlemlenmemiştir. 10 µg/ml ve 20 µg/ml uyarımları incelendiğinde ise hem US ve düşük dozda uyarımlara kıyasla ölü hücre sayısında artış gözlemlenmiş hem de bazı hücrelerin epitel hücre morfolojilerini kaybederek büzüşmeye başladıkları tespit edilmiştir. Laboratuvarımız tarafından BEAS-2B ile yapılmış başka bir deneyde, hücreler Der p6 alerjeninin farklı konsantrasyonları (2, 5, 10, 20 ve 40 µg/ml) ile 24 saat uyarılmıştır. EtBr/Kalsein boyaması sonucunda 5 µg/ml dozundan itibaren artan dozlar ile orantılı bir şekilde hücre ölümünün de arttığı gösterilmiştir. Yapılan diğer canlılık/sitotoksosite

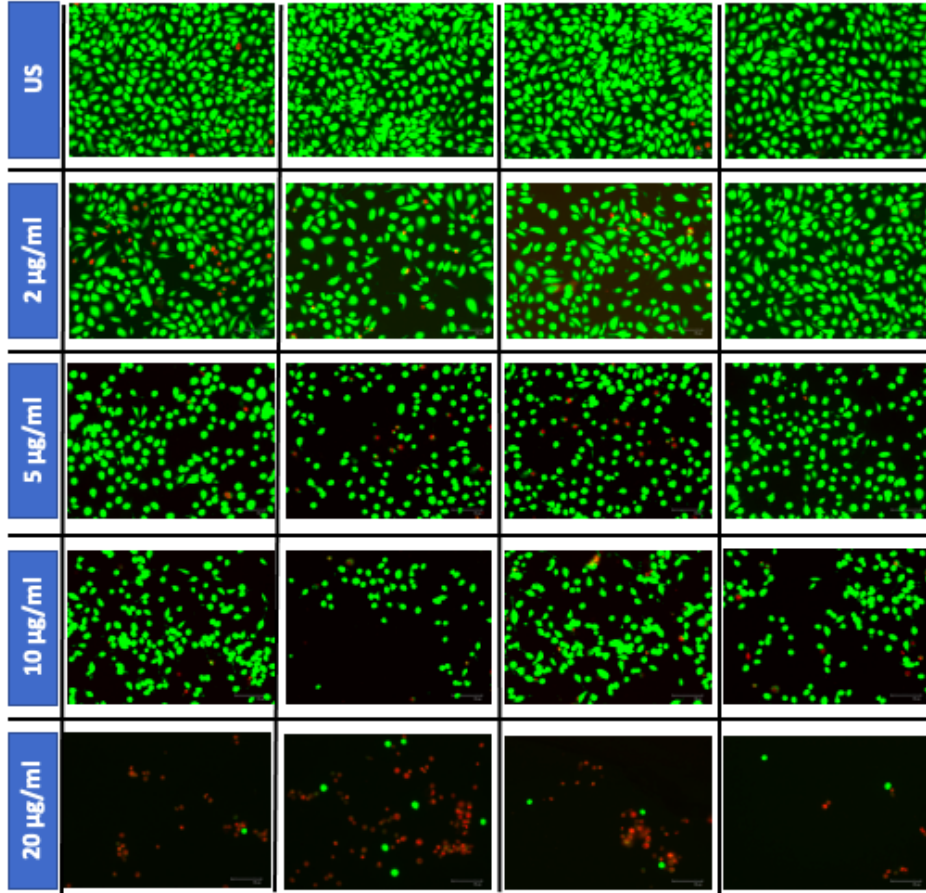
analizleri ile birlikte 40 µg/ml Der p6 dozunun BEAS-2B hücre hattında toksik etki göstermeye başladığı tespit edilmiştir [98].



**Şekil 4.10.** BEAS-2B hücrelerinin 72 saatte artan konsantrasyonda Der p6 alerjeni ile uyarılması sonucunda elde edilen canlı/ölü hücre boyama görüntüleri (20X, bar 100 µm) (yeşil:canlı; kırmızı:ölü)

72 saatlik artan konsantrasyonlarda Der p6 uyarımı sonrasında BEAS-2B hücrelerinin EtBr/Kalsein boyama sonuçları incelendiğinde, doza bağımlı olarak ölü hücre sayısının artmaya başladığı tespit edilmiştir. 2 µg/ml dozu ile US koşulu kıyaslandığında hem ölü hücre sayısında artış meydana geldiği hem de bazı hücrelerin epitel hücre morfolojisini kaybettiği gözlemlenmiştir. Benzer şekilde 5 µg/ml Der p6 uyarımı US koşulu ile karşılaştırıldığında ölü hücre sayısının arttığı ve epitel hücre şeklini kaybederek büzüşen hücrelerin olduğu görülmüştür. 10 µg/ml ve 20 µg/ml Der p6 alerjeni ile uyarılan BEAS-2B hücrelerinin epitel hücre morfolojisinden tamamen uzaklaştığı ve hücre ölümündeki artış ile birlikte hücrelerin tutundukları yüzeyden ayrıldığı ve hücre yoğunluğunun da azaldığı boyama görüntülerinde

görülmektedir. Epitel hücre üzerinde, 72 saatlik uyarımın 8 ve 24 saatlik uyarımlardan daha fazla hasara sebep olduğu yapılan EtBr/Kalsein boyama deneyi ile gözlemlenmiştir. 72 saat uyarım sonrasında yapılan MTT testinde, hücre canlılığının 20 µg/ml dozunda US koşuluna kıyasla azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.4). Elde edilen ikili canlı/ölü hücre boyama sonuçları ile MTT sonucu uyumluluk göstermektedir.

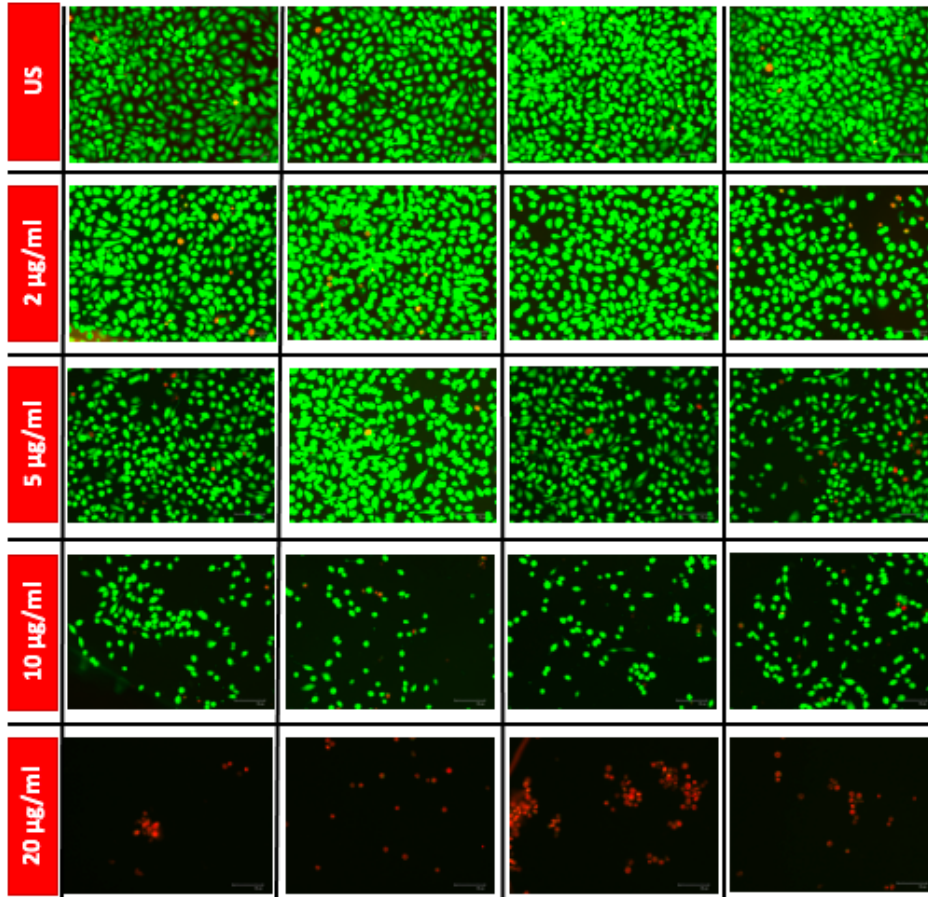


**Şekil 4.11.** BEAS-2B hücrelerinin 8 saatte artan konsantrasyonda Cup a1 alerjeni ile uyarılması sonucunda elde edilen canlı/ölü hücre boyama görüntüleri (20X, bar 100 µm) (yeşil:canlı; kırmızı:ölü)

8 saat süresince Cup a1 (2 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml) alerjen dozları ile uyarılan BEAS-2B hücrelerinin EtBr/Kalsein boyama sonuçlarına bakıldığında doz artışına bağlı olarak hücre ölümünde artış olduğu gözlemlenmiştir. 5 µg/ml ve 10 µg/ml Cup a1 ile uyarılan hücrelerde US koşuluna kıyasla ölü hücre sayısında artış, canlı hücre sayısında ise azalma tespit edilmiştir. Aynı zamanda bu dozlarda hücrelerin epitel morfolojilerini kayb ettikleri de



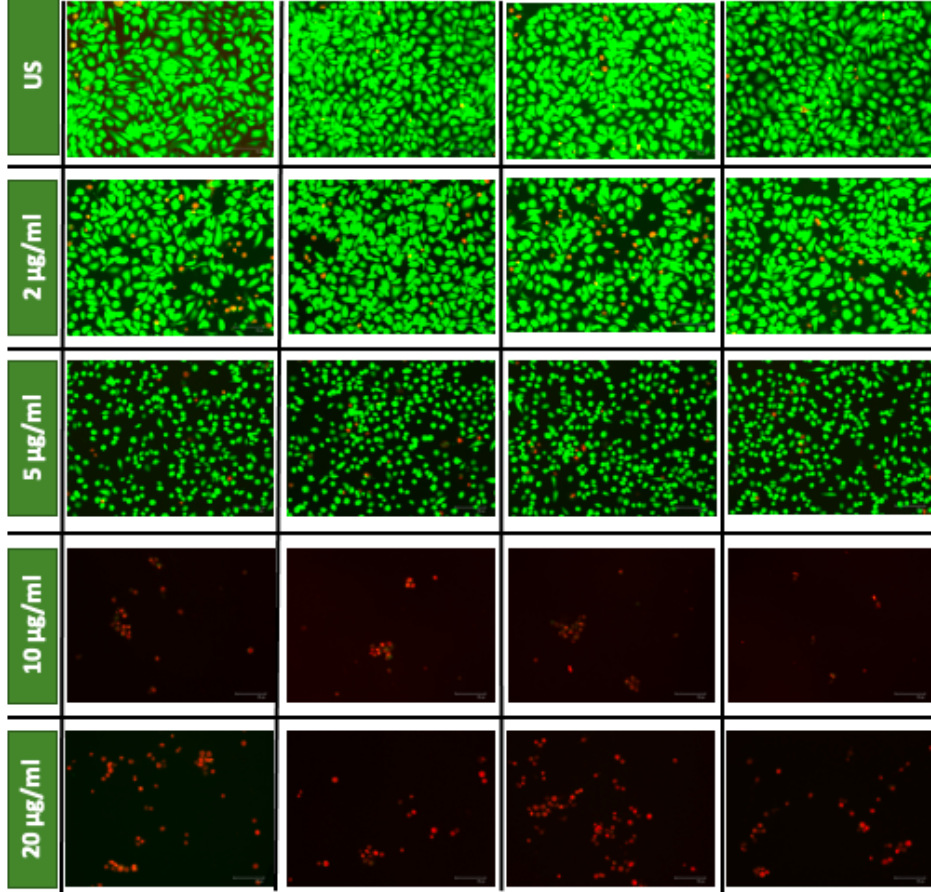
gözlemlenmiştir. LDH ve MTT sonucu ile uyumlu olarak 20 µg/ml Cup a1 dozunun bronş epitel hücre hattı için toksik olduğu ve hücrelerin öldüğü görülmüştür.



**Şekil 4.12.** BEAS-2B hücrelerinin 24 saatte artan konsantrasyonda Cup a1 alerjeni ile uyarılması sonucunda elde edilen canlı/ölü hücre boyama görüntüleri (20X, bar 100 µm) (yeşil:canlı; kırmızı:ölü)

8 saatlik uyarım sonucundaki boyama görüntüleri ile benzer şekilde, 24 saatte de doz artışına bağlı olarak hücre ölümlerinde artış görülmüştür. 2 µg/ml Cup a1 uyarımı sonrasında gözlemlenen ölü hücre sayısının US koşulundan fazla olduğu tespit edilmiştir. 5 µg/ml alerjen ile uyarılan BEAS-2B hücrelerinde canlı hücre sayısı azalırken, yaşayan hücrelerin morfolojilerinde de değişim saptanmıştır. 24 saat 10 µg/ml Cup a1 uyarımında canlı hücre sayısının, 8 saat 10 µg/ml uyarımından fazla olduğu görülmüştür. Bu uyarım dozunda da hücre ölümünün fazla olduğu ve hücre morfolojilerinin değiştiği tespit edilmiştir. 20 µg/ml uyarımı ise 8 saatteki uyarıma benzer olarak toksik etki göstermiş ve kuyucuk içerisinde canlı hücreye

rastlanmamıştır. Elde edilen ikili canlı/ölü hücre boyama sonuçları LDH ve MTT test sonuçları ile uyumludur (Şekil 4.5 ve Şekil 4.7).



**Şekil 4.13.** BEAS-2B hücrelerinin 72 saatte artan konsantrasyonda Cup a1 alerjeni ile uyarılması sonucunda elde edilen canlı/ölü hücre boyama görüntüleri (20X, bar 100 µm) (yeşil:canlı; kırmızı:ölü)

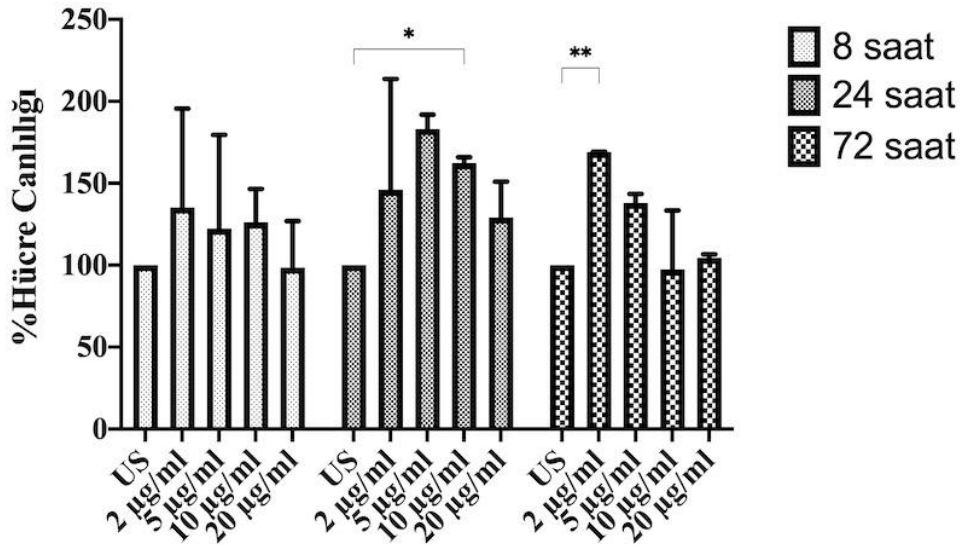
72 saat uyarım sonucunda artan konsantrasyona bağlı olarak canlı hücre sayısının azaldığı ve 5 µg/ml dozda hücre morfolojisinin belirgin bir şekilde değiştiği gözlemlenmiştir. 72 saatlik uyarımlarda 10 µg/ml ve 20 µg/ml dozlarının BEAS-2B hücreleri için toksik olduğu MTT, LDH ve EtBr/Kalsein boyamaları ile tespit edilmiştir. 2 µg/ml doz uyarımı US ile karşılaştırıldığında hücre canlılığında azalma görülmüştür. MTT deneyinde de 72 saatlik 2 µg/ml uyarımın US koşuluna kıyasla %87 canlılık tespit edilmiş olup floresan canlılık görüntüleri MTT sonuçları ile uyumluluk göstermektedir. 5 µg/ml Cup a1 uyarımında hücre morfolojilerinin değiştiği görülmektedir. Epitel hücre morfolojisini kaybeden BEAS-2B

hücrelerinin bu doz ve sürede hücre canlılığı da azalmıştır. Boyama sonucunda elde edilen bu görüntüler MTT sonuçları (%46 canlılık) ile de uyumludur.

### 4.3. RPMI-2650 Hücre Hattında Artan Doz ve Zamanlarda Cup a1 ve Der p6 Alerjen Uyarımının Hücre Canlılığına ve Sitotoksitesine Etkisi

Alerjenler için uygun doz ve zamanı belirleyebilmek için, RPMI-2650 hücre hattı 8, 24 ve 72 saat boyunca 2 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml konsantrasyonlarda Cup a1 ve Der p6 alerjenleri ile uyarılmıştır. Hücre canlılığının tespiti için kantitatif bir yöntem olan MTT testi ve kalitatif bir yöntem olan etidyum bromür/kalsein canlı/ölü hücre boyaması yapılmıştır. Sitotoksite analizi için ise nekrotik ölüm sonrasında hücre dışına salınan laktat dehidrogenaz enziminin substratı parçalaması prensibi ile çalışan LDH testi gerçekleştirilmiştir.

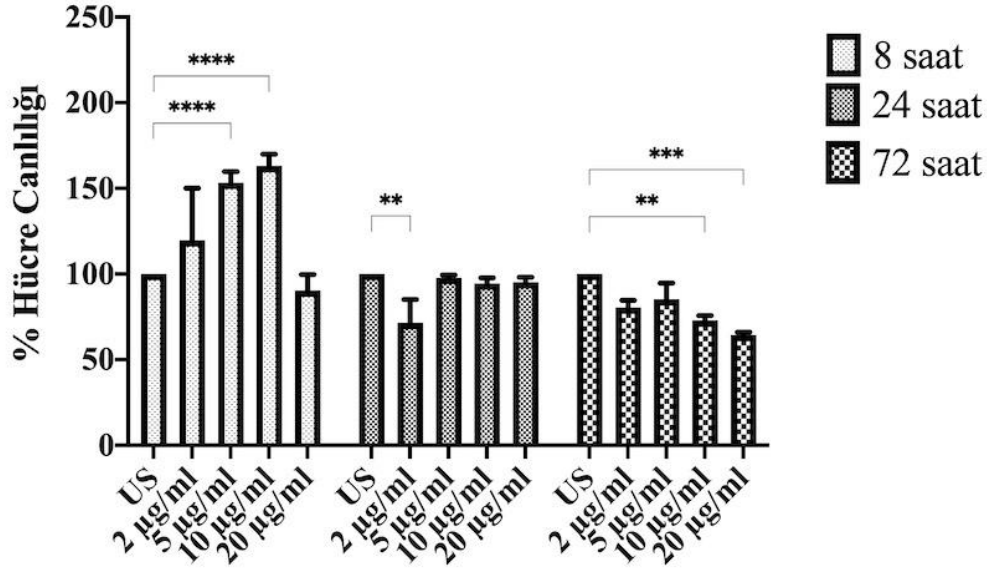
#### 4.3.1. Alerjenler ile Uyarılan RPMI-2650 Hücrelerinin Canlılığının MTT ile Tespiti



Şekil 4.14. RPMI-2650 hücrelerinin artan konsantrasyonlarda ve farklı zamanlarda Der p6 alerjeni ile uyarılması sonucunda elde edilen MTT sonuçları; n=3; \*p<0,01 \*\*p<0,005

Der p6 uyarımlarının MTT sonuçları için ‘‘Two-Way ANOVA’’ istatistik testi kullanılmış ve sonuçlar uyarılmamış (US) koşul ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmaların her biri saatler içindeki kendi uyarılmamış koşulları ile yapılmıştır. 8, 24 ve 72 saatlik Der p6 uyarımları sonucunda yapılan MTT testinde RPMI-2650 hücrelerinde canlılığın azaldığı tespit

edilmemiştir. 3 farklı saatte Der p6 ile uyarılan RPMI-2650 hücrelerinde yapılan MTT testi sonucunda, mitokondriyal aktivitelerde uyarıma bağlı anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir.



Şekil 4.15. RPMI-2650 hücrelerinin artan konsantrasyonlarda ve farklı zamanlarda Cup a1 alerjini ile uyarılması sonucunda elde edilen MTT sonuçları; n=3; \*\*p<0,005 \*\*\*p<0,0005 \*\*\*\*p<0,0001

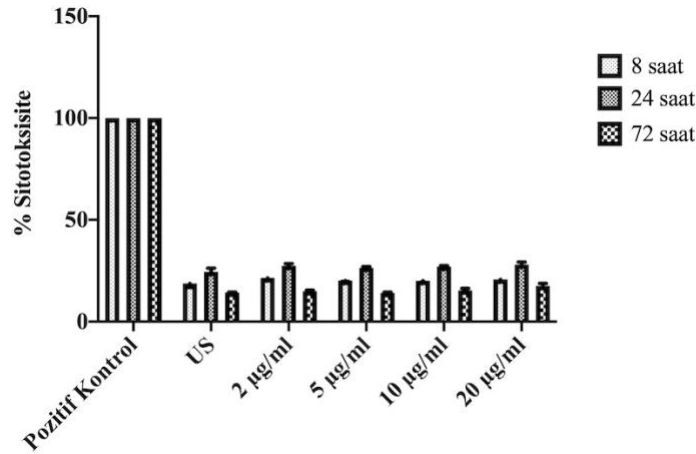
Cup a1 uyarımının hücre canlılığı üzerine etkisini değerlendirmek için ‘‘Two-way ANOVA’’ istatistik testi kullanılmış ve sonuçlar uyarılmamış (US) koşul ile karşılaştırılmıştır. 8 saatlik uyarım sonucunda 2 µg/ml, 5 µg/ml ve 10 µg/ml dozların hücre canlılığında azalmaya sebep olmadığı görülmüştür. 20 µg/ml Cup a1 uyarımında ise 8 saat sonunda canlılığın %90 olduğu bulunmuştur. 24 saatlik uyarım sonucunda ise 2 µg/ml uyarımın hücre canlılığını azaltarak %75 değerine düşürdüğü ancak diğer uyarımların kontrol grubu düzeyinde olduğu gözlemlenmiştir. 8 ve 24 saatlik uyarımlar ile karşılaştırıldığında, 72 saat sonunda uyarıma bağlı olarak hücre canlılığında azalma saptanmıştır. 2 µg/ml uyarımında hücre canlılığı %80 değerinde, 5 µg/ml uyarımında %84 değerinde, 10 µg/ml uyarımında %73 değerinde ve 20 µg/ml Cup a1 uyarımında ise %64 değerinde tespit edilmiştir. İstatistik testine göre hücre canlılığındaki bu azalmalarda 10 µg/ml ve 20 µg/ml 72 saat uyarımı anlamlı bulunmuştur.

İki farklı hücre hattı için elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, bronş epitel hücrelerinde nazal hücrelere kıyasla alerjen uyarımlarından sonra hücre ölümünün daha fazla olduğu tespit edilmiştir. 2012 yılında David ve arkadaşlarının yayınladıkları bir çalışmada bronş ve nazal



epitel hücrelerin LPS ve akroleine karşı sitokin ve gen profillerinde farklı cevaplar verdiği gözlemlenmiştir [125]. Mark Thomas ve arkadaşları tarafından 2016 yılında yapılan bir araştırmada ise %50 sigara dumanı ekstraktı (CSE) konsantrasyonu ile 4 saatlik uyarımın bronş epitel hücrelerde canlılığı yaklaşık %65 azalttığı tespit edilirken, nazal epitel hücrelerde canlılığın sadece %30 azaldığı saptanmıştır [126]. Tez kapsamında gerçekleştirilen MTT testi sonucunda elde edilen veriler literatür sonuçları ile uyumlu bir şekilde; bronş epitel hücrelerin alerjen uyarımı sonrasında canlılığının nazal epitel hücrelere göre daha fazla düşmesine neden olduğu bulunmuştur.

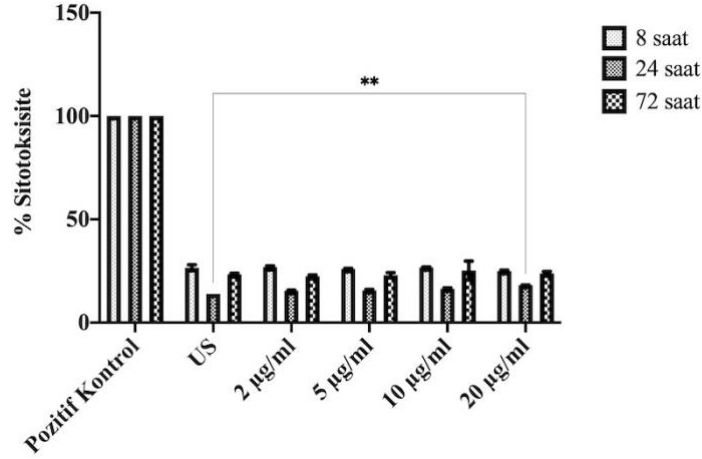
#### 4.3.2. Alerjenler ile Uyarılan RPMI-2650 Hücrelerinin Sitotoksosite Ölçümlerinin LDH Testi ile Tespiti



Şekil 4.16. RPMI-2650 hücrelerinin artan konsantrasyonlarda ve farklı zamanlarda Der p6 alerjeni ile uyarılması sonucunda elde edilen LDH sonuçları; n=3; \*p<0,01 \*\*p<0,005

Der p6 uyarımlarının LDH sonuçları için ‘‘Dunnet Çoklu Karşılaştırma’’ istatistik testi kullanılmış ve sonuçlar uyarılmamış (US) koşul ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmaların her biri saatler içindeki kendi uyarılmamış koşulları ile yapılmıştır. 8 saatlik farklı dozlarda Der p6 uyarımının sitotoksosite değerlerinin yaklaşık %20 civarında olduğu ve US ile karşılaştırıldığında uyarımların sitotoksosite değerlerinin benzer olduğu görülmüştür. 24 saatlik uyarımda sitotoksosite 8 saate göre bütün koşullarda artmış fakat koşulların sitotoksosite değerleri arasında bir farklılık gözlemlenmemiştir. Bu saatteki farklı doz uyarımların yüzde sitotoksosite değerleri yaklaşık %25 olarak hesaplanmıştır. 72 saat uyarım sonucunda da Der p6 uyarımına bağlı olarak artan bir sitotoksosite değerine rastlanmamaktadır. 2 µg/ml, 5 µg/ml, 10

$\mu\text{g/ml}$  ve  $20 \mu\text{g/ml}$  uyarımları sonucundaki yüzde sitotoksosite değerleri US ile benzer bir şekilde %15 olarak tespit edilmiştir. LDH testi sonucunda farklı dozlardaki ve saatlerdeki uyarımların hücreyi nekroza götürmediği saptanmıştır.



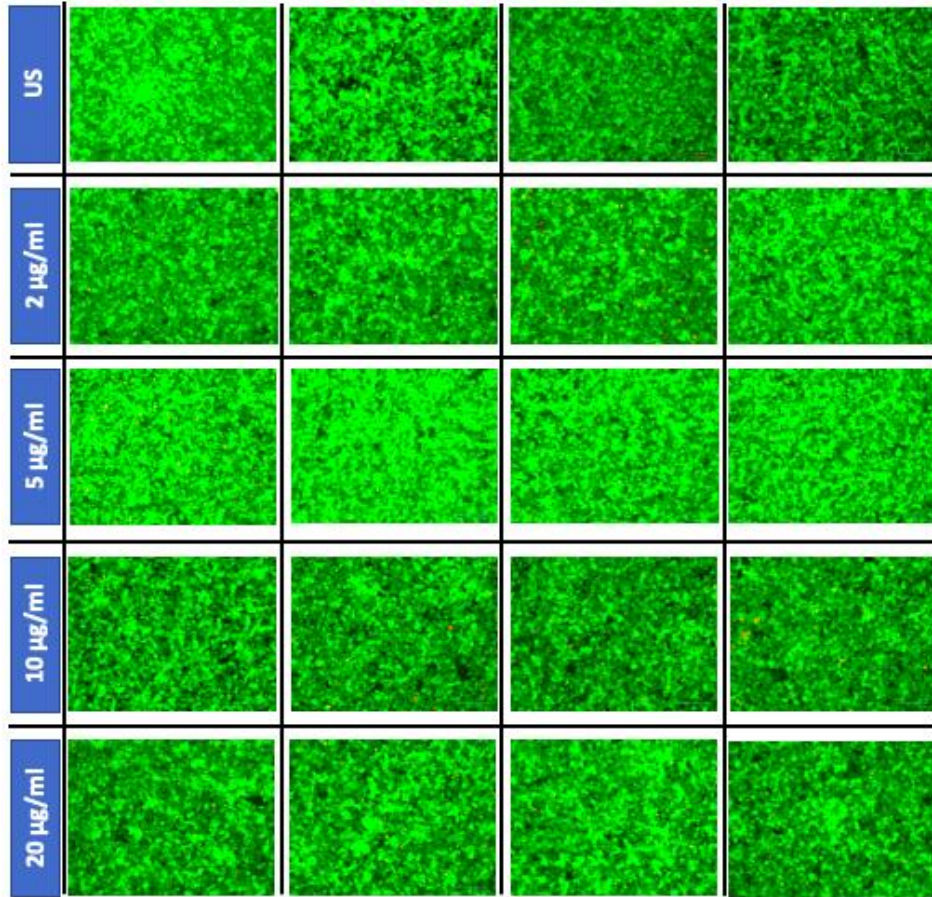
Şekil 4.17. RPMI-2650 hücrelerinin artan konsantrasyonlarda ve farklı zamanlarda Cup a1 alerjeni ile uyarılması sonucunda elde edilen LDH sonuçları; n=3; \*\*p<0,005, \*\*\*\*p<0,0001

Cup a1 uyarımlarının LDH sonuçları için “Dunnet Çoklu Karşılaştırma” istatistik testi kullanılmış ve sonuçlar uyarılmamış (US) koşul ile karşılaştırılmıştır. 8 ve 72 saatlik Cup a1 uyarımı sonucunda yüzde sitotoksosite değerleri benzer ve yaklaşık %25 olarak hesaplanmıştır. 24 saat uyarımda ise sitotoksosite değerleri ise yaklaşık %15 olarak hesaplanmıştır. Alerjen ile uyarılan koşulların yüzde sitotoksosite değerlerinin US koşulundaki değere benzer olduğu saptanmıştır. Der p6 uyarımındaki LDH sonuçlarına benzer bir şekilde Cup a1 uyarımı sonrasındaki LDH sonuçlarında da uyarıma bağlı olarak artan bir sitotoksosite değeri tespit edilmemiştir. Bu sonuçlar Cup a1 ile uyarılan RPMI-2650 hücrelerinin bu doz ve zamanlarda nekroza gitmediğini göstermektedir.

BEAS-2B ve RPMI-2650 hücrelerinin Cup a1 uyarımı sonrasında elde edilen sitotoksosite değerleri karşılaştırıldığında, Cup a1 alerjeninin bronş epitel hücre hattı için daha toksik bir etkiye sebep olduğu gözlemlenmektedir. MTT ve LDH sonuçlarına bakıldığında, bronş epitel hücre hattı olan BEAS-2B ile kıyaslandığında nazal epitel hücre hattı olan RPMI-2650 hücrelerinin Cup a1 aracılı hücre ölümüne karşı daha dirençli olduğu görülmüştür (Şekil 4.4, 4.7, 4.15 ve 4.17).

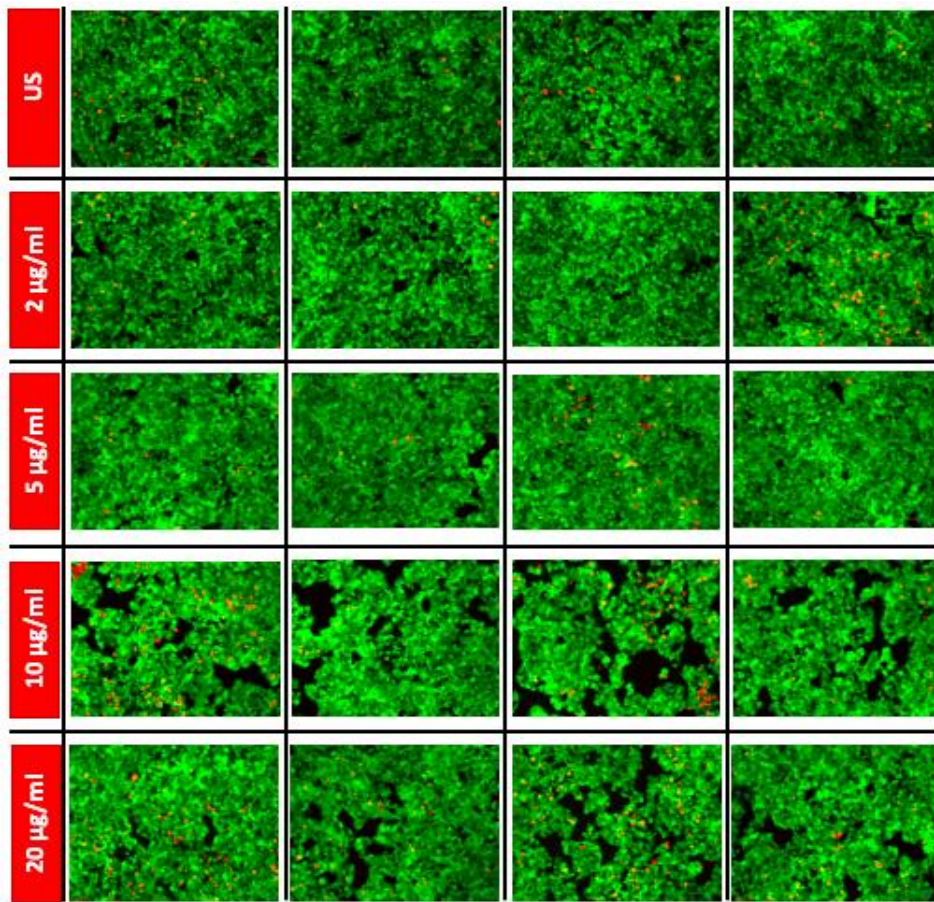
### 4.3.3. Alerjenler ile Uyarılan RPMI-2650 Hücrelerinde Canlı/Ölü Hücrelerin EtBr/Kalsein Boyaması ile Floresan Mikroskopta Görüntülenmesi

2 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml dozlar ile 8, 24 ve 72 saat uyarılan RPMI-2650 hücrelerinde hücre canlılığının tespiti için EtBr/Kalsein boyaları kullanılarak floresan boyama yapılmış ve sonuçlar EVOS Floid floresan mikroskobu ile gözlemlenmiştir. Bu deney sonucunda canlı olan hücreler yeşil renkte, ölü hücreler ise kırmızı renkte gözlemlenmesi gerekmektedir. 4. pasaj RPMI-2650 hücre hattı kullanılarak yapılan bu deneyde, floresan mikroskopta görüntü alınırken kuyucuğun tamamını kapsayacak şekilde 4 görüntü çekilmiştir. 8, 24 ve 72 saatlik Der p6 uyarımı sonucunda elde edilen görüntüler Şekil 4.18, Şekil 4.19 ve Şekil 4.20’de gösterilmiştir. Benzer doz/zaman Cup a1 uyarım sonuçları ise Şekil 4.21, Şekil 4.22 ve Şekil 4.23’te verilmiştir.



**Şekil 4.18.** RPMI-2650 hücrelerinin 8 saatte artan konsantrasyonlarda Der p6 alerjeni ile uyarılması sonucunda elde edilen canlı/ölu hücre boyama görüntüleri (20X, bar 100 µm) (yeşil:canlı; kırmızı:ölu)

8 saatlik artan konsantrasyonlarda Der p6 uyarımı sonrasında RPMI-2650 hücrelerinin EtBr/Kalsein boyama sonuçları incelendiğinde, uyarım dozlarında gözlemlenen hücre ölümünün US koşulundakinden çok fazla olmadığı ve görüntülerin benzerlik gösterdiği gözlemlenmiştir. 8 saat uyarımın hücre morfolojisinde de bir değişikliğe sebep olmadığı tespit edilmiştir. Der p6 alerjeninin serin proteaz aktivitesinin kullanılan dozlarda ve 8 saatte toksik bir etkiye sebebiyet vermediği düşünülmektedir. EtBr/Kalsein boyama sonuçları MTT ve LDH testlerinin sonuçları ile benzerlik göstermektedir (Şekil 4.15 ve Şekil 4.17). Literatürde 8 saatte Der p6 alerjeni ile nazal epitel hücreyi uyaran başka bir çalışma bulunamamıştır.

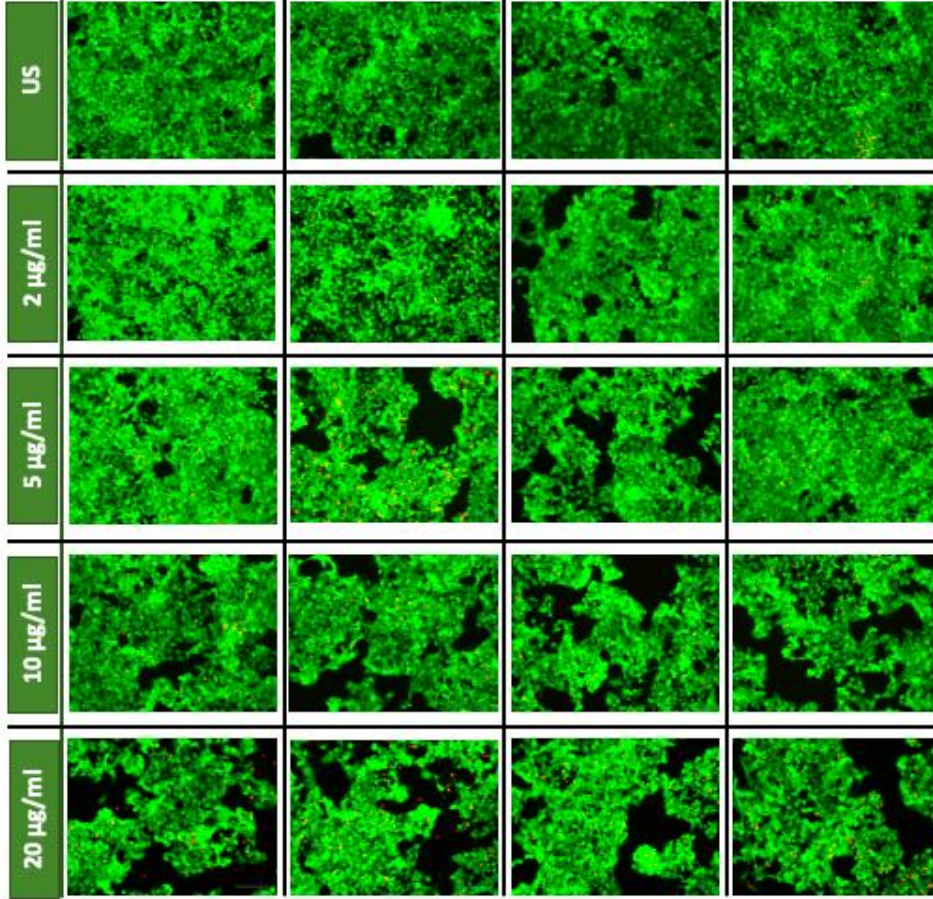


**Şekil 4.19.** RPMI-2650 hücrelerinin 24 saatte artan konsantrasyonlarda Der p6 alerjeni ile uyarılması sonucunda elde edilen canlı/ölü hücre boyama görüntüleri (20X, bar 100 µm)

24 saatlik artan konsantrasyonlarda Der p6 uyarımı sonrasında RPMI-2650 hücrelerinin EtBr/Kalsein boyama sonuçları incelendiğinde, 2 µg/ml ve 5 µg/ml uyarımlarının anlamlı bir ölüme yol açmadığı ve uyarılmamış US koşulu ile benzer bir boyama sonucu tespit edilmiştir. 10 µg/ml ve 20 µg/ml Der p6 uyarımında ise uyarılmamış koşula kıyasla hücre canlılığının

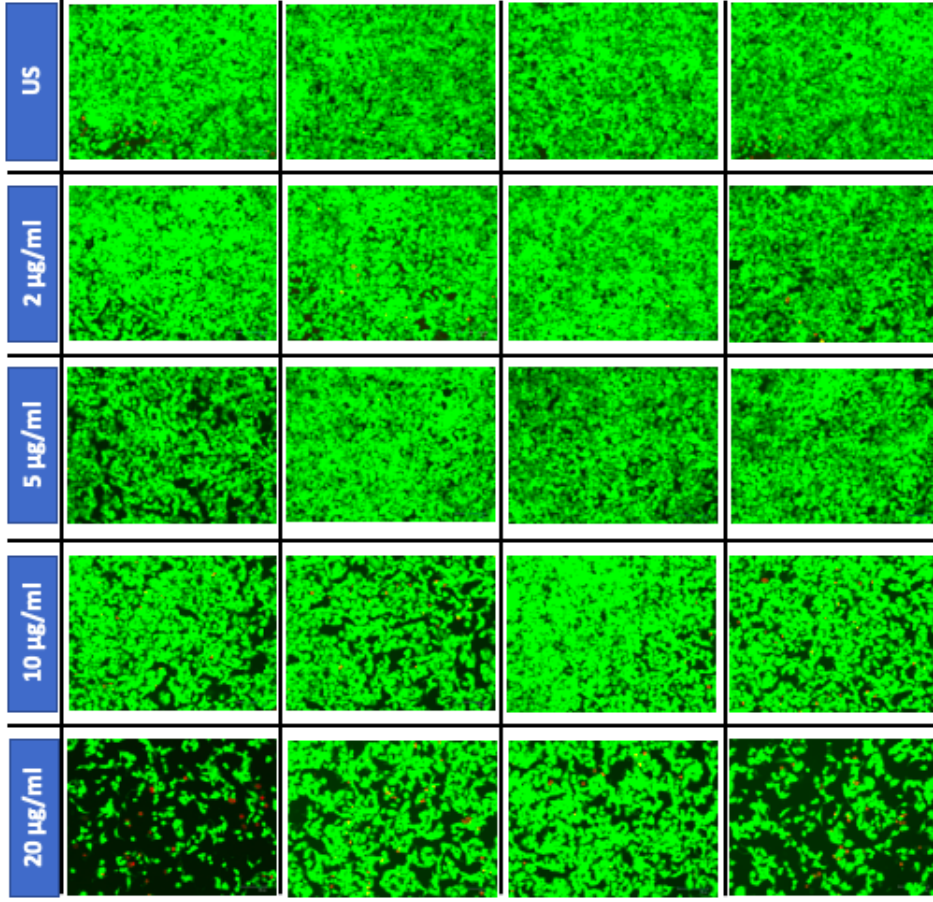


önemli bir şekilde azaldığı gözlemlenmiştir. 10 µg/ml ve 20 µg/ml dozlarındaki Der p6 ile 24 saat boyunca uyarılan RPMI-2650 hücrelerinin alerjen uyarımından etkilendiği gözlenmektedir. MTT testinde 24 saat ve dozlardaki uyarımlarda hücre canlılığında azalma tespit edilememesine karşın, görüntü sonuçları incelendiğinde 10 µg/ml ve 20 µg/ml Der p6 uyarımının hücre ölümüne sebep olduğu gözlemlenmektedir.



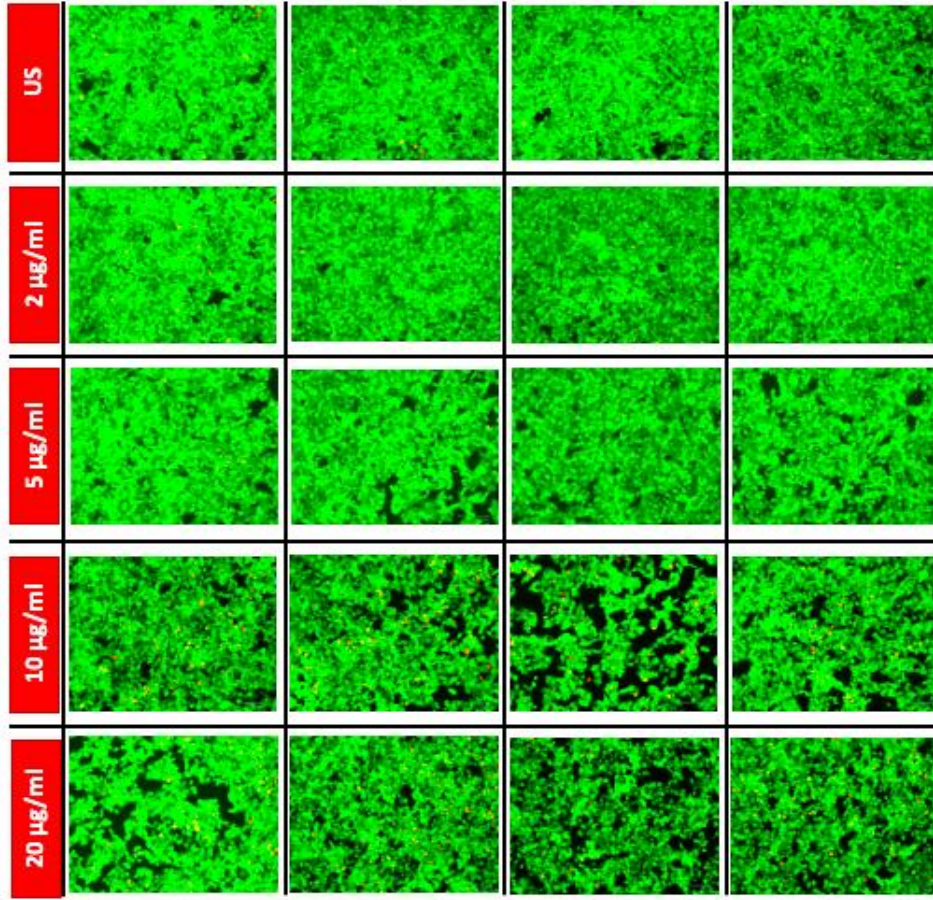
**Şekil 4.20.** RPMI-2650 hücrelerinin 72 saatte artan konsantrasyonlarda Der p6 alerjeni ile uyarılması sonucunda elde edilen canlı/ölü hücre boyama görüntüleri (20X, bar 100 µm)

72 saatlik artan konsantrasyonlarda Der p6 uyarımı sonrasında RPMI-2650 hücrelerinin EtBr/Kalsein boyama sonuçları incelendiğinde, artan dozlarda alerjen uyarımının US koşulu ile karşılaştırıldığında canlı hücre sayısında azalma gözlemlenmiştir. 10 µg/ml ve 20 µg/ml Der p6 uyarımı sonucunda görüntülerde ölü hücre sayısında artış, canlı hücre sayısında ise azalış tespit edilmiştir. Elde edilen boyama sonuçlarında MTT ve LDH sonuçlarının aksine, nazal epitel hücrelerde alerjen dozundaki artış ile orantılı bir şekilde canlı hücre sayısında düşüş görülmüştür.



**Şekil 4.21.** RPMI-2650 hücrelerinin 8 saatte artan konsantrasyonlarda Cup a1 alerjeni ile uyarılması sonucunda elde edilen canlı/ölü hücre boyama görüntüleri (20X, bar 100 µm) (yeşil:canlı; kırmızı:ölü)

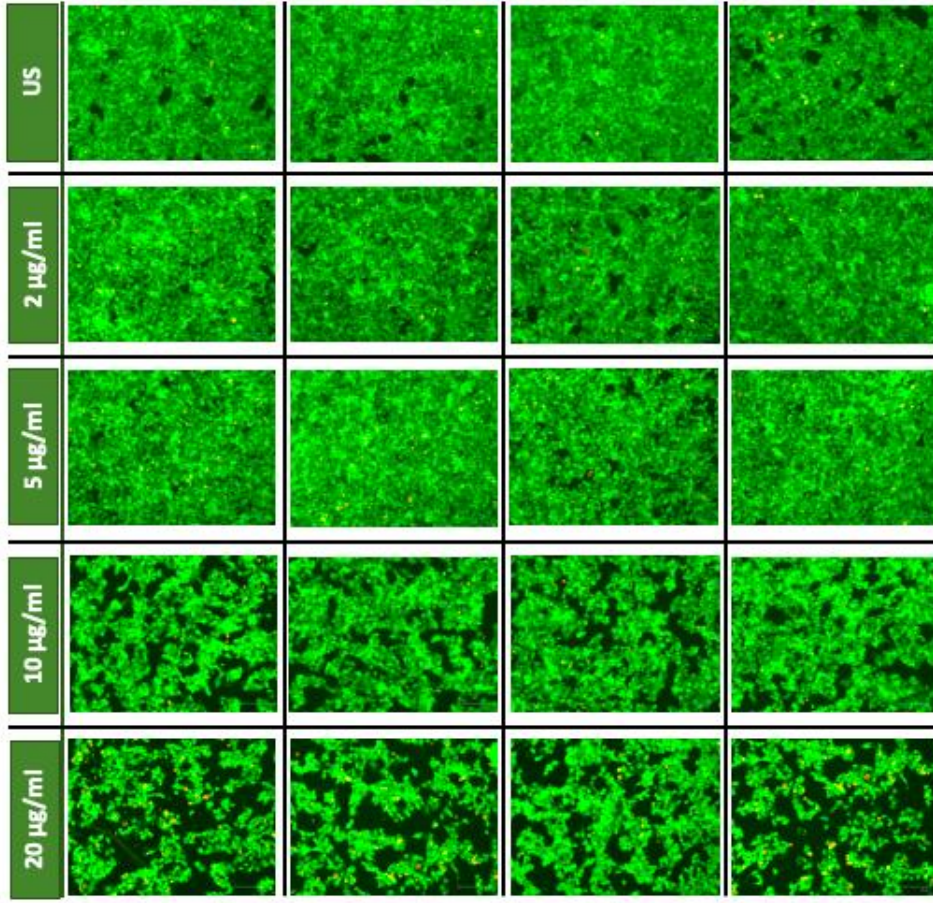
8 saatlik artan konsantrasyonlarda Cup a1 uyarımı sonrasında RPMI-2650 hücrelerinin EtBr/Kalsein boyama sonuçları incelendiğinde, 2 µg/ml ve 5 µg/ml uyarımlarında US ile kıyaslandığında canlı hücre yoğunluğunun benzer olduğu görülmüştür. 10 µg/ml uyarımında canlılık uyarılmamış koşula kıyasla küçük bir miktarda azalmasına karşın, anlamlı bir ölüm gözlenmemiştir. 20 µg/ml Cup a1 ile uyarılan canlı nazal epitel sayısında belirgin bir azalma gözlemlenmiştir. MTT deneyi sonucunda 20 µg/ml uyarımın US koşuluna kıyasla hücre canlılığını %90 değerine düşürdüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.15).



**Şekil 4.22.** RPMI-2650 hücrelerinin 24 saatte artan konsantrasyonlarda Cup a1 alerjeni ile uyarılması sonucunda elde edilen canlı/ölu hücre boyama görüntüleri (20X, bar 100 µm) (yeşil:canlı; kırmızı:ölu)

24 saat Cup a1 ile uyarılan RPMI-2650 hücrelerinin ikili boyama sonuçları incelendiğinde, 2 µg/ml uyarım ve US koşulu arasında canlı hücre sayısının benzer olduğu gözlemlenmiştir. 10 µg/ml ve 20 µg/ml uyarımlarda ise ölu hücre sayılarında artış tespit edilmiştir. Elde edilen ikili canlı/ölu hücre boyama sonuçlarında, yüksek dozlarda ölu hücre sayısında artış gözlemlenmesine rağmen MTT ve LDH deneylerinin sonuçlarında hücre canlılığında düşüşe ya da sitotoksisite değeriinde artışa rastlanmamaktadır (Şekil 4.15 ve Şekil 4.17).





**Şekil 4.23.** RPMI-2650 hücrelerinin 72 saatte artan konsantrasyonlarda Cup a1 alerjeni ile uyarılması sonucunda elde edilen canlı/ölü hücre boyama görüntüleri (20X, bar 100 µm) (yeşil:canlı; kırmızı:ölü)

RPMI-2650 hücreleri 72 saat 2 µg/ml ve 5 µg/ml Cup a1 alerjeni ile uyarıldıktan sonra yapılan EtBr/Kalsein ikili boyamada görüntü sonuçlarına bakıldığında US koşuluna kıyasla anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Fakat doz artışına bağlı olarak 10 µg/ml ve 20 µg/ml koşullarında canlı hücre sayılarında azalma tespit edilmiştir. MTT sonucunda canlılık, 10 µg/ml Cup a1 uyarımda %73, 20 µg/ml Cup a1 uyarımda ise %64 değerinde tespit edilmiştir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde, elde edilen boyama görüntüleri ile MTT sonuçlarının uyumlu olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.15).

Canlılık ve sitotoksosite deney sonuçları incelendiğinde yapılan 3 testin sonuçlarının bronş epitel hücre uyarımlarında birbirleri ile uyumlu olduğu gözlemlenirken, nazal epitel hücrelerdeki 24 ve 72 saat Der p6 ve 24 saat Cup a1 uyarımlarının test sonuçları arasında çelişki gözlemlenmektedir. Alerjen dozunu belirleyebilmek amacıyla gerçekleştirilmiş olan 3 testin



çalışma prensibi birbirinden farklıdır. MTT testi, farklı uyarılara maruz kalma sonucunda hücrelerin mitokondriyal aktivitelerini ölçerek canlılık hakkında bilgi verirken; LDH testi ise membran hasarı nedeniyle ortama salınan laktat dehidrojenaz enziminin miktarı üzerinden sitotoksisiteyi ölçmektedir. İkili boyama deneyinde ise membran geçirgenliği prensibine dayalı olarak canlı ve ölü hücreleri boyamaktadır. Boyama sonucunda gözlemlenen hücre ölümlerinin MTT test sonuçlarında gözlemlenmemesinin sebebi alerjen uyarımlarının kaspaz bağımlı yolları tetiklemesi ile mitokondriyal aktivitenin artmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. LDH testi ile belirlenen sitotoksisite sonuçlarının görüntü sonuçları ile korele olmama sebebi ise alerjen uyarımı sonrasında hücrelerin nekroz ile değil de programlı ölüm yolları ile ölüme gitmesinden kaynaklanabilir diye düşünülmektedir.

Canlılık ve sitotoksisite deneyleri kapsamında uygun doz ve zamana karar verebilmek için 3 farklı test (MTT, LDH ve EtBr/Kalsein ikili boyama) RPMI-2650 ve BEAS-2B hücreleri ile yapılmıştır. Yapılan bu deneyler sonucunda sonraki iş paketleri için hem hücre canlılığının azaldığı hem de LDH miktarının kontrol koşuluna göre artmadığı saat ve dozlar seçilmiştir. Elde edilen tüm sonuçlarda hücre canlılığının 2 farklı alerjen ve hücre hattında 72 saatte net bir şekilde azaldığı gözlemlenmiştir. Analizler sonucunda BEAS-2B hücre hattı için Cup a1 alerjeninde 2 µg/ml ve 5 µg/ml dozları seçilirken, Der p6 alerjen uyarımı için 10 µg/ml ve 20 µg/ml dozları ilerleyen çalışmalar için seçilmiştir. RPMI-2650 hücre hattı için ise Cup a1 alerjeninde 10 µg/ml ve 20 µg/ml dozları seçilirken, Der p6 alerjen uyarımında kullanılmak üzere 10 µg/ml ve 20 µg/ml dozları seçilmiştir. Alerjenlere karşı hücre cevabının inceleneceği diğer deneylerde bu dozların 8, 24 ve 72 saat uyarımının yapılmasına karar verilmiştir. Seçilen konstrasyonlar Tablo 4.1’de özetlenmiştir.

**Çizelge 4.1.** Canlılık ve sitotoksisite testleri sonucunda belirlenen dozlar

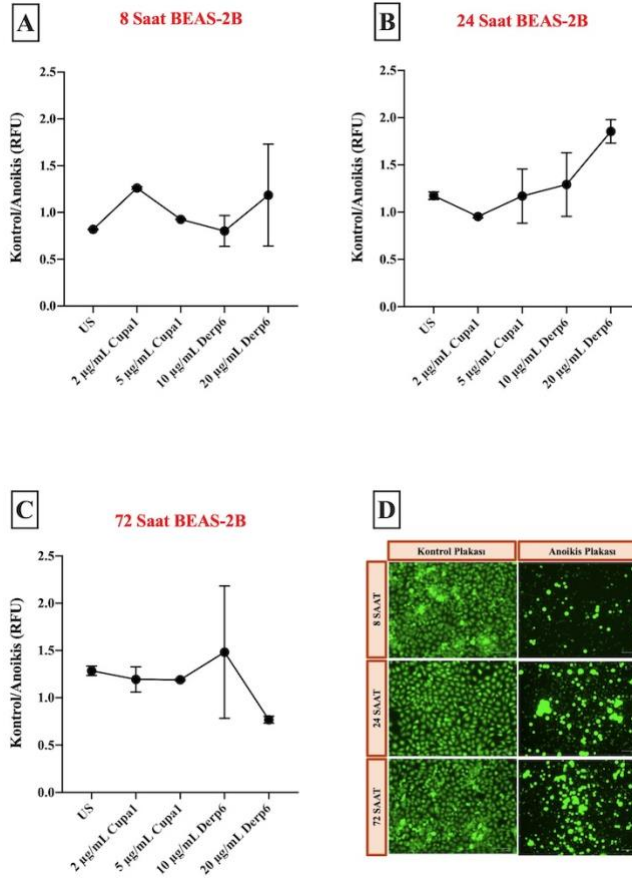
	<b>Cup a1</b>	<b>Der p6</b>
<b>BEAS-2B</b>	2 µg/ml ve 5 µg/ml	10 µg/ml ve 20 µg/ml
<b>RPMI-2650</b>	10 µg/ml ve 20 µg/ml	10 µg/ml ve 20 µg/ml

Ek olarak, ilerleyen deneyler için kullanılan dozun insan vücudunda maruz kalınan alerjen miktarları ile uyumlu olması hedeflenmiş olup, bu doğrultuda uygun dozlar belirlenmiştir. Literatürde günlük solunum yolu ile maruz kaldığımız Der p6 ve Cup a1 miktarı bilinmemektedir. Fakat 1994 yılında yapılan bir araştırma HDM’nin majör alerjenleri olan Der

p1 ve Der p2 miktarları 6 farklı HDM içeriğinde analiz edilmiş ve HDM'de 12-30 µg/ml Der p1 alerjeni ve 3-15 µg/ml Der p2 alerjini tespit edilmiştir [127]. 2020 yılında yürütülen bir başka çalışmada ise astımlı çocukların odasından ev tozu toplanmış ve içeriğinde sadece yaklaşık 291,56 ng/g Der p1 bulunduğu gösterilmiştir [128]. Bu çalışmalardan yola çıkarak Der p6 alerjen dozunu arttırmanın günlük koşulları taklit edemeyeceği düşünülmüştür. Cup a1 ile ilgili literatürde böyle bir çalışmaya rastlanmamıştır. Fakat 2011 yılında Phelum pratense bitkisinin alerjeni olan ve Cup a1 gibi IgE'ye bağlanabilen karbonhidrat bölgesi bulunan Phl p5 ile yapılan bir çalışmada, alerji semptomu göstermek için günlük 15-25 µg alerjene maruz kalınmasının yeterli olduğu gözlemlenmiştir [129]. Literatürde bu sonuçlardan yola çıkarak ve deney sonuçları değerlendirilerek dozlara karar verilmiştir.

#### **4.4. BEAS-2B ve RPMI-2650 Hücre Hatlarında Artan Doz ve Zamanlarda Cup a1 ve Der p6 Alerjen Uyarımının Anoikis Yolağı Üzerine Etkisi**

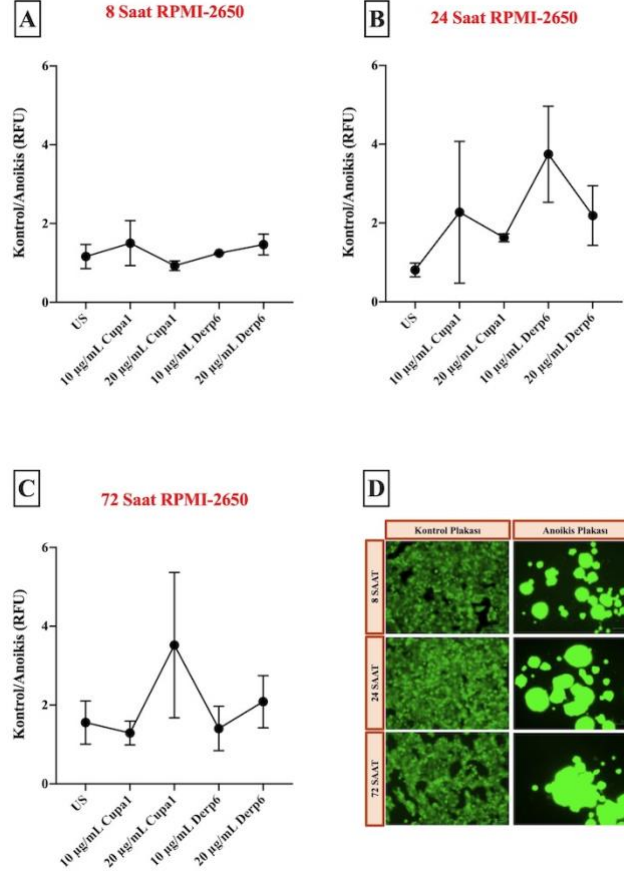
Gerçekleştirilen deney sonucunda elde edilen kontrol ve anoikis plakasındaki RFU değerleri oranlanmıştır. Kontrol/Anoikis oranı 1'den büyük ise uyarım anoikis ölüm yolağına sebep olmuş, oran 1'den küçük ya da eşit ise uyarım anoikis ölüm yolağını tetiklememiş şeklinde yorum yapılmıştır. Uyarım sonrasında BEAS-2B ve RPMI-2650 hücrelerinde gerçekleştirilen anoikis testlerinin sonuçları Şekil 4.24 ve Şekil 4.25'te verilmiştir.



**Şekil 4.24.** Uygun konsantrasyondaki alerjenler ile uyarılan BEAS-2B hücrelerinin 8 saat (A), 24 saat (B) ve 72 saat (C) RFU oranları ve kontrol koşullarının floresan mikroskop (D) görüntüleri (20X, bar 100 µm)

8 saat uyarımları incelendiğinde kontrol/anoikis oranları 2 µg/ml Cup a1 uyarımı için 1,26 olarak; 20 µg/ml Der p6 uyarımı için ise 1,18 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.24-A). Bu koşullar alerjen ile uyarılmamış kontrol koşulunun oranı ile karşılaştırıldığında ise anlamlı bir artış gözlemlenmemiştir. 24 saat uyarımında ise 10 µg/ml Der p6 uyarımında oran 1,29 hesaplanırken, 20 µg/ml Der p6 uyarımında oran 1,85 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.24-B). 72 saat uyarım koşulları incelendiğinde ise en yüksek oranının 10 µg/ml Der p6 dozunda 1,48 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.24-C). 8 saat uyarımları ile benzer şekilde 24 ve 72 saat uyarımlarında da kontrol koşuluna kıyasla anlamlı bir artış gözlemlenmemiştir. Floresan mikroskop ile uyarılmamış koşullar kontrol edilmiştir (Şekil 4.24-D). Literatür ile uyumlu bir şekilde kontrol plakasına ekilen bronş epitel hücreler yüzeye tutunmuşken PolyHema kaplı anoikis plakasına ekilen bronş epitel hücreler yüzeye tutunmamıştır [130]. Elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında 20 µg/ml Der p6 uyarımının 24 saatteki oranının 8 ve 72 saate kıyasla daha

yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum 24 saatlik uyarımın hücrelerde anoikis yolağını tetikleyebileceği ve diğer uyarımlarda gözlemlenen hücre ölümlerinin farklı yollar üzerinden gerçekleşmiş olabileceğini düşündürmektedir.



**Şekil 4.25.** Uygun konsantrasyondaki alerjenler ile uyarılan RPMI-2650 hücrelerinin 8 saat (A), 24 saat (B) ve 72 saat (C) RFU oranları ve kontrol koşullarının floresan mikroskop (D) görüntüleri (20X, bar 100 µm)

8 saat 10 µg/ml Cup a1 uyarımında kontrol/anoikis oranı 1,5 olarak, 20 µg/ml Der p6 uyarımında ise oran 1,46 olarak bulunmuştur (Şekil 4.25-A). Bu oranların hiçbiri uyarılmamış koşula kıyasla anlamlı bir artış göstermemiştir. 24 saat uyarımında ise alerjen ile uyarılmış koşullarında hepsinde oran birden yüksektir (Şekil 4.25-B). Fakat 24 saat uyarımında da benzer bir şekilde kontrol koşuluna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlenmemiştir. 72 saat uyarımda en yüksek oran 3,5 ile 20 µg/ml Cup a1 koşulunda tespit edilmesine rağmen bu oran kontrol koşuluna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 4.25-C). BEAS-2B anoikis test sonuçlarına benzer şekilde RPMI-2650 hücrelerinde de kontrol koşullarının

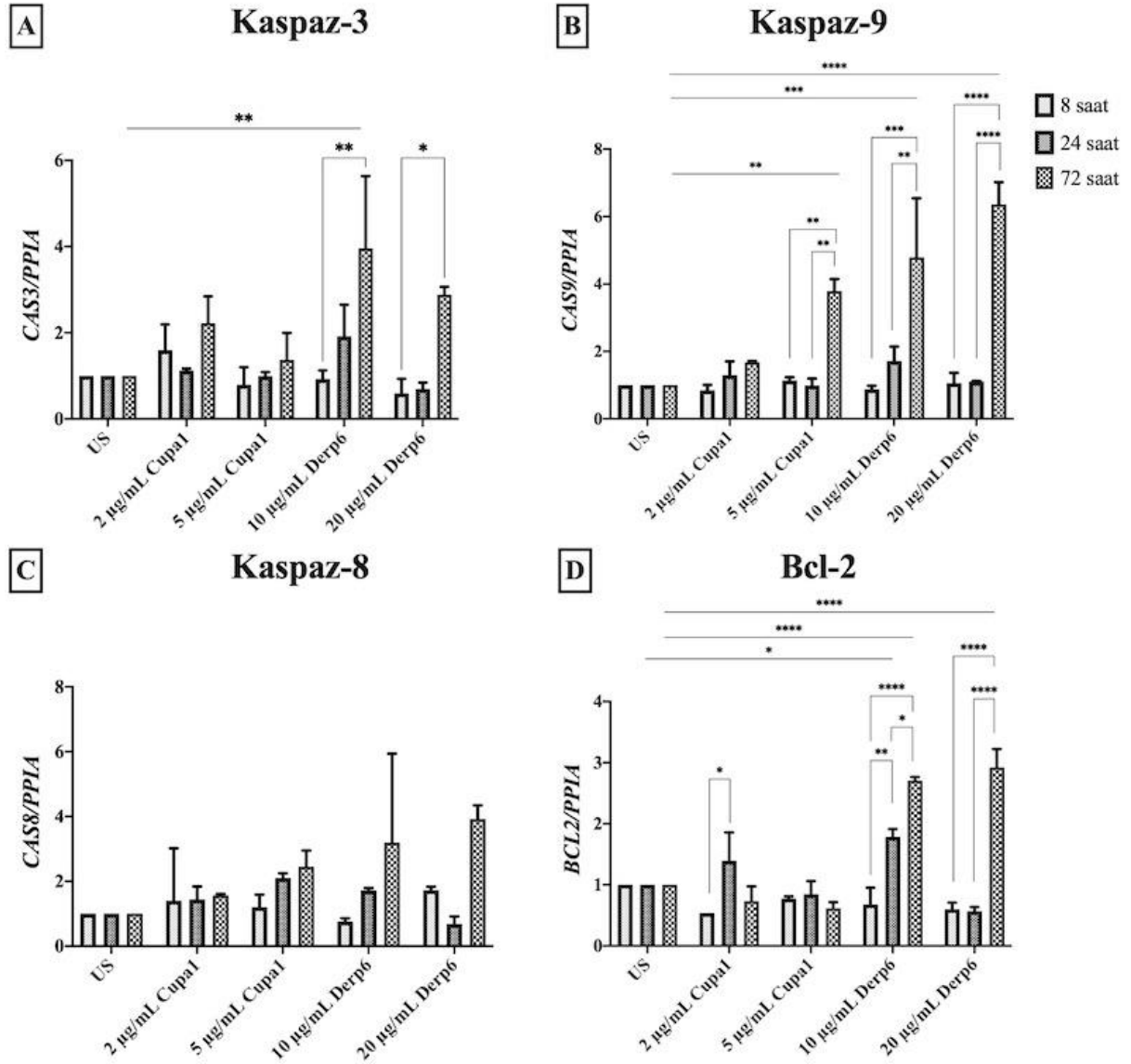
görüntüleri alınmış ve literatür ile uyumlu bulunmuştur (Şekil 4.25-D) [130]. Nazal epitel hücre uyarım sonuçları bronş epitel hücreler ile kıyaslandığında 8 saatte benzer şekilde bir anoikis için belirli bir değişiklik olmadığı gözlemlenmiştir. Fakat 24 saat uyarımında bronş epitel hücrelerden farklı olarak nazal epitel hücrelerde düşük doz alerjenlerin anoikis yolunu tetikleyebileceği düşünülmektedir.

#### **4.5. BEAS-2B Hücre Hattında Artan Doz ve Zamanlarda Cup a1 ve Der p6 Alerjen Uyarımının Ölüm Yolakları ve EMT Süreci Üzerine Etkisi**

Hücre cevabını ölüm yolakları ve EMT süreci üzerinden incelemek için gen ifadesi gerçek zamanlı PZR yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Apoptoz yolunu incelemek için *CAS3*, *CAS8*, *CAS9* ve *BCL2* (Şekil 4.26), Anoikis yolunu incelemek için *BMF*, *PTRH2* (Şekil 4.27), Nekroptoz yolunu incelemek için *RIPK3*, *MLKL* (Şekil 4.28), Partanatoz yolunu incelemek için *AIF*, *PARP1* (Şekil 4.29) ve EMT sürecini incelemek için *CDH1*, *CDH2* ve *SNAI1* (Şekil 4.30) genleri qPZR yöntemi ile tespit edilmiştir.

##### **4.5.1. Alerjen Uyarımı Sonrasında Apoptoz Yolunun Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi**

Alerjen uyarımı sonrasında epitel hücre yanıtını apoptoz yolu üzerinden incelemek için içsel yolda görev alan kaspaz-3 ve kaspaz-9, dışsal yolda görev alan kaspaz-8 ve anti-apoptotik görevde olan Bcl-2 proteinlerini kodlayan genlerin ekspresyonlarındaki değişimin incelenmesine karar verilmiştir [131].



**Şekil 4.26.** *CAS3* (A), *CAS9* (B), *CAS8* (C) ve *BCL2* (D) gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR analizi; n=3; \*p<0,01 \*\*p<0,005 \*\*\*p<0,0005 \*\*\*\*p<0,0001 (düz çizgiler: kontrol grubuna kıyasla uyarım koşulunun istatistiği; çentikli çizgiler: aynı alerjen dozundaki farklı saatlerin istatistiği)

Bronş epitel hücrelerin 10 µg/ml Der p6 alerjeni ile 72 saat uyarımı sonrasında içsel apoptoz yolağında efektör kapsaz olarak görev alan *CAS3* gen ifadesinde kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. 10 µg/ml Der p6 uyarımının 72 saatinde *CAS3* gen ifadesinde yaklaşık 4 katlık bir artış gözlemlenirken, 24 saatlik uyarımda yaklaşık 2 katlık bir artış tespit edilmiş ve 8 saat uyarımındaki gen ifadesi kontrol grubuyla benzer bulunmuştur. 72 saatlik 10 µg/ml ve 20 µg/ml Derp6 uyarımların 8 saatlik uyarımlarına kıyasla *CAS3* gen ifadesinde artış olduğu

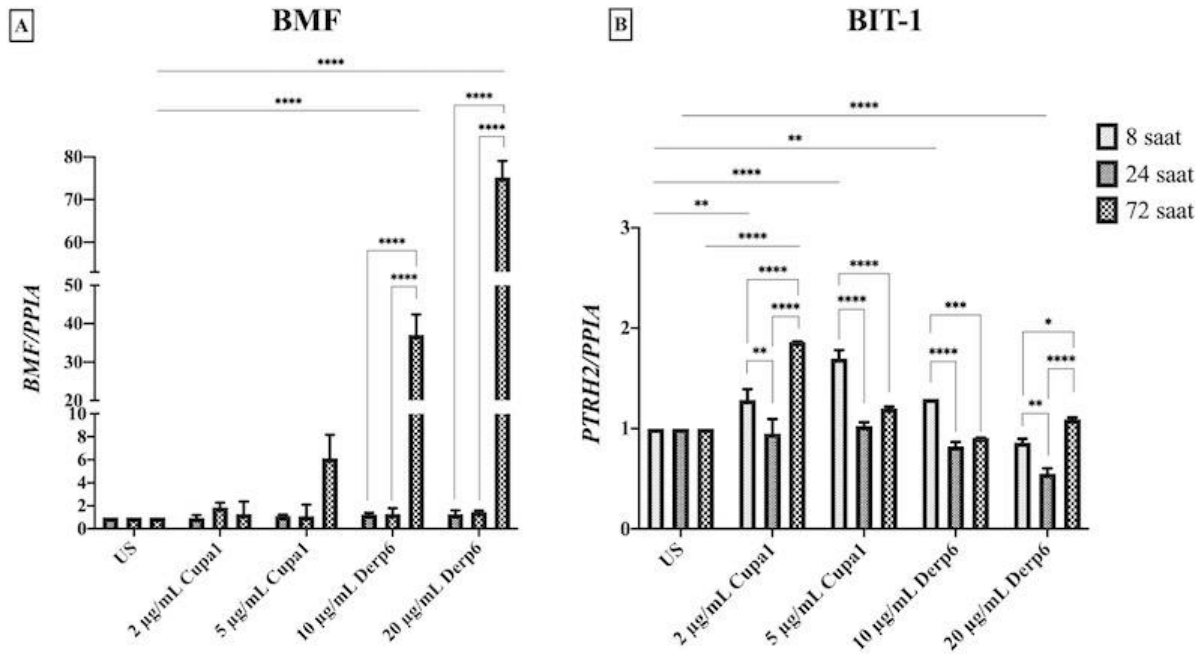
saptanmıştır (Şekil 4.26-A). Cup a1 uyarımları *CAS3* geninde artışa sebep olmazken Der p6 alerjeninin 72 saat uyarımının gen ekspresyonunda artışa sebep olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde 72 saat Der p6 uyarımlarının içsel apoptoz yolağında başlatıcı kaspaz olarak görev alan kaspaz-9 gen ifadesinde artışa sebep olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.26-B). *CAS3* sonuçlarının aksine yüksek doz Cup a1 uyarımının *CAS9* ekspresyonunu arttırdığı bulunmuştur. Elde edilen sonuçlarda, 72 saatlik uyarımların 8 ve 24 saate kıyasla *CAS9* ifadesinde artışa sebep olduğu da gösterilmiştir. Dışsal apoptoz yolağında başlatıcı kaspaz olarak görev alan *CAS8* gen ifadesinde ise hiçbir doz ve zaman uyarımında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlenmezken, yüksek doz Der p6 uyarımının *CAS8* geninde 4 katlık artışa sebebiyet verdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.26-C). Anti-apoptotik görev üstlenen *BCL2* gen ifadesinde ise 20 µg/ml Der p6 uyarımı kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 3 katlık bir artışa sebep olmuştur. 10 µg/ml Der p6 alerjeninin hem 24 hem de 72 saatlik uyarımı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *BCL2* geninde istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olmuştur. 24 saat 2 µg/ml Cup a1 uyarımı 8 saatlik uyarıma göre artış göstermiş olmasına rağmen kontrol grubuna kıyasla Cup a1 uyarımları *BCL2* gen ekspresyonunda anlamlı bir artışa sebep olmamıştır (Şekil 4.26-D). Cup a1 uyarımı *CAS9* gen ifadesini artırırken *CAS3* gen ifadesi üzerinde anlamlı bir etkisi yoktur. Bu durum, Cup a1'in başlatıcı kaspaz olan *CAS9*'un ifadesini artırarak içsel apoptozu tetikleyebileceğini ancak sonlandırıcı/cellat kaspaz olan *CAS3* genini artırmak için yeterli olmadığı ve hücrelerdeki apoptoz sürecinin tamamlanması için yeterli sinyal gönderemediğini düşündürmektedir.

2015 yılında yayınlanan bir çalışmada, BEAS-2B hücreleri HDM'nin bir diğer majör alerjeni olan Der p2 ile uyarılmış ve bunun sonucunda hücrelerde içsel ve dışsal apoptoz yolağının tetiklendiği gözlemlenmiştir. Çalışma kapsamında apoptozu araştırmak için TUNEL ve Annexin V akış sitometri teknikleri kullanılmış olup doz artışına (10, 20 ve 40 µg/ml) bağlı olarak apoptozun da arttığı tespit edilmiştir [132]. HDM'nin başka bir majör alerjeni ve sistein proteaz aktivitesine sahip olan Der p1 alerjeninin bronş epitel hücrelerde apoptozu sebep olduğu Annexin V boyaması ile 2003 yılında yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir [133]. Tze Khee ve arkadaşlarının yayınladığı bir başka çalışmada da BEAS-2B hücreleri HDM ile uyarılmış ve Annexin V akış sitometrisi ile HDM'nin hücreleri apoptozu götürdüğü saptanmıştır [134]. Benzer çalışma grubunun 2017 yılındaki bir çalışmasında ise BEAS-2B hücrelerine yapılan HDM uyarımının süresi arttıkça apoptozu uğrayan hücre sayısında arttığı gözlemlenmiştir [135]. *Olea europaea* polen ekstraktı ile 2007 yılında yapılan bir başka çalışmada ise uyarılan BALB/c farelerin akciğer dokusunda apoptozu rastlanmıştır [136]. Der p6 ve Cup a1 ile ilgili

literatürde kısıtlı çalışma olmasına ve bu çalışmaların apoptoz ile ilişkili olmamasına rağmen literatürdeki diğer polen ve HDM çalışmaları maruziyetin apoptoza sebebiyet verebileceğini göstermektedir.

#### 4.5.2. Alerjen Uyarımı Sonrasında Anoikis Yolağının Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi

Alerjen uyarımı sonrasında epitel hücre yanıtını anoikis yolağı üzerinden araştırmak için kaspaz bağımlı yolda görev alan *BMF* ve kaspaz bağımsız yolda görev alan Bit-1 proteinini kodlayan *PTRH2* gen ifadelerindeki değişim incelenmiştir [65, 137].



**Şekil 4.27.** *BMF* (A) ve *PTRH2* (B) gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR analizi; n=3; \*p<0,01 \*\*p<0,005 \*\*\*p<0,0005 \*\*\*\*p<0,0001 (düz çizgiler: kontrol grubuna kıyasla uyarım koşulunun istatistiği; çentikli çizgiler: aynı alerjen dozundaki farklı saatlerin istatistiği)

Epitel hücrelerde *BMF* anoikisin kaspaz bağımlı yolağında Bcl-2 gibi anti-apoptotik proteinleri inhibe ederek yolağa katkı sağlamaktadır. BEAS-2B hücrelerinin 72 saat Der p6 ile uyarılması sonucunda kontrol grubuna kıyasla *BMF* gen ifadelerinde artış gözlemlenmektedir. 10 µg/ml Der p6 uyarımı *BMF* geninin ekspresyonunu 37 kat artırırken, 20 µg/ml Der p6 uyarımı bu genin ifadesini 75 kat arttırmıştır. 72 saat Der p6 uyarımlarının *BMF* gen ifadesini 8 ve 24 saatlik uyarımlara göre de istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı tespit edilmiştir. Der p6 uyarımının aksine Cup a1 alerjeni ile uyarım *BMF* gen ekspresyonunda istatistiksel olarak

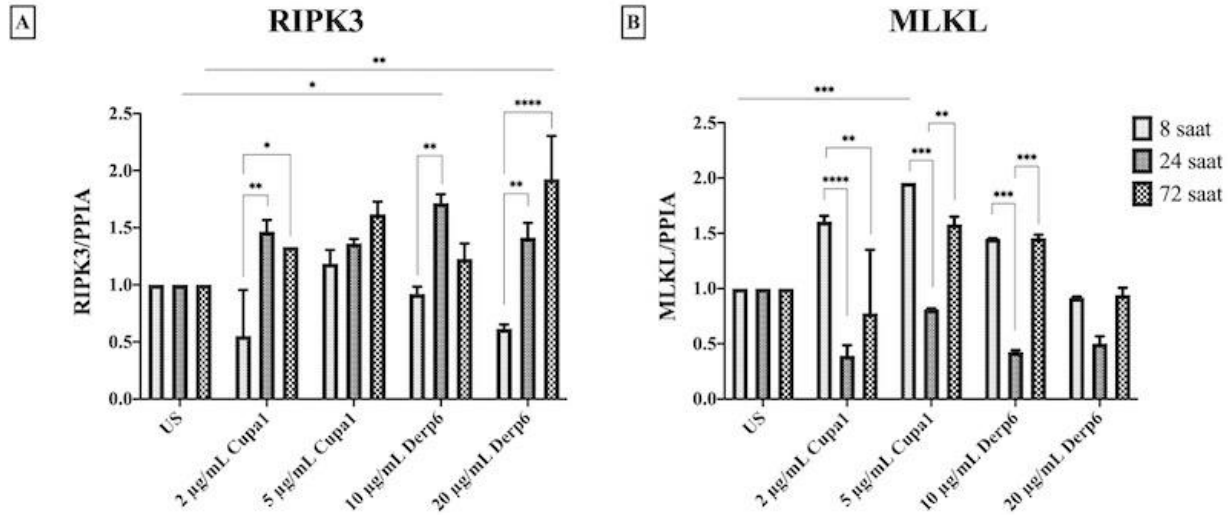


anlamli bir değişime sebep olmamiştir (Şekil 4.27-A). Anoikisin kaspaz bağımsız yolağında görev alan *PTRH2* ekspresyonunda ise iki alerjen uyarımında da *BMF* gen ekspresyonunda olduğu gibi dramatik bir artış gözlemlenmemektedir. Fakat 72 saat 2 µg/ml Cup a1 uyarımının kontrol koşuluna kıyasla *PTRH2* geninde yaklaşık 2 katlık bir artışa neden olduğu gözlemlenmektedir. 8 saatlik 5 µg/ml Cup a1 alerjen uyarımında da benzer şekilde 2 katlık anlamli bir artış gözlemlenmekle birlikte *BMF* geninin ifadesindeki gibi dramatik bir artış hiçbir uyarımda tespit edilmemiştir (Şekil 4.27-B). Der p6 uyarımı sonrasında *CAS3* ve *CAS9* gen ifadesindeki artış ile birlikte *BMF* geninde gözlemlenen artış 72 saat Der p6 alerjeni ile uyarımın anoikis yolağını tetikleyebileceğini düşündürmektedir.

Alerjen uyarımının hücrelerde anoikise sebep olma durumu ile ilgili literatürde sınırlı bilgi bulunmaktadır. 2018 yılında mantar virülans faktörü olan gliotoksin ile uyarılan BEAS-2B hücrelerinde anoikis ölüm yolağının tetiklendiğini tespit eden bir çalışma yayınlanmıştır. Bu çalışmada gliotoksinin hücreler ile ekstrasellüler matriks arasındaki integrin bağlantısına zarar vererek hücreleri anoikise sürüklediğini belirtilmiştir [111]. Proteaz aktivitesine sahip alerjenlerin de reseptörler aracılığıyla MMP9 gibi proteazların salınmasına neden olabileceği ve bu şekilde hücre-hücre ve hücre-ECM bağlantılarındaki hasara bağlı olarak anoikise görülebileceği literatürde belirtilmiştir [138].

#### **4.5.3. Alerjen Uyarımı Sonrasında Nekroptoz Yolağının Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi**

Alerjen uyarımı sonrasında epitel hücre yanıtını nekroptoz yolağı üzerinden araştırmak için *RIPK3* ve *MLKL* ifadelerindeki değişim incelenmiştir (Şekil 4.28).



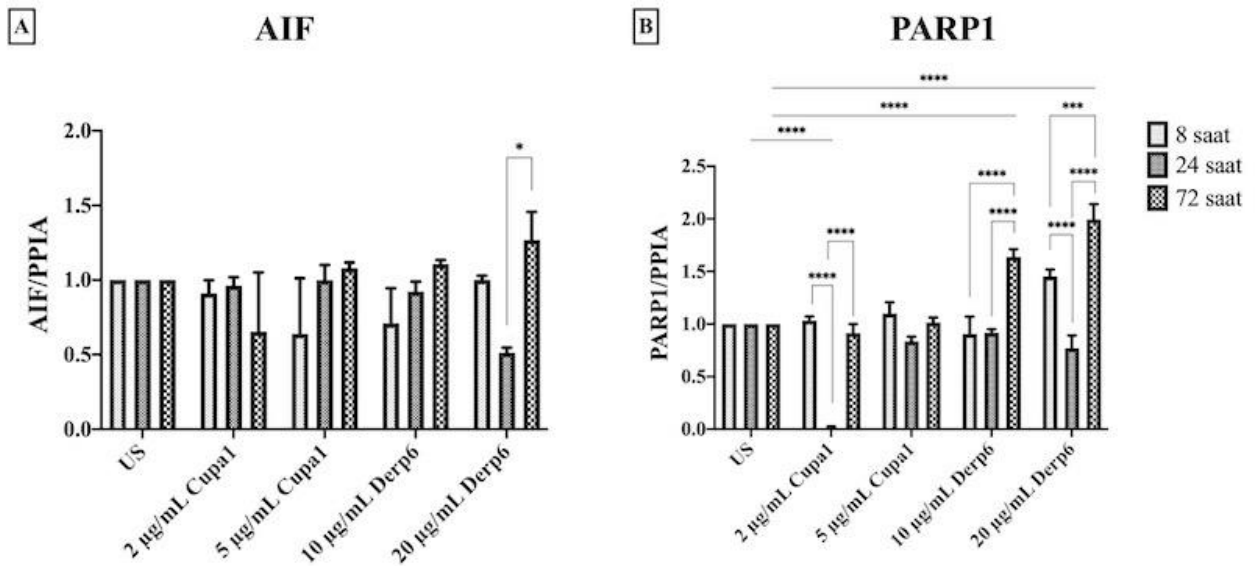
**Şekil 4.28.** *RIPK3* (A) ve *MLKL* (B) gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR analizi; n=3; \*p<0,01 \*\*p<0,005 \*\*\*p<0,0005 \*\*\*\*p<0,0001 (düz çizgiler: kontrol grubuna kıyasla uyarım koşulunun istatistiği; çentikli çizgiler: aynı alerjen dozundaki farklı saatlerin istatistiği)

Kaspaz 8 enziminin inhibe olduğu durumlarda, dış faktörlere maruziyet *RIPK3* enziminin aktive olarak *MLKL* proteinini fosforlamasına ve hücrenin nekroptoz ölüm yolağına gitmesine sebebiyet verdiği bilinmektedir [71]. Cup a1 uyarımı kontrol koşuluna göre anlamlı bir artışa neden olmazken, 24 saat 10 µg/ml Der p6 ve 72 saat 20 µg/ml Der p6 uyarımları kontrol koşuluna göre *RIPK3* gen ifadesinde anlamlı bir artışa sebep olmuştur. Kontrol koşuluna kıyasla *RIPK3* gen ifadesindeki en yüksek artış 20 µg/ml Der p6 alerjeni ile 72 saat uyarımda yaklaşık 2 kat olarak saptanmıştır. Yüksek doz Der p6 uyarımının gen ifadesinde neden olduğu değişim incelendiğinde, 72 saat uyarımın 8 saat uyarıma göre de gen ifadesini arttırdığı gözlemlenmektedir (Şekil 4.28-A). *MLKL* gen ifadesinde ise sadece 8 saat 5 µg/ml Cup a1 uyarımının kontrol koşuluna göre artışa sebep olduğu gözlemlenmektedir. İki farklı konsantrasyondaki Der p6 uyarımı sonucunda *MLKL* gen ifadesinde anlamlı bir değişim saptanmamıştır. *RIPK3* gen ifadesindeki anlamlı artış Der p6 uyarımında gözlemlenirken, *MLKL* seviyesindeki istatistiksel olarak anlamlı artış Cup a1 uyarımında tespit edilmiştir (Şekil 4.28-B). Nikos ve arkadaşlarının 2021 yılında HDM ile indüklenen astım fare modeli ile yaptıkları bir çalışmada, hava yolu epitel hücrelerinde gerçekleşen nekroptozun hava yolu alerjik inflamasyonunu şiddetlendirdiği tespit edilmiştir [80]. Tez kapsamında Cup a1 ve Der p6 uyarımları sonrasında yapılan gen ifadesi analizlerinde nekroptoz yolağı ile ilişkili genlerdeki anlamlı artış çok yüksek olmasa da alerjen uyarımının nekroptoz ölüm yolunu düşük

bir düzeyde tetikleyebileceği düşünülmektedir. 24 ve 72 saat uyarımlarında *RIPK3* gen ifadesinde artışa sebep olan Der p6 koşullarının, MLKL proteinin fosforilasyonunu sağlayarak nekroptoz yolağını indüklemiş olabileceği tahmin edilmektedir.

#### 4.5.4. Alerjen Uyarımı Sonrasında Partanatoz Yolağının Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi

Alerjen uyarımı sonrasında epitel hücre yanıtını partanatoz yolağı üzerinden araştırmak için *AIF* ve *PARP1* ifadelerindeki değişim incelenmiştir. Epitel hücrelerde gerçekleşen bu ölüm yolağında, uyarana bağlı hızla aktive olan PARP-1 enzimi mitokondriden AIF salınmasına neden olmaktadır. Sonrasında ise çekirdeğe transloke olan AIF, DNA fragmantasyonuna sebep olarak hücreyi ölüme götürmektedir [69].



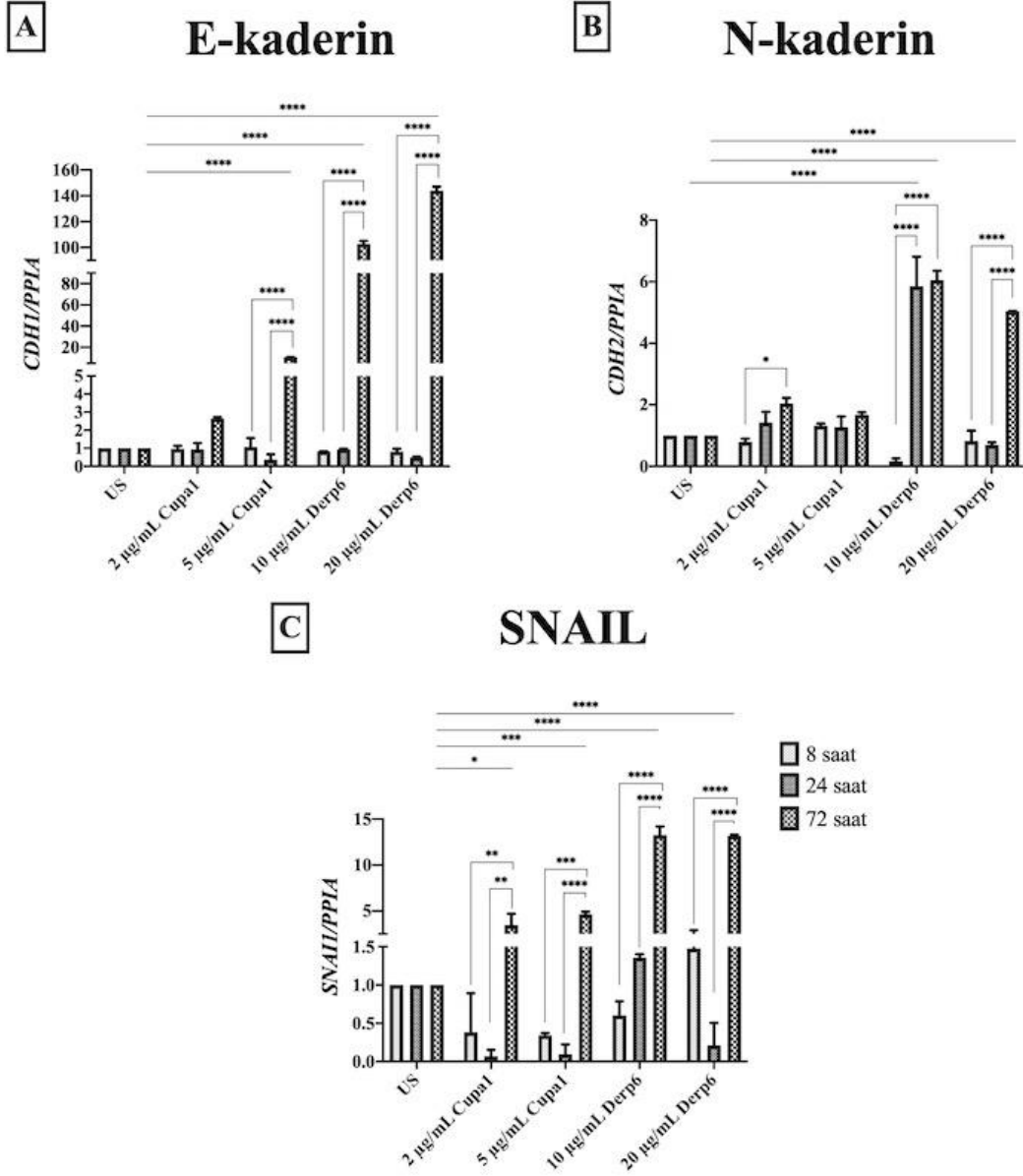
**Şekil 4.29.** *AIF* (A) ve *PARP1* (B) gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR analizi; n=3; \*p<0,01 \*\*\*p<0,0005 \*\*\*\*p<0,0001 (düz çizgiler: kontrol grubuna kıyasla uyarım koşulunun istatistiği; çentikli çizgiler: aynı alerjen dozundaki farklı saatlerin istatistiği)

Gen ifade sonuçları incelendiğinde, hiçbir uyarımın kontrol koşuluna göre *AIF* geninin seviyesinde anlamlı bir artışa neden olmamıştır (Şekil 4.29-A). Cup a1 alerjen uyarımının iki dozunda da *PARP1* seviyesinde artış gözlemlenmemiştir. Fakat 72 saat Der p6 uyarımlarının kontrol koşuluna kıyasla *PARP1* gen seviyesini arttırmıştır. Konsantrasyonlar kendi aralarındaki saatler ile karşılaştırıldığında da 72 saat uyarımın 8 ve 24 saatlik uyarımlara göre

*PARP1* gen ekspresyonunu arttırdığı görülmüştür. *PAPRI* gen ifadesindeki en yüksek artış 72 saat 20 µg/ml Der p6 uyarımında yaklaşık 2 kat olarak saptanmıştır (Şekil 4.29-B). Sigara dumanı uyarımının insan bronş epitel hücrelerinde partanatoz ölüm yolağını tetiklediği bilgisine AIF proteininin çekirdeğe transloke edilen miktarı ölçülerek tespit edilmiş [139] ve epitel hücrelerde gözlemlenen ölüm yolaklarından birinin de partanatoz olduğu gösterilmiştir. Zaffini ve arkadaşlarının 2016 yılında yayınladıkları başka bir çalışmada ise, HDM ile indükledikleri kronik astım modelinde PARP-1 enzimi inhibe edilmiş ve bunun sonucunda hava yolu yeniden yapılandırılma sürecinin etkilendiği gözlemlenmiştir [79]. Bu bulgular, özellikle Der p6 alerjeni ile uyarımın *PARP-1* gen ifadesindeki artışa neden olarak partanatoz ölüm yolunu tetikleme potansiyelinin olduğunu, ancak kullanılan konsantrasyon ve uyarım süresinin *AIF* gen ifadesini artıracak şiddette olmadığını göstermektedir.

#### **4.5.5. Alerjen Uyarımı Sonrasında EMT Sürecinin Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi**

Alerjen uyarımı sonrasında epitel hücre yanıtını EMT yolağı üzerinden araştırmak için epitel hücre biyobelirteci olan E-kaderin, mezenkimal hücre biyobelirteci olan N-kaderin ve EMT sürecinde transkripsiyon faktörü olan SNAIL proteinleri kodlayan gen ifadelerindeki değişim incelenmiştir. E-kaderin proteinini kodlayan gen *CDH1*, N-kaderini kodlayan gen *CDH2* ve SNAIL proteinini kodlayan gen *SNAI1* olarak isimlendirilmektedir.



**Şekil 4.30.** *CDH1* (A), *CDH2* (B) ve *SNAI1* (C) gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR analizi; n=3; \*p<0,01 \*\*p<0,005 \*\*\*p<0,0005 \*\*\*\*p<0,0001 (düz çizgiler: kontrol grubuna kıyasla uyarım koşulunun istatistiği; çentikli çizgiler: aynı alerjen dozundaki farklı saatlerin istatistiği)

*CDH1*, *CDH2* ve *SNAI1* gen ifadelerindeki uyarıma bağlı değişim Şekil 4.30'de gösterilmiştir. E-kaderin gen ifadesindeki değişim incelendiğinde, 8 ve 24 saatlik alerjen uyarımları kontrol koşuluna kıyasla anlamlı bir değişime neden olmazken, 72 saatlik 5 µg/ml Cup a1, 10 µg/ml Der p6 ve 20 µg/ml Der p6 uyarımlarının gen ifadesinde dramatik bir artışa sebep olduğu gözlemlenmektedir. 5 µg/ml Cup a1 ile 72 saat uyarılan BEAS-2B hücrelerinde ise E-kaderin

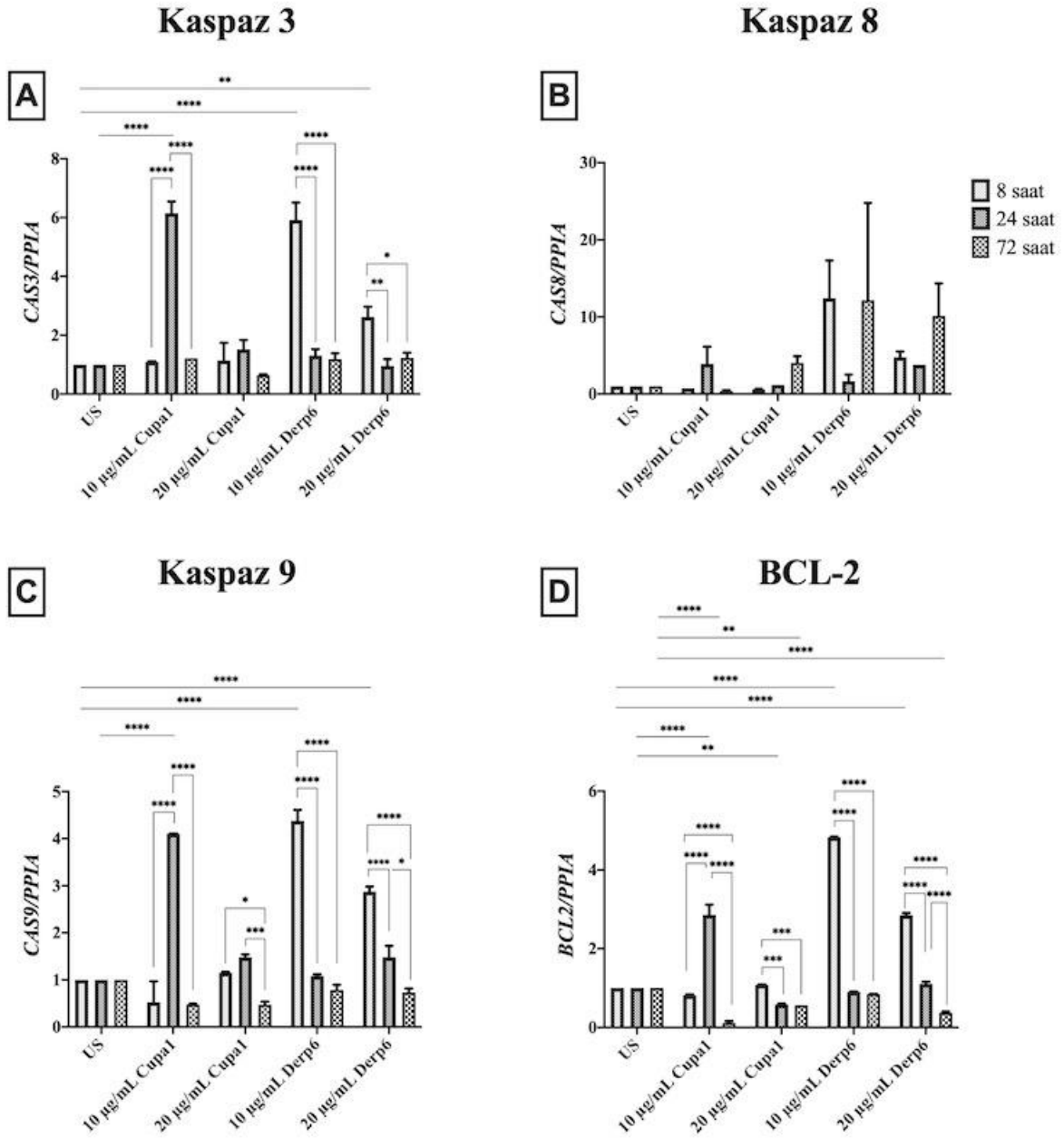
seviyesi 10 kat artış göstermiştir. 72 saat boyunca 10 µg/ml Der p6 ile uyarıldığında gen ifadesinde 102 kat, 20 µg/ml Der p6 ile uyarıldığında ise 144 kat artış saptanmıştır (Şekil 4.30-A). N-kaderin gen ekspresyonundaki değişim incelendiğinde ise Der p6 uyarımlarının artışa sebep olduğu, Cup a1 uyarımlarının gen ifadesini etkilemediği görülmüştür. 10 µg/ml Der p6 ile 24 ve 72 saatlik uyarımlar yaklaşık 6 katlık bir anlamlı artışa neden olmuştur. 72 saat 20 µg/ml Der p6 uyarımı ise BEAS-2B hücrelerinde N-kaderin gen ifadesinin 5 kat artmasını sağlamıştır (Şekil 4.30-B). SNAIL gen ifadesinde ise 72 saatlik bütün uyarımlarda kontrole kıyasla anlamlı bir artış tespit edilmiştir. 72 saatte 2 µg/ml Cup a1 uyarımı gen ifadesini 3,5 kat, 5 µg/ml uyarım ise 4,6 kat arttırmıştır. Der p6 uyarımı ise epitel hücrede SNAIL ekspresyonunun yaklaşık 13 kat artmasına neden olmuştur (Şekil 4.30-C). Literatürde HDM uyarımları sonrasında bronş epitel hücrelerde epitel belirteçlerin azaldığı ve mezenkimal belirteçlerin arttığına dair yayınlar bulunmaktadır [90, 140]. Tez kapsamında yapılan çalışmalarda alerjen uyarımı sonrasındaki en yüksek ifade artışının E-kaderinde olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuç literatürdeki bu yayınlar ile çelişirken, E-kaderinin kanser hücrelerindeki anoikis direnç mekanizmasını baskılayabildiğini ve bu sayede hücrelerde ölüm yolağını tetiklendiğini gösteren çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur [141].

BEAS-2B hücrelerinde Der p6 ve Cup a1 uyarımları yapıldıktan sonra elde edilen gen sonuçları dikkate alındığında, bronş epitel hücre hattında ölüm yolağını tetikleyebilecek uyarımların 72 saat sonucunda ortaya çıktığı gözlemlenmiştir. Bu sebeple, tez kapsamında yapılacak ko-kültür çalışmaları için Cup a1 alerjeni için 2 µg/ml ve 5 µg/ml konsantrasyonları, Der p6 alerjeni için ise 10 µg/ml ve 20 µg/ml konsantrasyonları seçilmiş olup uyarım süresinin 72 saat olmasına karar verilmiştir.

#### **4.6. RPMI-2650 Hücre Hattında Artan Doz ve Zamanlarda Cup a1 ve Der p6 Alerjen Uyarımının Ölüm Yolakları ve EMT Mekanizması Üzerine Etkisi**

Hücre cevabını ölüm yolakları ve EMT süreci üzerinden incelemek için gen ifadesi gerçek zamanlı PZR yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Apoptoz yolağını incelemek için *CAS3*, *CAS8*, *CAS9* ve *BCL2* (Şekil 4.31), Anoikis yolağını incelemek için *BMF*, *PTRH2* (Şekil 4.32), Nekroptoz yolağını incelemek için *RIPK3*, *MLKL* (Şekil 4.33), Partanatoz yolağını incelemek için *AIF*, *PARP1* (Şekil 4.34) ve EMT sürecini incelemek için *CDH1*, *CDH2* ve *SNAIL* (Şekil 4.35) genleri qPZR yöntemi ile tespit edilmiştir.

#### 4.6.1. Alerjen Uyarımı Sonrasında Apoptoz Yolağının Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi



**Şekil 4.31.** CAS3 (A), CAS8 (B), CAS9 (C) ve BCL2 (D) gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR analizi; n=3; \*p<0,01 \*\*p<0,005 \*\*\*p<0,0005 \*\*\*\*p<0,0001 (düz çizgiler: kontrol grubuna kıyasla uyarım koşulumunun istatistiği; çentikli çizgiler: aynı alerjen dozundaki farklı saatlerin istatistiği)

Nazal epitel hücrelerde uyarıma bağlı gerçekleşen apoptoz gen ifadelerindeki değişim Şekil 4.31’de gösterilmiştir. CAS3 gen ifadesindeki değişim incelendiğinde, kontrol koşuluna kıyasla

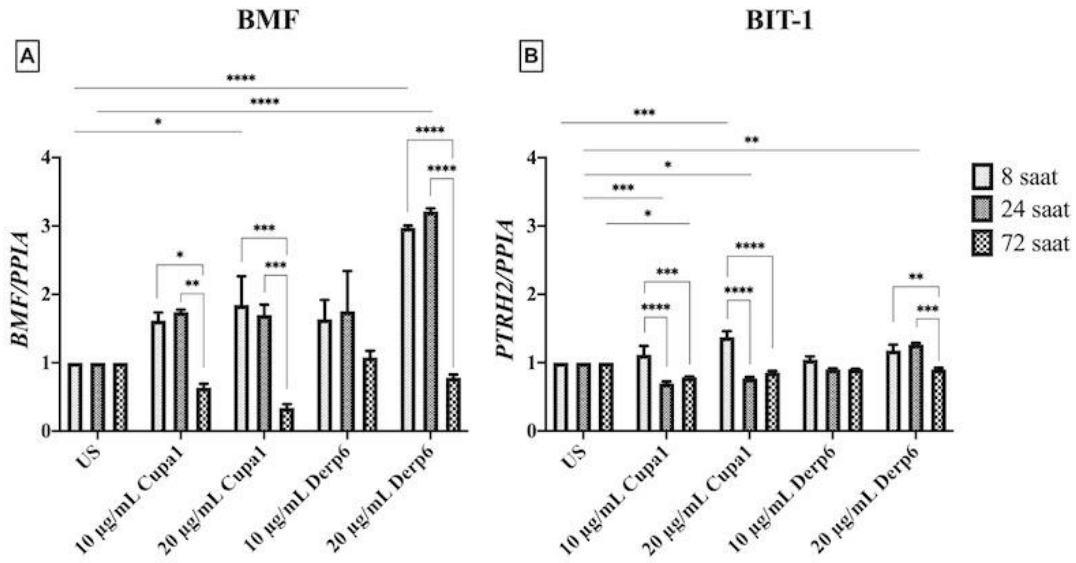
10 µg/ml Cup a1 ile 24 saatlik uyarımın *CAS3* seviyesinde yaklaşık 6 katlık bir artışa sebep olduğu gözlemlenmiştir. Yüksek doz Cup a1 uyarımı gen ifadesinde değişime neden olmazken, 8 saat 10 µg/ml Der p6 uyarımı gen seviyesini yaklaşık 6 kat, 8 saat 20 µg/ml Der p6 uyarımı ise 2,6 kat arttırmıştır (Şekil 4.31-A). 72 saatlik Der p6 uyarımları *CAS8* gen ifadesinde yaklaşık 10 katlık bir artışa sebep olmasına rağmen bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Cup a1 uyarımları da kontrol koşuluna kıyasla *CAS8* ekspresyonunda anlamlı bir artışa neden olmamıştır (Şekil 4.31-B). *CAS9* gen ifadesindeki değişim incelendiğinde ise *CAS3* gen ifadesindeki değişime benzer bir grafik gözlemlenmiştir. Benzer şekilde 24 saat 10 µg/ml Cup a1 uyarımı *CAS9* ekspresyonunu 4 kat arttırmıştır. 8 saatlik Der p6 uyarımlarında ise düşük konsantrasyon gen ifadesinde 4,3 kat, yüksek doz ise 2,8 kat artışa sebep olmuştur (Şekil 4.31-C). Apoptoz yolağında anti-apoptotik görevde olan *BCL2* genindeki değişim de *CAS3* ve *CAS9* sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Kontrol koşulu ile karşılaştırıldığında, 24 saat 10 µg/ml Cup a1 uyarımı gen ifadesini yaklaşık 3 kat, 8 saat 10 µg/ml Der p6 uyarımı 4,8 kat ve 8 saat 20 µg/ml Der p6 uyarımı 2,8 kat arttırmıştır. Gen ifadesinde artışa sebep olan bu 3 koşul diğer saatler ile karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.31-D). Genel olarak bakıldığında kaspaz 3 ve kaspaz 9 uyarımlarına benzer şekilde, alerjen uyarımları *BCL2* gen ifadesini ilk 8 saatte artış trendi göstermiş, ancak 24 ve 72 saatlik uyarımlar sonrası bu artış trendi baskılanmıştır. Bu bulgular, alerjen aracılı kaspaz ifadesindeki artışa cevap olarak, hücrelerin anti-apoptotik *BCL2* ifadesini artırdığını düşündürmektedir.

Alerjik rinit hastalığında epitel hücrelerdeki hasarın anlatıldığı 2022 yayınında AR koşulunda bazen epitel hücrelerin apoptoza uğradığı bazen ise epitel hücrelerde gözlemlenen apoptozun azaldığı tespit edilmiştir. Epitel hücrelerde apoptozun azalmasının nazal mukozaya hipertropisine sebebiyet verdiği belirtilirken bu azalmanın kaspazlar üzerinden de incelenmesi gerektiği ifade edilmiştir [142].

#### **4.6.2. Alerjen Uyarımı Sonrasında Anoikis Yolağının Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi**

Alerjen uyarımı sonrasında epitel hücre yanıtını anoikis yolağı üzerinden araştırmak için kaspaz bağımlı yolda görev alan *BMF* ve kaspaz bağımsız yolda görev alan *PTRH2* gen ifadelerindeki değişim incelenmiştir. Şekil 4.32’de uyarımlara bağlı anoikis yolağında görev alan gen seviyelerinin değişimi gösterilmiştir.



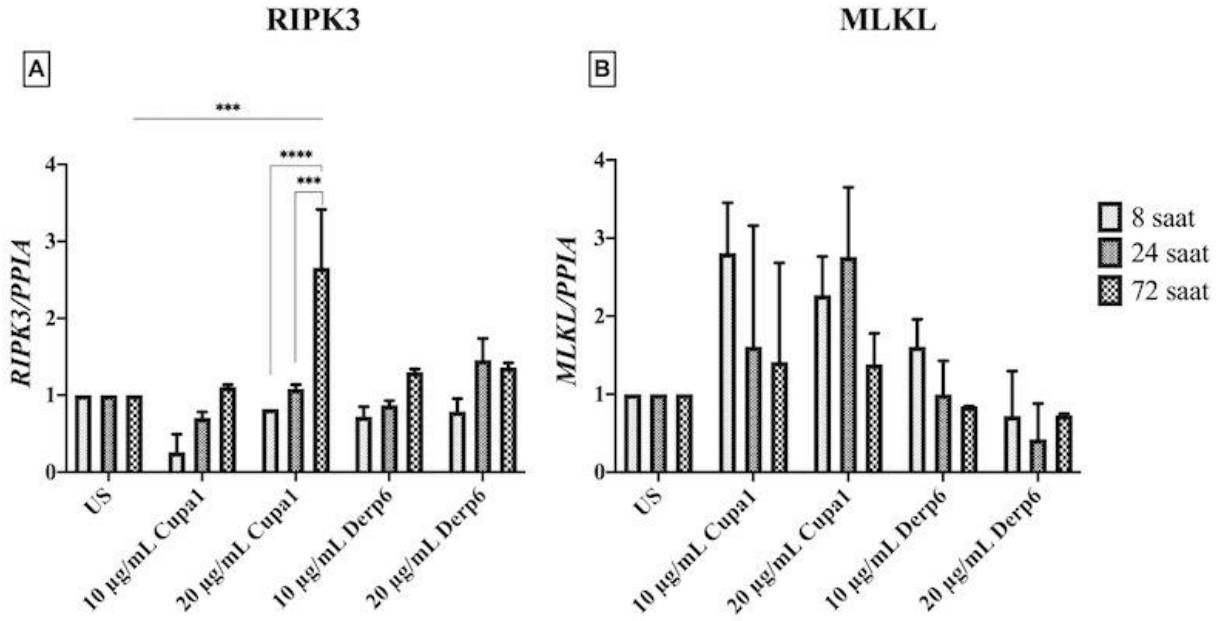


**Şekil 4.32.** *BMF* (A) ve *PTRH2* (B) gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR analizi; n=3; \*p<0,01 \*\*p<0,005 \*\*\*p<0,0005 \*\*\*\*p<0,0001 (düz çizgiler: kontrol grubuna kıyasla uyarım koşulunun istatistiği; çentikli çizgiler: aynı alerjen dozundaki farklı saatlerin istatistiği)

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, kontrol koşuluna kıyasla 8 saatlik Cup a1 ve Der p6 uyarımı sonrası *BMF* gen seviyesinde konsantrasyona bağlı olarak bir artış trendi gösterdiği tespit edilmiş olup yalnızca yüksek konsantrasyon Cup a1 ve Der p6 uyarımındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. 8 ve 24 saat 20 µg/ml Der p6 uyarımı *BMF* ekspresyonunu yaklaşık 3 kat arttırmıştır. Yüksek konsantrasyon Der p6 alerjen uyarımının 72.saatinde ise 8 ve 24 saatte görülen artış bazal seviyeye dönmüştür (Şekil 4.32-A). Anokisin kaspaz bağımsız yolağında görev alan *PTRH2* gen ifadesinde ise Bmf geninin aksine hiçbir koşulda anlamlı artış tespit edilmemiştir (Şekil 4.32-B). Literatürde nazal epitel hücrelerin herhangi bir aeroalerjen ile uyarıldığı ve anokis cevabının incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Elde ettiğimiz bulgular ise erken saat alerjen uyarımlarının nazal epitel hücrelerinde kaspaz bağımlı anokis yolağını tetikleyebileceğini düşündürmektedir. Fakat nazal epitel hücrelerdeki *BMF* gen ifadesi sonuçları bronş epitel hücreler ile kıyaslandığında, Der p6 uyarımının gen ifadesini bronş epitel hücre cevabındaki kadar dramatik bir şekilde arttırmadığı gözlemlenmektedir.

### 4.6.3. Alerjen Uyarımı Sonrasında Nekroptoz Yolağının Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi

Alerjen uyarımı sonrasında epitel hücre yanıtını nekroptoz yolağı üzerinden araştırmak için *RIPK3* ve *MLKL* ifadelerindeki değişim incelenmiştir. Nekroptoz ölüm yolağında görev alan *RIPK3* ve *MLKL* gen ifadelerindeki değişim Şekil 4.33'te gösterilmiştir.



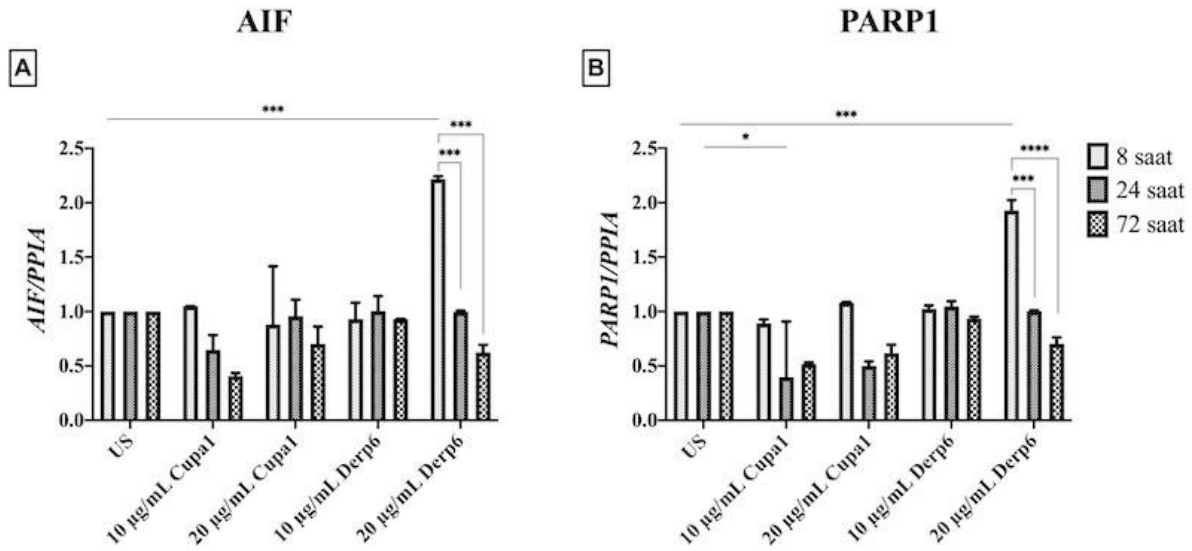
**Şekil 4.33.** *RIPK3* (A) ve *MLKL* (B) gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR analizi; n=3; \*\*\*p<0,0005 \*\*\*\*p<0,0001 (düz çizgiler: kontrol grubuna kıyasla uyarım koşulunun istatistiği; çentikli çizgiler: aynı alerjen dozundaki farklı saatlerin istatistiği)

*RIPK3* gen ekspresyonundaki değişim incelendiğinde, nazal epitel hücrelerde sadece 72 saat 20 µg/ml Cup a1 uyarımının gen ifadesinde 2,6 katlık anlamlı bir artışa sebep olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.33-A). Diğer uyarım koşullarında kontrol grubuna kıyasla gen ifadesinde anlamlı bir artış saptanmamıştır. *MLKL* gen ifadesinde de kontrol grubu ile karşılaştırıldığında uyarım koşulları anlamlı bir değişim göstermemiştir (Şekil 4.33-B). Yoo-Jin Lee ve arkadaşlarının 2020 yılındaki çalışmalarında *Arctium lappa* Linnaeu'nun tohumlarından elde edilen Arctigenin molekülü ile RPMI-2650 hücreleri uyarılmış ve bu uyarım sonucunda hücrelerdeki apoptoz ve nekroptoz yolaklarının tetiklendiği saptanmıştır [143]. Fakat literatürde HDM ya da polen alerjisi ile uyarılmış ve nekroptoz ölüm yolağı incelenmiş bir yayına rastlanmamıştır. Elde ettiğimiz bulgular, nazal epitel hücrelerdeki Cup a1- veya Der p6-

aracılı hücre ölümlerinin nekroproz dışındaki başka yollar üzerinden gerçekleşiyor olabileceğini düşündürmektedir.

#### 4.6.4. Alerjen Uyarımı Sonrasında Partanatoz Yolağının Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi

Alerjen uyarımı sonrasında epitel hücre yanıtını partanatoz yolağı üzerinden araştırmak için *AIF* ve *PARP1* ifadelerindeki değişim incelenmiştir (Şekil 4.34).



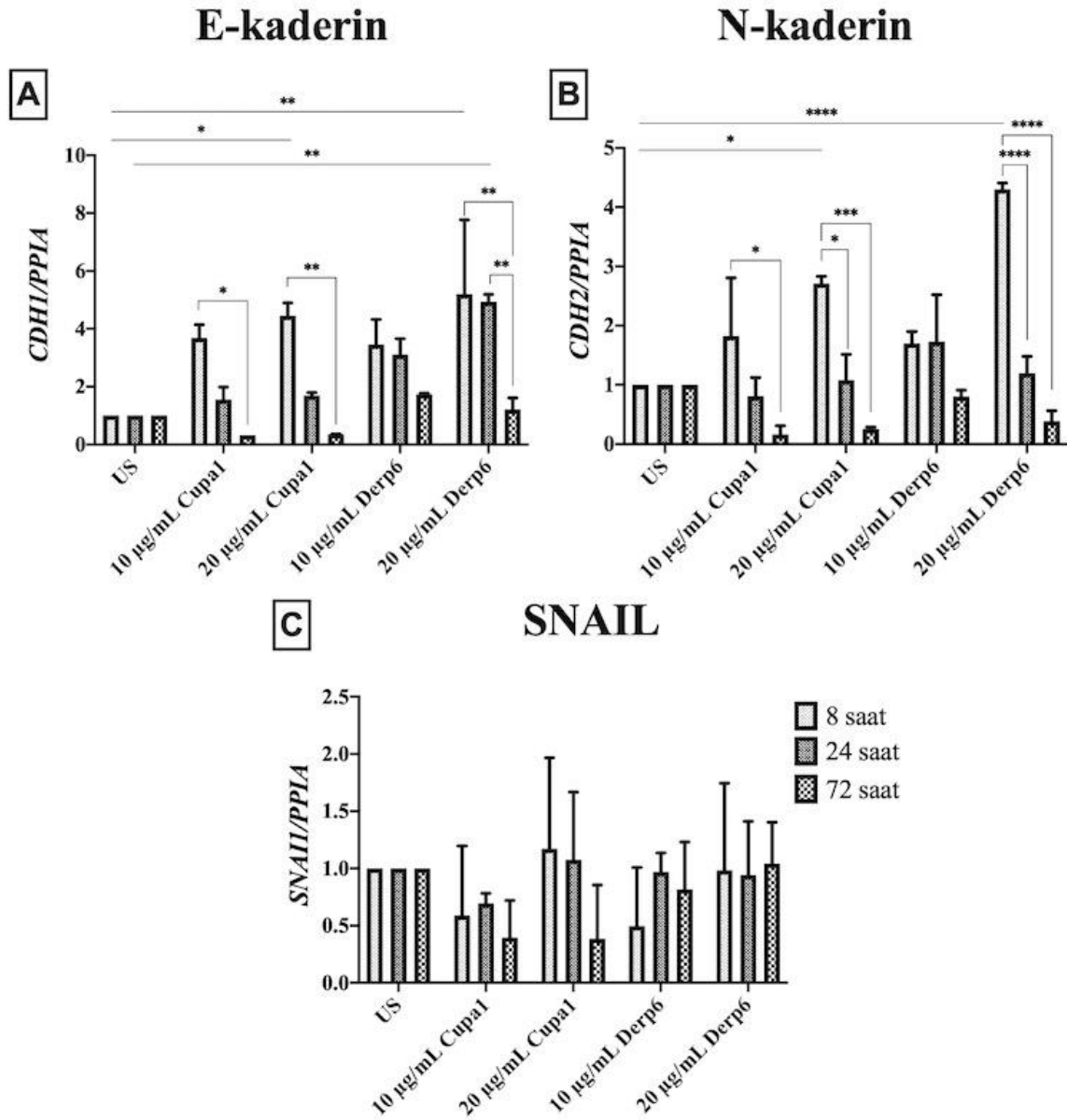
**Şekil 4.34.** *AIF* (A) ve *PARP1* (B) gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR analizi; n=3; \*p<0,01 \*\*\*p<0,0005 \*\*\*\*p<0,0001 (düz çizgiler: kontrol grubuna kıyasla uyarım koşulunun istatistiği; çentikli çizgiler: aynı alerjen dozundaki farklı saatlerin istatistiği)

*AIF* ve *PARP1* gen ifadeleri incelendiğinde, 20 µg/ml Der p6 alerjeni ile nazal epitel hücreleri 8 saat uyarım gen ifadelerinde anlamlı bir değişikliğe sebebiyet vermiştir. Kontrol koşuluna kıyasla 8 saatlik yüksek doz Der p6 uyarımı *AIF* genini 2,2 kat, *PARP1* gen ifadesini ise yaklaşık 2 kat arttırmıştır. 8 saatlik uyarımda gözlemlenen bu artış 24 ve 72 saat sonuçları ile kıyaslandığında da anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Fakat diğer uyarım koşulları kontrol koşulu ile karşılaştırıldığında, *AIF* ve *PARP1* ekspresyon seviyesinde anlamlı bir artışa sebep olmamıştır. Literatürde nazal epitel hücrelerin herhangi bir uyarım sonrasında partanatoz ölüm yolağının incelendiği bir yayına rastlanmamıştır. Elde ettiğimiz bulgular, nazal epitel hücrelerdeki yalnızca yüksek konsantrasyondaki Der p6-aracılı hücre ölümlerinin partanatozu

tetikleyebileceğini, Cup a1 alerjeni aracılı hücre ölümlerinin ise partanatoz dışındaki başka yollar üzerinden gerçekleşiyor olabileceğini düşündürmektedir.

#### **4.6.5. Alerjen Uyarımı Sonrasında EMT Sürecinin Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi**

*CDH1* ve *CDH2* gen ifadeleri değerlendirildiğinde benzer şekilde 8 saatlik yüksek doz alerjen uyarımlarının kontrol koşuluna göre ekspresyonu arttırmış olduğu gözlemlenmektedir (Şekil 4.35-A ve Şekil 4.35-B). 20 µg/ml Cup a1 uyarımı *CDH1* gen ifadesini 4,4 kat, *CDH2* gen ifadesini ise 2,7 kat arttırmıştır. 20 µg/ml Der p6 uyarımı ise kontrole kıyasla E-kaderin gen seviyesini 5 kat, N-kaderin ekspresyonunu ise 4,3 kat arttırmıştır ve 8 saatlik uyarımda gözlemlenen bu artış 24 ve 72 saat uyarımlarına göre de istatistiksel olarak anlamlı tespit edilmiştir. Nazal epitel hücreleri 24 saat 20 µg/ml Der p6 ile uyarıldığında da *CDH1* gen ifadesinde yaklaşık 5 katlık anlamlı bir artışa sebep olmuştur. *SNAI1* gen ifadesinde ise kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artışa sebep olan koşul tespit edilmemiştir (Şekil 4.35-C). Alerjik rinit hastaların nasal poliplerinde TGF-B seviyesi sağlıklı bireylere kıyasla daha yüksek bulunmuştur [144]. Aynı zamanda yayınlanan bazı çalışmalar mezenkimal hücre belirteçlerinin de hastalık durumunda arttığını göstermesine rağmen alerjik rinit hastalığında EMT süreci ile ilgili kapsamlı bir çalışma bulunmamaktadır [88]. Tez kapsamında elde edilen sonuçlarda yüksek konsantrasyondaki alerjen uyarımlarında hem E-kaderin hem de N-kaderin ekspresyonunun kontrol koşuluna göre artış gösterdiği bulunmuştur.



**Şekil 4.35.** *CDH1* (A), *CDH2* (B) ve *SNAIL* (C) gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR analizi; n=3; \*p<0,01 \*\*p<0,005 \*\*\*p<0,0005 \*\*\*\*p<0,0001 (düz çizgiler: kontrol grubuna kıyasla uyarım koşulunun istatistiği; çentikli çizgiler: aynı alerjen dozundaki farklı saatlerin istatistiği)

Cup a1 ve Der p6 uyarımı sonrasında RPMI-2650 hücrelerinden elde edilen gen ifadesi sonuçları dikkate alındığında, kaspaz değişimlerinde en etkili konsantrasyonun her iki alerjen için de düşük doz olduğu tespit edilmiştir. Diğer gen ifadeleri incelendiğinde uyarımların gen ifadesine etkisi noktasında aşırı bir farklılık gözlemlenmemiştir. BEAS-2B hücre cevabından farklı olarak nazal epitel hücrelerin daha erken cevap verdiği görülmüştür ve bronş epitel

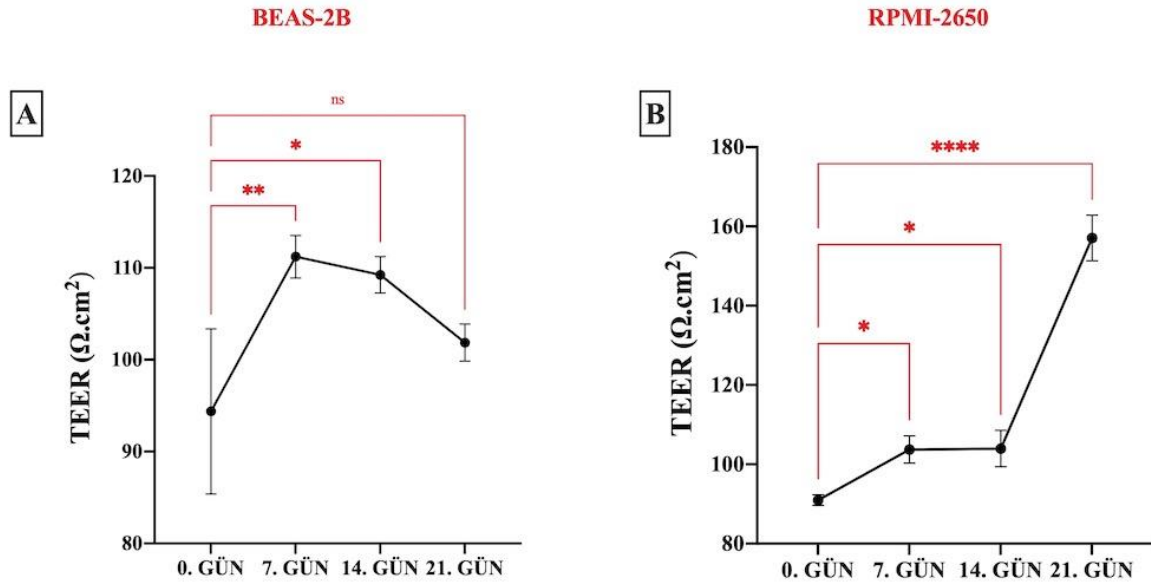
hücrelerinde nazal epitel hücrelerine kıyasla gen ifadelerinde daha dramatik değişimler tespit edilmiştir. Bu sebeple ko-kültür deneylerinde nazal hücrelerin 10 µg/ml Der p6 ve 10 µg/ml Cup a1 dozları ile 8 ve 24 saat uyarılmasına karar verilmiştir.

#### **4.7. BEAS-2B veya RPMI-2650 Hücre Hatlarının EoL-1 Hücreleriyle Ko-kültür Sistemine Alınması**

Hücre cevabını ölüm yolları ve EMT süreci üzerinden incelemek için BEAS-2B ve RPMI-2650 hücreleri 21 gün boyunca ALI-kültür yöntemi ile kültürlenmiştir. Kültürlenme süreci boyunca 0, 7, 14 ve 21. günlerde TEER ölçümü yapılmıştır (Şekil 4.34). Epitel hücreler aktive edilmiş EoL-1 hücre hatları ile kültüre alınacağı için ALI-kültür süresi sona ermeden BA ile aktive etme deneyleri yapılmış ve ECP ELISA kiti ile karakterize edilmiştir (Şekil 4.35). Ardından bir deney grubu aktive edilen EoL-1 hücreleri ile ko-kültüre alınmıştır.

##### **4.7.1. BEAS-2B ve RPMI-2650 Hücrelerinin TEER Sonuçları**

RPMI-2650 ve BEAS-2B hücrelerin transwell insert içerisine ekilerek, hücreler konfluente ulaştıktan sonra apikal kısımdan havaya bazal kısımdan ise besiyerine maruz bırakıldığı bu sistem ALI-kültür olarak adlandırılmaktadır. ALI-kültür hava yolu epitel hücrelerinin özelliklerini taklit eder ve hayvan çalışmalarına en uygun alternatif olarak belirtilmektedir. Literatürde ve laboratuvarımızda yürütülen diğer çalışmalar referans alındığında, BEAS-2B ve RPMI-2650 hücrelerinin 21 gün boyunca ALI-kültür sisteminde kültürlenmesine karar verilmiştir. Bu süreç içerisinde 0, 7, 14 ve 21. günlerde TEER ölçümleri yapılmıştır.

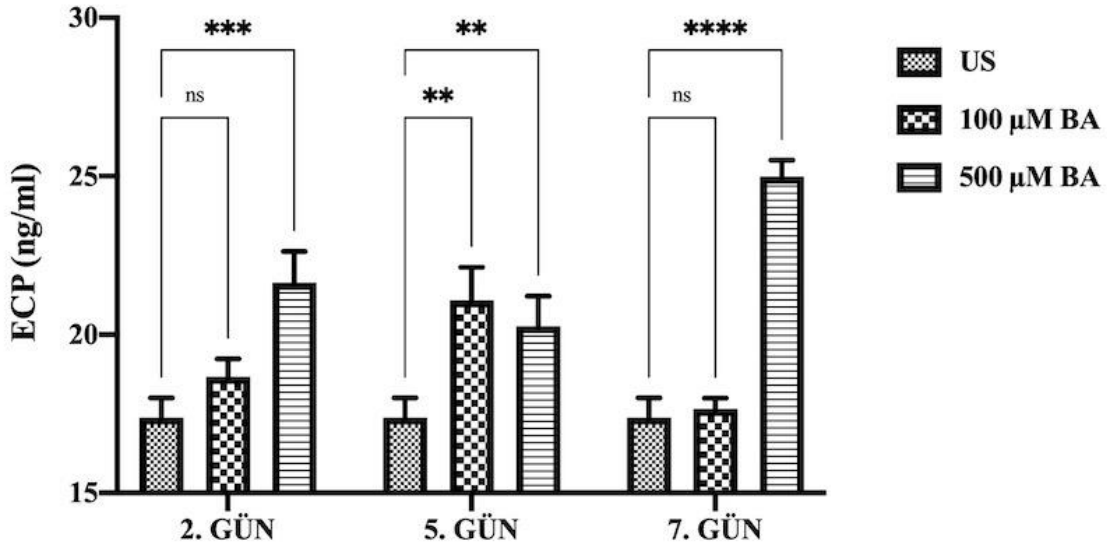


**Şekil 4.36.** ALI-kültür süreci boyunca BEAS-2B (A) ve RPMI-2650 (B) hücrelerinin TEER değerleri; n=3; \*p<0,01 \*\*p<0,005 \*\*\*\*p<0,0001

BEAS-2B hücre hattı insert içerisinde %100 konfluente ulaştıktan sonra apikal kısımdaki besiyeri uzaklaştırılarak 0. gün TEER değeri ölçülmüş ve 94  $\Omega.cm^2$  bulunmuştur (Şekil 4.36.). 7. Günde bu değer 111  $\Omega.cm^2$ 'ye istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış fakat daha sonraki günlerde bu değer azalmaya başlamıştır. 14. Gün 104  $\Omega.cm^2$ 'ye azalan değer 0. Gün TEER değeri ile karşılaştırıldığında anlamlı kabul edilir iken 21. günde elde edilen 101  $\Omega.cm^2$  değerine azalma istatistiksel olarak anlamsız tespit edilmiştir. 2012 ve 2020 yıllarında yayınlanan 2 farklı makalede BEAS-2B ALI-kültür yöntemi ile kültürlenmiş ve farklı zamanlarda TEER değerlerinin ölçülmüştür. Bu yayınlarda 21. güne yaklaştıkça TEER değerlerinde artış görülmesine rağmen bu artışlar 0. günden aşırı yüksek bulunmamıştır [145, 146]. Literatüre benzer şekilde 0. güne göre 21. günde ölçülen TEER değerindeki artış sınırlıdır. RPMI-2650 hücre hattında ise 21. güne kadar elde edilen bütün TEER değerleri 0. günden yüksektir. 0. gün TEER değeri 90  $\Omega.cm^2$  iken 21. gün TEER değeri 157  $\Omega.cm^2$ 'ye yükselmiştir. 7 ve 14. günler de TEER değeri yaklaşık 103  $\Omega.cm^2$  olarak hesaplanmıştır. 21. günde tespit edilen bu artış 0. gün ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. 21. günde artan TEER değeri literatür ile uyumlu bulunmuştur [147]. Tez kapsamında yapılan deneyler, literatür ve laboratuvarında gerçekleştirilen önceki çalışmalar dikkate alındığında ALI-kültür süresinin 21 gün olmasına karar verilmiştir.

#### 4.7.2. BA ile Aktifleştirilen EoL-1 Hücre Hattının Karakterizasyonu

Literatürde eozinofiller aktifleştirmek için bütirik asit (BA) veya dibütiril siklik AMP (dbcAMP) gibi farklı uyarılar kullanılmaktadır. Aktifleştirme sürecinde genellikle BA kullanılmak ile birlikte uygulanan konsantrasyonlar ve süreler değişkenlik göstermektedir [148-150]. Literatürde kullanılan konsantrasyonlar ve süreler baz alındığında, EoL-1 hücre hattını aktifleştirmek için 100  $\mu$ M ve 500  $\mu$ M BA konsantrasyonlarının 2, 5 ve 7 gün boyunca denenmesine karar verilmiştir. Bu konsantrasyon ve sürelerde BA ile uyarılan EoL-1 hücre hatlarının uyarım sürelerinin sonunda süpernatantları toplanmış ve ELISA deneyinde ECP miktarını analiz etmek için kullanılmıştır.



**Şekil 4.37.** EoL-1 hücre hattından 2, 5 ve 7 gün boyunca süpernatana salınan ECP miktarı; n=3; \*\*p<0,005 \*\*\*p<0,0005 \*\*\*\*p<0,0001

Analiz sonuçları incelendiğinde uyarılmamış EoL-1 hücrelerinden salınan ECP miktarı yaklaşık 17 ng/ml iken BA uyarımı ile salınan ECP miktarı artış göstermiştir. 2 gün boyunca 500  $\mu$ M BA ile uyarılan koşulda 21,64 ng/ml ECP salınırken 100  $\mu$ M uyarımda 18,66 ng/ml konsantrasyonda protein salınmıştır. Fakat bu artışlarda 500  $\mu$ M koşulu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. 5 gün uyarım süresinde ise her iki dozda da salınan ECP miktarı benzer ve yaklaşık 20,5 ng/ml konsantrasyonunda tespit edilmiştir. 7 gün uyarım incelendiğinde ise istatistiksel olarak anlamlı tek artışın 500  $\mu$ M dozunda olduğu görülmüştür. Bu dozda hücrelerden yaklaşık 25 ng/ml ECP salınmıştır. Fakat hücre kültüründe yapılan gözlemlerde 7.

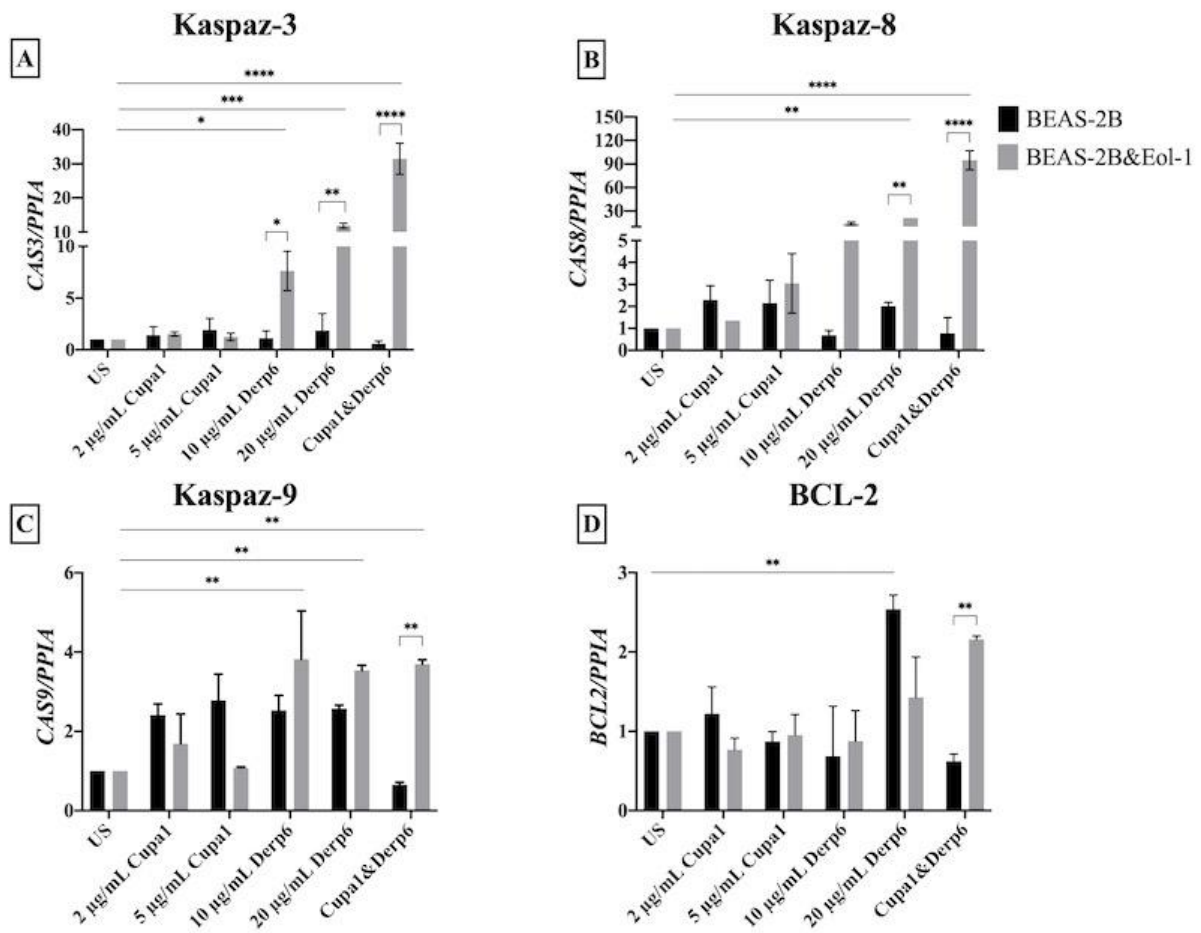


günde EoL-1 hücrelerinin ölmeye başladığı tespit edilmiştir. Bu sebeple aktiveleştirme protokolü için istatistiksel olarak kontrol koşuluna göre anlamlı olan ve yüksek ECP konsantrasyonu tespit edilen koşulun seçilmesine ve 2 gün 500 µM uyarım yapılmasına karar verilmiştir.

#### 4.8. BEAS-2B/EoL-1 Ko-kültür Sisteminde Belirlenen Doz ve Zamanlarda Cup a1 ve Der p6 Alerjen Uyarımının Ölüm Yolakları ve EMT Mekanizması Üzerine Etkisi

48 kuyucuklu plakada yapılan uyarımlar sonucunda elde edilen gen verilerine göre 2 ve 5 µg/ml Cup a1 alerjeni ve 10 ve 20 µg/ml Der p6 alerjeni ile 72 saat uyarım koşulları seçilmiştir. Alerjenlerin sinerjik etkisini gözlemlemek için 2 µg/ml Cup a1 ve 10 µg/ml Der p6 dozu ile 72 saat uyarım koşulu seçilmiştir. Hücre cevabını ölüm yolakları ve EMT süreci üzerinden incelemek için gerçek zamanlı PZR yöntemi kullanılmıştır.

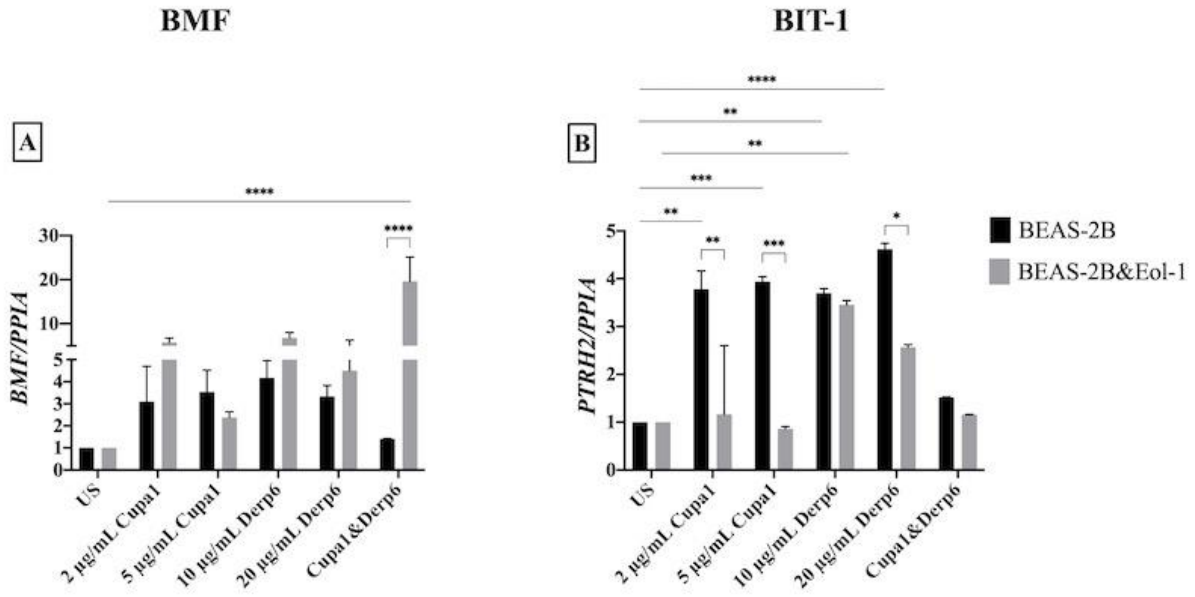
##### 4.8.1. Alerjen Uyarımı Sonrasında Apoptoz Yolağının Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi



**Şekil 4.38.** 72 saat uyarım sonrasında mono-kültür ve ko-kültür sisteminde *CAS3* (A), *CAS8* (B) ve *CAS9* (C) ve *BCL2* (D) gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR analizi; n=3; \*p<0,01 \*\*p<0,005 \*\*\*p<0,0005 \*\*\*\*p<0,0001 (düz çizgiler: kontrol grubuna kıyasla uyarım koşulunun istatistiği; çentikli çizgiler: aynı alerjen dozundaki mono&ko-kültür koşullarının istatistiği)

*CAS3* gen ifadesi sonuçları incelendiğinde, Der p6 ve Cup a1 & Der p6 uyarımlarının gen ifadesinde anlamlı bir artışa sebep olduğu gözlemlenmiştir. 10 µg/ml Der p6 uyarımı kaspaz 3 ekspresyonunu kontrol koşuluna kıyasla 7,6 kat arttırırken, 20 µg/ml Der p6 uyarımı 11,8 kat arttırmıştır. Cup a1 ve Der p6 alerjenlerinin sinerjik etkisini incelemek istediğimiz uyarım koşulunda ise kaspaz 3 seviyesi 31,4 kat artış göstermiştir. *CAS3* gen ifadesinde artışa sebep olan bu uyarım koşulları incelendiğinde artışın ko-kültür sisteminde meydana geldiği görülmüştür. Der p6 ve Cup a1 & Der p6 uyarımlarında sadece epitel hücre ekilmiş olan koşullara kıyasla ko-kültür sisteminde gen artışı anlamlı tespit edilmiştir. Benzer şekilde iki alerjen ile aynı anda uyarılan koşulda kaspaz 8 gen ifadesi yaklaşık 95 kat artmıştır. 20 µg/ml Der p6 uyarımında ise kontrol koşuluna kıyasla kaspaz 8 ekspresyonu 21 kat artmıştır. 10 µg/ml Der p6 uyarımı gen ifadesini 14 kat arttırmış olmasına rağmen bu artış anlamlı bulunmamıştır. Benzer şekilde Cup a1 uyarımları iki genin seviyesinde de anlamlı bir artışa sebebiyet vermemiştir. *CAS9* gen ifadesinde ko-kültür sistemindeki Der p6 ve Cup a1 & Der p6 uyarımları kontrol koşuluna kıyasla anlamlı bir artışa neden olmuştur. İki alerjen ile aynı anda uyarılan koşulda ise ko-kültür sisteminde kaspaz 9 gen ifadesinde yaklaşık 4 katlık bir artış gözlemlenirken mono-kültür sisteminde artış gözlemlenmemiştir. Apoptoz yolağında anti-apoptotik rolü olan *BCL2* geninde ise sadece mono-kültürde 20 µg/ml Der p6 uyarımında kontrol koşuluna göre anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Kaspaz gen ifadeleri incelendiğinde ekspresyon seviyelerinde artışa neden olan koşulların ko-kültür sisteminde olduğu saptanmıştır. Literatürde eozinofil/bronş epitel ko-kültür sisteminde apoptozun araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

#### 4.8.2. Alerjen Uyarımı Sonrasında Anoikis Yolağının Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi

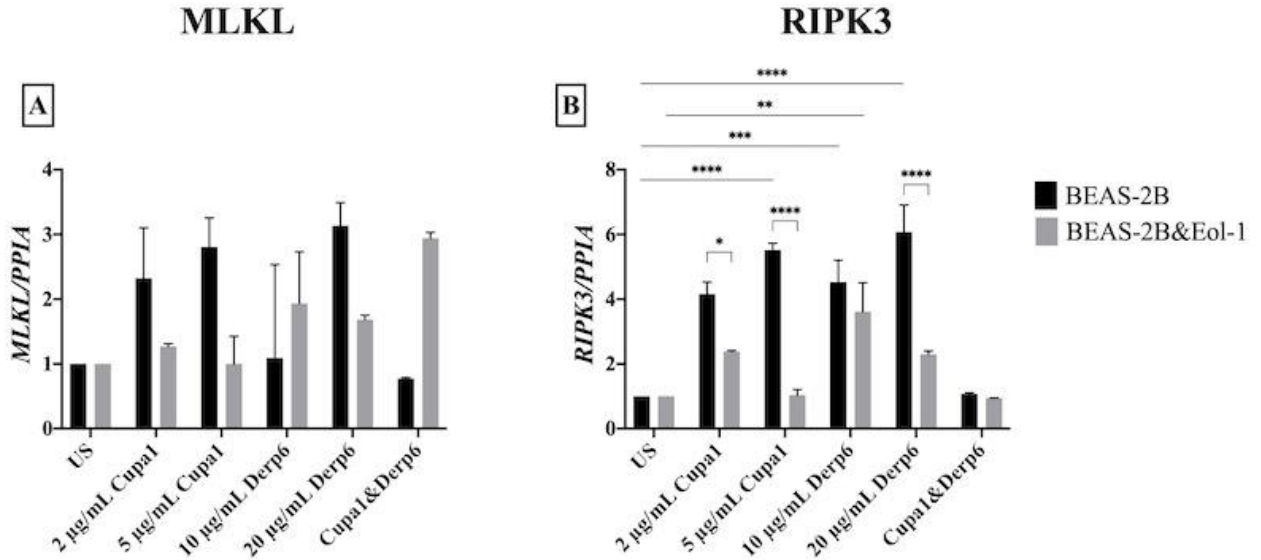


**Şekil 4.39.** 72 saat uyarım sonrasında mono-kültür ve ko-kültür sisteminde *BMF* (A) ve *PTRH2* (B) gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR analizi; n=3; \*p<0,01 \*\*p<0,005 \*\*\*p<0,0005 \*\*\*\*p<0,0001 (düz çizgiler: kontrol grubuna kıyasla uyarım koşulunun istatistiği; çentikli çizgiler: aynı alerjen dozundaki mono&ko-kültür koşullarının istatistiği)

Kaspaz bağımlı anoikis yolağında görev alan *Bmf* gen ifadesindeki anlamlı artış ko-kültür sisteminde Cup a1 & Der p6 uyarım koşulunda gözlemlenmiştir. 2 µg/ml Cup a1 ve 10 µg/ml Der p6 ile aynı anda uyarılan BEAS-2B&EoL-1 hücreleri kontrol koşuluna kıyasla *BMF* genini 19 kat arttırmıştır. Ko-kültürdeki uyarım sonucu artan gen ifadesi mono-kültür ile karşılaştırıldığında da anlamlı bulunmuştur. Diğer uyarım koşulları ise ekspresyon seviyesini anlamlı bir şekilde arttırmamıştır. Anoikisin kaspaz bağımsız yolağında görev alan *PTRH2* geninin ifadesinde ise *BMF* gen ekspresyonunun aksine Cup a1 ve Der p6 alerjenleri ile aynı anda uyarılmak *PTRH2* gen seviyesinde anlamlı bir değişime sebep olmamıştır. *BMF* gen seviyesindeki değişimlerin aksine *PTRH2* gen ifadesindeki artışlar sadece epitel hücrelerin yer aldığı grupta gözlemlenmiştir. Mono-kültürde gerçekleştirilen Cup a1 uyarımları Bit-1 ekspresyonunu yaklaşık 4 kat arttırmıştır. Mono-kültürde yapılan 10 µg/ml Der p6 uyarımı gen ifadesinde 3,7 kat artışına, 20 µg/ml Der p6 uyarımı ise 4,6 kat artışa sebep olmuştur. 20 µg/ml Der p6 uyarımında ve Cup a1 uyarımlarında mono-kültürde gözlemlenen artışlar ko-kültür ile

karşılaştırıldığında da anlamlı bulunmuştur. Literatürde eozinofil/bronş epitel ko-kültür sisteminde anoikis ölüm yolağının araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

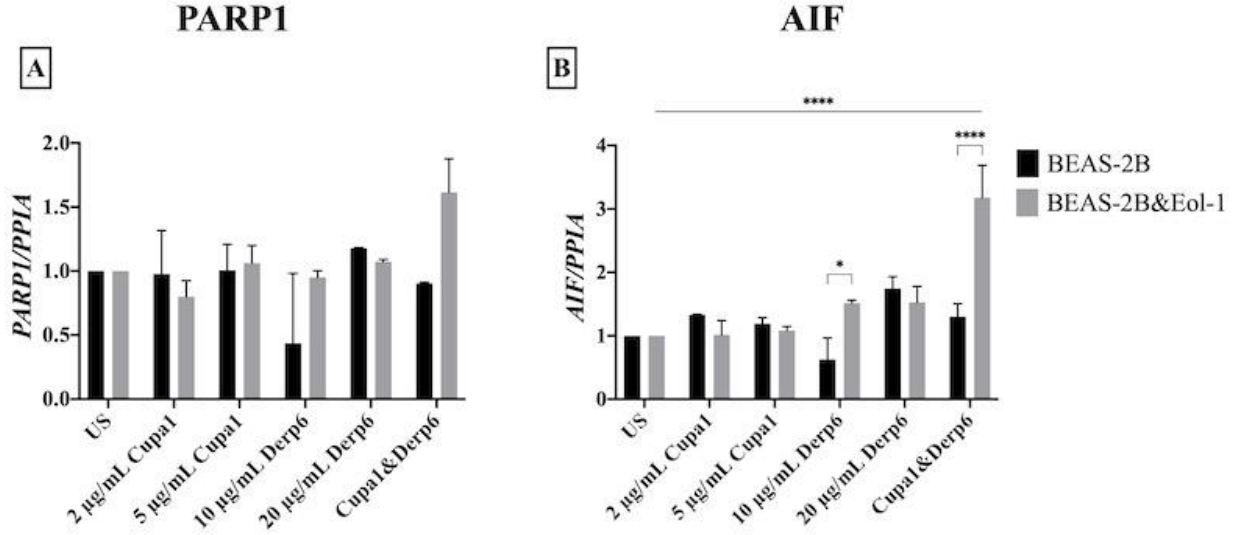
#### 4.8.3. Alerjen Uyarımı Sonrasında Nekroptoz Yolağının Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi



**Şekil 4.40.** 72 saat uyarım sonrasında mono-kültür ve ko-kültür sisteminde *MLKL* (A) ve *RIPK3* (B) gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR analizi; n=3; \*p<0,01 \*\*p<0,005 \*\*\*p<0,0005 \*\*\*\*p<0,0001 (düz çizgiler: kontrol grubuna kıyasla uyarım koşulunun istatistiği; çentikli çizgiler: aynı alerjen dozundaki mono&ko-kültür koşullarının istatistiği)

Uyarımlara bağlı *MLKL* gen ifadesindeki değişimler kontrol koşula göre karşılaştırıldığında anlamlı bulunmamıştır. Benzer şekilde mono-kültür ve ko-kültür sisteminde yapılan uyarımların *MLKL* gen ifadesindeki değişimleri kıyaslandığında da anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. *RIPK3* gen ifadesinde ise ko-kültüre kıyasla mono-kültürde gerçekleştirilen Cup a1 uyarımlarının gen ifadesine artışa neden olduğu gözlemlenmiştir. Mono-kültürdeki 5 µg/ml Cup a1 uyarımı kontrol grubuna kıyasla gen ifadesini yaklaşık 4 kat, 10 µg/ml Der p6 uyarımı 3,6 kat ve 20 µg/ml Der p6 uyarımı 4,6 kat arttırmıştır. Cup a1 ve Der p6 alerjenleri ile aynı anda uyarmak ise iki gen ifadesinde de anlamlı bir değişime neden olmamıştır. Literatürde eozinofil/bronş epitel ko-kültür sisteminde nekroptoz ölüm yolağının araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

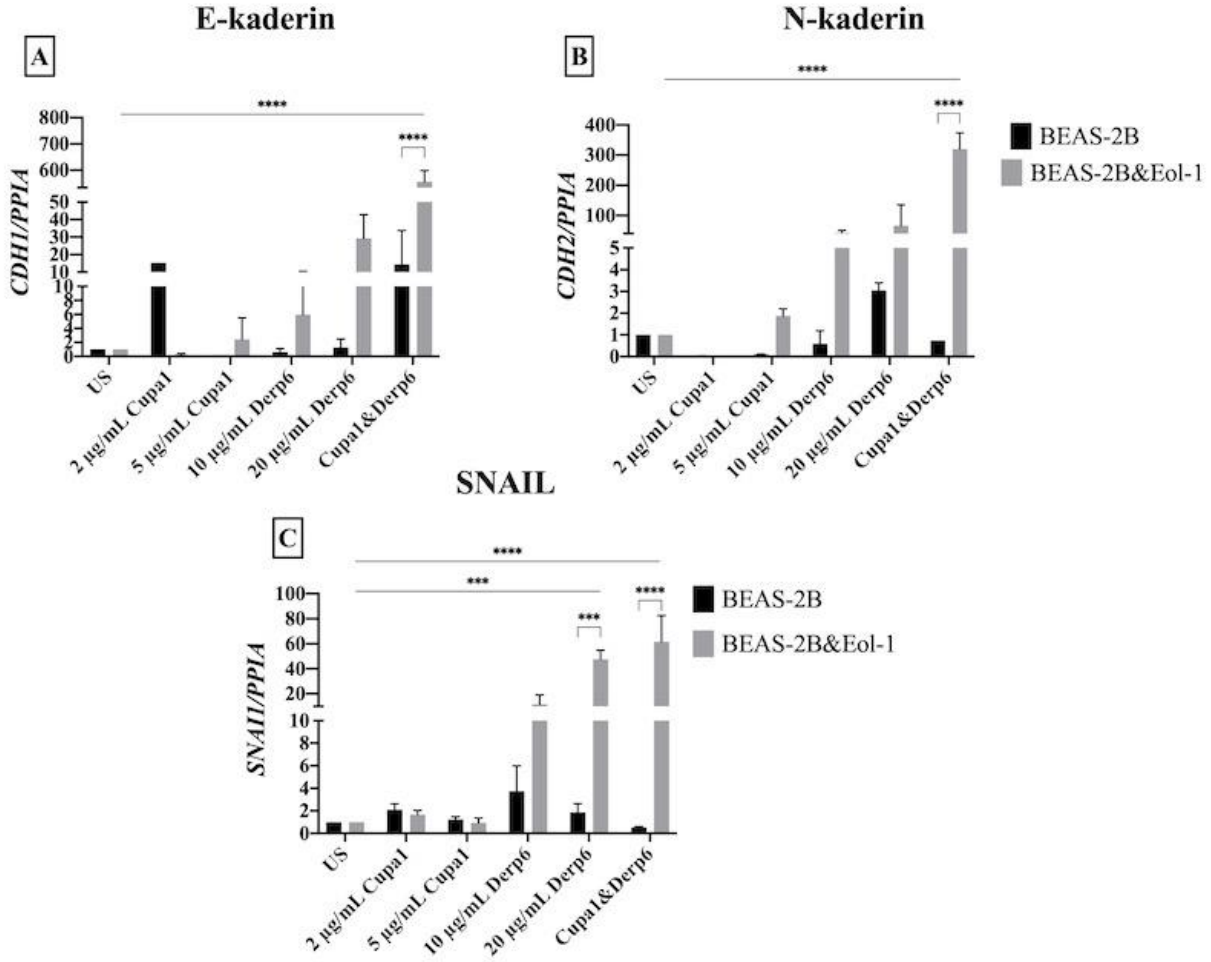
#### 4.8.4. Alerjen Uyarımı Sonrasında Partanatoz Yolağının Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi



**Şekil 4.41.** 72 saat uyarım sonrasında mono-kültür ve ko-kültür sisteminde *PARP1* (A) ve *AIF* (B) gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR analizi; n=3; \*p<0,01 \*\*\*\*p<0,0001 (düz çizgiler: kontrol grubuna kıyasla uyarım koşulunun istatistiği; çentikli çizgiler: aynı alerjen dozundaki mono&ko-kültür koşullarının istatistiği)

Partanatoz ölüm yolağında görev alan *PARP1* enziminin ekspresyonunda uyarım koşullarına bağlı anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir. Apoptoz indükleyici faktör olan ve aynı zamanda partanatoz ölüm yolağında çekirdeğe transloke olan *AIF* proteininin gen ifadesinde ise anlamlı bir artış Cup a1 & Der p6 uyarımda ko-kültür sisteminde gözlemlenmiştir. Saptanan bu artış hem kontrol grubu ile hem de mono-kültür sonucu ile karşılaştırıldığında anlamlı bulunmuştur. Kontrol grubuna kıyasla diğer uyarımlar gen ifadesinde anlamlı bir değişime neden olmamıştır. Literatürde eozinofil/bronş epitel ko-kültür sisteminde partanatoz ölüm yolağı üzerinde çalışan bir yayına rastlanmamıştır.

#### 4.8.5. Alerjen Uyarımı Sonrasında EMT Yolağının Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi



**Şekil 4.42.** 72 saat uyarım sonrasında mono-kültür ve ko-kültür sisteminde *CDH1* (A), *CDH2* (B) ve *SNAIL* (C) gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR analizi; n=3; \*\*\*p<0,0005 \*\*\*\*p<0,0001 (düz çizgiler: kontrol grubuna kıyasla uyarım koşulunun istatistiği; çentikli çizgiler: aynı alerjen dozundaki mono&ko-kültür koşullarının istatistiği)

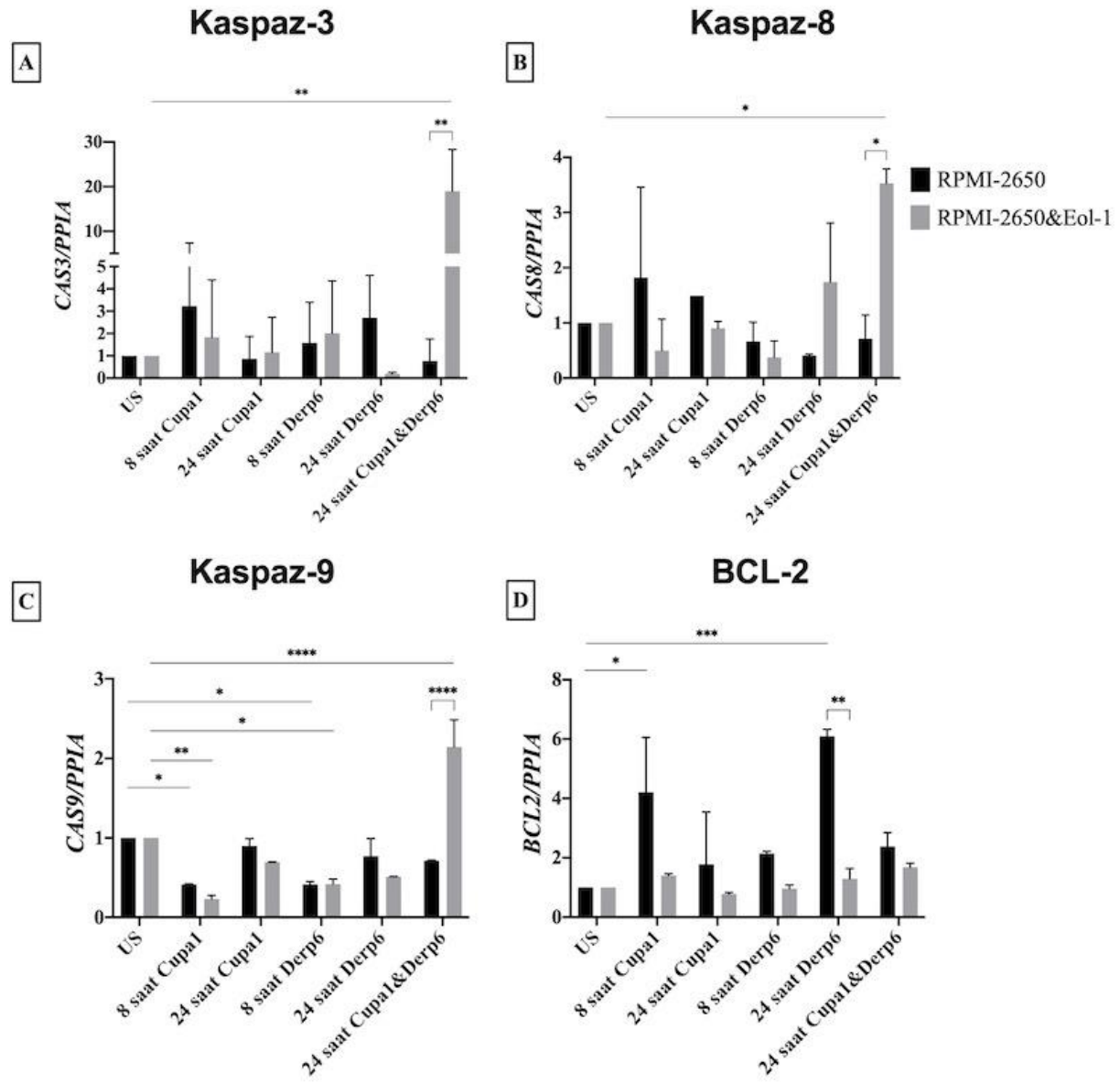
Epitel hücre belirteci olan E-kaderin gen ifadesi incelendiğinde özellikle ko-kültür sisteminde yapılan uyarımların gen ifadesini dramatik bir şekilde arttırdığı gözlemlenmiştir. Ko-kültür sisteminde 10 µg/ml Der p6 uyarımı gen seviyesini 5 kat, 20 µg/ml Der p6 uyarımı ise 29 kat arttırmıştır. Gen ifadesinde tespit edilen bu artışlar kontrol koşulu ile karşılaştırıldığında anlamlı bulunmamıştır. Cup a1&Der p6 uyarımında ise *CDH1* gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı 556 katlık artış tespit edilmiştir. Bu artış mono-kültür ile karşılaştırıldığında da anlamlı bulunmuş ve benzer şekilde mezenkimal hücre belirteci olan N-kaderin gen ifadesinde Cup a1-Der p6 uyarımında yaklaşık 320 katlık bir artış görülmüştür. Gen ifadesinde gözlemlenen bu artış hem kontrol koşuluna hem de mono-kültüre kıyasla anlamlıdır. *CDH2*

gen seviyesinde kontrol grubuna kıyasla 10 µg/ml Der p6 uyarımı 42 katlık, 20 µg/ml Der p6 uyarımı ise 66 katlık bir artışa neden olmasına rağmen yapılan istatistik testi sonucunda bu artışlar anlamlı bulunmamıştır. EMT sürecinde transkripsiyon faktörü olarak rol alan *SNAIL* geninin ifadesinde ise ko-kültür sisteminde yüksek doz Der p6 ve Cup a1&Der p6 koşulları anlamlı artışa neden olmuştur. 20 µg/ml Der p6 uyarımı *SNAIL* gen ifadesini 47 kat, Cup a1&Der p6 uyarımı ise 61 kat arttırmıştır. Ko-kültür uyarım koşullarında kontrole kıyasla anlamlı olan bu artışların mono-kültür sonucu ile karşılaştırıldığında da anlamlı olduğu gözlemlenmiştir. Cup a1 uyarımlarında ise hem ko-kültür & mono-kültür karşılaştırmasında hem de kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir değişim tespit edilmemiştir. 2013 yılında Atsushi ve arkadaşlarının yayınladığı bir çalışmada EoL-1 ve BEAS-2B hücreleri ko-kültüre alınmış ve çalışma kapsamında eozinofillerin havayolu yeniden yapılandırılmasında epitel hücrelerdeki EMT sürecini nasıl etkilediği araştırılmıştır [14]. Bu çalışmada herhangi bir uyarım yapılmadan EoL-1 ve BEAS-2B hücreleri ko-kültüre alındığında, mono-kültür koşuluna göre E-kaderin gen ifadesi azaldığı, vimentin gen ifadesinin ise arttığı tespit edilmiştir. Tez kapsamında yapılan deneylerde ise ko-kültürde uyarım yapıldığında hem epitel hücre belirteci E-kaderinin hem de mezenkimal hücre belirteci N-kaderinin arttığı tespit edilmiştir.

#### **4.9. RPMI-2650/EoL-1 Ko-kültür Sisteminde Belirlenen Doz ve Zamanlarda Cup a1 ve Der p6 Alerjen Uyarımının Ölüm Yolakları ve EMT Mekanizması Üzerine Etkisi**

48 kuyucuklu plakada yapılan uyarımlar sonucunda elde edilen gen verilerine göre 10 µg/ml Cup a1 alerjeni ve 10 µg/ml Der p6 alerjeni ile 8 ve 24 saat uyarım koşulları seçilmiştir. Alerjenlerin sinerjik etkisini gözlemlemek için 10 µg/ml Cup a1 ve 10 µg/ml Der p6 dozu ile 24 saat uyarım koşulu seçilmiştir. Hücre cevabını ölüm yolakları ve EMT süreci üzerinden incelemek için gerçek zamanlı PZR yöntemi kullanılmıştır.

#### 4.9.1. Alerjen Uyarımı Sonrasında Apoptoz Yolağının Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi



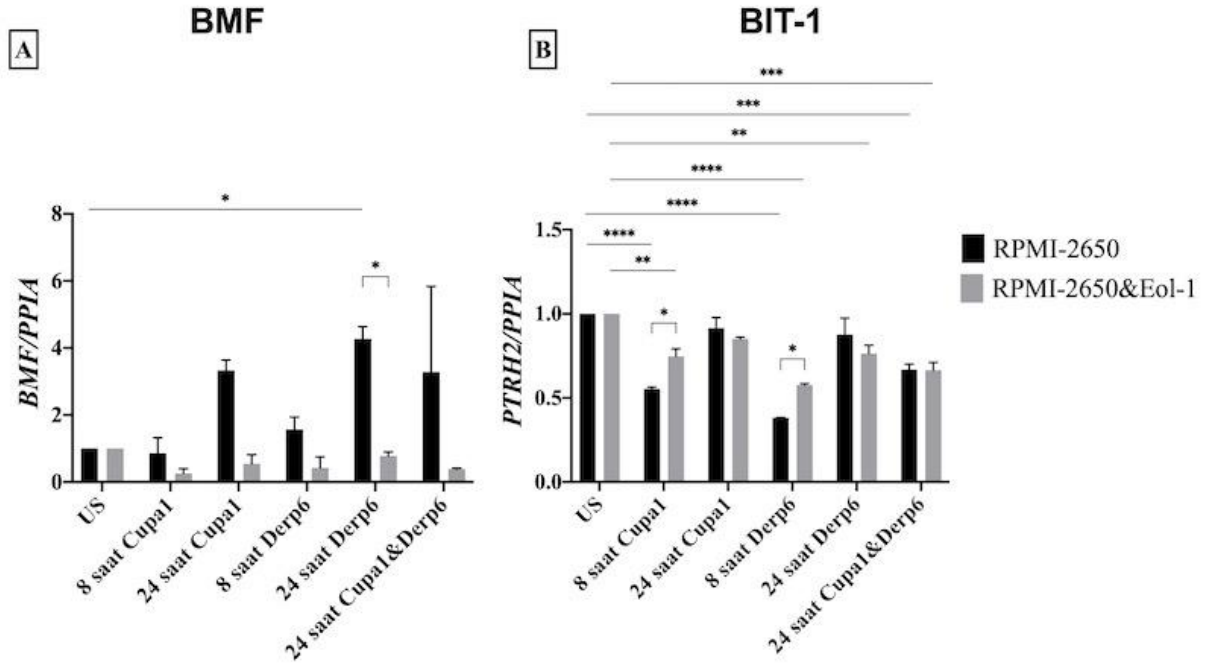
**Şekil 4.43.** 10 µg/ml Der p6 ve 10 µg/ml Cup a1 uyarımları sonrasında mono-kültür ve ko-kültür sisteminde CAS3 (A), CAS8 (B), CAS9 (C) ve BCL2 (D) gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR analizi; n=3; \*p<0,01 \*\*p<0,005 \*\*\*p<0,0005 \*\*\*\*p<0,0001 (düz çizgiler: kontrol grubuna kıyasla uyarım koşulunun istatistiği; çentikli çizgiler: aynı alerjen dozundaki mono&ko-kültür koşullarının istatistiği)

Apoptoz içsel yolağında görev alan CAS3 gen ifadesindeki değişim incelendiğinde ko-kültürde Cup a1-Der p6 ile 24 saat yapılan uyarımın gen seviyesini kontrole kıyasla 19 kat arttırdığı gözlemlenmiştir. Aynı anda iki alerjen ile uyarılan ko-kültür sisteminde gözlemlenen bu artış



hem kontrol grubuna hem de mono-kültür uyarımına kıyasla anlamlı bulunmuştur. Mono-kültür ve ko-kültür sistemlerindeki diğer uyarım koşullarında anlamlı bir değişim tespit edilmemiştir. Benzer şekilde dışsal apoptoz yolağında görev alan Kaspaz 8 gen ifadesinde de anlamlı artışa sebep olan tek koşul 24 saat Cup a1&Der p6 uyarımıdır. Ko-kültürde Cup a1&Der p6 ile uyarılan nazal epitel hücreler kontrol grubuna kıyasla kaspaz 8 gen ekspresyonunu 3,5 kat arttırmıştır. Aynı zamanda bu artış mono-kültür uyarımı ile karşılaştırıldığında da anlamlı bulunmuştur. İçsel yolda görevli bir diğer enzim olan Kaspaz 9 geninin seviyesinde ise diğer kaspaz genlerindeki kadar dramatik bir artış gözlemlenmemiştir. Kontrol grubuna kıyasla CAS9 gen seviyesindeki anlamlı tek artış Cup a1&Der p6 uyarımında yaklaşık 2 kat olarak saptanmıştır. Kaspaz enzimlerinin genlerindeki anlamlı artışlar ko-kültür uyarımlarında tespit edilirken anti-apoptotik *BCL2* genindeki anlamlı değişimler mono-kültür uyarımlarında tespit edilmiştir. 8 saat 10 µg/ml Cup a1 uyarımı *BCL2* gen ifadesini 4 kat, 24 saat Der p6 uyarımı ise 6 kat arttırmıştır. 24 saat Der p6 mono-kültür uyarımında tespit edilen artış ko-kültür uyarımına kıyasla da anlamlı bulunurken 8 saat Cup a1 mono-kültür uyarımı ko-kültüre göre anlamlı tespit edilmemiştir. Literatürde EoL-1&BEAS-2B ko-kültüründe gerçekleşen bir apoptoz araştırması ile karşılaşılmamıştır.

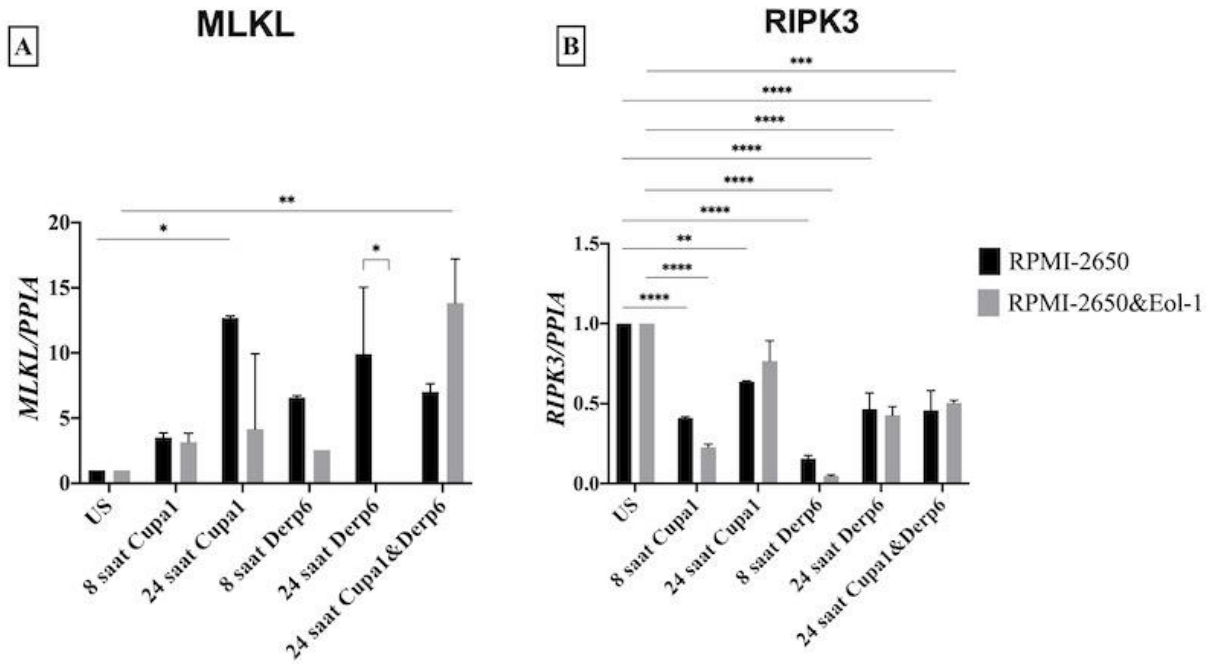
#### 4.9.2. Alerjen Uyarımı Sonrasında Anoikis Yolağının Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi



**Şekil 4.44.** 10 µg/ml Der p6 ve 10 µg/ml Cup a1 uyarımları sonrasında mono-kültür ve ko-kültür sisteminde *BMF* (A) ve *PTRH2* (B) gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR analizi; n=3; \*p<0,01 \*\*p<0,005 \*\*\*p<0,0005 \*\*\*\*p<0,0001 (düz çizgiler: kontrol grubuna kıyasla uyarım koşulunun istatistiği; çentikli çizgiler: aynı alerjen dozundaki mono&ko-kültür koşullarının istatistiği)

Bmf gen ifadesindeki değişimlere bakıldığında 24 saat Der p6 uyarımında mono-kültürde kontrol grubuna kıyasla 4,2 katlık anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Tespit edilen bu artış ko-kültürdeki uyarım ile kıyaslandığında da anlamlıdır. Ko-kültürde gerçekleştirilen uyarımların sonucunda *BMF* gen ifadeleri kontrole yakın bir seviyede tespit edilirken mono-kültürdeki uyarımların gen seviyesinde artışa sebep olduğu gözlemlenmiştir. *PTRH2* gen ifadesi incelendiğinde ise hem mono-kültürdeki hem ko-kültürdeki uyarımların hiçbiri anlamlı bir artışa sebep olmamıştır.

#### 4.9.3. Alerjen Uyarımı Sonrasında Nekroptoz Yolağının Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi

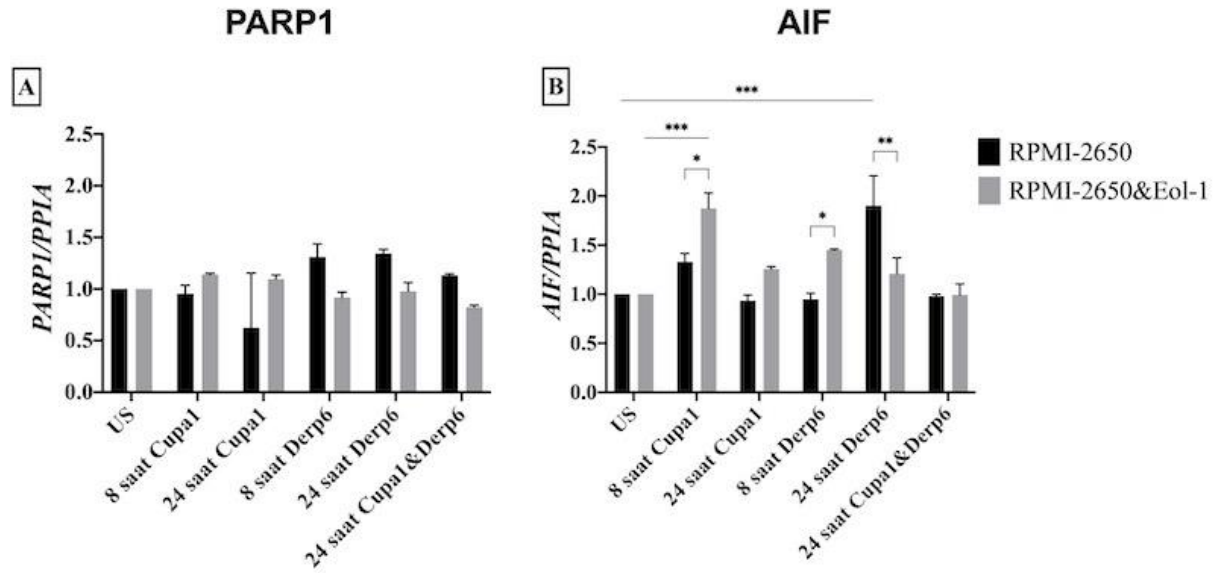


**Şekil 4.45.** 10 µg/ml Der p6 ve 10 µg/ml Cup a1 uyarımları sonrasında mono-kültür ve ko-kültür sisteminde *MLKL* (A) ve *RIPK3* (B) gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR analizi; n=3; \*p<0,01 \*\*p<0,005 \*\*\*p<0,0005 \*\*\*\*p<0,0001 (düz çizgiler: kontrol grubuna kıyasla

uyarım koşulunun istatistiği; çentikli çizgiler: aynı alerjen dozundaki mono&ko-kültür koşullarının istatistiği)

Nekrotoz yolağında görev alan *MLKL* proteininin gen ifadesi incelendiğinde, 24 saat Cup a1 uyarımının mono-kültürdeki gen ifadesinde 16 katlık bir artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Ko-kültürde gerçekleştirilen Cup a1&Der p6 uyarımı ise *MLKL* ekspresyon seviyesini yaklaşık 14 kat arttırmıştır. *RIPK3* enziminin gen ifadesinde ise hiçbir koşulda anlamlı bir artış tespit edilememiştir.

#### 4.9.4. Alerjen Uyarımı Sonrasında Partanatoz Yolağının Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi



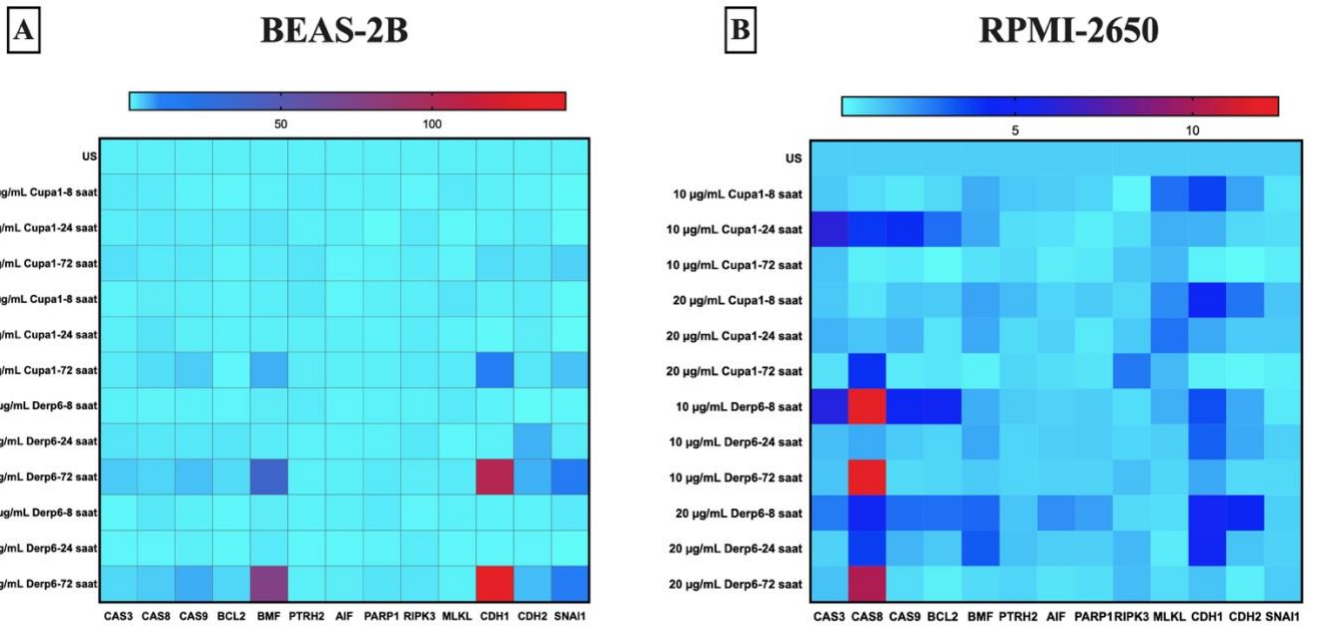
**Şekil 4.46.** 10 µg/ml Der p6 ve 10 µg/ml Cup a1 uyarımları sonrasında mono-kültür ve ko-kültür sisteminde *PARP1* (A) ve *AIF* (B) gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR analizi; n=3; \*p<0,01 \*\*p<0,005 \*\*\*p<0,0005 (düz çizgiler: kontrol grubuna kıyasla uyarım koşulunun istatistiği; çentikli çizgiler: aynı alerjen dozundaki mono&ko-kültür koşullarının istatistiği)

Sitoplazmada PAR birikmesinden sorumlu enzim *PARP1* gen seviyesinde hiçbir koşulda anlamlı bir değişim tespit edilememiştir. Apoptoz indükleyici faktör olarak hem apoptozda hem de partanatozda görev alan *AIF* geninde ise ko-kültürde 8 saat Cup a1 uyarımında ve mono-kültürde 24 saat Der p6 uyarımında kontrole kıyasla anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Ko-kültürde 8 saat Cup a1 uyarımı *AIF* geninde 1,8 katlık, mono-kültürde 24 saat Der p6 uyarımı

ise 1,9 katlık bir artışa neden olmuştur. Tespit edilen bu artışlar ko-kültür & mono-kültür sistemleri arasında karşılaştırıldığında da anlamlı bulunmuştur.

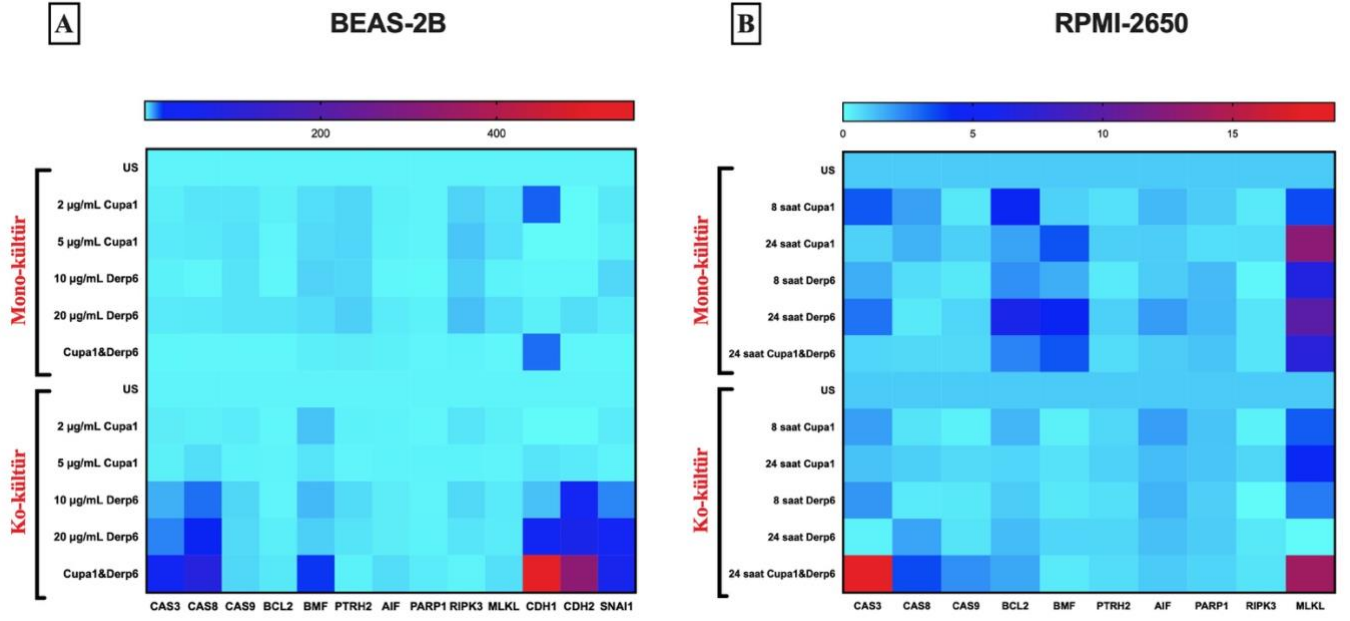
RPMI-2650 hücre hattı ile gerçekleştirilen mono-kültür ve ko-kültür deneylerinde *CDH1*, *CDH2* ve *SNAI1* gen ifadeleri ise qPZR yöntemi ile tespit edilememiştir.

Tek tabaka (48 kuyucuklu plaka) uyarımları sonucunda nazal ve bronşiyal epitel hücrelerdeki gen ifadesi değişimleri Şekil 4.47’de özetlenmiştir.



**Şekil 4.47.** Tek tabaka kültürde tespit edilen gen ifadesi değişiklikleri

Mono-kültür ve ko-kültür uyarımları sonucunda nazal ve bronşiyal epitel hücrelerde gözlemlenen gen ifadesi değişimleri ise Şekil 4.48’de özetlenmiştir.



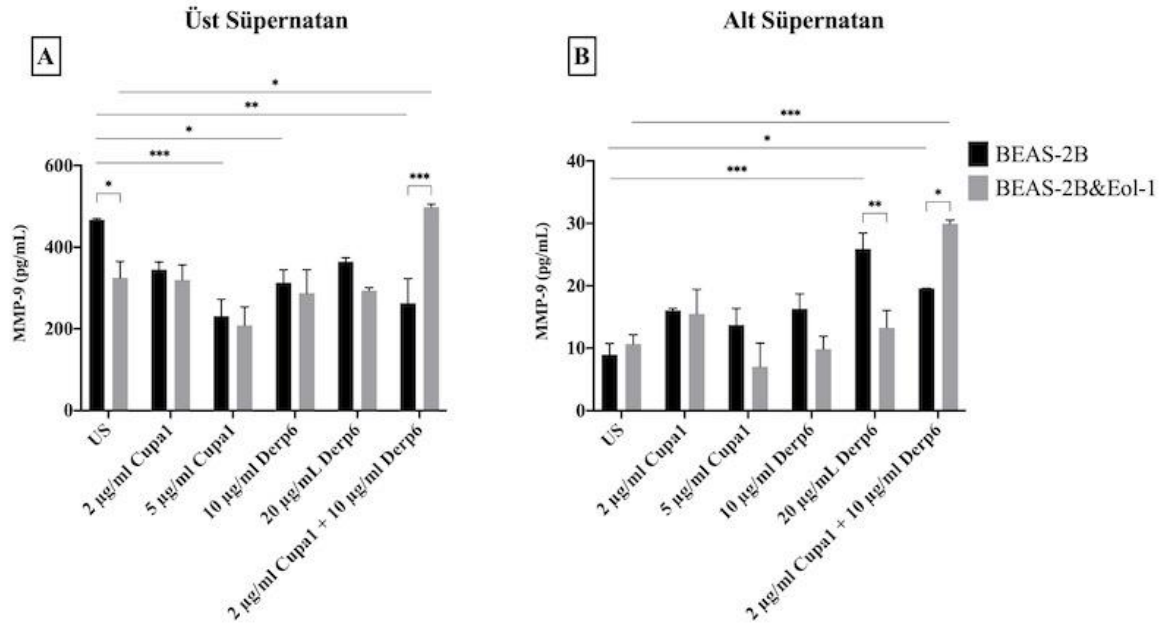
**Şekil 4.48.** Mono-kültür ve ko-kültürde tespit edilen gen ifadesi değişiklikleri

#### 4.10. Alerjen Uyarımı Sonrasında Süpernatana Salınan Sitokin Seviyesinin ELISA ile İncelenmesi

Eozinofillerin alerjen uyarımı ile birlikte epitel hücrelerin cevaplarına katkısının incelenmesi amaçlanan bu tez kapsamında transwell insertler yardımıyla mono-kültür ve ko-kültür sistemleri kurulmuştur. Epitel hücrelerin Cup a1 ve Der p6 alerjenleri ile uygun uyarım süreleri tamamlandığında üst süpernatana ve alt süpernatana toplanmış ve alerjenlerin sitokin salınımına etkisinin inceleneceği ELISA deneylerinde kullanılmak için  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. Tez kapsamında epitel hücrelerden salınan TNF-  $\alpha$ , TGF-  $\beta$ , MMP9 ve GM-CSF sitokin seviyeleri incelenmiştir.

##### 4.10.1. BEAS-2B Hücre Hattının Alerjen Uyarımı Sonrası Süpernatana Salınan Sitokin Profili

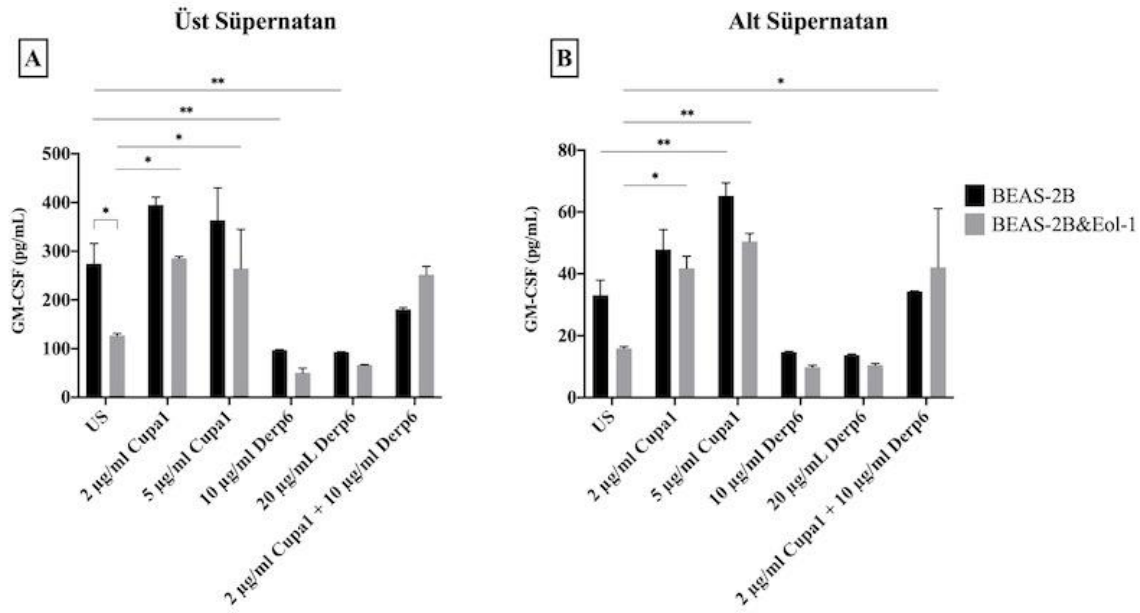
BEAS-2B hücrelerinde sandviç ELISA yöntemi kullanılarak yapılan deneylerde, hücrelerden salınan TNF-a seviyesi kitin standart aralığının (15.6 pg/mL - 1,000 pg/mL) altında kaldığı için tespit edilememiştir.



**Şekil 4.49.** 72 saat alerjen uyarımları sonrasında BEAS-2B hücre hattından üst (A) ve alt (B) süpernatantlara salınan MMP9 miktarı; n=3; \*p<0,01 \*\*p<0,005 \*\*\*p<0,0005 (düz çizgiler: kontrol grubuna kıyasla uyarım koşulunun istatistiği; çentikli çizgiler: aynı alerjen dozundaki mono&ko-kültür koşullarının istatistiği)

Mono-kültür kontrol koşulunda üst süpernatana salınan MMP9 konsantrasyonu 467 pg/ml iken ko-kültür kontrol koşulunda üst süpernatana salınan MMP9 konsantrasyonu ise 325 pg/ml olarak tespit edilmiştir. Mono-kültür ve ko-kültürde tespit edilen bu fark istatistiksel analizde anlamlı bulunmuştur. Mono-kültürde kontrol koşuluna kıyasla 5 µg/ml Cup a1, 10 µg/ml Der p6 ve Cup a1&Der p6 koşullarında üst süpernatana salınan MMP-9 miktarlarında anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Ko-kültürde ise Cup a1&Der p6 koşulunda üst süpernatana salınan MMP 9 konsantrasyonu 498 pg/ml olarak hesaplanmış ve kontrol koşuluna göre bu artış anlamlı bulunmuştur. Alt süpernatana salınan MMP9 konsantrasyonu incelendiğinde ise kontrol koşulunda mono-kültür ve ko-kültür arasında anlamlı bir değişim tespit edilmemiştir. Mono-kültürün kontrol koşulunda alt süpernatana salınan MMP9 9 pg/ml konsantrasyonunda iken 20 µg/ml Der p6 uyarımında konsantrasyon 26 pg/ml ve Cup a1&Der p6 uyarımında konsantrasyon 19,5 pg/ml tespit edilmiştir. Kontrol koşuluna göre gözlemlenen bu artışlar istatistiksel analize göre anlamlıdır. Ko-kültür kontrol koşulunda salınan MMP9 konsantrasyonu 10 pg/ml iken Cup a1& Der p6 uyarımında yaklaşık 30 pg/ml MMP9 alt süpernatana salınmaktadır. Bu uyarımda gözlemlenen artış hem kontrol koşuluna hem de

mono-kültür koşuluna kıyasla anlamlı bulunmuştur. 2021 yılında ekibimizin yayınladığı bir başka çalışmada BEAS-2B hücreleri 10 µg/ml Der p6 ile uyarılmış ve kontrol koşuluna göre MMP9 salınmasında azalma gözlemlenmiştir. Fakat tespit edilen bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir [98]. Tez kapsamında yapılan çalışmada ise mono-kültürde 10 µg/ml Der p6 uyarımında üst süpernatana salınan MMP9 miktarındaki azalma anlamlı bulunmuştur.

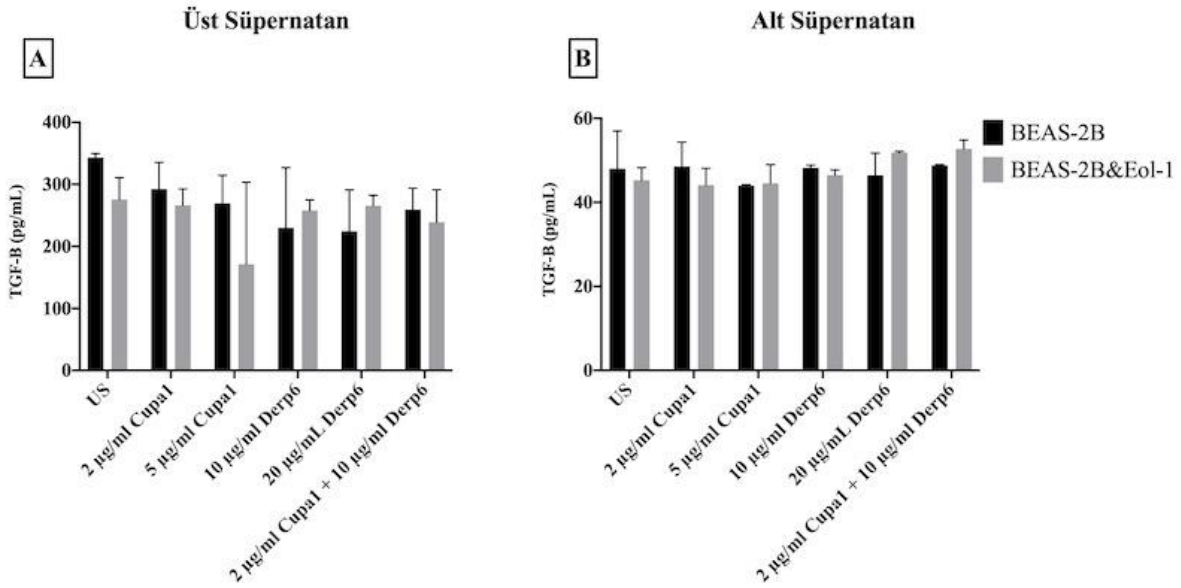


**Şekil 4.50.** 72 saat alerjen uyarımları sonrasında BEAS-2B hücre hattından üst (A) ve alt (B) süpernatanlara salınan GM-CSF miktarı; n=3; \*p<0,01 \*\*p<0,005 (düz çizgiler: kontrol grubuna kıyasla uyarım koşulunun istatistiği; çentikli çizgiler: aynı alerjen dozundaki mono&ko-kültür koşullarının istatistiği)

Üst süpernatana salınan GM-CSF miktarı mono-kültür kontrol koşulunda 274 pg/ml konsantrasyonunda tespit edilirken, ko-kültür kontrol koşulunda 126 pg/ml konsantrasyonunda tespit edilmiştir. Ko-kültür sisteminde üst süpernatana salınan GM-CSF miktarı mono-kültür sistemine göre anlamlı azalmıştır. Benzer bir azalma alt süpernatanda da gözlemlenmesine rağmen bu azalma istatistiksel analize göre anlamlı değildir. Mono-kültürde Der p6 uyarımları üst süpernatana salınan GM-CSF miktarında anlamlı bir azalmaya neden olmuştur. Ko-kültürde ise Cup a1 uyarımları üst süpernatana salınan GM-CSF miktarında anlamlı bir artışa sebep olmuştur. Alt süpernatanda benzer şekilde ko-kültürdeki Cup a1 uyarımları GM-CSF protein seviyesini arttırırken, mono-kültürde gerçekleştirilen 5 µg/ml Cup a1 uyarımı da protein miktarını anlamlı bir şekilde arttırmıştır. Cup a1&Der p6 uyarımı ko-kültürde alt süpernatana



42 pg/ml konsantrasyonunda GM-CSF salınmasına neden olmuştur. Bu artış kontrol koşuluna kıyasla anlamlıdır. Laboratuvar ekibimiz tarafından yayınlanan çalışmada ALI-kültürde büyütülen BEAS-2B hücreleri 10 µg/ml Der p6 ile uyarıldıktan sonra apikal bölüme salınan GM-CSF miktarında kontrol grubuna göre azalma gözlemlenmiştir [98]. Gerçekleştirilen deneyde benzer şekilde mono-kültürde 10 µg/ml ve 20 µg/ml Der p6 uyarımlarında apikale salınan GM-CSF miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir.



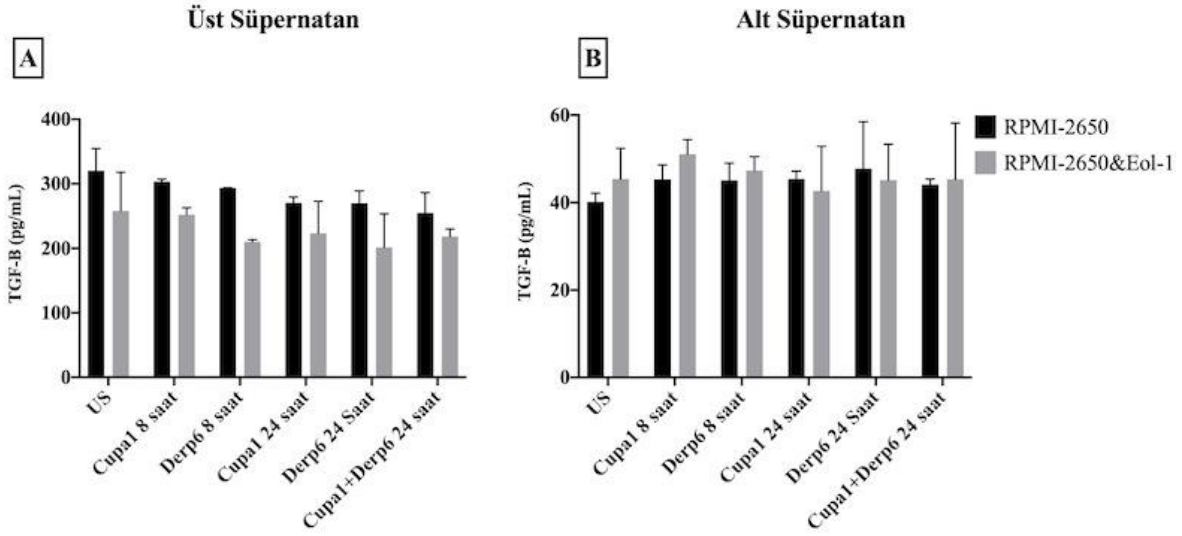
**Şekil 4.51.** 72 saat alerjen uyarımları sonrasında BEAS-2B hücre hattından üst (A) ve alt (B) süpernatantlara salınan TGF-β miktarı; n=3

Üst süpernatana kontrol ve uyarım koşullarında yaklaşık 200-350 pg/ml aralığında TGF-B salındığı gözlemlenmiştir. Alt süpernatana kontrol ve uyarım koşullarında yaklaşık 40-50 pg/ml aralığında TGF-B salındığı saptanmıştır. Uyarım koşulları ile üst ve alt süpernatana salınan TGF-B miktarının arasında anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir. 2017 yılında BEAS-2B&EoL-1 ko-kültür oluşturularak yapılan bir deney sisteminde ko-kültür koşulunda salınan TGF-B miktarında mono-kültüre göre anlamlı bir artış tespit edilmiştir [118]. Tez kapsamında yürütülen deney sonucunda elde edilen sonuçlar literatür ile uyumlu değildir.

#### 4.10.2. RPMI-2650 Hücre Hattının Alerjen Uyarımı Sonrası Süpernatana Salınan Sitokin Profili



RPMI-2650 hücrelerinde sandviç ELISA yöntemi kullanılarak yapılan deneylerde, hücrelerden salınan TNF-a seviyesi kitin standart aralığının (15.6 pg/mL - 1,000 pg/mL) altında kaldığı için tespit edilememiştir. GM-CSF kitinin standartları 15.6 pg/mL - 1,000 pg/mL aralığında ve MMP9 kitinin standartları 0,625 ng/ml – 20 ng/ml aralığındadır. Uygun koşullardaki uyarımlardan sonra toplanan alt ve üst süpernatantlardaki GM-CSF ve MMP9 miktarları kitin tespit aralığının altında kalmıştır.

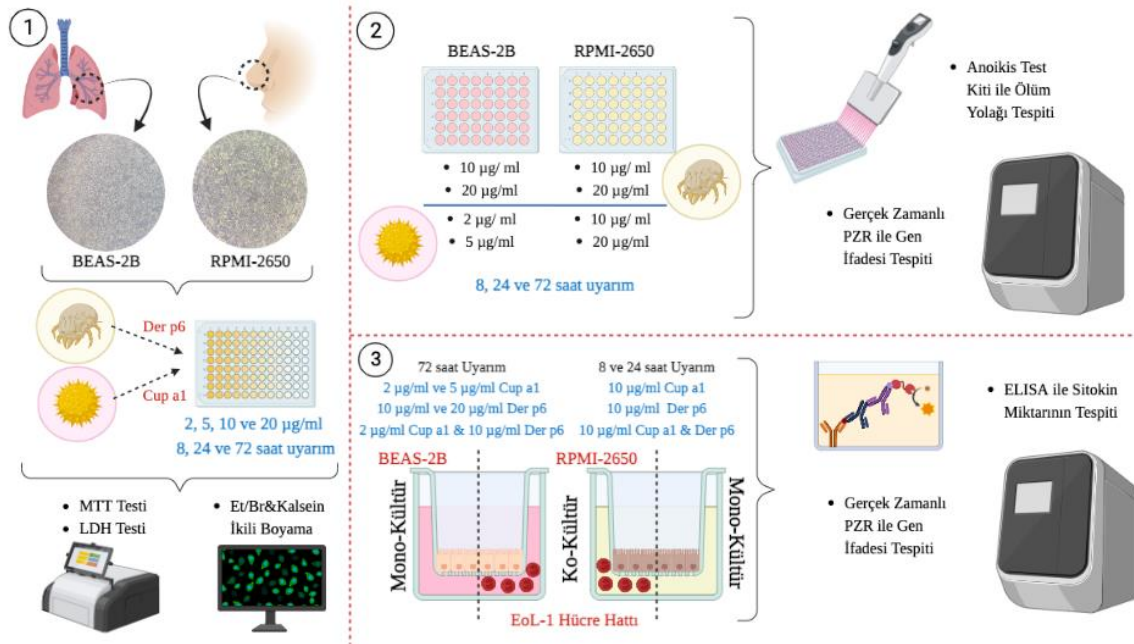


**Şekil 4.52.** 10 µg/ml Der p6 ve 10 µg/ml Cup a1 alerjen uyarımları sonrasında RPMI-2650 hücre hattından üst (A) ve alt (B) süpernatantlara salınan TGF-B miktarı; n=3

Üst süpernatana kontrol ve uyarım koşullarında yaklaşık 200-350 pg/ml aralığında TGF-B salındığı gözlemlenmiştir. Alt süpernatana kontrol ve uyarım koşullarında yaklaşık 40-50 pg/ml aralığında TGF-B salındığı saptanmıştır. 2005 yılında RPMI-2650 hücre hattı artan dozda HDM ile uyarılmış ve süpernatana salınan TGF-B seviyeleri tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen bu deneyde uyarımın dozundaki ve saatindeki artışına bağlı salınan TGF-B seviyesinin arttığı gözlemlenmiştir [151]. Tez kapsamında gerçekleştirilen deneylerde ise uyarım koşulları ile üst ve alt süpernatana salınan TGF-B miktarının arasında anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir.

## 5. YORUM

Tez kapsamında nazal ve bronşiyal epitel hücrelerin Der p6 ve Cup a1 alerjenlerine verdikleri hücre yanıtlarının hücre ölüm yolları (apoptoz, anoikis, partanatoz ve nekroptoz) ve EMT süreci üzerinden incelenmesi ve eozinofil hücrelerinin hücre cevabına katkısının araştırılması hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda RPMI-2650 ve BEAS-2B hücre hatları farklı doz ve sürelerde Cup a1 ve Der p6 alerjenleri ile uyarılmış ve uygun doza-zamana karar verebilmek için MTT, LDH ve EtBr/Kalsein floresan boyama canlılık ve sitotoksisite testleri yapılmıştır. Bu testlerin sonucu göz önüne alınarak hücrelerde %50'ye yakın ölüme neden olan uygun doza karar verilmiştir. Nazal ve bronşiyal epitel hücre hatları için farklı dozlar seçilmiştir. Tezin ilerleyen aşamasında alerjenler ile uyarılan hücrelerde anoikis testi yapılmış ve hücre cevabı gen ifadesi üzerinden gerçek zamanlı PZR yöntemi ile incelenmiştir. Gen ifadelerinde anlamlı değişime sebep olan uygun alerjen dozu ve süreler sonraki deneylerde kullanılmak üzere seçilmiştir. Eozinofillerin alerjen uyarımında hücre cevabına olan katkısını araştırmak için mono ve ko-kültür hücre sistemleri oluşturulmuştur. Alerjen uyarımları tamamlandıktan sonra hücrelerde 4 farklı ölüm yolağında (apoptoz, anoikis, nekroptoz ve partanatoz) ve EMT yolağında değişen gen ifadelerini incelemek için gerçek zamanlı PZR yöntemi kullanılmıştır. Alerjen uyarımı ile değişen sitokin seviyelerini incelemek için ise ELISA deneyi yapılmıştır. Tez kapsamında gerçekleştirilen deney şeması Şekil 5.1'de gösterilmiştir.



## Şekil 5.1. Deneş akış şeması

Gerçekleştirilen tez kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda belirtilmiştir;

- Cup a1 ve Der p6 alerjenleri ticari olarak satın alınmış ve deneşlere başlamadan önce Qubit cihazında yapılan DNA ve RNA saflık tayini analizinde beklenildiği gibi DNA ve RNA kontaminasyonu tespit edilmemiştir.
- Serin proteaz aktivitesine sahip Der p6 ve pektat liyaz aktivitesine sahip Cup a1 için yapılan proteaz aktivite testinde alerjenlerin proteaz özelliğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Der p6 alerjeninin proteaz aktivitesi olduğu bilindiğinden elde edilen sonuç literatür ile uyumludur. Fakat Cup a1 alerjeninin proteaz aktiviteye sahip olduğu literatürde ilk defa gösterilmiştir.
- Farklı dozlarda Der p6 ile uyarılan BEAS-2B hücrelerinde yüzde hücre canlılığındaki anlamlı düşüş 72 saat 20 µg/ml konsantrasyonunda gözlemlenmiş ve hücre canlılığı kontrol koşuluna kıyasla %77'ye gerilemiştir. Literatürde Der p6 alerjeni ile 72 saat uyarım gerçekleştirilmemiş olup 24 saat uyarım sonuçları laboratuvarın yayınlanmış diğer bir çalışması ile uyumlu bulunmuştur.
- BEAS-2B hücrelerinde gerçekleştirilen Cup a1 uyarımları incelendiğinde 20 µg/ml dozunun her saatte hücre canlılığını %10'un altına düşürdüğu tespit edilmiştir. 72 saatlik uyarımda doz ile korele bir şekilde hücre canlılığında azalma gözlemlenmiş ve 5 µg/ml Cup a1 uyarımında hücre canlılığı kontrol koşuluna kıyasla %46'ya düşmüştür.
- İki farklı alerjen ile uyarım sonrasında elde edilen MTT sonuçları Cup a1 ve Der p6 alerjenlerinin aynı doz uyarımlarının hücre canlılığını farklı etkileyebildiğini göstermektedir. 20 µg/ml Cup a1 uyarımı bütün saatlerde hücre canlılığını yaklaşık %1'e düşürürken, 72 saat 20 µg/ml Der p6 uyarımının hücre canlılığını sadece %77'ye kadar düşürebildiği gözlemlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar Cupressus arizonica bitkisinin majör alerjeni olan Cup a1'in BEAS-2B hücreleri üzerinde diğer alerjene kıyasla daha fazla hasara neden olduğunu göstermektedir.
- MTT test sonucu ile uyumlu bir şekilde Der p6 uyarımlarının LDH salımını kontrol koşuluna kıyasla aşırı miktarda arttırmadığı gözlemlenmiş ve uygulanan Der p6 alerjen dozlarının hiçbirinin nekroza sebep olmadığı düşünölmüştür. Literatürde Der p6 uyarımı sonrasında LDH testi gerçekleştirilen bir çalışma bulunmamakla birlikte, bu tez kapsamında ilk defa gerçekleştirilmiştir.

- Cup a1 uyarımı sonrasında gerçekleştirilen LDH testinin sonuçları da MTT testi ile uyumlu bulunmuştur. Tüm saatlerdeki 20 µg/ml Cup a1 uyarımının BEAS-2B hücreleri için toksik olduğu, yapılan LDH ve MTT testleri ile gösterilmiştir. Literatürde Cup a1 alerjeni ile hücresel düzeyde yapılan bir çalışmaya rastlanmamış olup yapılan bu deneyin literatüre katkı sağlayacağına inanmaktayız.
- EtBr/Kalsein ikili floresan boyama sonuçları incelendiğinde Der p6 uyarımının epitel hücre üzerinde, 72 saatlik uyarımının 8 ve 24 saatlik uyarımlardan daha fazla hasara sebep olduğu tespit edilmiştir.
- Cup a1 uyarımlarının EtBr/Kalsein ikili floresan boyama sonuçları incelendiğinde ise MTT ve LDH sonuçları ile uyumlu olduğu saptanmıştır. 20 µg/ml Cup a1 doz ile 8, 24 ve 72 saat uyarımlarının bronş epitel hücre hattı için toksik olduğu ve hücrelerin ölümüne sebebiyet verdiği gözlemlenmiştir.
- RPMI-2650 hücrelerindeki farklı doz ve saatlerdeki Der p6 uyarımları hücre canlılığında azalmaya neden olmamıştır. LDH sonuçlarında da benzer şekilde uyarımların hücrelerden yüksek miktarda LDH salınmasına sebebiyet vermediği tespit edilmiştir. Bu durum uygulanan doz ve saatteki Der p6 uyarımlarının hücrelerde nekroza neden olmadığını düşündürmektedir.
- RPMI-2650 hücre hattında gerçekleştirilen 72 saat Cup a1 uyarımlarında Der p6 uyarımının aksine hücre canlılığının azaldığı gözlemlenmiştir. MTT testinde 72 saatlik 10 µg/ml uyarımın hücre canlılığını %73 değerinde ve 20 µg/ml Cup a1 uyarımının ise %64 değerine düşürdüğü tespit edilmiştir. Der p6 uyarımındaki LDH sonuçlarına benzer bir şekilde Cup a1 uyarımı sonrasındaki LDH sonuçlarında da uyarıma bağlı olarak artan bir sitotoksosite değeri tespit edilmemiştir.
- RPMI-2650 hücrelerinin görüntü sonuçlarında MTT ve LDH sonuçlarının aksine, 24 ve 72 saat uyarımında nazal epitel hücrelerde Der p6 alerjen dozundaki artış ile orantılı bir şekilde canlı hücre sayısında düşüş gözlemlenmiştir. Cup a1 uyarımında ise MTT ve LDH sonuçları ile uyumlu olarak 8 ve 24 saat uyarımlarda hücre canlılığında düşüş gözlemlenmemişken 72 saat uyarımda doz artışına bağlı olarak 10 µg/ml ve 20 µg/ml koşullarında canlı hücre sayılarında azalma tespit edilmiştir.
- Canlılık & sitotoksosite test sonuçları göz önünde bulundurulduğunda, ilerleyen deneyler için 8, 24 ve 72 saatlik uyarımlar yapılması, BEAS-2B için 2 µg/ml Cup a1, 5 µg/ml Cup a1, 10 µg/ml Der p6 ve 20 µg/ml Der p6 dozları, RPMI-2650 için ise 10

$\mu\text{g/ml}$  Cup a1, 20  $\mu\text{g/ml}$  Cup a1, 10  $\mu\text{g/ml}$  Der p6 ve 20  $\mu\text{g/ml}$  Der p6 dozlarının seçilmesine karar verilmiştir.

- Seçilen doz ve zamanlarda alerjenler ile yapılan anoikis testinde BEAS-2B ve RPMI-2650 hücrelerinin kontrol koşuluna kıyasla kontrol/anoikis RFU oranında anlamlı bir artış tespit edilmemiştir. Bu durum uygulanan doz ve zamanlarda alerjenlerin anoikise sebep olmadığını düşündürmektedir.
- BEAS-2B hücrelerinin gen ifadesi analizinde, Der p6 uyarımlarının 72 saat sonunda *CAS3*, *CAS9* ve *BCL2* genlerinde artışa neden olduğu gözlemlenmiştir. Benzer şekilde Der p6 uyarımları BMF geninde de dramatik bir artışa sebep olmuştur. Diğer ölüm yolları ilişkili genlerin ekspresyon seviyesinde yüksek bir artış saptanmamıştır. EMT ilişkili genler incelendiğinde ise Der p6 uyarımının *CDH1*, *CDH2* ve *SNAI1* gen ifadelerinde artışa sebep olduğu görülmüştür. Sonuçlar değerlendirildiğinde hücrelerde uyarım sonucunda apoptoz ve anoikis ölüm yolağı ilişkili genlerin ve EMT ilişkili genlerin arttığı tespit edilmiştir.
- Cup a1 uyarımlarının BEAS-2B hücrelerinde sebep olduğu gen ifadesi değişikliği incelendiğinde ise, yüksek doz alerjen uyarımının 72 saatte *CAS9*, *CDH1* ve *SNAI1* gen ifadelerini arttırdığı saptanmıştır.
- Sonuçlar incelendiğinde 72 saat uyarımın gen ifadelerinde değişikliğe sebep olduğuna ve alerjenlerin bronş epitel hücresinde farklı cevaplara neden olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Mono-kültür ve ko-kültür deneyleri için 72 saat uyarımın yapılmasına karar verilmiştir.
- RPMI-2650 hücrelerinde 24 saatlik 10  $\mu\text{g/ml}$  Cup a1 uyarımında *CAS3*, *CAS9* ve *BCL2* genlerinde artış tespit edilmiştir. E-kaderin ve N-kaderin ifadelerindeki artış ise 8 saat 20  $\mu\text{g/ml}$  Cup a1 uyarımlarında saptanmıştır. 8 saat 10  $\mu\text{g/ml}$  Der p6 uyarımı *CAS3*, *CAS9*, *BCL2*, *BMF*, *PARP1*, *AIF*, *CDH1* ve *CDH2* genlerini arttırmıştır.
- Sonuçlar incelendiğinde düşük doz alerjen ile 8 ve 24 saat uyarımların gen ifadelerinde değişime sebep olduğu gözlemlenmiştir. Mono-kültür ve ko-kültür deneyleri için Cup a1 ve Der p6 alerjenleri ile 8 ve 24 saat 10  $\mu\text{g/ml}$  uyarımın yapılmasına karar verilmiştir.
- BEAS-2B ve RPMI-2650 hücrelerinin ALI-kültür yöntemi ile kültürlenmesinin kontrol edildiği TEER değerlerinde; nazal epitel hücrelerin 21. günde en yüksek TEER değerine ulaştığı tespit edilmiş ve 21 gün ALI-kültürde büyütülmesine karar verilmiştir. BEAS-2B hücrelerinin TEER değerlerinde sınırlı bir artış gözlemlenmesine rağmen bu sonucun literatür ile uyumlu olmasından ve laboratuvarımızda BEAS-2B ile rutin olarak

yapılan ALI-kültür deneylerinde 21 gün kullanılmasından dolayı 21 gün ALI-kültürde büyütülmesine karar verilmiştir.

- EoL-1 hücrelerinin farklılaştırma protokolü ECP ELISA kiti ile karakterize edilmiştir. Gerçekleştirilen deney sonucunda 2 gün 500 µM BA ile EoL-1 hücrelerinin farklılaştırılmasına karar verilmiştir.
- Alerjenlerin sinerjik etkilerini incelemek için BEAS-2B hücrelerinin 72 saat 2 µg/ml Cup a1 & 10 µg/ml Der p6, RPMI-2650 hücrelerinin ise 24 saat 10 µg/ml Cup a1 & 10 µg/ml Der p6 ile uyarılmasına karar verilmiştir.
- Apoptoz ilişkili genler incelendiğinde BEAS-2B ko-kültür sisteminde Der p6 ve Cup a1&Der p6 uyarımlarının *CAS3*, *CAS8* ve *CAS9* genlerinde artışa neden olduğu, mono-kültürde ise 20 µg/ml Der p6 uyarımının *BCL2* gen ifadesini arttırdığı tespit edilmiştir.
- Anoikis ilişkili genlerde ise BEAS-2B ko-kültür sisteminde Cup a1&Der p6 uyarımının *BMF* genini arttırdığı, mono-kültürde ise Cup a1&Der p6 hariç diğer uyarımların *PTRH2* genini arttırdığı gözlemlenmiştir.
- Nekroptoz ilişkili genlerde BEAS-2B mono-kültüründe yüksek doz Cup a1 uyarımının ve her iki dozdaki Der p6 uyarımının *RIPK3* geninde artışa sebep olduğu saptanmıştır. Ko-kültürde uyarıma bağlı nekroptoz ilişkili genlerde artış gözlemlenmemiştir.
- Partanatoz ilişkili genlerde ise sadece bronş epitel hücrelerinin ko-kültür sisteminde Cup a1&Der p6 uyarımı sonucunda *AIF* gen ifadesinin arttığı görülmüştür.
- EMT ilişkili *CDH1*, *CDH2* ve *SNAI1* genindeki artış Cup a1&Der p6 uyarımında gözlemlenmiştir. Cup a1 uyarımları gen ifadelerinde değişime sebep olmamıştır. Fakat 20 µg/ml Der p6 uyarımının *SNAI1* gen ekspresyonunu arttırdığı görülmüştür.
- Nazal epitel hücre hattında yapılan uyarımlar incelendiğinde apoptoz ilişkili *CAS3*, *CAS8* ve *CAS9* gen ifadelerindeki artışın ko-kültürdeki Cup a1&Der p6 uyarımından kaynaklandığı tespit edilmiştir. Anti-apoptotik *BCL2* gen ifadesindeki artışa ise mono-kültürdeki 8 saat Cup a1 ve 24 saat Der p6 uyarımları sebep olmuştur.
- Anoikis ilişkili genler incelendiğinde nazal epitel hücrenin mono-kültür sisteminde 24 saat Der p6 uyarımı *BMF* gen ekspresyonunu arttırmıştır. *PTRH2* gen ifadesinde ise anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir.
- Nazal epitel hücrede nekroptoz ilişkili genlerden *MLKL* gen ifadesi mono-kültürde 24 saat Cup a1 uyarımında ve Cup a1&Der p6 uyarımında artmıştır. *RIPK3* gen ifadesinde ise anlamlı bir artış tespit edilmemiştir.

- Partanatoz ilişkili genlerden *AIF* gen ekspresyonunun ise ko-kültürde 8 saat Cup a1 uyarımında ve 24 saat mono-kültür Der p6 uyarımında arttığı görülmüştür.
- BEAS-2B hücrelerinden süpernatana salınan MMP9 miktarı incelendiğinde; üst süpernatana salınan protein miktarı mono-kültürde uyarımlar ile birlikte azalırken ko-kültürde Cup a1&Der p6 uyarımı ile birlikte artış göstermektedir. Alt süpernatanda ise hem mono-kültürde hem de ko-kültürde salınan protein miktarında artış tespit edilmiştir.
- BEAS-2B hücrelerinden süpernatana salınan GM-CSF miktarı incelendiğinde; Üst süpernatana salınan protein miktarı Cup a1 uyarımı ile hem mono-kültürde hem de ko-kültürde artış göstermiştir. Benzer şekilde alt süpernatana salınan GM-CSF miktarının Cup a1 uyarımı ile hem mono-kültürde hem de ko-kültürde arttığı gözlemlenmiştir.
- RPMI-2650 ve BEAS-2B hücrelerinden süpernatana salınan TGF- $\beta$  miktarı ile uyarım koşulları arasında bir ilişki bulunamamıştır.
- Tez çalışmasında nazal ve bronşiyal epitel hücre hatlarının kullanılmış olması bu çalışmanın kısıtlayıcı faktörüdür. RPMI-2650 hücre hattının alerjik rinit gibi birçok alerjik hastalık ve yolak çalışmalarında tercih edilen bir hücre olması ve BEAS-2B hücre hattının sağlıklı bireylerden alınan bronş epitel hücrelerden elde edilmiş olması tez çalışması kapsamında bu hücreleri tercih etmemizin nedenidir. Fakat çalışmanın bulgularının güçlenmesi için deneyler nazal ve bronşiyal primer hücreler kullanılarak tekrarlanmalıdır.
- Alerjik akciğer hastalıklarında atakların en yaygın tetikleyicilerinden HDM ve polen alerjenlerinin hücre cevabına etkisinin hücre ölüm yolakları ve EMT süreci üzerinden incelendiği bu çalışmada deneyler yolak ile ilişkili gen ifadeleri üzerinden yürütülmüştür. Çalışmanın bir diğer kısıtlayıcı yönünü ise hücre cevabının protein düzeyinde incelenmemesi oluşturmaktadır. Gen ifadeleri ile elde edilen sonuçların daha iyi yorumlanabilmesi için deneyler protein düzeyinde tekrarlanmalıdır.
- Literatürde Cup a1 ile ilgili hiçbir hücresel düzeyde yayın olmaması ve Der p6 ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunması sebebiyle tez kapsamında yapılan deneyler hem literatüre katkı sağlayacak hem de yapılacak diğer deneyler için öncü niteliği taşıyacaktır.

Tez kapsamında gerçekleştirilen deneyler sonucunda Cup a1 ve Der p6 alerjenlerinin hücreler üzerindeki etkilerinin farklı olduğu ve benzer şekilde farklı kökenden gelen epitel hücrelerin

aynı alerjene farklı yanıtlar verdiği tespit edilmiştir. Cup a1 alerjeninin yüksek dozları bronş epitel hücrelerde nekroza sebep olurken nazal epitel hücreleri benzer şekilde etkilememektedir. Der p6 alerjen uyarımı sonrasında bronş epitel hücrelerde kaspaz genleri ile birlikte BMF gen ekspresyonunun artması hücre cevabının anoikis yolağı ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Ko-kültür çalışmalarında ise aktifleşen eozinofillerin epitel hücre cevabını etkilediği gözlemlenmiştir. Der p6 uyarımlarının BEAS-2B&EoL-1 ko-kültür sisteminde kaspaz gen ifadelerini arttırdığı tespit edilirken sinerjik etkiyi gözlemek için iki alerjen ile aynı anda uyarılan koşullarda kaspaz genlerinde daha yüksek bir artış tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar literatüre katkı sağlayacak ve polen ve HDM alerjenlerinin ölüm yolakları üzerine etkilerini araştırmak için öncü olacaktır. Özellikle Türkiye'nin doğal ikliminde bulunmayan fakat süs bitkisi olarak park ve bahçelere ekilen *Cupressus arizonica* bitkisinin polenin majör alerjeninin etkileri gözlemlendiğinde; peyzaj için ekimi yapılacak bitkilerin daha dikkatli araştırması gerekliliği göz önünde bulundurulmalıdır.



## 6. KAYNAKLAR:

1. Bateman, E., et al., *Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary*. The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology, 2008. **31**: p. 143-78.
2. Collaborators, G.B.D., et al., *Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019*. The Lancet, 2020. **396**.
3. Schatz, M. and L. Rosenwasser, *The allergic asthma phenotype*. J Allergy Clin Immunol Pract, 2014. **2**(6): p. 645-8; quiz 649.
4. Peters, S.P., *Asthma phenotypes: nonallergic (intrinsic) asthma*. J Allergy Clin Immunol Pract, 2014. **2**(6): p. 650-2.
5. Chipps, B.E., K.R. Murphy, and J. Oppenheimer, *2020 NAEPP Guidelines Update and GINA 2021—Asthma Care Differences, Overlap, and Challenges*. The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice, 2022. **10**(1, Supplement): p. S19-S30.
6. Komlósi, Z.I., et al., *Cellular and molecular mechanisms of allergic asthma*. Molecular Aspects of Medicine, 2022. **85**: p. 100995.
7. Heijink, I.H., et al., *Epithelial cell dysfunction, a major driver of asthma development*. Allergy, 2020. **75**(8): p. 1902-1917.
8. Xiao, C., et al., *Defective epithelial barrier function in asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **128**(3): p. 549-56.e1-12.
9. de Boer, W.I., et al., *Altered expression of epithelial junctional proteins in atopic asthma: possible role in inflammation*. Can J Physiol Pharmacol, 2008. **86**(3): p. 105-12.
10. Tan, H.T., et al., *Tight junction, mucin, and inflammasome-related molecules are differentially expressed in eosinophilic, mixed, and neutrophilic experimental asthma in mice*. Allergy, 2019. **74**(2): p. 294-307.
11. Green, R.H., et al., *Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial*. The Lancet, 2002. **360**(9347): p. 1715-1721.
12. Nakagome, K. and M. Nagata, *Involvement and Possible Role of Eosinophils in Asthma Exacerbation*. Frontiers in Immunology, 2018. **9**.
13. Wong, D., et al., *Eosinophils from patients with blood eosinophilia express transforming growth factor beta 1*. 1991.

14. Yasukawa, A., et al., *Eosinophils promote epithelial to mesenchymal transition of bronchial epithelial cells*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e64281.
15. Owen, W., et al., *Synthesis and release of leukotriene C4 by human eosinophils*. The Journal of Immunology, 1987. **138**(2): p. 532-538.
16. Bousquet, J., et al., *Allergic rhinitis*. Nature Reviews Disease Primers, 2020. **6**(1): p. 95.
17. Zuberbier, T., et al., *Economic burden of inadequate management of allergic diseases in the European Union: a GA(2) LEN review*. Allergy, 2014. **69**(10): p. 1275-9.
18. Burte, E., et al., *Long-term air pollution exposure is associated with increased severity of rhinitis in 2 European cohorts*. J Allergy Clin Immunol, 2020. **145**(3): p. 834-842.e6.
19. Rahim, N.A., et al., *Anti-Allergic Rhinitis Effects of Medicinal Plants and Their Bioactive Metabolites via Suppression of the Immune System: A Mechanistic Review*. Frontiers in Pharmacology, 2021. **12**.
20. Choi, B.S., *Is determining nasal eosinophil count and nasal eosinophil peroxidase concentration clinically useful in children with rhinitis?* Korean journal of pediatrics, 2019. **62**(9): p. 342-343.
21. Chen, Y., et al., *Elevated Levels of Activated and Pathogenic Eosinophils Characterize Moderate-Severe House Dust Mite Allergic Rhinitis*. Journal of Immunology Research, 2020. **2020**: p. 8085615.
22. Benson, M., R. Uddman, and L.O. Cardell, *Epithelial cells in nasal fluids from patients with allergic rhinitis: how do they relate to epidermal growth factor, eosinophils and eosinophil cationic protein?* Acta Otolaryngol, 2002. **122**(2): p. 202-5.
23. Warrington, R., F. Silviu-Dan, and T. Wong, *Drug allergy*. Allergy, Asthma & Clinical Immunology, 2018. **14**(2): p. 60.
24. Sicherer, S.H. and H.A. Sampson, *Food allergy*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2010. **125**(2, Supplement 2): p. S116-S125.
25. Golden, D.B.K., *Chapter 15 - Insect Allergy*, in *Middleton's Allergy Essentials*, R.E. O'Hehir, S.T. Holgate, and A. Sheikh, Editors. 2017, Elsevier. p. 377-393.
26. Gawchik, S.M., *Latex allergy*. Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine, 2011. **78**(5): p. 759-772.
27. Rudert, A. and J. Portnoy, *Mold allergy: is it real and what do we do about it?* Expert Review of Clinical Immunology, 2017. **13**(8): p. 823-835.

28. Taketomi, E.A., et al., *Pollen allergic disease: pollens and its major allergens*. Brazilian Journal of Otorhinolaryngology, 2006. **72**(4): p. 562-567.
29. Fassio, F. and F. Guagnini, *House dust mite-related respiratory allergies and probiotics: a narrative review*. Clinical and molecular allergy : CMA, 2018. **16**: p. 15-15.
30. Hossny, E., S. El-Sayed, and N. Abdul-Rahman, *Sensitivity to Five Types of House Dust Mite in a Group of Allergic Egyptian Children*. Pediatric allergy, immunology, and pulmonology, 2014. **27**(3): p. 133-137.
31. Portnoy, J., et al., *Environmental assessment and exposure control of dust mites: a practice parameter*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2013. **111**(6): p. 465-507.
32. Sidenius, K.E., et al., *Allergen cross-reactivity between house-dust mites and other invertebrates*. Allergy, 2001. **56**(8): p. 723-33.
33. Pang, S.L., et al., *IgE-binding residues analysis of the house dust mite allergen Der p 23*. Scientific Reports, 2021. **11**(1): p. 921.
34. Acevedo, N., J. Zakzuk, and L. Caraballo, *House Dust Mite Allergy Under Changing Environments*. Allergy, asthma & immunology research, 2019. **11**(4): p. 450-469.
35. Custovic, A. and A. Simpson, *DUST MITE*, in *Encyclopedia of Respiratory Medicine*, G.J. Laurent and S.D. Shapiro, Editors. 2006, Academic Press: Oxford. p. 54-59.
36. Zeytun, E., et al., *Sensitivity to House Dust Mites Allergens in Patients with Allergic Asthma in Erzincan Province, Turkey*. Turkiye Parazitoloj Derg, 2017. **41**(1): p. 34-41.
37. Ogi, K., et al., *Der p 1 Disrupts the Epithelial Barrier and Induces IL-6 Production in Patients With House Dust Mite Allergic Rhinitis*. Frontiers in Allergy, 2021. **2**.
38. Winton, H.L., et al., *Class specific inhibition of house dust mite proteinases which cleave cell adhesion, induce cell death and which increase the permeability of lung epithelium*. British journal of pharmacology, 1998. **124**(6): p. 1048-1059.
39. Simpson, R.J., et al., *Structural studies on the allergen Der p1 from the house dust mite Dermatophagoides pteronyssinus: similarity with cysteine proteinases*. Protein Seq Data Anal, 1989. **2**(1): p. 17-21.
40. Wan, H., et al., *Quantitative structural and biochemical analyses of tight junction dynamics following exposure of epithelial cells to house dust mite allergen Der p 1*. Clin Exp Allergy, 2000. **30**(5): p. 685-98.
41. King, C., et al., *Dust mite proteolytic allergens induce cytokine release from cultured airway epithelium*. J Immunol, 1998. **161**(7): p. 3645-51.

42. Trompette, A., et al., *Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein*. Nature, 2009. **457**(7229): p. 585-588.
43. Wang, H.Y., et al., *Evaluation of the Role of IgE Responses to Der p 1 and Der p 2 in Chinese House Dust Mite-Allergic Patients*. Int Arch Allergy Immunol, 2015. **167**(3): p. 203-10.
44. Waldron, R., et al., *Proteome and allergenome of the European house dust mite Dermatophagoides pteronyssinus*. PloS one, 2019. **14**(5): p. e0216171-e0216171.
45. Karaguzel, D., et al., *House dust mite-derived allergens effect on matrix metalloproteases in airway epithelial cells*. Experimental Lung Research, 2021. **47**(9): p. 436-450.
46. Xie, Z.-J., K. Guan, and J. Yin, *Advances in the clinical and mechanism research of pollen induced seasonal allergic asthma*. American journal of clinical and experimental immunology, 2019. **8**(1): p. 1-8.
47. Matsumura, Y., *Role of Allergen Source-Derived Proteases in Sensitization via Airway Epithelial Cells*. Journal of allergy, 2012. **2012**: p. 903659-903659.
48. Vinhas, R., et al., *Pollen proteases compromise the airway epithelial barrier through degradation of transmembrane adhesion proteins and lung bioactive peptides*. Allergy, 2011. **66**(8): p. 1088-98.
49. Bicakci, A. and A. Bilisik Tosunoglu, *Allergenic Pollen in Turkey*. Asthma Allergy Immunology, 2019.
50. Bicakci, A., et al., *Allerjenik Cupressaceae (servi, ardiç ağacı) polenlerinin Türkiye'deki dağılımları Allergenic Cupressaceae (cypress family) pollen concentrations in Turkey*. Asthma Allergy Immunol, 2010. **888**: p. 1-121.
51. Di Felice, G., et al., *Allergens of Arizona cypress (Cupressus arizonica) pollen: characterization of the pollen extract and identification of the allergenic components*. J Allergy Clin Immunol, 1994. **94**(3 Pt 1): p. 547-55.
52. Bobolea, I., et al., *Seasonal eosinophilic bronchitis due to allergy to Cupressus arizonica pollen*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2011. **106**(5): p. 448-9.
53. Aceituno, E., et al., *Molecular cloning of major allergen from Cupressus arizonica pollen: Cup a I*. Clin Exp Allergy, 2000. **30**(12): p. 1750-8.
54. Domínguez-Ortega, J., et al., *Prevalence of allergic sensitization to conifer pollen in a high cypress exposure area*. Allergy Rhinol (Providence), 2016. **7**(4): p. 200-206.

55. Röschmann, K., et al., *Timothy grass pollen major allergen Phl p 1 activates respiratory epithelial cells by a non-protease mechanism*. Clin Exp Allergy, 2009. **39**(9): p. 1358-69.
56. Makinde, T., R.F. Murphy, and D.K. Agrawal, *The regulatory role of TGF-beta in airway remodeling in asthma*. Immunol Cell Biol, 2007. **85**(5): p. 348-56.
57. Schwartz, L.M., *Autophagic Cell Death During Development – Ancient and Mysterious*. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2021. **9**.
58. McIlwain, D.R., T. Berger, and T.W. Mak, *Caspase functions in cell death and disease*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(4): p. a008656.
59. Mcilwain, D., T. Berger, and T.W. Mak, *Caspase functions in cell death and disease*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2015. **7** **4**.
60. Shi, Y., *Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view*. Protein science : a publication of the Protein Society, 2004. **13**(8): p. 1979-1987.
61. Chen, Y., et al., *Distinct Types of Cell Death and the Implication in Diabetic Cardiomyopathy*. Frontiers in Pharmacology, 2020. **11**.
62. Galluzzi, L., et al., *Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018*. Cell Death & Differentiation, 2018. **25**(3): p. 486-541.
63. Adeshakin, F.O., et al., *Mechanisms for Modulating Anoikis Resistance in Cancer and the Relevance of Metabolic Reprogramming*. Frontiers in Oncology, 2021. **11**.
64. Paoli, P., E. Giannoni, and P. Chiarugi, *Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2013. **1833**(12): p. 3481-3498.
65. Jan, Y., et al., *A mitochondrial protein, Bit1, mediates apoptosis regulated by integrins and Groucho/TLE corepressors*. Cell, 2004. **116**(5): p. 751-62.
66. Tait, S.W.G. and D.R. Green, *Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut*. Oncogene, 2008. **27**(50): p. 6452-6461.
67. Zhou, Y., et al., *Parthanatos and its associated components: Promising therapeutic targets for cancer*. Pharmacol Res, 2021. **163**: p. 105299.
68. Wang, Y., et al., *A nuclease that mediates cell death induced by DNA damage and poly(ADP-ribose) polymerase-1*. Science, 2016. **354**(6308).
69. Fatokun, A.A., V.L. Dawson, and T.M. Dawson, *Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities*. Br J Pharmacol, 2014. **171**(8): p. 2000-16.

70. Nailwal, H. and F.K.-M. Chan, *Necroptosis in anti-viral inflammation*. Cell Death & Differentiation, 2019. **26**(1): p. 4-13.
71. Dhuriya, Y.K. and D. Sharma, *Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death*. Journal of Neuroinflammation, 2018. **15**(1): p. 199.
72. Haun, F., et al., *Identification of a novel anoikis signalling pathway using the fungal virulence factor gliotoxin*. Nature Communications, 2018. **9**(1): p. 3524.
73. Chuang, C.Y., C.H. Chang, and Y.L. Huang, *Thioredoxin mediates remodeling factors of human bronchial epithelial cells upon interaction with house dust mite-stimulated eosinophils*. Inhal Toxicol, 2009. **21**(2): p. 153-67.
74. Hoffman, S.M., et al., *Endoplasmic reticulum stress mediates house dust mite-induced airway epithelial apoptosis and fibrosis*. Respiratory research, 2013. **14**(1): p. 141-141.
75. Conejero, L., et al., *Pollen-induced airway inflammation, hyper-responsiveness and apoptosis in a murine model of allergy*. Clin Exp Allergy, 2007. **37**(3): p. 331-8.
76. Zaffini, R., G. Gotte, and M. Menegazzi, *Asthma and poly(ADP-ribose) polymerase inhibition: a new therapeutic approach*. Drug design, development and therapy, 2018. **12**: p. 281-293.
77. Tezcan, G., et al., *The Ala allele at Val762Ala polymorphism in poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) gene is associated with a decreased risk of asthma in a Turkish population*. Journal of Asthma, 2009. **46**(4): p. 371-374.
78. Ozaydin, A., et al., *Investigation of poly (ADP-ribose) polymerase-1 genetic variants as a possible risk for allergic rhinitis*. Genetic Testing and Molecular Biomarkers, 2014. **18**(1): p. 57-61.
79. Sethi, G.S., V. Dharwal, and A.S. Naura, *Poly(ADP-Ribose)Polymerase-1 in Lung Inflammatory Disorders: A Review*. Frontiers in Immunology, 2017. **8**.
80. Oikonomou, N., et al., *Airway epithelial cell necroptosis contributes to asthma exacerbation in a mouse model of house dust mite-induced allergic inflammation*. Mucosal Immunology, 2021. **14**(5): p. 1160-1171.
81. Lamouille, S., J. Xu, and R. Derynck, *Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2014. **15**(3): p. 178-196.
82. Yang, J., et al., *Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2020. **21**(6): p. 341-352.

83. Dongre, A. and R.A. Weinberg, *New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2019. **20**(2): p. 69-84.
84. Lamouille, S., J. Xu, and R. Derynck, *Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2014. **15**(3): p. 178-196.
85. Gonzalez, D.M. and D. Medici, *Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition*. Science signaling, 2014. **7**(344): p. re8-re8.
86. Wang, Y., et al., *The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis*. Curr Cancer Drug Targets, 2013. **13**(9): p. 963-972.
87. Redington, A.E., et al., *Transforming growth factor-beta 1 in asthma. Measurement in bronchoalveolar lavage fluid*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **156**(2 Pt 1): p. 642-7.
88. Anderson, E.D., M.E. Alishahedani, and I.A. Myles, *Epithelial-Mesenchymal Transition in Atopy: A Mini-Review*. Front Allergy, 2020. **1**.
89. Zou, Y., et al., *House dust mite induces Sonic hedgehog signaling that mediates epithelial-mesenchymal transition in human bronchial epithelial cells*. Molecular medicine reports, 2019. **20**(5): p. 4674-4682.
90. Heijink, I.H., et al., *House dust mite-promoted epithelial-to-mesenchymal transition in human bronchial epithelium*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010. **42**(1): p. 69-79.
91. Johnson, J.R., et al., *Chronic respiratory aeroallergen exposure in mice induces epithelial-mesenchymal transition in the large airways*. PloS one, 2011. **6**(1): p. e16175-e16175.
92. Li, X., et al., *TGF- $\beta$ 1 Induces Epithelial-Mesenchymal Transition of Chronic Sinusitis with Nasal Polyps through MicroRNA-21*. Int Arch Allergy Immunol, 2019. **179**(4): p. 304-319.
93. Shin, H.W., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 mediates nasal polypogenesis by inducing epithelial-to-mesenchymal transition*. Am J Respir Crit Care Med, 2012. **185**(9): p. 944-54.
94. Fischer, D.S., et al., *Single-cell RNA sequencing reveals ex vivo signatures of SARS-CoV-2-reactive T cells through 'reverse phenotyping'*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 4515.

95. Kumar, R., et al., *Type I Interferons Suppress Anti-parasitic Immunity and Can Be Targeted to Improve Treatment of Visceral Leishmaniasis*. Cell Rep, 2020. **30**(8): p. 2512-2525.e9.
96. Poreba, M., et al., *Highly sensitive and adaptable fluorescence-quenched pair discloses the substrate specificity profiles in diverse protease families*. Scientific Reports, 2017. **7**(1): p. 43135.
97. Neilands, J., et al., *Bacterial profiles and proteolytic activity in peri-implantitis versus healthy sites*. Anaerobe, 2015. **35**(Pt A): p. 28-34.
98. Karaguzel, D., et al., *House dust mite-derived allergens effect on matrix metalloproteases in airway epithelial cells*. Exp Lung Res, 2021. **47**(9): p. 436-450.
99. Kreft, M.E., et al., *The characterization of the human nasal epithelial cell line RPMI 2650 under different culture conditions and their optimization for an appropriate in vitro nasal model*. Pharm Res, 2015. **32**(2): p. 665-79.
100. Chacon, E., D. Acosta, and J.J. Lemasters, *9 - Primary Cultures of Cardiac Myocytes as In Vitro Models for Pharmacological and Toxicological Assessments*, in *In Vitro Methods in Pharmaceutical Research*, J.V. Castell and M.J. Gómez-Lechón, Editors. 1997, Academic Press: San Diego. p. 209-223.
101. Vaghela, K., D. Bhatt, and M. Zaveri, *PHYTOPHARMACOGNOSTICAL STUDY OF SOME SELECTED ANTITUBERCULOSIS PLANTS AND STUDY OF ITS CYTOTOXICITY SCREENING USING VERO CELL LINE*. 2021.
102. Tipton, D.A., et al., *In vitro cytotoxic and anti-inflammatory effects of myrrh oil on human gingival fibroblasts and epithelial cells*. Toxicol In Vitro, 2003. **17**(3): p. 301-10.
103. Kumar, P., A. Nagarajan, and P.D. Uchil, *Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay*. Cold Spring Harb Protoc, 2018. **2018**(6).
104. Forest, V., et al., *Adsorption of lactate dehydrogenase enzyme on carbon nanotubes: how to get accurate results for the cytotoxicity of these nanomaterials*. Langmuir, 2015. **31**(12): p. 3635-43.
105. Gao, J., et al., *Downregulation of GSDMD attenuates tumor proliferation via the intrinsic mitochondrial apoptotic pathway and inhibition of EGFR/Akt signaling and predicts a good prognosis in non-small cell lung cancer*. Oncol Rep, 2018. **40**(4): p. 1971-1984.



106. Yen, T.J. and H.I. Lin, *7 - Mediated differentiation of stem cells by engineered semiconducting silicon nanowires*, in *Semiconducting Silicon Nanowires for Biomedical Applications*, J.L. Coffey, Editor. 2014, Woodhead Publishing. p. 118-143.
107. Hussain, H., et al., *Determination of cell viability using acridine orange/propidium iodide dual-spectrofluorometry assay*. *Cogent Food & Agriculture*, 2019. **5**(1): p. 1582398.
108. Woock, A.E., et al., *Serine residues 726 and 780 have nonredundant roles regulating STAT5a activity in luminal breast cancer*. *Sci Rep*, 2021. **11**(1): p. 13506.
109. Le, A., et al., *MiR-144-induced KLF2 inhibition and NF-kappaB/CXCR1 activation promote neutrophil extracellular trap-induced transfusion-related acute lung injury*. *J Cell Mol Med*, 2021. **25**(14): p. 6511-6523.
110. Lee, S., et al., *Effect of Nephilysin Inhibition for Ischemic Mitral Regurgitation after Myocardial Injury*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(16).
111. Haun, F., et al., *Identification of a novel anoikis signalling pathway using the fungal virulence factor gliotoxin*. *Nat Commun*, 2018. **9**(1): p. 3524.
112. Que, Z.J., et al., *Jinfukang regulates integrin/Src pathway and anoikis mediating circulating lung cancer cells migration*. *J Ethnopharmacol*, 2021. **267**: p. 113473.
113. Chen, S. and J. Schoen, *Air-liquid interface cell culture: From airway epithelium to the female reproductive tract*. *Reprod Domest Anim*, 2019. **54 Suppl 3**: p. 38-45.
114. Heijink, I.H., et al., *Characterisation of cell adhesion in airway epithelial cell types using electric cell-substrate impedance sensing*. *Eur Respir J*, 2010. **35**(4): p. 894-903.
115. Anderson, E.D., M.E. Alishahedani, and I.A. Myles, *Epithelial-Mesenchymal Transition in Atopy: A Mini-Review*. *Frontiers in allergy*, 2020. **1**: p. 628381.
116. Srinivasan, B., et al., *TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems*. *Journal of laboratory automation*, 2015. **20**(2): p. 107-126.
117. Schlinkert, P., et al., *The oxidative potential of differently charged silver and gold nanoparticles on three human lung epithelial cell types*. *Journal of nanobiotechnology*, 2015. **13**: p. 1-1.
118. Lee, Y.Z., et al., *Blockade of Eosinophil-Induced Bronchial Epithelial-Mesenchymal Transition with a Geranyl Acetophenone in a Coculture Model*. *Front Pharmacol*, 2017. **8**: p. 837.

119. Al-Rabia, M.W., et al., *Membrane receptor-mediated apoptosis and caspase activation in the differentiated EoL-1 eosinophilic cell line*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(6): p. 1045-55.
120. Yoon, J., et al., *Eosinophil Activation by Toll-Like Receptor 4 Ligands Regulates Macrophage Polarization*. Front Cell Dev Biol, 2019. **7**: p. 329.
121. Engvall, E. and P. Perlmann, *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G*. Immunochemistry, 1971. **8**(9): p. 871-4.
122. Mills, P.R., R.J. Davies, and J.L. Devalia, *Airway epithelial cells, cytokines, and pollutants*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **160**(5 Pt 2): p. S38-43.
123. Waritani, T., et al., *An ELISA protocol to improve the accuracy and reliability of serological antibody assays*. MethodsX, 2017. **4**: p. 153-165.
124. Pichler, U., et al., *Pectate lyase pollen allergens: sensitization profiles and cross-reactivity pattern*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0120038.
125. Comer, D.M., J.S. Elborn, and M. Ennis, *Comparison of nasal and bronchial epithelial cells obtained from patients with COPD*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e32924.
126. Williams, M.T.S., et al., *Bronchial epithelial cell lines and primary nasal epithelial cells from cystic fibrosis respond differently to cigarette smoke exposure*. Journal of Cystic Fibrosis, 2016. **15**(4): p. 467-472.
127. Meyer, C.H., et al., *Comparison of the levels of the major allergens Der p I and Der p II in standardized extracts of the house dust mite, Dermatophagoides pteronyssinus*. Clin Exp Allergy, 1994. **24**(11): p. 1041-8.
128. Dabbaghzadeh, A., et al., *House Dust Mite Allergen Levels of Der p1 and Der f1 in Houses of Asthmatic Children*. Journal of Pediatrics Review, 2020. **8**: p. 267-274.
129. Demoly, P. and M.A. Calderon, *Dosing and efficacy in specific immunotherapy*. Allergy, 2011. **66 Suppl 95**: p. 38-40.
130. Ko, H., et al., *Protein kinase casein kinase 2-mediated upregulation of N-cadherin confers anoikis resistance on esophageal carcinoma cells*. Mol Cancer Res, 2012. **10**(8): p. 1032-8.
131. Kiraz, Y., et al., *Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis*. Tumour Biol, 2016. **37**(7): p. 8471-86.
132. Lin, C.H., Y.C. Hong, and S.H. Kao, *Aeroallergen Der p 2 induces apoptosis of bronchial epithelial BEAS-2B cells via activation of both intrinsic and extrinsic pathway*. Cell Biosci, 2015. **5**: p. 71.

133. Baker, S.F., et al., *Peptidase allergen Der p 1 initiates apoptosis of epithelial cells independently of tight junction proteolysis*. Mol Membr Biol, 2003. **20**(1): p. 71-81.
134. Chan, T.K., et al., *House dust mite-induced asthma causes oxidative damage and DNA double-strand breaks in the lungs*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2016. **138**(1): p. 84-96.e1.
135. Chan, T.K., et al., *Aeroallergens Induce Reactive Oxygen Species Production and DNA Damage and Dampen Antioxidant Responses in Bronchial Epithelial Cells*. J Immunol, 2017. **199**(1): p. 39-47.
136. Conejero, L., et al., *Pollen-induced airway inflammation, hyper-responsiveness and apoptosis in a murine model of allergy*. Clinical & Experimental Allergy, 2007. **37**(3): p. 331-338.
137. Schmelzle, T., et al., *Functional role and oncogene-regulated expression of the BH3-only factor Bmf in mammary epithelial anoikis and morphogenesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(10): p. 3787-3792.
138. Matsumura, Y., *Role of Allergen Source-Derived Proteases in Sensitization via Airway Epithelial Cells*. J Allergy (Cairo), 2012. **2012**: p. 903659.
139. Künzi, L. and G.E. Holt, *Cigarette smoke activates the parthanatos pathway of cell death in human bronchial epithelial cells*. Cell Death Discovery, 2019. **5**(1): p. 127.
140. Johnson, J.R., et al., *Chronic respiratory aeroallergen exposure in mice induces epithelial-mesenchymal transition in the large airways*. PLoS One, 2011. **6**(1): p. e16175.
141. Mohit Kumar, J., et al., *E-cadherin represses anoikis resistance in sarcomas through both signaling and mechanical mechanisms*. bioRxiv, 2018: p. 347815.
142. Li, Y., L. Sun, and Y. Zhang, *Programmed cell death in the epithelial cells of the nasal mucosa in allergic rhinitis*. International Immunopharmacology, 2022. **112**: p. 109252.
143. Lee, Y.-J., et al., *Apoptosis and necroptosis-inducing effects of arctigenin on nasal septum carcinoma RPMI-2650 cells in 2D and 3D culture*. Molecular & Cellular Toxicology, 2020. **16**(1): p. 1-11.
144. Salib, R.J., *Transforming growth factor-beta gene expression studies in nasal mucosal biopsies in naturally occurring allergic rhinitis*. Ann R Coll Surg Engl, 2007. **89**(6): p. 563-73.
145. Stewart, C.E., et al., *Evaluation of differentiated human bronchial epithelial cell culture systems for asthma research*. J Allergy (Cairo), 2012. **2012**: p. 943982.

146. He, R.W., et al., *Optimization of an air-liquid interface in vitro cell co-culture model to estimate the hazard of aerosol exposures*. J Aerosol Sci, 2021. **153**: p. 105703.
147. Pozzoli, M., et al., *Application of RPMI 2650 nasal cell model to a 3D printed apparatus for the testing of drug deposition and permeation of nasal products*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2016. **107**: p. 223-233.
148. Ishihara, K., et al., *Differentiation of eosinophilic leukemia EoL-1 cells into eosinophils induced by histone deacetylase inhibitors*. Life Sci, 2007. **80**(13): p. 1213-20.
149. Kaneko, M., et al., *Mechanism for the differentiation of EoL-1 cells into eosinophils by histone deacetylase inhibitors*. Int Arch Allergy Immunol, 2007. **143 Suppl 1**: p. 28-32.
150. Saito, H., et al., *Effect of butyric acid on induction of differentiation into eosinophil-like cells in human eosinophilic leukemia cells, EoL-1 cell line: possible role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as an autocrine differentiating factor*. Int Arch Allergy Immunol, 1993. **100**(3): p. 240-7.
151. Salib, R.J., L.C. Lau, and P.H. Howarth, *The novel use of the human nasal epithelial cell line RPMI 2650 as an in vitro model to study the influence of allergens and cytokines on transforming growth factor- $\beta$  gene expression and protein release*. Clinical & Experimental Allergy, 2005. **35**(6): p. 811-819.

## **EKLER**

### **EK 1 – Tezden Türetilmiş Bildiriler**

- EB. Doğan, BD. Koçkaya, BE. Saraç, B. Kılıç, H. Akel Bilgiç, Ç. Karaaslan, Bronşiyal ve Nazal Epitel Hücrelerde Der p6 ve Cup a1 Alerjenlerinin Farklı Hücre Ölüm Yolakları Üzerindeki Etkileri, EAACI 2023, Hamburg/Almanya (Flash Talk)

## **EK 2 – Tez Orjinallik Raporu**