

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**ALLERJİK RİNİTLİ HASTALARDA ALLERJEN
İMMÜNOTERAPİSİNİN REGÜLATÖR B HÜCRELER
ÜZERİNE ETKİSİ**

MEHTAP ÜLKER

**DANIŞMAN
DOÇ.DR. Umut Can Küçüksezer**

**İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI
İMMÜNOLOJİ**

İSTANBUL-2021

TEZ ONAYI

BEYAN

İTHAF

Annem, babam, kardeşim ve sevgili kızıma ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın planlanmasında büyük emeği ve katkısı olan, gerek bilimsel katkıları gerekse yaşam görüşü ile bana yol gösteren, kullandığı her cümlelerin hayatıma kattığı önemini asla unutmayacağım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Ali ŞENGÜL'e, çalışmanın her basamağında değerli görüşlerini esirgemeyen çalışma süresi boyunca değerli bilgilerini bizlerle paylaşan ve katkıda bulunan çok kıymetli hocam Prof. Dr. Günnur DENİZ'e, benden biran olsun yardımlarını esirgemeyen Abdullah Yılmaz'a, çalışmanın klinik verileri ve hasta seçimleri ile klinik datalarda bana yardımcı olan Doç. Dr. Semra DEMİR ve Uzm. Dr. Nida ÖZTOP'a, çalışmam sırasında sadece bilgi birikimiyle değil anlayışı ve güler yüzüyle destek olan Prof. Dr. Elif AYDINER'e, çalışmam süresi boyunca bana anlayış ve sabır göstererek katlanan ve hayatımın her anında yanımda olan sevgili kızım Naz'a, desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen canım ailem annem, babam ve kardeşime, ve tabi ki çalışmanın planlanması, işleyişi ve gerçekleştirilmesinde tüm zorlukları benimle göğüsleyen bana katlanan ve yardımlarını esirgemeyen, bilimsel bilgisi ve istatistik bilgisi ile bu çalışmaya çok büyük katkılarda bulunan sevgili danışman hocam Doç. Dr. Umut Can KÜÇÜKSEZER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 36719

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xi
ÖZET	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Doğal Bağışıklık Sistemi Hücreleri ve İmmün Tolerans	4
2.1.1. Antijen Sunucu Hücreler.....	4
2.1.2. Mast Hücreleri.....	5
2.1.3. Bazofiller.....	6
2.1.4. Programlanmış Ölüm Reseptörü (PD-1).....	6
2.1.5. Doğal Öldürücü Hücreler (NK Hücreleri)	6
2.1.6. Doğal Lenfoid Hücreler (ILC)	7
2.2. Kazanılmış Bağışıklık Sistemi Hücreleri ve İmmün Tolerans	7
2.2.1. Regülatör T Hücreleri	7
2.2.1.1. Doğal Regülatör T Hücreleri.....	8
2.2.1.2. Çevresel / Uyarılabilir Regülatör T Hücreleri.....	9
2.2.2. Regülatör B Hücreleri	10
2.2.2.1. CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD27 ^{int} CD38 ⁺ B Hücreleri (Plazmablast)	13
2.2.2.2. CD24 ^{hi} CD27 ⁺ B Hücreleri (B10)	13

2.2.2.3. CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD38 ^{hi} Regulator B Hücreleri	14
2.2.2.4. Br1 Hücreleri.....	14
2.2.2.5. Regulator B Hücrelerinin Baskılama Mekanizmaları	15
2.3. Aşırı Duyarlılık Reaksiyonları.....	16
2.3.1. Tip I Aşırı Duyarlılık Reaksiyonları	16
2.3.2. Tip II Aşırı Duyarlılık Reaksiyonları.....	17
2.3.3. Tip III Aşırı Duyarlılık Reaksiyonları	17
2.3.4. Tip IV Aşırı Duyarlılık Reaksiyonları	17
2.4. Allerjik İnflamasyon	18
2.4.1. Allerji Tarihçesi	18
2.5. Rinit.....	21
2.5.1. İdiyopatik Rinit	21
2.5.2. Enfeksiyöz Rinit.....	21
2.5.3. Mesleksel Rinit	21
2.5.4. Hormonel Rinit	21
2.5.5. İlaça Bağlı Rinit	22
2.5.6. Eozinofili ile Seyreden Nonallerjik Rinit Sendromu (Nonallergic Rhinitis with Eosinophilia Syndrome; NARES)	22
2.5.7. Fiziksel ve Kimyasal Faktörlere Bağlı Nazal Semptomlar	22
2.5.8. Besin Tarafından Tetiklenen Rinit.....	22
2.5.9. Atrofik Rinit.....	22
2.5.10. Emosyonel Rinit.....	22
2.5.11. Yaşlılık Riniti.....	23
2.5.12. Allerjik Rinit	23
2.6. Allerjene Özgü İmmünoterapi (AİT).....	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1. Çalışma Grubu	25
3.2. Hasta ve Kontrol Gruplarının Seçimi	25
3.3. Periferik Kan Örneklerinin Alınması.....	27

3.4. Kan Örneklerinin Laboratuvara Transferi	27
3.5. Akan Hücre Ölçer ile Regülatör T ve B Hücre Fenotiplerinin Belirlenmesi.....	28
3.6. ELISA ile Allerjene Özgü IgE ve IgG4 Değerlerinin Belirlenmesi	32
3.6.1. Allerjene Özgü IgG4 ELISA.....	32
3.7. İstatistiksel Değerlendirme	34
4. BULGULAR.....	35
4.1. Klinik ve Laboratuvar Bulgular	35
4.1.1. Akan Hücre Ölçer Bulguları	37
4.1.1.1. CD3 ⁺ T Hücre Oranları	37
4.1.1.2. CD3 ⁺ CD4 ⁺ Yardımcı T Hücre Oranları	38
4.1.1.3. CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ Regülatör T Hücre Oranları	39
4.1.1.4. CD19 ⁺ B Hücre Oranları.....	39
4.1.1.5. CD19 ⁺ CD25 ⁺ CD71 ⁺ CD73 ⁻ Regülatör B Hücre Oranları	40
4.1.1.6. CD19 ⁺ CD24 ⁺ CD27 ⁺ Regülatör B Hücre Oranları	41
4.1.1.7. CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD38 ^{hi} Regülatör B Hücre Oranları.....	42
4.1.1.8. Çalışma Gruplarında Ev Tozu Akarına Özgü IgG4 Düzeyleri	43
5. TARTIŞMA	44
KAYNAKLAR	49
HAM VERİLER	61
FORMLAR	62
ETİK KURUL KARARI	63
PATENT HAKKI İZNİ	64
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	65
ÖZGEÇMİŞ	66

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2-1: Farede Regülatör B Hücrelerinin Sınıflandırılması	12
Tablo 2-2: İnsanda Regülatör B Hücrelerinin Sınıflandırılması.....	13
Tablo 2-3: Aşırı Duyarlılık Reaksiyonları	18
Tablo 3-1: Lenfositlerin İmmün Fenotiplenmesinde Kullanılan Monoklonal Antikorlar	28
Tablo 3-2: Fenotiplendirilen Hücre Yüzey Antijenleri ve Görevleri	31
Tablo 4-1: Çalışmaya Katılan Hastalara Ait Demografik Veriler	35
Tablo 4-2: Allerjik Rinitli Hastaların AİT Öncesi ve Çalışma Sırasında Tespit Edilen Klinik Skorları ve Laboratuvar Değerleri	36

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Dendritik Hücrelerin İmmün Yanıt veya İmmün Toleransa Katılımları	5
Şekil 3-1: Akan Hücre Ölçer ile Veri Analizi.....	30
Şekil 4-1: Sağlıklı Kontrol, AR ve AİT Gruplarının CD3 ⁺ T Hücre Dağılımları.....	37
Şekil 4-2: Sağlıklı Kontrol, AR ve AİT Gruplarının CD3 ⁺ CD4 ⁺ T Hücre Dağılımları .	38
Şekil 4-3: Sağlıklı Kontrol, AR ve AİT Gruplarına Ait CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ T Hücre Dağılımları	39
Şekil 4-4: Sağlıklı Kontrol, AR ve AİT Gruplarının CD3 ⁻ CD19 ⁺ B hücre Değerleri	40
Şekil 4-5: Sağlıklı Kontrol, AR ve AİT Gruplarında CD19 ⁺ CD25 ⁺ CD71 ⁺ CD73 ⁻ Regülatör B Hücre Dağılımları.....	41
Şekil 4-6: Sağlıklı Kontrol, AR ve AİT Gruplarının CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD27 ⁺ Regülatör B Hücre Değerleri.....	41
Şekil 4-7: CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD38 ^{hi} Regülatör B Hücrelerinin Sağlıklı kontrol, AR ve AİT Grupları Arasında Karşılaştırılması	42
Şekil 4-8: AİT, AR ve Sağlık Kontrol Gruplarında SIgG4 Tespitinde ELISA Plak Görüntüsü.....	43
Şekil 4-9: Sağlıklı Kontrol, AR ve AİT Gruplarının Ev Tozu Akarına Özgü IgG4 Dağılımları	43

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AH: Antihistaminik

AİT: Allerjene özgü immünoterapi

AR: Allerjik rinit

ASH: Antijen sunucu hücre

Breg: Regülatör B hücresi

CD: Farklılaşma antijeni (Cluster of differentiation)

d1: Dermatophogoides pteronyssinus

d2: Dermatophagoides farinae

DH: Dendritik hücre

EDTA: Etilendiamin tetra asetik asit

ELİSA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

Ig: İmmün globülin

IL: İnterlökin

INS: İntranasal kortikosteroid

LTRA: Lökotrien reseptör antagonisti

MHC: Majör doku uyumluluk kompleksi

NK: Doğal öldürücü hücre

NKT: Doğal öldürücü T hücre

SCIT: Sub-kutan immünoterapi

sIgE: Allerjene özgü İmmün globülin E

sIgG4: Allerjene özgü İmmün globülin G4

SLIT: Sub-lingual immünoterapi

TGF: Transforme edici büyüme faktörü

Th: Yardımcı T h creti

Treg: Regülatör T h creti

TTS-6: Total Semptom Skoru-6

VAS: Visual Analog Skalası

ÖZET

Ülker, M. (2021). Allerjik Rinitli Hastalarda Allerjen İmmünoterapisinin Regülatör B Hücreler Üzerine Etkisi. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İmmünoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi. İstanbul.

Allerjik rinit (AR), IgE aracılı allerjik inflamasyon hastalığı olup tedavisinde farmakoterapi ve allerjene özgü immünoterapi (AİT) kullanılmaktadır. AİT mekanizmaları tam bilinmemekle birlikte, son yıllarda, regülatör T hücreleri (Treg) dışında başka baskılayıcı hücre alt gruplarının da immün tolerans katıldığını ortaya çıkarılmıştır. Farklı alt gruplarıyla regülatör B hücrelerinin (Breg) farklı hastalıkların patogeneze katıldığı öne sürülmektedir. AİT ile Breg hücre ilişkisini kanıtlamaya yönelik çalışmalar mevcut ama yetersizdir.

Bu çalışmanın amacı, AİT görmüş, ev tozu akarı duyarlı allerjik rinit (AR) hastalarında, AİT'e cevaben uyarılmış periferik kan regülatör B hücre alt gruplarından $CD19^+CD25^+CD71^+CD73^-$, $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$ ve $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$ oranlarını saptamak, bu oranları en az 2 yıl AİT görmüş AR hastaları, AR tanısı almış ancak AİT almamış hastalar ve sağlıklı kontrollerle karşılaştırmaktır. Ayrıca, AİT sonucu uyarıldığı bilinen ve Tr1 hücreleri olarak adlandırılan $CD3^+CD4^+CD25^+CD127^-$ Treg hücre oranlarını Breg hücre oranlarıyla karşılaştırmaktır. İlgili hücre grupları, hastalar ve sağlıklı kontrollerden alınan periferik kan örneklerinden akan hücre ölçer kullanımı ile saptanmıştır. Aynı grupların serum örneklerinden ev tozu akarına özgü IgG4 düzeyleri, Elisa yöntemi ile tespit edilmiştir.

Sonuçlarımız, $CD19^+CD25^+CD71^+CD73^-$ Breg hücre grubunun AİT alan hastalarda arttığını, en düşük oranın ise sağlıklı kontrol grubunda olduğunu göstermiştir. AR hastalarında yüksek gözlenen $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$ Breg hücre oranının AİT sonrası azaldığı gözlenmiştir. Ev tozu akarına özgül IgG4 oranları, AİT sonrası AR grubunda, AR hastaları ve sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$).

Bu çalışma, $CD19^+CD25^+CD71^+CD73^-$ Breg grubunun AİT sonucunda artışını göstermiş olup, $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$ grubunun AR hastalarında artışı ise bu grubun AR'yi düzenlemeye çalıştığını düşündürmektedir. AİT sonucu artmış IgG4, Breg hücrelerinin immün regülasyondaki rollerini desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Allerjik rinit, allerjen, B regülatör hücre, immünoterapi, immün regülasyon

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 36719

ABSTRACT

Ulker, M. (2021). Effects of allergen specific immunotherapy on B regulatory cells of patients with allergic rhinitis. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Immunology. Doctoral Thesis. İstanbul.

Allergic rhinitis (AR) is an IgE-mediated allergic inflammatory disease. Conventional pharmacotherapy and allergen-specific immunotherapy (AIT) is utilized for cure of AR. The mechanism of AIT hasn't been fully revealed. Regulatory T cells (Treg) contribution in immune tolerance is well known and regulatory B cell (Breg) subsets contribution in a number of diseases has just been revealed. Studies tried to establish a link between AIT and Bregs, however, still with lacking robust evidence.

This study aimed to investigate Breg subsets in peripheral blood of AR patients following AIT. Breg subpopulations ($CD19^+CD73^-CD25^+CD71^+$, $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$ and $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$) were evaluated by flow cytometry in house dust mite (HDM) sensitized AR patients with an initial diagnose, AR patients following AIT of minimum 24 months and healthy individuals. In addition, dominance of regulatory T (Treg) cells known as Tr1 ($CD3^+CD4^+CD25^+CD127^-$), which are already known to be stimulated following AIT were compared with that of Breg subsets. HDM specific IgG4 from sera samples were measured by Elisa.

The induction of $CD19^+CD25^+CD71^+CD73^-$ Breg cell subset in patients following AIT was reported, while the increased ratios of $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$ Breg subset was noted in AR patients prior to AIT. HDM specific IgG4 was induced following the course of AIT.

The induction of $CD19^+CD25^+CD71^+CD73^-$ Breg cell subset following AIT and increased levels of $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$ subset in AR patients could reveal differential contribution of Bregs in various stages of AR pathogenesis. Induction of IgG4 strongly supports the contribution of Bregs in success of AIT.

Keywords: Allergic rhinitis, allergen, B regulatory cell, immunotherapy, immune regulation

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project no: 36719

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Allerjik rinit (AR), IgE aracılı bir allerjik inflamasyon hastalığı olup tedavisinde diğer allerjik hastalıklar gibi, farmakoterapi ve allerjene özgü immünoterapi (AİT) kullanılmaktadır. AİT'i farmakoterapiden ayıran en önemli nokta, tedavinin tamamlanmasının ardından uzun süreli allerjen yanıtıslılığının sağlanması, diğer bir deyişle hastalığın iyileşmesidir. Uzun yıllardır kullanılmakta olan AİT'nin mekanizmaları henüz tam açığa kavuşmamış olmakla beraber allerjene özgü regülatör T hücrelerinin (Treg) oluşması ve Treg kaynaklı IL-10, TGF- β ve IL-35 gibi sitokinler aracılığıyla sağlanan, allerjene özgü, aktif ve baskılayıcı bir yanıtın AİT sonucu ortaya çıktığı bilinmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar başka baskılayıcı hücre gruplarının da immün düzenlenmeye katıldığını ortaya çıkartmıştır. Regülatör B hücreleri (Breg), farklı alt gruplarıyla farklı hastalıkların patogeneğinde roller oynamaktadır. AİT ile Breg hücrelerinin ilişkisini kanıtlamaya yönelik çalışmalar mevcut ama yetersizdir.

Bu çalışma, AİT görmüş, ev tozu akarına duyarlı allerjik rinit hastalarında, AİT'e cevaben uyarılmış periferik kan regülatör B hücre alt gruplarının (CD19⁺CD73⁻CD25⁺CD71⁺, CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ ve CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}), oranlarını saptamayı, bu oranları AR tanısı almış ve henüz AİT başlamamış hastalar ve allerjik hastalıklar açısından sağlıklı olduğu bilinen bireylerle karşılaştırmayı amaçlamaktadır. Ayrıca, AİT ile zaten uyarıldığı bilinen ve Tr1 hücreleri olarak adlandırılan (CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁻) Treg hücre oranlarının Breg hücre oranlarıyla korelasyonunu incelemektir. İlgili hücre grupları, hastalar ve sağlıklı kontrollerden alınan periferik kan örneklerinden, akan hücre ölçer kullanımı ile saptanmıştır. Yine allerjik reaksiyonlarda koruyucu etki gösteren ve AİT sonrası arttığı bilinen IgG4 seviyeleri de hem AİT öncesi hem de AİT sonrası hastalarda analiz edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Bağıışıklık sistemi, konağın enfeksiyöz ajanlar ve kansere karşı korunması görevini üstlenmektedir. Birçok doku, hücre ve onların ürünleriyle, patojenlere karşı özgül veya özgül olmayan yanıtlar verilmektedir. Buna karşın, aynı sistemin kendisi patolojik ve zarar verici bağıışık yanıt ile doku hasarına ve hastalıklara da yol açabilmektedir. Bu nedenle sağlıklı bir bağıışıklık sistemi hassas bir denge içerisinde çalışmalıdır. Bu dengenin sağlanabilmesi için organizmanın kendinden olan (self) ile olmayanı (non-self) ayırt edebilmesi gereklidir. Bağıışıklık sisteminin bu hassas dengesinin altında immün tolerans yatmaktadır. Bu dengenin yanıtsızlık yönünde bozulması, immün yetersizlikler ve kanserleri ortaya çıkartabilirken, aşırı immün yanıtlar ise otoimmün hastalıklar ve allerjik hastalıklar ile sonuçlanabilir [1].

Sağlıklı bir bağıışıklık sisteminin, doğal ve kazanılmış bağıışıklık adı verilen iki farklı kolu var olup birbirleriyle tam bir uyum içerisinde çalışmaları gereklidir. Doğal bağıışıklıkta epitelyal bariyerler, dentritik hücreler, fagositler, doğal öldürücü (NK) hücreler, monosit ve makrofajlar, kompleman sistemi rol alırken, kazanılmış bağıışıklıkta ise T ve B lenfositleri ve bunların ürettiği moleküller yer alır. Hem doğal hem de kazanılmış bağıışıklık sistemi hücreleri, yabancı veya kendinden olanı ayırt edebilir. Bunun için her iki sistemde de hücrelerin oluşumundan olgunlaşıp perifere ve dokulara geçişine kadar bir seri eğitim var olup, sonunda hücreler kendinden olan ile olmayanı ayırt edebilir hale gelirler. Hücrelerin kendinden olana ve yabancı fakat zararsız antijenlere yanıtsızlık hali olan immün tolerans ise bu eğitimin ardından açığa çıkmaktadır [2].

İmmün tolerans, merkezi ve çevresel olmak üzere iki başlıkla incelenebilir. T hücreleri timusta ve B hücreleri kemik iliğinde gelişirken, hem öz antijenleri hem de yabancı antijenleri tanıyabilen reseptörlere sahiptirler. Antijeni tanımak için T hücre yüzeyinde T hücre reseptörü (TCR), B hücrelerin yüzeyinde ise B hücre reseptörü (BCR) vardır. Antijen, antijen sunucu hücreler (ASH) tarafından sunulur. Antijen sunumunda majör doku uyumluluk kompleksi (MHC) molekülleri görevlidir. MHC moleküllerinden Sınıf I ve Sınıf II molekülü antijen sunumunda görev alır. Antijenler,

MHC Sınıf I ile CD8⁺ T lenfositlerine, MHC Sınıf II ile CD4⁺ T lenfositlere sunulurlar. Bu antijenlerin lenfositlere sunumunda kuvvetli etkileşim olursa, bu hücreler apoptoz ile ortadan kaldırılırlar. Bu işlem, negatif seçim olarak adlandırılır. Antijenlerin lenfositlerle kuvvetle etkileşime girmesi, ya yüksek miktarda o antijenlerin bulunması ya da kuvvetli afinite ile bağlanmasıyla olur. Bunlar da genellikle plazma proteinleri ve hücre proteinleridir. Bu tolerans mekanizmasında negatif seçim, merkezi toleransı oluşturur.

Bazen negatif seçimde hatalar olabilir ve öz antijenler periferik kaçabilir. Periferik çıkan bazı öz antijen yanıtı hücreler periferik tolerans ile kontrol altına alınırken bazen de bu hücreler regülatör hücrelere dönüşürler. Periferik toleransta periferik çıkan öz antijene yanıtı hücreler ya anergi (cevapsızlık) ile susturulur, ya da hücre ölümü ile ortadan kaldırılır. T hücrelerinin efektör hücre haline gelmesi veya bellek hücrelerine dönüşebilmesi için iki sinyal gerekmektedir. Birinci sinyal antijen sunumu, ikincisi ise, ikincil sinyal dediğimiz eş uyaran moleküllerin hücre yüzeyinde gösterilmesidir. Periferde öz antijenler, ASH tarafından sürekli olarak T hücrelerine sunulurlar. Normal bir bağışıklık sisteminde T hücreleri öz antijenleri tanıyarak ikincil sinyal olan CTLA-4 (CD28 analogu) ile bağlanır ve efektör veya bellek hücrelerine dönüşür. Periferik toleransta ise; MHC molekülleri ile sunulan antijenler TCR ile bağlanır ancak ikincil sinyal algaçları olmadığı için ya anergi (cevapsızlık) oluşur, ya da bu hücreler apoptoz ile ortadan kaldırılırlar.

Periferik çıkan bir grup hücrelerin, aldıkları birtakım sinyallerle regülatör T ve B hücrelerine dönüştüğü düşünülmektedir. Bu hücrelerin de periferik toleransta rol aldığı bilinmektedir [3]. Tolerans mekanizmasında kazanılmış immün sistem hücrelerinin dışında NK ve ILC hücreleri gibi doğal bağışıklık sistemi hücrelerinin de rol oynayabildikleri öne sürülmektedir [4].

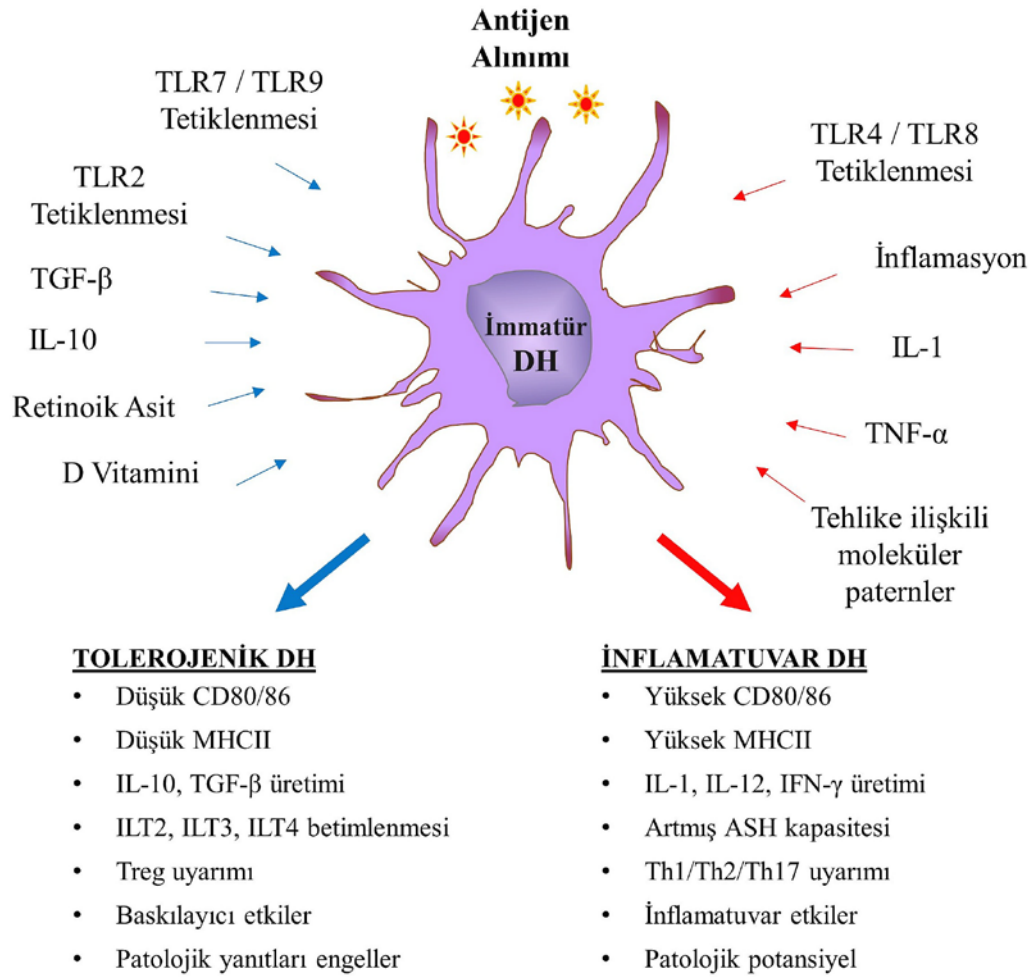
İmmün tolerans oluşumunda doğal ve kazanılmış bağışıklık sistemi hücreleri görev almaktadır.

2.1. Doğal Bağışıklık Sistemi Hücreleri ve İmmün Tolerans

2.1.1. Antijen Sunucu Hücreler

İmmün sistemde antijen sunumu yaparak immün yanıtları başlatabilme kapasitesindeki hücreler, dendritik hücreler (DH), makrofajlar ve B hücreleridir. DH'ler, profesyonel ASH'ler olarak bilinirler. Deri, solunum sistemi ve gastrointestinal sistemde yüksek miktarda bulunup bu bölgelerden giren antijenleri yakalayıp fagosite ederek T hücrelerine sunmak birincil görevleridir. Dinlenme halindeyken ikincil sinyal moleküllerini ve MHC moleküllerini yüzeylerinde göstermeyen DH'ler, antijen sunumlarıyla birlikte bu sinyal moleküllerini (CD40, CD80, CD86) ve MHC moleküllerini yüzeylerinde yüksek miktarlarda betimlemeye başlarlar. Ayrıca, sitokin üretimleriyle birlikte de $CD4^+$ T hücrelerini geliştirecek yanıtı göre yönlendirirler. Buna göre $CD4^+$ T hücreleri, mikroçevre şartlarını da dikkate alarak Th1, Th2, Th17 gibi farklı efektör alt gruplara yönlendirilerek farklı immün yanıtların oluşumunu başlatırlar. Görüldüğü gibi DH'ler, orkestra şefi gibi davranarak doğal bağışıklık sistemi ile kazanılmış bağışıklık sistemi arasında doğru ve etkin iletişimi sağlar [5], bununla beraber, yüzey molekülleri ve sitokin üretimleriyle tolerans oluşumunda karar verici olarak davranabilirler [2].

Olgunlaşmamış DH'ler herhangi bir bölgede inflamasyon varlığında, o bölgeden lenf noduna doğru hareket ederken, yüzeylerinde MHC sınıf II, CD80, CD86 betimlenmesini artırarak ve IL-1, IL-12 ve IFN- γ gibi inflamatuvar sitokinleri üretmeye başlayarak olgunlaşırlar. Bu sitokinlerle beraber naif $CD4^+$ T hücrelerinin Th1, Th2, ya da Th17 hücrelerine yönlendirmelerinde etkin olurlar. Bu durum DH'lerin kazanılmış bağışıklık sistemi hücreleri ile açıkça iş birliği içerisinde olduğunu göstermektedir. Birincil sinyal, yani antijen sunumu olduğu halde inflamasyon yoksa bu sefer DH'lerden IL-10 ve TGF- β gibi baskılayıcı sitokinler salgılanır. Bu durumda dinlenme halinde olduğu gibi aktivasyon moleküllerini hücre içine çeker ve baskılayıcı DH'lere dönüşürler. Yapılan çalışmalar, DH'lerin immün toleransa önemli katkılarını göstermiştir (Şekil 2-1) [6].



Şekil 2-1: Dendritik Hücrelerin İmmün Yanıt veya İmmün Toleransa Katılımları

Dendritik hücreler, çevresel uyanılara bağlı olarak, aynı antijene farklı yanıtlar verebilirler. Antijenin alındığı andaki çevresel faktörler tolerojenik veya inflamatuvar yönde DH farklılaşmasına yol açabilir ve bu sayede verilecek immün yanıt değişebilir. Bu şekil, Acta Medica Academica 2020 yayınından düzenlenerek kullanılmıştır [2].

Yapılan bir çalışmada, deneysel astım oluşturulmuş farelere AİT ve kortikosteroid tedavileri uygulanmış, allerjen ile tetiklenen DH’lerde fonksiyonel artış saptanmıştır [2, 7]. Takip eden pek çok benzer çalışmada da DH’lerin, salgıladıkları IL-10 sitokini ve immünglobulin benzeri transkript (ILT)2, ILT3, ILT4 gibi moleküllerle toleransı tetiklediği tespit edilmiştir [8].

2.1.2. Mast Hücreleri

Allerjinin önemli efektör hücreleri arasında yer alan mast hücreleri granüler yapıdadır ve IgE antikoru yüzeylerinde bulunan Fc ϵ RI’e bağlandığında ve ardından

özgül antijenin bu antikorlara bağlanması halinde, bu granüllerde bulunan histamin, lipid mediatörleri ve proteazları boşaltarak damar geçirgenliğini arttırırken düz kasların kasılmasına ve nörojenik vazodilatasyona yol açar. Öte yandan IL-10 ve TGF- β salgılayabilen bu hücrelerin immün toleransa katılımları gösterilmiştir [2].

2.1.3. Bazofiller

Mast hücreleri gibi granüler yapıda olup IgE antikor, yüzeylerinde bulunan Fc ϵ RI'e bağlandığında ve ardından özgül antijenler ile bu reseptörler tetiklendiğinde, bu granüllerde bulunan histamin, lipid mediatörleri ve proteazları boşaltarak damar geçirgenliğini arttırırken düz kasların kasılmasına ve nörojenik vazodilatasyona yol açar. Son yıllarda allerjik rinit (AR) hastalarında yapılan bir çalışmada bazofil cevapsızlığının AR şiddetini aşırı derecede arttırdığı gözlenmiştir [9].

2.1.4. Programlanmış Ölüm Reseptörü (PD-1)

Programlanmış ölüm reseptörü-1 (PD-1), T hücrelerinde, B hücrelerinde, monositlerde ve regülatör T hücrelerinde bulunan B7 ailesine ait ikincil sinyal (ko-stimülatör) moleküldür. PD-L1'in (B7-H1) ve PD-L2 (B7-H2) olmak üzere iki önemli reseptörü vardır. PD-L1; DH'lerde, B hücrelerinde, makrofajlarda bulunurken PD-L2, makrofaj ve DH'lerde bulunur. PD-L1 daha çok tümör immünoterapisinde T hücre aktivasyonunu baskılayarak apoptozu tetiklerken aynı zamanda regülatör T hücre oluşumunu da sağlar [10]. Diğer yandan, hem PD-L1'in hem de PD-L2'nin allerjik hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir [11].

2.1.5. Doğal Öldürücü Hücreler (NK Hücreleri)

NK hücreleri, tümör hücrelerine ve virüsle enfekte olmuş hücrelere yüzeylerinde bulunan aktivatör ve inhibitör reseptörleriyle ve özellikle de salgıladıkları sitokinleriyle cevap veren doğal bağışıklık hücreleridir. Yüzey belirteçleri CD3⁻CD16⁺CD56⁺ olan lenfositler olarak bilinirler. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar bu hücre grubunun CD16 yüzey belirteçlerinin olup olmamasına göre de iki gruba ayrıldığını göstermektedir. Birinci grup CD16⁺CD56^{dim} olan grup olup sitotoksik aktivitesi yüksektir. Diğer grup ise CD16⁻CD56⁺ fenotipiyle tanınıp sitotoksik aktivitesi yerine

yüksek kapasitede sitokin salgılama özelliği bilinmektedir [12]. Bu farklı sitokinlerin üretimi NK hücrelerini hem inflamasyon hem de regülasyonda görev almalarını sağlamaktadır [13-15]. NK hücreleri salgıladıkları sitokinler yardımıyla T hücrelerinin Th1 ve Th2 yönüne doğru değişimine [15] ve IL-10 salgılayarak da immün regülasyona katılabildikleri gösterilmiştir [13]. Ayrıca regülasyon ve immün yanıt için salgıladıkları diğer sitokinler IFN- γ , TNF, IL-5, IL-13, IL-10, GM-CSF iken CCL3, CCL4, CCL5, CCL8'de salgıladıkları kemokinlerdir [16].

2.1.6. Doğal Lenfoid Hücreler (ILC)

Doğal lenfoid hücreler (ILC), epitelyal, stromal ve miyeloid hücrelerden salınan sitokinleri ile bilinir. Yüzeylerinde özgül herhangi bir belirteç yoktur. Salgıladıkları sitokinler ile hem allerjik hem de inflamatuvar reaksiyonlarda doğal bağışıklık ile kazanılmış bağışıklık arasında köprü oluşturarak önemli bir rol oynarlar. Salgıladıkları sitokinlere göre Th1, Th2 ve Th17 hücrelerine çok benzerlik gösterirler. Bu hücreler, ILC1, ILC2, ILC3 olarak gruplandırılırlar [2]. ILC2 grubunun allerjik hastalıklarda etkili rol oynadığı bilinmektedir. ILC2, naif T hücrelerinin Th2 hücrelerine dönüşmesinde önemli rol oynar. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda AİT sonrası periferik kanda ILC2 hücrelerinin sayıca azaldığı bildirilmiştir [17].

Son dönemde yapılan çalışmalar, IL-10 ve TGF- β salgılayan, Treg hücreleri ve diğer ve ILC gruplarından farklı olan ve regülatör ILC hücreleri olarak adlandırılan bir grubu ortaya çıkartmıştır. Bu hücrelerin, yüzeylerinde CD25 ve CTLA-4 betimledikleri ve periferik kanda Th2 hücrelerinin azalmasına neden olabildikleri gösterilmiştir [18].

2.2. Kazanılmış Bağışıklık Sistemi Hücreleri ve İmmün Tolerans

2.2.1. Regülatör T Hücreleri

1960'ların başında öğrendiğimiz immünoloji bilgilerimiz son 50 yılda yavaş yavaş gelişerek çok daha karmaşık hale geldi. 1966 ve 1968 yılları arasında Claman ve arkadaşları B hücrelerini antikor kaynağı hücreler, T hücrelerini ise gecikmiş tipte aşırı duyarlılıkta rol oynayan hücreler olarak tanımladılar. 1971'de Gershon ve Kondo, inflamasyon sırasında lenfositlerin olumsuz etkileşimlerini tespit ettiler ve buna

"immünolojik toleransta enfeksiyon" adını verdiler. Bu çalışmayla ilk defa "baskılayıcı" bir terimden bahsedildi. "Baskılayıcı T-hücresi" hipotezi ise 1970'lerden sonra Vadas ve arkadaşları tarafından 1976 yılında ve Okumura ve arkadaşları tarafından 1977 yıllarında ortaya atıldı. Ancak daha sonraki çalışmalarda baskılayıcı T hücre hipotezi immünoloji tarafından uzunca bir süre reddedilmiştir. 1989'da Mosmann ve Coffman, aktivasyondan sonra salgılanan sitokinlerin profillerine bağlı olarak T-yardımcı (TH)-1 ve (TH) -2 $CD4^+$ T hücresi alt kümelerini tanımladı. Buna göre TH1 hücreleri; IFN- γ , IL-15 ve TNF- α sitokinlerini Th2 hücreleri ise, IL-4, IL-5, IL-6 ve IL-13 sitokinlerini salgılıyordu. 1994 yılında Powrie ve arkadaşları ağır kombine immün yetmezlikli (SCID) farelerde, $CD4^+$ T hücrelerinin alt kümelerinin intestinal inflamasyonu indüklediğini ve bunlardan koruduğunu gösterdi. Bu çalışmayla immün baskılayıcı lenfositlerin varlığı bir kez daha gösterilmiş oldu. 1995'te Sakaguchi ve arkadaşları self toleransın, CD25 (IL-2R alfa zinciri) betimleyen aktive $CD4^+$ T hücreleri ile alakalı olduğunu buldu. Bu $CD4^+CD25^+$ T hücrelerinden yoksun populasyonlarda otoimmün hastalıkların geliştiği görülmüştür. Nihayet Hori ve arkadaşları ile Fontenot ve arkadaşlarının yaptığı iki ayrı çalışmada da $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ hücre popülasyonu, doğal regülatör T hücreleri olarak tanımlanmıştır. Bu çalışma ile FOXP3'ün, regülatör T hücre olarak önemi vurgulanmıştır [19].

Kökenlerine göre doğal regülatör T hücreleri ve çevresel/indüklenabilir regülatör T hücreleri olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar.

2.2.1.1. Doğal Regülatör T Hücreleri

Bu hücre grubu timusta T hücre olgunlaşması esnasında, self-antijenlere yanıtılı $CD4^+$ T hücreleri içerisindeki bir kısım hücreden oluşmakta olup gelişim mekanizması henüz tam bilinmemektedir [20]. İnsanda fetal dönemde gebeliğin 14. haftasında ortaya çıkan, fenotipik olarak $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ hücrelerdir. Doğal regülatör T hücreleri; $CD4^+$ T hücrelerini, $CD8^+$ T hücrelerini, B hücrelerini, dendritik hücreleri (DH), NKT hücrelerini, NK hücrelerini, monositleri / makrofajları, mast hücrelerini, bazofilleri ve eozinofilleri baskılayabilir. Gelişimleri, işlevselliği ve çoğalmaları için IL-2 gereklidir. Yapılan birçok çalışma, regülatör T hücrelerinin sayılarının normal olmasına rağmen

IL-2, IL2a ve b betimlemeyen farelerde kuvvetli otoimmün hastalıkların olduğunu göstermiştir [21].

2.2.1.2. Çevresel / Uyarılabilir Regülatör T Hücreleri

Allerjenler, besin antijenleri gibi yabancı ancak zararlı olmadığı bilinen antijenlere karşı naif CD4⁺ T hücrelerinin antijenle karşılaşmalarından sonra oluşan çevresel/uyarılabilir regülatör T hücreleri, IL-10, IL-35, TGF- β gibi regülatör sitokinler salgırlar. [22].

Her iki grup, FoxP3 transkripsiyon faktörünü betimlemekte olup, FoxP3 göstermeyen bir grup regülatör T hücresi daha vardır ki onlar da kendi içinde üç grup içinde incelenmektedir. Bunlar Tr1, Th3 ve CD8⁺ Treg hücreleri olarak isimlendirilirler. Tr1; periferde antijen uyarımı ile aktive olarak yüzeyinde LAG3 (lymphocyte-activation gene3) belirteci gösteren ve IL-10 salgılayarak işlev gösteren hücre grubudur. CD25 ve FOXP3 belirteçlerini yüzeylerinde göstermezler. Ancak CD49b eksprese ederler. Th3; yine periferde antijen uyarısı ile aktive olup TGF- β salınımı ile karakterizedir. Son olarak CD8⁺ Treg hücreleri ise; antijene özel hafıza hücreleri olup salgıladıkları IL-10 ve TGF- β gibi sitokinlerle baskılayıcı özelliğe sahip regülatör T hücreleri olarak bilinmektedirler. Halen CD8⁺ Treg hücreleri ile ilgili bilinmeyen çok şey vardır [20].

Regülatör hücrelerin her bir grubu aynı görev için özelleşmiştir. Amaç; salgıladıkları sitokinlerle ve hücre hücre etkileşimi kurarak organizmanın aşırı bağışıklık yanıtı vermesini engellemek ve yabancı ajana karşı korunmasını sağlamaktır. Regülatör T hücreleri, baskılayıcı aktivitelerini IL-10, IL-35 ve TGF- β gibi sitokinler ve CD25, CD39 ve CD73, cAMP, histamin reseptörü 2, adenosin reseptörü 2, sitotoksik T lenfosit antijen-4 (CTLA-4), program ölüm-1 (PD-1) ve sitoliz mekanizması (granzim A ve B) ile sağlarlar [1, 23]. Ayrıca, son yıllarda yapılan çalışmalarlar, Treg'lerin mikroRNA'lar üzerinden efektör T hücre yanıtlarını baskılayabildiklerini bildirmiş ve Treg aracılı baskılayıcı mekanizmalarda yeni bir ilgi alanı açığa çıkarmıştır [24].

Regülatör T hücreleri, sağlıklı bir kişide inflamasyon ile tetiklenmiş DH'leri, CD80/CD86'nın yüzey betimlenmesini azaltarak, ya da kendi üzerlerinde bulunan CTLA-4, LAG-3, LFA-1 gibi belirteçlerle baskılayabilir. Regülatör T hücreleri ayrıca

Th yönlenimini de baskılayabilirler, bazofillerin ve mast hücrelerinin olgunlaşmasını ve degranülasyonunu inhibe ederek efektör hücreleri kontrol edebilir, böylece FcεRI ekspresyonunu ve OX40-OX40L etkileşimleri yoluyla degranülasyonu azaltabilir. Bunun dışında eozinofillerin ve T hücrelerinin hasarlı dokuya sızmasını önler, inflamasyonun azalmasını sağlar ve hasarlı dokunun onarımına katkıda bulunabilirler [25]. Regülatör T hücrelerinin dikkat çeken diğer bir fonksiyonu da kazanılmış bağışıklık sistemini düzenleyebilmeleridir. Bu hücreler, antijene özgü B hücrelerinin IgE tipinde antijen üretimini azaltabilir ve IgG4 tipi anti-inflamatuar immünoglobulin düzeylerini artırabilir [26].

Tüm bu bahsedilen özellikleri sayesinde Treg hücrelerinin allerjik hastalıkların patogenezindeki önemli katılımları görülmektedir. Ayrıca, bu hücreler, gelecekte allerjik hastalıkların tedavisinde kullanılabilecek mükemmel adaylar olarak dikkat çekmektedir.

2.2.2. Regülatör B Hücreleri

B hücrelerinin immün düzenlemeye katılmalarının incelenmesi oldukça eskiye dayanmaktadır. 1970'lerde OVA ile sensitize edilmiş ve gecikmiş hipersensitivite reaksiyonu gösteren kobaylarda yapılan bir çalışmada, B hücre deplesyonu gerçekleştirilmiş kobaylarda, normal B hücrelerine sahip kobaylara göre baskılayıcı etkinin daha az olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmada T hücre fonksiyonu ve süpresif etkisini göstermesi için T ve B hücrelerinin immün regülasyonda önemli olduğu ve bunun da B hücrelerinin antikör üretimi ile ilgili olmadığı vurgulanmıştır [27]. Yaklaşık 20 yıl kadar sonra yapılan çalışmalar, B hücrelerinin baskılayıcı mekanizmalarının anlaşılmasında yol gösterici olmuştur. 1996 yılında Wolf ve arkadaşları deneysel otoimmün ensefalomiyelit (EAE) oluşturulmuş fare modeli üzerinde çalışmışlardır. Bu çalışmaya göre wildtype (WT) farelerde iyileşme gözlenirken B hücre azaltılmış fare modelinde (uMT) iyileşme başarısı gösterilememiştir. Sonuç olarak bu çalışma aslında B hücrelerinin hastalığın oluşumu ile ilgili olmadığını, aksine deneysel otoimmün ensefalit (EAE) hastalığında otoimmün cevap oluşumunda önemli koruyucu görevlerinin olduğunu savunmaktadır [28]. 2002 yılında Fillatreau ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da B hücre noksanlığı olan fare modelinde IL-10 eksikliği de görülmüş ve IL-10 ile B hücrelerinin ilişkili olduğu saptanmıştır [29]. Tüm bu

çalışmalar, EAE fare modelinde IL-10 salgılayan B hücrelerinin otoimmünite düzenlenmesinde önemli rol oynadığını göstermektedir. Aynı yıllarda yapılan diğer kronik inflamasyon fare modellerinde IL-10 salgılayan B hücrelerinin enfeksiyona karşı koruyucu olduğunu göstermiştir Tüm bu çalışmalar fare modellerinde bir anlam ifade ederken insanda IL-10 salgılayan B hücrelerinin varlığı ve anlamı bilinmiyordu. Çok sürmeden bir kaç vaka bildirim çalışmaları yayınlandı. Rituksimab kullanılan hastalarda B hücre deplesyonu ile birlikte psöriasis veya ülseratif kolit geliştiği görüldü [30, 31]. Bu çalışmalar regülatör B hücrelerinin tanımlanması açısından önemli kaynaklar olmuştur. Bütün bu çalışmaların ışığında regülatör B hücreleri hem fenotipik hem de fonksiyonel olarak gruplandırılmıştır. Yapılan tüm bu çalışmalarda Breg hücrelerinin otoimmünite, allerjik hastalıklar, enfeksiyöz hastalıklar, kanser ve transplantasyonda önemli rolleri olduğunu göstermiştir [32].

Akdis ve arkadaşları, 1998 yılında yayınladıkları bir çalışmada arıcılarda, arı zehiriyle karşılaşmanın ardından B hücrelerinde IL-10 ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir [33]. Aynı grup, daha sonra yaptıkları çalışmayla, antijene özgü immün yanıtları baskılayabilen Breg hücrelerinin aynı zamanda antijene özgü IgG4 (sIgG4) ürettiklerini göstermiştir [34]. Bu tarihsel keşif sırasında regülatör B hücrelerinin yüzey belirteçlerine ve salgıladıkları sitokinlere göre de sınıflanabileceği bildirilmiştir. Buna göre insana genetik olarak en yakın olan kemirgenler ve insanlar arasında yüzey belirteçleri ve salgıladıkları sitokinlere göre sınıflandırmada bazı farklılıklar olduğu gözlenmektedir.

B hücreleri, yüzeylerindeki antijenleri ve salgıladıkları sitokinleri ile hem insanda hem de kemirgenlerde birbirinden farklı iki gruba ayrılırlar. Bu gruplar B-1 ve B-2 hücre grubu olarak isimlendirilir. B-1 hücreleri fetal dönemde bulunurken B-2 hücreleri yetişkin dönemde görülürler. B-1 hücreleri fetal dönemde oluşurken karaciğerden köken alır ve $CD5^+$ / $CD5^-$ olma durumuna göre ki gruptan oluşur. $CD5^+$ B1 hücreleri B-1a, $CD5^-$ B1 hücreleri ise B-1b olarak isimlendirilirler. B-1 ve marjinal zon (MZ) B hücreleri fetal dönemde karaciğerden üretilirken B-2 hücreleri erişkin dönemde dalak ve kemik iliğinden üretilmektedir. B-2 hücreleri lenfoid doku ve kanda dolaşır, afinite olgunlaşması ve antikör cevabında yer alırlar. Buna karşın B-1 hücreleri mukozal bölgede ve embriyo gelişiminde mezoderm katmanları arasında yer alır [35]. Oluşan ilk

öncül B hücreleri yüzeylerinde BCR, IgG ve IgM reseptörleri taşır. Bu hücreler CD27 betimlemezler. Olgun olmayan ve transisyonel B hücre de denilen bu hücreler periferik kana doğru hareket ederek periferde CD24 ve CD38 antijenlerini sergilemeye başlarlar. Antijen sunumu ile antijeni tanıyan ve aktive olan B hücreleri plasmablastlara ya da IL-10⁺ plasmablastlara, plazma hücrelerine, hafıza B hücrelerine ya da IL-10⁺ regülatör B hücrelerine dönüşebilirler. Hangi şartlarda ve nasıl bu hücrelere dönüştükleri hala net değildir [32]. Fare ve insanlarda regülatör B hücreleri ayrı ayrı tanımlanmıştır. Tablo 2-1 ve Tablo 2-2’de hem fare hem de insan regülatör B hücreleri sınıflandırması belirtilmiştir [32]. Ancak, sadece insandaki Breg hücreleri üzerinde durulacaktır.

Tablo 2-1: Farede Regülatör B Hücrelerinin Sınıflandırılması

Adı	Yüzey Belirteci	Lokalizasyon	Salgı	Görev
B-1a	CD19 ⁺ CD5 ⁺	Karaciğer ve kemik iliği	IL10	Yenidoğan farelerde TLR aracılı inflamasyonu kontrol eder
B10	CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD1d ^{hi}	Dalak	IL10	LPS, PMA ve iyonominin kaynaklı ex vivo stimülasyon yoluyla inflamasyonu baskılar. Monositler tarafından TNF-α üretimini baskılar. Efektör CD4 ⁺ T hücreleri ve Th17 hücrelerini baskılar.
T2-MZP	CD19 ⁺ CD21 ^{hi} CD D23 ^{hi} CD24 ^{hi} IgM ^{hi} IgD ⁺ CD1d ⁺	Dalak	IL-10	Treg hücrelerini indükler ve efektör CD4 ⁺ CD8 ⁺ T hücrelerini baskılar.
Plazma Hücresi	CD138 ⁺ MHC-II ^{lo} B220	Dalak	IL-10, IL-35	Patojenik bir T hücre oluşumunda dendritik hücre fonksiyonunun baskılayarak otoimmün inflamasyonu baskılar.
	sIgM ⁺ CD138 ^{hi} TA CI ⁺ CXCR4 ⁺ CD1d ⁱ ntTim1 ^{int}	Dalak	IL-10, IL-35	CD4 ⁺ T hücrelerini baskılar.
Tim-1 ⁺	Tim-1 ⁺ CD19 ⁺	Dalak, Lenf Düğümü	IL-10	İnflamasyon sırasında Th1 ve Th17 hücrelerini kontrol eder, Treg üzerindeki IL-10 ekspresyonunu artırır. TH2 hücrelerini uyarır. Artrite karşı koruma sağlar, Leishmania donovani enfeksiyonu erken evrelerinde antijene özgü CD8 ⁺ T-hücre yanıtlarını baskılar.
MZ	CD19 ⁺ CD21 ^{hi} CD23 ⁻	Dalak	IL-10	

Tablo 2-2: İnsanda Regülatör B Hücrelerinin Sınıflandırılması

Adı	Yüzey Belirteci	Lokalizasyon	Salgı	Görev
Plazmablast	CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD27 ^{int} CD38 ⁺	Periferik Kan	IL10	Efektör CD4 ⁺ T hücrelerini ve DH'leri baskılar
B10	CD24 ^{hi} CD27 ⁺	Periferik Kan	IL10	Efektör CD4 ⁺ T hücrelerini ve Th17 hücrelerini baskılar, TNF-a'yı baskılar
Olgunlaşmamış hücre	CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD38 ^{hi}	Kan ve inflame dokularda	IL10	Naif T hücrelerinin Th1 ve Th17'ye değişimini engeller
Br1	CD19 ⁺ CD25 ⁺ CD71 ⁺ C D73 ⁻	Periferik Kan	IL-10 ve IgG4	CD4+CD25-T hücrelerin regülatör T hücrelerine dönüşümünü sağlar. IL-10 ile infmasyonu kontrol altına alır, regülatör hücre oluşumunu sağlar, ve IgG4 oluşumu tetikler.

2.2.2.1. CD19⁺ CD24^{hi} CD27^{int}CD38⁺ B Hücreleri (Plazmablast)

Sağlıklı insanların periferik kanında tespit edilmiştir. Bu hücrelerin varlığı plazma hücrelerinin oluşumunu gösterir. CpG, IL-2 ve IL-6 ile uyarılırlar. CD27⁺CD38^{hi} B hücreleri de IL-10 salgılayan regülatör B hücreleri olarak bilinirler [32, 36].

2.2.2.2. CD24^{hi} CD27⁺ B Hücreleri (B10)

B10 hücreleri de denilen bu hücreler IL-10 salgılayarak immün regülasyonda görev alırlar. Lipopolisakkarit ve CpG ile uyarılabilirler. Periferik kanda IL-10 salgılanarak TNF- α 'yı baskılayabilirler. Sistemik ve otoimmün hastalılarda çok yükseldiği için daha çok sistemik ve otoimmün hastalıklarla ilişkili oldukları öne sürülmektedir [32].

2.2.2.3. CD19⁺ CD24^{hi} CD38^{hi} Regülatör B Hücreleri

İlk olarak 2010 yılında sağlıklı insanların periferik kanında tespit edilmiştir, ancak hem SLE ve RA gibi otoimmün hastalıklarda hem de transplantasyonda önemli görevleri olduğu gösterilmiştir [37, 38]. Görevleri naif CD4⁺ T hücrelerinin Th1 ve Th17 yönünde cevap oluşturmalarını baskılayarak regülatör T hücre oluşumunu tetiklemektir. Bunu yaparken IL-10 salgırlar [39]. B hücreleri lipid antiijenleri invaryant doğal öldürücü (iNKT) hücrelere sunabilirler. Yapılan çalışmalar Breg hücrelerinin azalması ile iNKT hücrelerinin de azaldığını göstermektedir. Ancak anti-CD20 tedavisiyle iNKT sayılarının düzeldiği de yine aynı çalışmada vurgulanmıştır [38].

2.2.2.4. Br1 Hücreleri

Bu hücrelerin varlığı 2013 yılında fark edilmiştir. Yüzeylerinde CD19⁺CD25⁺CD71⁺CD73⁻ betimlerler. Yapılan çalışmalarda bu hücrelerin allerjik hastalıklarda görevli olduğunu gösterilmiştir. Br1 hücreleri baskılayıcı özellikleri ile inflamasyonu kontrol altına alıp IL-10 salgılayarak regülatör T hücrelerinin oluşmasını tetiklerler. Ayrıca IgG4 oluşumunda da etkilidirler [34, 40, 41]. Arı zehiri allerjisi olan kişilerde ve arı bakıcılarında yapılan bir çalışma sonrasında CD19⁺CD25⁺(IL-2R), CD71⁺ (transferrin reseptör1) ve CD73⁻ ya da çok düşük oranda betimleyen Br1 hücreleri tespit edilmiştir [34]. Arı zehiri allerjisi olan hastalara yapılan immünoterapiden 3 veya 4 ay sonra fosfolipaz A2 özgül IL-10 salgılayan Br1 hücrelerinin sağlıklı arı bakıcılarının Br1 hücrelerine kıyasla 2-5 kat daha fazla olduğu görülmüştür [42]. 2019 yılında ev tozu akarı allerjenlerine karşı yapılan bir çalışmada AİT'ten iki yıl sonra klinik olarak semptomlarda iyileşme görülen hastalarda iyileşmeyenlere göre IL-10 salgılayan B hücrelerinin, plazmablastların, IgG4 antikorunun arttığı tespit edilmiştir [43].

Ayrıca 2018 yılında Komlosi ve arkadaşlarının yayınladığı bir makalede CD40L, ILC3 ve regülatör B hücrelerinin birbirleri ile ilişkili olduğunu gösterilmiştir. ILC3 hücreleri B hücrelerinde bulunan BAFF-reseptörü yoluyla IL-15 salgılatmakta bu sitokin de ILC3'ün büyümesini ve yüzeyinde CD40L'nı eksprese etmesini sağlamaktadır. Dolayısıyla IL-15 CD40L ekspresyonunu arttırmakta ve ILC3 için

gerekli bir sitokinken, ILC3 de, IL-10 ve PDL1 eksprese eden regülatör B hücrelerinin oluşması, yaşaması ve çoğalması gereklidir [44].

2.2.2.5. Regülatör B Hücrelerinin Baskılama Mekanizmaları

Regülatör B hücrelerinin salgıladığı önemli sitokinler IL-10, TGF- β ve IL-35'tir [45]. Ayrıca, bu hücreler, sitokin üretimleri dışında, baskılayıcı özelliğini bilinen PD-L1, Granzim B, CD39, CD73 ve Aril hidrokarbon reseptörü gibi molekülleri de kullanabilirler [32].

IL-10; kuvvetli bir immün baskılayıcı sitokindir. Mast hücreleri, doğal öldürücü hücreler, T lenfositleri, dentritik hücreler, monositler, makrofajlar, B hücreleri, regülatör B ve T hücreleri, bazı NK hücreleri, doğal lenfoid hücreleri (ILC) gibi bir çok bağışıklık sistemi hücrelerinden salgılanırlar [46, 47]. IL-10, organ nakli, otoimmün hastalıklar, tümör toleransı ve allerji gibi kronik inflamatuvar hastalıklarda inflamatuvar cevap ve immün tolerans arasında dengeyi sağlar. T hücrelerinin baskılayıcı etkisini çoğaltmasını baskılayarak veya sitokin salgılatarak, direkt ya da indirekt olarak etkiler. Aynı zamanda B hücrelerinin yaşamsal faaliyetlerinin sürmesini, plazma hücrelerine dönüşmesini ve izotip dönüşümünü sağlayan yine IL-10'dur [41]. Regülatör diğer bir sitokin olan TGF- β , naif CD4⁺ T hücrelerinin regülatör T hücrelerine dönüşmesini sağlayan önemli bir sitokindir [41]. Yara iyileşmesi ve doku tamirinde de görev alır. Yapılan çalışmalarda transplantasyon sonrasında organ sağkalım süresinde olumlu yönde etkili olduğu gösterilmiştir [48].

IL-35; inflamasyonun baskılanmasında ve otoimmün cevaplarda önemli bir sitokindir. Hem regülatör T hem de regülatör B hücreleri tarafından üretilir. Regülatör T hücreleri tarafından salgılanarak çoğalmalarını ve Th17 ve Th1 hücrelerinin baskılanmalarını sağlar. Regülatör B hücreleri yüzeyinde CD19, CD62 ligand (62L), Fas ligand (Fas-L), MHC-II, PL-1 gibi belirteçleri göstererek immün baskılamada regülatör B hücrelerini de işin içine çeker [41].

PD-L1; Regülatör B hücre yüzeyinde bulunan PD-L1, CD279 olarak da bilinen ve aktive olmuş T hücreleri, B hücreleri, monositler, DH ve NKT hücreleri üzerinde bulunan PD-1 ile bağlanarak immün regülasyonda görev alır. Romatoid Artrit gibi otoimmün hastalıklarda PD-L1 yüzey belirtecini artırması gösterilmiştir [49].

Granzim B; Serin proteaz enzimidir ve NK hücreleri ve T hücreleri ile $CD19^+CD38^+CD1d^+IgM^+CD147^+$ Breg hücrelerinden salgılandığı bildirilmiştir. T hücrelerinden IL-21 salgılanması ile Granzim B (GrB) üretebilen hücreler oluşur ve bu hücrelerin kanser, otoimmün hastalıklar ve graft versus host hastalığında etkili hücreler olduğu düşünülmektedir [50].

2.3. Aşırı Duyarlılık Reaksiyonları

İmmün sistem, yabancı antijenlere karşı birçok farklı strateji kullanarak en uygun korumayı sağlamak için özelleşmiştir. Ancak bu sistemdeki aksaklıklar, konak için büyük hasarlara yol açabilecek anormal immün yanıtlarla sonuçlanabilir. Aşırı duyarlılık, bağışıklık sisteminin yabancı ya da kendinden olan antijenlere karşı geliştirdiği, aşırı ve patojenik yanıt olarak tanımlanabilir. Gell ve Coombs 1963 yılında aşırı duyarlılık reaksiyonlarını temel dört gruba ayırmışlardır. Bunlar; TipI, TipII, TipII ve TipIV olarak isimlendirilirler. Ancak günümüzde mekanizmaların daha iyi anlaşılması için TipII ve TipIV'ün alt grupları ile yeniden sınıflandırma ihtiyacı doğmuştur (Tablo 2-3). Klinikte bu aşırı duyarlılık tiplerinin herbiri tek başına görüldüğü gibi farklı tipler aynı anda aynı kişide de görülebilir [51].

2.3.1. Tip I Aşırı Duyarlılık Reaksiyonları

Allerjenlere karşı gelişen, IgE aracılı aşırı duyarlılık reaksiyonlarıdır. Th2 tipinde $CD4^+$ T hücreleri ve bu hücrelerin sitokin salgılarıyla B hücrelerinin IgE tipinde antikor üretimi sağlanarak mast hücreleri ve bazofil üzerinde bulunan $Fc\epsilon RI$ 'e bağlanması gerçekleştirilir. Böylece duyarlılaşma sağlanmış olur. Aynı allerjen ile ikinci kez karşılaşıldığında, allerjenin bağlı bulunduğu özgül IgE bu hücrelere çapraz bağlanma ile bağlanarak allerjik reaksiyonu tetikler. Bu aşamada bir erken bir de geç faz olarak adlandırılan iki faz gerçekleşebilir. Erken faz dakikalar içerisinde mast hücreleri ve bazofillerden; histamin, lizozomal enzimler, proteazlar ve diğer mediatörlerin salınımı ile gerçekleşir. Ayrıca, mast hücrelerinden prostaglandin D2 ve lökotrien C4 de bu aşamada salınır. Geç faz ise 4 ile 8 saat içerisinde gerçekleşir ve mast hücrelerinden interlökin I (IL)-1, tümör nekrosis faktör (TNF)- α , IL-4, IL-5, IL-13, ve granülasit monosit koloni stimülan faktör (GM-CSF) salınımı ile özelleşmiştir [52].

2.3.2. Tip II Aşırı Duyarlılık Reaksiyonları

Tip II aşırı duyarlılık reaksiyonları son yıllarda yapılan modern sınıflandırmaya göre iki aşamada gruplandırılabilir. Birinci grup (TipIIa) IgG ve IgM aracılı kompleman aktivasyonu ile gerçekleşir. IgG/IgM hücre yüzey komponentlerine bağlanarak sitotoksitiyeyi üç yol ile aktive eder. İlkinde, antijen-antikor birlikteliği ile klasik yoldan kompleman aktivasyonu ile membran atak kompleksi (C5-C9) oluşturularak hedef hücre lizisi sağlanır. İkincisinde, IgG antikor, doğal öldürücü hücreler ve makrofajlar üzerinde bulunan FcγRIIb receptörlerine bağlanarak perforin ve granzim salgılayarak hedef hücreyi öldürür. Sonuncusunda ise hem IgG hem de IgM antikor fagositler üzerinde bulunan Fc reseptörlerine bağlanarak fagositoz yolu ile hücre ölümünü sağlarlar. İkinci grup (TipIIb) ise, otoantikorların hücre stimülasyonu yolu ile reaksiyon oluşturmalarıdır. Graves Hastalığı bu reaksiyonlara örnektir [51].

2.3.3. Tip III Aşırı Duyarlılık Reaksiyonları

Tip III aşırı duyarlılık reaksiyonlarında IgG veya IgM antikorları antijene bağlanarak immün kompleks oluştururlar. Oluşan immün kompleksler, arterlerde, sinovial kapsüllerde ya da böbrek glomerüllerinde birikerek bu bölgelerde kompleman aktivasyonu ile organ hasarına neden olurlar. Nefrit, Artrit ya da vaskülit bu grupta sayılabilir. Ayrıca bu antijenler self antijenler de olabilir. Yine lupus ve serum hastalığı da bu gruba örnek olarak verilebilir [51].

2.3.4. Tip IV Aşırı Duyarlılık Reaksiyonları

Gecikmiş tip cevap olarak da bilinen TipIV aşırı duyarlılık reaksiyonları efektör T hücre cevabı ile ilişkilidir. Sitotoksik T hücreleri veya yardımcı T hücreleri, makrofajları, eozinofilleri ya da nötrofilleri aktive ederek bu hücrelerin ürettiği reaktif oksijen ara ürünleri, lizozomal enzimler ve sitokinler ile doku hasarına neden olabilirler. 1963 yılında Gell ve Coombs'un sınıflandırmasının aksine şimdi Tip IV aşırı duyarlılık reaksiyonları kendi içinde dört grupta incelenir. Tip IVa, Tip IVb, Tip IVc, Tip IVd. İlk 1963de Gell ve Coombs'un tanımladığı TipIV, modern sınıflandırmaya göre TipIVa olarak isimlendirilmiştir. Tip IVa'da makrofajlardan salgılanan IFN-γ ve TNF-α sitokinleri ile aktive olan Th1 tipi hücreler görev alır. Tip I diyabet, kontakt dermatit bu grupta yer alır. Tip IVb grubunda Th2 tipi hücreler görevlidir. Bu grupta eozinofilik

inflamasyon önemlidir, Dirençli Astım ve Allerjik Rinit bu grup için örnek teşkil eder. Tip IVc grubu aşırı duyarlılık reaksiyonlarında CD8⁺T hücreleri hedef hücrelerini perforin ve granzim ile öldürürken doku hasarına sebep olabilir. Stevens-Johnson Sendromu bu grubun klinik örneği olarak verilebilir. Son olarak Tip IVd grubunda ise, nötrofilik inflamasyon ön plandadır. Behçet hastalığı bu grupta yer alır [53].

Tablo 2-3: Aşırı Duyarlılık Reaksiyonları

Aşırı Duyarlılık Reaksiyonları Sınıflandırması		
Sınıflandırma	Mekanizma	Klinik Örnek
TipI	Mast hücre aracılı	
	IgE bağımlı	Anaflaksi, anjiyoderma, Astım, Allerjik Rinit
TipIIa	IgE bağımsız Antikor bağımlı -genellikle kompleman etkili sitotoksitite	Soğuk ürtikeri İmmün Sitopeni
TipIIb	Antikor bağımlı -hücre uyarımı ile	Graves Hastalığı, Kronik İdiyopatik Ürtiker
TipIII	İmmün kompleks aracılı kompleman aktivasyonu	Vaskülüt, ilaca bağlı Lupus
TipIVa	Th1 aracılı makrofaj aktivasyonu	TipI diyabet, Kontakt dermatit, Tüberkülin test reaksiyonu
TipIVb	Th2 hücre aracılı eozinofilik inflamasyon	Allerjik Rinit, dirençli Astım
TipIVc	Sitotoksik T hücre aracılı reaksiyon	Stevens-Johnson sendromu, toksik epidermal nekroz
TipIVd	T hücre aracılı nötrofilik inflamasyon	Behçet Hastalığı

2.4. Allerjik İnflamasyon

2.4.1. Allerji Tarihçesi

Allerji, atopi, anaflaksi gibi terimler günlük hayatta sıkça kullanılan tıbbi terimlerdir. Tarihte kullanılan ilk terim ise ‘Anaflaksi’dir. M.Ö 2643 yılında Eski Mısır’ın kurucusu Firavun Menses’in arı sokması ile aniden ölmesi ile anafilaksi tarihe geçen ilk kayıttır [54]. Bununla birlikte, 1902 yılında Portier ve Richet köpeklere ilk kez yılan balığı serumu vermiş, ardından, köpeklere ikinci kez aynı serum verildiğinde duyarlılık meydana gelmiştir. “Korunmasızlık” anlamına gelen anaflaksi terimi ilk kez kullanılmıştır [55]. Allerji Yunanca’da diğer anlamına gelen ‘allos’ kelimesinden köken

almıştır. 1905 yılında Pirquet ve Schick yabancı serum enjeksiyonu ile ortaya çıkan bir serum hastalığı tanımlamış, 1906 yılında ise Baron Clemens von Pirquet ilk defa allerji terimini kullanmıştır [56]. 1921 yılında Prausnitz ve Küstner, balık allerjisi olan bireye intradermal balık özütü enjekte etmiş ve buna bağlı olarak ödem ve ani kızarıklık gözlemlenmiştir. Bu deneyle birlikte ilk defa allerjik reaksiyon tanımı yapılmıştır [57]. Cooke, 1923’de ilk defa Yunanca’da “yerinde olmayan” anlamına gelen “atopi” terimini kullanmıştır [58]. 1967’de ise Ishizaka, saman nezleli hastaların serumunda IgE antikorunu keşfederek, allerji patogenezi alanında önemli gelişmeleri başlatmıştır [59]. Son 10 yılda allerjik hastalıkların prevalansı hızla artışa geçmiştir. Yapılan çalışmalar, allerjik hastalıkların oranının, dünya popülasyonunun %30’nu oluşturduğunu göstermektedir. Çalışmalar bu oranın modern hayat yaşantısı ile direkt ilgili olduğunu gösterdiği gibi, genetik alt yapı ve özellikle de babadan kalıtım ile ilgili olduğunu da göstermektedir [60, 61].

Tip I aşırı duyarlılık reaksiyonları içerisinde incelenen allerjik hastalıklarda Th2 yönünde immün yanıt oluşurken hem doğal bağışıklık hem de kazanılmış bağışıklık bu yanıtı eşlik eder. Bu yanıt sırasında epitelyal hücreler, grup2 doğal lenfoid hücreler (ILC2), ASH, Th2 hücreleri, B hücreleri, IL-4 salgılayan küçük bir grup NK hücreleri, NKT hücreleri, eozinofil, bazofil ve mast hücreleri reaksiyona katılır. Bu sırada immün sistem hücrelerinden IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, doku ve epitelyal hücrelerden ise IL-25, IL-31, IL-33 ve timik stromal lenfopoietin (TSLP) gibi kompleks birçok sitokin salgılanır [22].

Allerjik reaksiyonlar, duyarlılaşma ve efektör faz olmak üzere iki büyük fazda incelenebilir. Duyarlılaşma fazında klinik bulgular söz konusu değildir, semptom yoktur. Allerjen, deri yolu, hava yolu ya da bağırsak yoluyla antijen sunan hücreler tarafından alınır, işlenir ve MHC Sınıf II ile $CD4^+$ T hücrelerine sunulur. Böylece allerjene özgü $CD4^+$ Th2 hücreleri oluşur. Th2 tipi hücreler yüksek miktarda IL-4 ve IL-13 sitokinleri salgırlar. Bu sitokinlerin özelliği B hücrelerinin plazma hücrelerine ve IgE antikor oluşumu için izotip değişimi yapmasına olanak sağlamasıdır. Oluşan IgE antikorları mast hücreleri ve bazofiller üzerinde bulunan $Fc\epsilon R1$ ’e yüksek afinite ile bağlanırlar. Bu aşamada klinik olarak semptom görülmez ve bu faza duyarlılaşma fazı denilir. Bu ilk bağlanmadan sonra aynı allerjen ile yeniden karşılaşma olduğunda allerjik reaksiyon ve semptomlar görülmeye başlar [62].

Allerjik hastalar dışarıdan gelecek allerjenlere karşı savunma sistemini değiştirme ihtiyacı duyarak epitelyal hücreleri sadece bir bariyer olarak değil aynı zamanda regülatör hücreleri organize edebilmek için kullanmak üzere özelleştirmiştir. Bu ihtiyaç nedeni ile de epitelyal hücrelerden bazı sitokinlerin salınımına olanak sağlayıp (IL-25, IL-33, IL-31 veya TLSP) hem DH üzerinde hem de ILC hücreleri üzerinde etkinlik sağlayarak Th2 hücrelerini organize ederek duyarlılaşmayı sağlayabilirler. Efektör fazda, duyarlılaşmadan sonra aynı allerjen ile tekrar karşılaşıldığında bazofil ve mast hücreleri üzerinde bulunan FcεRI'e IgE antikorlarının çapraz bağlanması ile gerçekleşir. Bu bağlanma ile mast hücreleri ve bazofillerden histamin, heparin proteazlar, prostaglandinler, lökotrienler ve sitokinler salgılanmasına neden olur. Bu faz, akut inflamasyonun olduğu ve yukarıda bahsedilen hücre tepkilerinin anında gerçekleştiği bir faz olarak bilinir. Geç faz reaksiyonları ise dokuda gerçekleşir. Kronik alerjik inflamasyonda, mukoza altında ve dermiste bulunan hafıza Th2 hücreleri etkin şekilde görev alırlar [22].

Allerjik hastalıklar, çevresel antijenlere karşı doğuştan ve kazanılmış immün sistem ile yanıt verirler. Ve bu yanıtlarının en çok bilinen ve tanı kriterlerinden biri Th2 tipi hücre yanıtı ve allerjene özgü IgE yanıtıdır [63]. CD4⁺ Naif T hücreleri ortamdaki sitokinlere, diğer hücrelere ve moleküllere bağlı olarak farklı T hücre alt gruplarına farklılaşırlar. Bu T hücre alt grupları; Th1, Th2, Th9, Th17 ve Th22 tipi bellek ve efektör hücrelerdir [47]. Th2 tipi yolak oluştuktan sonra bir erken faz allerjik reaksiyonlar ve bir de geç faz allerjik reaksiyonlar olmak üzere iki farklı aşamada allerjik reaksiyonlar gelişir. Erken faz allerjik reaksiyonlarda duyarlılaşma ve hafıza hücrelerinin oluşumu söz konusu iken, geç faz allerjik reaksiyonlar sırasında efektör hücrelerin neden olduğu doku hasarı ve inflamasyon söz konusudur. Erken faz allerjik reaksiyonlar sırasında Th2 tipi yolağın aktifleşmesi ile bu hücrelerden IL-4 ve IL-13 salgılanmaya başlar. Bu sitokinler, B hücrelerinin epsilon (ε) ağır zincirinin sınıf kayması yapmasına yardımcı olur ve B hücrelerinden allerjene özgü IgE antikorı üretilmeye başlanır. Allerjenlerin alımının artması ile birlikte allerjene özgü IgE antikorı yüksek afinite ile mast hücreleri, bazofil ve antijen sunan hücreler üzerinde bulunan FcεRI'e bağlanır [64]. Bu olaya duyarlılaşma denir [65]. Aynı antijenle tekrar karşılaşıldığında IgE antikorı reseptörlerine çapraz bağlanır ve bu defa Tip I aşırı duyarlılık reaksiyonu gelişir [66]. Allerjik hastalıklar gelişirken Th2 hücrelerinden

salınan sitokinlerin yanında (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 gibi), proinflamatuvar sitokinler de salınır. Bu sitokinler literatüre yeni girmiş IL-25, IL-31 ve IL-33'tür [67].

2.5. Rinit

Hapşırık, kaşıntı, tıkanıklık gibi nazal semptomlarla kendini gösteren ve bu semptomların ardışık günlerde tekrar etmesi ve en az bir saatten fazla sürmesi hali “rinit” olarak adlandırılmaktadır [68]. Rinitler, etyolojilerine bağlı olarak sınıflandırılır.

2.5.1. İdiyopatik Rinit

İlk semptomları burun tıkanıklığı ve burun akıntısıdır. Eskiden vazomotor rinit olarak adlandırılırken günümüzde nonallerjik rinopati, nonallerjik rinit [noneozinofilik nonallerjik rinit (NENAR), nonallerjik noninfeksiyöz perennial allerjik rinit (NANIPAR)] terimleri kullanılmaktadır. Isı farklılığından etkilenirler. Soğuk, sigara dumanı, kimyasallar, keskin kokular idiyopatik rinit semptomlarını uyarabilir [69]. Bu hastaların allerjik deri testleri negatif olmakla beraber mast hücreleri artmıştır. [70]. Bu durum, lokal mukozal allerji varlığını gösterir ve “entopi” terimiyle açıklanır.

2.5.2. İnfeksiyöz Rinit

Rinosinüzit de denilir. Bir veya birden fazla sinüsün iltihaplanmasıdır. Burunda tıkanıklık ve akıntı, yüzde bası ve ağrı, koku kaybı ile karakterizedir. Hastalık 12 haftadan kısa sürüyorsa akut, 12 haftadan daha uzun sürüyorsa kronik rinosinüzit olarak sınıflandırılır [71].

2.5.3. Mesleksel Rinit

Belirli iş ortamındaki nedenlerin veya durumların sorumlu olduğu burnun inflamatuvar hastalığıdır. IgE aracılı duyarlılaşmadır. Ve ajanın seviyesi mesleksel rinit gelişiminin en önemli tanımlayıcısıdır. Mesleksel astımdan 2-4 kat daha sık görülür. Etiyolojik ajanlar arasında; kimyasallar, lateks, odun tozu, talaş, tahıllar, sayılır [72].

2.5.4. Hormonel Rinit

Bazı endokrinolojik hastalıklarda nazal konjesyon görülebilir. Bu hastalıklar; hipotroidi, menstrüel siklus, gebelik ve puberte gibi hastalıklardır [68].

2.5.5. İlaça Bağlı Rinit

Özellikle nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar ve asetilsalisilik asit lökotrienlerin ve eozinofillerin artmasına yol açar ve duyarlı insanlarda akut inflamatuvar yanıtlar oluşturarak klinik olarak astım atklarına, rinoreye, konjunktival hiperemiye ve uzun dönemde nazal polipozise neden olur [73]. Asetilsalisilik asite bağlı oluşan astım Samter sendromu olarak bilinir. Ayrıca klonidin, guanetidin ve metildopa gibi ilaçlar, nörojenik mekanizmalarla konjesyon ve rinoreye yol açabilir. Nazal dekonjestanların uzun süreli kullanımı, burun epitel erozyonu, silya kaybı ve ödemle kendini gösteren ve rinitis medikamentoza olarak tanımlanan reaksiyonel nazal tıkanmaya sebep olur [74].

2.5.6. Eozinofili ile Seyreden Nonallerjik Rinit Sendromu (Nonallergic Rhinitis with Eosinophilia Syndrome; NARES)

Asetilsalisilik asit duyarlılığının erken formu olduğu düşünülmektedir. Atopi görülmez ancak nazal sürüntüde eozinofiller sıklıkla $> \%20$ 'dir. Klinikte hapsirik, kaşıntı, rinore ve anozmi eşlik eder. Eozinofiller epitel hücrelerde sitotoksik özellik gösterirler [75].

2.5.7. Fiziksel ve Kimyasal Faktörlere Bağlı Nazal Semptomlar

Ortam sıcaklığının ani değişimi, sigara içiciliği, kimyasallar, egzersiz ve soğuk hava nazal semptomlarla kendini gösterebilir [76].

2.5.8. Besin Tarafından Tetiklenen Rinit

Besin allerjisinde hapsirik ve kaşıntı yoktur. Özellikle kapsaisin içeren acı ve baharatlı gıda tüketiminden sonra burunda şeffaf bir akıntı gerçekleşir. Bu da nöronal sistemin uyarılması ve nöropeptitlerin salınımı ile gerçekleşir [77].

2.5.9. Atrofik Rinit

Nazal mukozanın ve altındaki kemiğin atrofisi nedeniyle oluşur. Sık sık geçirilen üst solunum yolları enfeksiyonları ve sık olunan sinüs cerrahileri bu duruma neden olabilir [78].

2.5.10. Emosyonel Rinit

Stres ya da duygusal faktörler ile tetiklenir ve otonomik uyarı ile burnu tetikleyerek ortaya çıkar [78].

2.5.11. Yaşlılık Riniti

Yaşlanma etkisiyle burun mukozası ve silialarındaki değişiklikler şeffaf burun akıntısını tetikleyerek rinit tabolasunu başlatmaktadır. Yaşa bağlı değişiklikler ile oluştuğu için tedavisi zordur [78].

2.5.12. Allerjik Rinit

Allerjik Rinit (AR), allerjenlere maruz kalan bireylerde nazal mukozanın allerjik inflamasyonu ile karakterize, bulaşıcı olmayan, inflamatuvar bir hastalıktır [79]. Allerjik Rinitte hapşıрма, kaşıntılı damak, burun akıntısı ve burun tıkanıklığı görülmektedir. Bu etkiler ise IgE aracılı mast hücre degranülasyonu sonucu oluşmaktadır. Sonuç olarak da kaşıntılı gözler, gözlerde yanma ve kızarıklık, sulanma ve yanma gibi semptomlar ortaya çıkar [80]. AR'ye çoğunlukla astım atakları eşlik eder. Tanı için serum IgE, IgG ve IgA düzeyleri önemli olduğu gibi özel muayene ve klinik bulguları da çok önemlidir.

Allerjik Rinit toplumda sık görülen ve yaşam kalitesini ciddi olarak etkileyen bir hastalıktır. Son yıllarda AR insidansında keskin artışlar saptanmıştır. Dünya çapında nüfusun %10 ile %20 sini etkilemektedir [81]. Bununla beraber tabiki epidemiyolojik olarak değişiklikler göstermektedir. Örneğin; Amerikalı yetişkinlerde AR prevalansı %10-30 [68], astım etkisiyle birlikte AR prevalansı Avrupa ve ABD'nin genel popülasyonunda %40-50 ve Çin ankarasında %4-38 civarındadır. Ayrıca ailede atopi ve rinit öyküsü olanlarda AR'nin görülme olasılığı daha da yüksektir [82].

Allerjik Rinit, burun mukozası inflamasyonu hastalığıdır. Allerjen ile karşılaşıldığında TipI aracılı IgE tipi antikor ile karakterize reaksiyondur. Allerjik Rinitte görülen semptomlar; burunda akıntı, hapşırık, gözlerde kızarıklık ve yanma, nazal mukozanın enflamasyonu sonucu oluşmaktadır. Amerika Birleşik Devletlerinde en sık görülen kronik hastalık olduğu bildirilmiştir [83]. Toplumda sık görülmesi ve prevalansının yüksek olması, yaşam kalitesini ciddi düzeyde etkilemesi hastalığın iyileştirilmesi açısından oldukça büyük önem teşkil etmektedir. Allerji tedavisinde günümüzde de kullanılan, glukokortikosteroid tedavisi ve AİT olmak üzere başlıca iki tedavi olasılığı vardır. Glukokortikosteroid tedavisi; hastalığı tamamen iyileştirmeden sadece inflamasyona odaklı etkili bir tedavi şeklidir. AİT ise, hastalığın temel mekanizmaları üzerinde etkilidir. Bu nedenle hastalığın seyrini tamamen değiştirebilir. Glukokortikosteroid tedavisi, Treg hücre indüklemeye kapasitesi yoluyla bazı tolerans

indükleyici etkiler gösterse de, AİT, iyileşme ve allerjen toleransının başlaması, uzun süre devam etmesi ve tedavinin kesilmesinden sonra bile iyileşme durumunun devam etmesini sağlayan tek tedavi seçeneği olarak kabul edilir [84]. 100 yıldan uzun bir geçmişe sahip olmasına rağmen, hala sadece az sayıda hasta AİT ile tedavi edilebilmektedir. Bunun nedeni yüksek maliyet, uzun tedavi süresinin gerekliliği, standardizasyon ve etkinliktir. Ancak son on yılda bu sorunlar ile ilgili de önemli gelişmeler yaşanmıştır [85].

2.6. Allerjene Özgü İmmünoterapi (AİT)

Allerjene özgü immünoterapi, AR, astım, besin ve arı zehiri allerjisi gibi allerjik hastalıklarda kullanılan etkili bir tedavi biçimidir. Allerjik hastalıkların tedavisinin kontrol altına alınmasındaki en büyük zorluk hastalığın heterojen bir yapıya sahip olmasıdır. Bu nedenle hastalığın fenotiplendirilmesi, klinik ve morfolojik olarak sınıflandırılması tedavi açısından kolaylık sağlayacaktır. Ancak hastalığın fenotipik özelliklerinin immünolojik mekanizmalar ile ilişkisi henüz tam olarak bilinmemektedir.. AİT'in AR seyrine etkisi, inflamasyon ve tolerans kavşağındaki katılımı halen detaylı araştırmaların konusudur [86]. Hastalık ile ilgili biyobelirteçler belirlenmeli ve AİT hangi biyobelirteçlere nasıl yanıt veriyor tespit edilmelidir. Böylece daha en başta hastalık tanısında kullanılan biyobelirteçlere göre AİT tedavisi başlanmış olunacaktır. Bu durum hem zaman kaybını önlemeye hem de yüksek maliyetlerle uygulanan bu tedavinin boşa gitmemesine olanak sağlayacaktır [62].

Deneysel çalışmalarda, yüksek doz allerjene maruziyet ve allerjen immünoterapi sonucunda allerjen toleransını tetikleyen fonksiyonel özgül regülatör T ve B hücre oluşumu gösterilmiştir [34, 41, 46, 61, 87].

Allerjik Rinit'li hastalarda AİT tedavisi ile hem mevsimsel hem de sürekli olan şikayetlerde iyileşme gözlemlenmiş ve yaşam kalitesi arttırılmıştır. Sub-kutan AİT (SCIT) ve sub-lingual AİT (SLIT) olmak üzere iki farklı AİT yöntemi vardır. AR ve astım hastalarında her iki yöntemde kullanılabilir, güvenli ve etkilidir. Yapılan çalışmalar AR'li hastalarda SCIT ya da SLIT yöntemi ile tedavi başlangıcından yaklaşık 2-4 ay sonra iyileşmenin başladığı ve semptomların azaldığı rapor edilmiştir [52, 88].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubu

Çalışmaya üç grup dâhil edilmiştir. Birinci grup, ev tozu akarına yanıtı olup allerjik rinit tanısı almış, en az 2 yıl AİT almakta olanlardan oluşmaktadır. İkinci grup, ev tozu akarına yanıtı olup allerjik rinit tanısı almış ancak henüz AİT'e başlanmamış hastalardan oluşmaktadır. Üçüncü grup ise allerjik hastalığı olmadığı bilinen sağlıklı kontrol grubudur.

3.2. Hasta ve Kontrol Gruplarının Seçimi

Çalışma, İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü İmmünoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Çalışma, İstanbul Tıp Fakültesi Yerel Etik kurulunun 36719 numaralı kararı ile onaylanmış olup, çalışmaya katılan tüm hastalar ve sağlıklı bireyler, çalışmanın içeriği hakkında bilgilendirilmiş ve kendilerinden imzalı onay belgeleri alınmıştır. Hiçbir birey, çalışmanın herhangi bir aşamasında çalışmadan ayrılmamıştır.

Çalışmamıza; İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları AD, İmmünoloji ve Allerji BD'na başvurmuş ve sadece ev tozu akarına karşı AR tanısı almış fakat henüz immünoterapiye başlanmamış olan erişkin 27 hasta, AR tanısı konmuş medikal tedavi ile kontrol altına alınamayan ve en az 2 yıl alerjene özgü immünoterapi görmüş olan erişkin 25 hasta, ve allerjik hastalığı veya otoimmün bir hastalığının olmadığı bilinen 25 erişkin sağlıklı kontrol grubu dâhil edilmiştir.

Olgular; İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları A.D. İmmünoloji ve Allerji B.D.'ndan sağlanmıştır. Hastaların demografik bulguları (yaş, boy, kilo) ile aile öyküsü, sigara kullanım öyküsü, eşlik eden hastalıklar, medikal tedavileri sorgulanmış, allerjik rinit tanısı Allergic Rhinitis and Its Impact on Asthma (ARIA) Allerjik Rinit kılavuzu [89] ve Türk Allerji Derneği Allerjik Rinit Tanı ve Tedavi Kılavuzuna göre çalışmaya katılan hekimler tarafından ayrıntılı hasta öyküsü ve yardımcı laboratuvar testlerine dayanılarak konulmuştur. Hasta öyküsü alınırken, yakınmalar semptom başlangıcından itibaren sorgulanarak her bir semptomun sıklığı

(devamlı veya epizodik), yılın hangi döneminde belirgin olduğu (mevsimsel, yıl boyu ve birlikteliği), süresi, ağırlaştırıcı etmenler, tetikleyiciler, daha önceki tedavileri ve tedaviye yanıtları sorgulanarak, hapşırık, burun akıntısı, göz bulguları (gözlerde kızarıklık, yaşarma ve kaşıntı), burun tıkanıklığı, kulak/damak bulguları (kulakta kaşıntı, damakta kaşıntı, işitmede azalma) semptomları tek tek kaydedilmiştir. Yardımcı tanı testleri olarak deri prik testleri ile özgül Immunoglobulin E (sIgE) kullanılmıştır. Ev tozu akarları (*dermatophagoides pteronyssinus*, *dermatophagoides farinae*), polenler (çayır, ağaç, yabani ot, hububat), mantarlar (*aspergillus fumigatus*, *alterneria alternata*), hayvan epitelleri (kedi, köpek) ve latexe karşı prik testleri uygulanmıştır. Allerjen ekstrası olarak AllergoPharma – Alk Abello, Germany allerjen ekstrasıları kullanılmıştır. Allerji prik testi öncesinde eğer antihistaminik kullanımı varsa, hastaların 1 hafta süreyle medikal tedavisine ara verilmiştir. Prik testleri her hastaya ön koldan uygulanmış ve pozitif kontrol olarak histamin, negatif kontrol olarak da salin çözeltisi kullanılmıştır. Test yapıldıktan 15-20 dakika sonra endürasyon çapı ve eşlik eden eritem değerlendirilmiştir. Endürasyon çapının ≥ 3 mm olması, histamine eşit veya daha büyük ödem çapı (histamin ≥ 3 mm) pozitif reaksiyon olarak kabul edilmiştir. Medikal tedaviye yanıtsız olup immunoterapi kullanan hastaların immunoterapi çeşitleri (Novohelisen depot 708-725 veya Alutard 510) kayıt altına alınmıştır. (Tüm hastalar immunoterapinin idame fazında olduklarından 1cc/aylık subkutan tedavisi altında idi). İmmunoterapinin en az 2 yılını dolduran 25 hastaya ev tozu akarları olan *dermatophagoides pteronyssinus* (d1), *dermatophagoides farinae* (d2)'ya karşı, immunoterapi kontrolü açısından allerji prik testleri yenilenmiştir. Çalışmaya dâhil edilen immunoterapi grubundaki hastaların immunoterapi öncesindeki d1, d2 sIgE ve total IgE düzeyleri hasta dosyalarından tek tek bakılarak kaydedilmiştir.

Hastaların AR semptom derecelerini değerlendirmek için Türkçeye de valide edilen Total Semptom Skoru-6 (TTS-6) [90] ve Visual Analog Skalası (VAS) kullanılmıştır [90]. TTS-6 da her bir semptom için (hapşırık, burun akıntısı, burun kaşıntısı, göz bulguları, kulak, damak kaşıntısı ile nazal konjesyon) 0 ile 3 arasında puanlama yapılmıştır. “0: semptom yok, 1: semptom var ancak hafif, 2: semptom var ancak gün içi tolere edilebilir, 3: belirgin semptom var, gün içi tolere edilemiyor” olarak kaydedilmiştir. VAS skalasında ise her bir semptom için hastalardan 0'dan 10'a kadar puan verilmesi istenmiştir. Sıfır puan semptom yok, 10 puan ise en yüksek semptom

puanı olarak kabul edilmiş ve <5'in altında olan semptomlar hafif, >5 üzerinde olan semptomlar ise orta/ağır olarak değerlendirilmiştir. Her iki grupta belirtilen skorlar çalışmaya dâhil edilen çalışanların gözetiminde yapılmıştır. AİT alan hastaların, AİT öncesi bazal TTS-6 ve VAS skorlarına dosya kayıtlarından ulaşılmıştır.

Her iki grubun medikal tedavilerini değerlendirmek amacıyla Medikasyon Skoru kullanılmıştır. Nazal ve/veya oral antihistaminik (AH) kullanımı 1 puan, intranasal kortikosteroid (INS) kullanımı 2 puan, Lökotrien reseptör antagonisti (LTRA) kullanımı 3 puan, LTRA ve INS kullanımı 4 puan, LTRA ve AH kullanımı 5 puan, LTRA, INS, AH kullanımı 6 puan ve oral kortikosteroid kullanımı 6 puan olarak puanlandırılmıştır. Her hastanın güncel medikasyon skoru kayıt altına alınırken, immunoterapi grubunun immunoterapi öncesi medikasyon skorlarına dosya kayıtlarından ulaşılmıştır.

Allerji öyküsü olan ve alerjen prik testlerinde sadece ev tozu akarlarına karşı pozitif reaksiyon veren hastalar çalışmaya dâhil edilmiş ve hastalardan ev tozu akarları olan dermatophagoides pteronyssinus (d1), dermatophagoides farinae (d2) için özgül Immunoglobulin E (sIgE), total IgE ölçümleri rutin olarak yapıldığı için klinik tarafından sağlanmıştır. Özgül IgE ve Total IgE (Çin, Snibe Maglubi kit) Enzim İmmunoassay (ELİSA) yöntemi ile bakılmıştır.

3.3. Periferik Kan Örneklerinin Alınması

Kan alımı, vacutainer sistemiyle gerçekleştirilmiştir. Klinik tarafından tanı konmuş ve henüz AİT başlamamış AR hastaları ve en az 2 yıldır AİT görmüş AR hastaları çalışmaya dâhil edilmiştir. Sağlıklı kontrol olgu örnekleri ise, herhangi bir sağlık sorunu bulunmayan gönüllü bireylerden sağlanmıştır. Kan alımı, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları AD kan alma birimi tarafından gerçekleştirmiştir. Her bir bireyden 2 ml Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)'li tüpe ve 5 ml jelli düz cam tüpe venöz kan örnekleri alınmıştır.

3.4. Kan Örneklerinin Laboratuvara Transferi

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları A.D., Allerji ve Klinik İmmünoloji Bilim Dalı'ndan alınan kan örnekleri, İ.Ü. Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji A.D. Laboratuvarı'na, oda ısısında, herhangi bir buz

aküsü kullanılmadan ulaştırılmıştır. Kan örneklerinde pıhtı bulunması, örneklerin hemolizli olması gibi etkenler örneklerin dışlanma kriterlerindendir. Dışlanan örnekler yerine yeni örnekler çalışmaya dâhil edilmiştir. Laboratuvara getirilen kan örneklerinden EDTA'lı tüplere alınan örnekler akan hücre ölçer cihazında fenotiplendirme için hemen çalışılmış, düz cam tüpe alınan kan örnekleri, ELISA yöntemi ile tespit edilecek sIgG4 testi için kullanılmak üzere sanrtifüjde 3000 rpm'de 5dak çevirilerek serum izolasyonu sağlanmış ve daha sonra teste alınmak üzere -20 derecede alikotlanarak saklanmıştır.

3.5. Akan Hücre Ölçer ile Regülatör T ve B Hücre Fenotiplerinin Belirlenmesi

Bu basamaktaki deneyler İ.Ü. Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji A.D. laboratuvarlarında yapılmıştır.

Treg hücre ve Breg hücreleri karakterizasyonu için belirlediğimiz alt gruplara özel antikorlar ve boyalar aşağıdaki tabloda gösterildiği gibi seçilmiştir.

Tablo 3-1: Lenfositlerin İmmün Fenotiplenmesinde Kullanılan Monoklonal Antikorlar

Kullanılan Antikorlar	Kullanılan Boyalar	Antikor Miktarları
Anti-CD3	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	5 µl
Anti-CD25	Phycoerythrin PE	5 µl
Anti-CD19	PE-Cy5	4 µl
Anti-CD73	PE-Cy7	5 µl
Anti-CD71	APC	3 µl
Anti-CD38	ALEXA 700	5 µl
Anti-CD4	APC-Cy7	5 µl
Anti-CD24	brilliant-violet 421	3 µl
Anti-CD127	brilliant-violet-510	5 µl
Anti-CD27	brilliant-violet-711	5 µl

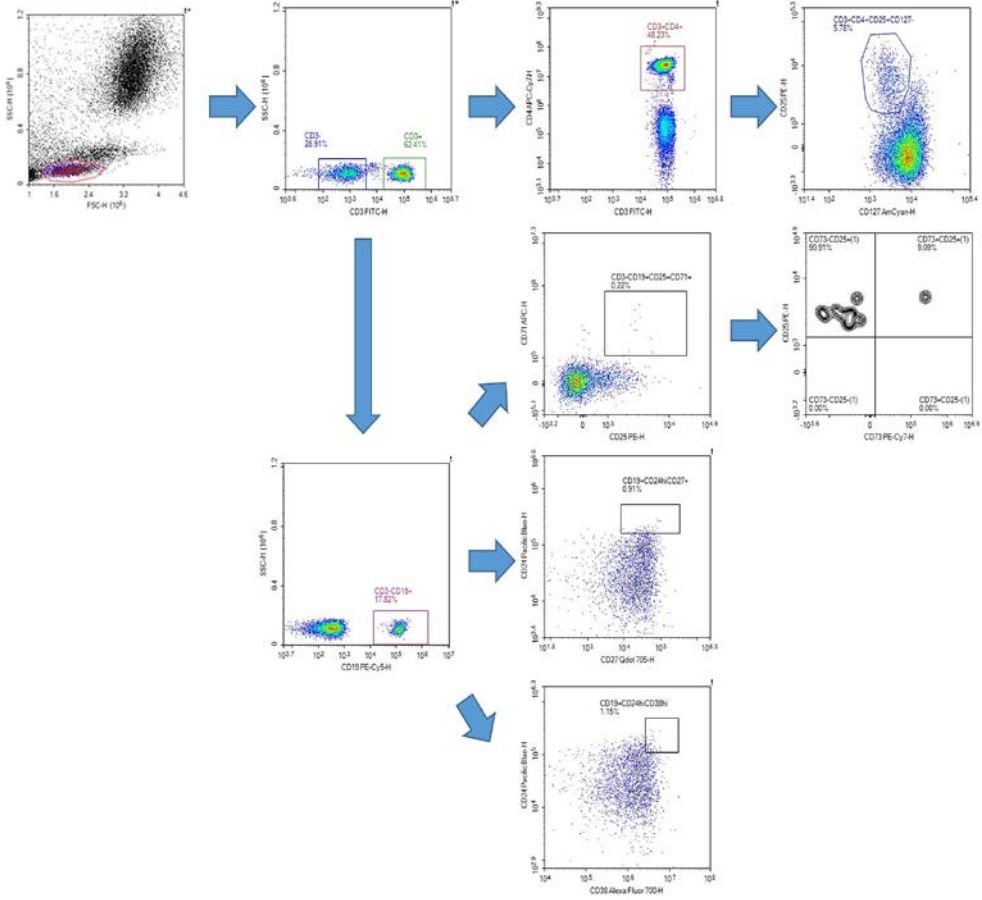
Çalışmaya sağlıklı bir kişiden alınan kan ile uygun boyama şartları standardize edilerek başlanmıştır. İlk grup olarak en az 2 yıl boyunca AİT almış hastalar çağrılmış ve hem AR tanısı almış ancak henüz aşı tedavisine başlanmamış grup, hem de sağlıklı kontrol gruplarının cinsiyet ve yaş seçimi için öncelikli tercih edilmiştir.

Hedef gösterdiğimiz tüm hücre gruplarının tek bir tüpte boyanması sağlanmıştır. Bunun için gerekli uygun antikor ve boyalar tablo 3-1'de gösterilmiştir. Tüplere pipetlenen antikor miktarları deney başlangıcında yapılan optimizasyon çalışmasında, bir seri dilüsyon çalışmaları ile belirlenmiştir.

Buna göre;

- Her hasta veya kontrol örnekleri için bir tüp boyama yapılmıştır.
- Yukarıda belirtilen antikolar belirtilen miktarlarda aynı tüp içerisine pipetlenmiştir.
- Üzerine hasta veya kontrol grubunda EDTA'lı tüplere alınan periferik kan örneklerinden 100 µl pipetlenmiştir.
- Tüpler bir karıştırıcı yardımı ile karıştırılarak karanlık ortamda ve oda ısısında 20 dakika inkübe edilmiştir.
- Üzerine 1ml 1X RBC Lysis Buffer solusyonu (Biolegend, UK) eklenmiş, karanlık ortamda ve oda ısısında 15 dakika inkübe edilmiştir.
- Üzerine 2 ml yıkama solüsyonu (Becton, Dickinson and Company, USA) eklenerek 1800 rpm'de 5 dak santrifüj edilmiştir.
- Santrifüjden çıkan tüpler ters çevrilerek dökülerek süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- İki ml yıkama solüsyonu eklenerek 1800 rpm'de 5 dak santrifüj edilmiş, bu basamak 2 kez tekrarlanmıştır.
- Santrifüjden çıkan tüpler ters çevrilerek dökülerek süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- Üzerine 300 µl dilüsyon solüsyonu (Becton, Dickinson and Company, USA) eklenerek karıştırılarak cihazda değerlendirilmiştir.

Çalışmada; $CD3^+CD4^+CD25^+CD127^-$ regülatör T hücre grubu ve üç ayrı regülatör B hücre grubu ($CD19^+CD25^+CD71^+CD73^-$, $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$, $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$ veri analizleri cihaz yazılımı ile değerlendirilerek istatistiksel olarak değerlendirmeye alınmıştır.



Şekil 3-1: Akan Hücre Ölçer ile Veri Analizi.

Bir sağlıklı kontrole ait akan hücre ölçer çıktısında kapılama stratejisi örneklerle gösterilmiştir. Değerlendirmeye alınan hücre gruplarının taşıdığı antijenler, bulunduğu yer ve görevleri Tablo-3-2’de özetlenmiştir.

Tablo 3-2: Fenotiplendirilen Hücre Yüzey Antijenleri ve Görevleri

Bu tablodaki veriler, <https://www.abcam.com/primary-antibodies/human-cd-antigen-guide> adresinden alıntılanmıştır.

Hücre Yüzey Antijeni	Bulunduğu Yer	Görevi
CD3	Olgun T hücrelerinde ve timositlerde bulunur.	Hem yardımcı hem de sitotoksik T hücrelerinde aktive edici ko-reseptördür. TCR oluşumunu düzenler.
CD4	Timositlerde, yardımcı T hücrelerinde, regülatör T hücrelerinde, monosit, makrofaj ve dentritik hücrelerde bulunur.	Ko-reseptördür ve antijen sunan hücrede MHC-II'ye bağlanarak T hücrelerini aktive eder. Timik farklılaşmayı sağlar, HIV için belirteçtir.
CD19 (B lenfosit yüzey antijeni)	Plazma hücresi hariç tüm B hücrelerinde ve foliküler dentritik hücrelerde bulunur.	B hücre gelişimini, farklılaşmasını ve aktivasyonunu sağlar, sinyal iletiminde görev alır
CD25 (IL-2R)	Aktive T ve B hücrelerinde bazı timositlerde, Pre-B hücrelerinde, regülatör T hücrelerinde ve oligodentrositlerde bulunur.	IL-2 sitokinin reseptörüdür.
CD27 (TNF Reseptör süper aile üyesi)	T hücrelerinde B hücre altgruplarında, medullar timositte ve NK hücrelerinde bulunur.	T ve B hücre aktivasyonunda ko-stimulatör moleküldür.
CD38 (ADP ribozil siklaz1)	Hematopoietik hücrelerin çoğunda, plazma hücrelerinde, erken T ve B hücrelerinde, germinal merkez B hücrelerinde bulunur.	Tip II transmembran proteinidir. Hücre aktivasyonu, çoğalması ve adezyonundan sorumludur.
CD71 (tranferrin reseptör protein 1)	Çoğalan hücrelerde, retikülositlerde, eritroid öncüleri ve aktive edilmiş lökositlerde bulunur.	Hücre çoğalması sırasında demir alımını kontrol eder.
CD73 (5' nükleotidaz)	B ve T hücre alt gruplarında, endotel hücrelerinde, epitel hücrelerinde, dentritik hücrelerinde bulunur	Nükleotidleri fosforile eder
CD127 (IL-7R)	B hücre öncülerinde, olgun T hücreleri, timositlerde ve monositlerde bulunur.	IL-7 için reseptör görevi vardır.

3.6. ELISA ile Allerjene Özgü IgE ve IgG4 Değerlerinin Belirlenmesi

Allerjene özgü immünoterapide kullanılan ev tozu akarı allerjenleri olan d1 ve d2'ye karşı IgE ve IgG4 düzeylerinin ölçülmesi, hastaların allerjik durumlarının gösterilmesi, AİT sonucunda sIgG4 oluşumunun gösterilebilmesi ve sağlıklı kontrollerin değerlendirilebilmeleri açısından önem taşımaktadır. sIgG4 düzeyleri sayesinde AİT'in başarısının gösterilmesi hedeflenmiştir.

Bu amaçla, hastalardan alınan kan örneklerinin akan hücre ölçer çalışmaları yapılırken aynı anda serum örnekleri de sIgE ve sIgG4 düzeyleri tespit edilmek üzere izole edilmiştir. sIgE düzeyleri rutin olarak klinik tarafından çalıştırılmış ve hasta dosyalarına işlenmiştir. sIgG4 düzeyi için ise ilgili allerjenler ve sIgG4 ELİSA kiti aşağıdaki yöntemle göre çalışılmıştır.

3.6.1. Allerjene Özgü IgG4 ELISA

Kullandığımız AllergenA sIgG4 kiti (RADIM Dialab Services, Italy), iki tip enzim-linked immünoabsorbant assay (ELISA) modeli içermektedir. Standartlar ve kontroller için Sandwich yöntemi kullanılırken örnekler için indirekt yöntem kullanılmaktadır. Çalışma aşağıdaki basamaklarla gerçekleştirilmiştir.

1. Kit buzdolabından çıkarılmış ve tüm solüsyonlar oda ısısına gelinceye kadar bekletilmiştir. Mikro plak paketinden çıkarılmadan en az 30 dakika oda ısısında bekletilmiş, kullanılacağı zaman fermuarlı kısım açılarak çıkartılmıştır.

NOT: Kalibratörler(1-6) ve Kontrol serumları ile, Konjugat1 (Conj E1), Konjugat2 (Conj E2), örnek dilüent (DIL), Tampon(BUF AS), substrat (SUBS), stop solüsyonu (STOP) kullanıma hazırdır. Yıkama solüsyonu (WASH 20X) kullanılmadan hemen önce 1X'e dilüe edilmiştir.

Örnek Hazırlama: daha önce 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek izole edilen serum örnekleri 25 kez seyreltilerek kullanılmıştır. (10 µl örnek serumu üzerine 240 µl örnek dilüenti (DIL) eklenir).

2. 96'lık plakin A1 ve A2 kuyucukları Blank için boş bırakılmıştır.
3. Tüm kuyucuklara 100 µl Assay Buffer pipetlenmiştir.

4. 1. ve 2. sıraya kalibratörler (1-6) ve Kontrol serumları çift kuyucuk olacak şekilde 50 µl pipetlenmiş, 3.sıradan itibaren her kuyucuğa tek olmak üzere 50 µl örnek hazırlama protokolüne göre hazırlanmış örnek serumları dağıtılmıştır.
5. 1. ve 2. sırada bulunan kalibratör ve kontrol serumu üzerine 50 µl CONJ E1 pipetlenmiştir.
6. Serum dağıtılan 3 sıradan sonraki her örnek üzerine daha önce hazırlanan mix allerjen örneğinden 70 µl pipetlenmiştir.

Mix allerjen hazırlanması: Örnek başına 35 µl d1+ 35u µl d2 pipetlenir homojen olarak karıştırılmış ve kuyucuk başına 70 µl pipetlenmiştir.

7. Plak 37 °C’de 60 dakika çalkalayıcı üzerinde (500-800rpm) inkübe edilmiştir.

Not: Kalibratörler, kontroller ve örnek serumlarının dağıtılıp inkübasyona bırakılması için geçen süre toplamda 15 dakikayı geçmemelidir.

8. Inkübasyon sonunda plak test çevrilerek dökülmüş ve 300 µl Wash buffer (1X) ile 5 kere yıkama yapılmıştır.
9. Son yıkamadan sonra, kurutma kağıdına emdirilerek kurutulan kuyucuklar üzerine 150 µl CONJ E2 eklenmiştir (Blank kuyucuklar hariç).
10. Plak 37 °C’de 30 dakika çalkalayıcı üzerinde (500-800rpm) inkübe edilmiştir.
11. 8. basamak tekrar edilmiştir.
12. Her kuyucuğa 100 µl SUBS eklenerek 37 °C’de 15 dakika çalkalayıcı üzerinde (500-800rpm) fakat bu sefer karanlıkta inkübe edilmiştir.
13. Her kuyucuğa 100 µl STOP solüsyonu eklenerek oda ısısında çalkalayıcı üzerinde 1-2 dakika beklenmiştir.
14. 450 ve 405 nm’de iki ayrı okuma yapılmıştır.

SIgG4 değerlendirmesi yaparken iki standart eğri çizilmesi gerekmiştir. Kalibratör 1-6 450 nm’de değerlendirilirken, kalibratör 6, 405 nm’de

değerlendirilmiştir. Sonuçlar analiz edilirken Blank 0,09'dan küçük olmalıdır. Ölçülen serum OD değerleri 2,3'den küçük ise 450nm'de oluşturulan standart eğri, büyük ise 405nm'de oluşturulan standart eğri kullanılmıştır.

3.7. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışma istatistiklerinin değerlendirilmesinde IBM SPSS Statistics 21, grafiklerin oluşturulmasında ise Graphpad Prism 5 yazılımları kullanılmıştır. Çalışma gruplarının normal dağılıma uygunlukları Kolmogorov-Smirnov Testi ile değerlendirilmiştir. Normal dağılıma uyan veriler, ikili karşılaştırmalarda bağımsız gruplar için T testi, üç gruplu karşılaştırmalarda ise ANOVA Testi ve post-hoc test olarak Tukey testi ile değerlendirilmiştir. Normal dağılıma uymayan grupların analizleri ise, ikili gruplarda non-parametrik Mann-Whitney testi, üçlü gruplarda ise ANOVA Testi ve post-hoc test olarak Dunnett Testi ile değerlendirilmiştir. Korelasyonlar Spearman Testi ile değerlendirilmiştir. ($p < 0.05$) istatistiksel anlamlılık derecesi olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Klinik ve Laboratuvar Bulgular

Çalışmaya AR tanısı almış 52 hasta dâhil edilmiştir. Bunlardan 25'i AİT alan ve 27'si AİT başlanmamış hasta grubudur. AİT alan 25 hastanın AİT süreleri 22-42 ay aralığındadır. İmmünoterapi almış hastaların 18'i kadın ve 7'si erkek hastadan oluşmaktadır. AİT tedavisi başlanmamış 27 hastanın ise 22'si kadın ve 5'i erkek hastadan oluşmaktadır. Ayrıca 18 kadın 7 erkek olmak üzere 25 sağlıklı kontrol grubu çalışmaya dâhil edilmiştir. AİT alan hasta grubun yaş ortalaması $41,40 \pm 14,44$ iken, AİT almayan hasta grubunun yaş ortalaması $31,70 \pm 13,46$ 'dır. Sağlıklı kontrol grubu yaş ortalaması ise $38,91 \pm 10$ 'dur. AR hastalık süreleri, AİT alanlarda 60 (34-240) ay iken, almayanlarda ise 48 ay (12-240)'dır. Tüm bu bilgiler ile birlikte hastaların aile öyküleri ile ek hastalık öyküleri de tablo 4.1'de özetlenmiştir.

Tablo 4-1: Çalışmaya Katılan Hastalara Ait Demografik Veriler

Özellikler	İmmünoterapi alan n= 25	İmmünoterapi almayan n=27	Kontrol n=25	p
Yaş (ortalama $\pm$ SD, yıl)	41,40 $\pm$ 14,44	31,70 $\pm$ 13,46	38,91 $\pm$ 10,67	0,025
Cinsiyet (n)				
Kadın (n,%)	18 (%72)	22(%81.5)	18 (%72)	0,671
Erkek (n,%)	7 (%28)	5 (%18.5)	7 (%28)	
Aile öyküsü (n,%)	9 (%36)	14 (%51.9)	-	0,250
Ek hastalık öyküsü (n,%)	17 (%68)	12 (%44.4)	-	0,760
Astım (n)	11	8		
İlaç Allerjisi (n)	1	0		
Nazal polipozis (n)	1	0		
Ürtiker (n)	2	1		
Atopik dermatit (n)	2	0		
Diğer (hiperlipidemi, hipertansiyon, hipotiroidi)	6	3		
Allerjik rinit süresi □ay, median (min-max)□	60 (34-240)	48 (12-240)	-	0,117

Polikliniğe başvuran hastaların şikayetleri dinlenerek oluşturulan tedavi öncesi medikasyon skorları, VAS skorları ve semptom skorları hasta dosyalarından temin edilmiştir. Tedavi öncesinde tespit edilen total IgE ve SpIgE (d1, d2) değerleri de kayıt altına alınmıştır. Çalışmaya dâhil edilen 25 AİT gurubu hastanın tedavinin 22 ay ile -42. ay aralığında alınan kan örnekleri ile birlikte yeniden medikasyon skorları, VAS skorları, semptom skorları, total IgE ve SpIgE (d1 ve d2) değerleri hesaplanıp kaydedilmiştir. AİT alan hastaların AİT öncesi ve sonrası; medikasyon skorları, VAS skorları, semptom skorları, total IgE, SpIgE (d1 ve d2), SIgG4, CD19⁺CD25⁺CD71⁺CD73⁻, CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺, CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}, CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁻ değerleri Tablo4.2’de karşılaştırmalı olarak özetlenmiştir.

Tablo 4-2: Allerjik Rinitli Hastaların AİT Öncesi ve Çalışma Sırasında Tespit Edilen Klinik Skorları ve Laboratuvar Değerleri

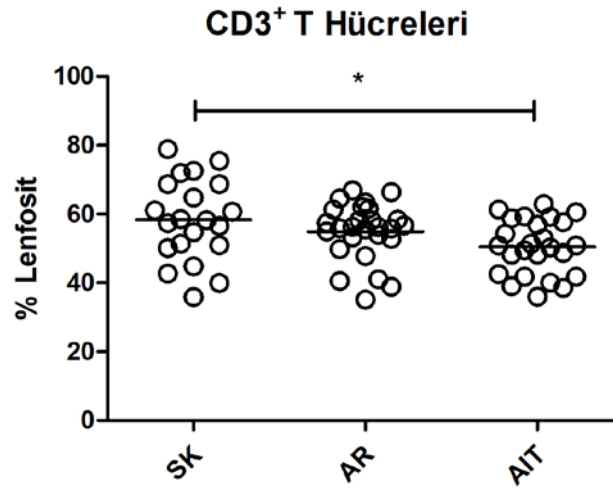
	AİT Öncesi	AİT (22-42 Ay)	p
Medikasyon skoru (mean±SD)	4,84±1,57	2,36±1,49	0,000
VAS (mean±SD)	4,36±3	1,68±1,37	<0,001
Semptom skoru (mean±SD)	11,00±2,87	7,73±4,14	0,000
Total IgE (median/min-max)	198 (108-987)	225 (79-1303)	0,925
d1 spesifik IgE (median(min-max)	4,93 (0,39-208)	4,74 (0,10-100)	0,290
d2 spesifik IgE (median/min-max)	4,82 (0,11-111)	4,25 (0,19-100)	0,339
SIgG4 (mean±SD)	320,42±320,92	1056,37±647,10	<0,001
CD19⁺CD25⁺CD71⁺CD73⁻,	1,67±1,05	2,32±1,38	<0,05
CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺	56,89±14,00	39,31±15,77	<0,001
CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}	1,03±0,95	2,07±1,15	<0,05
CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁻	6,04±1,83	4,87±1,44	<0,05

4.1.1. Akan Hücre Ölçer Bulguları

Akan hücre ölçer ile, $CD3^+$ T hücre grupları, $CD3^+CD4^+$ T hücre grupları, $CD3^+CD4^+CD25^+CD127^-$ regülatör T grupları, ve regülatör B hücre gruplarından Br1 $CD19^+CD25^+CD71^+CD73^-$ hücre grupları ile $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$ B hücre ve $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$ B hücre fenotipleri belirlenmiştir.

4.1.1.1. $CD3^+$ T Hücre Oranları

Sağlıklı kontrol grubu, AR hastaları ve AİT grubu arasında $CD3^+$ T hücreleri periferik kanda bulunma yüzdeleri açısından karşılaştırılmıştır. Şekil 4-1'e göre grupların değerleri birbirine yakın olmakla beraber AİT grubunun $CD3^+$ T hücre oranlarının sağlıklı kontrollere göre anlamlı şekilde azaldığı gözlenmiştir ($P < 0,05$).

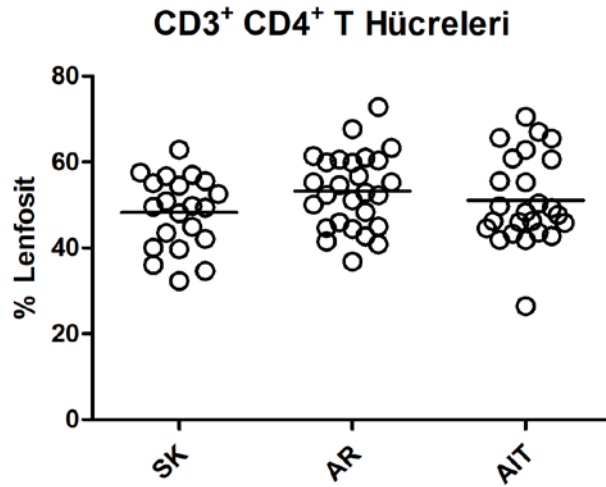


Şekil 4-1: Sağlıklı Kontrol, AR ve AİT Gruplarının $CD3^+$ T Hücre Dağılımları

Dağılım grafiğinde ortalama değerler ve bireyleri değerleri sunulmaktadır. SK: Sağlıklı kontrol, AR: AİT almamış allerjik rinit hastaları, AIT: allerjene özgü immünoterapi görmüş allerjik rinit hastaları. * $p < 0,05$.

4.1.1.2. CD3⁺CD4⁺ Yardımcı T Hücre Oranları

CD3⁺CD4⁺ T hücreleri, yardımcı T hücreleri olarak adlandırılırlar. Bu hücreler, adaptif immün yanıtların gelişmesinde anahtar rollere sahiptir. CD4⁺ T hücre oranları incelendiğinde, Şekil 4-2’de görüldüğü gibi sağlıklı kontroller, AİT almış AR hastaları ve henüz AİT’e başlanmamış AR hastaları arasında anlamlı fark gözlenmemiştir. Diğer bir deyişle, grupların değerleri birbirine benzerdir ve gruplar arasında istatistiksel fark yoktur ($P>0,05$).

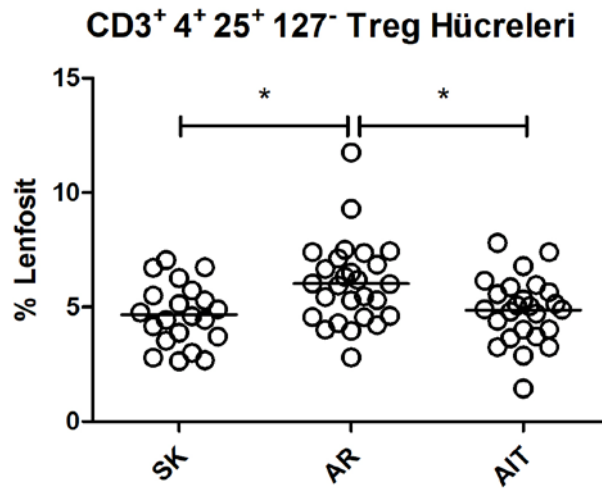


Şekil 4-2: Sağlıklı Kontrol, AR ve AİT Gruplarının CD3⁺CD4⁺ T Hücre Dağılımları

Dağılım grafiğinde ortalama değerler ve bireyleri değerleri sunulmaktadır. SK: Sağlıklı kontrol, AR: AİT almamış allerjik rinit hastaları, AIT: allerjene özgü immünoterapi almış allerjik rinit hastaları.

4.1.1.3. CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Regülatör T Hücre Oranları

CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁻ T hücreleri, Treg hücrelerinin bir çeşididir. Bu hücrelerin immün yanıtların baskılanmasında çok önemli rolleri bulunmaktadır. Çalışma gruplarında Treg hücre oranları incelendiğinde, AR hastalarının Treg oranlarının sağlıklı kontroller ve AİT görmüş AR hastalarına göre anlamlı derecede yüksek olduğu, sağlıklı kontroller ile AİT görmüş AR hastaları arasında ise herhangi bir istatistiksel fark bulunmadığı gözlenmiştir. Şekil 4-3'e göre sağlıklı kontrol ile AR hasta grubu arasında ve AR hasta grubu ile AİT grubu arasında ayrı ayrı istatistiksel olarak anlamlı farklar gösterilmiştir ($p < 0.05$).



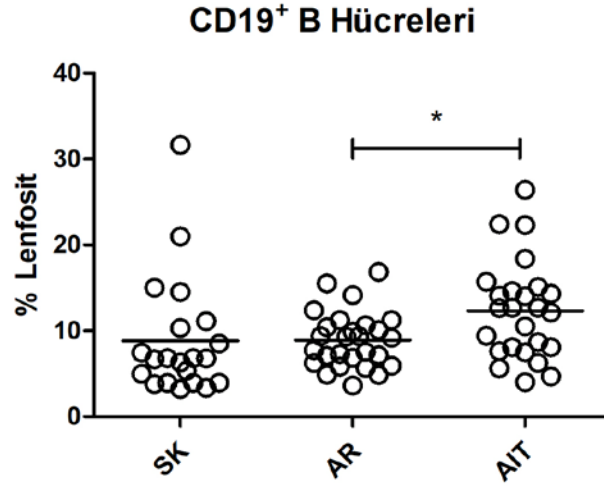
Şekil 4-3: Sağlıklı Kontrol, AR ve AİT Gruplarına Ait CD3⁺CD4⁺ CD25⁺CD127⁻ T Hücre Dağılımları

Dağılım grafiğinde ortalama değerler ve bireyleri değerleri sunulmaktadır. SK: Sağlıklı kontrol, AR: AİT almamış allerjik rinit hastaları, AIT: allerjene özgü immünoterapi görmüş allerjik rinit hastaları. * $p < 0,05$.

4.1.1.4. CD19⁺ B Hücre Oranları

CD19⁺ B hücreleri, antikor üretimleriyle patojene özgü immün yanıtların belirlenmesinde önemli rollere sahiptir. IgE izotipinde antikor üretimi, allerjik yanıtların başlayabilmesi için mutlaka gereklidir. Öte yandan, bu hücrelerin IgG4 üretmesi, allerjik hastalıklar açısından tolerans olarak algılanmakta, ölçülen sIgG4 düzeylerinin ise tolerans oluşumunda belirleyici olduğu bilinmektedir [43]. Çalışma gruplarında CD19⁺ B hücre oranları incelendiğinde, sağlıklı kontrollere göre AR hastalarında

istatistiksel anlamlılığa ulaşmayan bir artış gözlenmiş olup AİT almış AR hastalarında CD19⁺ B hücre oranları ise henüz immünoterapi görmemiş AR hastalarına göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde artmıştır. (Şekil 4-4) ($p < 0.05$).

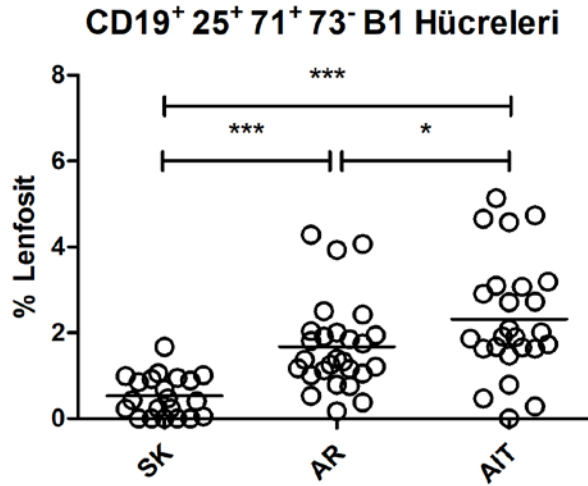


Şekil 4-4: Sağlıklı Kontrol, AR ve AİT Gruplarının CD3⁺CD19⁺ B hücre Değerleri

Dağılım grafiğinde ortalama değerler ve bireyleri değerleri sunulmaktadır. SK: Sağlıklı kontrol, AR: AİT almamış allerjik rinit hastaları, AIT: allerjene özgü immünoterapi almış allerjik rinit hastaları. * $p < 0,05$.

4.1.1.5. CD19⁺ CD25⁺ CD71⁺ CD73⁻ Regülatör B Hücre Oranları

CD19⁺CD25⁺CD71⁺CD73⁻ Breg hücrelerinin oranları Şekil 4-5'te özetlenmiştir. AİT görmemiş AR hastalarındaki oranların sağlıklı kontrollere göre ileri düzeyde anlamlı olarak arttığı ($p < 0.001$), söz konusu hücre oranlarının AİT almış AR hastalarında AİT almamışlara ve sağlıklı kontrollere göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak arttığı görülmüştür (sırasıyla $p < 0.05$ ve $p < 0.001$). Bu bulgular, CD19⁺CD25⁺CD71⁺CD73⁻ Breg hücrelerinin AİT'e cevaben güçlü biçimde uyarıldığını göstermektedir.

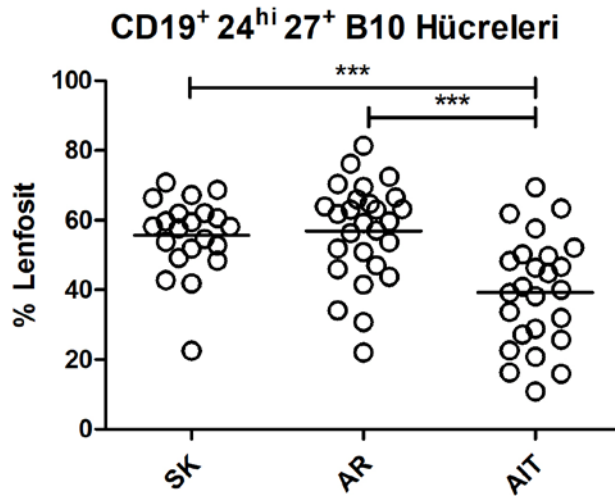


Şekil 4-5: Sağlıklı Kontrol, AR ve AİT Gruplarında CD19⁺CD25⁺CD71⁺CD73⁻ Regülatör B Hücre Dağılımları

Dağılım grafiğinde ortalama değerler ve bireyleri değerleri sunulmaktadır. SK: Sağlıklı kontrol, AR: AİT almamış allerjik rinit hastaları, AIT: allerjene özgü immünoterapi almış allerjik rinit hastaları. * $p < 0,05$, *** $p < 0.001$.

4.1.1.6. CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ Regülatör B Hücre Oranları

CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ fenotipindeki B Hücreleri, Breg hücrelerinin bir alt grubudur. Çalışma gruplarındaki oranlar Şekil 4-6'da gösterilmiştir. AİT almış AR hastalarında AİT almamış AR hastaları ve sağlıklı kontrollere göre anlamlı düzeyde azalma saptanmıştır (sırasıyla $p < 0.001$ ve $p < 0.001$).

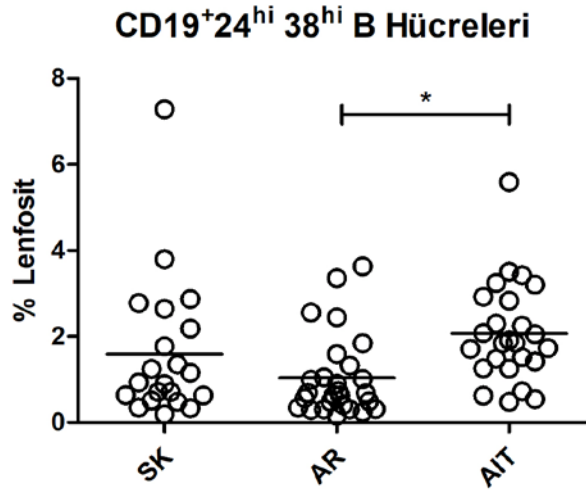


Şekil 4-6: Sağlıklı Kontrol, AR ve AİT Gruplarının CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ Regülatör B Hücre Değerleri

Dağılım grafiğinde ortalama değerler ve bireyleri değerleri sunulmaktadır. SK: Sağlıklı kontrol, AR: AİT almamış allerjik rinit hastaları, AIT: allerjene özgü immünoterapi almış allerjik rinit hastaları. *** $p < 0,001$.

4.1.1.7. CD19⁺ CD24^{hi} CD38^{hi} Regülatör B Hücre Oranları

Sağlıklı kontrol grubu, AR ve AİT grubu CD19⁺ CD24^{hi} CD38^{hi} regülatör B hücre periferik kanda bulunma oranları incelendiğinde AR grubu ile AİT grubu arasında istatistiksel bir artış gözlenmiştir (Şekil 4-7) ($P < 0,05$).



Şekil 4-7: CD19⁺ CD24^{hi} CD38^{hi} Regülatör B Hücrelerinin Sağlıklı kontrol, AR ve AİT Grupları Arasında Karşılaştırılması

Dağılım grafiğinde ortalama değerler ve bireyleri değerleri sunulmaktadır. SK: Sağlıklı kontrol, AR: AİT almamış allerjik rinit hastaları, AIT: allerjene özgü immünoterapi almış allerjik rinit hastaları. * $p < 0,05$.

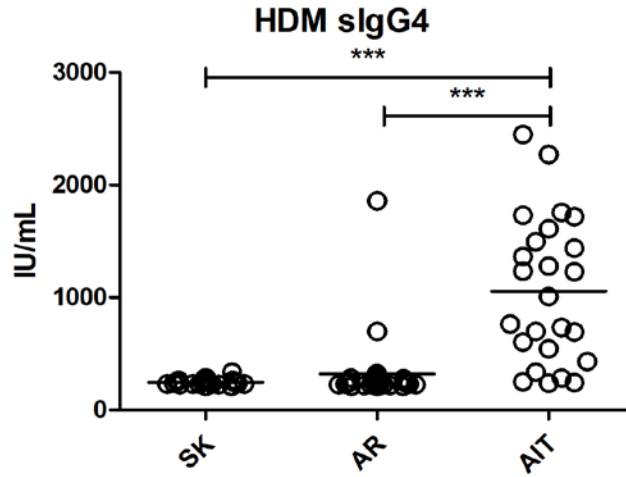
4.1.1.8. Çalışma Gruplarında Ev Tozu Akarına Özgü IgG4 Düzeyleri

Allerjik reaksiyonlarda koruyucu etki gösteren ve immünoterapi sonrası arttığı bilinen ev tozu akarına özgü IgG4 antikör serum seviyeleri, sağlıklı kontroller, AİT görmüş AR hastaları ve AİT görmemiş AR hastalarında ELİSA yöntemiyle değerlendirilmiştir (Şekil 4-8).



Şekil 4-8: AİT, AR ve Sağlık Kontrol Gruplarında sIgG4 Tespitinde ELISA Plak Görüntüsü

AR hastaları ile AİT grubu arasında ve sağlıklı kontrol grubu ile AİT grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$). Çalışma gruplarında ev tozu akarına özgü IgG4 düzeyleri AİT grubunda, AR ve sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p < 0.001$) (Şekil 4-9)



Şekil 4-9: Sağlıkli Kontrol, AR ve AİT Gruplarının Ev Tozu Akarına Özgü IgG4 Dağılımları

Dağılım grafiğinde ortalama değerler ve bireyleri değerleri sunulmaktadır. HDM: Ev tozu akarı allerjisi, sIgG4: allerjene özgü IgG4, SK: Sağlıkli kontrol, AR: AİT görmemiş allerjik rinit hastaları, AİT: allerjene özgü immünoterapi görmüş allerjik rinit hastaları. *** $p < 0,001$.

5. TARTIŞMA

Allerjik hastalıkların gelişmiş ülkelerdeki sıklığı her geçen yıl artmaktadır. Bu artıştan sorumlu mekanizmaların araştırılması, altta yatan mekanizmaların daha iyi anlaşılması sayesinde yeni tedavi olasılıklarının geliştirilebilmesi mümkün olabilecektir. Son yıllarda, kişiselleştirilmiş tıp uygulamalarının allerjik hastalıklar alanına da girmesi sayesinde en uygun hastaya, kişiye özel tasarlanmış en iyi tedavi imkânlarının sağlanabilmesi, hem hastalıkla mücadelede başarıyı arttırabilir, hem masrafların azalmasını getirebilir, hem de AİT başarısını daha da yükseltebilir. Allerjene özgü immünoterapi alanında son çalışmalar, daha kısa sürede tolerans uyarılmasını ve daha uzun süre sürdürülmesini hedeflemektedir. Modifiye allerjenlerin kullanılması, farklı uygulama yollarının denenmesi ve tıbbi tanıdaki gelişmeler sayesinde kişinin hastalık endotipine en uygun tedavilerin seçilmesi sayesinde bu hedeflere ulaşabilmek mümkün olabilir [62]. Ancak, allerjik hastalıkların mekanizmalarının daha net anlaşılması ve AİT'in etki mekanizmalarında halen net olmayan noktaların aydınlatılması ihtiyaçları, temel bilim araştırmalarının öneminin altını bir kez daha çizmektedir.

Allerjene özgü immünoterapinin sağladığı yanıtızlığın altında regülatör hücre gruplarının yattığı uzun zamandır bilinmektedir. AİT tedavisinin subkutenöz ya da sublingual olması farkına bakılmaksızın her iki şekilde de, monosensitize bireylerde yeni duyarlılaşmayı önlediği ve allerjik rinitli hastaların astım olma durumunu engellediği bilinmektedir [91]. AİT ile birlikte değişimleri takip etmek için bazı değişkenlere ihtiyaç bulunmaktadır. Klinikte hastanın tedaviden faydalanıp faydalanamadığını takip etmek için bazı skorlar takip edilmektedir Bunlar; toplam semptom skorları, medikasyon skorları veya VAS skorlarıdır [92]. Kliniğe başvuran hastaların şikâyetlerine göre bu skorlar oluşturulmakta ve tedavi ile birlikte takip edilmektedir. Retrospektif olarak yapılan birçok çalışmada en az bir yıldır AİT alan astım ve/veya allerjik rinit tanıli hastalarda semptom skorlarının, medikasyon skorlarının ve VAS skorlarının istatistiksel anlamda azaldığı tespit edilmiştir [93].

Türkiye'de de allerjik rinitli hastalarda AİT etkinliğini araştırmak için birtakım çalışmalar yapılmıştır. Çalışmalarda AİT alan hasta grubu ile ilaç tedavisi alan hasta grubu semptom skorları, deri prik testi, total ve spesifik IgE düzeyleri karşılaştırılmıştır.

Yapılan bir dizi çalışmaların sonunda semptom skorlarının ve deri prik testinin AİT etkinliğini ölçmek için kullanılabileceği sonucuna varılmıştır [92, 94]. Literatürden yola çıkarak, çalışmamızda biz de AİT tedavisi almış ve almamış hasta gruplarımızı, semptom skorları, medikasyon skorları, VAS skorları, total IgE ve allerjene özgül IgE'ler açısından karşılaştırarak elde edilen sonuçların regülatör T ve B hücreleri ile ilişkisini ortaya koymaya çalıştık. Çalışmamızda semptom skorlarının AİT grubunda $11,00 \pm 2,87$ 'den $7,73 \pm 4,14$ 'e ($P<0,05$), medikasyon skorlarının $4,84 \pm 1,57$ 'den $2,36 \pm 1,49$ 'a ($P<0,05$), VAS skorlarının $4,36 \pm 3$ 'ten $1,68 \pm 1,37$ 'ye ($P<0,05$), düştüğünü gördük. Total IgE ve özgül IgE parametrelerinde istatistiksel anlamda bir fark göremedik. Semptom, medikasyon ve VAS skorlarına göre uygulanan AİT tedavimizin etkin ve başarılı olduğunu düşünmekteyiz.

Literatür bilgilerimize göre etkin bir AİT tedavisinin diğer bir önemli biyobelirteci serum IgG4 düzeyleridir [95]. Allerjik hastalıklarda AİT ile tedavi sonrasında IgG4 serum düzeylerinin arttığı ve bu artışın üç farklı hipoteze dayandığı bildirilmiştir. Bunlardan ilki, AİT tedavisi ile birlikte regülatör T hücrelerinin aktivasyonu artar, IL-10 ve TGF-B salgılanır, IgG4 seviyeleri artar. Ancak burada IgG4'ün fonksiyonel etkinliğinden değil, IL-10'un regülatör T hücre aracılığı ile koruyuculuğundan bahsedilmiştir. İkincisi, klasik olarak bilinen yoldur. IgG4 IgE ile rekabet ederek bazofillere bağlanır ve bazofil aktivasyonunu engeller. Üçüncüsü ise, B hücreleri antikor yapımında ve sitokin üretiminde görevlidir. IgG4 üreten bir B hücresi IL-10 da salgılamaktadır. Ancak IgG4 üreten aynı B hücresinin aynı anda IL-10 salgılayıp salgılanmadığı bilinmemekle birlikte IL-10'un IgG4 oluşumunda önemli katkıları olduğu öne sürülmektedir [96].

AİT uygulanmış AR/astımlı çocuk hastalarda AİT'ten sonra 4.ay ve 12 ayda IgG4 düzeyleri artmış ve bu artışın klinik semptomlarla ters korele olduğu gösterilmiştir [97]. Bu çalışmaya göre AİT ile IgG4 serum düzeyleri yükselmiştir. SIgG4 antikorları, IgE-allerjen kompleksini oluşturmak için allerjenlere bağlanan özgül IgE ile rekabet halindedir. SIgG4 allerjene bağlanarak bazofil aktivasyonunu engeller. IgG4 allerjeni çapraz bağlayamadığı ve komplemanı aktive edemediği için blokan bir antikor olarak kabul edilmektedir [98].

Bizim çalışmamızda sIgG4, AİT grubunda, allerjik rinit ve sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$). Literatüre

bakıldığında IgG4'ün serum düzeylerinin başarılı bir AİT ile arttığı ortak sonuçtur. Ancak, hangi allerjik hastalık gruplarında ve ne kadar süre ile AİT uygulanacağı halen net değildir.

AİT'in sağladığı allerjene yanıtıslılığın altında regülatör hücre gruplarının yattığı uzun zamandır bilinmektedir. İlk olarak keşfedilen Treg hücrelerinden bugüne kadar NK, ASH, ILC gibi hücrelerin de regülatör alt grupları gösterilmiş olup regülatör B hücreleriyle ilgili bilgiler kısmen daha yeni ve henüz eksiktir [22].

Klasik literatür bilgilerimize göre regülatör T hücre alt grubunun (nTreg ve Tr1) allerjik hastalıklarda ve AİT grubunda sağlıklı kontrollere göre arttığı bilinmektedir [99]. Bizim çalışmamızda, CD3⁺ T hücrelerinde AİT grubunda sağlıklı kontrollere göre anlamlı düşüş gözlenmiş (p<0,05) ancak CD4⁺ T hücre oranları açısından gruplar arasında fark saptanmamıştır. Buna karşın, CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁻ T hücre grubu, AR grubunda sağlıklı kontrollere göre anlamlı bir artış (P<0,05) göstermiş olsa da, literatürün aksine AİT grubunda anlamlı bir azalma göstermiştir (P<0,05). Çalışmaya alınan hasta gruplarımızın uzun hastalık süresi göz önünde bulundurulduğunda, hasta gruplarında tolerans mekanizmasının belki de kendiliğinden geliştiği düşünülebilir. 2 yıldan daha fazla AİT verildiği düşünüldüğünde regülatör T hücrelerinin görevlerini regülatör B hücrelerine bıraktıkları düşünülebilir. Ancak bu konu ile ilgili daha fazla ve daha detaylı çalışmalara ihtiyaç olduğu görülmektedir.

Regülatör B hücre alt grupları ve ilişkili oldukları hastalık gruplarından faydalanılarak üç regülatör farklı B hücre grubu çalışmaya dâhil edilmiştir [32]. Bir B hücre belirteci olan ve regülatör B hücrelerinde de bulunan CD19 antijeni-taşıyan hücrelerin periferik kanda bulunma yüzdeleri sağlıklı kontrol, AİT almayan AR grubu ve AİT alan AR grubu açısından karşılaştırıldığında, sağlıklı kontroller ile AİT almayan AR grubu arasında periferik kanda bulunma yüzde değerleri açısından istatistiksel fark bulunamamıştır. AİT alan AR'li hastalar ile AİT almayan AR'li hastalar karşılaştırıldığında ise AİT alan grupta CD19⁺ B hücre oranlarının arttığı görülmüştür (P<0,05). 2017 yılında Çeliksoy ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada aktif CD19⁺ B hücre (CD19⁺CD38⁻CD21⁻) sayılarının AİT ile azaldığı bildirilmiştir [100]. Bu bulgu ile bu araştırmacılar AİT tedavisinde CD19⁺ B hücre sayısının biyobelirteç olabileceğini, hastanın tedavi yanıtının değerlendirilmesinde ve tedavinin süresine karar

verilmesinde etkin ve önemli bir belirteç olduğunu öne sürmüşlerdir. 2018 yılında Luo ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada ise CD19⁺ B hücre sayıları AİT olmaksızın, sağlıklı kontroller ile AR'li hastalar arasında karşılaştırılmış ve AR'li hastaların CD19⁺ B hücre sayılarının arttığı rapor edilmiştir [101]. Bizim çalışmamızda da CD19⁺ B hücrelerinin periferik kan yüzdeleri sağlıklı kontroller ile AR hastaları arasında karşılaştırıldığında, AR'li hastalarda sağlıklı kontrollere göre artış görünse de istatistiksel anlam ifade etmemektedir. Ancak çalışmamızda B hücre aktivasyon belirteçlerine bakılmamış sadece regülatör B hücre alt grupları için CD19 belirteci kullanılmıştır. AİT grubunda AİT almayan gruba göre anlamlı bir fark olması bu artış gösteren hücrelerin aktif B hücreleri değil regülatör B hücreleri olduğunu düşündürmektedir.

Regülatör B hücre belirteçleri ve sitokin salgıları ile ilgili günümüze kadar yapılmış pek çok çalışma vardır. Bu çalışmalar daha çok otoimmün hastalıklar ve enfeksiyon hastalıkları ile ilgilidir ya da transplantasyon gibi tolerans mekanizmaları ile ilişkilidir. Kolit, sedef hastalığı ya da böbrek transplantasyonlu hastalarda B hücre deplesyonu sağlanarak regülatör B hücrelerinin rolü aydınlatılmaya çalışılmıştır [31, 102]. Ancak allerjik hastalıklar ile ilgili yapılan çok fazla çalışma yoktur. Allerjik hastalıklarda uygulanan AİT'in IgG4 oluşumuna neden olduğu ve IL-10 artışı ile spesifik T ve B hücre yanıtına neden olduğu bilinmektedir [45]. IL-10 eksikliğinde kolit olduğu bilinmektedir [103]. IL-10 proinflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin salgılanmasını baskılar ve aynı zamanda antijen sunumunu inhibe eder [104]. IL-10 sitokininin hücrelerin yaşamlarını sürdürmelerinde, çoğalmalarında farklılaşmalarında ve izotip değişimde büyük önem taşıdığı bilinmektedir. IL-10'un IgG4 oluşmasına destek olduğu iddia edilmektedir [33].

Akdiş ve arkadaşları 2013 yılında yaptıkları çalışmada yüksek düzey IL-10 üreten regülatör B hücrelerinin Br1 (CD19⁺ CD25⁺ CD71⁺ CD73⁻) hücreleri olduğunu ve aynı zamanda IgG4 salgılayan hücreler olduğunu yüksek doz arı allerjisine maruz kalan arıcılar ile yaptıkları çalışmada göstermişlerdir [34]. Ayrıca Br1 hücreleri dışında allerjik rinitte regülasyonu sağlayan ve IL-10 salgılayan hücreler de tanımlanmıştır [45]. Bunlar; CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ ve CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} hücreleridir. Bu hücre gruplarının periferik kanda bulunma yüzdeleri çalışmalara göre farklılık göstermektedir. Kometura ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ hücreleri AR ve

astımlı hastalarda sağlık konrollere göre sayıca azalma göstermiştir. AR'li gruplarda $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$ hücrelerinin arttığını ve $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$ hücrelerinin azaldığını gösteren çalışma da vardır. [105]. AR'li hastalarda yapılan bir başka çalışmada ise Br1 ($CD19^+CD25^+CD71^+CD73^-$) hücrelerinin sağlıklı konrollere göre azaldığı raporlanmıştır [106]. Ancak, AİT tedavisi ile bu hücre gruplarının AR'li hastalarda ve sağlıklı kontrol gruplarında nasıl değiştiği halen bilinmemektedir. Çalışmamızda $CD19^+CD25^+CD71^+CD73^-$ Br1 hücrelerinin periferik kanda bulunma yüzdelerinin, AR hastalarında ve en az 22 ay AİT almış hastalarda sağlıklı kontrol grubuna göre artmış olması ilginç bir bulgudur. Akdiş ve arkadaşlarının [106] aksine bu Br1 hücre grubunun AR hastalarında sağlıklı kontrol grubuna göre artması toleransın allerjenle karşılaşmayla tetiklenmiş olabileceğini düşündürmektedir. Seçilen AR'li hasta gruplarında semptom sürelerinden AİT süreleri çıkarıldığında 70 ay hastalık süresi olduğu görülmektedir. Bu süreçte AİT almamış hastaların ilaç tedavisi alıp almadıkları bilinmemektedir.

Sonuç olarak, allerjik hastalık mekanizmalarının aydınlatılmasına yönelik çalışmalar, regülatör özelliğe sahip hücrelerin önemini gün geçtikçe daha fazla ortaya koymaktadır. Allerjik hastalıkların tanısına yönelik çalışmalarla beraber AİT mekanizmalarının daha iyi anlaşılması, doğru hasta gruplarının seçilmesi ve bunların doğru tedavi olanaklarına kavuşmasına yardım edebilir. Çalışmamızda değişimlerini saptadığımız Breg hücre alt gruplarıyla ilgili yapılacak daha detaylı fonksiyonel çalışmalar ile hem bu hücrelerin tanısal değerleri ortaya konulabilir, hem de gelecekte kişiye özgü tedavi olanaklarının geliştirilebilmesi için bu hücre grupları kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1. Palomares O., M. Akdis, M. Martin-Fontecha ve C.A. Akdis. Mechanisms of immune regulation in allergic diseases: the role of regulatory T and B cells. *Immunol Rev* 2017; **278**(1): 219-236.
2. Kucuksezer U.C., C. Ozdemir, M. Akdis ve C.A. Akdis. Influence of Innate Immunity on Immune Tolerance. *Acta Med Acad* 2020; **49**(2): 164-180.
3. Savage P.A., D.E.J. Klawon ve C.H. Miller. Regulatory T Cell Development. *Annu Rev Immunol* 2020; **38**: 421-453.
4. Boonpiyathad T., N. Meyer, M. Moniuszko, M. Sokolowska, A. Eljaszewicz, O.F. Wirz, ve ark. . High-dose bee venom exposure induces similar tolerogenic B-cell responses in allergic patients and healthy beekeepers. *Allergy* 2017; **72**(3): 407-415; Wang S., P. Xia, Y. Chen, Y. Qu, Z. Xiong, B. Ye, ve ark. . Regulatory Innate Lymphoid Cells Control Innate Intestinal Inflammation. *Cell* 2017; **171**(1): 201-216 e18.
5. Durand M. ve E. Segura. The known unknowns of the human dendritic cell network. *Front Immunol* 2015; **6**: 129.
6. Huang H., W. Dawicki, M. Lu, A. Nayyar, X. Zhang ve J.R. Gordon. Regulatory dendritic cell expression of MHCII and IL-10 are jointly requisite for induction of tolerance in a murine model of OVA-asthma. *Allergy* 2013; **68**(9): 1126-35.
7. Froidure A., C. Shen ve C. Pilette. Dendritic cells revisited in human allergic rhinitis and asthma. *Allergy* 2016; **71**(2): 137-48.
8. Gregori S., D. Tomasoni, V. Pacciani, M. Scirpoli, M. Battaglia, C.F. Magnani, ve ark. . Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood* 2010; **116**(6): 935-44.
9. Puan K.J., A.K. Andiappan, B. Lee, D. Kumar, T.S. Lai, G. Yeo, ve ark. . Systematic characterization of basophil anergy. *Allergy* 2017; **72**(3): 373-384.
10. Salmaninejad A., S.F. Valilou, A.G. Shabgah, S. Aslani, M. Alimardani, A. Pashdar, ve ark. . PD-1/PD-L1 pathway: Basic biology and role in cancer immunotherapy. *J Cell Physiol* 2019; **234**(10): 16824-16837.

11. Akbari O., P. Stock, A.K. Singh, V. Lombardi, W.L. Lee, G.J. Freeman, ve ark. . PD-L1 and PD-L2 modulate airway inflammation and iNKT-cell-dependent airway hyperreactivity in opposing directions. *Mucosal Immunol* 2010; **3**(1): 81-91.
12. Kucuksezer U.C., E. Aktas Cetin, F. Esen, I. Tahrali, N. Akdeniz, M.Y. Gelmez, ve ark. . The Role of Natural Killer Cells in Autoimmune Diseases. *Front Immunol* 2021; **12**: 622306.
13. Deniz G., G. Erten, U.C. Kucuksezer, D. Kocacik, C. Karagiannidis, E. Aktas, ve ark. . Regulatory NK cells suppress antigen-specific T cell responses. *J Immunol* 2008; **180**(2): 850-7.
14. Aktas E., G. Erten, U.C. Kucuksezer ve G. Deniz. Natural killer cells: versatile roles in autoimmune and infectious diseases. *Expert Rev Clin Immunol* 2009; **5**(4): 405-20.
15. Deniz G., M. Akdis, E. Aktas, K. Blaser ve C.A. Akdis. Human NK1 and NK2 subsets determined by purification of IFN-gamma-secreting and IFN-gamma-nonsecreting NK cells. *Eur J Immunol* 2002; **32**(3): 879-84.
16. Fauriat C., E.O. Long, H.G. Ljunggren ve Y.T. Bryceson. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* 2010; **115**(11): 2167-76.
17. Lao-Araya M., E. Steveling, G.W. Scadding, S.R. Durham ve M.H. Shamji. Seasonal increases in peripheral innate lymphoid type 2 cells are inhibited by subcutaneous grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2014; **134**(5): 1193-5 e4; Tenn M.W., J. Thiele, L.M. Steacy, D.E. Adams ve A.K. Ellis. Peripheral group 2 innate lymphoid cells are decreased following nasal allergen challenge in allergic rhinitis. *Allergy* 2019; **74**(2): 388-391.
18. Morita H., T. Kubo, B. Ruckert, A. Ravindran, M.B. Soyka, A.O. Rinaldi, ve ark. . Induction of human regulatory innate lymphoid cells from group 2 innate lymphoid cells by retinoic acid. *J Allergy Clin Immunol* 2019; **143**(6): 2190-2201 e9.
19. Peterson R.A. Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. *Toxicol Pathol* 2012; **40**(2): 186-204; Sakaguchi S. Regulatory T cells: history and perspective. *Methods Mol Biol* 2011; **707**: 3-

- 17; Sakaguchi S., T. Yamaguchi, T. Nomura ve M. Ono. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008; **133**(5): 775-87.
20. Calzada D., S. Baos, L. Cremades-Jimeno ve B. Cardaba. Immunological Mechanisms in Allergic Diseases and Allergen Tolerance: The Role of Treg Cells. *J Immunol Res* 2018; **2018**: 6012053.
21. Malek T.R., A. Yu, L. Zhu, T. Matsutani, D. Adeegbe ve A.L. Bayer. IL-2 family of cytokines in T regulatory cell development and homeostasis. *J Clin Immunol* 2008; **28**(6): 635-9.
22. Kucuksezer U.C., C. Ozdemir, L. Cevhertas, I. Ogulur, M. Akdis ve C.A. Akdis. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and allergen tolerance. *Allergol Int* 2020; **69**(4): 549-560.
23. Zhao H., X. Liao ve Y. Kang. Tregs: Where We Are and What Comes Next? *Front Immunol* 2017; **8**: 1578.
24. Martin-Orozco E., M. Norte-Munoz ve J. Martinez-Garcia. Regulatory T Cells in Allergy and Asthma. *Front Pediatr* 2017; **5**: 117.
25. Nonaka M., R. Pawankar, A. Fukumoto ve T. Yagi. Heterogeneous response of nasal and lung fibroblasts to transforming growth factor-beta 1. *Clin Exp Allergy* 2008; **38**(5): 812-21; Kashyap M., A.M. Thornton, S.K. Norton, B. Barnstein, M. Macey, J. Brenzovich, ve ark. . Cutting edge: CD4 T cell-mast cell interactions alter IgE receptor expression and signaling. *J Immunol* 2008; **180**(4): 2039-43.
26. Meiler F., S. Klunker, M. Zimmermann, C.A. Akdis ve M. Akdis. Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. *Allergy* 2008; **63**(11): 1455-63.
27. Katz S.I., D. Parker ve J.L. Turk. B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions. *Nature* 1974; **251**(5475): 550-1.
28. Wolf S.D., B.N. Dittel, F. Hardardottir ve C.A. Janeway, Jr. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *J Exp Med* 1996; **184**(6): 2271-8.
29. Fillatreau S., C.H. Sweenie, M.J. McGeachy, D. Gray ve S.M. Anderton. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol* 2002; **3**(10): 944-50.

30. Guidelli G.M., A. Fioravanti, P. Rubegni ve L. Feci. Induced psoriasis after rituximab therapy for rheumatoid arthritis: a case report and review of the literature. *Rheumatol Int* 2013; **33**(11): 2927-30; Goetz M., R. Atreya, M. Ghalibafian, P.R. Galle ve M.F. Neurath. Exacerbation of ulcerative colitis after rituximab salvage therapy. *Inflamm Bowel Dis* 2007; **13**(11): 1365-8.
31. Dass S., E.M. Vital ve P. Emery. Development of psoriasis after B cell depletion with rituximab. *Arthritis Rheum* 2007; **56**(8): 2715-8.
32. Ma S., P. Satitsuksanoa, K. Jansen, L. Cevhertas, W. van de Veen ve M. Akdis. B regulatory cells in allergy. *Immunol Rev* 2021; **299**(1): 10-30.
33. Akdis C.A., T. Blesken, M. Akdis, B. Wuthrich ve K. Blaser. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest* 1998; **102**(1): 98-106.
34. van de Veen W., B. Stanic, G. Yaman, M. Wawrzyniak, S. Sollner, D.G. Akdis, ve ark. . IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 2013; **131**(4): 1204-12.
35. Geherin S.A., D. Gomez, R.A. Glabman, G. Ruthel, A. Hamann ve G.F. Debes. IL-10+ Innate-like B Cells Are Part of the Skin Immune System and Require alpha4beta1 Integrin To Migrate between the Peritoneum and Inflamed Skin. *J Immunol* 2016; **196**(6): 2514-2525; Yoshimoto M., E. Montecino-Rodriguez, M.J. Ferkowicz, P. Porayette, W.C. Shelley, S.J. Conway, ve ark. . Embryonic day 9 yolk sac and intra-embryonic hemogenic endothelium independently generate a B-1 and marginal zone progenitor lacking B-2 potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; **108**(4): 1468-73.
36. Matsumoto M., A. Baba, T. Yokota, H. Nishikawa, Y. Ohkawa, H. Kayama, ve ark. . Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity* 2014; **41**(6): 1040-51.
37. Nouel A., Q. Simon, C. Jamin, J.O. Pers ve S. Hillion. Regulatory B cells: an exciting target for future therapeutics in transplantation. *Front Immunol* 2014; **5**: 11; Flores-Borja F., A. Bosma, D. Ng, V. Reddy, M.R. Ehrenstein, D.A. Isenberg, ve ark. . CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Sci Transl Med* 2013; **5**(173): 173ra23.

38. Bosma A., A. Abdel-Gadir, D.A. Isenberg, E.C. Jury ve C. Mauri. Lipid-antigen presentation by CD1d(+) B cells is essential for the maintenance of invariant natural killer T cells. *Immunity* 2012; **36**(3): 477-90.
39. Blair P.A., L.Y. Norena, F. Flores-Borja, D.J. Rawlings, D.A. Isenberg, M.R. Ehrenstein, ve ark. . CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity* 2010; **32**(1): 129-40.
40. Wirz O.F., A. Globinska, U. Ochsner, W. van de Veen, E. Eller, E.S. Christiansen, ve ark. . Comparison of regulatory B cells in asthma and allergic rhinitis. *Allergy* 2019; **74**(4): 815-818.
41. van de Veen W., B. Stanic, O.F. Wirz, K. Jansen, A. Globinska ve M. Akdis. Role of regulatory B cells in immune tolerance to allergens and beyond. *J Allergy Clin Immunol* 2016; **138**(3): 654-665.
42. Pniewska E., M. Sokolowska, I. Kuprys-Lipinska, M. Przybek, P. Kuna ve R. Pawliczak. The step further to understand the role of cytosolic phospholipase A2 alpha and group X secretory phospholipase A2 in allergic inflammation: pilot study. *Biomed Res Int* 2014; **2014**: 670814.
43. Boonpiyathad T., W. van de Veen, O. Wirz, M. Sokolowska, B. Ruckert, G. Tan, ve ark. . Role of Der p 1-specific B cells in immune tolerance during 2 years of house dust mite-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2019; **143**(3): 1077-1086 e10.
44. Komlosi Z.I., N. Kovacs, W. van de Veen, A.I. Kirsch, H.B. Fahrner, M. Wawrzyniak, ve ark. . Human CD40 ligand-expressing type 3 innate lymphoid cells induce IL-10-producing immature transitional regulatory B cells. *J Allergy Clin Immunol* 2018; **142**(1): 178-194 e11.
45. Stanic B., W. van de Veen, O.F. Wirz, B. Ruckert, H. Morita, S. Sollner, ve ark. . IL-10-overexpressing B cells regulate innate and adaptive immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 2015; **135**(3): 771-80 e8.
46. Palomares O., M. Martin-Fontecha, R. Lauener, C. Traidl-Hoffmann, O. Cavkaytar, M. Akdis, ve ark. . Regulatory T cells and immune regulation of allergic diseases: roles of IL-10 and TGF-beta. *Genes Immun* 2014; **15**(8): 511-20.

47. Akdis M., S. Burgler, R. Cramer, T. Eiwegger, H. Fujita, E. Gomez, ve ark. . Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2011; **127**(3): 701-21 e1-70.
48. Lee K.M., R.T. Stott, G. Zhao, J. SooHoo, W. Xiong, M.M. Lian, ve ark. . TGF-beta-producing regulatory B cells induce regulatory T cells and promote transplantation tolerance. *Eur J Immunol* 2014; **44**(6): 1728-36.
49. Zacca E.R., L.I. Onofrio, C.D.V. Acosta, P.V. Ferrero, S.M. Alonso, M.C. Ramello, ve ark. . PD-L1(+) Regulatory B Cells Are Significantly Decreased in Rheumatoid Arthritis Patients and Increase After Successful Treatment. *Front Immunol* 2018; **9**: 2241.
50. Lindner S., K. Dahlke, K. Sontheimer, M. Hagn, C. Kaltenmeier, T.F. Barth, ve ark. . Interleukin 21-induced granzyme B-expressing B cells infiltrate tumors and regulate T cells. *Cancer Res* 2013; **73**(8): 2468-79.
51. Dispenza M.C. Classification of hypersensitivity reactions. *Allergy Asthma Proc* 2019; **40**(6): 470-473.
52. Alvaro-Lozano M., C.A. Akdis, M. Akdis, C. Alviani, E. Angier, S. Arasi, ve ark. . EAACI Allergen Immunotherapy User's Guide. *Pediatr Allergy Immunol* 2020; **31 Suppl 25**: 1-101.
53. Pichler W.J. Delayed drug hypersensitivity reactions. *Ann Intern Med* 2003; **139**(8): 683-93.
54. Sheffer A.L. Anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 1985; **75**(2): 227-33.
55. Ring J., M. Grosber, K. Brockow ve K.C. Bergmann. Anaphylaxis. *Chem Immunol Allergy* 2014; **100**: 54-61.
56. Shulman S.T. Clemens von Pirquet: A Remarkable Life and Career. *J Pediatric Infect Dis Soc* 2017; **6**(4): 376-379.
57. Bergmann K.C. Milestones in the 20th century. *Chem Immunol Allergy* 2014; **100**: 27-45.
58. Kramer O.N., M.A. Strom, B. Ladizinski ve P.A. Lio. The history of atopic dermatitis. *Clin Dermatol* 2017; **35**(4): 344-348.
59. Ishizaka K. ve T. Ishizaka. Identification of gamma-E-antibodies as a carrier of reaginic activity. *J Immunol* 1967; **99**(6): 1187-98.
60. Tan H.T., K. Sugita ve C.A. Akdis. Novel Biologicals for the Treatment of Allergic Diseases and Asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2016; **16**(10): 70;

- Smits H.H., P.S. Hiemstra, C. Prazeres da Costa, M. Ege, M. Edwards, H. Garn, ve ark. . Microbes and asthma: Opportunities for intervention. *J Allergy Clin Immunol* 2016; **137**(3): 690-7.
61. Akdis C.A. ve M. Akdis. Advances in allergen immunotherapy: aiming for complete tolerance to allergens. *Sci Transl Med* 2015; **7**(280): 280ps6.
 62. Kucuksezer U.C., C. Ozdemir, M. Akdis ve C.A. Akdis. Precision/Personalized Medicine in Allergic Diseases and Asthma. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2018; **66**(6): 431-442.
 63. Akdis M. ve C.A. Akdis. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2007; **119**(4): 780-91; Akdis C.A. Allergy and hypersensitivity: mechanisms of allergic disease. *Curr Opin Immunol* 2006; **18**(6): 718-26.
 64. Soyer O.U., M. Akdis ve C.A. Akdis. Mechanisms of subcutaneous allergen immunotherapy. *Immunol Allergy Clin North Am* 2011; **31**(2): 175-90, vii-viii.
 65. Wang M., K. Takeda, Y. Shiraishi, M. Okamoto, A. Dakhama, A. Joetham, ve ark. . Peanut-induced intestinal allergy is mediated through a mast cell-IgE-FcepsilonRI-IL-13 pathway. *J Allergy Clin Immunol* 2010; **126**(2): 306-16, 316 e1-12.
 66. Simons F.E. Anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2010; **125**(2 Suppl 2): S161-81; Kalesnikoff J. ve S.J. Galli. New developments in mast cell biology. *Nat Immunol* 2008; **9**(11): 1215-23.
 67. Iwakura Y., H. Ishigame, S. Saijo ve S. Nakae. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity* 2011; **34**(2): 149-62; Liew F.Y., N.I. Pitman ve I.B. McInnes. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat Rev Immunol* 2010; **10**(2): 103-10; Goswami S., P. Angkasekwinai, M. Shan, K.J. Greenlee, W.T. Barranco, S. Polikepahad, ve ark. . Divergent functions for airway epithelial matrix metalloproteinase 7 and retinoic acid in experimental asthma. *Nat Immunol* 2009; **10**(5): 496-503; Kakkar R. ve R.T. Lee. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nat Rev Drug Discov* 2008; **7**(10): 827-40; Wang Y.H., P. Angkasekwinai, N. Lu, K.S. Voo, K. Arima, S. Hanabuchi, ve ark. . IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells. *J Exp Med* 2007; **204**(8): 1837-47;

- Bilsborough J., D.Y. Leung, M. Maurer, M. Howell, M. Boguniewicz, L. Yao, ve ark. . IL-31 is associated with cutaneous lymphocyte antigen-positive skin homing T cells in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2006; **117**(2): 418-25; Dillon S.R., C. Sprecher, A. Hammond, J. Bilsborough, M. Rosenfeld-Franklin, S.R. Presnell, ve ark. . Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nat Immunol* 2004; **5**(7): 752-60.
68. Bousquet J., N. Khaltaev, A.A. Cruz, J. Denburg, W.J. Fokkens, A. Togias, ve ark. . Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy* 2008; **63 Suppl 86**: 8-160.
69. Kaliner M.A. Nonallergic rhinopathy (formerly known as vasomotor rhinitis). *Immunol Allergy Clin North Am* 2011; **31**(3): 441-55.
70. Powe D.G., R.S. Huskisson, A.S. Carney, D. Jenkins ve N.S. Jones. Evidence for an inflammatory pathophysiology in idiopathic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 2001; **31**(6): 864-72.
71. Fokkens W., V. Lund ve J. Mullol. EP3OS 2007: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2007. A summary for otorhinolaryngologists. *Rhinology* 2007; **45**(2): 97-101.
72. Moscato G., O. Vandenplas, R.G. Van Wijk, J.L. Malo, L. Perfetti, S. Quirce, ve ark. . EAACI position paper on occupational rhinitis. *Respir Res* 2009; **10**: 16.
73. Kowalski M.L., J.S. Makowska, M. Blanca, S. Bavbek, G. Bochenek, J. Bousquet, ve ark. . Hypersensitivity to nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) - classification, diagnosis and management: review of the EAACI/ENDA(#) and GA2LEN/HANNA*. *Allergy* 2011; **66**(7): 818-29.
74. Varghese M., M.C. Glaum ve R.F. Lockey. Drug-induced rhinitis. *Clin Exp Allergy* 2010; **40**(3): 381-4.
75. Ellis A.K. ve P.K. Keith. Nonallergic rhinitis with eosinophilia syndrome and related disorders. *Clin Allergy Immunol* 2007; **19**: 87-100.
76. Graudenz G.S., R.G. Landgraf, S. Jancar, A. Tribess, S.G. Fonseca, K.C. Fae, ve ark. . The role of allergic rhinitis in nasal responses to sudden temperature changes. *J Allergy Clin Immunol* 2006; **118**(5): 1126-32; Hakansson K., C. von Buchwald, S.F. Thomsen, J.P. Thyssen, V. Backer ve A. Linneberg. Nonallergic

- rhinitis and its association with smoking and lower airway disease: A general population study. *Am J Rhinol Allergy* 2011; **25**(1): 25-9.
77. Cingi C., D. Demirbas ve M. Songu. Allergic rhinitis caused by food allergies. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2010; **267**(9): 1327-35.
 78. Liva G.A., A.D. Karatzanis ve E.P. Prokopakis. Review of Rhinitis: Classification, Types, Pathophysiology. *J Clin Med* 2021; **10**(14).
 79. Wheatley L.M. ve A. Togias. Clinical practice. Allergic rhinitis. *N Engl J Med* 2015; **372**(5): 456-63.
 80. Hansen I., L. Klimek, R. Mosges ve K. Hormann. Mediators of inflammation in the early and the late phase of allergic rhinitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; **4**(3): 159-63; Smurthwaite L. ve S.R. Durham. Local IgE synthesis in allergic rhinitis and asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2002; **2**(3): 231-8; Park Y.J. ve J.N. Baraniuk. Mechanisms of allergic rhinitis. *Clin Allergy Immunol* 2002; **16**: 275-93.
 81. Brozek J.L., J. Bousquet, C.E. Baena-Cagnani, S. Bonini, G.W. Canonica, T.B. Casale, ve ark. . Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines: 2010 revision. *J Allergy Clin Immunol* 2010; **126**(3): 466-76.
 82. Kaiser H.B. Risk factors in allergy/asthma. *Allergy Asthma Proc* 2004; **25**(1): 7-10; Peden D.B. Effect of pollutants in rhinitis. *Curr Allergy Asthma Rep* 2001; **1**(3): 242-6; D'Amato G., G. Liccardi, M. D'Amato ve M. Cazzola. The role of outdoor air pollution and climatic changes on the rising trends in respiratory allergy. *Respir Med* 2001; **95**(7): 606-11.
 83. Blaiss M.S. Allergic rhinitis: Direct and indirect costs. *Allergy Asthma Proc* 2010; **31**(5): 375-80.
 84. Karaki S., G. Garcia, C. Tcherakian, F. Capel, T. Tran, M. Pallardy, ve ark. . Enhanced glucocorticoid-induced leucine zipper in dendritic cells induces allergen-specific regulatory CD4(+) T-cells in respiratory allergies. *Allergy* 2014; **69**(5): 624-31; Hamdi H., V. Godot, M.C. Maillot, M.V. Prejean, N. Cohen, R. Krzysiek, ve ark. . Induction of antigen-specific regulatory T lymphocytes by human dendritic cells expressing the glucocorticoid-induced leucine zipper. *Blood* 2007; **110**(1): 211-9.
 85. Komlosi Z.I., N. Kovacs, M. Sokolowska, W. van de Veen, M. Akdis ve C.A. Akdis. Mechanisms of Subcutaneous and Sublingual Aeroallergen

- Immunotherapy: What Is New? *Immunol Allergy Clin North Am* 2020; **40**(1): 1-14.
86. Wenzel S.E. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med* 2012; **18**(5): 716-25; Akdis C.A., C. Bachert, C. Cingi, M.S. Dykewicz, P.W. Hellings, R.M. Naclerio, ve ark. . Endotypes and phenotypes of chronic rhinosinusitis: a PRACTALL document of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology and the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. *J Allergy Clin Immunol* 2013; **131**(6): 1479-90.
 87. Palomares O., B. Ruckert, T. Jartti, U.C. Kucuksezer, T. Puhakka, E. Gomez, ve ark. . Induction and maintenance of allergen-specific FOXP3+ Treg cells in human tonsils as potential first-line organs of oral tolerance. *J Allergy Clin Immunol* 2012; **129**(2): 510-20, 520 e1-9; Meiler F., J. Zumkehr, S. Klunker, B. Ruckert, C.A. Akdis ve M. Akdis. In vivo switch to IL-10-secreting T regulatory cells in high dose allergen exposure. *J Exp Med* 2008; **205**(12): 2887-98; Platts-Mills T., J. Vaughan, S. Squillace, J. Woodfolk ve R. Sporik. Sensitisation, asthma, and a modified Th2 response in children exposed to cat allergen: a population-based cross-sectional study. *Lancet* 2001; **357**(9258): 752-6.
 88. Ozdemir C., U.C. Kucuksezer, M. Akdis ve C.A. Akdis. Mechanisms of Aeroallergen Immunotherapy: Subcutaneous Immunotherapy and Sublingual Immunotherapy. *Immunol Allergy Clin North Am* 2016; **36**(1): 71-86.
 89. Bousquet J., H.J. Schunemann, A. Togias, C. Bachert, M. Erhola, P.W. Hellings, ve ark. . Next-generation Allergic Rhinitis and Its Impact on Asthma (ARIA) guidelines for allergic rhinitis based on Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation (GRADE) and real-world evidence. *J Allergy Clin Immunol* 2020; **145**(1): 70-80 e3.
 90. Bousquet P.J., C. Combescure, F. Neukirch, J.M. Klossek, H. Mechin, J.P. Daures, ve ark. . Visual analog scales can assess the severity of rhinitis graded according to ARIA guidelines. *Allergy* 2007; **62**(4): 367-72.
 91. Moller C., S. Dreborg, H.A. Ferdousi, S. Halken, A. Host, L. Jacobsen, ve ark. . Pollen immunotherapy reduces the development of asthma in children with seasonal rhinoconjunctivitis (the PAT-study). *J Allergy Clin Immunol* 2002; **109**(2): 251-6.

92. Akbas Y. ve M.R. Saatci. [Monitoring the efficacy of immunotherapy by symptom scores and the skin prick test in patients with allergic rhinitis]. *Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg* 2003; **10**(6): 221-5.
93. ErdoĖAn A.P., Z. Peker ve A.Z. SİN. Alerjen Spesifik İmmünoterapi: Etkinliđi Ve Yaşam Kalitesi Üzerine Etkileri. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2020.
94. Cuesta-Herranz J., J.J. Laguna, R. Mielgo, I. Perez-Camo, A.M. Callejo, L. Begona, ve ark. . Quality of life improvement with allergen immunotherapy treatment in patients with rhinoconjunctivitis in real life conditions. Results of an observational prospective study (ICARA). *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2019; **51**(5).
95. Feng M., X. Zeng, Q. Su, X. Shi, M. Xian, R. Qin, ve ark. . Allergen Immunotherapy-Induced Immunoglobulin G4 Reduces Basophil Activation in House Dust Mite-Allergic Asthma Patients. *Front Cell Dev Biol* 2020; **8**: 30; Nordin L.E., M.C. Moller, P. Julin, A. Bartfai, F. Hashim ve T.Q. Li. Post mTBI fatigue is associated with abnormal brain functional connectivity. *Sci Rep* 2016; **6**: 21183; Rogala B., J. Jarzab, B. Rymarczyk ve B. Tluczykont. [Allergen specific-IgG4 in circulating immune complexes in patients with inhalant allergy undergoing specific immunotherapy]. *Wiad Lek* 2004; **57**(3-4): 123-30.
96. Aalberse R. The role of IgG antibodies in allergy and immunotherapy. *Allergy* 2011; **66 Suppl 95**: 28-30.
97. Zhao D., X. Lai, M. Tian, Y. Jiang, Y. Zheng, B. Gjesing, ve ark. . The Functional IgE-Blocking Factor Induced by Allergen-Specific Immunotherapy Correlates with IgG4 Antibodies and a Decrease of Symptoms in House Dust Mite-Allergic Children. *Int Arch Allergy Immunol* 2016; **169**(2): 113-20.
98. Aalberse R.C., S.O. Stapel, J. Schuurman ve T. Rispens. Immunoglobulin G4: an odd antibody. *Clin Exp Allergy* 2009; **39**(4): 469-77; van der Zee J.S., P. van Swieten ve R.C. Aalberse. Inhibition of complement activation by IgG4 antibodies. *Clin Exp Immunol* 1986; **64**(2): 415-22.
99. Boonpiyathad T., M. Sokolowska, H. Morita, B. Ruckert, J.I. Kast, M. Wawrzyniak, ve ark. . Der p 1-specific regulatory T-cell response during house dust mite allergen immunotherapy. *Allergy* 2019; **74**(5): 976-985; Jutel M., M. Akdis, F. Budak, C. Aebischer-Casaulta, M. Wrzyszc, K. Blaser, ve ark. . IL-10

- and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol* 2003; **33**(5): 1205-14.
100. Celiksoy M.H., R. Sancak ve A. Yildiran. The role of active B cells in allergen immunotherapy. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2017; **45**(5): 439-444.
 101. Luo J., H. Guo, Z. Liu, T. Peng, X. Hu, M. Han, ve ark. . Analysis of Peripheral B Cell Subsets in Patients With Allergic Rhinitis. *Allergy Asthma Immunol Res* 2018; **10**(3): 236-243.
 102. Kabei K., J. Uchida, T. Iwai, T. Yamasaki, N. Kuwabara, T. Naganuma, ve ark. . Late-onset neutropenia and acute rejection in ABO-incompatible kidney transplant recipients receiving rituximab and mycophenolate mofetil. *Transpl Immunol* 2014; **31**(2): 92-7.
 103. Kuhn R., J. Lohler, D. Rennick, K. Rajewsky ve W. Muller. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993; **75**(2): 263-74.
 104. Moore K.W., R. de Waal Malefyt, R.L. Coffman ve A. O'Garra. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; **19**: 683-765.
 105. Herrin R.A. ve J.F. Boyd. Desmopressin acetate prophylaxis in a patient with hemophilia A: report of case. *J Am Dent Assoc* 1988; **117**(5): 593-4.
 106. Kim A.S., T.A. Doherty, M.R. Karta, S. Das, R. Baum, P. Rosenthal, ve ark. . Regulatory B cells and T follicular helper cells are reduced in allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2016; **138**(4): 1192-1195 e5.

HAM VERİLER

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

PATENT HAKKI İZİNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

ALLERJİK RİNİTLİ HASTALARDA ALLERJEN İMMÜNOTERAPİSİNİN REGÜLATÖR B HÜCRELER ÜZERİNE ETKİSİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 7	% 7	% 3	% 2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
2	www.slideshare.net İnternet Kaynağı	% 1
3	Submitted to Uludag University Öğrenci Ödevi	% 1
4	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<% 1
5	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% 1
6	pt.slideshare.net İnternet Kaynağı	<% 1
7	dspace.baskent.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
8	www.aai.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1

ghs.asyod.org

ÖZGEÇMİŞ