

Deneysel Araştırma

Fitohemaglutinin ve İnterlökin-2'nin İnsan-T-Hücrelerine Etkisinin Karşılaştırılması

Pınar ÇETİNALP DEMİRCAN^{1,a}

¹*İstanbul Bilim Üniversitesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye*

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, CD3+T-hücrelerini fitohemaglutinin (phytohemagglutinin,PHA), İnterlökin-2(interleukin-2,IL-2) ve PHA+IL-2 ile birlikte uyularak, farklı uyarıcılarla uyarılmanın CD3+T-hücre çoğalmı ve aktivasyon molekülleri ekspresyonuna etkisinin belirlenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Sağlıklı 15 kadının herbirinden 6 mL periferik kan örneği alınarak RosetteSep yöntemiyle 3×10^6 adet CD3+T-hücre izole edildi. CD3+T-hücreleri faz-kontrast mikroskopta sayıldı ve izolasyon saflıkları immunfloresan ve akım sitometrik yöntemlerle belirlendi. 12 kuyucuklu kültür kabının 3'er kuyucuğuna 2×10^5 adet paylaştırılan hücrelere 10 µg/mL PHA, 13µL/mL IL-2 ve 10 µg/mL PHA+13µL/mL IL-2 uygulanarak 24 saat inkübatörde inkübe edildi. Uyarıcıyla uyarılmamış CD3+T-hücreleriyle (kontrol grubu) karşılaştırılan uyarılmış CD3+T-hücre gruplarının; çoğalmaları spektrofotometrik yöntemle WST-1 testi ve akım sitometride CFSE testi ile aktivasyon moleküllerinin ekspresyonları CD25,CD38,CD69,CD71 ve HLA-DR antikorları ile akım sitometride ölçüldü.

Bulgular: WST-1 ve CFSE test değerleri gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; PHA-CD3+T-hücrelerinin (p <0.001) ve PHA+IL-2-CD3+T-hücrelerinin (p <0.001) IL-2-CD3+T-hücrelerinden anlamlı olarak daha fazla çoğaldıkları yani uyarıldıkları tespit edildi. Akım sitometride ölçülen aktivasyon moleküllerinin düzeyleri gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; IL-2-CD3+T-hücrelerine kıyasla, PHA-CD3+T-hücrelerinde ve PHA+IL-2-CD3+T-hücrelerinde CD25 (p <0.001), CD38 (p <0.001), CD71 (p <0.001) ve HLA-DR (p <0.001) % ekspresyon düzeylerinde anlamlı artış tespit edildi.

Sonuç: PHA ve PHA+IL-2 ile uyarılan CD3+T-hücrelerinde hücre proliferasyonunun ve aktivasyon molekülleri düzeylerinin benzer olduğu ve IL-2 ile uyarılan hücrelere kıyasla fazla olduğu tespit edildiğinden, *invitro* çalışmalarda CD3+T-hücre uyarıcısı olarak PHA kullanılmasının başka bir uyarıcıya gerek duyulmaksızın tek başına etkin olduğu ve CD3+T-hücrelerde IL-2'ye kıyasla daha fazla çoğalmı ve uyarılmayı sağladığı sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: CD3+T-Hücre, Uyarma, Fitohemaglutinin, İnterlökin-2.

ABSTRACT

Comparison of the Effect of Phytohemagglutinin and Interleukin-2 on Human-T-Cells

Objective: In this study, it is aimed to determine the effect of stimulation with different stimuli on CD3+T-cells proliferation and activation molecules by stimulating phytohemagglutinin (PHA), Interleukin-2 (IL-2) and PHA+IL-2 together.

Material and Method: Six mL peripheral blood samples were obtained from each 15 healthy women and their 3×10^6 CD3+T-cells were isolated by the RosetteSep method. CD3+T-cells were counted on a phase-contrast microscope and their isolation purity were determined by immunofluorescence and flow cytometric methods. 2×10^5 cells were apportioned in a 3-well dish of a 12-well culture dish, applied 10µg/mL PHA, 13µL/mL IL-2 and 10µg/mL PHA+13 µL/mL IL-2 and incubated in incubator for 24 hours. Cells groups of stimulated CD3+T-cells compared with CD3+T-cells(control group) not stimulated with any stimulants; their proliferations measured by spectrophotometric method using WST-1 test and flow cytometry by CFSE test, their expressions of activation molecules measured by flow cytometry with CD25, CD38, CD69, CD71 and HLA-DR antibodies.

Results: When WST-1 and CFSE test values were compared statistically between groups; It was determined that PHA-CD3+T-cells (p <0.001) and PHA + IL-2-CD3+T-cells (p <0.001) were significantly more proliferated, in other words activated than IL-2-CD3+T-cells. When levels of activation molecules evaluated by flow cytometry were compared statistically between groups; in comparison to IL-2-CD3+T-cells, significantly increased % expression values of CD25 (p <0.001), CD38 (p <0.001), CD71 (p <0.001) and HLA-DR (p <0.001) were detected in PHA-CD3+T-cells and PHA+IL-2-CD3+T-cells.

Conclusion: Since the proliferation and activation molecule levels in CD3+T-cells stimulated by PHA and PHA + IL-2 were similar and more than than stimulated by IL-2, it was concluded that the use of PHA as a CD3+T-cell stimulant in *invitro* studies alone was effective with no need for other stimulants and provided more proliferation and stimulation compared to IL-2 in CD3+T-cells.

Keywords: CD3+T-Cell, Stimulation, Phytohemagglutinin, Interleukin-2.

Bu makale atıfta nasıl kullanılır: Çetinalp Demircan P. Fitohemaglutinin ve İnterlökin-2'nin İnsan-T-Hücrelerine Etkisinin Karşılaştırılması. Fırat Tıp Dergisi 2019; 24 (4): 177-185.

How to cite this article: Cetinalp Demircan P. Comparison of the Effect of Phytohemagglutinin and Interleukin-2 on Human-T-Cells. Fırat Med J 2019; 24 (4): 177-185.

İmmün sistemin fizyolojik olarak görevi bireyleri enfeksiyonlara karşı korumaktır. İmmün sistem hücreleri olan lökositlerin (beyaz kan hücrelerinin) periferik kanda %20-30 kadarını lenfositler, lenfositlerinde %70-80'ini T-lenfositler oluşturur. İmmün sistemin en

önemli hücreleri olan ve tüm T-hücrelerini kapsayan CD3+T-hücreleri, hücrelerin yönettiği ve katıldığı özgül immüniteyi oluştururlar (1-7). T-hücrelerinin öncülleri timusta gelişir. Timustan çıkarak periferik lenfoid organlara geçen hücreler, burada olgun T-

^aYazışma Adresi: Pınar ÇETİNALP DEMİRCAN, İstanbul Bilim Üniversitesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Tel: 0212 213 6486

Geliş Tarihi/Received: 21.09.2018

e-mail: pinarcdemircan@hotmail.com

Kabul Tarihi/Accepted: 21.02.2019

hücrelerine farklılaşırlar. T-hücrelerinin gelişimini interlökin-2 (interleukin-2, IL-2), interlökin-4 (interleukin-4, IL-4) ve interlökin-7 (interleukin-7, IL-7) gibi sitokinler etkiler. T-hücrelerinin herhangi bir enfeksiyona karşı cevap oluşturabilmesi için aktif hale geçmesi gerekmektedir. T-hücreler yalnızca protein yapısındaki antijenleri (Timus veya T-hücre bağımlı antijenleri) tanıyabilirler. T-hücrelerin aktivasyonu, enflamasyona yakın lenf düğümlerinde gerçekleşir. Her bir T-hücresinde spesifik bir antijeni tanıyan T-hücre reseptörü (T-cell receptor, TCR) bulunur. TCR'ye antijenin ve eş uyarıcı moleküllerinin bağlanması sonucu oluşan sinyal iletimi etkisiyle T-hücresi aktifleşir. İkinci sinyaller yada eş uyarıcılar adı verilen peptidler, T-hücre yanıtının optimal olarak başlamasını sağlar. Bu peptidlerin major histokompatibilite kompleksinin (major histocompatibility complex, MHC) protein kısmına bağlandığında antijen sunumu gerçekleşir. TCR için gerekli ligandlar, antijenik peptidin aminoasitleri ve MHC molekülünün kalıntılarıdır. Peptid-MHC kompleksinin TCR'e bağlanmasıyla T-hücre aktivasyonuna neden olacak bir takım biyokimyasal olaylar tetiklenmiş olur (1, 8-11). Araştırmacılarca yapılan *invitro* ve *invivo* çalışmalar, T-hücrelerinin aktivasyonu ve büyümesi için eş uyarıcılara ihtiyaç duyduklarını göstermiştir. *Invivo* ortamda, uyarılma doğal yollarla bu şekilde gerçekleşirken, *invitro*da T hücrelerinin aktif hale gelebilmeleri için bir takım uyarıcılarla uyarılmaları gerektiği bildirilmiştir. Bunlar fitohemaglutinin (phytohemagglutinin,PHA) ve konkovalin A (concanavalin A,conA) gibi mitojenler, kandida ve tetanoz gibi bakteriyel antijenler, interlökin-2 (interleukin-2, IL-2) gibi sitokinler ve lenfosit fonksiyon-bağlı antijen-1 (lymphocyte function-associated antigen-1, LFA-1) gibi integrinlerdir (1, 12-15). PHA, galaktoz, N-asetilglukozamin ve mannoz içeren kompleks oligosakkaritler için karbonhidrat bağlanma spesifitesine sahip bir lektindir. PHA, CD3+T-hücrelerden sentezlenen dectin-1 reseptörüne bağlanır. Dectin-1, küçük C-tipi transmembran lektin reseptörüdür. PHA, dectin-1 reseptörüne bağlanarak hücre içi Ca²⁺ iyon akımını aktifler. Bu hücresel aktivasyonla birlikte T-hücrelerinde; aktivasyon molekülleri salınımı sağlanır, fagositoz tetiklenir, NADPH oksidaz tarafından reaktif oksijen üretimi gerçekleşir ve enflamatuvar sitokin ve kemokin üretimi etkin olur (16-18).

Ayrıca CD3+T-hücrelerinin PHA tarafından uyarılması, hücrenin hücre döngüsünün hareketsiz G0 fazından G1 fazına klasik bir geçiş modelini ve daha sonra döngünün S- G2- ve M-fazları boyunca ilerlemesini göstermektedir (19). Araştırmacılarca, T-hücrelerinin aktiflendiğinde hareketlerinin arttığı, çoğaldığı ve yüzeylerinde birçok aktivasyon molekülünü ekspresye ettiği ve bunun sonucunda da morfolojilerinin değişerek yapısında bazı uzantılara sahip oldukları açıklanmıştır (20-29).

PHA ve IL-2, T-hücrelerinin *invitro* ortamda çoğaltılmaları ve hücre yüzey aktivasyon moleküllerini ekspresye etmeleri için kullanılan uyarıcılardandır. Uyarıcılarla uyarılan T-hücreleri CD25, CD38, CD69,

CD71 ve HLA-DR gibi antijenleri yüzeylerinde ekspresye ederler ki bunlar dinlenme halindeki T-hücrelerinde ya çok az ekspresye edilir ya da hiç edilmezler (20, 22, 24-26, 30-33). Bu yüzden bunlara 'aktivasyon molekülleri' adı verilir. Bu aktivasyon molekülleri monoklonal antikorlar (mAbs) kullanılarak immünfloresan yöntemle (IF) ve akım sitometrik analizlerle kolaylıkla tespit edilebilirler. Yakın zamanlarda yapılan çalışmalar, PHA ile uyarılmış T-hücrelerinin hücresel cevabında aktivasyon moleküllerinden CD25, CD69, CD71 ve HLA-DR'nin hızlı ekspresye olduğunu göstermiştir (24, 34-36).

Bu çalışmada, CD3+T-hücrelerinin uyarılmasında etkin uyarıcının ya da uyarıcıların tespit edilmesi ayrıca uyarıcıların birlikte kullanılmasının uyarılmayı artırıcı etkisi olup olmadığının belirlenmesi hedeflendi. Bu amaçla, sağlıklı insan periferik kanından izole edilmiş CD3+T-hücrelerinin PHA ve IL-2 ile ayrı ayrı ve her iki uyarıcı ile birlikte uyarıldıklarında hücre çoğalması ve hücre yüzey aktivasyon moleküllerinin ekspresyonlarındaki değişimin ölçümü gerçekleştirildi.

GEREÇ VE YÖNTEM

Örneklerin Seçimi

Bu çalışma, İstanbul Bilim Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezin'de, aynı merkezde çalışan yaş ortalaması 35±5 olan 15 sağlıklı premenapoz kadın gönüllüden bilgilendirme onamı alınarak gerçekleştirildi. Gönüllülerin sigara, alkol ve herhangi bir ilaç kullanmayan, immün ve kronik hastalığı olmayan ve son 6 ayda şiddetli enfeksiyon ya da viral bir hastalık geçirmeyen kişiler olmasına dikkat edildi.

Periferik Kandan CD3+T-hücrelerinin İzolasyonu, Tespiti ve Sayımı

Sağlıklı 15 kadın gönüllünün her birinden 6'şar mL periferik kan örneği EDTA'lı tüplere alındıktan sonra bu kanlardan periferik kan havuzu oluşturuldu. CD3+T-hücreleri, T-hücre negatif immün seleksiyon kokteyli olan RosetteSep kiti (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada) kullanılarak izole edildi. CD3+T-hücrelerinin varlığı invört mikroskopta (Leica Wetzlar, Germany) tespit edildi ve fotoğrafları çekildi. Daha sonra Thoma lamı kullanılarak faz-kontrast mikroskopta sayıldı (Leica Wetzlar, Germany) ve toplamda 3x10⁶ CD3+T-hücresi olduğu tespit edildi.

CD3+T-hücrelerinin anti-CD3 Antikoruyla İmmünfloresan (IF) Yöntemle Boyanması

CD3+T-hücreler soğuk metanolde (Merck Kenilworth, New Jersey, United States) fikse edildi. Hücrelerin %0.025 Triton X-100 (Merck, Merck Kenilworth, New Jersey, United States) ile permeabilizasyonu sonrası hücreler %1.5 normal keçi yada eşek bloke edici serumla (Santa Cruz,California,USA) PBS'de non-spesifik bağlı immunoglobulin G'nin supresyonu için inkübe edildi. Yıkama sonrası hücreler, primer anti-CD3 antikoruyla gece boyu inkübe edildi. Daha sonra

hücreler primer antikora uygun FITC-işaretli sekonder antikorla (Santa Cruz, California, United States) inkübe edildi. Yıkama sonrasında hücreler %10FBS, 100 U/mL penicillin, 0.1mg/mL streptomycin, and 200 mM glutamax (Invitrogen/GIBCO, Waltham, Massachusetts, USA) içeren RPMI-1640 besiyeri (Invitrogen/GIBCO, Waltham, Massachusetts, USA) içinde DAPI boyasında (Santa Cruz, California, United States) inkübe edildi. Ardından immünfloresan mikroskopuyla (Leica Wetzlar, Germany) CD3+T-hücreleri tespit edilerek fotoğrafları çekildi.

CD3+T-hücrelerinin İzolasyon Safılık Analizinin Akım Sitometri Cihazında Ölçümü

CD3+T-hücrelerinin izolasyonunun safılık analizi akım sitometri cihazında (Becton Dickinson, FACS Calibur, San Jose, CA, USA) %90,63 olarak ölçüldü. Bu yöntemde, izole edilen CD3+T-hücre süspansiyonu 10 µL PerCP-konjuge anti-CD3 hücre yüzey monoklonal antikoruna (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) 15 dakika oda ısısında karanlıkta inkübe edilmesinin ardından akım sitometri cihazında ölçüldü.

CD3+T-hücrelerinin PHA, IL-2 ve PHA+IL-2 ile Uyarılması

Oniki kuyucuklu kültür plağının 3'er kuyusuna 2×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde paylaştırılan 3 farklı gruptaki CD3+T-hücreleri, %10 FBS, 100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin ve 200 mM glutamax (Invitrogen/GIBCO) içeren RPMI-1640 (Invitrogen/GIBCO) besiyerindeki uyarıcılarla 24 saat inkübe edildi. Herhangi bir uyarıcıyla uyarılmayan 2×10^5 hücre/kuyucuk olan (kontrol grubu) CD3+T-hücreleri de 3 ayrı kuyuya aynı besiyerinde pipetlendi. Birinci gruptaki CD3+T-hücreleri herhangi bir uyarıcıyla uyarılmadan (kontrol grubu), 2. gruptaki CD3+T-hücreleri 10 µg/mL PHA ile (PHA; Invitrogen/GIBCO, Waltham, Massachusetts, USA) uyarılarak, 3.gruptaki CD3+T-hücreleri 13µL/mL IL-2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri United States) ile uyarılarak ve 4.gruptaki CD3+T-hücreleri 10 µg/mL PHA ve 13µL/mL IL-2 ile uyarılarak %5CO₂ içeren 37°C inkübatörde (Sanyo MCO-20AIC, Moriguchi, Osaka, Japan) 24 saat inkübe edildi.

Uyarılmış CD3+T-hücrelerin Faz-Kontrast Mikroskopta Görüntülenmesi

CD3+T-hücrelerin uyarıldığında oluşan morfolojik değişikliklerinin görüntüsü faz-kontrast mikroskopta (Leica Wetzlar, Germany) gözlenerek fotoğrafları çekildi.

Uyarılmış ve Uyarılmamış CD3+T-hücre Çoğalımının WST-1 Testiyle Ölçümü

PHA, IL-2, PHA+IL-2 ile uyarılmış ve uyarılmamış CD3+T-hücre gruplarının çoğalımının tayini spektrofotometrik yöntemle WST-1 testi (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) ile gerçekleştirildi. Bunun için, CD3+T-hücreleri her gruptan 3'er örnek ve 1×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür plağının 3'er kuyucuğuna pipetlendi. Tüm kuyucuklara 10µL WST-1 (Roche Diagnostics, Mannheim, Ger-

many) ayırıcı pipetlendi. Kültür plağı %5CO₂ içeren 37°C inkübatörde 4 saat inkübe edildi. 4. saatin sonunda tüm kuyucuklardaki hücrelerin absorbans değerleri spektrofotometrik yöntemle 480 nm'de mikroplate okuyucuda (Elisa Versamax, Sunnyvale, CA, USA) okundu.

Uyarılmış ve Uyarılmamış CD3+T-hücre Çoğalımının CFSE Testiyle Ölçümü

PHA, IL-2 ve PHA+IL-2 ile uyarılmış ve uyarılmamış CD3+T-hücrelerinin CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) % ekspresyon düzeyleri ve MCS ölçümleri akım sitometri cihazında ölçüldü. Bunun için her gruptaki CD3+T-hücreleri; DMSO (Dimetil sulfoksit) içinde hazırlanan CFSE çalışma ayırıcı (1-10 µM) ile işaretlenerek 15 dakika 37°C su banyosunda inkübe edildi ve düzeyleri akım sitometri cihazında ölçüldü.

Uyarılmış ve Uyarılmamış CD3+T-hücre Yüzey Aktivasyon Moleküllerinin Ölçümü

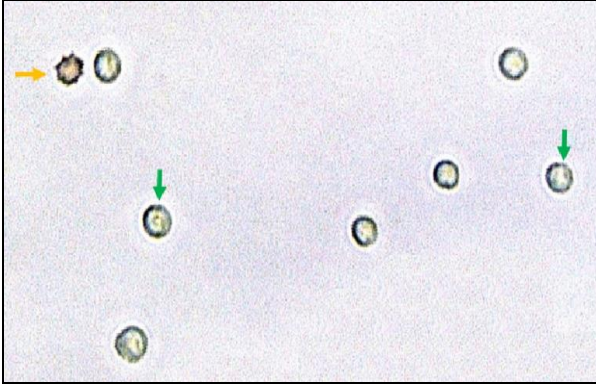
PHA, IL-2 ve PHA+IL-2 ile birlikte uyarılmış ve uyarılmamış CD3+T-hücrelerinin hücre yüzey aktivasyon moleküllerinin % ekspresyon düzeyleri ve MCS ölçümleri akım sitometri cihazında ölçüldü. Bunun için her gruptaki CD3+T-hücreleri; 10'ar µL PE-konjuge anti-CD25, PE-konjuge anti-CD38, APC-konjuge anti-CD69, PE-konjuge anti-CD71 ve PE-konjuge anti-HLA-DR hücre yüzey monoklonal antikorlarıyla (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) işaretlenerek 15 dakika oda ısısında karanlıkta inkübe edildi ve düzeyleri akım sitometri cihazında ölçüldü.

İstatistiksel Analiz

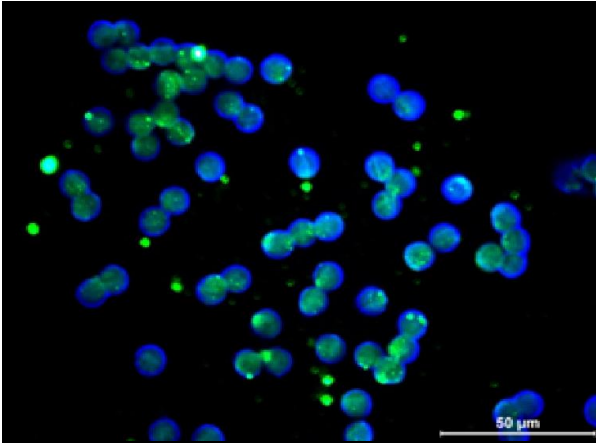
Bu çalışmada sürekli değişkenler için Shapiro-Wilks testi uygulandı. Değişkenler normal dağılım göstermediği için gruplar arası karşılaştırma Kruskal Wallis test ve Dunn Çoklu Karşılaştırma testi ile analiz edildi ve medyan (%25-%75) yüzdelik değerler olarak gösterildi. İstatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics 22.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois) programı kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi p <0.05 olarak alındı.

BULGULAR

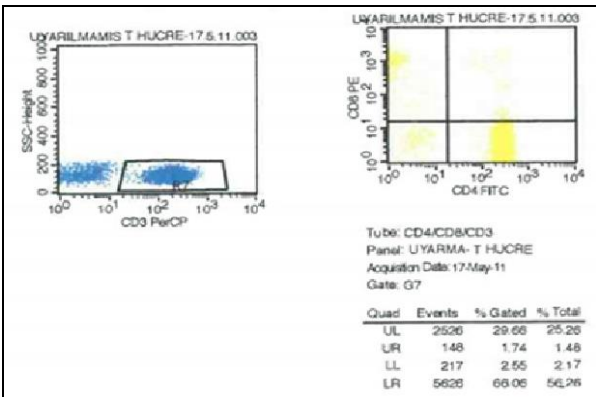
Sağlıklı kadın gönüllülerin periferik kanlarından izole edilen CD3+T-hücrelerinin görüntüsü invört mikroskopta (Şekil 1) elde edildikten sonra hücre izolasyonlarının saflığı IF ve akım sitometrik yöntemlerle CD3 antikoruna ile işaretlenerek tespit edildi (Şekil 2, Şekil 3). PHA, IL-2 ve PHA+IL-2 ile uyarılmış CD3+T-hücre grupları faz-kontrast mikroskobunda incelendiğinde, morfolojilerinin değiştiği, yapılarında bazı uzantılar oluştuğu ve yer yer kümeleştikleri gözlemlendi (Şekil 4).



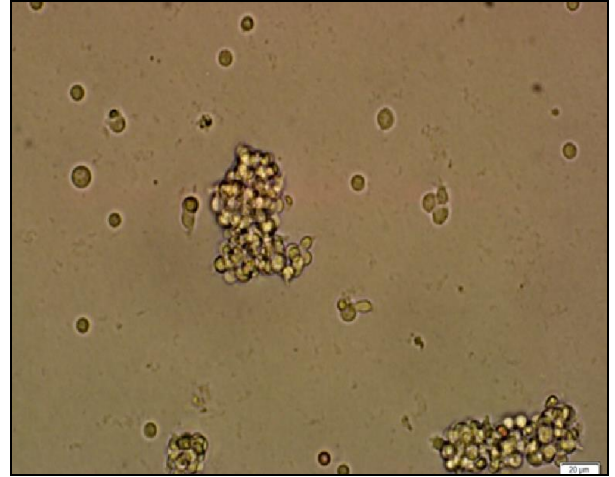
Şekil 1. RosetteSep kiti kullanılarak insan periferik kanından izole edilmiş CD3+T-hücrelerinin invört mikroskoptaki görüntüsü. Kitteki antikor içeriğinin eritrositlerle ve diğer istenmeyen hücrelerle kompleks oluşturarak (rozet yapılar) (turuncu oklar) negatif seleksiyon ile çöktürülüp ortamdaki uzaklaştırılması sonucu saf CD3+T-hücreleri (yeşil oklar) tipik morfolojik özellikleriyle ayır edilebilmektedir (Büyütme x100).



Şekil 2. CD3+T-hücrelerinin IF yöntemle CD3 antikoruyla boyanması sonucu elde edilen IF mikroskoptaki görüntüsünde, hücrelerin yeşil renkte CD3 ve mavi renkte çekirdek boyası (DAPI) ışması yapıldığı ve T-hücrelerinin CD3 izolasyonunun gerçekleştiği gözlenmiştir.



Şekil 3. CD3+T-hücrelerinin CD3 antikoruyla işaretlenmesi sonucu %90.63 düzeyinde saflıkla izole edildiklerini gösteren akım sitometri sonucu.



Şekil 4. Yirmidört saat boyunca inkübatörde PHA ve IL-2 ile uyarılan CD3+T-hücrelerinin morfolojilerinin değiştiği ve yapılarında bazı uzantılar oluştuğu, hücrelerin yer yer kümeleştiği faz-kontrast mikroskopta gözlemlendi.

CD3+T-hücrelerinin uyarılmış ve uyarılmamış gruplarının çoğalım ve uyarılma düzeyleri; spektrofotometrik yöntemle WST-1 testi ve akım sitometri yöntemiyle CFSE testi ile; ayrıca CD25, CD38, CD69, CD71 ve HLA-DR hücre yüzey aktivasyon moleküllerinin % ekspresyon düzeyleri ve MCS ölçümleri akım sitometri yöntemiyle ölçülerek tespit edildi.

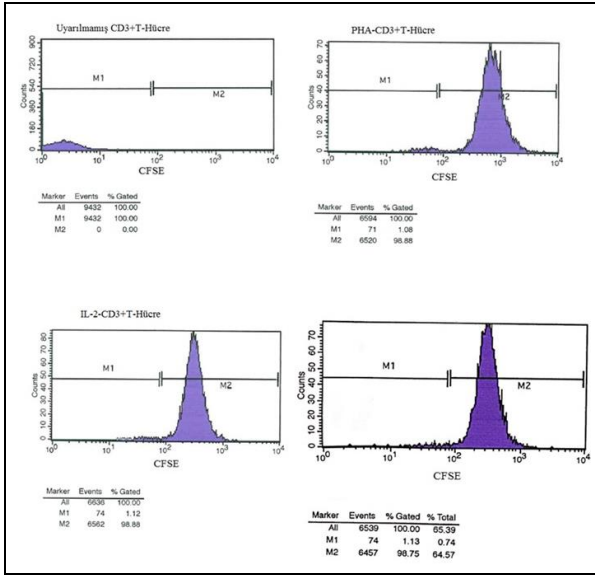
WST-1 testi sonuçlarına göre; uyarılmamış CD3+T-hücreleri (1. grup, kontrol) ile karşılaştırıldığında; PHA-CD3+T-hücrelerinin (2. grup) ($p < 0.001$) ve IL-2+PHA-CD3+T-hücrelerinin (4. grup) ($p < 0.001$) istatistiksel açıdan önemli çoğalım gösterdikleri yani uyarıldıkları tespit edildi. IL-2-CD3+T-hücrelerinde (3. grup) de istatistiksel açıdan önemli olmasa da kontrole kıyasla çoğalım farkı tespit edildi. Bunun yanı sıra, IL-2-CD3+T-hücrelerine kıyasla, PHA-CD3+T-hücrelerinin ($p < 0.001$) ve PHA+IL-2-CD3+T-hücrelerinin ($p : 0.006$) istatistiksel açıdan anlamlı olarak çoğalım gösterdikleri yani uyarıldıkları tespit edildi (Tablo 1).

CFSE testi sonuçlarına göre; WST-1 testine benzer şekilde uyarılmamış CD3+T-hücreleri ile karşılaştırıldığında; PHA-CD3+T-hücrelerinin ($p < 0.001$) ve IL-2+PHA-CD3+T-hücrelerinin ($p < 0.001$) istatistiksel açıdan önemli çoğalım gösterdikleri yani uyarıldıkları tespit edildi. Bunun yanı sıra, IL-2-CD3+T-hücrelerine kıyasla PHA-CD3+T-hücrelerinin ($p : 0.01$) ve PHA+IL-2-CD3+T-hücrelerinin ($p : 0.001$) anlamlı olarak çoğalım gösterdikleri yani uyarıldıkları tespit edildi (Tablo 1, Şekil 5).

Tablo 1. Değişkenlerin gruplararası karşılaştırılması sonuçları.

Değişkenler	Gruplar				p	Çoklu Karşılaştırma
	1 Medyan (%25-%75)	2 Medyan (%25-%75)	3 Medyan (%25-%75)	4 Medyan (%25-%75)		
CFSE	0.09 (0.085-0.098)	98.86 (97.90-99.88)	95.39 (94.55-96.21)	98.6 (97.78-99.87)	<0.001	1-2: <0.001 1-4: <0.001 2-3: 0.010 3-4: 0.001
WST	0.14 (0.141-0.145)	0.16 (0.15-0.16)	0.143 (0.142-0.147)	0.150 (0.149-0.161)	<0.001	1-2: <0.001 1-4: <0.001 2-3: <0.001 3-4: 0.006

1. grup: Uyarılmamış CD3+T-hücreleri, kontrol; 2. grup: PHA-CD3+T-hücreleri; 3. grup: IL-2-CD3+T-hücreleri; 4. grup: PHA+ IL-2-CD3+T-hücreleri.

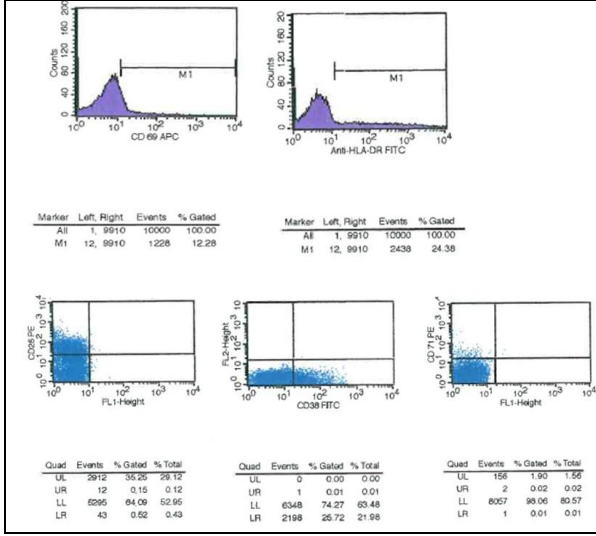
**Şekil 5.** Uyarılmamış CD3+T-hücre grubu (kontrol) ve tüm uyarılmış CD3+T-hücre gruplarının CFSE akım sitometri verileri.

Uyarılmış gruplardaki CD3+T-hücreleri aktivasyon moleküllerinin % ekspresyon düzeyleri uyarılmamış CD3+T-hücreleriyle karşılaştırıldığında, PHA-CD3+T-hücrelerinde; CD25 (p <0.001), CD69 (p <0.001) ve CD71 (p <0.001) değerlerinin, PHA+IL-2-CD3+T-hücrelerinde; CD38 (p <0.001), CD69 (p <0.001) ve HLA-DR (p <0.001) düzeylerinin istatistiksel açıdan anlamlı artış gösterdiği tespit edildi. Ayrıca IL-2-CD3+T-hücreleri ile karşılaştırıldığında, PHA-CD3+T-hücrelerinde CD25 (p <0.001), CD38 (p <0.001) CD71 (p <0.001) ve HLA-DR (p <0.001) düzeylerinin, PHA+IL-2-CD3+T-hücrelerinde ise; CD25 (p <0.001), CD38 (p <0.001), CD69 (p <0.001), CD71 (p <0.001) ve HLA-DR (p <0.001) düzeylerinin anlamlı olarak arttığı tespit edildi (Tablo 2, Şekil 6, Şekil 7, Şekil 8, Şekil 9).

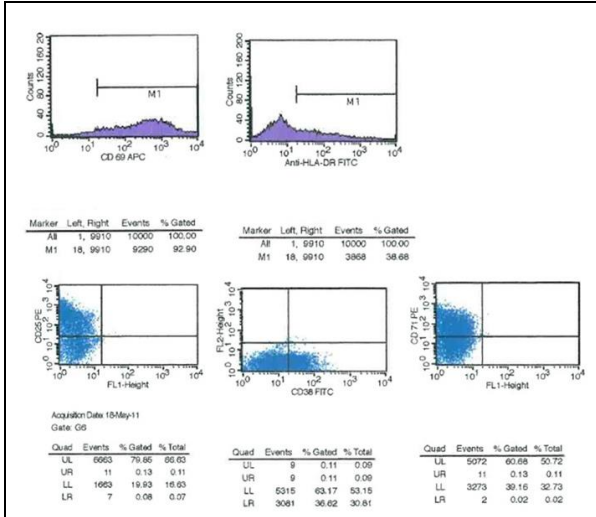
Tablo 2. Değişkenlerin gruplararası karşılaştırılması sonuçları.

Değişkenler	Gruplar				p	Çoklu Karşılaştırma
	1 Medyan (%25-%75)	2 Medyan (%25-%75)	3 Medyan (%25-%75)	4 Medyan (%25-%75)		
HLA-DR	24.38 (23.12-25.13)	28.75 (27.67-29.12)	20.98 (19.98-21.23)	31.21 (30.98-31.67)	<0.001	1-4: <0.001 2-3: <0.001 3-4: <0.001
CD38	1.90 (1.80-2.00)	36.62 (35.56-37.32)	6.87 (6.82-6.90)	67.88 (66.45-68.67)	<0.001	1-4: <0.001 2-3: <0.001 3-4: <0.001
CD71	25.72 (24.11-26.28)	92.15 (91.98-92.90)	19.87 (19.67-20.12)	34.61 (34.12-35.78)	<0.001	1-2 <0.001 2-3: <0.001 3-4: <0.001
CD69	12.67 (12.28-12.78)	61.56 (60.68-62.12)	35.91 (34.98-36.12)	93.30 (92.11-94.28)	<0.001	1-2 <0.001 1-4: <0.001 3-4: <0.001
CD25	35.25 (33.21-37.13)	79.85 (79.56-80.11)	24.82 (24.51-25.51)	75.05 (73.26-77.12)	<0.001	1-2 <0.001 2-3: <0.001 3-4: <0.001

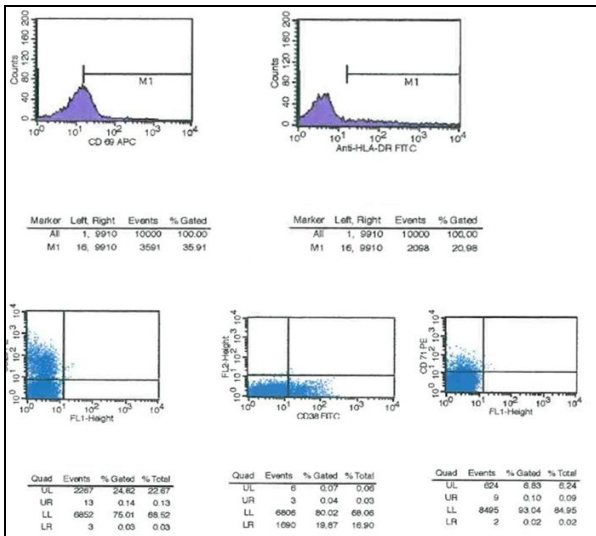
1. grup: Uyarılmamış CD3+T-hücreleri, kontrol; 2. grup: PHA-CD3+T-hücreleri; 3. grup: IL-2-CD3+T-hücreleri; 4. grup: IL-2+PHA-CD3+T-hücreleri.



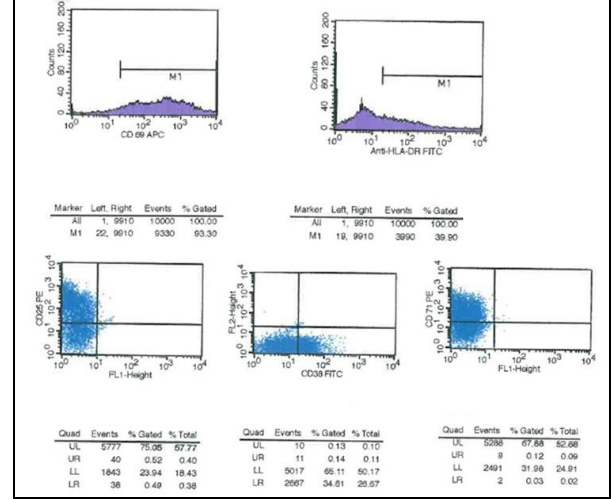
Şekil 6. Uyarılmamış CD3+T-hücre grubu (1. grup, kontrol) aktivasyon moleküllerinin akım sitometri verisi.



Şekil 7. PHA-CD3+T-hücre grubu (2. grup) aktivasyon moleküllerinin akım sitometri verisi.



Şekil 8. IL-2-CD3+T-hücre grubu (3. grup) aktivasyon moleküllerinin MCS akım sitometri verisi.



Şekil 9. PHA+IL-2-CD3+T-hücre grubu (4. grup) aktivasyon moleküllerinin akım sitometri verisi.

TARTIŞMA

Bu çalışmada, 15 sağlıklı kadın gönüllünün periferik kanından izole edilen CD3+T-hücrelerinin saflığı IF ve akım sitometrik yöntemlerle tespit edildiğinde, akım sitometride izolasyon saflığının %90.63 düzeyinde gerçekleştiği tespit edildi. İzole edilen CD3+T-hücreleri PHA ve IL-2 ile ayrı ayrı ve her ikisi uyarıcı ile birlikte 24 saat boyunca uyarıldı. Her üç uyarılma sonucunda da hücre morfolojilerinin değiştiği, hücrelerin yer yer kümeleştiği ve yapılarında bazı uzantılar olduğu faz-kontrast mikroskopunda gözlemlendi.

Yapılan birçok çalışmada, T-hücrelerinin uyarıldıklarında çoğaldıkları ve hücre yüzeylerinde birçok aktivasyon molekülünü ekspresse ettikleri açıklanmıştır. PHA gibi mitojen, IL-2 gibi sitokin ve LFA-1 gibi integrin yapısındaki uyarıcılar, T-hücrelerinin *invitro* ortamda çoğalabilmeleri ve bazı hücre yüzey aktivasyon moleküllerini ekspresse etmeleri için kullanılmaktadır. Uyarıcılarla uyarılan T-hücreleri CD25, CD38, CD69, CD71 ve HLA-DR gibi aktivasyon moleküllerini ekspresse ederler ki bu moleküller dinlenme halindeki uyarılmamış T-hücrelerinde ya çok az sentez edilir ya da hiç edilmezler (20-29, 37).

Çalışmada, uyarılmamış CD3+T-hücrelerle karşılaştırıldığında; PHA ve PHA+IL-2 ile uyarılan CD3+T-hücrelerinin CD25, CD38, CD69, CD71 ve HLA-DR düzeylerinde ekspresyon artışı tespit edildi. CD3+T-hücreler IL-2 ile uyarıldığında ise, uyarılmamış hücrelere kıyasla sadece CD38 ve CD69 aktivasyon moleküllerinde ekspresyon artışı görüldü. Ayrıca CD25 ve CD71'in en yüksek ekspresyon değerleri PHA-CD3+T-hücrelerinde; CD38, CD69 ve HLA-DR'nin en yüksek ekspresyon değerleri PHA+IL-2-CD3+T-hücrelerinde tespit edildi.

Bunun yanı sıra, PHA ve PHA+IL-2 ile uyarılan CD3+T-hücrelerinden sentezlenen aktivasyon molekülleri ekspresyon düzeylerinde birbirine yakın düzeyler ölçülse de; IL-2 ile uyarılan CD3+T-hücrelerinden

sentezlenen tüm aktivasyon moleküllerinde bu iki gruba oranla daha düşük düzeyler tespit edildi.

Uyarılan üç ayrı hücre grubunu aktivasyon molekülleri ekspresyonları açısından kendi içinde karşılaştırdığımızda, PHA-CD3+T-hücrelerinde CD25, CD38, CD71 ve HLA-DR düzeylerinin IL-2-CD3+T-hücrelerinden anlamlı düzeyde artış gösterdiği; PHA+IL-2-CD3+T-hücrelerinde ise CD25, CD38, CD69, CD71 ve HLA-DR düzeylerinin IL-2-CD3+T-hücrelerinden anlamlı düzeyde artış gösterdiği görüldü. PHA-CD3+T-hücreleri ve PHA+IL-2-CD3+T-hücrelerinden sentezlenen CD25 ve HLA-DR aktivasyon molekülleri yüzdeleri ise benzerdi.

Yapılan akım sitometri çalışmalarında PHA gibi mitojenik ve antijenik uyarıcılarla uyarılan T-hücrelerinden CD25, CD38, CD69, CD71 ve HLA-DR gibi hücre yüzey aktivasyon moleküllerinin sentezlendiği tespit edilmiştir. Ayrıca PHA ile uyarılan bu moleküllerden en fazla ekspresyonun CD25'de olduğu, ardından CD71, CD69 ve HLA-DR'nin geldiğini bildirilmiştir. (24, 30-33).

CD3+T-hücrelerinin uyarılmasına bağlı olarak çoğalmaları değerlendirildiğinde; WST-1 ve CFSE testlerinde benzer sonuçlar elde edildi. Her iki testte de PHA-CD3+T-hücreler ve PHA+IL-2-CD3+T-hücreler birbirine yakın çoğalm düzeylerine sahipti. Ayrıca bu gruplar uyarılmamış CD3+T-hücreler ve IL-2-CD3+T-hücrelerle karşılaştırıldığında sayılarında anlamlı düzeyde artış olduğu tespit edildi. Benzer şekilde, PHA

ve IL-2 ile uyarılan birçok T-hücre çalışmasında, uyarılmanın T-hücre çoğalmını arttırdığı bildirilmiştir (25, 28, 38-41).

Böylece, uyarılmamış CD3+T-hücreler ve IL-2 ile uyarılan CD3+T-hücreler ile karşılaştırıldığında PHA ile ve PHA+IL-2 ile uyarılan CD3+T-hücrelerde, hem hücre çoğalmının hem de aktivasyon molekülleri ekspresyon düzeylerinin anlamlı olarak arttığı tespit edilmiş oldu. Hücrelerin PHA ve PHA+IL-2 ile uyarılmasında ise hücre çoğalmı ve aktivasyon molekülleri ekspresyon düzeyleri açısından istatistiksel açıdan anlamlı bir fark elde edilmediğinden *invitro* ortamda CD3+T-hücre uyarımı için tek bir uyarıcı olarak PHA'nin yeterli olacağı kanısına varılmış oldu. Sonuç olarak, bu çalışma CD3+T-hücrelerini PHA ve IL-2 ile ayrı ayrı uyarmanın yanısıra, PHA+IL-2 ile birlikte uyarmanın CD3+T-hücre çoğalm ve aktivasyon molekülü ekspresyonunu artırıp arttırmadığını belirlemek amacıyla kurgulandı. En yüksek düzeyde hücre çoğalmı ve aktivasyon molekülleri ekspresyonu PHA ve PHA+IL-2 ile uyarılan CD3+T-hücrelerinde tespit edildi. Böylece, CD3+T-hücre uyarılmasında PHA'nin yalnız başına IL-2'ye ihtiyaç olmadan yeterli ve etkili bir uyarıcı olduğu sonucuna varılmış oldu.

Teşekkür: Çalışmalarım süresince değerli yardımlarıyla bana destek olan hocalarım Prof. Dr. Erdal Karaöz ve Doç. Dr. Ayla Eker Sarıboyacı'ya çok teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

1. Germain RN. T cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 309-22.
2. Palmer E. Negative selection-clearing out the ad apples from the T cell repertoire. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 383-91.
3. Williams MA, Bevan MJ. Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 171.
4. Camcıoğlu Y, Deniz G. Temel immünoloji, immün sistemin işlev ve bozuklukları: immün sisteme giriş. İstanbul Tıp Kitapevi 1. Baskı İstanbul 2007: 1-21.
5. Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, et al. IL-4 inhibits TGF- β -induced Foxp3+ T cells and, together with TGF- β , generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol* 2008; 9: 1347-55.
6. Wan YY, Flavell RD. How diverse- CD4 effector T cells and their functions. *J Mol Cell Biol* 2009; 1: 20-36.
7. Zhu J, Paul WE. Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol Rev* 2010; 238: 247-62.
8. Blanchard N1, Lankar D, Faure F, et al. TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. *J Immunol* 2002; 168: 3235-41.
9. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. 7/E Elsevier Saunders. Philadelphia, USA 2009: 173-203.
10. Başkan EB. T hücre immünesi. *Türkderm* 2013; 47: 18-23.
11. Düzgün N. İmmün Sistem Tanıtımı. İhastalıklarırom atoloji.medicine.ankara.edu.tr/files/2014; 97-122.

12. Katzen D, Chu E, Terhost C, et al. Mechanisms of human T cell response to mitogens: IL 2 induces IL 2 receptor expression and proliferation but not IL 2 synthesis in PHA-stimulated T cells. *J Immunol* 1985; 135: 1840-45.
13. Rothwell, L, Hamblin A, Kaiser P. Production and characterisation of monoclonal antibodies specific for chicken interleukin-2. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 83: 149-60.
14. Lawson S, Rothwell L, Lambrecht B, Howes K, Venugopal K, Kaiser P. Turkey and chicken interferon- γ , which share high sequence identity, are biologically cross-reactive. *Develop Compar Immunol* 2001; 25: 69-82.
15. Zhou Z-H, Karnaukhova E, Rajabi M, Kozłowski S. Oversulfated chondroitin sulfate binds to chemokines and inhibits stromal cell- derived factor-1 mediated signaling in activated T cells. *PLoS ONE*, DOI: 10.1371/journal.2014; 9: 9: e94402.
16. Mire-Sluis AR, Wickremasinghe RG, Hoffbrand AV, Timms AM, Francis GE. Human T lymphocytes stimulated by phytohaemagglutinin undergo a single round of cell division without a requirement for interleukin-2 or accessory cells. *Immunology* 1987; 60: 7-12.
17. Herre JI, Marshall AS, Caron E, et al. Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. *Blood* 2004; 104: 4038-45.
18. Ma JI, Becker C, Lowell CA, Underhill DM. Dectin-1-triggered Recruitment of Light Chain 3 Protein to Phagosomes Facilitates Major Histocompatibility Complex Class II Presentation of Fungal-derived Antigens. *J Biol Chem* 2012; 287: 34149-56.
19. Darzynkiewicz Z, Traganos F, Sharpless T, Melamed MR. Lymphocyte stimulation: a rapid multiparameter analysis. 1976; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 73: 2881-4.
20. Ko HS, Fu SH, Winchester RJ, Yu DTY, Kunkel HG: Ia determinants on stimulated human T lymphocytes. *J Exp Med* 1979; 150: 246-55.
21. Judd W, Poodry CA, Strominger JL: Novel surface antigen expressed on dividing cells but absent from nondividing cells. *J Exp Med* 1980; 152: 1430-35.
22. Cebrian M, Yague E, Rincon M, Lopez-Botet M, Landazuri MO, Sanchez-Madrid E. Triggering of T-cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes. *J Exp Med* 1988; 168: 1621-37.
23. Fraser JD, Strauss D, Weiss A: Signal transduction events leading to T-cell lymphokine gene expression. *Immunol Today* 1993; 14: 357-62.
24. Caruso A, Licenziati S, Corulli M, et al. Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometry* 1997; 27: 71-6.
25. Demircan PC, Sariboyaci AE, Unal ZS, Gacar G, Subasi C, Karaoz E. Immunoregulatory effects of human dental pulp-derived stem cells on T cells: comparison of transwell co-culture and mixed lymphocyte reaction systems. *Cytotherapy* 2011; 13: 1205-20.
26. Bitgen N, Altuntaş DH, Hamurcu Z, Demirtaş H, Ozturk F. Fitohemaglutinin ile uyarılmış insan T-lenfositlerindeki AgNOR motiflerinin T-lenfosit alt grupları ile karşılaştırmalı olarak incelenmesi. *Erciyes Med J* 2012; 34: 132-6.
27. Sariboyaci AE, Demircan PC, Gacar G, Unal ZS, Erman G, Karaoz E. Immunomodulatory properties of pancreatic islet-derived stem cells co-cultured with T cells: Does it contribute to the pathogenesis of type 1 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2014; 122: 1-11.
28. Karaoz E, Demircan PC, Erman G, Güngörürler E, Sariboyaci AE. Comparative analyses of immune-suppressive characteristics of bone-marrow, Wharton's jelly and adipose-tissue derived human MSCs. *Turk J Hematol* 2017; 34: 213-25.
29. Walling BL and Kim M. LFA-1 in T cell migration and differentiation. *Front Immunol* 2018; 9: 1-10.
30. Triebel F, DeRoquefeuil S, Blanc C, Charron DJ, Debre P. Expression of MHC class II and Tac antigens on IL-2 activated human T-cell clones that can stimulate in MLR, AMLR, PLT, and can present antigen. *Human Immunol* 1986; 15: 302-8.
31. Waldmann TA. The structure, function, and expression of interleukin-2 receptors on normal and malignant lymphocytes. *Science* 1986; 232: 727-32.
32. Siegal JP, Sharon M, Smith PL, Leonard WJ. The IL-2 receptor B chain (p70): Role in mediating signal for LAK, NK, and proliferative activities. *Science* 1987; 238: 75-8.
33. Nakamura S, Sung SSJ, Björndahl JM, Fu SM. Human T-cell activation IV. T-cell activation and proliferation via the early activation antigen EA-1. *J Exp Med* 1989; 169: 677-89.
34. Leroux M, Schindler L, Braun R, Doerr HW, Geissen HP, Kirchner H. A whole blood lymphoproliferation assay for measuring cellular immunity against herpes viruses. *J Immunol Methods* 1989; 79: 251-7.
35. Maino VC, Suni MA, Ruitenberg JJ. Rapid flow cytometric method for measuring lymphocyte subset activation. *Cytometry* 1995; 20: 127-33.
36. Krowka JF, Cuevas B, Maron DC, Steimer KS, Ascher MS, Sheppard HW. Expression of CD69 after in vitro stimulation: a rapid method for quantitating impaired lymphocyte responses in HIV-infected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1996; 11: 95-104.

37. Sandoval-Montes C1, Santos-Argumedo L. CD38 is expressed selectively during the activation of a subset of mature T cells with reduced proliferation but improved potential to produce cytokines. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 513-21.
38. Cooper David and Pellis NR. Suppressed PHA activation of T lymphocytes in simulated microgravity is restored by direct activation of protein kinase C. *Journal of Leukocyte Biology* 1998; 63: 550-62.
39. Pesoa S, Martín A, Mariani AL, Vullo C, Serra H. Interleukin 2 induction of proliferation in resting T lymphocytes requires contact with monocytes. *Medicina (B Aires)* 2000; 60: 202-10.
40. Bocharov1 G, Luzyanina T, Cupovic3 J, Burkhard L. Asymmetry of cell division in CFSE-based lymphocyte proliferation analysis. *Front Immunol* 2013; 4: 1-7.
41. Ahluwalia B, Magnusson MK, Isaksson S, Larsson F, Öhman L. Effects of Aloe barbadensis Mill. extract (AVH200®) on human blood T cell activity in vitro. *J Ethnopharmacol* 2016; 179: 301-9.