

PINAR KASAPÖĞÜ

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2024

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

TİP 1 DİYABET PATOGENEZİNDE REGÜLATÖR T
HÜCRE FONKSİYONLARI VE HÜCRE
ETKİLEŞİMLERİNİN İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

PINAR KASAPOĞLU

DANIŞMAN
PROF. DR. ALİ OSMAN GÜROL

İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI
İMMÜNOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2024

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

PINAR KASAPOĞLU

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın hazırlanması ve yürütülmesi boyunca yardımlarını esirgemeyen, her alanda desteğini gördüğüm danışman hocam Prof. Dr. Ali Osman Gürol'a, eğitimim boyunca ilgisini ve sevgisini eksik etmeyen Prof. Dr. Günnur Deniz'e, engin tecrübesiyle yol gösterdiği için sayın hocam Prof. Dr. M. Temel Yılmaz'a teşekkürlerimi sunarım.

Bana her konuda yardımcı olan, sevgisini ve desteğini hiçbir zaman unutmayacağım Prof. Dr. Nilgün Işıksağan'a, ilk günden beri dostlukları ve yardımseverlikleri ile gerek çalışmalarında gerekse sosyal hayatta beni yalnız bırakmayan hep destek olan dostlarım Aslı Çağlar, Esmâ Zekiroğlu, Dr. Murat Koşer ve Prof. Dr. Mahdi Behzad'a sonsuz teşekkür ederim.

Bu tezin oluşturulması sırasında deneyimlerini benimle paylaşan sevgili arkadaşlarım Doç. Dr. Sibel P. Yentür ve Doç. Dr. Vuslat Yılmaz'a, akım sitometrisi çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Suzan Adın-Çınar'a, DETAE İmmünoloji Anabilim Dalı ailesine, manevi desteklerini her zaman hissettiğim çalışma arkadaşlarım İleri Analiz Laboratuvar ekibine teşekkür ederim.

Bu süreçte desteklerini esirgemeyen Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına teşekkür etmeyi ayrıca bir borç bilirim.

Tüm arkadaşlarıma, beni anlamaya çalışarak dinleyen sevgili dostlarıma ve eğitimim boyunca beni destekleyen sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2598 / 51476

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	ii
İTHAF.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xi
ÖZET	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
1.1. Diabetes Mellitus	3
1.1.1. Genel Bilgi	3
1.1.2. Epidemiyoloji.....	3
1.1.3. Tanı ve Sınıflandırma.....	4
1.1.3.1. Tip 1 Diyabet.....	5
1.1.3.2. Tip 2 Diyabet.....	8
1.1.3.3. Gestasyonel Diyabet.....	10
1.2. İmmün Sistem	10
1.2.1. T Lenfositler ve Sitokinler	11
1.3. D Vitamini	14
1.4. Progesteron	15
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	18
2.1. Çalışma Grubu	18
2.2. Periferik Kan Mononükleer Hücre Ayırımı	18
2.3. Akan Hücre Ölçer ve İmmüfenotipleme.....	19
2.4. Hücre İçi Foxp3 ve CTLA4 Boyaması	21
2.5. Hücre Kültürü	22
2.6. Elisa ve Lumineks Ölçümleri.....	22
2.7. İstatistiksel Analiz.....	23
3. BULGULAR.....	24
4. TARTIŞMA	61

KAYNAKLAR	67
HAM VERİLER	81
FORMLAR	86
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	87



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Antikor fluorokrom boyama kombinasyonu	21
Tablo 3-1: Kontrol, diyabet, yeni ve eski tanıli diyabet gruplarını içeren alt grupların yaş ve cinsiyet açısından değerlendirilmesi	24
Tablo 3-2: Kontrol, diyabet, yeni ve eski tanıli diyabet gruplarını içeren alt grupların klinik parametreler açısından değerlendirilmesi	25
Tablo 3-3: Total diyabet, yeni tanı ve eski tanı diyabet gruplarının kültür öncesi taze (uyarısız) periferik kan mononükleer hücre değerlendirmeleri	26
Tablo 3-4: Total diyabet, yeni tanı ve eski tanı diyabet gruplarının CD3+CD28+ uyarımlı ölçümlere ilişkin değerlendirmeleri	27
Tablo 3-5: Total diyabet, yeni tanı ve eski tanı diyabet gruplarının CD3+CD28+VitD uyarımlı ölçümlere ilişkin değerlendirmeleri	28
Tablo 3-6: Total diyabet, yeni tanı ve eski tanı diyabet gruplarının CD3+CD28+Progesteron uyarımlı ölçümlere ilişkin değerlendirmeleri.....	29
Tablo 3-7: Total diyabet, yeni tanı ve eski tanı diyabet gruplarının CD3+CD28+VitD+Progesteron uyarımlı ölçümlere ilişkin değerlendirmeleri	29
Tablo 3-8: Total diyabet, yeni tanı ve eski tanı diyabet gruplarının CD3+CD28+ uyarımlı sitokin değerlendirmeleri	31
Tablo 3-9: Total diyabet, yeni tanı ve eski tanı diyabet gruplarının CD3+CD28+VitD uyarımlı sitokin değerlendirmeleri.....	31
Tablo 3-10: Total diyabet, yeni tanı ve eski tanı diyabet gruplarının CD3+CD28+Progesteron uyarımlı sitokin değerlendirmeleri.....	32
Tablo 3-11: Total diyabet, yeni tanı ve eski tanı diyabet gruplarının CD3+CD28+VitD+Progesteron uyarımlı sitokin değerlendirmeleri.....	32
Tablo 3-12: Uyarılara karşı lenfosit değişimlerinin değerlendirilmesi	33
Tablo 3-13: Uyarılara karşı T Hücre değişimlerinin değerlendirilmesi.....	34
Tablo 3-14: Uyarılara karşı yardımcı T Hücre değişimlerinin değerlendirilmesi.....	35
Tablo 3-15: Uyarılara karşı sitotoksik T Hücre değişimlerinin değerlendirilmesi	37
Tablo 3-16: Uyarılara karşı B Hücre değişimlerinin değerlendirilmesi.....	38
Tablo 3-17: Uyarılara karşı CD4+CD25+ değişimlerinin değerlendirilmesi	39
Tablo 3-18 : Uyarılara karşı TREG değişimlerinin değerlendirilmesi.....	40

Tablo 3-19: Uyaranlara karşı CD4+CD25+CXCR5-CD127-FOXP3+ değişimlerinin değerlendirilmesi	41
Tablo 3-20: Uyaranlara karşı CD4+CD25+CXCR5-CD127-PD1+ değişimlerinin değerlendirilmesi	43
Tablo 3-21: Uyaranlara karşı CD4+CD25+CXCR5-CD127-cCTLA4+ değişimlerinin değerlendirilmesi	44
Tablo 3-22: Uyaranlara karşı TFH değişimlerinin değerlendirilmesi	45
Tablo 3-23: Uyaranlara karşı CD4+CD25-CXCR5+PD1+ değişimlerinin değerlendirilmesi	47
Tablo 3-24: Uyaranlara karşı CD4+CD25-CXCR5+cCTLA4+ değişimlerinin değerlendirilmesi	48
Tablo 3-25: Uyaranlara karşı TFR değişimlerinin değerlendirilmesi.....	49
Tablo 3-26: Uyaranlara karşı CD4+CD25+CXCR5+CD127-cFOXP3+ değişimlerinin değerlendirilmesi	50
Tablo 3-27: Uyaranlara karşı CD4+CD25+CXCR5+CD127-cCTLA4+ değişimlerinin değerlendirilmesi	51
Tablo 3-28: Uyaranlara karşı CD4+CD25+CXCR5+CD127-PD1+ değişimlerinin değerlendirilmesi	52
Tablo 3-29: Uyaranlara karşı IL-10 değişimlerinin değerlendirilmesi	53
Tablo 3-30: Uyaranlara karşı IFN- γ değişimlerinin değerlendirilmesi	55
Tablo 3-31: Uyaranlara karşı IL-17 değişimlerinin değerlendirilmesi	56
Tablo 3-32: Uyaranlara karşı TNF- α değişimlerinin değerlendirilmesi	57
Tablo 3-33: Uyaranlara karşı IL-21 değişimlerinin değerlendirilmesi	58
Tablo 3-34: Uyaranlara karşı TGF- β değişimlerinin değerlendirilmesi	59
Tablo 3-35: Uyaranlara karşı IL-4 değişimlerinin değerlendirilmesi	60

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Sağlıklı periferik kan mononükleer hücreler ile akan hücre ölçer analiz sisteminde uygulanan kapılama stratejileri. a) Otofloresan ve floresan eksi bir tüpleri ile pozitiflik sınırının belirlenmesi, b) TREG, TFH ve TFR hücre kapılama örneği, c) Yardımcı ve sitotoksik T hücre kapılama stratejisi, d) FOXP3, CTLA4 ve PD1 floresan eksi bir yöntemi ile sınır tayini	21
Şekil 3-1: Periferik kan mononükleer hücrelerden yapılan Tip 1 diyabetli hasta immünofenotipleme örneği.....	25
Şekil 3-2: Uyarı yanıtları açısından yardımcı T lenfosit değişimleri. $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$ olarak değerlendirildi, anlamlılık belirtilmeyen çubuklar $**p<0,01$ 'dir. ..	36
Şekil 3-3: Uyarı yanıtları açısından regülatör T hücre değişimleri. $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$ olarak değerlendirildi, anlamlılık belirtilmeyen çubuklar $*p<0,01$ 'dir.	41
Şekil 3-4: Uyarı yanıtları açısından CD4+CD25+CXCR5-CD127-FOXP3+ hücre değişimleri. $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$ olarak değerlendirildi, anlamlılık belirtilmeyen çubuklar $**p<0,01$ 'dir.	43
Şekil 3-5: Uyarı yanıtları açısından foliküler T hücre değişimleri. $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$ olarak değerlendirildi, anlamlılık belirtilmeyen çubuklar $**p<0,01$ 'dir. ..	47
Şekil 3-6: Uyarı yanıtları açısından foliküler regülatör T hücre değişimleri. $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$ olarak değerlendirildi, anlamlılık belirtilmeyen çubuklar $**p<0,01$ 'dir.....	50
Şekil 3-7: Uyarı yanıtları açısından interlökin-10 düzeyi değişimleri. $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$ olarak değerlendirildi, anlamlılık belirtilmeyen çubuklar $**p<0,01$ 'dir. ..	55
Şekil 3-8: Uyarı yanıtları açısından tümör nekroz faktör-alfa düzeyi değişimleri. $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$ olarak değerlendirildi, anlamlılık belirtilmeyen çubuklar $**p<0,01$ 'dir.....	58
Şekil 3-9: Uyarı yanıtları açısından interlökin-21 düzeyi değişimleri. $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$ olarak değerlendirildi, anlamlılık belirtilmeyen çubuklar $**p<0,01$ 'dir. ..	59
Şekil 0-1: Uyarı yanıtları açısından lenfosit değişimleri	81
Şekil 0-2: Uyarı yanıtları açısından CD3+ T lenfosit değişimleri.....	81
Şekil 0-3: Uyarı yanıtları açısından sitotoksik T lenfosit değişimleri	82
Şekil 0-4: Uyarı yanıtları açısından B lenfosit değişimleri.....	82
Şekil 0-5: Uyarı yanıtları açısından CD4+CD25+ hücre değişimleri.....	83

Şekil 0-6: Uyarı yanıtları açısından CD4+CD25+CXCR5-CD127-PD1+ hücre değişimleri	83
Şekil 0-7: Grup içi uyarı yanıtları açısından CD4+CD25+CXCR5-CD127-cCTLA4+ hücre değişimleri.....	84
Şekil 0-8: Uyarı yanıtları açısından CD4+CD25+CXCR5+CD127-cCTLA4+ hücre değişimleri	84
Şekil 0-9: Uyarı yanıtları açısından CD4+CD25+CXCR5+CD127-PD1+ hücre değişimleri	85
Şekil 0-10: Uyarı yanıtları açısından interferon-gama düzeyi değişimleri.....	85



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- AIRE : Otoimmün regülatör
- APC : Antijen sunan hücre
- APG : Açlık plazma glukozu
- ASCL2 : Achaete scute benzeri 2
- BAG : Bozulmuş açlık glukozu
- Bcl-6 : B hücre lenfoma-6
- BGT : Bozulmuş glukoz toleransı
- BKİ : Beden kitle indeksi
- Blimp1 : B lenfosit-indükleyici maturasyon protein 1
- CTLA-4 : Sitotoksik T lenfosit-ilişkili protein 4
- CXCR5 : CXC kemokin reseptörü tip 5
- ERBB3 : Erb-B2 reseptör tirozin kinaz 3
- FOXP3 : Forkhead box protein 3
- GABA : Gama-aminobütirik asit
- GAD : Glutamik asit dekarboksilaz
- GADA : Glutamik asit dekarboksilaz otoantikor
- GDM : Gestasyonel diabetes mellitus
- GM : Germinal merkezi
- HbA1c : Hemoglobin A1c
- HIP14 : Huntingtin-etkileşen protein 14
- HLA : İnsan lökosit antijeni
- IA-2 : Adacık antijen-2
- IA2 : Anti-tirozin fosfataz
- IA-2A : Protein tirozin fosfataz otoantikor

IAA : İnsülin otoantikor

ICA : Adacık hücresi otoantikor

ICOS : İndüklenebilir eş-uyaran molekül

IFIH1 : İnterferon-indüklü helikaz C domain içeren protein 1

IFN- γ : İnterferon gama

IL : İnterlökin

IL2Ra : İnterlökin-2 reseptör alfa

İAA : İnsülin otoantikor

iTREG : İndüklenmiş regülatör T hücre

LADA : Erişkinde latent otoimmün diyabeti

MHC : Majör histokompatibilite kompleksi

MODY : Monogenik Diyabet

mPR : Membran progesteron reseptörü

NKT : Doğal öldürücü T

OGTT : Oral Glukoz Tolerans Testi

P4 : Progesteron

PBS : Fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi

PD-1 : Programlı ölüm-1

PD-1L : Programlı ölüm 1-ligand

PKMH : Periferik kan mononükleer hücreler

PR : Progesteron reseptör

PTPN22 : Protein tirozin fosfataz reseptör olmayan tip 22

SLE : Sistemik lupus eritematozus

STAT3 : Sranskripsiyon aktivatörleri 3

T1DM : Tip 1 Diabetes Mellitus

T2DM : Tip 2 Diabetes Mellitus

TFH: T foliküler yardımcı hücre

TFR : Foliküler regülatör T hücre

TGF- β : Transforme edici büyüme faktör-beta

TNF- α : Tümör nekroz faktörü alfa

TREG : Regülatör T hücre

VitD : 1,25 dihidroksi vitamin D3



ÖZET

Kasapoglu P. Tip 1 diyabet patogeneğinde regülatör T hücre fonksiyonları ve hücre etkileşimlerinin in vitro değerlendirilmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji AD. Doktora Tezi. İstanbul. 2024.

İmmünolojik açıdan tip 1 diyabet, genetik ve çevresel faktörlerin etkisi ile regülatör T hücrelerin (TREG) azalması, otoreaktif hücrelerin artışı ve sonuçta beta hücre hasarı ile karakterize kompleks bir hastalıktır. Bu çalışmada on yeni tanılı (YTT1DM), on beş eski tanılı Tip 1 diyabet (ETT1DM) hastası ve on beş sağlıklı bireyin B, T lenfosit ve özellikle TREG, foliküler T hücre (TFH), foliküler regülatör T (TFR) hücrelerinin diyabet patogeneğindeki rollerini belirleyerek, vitamin D ve progesteronun bu hücrelere etkisini değerlendirmek, kişiye özel hücre tedavisi açısından kliniğe katkı sağlamak amaçlanmıştır. Kültür öncesi uyarımsız (taze kan) ve anti-CD3+anti-CD28, anti-CD3+anti-CD28+vitamin D, anti-CD3+anti-CD28+progesteron ve anti-CD3+anti-CD28+vitamin D+progesteron uyarımları sonrası, TREG (CD4+CD25+CD127-CXCR5-), TFH (CD4+CD25-CXCR5+) ve TFR (CD4+CD25+CD127-CXCR5+) hücreleri akan hücre ölçer sistemi ile analiz edilmiştir. Bu hücre gruplarının sitoplazmik boyama ile CTLA4 ve FOXP3, yüzey boyama ile PD1 düzeyleri belirlenmiştir. IL-10, TGF- β , IL-21, IL-17, IL-4, TNF- α , IFN- γ düzeyleri kültür üst sıvısında çalışılmıştır. IFN- γ , TNF- α , IL-21 seviyeleri tüm gruplarda kontrole göre yüksek bulunmuştur. Progesteron, vitamin D ve birlikte uyarım sonucunda IL-21 seviyeleri kontrol seviyesine inmiştir. IL-10 düzeyi tüm diyabetlilerde diğer uyarımlara göre özellikle vitamin D ve progesteronun birlikte uyarımıyla artmıştır. Diyabet hastalarının TFR düzeyi kontrole göre düşük, TFH oranı ise yüksek bulunmuştur. Diğer uyarımlara göre, vitamin D ve progesteron uyarımı CD3+CD4+ ve TFR hücreleri arttırmış, CD3+CD8+ hücreleri azaltmıştır. Vitamin D immün sistem hücrelerine otoimmünite açısından olumlu etki etmiş ve progesteron etkisiyle bu etki kuvvetlenmiştir. Bu uyarımlarla otolog hücre tedavisi uygulandığında, klinikte umut verici olacağı görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Diabetes mellitus, regülatör T hücre, foliküler yardımcı T hücre, vitamin D, progesteron

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 51476/2598

ABSTRACT

Kasapoglu P. In vitro evaluation of regulatory T cell functions and cell interactions in the pathogenesis of Type 1 diabetes. İstanbul University, Institute of Health Science, Institute of Aziz Sancar Experimental Medicine, Department of Immunology, Doctoral dissertation. İstanbul. 2024.

Immunologically, T1DM is a complex disease characterized by a decrease in TREG, an increase in autoreactive cells, and ultimately beta cell damage, under the influence of genetic and environmental factors. In this study, by determining the roles of B, T and especially TREG, TFH, TFR cells in the pathogenesis of diabetes of ten new-onset, fifteen previously diagnosed diabetes patients and fifteen healthy individuals, it is aimed to evaluate the effects of vitamin D and progesterone on these cells and to contribute to clinic in terms of personalized cell therapy. TREG(CD4+CD25+CD127-CXCR5-), TFH(CD4+CD25-CXCR5+), TFR(CD4+CD25+CD127-CXCR5+) was analyzed with flow cytometry system before culture unstimulated (fresh blood) and after anti-CD3+anti-CD28, anti-CD3+anti-CD28+vitamin D, anti-CD3+anti-CD28+progesterone, anti-CD3+anti-CD28+vitamin D+progesterone stimulations. The levels were determined with intracellular staining of CTLA4, FOXP3 and surface staining of PD1 on these cells. IL-10, TGF- β , IL-21, IL-17, IL-4, TNF- α , IFN- γ levels were measured from culture supernatant. IFN- γ , TNF- α , IL-21 levels were found to be high in all groups to control. IL-21 levels decreased to control levels with the stimulations. IL-10 levels especially were increased with vitamin D+progesterone stimulation to other stimulations. The TFR level of diabetic patients was found to be lower and the TFH rate was higher than the control group. Compared to other stimulations, vitamin D+progesterone stimulation increased CD3+CD4+ and TFR cells and decreased CD3+CD8+ cells. Vitamin D had a positive effect on immune system cells in terms of autoimmunity, and this effect was strengthened by the progesterone. With these stimulations, autologous cell therapy seems to be promising in the clinic.

Key Words: Diabetes mellitus, Regulatory T cell, Follicular helper T cell, Vitamin D, Progesterone

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 51476/2598

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tip 1 diabetes mellitus (T1DM) etiopatogenezinde, genetik yatkınlık, çevresel tetikleyiciler rol oynamaktadır. İmmünolojik açıdan ise, genetik yatkınlık ile çevresel tetikleyicilerin etkileşimi sonucunda regülatör T (TREG) hücrelerinin azalması, otoreaktif T hücrelerinin artmasıyla karakterize otoimmün süreç başlamaktadır. İmmün hasarın göstergelerinden biri B hücrelerinin ürettiği adacık hücre otoantikorlarıdır (1, 2, 3, 4). Normal antikor üretim süreci ve tolerans mekanizmaları dikkate alındığında TREG hücreler, T foliküler yardımcı hücreler (TFH) ve yeni tanımlanmış olan foliküler regülatör T hücrelerin (TFR) T1DM patogenezinde önemli rolleri olduğu görülmektedir.

TREG'lerin ontogenezi ve fonksiyonundaki tanımlayıcı transkripsiyon faktörü forkhead box P3 (FOXP3)'dür. FOXP3⁺TREG, otoantijenlere karşı toleransta anahtar rol oynamaktadır. Yüzey belirteçleri arasında glukokortikoid-indüklü tümör nekroz faktör ilişkili reseptör, programlı ölüm-1 (PD-1), sitotoksik T lenfosit-ilşkili protein 4 (CTLA-4) ve programlı ölüm 1-ligand (PD-1L) yer almaktadır. Ayrıca interlökin (IL)-10, IL-35, transforme edici büyüme faktör-beta (TGF- β) gibi sitokinler salgılayarak işlev görürler (5, 6). T1DM'de yapılan TREG çalışmalarında genel kanı efektör T hücrelere karşı azalmış fonksiyon gösterdikleridir. Efektör T hücre ve TREG arasındaki dengesizlik sonucunda öze toleransın devam ettirilmesinde aksama meydana gelmekte ve proinflamatuvar bir sürecin başlamasıyla beta hücre hasarı oluşmaktadır. T1DM'de TREG sayı ve fonksiyon ile ilişkili değişimlerin nedenleri arasında IL2/IL2R sinyalizasyon bozukluğu, olgunlaşmamış veya defektif dendritik hücreler yer almaktadır (7).

Birçok otoimmün hastalıkta IL-21 artışı gözlenmiştir ve en önemli kaynağı TFH hücreleridir. IL-21, T hücresinin proliferasyonunu arttırmaktadır, TFH'lerin regülatör hücrelere etkisi hakkında az çalışma mevcuttur. TFH'ler, B hücre foliküllerinin germinal merkezinde (GM) bulunmaktadır (8). Yüzeylerinde CXC kemokin reseptörü tip 5 (CXCR5), indüklenebilir eş-uyaran molekül (ICOS), PD-1, CD40L, ve CD84 gibi antijenler eksprese ederler (9). Transkripsiyon faktörleri B hücre lenfoma-6 (Bcl-6) ve achaete scute benzeri 2 (ASCL2)'dir. B hücrelerinin antikor salgılayan plazma ve hafıza hücrelerine dönüşmesini sağlamaktadırlar (10, 11). Kontrolsüz TFH yanıtları aşırı otoantikor üretimini indükleyip otoimmüniteyi tetikleyebilmektedir (12). T1DM'de TFH sayısında artış bildirilmiştir (13). GM reaksiyonları pozitif ve negatif olarak yönlendirilebilir. CXCR5⁺Foxp3⁺ foliküler regülatör T hücreler, GM reaksiyonlarını

negatif etkileyen (baskılayıcı düzenleyici) hücrelerdir. TFH'ye benzer şekilde, CXCR5, ICOS, PD-1, Bcl-6, B lenfosit-indükleyici maturasyon protein 1 (Blimp1) eksprese ederler fakat CD40L eksprese etmemektedir ve ayrıca IL-4 ve IL-21 salgılamamaktadırlar (14, 15, 16). *In vitro* insan çalışmasında TFR hücrelerinin lenfoid dokuya göçerek antikor üretimini ve TFH fonksiyonlarını baskıladığı gösterilmiştir (17, 18).

D vitamini eksikliği, T1DM gelişimini tetikleyen önemli çevresel faktörlerdendir. Aktif form olarak bilinen kalsitriol (1,25 dihidroksi vitamin D3, 1,25(OH)₂D3, VitD, 1,25D) immün sistemin düzenleyicisi olarak kabul edilmektedir (19). Vitamin D3'ün otoimmüniteyi baskıladığı, TREG'lerde FOXP3 ekspresyonunu arttırdığı ve sürekliliğini sağladığı, *in vitro* Vitamin D takviyesiyle T1DM'de TREG'lerin baskı gücü kazandığı araştırmalarla kanıtlanmıştır (20, 21).

Progesteron, çok fonksiyonlu, steroid yapıda cinsiyet hormonudur ve nükleer progesteron reseptör ligandıdır (22, 23). İmmün sistem hücreleri üzerine anti-proliferatif ve anti-inflamatuar etkileri hakkında çalışmalar mevcuttur. Hamile farelerde TREG-indükleyici fonksiyon gösterdikleri, insan kordon kanı naif T hücrelerinden Foxp3⁺TREG oluşturduğu ve stabil oldukları bildirilmiştir (24, 25). Diyabet çalışmalarında ise olumlu ve olumsuz etkileri bildirilmiştir (26).

Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda, T1DM hastaları ve sağlıklı kontrollerin periferik kan TREG, TFH, TFR hücreleri, çeşitli yüzey belirteçleri, sitokin salınımları ve hücre içi transkripsiyon faktör açısından incelenmesi, bu hücre gruplarının otoimmün yanıt açısından birbirleriyle olan etkileşimleri, bu etkileşimlere D vitamini ve progesteronun etkilerinin açıklanması amaçlanmıştır. Literatürde T1DM hastalarında bu hücre gruplarının etkileşimleri üzerine vitamin D ve progesteron etkilerini ayrıntılı inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Böylece bu hücrelerin, T1DM patogenezi ve otoimmün mekanizmalardaki rollerini belirleyerek, uzun vadede kişiye özel hücre tedavisi geliştirmeyi destekleyici bilgiler edinmek planlanmıştır.

1.1. Diabetes Mellitus

1.1.1. Genel Bilgi

Diabetes mellitus, pankreas beta hücrelerinden salgılanan insülinin, göreceli ya da mutlak eksikliği, moleküldeki yapısal bozukluklar veya çevresel dokularda insülin etkisine karşı meydana gelen direnç nedeniyle oluşan, fazla sayıda organı etkileyerek çoklu sistem tutulumuna neden olan hiperglisemi ile karakterize kronik ve geniş spektrumlu bir metabolizma bozukluğudur. Yüksek glukoz düzeyleri nedeni ile zaman içerisinde kalp, böbrek, kan damarları, göz ve sinirlerde belirgin deformasyona neden olarak birçok komplikasyonu seyrinde barındırabilmektedir (28).

1.1.2. Epidemiyoloji

Yirmibirinci yüzyılın yayılım hızı en yüksek olan acil durumlarından biri olarak onuncu baskı IDF Diyabet atlasında yerini almaktadır. Epidemiyolojik çalışmalara göre 2021 yılında beşyüzotuzyediyedi milyon olan diabetli kişi (20-79 yaş arası) sayısının 2030 ve 2045 yıllarında sırasıyla 643 ve 783 milyona ulaşacağı öngörülmektedir. Dünya genelinde tanısı konulmamış 240 milyon yetişkin diabetli olduğu tahmin ediliyor. Bunların neredeyse %90'ının da düşük ve orta gelirli ülkelerde yaşadığı öngörülmektedir. 2021'de 1,2 milyondan fazla çocuk ve ergen (19 yaş altı) tip 1 diyabet hastası olduğu bilinmektedir. Bunların yarısından fazlası (%54) 15 yaş altındadır. Sistematik bir literatür incelemesine göre, diyabet insidansı, 2006'dan 2017'ye kadar olan dönemde, çoğunlukla yüksek gelirli popülasyonların %70'inden fazlasında sabit kalmış veya azalmıştır. Ülkelerin %80'inden fazlası, 2010'dan bu yana diyabet insidansında düşüş veya sabitlik olduğunu bildirmiştir. 20-79 yaş arası kadınlarda tahmin edilen diyabet prevalansı erkeklerden biraz daha düşüktür (%10.2'ye karşılık %10.8). 2021'de diabetli erkeklerin, kadınlardan 17,7 milyon daha fazla olduğu belirlenmiştir (29).

Uluslararası Diyabet Federasyonu projeksiyonları, 2045'de Türkiye'nin yaklaşık 5 milyon yaşlı diabetli sayısı ile en üsteki dokuzuncu ülke olacağına işaret etmektedir. 2021 yılı Türkiye yetişkin diyabet prevalansı %15,9 (toplam vaka 9,020,900'dür) (29). T1DM insidansı açısından standardizasyon yapımı yaş kriterine dayandırıldığında sonuç 10,8/100.000/yıl (%95 GA: 10,1–11,5). Erkeklerde 10,4/100.000/yıl, kızlarda 11,3/100.000/yıl'dır (30). 2021 yılı verilerine göre 0-14 yaş arası yaklaşık 20 milyon çocuğun, 13bin'i tip 1 diyabete sahiptir. Bu çocukların yaklaşık 2200 adeti yeni tanı olarak sınıflandırılmıştır. 0-19 yaş verilerine göre ise yaklaşık 26.8 milyon çocuğun

25bin'i diyabete sahiptir. Bu çocukların yaklaşık 2800 adedi yeni tanı olarak sınıflandırılmıştır (29).

1.1.3. Tanı ve Sınıflandırma

25 kg/m² ve üzeri beden kitle indeksi (BKİ), bunun yanı sıra ek risk faktörlerine sahip olan kişilerde diyabet taraması önerilmektedir. Ek risk faktörleri arasında, sedanter yaşam, diyabet tanılı birinci dereceden akraba mevcudiyeti, etnisite (Afrika kökenli Amerikalılar, Latin ırk gibi), doğum ağırlığı dört kilogram ve üzeri bebek sahipleri ve daha önce gestasyonel diyabet tanısı almak, doğduğunda düşük doğum ağırlıklıya sahip olmak, 140/90 mmHg ve üzeri hipertansiyona sahip olmak ya da hipertansif tedavi görenler), 35 mg/dl altında HDL-kolesterol ve/veya trigliseridi 250 mg/dl üzerinde olmak, insülin direncine dair klinik veri varlığı, polikistik over sendromu, geçmişte Bozulmuş açlık glukozu (BAG) veya Bozulmuş glukoz toleransı (BGT) olması, kardiyovasküler hastalık varlığı, kronik dejeneratif beyin hastalığı veya antipsikotik ilaç kullanımı, organ nakli sayılmaktadır. Riskli gruplarda, BAG'nun 100-125 mg/dl, BGT açısından tokluk Oral Glukoz Tolerans Testi (OGTT) 2. saat plazma glukozunun 140-199 mg/dl olması, hemoglobin A1c (HbA1c) %5.7-6.4 olması prediyabet tanı kriterleri arasında yer almaktadır. İzole BAG [açlık plazma glukozu (APG) 100-125 mg/dl ve 75g OGTT 2.saat 140 mg/dl altında], izole BGT (APG 100 mg/dl altında ve 75g OGTT 2.saat 140-199 mg/dl) ve BAG + BGT (APG 100-125 mg/dl ve 75g OGTT 2.saat 140-199 mg/dl) için her iki kriterin bulunması şarttır (31, 32).

Laboratuvar testlerinin tanıda kullanımında belirli kriterler bulunmaktadır. Bu kriterlerden birinin varlığı tanı için yeterlidir. Minimum 8 saat açlık sonrası, venöz plazma glukoz oksidaz yöntemiyle yapılan ölçümde açlık plazma glukozu değerinin minimum 126 mg/dl (7.0 mmol/L) olması, diyabet semptomları mevcut olan birinin, günün herhangi bir saatinde ölçülen gıda alımına bağlı olmadan rastlantısal plazma glukoz değerinin 200mg/dl (11.1 mmol/L) ve üzerinde olması, 75 g oral glukoz alımı ile yapılan OGTT'de 2.saat plazma glukozu 200 mg/dl ve üzeri olması, HbA1c %6.5 (48 mmol/mol) ve üzeri olması diyabet tanı kriterleri olarak kullanılmaktadır (31, 32).

Bu tanı kriterleri elde edilirken dikkate alınması gereken bazı noktalar bulunmaktadır. Bunlar, plazma glukoz ölçümüne göre tam kan glukoz ölçümü %11, kapiller glukoz ölçümü %7, serum glukoz değeri %5 civarında daha düşük bulunması, HbA1c'nin ancak uluslararası standardize edilmiş yöntemlerle ölçüm yapıldığında tanı

testi olarak kullanılabileceği fakat Türkiye’de henüz HbA1c ölçüm testleri standardize edilemediği için tek başına tanı testi olarak kullanımının önerilmediği, ayrıca anemi, hemoglobinopati, gebelik (2. ve 3. trimester) varlığında, C ve E vitamini gibi antioksidan kullanımında tanı testi olarak kullanılamadığı, HbA1c değeri ile plazma glukoz değeri arasında uyumsuzluk var ise HbA1c etkileyen durumlar göz önüne alınması gerektiği, diyabet semptomlarının bulunduğu durumlar dışında, tanının bir sonraki gün doğrulanması gerektiği, OGTT yapılan bazı kişilerin açlık ve 2 saatlik glukoz değerleri normal ya da BAG/BGT aralıklarında bulunmasına karşın birinci saat glukoz değeri 200mg/dl üzerinde olduğu görüldüğünde bu olguların diyabet riski yönünden izlenmesi oldukça yaygın kabul edilen bir yaklaşım olduğu dikkate alınması gereken noktalar arasında sayılmaktadır (31, 32).

1.1.3.1. Tip 1 Diyabet

Tip 1 diyabet, insülin üreten pankreatik beta hücrelerinin otoimmün yıkımı veya hasarından kaynaklanan, insülin eksikliği ve hiperglisemi ile karakterize kronik bir durumdur. Tip 1 diyabetin etiyolojisi genetik, çevresel ve immünolojik faktörleri içerir, karmaşık ve çok faktörlüdür (33, 34, 35).

Genellikle çocukluk veya ergenlik döneminde ortaya çıkmaktadır. Tip 1 diyabetin klinik özellikleri arasında poliüri, polidipsi, polifaji, kilo kaybı, yorgunluk, bulanık görme ve ketoasidoz sayılmaktadır. Tip 1 diyabet tanısı, hiperglisemi (>200 mg/dL) ve bir veya daha fazla pozitif otoantikor varlığına dayanır. Tip 1 diyabetin tedavisi, glisemik kontrolü sağlamak ve akut/kronik komplikasyonları önlemek için diyet ve yaşam tarzı değişikliklerinin yanı sıra ömür boyu insülin tedavisi gerektirir.

T1DM’li bireylerin yakınlarında diyabet görülme sıklığı değerlendirildiğinde diyabetlilerin yüzde on veya onbeşinin birinci veya ikinci derece akrabalarında diyabet ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte, çocukların yaklaşık %6’sı, kardeşlerin %5’i ve monozigotik ikizlerin %50’si hastalığı gösterdiğinden, genel popülasyondaki %0,4 prevalansa kıyasla hastaların akrabalarında yaşam boyu T1DM geliştirme riski önemli ölçüde artmıştır (36, 37). Büyük genetik analiz yapılan çalışmalarda tüm genom taramalarında diyabet ile ilişkili elliden fazla risk lokusu belirlenmiştir (38). Yatkınlık genlerinin bulunduğu bölge incelendiğinde 6. Kromozomdaki majör histokompatibilite kompleksi (MHC) içinde insan lökosit antijeni (HLA) olarak yer alırlar. Bu polimorfik aleller, riskin yaklaşık yarısından sorumlu tutulmaktadır. Sırasıyla Onbirinci ve ikinci

kromozomdaki insülin geni (Ins-VNTR, IDDM 2) polimorfizmleri ve CTLA-4 geni yatkınlığın yaklaşık yüzde onbeşinden sorumludur. Sayısız farklı lokus diyabet açısından duyarlılığa sebep olurken, bu duyarlılık tablosunun başka hastalıkların eşlik ettiği şekilde de meydana geldiği bilinmektedir (38, 39). Tip 1 diyabetle ilişkilendirilen diğer genetik bağlantılar arasında insülin, protein tirozin fosfataz reseptör olmayan tip 22 (PTPN22), interlökin-2 reseptör alfa (IL2Ra), otoimmün regülatör (AIRE), FoxP3 sinyal iletilicileri ve transkripsiyon aktivatörleri 3 (STAT3), interferon-indüklü helikaz C domain içeren protein 1 (IFIH1), Huntingtin-etkileşen protein 14 (HIP14), Erb-B2 reseptör tirozin kinaz 3 (ERBB3) bulunmaktadır. Foxp3'ün konjenital disfonksiyonu, insanlarda X kromozomu ile ilişkili bir otoimmün poliendokrin bozukluk (IPEX sendromu) olarak ortaya çıkar ve T1DM, alerjiler, enteropatiler ve egzamadan oluşan bir fenotip ile kendini gösterir (40). Foxp3 transkripsiyon faktörü, TREG'lerin ayırt edici özelliğidir. TREG'lerde Foxp3'ün ekspresyon seviyesi, IL-2 reseptörünün (CD25) alfa zincir ekspresyonu ile pozitif olarak ilişkilidir ve IL-7 için reseptörün alfa zincir (CD127) ekspresyonu ile ters ilişkilidir. TREG'ler, CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin proliferasyonunu, salgılama aktivitesini ve bunların sitolitik aktivitesini baskılar (41).

Özellikle, HLA-DR3, DQB1*0201 (DR3-DQ2 olarak da anılır) ve HLA-DR4, DQB1*0302 (DR4-DQ8 olarak da anılır) haplotipleri T1DM'li bireylerin neredeyse yüzde yüzünde bulunurken, bu oran sağlıklı bireylerde yüzde kırktır. Ayrıca hastaların yaklaşık %30'unda her iki haplotip de (DR3/4 heterozigot) bulunur (42,43). Öte yandan, DRB1*0403 ve DPB1*0402 gibi bazı DR4 alellerinin varlığı, DQB1*0302 yüksek riskli alelin varlığında bile T1DM gelişme riskini azaltır. Ek olarak, HLA aleli DQB1*0602, T1DM gelişimine karşı koruma sağlar. Bu alel, genel ABD popülasyonunun yaklaşık %20'sinde bulunur, ancak T1DM gelişen çocukların yalnızca %1'inde bulunmaktadır (34, 44, 45, 46, 47).

Çevresel faktörlerin, beta hücre yıkımına yol açan otoimmün süreci tetikleyebildiği veya modüle edebildiği bilinmektedir. Enterovirüsler gibi çeşitli virüslerin, muhtemel otoreaktif T hücrelerinin moleküler taklidini oluşturarak veya aktivasyonunu indükleyerek tip 1 diyabetin potansiyel tetikleyicileri olarak görev aldıkları öne sürülmüştür. Tip 1 diyabet riskini etkileyebilecek diğer çevresel faktörler arasında diyet, hijyen, mikrobiyom ve toksinlere maruz kalma yer almaktadır (48).

Beslenme açısından T1DM yatkınlığı araştırmalarında, yatkınlık sağlayan ya da diyabet geliştirme riski yüksek olan durumlar arasında yenidoğan döneminde ilk 6 ay inek sütü temelli formül mama ile beslenen, anne sütü alamayan çocuklar yer almaktadır (49, 50). Birçok hastalıktan korunmada önemli yeri olan anne sütünün tip 1 diyabet gelişimini önlemek açısından da, ilk altı ay anne sütü ile beslenme sağlanmalı, sonrasında iki yaşa kadar da emzirme önerilmektedir (51). Dünya Sağlık Örgütü de desteklemektedir (52). Otoantikor oluşumu açısından gluten tüketimi bebekler için risklidir ve 4 aydan önce verilmesi diyabet riskini arttırdığı gözlemlenmiş fakat daha büyük çaplı araştırmalarda bu bulgu desteklenememiştir.

Kabakulak, Cocksackie B3 ve B4, Kızamıkçık ve Influenza B enfeksiyonunu takiben akut fulminan diyabet meydana geldiği bildirilmiştir. Hiperglisemik ketozis, ani, semptomların bir hafta içinde ortaya çıktığı, adacık antikorları negatif ve C-peptitin son derece düşük olduğu bir durumdur. Bu durumda, beta hücre hasarı, viral invazyondan kaynaklanan doğrudan litik etkilere, ikincil olarak meydana gelir, otoimmünite olmadan mutlak insülin eksikliği ve yaygın beta hücre yıkımına neden olur (53, 54). Bazı mekanizmalar, beta hücre antijenlerine benzerlik gösterir ve potansiyel olarak çapraz-reaktif otoimmün yanıtı tetikleyebilen, viral epitop dizilerinin olduğu moleküler taklitleri içermektedir (55). Beta hücrelerinin viral enfeksiyonu ayrıca MHC sınıf I'in aşırı ekspresyonu ile sonuçlanarak, kendi antijenlerinin sunumuna ve daha fazla otoimmünitenin devam etmesine neden olmaktadır (55, 53, 56).

Enterovirüsler, solunum, mide-bağırsak ve nörolojik hastalıklara neden olabilen bir virüs grubudur. Birkaç çalışma, enterovirüs enfeksiyonunun, T1DM belirteçleri olan otoantikora serokonversiyon riskini artırabileceğini göstermiştir. Enterovirüs enfeksiyonu, ayrıca pankreasta insülin üreten beta hücrelerine zarar vererek serokonversiyondan T1DM'nin klinik başlangıcına ilerlemeyi hızlandırabilir. Ayrıca enterovirüs enfeksiyonu, T1DM patogenezinde yer alan bağışıklık sistemini ve bağırsak mikrobiyomunu modüle edebilir.

Enterovirüs enfeksiyonu, T1DM'de nedensel bir faktör olduğuna dair en güçlü kanıtlara sahipken, rotavirüs aşısının koruyucu bir etkisi olabileceği düşünülmektedir. Grip ve COVID-19, T1DM için potansiyel risk faktörleri olarak düşünülmekte, ancak rollerini ve mekanizmalarını doğrulamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

Tip 1 diyabet gelişimine etki eden immünolojik faktörler değerlendirildiğinde, otoreaktif T ve B hücrelerinin, insülin, glutamik asit dekarboksilaz (GAD) ve adacık antijen-2 (IA-2) gibi beta hücre antijenlerini tanıdıkları ve bunlara karşı reaktivite göstererek, pankreas adacıklarına karşı aktivasyonu içermektedir. Bu antijenlere karşı üretilen otoantikörler, T1DM'li çoğu hastanın serumunda saptanmaktadır, hastalık tahmini ve teşhisi için biyobelirteç görevi görmektedir. Adacığa özgü otoantikörler genellikle yaşamın erken dönemlerinde ortaya çıkar ve T1DM gelişmeden önce bazen 20 yıldan fazla bir süre sayı ve titre açısından dalgalanabilir (57). T1DM'de immün tolerans kaybının ve otoimmün yanıtın düzenlenmesinin altında yatan mekanizmalar hala tam olarak anlaşılamamıştır.

Beta hücre yüzeyinde veya sitoplazma içinde çeşitli antijenleri hedef alan otoantikörlerin varlığı, çoğu kez klinik semptomların başlamasından önce, T1DM'li hastaların çoğunun kanında saptanabilir. Adacık hücresi otoantikörleri, beta hücresindeki GAD, insülin ve protein tirozin fosfataz gibi sitoplazmik proteinlere yöneliktir. Glutamik asit dekarboksilaz otoantikörleri (GADA), sinir sistemi ve pankreatik adacıklarda glutamatın gama-aminobütirik aside (GABA) dönüşümünü katalize eden bir enzim olan GAD'a özgüdür. İnsülin otoantikörleri (IAA), glukoz metabolizmasını düzenleyen ve kan şekeri düşüren hormon olan insüline özgüdür. Protein tirozin fosfataz otoantikörleri (IA-2A), insülin sekresyonunda ve beta hücre farklılaşmasında yer alan bir transmembran protein olan IA-2'ye özgüdür. Bu otoantikörlerin varlığı, beta hücrelerine karşı devam eden bir bağışıklık saldırısına işaret eder, bu da insülin sekresyonunun ilerleyici kaybına ve hiperglisemi gelişimine yol açar. Bu otoantikörlerin saptanması, T1DM'yi otoimmünite ile ilişkili olmayan tip 2 diabetes mellitus (T2DM) veya monogenik diyabet gibi diğer diyabet formlarından ayırmaya da yardımcıdır. Ayrıca, otoantikör ölçümü ile T1DM'li hastaların akrabaları veya diğer otoimmün hastalıkları olan çocuklar gibi, beta hücre hasarı sonucu diyabet gelişim riski olan kişiler belirlenebilir. Böylece bu kişiler, T1DM'nin başlamasını önlemek veya geciktirmek için erken müdahale stratejilerinden yararlanabilir (34, 58).

1.1.3.2. Tip 2 Diyabet

Tip 2 diyabet genel anlamda yeterli insülin üretimi ve kullanımı olamayan durumları kapsar, bu durumlara otoimmünite eşlik etmez, insülin direnci ve metabolik sendrom gibi insülin yetersizliği nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Nispi insülin eksikliği ve

direnç olan bu grup diyabetlilerin yüzde doksanbeşine tekabül etmektedir. Gelişim mekanizmasında özel bir neden olmamakla birlikte, β -hücre otoimmünitesi oluşmaz, hastalığın altyapısında herhangi bir diyabet oluşum nedeni bulunmamaktadır. Hastalık zemininde insülin direncine de yol açabilen obezite veya aşırı kilo mevcuttur. Bilinen kilo kriterlerine göre obezite veya kilo artışı olmayan bireylerde, bel-karın çevresine dağılan yağ yüzdesinde artış görülmektedir. T2DM'li kişilerde normal veya yüksek görünen insülin seviyeleri olabilir, ancak kan şekerini normalleştirmedeki başarısızlık, glukozla uyarılan insülin sekresyonundaki göreceli bir kusuru yansıtır. Dolayısıyla, bu kişilerde direnci dengeleyecek salgı mekanizmasında problem oluşmaktadır. Direnci kırmak için çeşitli stratejiler olmakla birlikte tamamen düzelme nadirdir. İleri yaş, sedanter yaşam, fazla kilo T2DM gelişiminde önemli rol alır. Gestasyonel diabetes mellitus (GDM), hipertansiyon, lipid bozukluğu, polikistik over sendromu ve bazı etnik alt sınıfa (Afrikalı Amerikalı, Kızılderili, Hispanik/Latin ve Asyalı Amerikalı) dahil olan kişilerde daha sık görülür. Yaş, BKİ, kullanılan ilaçlar, HIV, dış kontrolleri tip 2 diyabet taraması açısından yol gösterici olmaktadır. Bununla birlikte, T2DM'nin genetiği, bu hassas tıp çağında çok az anlaşılmıştır ve yoğun araştırmalar altında olmasının yanısıra birinci derece akrabalar arasında T1DM'li kişilere göre daha fazla ilişki mevcuttur. T2DM için geleneksel risk faktörleri olmayan ve/veya daha genç yaştaki yetişkinlerde, T1DM'yi ekarte etmek için adacık otoantikor testleri (örn. GAD65 otoantikorları) önerilir (59).

Son on yılda, çocuklar ve ergenlerde T2DM insidansı ve prevalansı, özellikle ırksal ve etnik azınlık popülasyonlarında önemli ölçüde artmıştır. Biriken veriler, genç başlangıçlı T2DM olarak adlandırılan genç insanlarda (<40 yaş), geç başlangıçlı T2DM'de görülenden daha hızlı bir β -hücre fonksiyonu bozulmasına sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca, genç başlangıçlı T2DM'li bireylerde, T1DM'li kişilere göre daha yüksek komplikasyon riski var gibi görünmektedir. T2DM'li genç erişkinlerin sayısı arttıkça, genç başlangıçlı T2DM'nin hem gelişmekte olan hem de gelişmiş ülkelerde, özellikle belirli etnik kökenlerde, daha geniş diabetes mellitus popülasyonunun daha sık görülen bir özelliği haline geleceği tahmin edilmektedir. Bununla birlikte, erken ölüm ve olay komplikasyonlarının aşırı riskinin büyüklüğü tam olarak anlaşılmamıştır; aynı şekilde, bu aşırı riskin potansiyel nedenleri de belirsizdir (60).

1.1.3.3. Gestasyonel Diyabet

Gestasyonel diyabet, glukoz tolerans bozukluğuna bağlı kan şekeri seviyeleri çok yükseldiğinde gelişen bir diyabet türüdür. Mevcut diyabetinin farkında olmayan tanısız bireylerin, gebeliğin 24-28. haftalarında yapılan tarama esnasında belirlenen GDM'lerden ayırt edilmesi zordur. Teşhis iki strateji ile belirlenmektedir. Tek aşamalı stratejide, 75gr OGTT ile 8 saat gece açlığı sonrası, 1. ve 2. saatlerde plazma glukoz ölçümü yapılmaktadır. Açlık ≥ 92 mg/dL, 1. saat ≥ 180 mg/dL, 2. saat ≥ 153 mg/dL glukoz güzeyi ile GDM tanısı koyulur (61).

İki aşamalı stratejinin, birinci aşamasında 50gr OGTT ile 1. saatte (açlık gerekmez) plazma glukoz ölçümü 140-180 mg/dL arasında ise 100 gr OGTT uygulamasına geçilir. İkinci aşamada en az 8 saatlik gece açlığı sonrası sabah 100 gr OGTT yapılmaktadır. İki aşamalı stratejide GDM tanısı, açlık ≥ 95 mg/dL, 1. saat ≥ 180 mg/dL, 2. saat ≥ 155 mg/dL, 3. saat ≥ 140 mg/dL olması durumlarından en az iki tanesinin karşılanması içermektedir (61).

Hangi stratejinin daha net kabul göreçeği noktasında 2010 yılında yayımlanan "Hiperglisemi ve Gebelikteki İstenmeyen Sonuçları" (HAPO Study) çalışması sonrası GDM için yeni tanı kriterleri belirlenmiştir (62). Sonuçlar değerlendirildiğinde, Uluslararası Gebelik ve Diyabet Çalışma Grupları Birliği, tek aşamalı OGTT kullanılması önerilmiştir (63) ve tek aşamalı strateji uygulandığında, bazı ulusal otoritelerin GDM tanısı artışı, ekonomik ve emosyonel problemlerin artışı konusunda tedirgin oldukları görüşünü bildirmişlerdir.

1.2. İmmün Sistem

İmmün sistem, öz olanı olmayandan ayırır, potansiyel olarak zararlı molekülleri ve hücreleri vücuttan uzaklaştırır. Aynı zamanda konakçı dokulardan kaynaklanan anormal hücreleri tanıma ve yok etme kapasitesine de sahiptir. İmmün sistem, vücudu patojenlerden ve hatalı hücrelerden korumada farklı rollere sahip çeşitli hücre türlerinden oluşur. Genel olarak; doğal immünitenin elemanları, fagositik hücreler (örneğin nötrofiller, monositler, makrofajlar), polimorfonükleer lökositler (fagositik nötrofillere ek olarak, eozinofiller ve bazofiller dahil), doğal lenfoid hücrelerdir (doğal öldürücü hücreler). Kazanılmış immünitenin elemanları ise B ve T lenfositlerdir. Kazanılmış immün sistem, belirli patojenleri ve tümör hücrelerini ortadan kaldıran son derece uzmanlaşmış hücrelerden ve süreçlerden oluşan genel bağışıklık sisteminin bir alt

sistemidir. Kazanılmış immün sistem otoimmün hastalıkların patogenezinde rol almaktadır. Bu durum patojenlerin öz antijenlere benzemesi yani moleküler taklit veya bağışıklık sisteminin kendi ve kendi olmayan arasında ayırım yapamadığı bağışıklık toleransının düzensizliği nedeniyle gerçekleşebilir. Otoimmün hastalıkların bazı örnekleri T1DM, artrit, multipl skleroz ve sistemik lupus eritematozudur (64,65). Otoimmün durumlarda antijen sunan hücreler, otoreaktif T hücrelerine kendi antijenlerini sunarak, proinflamatuvar mediatörler üreterek, kompleman sistemini aktive ederek, fagositoz veya sitotoksikite yoluyla doku hasarını indükleyerek de patogeneze katkıda bulunabilir (66). B ve T hücreleri otoimmün yanıtların başlatılmasında ve sürdürülmesinde birbirleriyle iş birliği yapar. B hücreleri, antijen sunan hücreler (APC) olarak hareket edebilir ve kendi antijenlerini T hücrelerine sunabilir; bunlar da B hücrelerini aktive etmek ve plazma hücrelerine veya hafıza hücrelerine farklılaştırmak için ortak uyarıcı sinyaller ve sitokinler sağlar. B hücreleri ayrıca IL-6, IL-10, tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) ve interferon-gama (IFN- γ) gibi sitokinler üreterek veya dendritik hücre aktivitesini modüle ederek T hücresi fonksiyonunu ve farklılaşmasını düzenleyebilir. Tersine, T hücreleri, CD40L, ICOS, OX40 veya CTLA-4 gibi yüzey moleküllerini eksprese ederek veya IL-4, IL-21 veya TGF- β gibi sitokinleri salgılayarak B hücresi aktivasyonunu, hayatta kalmasını, afinite olgunlaşmasını ve sınıf değişimini etkileyebilir. B ve T hücrelerinin efektör ve düzenleyici fonksiyonları arasındaki denge, immün toleransın sürdürülmesi ve otoimmünitenin önlenmesi açısından çok önemlidir. Bununla birlikte bu denge, otoreaktif B ve T hücrelerinin anormal aktivasyonunu, farklılaşmasını veya hayatta kalmasını tetikleyebilen genetik faktörler, çevresel tetikleyiciler veya enfeksiyonlar tarafından bozulabilir. Otoimmün hastalıklarda lenfositlerin rolü, karmaşıktır ve lenfositlerin fenotipine, aktivasyon durumuna, doku lokalizasyonuna ve diğer immün hücrelerle etkileşimine bağlıdır. Bu nedenle, bu hücrelerin otoimmün hastalıklardaki ilişkisinin ve ilişkili mekanizmaların anlaşılması, gelecekte daha etkili tedavi stratejilerinin belirlenmesine yol açabilir (67, 68, 69, 70, 71).

1.2.1. T Lenfositler ve Sitokinler

T hücre alt grupları ve sitokinler, çeşitli patojenlere ve hastalıklara karşı bağışıklık tepkisini düzenleyen kazanılmış bağışıklık sisteminin önemli bileşenleridir. T hücreleri, CD4 veya CD8 gibi yüzey moleküllerinin ekspresyonuna, transkripsiyon faktörlerine ve

diğer bağışıklık hücrelerinin aktivitesini modüle eden küçük proteinler olan spesifik sitokinlerin salgılanmasına bağlı olarak farklı alt gruplara ayrılabilir.

CD4+ T yardımcı (Th) hücreler, antikor üretimi için B hücrelerine ve sitotoksikite için CD8+ T hücrelerine yardım etmektedir. Yardımcı T hücreleri ayrıca sitokin profillerine ve fonksiyonlarına bağlı olarak Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, TREG, TFR ve TFH gibi çeşitli alt tiplere ayrılmaktadır. Örneğin, genel olarak Th1 hücreleri IFN- γ salgılayıp, hücre içi patojenlere karşı hücre aracılı bağışıklığı desteklerken, Th2 hücreleri IL-4, IL-5, IL-6 ve IL-13 salgılar ve hücre dışı patojenlere karşı humoral bağışıklığı desteklemektedir (72). Parazit enfeksiyonlarına ve alerjik reaksiyonlara karşı koruma sağlayan antikor yanıtını teşvik etmektedir. Th17 hücreleri, özellikle mantar ve bakteri enfeksiyonlarına karşı koruyucu rol oynar ve inflamatuvar yanıtın oluşumunda önemli bir yere sahiptir. TFH hücreleri, antikor üretiminde önemli olan B hücrelerinin foliküler bölgelerdeki aktivasyonunu ve diferansiyasyonunu destekler. Th22 hücreleri cilt bariyerinin korunmasında ve onarımında görev alırken, Th9 hücreleri astım ve parazit enfeksiyonlarına karşı koruyucu immün yanıtların oluşumunda yer alır. TREG hücreleri ise bağışıklık sisteminin aşırı aktive olmasını önleyerek otoimmünite ve alerjik reaksiyonların kontrol altında tutulmasına yardımcı olur.

CD8+ sitotoksik T lenfositleri (CTL) perforin ve granzim salınımıyla enfekte veya anormal hücreleri doğrudan öldürür. CTL'ler ayrıca makrofajları aktive eden ve inflamasyonu arttıran IFN- γ ve TNF- α gibi sitokinleri de salgırlar (73).

Gama-delta T hücreleri ve doğal öldürücü T (NKT) hücreleri, doğuştan gelen ve kazanılmış bağışıklık arasında köprü kuran hücrelerdir. CD1d ve MHC sınıf I ile ilişkili protein gibi klasik olmayan majör MHC molekülleri tarafından sunulan peptit olmayan antijenleri tanırlar ve bağışıklık tepkisini modüle eden çeşitli sitokinler salgırlar (74).

Düzenleyici T hücreleri immün sistemde baskılayıcı özelliklere sahiptir, efektör T hücrelerinin çoğalmasını baskılar veya indüksiyonunu geri yönde düzenleyerek öz antijenlere toleransı sürdürür ve otoimmün hastalıkların önlenmesinde rol alır. Genel olarak CD4, FOXP3, CD25 ifade ederler. TGF- β farklılaşmada rol alan sitokindir ve TREG homeostazında önemli rolü vardır. IL-10 ve TGF- β gibi antiinflamatuvar sitokinler salgılayarak ve ayrıca CTLA-4 ve PD1 gibi inhibitör molekülleri eksprese ederek bağışıklık tepkisini baskılar ve kendi kendine toleransı sürdürür (6, 75). TREG hücrelerinin sayısal farklılaşması ya da fonksiyonel bozuklukları çeşitli otoimmün

hastalıklara (multiple skleroz, lupus, diyabet, kanser) sebep olmakla birlikte, terapötik potansiyeli açısından çeşitli modülasyonları ile tedavi amacıyla da kullanılmaktadır (75, 76).

Yardımcı foliküler T hücreler, bağışıklık sisteminin önemli bir bileşeni olarak, antijenlere karşı B hücrelerinin antikör üretimini düzenleyerek vücudun savunma mekanizmasında kritik bir rol oynarlar. Bu hücreler, özellikle lenf nodlarında bulunur ve B hücrelerinin farklılaşmasını ve antikör üreten plazma hücrelerine dönüşmesini teşvik eder. TFH hücrelerinin karakterizasyonu, bu hücrelerin yüzeyinde, sitoplazmasında ve çekirdeğinde bulunabilen ve aktivasyon durumunu gösteren belirteçlerin incelenmesiyle yapılır. Bu belirteçler arasında, B hücreleriyle etkileşimde bulunan ve TFH hücrelerinin fonksiyonunu belirleyen BCL-6, ICOS ve TIM-3 gibi moleküller bulunur. Akan hücre ölçer ve immüno Floresan boyama gibi teknikler, bu moleküllerin ifadesinin belirlenmesinde kullanılır.

TFH hücrelerinin yüzeyinde, B hücreleriyle etkileşime giren ve bu etkileşimi düzenleyen çeşitli moleküller arasında, kostimülatör moleküller ve kemokin reseptörleri gibi proteinler yer alır. Örneğin, ICOS ve PD-1 gibi moleküller, TFH hücrelerinin aktivasyonunu ve B hücreleriyle olan etkileşimini düzenlerken, CXCR5 reseptörü ise TFH hücrelerinin lenf nodlarına göç etmesini sağlar. TFH hücrelerinin otoimmün hastalıklar, enfeksiyonlar ve kanser gibi çeşitli patolojik durumlarda rol oynadığı gösterilmiştir. TFH hücrelerinin aktivasyonu ve fonksiyonu, otoimmün hastalıkların tedavisinde ve kanser immünoterapisinde potansiyel hedefler olarak görülmektedir. Bu hücrelerin aktivasyonunu hedefleyen tedaviler, antikör üretimini artırarak veya azaltarak hastalığın seyrini değiştirebilir. Bu nedenle, TFH hücrelerinin moleküler ve fonksiyonel özelliklerinin daha iyi anlaşılması, bu hücrelerin hastalıkların tedavisinde nasıl kullanılabileceğine dair önemli ipuçları sunmaktadır (77).

Foliküler regülatör T hücreler, lenfoid hücre germinal merkezlerinde bulunur. Germinal merkez yanıtlarını düzenler ve B hücre aktivasyonunu baskırlar. Regülatör T hücrelerinin alt grubu olarak tanımlanırlar. Hem TREG hem de TFH belirteçlerini ifade ederler. Bunlar TFH'ye benzer olarak CXCR, Bcl-6, PD1, ICOS ve IL-21, TREG'e benzer olarak da Foxp3, CD25, CTLA4, IL-10 ve TGF- β ifade ederler (78, 79, 80, 81, 82). TFR hücrelerinde meydana gelebilecek bozukluklar, otoimmün hastalıkların patogenezi ile bağlantılı olan bozulmuş germinal merkez reaksiyonları ve otoreaktif B

hücre artışı ile otoantikor yanıtlarına neden olur (78,80, 81). Diğer düzenleyici hücrelerden lokasyonu, fonksiyonu, fenotipik karakteri, farklılaşma süreci ve otoimmün hastalıklardaki rolü ile farklılaşmaktadır.

T hücre alt gruplarının plastisitesi, bağışıklık yanıtlarının dinamik doğasını ve çevresel sinyallere adaptasyonunu yansıtır. Bu plastisite sayesinde, T hücreleri farklı bağışıklık durumlarına göre farklılaşabilir ve yeniden programlanabilir. Bu dinamik yapı, bağışıklık sisteminin karmaşık regülasyonunu ve patojenlere karşı savunma mekanizmalarının çeşitliliğini gösterir. Sonuç olarak, yardımcı T hücre alt grupları, vücudun enfeksiyonlara ve hastalıklara karşı koyma yeteneğinde merkezi bir rol oynar ve bu hücrelerin detaylı anlaşılması, bağışıklıkla ilgili hastalıkların tedavisinde yeni yolların keşfedilmesine olanak tanır.

Farklı T hücresi alt grupları ve sitokinler arasındaki denge, patojenlerin etkili bir şekilde temizlenmesi için çok önemlidir. T hücresi alt gruplarının ve sitokinlerin düzensizliği, otoimmün bozukluklar, alerjiler, kronik enfeksiyonlar ve kanser gibi çeşitli hastalıklara yol açabilir.

1.3. D Vitamini

D vitamini, vücudun güneş ışığına maruz kaldığında ürettiği bir hormondur. Kalsiyum ve kemik homeostazında, doğuştan gelen ve kazanılmış bağışıklık tepkilerini modüle etmede önemli rollere sahiptir. D vitamini eksikliği, artan otoimmünite ve enfeksiyona yatkınlık ile ilişkilidir (83, 84).

D vitamininin en iyi besin kaynaklarından bazıları somon, ringa balığı ve kılıç balığı gibi yağlı balıklardır. Mantarlar, serbest gezinen tavuklardan elde edilen yumurta sarısı, süt, tahıl gevreği ve portakal suyu gibi güçlendirilmiş yiyecekler de verimli kaynaklardır. D vitamini, farklı biyolojik süreçlerde yer alan farklı formlara sahiptir. Vitamin D2 (ergokalsiferol) bitkilerde ve mantarlarda sentezlenirken, vitamin D3 (kolekalsiferol) hayvanlarda ve insanlarda güneş ışığına maruz kalan deride sentezlenir. Bu vitaminler aktif değildir ve vücutta metabolize edilmeleri gerekir. D vitamini metabolizmasında ilk adım, yiyeceklerden veya güneş ışığından gelen D vitamininin, karaciğerde CYP2R1 enzimi tarafından 25-hidroksi D vitaminine (25D) (kalsidiol) dönüştürülmesidir. İkinci adım, 25D'nin CYP27B1 enzimi tarafından böbrekte D vitaminin aktif formu olan 1,25-dihidroksivitamin D (kalsitriol) dönüştürülmesidir. Üçüncü adım, 1,25D'nin, gen ekspresyonunu ve hücresel fonksiyonları düzenlediği

bağışıklık hücreleri gibi çeşitli dokulardaki D vitamini reseptörüne (VDR) bağlanmasıdır (84, 85).

Bağışıklık hücrelerinde bulunan VDR ve 1,25D bağlandığında bu hücrelerin farklılaşmasını, çoğalmasını ve fonksiyonlarını etkiler. Örneğin, 1,25D makrofajların enfeksiyonla savaşmasına yardımcı olur. Ayrıca, T hücrelerinin aktivasyonunu baskılayarak otoimmün hastalıklara karşı koruyucu bir rol oynar. Fizyolojik eksiklik durumlarında immün sistemde güç kaybı ve enfeksiyonlara dirençte azalma meydana gelebilir. Dolayısıyla, yeterli miktarda D vitamini almak hem kemik hem de bağışıklık sağlığı için önemlidir (86, 87, 88).

D vitamini, doğuştan gelen ve kazanılmış bağışıklık tepkilerini modüle etmede önemli bir role sahiptir. Patojenleri doğrudan öldürebilen veya inflamatuvar yanıtları modüle edebilen katelisidin ve defensinler gibi antimikrobiyal peptitlerin ekspresyonunu artırabilir. D vitamini ayrıca proinflamatuvar Th1 ve Th17 hücrelerinin farklılaşmasını ve aktivasyonunu baskılayarak, düzenleyici T hücrelerinin indüksiyonunu ve işlevini artırarak daha tolerojenik bir immünolojik durumu destekleyebilir. T hücrelerini aktive etmekten ve bağışıklık toleransını indüklemekten sorumlu olan dendritik hücreler gibi antijen sunan hücrelerin olgunlaşmasını düzenleyebilir. Ayrıca aşırı bağışıklık reaksiyonlarını baskılayan ve otoimmüniteyi önleyen düzenleyici T hücrelerinin gelişimini de teşvik edebilir. D vitamini ayrıca B hücresi olgunlaşmasını ve antikor üretimini etkileyebilir (83, 84, 86, 87, 88).

Özetle D vitamini, bağışıklık sistemi için çeşitli formları ve işlevi olan hayati bir besindir. Bağışıklık hücrelerini ve bunların etkileşimlerini etkileyerek hem doğal hem de adaptif bağışıklığı etkileyebilir. D vitamini eksikliği, bağışıklık fonksiyonunu bozabilir, enfeksiyon ve hastalığa karşı duyarlılığı artırabilir.

1.4. Progesteron

Progesteron (P4), meme bezlerinin gelişimini, yumurtlamayı, embriyo implantasyonunu ve hamileliğin sürdürülmesini destekleyen çok işlevli bir kadın seks hormonudur. P4, yumurtalıktaki granüloza hücreleri ve korpus luteum tarafından üretilir. Hamilelik sırasında plasenta P4 üretimi için önemli bir organ haline gelir. P4, kordon kanı eritroblastları tarafından da üretilir ve kordon kanında yüksek seviyelerde bulunur (24, 89). Mekanizması hala belirsiz olmasına rağmen, P4'ün fetal ve maternal antijenlere karşı immün yanıtların azaltılmasında rol oynadığı düşünülmektedir (90). P4,

glukokortikoidler, testosteron ve estradiol dahil olmak üzere diğer nükleer hormonlara dönüştürülebilen 17-hidroksiprogesterona metabolize edilir. P4 veya onun metabolik türevleri bir dizi farklı reseptör aracılığıyla çalışır. Bunlar nükleer progesteron reseptörlerini (PR-A, PR-B ve PR-C), membran progestin reseptörlerini (mPR α , mPR β ve mPR γ), progesteron reseptörü membran bileşeni-1 ve -2 ve glukokortikoid reseptörünü içerir. PR'lerin ve mPR'lerin T hücreleri tarafından eksprese edildiği belgelenmiştir (24, 91, 92).

Progesteron, çeşitli otoimmün durumlarda semptomların alevlenmesi veya azalmasıyla ilişkilendirilmiştir. Kadın/erkek oranı belirgin olan bazı otoimmün hastalıklar arasında primer biliyer siroz 16:1, antifosfolipid sendromu 12:1, sistemik lupus eritematozus (SLE) 9-10:1 ve multipl skleroz 2:11 yer alır. Progesteron genellikle bir antiinflamatuvar hormon olarak kabul edilir ve yüksek progesteron seviyeleri, hamilelikte görülen bağışıklık sisteminin dengesini etkileyen en güçlü sinyallerden biri olarak kabul edilir. Romatoid artritte hormonal etki, adet döngüsü içinde meydana gelen semptomatik değişiklikler, hamilelik sırasında semptomların azalması ve doğumdan sonra alevlenmelerin artmasıyla temsil edilir (93). T hücrelerini aktive etmekten ve bağışıklık toleransını indüklemekten sorumlu olan antijen sunan hücrelerin olgunlaşmasını düzenleyebilir. Ayrıca aşırı bağışıklık reaksiyonlarını baskılayan ve otoimmüniteyi önleyen düzenleyici T hücrelerinin gelişimini de teşvik edebilir. P4 seviyeleri yüksek olduğunda bağışıklık sisteminin alevlenme olasılığı daha az olur, düşük olduğunda ise daha fazla alevlenir. Otoimmün hastalıkları olan kadınların hamile kaldıklarında genellikle otoimmün semptomlarında önemli bir azalma olduğu yaygın olarak bilinmektedir (94, 95).

Progesteron, Th-2 benzeri sitokin profilini destekleyerek, bağışıklık sistemini baskılayıcı bir şekilde etki eder. Progesteron T hücrelerini çeşitli şekillerde etkiler. $\gamma\delta$ T hücresi trafiğini ve aktivitesini düzenlemek için özellikle önemli olduğu bulunmuştur. Progesteron konsantrasyonu, endometrium ve desiduaya $\gamma\delta$ T hücresi alımıyla güçlü bir şekilde ilişkilidir ve $\gamma\delta$ T hücrelerinin anormal frekansları, spontan düşükle ilişkilidir. Yüksek progesteronlu bir ortam, T hücresi aktivasyonunu bastırır ve anti-patojen antikörler üretme yeteneğini korudukları lenfoid dokulara T hücresi göçünü indükler. Bu mekanizma, gebelikte fetüse özgü olmayan T hücresi fonksiyonunun sürdürülmesinde çok önemli olabilir. Progesteronun bağışıklık düzenlemesinde, glukokortikoid

etkilerinden kaçarak T hücresi yeterliliğini koruduğu görülmektedir. Bu, progesteronun, bağışıklık tehdidi sırasında T hücresi fonksiyonunun sürdürülmesinde bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (95, 96, 97).

Progesteron, güçlü bir TREG indüksiyon aktivitesine sahip, immün düzenleyici bir nükleer hormondur. Yüksek düzeyde baskılayıcı aktiviteye ve in vivo olarak geliştirilmiş stabiliteye sahip indüklenmiş TREG (iTREG) hücreleri oluşturmak için kullanılabilir. İnflamatuvar koşullarda oldukça stabil olan iTREG hücreleri üretir. Ayrıca, progesteronun indüklediği iTREG hücreleri TGF- β 1'i yüksek oranda eksprese eder ve birden fazla dokudaki inflamasyonu düzenlemede etkilidir. Progesteronun, gelişmiş düzenleyici aktiviteye sahip iTREG hücrelerini uyarmadaki işlevi, progesteronun mTOR yolunu baskılamadaki işlevi ile ilişkilidir. Çeşitli çalışmalar progesteronun Th1/Th2/Th17 ve TREG bağışıklığının önemli bir düzenleyicisi olduğunu ileri sürmektedir. Progesteron, doğrudan veya diğer hücrelerin fonksiyonunu değiştirerek, örneğin CD4⁺ ve CD8⁺ TREG hücrelerinin oluşumuna yol açan tolerojenik dendritik hücreleri indükleyerek TREG hücre oluşumunu etkiler (25, 95, 98, 99, 100, 101).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Çalışma Grubu

Çalışmaya İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı Diyabet Polikliniği'nden ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Pediatrik Endokrinoloji Bilim Dalı'nda takip edilen, ciddi komplikasyonu olmayan, başka bir immünolojik hastalığı olmayan (allerji, kanser vb.), son 5 ayda enfeksiyon geçirmeyen, HbA1C >5.5, son altı ayda D vitamini takviyesi almayan, T1DM tanısı yeni konulan (<6 ay) 10 kişi ve en az 5 yıldır tanısı koyulmuş 15 kişi, toplam 25 kişilik 2 alt grup ve kontrol olarak yaş ve cinsiyet uyumlu, 15 sağlıklı kişi dahil edilmiştir.

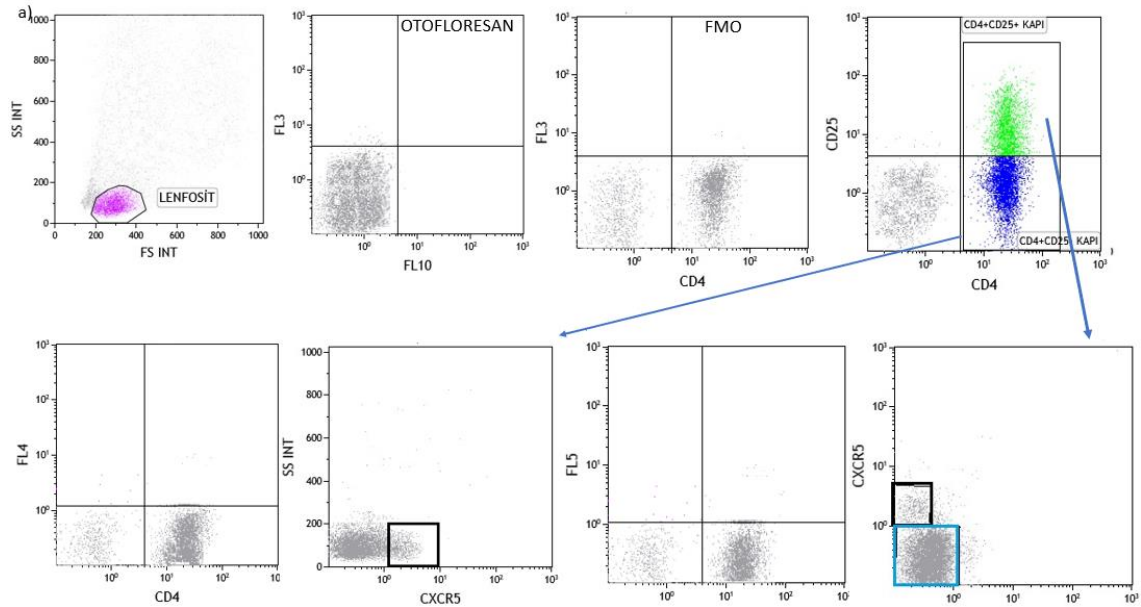
Bu çalışma İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 16.01.2015 tarih ve 01 sayılı toplantıda 205 sayılı rapor ile onaylanmıştır. Tüm katılımcılardan gönüllü olur formu ile onamları alınmıştır.

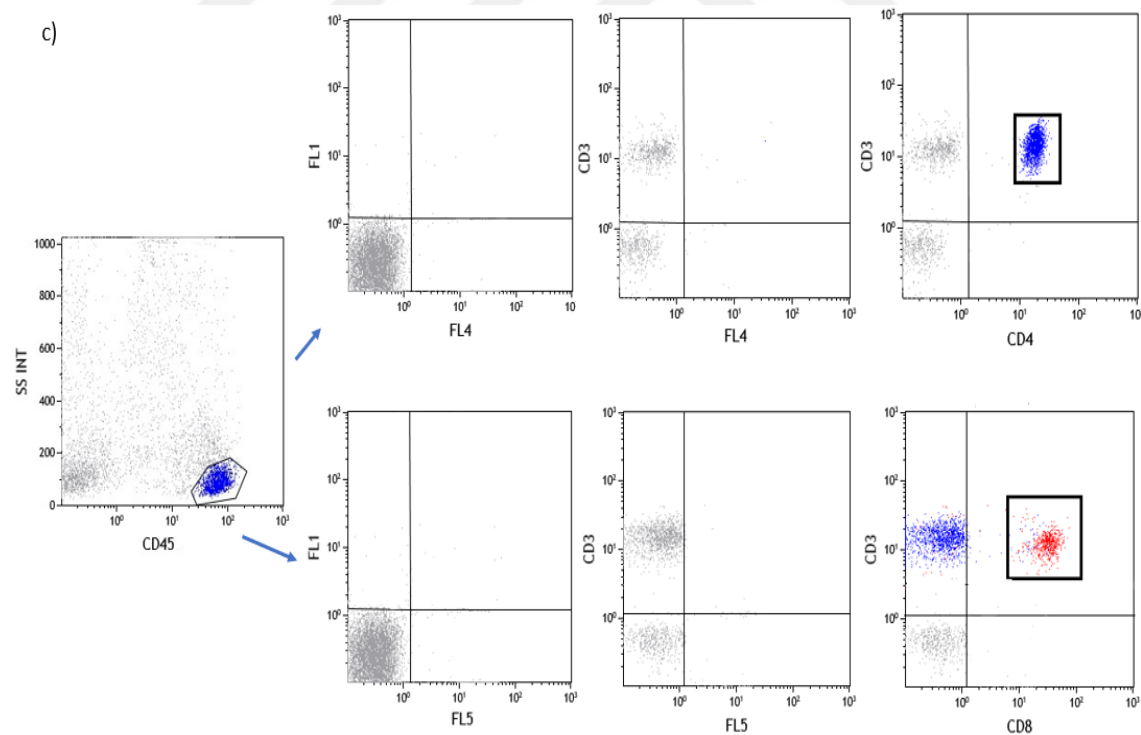
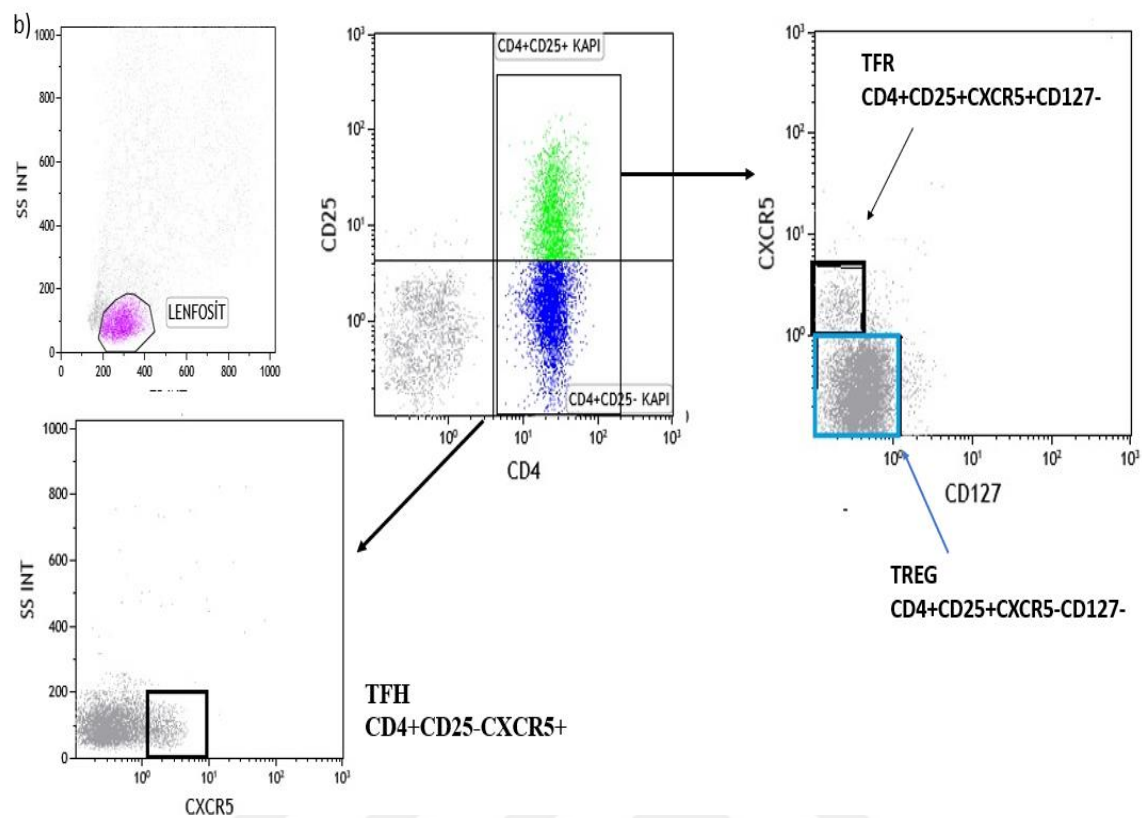
2.2. Periferik Kan Mononükleer Hücre Ayırımı

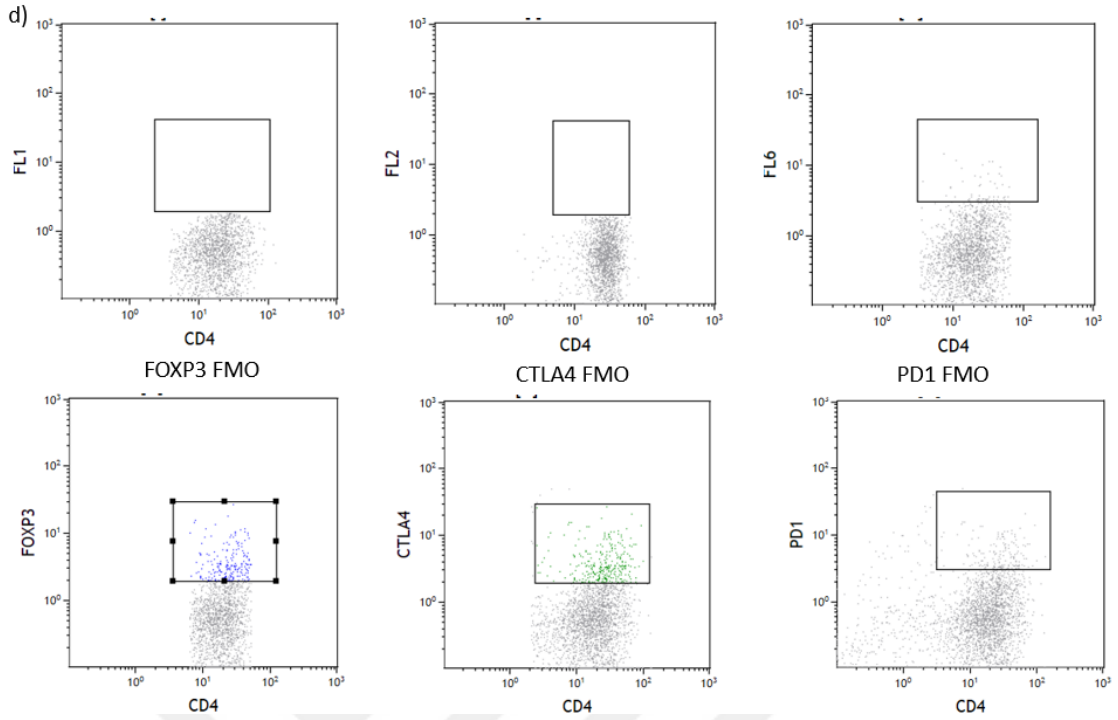
EDTA'lı tüpe alınan 20ml periferik kandan, gradyan yöntemi ile periferik kan mononükleer hücreler (PKMH) izole edildi. Steril falkona aktarılan kana aynı miktarda steril fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS, Sigma, ABD) eklendi. Elde edilen karışımın üçte biri oranında fikol (Histopaque-1077-Biochrome, ABD) farklı bir falkona konularak karışım yavaşça fikole aktarıldı. Santrifüj işlemi oda ısısında 2200 dönüş/dakika (rpm) 30 dakika (dk.) olacak şekilde gerçekleştirildi. Yoğunluğuna göre ayrılan bulutsu katman, 1500 rpm'de 15 dk +4°C'de çöktürüldü. Hücre blunmayan üst sıvı atıldı, altta kalan mononükleer hücre tabakası sulandırıldı ve 1250 rpm'de 10 dk. +4°C'de santrifüj edildi. Canlı-ölü hücre ayırımı için tripan mavisi boyanan hücreler mikroskopta sayıldı. Elde edilen steril ve saf hücreler, buz içerisinde kültür medyumu ile deneyde kullanılabilecek kadar muhafaza edildi. Zenginleştirilmiş hücre kültür medyumu hazırlanırken, RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute, Gibco, İngiltere) içine %10 fetal dana serumu (FBS, Gibco, İngiltere), 2 mM L-glutamin (Sigma, ABD), 10000 IU/ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin (Sigma, ABD) ve 1 mM sodyum piruvat (Gibco, İngiltere) kullanıldı.

2.3. Akan Hücre Ölçer ve İmmünofenotipleme

Periferik kan mononükleer hücrelerin yüzey ve hücre içi boyamaları için anti-human CD45 (APC), CD3 (FITC), CD8 (PC7), CD4 (PC5 ve KrO), CD25 (ECD), PD-1 (APC), CD127 (PC7), CTLA4 (PE) ve CD19 (ECD) antikorları Beckman Coulter (Beckman Coulter Inc., ABD) firmasından temin edildi. Kullanılan diğer antikorlar ise anti-human CXCR5 (Percp, R&D-System, ABD) ve anti-human FOXP3'dür (FITC, eBioscience, ABD) (Tablo 2-1). Hasta numunesi alındıktan sonra elde edilen PKMH ile kültür öncesi taze olarak (uyarısız) immünofenotipleme yapıldı. TREG hücresi CD4+CD25+CD127-CXCR5- olarak, TFH hücresi CD4+CD25-CXCR5+ olarak, TFR hücresi CD4+CD25+CD127-CXCR5+ olarak tanımlandı. Şekil 2-1'de kapılama stratejisi gösterilmiştir. Yüzey boyama için 100 µl boyama tamponu (%0,2 PBS) içinde, akan hücre ölçer tüpüne ikiyüzbin hücre ve fluorokrom işaretli monoklonal antikorlar eklenerek 20 dk. oda sıcaklığında, karanlıkta inkübasyon yapıldı. Santrifüj aşamasında yıkama işlemi PBS ile 1500 rpm 10 dk. +4°C'de gerçekleştirildi. 100 µl akış sıvısı (IsoFlow Kılıf sıvısı, Beckman Coulter, ABD) içinde akan hücre ölçer ile sayım yapıldı. Araştırılan molekülün pozitiflik sınırını belirlemek için floresan eksi bir (FEB/FMO) tüpü kullanıldı. Hücre ölçümlerinde Navios™ cihazı (Beckman Coulter, ABD) kullanıldı. Kaluza™ Yazılımı (Beckman Coulter, ABD) ile analiz yapıldı.







Şekil 2-1: Sağlıklı periferik kan mononükleer hücreler ile akan hücre ölçer analiz sisteminde uygulanan kapılama stratejileri. a) Otofloresan ve floresan eksi bir tüpleri ile pozitiflik sınırının belirlenmesi, b) TREG, TFH ve TFR hücre kapılama örneği, c) Yardımcı ve sitotoksik T hücre kapılama stratejisi, d) FOXP3, CTLA4 ve PD1 floresan eksi bir yöntemi ile sınır tayini

Tablo 2-1: Antikor fluorokrom boyama kombinasyonu

FITC (FL1)	PE (FL2)	ECD (FL3)	PC5/PERCP (FL4)	PC7 (FL5)	APC (FL6)	KRO (FL10)
FOXP3	CTLA4	CD25	CXCR5	CD127	PD1	CD4
CD3	-	CD19	CD4	CD8	CD45	-

FITC; Floresein izotiyosiyanat, ECD; Fikoeritrin-Teksas kırmızısı, PC5; Fikoeritrin siyanin 5, PC7; Fikoeritrin siyanin 7, PERCP; Peridin-klorofil proteini, PE; Fikoeritrin APC; Allofikosiyenin KrO; Krom turuncu, FOXP3; Forkhead box P3, CTLA4; Sitotoksik T lenfosit ile ilişkili protein 4, PD1; Programlı ölüm 1, CD; Farklılaşma kümesi, FL; Florokrom

2.4. Hücre İçi Foxp3 ve CTLA4 Boyaması

Hücre stabilitesini sağlamak ve güvenilir veri elde etmek için hücre içi FOXP3 ve CTLA4 düzeyleri, Foxp3 transkripsiyon faktör boyama tampon seti (eBioscience, ABD)

kullanılarak belirlendi. Kitin önerdiği protokol ile anti-human FOXP3 ve anti-human CTLA4 antikorları ile hücre içi boyama yapabilmek için, öncelikle PKMH'lerin anti-CD4, anti-CD127, anti-CXCR5, anti-PD1 ve anti-CD25 antikorları ile yüzey boyaması gerçekleştirildi. Hücrelerin üzerine taze hazırlanmış fiksasyon-permeabilizasyon çözeltisi (1x Fix/Perm) eklenip +4°C'de 60 dk. inkübasyona bırakıldı. Permeabilizasyon için tampon (1x) eklenip 2 kez 400g'de 5 dk. oda ısısında santrifüj edilerek yıkandı. Pelet üzerine hücre içi tayin etmek istediğimiz beşer mikrolitre anti-FOXP3 ve anti-CTLA4 antikoru eklenip, +4°C'de 30 dk. inkübe edildi. Ardından permeabilizasyon tamponu (1xPerm Buffer) eklenip santrifüj edilerek 2 kez 400g'de 5 dk. oda ısısında yıkandı. Hücreler akış sıvısı (IsoFlow Kılıf sıvısı, Beckman Coulter, ABD) ile sulandırılıp akan hücre ölçer (Navios TM, Beckman Coulter, ABD) sistemi ile analiz edildi.

2.5. Hücre Kültürü

Progesteron (p8783, Sigma-Aldrich, ABD) ve VitD'nin (Abbott Laboratories, USA) periferik kan mononükleer hücrelere etkisini değerlendirmek amacıyla hücre kültürü yapıldı ve üst sıvılardan sitokin düzeylerine bakıldı. PKMH'ler anti-CD3 (Ultra-LEAF anti-human CD3, Biolegend, ABD)+anti-CD28 (Biolegend, ABD), anti-CD3+anti-CD28+Progesteron, anti-CD3+anti-CD28+VitD, anti-CD3+anti-CD28+Progesteron+VitD uyarım koşullarında 4 gün boyunca kültüre edildi ve hücreler akan hücre ölçerde değerlendirildi. Kuyucuklar, 100µl PBS içinde konsantrasyon 2 µg/ml olacak biçimde 37°C'de 4 saat boyunca anti-CD3 ile kaplandı (102). 100 ul PBS ile yıkandı. 2,5 ug/ml konsantrasyonda çözünür anti-CD28 uyarımı yapıldı. 200 mikrolitre kuyu hacmi, 200.000 hücre içerecek şekilde medyumla tamamlandı. Ayrıca ilgili kuyulara P4 (2 µg/ml) (24) ve 1,25 VitD (10^{-8} M=4 ng/ml) (102) eklendi. +37°C'de %5 CO2 içeren inkübatörde inkübe edildi. 100 µl medyum içinde anti-CD45, anti-CD3, anti-CD8, anti-CD19, anti-CD4, anti-CD25, anti-CXCR5, anti-CD127, anti-FOXP3, anti-CTLA4, anti-PD1 monoklonal antikorlarıyla boyandı ve akan hücre ölçer sistemi ile okutulup, Kaluza analiz programıyla analizi yapıldı.

2.6. Elisa ve Lumineks Ölçümleri

25-hidroksi vitamin D3 düzeyi ELISA kiti (Immunodiagnostic Systems, İngiltere) kullanılarak tüm katılımcıların serum örneklerinden ölçüldü. Hemogloblin A1c düzeyleri EDTA'lı tüpte tam kandan yüksek performans sıvı kromatografi yöntemiyle, C-peptid düzeyleri serum numunesinden kemilüminesans yöntemiyle belirlendi.

Tip 1 diabetes mellituslu hasta ve kontrol numunelerinin kültür uyarımları sonrası üst sıvılarından (n=160) IL-10 (Diaclone, Fransa) ve TGF- β (Abbkin Scientific Co. Ltd., ABD) düzeyleri, ELISA yöntemiyle ölçüldü. IL-4, IL-21, IFN- γ , IL17 ve TNF- α Lumineks yöntemiyle kitin (R&D systems, ABD) önerdiği protokol uygulanarak ölçüldü. Kısaca, tüm solüsyonlar kılavuza uygun olarak hazırlandı. Her kuyucuğa 50 μ L standard veya örnek eklendi. Her kuyucuğa 50 μ L dilüe edilmiş mikropartikül kokteyl (IL-4, IL-21, IFN- γ , IL17 ve TNF- α) eklendi. 2 saat 800 rpm'de oda sıcaklığında orbital mikropate çalkalayıcısında (Hangzhou Allsheng, China) inkübe edildi. Mevcut sıvı, her kuyucuktan uzaklaştırılarak 100 μ L yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkama yapıldı. Sıvı tekrar uzaklaştırıldı. Her kuyucuğa 50 μ L dilüe edilmiş biotin-antikor kokteyl eklendi. Üzerini kapatıp 25°C'de 1 saat 800 rpm'de çalkalayıcıda inkübe edildi. Yıkama işlemi aynı şekilde tekrar edildi. Her kuyucuğa 50 μ L dilue edilmiş streptavidin-PE eklendi. 25°C'de 30 dk. 800 rpm'de inkübe edildi. Her kuyucuğa 100 μ L yıkama solüsyonu eklendi. 25°C'de 2 dk. 800 rpm'de inkübe edildi. Luminex® 100/200TM (Luminex Inc., ABD) kullanarak 90 dk. içinde okuma yapıldı.

2.7. İstatistiksel Analiz

Çalışmadan elde edilen veriler değerlendirilirken, istatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics 22 programı kullanıldı. Parametrelerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro Wilks testleri ile değerlendirildi. Tanımlayıcı istatistiksel metodların (Ortalama, Standart sapma) yanısıra çalışma verileri değerlendirilirken niceliksel verilerin kıyaslamasında normal dağılım gösteren parametrelerin gruplar arası karşılaştırmaları Oneway Anova testi ile farklılığa neden olan grubun tespiti ise Tukey HDS testi ile yapıldı. Normal dağılım göstermeyen parametrelerin gruplar arası kıyaslamasında Kruskal Wallis testi ile farklılığa neden olan grup belirlenirken Dunn's test kullanıldı. Normal dağılım gösteren ve göstermeyen parametrelerin iki grup arası karşılaştırmalarında sırasıyla Student t test, Mann Whitney U test kullanıldı. Sırasıyla, normal dağılım gösteren ve göstermeyen parametrelerin grup içi karşılaştırmalarında tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi (post hoc Bonferroni test); Friedman Test (post hoc Wilcoxon işaret testi) kullanıldı. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise Ki-Kare testi ve Continuity (Yates) Düzeltmesi kullanıldı. Anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

3. BULGULAR

Kadın (n=20) ve erkek (n=20) oranı eşit olacak şekilde, minimum 10, maksimum 37 yaşında olan 40 birey ile çalışma yapılmıştır. Yaş ortalaması 19.47 ± 7.28 yıl olarak belirlenmiştir. Olgular dört grup altında değerlendirilmiştir. Yeni tanı T1DM'li 10 olgu, eski tanı T1DM'li 15 olgu ve sağlıklı 15 olgu çalışmaya dahil edilmiştir. Analiz yapılırken total diyabet grubu, yeni tanı T1DM, eski tanı T1DM ve sağlıklı kontrol grubu karşılaştırılmıştır.

Tüm diyabetli hastaları içeren total diyabet grubu, yeni tanı T1DM ve eski tanı T1DM'li hastaları içeren alt gruplar ve kontrol arasında demografik veri dağılımları açısından belirgin farklılık yoktur ($p > 0,05$) (Tablo 3-1).

Tablo 3-1: Kontrol, diyabet, yeni ve eski tanı diyabet gruplarını içeren alt grupların yaş ve cinsiyet açısından değerlendirilmesi

	p	Diyabet (n=25)	Kontrol (n=15)	Yeni tanı T1DM (n=10)	Eski tanı T1DM (n=15)	P
Yaş $_{Ort \pm SS}$	¹ 0,822	19,68 $\pm$ 6,64	19,13 $\pm$ 8,48	16,10 $\pm$ 7,38	22,07 $\pm$ 5,02	³ 0,129
Cinsiyet $_n$ (%)						
Kadın	² 1,000	12 (%48)	8 (%53,3)	5 (%50)	7 (%46,7)	⁴ 0,936
Erkek		13 (%52)	7 (%46,7)	5 (%50)	8 (%53,3)	

¹Student t Test, ²Continuity (yates) düzeltmesi, ³Oneway ANOVA Test, ⁴Ki-kare test. İlk p değeri diyabet ve kontrol grubu kıyaslandığında oluşan anlamlılığı, ikinci p değeri yeni ve eski tanı T1DM ile kontrol grubu karşılaştırmasında oluşan anlamlılığı ifade etmektedir. T1DM; Tip 1 diabetes mellitus

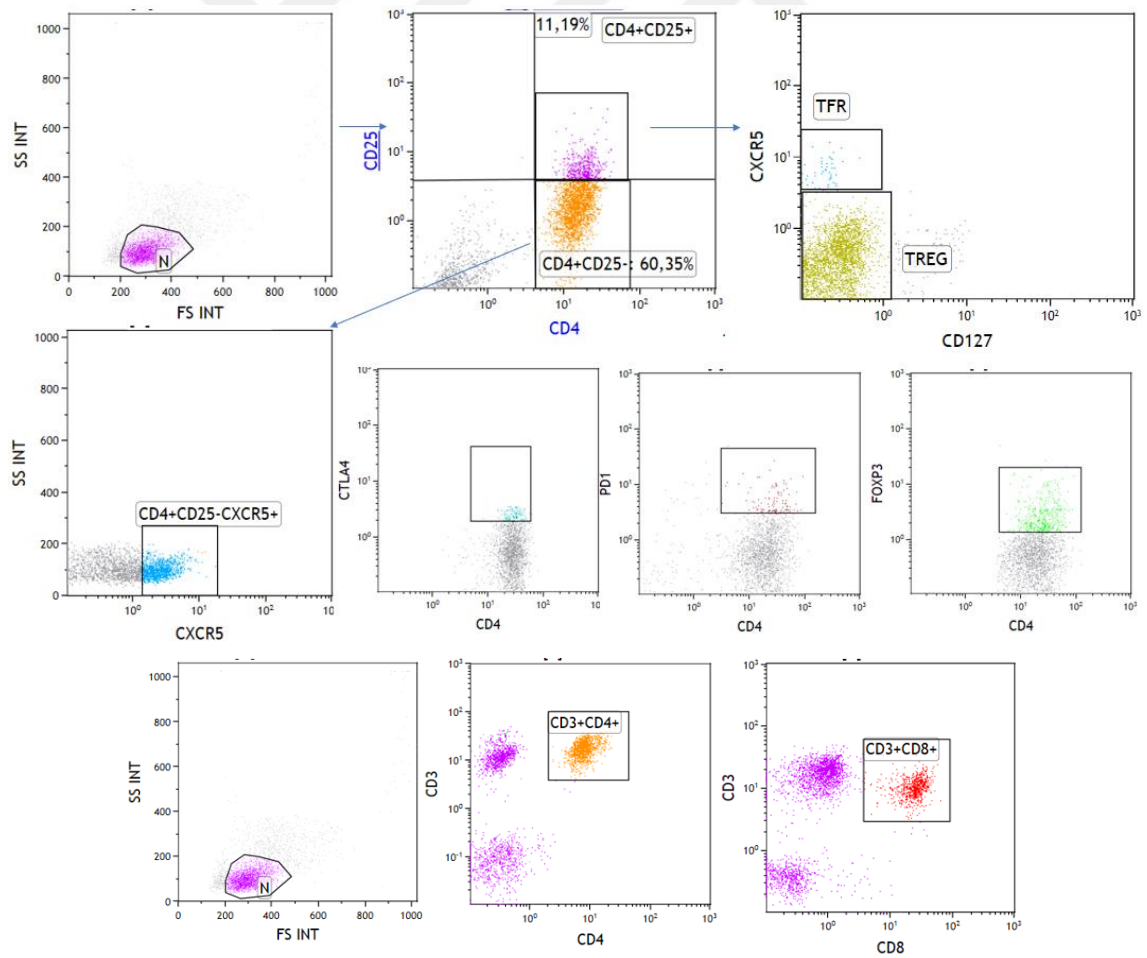
Total diyabet, yeni tanı, eski tanı T1DM ve kontrol grupları kıyaslandığında, tüm gruplarının HbA1c düzeyi ($p=0,001$), kontrol grubundan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Ayrıca yeni tanı T1DM grubunun HbA1c düzeyi, eski tanı T1DM grubundan ($p=0,001$) yüksek bulunmuştur.

Tüm grupların C-Peptid düzeyi, kontrolden anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. Yeni tanı ve eski tanı T1DM arasında fark yoktur ($p=0,328$) (Tablo 3-2).

Tablo 3-2: Kontrol, diyabet, yeni ve eski tanıli diyabet gruplarını içeren alt grupların klinik parametreler açısından değerlendirilmesi

	p	Diyabet	Kontrol	Yeni tanı T1DM	Eski tanı T1DM	p
HbA1c (%) Ort±SS (medyan)	¹ 0,001*	9,98±2,46 (9)	5,23±0,36 (5,3)	12,27±1,24 (12,4)	8,45±1,76 (8,1)	³ 0,001*
D Vitamini (ng/ml) Ort±SS	² 0,806	24,77±6,47	25,29±6,33	23,87±6,34	25,37±6,7 1	⁴ 0,828
C-Peptid (ng/ml) Ort±SS (medyan)	¹ 0,001*	0,27±0,17 (0,2)	3,07±0,78 (3,1)	0,38±0,18 (0,4)	0,19±0,12 (0,2)	³ 0,001*

¹Mann Whitney U Test, ²Student t Test, ³Kruskal Wallis Test, ⁴Oneway ANOVA Test, * $p < 0,05$. İlk p değeri diyabet ve kontrol grubu kıyaslandığında oluşan anlamlılığı, ikinci p değeri yeni ve eski tanı T1DM ile kontrol grubu karşılaştırmasında oluşan anlamlılığı ifade etmektedir. T1DM; Tip 1 diabetes mellitus



Şekil 3-1: Periferik kan mononükleer hücrelerden yapılan Tip 1 diyabetli hasta immünofenotipleme örneği

Diyabet grubunun taze (kültür öncesi uyarımsız) numune CD4+CD25+ ($p=0,002$), CD4+CD25+CD127-CXCR5-cFOXP3+ ($p=0,027$) ve TFR düzeyleri ($p=0,005$) kontrol grubuna göre belirgin azalmıştır. TFH yüzdesi, kontrole kıyasla artmıştır ($p=0,001$). Aynı hücre gruplardaki artış ve azalış, yeni ve eski tanı T1DM grupları ve kontrol grubu arasında da tespit edilmiştir. Yeni tanı ve eski tanı T1DM arasında değişim bulunmamaktadır (Tablo 3-3).

Tablo 3-3: Total diyabet, yeni tanı ve eski tanı diyabet gruplarının kültür öncesi taze (uyarımsız) periferik kan mononükleer hücre değerlendirmeleri

Taze PKMH (Kültür öncesi) (%)	p	Diyabet Ort±SS	Kontrol Ort±SS	Yeni tanı Eski tanı T1DM T1DM		p
				Ort±SS	Ort±SS	
CD45+ Lenfosit	0,783	90,64±4,54	90,07±7,16	91,6±3,47	90±5,14	0,753
CD3+ T hücre	10,831	73,98±7,53	74,61±11,0	74,82±6,93	73,41±8,08	0,910
CD3+CD4+ (Yardımcı T hücre)	0,358	44,07±4,65	46,42±8,94	44,05±3,16	44,09±5,54	0,563
CD3+CD8+ (Sitotoksik T hücre)	0,141	28,34±4,72	26,09±4,37	29,11±4,87	27,83±4,73	0,274
CD19+ (B hücre)	0,278	10,45±2,1	9,75±1,71	10,94±2,55	10,13±1,75	0,337
CD4+CD25+	0,027*	12,42±2,84	15,77±4,95	12,23±2,58	12,55±3,09	0,036*
CD4+CD25+CD127-CXCR5- (TREG)	0,207	63,51±7,12	66,18±4,82	63,94±4,17	63,22±8,69	0,439
CD4+CD25+CD127-CXCR5-cFOXP3+	0,002*	63,07±1,54	64,58±1,14	62,83±1,18	63,23±1,76	0,008*
CD4+CD25+CD127-CXCR5-PD1+	0,947	7,78±2,82	7,85±2,99	7,61±3,35	7,9±2,53	0,969
CD4+CD25+CD127-CXCR5-cCTLA4+	0,067	58,93±1,78	60,23±2,24	59,02±1,11	58,87±2,15	0,147
CD4+CD25-CXCR5+ (TFH)	0,001*	6,14±1,61	4,18±1,43	6,1±1,74	6,17±1,58	0,002*
CD4+CD25-CXCR5+PD1+	0,195	5,03±0,2	4,95±0,16	4,98±0,21	5,06±0,19	0,266
CD4+CD25-CXCR5+cCTLA4+	0,963	2,27±0,16	2,27±0,11	2,25±0,21	2,29±0,12	0,785
CD4+CD25+CD127-CXCR5+ (TFR)	0,005*	9,24±2,37	13,64±5,01	9,46±1,9	9,09±2,69	0,003*
CD4+CD25+CD127-CXCR5+cFOXP3+	0,215	26,17±1,61	25,53±1,46	26,05±1,73	26,25±1,58	0,446
CD4+CD25+CD127-CXCR5+cCTLA4+	0,539	15,56±1,58	15,89±1,75	15,11±1,38	15,86±1,68	0,448
CD4+CD25+CD127-CXCR5+PD1+	0,396	17,04±1,65	17,5±1,59	17,48±1,72	16,75±1,59	0,387

Total diyabet ve kontrol kıyaslanırken *Student t Test*, eski tanı, yeni tanı ve kontrol kıyaslanırken *Oneway ANOVA Testi* kullanılmıştır. İlk p değeri diyabet ve kontrol grubu kıyaslandığında oluşan anlamlılığı, ikinci p değeri yeni ve eski tanı T1DM ile kontrol grubu karşılaştırmasında oluşan anlamlılığı ifade etmektedir. T1DM; Tip 1 diabetes mellitus, * $p<0,05$.

Diyabet grubunun CD3+CD28+ uyarımlı CD4+CD25+ düzeyleri ($p=0,047$), TREG düzeyleri ($p=0,001$), TFR düzeyleri ($p=0,001$), kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük, TFH düzeyleri ise yüksektir ($p=0,001$).

Eski ve yeni tanı grupları açısından farklılıklara baktığımızda, sadece **eski tanı T1DM grubunda CD4+CD25+ düzeyleri, kontrolden ($p=0,041$) anlamlı şekilde düşük bulunmuştur**. Yeni tanı ve eski tanı T1DM arasında anlamlılık mevcut değildir ($p=0,811$). Total diyabet grubunda olduğu gibi **yeni tanı T1DM ($p=0,047$) ve eski tanı T1DM'nin ($p=0,005$) TFH düzeyleri, kontrol'den anlamlı şekilde yüksek, TFR düzeyleri ise düşük bulunmuştur ($p=0,001$) (Tablo 3-4).**

Tablo 3-4: Total diyabet, yeni tanı ve eski tanı diyabet gruplarının CD3+CD28+ uyarımlı ölçümlere ilişkin değerlendirmeleri

CD3+CD28+ (%)	p	Diyabet		Kontrol		Yeni tanı	Eski tanı	p
		Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	T1DM	T1DM	
CD45+ Lenfosit	0,751	86,06±8,43	86,91±7,63	87,73±10,7	84,95±6,71			0,675
CD3+ T hücre	0,589	77,54±5,08	78,46±5,3	76,88±5,11	77,98±5,2			0,758
CD3+CD4+ (Yardımcı T hücre)	0,499	47,77±4,41	48,83±5,28	48,68±3,81	47,16±4,8			0,591
CD3+CD8+ (Sitotoksik T hücre)	0,218	23,48±4,7	25,71±6,56	22,22±4,37	24,32±4,86			0,305
CD19+ (B hücre)	0,683	17,61±5,95	16,89±4,12	17,76±6,63	17,51±5,68			0,915
CD4+CD25+	0,047*	13,89±2,06	16,54±4,52	14,38±1,84	13,57±2,2			0,046*
CD4+CD25+CD127-CXCR5- (TREG)	0,014*	65,25±4,69	68,4±3,02	65,46±4,82	65,11±4,77			0,084
CD4+CD25+CD127-CXCR5-cFOXP3+	0,835	64,76±6,64	65,25±7,7	64,47±6,34	64,96±7,04			0,965
CD4+CD25+CD127-CXCR5-PD1+	0,601	10,03±2,16	9,69±1,63	10,22±1,67	9,9±2,49			0,810
CD4+CD25+CD127-CXCR5-cCTLA4+	0,738	63,55±4,51	63,03±5,05	62,72±3,68	64,11±5,04			0,734
CD4+CD25-CXCR5+ (TFH)	0,001*	8,09±2,25	5,82±1,35	7,82±1,09	8,27±2,8			0,004*
CD4+CD25-CXCR5+PD1+	0,331	4,84±0,35	4,73±0,29	4,85±0,32	4,83±0,38			0,622
CD4+CD25-CXCR5+cCTLA4+	0,154	2,35±0,26	2,23±0,23	2,26±0,29	2,41±0,23			0,118
CD4+CD25+CD127-CXCR5+ (TFR)	0,001*	9,2±1,29	13,93±1,87	9,06±1,44	9,29±1,23			0,001*
CD4+CD25+CD127-CXCR5+cFOXP3+	0,407	26,23±3,83	27,39±4,88	27,53±3,69	25,37±3,79			0,328
CD4+CD25+CD127-CXCR5+cCTLA4+	0,289	19,36±3	20,4±2,86	18,5±3,76	19,94±2,33			0,282
CD4+CD25+CD127-CXCR5+PD1+	0,825	19,09±3,01	19,29±2,3	18,28±3,74	19,63±2,4			0,479

Total diyabet ve kontrol kıyaslanırken *Student t Test*, eski tanı, yeni tanı ve kontrol kıyaslanırken *Oneway ANOVA Testi* kullanılmıştır. İlk p değeri diyabet ve kontrol grubu kıyaslandığında oluşan anlamlılığı, ikinci p değeri yeni ve eski tanı T1DM ile kontrol grubu karşılaştırmasında oluşan anlamlılığı ifade etmektedir. T1DM; Tip 1 diabetes mellitus, * $p<0,05$.

Diyabet grubunun CD3+CD28+VitD uyarımı ile sitotoksik T hücre ve ($p=0,001$) TFR düzeyleri ($p=0,010$) kontrole kıyasla düşmüş, TFH seviyesi ise kontrole kıyasla artmıştır ($p=0,045$). Eski ve yeni tanı grupları açısından farklılıklara baktığımızda, total diyabetteki gibi **yeni ($p=0,009$) ve eski tanı T1DM'nin ($p=0,001$)**

sitotoksik T hücre düzeyleri kontrolden, anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. Yeni tanı ve eski tanı T1DM arasında fark bulunmamaktadır ($p=0,726$). Eski tanı diyabet grubunda total diyabetteki gibi TFH düzeyleri, kontrolden ($p=0,040$) anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. TFR düzeyleri, kontrolden ($p=0,045$) anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. Yeni tanı ve eski tanı T1DM arasında anlamlılık mevcut değildir ($p=0,969$). (Tablo 3-5).

Tablo 3-5: Total diyabet, yeni tanı ve eski tanı diyabet gruplarının CD3+CD28+VitD uyarımlı ölçümlere ilişkin değerlendirmeleri

CD3+CD28+VitD (%)	p	Diyabet		Kontrol		Yeni tanı	Eski tanı	p
		Ort±		Ort±		T1DM	T1DM	
		SS	SS	SS	SS	Ort±SS	Ort±SS	
CD45+ Lenfosit	0,079	89,36±6,06	92,07±3,43	88,4±5,52	90±6,5	0,235		
CD3+ T hücre	0,208	80,31±5,46	82,75±6,42	79,12±5,28	81,1±5,61	0,326		
CD3+CD4+ (Yardımcı T hücre)	0,154	57,34±4,72	54,96±5,45	55,63±3,84	58,47±5,02	0,139		
CD3+CD8+ (Sitotoksik T hücre)	0,001*	19,29±2,89	24,05±3,73	19,9±2,99	18,89±2,85	0,001*		
CD19+ (B hücre)	0,463	16,16±4,73	14,89±6	17,65±3,64	15,17±5,21	0,392		
CD4+CD25+	0,108	21,62±2,27	24,25±5,74	20,9±2,6	22,09±1,97	0,108		
CD4+CD25+CD127-CXCR5- (TREG)	0,900	72,34±3,97	72,54±6,06	71,53±4,3	72,88±3,79	0,790		
CD4+CD25+CD127-CXCR5-FOXP3+	0,204	70,42±2,89	69,18±3	70,03±3,11	70,67±2,81	0,392		
CD4+CD25+CD127-CXCR5-PD1+	0,246	12,42±2,36	11,58±1,84	12,63±2,62	12,28±2,25	0,477		
CD4+CD25+CD127-CXCR5-cCTLA4+	0,503	70,74±6,62	69,34±5,82	70,3±7,53	71,03±6,19	0,770		
CD4+CD25-CXCR5+ (TFH)	0,045*	6,28±1,17	5,13±1,9	5,96±1,23	6,5±1,12	0,048*		
CD4+CD25-CXCR5+PD1+	0,244	4,02±1,77	4,77±2,21	3,83±1,89	4,14±1,74	0,475		
CD4+CD25-CXCR5+cCTLA4+	0,305	1,31±1,02	1,63±0,79	1,43±0,97	1,23±1,07	0,519		
CD4+CD25+CD127-CXCR5+ (TFR)	0,010*	11,58±2,92	14,16±2,95	11,75±3,37	11,46±2,7	0,038*		
CD4+CD25+CD127-CXCR5+cFOXP3+	0,517	29,16±7,13	30,22±2,98	28,8±9,48	29,4±5,39	0,840		
CD4+CD25+CD127-CXCR5+cCTLA4+	0,979	25,54±8,39	25,61±7,68	23,45±7,52	26,94±8,89	0,579		
CD4+CD25+CD127-CXCR5+PD1+	0,718	22,61±7,69	23,77±10,8	21,69±8,34	23,22±7,47	0,850		

Total diyabet ve kontrol kıyaslanırken *Student t Test*, eski tanı, yeni tanı ve kontrol kıyaslanırken *Oneway ANOVA Testi* kullanılmıştır. İlk p değeri diyabet ve kontrol grubu kıyaslandığında oluşan anlamlılığı, ikinci p değeri yeni ve eski tanı T1DM ile kontrol grubu karşılaştırmasında oluşan anlamlılığı ifade etmektedir. T1DM; Tip 1 diabetes mellitus, * $p<0,05$.

Gruplar arasında CD3+CD28+progesteron uyarımı ile anlamlı farklılık elde edilmemiştir ($p>0,05$) (Tablo 3-6).

Tablo 3-6: Total diyabet, yeni tanı ve eski tanı diyabet gruplarının CD3+CD28+Progesteron uyarımlı ölçümlere ilişkin değerlendirmeleri

CD3+CD28+Progesteron (%)	p	Diyabet	Kontrol	Yeni tanı T1DM	Eski tanı T1DM	p
		Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	
CD45+ Lenfosit	0,917	85,2±5,31	85±6,63	85,8±5,79	84,8±5,13	0,913
CD3+ T hücre	0,531	76,86±7,23	78,37±7,37	77,9±8,39	76,17±6,57	0,699
CD3+CD4+ (Yardımcı T hücre)	0,950	48,54±3,49	48,6±1,54	49,45±5,41	47,93±1,07	0,449
CD3+CD8+ (Sitotoksik T hücre)	0,851	23,62±4,32	23,35±4,74	23,45±4,46	23,74±4,38	0,971
CD19+ (B hücre)	0,573	18,49±5,41	17,49±5,33	17,25±5,07	19,32±5,63	0,552
CD4+CD25+	0,318	21,28±9,41	24,39±9,46	19,22±8,05	22,65±10,25	0,414
CD4+CD25+CD127-CXCR5- (TREG)	0,948	71,09±13,8	70,8±12,62	72,46±14,26	70,17±13,92	0,916
CD4+CD25+CD127-CXCR5-cFOXP3+	0,983	69,08±11,5	68,99±13	70,96±8,38	67,83±13,37	0,821
CD4+CD25+CD127-CXCR5-PD1+	0,474	10,21±3,3	10,92±2,38	11,11±3,35	9,61±3,25	0,369
CD4+CD25+CD127-CXCR5-CTLA4+	0,198	68,3±7,77	71,77±8,67	68,16±7,78	68,39±8,04	0,440
CD4+CD25-CXCR5+ (TFH)	0,435	5,8±1,5	6,19±1,45	6,03±1,62	5,65±1,46	0,613
CD4+CD25-CXCR5+PD1+	0,350	3,73±2,81	4,61±2,95	3,63±2,14	3,79±3,25	0,644
CD4+CD25-CXCR5+cCTLA4+	0,091	2,12±1,25	2,94±1,72	1,95±1,49	2,24±1,11	0,218
CD4+CD25+CD127-CXCR5+ (TFR)	0,156	12,29±3,92	14,24±4,43	12,71±3,87	12,01±4,07	0,340
CD4+CD25+CD127-CXCR5+cFOXP3+	0,799	30,38±8,09	31,06±8,3	30,61±6,96	30,22±9	0,962
CD4+CD25+CD127-CXCR5+cCTLA4+	0,909	26,71±6,46	26,47±6,55	26,17±6,97	27,07±6,33	0,939
CD4+CD25+CD127-CXCR5+PD1+	0,585	23,93±10,8	25,89±11,1	22,99±11,56	24,56±10,56	0,812

Total diyabet ve kontrol kıyaslanırken *Student t Test*, eski tanı, yeni tanı ve kontrol kıyaslanırken *Oneway ANOVA Testi* kullanılmıştır. İlk p değeri diyabet ve kontrol grubu kıyaslandığında oluşan anlamlılığı, ikinci p değeri yeni ve eski tanı T1DM ile kontrol grubu karşılaştırmasında oluşan anlamlılığı ifade etmektedir. T1DM; Tip 1 diabetes mellitus, * $p<0,05$.

Diyabet grubunun CD3+CD28+VitD+Progesteron uyarımlı lenfosit ($p=0,001$), CD4+CD25+CD127-CXCR5-cFOXP3+ hücre ($p=0,021$) ve TFR düzeyleri ($p=0,031$) kontrol grubundan düşük bulunmuştur. Yeni ve eski tanı gruplarına sadece lenfosit düzeylerindeki düşüklük yansımıştır (Tablo 3-7).

Tablo 3-7: Total diyabet, yeni tanı ve eski tanı diyabet gruplarının CD3+CD28+VitD+Progesteron uyarımlı ölçümlere ilişkin değerlendirmeleri

CD3+CD28+VitD+Progesteron (%)	p	Diyabet	Kontrol	Yeni tanı T1DM	Eski tanı T1DM	p
		Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	
CD45+ Lenfosit	0,001*	86,4±4,19	91,13±3,18	85,3±2,83	87,13±4,85	0,001
CD3+ T hücre	0,186	79,68±5,55	77,27±5,39	79,3±5,68	79,93±5,65	0,407
CD3+CD4+ (Yardımcı T hücre)	0,365	56±5,46	54,25±6,46	55,8±4,57	56,14±6,13	0,660
CD3+CD8+ (Sitotoksik T hücre)	0,869	22,46±4,02	22,25±3,47	21,99±4,35	22,77±3,9	0,873

CD19+ (B hücre)	0,335	18,22±4,75	19,77±4,99	18,34±3,92	18,15±5,36	0,629
CD4+CD25+	0,529	22,59±7,9	24,41±10,0	21,68±5,01	23,19±9,48	0,753
CD4+CD25+CD127-CXCR5- (TREG)	0,207	76,34±6,64	78,98±5,63	74,91±7,72	77,3±5,91	0,298
CD4+CD25+CD127-CXCR5-cFOXP3+	0,021*	76,3±4,89	80,11±4,7	75,42±5,19	76,89±4,76	0,054
CD4+CD25+CD127-CXCR5-PD1+	0,377	14,32±6,92	16,47±8,03	13,77±6,04	14,69±7,64	0,650
CD4+CD25+CD127-CXCR5-cCTLA4+	0,760	70,88±11,6	71,96±9,3	70,16±11,2	71,35±12,2	0,922
CD4+CD25-CXCR5+ (TFH)	0,436	5,68±1,92	6,16±1,77	5,75±1,72	5,63±2,1	0,733
CD4+CD25-CXCR5+PD1+	0,323	3,8±2,16	4,48±1,92	3,95±2,26	3,7±2,17	0,592
CD4+CD25-CXCR5+cCTLA4+	0,800	2,11±1,26	2,21±1,13	2,37±1,43	1,94±1,15	0,669
CD4+CD25+CD127-CXCR5+ (TFR)	0,031*	11,38±2,59	13,25±2,5	11,11±2,92	11,56±2,44	0,092
CD4+CD25+CD127-CXCR5+cFOXP3+	0,389	30,47±7,7	32,69±8,02	31,84±8,56	29,55±7,24	0,539
CD4+CD25+CD127-CXCR5+cCTLA4+	0,892	24,51±9,06	24,07±10,7	23,18±9,92	25,39±8,69	0,851
CD4+CD25+CD127-CXCR5+PD1+	0,616	24,16±8,81	25,67±9,6	23,23±8,73	24,79±9,11	0,811

Total diyabet ve kontrol kıyaslanırken *Student t Test*, eski tanı, yeni tanı ve kontrol kıyaslanırken *Oneway ANOVA Testi* kullanılmıştır. İlk p değeri diyabet ve kontrol grubu kıyaslandığında oluşan anlamlılığı, ikinci p değeri yeni ve eski tanı T1DM ile kontrol grubu karşılaştırmasında oluşan anlamlılığı ifade etmektedir. T1DM; Tip 1 diabetes mellitus, * $p<0,05$.

Tablo 3-8: Total diyabet, yeni tanı ve eski tanı diyabet gruplarının CD3+CD28+ uyarımlı sitokin değerlendirmeleri

CD3+CD28+		Diyabet	Kontrol	Yeni tanı T1DM	Eski tanı T1DM	
pg/ml	p	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	p
IL-10	0,557	16,81±10,03 (15,7)	19,63±10,2 (16,8)	15,29±10,0 (14,5)	17,83±10,2 (15,8)	0,617
IFN- γ	0,001*	218,24±105,26 (207,9)	60,58±20,5 (56,9)	204,25±77,7 (192,8)	227,57±121,9 (240,3)	0,001
IL-17	0,900	91,38±70,45 (56,2)	82,44±45,6 (82,1)	90,61±80,1 (48,2)	91,89±66,2 (56,2)	0,919
TNF- α	*0,001*	197,93±86,87 (191,1)	101,9±69,4 (104,9)	208,09±92,7 (181,9)	191,15±85,3 (191,1)	**0,005
IL-21	*0,001*	155,45±43,16 (150,9)	103,99±35,0 (92,7)	159,74±38,7 (171,2)	152,59±46,9 (144,3)	**0,002
TGF- β	0,727	100,97±55,27 (84,3)	105,25±80,9 (96,3)	103,99±56,4 (88,8)	98,96±56,4 (84,3)	0,927
IL-4	0,922	80,58±34,93 (85,1)	78,97±41,5 (72,9)	81,28±42,7 (98,6)	80,11±30,2 (81,2)	0,993

Tablo 3-9: Total diyabet, yeni tanı ve eski tanı diyabet gruplarının CD3+CD28+VitD uyarımlı sitokin değerlendirmeleri

CD3+CD28+VitD		Diyabet	Kontrol	Yeni tanı T1DM	Eski tanı T1DM	
pg/ml	p	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	p
IL-10	0,989	21,77±12,22 (21,4)	21,75±11,21 (17,9)	20,02±5,94 (19,6)	22,93±15,16 (21,9)	0,991
IFN- γ	0,001*	181,11±73,5 (191,5)	77,49±36,15 (72,7)	185,56±83,16 (194,5)	178,14±69,21 (191,5)	0,001*
IL-17	*0,801	92,09±54,2 (85,3)	87,39±60,82 (77,5)	90,38±59,98 (74)	93,23±52,15 (85,3)	**0,962
TNF- α	0,011*	172,2±77,54 (162,9)	107,81±65,85 (98,5)	176,28±76,95 (205,9)	169,49±80,51 (139,7)	0,041*
IL-21	*0,268	117,93±61,68 (112,5)	100,9±34,14 (103,1)	123,99±77,85 (114,4)	113,89±50,83 (104,4)	**0,567
TGF- β	*0,283	128,31±66,22 (126,8)	104,4±69 (95,9)	124,68±62,44 (134,6)	130,73±70,67 (120,8)	**0,553
IL-4	*0,449	94,42±45,62 (82,3)	83,54±39,77 (81,2)	92,62±42,61 (84,2)	95,63±48,96 (82,3)	*0,743

Total diyabet ve kontrol kıyaslanırken *Mann Whitney U Test*, **Student t Test*, eski tanı, yeni tanı ve kontrol kıyaslanırken *Kruskal Wallis*, ***Oneway ANOVA Testi* kullanılmıştır. İlk p değeri diyabet ve kontrol grubu kıyaslandığında oluşan anlamlılığı, ikinci p değeri yeni ve eski tanı T1DM ile kontrol grubu karşılaştırmasında oluşan anlamlılığı ifade etmektedir. T1DM; Tip 1 diabetes mellitus, **p<0,05*.

Tablo 3-10: Total diyabet, yeni tanı ve eski tanı diyabet gruplarının CD3+CD28+Progesteron uyarımlı sitokin değerlendirmeleri

CD3+CD28+ pg/ml	Progesteron p	Diyabet Ort±SS (medyan)	Kontrol Ort±SS (medyan)	Yeni tanı T1DM Ort±SS (medyan)	Eski tanı T1DM Ort±SS (medyan)	p
IL-10	0,978	21,38±12,48 (20,6)	21,2±8,23 (19,5)	20,38±6,5 (22,7)	22,05±15,4 (20,6)	0,776
IFN- γ	0,001*	185,41±88,8 (173,6)	79,14±29,56 (73,5)	190,16±85,9 (190,8)	182,24±93,5 (173,6)	0,002*
IL-17	0,922	93,31±43,36 (88,4)	94,53±51,47 (87,3)	95,16±37,2 (87,9)	92,08±48,2 (90,9)	0,982
TNF- α	0,004*	180,92±70,6 (156,3)	108,65±55,53 (106,1)	183,04±75,9 (158,1)	179,5±69,5 (156,3)	0,017*
IL-21	0,128	145,14±81,25 (149,4)	102,87±55,15 (89,1)	147,23±88,4 (150,8)	143,75±79,3 (149,4)	0,314
TGF- β	0,386	131,34±86,52 (113,8)	108,21±79,17 (90,4)	120,46±80,4 (97)	138,6±92,3 (120,6)	0,647
IL-4	0,944	97,04±66,15 (75,2)	91,18±43,67 (88,8)	94,51±67,7 (70)	98,73±67,4 (84,5)	0,982

Tablo 3-11: Total diyabet, yeni tanı ve eski tanı diyabet gruplarının CD3+CD28+VitD+Progesteron uyarımlı sitokin değerlendirmeleri

CD3+CD28+VitD+ Progesteron (pg/ml)	p	Diyabet Ort±SS (medyan)	Kontrol Ort±SS (medyan)	Yeni tanı T1DM Ort±SS (medyan)	Eski tanı T1DM Ort±SS (medyan)	p
IL-10	0,989	28,56±11,9 (26,5)	28,13±12 (25,6)	27,58±7,1 (29,5)	29,21±14,4 (25,7)	0,963
IFN- γ	0,001*	172,54±90,2 (159,8)	75,04±29,4 (60,4)	181,7±108,7 (196,6)	166,44±79,2 (144,2)	0,004*
IL-17	0,665	95,22±54,3 (76,1)	88,13±51,5 (80,4)	97,19±54,4 (84,5)	93,91±56,1 (73,7)	0,797
TNF- α	0,494	131,71±76 (98,5)	109,4±46,9 (99,7)	125,25±9 (93,9)	136,02±65,4 (145,3)	0,584
IL-21	⁺ 0,710	109,79±44,1 (108,1)	104,8±34,3 (90,8)	114,46±50 (113,6)	106,68±41,2 (108,1)	⁺⁺ 0,839
TGF- β	0,030*	166,74±86,5 (172,5)	100,44±50,7 (107,3)	166,59±89,1 (171,6)	166,84±87,8 (172,5)	0,095
IL-4	⁺ 0,471	96,73±47,8 (99,3)	85,27±49 (77,3)	95,26±50,5 (96,4)	97,71±47,6 (101,1)	⁺⁺ 0,768

Total diyabet ve kontrol kıyaslanırken *Mann Whitney U Test*, ⁺*Student t Test*, eski tanı, yeni tanı ve kontrol kıyaslanırken *Kruskal Wallis*, ⁺⁺*Oneway ANOVA Testi* kullanılmıştır. İlk p değeri diyabet ve kontrol grubu kıyaslandığında oluşan anlamlılığı, ikinci p değeri yeni ve eski tanı T1DM ile kontrol grubu karşılaştırmasında oluşan anlamlılığı ifade etmektedir. T1DM; Tip 1 diabetes mellitus, * $p < 0,05$.

Diyabet grubunda ve alt grupları olan eski tanı ve yeni tanı T1DM gruplarında CD3+CD28+ uyarımı sonrası IFN- γ , TNF- α , IL-21 düzeylerinin, kontrole kıyasla yüksek olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3-8).

Diyabet grubunun CD3+CD28+VitD uyarımlı IFN- γ (p=0,001) ve TNF- α (p=0,021) düzeyleri kontrole kıyasla anlamlı düzeyde yükselmiştir. Yeni (p=0,003) ve eski tanı T1DM'nin (p=0,001) IFN- γ ve TNF- α düzeyleri, sırasıyla p=0,025, p=0,041 düzeyinde kontrolden anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (Tablo 3-9).

Diyabet grubunun CD3+CD28+Progesteron uyarımlı IFN- γ (p=0,001) ve TNF- α (p=0,004) düzeyleri, kontrole göre belirgin yükselmiştir. Alt gruplara da benzer şekilde yansıyarak, yeni tanı T1DM (p=0,008) ve eski tanı T1DM'nin (p=0,007) IFN- γ düzeyleri ve TNF- α düzeyleri, sırasıyla p=0,021, p=0,011 düzeyinde kontrolden anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (Tablo 3-10).

Diyabet grubunun CD3+CD28+VitD+Progesteron uyarımlı IFN- γ (p=0,001) ve TGF- β düzeyleri (p=0,03) kontrole kıyasla belirgin yükselmiştir. Alt gruplarda ise sadece, IFN- γ düzeyleri, kontrolden yüksek bulunmuştur (Tablo 3-11).

Tablo 3-12: Uyarılara karşı lenfosit değişimlerinin değerlendirilmesi

Lenfosit (%)	Diyabet	Yeni tanı	Eski tanı	Kontrol
		T1DM	T1DM	
	Ort $\pm$ SS	Ort $\pm$ SS	Ort $\pm$ SS	Ort $\pm$ SS
Taze PKMH (T1)	90,64 $\pm$ 4,54	91,6 $\pm$ 3,47	90 $\pm$ 5,14	90,07 $\pm$ 7,16
CD3+CD28+ (T3)	86,06 $\pm$ 8,43	87,73 $\pm$ 10,69	84,95 $\pm$ 6,71	86,91 $\pm$ 7,63
CD3+CD28+VitD (T4)	89,36 $\pm$ 6,06	88,4 $\pm$ 5,52	90 $\pm$ 6,5	92,07 $\pm$ 3,43
CD3+CD28+Progesteron (T5)	85,2 $\pm$ 5,31	85,8 $\pm$ 5,79	84,8 $\pm$ 5,13	85 $\pm$ 6,63
CD3+CD28+VitD+Progesteron (T6)	86,4 $\pm$ 4,19	85,3 $\pm$ 2,83	87,13 $\pm$ 4,85	91,13 $\pm$ 3,18
P	<0,05*	<0,05*	>0,05	<0,05*
T1-T3	AD	AD	AD	AD
T1-T4	AD	AD	AD	AD
T1-T5	0,012*	AD	AD	AD
T1-T6	AD	0,011*	AD	AD
T3-T4	AD	AD	AD	AD
T3-T5	AD	AD	AD	AD
T3-T6	AD	AD	AD	AD
T4-T5	AD	AD	AD	0,017*
T4-T6	AD	AD	AD	AD

T5-T6	AD	AD	AD	0,028*
-------	----	----	----	---------------

Tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi (post hoc Bonferroni test) *p<0,05 AD: Anlamli değil

Lenfosit düzeylerinin uyaranlara verdiği yanıtlar şu şekildedir.

Total diyabette T1 şartına göre T5 uyarımında ve yeni tanı T1DM’de T1 şartına göre T6 uyarımında lenfosit düzeylerinde düşüş görülmektedir.

Kontrolde; T4 uyarımına göre T5 uyarımında görülen düşüş anlamlı, T5 uyarımına göre T6 uyarımında görülen artış anlamlıdır (p<0,05) (Tablo 3-12).

Tablo 3-13: Uyaranlara karşı T Hücre değişimlerinin değerlendirilmesi

T Hücre (%)	Diyabet	Yeni tanı T1DM	Eski tanı T1DM	Kontrol
	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS
Taze PKMH (T1)	73,98±7,53	74,82±6,93	73,41±8,08	74,61±11,03
CD3+CD28+ (T3)	77,54±5,08	76,88±5,11	77,98±5,2	78,46±5,3
CD3+CD28+VitD (T4)	80,31±5,46	79,12±5,28	81,1±5,61	82,75±6,42
CD3+CD28+Progesteron (T5)	76,86±7,23	77,9±8,39	76,17±6,57	78,37±7,37
CD3+CD28+VitD+Progesteron (T6)	79,68±5,55	79,3±5,68	79,93±5,65	77,27±5,39
P	<0,05	>0,05	<0,05*	>0,05
T1-T3	AD	AD	AD	AD
T1-T4	0,017*	AD	0,035*	AD
T1-T5	AD	AD	AD	AD
T1-T6	0,017*	AD	0,045*	AD
T3-T4	AD	AD	AD	AD
T3-T5	AD	AD	AD	AD
T3-T6	AD	AD	AD	AD
T4-T5	AD	AD	AD	AD
T4-T6	AD	AD	AD	AD
T5-T6	AD	AD	AD	AD

Tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi (post hoc Bonferroni test) *p<0,05 AD: Anlamli değil

Total diyabette ve Eski tanı T1DM’de, kültür öncesi taze (uyarısız) PKMH’lere göre T4 ve T6 uyarımında T hücresinde artış görülmektedir (Tablo 3-13).

Tablo 3-14: Uyarılara karşı yardımcı T Hücre değişimlerinin değerlendirilmesi

Yardımcı T hücre (%)	Dişabet	Yeni tanı		Eski tanı	Kontrol
		T1DM	T1DM		
	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS
Taze PKMH (T1)	44,07±4,65	44,05±3,16	44,09±5,54	46,42±8,94	
CD3+CD28+ (T3)	47,77±4,41	48,68±3,81	47,16±4,8	48,83±5,28	
CD3+CD28+VitD (T4)	57,34±4,72	55,63±3,84	58,47±5,02	54,96±5,45	
CD3+CD28+Progesteron (T5)	48,54±3,49	49,45±5,41	47,93±1,07	48,6±1,54	
CD3+CD28+VitD+Progesteron (T6)	56±5,46	55,8±4,57	56,14±6,13	54,25±6,46	
P	<0,05	<0,05*	<0,05*	<0,05*	
T1-T3	AD	AD	AD	AD	
T1-T4	0,001*	0,001*	0,001*	AD	
T1-T5	0,014*	AD	AD	AD	
T1-T6	0,001*	0,001*	0,001*	AD	
T3-T4	0,001*	0,019*	0,001*	0,031*	
T3-T5	AD	AD	AD	AD	
T3-T6	0,001*	0,007*	0,021*	AD	
T4-T5	0,001*	AD	0,001*	0,014*	
T4-T6	AD	AD	AD	AD	
T5-T6	0,001*	AD	0,003*	0,042*	

Tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi (post hoc Bonferroni test)

*p<0,05

AD: Anlamalı değil

Yardımcı T hücre düzeylerinin uyarılara verdiği yanıtlar şu şekildedir

Dişabet grubunda, T1 şartına göre T4, T5, T6, ve T3 uyarımına göre T4 ve T6 uyarımında görülen artış istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05). T4 uyarımına göre T5 uyarımında görülen düşüş istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05). T5 uyarımına göre T6 uyarımında görülen artış istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05).

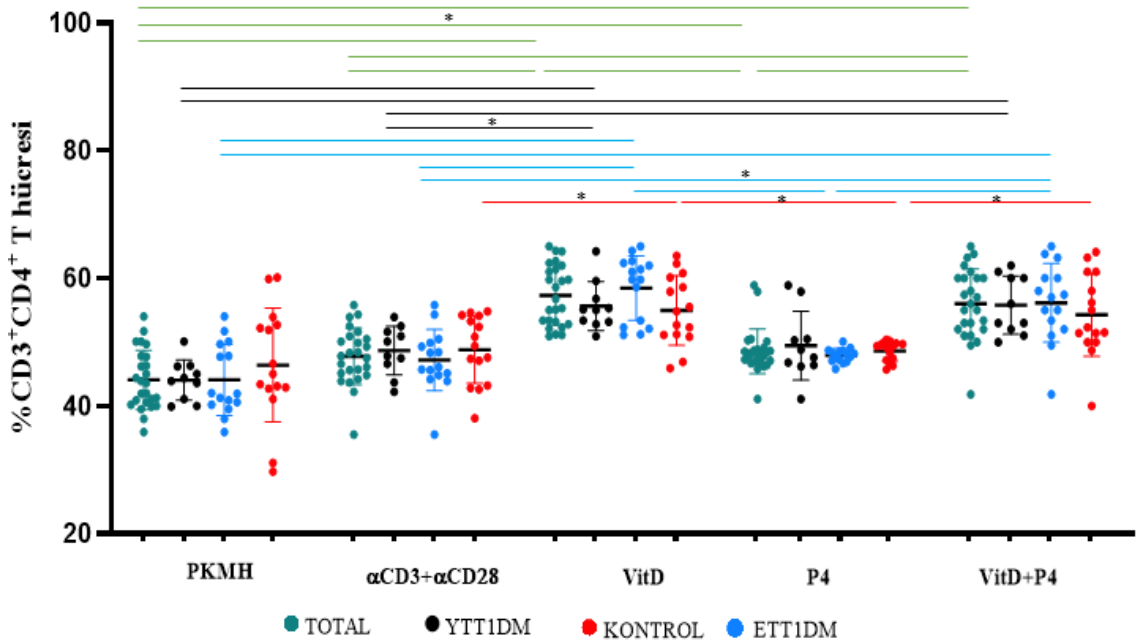
Yeni tanı T1DM'de; bulunulan şarta göre yardımcı T hücre düzeylerinde görülen değişim istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,008). T1 şartına göre, T3 ve T5 uyarımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemişken (p>0,05); **T1 şartına göre T4 ve T6 uyarımında görülen artış, T3 uyarımına göre T4 ve T6 uyarımında görülen artış istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05).**

Eski tanı T1DM'de; bulunulan şarta göre yardımcı T hücre düzeylerinde görülen değişim istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,001). T1 şartına göre, T3 ve T5 uyarımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemişken (p>0,05); **T1 şartına göre T4 ve T6 uyarımında görülen artış (p<0,05), T3 uyarımına göre T4 ve T6 uyarımında**

görülen artış, T5 uyarımına göre T6 uyarımında görülen artış istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). T4 uyarımına göre T5 uyarımında görülen düşüş istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).

Kontrolde; bulunulan şarta göre yardımcı T hücre düzeylerinde görülen değişim istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,016$). T3 uyarımına göre T4 uyarımında görülen artış, T5 uyarımına göre T6 uyarımında görülen artış istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). T4 uyarımına göre T5 uyarımında görülen düşüş istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). Diğer uyarılarda anlamlılık görülmemiştir (Tablo 3-14) (Şekil 3-2). Sonuç olarak yardımcı T hücreleri, Vitamin D etkisi ile tüm gruplarda özellikle diyabet grubunda artmaktadır.

Şekillerde kullanılan renkli anlamlılık çizgileri her grubun kendi rengini (eski tanı tip 1 diyabet grubu, mavi; yeni tanı tip 1 diyabet grubu, siyah; total diyabet grubu, yeşil; kontrol grubu, kırmızı renk) temsil etmektedir ve diğer uyarılar, ayrıca diğer gruplarla olan farklarını göstermektedir.



Şekil 3-2: Uyarı yanıtları açısından yardımcı T lenfosit değişimleri. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ olarak değerlendirildi, anlamlılık belirtilmeyen çubuklar ** $p<0,01$ 'dir.

Tablo 3-15: Uyarılara karşı sitotoksik T Hücre değişimlerinin değerlendirilmesi

Sitotoksik T Hücre (%)	Diyabet Ort±SS	Yeni tanı T1DM	Eski tanı T1DM	Kontrol
		Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS
Taze PKMH (T1)	28,34±4,72	29,11±4,87	27,83±4,73	26,09±4,37
CD3+CD28+ (T3)	23,48±4,7	22,22±4,37	24,32±4,86	25,71±6,56
CD3+CD28+VitD (T4)	19,29±2,89	19,9±2,99	18,89±2,85	24,05±3,73
CD3+CD28+Progesteron (T5)	23,62±4,32	23,45±4,46	23,74±4,38	23,35±4,74
CD3+CD28+VitD+Progesteron (T6)	22,46±4,02	21,99±4,35	22,77±3,9	22,25±3,47
P	<0,05	>0,05	<0,05*	>0,05
T1-T3	0,006*	AD	AD	AD
T1-T4	0,001*	AD	0,001*	AD
T1-T5	0,023*	AD	AD	AD
T1-T6	0,001*	AD	0,002*	AD
T3-T4	0,004*	AD	0,017*	AD
T3-T5	AD	AD	AD	AD
T3-T6	AD	AD	AD	AD
T4-T5	0,007*	AD	0,039*	AD
T4-T6	AD	AD	AD	AD
T5-T6	AD	AD	AD	AD

Tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi (post hoc Bonferroni test)

*p<0,05 AD: Anlamlı değil

Total diyabette bulunulan şarta göre sitotoksik T hücre düzeylerinde görülen değişim anlamlılık ifade etmektedir (p=0,001). **T1 şartına göre T3, T4, T5 ve T6 uyarımında; T3 uyarımına göre T4 uyarımındaki azalma; T4 uyarımına göre T5 uyarımındaki artışlar belirgin anlamlılık içermektedir (p<0,05).**

Yeni tanı T1DM'de; bulunulan şarta göre sitotoksik T hücre düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemiştir (p=0,155).

Eski tanı T1DM'de; bulunulan şarta göre sitotoksik T hücre düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı değişim görülmüştür (p=0,001). **T1 şartına göre, T4 ve T6 uyarımında görülen düşüşler istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05). T3 uyarımına göre T4 uyarımında görülen düşüş istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05). T4 uyarımına göre T5 uyarımında görülen artış istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05).** Diğer uyarılarda anlamlı değişimler görülmemiştir (p>0,05).

Kontrolde; bulunulan şarta göre sitotoksik T hücre düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemiştir (p=0,438) (Tablo 3-15).

Sonuç olarak sitotoksik T hücreleri, Vitamin D etkisi ile diyabet grubunda azalmaktadır. Bu düşüş belirgin olarak Eski tanı T1DM grubunda ortaya çıkmaktadır.

Tablo 3-16: Uyarılara karşı B Hücre değişimlerinin değerlendirilmesi

B Hücre (%)	Diyabet	Yeni tanı		Eski tanı	Kontrol
		T1DM	T1DM		
	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS
Taze PKMH (T1)	10,45±2,1	10,94±2,55	10,13±1,75	9,75±1,71	
CD3+CD28+ (T3)	17,61±5,95	17,76±6,63	17,51±5,68	16,89±4,12	
CD3+CD28+VitD (T4)	16,16±4,73	17,65±3,64	15,17±5,21	14,89±6	
CD3+CD28+Progesteron (T5)	18,49±5,41	17,25±5,07	19,32±5,63	17,49±5,33	
CD3+CD28+VitD+Progesteron (T6)	18,22±4,75	18,34±3,92	18,15±5,36	19,77±4,99	
P	<0,05	<0,05*	<0,05*	<0,05*	
T1-T3	0,001*	0,009*	0,006*	0,001*	
T1-T4	0,001*	0,011*	0,043*	AD	
T1-T5	0,001*	0,016*	0,001*	0,001*	
T1-T6	0,001*	0,001*	0,003*	0,001*	
T3-T4	AD	AD	AD	AD	
T3-T5	AD	AD	AD	AD	
T3-T6	AD	AD	AD	AD	
T4-T5	AD	AD	AD	AD	
T4-T6	AD	AD	AD	AD	
T5-T6	AD	AD	AD	AD	

Tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi (post hoc Bonferroni test)

*p<0,05 AD: Anlamlı değil

Total diyabet grubunda bulunan şarta göre B hücre düzeylerinde görülen değişim istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,001). **T1 şartına göre T3, T4, T5 ve T6 uyarımında görülen artışlar belirgin anlamlılık içermektedir (p<0,05).**

Yeni tanı ve eski tanı T1DM’de; bulunan şarta göre B hücre düzeylerinde görülen değişim istatistiksel olarak anlamlıdır. **T1 şartına göre T3, T4, T5 ve T6 uyarımında görülen artış istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05).**

Kontrolde; bulunan şarta göre B hücre düzeylerinde görülen değişim istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,001). T1 şartına göre T4 uyarımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemişken (p>0,05); **T1 şartına göre T3, T5 ve T6 uyarımında görülen artış istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05)** (Tablo 3-16).

Tablo 3-17: Uyarılara karşı CD4+CD25+ değişimlerinin değerlendirilmesi

CD4+CD25+ (%)	Diyabet Ort±SS	Yeni tanı	Eski tanı	Kontrol Ort±SS
		T1DM Ort±SS	T1DM Ort±SS	
Taze PKMH (T1)	12,42±2,84	12,23±2,58	12,55±3,09	15,77±4,95
CD3+CD28+ (T3)	13,89±2,06	14,38±1,84	13,57±2,2	16,54±4,52
CD3+CD28+VitD (T4)	21,62±2,27	20,9±2,6	22,09±1,97	24,25±5,74
CD3+CD28+Progesteron (T5)	21,28±9,41	19,22±8,05	22,65±10,25	24,39±9,46
CD3+CD28+VitD+Progesteron (T6)	22,59±7,9	21,68±5,01	23,19±9,48	24,41±10,06
P	<0,05	<0,05*	<0,05*	<0,05*
T1-T3	AD	AD	AD	AD
T1-T4	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*
T1-T5	0,002*	AD	0,044*	0,001*
T1-T6	0,001*	0,008*	0,009*	0,003*
T3-T4	0,001*	0,001*	0,001*	AD
T3-T5	0,009*	AD	0,045*	AD
T3-T6	0,001*	0,040*	0,026*	AD
T4-T5	AD	AD	AD	AD
T4-T6	AD	AD	AD	AD
T5-T6	AD	AD	AD	AD

Tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi (post hoc Bonferroni test)

*p<0,05

AD: Anlamlı değil

Diyabet grubunda bulunan şarta göre CD4+CD25+ hücre düzeylerinde belirgin anlamlılık mevcuttur (p=0,001). **T1 şartına göre T4, T5 ve T6 uyarımında belirgin artış mevcuttur (p<0,05). T3 uyarımına göre T4, T5 ve T6 uyarımında görülen artışlar belirgin anlamlılık içermektedir (p<0,05).**

Yeni tanı T1DM'de; bulunan şarta göre CD4+CD25+ düzeylerinde görülen değişim istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,001). **T1 şartına göre T4 ve T6 uyarımında görülen artış, T3 uyarımına göre T4 ve T6 uyarımında görülen artış istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05).**

Eski tanı T1DM'de; bulunan şarta göre CD4+CD25+ düzeylerinde görülen değişim istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,001). **T1 şartına göre T4, T5 ve T6 uyarımında görülen artış, T3 uyarımına göre T4, T5 ve T6 uyarımında görülen artış istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05).**

Kontrolde; bulunulan şarta göre CD4+CD25+ düzeylerinde görülen değişim istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,001$). **T1 şartına göre T4, T5 ve T6 uyarımında görülen artış istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$)** (Tablo 3-17).

Sonuç olarak CD4+CD25+ hücre düzeyi, Vitamin D ve progesterone etkileri ile tüm gruplar artmaktadır.

Tablo 3-18 : Uyarılara karşı TREG değişimlerinin değerlendirilmesi

TREG (%)	Diyabet Ort±SS	Yeni tanı	Eski tanı	Kontrol Ort±SS
		T1DM Ort±SS	T1DM Ort±SS	
Taze PKMH (T1)	63,51±7,12	63,94±4,17	63,22±8,69	66,18±4,82
CD3+CD28+ (T3)	65,25±4,69	65,46±4,82	65,11±4,77	68,4±3,02
CD3+CD28+VitD (T4)	72,34±3,97	71,53±4,3	72,88±3,79	72,54±6,06
CD3+CD28+Progesteron (T5)	71,09±13,81	72,46±14,26	70,17±13,92	70,8±12,62
CD3+CD28+VitD+Progesteron (T6)	76,34±6,64	74,91±7,72	77,3±5,91	78,98±5,63
P	<0,05	<0,05*	<0,05*	<0,05*
T1-T3	AD	AD	AD	AD
T1-T4	0,001*	AD	0,025*	AD
T1-T5	AD	AD	AD	AD
T1-T6	0,001*	0,040*	0,001*	0,001*
T3-T4	0,001*	AD	0,006*	AD
T3-T5	AD	AD	AD	AD
T3-T6	0,001*	AD	0,001*	0,001*
T4-T5	AD	AD	AD	AD
T4-T6	AD	AD	AD	AD
T5-T6	AD	AD	AD	AD

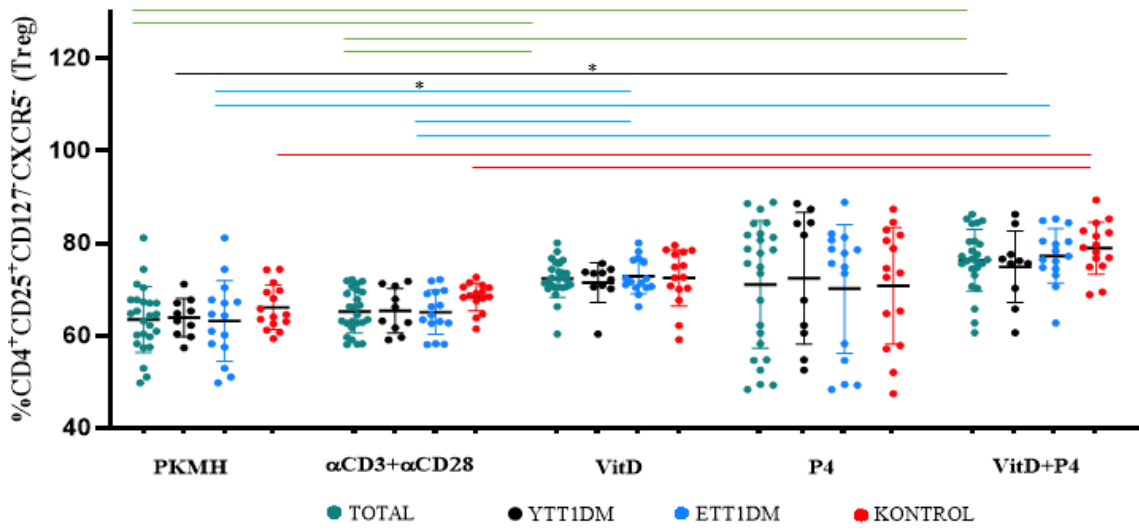
Tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi (post hoc Bonferroni test) * $p<0,05$ AD: Anlamlı değil

Diyabet grubunda bulunulan şarta göre TREG düzeylerinde görülen değişim istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,001$). **T1 şartına göre T4 ve T6 uyarımında görülen artış istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).** T3 uyarımına göre T4 ve T6 uyarımında görülen artış istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).

Yeni tanı T1DM’de; bulunulan şarta göre TREG düzeylerinde görülen değişim istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,041$). **T1 şartına göre T6 uyarımında görülen artışlar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).**

Eski tanı T1DM’de; bulunulan şarta göre TREG düzeylerinde görülen değişim istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,001$). **T1 şartına göre T4 ve T6 uyarımında görülen artışlar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).** T3 uyarımına göre T4 ve T6 uyarımında görülen artışlar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).

Kontrolde; bulunulan şarta göre TREG düzeylerinde görülen değişim anlamlıdır ($p=0,001$). **T1 şartına göre T6 uyarımında görülen artış, T3 uyarımına göre T6 uyarımında görülen artış istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$)** (Tablo 3-18) (Şekil 3-3).



Şekil 3-3: Uyarı yanıtları açısından regülatör T hücre değişimleri. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ olarak değerlendirildi, anlamlılık belirtilmeyen çubuklar * $p<0,01$ ’dir.

Tablo 3-19: Uyarınlara karşı CD4+CD25+CXCR5-CD127-FOXP3+ değişimlerinin değerlendirilmesi

CD4+CD25+CXCR5-CD127-FOXP3+ (%)	Diyabet Ort±SS	Yeni tanı	Eski tanı	Kontrol Ort±SS
		T1DM Ort±SS	T1DM Ort±SS	
Taze PKMH (T1)	63,07±1,54	62,83±1,18	63,23±1,76	64,58±1,14
CD3+CD28+ (T3)	64,76±6,64	64,47±6,34	64,96±7,04	65,25±7,7
CD3+CD28+VitD (T4)	70,42±2,89	70,03±3,11	70,67±2,81	69,18±3
CD3+CD28+Progesteron (T5)	69,08±11,53	70,96±8,38	67,83±13,37	68,99±13
CD3+CD28+VitD+Progesteron (T6)	76,3±4,89	75,42±5,19	76,89±4,76	80,11±4,7
P	<0,05	<0,05*	<0,05*	<0,05*
T1-T3	AD	AD	AD	AD

T1-T4	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*
T1-T5	AD	0,048*	AD	AD
T1-T6	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*
T3-T4	0,010*	AD	AD	AD
T3-T5	AD	AD	AD	AD
T3-T6	0,001*	0,018*	0,003*	0,001*
T4-T5	AD	AD	AD	AD
T4-T6	0,002*	AD	0,037*	0,001*
T5-T6	AD	AD	0,045*	0,041*

*Tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi (post hoc Bonferroni test) *p<0,05 AD: Anlamlı değil*

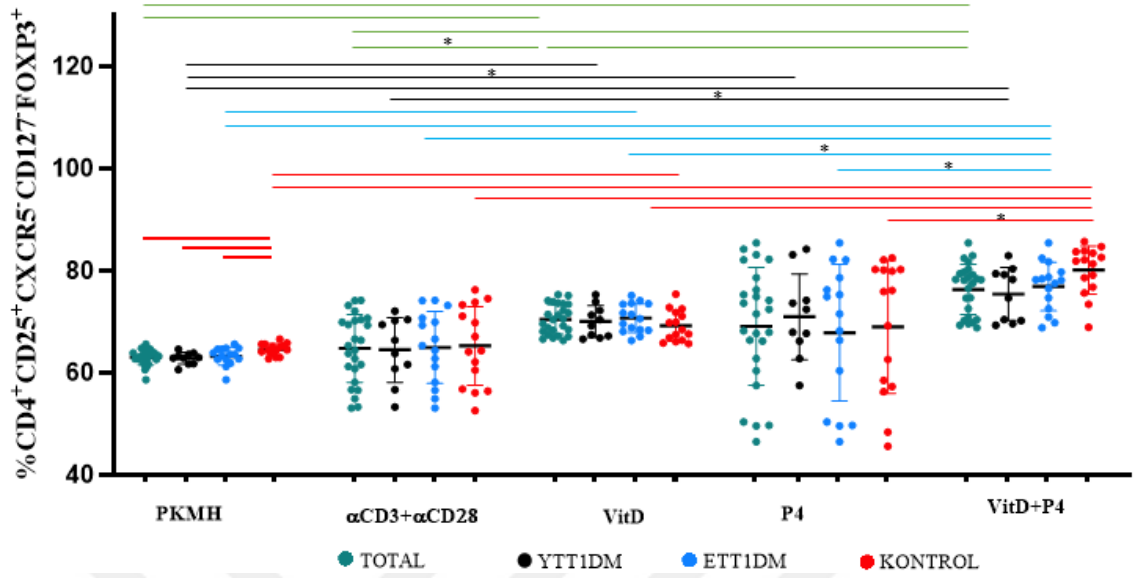
Diyabet grubunda bulunan şarta göre **CD4+CD25+CXCR5-CD127-FOXP3+** düzeylerinde görülen değişim istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,001). **T1 şartına göre T4 ve T6 uyarımında görülen artış istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05). T3 uyarımına göre T4 ve T6 uyarımında görülen artış istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05). T4 uyarımına göre T6 uyarımında görülen artış istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05).**

Yeni tanı T1DM'de; bulunan şarta göre **CD4+CD25+CXCR5-CD127-FOXP3+** düzeylerinde görülen değişim istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,001). **T1 şartına göre T4, T5 ve T6 uyarımında görülen artışlar istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05). T3 uyarımına göre T6 uyarımında görülen artış istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05).**

Eski tanı T1DM'de; bulunan şarta göre **CD4+CD25+CXCR5-CD127-FOXP3+** düzeylerinde görülen değişim istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,001). **T1 şartına göre T4 ve T6 uyarımında görülen artışlar istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05). T3, T4 ve T5 uyarımına göre T6 uyarımında görülen artış istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05).**

Kontrolde; bulunan şarta göre **CD4+CD25+CXCR5-CD127-FOXP3+** düzeylerinde görülen değişim istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,001). **T1 şartına göre T4 ve T6 uyarımında görülen artışlar istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05). T3, T4 ve T5 uyarımına göre T6 uyarımında görülen artış istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05) (Tablo 3-19) (Şekil 3-4).**

Sonuç olarak, **CD4+CD25+CXCR5-CD127-FOXP3+** hücre düzeyi, başlıca progesteronun etkisi ön planda olmak üzere vitamin D varlığında tüm gruplarda, özellikle total diyabet grubunda artmaktadır.



Şekil 3-4: Uyarı yanıtları açısından CD4⁺CD25⁺CXCR5⁻CD127⁻FOXP3⁺ hücre değişimleri. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ olarak değerlendirildi, anlamlılık belirtilmeyen çubuklar ** $p<0,01$ 'dir.

Tablo 3-20: Uyarılara karşı CD4⁺CD25⁺CXCR5⁻CD127⁻PD1⁺ değişimlerinin değerlendirilmesi

CD4 ⁺ CD25 ⁺ CXCR5 ⁻ CD127 ⁻ PD1 ⁺ (%)	Diyabet Ort±SS	Yeni	tanı	Eski	tanı
		T1DM Ort±SS	T1DM Ort±SS	T1DM Ort±SS	Kontrol Ort±SS
Taze PKMH (T1)	7,78±2,82	7,61±3,35	7,9±2,53	7,85±2,99	
CD3 ⁺ CD28 ⁺ (T3)	10,03±2,16	10,22±1,67	9,9±2,49	9,69±1,63	
CD3 ⁺ CD28 ⁺ VitD (T4)	12,42±2,36	12,63±2,62	12,28±2,25	11,58±1,84	
CD3 ⁺ CD28 ⁺ Progesteron (T5)	10,21±3,3	11,11±3,35	9,61±3,25	10,92±2,38	
CD3 ⁺ CD28 ⁺ VitD+Progesteron (T6)	14,32±6,92	13,77±6,04	14,69±7,64	16,47±8,03	
P	<0,05	>0,05	<0,05*	<0,05*	
T1-T3	0,038*	AD	AD	AD	
T1-T4	0,001*	AD	0,001*	0,022*	
T1-T5	0,043*	AD	AD	AD	
T1-T6	0,001*	AD	0,015*	0,018*	
T3-T4	0,003*	AD	0,035*	AD	
T3-T5	AD	AD	AD	AD	
T3-T6	AD	AD	0,045*	AD	
T4-T5	AD	AD	AD	AD	

T4-T6	AD	AD	AD	AD
T5-T6	AD	AD	AD	AD

Tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi (post hoc Bonferroni test), * $p<0,05$, AD: Anlamlı değil

Diyabet grubunda bulunulan şarta göre **CD4+CD25+CXCR5-CD127-PD1+** düzeylerinde görülen değişim istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,001$). **T1 şartına göre T3, T4, T5 ve T6 uyarımında görülen artış istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).**

Yeni tanı T1DM’de; bulunulan şarta göre **CD4+CD25+CXCR5-CD127-PD1+** düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemiştir ($p>0,05$).

Eski tanı T1DM’de; bulunulan şarta göre **CD4+CD25+CXCR5-CD127-PD1+** düzeylerinde görülen değişim istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,001$). **T1 şartına göre T4 ve T6 uyarımında görülen artışlar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).** **T3 uyarımına göre T4 ve T6 uyarımında görülen artışlar anlamlıdır ($p<0,05$).**

Kontrolde; bulunulan şarta göre **CD4+CD25+CXCR5-CD127-PD1+** düzeylerinde görülen değişim istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,001$). **T1 şartına göre T4 ve T6 uyarımında görülen artışlar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$)** (Tablo 3-20).

Sonuç olarak; **CD4+CD25+CXCR5-CD127-PD1+** hücre düzeyi, başlıca Vitamin D etkisi ile özellikle eski tanı T1DM grubunda artmaktadır.

Tablo 3-21: Uyarınlara karşı CD4+CD25+CXCR5-CD127-cCTLA4+ değişimlerinin değerlendirilmesi

CD4+CD25+CXCR5-CD127-cCTLA4+ (%)	Diyabet	Yeni tanı	Eski tanı	Kontrol
		T1DM	T1DM	
	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS
Taze PKMH (T1)	58,93±1,78	59,02±1,11	58,87±2,15	60,23±2,24
CD3+CD28+ (T3)	63,55±4,51	62,72±3,68	64,11±5,04	63,03±5,05
CD3+CD28+VitD (T4)	70,74±6,62	70,3±7,53	71,03±6,19	69,34±5,82
CD3+CD28+Progesteron (T5)	68,3±7,77	68,16±7,78	68,39±8,04	71,77±8,67
CD3+CD28+VitD+Progesteron (T6)	70,88±11,57	70,16±11,16	71,35±12,2	71,96±9,3
P	<0,05	>0,05	<0,05*	<0,05*
T1-T3	0,002*	AD	0,045*	AD
T1-T4	0,001*	AD	0,001*	0,001*
T1-T5	0,001*	AD	0,015*	0,001*
T1-T6	0,001*	AD	0,031*	0,005*

T3-T4	0,004*	AD	AD	AD
T3-T5	AD	AD	AD	AD
T3-T6	0,003*	AD	AD	AD
T4-T5	AD	AD	AD	AD
T4-T6	AD	AD	AD	AD
T5-T6	AD	AD	AD	AD

Tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi (post hoc Bonferroni test), * $p < 0,05$ AD: Anlamlı değil

Diyabet grubunda bulunan şarta göre **CD4+CD25+CXCR5-CD127-cCTLA4+** düzeylerinde görülen değişim istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,001$). **T1 şartına göre T3, T4, T5 ve T6 uyarımında görülen artış istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$).** T3 uyarımına göre T4 ve T6 uyarımında görülen artış istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$).

Yeni tanı T1DM’de; CD4+CD25+CXCR5-CD127-cCTLA4+ düzeylerinde görülen değişim istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$).

Eski tanı T1DM’de CD4+CD25+CXCR5-CD127-cCTLA4+ düzeylerinde **T1 şartına göre T3, T4, T5 ve T6 uyarımında görülen artışlar anlamlıdır ($p < 0,05$).**

Kontrolde; bulunan şarta göre **CD4+CD25+CXCR5-CD127-cCTLA4+** düzeylerinde görülen değişim anlamlıdır ($p=0,001$). **T1 şartına göre T4, T5 ve T6 uyarımında görülen artışlar anlamlıdır ($p < 0,05$)** (Tablo 3-21).

Sonuç olarak, yeni tanı T1DM grubu dışında taze numuneye göre tüm uyarılar ile belirgin artışlar elde edilmiştir.

Tablo 3-22: Uyarılara karşı TFH değişimlerinin değerlendirilmesi

TFH (%)	Diyabet	Yeni tanı T1DM	Eski tanı T1DM	Kontrol
	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS
Taze PKMH (T1)	6,14±1,61	6,1±1,74	6,17±1,58	4,18±1,43
CD3+CD28+ (T3)	8,09±2,25	7,82±1,09	8,27±2,8	5,82±1,35
CD3+CD28+VitD (T4)	6,28±1,17	5,96±1,23	6,5±1,12	5,13±1,9
CD3+CD28+Progesteron (T5)	5,8±1,5	6,03±1,62	5,65±1,46	6,19±1,45
CD3+CD28+VitD+Progesteron (T6)	5,68±1,92	5,75±1,72	5,63±2,1	6,16±1,77
P	<0,05	>0,05	<0,05*	<0,05*
T1-T3	0,026*	AD	AD	0,030*
T1-T4	AD	AD	AD	AD

T1-T5	AD	AD	AD	0,026*
T1-T6	AD	AD	AD	0,043*
T3-T4	0,023*	AD	AD	AD
T3-T5	0,001*	AD	0,034*	AD
T3-T6	0,001*	AD	0,040*	AD
T4-T5	AD	AD	AD	AD
T4-T6	AD	AD	AD	AD
T5-T6	AD	AD	AD	AD

*Tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi (post hoc Bonferroni test), *p<0,05 AD: Anlamlı değil*

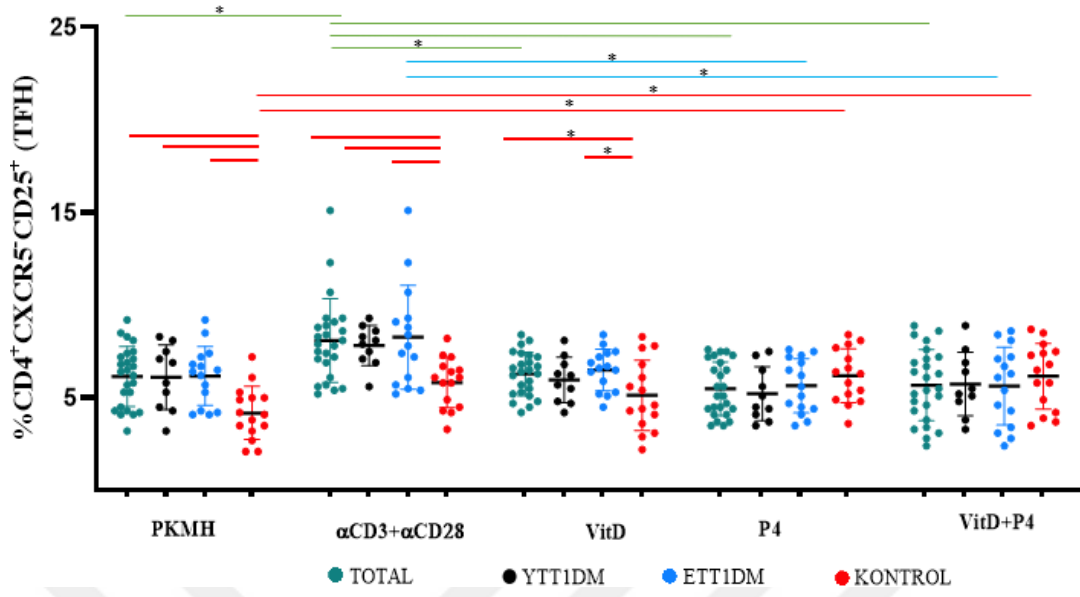
Diyabet grubunda bulunan şarta göre TFH düzeylerinde görülen değişim istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,002). **T1 şartına göre T3 uyarımında görülen artış istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05). T3 uyarımına göre T4, T5 ve T6 uyarımında görülen düşüş istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05).**

Yeni tanı T1DM’de; bulunan şarta göre TFH düzeylerinde görülen değişim istatistiksel olarak anlamlı değildir (p>0,05).

Eski tanı T1DM’de; bulunan şarta göre TFH düzeylerinde görülen değişim istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,046). **T3 uyarımına göre T5 ve T6 uyarımında görülen düşüşler istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05).**

Kontrolde; bulunan şarta göre TFH düzeylerinde görülen değişim istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,001). **T1 şartına göre T3, T5 ve T6 uyarımında görülen artışlar istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05) (Tablo 3-22) (Şekil 3-5).**

Sonuç olarak, TFH hücre düzeyi, başlıca progesteron etkisi ile diyabet grubunda, özellikle eski tanı T1DM grubunda azalmaktadır.



Şekil 3-5: Uyarı yanıtları açısından foliküler T hücre değişimleri. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ olarak değerlendirildi, anlamlılık belirtilmeyen çubuklar ** $p < 0,01$ 'dir.

Tablo 3-23: Uyarınlara karşı CD4+CD25-CXCR5+PD1+ değişimlerinin değerlendirilmesi

CD4+CD25-CXCR5+PD1+ (%)	Yeni tanı Eski tanı			
	Diyabet	T1DM	T1DM	Kontrol
	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS
Taze PKMH (T1)	5,03±0,2	4,98±0,21	5,06±0,19	4,95±0,16
CD3+CD28+ (T3)	4,84±0,35	4,85±0,32	4,83±0,38	4,73±0,29
CD3+CD28+VitD (T4)	4,02±1,77	3,83±1,89	4,14±1,74	4,77±2,21
CD3+CD28+Progesteron (T5)	3,73±2,81	3,63±2,14	3,79±3,25	4,61±2,95
CD3+CD28+VitD+Progesteron (T6)	3,8±2,16	3,95±2,26	3,7±2,17	4,48±1,92
P	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
T1-T3	AD	AD	AD	AD
T1-T4	AD	AD	AD	AD
T1-T5	AD	AD	AD	AD
T1-T6	AD	AD	AD	AD
T3-T4	AD	AD	AD	AD
T3-T5	AD	AD	AD	AD
T3-T6	AD	AD	AD	AD
T4-T5	AD	AD	AD	AD
T4-T6	AD	AD	AD	AD
T5-T6	AD	AD	AD	AD

Tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi (post hoc Bonferroni test)

AD: Anlamlı değil

Diyabet, Yeni tanı T1DM, eski tanı T1DM ve kontrolde; bulunulan şarta göre **CD4+CD25-CXCR5+PD1+** düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemiştir ($p>0,05$) (Tablo 3-23).

Tablo 3-24: Uyarılara karşı CD4+CD25-CXCR5+cCTLA4+ değişimlerinin değerlendirilmesi

CD4+CD25-CXCR5+cCTLA4+ (%)	Yeni tanı Eski tanı			
	Diyabet	T1DM	T1DM	Kontrol
	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS
Taze PKMH (T1)	2,27±0,16	2,25±0,21	2,29±0,12	2,27±0,11
CD3+CD28+ (T3)	2,35±0,26	2,26±0,29	2,41±0,23	2,23±0,23
CD3+CD28+VitD (T4)	1,31±1,02	1,43±0,97	1,23±1,07	1,63±0,79
CD3+CD28+Progesteron (T5)	2,12±1,25	1,95±1,49	2,24±1,11	2,94±1,72
CD3+CD28+VitD+Progesteron (T6)	2,11±1,26	2,37±1,43	1,94±1,15	2,21±1,13
P	<0,05	>0,05	>0,05	<0,05*
T1-T3	AD	AD	AD	AD
T1-T4	0,002*	AD	AD	AD
T1-T5	AD	AD	AD	AD
T1-T6	AD	AD	AD	AD
T3-T4	0,001*	AD	AD	AD
T3-T5	AD	AD	AD	AD
T3-T6	AD	AD	AD	AD
T4-T5	AD	AD	AD	0,042*
T4-T6	AD	AD	AD	AD
T5-T6	AD	AD	AD	AD

Tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi (post hoc Bonferroni test)

* $p<0,05$ AD: Anlamlı değil

Diyabet grubunda bulunulan şarta göre **CD4+CD25-CXCR5+cCTLA4+** düzeylerinde görülen değişim istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,004$). **T1 ve T3** uyarımına göre **T4** uyarımında görülen düşüş istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).

Yeni tanı T1DM ve eski tanı T1DM’de; bulunulan şarta göre **CD4+CD25-CXCR5+cCTLA4+** hücre düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemiştir ($p>0,05$).

Kontrolde; bulunulan şarta göre CD4+CD25-CXCR5+cCTLA4+ hücre düzeylerinde görülen değişim anlamlıdır ($p=0,005$). **T4 uyarımına göre T5 uyarımında görülen artış istatistiksel olarak anlamlıdır** ($p<0,05$) (Tablo 3-24).

Tablo 3-25: Uyarınlara karşı TFR değişimlerinin değerlendirilmesi

TFR (%)	Diyabet Ort±SS	Yeni tanı	Eski tanı	Kontrol Ort±SS
		T1DM Ort±SS	T1DM Ort±SS	
Taze PKMH (T1)	9,24±2,37	9,46±1,9	9,09±2,69	13,64±5,01
CD3+CD28+ (T3)	9,2±1,29	9,06±1,44	9,29±1,23	13,93±1,87
CD3+CD28+VitD (T4)	11,58±2,92	11,75±3,37	11,46±2,7	14,16±2,95
CD3+CD28+Progesteron (T5)	12,29±3,92	12,71±3,87	12,01±4,07	14,24±4,43
CD3+CD28+VitD+Progesteron (T6)	11,38±2,59	11,11±2,92	11,56±2,44	13,25±2,5
P	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05
T1-T3	AD	AD	AD	AD
T1-T4	AD	AD	AD	AD
T1-T5	AD	AD	AD	AD
T1-T6	AD	AD	AD	AD
T3-T4	0,017*	AD	AD	AD
T3-T5	0,045*	AD	AD	AD
T3-T6	0,028*	AD	AD	AD
T4-T5	AD	AD	AD	AD
T4-T6	AD	AD	AD	AD
T5-T6	AD	AD	AD	AD

Tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi (post hoc Bonferroni test)

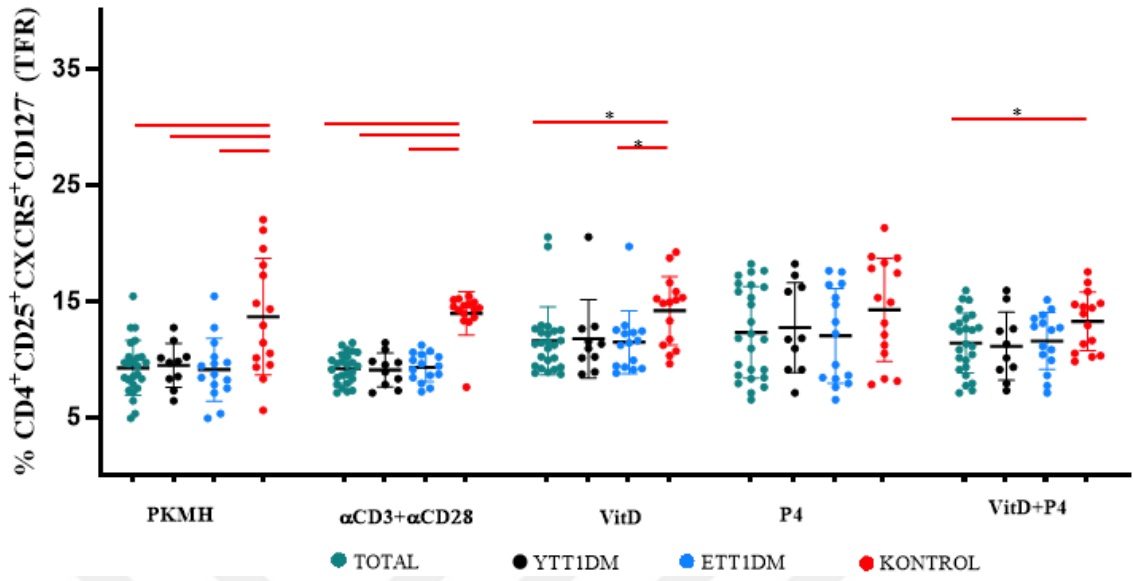
* $p<0,05$

AD: Anlamlı değil

Diyabet grubunda bulunulan şarta göre TFR düzeylerinde görülen değişim istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,001$). **T3 uyarımına göre T4, T5 ve T6 uyarımında görülen artış istatistiksel olarak anlamlıdır** ($p<0,05$).

Yeni tanı T1DM, eski tanı T1DM ve kontrolde; bulunulan şarta göre TFR düzeylerinde anlamlı bir değişim görülmemiştir ($p>0,05$) (Tablo 3-25) (Şekil 3-6).

Sonuç olarak TFR hücre düzeyi diyabet alt gruplarına yansımada tüm uyarınlara ile diyabet grubunda artmaktadır.



Şekil 3-6: Uyarı yanıtları açısından foliküler regülatör T hücre değişimleri. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ olarak değerlendirildi, anlamlılık belirtilmeyen çubuklar ** $p<0,01$ 'dir.

Tablo 3-26: Uyarınlara karşı CD4+CD25+CXCR5+CD127-cFOXP3+ değişimlerinin değerlendirilmesi

CD4+CD25+CXCR5+CD127-cFOXP3+ (%)	Yeni tanı Eski tanı			
	Diyabet		T1DM	
	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS
Taze PKMH (T1)	26,17±1,61	26,05±1,73	26,25±1,58	25,53±1,46
CD3+CD28+ (T3)	26,23±3,83	27,53±3,69	25,37±3,79	27,39±4,88
CD3+CD28+VitD (T4)	29,16±7,13	28,8±9,48	29,4±5,39	30,22±2,98
CD3+CD28+Progesteron (T5)	30,38±8,09	30,61±6,96	30,22±9	31,06±8,3
CD3+CD28+VitD+Progesteron (T6)	30,47±7,7	31,84±8,56	29,55±7,24	32,69±8,02
P	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
T1-T3	AD	AD	AD	AD
T1-T4	AD	AD	AD	AD
T1-T5	AD	AD	AD	AD
T1-T6	AD	AD	AD	AD
T3-T4	AD	AD	AD	AD
T3-T5	AD	AD	AD	AD
T3-T6	AD	AD	AD	AD
T4-T5	AD	AD	AD	AD
T4-T6	AD	AD	AD	AD

T5-T6	AD	AD	AD	AD
-------	----	----	----	----

Tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi (post hoc Bonferroni test) AD: Anlamlı değil

Diyabet grubunda bulunan şarta göre CD4+CD25+CXCR5+CD127-cFOXP3+ düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemiştir (p=0,170).

Yeni tanı T1DM, eski tanı T1DM ve kontrolde; CD4+CD25+CXCR5+CD127-cFOXP3+ ekspresyonu düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemiştir (p>0,05) (Tablo 3-26).

Tablo 3-27: Uyarılara karşı CD4+CD25+CXCR5+CD127-cCTLA4+ değişimlerinin değerlendirilmesi

CD4+CD25+CXCR5+CD127-cCTLA4+ (%)	Diyabet	Yeni tanı	Eski tanı	Kontrol
		T1DM	T1DM	
	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS
Taze PKMH (T1)	15,56±1,58	15,11±1,38	15,86±1,68	15,89±1,75
CD3+CD28+ (T3)	19,36±3	18,5±3,76	19,94±2,33	20,4±2,86
CD3+CD28+VitD (T4)	25,54±8,39	23,45±7,52	26,94±8,89	25,61±7,68
CD3+CD28+Progesteron (T5)	26,71±6,46	26,17±6,97	27,07±6,33	26,47±6,55
CD3+CD28+VitD+Progesteron (T6)	24,51±9,06	23,18±9,92	25,39±8,69	24,07±10,73
P	<0,05	<0,05*	<0,05*	<0,05*
T1-T3	0,001*	AD	0,005*	0,001*
T1-T4	0,001*	AD	0,005*	0,008*
T1-T5	0,001*	0,015*	0,001*	0,001*
T1-T6	0,001*	AD	0,009*	0,005*
T3-T4	0,014*	AD	AD	AD
T3-T5	0,001*	0,044*	0,009*	0,023*
T3-T6	0,046*	AD	AD	AD
T4-T5	AD	AD	AD	AD
T4-T6	AD	AD	AD	AD
T5-T6	AD	AD	AD	AD

Tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi (post hoc Bonferroni test) *p<0,05 AD: Anlamlı değil

Diyabet grubunda bulunan şarta göre **CD4+CD25+CXCR5+CD127-cCTLA4+** hücre düzeylerinde görülen değişim istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,001). **T1 şartına göre T3, T4, T5 ve T6 uyarımında görülen artış istatistiksel olarak**

anlamlıdır ($p<0,05$). T3 uyarımına göre T4, T5 ve T6 uyarımında görülen artış istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).

Yeni tanı T1DM'de; bulunulan şarta göre CD4+CD25+CXCR5+CD127-cCTLA4+ düzeylerinde görülen değişim istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,036$). T1 ve T3 uyarımına göre T5 uyarımında görülen artış anlamlıdır ($p<0,05$).

Eski tanı T1DM'de; bulunulan şarta göre CD4+CD25+CXCR5+CD127-cCTLA4+ düzeylerinde görülen değişim istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,001$). T1 şartına göre T3, T4, T5 ve T6 uyarımında görülen artışlar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). T3 uyarımına göre T5 uyarımında görülen artış istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).

Kontrolde; bulunulan şarta göre CD4+CD25+CXCR5+CD127-cCTLA4+ düzeylerinde görülen değişim istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,001$). T1 şartına göre T3, T4, T5 ve T6 uyarımında görülen artışlar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). T3 uyarımına göre T5 uyarımında görülen artış istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$) (Tablo 3-27).

Sonuç olarak CD4+CD25+CXCR5+CD127-cCTLA4+ hücre düzeyi diyabet alt gruplarına yansımada tüm uyaranlar ile diyabet grubunda artmaktadır. Taze numuneye göre artışlar yeni tanı dışında tüm gruplarda görülmektedir.

Tablo 3-28: Uyaranlara karşı CD4+CD25+CXCR5+CD127-PD1+ değişimlerinin değerlendirilmesi

CD4+CD25+CXCR5+CD127-PD1+ (%)	Diyabet Ort±SS	Yeni tanı	Eski tanı	Kontrol Ort±SS
		T1DM Ort±SS	T1DM Ort±SS	
Taze PKMH (T1)	17,04±1,65	17,48±1,72	16,75±1,59	17,5±1,59
CD3+CD28+ (T3)	19,09±3,01	18,28±3,74	19,63±2,4	19,29±2,3
CD3+CD28+VitD (T4)	22,61±7,69	21,69±8,34	23,22±7,47	23,77±10,8
CD3+CD28+Progesteron (T5)	23,93±10,76	22,99±11,56	24,56±10,56	25,89±11,12
CD3+CD28+VitD+Progesteron (T6)	24,16±8,81	23,23±8,73	24,79±9,11	25,67±9,6
P	<0,05	>0,05	<0,05*	>0,05
T1-T3	AD	AD	AD	AD
T1-T4	0,023*	AD	AD	AD
T1-T5	0,026*	AD	AD	AD

T1-T6	0,007*	AD	0,040*	AD
T3-T4	AD	AD	AD	AD
T3-T5	AD	AD	AD	AD
T3-T6	AD	AD	AD	AD
T4-T5	AD	AD	AD	AD
T4-T6	AD	AD	AD	AD
T5-T6	AD	AD	AD	AD

Tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi (post hoc Bonferroni test) * $p < 0,05$ AD: Anlamlı değil

Diyabet grubunda bulunan şarta göre CD4+CD25+CXCR5+CD127-PD1+ düzeylerinde görülen değişim istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,001$). **T1 şartına göre T4, T5 ve T6 uyarımında görülen artış istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$).**

Yeni tanı T1DM ve kontrolde; bulunan şarta göre CD4+CD25+CXCR5+CD127-PD1+ düzeyleri açısından belirgin bir anlamlılık taşımamaktadır ($p > 0,05$).

Eski tanı T1DM’de; bulunan şarta göre CD4+CD25+CXCR5+CD127-PD1+ düzeyleri açısından belirgin fark bulunmaktadır ($p=0,01$). **T1 şartına göre T6 uyarımında görülen artışlar belirgin fark içermektedir ($p < 0,05$)** (Tablo 3-28).

Tablo 3-29: Uyarılara karşı IL-10 değişimlerinin değerlendirilmesi

	Diyabet	Yeni tanı T1DM	Eski tanı T1DM	Kontrol
IL-10 pg/ml	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)
CD3+CD28+ (T3)	16,81±10,0 (15,7)	15,29±10,08 (14,5)	17,83±10,22 (15,8)	19,63±10,21 (16,8)
CD3+CD28+VitD (T4)	21,77±12,2 (21,4)	20,02±5,94 (19,6)	22,93±15,16 (21,9)	21,75±11,21 (17,9)
CD3+CD28+ Progesteron (T5)	21,38±12,4 (20,6)	20,38±6,48 (22,7)	22,05±15,45 (20,6)	21,2±8,23 (19,5)
CD3+CD28+ VitD+Progesteron (T6)	28,56±11,8 (26,5)	27,58±7,05 (29,5)	29,21±14,41 (25,7)	28,13±12,02 (25,6)
P	<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*
T3-T4	0,041*	AD	AD	AD
T3-T5	0,037*	AD	AD	AD
T3-T6	0,001*	0,017*	0,015*	0,048*

T4-T5	AD	AD	AD	AD
T4-T6	0,001*	0,022*	0,003*	0,031*
T5-T6	0,001*	0,009*	0,001*	0,005*
<i>Friedman test (post hoc Wilcoxon sign test)</i>		<i>*p<0,05</i>	<i>AD: Anlamlı değil</i>	

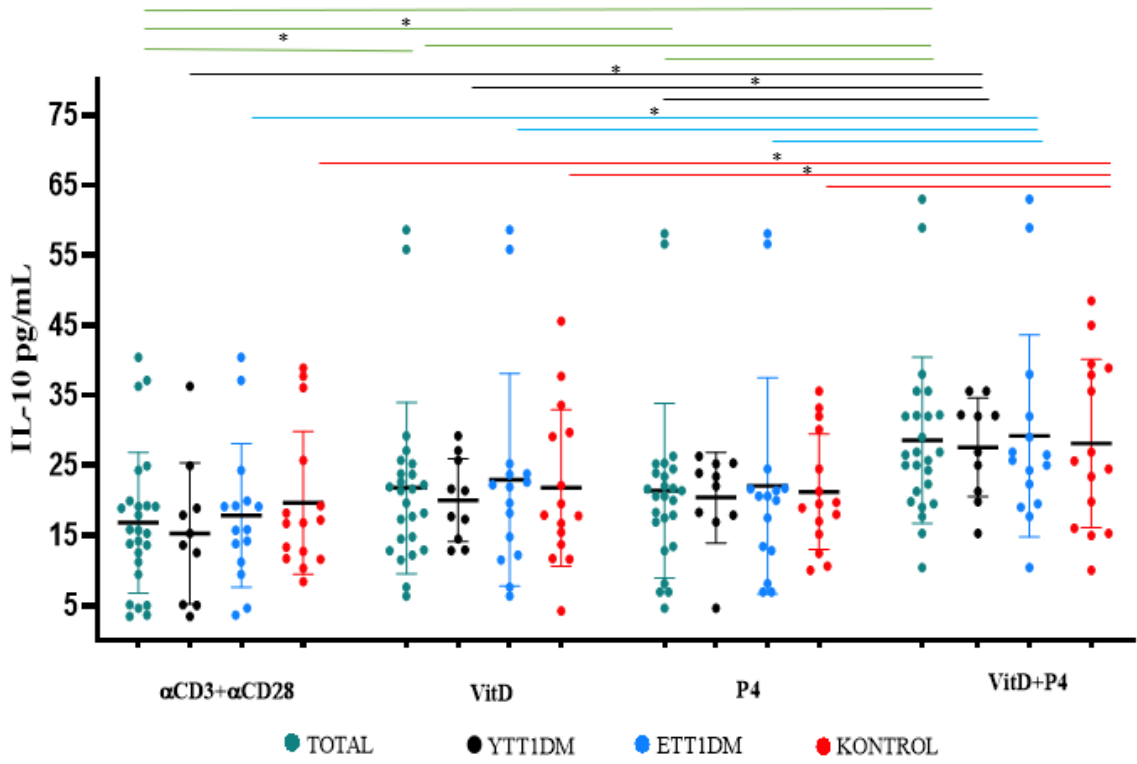
Diyabet grubunda bulunulan şarta göre IL-10 düzeylerinde görülen değişim istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,001$). **T3 uyarımına göre T4, T5 ve T6 uyarımında görülen artışlar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).** T4 ve T5 uyarımına göre T6 uyarımında görülen artışlar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).

Yeni tanı T1DM’de; bulunulan şarta göre IL-10 seviyeleri anlamlı fark içermektedir ($p=0,001$). **T3, T4 ve T5 uyarılarına göre T6 uyarımında görülen artışlar anlamlılık içermektedir ($p<0,05$).** Diğer uyarılarda anlamlılık içeren bir fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$).

Eski tanı T1DM’de; bulunulan şarta göre IL-10 seviyelerinde anlamlılık içeren fark tespit edilmiştir ($p=0,001$). **T3, T4 ve T5 uyarılarına göre T6 uyarımında görülen artışlar dikkate değer anlamlılık içermektedir ($p<0,05$).** Diğer uyarılarda anlamlılık içeren bir fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$).

Kontrolde; bulunulan şarta göre IL-10 düzeylerinde görülen değişim istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,007$). **T3, T4 ve T5 uyarılarına göre T6 uyarımında görülen artışlar dikkate değer anlamlılık içermektedir ($p<0,05$).** Diğer uyarılarda anlamlılık içeren bir fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$) (Tablo 3-29) (Şekil 3-7).

Sonuç olarak, total diyabet grubunda tüm uyarıların IL-10 düzeyini arttırdığı, diğer gruplarda vitamin D ve progesteronun birlikte daha etkin olduğu görülmektedir.



Şekil 3-7: Uyarı yanıtları açısından interlökin-10 düzeyi değişimleri. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ olarak değerlendirildi, anlamlılık belirtilmeyen çubuklar ** $p<0,01$ 'dir.

Tablo 3-30: Uyarılara karşı IFN- γ değişimlerinin değerlendirilmesi

	Diyabet	Yeni tanı T1DM	Eski tanı T1DM	Kontrol
	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS
IFN- γ pg/ml	(medyan)	(medyan)	(medyan)	(medyan)
CD3+CD28+ (T3)	218,24±105,2 (207,9)	204,25±77,71 (192,8)	227,57±121,98 (240,3)	60,58±20,49 (56,9)
CD3+CD28+VitD (T4)	181,11±73,5 (191,5)	185,56±83,16 (194,5)	178,14±69,21 (191,5)	77,49±36,15 (72,7)
CD3+CD28+ Progesteron (T5)	185,41±88,8 (173,6)	190,16±85,91 (190,8)	182,24±93,52 (173,6)	79,14±29,56 (73,5)
CD3+CD28+VitD+Progesteron (T6)	172,54±90,2 (159,8)	181,7±108,69 (196,6)	166,44±79,15 (144,2)	75,04±29,38 (60,4)
p	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
T3-T4	AD	AD	AD	AD
T3-T5	AD	AD	AD	AD

T3-T6	AD	AD	AD	AD
T4-T5	AD	AD	AD	AD
T4-T6	AD	AD	AD	AD
T5-T6	AD	AD	AD	AD
<i>Friedman test (post hoc Wilcoxon sign test)</i>		<i>*p<0,05</i>	<i>AD: Anlamlı değil</i>	

Total diyabet, yeni tanı T1DM, eski tanı T1DM ve kontrolde; bulunulan şarta göre IFN- γ düzeylerinde fark saptanmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 3-30).

Tablo 3-31: Uyarılara karşı IL-17 değişimlerinin değerlendirilmesi

	Diyabet	Yeni tanı T1DM	Eski tanı T1DM	Kontrol
IL-17 pg/ml	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)
CD3+CD28+ (T3)	91,38±70,4 (56,2)	90,61±80,1 (48,2)	91,89±66,2 (56,2)	82,44±45,64 (82,1)
CD3+CD28+VitD (T4)	92,09±54,2 (85,3)	90,38±59,98 (74)	93,23±52,15 (85,3)	87,39±60,82 (77,5)
CD3+CD28+ Progesteron (T5)	93,31±43,3 (88,4)	95,16±37,19 (87,9)	92,08±48,28 (90,9)	94,53±51,47 (87,3)
CD3+CD28+ VitD+Progesteron (T6)	95,22±54,3 (76,1)	97,19±54,39 (84,5)	93,91±56,1 (73,7)	88,13±51,48 (80,4)
p	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
T3-T4	AD	AD	AD	AD
T3-T5	AD	AD	AD	AD
T3-T6	AD	AD	AD	AD
T4-T5	AD	AD	AD	AD
T4-T6	AD	AD	AD	AD
T5-T6	AD	AD	AD	AD

Friedman test (post hoc Wilcoxon sign test)

AD: Anlamlı değil

Total diyabet, yeni tanı T1DM, eski tanı T1DM ve kontrolde; bulunulan şarta göre IL-17 düzeylerinde anlamlılık içeren fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$) (Tablo 3-31).

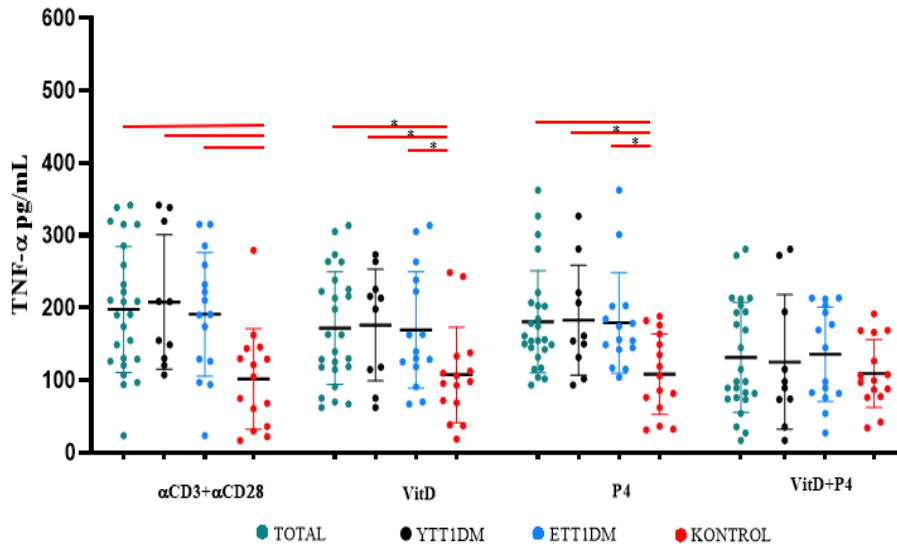
Tablo 3-32: Uyarılara karşı TNF- α değişimlerinin değerlendirilmesi

	Diyabet	Yeni tanı T1DM	Eski tanı T1DM	Kontrol
TNF- α pg/ml	Ort $\pm$ SS (medyan)	Ort $\pm$ SS (medyan)	Ort $\pm$ SS (medyan)	Ort $\pm$ SS (medyan)
CD3+CD28+ (T3)	197,93 $\pm$ 86,8 (191,1)	208,09 $\pm$ 92,74 (181,9)	191,15 $\pm$ 85,36 (191,1)	101,9 $\pm$ 69,42 (104)
CD3+CD28+VitD (T4)	172,2 $\pm$ 77,5 (162,9)	176,28 $\pm$ 76,95 (205,9)	169,49 $\pm$ 80,51 (139,7)	107,81 $\pm$ 65,85 (98)
CD3+CD28+ Progesteron (T5)	180,92 $\pm$ 70,6 (156,3)	183,04 $\pm$ 75,89 (158,1)	179,5 $\pm$ 69,55 (156,3)	108,65 $\pm$ 55,53 (106)
CD3+CD28+ VitD+Progesteron (T6)	131,71 $\pm$ 75,9 (98,5)	125,25 $\pm$ 93 (93,9)	136,02 $\pm$ 65,42 (145,3)	109,4 $\pm$ 46,87 (99)
p	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
T3-T4	AD	AD	AD	AD
T3-T5	AD	AD	AD	AD
T3-T6	AD	AD	AD	AD
T4-T5	AD	AD	AD	AD
T4-T6	AD	AD	AD	AD
T5-T6	AD	AD	AD	AD

Friedman test (post hoc Wilcoxon sign test)

AD: Anlamlı değil

Total diyabet, yeni tanı T1DM, eski tanı T1DM ve kontrolde; bulunulan şarta göre TNF- α düzeylerinde anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($p>0,05$) (Tablo 3-32) (Şekil 3-8).



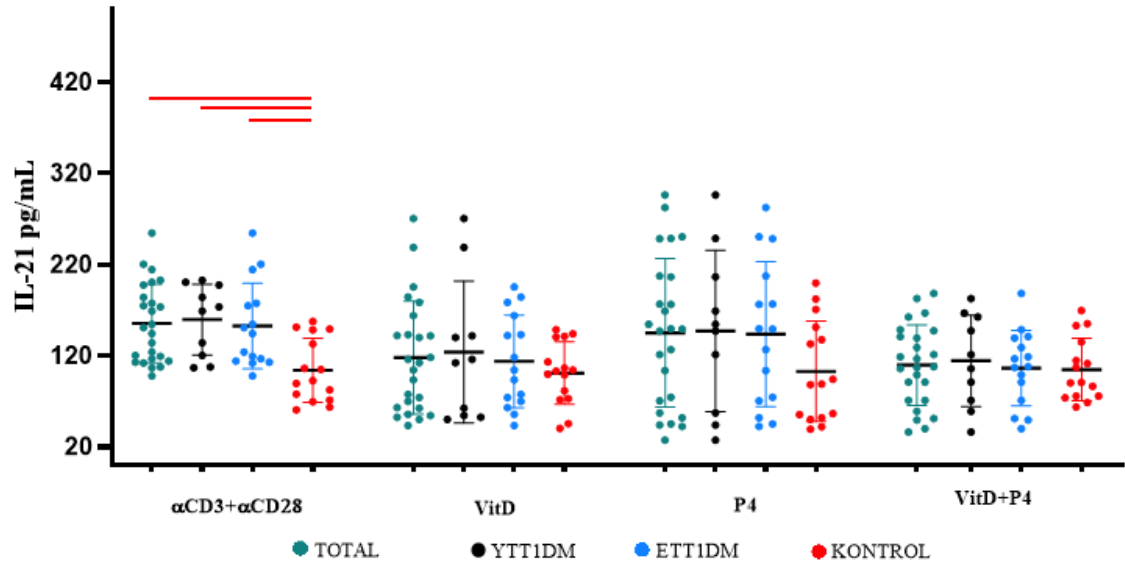
Şekil 3-8: Uyarı yanıtları açısından tümör nekroz faktör-alfa düzeyi değişimleri. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ olarak değerlendirildi, anlamlılık belirtilmeyen çubuklar ** $p<0,01$ 'dir.

Tablo 3-33: Uyarılara karşı IL-21 değişimlerinin değerlendirilmesi

	Diyabet	Yeni tanı T1DM	Eski tanı T1DM	Kontrol
IL-21 pg/ml	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)
CD3+CD28+ (T3)	155,45±43,1 (150,9)	159,74±38,75 (171,2)	152,59±46,97 (144,3)	103,99±35,03 (92,7)
CD3+CD28+VitD (T4)	117,93±61,6 (112,5)	123,99±77,85 (114,4)	113,89±50,83 (104,4)	100,9±34,14 (103,1)
CD3+CD28+ Progesteron (T5)	145,14±81,2 (149,4)	147,23±88,38 (150,8)	143,75±79,32 (149,4)	102,87±55,15 (89,1)
CD3+CD28+VitD+Progesteron (T6)	109,79±44,0 (108,1)	114,46±50,02 (113,6)	106,68±41,19 (108,1)	104,8±34,29 (90,8)
p	⁺ >0,05	>0,05	>0,05	>0,05
T3-T4	AD	AD	AD	AD
T3-T5	AD	AD	AD	AD
T3-T6	AD	AD	AD	AD
T4-T5	AD	AD	AD	AD
T4-T6	AD	AD	AD	AD
T5-T6	AD	AD	AD	AD

Friedman test (post hoc Wilcoxon sign test) *Tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi (post hoc Bonferroni test) * $p < 0,05$ AD: Anlamlı değil

Yeni tanı T1DM, eski tanı T1DM ve kontrolde; bulunulan şarta göre IL-21 düzeylerinde anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p > 0,05$) (Tablo 3-33) (Şekil 3-9).



Şekil 3-9: Uyarı yanıtları açısından interlökin-21 düzeyi değişimleri. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ olarak değerlendirildi, anlamlılık belirtilmeyen çubuklar ** $p < 0,01$ 'dir.

Tablo 3-34: Uyarınlara karşı TGF- β değişimlerinin değerlendirilmesi

		Yeni tanı	Eski tanı	
	Diyabet	T1DM	T1DM	Kontrol
TGF- β pg/ml	Ort $\pm$ SS (medyan)	Ort $\pm$ SS (medyan)	Ort $\pm$ SS (medyan)	Ort $\pm$ SS (medyan)
CD3+CD28+ (T3)	100,97 $\pm$ 55, 2 (84,3)	103,99 $\pm$ 56,4 (88,8)	98,96 $\pm$ 56,4 (84)	105,25 $\pm$ 80,91 (96)
CD3+CD28+ VitD (T4)	128,31 $\pm$ 66, 2 (126,8)	124,68 $\pm$ 62,44 (134,6)	130,73 $\pm$ 70,67 (120)	104,4 $\pm$ 69 (95)
CD3+CD28+ Progesteron (T5)	131,34 $\pm$ 86, 5 (113,8)	120,46 $\pm$ 80,42 (97)	138,6 $\pm$ 92,38 (120)	108,21 $\pm$ 79,17 (90)
CD3+CD28+ VitD+Progesteron (T6)	166,74 $\pm$ 86, 4 (172,5)	166,59 $\pm$ 89,08 (171,6)	166,84 $\pm$ 87,84 (172)	100,44 $\pm$ 50,72 (107)
p	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

T3-T4	AD	AD	AD	AD
T3-T5	AD	AD	AD	AD
T3-T6	AD	AD	AD	AD
T4-T5	AD	AD	AD	AD
T4-T6	AD	AD	AD	AD
T5-T6	AD	AD	AD	AD

Friedman test (post hoc Wilcoxon sign test) AD: Anlamlı değil

Diyabet, yeni tanı T1DM, eski tanı T1DM ve kontrol gruplarında uyaranlara karşı TGF- β düzeylerinde anlamlılık içeren bir değişim saptanmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 3-34).

Tablo 3-35: Uyaranlara karşı IL-4 değişimlerinin değerlendirilmesi

	Diyabet	Yeni tanı T1DM	Eski tanı T1DM	Kontrol
	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS
IL-4 pg/ml	(medyan)	(medyan)	(medyan)	(medyan)
CD3+CD28+ (T3)	80,58±34,9 (85,1)	81,28±42,76 (98,6)	80,11±30,25 (81,2)	78,97±41,55 (72,9)
CD3+CD28+VitD (T4)	94,42±45,6 (82,3)	92,62±42,61 (84,2)	95,63±48,96 (82,3)	83,54±39,77 (81,2)
CD3+CD28+ Progesteron (T5)	97,04±66,1 (75,2)	94,51±67,68 (70)	98,73±67,45 (84,5)	91,18±43,67 (88,8)
CD3+CD28+ VitD+Progesteron (T6)	96,73±47,7 (99,3)	95,26±50,54 (96,4)	97,71±47,63 (101,1)	85,27±48,97 (77,3)
p	*>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
T3-T4	AD	AD	AD	AD
T3-T5	AD	AD	AD	AD
T3-T6	AD	AD	AD	AD
T4-T5	AD	AD	AD	AD
T4-T6	AD	AD	AD	AD
T5-T6	AD	AD	AD	AD

*Friedman test (post hoc Wilcoxon sign test, *Tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi (post hoc Bonferroni test), AD: Anlamlı değil*

Diyabet, yeni tanı T1DM, eski tanı T1DM ve kontrol gruplarında uyaranlara karşı IL-4 seviyelerinde anlamlılık içeren bir değişim saptanmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 3-35).

4. TARTIŞMA

Diyabet hastalığı; gelişimi, etkileri ve komplikasyonları açısından multifaktöriyel bir hastalıktır. Patogenezini anlamak ve tedavi seçenekleri sunmak amacıyla birçok çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmada, B, T hücre ve alt grupları, özellikle TREG, TFH ve TFR hücre gruplarının, diyabet patogenezi ve otoimmün mekanizmalardaki rollerini belirleyerek, uzun vadede kişiye özel hücre tedavisi geliştirmeyi destekleyici bilgiler edinmek, hücre-hücre etkileşimlerinin farklı uyaranlara verdiği yanıtlarla, klinik çalışmalara, tedaviye ve literatüre katkı sağlamak planlanmıştır.

Diyabet patogenezinde otoreaktif T hücrelerinin rolü büyüktür. Otoreaktif CD8+ T hücrelerinin sağlıklı bireylerdeki pankreas lökosit popülasyonunun bir parçası olmasının yanı sıra T1DM'li kişilerde çok sayıda olduğu bilinmektedir. Otoreaktif CD8+ T hücrelerinin T1DM'li hastaların kanına kıyasla pankreasta mevcut olduğunu gösteren çalışmalar vardır (103, 104).

Vitamin D reseptörünün immün sistem hücrelerinde eksprese olması, CD8+ T hücrelerini de Vitamin D'nin etki edebileceği hedef hücre haline getirmektedir. Bazı çalışmalarda, in vitro 1,25D uygulamasının CD8+ T hücre çoğalmasını baskıladığı, VDR nakavt CD8+ T hücrelerinin hedef bulma düzenlerinin değiştiği, granzim B üretiminde azalma olduğu gösterilmiştir (105, 106, 107). Bizim çalışmamızda VitD uyarımı ile eski tanı ve Yeni tanı diyabetlilerin CD8+ T hücre sayısında kontrole göre azalma tespit edilmiştir. Diyabetlilerdeki bu azalma otoreaktif T hücrelerinin VitD ile baskılanmış olabileceğini göstermektedir. Vitamin D'nin diyabet patogenezinde otoimmüniteyi baskılama yollarının birinin de CD8+ T hücreleri baskılamaktan geçtiğini göstermektedir.

Yüksek TFH oranlarının diyabette otoantikor üretimi ile ilişkili olduğunu gösteren bunun yanı sıra TFR hücrelerinin otoantikor üretimini baskıladığını ortaya koyan birçok çalışma mevcuttur (14,15,35,108,109).

Bu çalışmada, taze kandan yapılan kültür öncesi ölçümlerde, total diyabet grubundaki anlamlılık, alt gruplara da eşit şekilde yansımıştır. Yeni tanı T1DM ve eski tanı T1DM'li hastaların CD4+CD25+ hücre, TFR hücre ve TREG'lerdeki cFOXP3 ekspresyon düzeyleri, kontrol grubundan anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. TFH oranı ise yüksek bulunmuştur. VitD+Progesteron uyarımı ile TREG'lerde Foxp3 ekspresyonu istatistiksel olarak hala düşüktür ama sayısal olarak dikkate değer bir artış mevcuttur.

Sjögren hastalarında yapılan bir çalışmada sirküle TFR hücrelerin arttığı fakat baskılayıcı potansiyelini yitirdiği gösterilmiştir (110). Germinal merkez (GM) ve dolaşımdaki TFR hücrelerini inceleyen bir başka çalışmada ise birbirlerinden bağımsız olarak artış gösterdikleri, sirküle TFR hücrelerin prekürsör Foxp3+ TREG'lerden köken alabildiği ve dokudaki durumu yansıtmadığı gösterilmiştir (111). Yeni tanı T1DM'li çocukların kanından yapılan çalışmada TFR hücrelerin arttığı gösterilmiştir (112). Çalışmamızda TREG'lerdeki cFOXP3 ekspresyon düzeyleri ile birlikte sirküle TFR hücrelerin azaldığı tespit edilmiştir, diyabetli bireylerde de dolaşımdaki TFR nin prekürsör TREG'den köken almış olduğu düşünülürse, pankreatik lenf nodu ile karşılaştırmalı çalışma bu veriyi desteklemek için gerekli görülse de, canlı pankreas dokusuna erişim oldukça zordur.

Germinal merkezde yüksek afiniteli sınıf dönüşümü yapmış adacık-spesifik otoantikor gelişiminin TFH ve TFR hücrelerinin kontrolü altında olabileceği gösterilmiştir (14, 113, 114). T1DM'li hastaların hastalık-ilişkili dokularındaki TFR hücre değişiklikleri, defektif humoral tolerans ve hastalık patogenezinde rol aldıklarını göstermektedir. Sekonder lenfoid organdaki TFR azalması, TFH-B etkileşimi düzenlemesinde azalmaya bağlı olarak adacık spesifik otoantikor üretimine katkıda bulunmaktadır. Aktif TFH hücrelerinin arttığı gösterilen çalışmalardan birinde, GM'lerin azaldığı ve germinal merkezden geçerek perifere geçtikleri gösterilmiştir (115).

Steroid hormonlarının her birinin, bir veya daha fazla ligand spesifik reseptörün aracılık ettiği kendine özgü biyolojik fonksiyonları vardır, ancak bir hücre tipi üzerinde kombine etkiler için aynı anda birlikte çalışabilirler. Ayrıca bir steroid hormon, zaman içinde sıralı düzenleme için başka bir hormonun işlevini geliştirebilir. Steroid hormonların bireysel eylemleri önemlidir, ancak işbirlikçi ve sıralı eylemleri olmadan, bir takım biyolojik süreçlerin son derece karmaşık düzenlemelerini başarmaları zordur. Menstrüal döngü, meme bezi gelişimi ve gebeliğin sürdürülmesinde, östrojen tarafından progesteron reseptör ekspresyonunun indüklenmesi gibi, progesteron tarafından VDR indüksiyonu immün düzenlemede büyük önem taşır (116, 117).

Çalışmamızda, IFN- γ , TNF- α , IL-21 eski Tanı ve Yeni Tanı diyabetlilerde yüksek bulunmuştur. Yalnız Progesteron uyarımı ve ayrıca yalnız Vitamin D uyarımında IL-21 düzeyleri normale dönmüştür. Her iki uyarımın olduğu şartta da IL-21 düzeyindeki azalma korunmaktadır. Başlıca IL-21 üretim kaynağı olan TFH hücrelerinin de

Progesteron ve çiftte uyarım olan şartlarda normal düzeylere indiği görülmektedir. Bu etkinin, ağırlıklı olarak progesteron üzerinden sağlanarak, TFH hücrelerinin baskılanmasıyla oluştuğunu düşündürmektedir.

Diyabetli grupta çiftte uyarım olan şartta TNF- α 'nın azaldığı, TGF- β 'nın arttığı tespit edilmiştir. Otoantikor oluşumu ve beta hücre yıkımında görev alan sitokinlerden olan TNF- α 'nın azalması, salgılandığı T hücrenin (TH1 gibi) baskılandığını ve TGF- β artışının muhtemel salındığı TREG ve TFR hücrelerinin bu uyarımlarla indüklendiğini düşündürmektedir (118, 119). İmmün ve pankreatik hücrelerden salınan, IL-6, TNF- α , IFN- α , IL-17 ve IL-21 T1DM gelişim fazlarında ve progresyonunda rol alan sitokinlerdendir. Th1, Th17, CD8+ T hücre ve NK gibi diabetojenik immün hücrelerin aktivasyonu ve proliferasyonu ile inflamasyonun artmasında rol alırlar (120). IL-21, T1DM progresyonunu sağlayan, başlıca etkili bir sitokindir. IL-21 baskılanması ile hastalığın önlendiğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Yeni tanı T1DM'li yetişkinlerde IL-21 blokajı ile beta hücre rezervinin korunmasını içeren faz 2 çalışmasında (NCT02443155) IL-21 üreten TFH hücrelerinin biyobelirteç olarak kullanarak, IL-21 blokajı ile diyabet gelişiminin kontrol edilebileceği yönünde bulgular mevcuttur (121). Yeni başlangıçlı T1D'li hastalarda TNF- α nötralizasyonu yapılan bir çalışmada da, azalmış HbA1C düzeyleri ve artmış endojen insülin düzeylerini göstererek beta hücre fonksiyonunun korunduğu ortaya konmuştur (122). IFN- γ 'nın, lokal pankreatik hücrelerde MHC-I ve MHC-II'nin anormal ekspresyonunu indüklediğini; bu sayede inflamatuvar süreci başlatarak, β hücrelerini öldürebileceği öne sürülmüştür (123, 124). TGF- β sinyali, timustaki doğal TREG'lerin gelişimi için kritik öneme sahiptir ve ayrıca FOXP3 ekspresyonunu ve periferik TREG'lerin farklılaşmasını indüklemektedir. Adacıklarda TGF- β 'nın transgenik ekspresyonunun, diyabet gelişimini önemli ölçüde inhibe ettiği ve buna TREG'lerin çoğalması, antijen sunan hücre fonksiyonunun inhibisyonu ve adacık antijenine spesifik T hücre yanıtlarının, Th2 yanıtına polarizasyonunun eşlik ettiği gösterilmiştir. Diyabetin TREG-aracılı önlenmesi için, TGF- β ve reseptör gerekliliği, adaptif olarak transfer edilen TREG'lerin, TGF- β reseptör sinyalizasyonu eksikliği olan adacık-reaktif CD8+ T hücrelerini kontrol edemediğini gösteren çalışma ile kanıtlanmıştır (125, 126, 127, 128). Vitamin D takviyesinin immünsüpresif sitokinleri (TGF- β gibi) arttırdığı, inflamatuvar sitokinleri azalttığı birçok çalışma ile gösterilmiştir (129, 130). Progesteronun da sadece TREG miktarını arttırmada değil, aynı zamanda baskılama kapasitesini de arttırdığı ve ayrıca TREG farklılaşmasında

rol oynadığı gösterilmiştir (24, 25, 101, 131). Ayrıca, IFN- γ veya IL-17 üreten T hücre gelişimini etkin bir şekilde baskıladığını gösteren çalışmalar mevcuttur (132, 133). Progesteron ve Vitamin D'nin birlikte etki mekanizması birçok hücre üzerinden işlev görmektedir. Çalışmamızda, Vitamin D ve P4 uyarımı yardımcı T hücreleri, CD4+CD25+ hücreleri, TFR'yi, TFR'deki CTLA4'ü arttırmış, sitotoksik T hücreleri azaltmıştır. Sadece VitD ile, TREG, TREG'deki cFOXP3, PD1 ve CTLA4 artmış, TFH ve TFH'de CTLA4 azalmıştır. TFR ve TFH hücre oranları Yeni tanı T1DM'de başlıca Vitamin D etkisi ile normale dönmüş, eski tanı grubunda değişiklik gözlenmemiştir. Bu durum, Yeni tanı durumunda hareketli olan mikroçevre sayesinde, diğer hücre tipleri üzerinden de olumlu etkiler elde edildiğini düşündürmektedir. Terapötik çalışmaların bazıları efektör T hücreler ve TREG'ler arasında denge oluşturmaya çalışmaktadır. Yeni tanı T1DM'li çocuklarda ekzojen insülin alım ihtiyacının azalmasını sağlayan, güvenilir TREG alım uygulamasını içeren bazı klinik denemeler mevcuttur (134). Amerikan Diyabet Derneği'nin "Diyabet" dergisinde yayınlanan bir çalışma, TFH hücrelerinin potansiyel olarak T1DM riskinin yeni bir belirteci olarak hizmet edebileceğini öne sürmektedir. Çalışma, TFH hücrelerindeki artışların, T1DM tanısından sonra ve hatta belirgin hastalığın başlangıcından önce bile tespit edilebileceğini göstermiştir (135). Başka bir çalışma, diyabetin bir fare modelinde ve yeni başlangıçlı T1DM'li bireylerde CTLA-4-immünoglobulin füzyon proteini (abatacept) kullanılarak kostimülasyon blokajı yoluyla TFH hücrelerinin azalıp azalmadığını test etmiştir (136). T1DM'li hastalarının periferik kan, dalak ve pankreas lenf düğümlerinde TFR hücrelerinin azaldığı ve baskılama yeteneğinin zayıfladığı gösterilmiştir. TFR hücrelerin adaptif transferi ile, NOD farelerde T1DM gelişimi önlenmiştir, böylece adaptif transferden sonraki günler TFR hücrelerinin T1DM'ye ilerlemeyi önlemede düzenleyici bir rol oynaması T1DM'yi tedavi etmek için potansiyel terapötik yöntemler olarak TFR hücrelerinin araştırılmasına destek sağlamaktadır (114, 137, 138).

Vitamin D ve progesteronun sinerjik etkisini gösteren çalışmaların çoğu hayvan modelleri, hücre hatları üzerinde gerçekleşmiştir (139, 140). İzole hücre grupları ile yapılacak çalışmalar ortaya çıkan etkilerin daha net olarak yorumlanmasını sağlayacak ve hedefe yönelik sonuçlar ortaya çıkaracaktır. Çalışmamız periferik kan mononükleer hücreler ile gerçekleşmiş olup, izole hücre bazlı gerçekleştirilememiştir. Az sayıdaki hedef hücre temini için fazla miktarda numune gerekliliği, sınırlı sayıdaki yeni tanı hastalar açısından çalışmamızın limitasyonunu oluşturmaktadır. T hücre alt gruplarının

kanser, otoimmün hastalıklar ve enfeksiyonlarla olan ilişkisi üzerine çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar, hücre alt gruplarının hastalığın seyrini ve tedaviye yanıtı nasıl etkileyebileceğini anlamak için kritik bilgiler sağlar. Otolog hücre tedavileri, özellikle kanser tedavisinde kullanılan CAR-T hücre terapisi gibi yenilikçi yaklaşımlar içerir. Özellikle hasar görmüş dokuların onarılması ve çeşitli hastalıkların tedavisinde umut vaat eden sonuçlar sunmaktadır. Vitamin D ve progesteronun kombinasyonu, inflamasyonu modüle edebilir, nöronların ve destek hücrelerinin zamanla ölümünü önleyebilir. Bu bulgular, otolog hücre tedavilerinin geliştirilmesinde ve uygulanmasında, bu iki molekülün potansiyel sinerjisinin daha da araştırılması gerektiğini göstermektedir. Özellikle, bu tedavilerin, bağışıklık sistemi, inflamasyon tepkileri ve hücrelerin kendini yenileme kapasitesi üzerindeki etkileri, gelecekteki klinik uygulamalar için önemli olabilir. Sonuç olarak, vitamin D ve progesteron ile güçlendirilmiş otolog hücre tedavileri, modern tıbbın önemli bir parçası haline gelme potansiyeline sahiptir ve bu alandaki araştırmalar, yeni ve etkili tedavi yöntemlerinin keşfedilmesine katkıda bulunabilir. Otoimmün hastalıkları olan bireyler için kişiselleştirilmiş tedavi şemalarının tasarlanmasına yardımcı olabilecek, hastaları sınıflandırmada T hücresi alt gruplarının hassas rolünü anlamak için ileri düzey çalışmalara ihtiyaç vardır. Mikronize progesteron ve onun sentetik analoglarının kullanıldığı tedaviler büyük önem taşımaktadır. TFR, TFH, TREG gibi hücreler kullanılarak yapılan hücre terapisinin hem profilaktik hem de terapötik uygulamalarda yüksek bir potansiyeli olabilir. TFR gibi hücrelerin izolasyonu ve çoğaltılmasıyla ilgili zorlukların çözüldüğü varsayılırsa, optimal endikasyon (tolerans indüksiyonu gibi), doz (hücre sayısına bağlı olarak), zamanlama konusunda hala birçok belirsizlik vardır. Özetle, TFR-TFH-B etkileşimlerinin anlaşılmasının geliştirilmesi, uzun vadeli sonuçların iyileştirilmesi açısından anlamlı olabilir.

İki nükleer hormon olan P4 ve D vitamininin her biri, bağışıklık sistemi de dahil olmak üzere bir dizi biyolojik sürecin düzenlenmesinde önemli rol oynar. T hücreleri doğrudan ve dolaylı olarak bu iki hormon tarafından düzenlenir. T hücrelerinde P4 ve VDR ekspresyonu arasındaki bağlantı, bunların bağışıklık sistemi ve sinir sistemi gibi diğer doku sistemlerindeki örtüşen düzenleyici işlevlerinin bazılarını açıklayabilir. İki hormon arasındaki işbirlikçi etkileşimlerin çoğunda arka planda T hücreleri önemli roller oynuyor olabilir, ancak diğer hücre türlerinin de benzer şekilde düzenlenmesi mümkündür. Sağlık ve hastalığın düzenlenmesinde iki steroid hormon arasındaki fonksiyonel etkileşimin tam anlamıyla sağlıklı bir şekilde kurulması için deneysel

dizaynı, metodolojisi, doz-yanıt ilişkisi gibi birçok parametrenin net olarak ortaya koyularak gerçekleştirilecek araştırmalar, klinik uygulama açısından güvenilir sonuçlar için ışık tutacaktır.



KAYNAKLAR

1. Brusko TM, Wasserfall CH, Clare-Salzler MJ, Schatz DA, Atkinson MA. Functional defects and the influence of age on the frequency of CD4+ CD25+ T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2005; 54:1407–1414.
2. Lindley S, Dayan CM, Bishop A, Roep BO, Peakman M, Tree TI. Defective suppressor function in CD4+CD25+ T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2005; 54:92–99.
3. Kukreja A, Cost G, Marker J, Zhang C, Sun Z, Lin-Su K, et al. Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest*. 2002; 109:131–140.
4. Putnam AL, Vendrame F, Dotta F, Gottlieb PA. CD4+CD25 high regulatory T cells in human autoimmune diabetes. *J Autoimmun*. 2005; 24:55–62.
5. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995; 155:1151–1164.
6. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008; 133:775–787.
7. Cabrera SM, Rigby MR, Mirmira RG. Targeting regulatory T cells in the treatment of type 1 diabetes mellitus. *Curr Mol Med*. 2012; 12(10): 1261–1272.
8. Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol*. 2011; 29:621–663.
9. Nurieva RI, Chung Y, Hwang D, Yang XO, Kang HS, Ma L, et al. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity*. 2008; 29:138–149.
10. Johnston RJ, Poholek AC, DiToro D, Yusuf I, Eto D, Barnett B, et al. Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science*. 2009; 325:1006–1010.
11. Liu X, Chen X, Zhong B, Wang A, Wang X, Chu F, et al. Transcription factor achaete-scute homologue 2 initiates follicular T-helper-cell development. *Nature*. 2014 Mar 27; 507(7493):513–518.

12. Vinuesa CG, Sanz I, Cook MC. Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9:845–857.
13. X Xu, Y Shi, Y Cai, Q Zhang, F Yang, H Chen, et al. GC Inhibition of Increased Circulating Tfh Cell by Anti-CD20 Monoclonal Antibody in Patients with Type 1 Diabetes. *PLoS ONE*. 2013; 8(11): e79858.
14. Chung Y, Tanaka S, Chu F, Nurieva RI, Martinez GJ, Rawal S, et al. Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nat Med*. 2011; 17:983–988.
15. Linterman MA, Pierson W, Lee SK, Kallies A, Kawamoto S, Rayner TF, et al. Foxp3⁺ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat Med*. 2011; 17:975–982.
16. Sage PT, Francisco LM, Carman CV, Sharpe AH. The receptor PD-1 controls follicular regulatory T cells in the lymph nodes and blood. *Nat Immunol*. 2013; 14:152–161.
17. Lim HW, Hillsamer P, Kim CH. Regulatory T cells can migrate to follicles upon T cell activation and suppress GC-Th cells and GC-Th cell-driven B cell responses. *J Clin Invest*. 2004; 114:1640–1649.
18. Lim HW, Hillsamer P, Banham AH, Kim CH. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4⁺ CD25⁺regulatory T cells. *J Immunol*. 2005; 175:4180–4183.
19. Bikle DD. What is new in vitamin D: 2006–2007. *Curr Opin Rheumatol*. 2007; 19: 383–388.
20. Hewison M. Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme. *Rheum Dis Clin North Am*. 2012; 38:125–139.
21. Van Belle TL, Vanherwegen A-S, Feyaerts D, De Clercq P, Verstuyf A, Korf H, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and Its Analog TX527 Promote a Stable Regulatory T Cell Phenotype in T Cells from Type 1 Diabetes Patients. *PLoS ONE*. 2014; 9(10): e109194.
22. Boonyaratanakornkit V, Bi Y, Rudd M, Edwards DP. The role and mechanism of progesterone receptor activation of extra-nuclear signaling pathways in regulating gene transcription and cell cycle progression. *Steroids*. 2008; 73: 922–928.

23. Fernandez-Valdivia R, Mukherjee A, Mulac-Jericevic B, Conneely OM, DeMayo FJ, Amato P, et al. Revealing progesterone's role in uterine and mammary gland biology: insights from the mouse. *Semin. Reprod. Med.* 2005; 23: 22–37.
24. Lee JH, Ulrich B, Cho J, Park J, Kim CH. Progesterone promotes differentiation of human cord blood fetal T cells into T regulatory cells but suppresses their differentiation into Th17 cells. *J. Immunol.* 2011; 187:1778–1787.
25. Mao G, Wang J, Kang Y, Tai P, Wen J, Zou Q, et al. Progesterone increases systemic and local uterine proportions of CD4+CD25+ Treg cells during midterm pregnancy in mice. *Endocrine Journal.* 2018; 65(1): 9-20.
26. Brănișteanu DD, Mathieu C. Progesterone in gestational diabetes mellitus: guilty or not guilty? *Trends Endocrinol Metab.* 2003;14(2):54-56.
27. Delovitch TL, Singh B. The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD. *Immunity.* 1997;7(6):727-738.
28. WHO. Diabetes [web page on the Internet]. Updated January 2021. Accessed June 29, 2024. World Health Organization: https://www.who.int/health-topics/diabetes#tab=tab_1
29. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas 2021 – 10th edition [web page on the Internet]. Bruxelles: IDF Press; 2021. Accessed on 15 Dec 2021. <https://diabetesatlas.org/atlas/tenth-edition/>.
30. Yeşilkaya E, Cinaz P, Andıran N, Bideci A, Hatun Ş, Sarı E, et al. First report on the nationwide incidence and prevalence of Type 1 diabetes among children in Turkey. *Diabet Med.* 2017; 34(3):405-410.
31. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2014; 37(Supplement_1): 81-90.
32. American Diabetes Association Professional Practice Committee. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2022. *Diabetes Care.* 2022; 45 (Supplement_1): 17–38.
33. WHO. NIGER: Communicable Diseases Risk Assessment July 2005. WHO Situation Reports 2003 [web page on the Internet]. Accessed 17 Dec 2021. http://www.who.int/hac/crises/ner/sitreps/Niger_CD%20Risk_29072005.pdf.

34. Paschou SA, Papadopoulou-Marketou N, Chrousos GP, Kanaka-Gantenbein C. On type 1 diabetes mellitus pathogenesis. *Endocr Connect.* 2018; 7(1): R38-R46.
35. Fousteri G, Ippolito E, Ahmed R, Hamad ARA. Beta-cell Specific Autoantibodies: Are they Just an Indicator of Type 1 Diabetes? *Curr Diabetes Rev.* 2017; 13(3):322-329.
36. Beyan H, Riese H, Hawa MI, Beretta G, Davidson HW, Hutton JC, et al. Glycotoxin and autoantibodies are additive environmentally determined predictors of type 1 diabetes: a twin and population study. *Diabetes.* 2012; 61: 1192–1198.
37. Redondo MJ, Rewers M, Yu L, Garg S, Pilcher CC, Elliott RB, et al. Genetic determination of islet cell autoimmunity in monozygotic twin, dizygotic twin, and non-twin siblings of patients with type 1 diabetes: prospective twin study. *BMJ.* 1999; 318.7185: 698-702.
38. Størling J, Pociot F. Type 1 diabetes candidate genes linked to pancreatic islet cell inflammation and beta-cell apoptosis. *Genes.* 2017; 8.2:72.
39. Aly TA, Ide A, Jahromi MM, Barker JM, Fernando MS, Babu SR, et al. Extreme genetic risk for type 1A diabetes. *PNAS.* 2006; 103.38:14074-14079.
40. Wildin RS, Freitas A. IPEX and FOXP3: clinical and research perspectives. *Journal of Autoimmunity.* 2005; 25: 56-62.
41. Paschou SA, Tigas S, Naka K, Papadopoulos GK, Tsatsoulis A. The role of T regulatory cells (Tregs) in the development and prevention of type 1 diabetes. *Journal of Clinical and Cellular Immunology S.* 2012; 2:003.
42. Khalil I, d'Auriol L, Gobet M, Morin L, Lepage V, Deschamps I, et al. A combination of HLA-DQ beta Asp57-negative and HLA DQ alpha Arg52 confers susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Clinical Investigation.* 1990; 85.4: 1315-1319.
43. Rowe RE, Leech NJ, Nepom GT, McCulloch DK. High genetic risk for IDDM in the Pacific Northwest. First report from the Washington State Diabetes Prediction Study. *Diabetes.* 1994; 43.1: 87-94.
44. Undlien DE, Friede T, Rammensee HG, Joner G, Dahl-Jørgensen K, Søvik O, et al. HLA-encoded genetic predisposition in IDDM: DR4 subtypes may be associated with different degrees of protection. *Diabetes.* 1997; 46.1: 143-149.

45. Baschal EE, Aly TA, Babu SR, Fernando MS, Yu L, Miao D, et al. HLA-DPB1*0402 protects against type 1A diabetes autoimmunity in the highest risk DR3-DQB1*0201/DR4-DQB1*0302 DAISY population. *Diabetes*. 2007; 56.9: 2405-2409.
46. Pugliese A, Gianani R, Moromisato R, Awdeh ZL, Alper CA, Erlich HA, et al. HLA-DQB1*0602 is associated with dominant protection from diabetes even among islet cell antibody-positive first-degree relatives of patients with IDDM. *Diabetes*. 1995; 44.6: 608-613.
47. Eroğlu Altinova A, Yetkin Ğ. Tip 1 Diabetes Mellitus'a Yatkınlıkta Rolü Olabilecek Genetik Faktörler. (Turkish). *Marmara Medical Journal*, 2011; 24.2: 126-130.
48. Quinn LM, Wong FS, Narendran P. Environmental Determinants of Type 1 Diabetes: From Association to Proving Causality. *Front. Immunol.* 2021; 12:737964.
49. Knip M, Virtanen SM, Åkerblom HK. Infant feeding and the risk of type 1 diabetes. *The American journal of clinical nutrition*, 2010; 91.5: 1506-1513.
50. Holmberg H, Whalberg J, Vaarala O, Ludvigsson J. Short duration of breast-feeding as a risk-factor for β -cell autoantibodies in 5-year-old children from the general population. *Br J Nutr.* 2007; 97:111–6.
51. Cardwell CR, Stene LC, Ludvigsson J, Rosenbauer J, Cinek O, Svensson J, et al. Breast-feeding and childhood-onset type 1 diabetes: A pooled analysis of individual participant data from 43 observational studies. *Diabetes Care*. 2012; 35:2215–25.
52. World Health Organization. Health Topics: Breastfeeding. [web page on the Internet] Accessed 25 Jan 2022, World Health Organization: https://www.who.int/health-topics/breastfeeding#tab=tab_1
53. Boddu SK, Aurangabadkar G, Kuchay MS. New Onset Diabetes, Type 1 Diabetes and COVID-19. *Diabetes Metab Syndr.* 2020; 14(6):2211–7.
54. Imagawa A, Hanafusa T, Miyagawa J, Matsuzawa Y. A Novel Subtype of Type 1 Diabetes Mellitus Characterized by a Rapid Onset and an Absence of Diabetes-Related Antibodies. Osaka IDDM Study Group. *N Engl J Med.* 2000; 342(5):301–7.

55. Rodriguez-Calvo T. Enterovirus Infection and Type 1 Diabetes: Unraveling the Crime Scene. *Clin Exp Immunol*. 2019;195(1):15–24.
56. Christen U, Edelmann KH, McGavern DB, Wolfe T, Coon B, Teague MK, et al. A Viral Epitope That Mimics a Self Antigen can Accelerate But Not Initiate Autoimmune Diabetes. *J Clin Invest*. 2004; 114(9):1290–8.
57. van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev*. 2011;91(1):79-118.
58. Sarkar S, Donner T. Autoantibodies in Type 1 Diabetes. Johns Hopkins Diabetes Guide [web page on the Internet]. 2020. Johns Hopkins Guides. Accessed 25 Jan 2022. www.hopkinsguides.com/hopkins/view/Johns_Hopkins_Diabetes_Guide/547013/all/Autoantibodies_in_Type_1_Diabetes
59. American Diabetes Association. 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes—2021. *Diabetes care*. 2021, 44(Supplement_1): S15-S33.
60. Magliano DJ, Sacre JW, Harding JL, Gregg EW, Zimmet PZ, Shaw JE. Young-onset type 2 diabetes mellitus—Implications for morbidity and mortality. *Nature Reviews Endocrinology*. 2020; 16.6: 321-331.
61. ElSayed NA, Aleppo G, Aroda VR, Bannuru RR, Brown FM, Bruemmer D. American Diabetes Association, Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Care in Diabetes—2023. *Diabetes Care*. 2023; 46(Suppl. 1):S19–S40.
62. Coustan DR, Lowe LP, Metzger BE, Dyer AR, International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups. The Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) study: paving the way for new diagnostic criteria for gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol*. 2010; 202(6):654.e1-6.
63. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Consensus Panel, Metzger BE, Gabbe SG, Persson B, Buchanan TA, Catalano PA, et al. International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. *Diabetes Care*. 2010; 33(3):676-682

64. Khan Academy. Adaptive immunity [web page on the Internet]. Accessed: 25 April 2022. <https://www.khanacademy.org/science/how-does-the-human-body-work-class-12/x7babbc170453fdb8:human-health-and-disease/x7babbc170453fdb8:types-of-immunity-and-the-immune-system/a/adaptive-immunity>
65. LibreTexts. 20.5: Adaptive Immune System [web page on the Internet]. Accessed: 11 August 2020. https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Human_Biology/Book%3A_Human_Biology_%28Wakim_and_Grewal%29/20%3A_Immune_System/20.5%3A_Adaptive_Immune_System
66. Versini M, Jeandel PY, Rosenthal E, Shoenfeld Y. Obesity in autoimmune diseases: not a passive bystander. *Autoimmun Rev.* 2014; 13(9):981-1000.
67. Musette P, Bouaziz JD. B cell modulation strategies in autoimmune diseases: new concepts. *Frontiers in immunology.* 2018; 9: 622.
68. Petersone L, Edner NM, Ovcinnikovs V, Heuts F, Ross EM, Ntavli E, et al. T cell/B cell collaboration and autoimmunity: an intimate relationship. *Frontiers in immunology.* 2018; 9:1941.
69. Zhang Z, Xu Q, Huang L. B cell depletion therapies in autoimmune diseases: Monoclonal antibodies or chimeric antigen receptor-based therapy? *Frontiers in immunology.* 2023; 14: 1126421.
70. Tobón GJ, Izquierdo JH, Cañas CA. B lymphocytes: development, tolerance, and their role in autoimmunity—focus on systemic lupus erythematosus. *Autoimmune diseases.* 2013; 2013:1: 827254.
71. Hampe CS. B Cell in Autoimmune Diseases. *Scientifica (Cairo).* 2012.
72. Heimall J. The adaptive cellular immune response: T cells and cytokines. UpToDate [web page on the Internet]. Accessed: 30 Jan 2023. <https://www.uptodate.com/contents/the-adaptive-cellular-immune-response-t-cells-and-cytokines>
73. Zinkernagel RM, Doherty PC. The discovery of MHC restriction. *Immunol Today.* 1997; 18(1):14-7.
74. Godfrey DI, Uldrich AP, McCluskey J, Rossjohn J, Moody DB. The burgeoning family of unconventional T cells. *Nat Immunol.* 2015; 16(10):1114-23

75. Chen W. Tregs in immunotherapy: opportunities and challenges. *Immunotherapy*. 2011; 3(8), 911-914.
76. Miyara M, Gorochov G, Ehrenstein M, Musset L, Sakaguchi S, Amoura Z. Human FoxP3⁺ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*. 2011; 10 (12): 744–755.
77. Walker LSK. The link between circulating follicular helper T cells and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2022; 22:567–575.
78. Hao H, Nakayamada S, Tanaka Y. Differentiation, functions, and roles of T follicular regulatory cells in autoimmune diseases. *Inflamm Regener*. 2021; 41:1-8.
79. Podestà MA, Cavazzoni CB, Hanson BL, Bechu ED, Ralli G, Clement RL, et al. Stepwise differentiation of follicular helper T cells reveals distinct developmental and functional states. *Nat Commun*. 2023; 14.1: 7712.
80. Zhu Y, Zou L, Liu YC. T follicular helper cells, T follicular regulatory cells and autoimmunity. *International immunology*. 2016; 28.4: 173-179.
81. Ding T, Su R, Wu R, Xue H, Wang Y, Su R, et al. Frontiers of Autoantibodies in Autoimmune Disorders: Crosstalk Between Tfh/Tfr and Regulatory B Cells. *Frontiers in Immunology*. 2021; 12: 641013.
82. Ye Y, Wang M, Huang H. Follicular regulatory T cell biology and its role in immune-mediated diseases. *J Leukoc Biol*. 2021; 110(2):239-255.
83. Sîrbe C, Rednic S, Grama A, Pop TL. An Update on the Effects of Vitamin D on the Immune System and Autoimmune Diseases. *Int. J. Mol. Sci*. 2022; 23: 9784.
84. Bikle DD. Vitamin D: Production, Metabolism and Mechanisms of Action. [web page on internet]. Accessed: 31 Dec 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278935/>
85. Dankers W, Colin EM, van Hamburg JP, Lubbert, E. Vitamin D in autoimmunity: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Frontiers in immunology*. 2017; 7:697.
86. Chun RF, Liu PT, Modlin RL, Adams JS, Hewison M. Impact of vitamin D on immune function: lessons learned from genome-wide analysis. *Front Physiol*. 2014; 5:151.

87. Charoenngam N, Holick MF. Immunologic effects of vitamin D on human health and disease. *Nutrients*. 2020; 12(7):2097.
88. Toubi E, Shoenfeld Y. The role of vitamin D in regulating immune responses. *Isr Med Assoc J*. 2010; 12(3):174–5.
89. Druckmann, R.; Druckmann, M.A. Progesterone and the immunology of pregnancy. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2005**, *97*, 389–396..
90. Arck P, Hansen PJ, Mulac Jericevic B, Piccinni MP, Szekeres-Bartho J. Progesterone during pregnancy: endocrine-immune cross talk in mammalian species and the role of stress. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2007; 58: 268–279.
91. Dressing GE, Goldberg JE, Charles NJ, Schwertfeger KL, Lange CA. Membrane progesterone receptor expression in mammalian tissues: a review of regulation and physiological implications. *Steroids*. 2011; 76: 11–17.
92. Dosiou C, Hamilton AE, Pang Y, Overgaard MT, Tulac S, Dong J, et al. Expression of membrane progesterone receptors on human T lymphocytes and Jurkat cells and activation of G-proteins by progesterone. *J. Endocrinol.* 2008; 196: 67–77.
93. Hughes GC. Progesterone and autoimmune disease. *Autoimmun Rev.* 2012; 11(6-7):A502-14.
94. Zwahlen M, Stute P. Impact of progesterone on the immune system in women: a systematic literature review. *Arch Gynecol Obstet.* 2024; 309:37–46.
95. Collins MK, McCutcheon CR, Petroff MG. Impact of estrogen and progesterone on immune cells and host–pathogen interactions in the lower female reproductive tract. *The Journal of Immunol.* 2022; 209(8), 1437-1449.
96. Kashiwagi H, Seki T, Oshima S, Ohno Y, Shimizu T, Yamada S, et al. High-progesterone environment preserves T cell competency by evading glucocorticoid effects on immune regulation. *Front Immunol.* 2022; 13:1000728.
97. Hellberg S, Raffetseder J, Rundquist O, Magnusson R, Papapavlou G, Jenmalm MC, et al. Progesterone Dampens Immune Responses in In Vitro Activated CD4⁺ T Cells and Affects Genes Associated With Autoimmune Diseases That Improve During Pregnancy. *Front Immunol.* 2021; 12:672168.

98. Lee JH, Lydon JP, Kim CH. Progesterone suppresses the mTOR pathway and promotes generation of induced regulatory T cells with increased stability. *Eur J Immunol.* 2012; 42(10):2683-96.
99. Maeda Y, Ohtsuka H, Tomioka M, Oikawa M. Effect of progesterone on Th1/Th2/Th17 and regulatory T cell-related genes in peripheral blood mononuclear cells during pregnancy in cows. *Vet Res Commun.* 2013; 37(1):43-9.
100. Piccinni MP, Raghupathy R, Saito S, Szekeres-Bartho J. Cytokines, Hormones and Cellular Regulatory Mechanisms Favoring Successful Reproduction. *Front Immunol.* 2021; 12:717808.
101. Mjosberg J, Svensson J, Johansson E, Hellstrom L, Casas R, Jenmalm MC. et al. Systemic reduction of functionally suppressive CD4^{dim}CD25^{high}Foxp3⁺ Tregs in human second trimester pregnancy is induced by progesterone and 17 β -estradiol. *J Immunol.* 2009; 183, 759-769.
102. Alahgholi-Hajibehzad M. (2014). Myastenia Gravis Hastalığında Regulator T Hücre (Treg) Fonksiyonlarının İncelenmesi. Erişim tarihi 09.09.2024. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İmmünoloji AD. Doktora Tezi. İstanbul.
<https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp>.
103. Bender C, Rajendran S, Von Herrath MG. New insights into the role of autoreactive CD8 T cells and cytokines in human type 1 diabetes. *Front in endocrinology.* 2021; 11: 606434.
104. Skowera A, Ellis RJ, Varela-Calvino R, Arif S, Huang GC, Van-Krinks C, et al. Ctl's are Targeted to Kill Beta Cells in patients with type 1 diabetes through recognition of a glucose-regulated preproinsulin epitope. *J Clin Invest.* 2008; 118:3390–402.
105. Chen J, Bruce D, Cantorna MT. Vitamin D receptor expression controls proliferation of naive CD8⁺ T cells and development of CD8 mediated gastrointestinal inflammation. *BMC immunology.* 2014, 15: 1-11.
106. Rigby WF, Yirinec B, Oldershaw RL, Fanger MW. Comparison of the effects of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ on T lymphocyte subpopulations. *European journal of immunology.* 1987; 17.4: 563-566.

107. Yuzefpolskiy Y, Baumann FM, Penny LA, Studzinski GP, Kalia V, Sarkar S. Vitamin D receptor signals regulate effector and memory CD8 T cell responses to infections in mice. *The Journal of nutrition*. 2014; 144.12: 2073-2082.
108. Viisanen T, Ihantola EL, Nääntö-Salonen K, Hyöty H, Nurminen N, Selvenius J, et al. Circulating CXCR5+ PD-1+ ICOS+ follicular T helper cells are increased close to the diagnosis of type 1 diabetes in children with multiple autoantibodies. *Diabetes*. 2017; 66(2): 437-447.
109. Sage PT, Sharpe AH. T follicular regulatory cells in the regulation of B cell responses. *Trends Immunol*. 2015; 36:410–418.
110. Fonseca VR, Agua-Doce A, Maceiras AR, Pierson W, Ribeiro F, Romão VC, et al. Human blood Tfr cells are indicators of ongoing humoral activity not fully licensed with suppressive function. *Science Immunology*. 2017; 2(14): ean1487.
111. Kumar S, Fonseca VR, Ribeiro F, Basto AP, Água-Doce A, Monteiro M, et al. Developmental bifurcation of human T follicular regulatory cells. *Science Immunology*. 2021; 6(59); eabd8411.
112. Vecchione A, Di Fonte R, Gerosa J, Jofra T, Cicalese MP, Napoleone V, et al. Reduced PD-1 expression on circulating follicular and conventional FOXP3+ Treg cells in children with new onset type 1 diabetes and autoantibody-positive at-risk children. *Clinic Immunol*. 2020; 211:108319.
113. Madec AM, Rousset F, Ho S, Robert F, Thivolet C, Orgiazzi J, et al. Four IgG anti-islet human monoclonal antibodies isolated from a type 1 diabetes patient recognize distinct epitopes of glutamic acid decarboxylase 65 and are somatically mutated. *Journal of immunol (Baltimore, Md.: 1950)*. 1996; 156(9):3541-3549.
114. Vecchione A, Jofra T, Gerosa J, Shankwitz K, Di Fonte R, Galvani G, et al. Reduced Follicular Regulatory T Cells in Spleen and Pancreatic Lymph Nodes of Patients with Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2021; 70(12):2892-2902.
115. Willcox A, Richardson SJ, Walker LSK, Kent SC, Morgan NG, Gillespie KM. Germinal centre frequency is decreased in pancreatic lymph nodes from individuals with recent-onset type 1 diabetes. *Diabetologia* 2017; 60: 1294–1303.

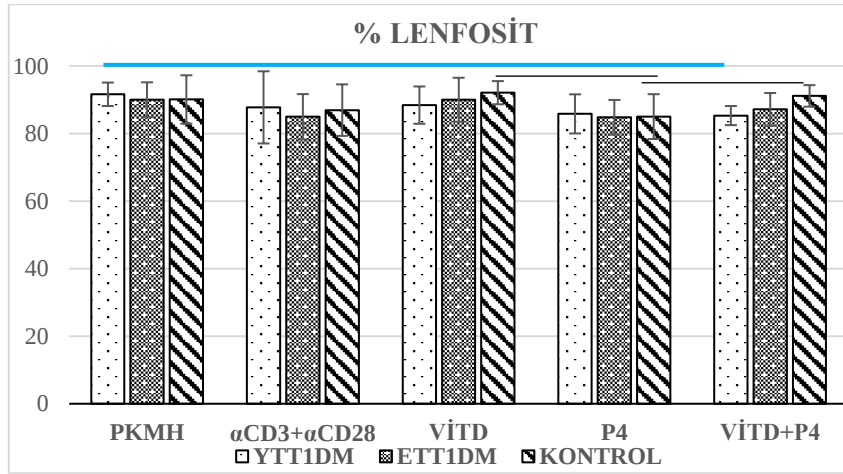
116. Kurita T, Lee K, Saunders PT, Cooke PS, Taylor JA, Lubahn DB, et al. Regulation of progesterone receptors and decidualization in uterine stroma of the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Biol Reprod.* 2001; 64: 272–283.
117. Thangamani S, Kim M, Son Y, Huang X, Kim H, Lee JH, et al. Cutting edge: progesterone directly upregulates vitamin d receptor gene expression for efficient regulation of T cells by calcitriol. *J Immunol.* 2015; 194: 883–886.
118. Alam MS, Otsuka S, Wong N, Abbasi A, Gaida MM, Fan Y, et al. TNF plays a crucial role in inflammation by signaling via T cell TNFR2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 118(50): e2109972118.
119. Christen U, Wolfe T, Möhrle U, Hughes AC, Rodrigo E, Green EA, et al. A dual role for TNF- α in type 1 diabetes: islet-specific expression abrogates the ongoing autoimmune process when induced late but not early during pathogenesis. *The Journal of Immunology.* 2001; 166.12:7023-7032.
120. Lu J, Liu J, Li L, Lan Y, Liang Y. Cytokines in type 1 diabetes: mechanisms of action and immunotherapeutic targets. *Clinical & translational immunology.* 2020; 9.3: e1122.
121. von Herrath M, Bain SC, Bode B, Clausen JO, Coppieters K, Gaysina L, et al. Anti-interleukin-21 antibody and liraglutide for the preservation of β -cell function in adults with recent-onset type 1 diabetes: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *The Lancet Diabetes & Endocrinology.* 2021; 9.4:212-224.
122. Mastrandrea L, Yu J, Behrens T, Buchlis J, Albini C, Fournier S, Quattrin T. Etanercept treatment in children with new-onset type 1 diabetes: pilot randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Diabetes care.* 2009; 32.7: 1244-1249.
123. Campbell IL, Wong GH, Schrader JW, Harrison LC. Interferon- γ enhances the expression of the major histocompatibility class I antigens on mouse pancreatic β cells. *Diabetes.* 1985; 34: 1205–1209.
124. Sarvetnick N, Liggitt D, Pitts SL, Hansen SE, Stewart TA. Insulin-dependent diabetes mellitus induced in transgenic mice by ectopic expression of class II MHC and interferon- γ . *Cell.* 1988; 52: 773–782.
125. Ishigame H, Zenewicz LA, Sanjabi S, Licona-Limón P, Nakayama M, Leonard WJ, Flavell RA. Excessive Th1 responses due to the absence of TGF-

- β signaling cause autoimmune diabetes and dysregulated Treg cell homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110.17: 6961-6966.
126. Peng Y, Laouar Y, Li MO, Green EA, Flavell RA. TGF- β regulates in vivo expansion of Foxp3-expressing CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells responsible for protection against diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 4572–4577.
 127. King C, Davies J, Mueller R, Lee MS, Krah T, Yeung B, et al. TGF- β 1 alters APC preference, polarizing islet antigen responses toward a Th2 phenotype. *Immunity*. 1998; 8.5: 601-613.
 128. Green EA, Gorelik L, McGregor CM, Tran EH, Flavell RA. CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells control anti-islet CD8⁺ T cells through TGF- β -TGF- β receptor interactions in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 10878–10883.
 129. Ghorbani Z, Rafiee P, Haghighi S, Razeghi Jahromi S, Djalali M, Moradi-Tabriz H, et al. The effects of vitamin D3 supplementation on TGF- β and IL-17 serum levels in migraineurs: post hoc analysis of a randomized clinical trial. *J Pharm Health Care Sci*. 2021; 3.7(1):9.
 130. Zhao R, Zhang W, Ma C, Zhao Y, Xiong R, Wang H, et al. Immunomodulatory function of vitamin D and its role in autoimmune thyroid disease. *Frontiers in immunology*. 2021; 12: 574967.
 131. Weinberg A, Enomoto L, Marcus R, Canniff J. Effect of menstrual cycle variation in female sex hormones on cellular immunity and regulation. *J. Reprod. Immunol*. 2011; 89: 70–77.
 132. Piccinni MP, Giudizi M, Biagiotti R, Beloni L, Giannarini L, Sampognaro S, et al. Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *J Immunol* 155, 128–133.
 133. Miyaura H, and Iwata M. Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids. *J Immunol*, 2002; 168, 1087–1094.

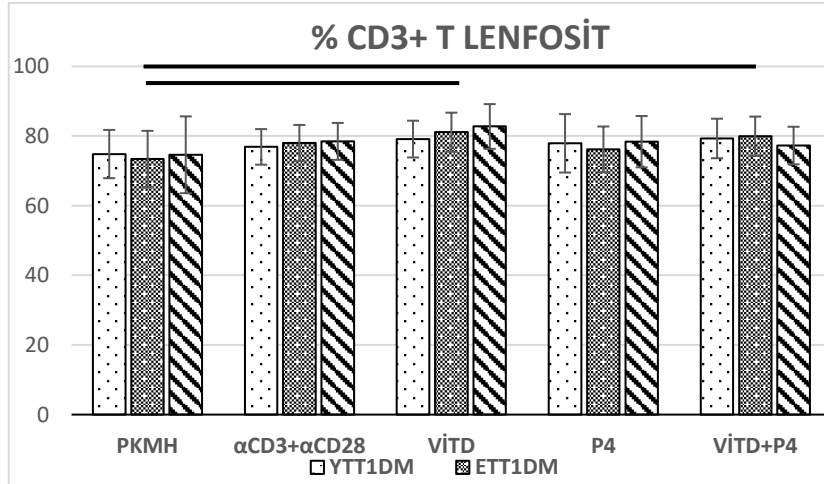
134. Hull CM, Peakman M & Tree TIM. Regulatory T cell dysfunction in type 1 diabetes: what's broken and how can we fix it?. *Diabetologia* Hull, 2017; 1839–1850.
135. Frank Heuts, Natalie M. Edner, Lucy S.K. Walker; Follicular T Helper Cells: A New Marker of Type 1 Diabetes Risk?. *Diabetes*; 2017; 66 (2): 258–260.
136. Edner NM, Heuts Thomas N. et al. Follicular helper T cell profiles predict response to costimulation blockade in type 1 diabetes. *Nat Immunol* 2020; 21, 1244–1255.
137. Bonami RH, Nyhoff LE, McNitt DH, Hulbert C, Felton JL, Kendall PL, et al. T-B lymphocyte interactions promote type 1 diabetes independently of SLAM-associated protein. *J Immunol*, 2020; 205(12):3263–76.
138. Xu X, Shen M, Zhao R, Cai Y, Jiang H, Shen Z, et al. Follicular regulatory T cells are associated with beta-cell autoimmunity and the development of type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 2019; 104(9):4199–213.
139. Hua F, Reiss JI, Tang H, Wang J, Fowler X, Sayeed I, Stein DG. Progesterone and low-dose vitamin D hormone treatment enhances sparing of memory following traumatic brain injury. *Horm Behav*. 2012 ;61(4):642-51.
140. Lee LR, Teng PN, Nguyen H, Hood BL, Kavandi L, Wang G, Turbov JM, Thaete LG, Hamilton CA, Maxwell GL, Rodriguez GC, Conrads TP, Syed V. Progesterone enhances calcitriol antitumor activity by upregulating vitamin D receptor expression and promoting apoptosis in endometrial cancer cells. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2013;6(7):731-43.

HAM VERİLER

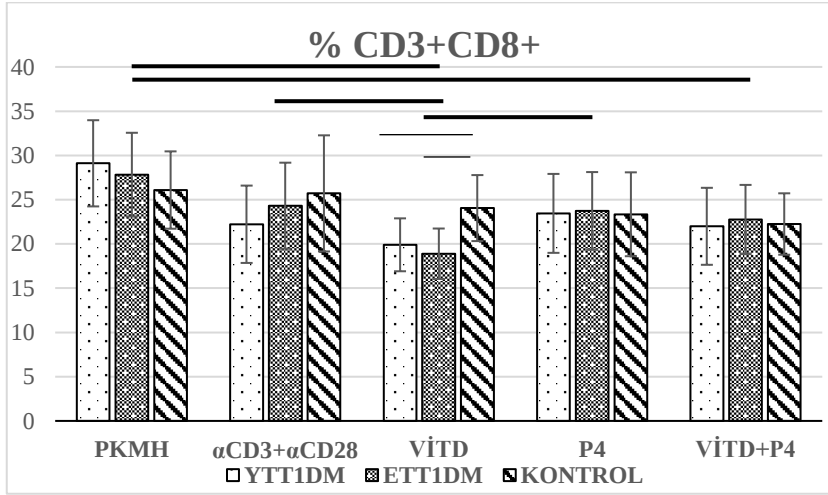
Değerlendirilen bazı hücre gruplarının şekil halinde gösterimi ham veriler bölümünde sunulmaktadır. Şekillerde kullanılan kalın siyah çizgi eski tanı tip 1 diyabet grubunun, mavi çizgi yeni tanı tip 1 diyabet grubunun ve ince siyah çizgi kontrol grubunun, diğer uyaranlar ve diğer gruplarla olan farklarını göstermektedir.



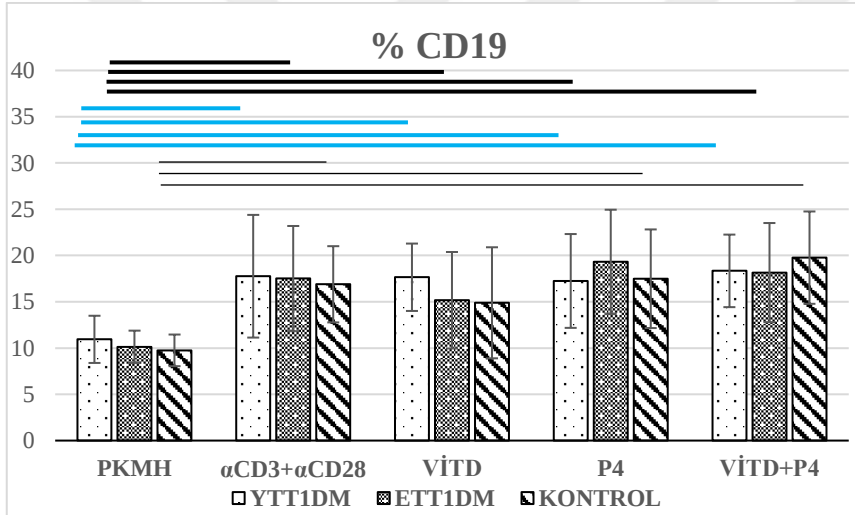
Şekil 0-1: Uyarı yanıtları açısından lenfosit değişimleri



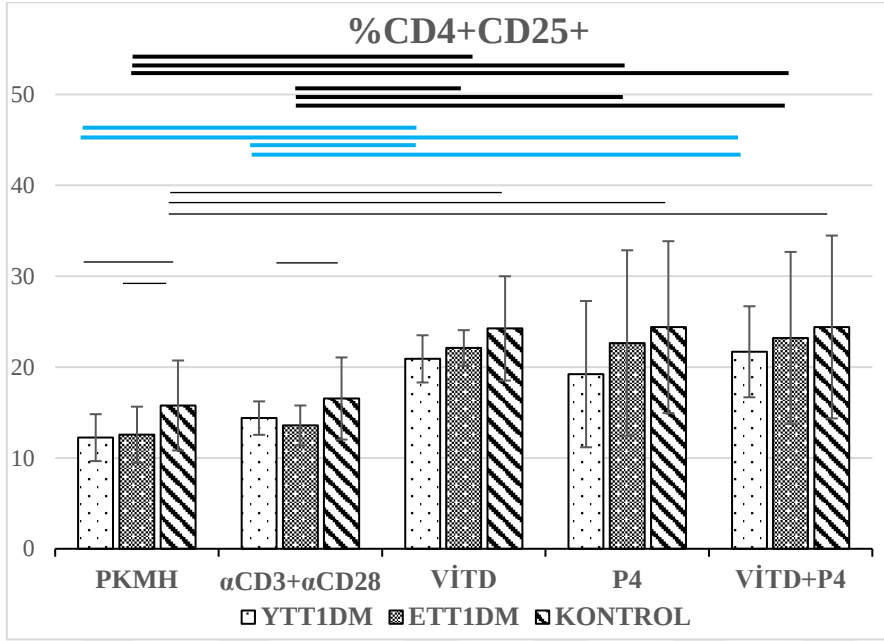
Şekil 0-2: Uyarı yanıtları açısından CD3+ T lenfosit değişimleri



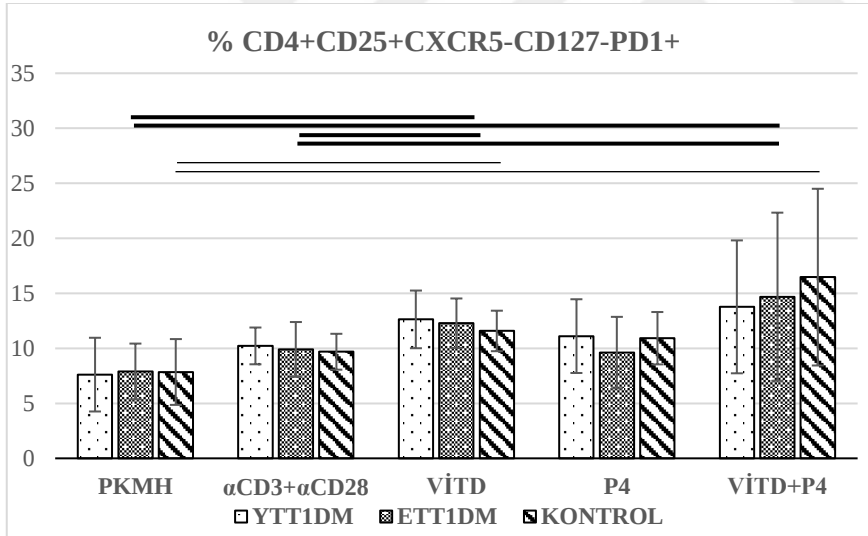
Şekil 0-3: Uyarı yanıtları açısından sitotoksik T lenfosit değişimleri



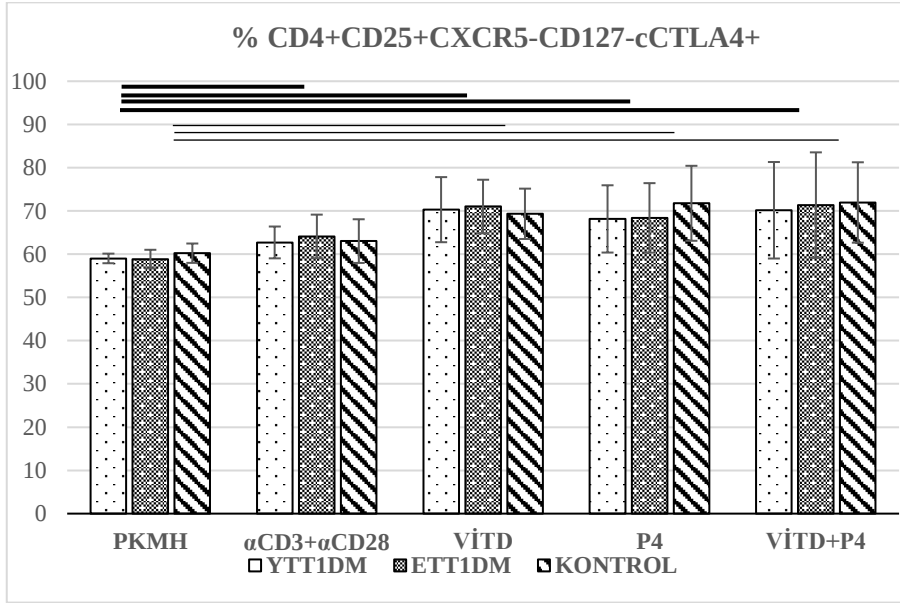
Şekil 0-4: Uyarı yanıtları açısından B lenfosit değişimleri



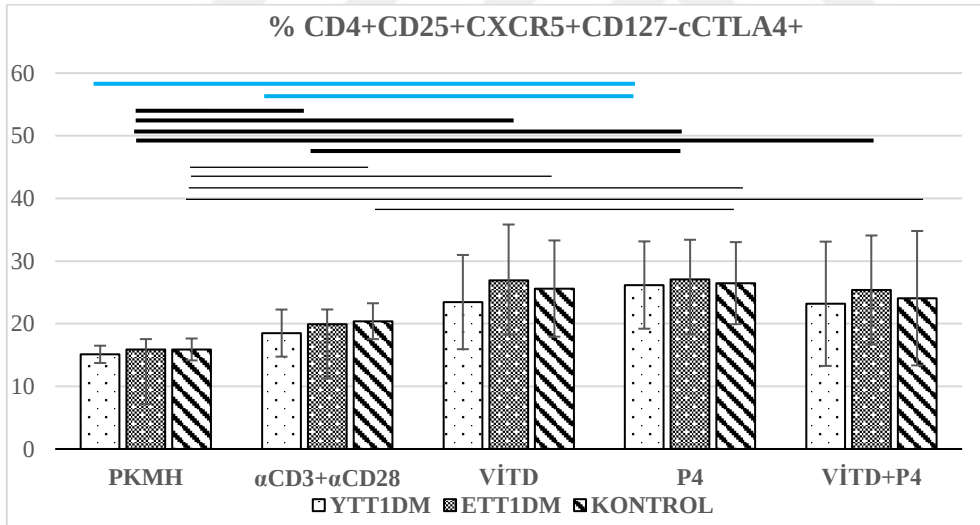
Şekil 0-5: Uyarı yanıtları açısından CD4+CD25+ hücre değişimleri



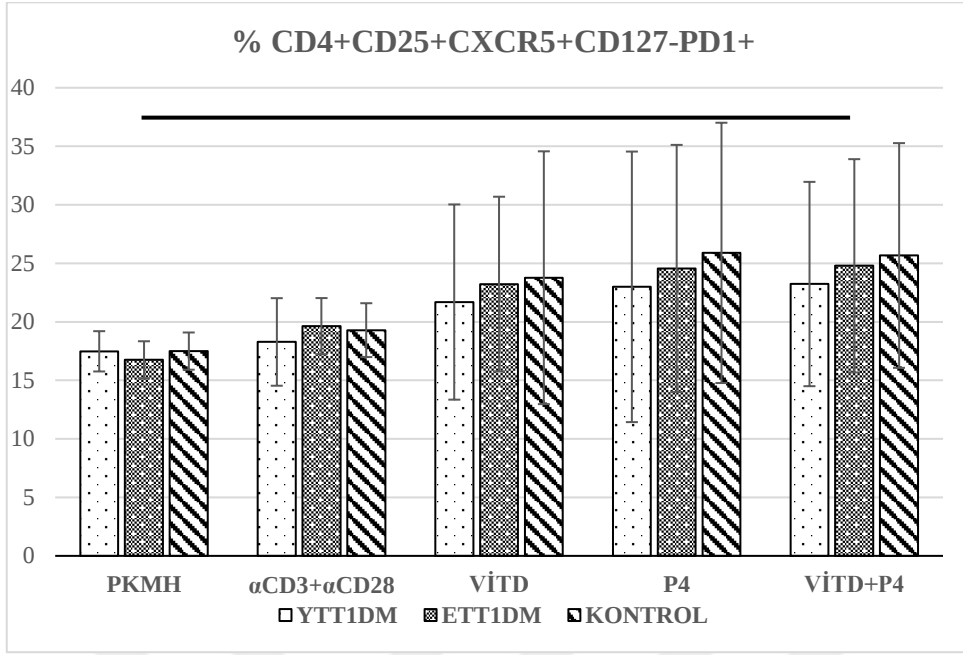
Şekil 0-6: Uyarı yanıtları açısından CD4+CD25+CXCR5-CD127-PD1+ hücre değişimleri



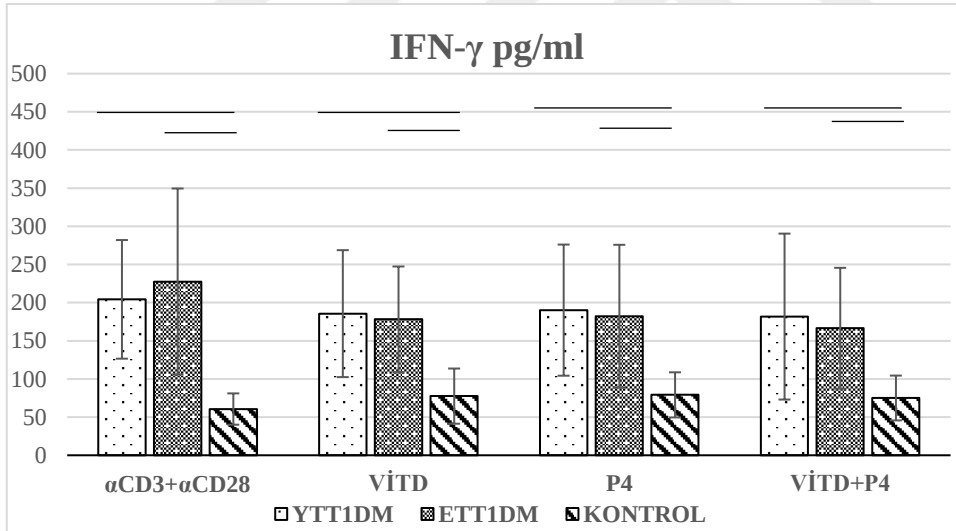
Şekil 0-7: Grup içi uyarı yanıtları açısından CD4+CD25+CXCR5-CD127-cCTLA4+ hücre değişimleri



Şekil 0-8: Uyarı yanıtları açısından CD4+CD25+CXCR5+CD127-cCTLA4+ hücre değişimleri



Şekil 0-9: Uyarı yanıtları açısından CD4+CD25+CXCR5+CD127-PD1+ hücre değişimleri



Şekil 0-10: Uyarı yanıtları açısından interferon-gama düzeyi değişimleri

FORMLAR

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

TİP 1 DİYABET PATOGENEZİNDE REGÜLATÖR T HÜCRE FONKSİYONLARI VE HÜCRE ETKİLEŞİMLERİNİN İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

ORJİNALLIK RAPORU

% 19	% 17	% 14	% 7
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 8
2	pdffox.com İnternet Kaynağı	% 1
3	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
4	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 1
5	acikerisim.medipol.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
6	Pekel, Vesna Vukobrat. "Three-dimensional Stereophotogrammetric Evaluation of Facial Soft Tissue Changes over a 6-Month Period Following Bimaxillary Surgery in Skeletal Class 3 Patients " Marmara I Universitesi (Turkey)	% 1