

VUSALA ABBASOVA

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2014

TEZ ONAYI**TEZ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İmmünoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Programında Vusala ABBASOVA tarafından hazırlanan Behçet
Hastalığında İnterlökin-23 Reseptörü, İnterferon-gamma ve İnterlökin-17A ilişkisi
başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak
kabul edilmiştir.

24 / 06 / 2014

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Prof. Dr. Güher SARUHAN DİRESKENELİ İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Fizyoloji A.D	
2.Prof. Dr. Günnur DENİZ İ.Ü. Deneysel Tıp Araş. Enst. İmmünoloji A. D.	
3.Prof. Dr. Ahmet GÜL İ.Ü. İstanbul Tıp Fak. İç Hast. A.D. Romatoloji B. D.	
4.Prof. Dr. Haner DİRESKENELİ Marmara Üni. Tıp Fak. İç Hast. AD. Romatoloji B. D.	
5.Doç. Dr. Esin AKTAŞ ÇETİN İ.Ü. Deneysel Tıp Araş. Enst. İmmünoloji A. D.	

BEYAN

iii

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün saffhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla 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 olmadığını beyan ederim.

Vusala Abbasova



İTHAF

Sevgili aileme ve arkadaşlarıma ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın her aşamasındaki desteğinden dolayı danışmanım Sayın Hocam Prof. Dr. Güher Saruhan-Direskeneli'ye,

Tez çalışmamda klinik desteği sağlayan hocam Prof. Dr.Ahmet Gül'e,

Çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen ve laboratuvarında çalışma becerisi kazanmamda büyük katkısı olan Dr. Vuslat Yılmaz ve Dr. Sibel Penbe Yentür'e, Abdullah Yılmaz'a

Çalışmalarımın her aşamasında ve karşılaştığım problemleri çözmem konusunda destek ve yardımlarıyla yanımda olan değerli dostum Mahdi Alahgholi-Hajibehzad'a,

Sıkıntılarımı paylaşarak zor dönemlerin üstesinden gelmemde katkıları olan Perihan Şemin'e, Pınar Kasapoğlu'na, Ümit Aslanhan'a, tüm arkadaşlarıma ve...

Beni her koşul ve şartta destekleyen, buralardan çok uzaktaki çok değerli aileme ve sevgili arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 34349



İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	Vİİ
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	XİV
ABSTRACT.....	XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Behçet Hastalığı (BH).....	2
2.1.1. Epidemiyoloji.....	2
2.1.2. Genetik Yatkınlık.....	3
2.1.3. Tanı	4
2.1.4. Klinik	4
2.2. İmmünopatogenez.....	4
2.2.1. $\gamma\delta$ T Hücreleri	4
2.2.2. BH’de $\gamma\delta$ T Hücreleri.....	5
2.2.3. Th1, Th17 ve Th22 Hücreleri	6
2.2.3.1. Th1	6
2.2.3.2. Th17.....	6
2.2.3.3. Th22	7
2.2.4. BH’de Th1, Th17 ve Th22 Hücreleri.....	8
2.3. İL-23R, İL-23 ve İL-17 İlişkisi.....	9
2.3.1. İL-23R Polimorfizminin İşlevsel Etkisi.....	9
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	11
3.1. Olgular	11
3.1.1. Behçet Hastaları	11

3.1.2. Sağlıklı Kontroller (SK).....	12
3.2. Periferik Kan Mononükleer Hücre (PKMH) Eldesi	12
3.3. Hücre Yüzey Molekül Boyaması.....	12
3.4. Hücre Kültürü	13
3.5. Hücre İçi Sitokin Boyaması	14
3.6. IL23R Genotiplendirmesi	15
3.7. İstatistik Değerlendirme.....	15
4. BULGULAR.....	16
4.1. $\gamma\delta$ T hücreleri	16
4.1.1. $\gamma\delta$ T Hücrelerinin Fenotipik Değerlendirilmesi	16
4.1.1.1. $\gamma\delta$ THR Reseptörü Taşıyan Hücrelerin Dağılımı.....	17
4.1.1.2. $\gamma\delta$ THR Reseptörü Taşıyan Hücrelerde İL-23R Dağılımı	17
4.1.1.3. $\gamma\delta$ THR Taşıyan T Hücrelerinde CD161 ve CCR6	18
4.1.2. $\gamma\delta$ T Hücrelerinin Aktivitesi	19
4.1.2.1. $\gamma\delta$ T Hücrelerinin Aktivite Belirteçleri (CD107a ve CD16).....	19
4.1.2.2. $\gamma\delta$ T Hücrelerinin Sitokin Üretimi	22
4.2. CD4 ⁺ T Hücreleri.....	25
4.2.1. CD4 ⁺ T Hücrelerinin Fenotipik Değerlendirilmesi	25
4.2.1.1. Naif ve Bellek CD4 ⁺ T Hücreleri.....	25
4.2.1.2. CD4 ⁺ T Hücrelerinde CD161 ve CCR6.....	25
4.2.2. CD4 ⁺ T Hücrelerde Sitokin Aktivitesi.....	26
4.3. İL-23R Genotipine Bağlı Sitokin Üretimi	28
4.3.1. $\gamma\delta$ T hücrelerde <i>IL23R</i> Genotipine Bağlı Sitokin Üretimi	28
4.3.2. CD4 ⁺ T hücrelerde <i>IL23R</i> Genotipine Bağlı Sitokin Üretimi.....	29
4.3.3. $\gamma\delta$ ve CD4 ⁺ T hücrelerinde <i>IL23R</i> Genotipine Göre İL-23R Yüzey Ekspresyonu.	30
5. TARTIŞMA	32
KAYNAKLAR	36
FORMLAR	42
ETİK KURUL KARARI	44
ÖZGEÇMİŞ	45

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3.1.1: Donör bilgi tablosu	11
Tablo 3.3: Hücre yüzey boyamada kullanılan monoklonal antikorlar	13
Tablo 3.4: Hücre kültüründe kullanılan uyaranlar ve kimyasallar	14
Tablo 3.5: Antikor-florokorm boyama kombinasyonu	15
Tablo 3.6: Çalışmada kullanılan cihazlar.....	15



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.3: İL-23, İL-23R ve İL-17A ilişkisi	9
Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	
Şekil 4.1.1: $\gamma\delta$ T hücrelerin kapılanması	16
Şekil 4.1.1.1: BH ve SK gruplarında $\gamma\delta$ T ve V γ 9 T hücre oranları	17
Şekil 4.1.1.2: BH ve SK'da İL-23R yüzdesi	18
Şekil 4.1.1.3: CD161 ve CCR6 dağılımları	19
Şekil 4.1.2.1-1: $\gamma\delta$ T hücre kapısında CD16 ⁺ ve CD107a ⁺ hücrelerinin oranları	19
Şekil 4.1.2.1-2: Bir kontrol donöründe uyarıya yanıt açısından $\gamma\delta$ T hücre kapısında CD16 ⁺ ve CD107a ⁺ hücrelerinin görüntüsü	20
Şekil 4.1.2.1-3: SK'lere göre BH'lerde $\gamma\delta$ T hücrelerinin artış oranının (indeks) dağılımı	21
Şekil 4.1.2.1-4: $\gamma\delta$ T hücre kapısında uyarılan hücrelerin CD16 ve CD107a yüzdeleri	21
Şekil 4.1.2.1-5: CD16 ve CD107a belirteçlerinin artış oranlarının yüzdesi	22
Şekil 4.1.2.2-1: Lenfosit kapısında $\gamma\delta$ T ⁺ İL-17A ⁺ , $\gamma\delta$ T ⁺ İL-22 ⁺ ve $\gamma\delta$ T ⁺ İFN- γ ⁺ oranları	23
Şekil 4.1.2.2-2: Kültür sonrası hücrelerin görüntüsü ve kapılanması ve $\gamma\delta$ T hücre kapısında İL-17A ⁺ İFN- γ ⁺ ve İL-22 ⁺ İFN- γ ⁺ hücrelerinin görüntüsü	23
Şekil 4.1.2.2-3: $\gamma\delta$ T hücre kapısında sitokin yüzdeleri	24
Şekil 4.1.2.2-4: $\gamma\delta$ T hücre kapısında İL-17A ⁺ İFN- γ ⁺ ve İL-22 ⁺ İFN- γ ⁺ hücre yüzdeleri	25
Şekil 4.2.1.1: CD4 ⁺ T hücre kapısında CD4 ⁺ CD45RO ⁻ hücrelerinin yüzdesi	25
Şekil 4.2.1.2-1: Lenfosit kapısında CD4 ⁺ T hücre yüzeyindeki CD161 ve CCR6 yüzdeleri	26
Şekil 4.2.1.2-2: CD4 ⁺ T hücre kapısında CD161 ⁺ , CCR6 ⁺ ve CD161 ⁺ CCR6 ⁺ yüzdeleri	26

Şekil 4.2.2-1: Lenfosit kapısında $CD4^+IL-17A^+$, $CD4^+IL-22^+$ ve $CD4^+IFN-\gamma^+$ hücrelerin oranı.....	27
Şekil 4.2.2-2: $CD4^+$ T hücrelerinin sitokin aktivitesi.....	27
Şekil 4.2.2-3: $CD4^+$ T hücre kapısında $IL-17A^+IFN-\gamma^+$ ve $IL-22^+IFN-\gamma^+$ hücrelerin sitokin aktivitesi.....	28
Şekil 4.3.1: $\gamma\delta$ T hücrelerinde SK ve BH'lerde G genotipini taşıyan ve taşımayan donörlerin sitokin yüzdeleri.....	29
Şekil 4.3.2: $CD4^+$ T hücrelerinde SK ve BH'lerde G genotipini taşıyan ve taşımayan donörlerin sitokin yüzdeleri.....	30
Şekil 4.3.3: IL23R genotipe göre IL-23R yüzey ekspresyon oranları.....	31
Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ABH	Aktif Behçet hastaları
AS	Ankilozan spondilit
ASH	Antijen sunucu hücreler
BH	Behçet hastalığı
EN	Eritema nodozum
FEB	Floresan eksi bir (Fluorescence Minus One)
FITC	Fluoresein izotiyosiyanat
GWAS	Genom çapı ilişkilendirme çalışmaları
HLA	İnsan lökosit antijeni
HLA	İnsan lökosit antijenleri
İBH	İnaktif Behçet hastaları
İFN- γ	İnterferon-gamma
İL	İnterlökin
İL-17	İnterlökin 17
İL-23	İnterlökin 23
İL-23R	İnterlökin 23 reseptörü
MHC	Doku uyumluluk kompleksi
NK	Doğal öldürücü hücreler
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PE	Fikoeritrin
PKMH	Periferik Kan Mononükleer Hücreleri
PRR	Pattern Recognition Receptors (Kalıp Tanıma Reseptörü)
RA	Romatoid artrit
RORC	Retinoid-Related Orphan Receptor C

SK	Sağlıklı kontrol
SLE	Sistemik lupus eritematozus
Th	Yardımcı T hücreleri
THR	T hücre reseptörü
TNP	Tek nükleotid polimorfizmi
$\gamma\delta$	Gamma/delta



ÖZET

Abbasova, V. (2014). Behçet Hastalığında IL-23R, IFN- γ , IL-17A İlişkisi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İmmünoloji AD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Behçet hastalığı (BH) patogenezinde $\gamma\delta$ T hücrelerinin rolü olduğu kanıtlanmıştır. Bu rolün $\gamma\delta$ T hücrelerinin BH'de IL-17A üretimi ile olduğu ileri sürülmektedir. Bu çalışmada $\gamma\delta$ T hücrelerinin ve karşılaştırmalı olarak CD4⁺ T hücrelerinin BH'deki etkileri sitokin üretimleri aracılığıyla araştırılmıştır.

Çalışmaya 25 BH ve 25 sağlıklı kontrol (SK) alındı. $\gamma\delta$ ve CD4⁺ T hücrelerinin yüzeyinde CD161, CCR6 ve IL-23R araştırıldı. Ayrıca $\gamma\delta$ T hücrelerinin sitotoksik aktivitesi CD107a ve CD16 belirteçleri ile ölçüldü. Periferik kan mononükleer hücreleri (PKMH) içerisindeki $\gamma\delta$ ve CD4⁺ T hücreleri, interlökin (İL)-17A, interferon (İFN)- γ ve İL-22 salgılarına göre değerlendirildi.

BH'de IL-17A salgılayan $\gamma\delta$ T hücrelerinin fenotipik belirteçlerinde bir artış bulunmadı. İL-17A (%0,2), IFN- γ (%2,1) ve İL-22 (%0,1) salgılayan $\gamma\delta$ T hücreleri BH'de SK'lara göre artmıştı (p= 0,001, p= 0,01 ve p= 0,006). BH'de *in vitro* $\gamma\delta$ T hücre artış oranının SK grubuna göre artışı gözlemlendi (p= 0,001). Uyarı ile CD107a oranı BH ve SK arasında değişmezken, CD16 oranı BH grubunda SK grubuna göre yüksek bulundu (p= 0,004).

CD4⁺ T hücrelerinde CD161⁺ (p= 0,012), CCR6⁺ (p= 0,013) ve CD161⁺CCR6⁺ (p= 0,006) BH grubunda artış gösterdi. CD4⁺ T hücrelerinde IL-17A⁺ (p= 0,002), IL-17A⁺IFN- γ ⁺ (p= 0,024) hücreleri de BH grubunda SK'ya göre artmış bulundu.

İL-23 reseptörü (R) polimorfizminde G aleli taşıyan sağlıklı donörlerin CD4⁺ T hücrelerinde IFN- γ ⁺ (p= 0,049), IL-17A⁺IFN- γ ⁺ (p= 0,027) IL-22⁺IFN- γ ⁺ (p= 0,015) oranı, G aleli taşımayanlara göre artmış bulundu.

Bu bulgular BH'de gözlenen inflamatuvar sitokin aktivitesinde CD4⁺ T hücrelerinin yanı sıra $\gamma\delta$ T hücrelerinin de rolü olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Behçet hastalığı, $\gamma\delta$ T hücresi, İFN- γ , İL-17A, sağlıklı kontrol

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından (Proje No: 34349) desteklenmiştir.



ABSTRACT

Abbasova, V. (2014). IL-17A, IL-23R and IFN- γ relevance in Behcet disease. Istanbul University, Institute of Health Sciences, Department of Immunology. Graduate Thesis. İstanbul.

The role of $\gamma\delta$ T cells is implicated in Behcet's disease (BD). The possible role of $\gamma\delta$ T cells in IL-17 related mechanisms is evaluated in BD.

The study population consisted of 25 BD patients and 25 healthy controls (HC). Phenotypic features are investigated by CD161, CCR6, IL-23R molecules on CD4⁺ T cells. In addition, the cytotoxic markers as CD16 and CD107a were determined on $\gamma\delta$ T cells. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) are stained intracellularly for IFN- γ , IL-17A and IL-22 in $\gamma\delta$ T cells and CD4⁺ T cells.

Although phenotypical markers for IL-17 producing T cells were not increased in BD, the proportions of IL-17A (0,2%), IFN- γ (2,1%) and IL-22 (0,1%) producing $\gamma\delta$ T cells were elevated in BD ($p=0,001$, $p=0,01$ and $p=0,006$). $\gamma\delta$ T cells proliferated in vitro more than HC ($p=0,001$), whereas induction of CD107a did not increase with stimulation, CD16 expression in these cells stay higher in BD than HC ($p=0,004$).

CD161⁺ ($p=0,012$), CCR6⁺ ($p=0,013$) and CD161⁺CCR6⁺ ($p=0,006$) on CD4⁺ T cells were increased in BD. IL-17A⁺ ($p=0,002$), IL-17A⁺IFN- γ ⁺ ($p=0,024$) producing CD4⁺ T cells were higher in BD patients compared to HC.

In HC, IFN- γ ⁺ ($p=0,049$), IL-17A⁺IFN- γ ⁺ ($p=0,027$), IL-22⁺IFN- γ ⁺ ($p=0,015$) proportions of CD4⁺ T cells were higher carrying G allele of IL-23R polymorphism than non-carriers.

These findings demonstrated that $\gamma\delta$ T cells as well as CD4⁺ T cells have a role of inflammatory cytokine activity in BD.

Key Words: Behcet disease, $\gamma\delta$ T cell, IFN- γ , IL17A, healthy control

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 34349



1. GİRİŞ VE AMAÇ

BH nörolojik tutulum, tekrarlayan oral ve genital ülserler, artrit, deri lezyonları, oküler ataklar ile tanımlanan kronik, inflamatuvar bir hastalıktır. Ataklarla gelişen hastalığın etyopatogenezi açıklanamamıştır. BH multifaktoriyel bir hastalık olarak kabul edilmektedir. Genetik yatkınlığı olan kişilerde çevresel koşulların etkisiyle hastalığın tetiklendiği ileri sürülmektedir.

CD4⁺ T hücrelerin alt gruplarından özellikle yardımcı T hücresi (Th) 1, Th17 ve Th22 gruplarının BH gelişiminde rolü olduğunu gösteren çok sayıda çalışma bildirilmiştir. Ayrıca insanda periferik kan CD3⁺ hücreleri içerisinde %5 oranında bulunan $\gamma\delta$ T hücrelerinin (CD3⁺CD4⁻CD8⁻) de BH'de rolü olduğu düşünülmektedir. $\gamma\delta$ T hücreleri mukozal immünitede rol oynamaktadır. BH'de mukozal lezyonların oluşması, $\gamma\delta$ T hücrelerinin bu hastalıkla ilişkisine işaret etmektedir.

Bu çalışmada, BH'de $\gamma\delta$ T ve CD4⁺ T hücrelerinde hücre içi İL-17A, İFN- γ ve İL-22 ekspresyon düzeyleri ölçülmüş ve yüzey belirteci olarak CD161, CCR6, İL-23R, CD45RO incelenmiştir. $\gamma\delta$ T hücrelerinin sitotoksik aktivitesini ölçmek amacıyla bu hücrelerin yüzeyinde CD16, CD107a molekülleri değerlendirilmiştir.

Ayrıca BH ile ilişkisi gösterilen bir İL-23R polimorfizminin İL-17 salgısına olası etkisini araştırmak için donörler İL-23R'nin genotiplerine göre (AA, AG ve GG) ayrılarak incelenmiş, CD4⁺ T ve $\gamma\delta$ T hücrelerinde hücre içi sitokin seviyeleri gruplar arası karşılaştırılmıştır.

Böylece BH etyopatogenezi ve takibinde yardımcı olabilecek değişkenliklerin tanımlanması sağlanmış, bu değişikliklerin BH'de immün disregülasyonundan sorumlu olabileceği düşünülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Behçet Hastalığı

BH tekrarlayan oral aft, genital ülser, üveit ve deri lezyonları ile karakterize inflamatuvar bir hastalıktır. BH deri-mukoza ve göz dışında eklemleri, merkezi sinir sistemini, gastrointestinal sistemi, akciğerleri, her çeşit ve büyüklükteki damarları da etkileyebilen sistemik bir vaskülit olarak kabul edilmektedir [1].

BH, Prof. Dr. Hulusi Behçet tarafından 1937 yılında, tekrarlayan oral ve genital ülserasyonlar ile hipopiyonlu üveitten oluşan üçlü semptom kompleksi olarak tanımlanmıştır. Ancak hastalığın tarihçesi Hipokrat'a kadar uzanmaktadır. Hipokrat M.Ö. 450'deki yazılarında BH'ye benzer klinik bulguları olan olgulardan söz etmektedir. İlk kez Prof. Dr. Hulusi Behçet bu bulguların tek bir hastalığa bağlı olabileceğini bildirmiştir. Yaptığı patolojik, anatomik ve mikrobiyolojik çalışmalarla, daha çok viral etiyoloji üzerinde durmuştur.

BH, akut alevlenme ve iyileşme dönemleri ile kronik seyir gösteren bir hastalıktır. Vasküler, santral sinir sistemi, pulmoner hastalık gibi ciddi komplikasyonlara ve mortaliteye erkeklerde daha sık rastlanır [2]. Hastalık sıklıkla 20-30 yaşlarında başlamaktadır. Oral aftöz ülserasyonlar hastalığın başlangıç bulgusu olarak tanımlanmaktadır. Oküler lezyonlar, genital ülserasyonlar, deri lezyonları (özellikle eritema nodosum), artropati, nörolojik belirtiler ve damar tutulumları hastalığın diğer bulguları olarak sıralanabilir. Hastalığın mortalitesi ilk 5 yılda % 0-6,3 arasında değişmektedir [3]. BH'nin tedavi modelleri semptomlara yönelik oluşturulmaktadır. Tedavi seçenekleri hastanın klinik bulgularına göre değişkenlik göstermektedir.

2.1.1. Epidemiyoloji

BH başlıca Akdeniz çevresindeki ülkelerde, Ortadoğu ve Uzakdoğu'da görülmektedir. Sıklığı Türkiye'de 80-300/100.000 ve Japonyada 13-30/100.000 bulunmuştur. Erkek/kadın dağılımı (E:K) Japonya, Akdeniz ülkeleri ve Ortadoğu'da erkekler lehinedir [4]. Buna karşılık ABD ve Kuzey Avrupa ülkelerinde bu oran yaklaşık 1:2 olarak kadınlar lehinedir. Göz tutulumu, nörolojik tutulum, kardiyovasküler tutulum kadınlarda daha seyrek iken, cilt lezyonları daha ön plandadır. Başlangıç yaşı genelde 3.

dekattır ve başlangıç yaşı prognostik faktörler arasında yer alır. Erken yaşta başlangıç (özellikle de 25 yaş altı) kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir [5, 6].

2.1.2. Genetik Yatkınlık

BH'nin multifaktöryel bir hastalık olduğu ve güçlü bir genetik yatkınlık gerektirdiği, ancak birçok çevresel faktör tarafından da etkilendiği kabul edilmektedir [7]. Aile yükü ve HLA-B51 ile ilişki genetik faktörlerin ana göstergesidir. BH'de immunolojik değişikliklerle ilgili pek çok kanıt bulunmasına rağmen, bunların patogenezdaki rolü tam olarak açıklanamamaktadır. Yapılan aile çalışmaları BH'nin genetik bir risk ile ilişkisi olduğunu göstermiştir. Genetik geçiş birden fazla faktöre bağlıdır [8].

HLA-B51, 6. kromozomda majör histokompatibilite kompleksinde (MHC) kodlanır ve BH ile ilişkilendirilmiş en kuvvetli genetik faktördür [9, 10]. Türkiye ve Japonya'da diğer beyaz ırka oranla daha sık birliktelik göstermektedir [11]. MHC lokusu üzerindeki diğer genler (MHC sınıf I ilişkili gen (MICA) ve TNF genleri) üzerinde de çalışmalar yapılmış, ancak bu genlerin etkilerinin *HLA-B51* ile bağlantı dengesizliğine (linkage disequilibrium) bağlı olarak geliştiği ileri sürülmüştür [12]. MHC bölgesi dışında kalan diğer birçok genin BH patogenezinde rolü olabileceği düşünülmüştür [13-15].

Türkiye popülasyonunda yapılan bir genom çaplı ilişkilendirme çalışmasında (Genome wide association study, GWAS) çalışmasında 1215 Behçet hastası ve 1278 sağlıklı kontrolde 311459 otozomal tek nükleotid polimorfizmi (TNP, SNP) taranmış ve *HLA-B*, *HLA-A*, *IL10*, *IL23R-IL12RB2* gen bölgelerinin BH ile ilişkisi gösterilmiştir [16]. Japonya'da yapılan benzer bir çalışmada *HLA-B51*'in BH ile ilişkisinin yanı sıra HLA bölgesinde *HLA-B*, *HLA-A*, non-HLA bölgesinde ise *IL10* ve *IL23R-IL12RB2* ile anlamlı ilişkisi ortaya çıkmıştır. Çin'de yapılan bir çalışmada ise *İL-23-İL-23R-İL-17A* yolağının BH'deki rolü ele alınarak *İL-23R* polimorfizminin (rs17375018) hastalıkla ilişkisi araştırılmıştır [17]. *İL-23R* polimorfizminin BH ile güçlü ilişkisini gösteren bu çalışmadan yola çıkarak yaptığımız bir araştırmada, *İL-23R* geninde aynı TNP'nin (rs17375018) *HLA-B51*'den bağımsız olarak BH ile ilişkisi gösterilmiştir (yayın aşamasında).

2.1.3. Tanı

BH'ye özgül bulgu ve semptomlar yoktur. Uluslararası Behçet Hastalığı Çalışma Grubu'nun 1990 yılında tanımladığı kriterler [18]. %91 duyarlılık ve %96 özgüllük ile yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.1.4. Klinik

BH'nın tekrarlayan oral aft, genital ülserler ve iridosiklit üçlü semptom kompleksi ile tanımlanmasından sonra geçen sürede farklı organların tutulduğu bir klinik spektruma sahip olduğu gözlenmiştir. Hastalığın klinik bulguları mukokutanöz, kas-iskelet, oftalmolojik, vasküler, merkezi sinir sistemi ve diğer organ tutulumlarını içermektedir. Hastalığın en sık başlangıç semptomu hemen tüm dünyada oral ülser olarak bildirilmiştir (%47-86). Yine genital ülser (%0-18) ve deri belirtilerinden özellikle eritema nodozum benzeri lezyonlar (%0-19) başlangıç semptomu olarak saptanabilmektedir. Deri paterji reaksiyonu hastalığa özgü bir bulgudur. Ancak coğrafik olarak belirgin farklılıklar göstermekte ve pozitifliği toplumdan topluma değişmektedir [5, 18-20].

2.2. İmmünopatogenez

BH'de immün yanıt ve inflamasyon söz konusudur. Th1, Th17 ve Th22 hücrelerinin BH gelişiminde önemli rolü olduğu gösterilmiştir. Herpes simplex virüsü (HSV) ve *Streptococcus sangius* başta olmak üzere birçok mikroorganizmanın etiyolojide rol aldığı düşünülmektedir [9, 21]. Ancak etiyolojik ajan olarak tek bir mikroorganizma olduğunu gösterir kuvvetli bir kanıt bulunmamaktadır. Enfeksiyon ajanlarının rolü ile ilgili kabul gören teorilerin başında, mikroorganizma antijenlerinin insan proteinleri ile yüksek derecede benzerlik göstermeleri ve çapraz reaksiyonun (moleküler benzeşme) immün yanıtı neden olmasıdır [9, 22]. BH'de serumda İL-1, İL-4, İL-6, İL-8, İL-10, İL-13, İL-18 ve TNF- α gibi sitokin düzeylerinde artış gösterilmiştir [23, 24].

2.2.1. $\gamma\delta$ T Hücreleri

$\gamma\delta$ T hücrelerinin otoimmünitede rolü olduğunu gösteren çok sayıda çalışma vardır [25, 26]. T hücrelerinin bir alt grubu olan $\gamma\delta$ T lenfositleri, enfeksiyonlar ve bakteri kaynaklı otoimmünitenin gelişiminde rol alır. $\gamma\delta$ T hücreleri (CD3⁺CD4⁻CD8⁻) insanda periferik kandaki CD3⁺ hücreler içerisinde %5 oranında bulunur. $\gamma\delta$ T hücreleri mukozal immünitede rol oynar, genel olarak barsak epitelinde bulunur ve 'intra-epitelyal lenfositler' olarak da adlandırılır. BH'de mukozal lezyonlar oluşur ve bu alanlarda $\gamma\delta$ T

hücrelerinin oranı sağlıklı donörlere göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir [27]. Bu hücreler kalıp tanıma reseptörü (PRR) sinyallerine hızlı cevap verme yeteneğine sahiptir. $\gamma\delta$ T hücrelerinin edinsel ve doğal immün yanıt arasındaki bağlantıyı sağladığı ileri sürülmektedir. $\gamma\delta$ T hücreleri tarafından salgılanan sitokinler, $\alpha\beta$ T hücrelerini etkilemektedir. Aktiflenmiş $\gamma\delta$ T hücreleri yardımcı T hücreleri gibi bazı sitokin ve kemokinleri eksprese ediyorlar. Mesela, sitokinlerden İFN- γ , TNF- α (Th1), İL-4 (Th2), İL-17 (Th17) [28].

İnsanda ve farede $\gamma\delta$ T hücrelerinin İFN- γ ve İL-17A salgılamasını, aynı zamanda otoimmün hastalıklarda rolünü gösteren çalışmalar mevcuttur [29, 30]. Bazı fare çalışmalarında, $\gamma\delta$ T hücrelerinin, İL-17'nin önemli bir kaynağı olduğu gösterilmiştir. Fare $\gamma\delta$ T hücreleri İL-23 ve İL-1 β ile kültür edildiğinde, Th17'ye benzer özellik kazanarak İL-17A, İL-22 ve İL-21 sentezlemektedir [31].

Erişkin sağlıklı donörlerde periferik kan $\gamma\delta$ T hücre grubunun büyük kısmı V γ 9 T hücre reseptörü (THR) taşıyan hücrelerdir [32]. Neonatal $\gamma\delta$ T hücrelerine fosfoantijen (zoledronat) ve İL-23 uygulanması ile İL-17⁺İFN- γ ⁺ V γ 9 T hücre oranı yükselir [33]. İL-17⁺ salgılayan V γ 9 T hücreleri, yüzeylerinde CCR6 kemokin reseptörünü taşır. Ayrıca bu hücreler İL-22 ve İFN- γ 'ı sentezlemektedir [34]. $\gamma\delta$ T hücreleri ve alt grupları, otoimmün hastalıklarda mikrobiyal patojenlere karşı immünolojik yanıt oluşturabilmektedir [34].

2.2.2. BH'de $\gamma\delta$ T Hücreleri

BH'de mukozal membranda ve periferik kanda $\gamma\delta$ T hücrelerinin arttığı bulunmuştur [35] [36]. Hastaların $\gamma\delta$ T hücreleri kültürde mikobakteriyel ısı şok proteini (HSP) peptitleri ve oral ülserlerden elde edilen mikroorganizmaların ürünleri ile çoğaldıkları gösterilmiştir [37]. Behçet hastalarında $\gamma\delta$ T hücrelerinin CD25, CD29 ve CD69 aktivasyon belirteçlerini eksprese ettikleri, aktiflenmiş bir fenotipe sahip oldukları ve İFN- γ , TNF- α ve İL-8 gibi inflamatuvar sitokinler ürettikleri saptanmıştır. Verjans ve ark. yaptığı bir çalışmada, üveiti olan hastaların ön kamara sıvılarında V γ 9 T hücrelerinde artış tespitlenmiştir [38]. Bir $\gamma\delta$ T hücrelerinin başka bir alt grupunu oluşturan V γ 2 THR taşıyan hücreler inflamatuvar sitokinlerden İFN- γ 'yı fazla salgılamaktadır [13, 39]. Parlakgöl ve ark. yaptığı bir çalışmada ise $\gamma\delta$ T hücrelerinin değil, CD16⁺ olan TCRV δ 2 hücreler BH ve SK arasında artış göstermiştir (70). Bu bulgular, $\gamma\delta$ T hücrelerinin ve alt

gruplarının BH immünopatogenezinde ve hastalık gelişimde önemli hücre grubu olduğunu düşündürmektedir.

2.2.3. Th1, Th17 ve Th22 Hücreleri

Naif T lenfositleri ürettikleri sitokinlere göre Th1, Th2, Th9, Th17 ve Th22 hücrelerine dönüşür. $CD4^+$ T hücre alt gruplarının otoimmün hastalıkların patogenezinde önemli olduğunu gösteren çalışmalar vardır. Bazı yayınlar BH'nin özellikle Th1, Th17 ve Th22 ile ilişkisini göstermektedir [40, 41].

2.2.3.1. Th1

Th1 hücrelerinin otoimmün hastalıklarda rolü kanıtlanmıştır. Th1'e yönelik sitokinler olan İFN- γ ve İL-2 hastaların periferik kanında hastalık aktivitesiyle ilişkili olarak artmaktadır [42, 43].

İFN- γ , tümör kontrolünde ve hücre içi bakteriyel ve viral enfeksiyonlara karşı doğal ve edinsel immünitede kritik rol oynar. İFN- γ , makrofajlar için önemli bir aktivatördür. İFN- γ ekspresyonundaki yükselme, otoimmün ve oto-enflamatuvar hastalıklarla ilişkilidir. İmmün sistemde İFN- γ 'nın önemi, viral replikasyonu doğrudan inhibe etmesi ve en önemlisi immün-uyarıcı ve immün-düzenleyici etkilerinin olmasıdır. İFN- γ baskın olarak NK ve NKT hücreleri ve antijen-spesifik immün yanıtın parçası olan $CD4$ Th1 ve $CD8$ sitotoksik T lenfositleri (CTL) tarafından üretilmektedir.

2.2.3.2. Th17

Th17, İL-17 salgılayan ve inflamatuvar otoimmün hastalıklarda rolü olan bir hücre grubudur. Bu hücre grubu TGF- β , İL-1 β , İL-6, İL-21, İL-23 gibi proinflamatuvar sitokinler etkisiyle farklılaşabilir. İL-17A, İL-17F, İL-26 sentezleyen Th17'ler, Th22 gibi İL-22 ve Th1 gibi İFN- γ de salgılayabilir [44]. Th17'lerin plastisite/dönüşüm özellikleri de vardır. İL-17 sentezleyen Th17 hücrelerinin İFN- γ^+IL17^+ hücrelere dönüşebildiklerini gösteren çalışmalar bildirilmiştir [45].

İnsan Th17 hücreleri İL-23R moleküllerini yüzeylerinde eksprese eder. İL-23'ün T hücrelerinin yüzeyinde bulunan İL-23R'e bağlanması sonucunda bu hücrelerden İL-17 salgılanmaktadır. İL-23, reseptörüne bağlandığı zaman İL-17'nin ekspresyonu gerçekleşir [46]. İL-23, $\gamma\delta$ T hücreler, doğal öldürücü hücreler (NK), mast hücreleri, lenfoid doku hücreleri ve diğer miyeloid hücreler (ör. nötrofiller) tarafından sentezlenir. İL-23, Th17 hücre yollarının aktiflenmesinde önemli faktördür [47].

İL-17 ailesi, A-F alt sınıflarından oluşur. $\gamma\delta$ T hücreleri, aktif $CD4^+$ T ve NK, lenfoid doku hücreleri tarafından salgılanır. Monosit ve nötrofillerin inflamasyon bölgesine göç etmesini sağlar. İL-17 salgılayan hücrelerin bir kısmı da $\gamma\delta$ T hücreleridir. İL-17, bakteri ve mantarlara karşı mukozal immünitede rol oynar. İL-17A salgılayan hücrelerin yüzeyinde CD161 molekülü ya da CCR6 kemokin reseptörü bulunduğu bildirilmektedir. CCR6 bu hücreleri inflamasyon bölgesine çekme görevini yapar [48]. S. Kagami ve ark. Th17 hücrelerini Th1 hücrelerinden ayırabilecek özel bir belirteç olmadığını bildirmiştir. Fakat CCR6 molekülü dolaşımda olan İL-17A⁺ hücrelerin % 86'sında, İFN- γ^+ hücrelerin ise çok az bir kısmında eksprese edildiğinden Th17'leri Th1'lerden ayırmak için kullanılabilen bir belirteçtir. CD161 ve İL-23R dolaşımdaki Th17'lerin yüzeyinde az eksprese olurken, Th1'lerin yüzeyinde ise daha da düşük miktarda ekspresyon gösterir. Buna dayanarak CD161 ve İL-23R Th17 için ayırıcı bir belirteç kabul edilmemektedir. CCR6 molekülünün hücre içi sitokinlerle kombine edilmesiyle Th17 ve Th1 hücreleri için daha net bir ayırım mümkün olmuştur [48].

BH'de naif $CD4^+$ T hücreleri ($CD4^+CD45RO^-$), Th1 ve Th17 hücre sitokinleri ile kültür edildiklerinde İL-17A m-RNA'sının arttığını gösterilmiştir [49].

2.2.3.3. Th22

Th22 hücreleri son dönemde tanımlanmış bir $CD4^+$ T lenfosit alt tipidir. 2009 yılında, bol miktarda İL-22 salgılayan, Th17 hücrelerinden farklı tipte bir CD4 T hücre alt tipi olarak Trifari ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. İL-22'nin kaynağının bu T hücre tipi ve Th17 olduğu anlaşılmıştır [50]. Bu efektör T hücrelerinin inflamatuvar kapasitesinin olduğu kanıtlanmıştır. Th22 hücreleri İL-22 ve TNF- α salgılamaktadır. Th22 hücreleri Th1, Th2 ve Th17 hücrelerinden bağımsız yollarla gelişir [50, 51].

İL-22, İL-10 ailesi üyelerinden bir sitokindir. İL-22, insanda aktif Th17, Th22 ve NK tarafından üretilir. İL-22 deride keratinosit proliferasyonuna ve epidermal hiperplaziye neden olur. Ayrıca dokunun yeniden yapılanmasında gerekli olan kemokinlerin ve antimikrobiyal peptidlerin salgılanmasını sağlar. Bazı çalışmalarda, bu sitokinin İL-17 ile beraber Th17 tarafından salgılandığı gösterilmişse de ana üretici hücre grubu Th22 kabul edilmektedir [52]. İL-22 salgısının psöriasis, Crohn, romatoid artrit (RA), Sjögren sendromu ve sistemik lupus eritematozus (SLE) gibi otoimmün hastalıklarında artışı bildirilmiştir [53].

İL-22R İL-22R tip 1 ve İL-10R alt birimlerinden oluşmaktadır ve genellikle hematopoetik olmayan hücrelerin yüzeyinde, özellikle epitelyal hücrelerde olmak üzere, pankreasta, barsak dokusunda, karaciğerde bulunmaktadır [54]. Th22 hücreleri, Th17 hücrelerinden farklı olarak sadece İL-22 salgılamaktadır. Th17 hücreleri ise İL-22'nin dışında İL-17, İL-4, İFN- γ salgılamaktadır [55]. Th17 hücrelerinin farklılaşması RORC üzerinden olurken, Th22 hücrelerinin farklılaşması aril hidrokarbon reseptörü (AHR) vasıtasıyla olmaktadır. AHR aktivasyonu İL-22 salgılanmasını uyarırken, İL-17 salgılanmasını inhibe eder [56]. Th22'ler Th17 hücrelerinden farklı olarak CCL20 eksprese etmezler [57]. Th22 hücreleri, CD3, CD4 belirteçlerini yüzeylerinde eksprese ederken doğal öldürücü hücrelerin ve CD8 hücrelerin belirteçlerini eksprese etmez. Th22 hücreleri ayrıca CCR4, CCR6 ve CCR10 reseptörlerini üzerinde taşır. Bu hücreler CCR4 ve CCR10 reseptörlerini kullanarak cilde yerleşebilmektedir [58, 59]. Th22 hücreleri için CCR4 ve CCR10 yüzey belirteçleri ve İL-17A İL-22⁺İFN- γ hücre içi sitokinleri ayırıcı faktör olmaktadır. Th22'ler Th2'den farklı olarak İL-4 ve Th1'den farklı olarak ise İFN- γ sentezlemezler. Bu özellikleri ile Th22 hücreleri Th17, Th1 ve Th2'den farklıdır [48].

2.2.4. BH'de Th1, Th17 ve Th22 Hücreleri

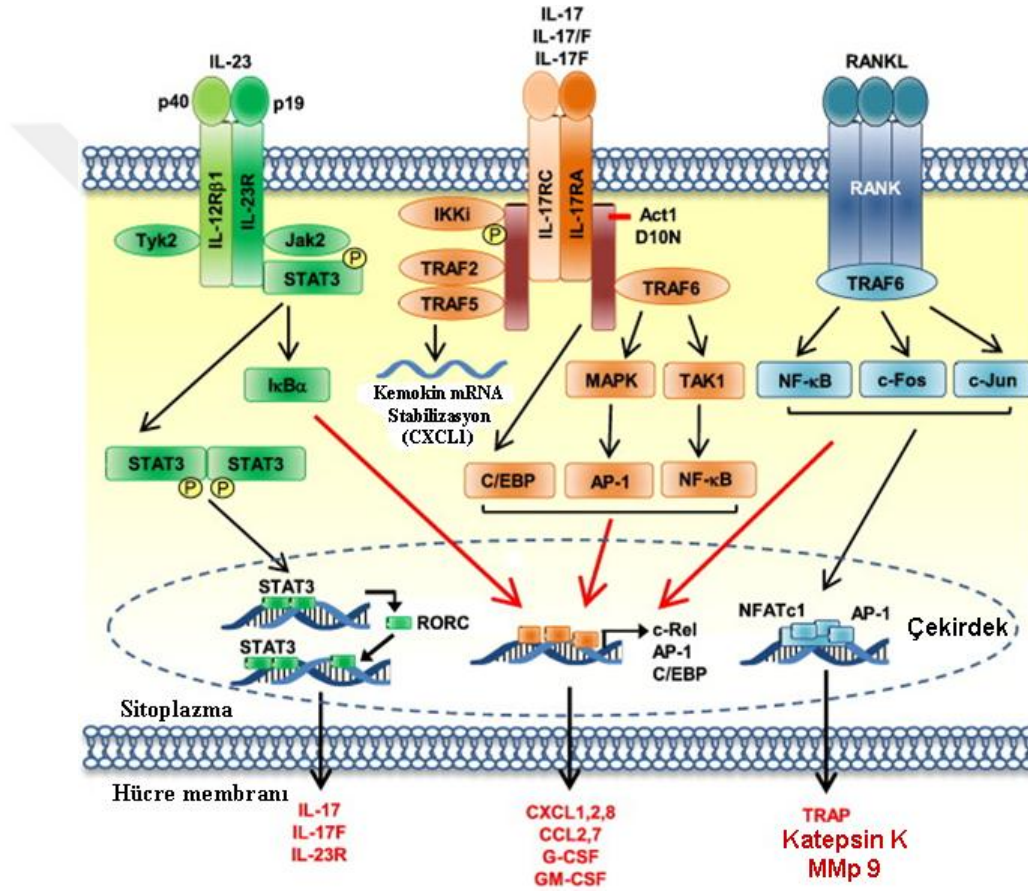
T hücre yanıtı BH'deki doku hasarında önemli rol oynar. Yapılan bir çalışmada aktif BH Periferik kan mononükleer hücreleri (PKMH) üst sıvılarında ve BH lezyonlarında Th1 sitokinleri olan İFN- γ , İL-12, İL-18'in arttığı gösterilmiştir [42, 60-62].

Aktif üveitli hastaların serum ve hücre üst sıvılarında Th17 ile ilişkili olan İL-6, İL-23 ve İL-17 ekspresyonlarının da arttığını gösteren çalışmalar yayınlanmıştır. İL-17 salgısındaki artışın BH aktivitesiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Aktif BH'de PKMH ve eritema nodosum (EN) dokusunda İL-23 ve İL-17'nin mRNA düzeyinde artış bulunmuştur [63]. Th17'nin ve İL-22'nin de BH'de rol oynadığı gösterilmiştir. Aktif üveitli hastaların CD4⁺ hücrelerinde ve deri EN'da İL-22 m-RNA düzeyi artmış bulunmuştur [64].

PKMH'de İL-22'yi sentezleyen esas hücre grubu aktif CD4⁺ hücreler iken bu hücrelerin sadece %31-41'inin aynı zamanda İL-17 sentezlediği bildirilmiştir [65]. BH ve otoimmün üveitli hastalarda, serum ve kültür üst sıvısında (PKMH ve CD4⁺ T hücre) İL-22'nin düzeyinde artış saptanmıştır. Ayrıca İL-22'nin inflamatuvar cevabı tetiklediği ve hastalık aktivitesiyle ilişki gösterdiği bildirilmiştir.

2.3. İL-23R, İL-23 ve İL-17 İlişkisi

Hücrelerde İL-17'nin üretimi, İL-23'ün İL-23R'ye bağlanması ve buna bağlı olarak STAT3 ve STAT4 yollarının aktive olması ile gelişmektedir. İL-23, İL-12 ile ortak olan İL12p40 ve İL23p19, İL-23R ise İL12Rβ1 ve İL-23R alt ünitelerinden oluşmaktadır[66, 67]. Bu sitokin miyeloid, epitelial ve endotelial hücrelerde üretilmekte ve İL-23R üzerinden sinyal iletmektedir (Şekil 2.3). Şekil 2.3'te İL-23'ün reseptörüne bağlanması sonucunda hücreiçi Jak2, STAT3 yolları üzerinden İL-17A'nın salgılanması mekanizması gösterilmiştir.



Şekil 2.3: İL-23, İL-23R ve İL-17A ilişkisi [66].

2.3.1. İL-23R Polimorfizminin İşlevsel Etkisi

İL-23R geni 1. kromozomun kısa kolunda (1p31) bulunmaktadır. İL-23R polimorfizminin Crohn hastalığı, RA, ankilozan spondilit (AS) gibi otoimmün

hastalıklarla ilişkisi önceki araştırmalarda tespit edilmiştir. Bu hastalıklarda İL-23'ün İL-23R ile bağlanarak İL-17 sentezini arttırdığı ileri sürülmektedir.

AS hastalarının kanında yapılan bir çalışmada, İL-23R eksprese eden T hücrelerinin, SK'ya göre 2 kat artmış olduğu gözlemlenmiş, İL-23R artışının $\gamma\delta$ T hücrelerinden kaynaklandığı saptanmıştır. İL-17⁺ olan CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinde İL-23R ekspresyonu artmazken, $\gamma\delta$ T hücrelerinde artan ekspresyon, İL-17 salgısındaki artış ile ilişkili bulunmuştur. Ayrıca İL-23R taşıyan, fakat $\gamma\delta$ olmayan T hücrelerinde İL-17 salgısı gözlemlenmemiştir. İL-17 salgılayan $\gamma\delta$ T hücrelerinin artışı AS ve psöriasis hastaların lezyonlarında da bulunmuş, bu hücre grubunun AS hastalığıyla kuvvetli bir ilişkisi olduğu bildirilmiştir [29].



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Olgular

3.1.1. Behçet Hastaları

BH tanı kriterlerine göre [18] tanı konan, aktif dönemde olan, immünosupresif tedavi alan ve almayan hastalar çalışmaya dahil edildi. Oral aft, genital ülser, deri lezyonu, eklem tutulumu bulguları olan hastalar aktif (ABH) ve bu bulguları göstermeyenler ise inaktif (İBH) olarak değerlendirildi (ABH; 16 ilaçlı ve 9 ilaçsız, İBH; 9 ilaçlı) Tablo 3.1.1.

Çalışmaya dahil edilen hasta grubuna ait periferik kan örnekleri İstanbul Tıp Fakültesi, Romatoloji Bilim Dalı'nda takip edilmekte olan hastalardan alındı ve çalışmanın deneysel aşamaları İstanbul Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı Nöroimmunoloji ve İmmünogenetik Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 06.05.2013 tarih ve 547 sayılı rapor ile onay almıştır. Tüm donörlerin onayları alınarak çalışmaya ait “bilgilendirilmiş gönüllü olur” formları okutuldu ve imzaları alındı.

Tablo 3.1.1: Donör bilgi tablosu.

	BH		SK
	ABH	İBH	
Toplam (N)	16	9	25
Cinsiyet: Kadın/Erkek	5/11	4/5	6/19
Ortalama Yaş	42,6±13,6	36,9±8	43,5±12
Ortanca Yaş	43,5 (20-62)	35 (29-50)	50 (18-63)

3.1.2. Sağlıklı Kontroller (SK)

Herhangi bir otoimmün hastalığı bulunmayan ve hasta gruplarıyla yaş ve cinsiyetleri bakımından uyumlu sağlıklı bireyler çalışmaya dahil edildi. Bireylere çalışmayla ilgili bilgi verilmesinin ardından “Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur” formları imzalatıldı.

3.2. Periferik Kan Mononükleer Hücre (PKMH) Eldesi

Etilendiamintetraasetikasit (EDTA) içeren tüp içerisinde alınan 10 ml periferik venöz kan örneği 1:1 oranında PBS (phosphate buffered saline, fosfat ile tamponlanmış tuz çözeltisi) ile sulandırıldıktan sonra, 50 ml'lik konik tabanlı tüp içerisinde, oda sıcaklığındaki steril fikol (Lymphoprep Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway) üzerine 1:3 oranında eklendi. Fikol ile kan örneğinin ayrı katmanlar halinde kalmasına dikkat edildi. Tüp içindeki örnekler 2200 rpm'de 30 dakika ve +20°C'de santrifüj edildi. Ardından kan-PBS karışımının en üstte kalan plazma kısmı uzaklaştırıldıktan sonra PKMH içeren, fikol ile plazma arasında ince bir tabaka halinde gözlenen beyaz bulutsu katman toplandı. Hücreler bir başka tüpte üzerine 40 ml'ye tamamlanacak şekilde steril PBS çözeltisi eklenerek 1500 rpm'de 15 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Hücreler bir kez daha 10 dakika 1300 rpm'de +4°C'de yıkandı. Yıkama sonrası üst sıvıları uzaklaştırılan PKMH üzerine 2 ml hücre kültürü medyumunu (RPMI-1640 (Gibco, Life Technologies, UK), %10 FBS (Fetal sığır serumu - Gibco, UK), %1 L-glutamin (Gibco, UK), %1 Streptomisin ve penisilin (Gibco, UK)) eklenerek canlı hücreler sayıldı. Bu amaçla, 10 µl PKMH hücre süspansiyonu, 90 µl tripan mavisini boyasıyla karıştırıldı. Tripan mavisinin ölü hücreleri boyama özelliğinden yararlanılarak hücre sayma kamarası (Thoma) yardımıyla ışık mikroskopunda 1 µl'de bulunan canlı PKMH sayısı hesaplandı.

3.3. Hücre Yüzey Molekül Boyaması

Hücre yüzey boyaması için; akım sitometresi tüpüne $3,5 \times 10^5$ PKMH 100 µl boyama tamponu (Staining buffer- PBS içinde %0,2 sığır albumini çözeltisi, BT) içinde eklendi ve aşağıdaki tabloda (Tablo 3.3) gösterilen floresan işaretli monoklonal antikolarla 20 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta boyandı. Ardından PBS ile 1500 rpm'de 10 dakika +4°C'de santrifüj yapılarak yıkandı, üzerine eklenen okuma tamponu (OT, 100 µl Flow sheath ve 100 µl %2 paraformaldehid) içinde akım sitometrisi ile okundu ve hücre gruplarının yüzdesi değerlendirildi.

Uyarılmış hücre yüzey moleküllerini saptamak amacıyla akım sitometresi tüpüne $3,5 \times 10^5$ kültüründen alınan hücre ve 200 μ l BT eklenerek 1300 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra tüplere 100 μ l BT eklenerek PKMH süspansiyonu elde edildi. Ardından hücre yüzey boyaması yapıldı.

Tablo 3.3: Hücre yüzey boyamada kullanılan monoklonal antikorlar

Monoklonal Antikor	Florokorm işareti	Miktar (μ l)	Firma
CD4	FITC	4	Beckman Coulter
CD3	PE	4	Beckman Coulter
$\gamma\delta$ THR	FITC	4	Beckman Coulter
$\gamma9$ THR	FITC	4	Beckman Coulter
CD16	PE-Cy5.5	2,5	Beckman Coulter
CD45RO	PE	4	Beckman Coulter
CD27	PE	4	Biolegend
CD107a	PE	4	BD (Becton Dickenson)
CD161	PE	3	Biolegend
CCR6	PerCp Cy5.5	3	Biolegend
İL-23R	PerCp Cy7.5	3	R&D

3.4. Hücre Kültürü

Hücre içi sitokin üretimi (İL-17A, İL-22 ve İFN- γ) ve sitotoksik aktivite (CD16, CD107a) ölçümleri için PKMH in vitro koşullarda uyarıldı. Bu amaçla uyarılacak PKMH 3 ayrı kuyuda ve her kuyuda 7×10^5 hücre olacak şekilde 96 kuyulu steril kültür plaklarına eklendi. PKMH 4 saat PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), ionomicin ve sitokin salınımını durdurmak amacıyla Brefeldin A varlığında kültüre edildi. Kültür plakları 37°C’de %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi.

Tablo 3.4: Hücre kültüründe kullanılan uyaranlar ve kimyasallar

Uyaran	Kullanım Dozu	Marka
PMA	2,5 µg/ml	Adipogen
İonomycin	25 µg/ml	Santa-Cruz
Brefeldin A	0,5 mg/ml	eBioscience

3.5. Hücre İçi Sitokin Boyaması

Kültürden alınan hücrelere hücre içi sitokin boyaması yapıldı. Bu amaçla fiksasyon ve permeabilizasyon kiti (eBioscience) kullanılarak hücreler akım sitometrik analizinde hücre içi boyama işlemine hazırlandı. Fiksasyon çözeltisi 1X konsantrasyonda olup %4 formaldehit içermekte idi ve hücre yüzeyini sabitlemek amacıyla kullanıldı. Permeabilizasyon çözeltisi ise 10X konsantrasyondaydı ve kullanılmadan önce 1:10 oranında distile suyla sulandırıldı. Permeabilizasyon çözeltisi (1X) %0.1 oranında saponin ve %0.0009 oranında sodyum azid içeriyordu.

Uyarılan hücrelerin üst sıvılar uzaklaştırılıp tüplere 1ml 1X fiksasyon sıvısı eklenerek vorteks yapıldı ve 1 saat karanlıkta +4⁰C'de inkübe edildi. Bu işlemi takiben, tüplere 2 ml 1X yıkama solüsyonu (YS, kit içeriğinden) eklendi ve 2 defa 1300 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra tüplere 100 µl 1X YS eklendi ve anti-İFN γ -PE (BD, 7 µl), anti-İL-17A-PERCPCy7.5 (BD, 3 µl) ve anti-İL-22-PERCPCy5.5 (eBioscience, 3 µl) monoklonal antikorları ile oda sıcaklığında, karanlıkta 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyonu takiben tüplere 2 ml 1X yıkama solüsyonu eklenerek 2 defa 1300 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvılar uzaklaştırıldıktan sonra üzerlerine 400 µl OT eklendi ve akım sitometresinde hücre gruplarının yüzdesi değerlendirildi. Akım sitometresinde tüm deneylerde araştırılan molekülün pozitiflik sınırını belirlemek için FEB (Floresan eksi bir (Fluoresence Minus One)) tüpü kullanıldı. Okumalar 3 renkli FACS Calibur'da (BD) gerçekleştirildi. Veri analizlerinde "Cell Quest" (BD) programı kullanıldı. Tablo 3.5'de PKMH'lerin antikor-florokorm boyama kombinasyonu gösterilmektedir.

Tablo 3.5: Antikor-florokorm boyama kombinasyonu

	ANTİKOR ADI		
#	FL1 (FITC)	FL2 (PE)	FL3 (PerCp)
1	$\gamma\delta$ THR	CD3	İL-23R
2	γ^9 THR	CD27	İL-23R
3	CD4	CD161	CCR6
4	$\gamma\delta$ THR	CD107a	CD16
5	$\gamma\delta$ THR	İFN- γ	İL-17A
6	$\gamma\delta$ THR	İFN- γ	İL-22
7	CD4	İFN- γ	İL17A
8	CD4	İFN- γ	İL-22
9	$\gamma\delta$ THR	CD107a	CD16

3.6. İL23R Genotiplendirmesi

İL-23R polimorfizmi (rs17375018) PRC-RFLP ile saptandı. PCR işlemi, son hacim 25 μ L olacak şekilde, amonyum (NH₄) tamponu, 2 mM MgCl₂, 0,2mM dNTP karışımı, 0,75U Taq (Fermentas), 0,4 μ M primer karışımı kullanılarak yapıldı. Enzimle kesim aşaması (PCR-RFLP) DNA'yı GGCC bölgesinden kesen Hae III enzimi (Fermentas) ve 10x R+ tampon ile (Fermentas) ve H₂O ile gerçekleştirildi. Gece boyu su banyosunda 37⁰C'de inkubasyon yapıldıktan sonra, ürünler %2 agaroz jele yüklenerek, elektroforez tanklarında 100mA, 150kV akım altında 30dakika yürütülerek ultraviyole transillüminatörü ile görüntülendi.

Tablo 3.6: Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihaz	Marka
Santrifüj	Hettich
%5 karbondioksitli etüv	Sanyo
Akım sitometri cihazı	EpicsXL, Coulter

3.7. İstatistik Değerlendirme

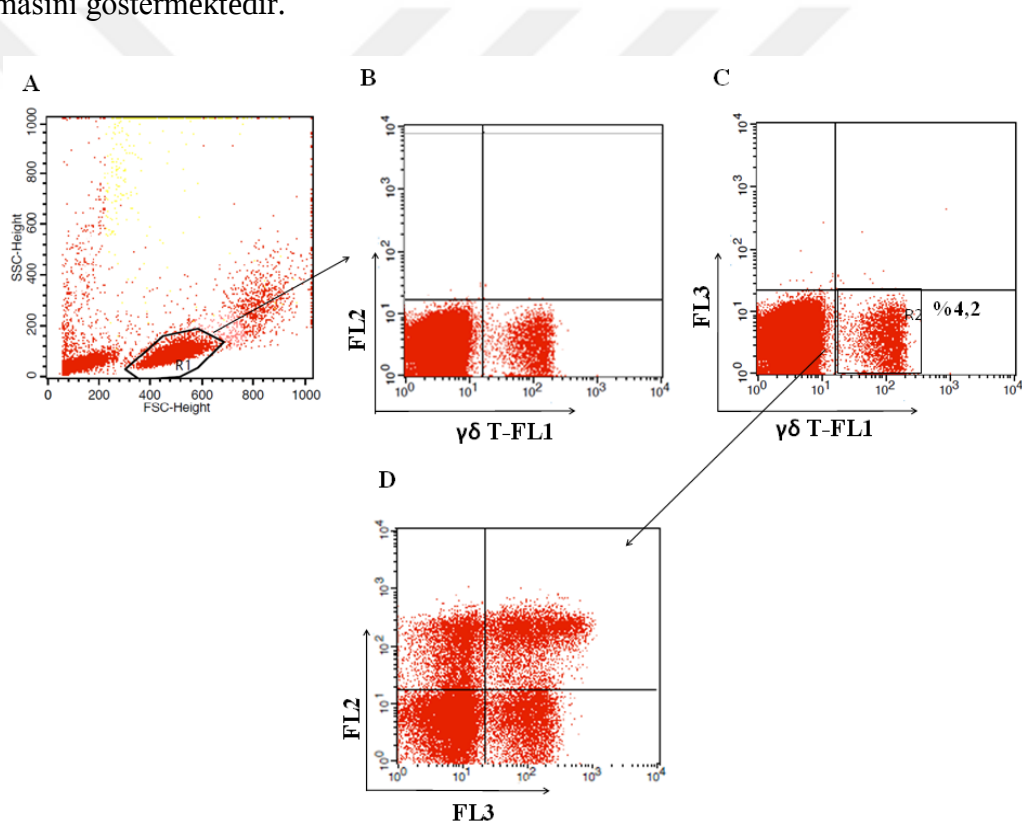
Karşılaştırmalar için parametrik olmayan Mann-Whitney-U testi uygulandı. Analizler SPSS 21.0 programı ile yapıldı. Grafikler için ise GraphPad-Prism5 programı kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık, p değerinin 0,05'den küçük olması olarak tanımlandı. Tüm grafiklerde ortanca ve aralık değerleri gösterildi.

4. BULGULAR

4.1. $\gamma\delta$ T hücreleri

4.1.1. $\gamma\delta$ T Hücrelerinin Fenotipik Değerlendirilmesi

BH’de etkinliği daha önce bildirilen $\gamma\delta$ T hücrelerinin periferik kandaki oranları ve aktivasyon durumlarını belirleyen yüzey işaretlerini saptamak amacıyla BH ile sağlıklı kontrolde lenfosit hücre popülasyonunda akım sitometresi ile inceleme yapıldı. FSC/SSC histogramında, lenfositler kaplandı ve bu kapı içindeki $\gamma\delta$ T hücrelerinin oranları Şekil 4’de gösterildiği gibi değerlendirildi. Şekil 4.1.1 akım sitometrisinde $\gamma\delta$ T hücrelerinin kaplanmasını göstermektedir.

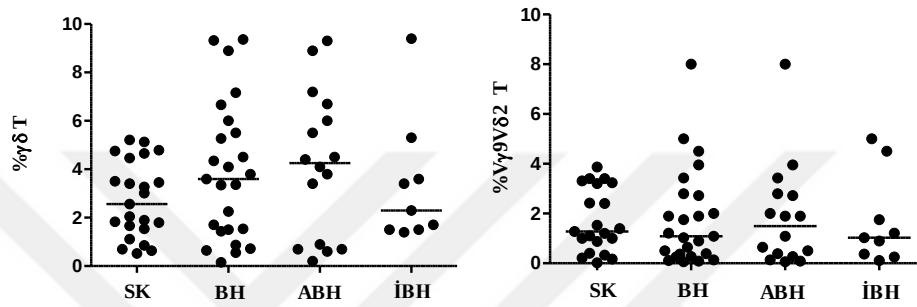


Şekil 4.1.1: $\gamma\delta$ T hücrelerin kaplanması.

A) Lenfosit kapısının seçilmesi (R1). B) $\gamma\delta$ T hücrelerinin kaplanması ile ikinci floresan (FL2) ile işaretli antikor olmayan tüpte negatiflik sınırı belirleme. C) Üçüncü floresan (FL3) ile işaretli antikor olmayan tüpte negatiflik sınırı belirleme. D) İkinci ve üçüncü floresanla (FL2/FL3) boyama örneği

4.1.1.1. $\gamma\delta$ THR Reseptörü Taşıyan Hücrelerin Dağılımı

BH ve SK'larda $\gamma\delta$ T hücrelerinin ve bu hücrelerin ana alt grubu olan $V\gamma 9$ T hücrelerinin değerlendirilmesi için anti-pan $\gamma\delta$ THR ve anti- $V\gamma 9$ monoklonal antikorları ile boyama yapıldı. Çalışmanın bu aşamasına 25 BH (ABH; n=16, İBH; n=9) ve 25 SK dahil edildi. Bu değerlendirmede her 2 hücre grubu dağılımı da SK ve BH grupları arasında anlamlı fark göstermedi (Şekil 4.1.1.1). $V\gamma 9$ T hücrelerinin BH'de % 56, SK'da %70 oranında CD27 pozitif olduğu görüldü (veri gösterilmedi).

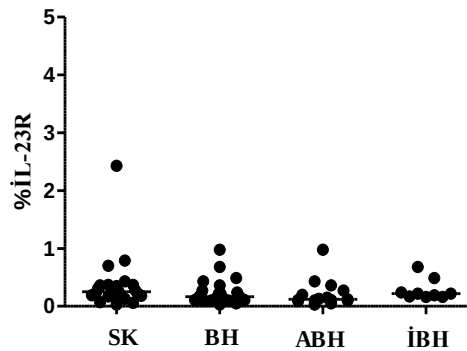


Şekil 4.1.1.1: BH ve SK gruplarında $\gamma\delta$ T ve $V\gamma 9$ T hücre oranları.

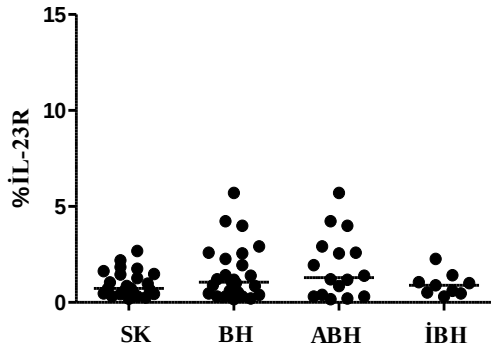
4.1.1.2. $\gamma\delta$ THR Reseptörü Taşıyan Hücrelerde İL-23R Oranı

Otoimmün hastalıklarda $\gamma\delta$ T hücrelerinin İL-17 salgıladığı ileri sürülmüştür. İL-17A salgılayan $\gamma\delta$ T hücrelerinin yüzeyinde İL-23R'nin artmış olduğu AS hastalarında gösterilmiştir [29]. İL-17A eksprese olmasını tetikleyen reseptör olarak İL-23R yüzdesine $CD3^+$ T, $\gamma\delta^+$ T ve $V\gamma 9^+$ T hücrelerinin yüzeyinde bakıldığında, toplam BH ya da ABH ve İBH ile SK arasında fark gözlenmedi (Şekil 4.1.1.2).

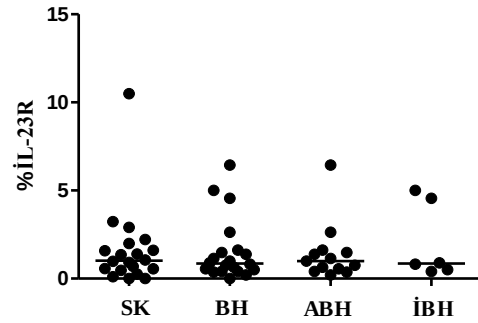
A



B



C



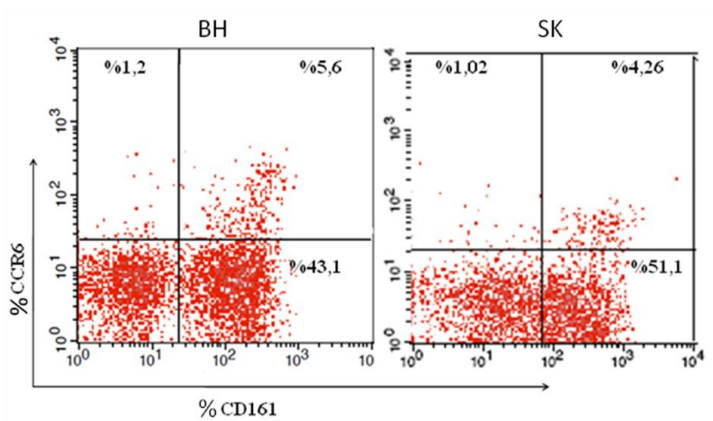
Şekil 4.1.1.2: BH ve SK'da İL-23R pozitifliği yüzdesi.

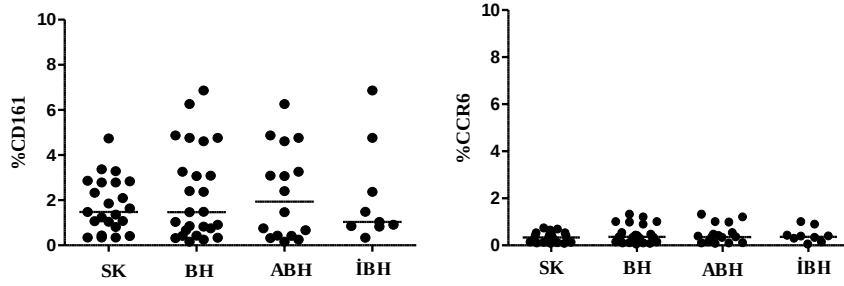
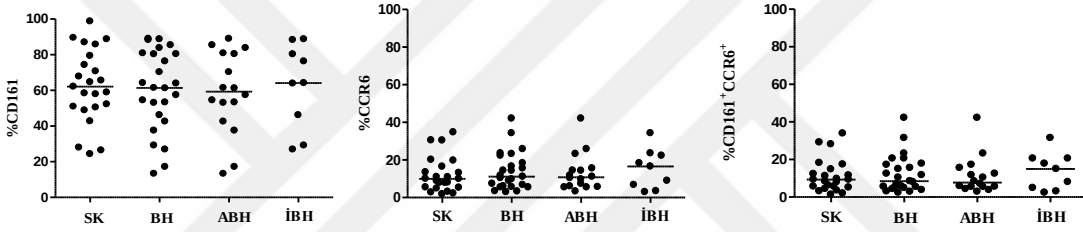
A) $CD3^+$ T, B) $\gamma\delta^+$ T ve C) $V\gamma9^+$ T hücrelerinde İL-23R oranları.

4.1.1.3. $\gamma\delta$ THR Taşıyan T Hücrelerinde CD161 ve CCR6

İL-17A salgılayan hücrelerin yüzey belirteci olarak CD161 ve CCR6 $\gamma\delta$ T hücrelerinin yüzeyinde ölçüldü. Taze kandan elde edilen PKMH monoklonal anti- $\gamma\delta$ T, anti-CD161 ve anti-CCR6 ile boyandı ve akım sitometresi ile değerlendirildi. CCR6, CD161 ya da çift pozitiflik karşılaştırıldı. Bu değerlendirme tüm lenfositler ve $\gamma\delta$ T hücrelerinde ayrı ayrı yapıldı. CD161 pozitifliği CCR6 ya göre daha yüksek oranlarda gözlenirken, hasta ve kontroller arasında anlamlı bir dağılım farkı görülmedi (Şekil 4.1.1.3).

A



B**C**

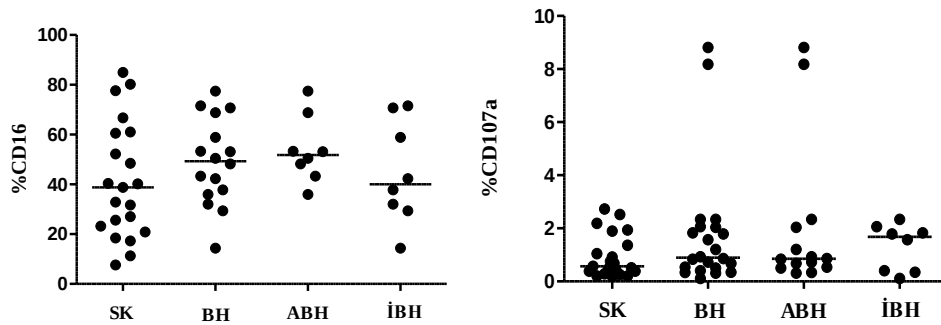
Şekil 4.1.1.3: CD161 ve CCR6 dağılımları.

A) Bir SK ve bir BH örneğinde $\gamma\delta$ T hücre kapısı içindeki CD161⁺CCR6⁺ görüntüsü. B) Lenfosit kapısı içindeki $\gamma\delta$ T hücrelerinde CD161⁺ ve CCR6⁺ oranı. C) $\gamma\delta$ T hücre kapısı içindeki CD161⁺, CCR6⁺ ve CD161⁺CCR6⁺ oranları

4.1.2. $\gamma\delta$ T Hücrelerinin Aktivitesi

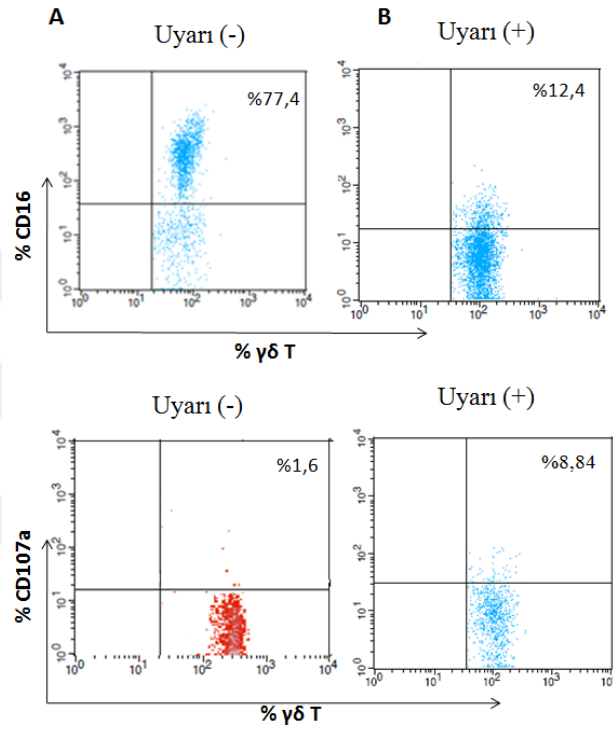
4.1.2.1. $\gamma\delta$ T Hücrelerinin Aktivite Belirteçleri (CD107a ve CD16)

$\gamma\delta$ T hücrelerinin yüzeyinde ex vivo ölçülen sitotoksik aktivite belirteci CD16 ve CD107a, SK ve BH grupları arasında anlamlı bir fark göstermedi (Şekil 4.1.2.1-1).



Şekil 4.1.2.1-1: $\gamma\delta$ T hücre kapısında CD16⁺ ve CD107a⁺ hücrelerinin oranları.

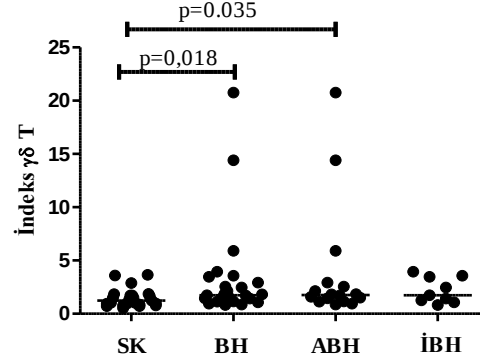
$\gamma\delta$ T hücrelerinin uyarıya yanıtını değerlendirmek üzere PKMH ayrıca PMA ve ionomisin ile 4 saat *in vitro* uyarıldıktan sonra $\gamma\delta$ T hücrelerinin yüzeyinde uyarı sonrası CD16 ve CD107a ekspresyonları da ölçüldü. Uygulanan uyarı ile CD16 yüzey ekspresyonu düşerken, CD107a ekspresyonu artış gösterdi. Bu uyarıya yanıt olarak yapılan ölçümlerin örneği Şekil 4.1.2.1-2 görülmektedir.



Şekil 4.1.2.1-2: Bir kontrol donöründe uyarıya yanıt açısından $\gamma\delta$ T hücre kapısında CD16⁺ ve CD107a⁺ hücrelerinin görüntüsü.

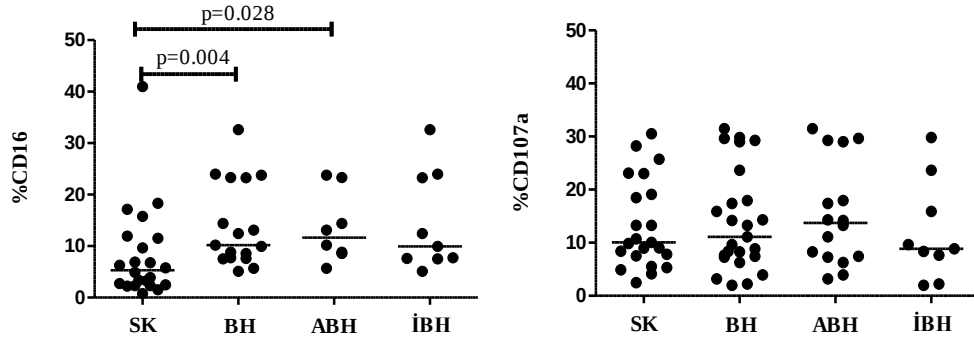
A) Uyarı öncesi, B) uyarı sonrası görüntü

SK ve BH grupları arasında $\gamma\delta$ T hücreleri uyarı sonrası artış oranları karşılaştırıldı. Bu amaçla uyarılı $\gamma\delta$ T % / uyarısız $\gamma\delta$ T % formülü ile “ $\gamma\delta$ T hücre artış oranı” hesaplandı. Bu artış oranının BH (%1,7 vs. 1,2 p= 0,018) ile ABH’de (%1,8 vs. 1,2 p= 0,035) SK’ye göre yüksek olduğu belirlendi (Şekil 4.1.2.1-3).



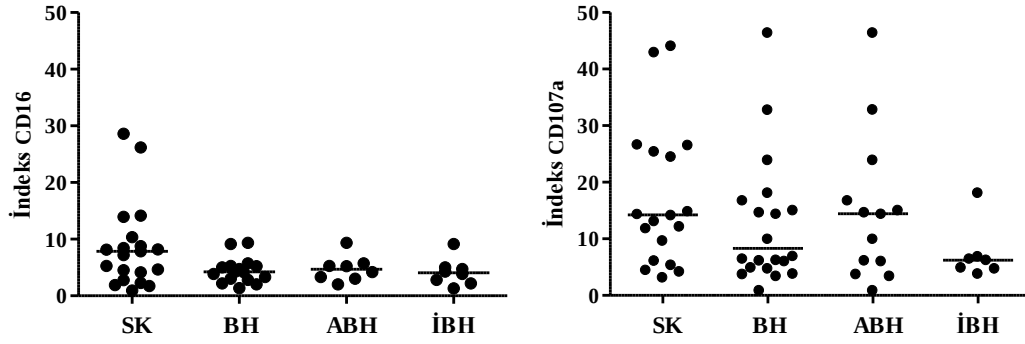
Şekil 4.1.2.1-3: SK'lere göre BH'lerde $\gamma\delta$ T hücrelerinin artış oranının (indeks) dağılımı.

In vitro uyarıldıktan sonra $\gamma\delta$ T hücrelerinin yüzeyinde düşüş gösteren CD16, BH grubunda (%11,6 vs. 5,3 $p=0,004$) ve ABH'de (%10,2 vs. 5,3 $p=0,028$) SK'lere göre daha yüksek kaldı. Uyarı sonrası ölçülen CD107a ise SK ve BH grupları arasında fark göstermedi (Şekil 4.1.2.1-4).



Şekil 4.1.2.1-4: $\gamma\delta$ T hücre kapısında uyarılan hücrelerin CD16 ve CD107a yüzdeleri.

$\gamma\delta$ T hücrelerinin uyarıya CD107a ve CD16 yanıtları, oran olarak karşılaştırıldığında (uyarı %/uyarısız %) gruplar arasında fark gözlenmedi (Şekil 4.1.2.1-5).

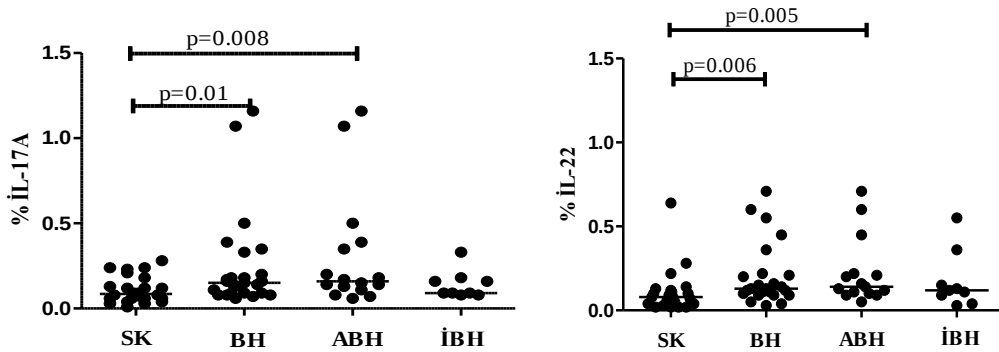


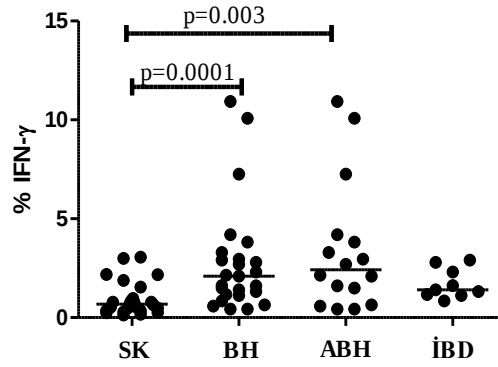
Şekil 4.1.2.1-5: CD16 ve CD107a belirteçlerinin artış oranlarının yüzdesi.

4.1.2.2. $\gamma\delta$ T Hücrelerinin Sitokin Üretimi

BH gelişiminde $\gamma\delta$ T hücrelerinin sitokin üretimi ile etkili olabileceği düşünülerek PKMH uyarılarak hücre içi sitokin boyamaları ile değerlendirildi. $\gamma\delta$ T hücrelerinde İL-17A, İL-22, İFN- γ üretimi akım sitometresi ile ölçüldü.

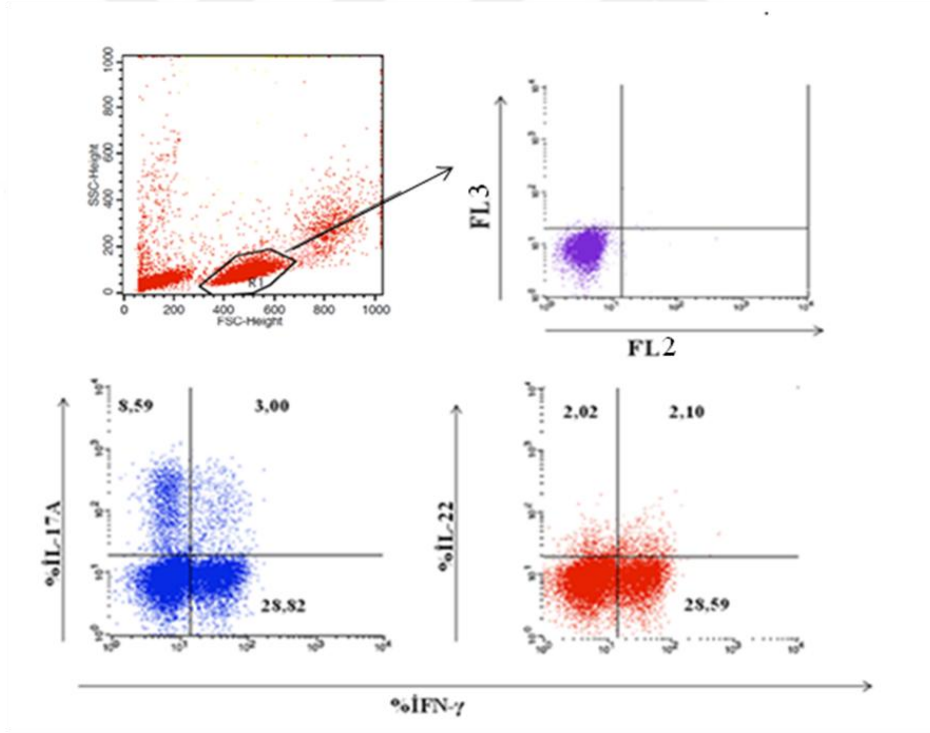
Lenfosit içerisindeki $\gamma\delta$ T hücrelerinde İL-17A, İL-22, İFN- γ oranları anlamlı farklar gösterdi. Hem BH, hem de ABH'nin $\gamma\delta$ T hücrelerinde İL-17A (%0,2 ve 0,2 vs. 0,1, $p=0,01$ ve $p=0,008$), İL-22 (%0,1 ve 0,1 vs. 0,1, $p=0,006$ ve $p=0,005$) ve İFN- γ (%2,1 ve 2,4 vs. 0,7 $p=0,0001$ ve $p=0,003$) pozitifliği SK'ya göre artmış bulundu (Şekil 4.1.2.2-1).





Şekil 4.1.2.2-1: Lenfosit kapısında $\gamma\delta T^+ IL-17A^+$, $\gamma\delta T^+ IL-22^+$ ve $\gamma\delta T^+ IFN-\gamma^+$ oranları.

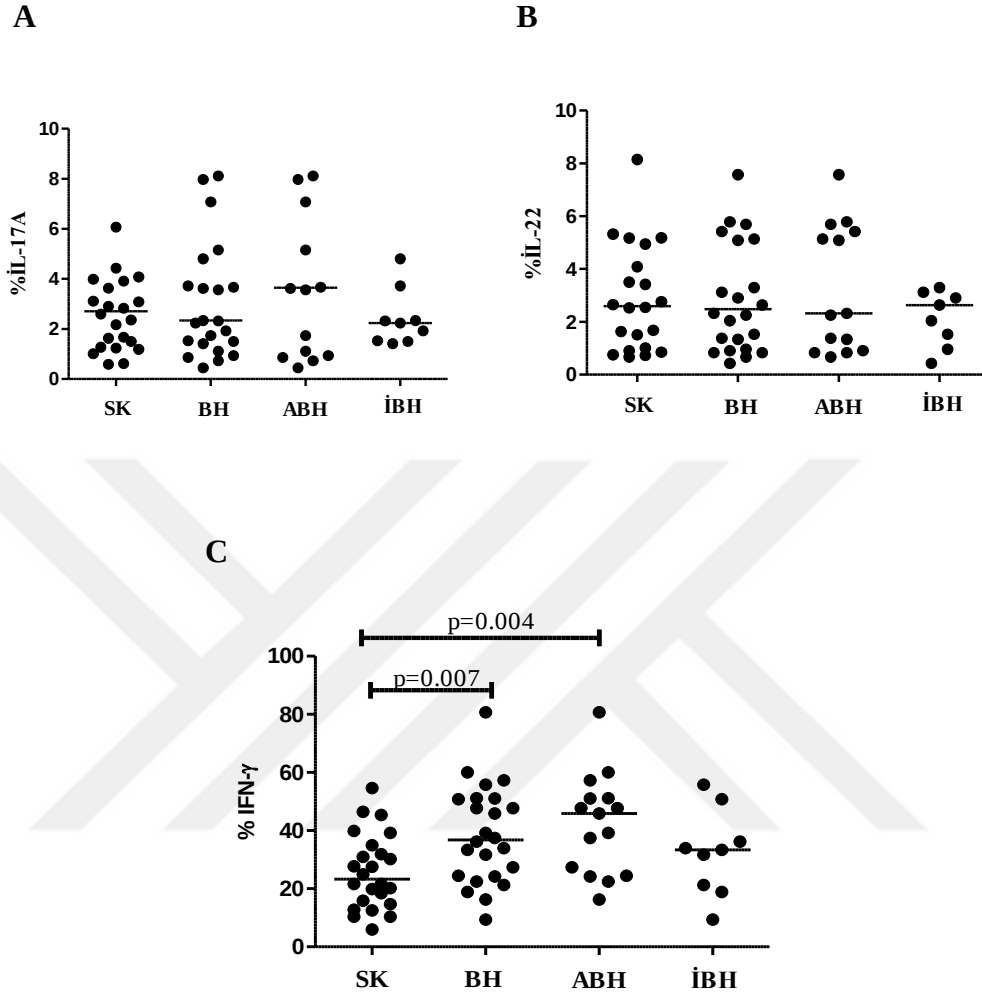
$IFN-\gamma^+$ ile birlikte $IL-17A^+$ veya $IL-22^+$ salgılayan hücreler ise $IL-17A^+ IFN-\gamma^+$ ve $IL-22^+ IFN-\gamma^+$ $\gamma\delta T$ hücrelerin (çift pozitif) yüzdesi olarak ölçüldü. Hücre içi sitokin varlığının ayırımı FEB tüpe göre yapıldı (Şekil 4.1.2.2-2).



Şekil 4.1.2.2-2: Kültür sonrası hücrelerin görüntüsü ve kapılanması ve $\gamma\delta T$ hücre kapısında $IL-17A^+ IFN-\gamma^+$ ve $IL-22^+ IFN-\gamma^+$ hücrelerinin görüntüsü.

$\gamma\delta T$ hücre kapısı içerisindeki $IFN-\gamma^+$ hücre oranı BH'de (%36,8 vs. 23,3 $p=0.007$) ve ABH'de (%45,8 vs. 23,3 $p=0.004$) artmış bulundu. $\gamma\delta T$ hücre kapısındaki $IL-$

17A⁺ ve İL-22⁺ hücre oranları ise BH ve SK arasında anlamlı fark göstermedi (Şekil 4.1.2.2-3).

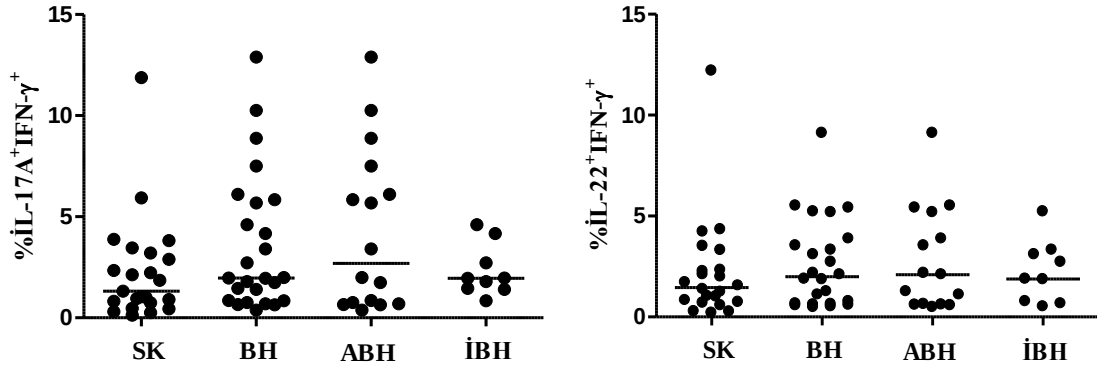


Şekil 4.1.2.2-3. $\gamma\delta$ T hücre kapısında sitokin yüzdeleri

A) İL-17A, B) İL-22, ve C) İFN- γ oranları

Hem $\gamma\delta$ T hücreleri, hem de CD4⁺ T hücreleri içerisinde İL-17A⁺İFN- γ ⁺ ve İL-22⁺İFN- γ ⁺ çift pozitif, “polifonksiyonel” hücre grupları olup bu hücrelerin bir kaç sitokini aynı anda üretebildikleri gösterilmiştir [39]. Bu çift pozitif hücrelerin oranının tek pozitiflere göre düşük olduğu gözlemlendi. SK grubunda $\gamma\delta$ T hücreleri içinde İL-17A⁺İFN- γ ⁺ $\gamma\delta$ T %1,3 ve İL-22⁺İFN- γ ⁺ $\gamma\delta$ T %1,5 olduğu halde, CD4⁺ T hücreleri için İL-17A⁺İFN- γ ⁺ %0,5 ve İL-22⁺İFN- γ ⁺ %0,45 bulundu.

Çift pozitif İL-17A⁺İFN- γ ⁺ $\gamma\delta$ T ve İL-22⁺İFN- γ ⁺ $\gamma\delta$ T hücreleri BH ve SK’lar arasında anlamlı fark göstermedi (Şekil 4.1.2.2-4).



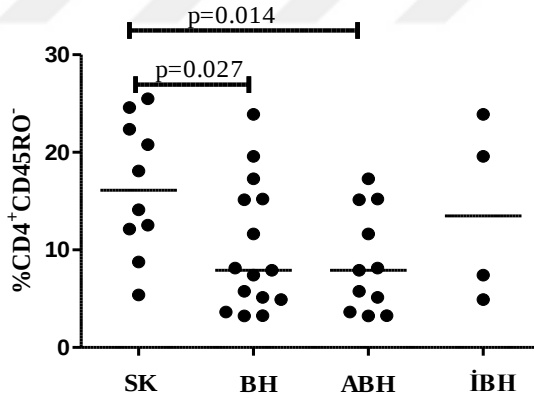
Şekil 4.1.2.2-4: $\gamma\delta$ T hücre kapısında İL-17A⁺İFN- γ ⁺ ve İL-22⁺İFN- γ ⁺ hücre yüzdeleri.

4.2. CD4⁺ T Hücreleri

4.2.1. CD4⁺ T Hücrelerinin Fenotipik Değerlendirilmesi

4.2.1.1. Naif ve Bellek CD4⁺ T Hücreleri

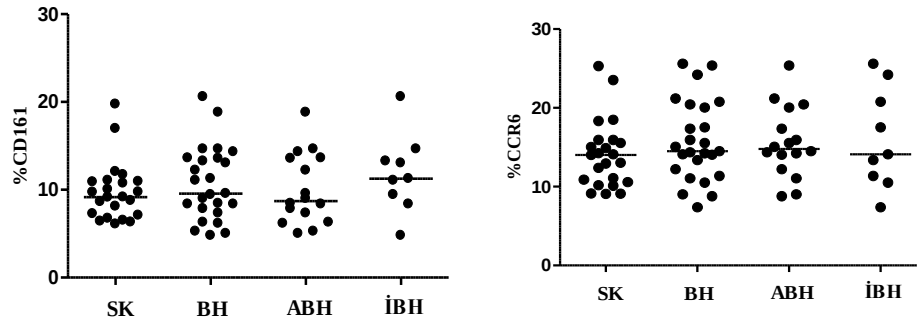
BH ve ABH gruplarında naif CD4⁺ T hücre oranlarının SK ya göre anlamlı olarak düşük olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2.1.1).



Şekil 4.2.1.1: CD4⁺ T hücre kapısında CD4⁺CD45RO⁻ hücrelerinin yüzdesi.

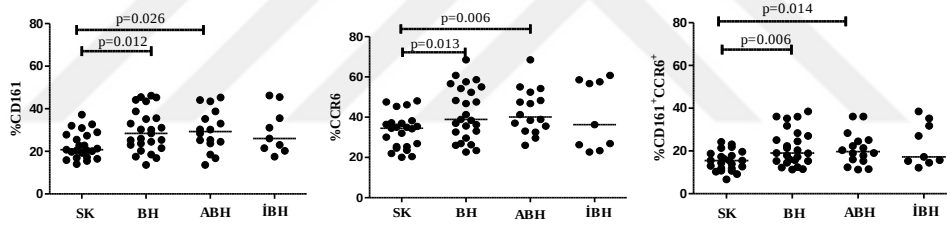
4.2.1.2. CD4⁺ T Hücrelerinde CD161 ve CCR6

İL-17A salgılayan CD4⁺ T hücrelerinin fenotipik tanımlanması için yüzeylerindeki CD161 ve CCR6 belirteçleri değerlendirildi. Lenfosit kapısındaki CD4⁺ T hücrelerde CD161 ve CCR6 moleküllerinin yüzdesinde anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 4.2.1.2-1).



Şekil 4.2.1.2-1: Lenfosit kapısında $CD4^+$ T hücre yüzeyindeki CD161 ve CCR6 yüzdeleri.

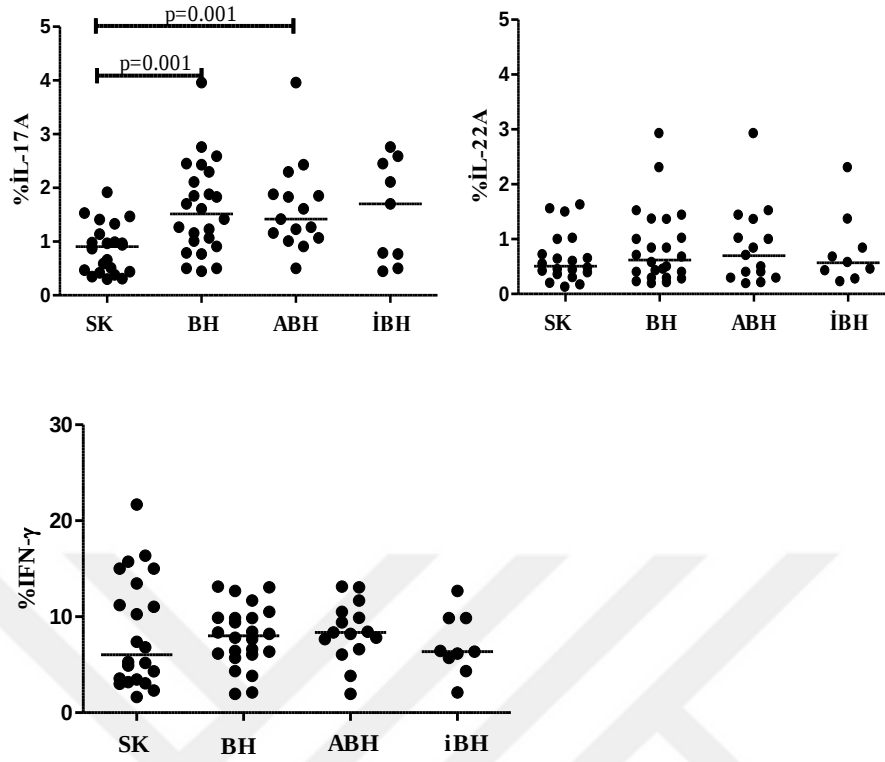
BH ve SK örnekleri $CD4^+$ T hücre kapısında değerlendirildiğinde, BH'lerde $CD161^+$, $CCR6^+$ ve çift $CD161^+CCR6^+$ yüzey belirteçlerinin ekspresyonunun arttığı belirlendi (%29,3 vs. 20,74 $p=0,012$, %40,1 vs. 34,5 $p=0,013$, %19,7 vs. 15,5; $p=0,006$). BH grubundaki artış ABH ile kontrol grubu arasında da gözlemlendi (%28,4 ve 20,7 $p=0,026$, %38,91 vs. 34,5 $p=0,006$, %19 vs. 15,51; $p=0,014$) (Şekil 4.2.1.2-2).



Şekil 4.2.1.2-2: $CD4^+$ T hücre kapısında $CD161^+$, $CCR6^+$ ve $CD161^+CCR6^+$ yüzdeleri.

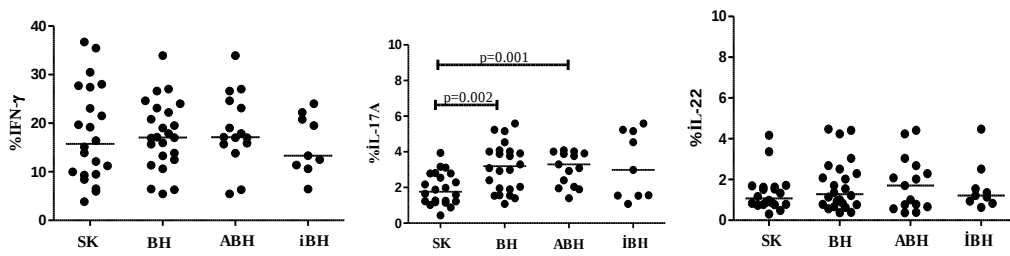
4.2.2. $CD4^+$ T Hücrelerde Sitokin Aktivitesi

PMA ve ionomisin uyarısından sonra $CD4^+$ T hücrelerinin hücre içi sitokin seviyeleri ölçüldüğünde lenfosit kapısında $CD4^+IL-17A^+$ T hücre oranının BH (%1,52 vs. 0,91 $p=0,001$) ve ABH'lerde (%1,4 vs. 0,91 $p=0,001$) SK'lara göre arttığı bulundu. $CD4^+IL-22^+$ ve $CD4^+IFN-\gamma^+$ oranlarında anlamlı fark belirlenmedi (Şekil 4.2.2-1).



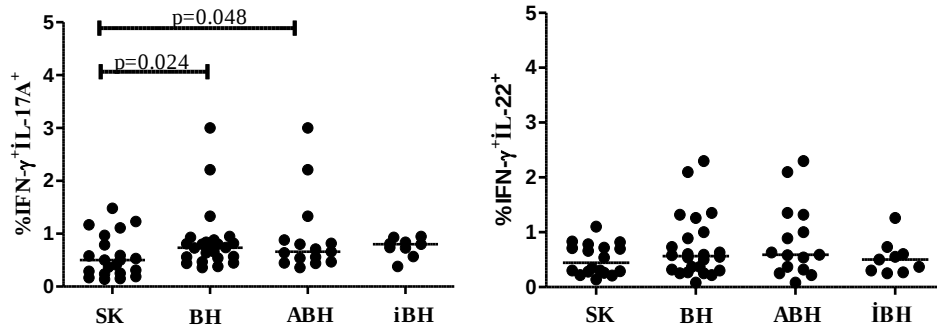
Şekil 4.2.2-1: Lenfosit kapısında CD4⁺IL-17A⁺, CD4⁺IL-22⁺ ve CD4⁺IFN- γ ⁺ hücrelerin oranı.

CD4⁺ T hücre kapısında da İL-17A⁺ oranı BH (%3,2 ve 1,77; p= 0,002) ve ABH'lerde (%3,3 ve 1,77; p= 0,001) artmıştı. İL-22⁺ ve İFN- γ ⁺ oranında ise anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 4.2.2-2).



Şekil 4.2.2-2: CD4⁺ T hücrelerinin sitokin aktivitesi.

CD4⁺ T hücre kapısında İL-17A⁺IFN- γ ⁺ çift pozitif hücre oranlarının da BH (%0,74 ve 0,5; p= 0,024) ve ABH'de (%0,7 ve 0,5; p= 0,048) SK'ya göre artmış olduğu saptandı. İL-22⁺IFN- γ ⁺ hücrelerin oranlarında anlamlı fark bulunmadı (Şekil 4.2.2-3).



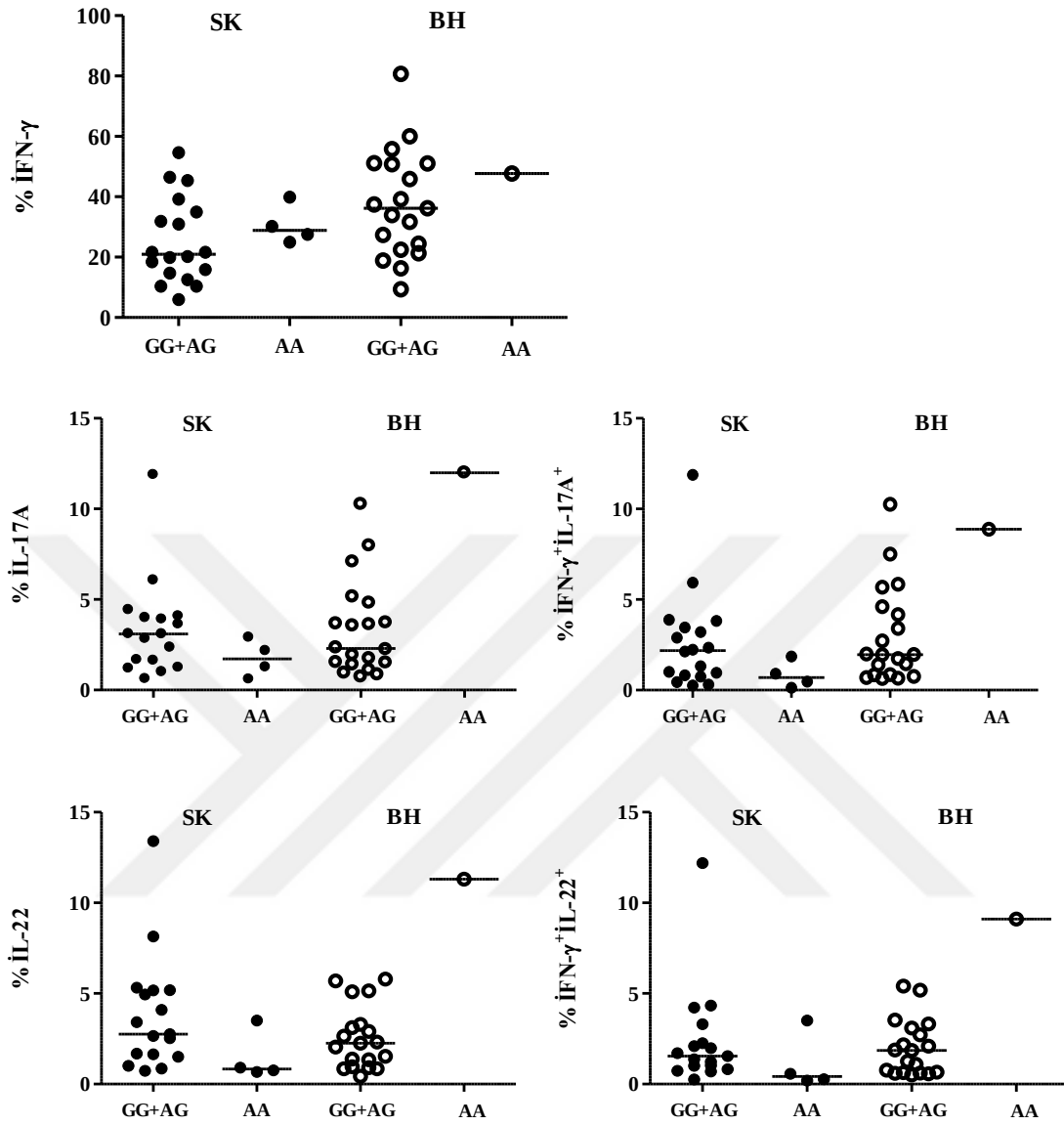
Şekil 4.2.2-3: CD4⁺ T hücre kapısında İL-17A⁺IFN-γ⁺ ve İL-22⁺IFN-γ⁺ hücrelerin sitokin aktivitesi.

4.3. İL-23R Genotipine Bağlı Sitokin Üretimi

İL-23R polimorfizmi taşıyan hücrelerin fonksiyonel farklılıkları sitokin üretimi açısından incelenilmektedir. İL-22, İL-17 ve İFN-γ sitokin düzeylerinin İL-23R genotipine göre değiştiğini gösteren çalışmalar bildirilmiştir [68, 69]. Daha önce belirtilen çalışmamızda, İL-23R (rs17375018) polimorfizmi BH grubunda %56,9 GG varlığına karşılık SK da %40,1 ile hastalıkla ilişki göstermişti (p= 0,0002, OR: 1,97 (%95 güven aralığı: 1,38-2,81)). Bu ilişkinin sitokin üretimine etkisi aşağıda karşılaştırıldı.

4.3.1. γδ T hücrelerde IL23R Genotipine Bağlı Sitokin Üretimi

Bu çalışmada yer alan donörler IL23R polimorfizmi için A ve G alellerine göre genotiplendirildi. BH grubunda yer alan donörlerde 1 AA, 6 AG ve 14 GG taşıyan hasta bulunurken ve SK grubunda 4 AA, 14 AG, 4 GG donor vardı. Polimorfik alel olan ve yüksek frekanslı olup BH de artmış olan G alelinin varlığına göre hasta ve kontroller gruplandı (GG+AG vs. AA). G aleline göre pozitif (GG+AG) ve negatif (AA) gruplarda γδ T hücrelerinin hücre içi İL-17A, İFN-γ ve İL-22 düzeyleri karşılaştırıldı. (Şekil 4.3.1)

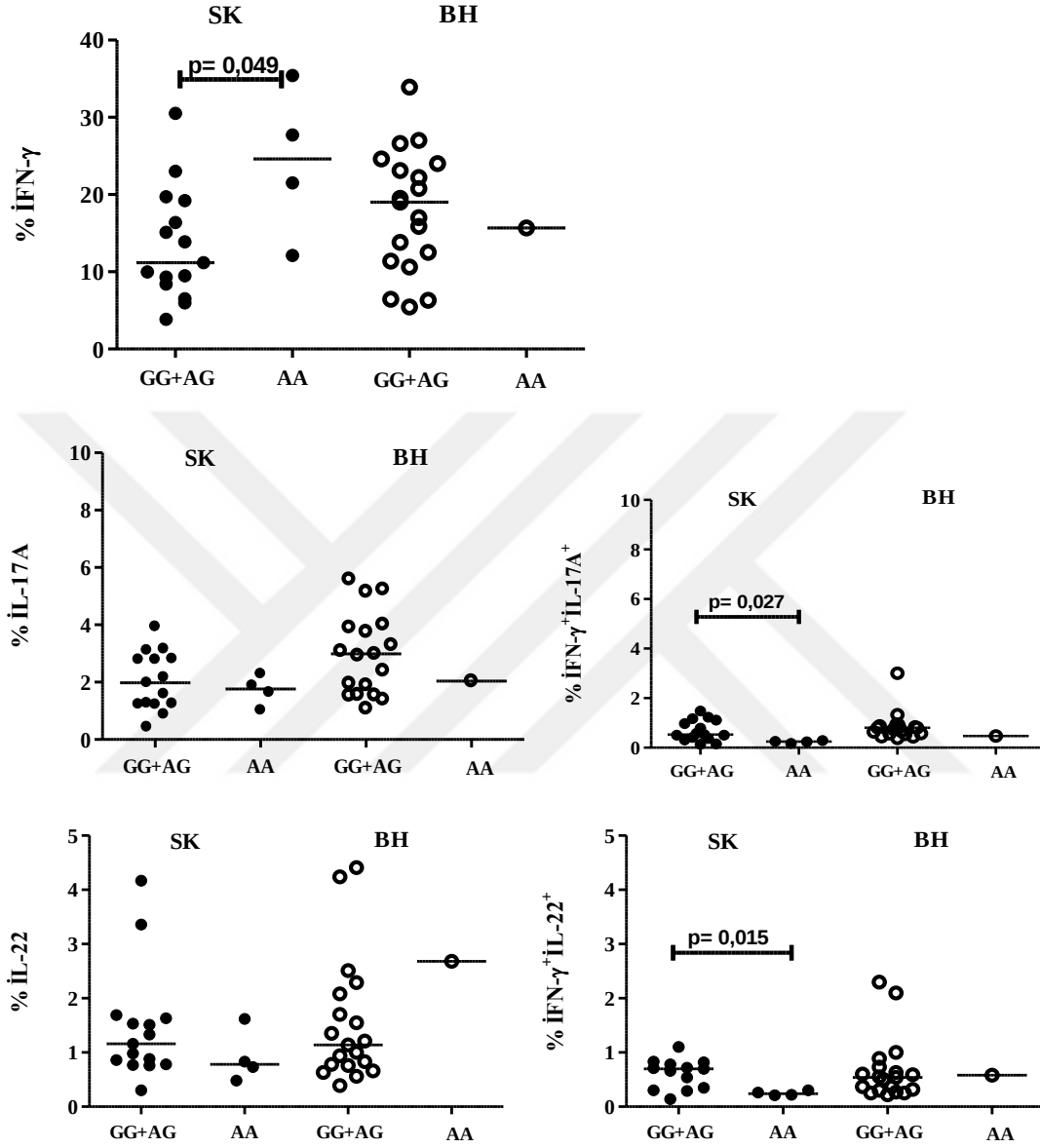


Şekil 4.3.1: $\gamma\delta$ T hücrelerinde SK ve BH’lerde G genotipini taşıyan ve taşımayan donörlerin sitokin yüzdeleri.

4.3.2. $CD4^+$ T hücrelerde *IL23R* Genotipine Bağlı Sitokin Üretimi

$CD4^+$ T hücrelerinde sitokin yüzdeleri *IL23R* G alelinin varlığına (GG+AG) ve yokluğuna (AA) göre değişkenlik gösterdi. SK grubunda *IL23R* G alelini taşıyanlarda $IFN-\gamma^+$ $CD4^+$ T hücre oranı taşımayanlara göre zayıf bir artış gösterdi (%24,6 vs. 11,2, $p=0,049$). $IFN-\gamma^+IL-17A^+$ ve $IFN-\gamma^+IL-22^+$ çift pozitif $CD4^+$ T hücreleri de SK grubunda *IL23R* G aleli taşıyanlarda artmıştı (%0,5 vs. 0,2, $p=0,027$ and %0,7 vs. 0,2, $p=$

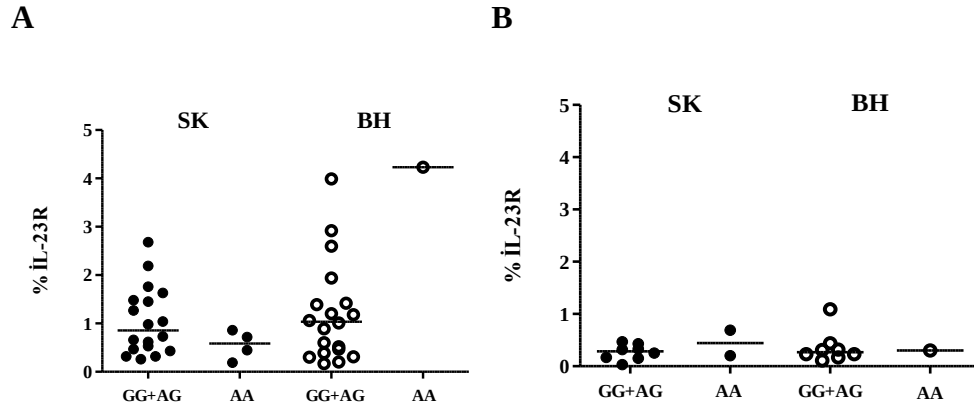
0,015)(Şekil 4.3.2). Ancak BH grubunda G taşımayan sadece 1 donör yer aldığı için bu karşılaştırmalara istatistik uygulanmadı.



Şekil 4.3.2: CD4⁺ T hücrelerinde SK ve BH'lerde G genotipini taşıyan ve taşımayan donörlerin sitokin yüzdeleri.

4.3.3. $\gamma\delta$ ve CD4⁺ T hücrelerinde *IL23R* Genotipine Göre *IL-23R* Yüzey Ekspresyonu

$\gamma\delta$ T ve CD4⁺ T hücre yüzeyinde *IL-23R* ekspresyon oranı, *IL23R* genotip gruplarına göre karşılaştırıldığında da BH ve SK'larda anlamlı değişiklik göstermedi (Şekil 4.3.3).



Şekil 4.3.3: *IL23R* genotipe göre İL-23R yüzey ekspresyon oranları.

A) $\gamma\delta$ T hücrelerinde, B) $CD4^+$ T hücrelerinde

5. TARTIŞMA

$\gamma\delta$ T hücreleri T lenfositlerinin %5'lik bir popülasyonunu kapsar. Periferik kanda $\gamma\delta$ THR taşıyan hücrelerin %70-90'lık kısmını V δ 2 ve V γ 9 zincirlerini taşıyan T hücreleri oluşturur [70]. Bu çalışmada SK ve BH grupları arasında $\gamma\delta$ T ve V γ 9 T hücrelerinin oranlarında bir fark bulunmadı.

İL-23R'nin AS, psöriazis ve inflamatuvar barsak hastalıkları gibi kronik inflamatuvar durumlarda önemli rolü olduğu ileri sürülmektedir [71, 72]. Kenna T.J. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada AS hastalarının periferik kanında İL-23R'nin arttığı ve bu artışın $\gamma\delta$ T hücrelerinden kaynaklandığı saptanmıştır. Aynı çalışmada psöriazis hastalarında $\gamma\delta$ T hücrelerinin büyük bir kısmının İL-23R eksprese ettiği de saptanmıştır. İL-23R'deki genetik çeşitlilik sonucu, İL-23'ün bu reseptöre bağlanmasıyla $\gamma\delta$ T hücrelerden fazla İL-17 salgılanmasına neden olabileceği varsayılmaktadır. Sağlıklı kontrollerde ise İL-17'nin asıl kaynağının CD4⁺ T hücreleri olduğu bildirilmiştir [29]. Yukarıda geçen çalışmaya dayanarak BH'de olası İL-17A kaynağı olarak, bu çalışmada, $\gamma\delta$ T hücreleri incelenmiş ve bu hücre grubunun BH de L-17A aktivitesine desteği gösterilmiştir.

$\gamma\delta$ T hücrelerinin uyarıya yanıtı araştırıldığında artış oranı BH'de SK'ya göre anlamlı yüksek bulundu. Uyarı ile CD16 belirtecinin yüzeyden kaybolması ise SK ya göre daha az oldu. Parlakgöl G. ve ark. yaptıkları çalışmada $\gamma\delta$ T hücrelerinin V δ 2 THR alt grubunda CD16 belirteci BH'de SK'ya göre yüksek bulunmuştu [73]. Bu çalışma ise tüm $\gamma\delta$ T hücrelerinde bu belirteci değerlendirilmiş ve önceki çalışma verisini desteklememiştir. Ayrıca CD107a sitotoksik aktivite belirteci olarak SK ve BH'de bir fark göstermedi. Ancak uyarı ile CD16 yüzey molekülünün BH'de kaybolmaması bu moleküle bağlı aktivitenin devamı olarak yorumlanmıştır.

$\gamma\delta$ T ve CD4⁺ T hücrelerde İL-17A sentezinin BH'de ve ABH'de SK dan yüksek olduğu bulundu. CD4⁺ T hücre kapısında da İL-17A, BH'de anlamlı artış gösterdi.

Bazı çalışmalar $\gamma\delta$ T hücrelerinin Th1 ve Th17 özellikleri taşıdığını göstermiştir. Buna göre $\gamma\delta$ T hücreleri, İFN- γ ve İL-17 eksprese edebilmektedir. İL-17 salgılayan $\gamma\delta$ T hücreleri CCR6 da taşır. CD27 ve CCR6'nın $\gamma\delta$ T hücreleri için İL-17 ve İFN- γ salgısını tanımlayan belirteçler olduğu gösterilmiştir [74].

Çalışmamızda $\gamma\delta$ T hücrelerinin ana alt grubu olan V γ 9 T hücreleri için CD27⁺ ayırımı yapılmıştır. Hem SK, hem de BH'de V γ 9 T hücrelerinin büyük oranının için CD27⁺ olduğunu gördük. Bu veriye dayanarak, $\gamma\delta$ T hücrelerinin büyük kısmının aktif hücreler olduğunu ortaya koyduk.

PMA ve ionomisinle uyarılmış $\gamma\delta$ T hücrelerinin sitotoksik aktivitesi CD107a ve CD16 belirteçleri ile ölçüldü. BH $\gamma\delta$ T hücrelerinde CD16 belirteci SK kadar azalmaz iken, CD107a ise değişiklik göstermedi ve bu bulgular $\gamma\delta$ T hücrelerinin BH 'de sitotoksik etkinliğinin artmadığı yönünde değerlendirildi.

Freysdottir J. ve arkadaşlarının bir çalışmasında aktif üveitli BH'lerin İFN- γ salgılayan $\gamma\delta$ T hücrelerinin oranının artmış olduğu gösterilmiştir. Bu makaleye göre İFN- γ salgısının arttığı hücreler aktif hücrelerdir [39]. Bu çalışmamızda biz de benzer bir sonuca ulaştık. BH ve ABH'de $\gamma\delta$ T hücrelerinden İFN- γ salgılanmasının arttığını gözlemledik. Bu bulgular aktif $\gamma\delta$ T hücrelerinin BH patogeneğinde direkt rolü olduğunu açıklamaktadır. Dolayısıyla, aktif $\gamma\delta$ T hücrelerinin sitokini olan İFN- γ 'nın BH patogeneğinde önemli bir faktör olduğu ortaya çıkmaktadır.

Araştırmalar sonucunda İL-17 salgılayan hücrelerin genel olarak CD4⁺CD45RO⁺ hücreler olduğu bilinmektedir [75]. Bu çalışmamızda CD4⁺ T hücrelerinin BH'lerde çoğunlukla CD45RO⁺ hücreler olduğunu gözlemledik. BH'lerde aynı zamanda CD4⁺İL-17⁺ hücrelerin anlamlı artış göstermesi, daha önce yapılan çalışmaları ve İL-17'nin daha çok hafıza hücrelerinden salgılandığı bulgusunu desteklemektedir. İL-17 salgılayan hücrelerin önemli bir belirteci olan CD161'in inflamatuvar süreçte önemli bir rol oynadığı ve hastalık aktivitesiyle ilişkisi bulunduğu ileri sürülmektedir [76]. Aslında CD161, İL-17A salgılayan hücrelerin belirteci olarak da kabul edilmektedir. Fakat İL-17A salgılayan asıl hücre grubu olan Th17 ayırımı için özgün bir belirteç değildir [48, 76]. S. Kagami ve arkadaşları çalışmalarında CCR6 molekülünün, Th17 hücreleri Th1'lerden ayırmak için daha özgül bir belirteç olduğunu göstermiştir. CCR6'nın dolaşımdaki İL-17A⁺ hücrelerin %81'i, İFN- γ ⁺ hücrelerin ise sadece %26'sı tarafından eksprese edildiğini bildirdiler. Bunun tersine CD161 ve İL-23R molekülleri, dolaşımdaki Th17 hücrelerinin az bir kısmında, Th1 hücrelerinin ise çoğunda bulunmuştur [48]. Çalışmamızda da İL-17A⁺, İFN- γ ⁺ ve İL-17A⁺İFN- γ ⁺ hücrelerini belirlemek için CD161 ve CCR6 belirteçleri kullanıldı. Hem CD4⁺ T, hem de $\gamma\delta$ T hücrelerinde İL-17A⁺İFN- γ ⁺ çift pozitif hücreler bulunuyordu. Bu grubu tanımlamak için CD161⁺CCR6⁺ çift pozitif belirteçlerini

kullandık. $CD4^+$ T hücrelerinde $IL-17A^+$ ve $IL-17A^+IFN-\gamma^+$ çift pozitif hücrelerin artışının yanısıra, $CD4^+CD161^+$, $CD4^+CCR6^+$ ve $CD4^+CD161^+CCR6^+$ hücrelerin arttığını da gözlemledik. $\gamma\delta$ T hücrelerinde ise böyle bir artış görülmedi. $CD4^+$ T'lerde $IL-17A^+IFN-\gamma^+$ çift pozitif hücrelerin oranı, $IL-17A^+$ ya da $IFN-\gamma^+$ tek pozitif hücrelerin oranından daha düşük bulundu. Aynı zamanda $CD161^+CCR6^+$ hücrelerin oranı da $CD161^+$ ya da $CCR6^+$ hücrelere göre düştü. $IFN-\gamma$ ve $IL-17A$ salgılayan $CD4^+$ T hücrelerinin BH'de artışı daha önce yapılan araştırmalarla desteklendiği saptandı [75, 77]. Aynı zamanda bu hücreler için seçilen yüzey belirteçlerinin de BH'deki $CD4^+$ T hücrelerde artış gösterdiği de gösterilmiş oldu. Oysaki $IL-17A$ salgılayan $\gamma\delta$ T hücreleri için $CD161$ ve $CCR6$ molekülleri iyi bir belirteç olmadığı gözlemlendi.

Çalışmamızda $\gamma\delta$ T hücrelerinde $IL-22$ 'nin BH'da SK'a göre artmış olduğunu gösterdik. $CD4^+$ T hücrelerinde ise SK ve BH arasında fark gözlenmedi. $IL-22^+IFN-\gamma^+$ çift pozitif hücrelerin oranında da bir artış bulunmadı.

$IL-23R$ polimorfizmi üzerine yapılan çalışmalar, bu reseptöre bağlı olarak $IL-17A$ düzeyinin değişkenlik gösterdiğini bildirmektedir [44]. Bu değişkenlik kendisini otoimmün hastalıklarda göstermektedir [68]. Yaptığımız bir çalışmada $IL-23R$ 'nin polimorfizminin (rs17375018) BH ile ilişkili olduğunu gösterilmiş idi (yayın aşamasında). Bu sonucu ele alarak $CD4^+$ ve $\gamma\delta$ T hücrelerinde $IL-23R$ (rs17375018) TNP'sinin G alelinin varlığına göre sitokin düzeylerini inceledik. Çalışmamızda $CD3^+$ T, $\gamma\delta$ T ve $V\gamma9V\delta2$ T hücreleri yüzeyinde $IL-23R$ oranı hasta ve sağlıklı gruplarda anlamlı fark göstermedi. Daha önce belirtilen çalışmamızda, $IL-23R$ polimorfizmi, BH grubunda %56,9 GG varlığına karşılık SK da %40,1 ile hastalıkla ilişki göstermişti ($p=0,0002$, OR: 1,97 (%95 güven aralığı: 1,38-2,81)). Bu çalışmada $\gamma\delta$ T hücreleri yüzeyinde $IL-23R$ polimorfizminin G alelini taşıyan donörlerin sitokin yüzdelerinde bir fark bulunmadı. Sağlıklıların $CD4^+$ T hücrelerinde ise G aleli taşıyan donörlerde A aleli taşıyanlara göre $IFN-\gamma^+$, $IL-22^+IFN-\gamma^+$, $IL-17A^+IFN-\gamma^+$ artış görüldü.

Sonuç olarak, bu çalışmamızda $\gamma\delta$ T hücrelerini BH grupları ve SK arasındaki dağılım farkları karşılaştırıldı. Tüm $\gamma\delta$ T hücre oranlarında bir fark bulunmadı. Aynı zamanda $\gamma\delta$ T hücrelerinin $IL-17A^+IFN-\gamma^+$ ve $IL-22^+IFN-\gamma^+$ çift sitokin pozitif hücreler olarak oranlarının çok düşük olduğu ve BH ile ilişkilendirilemeyeceği belirlendi. $IL-23R$ polimorfizminin ise $\gamma\delta$ T hücrelerindeki de sitokin düzeyini etkilemediği, ancak bu etkinin $CD4^+$ T hücrelerinde ortaya çıktığı gösterildi. Bu bulgular ile BH'de sitokin düzeyindeki

değişikliklerin ağırlıkla $CD4^+$ T hücrelerinden kaynaklandığı, ancak $\gamma\delta$ T hücrelerinin de İL-17A, IFN- γ ve İL-22 üretiminde kısmen yer aldığı gözlenmektedir.



KAYNAKLAR

1. Yazici, H. and Y. Yazici, *Criteria for Behcet's disease with reflections on all disease criteria*. J Autoimmun, 2014. **48-49**: p. 104-7.
2. Yazici, H., et al., *The ten-year mortality in Behcet's syndrome*. Br J Rheumatol, 1996. **35**(2): p. 139-41.
3. Jung, Y.S., et al., *Clinical course of intestinal Behcet's disease during the first five years*. Dig Dis Sci, 2013. **58**(2): p. 496-503.
4. Idil, A., et al., *The prevalence of Behcet's disease above the age of 10 years. The results of a pilot study conducted at the Park Primary Health Care Center in Ankara, Turkey*. Ophthalmic Epidemiol, 2002. **9**(5): p. 325-31.
5. Yurdakul, S., et al., *The prevalence of Behcet's syndrome in a rural area in northern Turkey*. J Rheumatol, 1988. **15**(5): p. 820-2.
6. Jaber, L., et al., *Prevalence of Behcet's disease in an Arab community in Israel*. Ann Rheum Dis, 2002. **61**(4): p. 365-6.
7. Hori, Y., et al., *Experimental Behcet's disease and ultrastructural X-ray microanalysis of pathological tissues*. J Dermatol, 1979. **6**(1): p. 31-7.
8. Remmers, E.F., et al., *Genome-wide association study identifies variants in the MHC class I, IL10, and IL23R-IL12RB2 regions associated with Behcet's disease*. Nat Genet, 2010. **42**(8): p. 698-702.
9. Direskeneli, H., *Behcet's disease: infectious aetiology, new autoantigens, and HLA-B51*. Ann Rheum Dis, 2001. **60**(11): p. 996-1002.
10. Ohno, S., et al., *Close association of HLA-Bw51 with Behcet's disease*. Arch Ophthalmol, 1982. **100**(9): p. 1455-8.
11. Verity, D.H., et al., *Behcet's disease, the Silk Road and HLA-B51: historical and geographical perspectives*. Tissue Antigens, 1999. **54**(3): p. 213-20.
12. Marshall, S.E., *Behcet's disease*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2004. **18**(3): p. 291-311.
13. Pay, S., et al., *Immunopathogenesis of Behcet's disease with special emphasize on the possible role of antigen presenting cells*. Rheumatol Int, 2007. **27**(5): p. 417-24.

14. Coskun, M., et al., *Specific interleukin-1 gene polymorphisms in Turkish patients with Behcet's disease*. Exp Dermatol, 2005. **14**(2): p. 124-9.
15. Kim, J.U., et al., *Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Behcet's disease and rheumatic diseases with vasculitis*. Ann Rheum Dis, 2003. **62**(11): p. 1083-7.
16. Kirino, Y., et al., *Genome-wide association analysis identifies new susceptibility loci for Behcet's disease and epistasis between HLA-B*51 and ERAP1*. Nat Genet, 2013. **45**(2): p. 202-7.
17. Jiang, Z., et al., *IL-23R gene confers susceptibility to Behcet's disease in a Chinese Han population*. Ann Rheum Dis, 2010. **69**(7): p. 1325-8.
18. *Criteria for diagnosis of Behcet's disease*. International Study Group for Behcet's Disease. Lancet, 1990. **335**(8697): p. 1078-80.
19. Lee, S., *Diagnostic criteria of Behcet's disease: problems and suggestions*. Yonsei Med J, 1997. **38**(6): p. 365-9.
20. Tursen, U., A. Gurler, and A. Boyvat, *Evaluation of clinical findings according to sex in 2313 Turkish patients with Behcet's disease*. Int J Dermatol, 2003. **42**(5): p. 346-51.
21. Lehner, T., *The role of heat shock protein, microbial and autoimmune agents in the aetiology of Behcet's disease*. Int Rev Immunol, 1997. **14**(1): p. 21-32.
22. Ergun, T., et al., *HSP 60 expression in mucocutaneous lesions of Behcet's disease*. J Am Acad Dermatol, 2001. **45**(6): p. 904-9.
23. Kulaber, A., et al., *Pro-inflammatory cellular immune response in Behcet's disease*. Rheumatol Int, 2007. **27**(12): p. 1113-8.
24. Saruhan-Direskeneli, G., et al., *Cytokines and chemokines in neuro-Behcet's disease compared to multiple sclerosis and other neurological diseases*. J Neuroimmunol, 2003. **145**(1-2): p. 127-34.
25. Kabelitz, D., et al., *Regulatory functions of gammadelta T cells*. Int Immunopharmacol, 2013. **16**(3): p. 382-7.
26. Korn, T. and F. Petermann, *Development and function of interleukin 17-producing gammadelta T cells*. Ann N Y Acad Sci, 2012. **1247**: p. 34-45.
27. Hamzaoui, K., et al., *Phenotype and functional profile of T cells expressing gamma delta receptor from patients with active Behcet's disease*. J Rheumatol, 1994. **21**(12): p. 2301-6.

28. Beetz, S., et al., *Innate immune functions of human gammadelta T cells*. Immunobiology, 2008. **213**(3-4): p. 173-82.
29. Kenna, T.J., et al., *Enrichment of circulating interleukin-17-secreting interleukin-23 receptor-positive gamma/delta T cells in patients with active ankylosing spondylitis*. Arthritis Rheum, 2012. **64**(5): p. 1420-9.
30. Schmolka, N., et al., *Epigenetic and transcriptional signatures of stable versus plastic differentiation of proinflammatory gammadelta T cell subsets*. Nat Immunol, 2013. **14**(10): p. 1093-100.
31. Ness-Schwickerath, K.J., C. Jin, and C.T. Morita, *Cytokine requirements for the differentiation and expansion of IL-17A- and IL-22-producing human Vgamma2Vdelta2 T cells*. J Immunol, 2010. **184**(12): p. 7268-80.
32. Constant, P., et al., *Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands*. Science, 1994. **264**(5156): p. 267-70.
33. Moens, E., et al., *IL-23R and TCR signaling drives the generation of neonatal Vgamma9Vdelta2 T cells expressing high levels of cytotoxic mediators and producing IFN-gamma and IL-17*. J Leukoc Biol, 2011. **89**(5): p. 743-52.
34. Caccamo, N., et al., *Differentiation, phenotype, and function of interleukin-17-producing human Vgamma9Vdelta2 T cells*. Blood, 2011. **118**(1): p. 129-38.
35. Bank, I., M. Duvdevani, and A. Livneh, *Expansion of gammadelta T-cells in Behcet's disease: role of disease activity and microbial flora in oral ulcers*. J Lab Clin Med, 2003. **141**(1): p. 33-40.
36. Yasuoka, H., et al., *Preferential activation of circulating CD8+ and gammadelta T cells in patients with active Behcet's disease and HLA-B51*. Clin Exp Rheumatol, 2008. **26**(4 Suppl 50): p. S59-63.
37. Hasan, A., et al., *Role of gamma delta T cells in pathogenesis and diagnosis of Behcet's disease*. Lancet, 1996. **347**(9004): p. 789-94.
38. Verjans, G.M., et al., *Vgamma9Vdelta2 T cells recovered from eyes of patients with Behcet's disease recognize non-peptide prenyl pyrophosphate antigens*. J Neuroimmunol, 2002. **130**(1-2): p. 46-54.
39. Freysdottir, J., S. Lau, and F. Fortune, *Gammadelta T cells in Behcet's disease (BD) and recurrent aphthous stomatitis (RAS)*. Clin Exp Immunol, 1999. **118**(3): p. 451-7.

40. Ben Ahmed, M., et al., *Involvement of chemokines and Th1 cytokines in the pathogenesis of mucocutaneous lesions of Behcet's disease*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(7): p. 2291-5.
41. Imamura, Y., et al., *Involvement of Th1 cells and heat shock protein 60 in the pathogenesis of intestinal Behcet's disease*. Clin Exp Immunol, 2005. **139**(2): p. 371-8.
42. Frassanito, M.A., et al., *Th1 polarization of the immune response in Behcet's disease: a putative pathogenetic role of interleukin-12*. Arthritis Rheum, 1999. **42**(9): p. 1967-74.
43. Sugi-Ikai, N., et al., *Increased frequencies of interleukin-2- and interferon-gamma-producing T cells in patients with active Behcet's disease*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998. **39**(6): p. 996-1004.
44. Di Meglio, P., et al., *The IL23R R381Q gene variant protects against immune-mediated diseases by impairing IL-23-induced Th17 effector response in humans*. PLoS One, 2011. **6**(2): p. e17160.
45. Piper, C., et al., *T cell GM-CSF expression in juvenile arthritis is contingent upon Th17 plasticity*. Arthritis Rheumatol, 2014.
46. Ghoreschi, K., et al., *T helper 17 cell heterogeneity and pathogenicity in autoimmune disease*. Trends Immunol, 2011. **32**(9): p. 395-401.
47. Parham, C., et al., *A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R*. J Immunol, 2002. **168**(11): p. 5699-708.
48. Kagami, S., et al., *Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(5): p. 1373-83.
49. Shimizu, J., et al., *Excessive CD4+ T cells co-expressing interleukin-17 and interferon-gamma in patients with Behcet's disease*. Clin Exp Immunol, 2012. **168**(1): p. 68-74.
50. Trifari, S., et al., *Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells*. Nat Immunol, 2009. **10**(8): p. 864-71.
51. Duhen, T., et al., *Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells*. Nat Immunol, 2009. **10**(8): p. 857-63.

52. Wolk, K., et al., *IL-22 increases the innate immunity of tissues*. Immunity, 2004. **21**(2): p. 241-54.
53. Li, Z., et al., *Gene expression profiling in autoimmune noninfectious uveitis disease*. J Immunol, 2008. **181**(7): p. 5147-57.
54. Zenewicz, L.A. and R.A. Flavell, *Recent advances in IL-22 biology*. Int Immunol, 2011. **23**(3): p. 159-63.
55. Stingl, K., et al., *The influence of tumor necrosis factor microsatellite polymorphisms on patient survival following hematopoietic stem cell transplantation*. Croat Med J, 2012. **53**(1): p. 24-9.
56. Ramirez, J.M., et al., *Activation of the aryl hydrocarbon receptor reveals distinct requirements for IL-22 and IL-17 production by human T helper cells*. Eur J Immunol, 2010. **40**(9): p. 2450-9.
57. Annunziato, F., et al., *Phenotypic and functional features of human Th17 cells*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1849-61.
58. Eyerich, S., et al., *Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling*. J Clin Invest, 2009. **119**(12): p. 3573-85.
59. Nogales, K.E., et al., *Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways*. Br J Dermatol, 2008. **159**(5): p. 1092-102.
60. Mege, J.L., et al., *Overproduction of monocyte derived tumor necrosis factor alpha, interleukin (IL) 6, IL-8 and increased neutrophil superoxide generation in Behcet's disease. A comparative study with familial Mediterranean fever and healthy subjects*. J Rheumatol, 1993. **20**(9): p. 1544-9.
61. Yamaguchi, Y., et al., *Natural killer cells control a T-helper 1 response in patients with Behcet's disease*. Arthritis Res Ther, 2010. **12**(3): p. R80.
62. Curnow, S.J., et al., *Serum cytokine profiles in Behcet's disease: is there a role for IL-15 in pathogenesis?* Immunol Lett, 2008. **121**(1): p. 7-12.
63. Na, S.Y., et al., *Up-regulation of Th17 and related cytokines in Behcet's disease corresponding to disease activity*. Clin Exp Rheumatol, 2013. **31**(3 Suppl 77): p. 32-40.
64. Chai, T., et al., *Increased expression of IL-22 is associated with disease activity in Behcet's disease*. Plos one, 2013

65. Sugita, S., et al., *Role of IL-22- and TNF-alpha-producing Th22 cells in uveitis patients with Behcet's disease*. J Immunol, 2013. **190**(11): p. 5799-808.
66. Suzuki, E., et al., *The IL-23/IL-17 axis in psoriatic arthritis*. Autoimmun Rev, 2014. **13**(4-5): p. 496-502.
67. Zwiers, A., et al., *Cutting edge: a variant of the IL-23R gene associated with inflammatory bowel disease induces loss of microRNA regulation and enhanced protein production*. J Immunol, 2012. **188**(4): p. 1573-7.
68. Schmechel, S., et al., *Linking genetic susceptibility to Crohn's disease with Th17 cell function: IL-22 serum levels are increased in Crohn's disease and correlate with disease activity and IL23R genotype status*. Inflamm Bowel Dis, 2008. **14**(2): p. 204-12.
69. Sarin, R., X. Wu, and C. Abraham, *Inflammatory disease protective R381Q IL23 receptor polymorphism results in decreased primary CD4+ and CD8+ human T-cell functional responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(23): p. 9560-5.
70. Gober, H.J., et al., *Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells*. J Exp Med, 2003. **197**(2): p. 163-8.
71. Reveille, J.D., et al., *Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies non-MHC susceptibility loci*. Nat Genet, 2010. **42**(2): p. 123-7.
72. Burton, P.R., et al., *Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants*. Nat Genet, 2007. **39**(11): p. 1329-37.
73. Parlakgul, G., et al., *Expression of regulatory receptors on gammadelta T Cells and their cytokine production in Behcet's disease*. Arthritis Res Ther, 2013. **15**(1): p. R15.
74. Do, J.S., et al., *CD4 T cells play important roles in maintaining IL-17-producing gammadelta T-cell subsets in naive animals*. Immunol Cell Biol, 2012. **90**(4): p. 396-403.
75. Chi, W., et al., *Upregulated IL-23 and IL-17 in Behcet patients with active uveitis*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. **49**(7): p. 3058-64.
76. Miao, J., et al., *Frequencies of circulating IL-17-producing CD4+CD161+ T cells and CD4+CD161+ T cells correlate with disease activity in rheumatoid arthritis*. Mod Rheumatol, 2014. **24**(2): p. 265-570.
77. Geri, G., et al., *Critical role of IL-21 in modulating TH17 and regulatory T cells in Behcet disease*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **128**(3): p. 655-64.

FORMLAR

Bugün sizden “Behçet hastalığında IFN- γ , IL-17 ve IL-23R ilişkisi” başlığıyla yürütülen çalışmaya katılmanız için kan örneği vermeniz istenmektedir. Bu çalışmanın amacı Behçet Hastalığının gelişimini anlamaya yönelik bilgiler elde etmektir. Bu araştırmaya yönelik bilimsel çalışmalara katkıda bulunmak amacıyla vereceğiniz kan örneği ve bu örnekten elde edilecek serum, DNA, RNA veya hücre İstanbul Tıp Fakültesi Fizyoloji AD Nöroimmünoloji ve İmmünogenetik laboratuvarlarında saklanacak ve incelemeler yine bu laboratuvarlarda bu çalışma için yapılacaktır.

Yapılacak bilimsel çalışmalar genellikle çok sayıda örnek ile yürütülecek ve bu çalışmalardan toplu sonuçlar çıkacaktır. Bu nedenle, çalışmaların kısa vadedeki sonuçlarından kişisel olarak sizin veya ailenizin diğer bireylerinin yararlanması söz konusu olmayabilir.

Bağışladığınız bu örnek ile çalışmaların sonuçlarından herhangi bir ticari kazanç beklememeyi de taahhüt ediyorsunuz. Bu çalışmaya katılmak için de herhangi bir ücret ödemeniz de gerekmemektedir.

Araştırma için örnek vermenizin, başka nedenlerle verdiğiniz zamanlarda da olabilecek iğne yerinde geçici olarak küçük kanama, morarma ve ağrı dışında herhangi bir yan etkisi yoktur. Kan vermeden önce her zaman almakta olduğunuz ilaçları kesmeniz de gerekmemektedir.

Bu araştırmaya yaklaşık 30 hasta ve 30 sağlıklı kişinin katılması planlanmaktadır. Araştırma için örnek verip vermemek konusunda özgürsünüz. Bu çalışmalara katılmayı ve örnek vermeyi kabul etmeseniz de, bu merkezde yürütülen tedavinizde herhangi bir aksama olmayacaktır. Çalışma kapsamında kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Çalışmaya katılmayı kabul ettikten sonra da, kararınızı değiştirmeniz mümkündür. Bu durumda vermiş olduğunuz örnek imha edilebilir ya da arzu ederseniz kimlik bilgilerinizden soyutlanarak saklanmaya devam edilebilir.

Yürümekte olan çalışmaların genel sonuçları hakkında Dr. Ahmet Gül ve Dr. Güher Saruhan-Direskeneli’den bilgi alabilir ve herhangi bir soru veya sorun olduğu takdirde bu doktorlara 0212-6318699 (Dr. Ahmet Gül) ve 0212-4142000-32716 (Dr. Güher Saruhan-Direskeneli) telefon numaralarından ulaşabilirsiniz.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri içeren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarda genetik/biyolojik incelemeler yapılmak üzere kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kan vermeyi kabul ediyorum.

Gönüllünün

Adı-Soyadı:

İmzası:

Velayet veya vasiyet altında bulunanlar için veli veya vasisinin:

Adı-Soyadı:

İmzası:

Açıklamaları yapan/örneği alan araştırmacının:

Adı-Soyadı:

İmzası:

Rıza alma işlemine bağından sonuna kadar tamklık eden kuruluş görevlisinin

Adı-Soyadı:

İmzası:

Tarih:/...../.....

İkinci bölüm: (Katılımcının/Hastanın Beyanı) (bu bölüm hazırlanan gönüllü olur formunun sonuna eklenmelidir)

Sayın Dr..... tarafından (kurum adı)..... (anabilim dalı adı, ünite adı vb.)’da tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (denek) olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılabileceğine inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim) Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Dr.....(Doktor ismi),(telefon ve adres) ‘ten arayabileceğimi biliyorum. (Doktor ismi, telefon ve adres bilgileri mutlaka belirtilmelidir)

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımuma ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

ETİK KURUL KARARI

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 547

Tarih : 06.05.2013

Konu : Prof.Dr. Güher SARUHAN DİRESKENELİ hk,

Sayın Prof.Dr. Güher SARUHAN DİRESKENELİ
Fizyoloji Anabilim Dalı

İlgi :Fizyoloji Anabilim Dalının 11/04/2013 gün ve 94 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz 2013/457 dosya numaralı "Behçet hastalığında IFN- γ , IL-17 ve IL-23R ilişkisi" başlıklı tez çalışması kurulumuzun 19/04/2013 tarihli 08 sayılı toplantısında etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.


Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: Tutanak

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	VUSALA	Soyadı	ABBASOVA
Doğ. Yeri	BAKÜ	Doğ. Tar.	13.10.1988
Uyruğu	AZERBAYCAN	TC Kim No	
Email	vusaleabbasova@yahoo.com	Tel	0090 544 543 14 81

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük. Lis.	Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İmmunoloji yüksek lisans programı	
Lisans	Bakü Devlet Üniversitesi	2010
Lise	Bakü No 289 'Zengi' lisesi	2006

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
Türkçe	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi		
Rusca	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi		
İngilizce	İyi	İyi	İyi		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Word	İyi
Microsoft Excell	İyi
Microsoft Powerpoint	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

- Satranç
- Resim yapmak
- Kitap koleksiyonu yaparak kütüphane oluşturmak

