



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ TIP
FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
Romatoloji Bilim Dalı**

ROMATOİD ARTRİT AKTİVASYONUNDA CD200'ÜN ÖNEMİ VAR MIDIR?

YANDAL UZMANLIK TEZİ

Uz.Dr. İrem GAYRET

Antalya, 2014



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ TIP
FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
Romatoloji Bilim Dalı**

ROMATOİD ARTRİT AKTİVASYONUNDA CD200'ÜN ÖNEMİ VAR MIDIR?

YANDAL UZMANLIK TEZİ

Uz.Dr. İrem GAYRET

Tez Danışmanı: Prof.Dr. M. Ender TERZİOĞLU

“Tezimden Kaynakça Gösterilerek Yararlanılabilir”

Antalya, 2014

“Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2013.04.0103.005 Proje No ile desteklenmiştir”

TEŞEKKÜR

Romatoid artrit, neden olduğu fonksiyonel bozukluklar ve psikososyal etkilerle hem hasta, hem de hasta yakınlarının hayatını etkileyen ve ciddi iş gücü kaybına neden olan bir hastalıktır. Hastalığın erken dönemde tanısı ve etkin şekilde tedavisi ile karşılaşılacak olumsuzluklar engellenebilir. Kullanabileceğimiz birçok ilaç seçeneği olmasına rağmen hastalığın daha etkin biçimde ve daha az yan etki ile tedavisi arzulanmaktadır. Bu nedenle hedefe yönelik yeni tedavi seçenekleri araştırılmaktadır. Romatoid artrit etiyopatogenezinde etkisi olduğu düşünölen CD200’de bu anlamda önem kazanmıştır. Romatoid artritte CD200’ün önemini aydınlatmak amacıyla bu çalışmanın yapılması düşünölmüştür.

Bu çalışmada ve uzmanlık dönemim boyunca engin bilgi birikimi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, örnek aldığım değerli hocam Sayın Prof.Dr. Ender Terzioğlu’na,

Örnek davranışları, motive edici yaklaşımlarıyla her zaman desteklerini hissettiğim kıymetli ağabeylerim Sayın Doç.Dr. Veli Yazısız ve Sayın Doç.Dr. Ali Berkant Avcı’ya,

Hayattaki en yakın dostum ve kardeşim canım Sibel’ciğıme,

Çalışma için finansal desteği sağlayan Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi’ne,

Bugüne kadar beni iyi ve kötü günümde yalnız bırakmayıp yanımda olan ve benimle gurur duyan annem, babam, teyzem ve canım kardeşlerime,

Aldığım nefesim, yaşam sebebim olan, bana varlığıyla güç veren eşim Adem Gayret’e,

Biricik tatlı kızım Selin’ime ve doğumuyla birkez daha bana hayat veren küçük oğlum Efe’me

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	iv
Şekiller Dizini	vii
Çizelgeler Dizini	viii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI	3
2.1. Romatoid Artrit Patogenezi	3
2.1.1. Otoantikorlar	3
2.1.1.1. Romatoid faktör	3
2.1.1.2. Anti-sitrüline peptid antikorlar	3
2.1.2. Genetik risk faktörleri	4
2.1.2.1. Hla ilişkili genler	4
2.1.2.2. Non-HLA ilişkili genler	5
2.1.3. Çevresel risk faktörleri	6
2.1.3.1. Sigara	6
2.1.3.2. Diğer çevresel risk faktörleri	6
2.1.4. İmmün sistem	7
2.1.4.1. T hücreleri	7
2.1.4.2. B hücreleri	8
2.1.4.3. Mast hücreleri	8
2.1.4.4. Monosit ve makrofajlar	9
2.1.5. İnflamatuar sitokinler	10
2.1.6. Kemik ve kıkırdak yıkımı: osteoklast ve fibroblastlar	10
2.2. CD200 ve CD200R	11
2.2.1. CD200 ve CD200R ekspresyonu	12
2.2.2. CD200 ve CD200R genleri ve izoformları	12
2.2.3. CD200/ CD200R sinyal kaskadı	14
2.2.4. CD200/ CD200R inhibisyon mekanizmaları	15
2.2.5. CD200/ CD200R fonksiyonları	18
2.2.6. CD200/ CD200R'ın artritteki rolünü gösteren hayvan çalışmaları	21
2.2.7. CD200/ CD200R insan çalışmaları	24

3. MATERYAL VE METOD	28
3.1. Hastaların Belirlenmesi	28
3.2. Örneklerin Alınması ve Analizi	29
3.3. İstatistiksel Yöntem	30
4. BULGULAR	31
4.1. Hasta ve Kontrol Grubunun Demografik Özellikleri	31
4.2. Hasta ve Kontrol Grubunun CD200, TNF α ve IFN γ Düzeyleri	32
4.3. TNF α , CD200, IFN γ düzeyleri ile Diğer Parametrelerin İlişkisi	35
5. TARTIŞMA	36
6. SONUÇLAR	40
7. ÖZET	41
8. ABSTRACT	42
9. KAYNAKLAR	43
10. EKLER	50
Ek 1. ACR / EULAR 2010 romatoid artrit tanı kriterleri	50
Ek 2. DAS28-ESR/CRP hesaplayıcı	51

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

aa	Aminoasit
ABD	Anabilim Dalı
ACPA	Anti Sitrülinlenmiş Peptid Antikoru
ACR	American Collage of Rheumatology
AML	Akut Myeloid Lösemi
Anti-CPP	Anti Siklik Sitrüline Peptid
APC	Antijen Sunan Hücre
BAFF	B Hücre Aktive Edici Faktör
BD	Bilim Dalı
bFGF	Temel(basic) Fibroblastik Büyüme Faktörü
BTLA	B ve T Lenfosit Attenuator
C3	Kompleman 3
CD200Fc	CD200 Füzyon Proteini
CD200RL	CD200 Reseptör Benzeri (like)
CIA	Kollajen İle İndüklenen Artrit
CNS	Santral Sinir Sistemi
COMP	Kıkırdak Oligomerik Matriks Proteini
CRP	C Reaktif Protein
CTL	Sitotoksik T Lenfosit
CTLA-4	Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4
DAP-12	12 kDa DNAX Aktive Edici Protein
DAS28	Hastalık (Disease) Aktivite Skoru 28
dl	Desilitre
DMARD	Hastalık Modifiye Edici Antiromatizmal İlaç
DNA	Deoksiribonükleik Asit
Dok	Downstream of Thyrosine Kinase
EAE	Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit)
EBV	Ebstein Barr Virüsü
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
ELİZA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ESR	Eritrosit Sedimentasyon Hızı
EULAR	European League Against Rheumatism

GM-CSF	Granülosit Monosit Koloni Stimulan Faktör
h	Saat
HLA	Human Leucocyte Antigen (İnsan Lökosit Antijeni)
IDO	İndolamin Dioksijenaz
IFN γ	İnterferon γ
Ig	İmmünoglobülin
IL	İnterlökin
IRF-5	İnterferon Regulator Faktör-5
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine Based Inhibitory Motif
iNOS	İndükelenebilir Nitrik Oksit Sentaz
kDa	Kilodalton
KLL	Kronik Lenfositik Lösemi
KO	Knocked Out
LN	Lenf Nodu
LPS	Lipopolisakkarid
mAb	Monoklonal Antikor
MAPK	Mitojen Aktive Protein Kinaz
mcg	Mikrogram
MCV	Modifiye Sitrülinlenmiş Vimentin
MDM	Monosit Derive Makrofaj
mg	Miligram
MHC	Major Histokompatibilite Antijeni
ml	Mililitre
mm	Milimetre
MM	Multipl Myelom
MMP	Matriks Metalloproteaz
mRNA	Haberci(Messenger) Ribonükleik Asit
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NF-kB	Nükleer Faktör-Kappa B
NK	Doğal Öldürücü Hücre (Naturel Killer Cell)
ODF	Osteoklast Diferansiasyon Faktörü
OPG-L	Osteoprotegrin Ligand
PAD	Peptidil Arjinin Diiminaz
PAF	Platelet Aktive Edici Faktör
PAMP	Patojen Assosiyasyon Moleküler Patern

PBMC	Periferik Kan Mononükleer Hücre
pg	Pikogram
PG	Prostaglandin
PHO	Hipertrofik Osteoartropati
PTB	Fosfotirozin Bağlama
RA	Romatoid Artrit
RANKL	Receptor Activator of NF kB Ligand
RANTES	Regulated on Activation, Normal T Cell Expresed and Secreted
RasGAP	RasGTPaz
RF	Romatoid Faktör
RT PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SCC	Skuamoz Hücreli Karsinom
SHIP	SH2 İçeren İnoзитol Fosfataz
SLE	Sistemik Lupus Eritematozus
SNP	Tek (single) Nükleotid Polimorfizmi
STAT4	Signal Transducer and Activator of Transcription 4
T_{FH}	T Folliküler Hücre
TGFβ	Transforme Edici Büyüme Faktörü β
Th	Yardımcı T hücre
TLR	Toll Like Receptor
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
TNFAIP3	Tumor Necrosis Factor Induced Protein 3
tr	Truncated
TRAF1	Tumor Necrosis Factor Associated Protein 1
Treg	T Regulatuar Hücre
TREM	Triggerring Receptor Expresed by Myeloid Cells (Genişletilmiş Myeloid Hücrede Ekspres Edilen Tetikleyici Reseptör)
μl	Mikrolitre
UV	Ultraviyole
VAS	Visual Analog Scale (Görsel Analog Skalası)

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>		<u>Sayfa</u>
2.1.	CD200 sinyal kaskadı	15
2.2.	CD200/CD200R ekspresyonu ve CD200/CD200R'ın immün sistem üzerinde etkileri	18
4.1.	RA hastaları ve kontrol grubunun plazma ve sinoviyal sıvı CD200 düzeyleri	33
4.2.	RA hastaları ve kontrol grubunun plazma ve sinoviyal sıvı IFN γ düzeyleri	33
4.3.	RA hastaları ve kontrol grubunun plazma ve sinoviyal sıvı TNF α düzeyleri	34

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. CD200/CD200R ekspresyonu ile sitokin, hücre grupları ve hastalıkların ilişkisi	21
4.1. RA hastaları ve kontrol grubunun demografik özellikleri	32
4.2. RA hastaları ve kontrol grubunun serum ve sinoviyal sıvıdaki CD200, TNF α ve IFN γ değerleri ve grupların birbirleriyle karşılaştırılması	34

1. GİRİŞ

Romatoid artrit (RA), poliartiküler simetrik eklem tutulumunun olduğu, kıkırdak harabiyeti, kemik erozyonları ve etkilenen eklemlerde fonksiyon kaybı ile seyreden kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Normalde aselüler olan sinoviyumun inflamatuvar hücrelerce invazyonu sonucu hastalığın primer lezyonu olan “pannus” gelişmektedir. Avrupa ve Kuzey Amerika’da %0.5-1 sıklığında görülmektedir. Hastalığa bayanlarda erkeklere göre 3 kat daha sık rastlanmaktadır. Hastalık ailesel kümeleşme göstermekte ve hastanın birinci derece akrabalarında risk normal popülasyona göre 2-10 kat artmaktadır (1).

Adaptif ve doğal immün sistem elemanlarının kompleks ilişkisi sonucu oluşan sitokinler, mediatörler ve otoantikörler hastalık patogenezinde yer almaktadır. Son on yıl içinde RA patogenezinin daha iyi anlaşılmasıyla birlikte tedavi seçenekleri de değişmiştir. Hastalara en erken dönemde tedavinin başlanması ve tedavi hedefinin hastalık remisyonu veya düşük hastalık aktivitesinin sağlanması gerektiği görüşü (treat to target, tight disease control) benimsenmiştir. Diğer otoimmün hastalıkların tedavisine benzer şekilde RA tedavisinde de başlıca hedef, yabancı veya otoantijenlere karşı gelişen immüniteyi suprese etmektir. RA tedavisinde uzun yıllar boyunca geleneksel hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaçlar (DMARD) olan metotreksat, antimalariyal ilaçlar, sulfasalazin, leflunomid, altın, siklosporin kullanılmış, son dönemde tümör nekroz faktörü α (TNF α)’nın hastalık patogenezindeki rolünün aydınlatılmasıyla anti-TNF tedaviler gündeme gelmiştir. Anti-TNF ilaçların sayıları gün geçtikçe artmış ve bunun yanı sıra B ve T hücrelerini ve diğer sitokinleri hedef alan tedaviler kullanıma girmiştir.

Tedavide kullanılan nonspesifik immünsupresif ilaçlar, toksisiteleri yanında nonspesifik supresyon sonucu gelişen fırsatçı enfeksiyon, malignite ve lenfoproliferatif hastalıklar gibi riskleri de beraberinde getirmektedir. Nonspesifik ilaç tedavisine olan ihtiyacı azaltmak veya ortadan kaldırmanın yolu da yeni antijen spesifik supresyon veya tolerans indüksiyonu sağlayan tedavi seçenekleri geliştirmektir. Bu da RA patogenezinin daha iyi anlaşılmasıyla mümkündür.

Son dönemde antijen tanınması ve T hücre reaktivitesinin indüksiyonu ile ilgili mekanizmalar önem kazanmıştır. İmmün reaktivitenin oluşması sadece antijen spesifik reseptörlerin uyarılmasına bağlı değildir. Bunun yanında T hücre aktivasyonu için

gerekli kostimülatuar sinyallerin oluşması da gerekmektedir. Bu kostimülatuar sinyallerin blokajının immüitenin gelişimini engelleyici etkileri ve tolerans gelişimine katkıları araştırılmaktadır. Kostimülatuar sinyallerin dışında, T hücrelerinin antijen sunan hücrelerden (APC) lenfositleri direkt olarak inaktive eden dominant supresif sinyaller aldığı gösterilmiştir. Bu dominant negatif sinyal molekül çiftlerinden biri de CD200:CD200R'dır. CD200:CD200R'ın lenfoid ve myeloid hücrelerin regulasyonunda ve immün tolerans gelişiminde rol oynadığı, hücrelerin diferansiasyon, adhezyon ve kemotaksisinde etkili olduğu ve mediatör ve sitokin salınımını regüle ettiği bilinmektedir (2). Bu özellikleri nedeniyle CD200, otoimmünite, organ transplantasyonu, allerjik hastalıklar ve kanser etiyopatogenezinde yer almaktadır (3).

2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

2.1. Romatoid Artrit Patogenezi

RA, eklemler başta olmak üzere diğer organ sistemlerini de etkileyen otoimmün bir hastalıktır. Hastalık gelişiminde otoantikorların, genetik faktörlerin, çevresel faktörlerin ve immün sistemde meydana gelen değişikliklerin rol oynadığı düşünülmektedir. Hastalığa yatkınlığı olan bireylerde genetik ve çevresel faktörlerin etkisiyle immün yanıt oluşmakta ve nasıl ve neden olduğunu tam olarak bilmediğimiz bir tetikleyici olayla sinoviyum etkilenmektedir.

2.2.1. Otoantikorlar

2.2.1.1. Romatoid faktör

RA hastalarının kanında Romatoid Faktör (RF) olarak adlandırılan immünoglobulin (Ig) G'nin Fc kısmına karşı gelişmiş antikorların tespit edilmesiyle hastalığın otoimmün bir hastalık olduğu görüşü desteklenmiştir. RF genellikle IgM tipinde olmakla birlikte IgG ve IgA tipinde de olabilir. Bu otoantikorların eklemlerde immün kompleks oluşturarak kompleman sistemini aktive ettiği, bu aktivasyonun vasküler permeabilite artışı ve kemotaktik faktörlerin salınımıyla effektör hücrelerin ekleme göç etmesini sağladığı düşünülmektedir. RF'nin RA dışı otoimmün hastalıklarda, bazı infeksiyon hastalıklarında ve hatta sağlıklı insanlarda da pozitif olması tek başına RF pozitifliğinin artrit gelişimi için yeterli olmadığını göstermektedir. Yapılan çalışmalarda RF'nin duyarlılığı %60-70 ve özgüllüğü %50-90 olarak saptanmıştır (1). Yapılan bir çalışmada RF'nin erken aritri olan hastalarda aritritin devamlılığının en güçlü göstergesi olduğu tespit edilmiştir (4). RF, radyografik progresyon ve ekstraartiküler tutulum olabileceğinin de bir göstergesidir.

2.1.1.2. Anti-sitrüline peptid antikorlar

Sitrülinizasyon, intraselüler proteinlerin apoptoz ile yıkımında rol oynayan fizyolojik bir basamaktır. Yüksek konsantrasyonda hücre içi kalsiyum varlığında peptidil arjinin diiminaz(PAD) enzimi ile arjinin sitrüline çevrilir. 1964'te ilk olarak antiperinükleer faktör ve 1979'da keratinositlerdeki sitrüline fillagrine bağlanmalarından dolayı antikeratin antikor olarak adlandırılmıştır. Yapılan çalışmalarda sitrülinlenmiş vimentin, fibrinojen ve enolaz gibi proteinlere reaktif olduğu

gösterilmiş ve anti-sitrüline edilmiş peptid antikorlar (ACPA) veya anti-siklik sitrüline peptid (anti-CCP) olarak adlandırılmıştır. Bu otoantikorum RF'den daha spesifik olduğu ve RA için özgüllüğünün %91-100 olduğu bilinmektedir. Duyarlılığı ise RF'ye benzerdir (%41-63) (1).

ACPA pozitif RA hastalarında hastalık gelişimi öncesinde ACPA'nın tanıdığı sitrülinlenmiş epitop sayısının arttığı (epitope spreading) ve otoantikorların izotip profilinin genişlediği görülmüştür. Bu otoantikorlar hastalık gelişiminden yıllar önce ve hastalık seyri boyunca serumda tespit edilmektedir. Daha önce tespit edilmiş olan ve RA için çok spesifik olduğu düşünülen Sa antijeninin sitrüline vimentin olduğu ve bu antikorum mutasyona uğramış izoformunun (mutated citrullinated vimentine-MCV) hastalık aktivitesiyle korele olduğu tespit edilmiştir (5). Yapılan deneylerde insan eklemünde saptanan anti-sitrüline kollajen tip II antikorlarının farede artrojenik olduğu görülmüştür (6). Kollajen ile indüklenen artriti (CIA) olan fare modellerinde anti-sitrüline fibrinojen antikorlarının artriti alevlendirdiği ve insan lökosit antijeni (HLA-human leucocyte antigen)-DRB1*0401 transjenik farelerde sitrülinlenmiş insan fibrinojeninin artrit gelişimini indüklediği saptanmıştır (7).

Bu otoantikorum erken artriti olan bireylerde RA gelişiminin habercisi olduğu, ciddi seyirli ve eroziv hastalıkla ilişkili olduğu ve ACPA titrelerinin hastalık aktivitesiyle korele olduğu gösterilmiştir (1).

2.1.2. Genetik risk faktörleri

İngilizlerde yapılan ikiz çalışmalarında RA patogenezinde ailesel kalıtımın %60 etkili olduğu görülmüştür (1). Son dönemdeki teknolojik ilerlemeler sayesinde RA ile ilgili genetik faktörler aydınlatılmaya başlanmış ve bu faktörlerin ACPA pozitif RA'da daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

2.1.2.1. HLA ilişkili genler

RA gelişiminde en etkili genetik risk faktörünün HLA klas II molekülü olduğu bilinmektedir. Otolog miks lenfosit reaksiyonu sonucu RA hastalarında genetik benzerlik olduğu ve bu benzerliğin HLA-DRB1 alleli olarak adlandırılan majör histokompetibilite kompleksi(MHC) klas II lokusunda olduğu saptanmıştır. Bazı HLA-DRB1 moleküllerinin DRβ1 zincirinin hipervariabl bölgesinde 70-74. aminoasit(aa) dizisinin (glutamin, lözin, arginin, alanin, alanin) aynı olduğu saptanmış ve bu bölgeye

“ortak epitop (shared epitope)” ismi verilmiştir. Ortak epitopun daha ciddi seyirli ve eroziv hastalıkla, ekstraartiküler bulgularla ilişkili olduğu bilinmektedir. Huizinga ve arkadaşları, ortak epitop varlığının ACPA pozitifliği için ilk ve en önemli risk faktörü olduğunu göstermişlerdir (8). HLA-DR3’ün ise ACPA negatif RA’da rolü olduğu ve ACPA dışında henüz tespit edilememiş olan bir başka otoantikor ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bazı HLA-DRB1 allelerinde ise aspartine rezidusu içeren aa sekansı (DERAA) bulunmakta ve bu sekansın RA’ya karşı koruyucu olduğu bilinmektedir (1). Ortak epitop taşıyan bireylerde bile DERAA olması, daha az eroziv seyreden hastalıkla ilişkilidir.

2.1.2.2. Non-HLA ilişkili genler

RA patogeneğinde rol oynadığı bilinen non-HLA genlerden biri lenfosit spesifik protein olan tirozin fosfatazı kodlayan PTPN22 genidir. 1858. pozisyonundaki tek gen polimorfizmi (SNP) sonucu gelişen mutasyon ile timik seleksiyon sırasında olması gereken otoantijen spesifik T hücrelerinin klonal olarak ortadan kaldırılması engellenmiştir. Bu mutasyonun ACPA pozitif RA patogeneğinde rolü olduğu bilinmektedir. Ortak epitop ve PTPN22’nin birlikteliğinde ise hastalık riski çok artmaktadır. Ayrıca STAT4 (signal transducer and activator of transcription 4), 6q23, 9q33.2’deki polimorfizmlerde ACPA pozitif RA’da rol oynamaktadır. STAT4, tip1 ve tip 17 yardımcı T hücre (Th) diferansiasyonunda görevli bir transkripsiyon faktörüdür.

TNFAIP3 (tumor necrosis factor alpha induced protein 3) ve TRAF1 (tumor necrosis factor associated factor 1), RA patogeneğinde rol oynayan diğer genlerdir. TNFAIP3, nükleer faktör-kB (NF-kB)’nin inhibitörü olan A20 proteinin kodlayarak TNF α sinyal yolunu regule eder. TRAF1 ise TNF α ’nın TNF reseptör-1 (TNFR-1) yoluyla olan sinyalizasyonunda görevli NF-kB üzerine etki eder. Bu bilgilerde RA patogeneğinde NF-kB’nin önemli bir rolü olduğunu göstermektedir.

CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4), KIF5A-PIP4K2C, CCL21, CDK6, CD28, PRDM1, CD2/CD58 ve IL2RA’yı kodlayan genlerdeki varyasyonlar ve kromozom 1p36.13’de lokalize PAD enzimini kodlayan PADI4 lokusundaki SNP de patogeneğinde yer almaktadır. İnterferon regulatuar faktör-5(IRF-5) geninin promotor bölgesindeki polimorfizmin ACPA negatif RA ile ilişkisi bilinmektedir. Non-HLA genlerinin hastalık gelişimine etkisi HLA genlerinin etkisinden daha azdır ve kompleks genetik çevresel etkileşim hastalık tablosuna katkıda bulunmaktadır (1).

2.1.3. Çevresel risk faktörleri

2.1.3.1. Sigara

Sigara, RA patogeneğinde en önemli çevresel risk faktörüdür. Sigara, hastalık seyrinin daha şiddetli olmasıyla ilişkilidir ve bu etki içilen paket-yıl sayısı arttıkça artmaktadır. Ortak epitop ve PTPN22'ye benzer şekilde sigarada ACPA pozitif RA gelişimi açısından önemli bir risk faktörüdür. Sigaranın proteinlerin sitrülizasyonunu arttırdığı bilinmektedir. Sigara içen bireylerin bronkoalveolar lavajlarında sitrülünlenmiş proteinler saptanmasına rağmen sigara içmeyenlerde bu proteinlere rastlanmamıştır. Ortak epitop varlığında sigara içiciliğinin RA gelişim riskini sigara içmeyen ve ortak epitop taşımayan bireylere göre 21 kat arttırdığı bilinmektedir (9).

2.1.3.2. Diğer çevresel risk faktörleri

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda RA patogeneğinde etkisi olabilecek birçok çevresel etken değerlendirilmiş ve sadece sigaranın etkisi kanıtlanabilmiştir. Sigaranın spesifik etki göstererek özellikle ACPA pozitif RA patogeneğinde rol oynadığı, diğer çevresel faktörlerin ise nonspesifik etki göstererek inflamasyonu tetiklediği düşünülmektedir.

Mikobakteri, Epstein Barr virüs (EBV), Parvovirüs B19 gibi patojenlerin genetik yatkınlığı olan bireylerde immün yanıtı tetiklediği düşünülmektedir. Bugüne kadar RA patogenezi ile ilişkili patojen kaynaklı antijen gösterilememiş ve etkinin moleküler benzerlikten (molecular mimicry) kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Bazı kohortlarda kahve tüketiminin RA ile ilişkili olabileceği saptanmış, fakat risk sigara kullanımına göre düzeltildiğinde bu etkinin kaybolduğu görülmüştür. Alkol tüketiminin ACPA pozitif RA'ya karşı koruyucu olduğu fakat ACPA negatif RA'da etkisinin olmadığı, yüksek vücut kitle indeksinin ACPA negatif RA gelişimi açısından anlamlı olabileceği, motor yağları ve hidrolik yağ gibi mineral yağlara mesleki maruziyetin de erkeklerde ACPA pozitif RA gelişiminde etkili olduğu saptanmıştır (1).

Bayanlarda RA'nın daha sık görülmesi nedeniyle seks hormonları ve üreme ile ilgili faktörlerin patogeneşte etkili olabileceği düşünülmüştür. Erken yaşta menarş olan bayanlarda RA gelişim riski daha azdır. Gebelik RA gelişimi için bir risk faktörüdür ve bayan RA hastalarının %12'sinde hastalık gebelikten sonraki ilk bir yıl içinde gelişmektedir. RA'sı olan bayanların gebelik sırasında hastalığı daha sessiz seyrederken doğum sonrası ilk 6 ayda relaps çok sıktır. Multiparitenin (>3 çocuk) hastalık şiddetini

arttırdığı fakat hastalığın gelişimine etkisinin olmadığı bilinmektedir. Oral kontraseptif kullanımının hastalık şiddetini azalttığı fakat bu etkinin yaşa göre düzeltme yapıldıktan sonra kaybolduğu gözlenmiştir (10).

2.1.4. İmmün sistem

RA'de görülen sinovit, sinoviyumun birçok immün hücre ile infiltrasyonu ile karakterizedir ve sentezlenen birçok sitokinin eklemde sinoviyal fibroblast ve osteoklastların aktivasyonu sonucu gelişen eklem ve kıkırdak hasarında rolü vardır.

2.1.4.1. T hücreleri

T hücreleri sinoviyal doku mononükleer hücrelerinin %30-50'sini oluşturmaktadır ve RA'da sinoviyumda en fazla görülen hücre tipidir. Büyük bir kısmını CD4⁺ Th hücreler oluşturmaktadır. Sağlıklı bireylerde Th1 hücreler intrasellüler bakterilere karşı etkilidir ve interferon γ (IFN γ) sentezler. Th2 hücreler ekstrasellüler parazitlerle mücadelede rol oynar ve interleokin (IL)4 sentezlemektedir. Son dönemde saptanan Th17 hücreler ekstrasellüler bakterilere karşı vücudun savunmasında, T regülatuar (Treg) hücreler ise immün toleransta ve immün modülasyonda görev alan hücrelerdir.

RA'da Th1 yanıtın Th2'den baskın olduğu bir immün sistem değişikliği söz konusudur. Otoimmün inflamasyonun gelişiminde Th17 hücreler önemli rol oynamaktadır. Bu hücre tipinin diferansiasyonu için transforme edici büyüme faktörü (TGF) β , IL23, IL6 ve IL1 β gibi sitokinlere ihtiyaç vardır. Th17 hücreler TNF α , IFN γ , IL10, IL17, IL6, IL22, granülosit-makrofaj koloni stimule eden faktör (GM-CSF) sentezlemektedir. IL17 lokal inflamasyonu arttırmakta, anjiogenez, osteoklastogenezde etkili olmakta ve sonuçta kemik ve kıkırdak harabiyetine yol açmaktadır. IL6 antagonisti olan tosilizumab'ın Th17 hücre oluşum ve fonksiyonunu engellediği bilinmektedir. Treg hücrelerin RA hastalarının sinoviyumunda artan oranda görüldüğü fakat TNFR-II eksprese ettikleri için TNF α 'nın kötü etkilerine maruz kalarak anormal fonksiyon gösterdikleri bilinmektedir. TNF antagonisti tedavi ile TGF β ve IL10 sekrete eden Treg popülasyonunun oluştuğu görülmüştür (1).

Efektör T hücre maturasyonunun gelişmesi için, T hücresinin antijeni MHC molekülü aracılığıyla tanınmasının yanı sıra kostimülatuar sinyallere de ihtiyaç vardır. Bu sinyal T hücre yüzeyindeki CD28 ile APC yüzeyindeki CD80/86 interaksyonu ile

sağlanmaktadır. Bu sinyalizasyon T hücre molekülü CTLA-4 ile regule edilmiştir. Bu yol, T hücre hedefli tedavi seçeneği olan abatacept tarafından kullanılmaktadır.

2.1.4.2. B hücreleri

Hastalarda artrit kliniği çıkmadan önce serumda otoantikörlerin saptanması otoantijen spesifik B hücre aktivasyonu ve plazma hücre diferansiasyonunun erken dönemde olduğunu göstermektedir. Sinoviyumda germinal merkez benzeri yapılara sıklıkla rastlanmaktadır ve B hücrelerinin kendilerinin de antijenik peptidleri sunma özelliğinin olduğu ve hatta naive T hücrelerini bile bu yolla etkiledikleri gösterilmiştir (11). B hücre yüzeyindeki toll like reseptörler (TLR), bakteriyel hücre duvarı komponentleri veya patojen assosiye moleküler paternlere (PAMP) bağlanarak tehlike sinyalleri oluşturmaktadır. Bu yolla RA sinoviyumunda bulunan ölü hücrelerden salınan mitokondriyal deoksiribonükleik asitler (DNA) otoreaktif B hücrelerini aktive etmekte, sonuçta otoantikör oluşumu ve immün kompleks gelişimini sağlamaktadır. Bu olaylar zinciri B hücre aktive edici faktör (BAFF) varlığında T hücre yardımı olmaksızın B hücre reseptörüne bağlanma sonucu gerçekleşebilir.

RA'da fibroblast benzeri sinoviyositler ve dendritik hücreler salgıladıkları faktörlerle B hücreleri sinoviyuma çekmekte ve bu hücrelerin diferansiasyon ve sağkalımını sağlamaktadır. B hücreleri yüzey Ig'leri ile antijenleri tanımakta ve APC gibi davranmaktadır. RA sinoviyunda artmış miktarda bulunan BAFF sayesinde normal koşullarda CD4⁺ T hücrelerine bağımlı CD40/CD40L ilişkisi T hücrelerinden bağımsız olarak gerçekleşmekte ve sonuçta Ig klas switching ve somatik hipermutasyon gelişmektedir. BAFF ayrıca B hücre sağkalımını da arttırmaktadır (1).

B hücreleri TNF α ve IL6 salgılayarak makrofaj aktivasyonuna neden olmaktadır. IL6, otokrin etki göstererek B hücrelerinin diferansiasyonuna katkıda bulunmaktadır. B hücrelerince sentezlenen RF, immün kompleks oluşturarak doku hasarına neden olmakta ve komplemanı aktive etmektedir. Bu immün kompleksler makrofajlar tarafından fagosite edilmekte ve inflamatuvar sitokin sentezi sağlanmaktadır.

2.1.4.3. Mast hücreleri

Doğal bağışıklık sisteminin parçası olan, anafilaksi, ve alerjik hastalıklarda rol oynayan granüllü hücrelerdir. Direkt hasar, Fc ϵ reseptörlerine çapraz bağlanma, TLR'e bağlanma, kompleman sisteminin aktivasyonu, sitokinler, histamin gibi biyojenik

aminler ve proteazlarla stimölasyon sonrası degranölle olurlar. Mast hücreleri olmayan farelerin deneysel artrit gelişimine dirençli olduğu tespit edilmiştir (12). TGFβ, C3a, C5a, serum amiloid A, platelet aktive edici faktör (PAF) mast hücre kemotaksisinde önemli rol oynar. Fibroblastlar, stromal hücreler, epitelyum hücrelerince sentezlenen kök hücre faktörü mast hücre diferansiasyonunda etkilidir. Mast hücrelerinin aktivasyonuyla komşu immün sistem hücrelerinin inflamatuvar fenotip kazanması sağlanır, anjioneogenez ve kartilaj hasarı tetiklenir. Bu hücreler IL17 sentezlemektedir ve bu etkilerinin Th17 hücrelerinden bile daha önemli olduğu gösterilmiştir (13). ACPA pozitif RA hastalarında IgE ACPA'nın olduğu görölmüş ve sinoviyal sıvıdaki histamin seviyelerinin çok yüksek olmasının IgE ACPA ilişkili mast hücre degranölasyonuna bağılı olduğu düşünölmüştür.

2.1.4.4. Monosit ve makrofajlar

Makrofajlar adaptif ve doğıal immün sistem cevaplarını entegre eden efektör hücrelerdir. RA'da sinoviyal membranda ve kıkırdak pannus bileşkesinde fazla miktarda bulunurlar. Makrofajların fagositoz, antijen sunumu, otoantikörleri tanıyan Fc reseptör ekspresyonu ve immün kompleks formasyonu, kompleman sisteminin aktivasyonu, TLR ekspresyonu, doku yıkımı ve dokuların yeniden şekillendirilmesi gibi görevleri vardır. TNFα, IL1, IL6 gibi proinflamatuvar sitokinleri, kıkırdak yıkımından sorumlu matriks metalloproteinaz (MMP)9 ve 12 ve GM-CSF gibi büyüme faktörlerini üretmektedir. Taşıdıkları yüzey molekülü olan CD68'in, sonraki dönemlerde RA'da ilaç yanıtını gösteren bir belirteç olabileceğı düşünölmektedir. Genetik yatkınlığı olan bireylerde, patojen ilişkili antijenler ilk kez makrofajlar ve dendritik hücrelerce tanınmakta, bu antijenler otoreaktif T hücrelerine sunulmakta ve böylece immün yanıt tetiklenmektedir. Makrofajlar, sinoviyumda T hücreleri ve fibroblastlarla direkt ilişki halindedir. İn vitro makrofaj ve fibroblastların birlikte kültüre edilmesiyle makrofajlardan IL6, IL8, GM-CSF sekresyonu ve kıkırdak harabiyeti indüklenmektedir. Bakteriyel hücre duvarı komponentleri olan lipopolisakkaridler(LPS), DNA ve hyalüronik asit gibi kıkırdak degradasyon ürünleri makrofajlar için kuvvetli aktivatörlerdir. Makrofajlar östrojenden etkilenmektedir. Bu da hastalık aktivitesinin gebelikteki değişimini açıklayabilir. Fizyolojik östrojen seviyeleri IL1 ekspresyonunu arttırırken, gebelikteki gibi yüksek östrojen seviyeleri IL1 sekresyonunu inhibe etmektedir. IL4; TNFα, IL1β, prostoglandin (PG)E2 ekspresyonunu azaltarak makrofaj

fonksiyonlarını baskılamaktadır. IL10, HLA-DR ekspresyonunu, antijenik işlemleri ve Fc reseptörlerinin ekspresyonunu azaltır. Murine modellerinde IL4 ve IL10'un güçlü anti-artritik etkisi olduğu gösterilmiştir. IL18, IL12 ve IL15 ile birlikte makrofajları aktive etmektedir. IL15, T hücrelerini aktive etmekte ve aktive T hücreleri de makrofajları uyarmaktadır. Transforme edici büyüme faktörü β (TGF β), doku hasarının ve dokunun yeniden şekillendirilmesinin önemli düzenleyicilerindendir ve makrofojlar tarafından üretilmektedir.

2.1.5. İnflamatuvar sitokinler

Üç aydan kısa süreli artriti olup, RA'ya ilerleyen hastaların sitokin profilinin remisyona giren ve diğer artritleri geliştiren hastalardan farklı olduğu görülmüştür. RA geliştirme potansiyeli olan hastalarda IL2, IL4, IL13, IL17 gibi T hücre sitokinlerinin ve epidermal büyüme faktörü (EGF), temel fibroblastik büyüme faktörü (bFGF), IL1 ve IL15 gibi makrofaj sitokinlerinin arttığı görülmüştür. IFN γ bu hastalarda saptanmamış ve fenotipten bağımsız olarak IL6 tespit edilmiştir. Bu sitokin profilinin RA hastalarında olmadığı ve sadece geçici bir süre hastalık başlangıcında olduğu görülmüştür. Erken RA hastalarında, Th1 sitokini IFN γ 'nın olmaması, IL4 ve IL13 gibi Th2 sitokinleri ve IL17 gibi Th17 sitokinlerinin bulunması hastalığın başlangıç döneminde Th2 ve Th17 hücrelerin etkin olduğunu göstermektedir. RA'da T hücreleri, makrofajlar, stromal hücreler sitokinlerin temel kaynağıdır. Hastalığın ileri dönemlerinde makrofaj kaynaklı sitokinler baskın iken T hücre kaynaklı sitokinler daha az mevcuttur. Makrofajlar tarafından üretilen TGF β , hem antiinflamatuvar hem proinflamatuvar özelliğe sahiptir. Genetik polimorfizm nedeniyle düşük TGF β düzeylerinin olması hastalık aktivitesi ile ilişkilidir. TGF β , Treg oluşumunu sağlamakta ve IL6 varlığında Th17 hücrelerinin gelişimini desteklemektedir.

2.1.6. Kemik ve kıkırdak yıkımı: osteoklast ve fibroblastlar

Kemik ve kıkırdak harabiyetinden sorumlu temel hücreler osteoklastlar ve sinoviyal fibroblastlardır. Sinoviyal fibroblastlar kıkırdaktaki ekstraselüler matriksin yıkımından, osteoklastlar da kemik yıkımından sorumludurlar. Bu hücreler, immün sistemin diğer hücreleri ile yakın ilişki halindedir ve inflamasyonun devamında rol oynayan sitokinleri salgırlarlar.

Sinoviyal fibroblastlar, sinoviyal hipertrofiye katkıda bulunacak şekilde lokal olarak prolifer olmaktadır. Bu hücrelerin RA'da yaşam süreleri uzamıştır ve apoptoza dirençlidirler. Kıkırdaktaki fibronektin, tip VI kollajen ve kıkırdak oligomerik matriks proteini (COMP)'nine bağlanarak invaziv özellik gösterirler. IL15, IL16, IL17, CXCL12, CXCL13 ve IL11 sentezleyerek T hücrelerini aktive eder ve B hücrelerinin migrasyon ve sağkalımını sağlar. PGE2 sentezi ile inflamasyona katkıda bulunur. MMP ve katepsin ile kıkırdak yıkımını sağlar. Kıkırdak yıkımı sonrası oluşan neo-antijenler poliklonal T ve B hücre proliferasyonuna katkıda bulunmaktadır.

Osteoklastlar, kemik yıkımından sorumlu temel hücrelerdir. Öncül hücrelerden osteoklast gelişimi için M-CSF ve osteoklast diferansiasyon faktörü (ODF) gerekmektedir. ODF ve osteoprotegrin ligand (OPG-L)'nin RANKL (receptor activator of NFκB ligand) ile aynı olduğu görülmüştür. RANKL, RA sinoviyumunda spesifik olarak eksprese edilmektedir. Deneysel artrit modellerinde, RANKL defektif farelerde aktif inflamasyon olsa bile kemik destrüksiyonu görülmemektedir. RANKL, T hücreleri, nötrofiller ve sinoviyal fibroblastlarca eksprese edilmektedir. TNFα, RANKL ekspresyonunu arttırmakta ve RANKL sinyalizasyonunu güçlendirmektedir. Th1 ve Th2 sitokinler (IFNγ, IL4, IL10), IL12 ve IL18 osteoklastogenezi baskılamakta, IL17 ise osteoblastlarda RANKL ekspresyonunu arttırarak osteoklast oluşumuna katkıda bulunmaktadır.

2.2. CD200 ve CD200R

CD200, 1981- 1982 yıllarında ilk kez Barclay ve arkadaşları tarafından fare monoklonal antikorları kullanılarak sıçan lenfoid dokusunda saptanan 41-47 kilodalton (kDa) ağırlıklı hücre yüzeyi glikoproteinidir ve OX-2 olarak adlandırılmıştır (14,15). CD200R, 2000 yılında Wright ve ekibi tarafından tespit edilmiştir (16). CD200 ve CD200R'ın Ig süpergen ailesine ait bir tip 1 membran glikoproteini olduğu ve birçok hücrede eksprese edildiği gösterilmiştir (14). CD200, iki Ig süperaile domaini, bir transmembran domaini ve kısa bir sitoplazmik domain içermektedir. CD200'ün sitoplazmik domaini sinyal motiflerini içermezken transmembran domaini de DAP-10, DAP-12 gibi sinyal moleküllerini bağlayan motifleri içermemektedir. Bu da CD200'ün overekspresyonu sonucu oluşan immünregulasyonun sinyal motifleri içeren bir reseptör (CD200R) aracılığıyla yapıldığını düşündürmüştür (17,18,19). CD200 ve CD200R'ın

ekstraselüler kısımları aynı iken sitozolik COOH kısımları farklılık göstermektedir (20). Bu farklılık CD200R'ın aktivatör veya inhibitör sinyalleri iletebilmesini sağlamıştır.

2.2.1. CD200 ve CD200R ekspresyonu

Wright ve arkadaşları, rekombinant insan CD200 monoklonal antikoru kullanarak CD200'ün doku dağılımını saptamışlardır (21). Sıçanlardaki dağılım paternine benzer olarak insanlarda CD200, myeloid (mast hücreleri, nötrofiller, makrofajlar, dendritik hücreler) ve lenfoid (B ve T hücreleri) hücreler, timositler, nöronlar, böbrek glomerülleri, tonsil follikülleri, sinsityotrofoblastlar, kardiyomyositler, keratinositler ve endotel hücre yüzeylerinde bulunmaktadır. İmmün sistem aktivasyonu sonucu artan TNF α ve IFN γ ile CD200 ekspresyonu artmaktadır (22,23,24). Apoptotik hücrelerin yüzeyinde de yüksek miktarda CD200 eksprese edilmektedir. Apoptoz p53 senteziyle ilişkilidir ve CD200 geni de p53 cevap elementi sekansı içermektedir. Apoptoz sırasındaki p53 artışı bu yolla CD200 artışına neden olmaktadır (25).

CD200R, lenfoid hücreler [B ve T lenfositler, doğal öldürücü (NK) hücreler] ve myeloid hücrelerde (dendritik hücreler, mast hücreleri, bazofiller, eozinofiller, makrofajlar özellikle de M2a regülatuar makrofajlar) tarafından eksprese edilir (26). CD200R, M2a makrofajlar için spesifik marker olarak kullanılmaktadır. CD200R ekspresyonu standart boyama ve flow sitometrik analizlerle dalaktan elde edilen fare lökositlerinde gösterilmiştir. Lökosit alt gruplarında CD200R dansitesinin farklı olduğu saptanmıştır. CD200R en fazla CD11b⁺ hücrelerde eksprese edilmektedir. Yardımcı CD4⁺ T hücrelerde CD200R ekspresyonu CD8⁺ sitotoksik T hücrelerden fazladır. Santral hafıza ve naife T hücrelerine oranla efektör/hafıza CD4⁺ T hücreleri ve Th2 hücrelerine oranla Th1 T hücreleri de daha fazla CD200R eksprese eder. B hücrelerinde de CD200R ekspresyonu en fazla hafıza hücrelerinde ve plazmablastlarda görülür (2). CD200/CD200R'ın olmadığı durumlarda (CD200^{-/-} farelerde) T, B, NK hücre sayılarının değişmediği ve serum Ig seviyelerinin de aynı kaldığı saptanmıştır (27).

2.2.2. CD200 ve CD200R genleri ve izoformları

Hem farede, hem de insanda CD200 ve CD200R aynı kromozom üzerinde kodlanmaktadır (farede 6. kromozom, insanda 3. kromozom). Reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ve cDNA klonlaması ile CD200'ün 3q12-13 ve CD200R'ın 3q13 bölgesinde olduğu saptanmıştır (28). Hem CD200, hem de CD200R

evrim sırasında oldukça korunmuştur. İnsan ve fare CD200 molekülleri aa seviyesinde >%80 homoloji göstermektedir. CD200 tek kopya halinde iken insan ve sıçanda CD200R'ın birden fazla kopyası bulunmaktadır (26,29). CD200R'ın bu izoformları CD200RL [reseptör-benzeri(like) - CD200RLa-e)] veya CD200R2-5 olarak adlandırılmıştır (CD200R2=CD200RLc, CD200R3=CD200RLb, CD200R4=CD200RLa) (29,30). CD200R ile kıyaslandığında CD200RL'in sitoplazmik kuyruğunda pozitif yüklü lisin rezidüleri olduğu görülmüştür. Bu kısımların 12 kDa DNAX-aktive edici protein (DAP-12) ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (31). CD200RLa kemik iliğindeki dendritik hücreler ve istirahat mast hücrelerinde yüksek titrede eksprese edilir. CD200RLb ise aktive makrofajlarda bulunur.

Farede ve insanda CD200R'ın değişik izoformlarının doku spesifik dağılımını olduğu görülmüştür (26,32). CD200R'ın izoformları arasında fonksiyonel farklılıklar olduğuna dair veriler giderek artmaktadır. CD200R izoformları, myeloid reseptör ailesi olan genişletilmiş myeloid hücrelerde eksprese edilen tetikleyici reseptör (TREM-triggering receptor expressed by myeloid cells) ailesinin bir üyesidir. En önemli karakteristikleri benzer ekstrasellüler domaine sahip en az iki izoformlarının olmasıdır. Farkları ise sitoplazmik kuyruktadır (33). Diğer inhibitör reseptörlerin aksine CD200R1 sitoplazmik kuyruğunda immünoreseptör tirozin bazlı inhibitör motif(ITIM-immunoreceptor thyrosine based inhibitory motif) içermemektedir. Diğer izoformlar (CD200R2-4) ise transmembran domainde DAP-10 ve DAP-12 için bağlanma bölgeleri içerir (26). CD200'ün bağlanmasını takiben CD200R2-4'te DAP 12 fosforilasyonu olurken CD200R1'in sitoplazmik kuyruğu direkt olarak fosforile olur.

CD200'ün tüm CD200R ve CD200RL'e bağlanıp bağlanmadığı araştırılmıştır. Gorczynski ve ekibi CD200'ün tüm reseptörlere bağlandığını göstermiştir (18). Hatherley ve ekibi ise CD200R ve CD200RL eksprese eden BaF hücreleri ve CD200Fc füzyon proteini spesifik monoklonal antikorlar kullanarak CD200'ün sadece CD200R'a bağlandığını, CD200RL'e bağlanmanın tespit edilemeyecek kadar az olduğunu saptamıştır. Bu farkın CD200R ve CD200RL'in N terminal kuyruğundaki yapısal farklılıktan ve DAP-12 ile ilişkiden kaynaklandığını savunmuştur (34,35).

Son dönemde CD200'ün detaylı yapısal haritalanması ve efektör hücre inhibisyonunda görevli sekansların bulunması için çalışılmalar yapılmıştır. Moleküler analizler CD200'ün CDR1, CDR2 ve CDR3 olmak üzere üç farklı domaini olduğunu göstermiştir. Hem CD200, hem CD200R'ın ekstraselüler NH₂ domaini ile iletişim

sağladığı ve etkileşimin 'GFCC' aa sekansı ile gerçekleştiği saptanmıştır. Bu bilgiye dayanarak CD200'ün 15 mer peptidlik kısmı sentezlenmiş ve bu peptidin de CD200 gibi immün sistem üzerinde inhibitör etkileri olduğu görülmüştür. Bazı peptidlerin ise CD200'ün aksine CD200R üzerinde antagonistik etkiler yaparak CD200'ün etkilerini bloke ettiği saptanmıştır. Antagonistik özelliklere sahip peptidlerin CDR1 ve CDR3 bölgelerinde olduğu görülmüştür (36,37). Çalışmalarda, kısa_truncated(tr) ve full-length CD200 olmak üzere iki farklı CD200 için heberci (messenger) ribonükleik asit (mRNA) ekspresyonu olduğu gösterilmiştir. CD200tr formunun full-length CD200 gibi immün sistemi suprese edici özelliği olduğu düşünülmüştür. Fakat CD200tr'in CD200'ün doğal antagonisti olduğu ve CD200R'a bağlanmasının TNF α üretimi ve sitotoksik T lenfosit (CTL) aktivasyonuna yol açtığı saptanmıştır. CD200tr, CD200RL'a bağlanmamaktadır (38). Hem CD200 hem de CD200tr sentezi LPS ile artmaktadır. Tümör ve virüsler CD200tr sentezini engelleyerek kendilerini immün sistemden korumaktadır (38).

2.2.3. CD200/CD200R sinyal kaskadı

CD200R, Ig süperaillesinden olan TREM grubu reseptörlerin bir üyesidir. İnhibitör reseptörlerin çoğu sitoplazmik ITIM domaini içermesine rağmen CD200R ITIM domaini içermeyip sitoplazmik kısmında üç tane tirozin rezidu bulundurur (39,40). Tirozin reziduelelerinin sinyal yolağındaki önemini saptamak amacıyla yapılan çalışmalarda üç tirozin reziduesu fenilalanine değiştirilmiş ve sonuçta CD200R'ın inhibitör özelliğinin kaybolduğu saptanmıştır (41). CD200R'a ligand bağlanması sonucu tirozinler fosforile olmakta ve sinyal yolağı çalışmaktadır. En distaldeki tirozin rezidusu Dok1(down stream of thyrosine kinase), Dok2 ve Shc moleküllerindeki fosfotirozin bağlama (PTB) domainine bağlanır. CD200R1'in PTB'ye bağlanmasını sağlayan ise reseptördeki NPXY motifidir (42). Dok fosforilasyonu SH2'yi aktifler, bu aktivasyon RasGTPaz (RasGAP), Csk ve SH2 içeren inozitol fosfataz (SHIP) molekülleri arasındaki ilişkiyi sağlar. Dok1, Crk ve CrkL aktivasyonunu, Dok2 ise RasGAP ve NcK aktivasyonunu sağlar. Yapılan çalışmalarda Dok1'in CrkL ile olan ilişkisinin Dok2'nin negatif regülatörü olduğu gösterilmiştir (42). Dok proteinleri RasGAP fosforilasyonu ve aktivasyonuna neden olmakta ve sonrasında mitojen aktive protein kinaz (MAPK) ve NF- κ B inhibe edilmektedir. MAPK aktivasyonunun inhibisyonu mast hücre degranülasyonunun azalmasına, TNF α , IFN γ , IL1, IL17, IL6, IL8 sitokin sentezinde ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) aktivitesinde

saptandıktan sonra düşünülmüştür. Bu immüno-regülatuar moleküllerden biri CD200R'a yapısal ve fonksiyonel olarak benzeyen B ve T lenfosit atenuatör (BTLA-B and T lymphocyte attenuator)'dır (45). BTLA, fare ve insan genomunda CD200R'ın yanında lokalizedir. Ig süperaillesinin bir üyesidir ve tirozin bazlı sinyal motifleri içermektedir. Anti-BTLA mAb'ları ile BTLA'nın kemik iliğinde ve timusta gelişmekte olan B ve T hücrelerinde ve tüm matür lenfositlerde, splenik makrofajlarda, matür kemik iliği kökenli dendritik hücrelerde eksprese edildiği gösterilmiştir. BTLA knocked-out (KO) farelerden elde edilen T hücreleri anti-CD3 stimülasyonuna fazla yanıt verirken anti-BTLA antikoru T hücrelerini suprese etmektedir. Anti-CD200R1 monoklonal antikoru (mAb) ile yapılan deneylerin sonuçları da bu verilere benzer bulunmuştur. Bu bulgularda CD200R1'in T hücre aktivasyonundaki direkt supresör etkisini desteklemektedir (46). Bu supresyon sonucu TGFβ ve IL10 üretiminin olduğu ve CTLA4 negatif hücre popülasyonunun olduğu görülmüştür (47,48). CD200R1 sinyalleri makrofaj aktivasyon sinyallerini de suprese etmektedir.

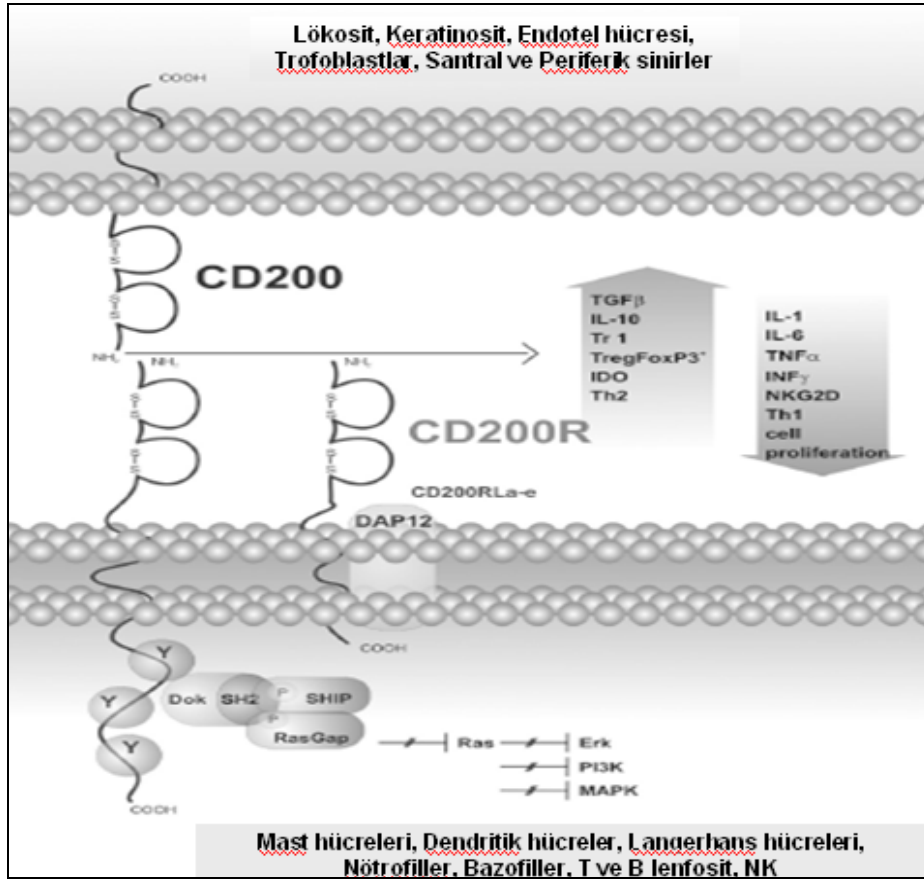
CD200R2 ve CD200R3 sinyallerinin ise dendritik hücre diferansiasyonunda etkili olduğu düşünülmektedir. CD4⁺CD25⁺ Treg fonksiyonunun immün sistem regulasyonunda önemi bilinmektedir (49). Bu hücre grubundaki fonksiyonel supresif aktivite FoxP3 transkripsiyon faktörünün ekspresyonuna bağlıdır (50,51). In vitro ve in vivo anti-CD200R2/R3 ile indüklenen tolerojenik dendritik hücrelerin CD4⁺CD25⁺ Treg oluşumunu arttırdığı ve bu hücrelerin fonksiyonunun hücre yüzeyinde CTLA4 ekspresyonu ve TGFβ üretimi ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Treg oluşmasında etkili Ig süpergen ailesine ait diğer hücre yüzey molekülleri de 4-1 BB (CD137 counter ligandı) (52) ve ICOS'tur (53). Fallerino ve arkadaşları CD200R'lerinin dendritik hücre oluşumundaki regülatuar etkilerini ve tolerans indüksiyonunu araştırmışlardır (54). Mürine dendritik hücrelerinde çözülebilir CD200Fc kullanılarak fonksiyonel CD200R saptanmış ve CD200:CD200R ile bu hücrelerde immünsupresif etki gözlenmiştir. CD200 füzyon proteini (CD200Fc) ile splenik dendritik hücrelerin plazmasitoid alt grubunda (CD11c⁺B220⁺120G8⁺) IDO enziminin ekspresyonu ile tolerojenik yolak başlatılmaktadır (55). Bu dendritik hücreler başka bir alıcıya verildiğinde ise in vivo antijen spesifik cevabı suprese edebilmektedir.

IDO, triptofan metabolizmasında rol oynayan bir enzimdir (54). Triptofanın kynurenine metabolize edilmesi güçlü bir proapoptotik sinyaldir. IDO ekspresyonu, CD4⁺ T hücre apoptozunda rol oynar. Allerjik farelerde IDO'nun ovalbumine karşı

CD4⁺ T hücre cevabını suprese ettiği görülmüştür (2). IDO ekspresyonunun en önemli indükleyicisi CD200/CD200R'dır. IDO oluşumunun, CD200Fc ile oluşan immünregulasyonun bir komponenti olduğu gösterilmiştir (56). IFN γ ve bakteriyel deoksiribonükleik asit (DNA) varlığında da IDO ekspresyonu olur. TNF α , IL1 ve LPS de IDO'nun inhibitör potansiyelini kuvvetlendirir (57,58). CD200/CD200R ilişkisi sonucu eksprese edilen IDO, APC'yi suprese ederek otoreaktiviteyi engeller ve fetusu spontan abortustan korur. IDO tarafından metabolize edilen triptofan, nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺) substratıdır. Artmış IDO aktivitesi NAD⁺ seviyesini azaltarak enerji defisiti yaratır (59). Bu durum, çok yüksek IDO düzeylerinin inflamasyon ve inflamasyonun şiddetiyle ilişkisini açıklamaktadır. Çok yüksek IDO seviyesi ve düşük triptofan düzeyleri otoimmün hastalıklarda kötü prognozla ilişkilidir (2).

Mürine peritoneal makrofaj hücreleri kullanılarak yapılan çalışmalarda, CD200/CD200R1'in IFN γ ve IL17 ile stimüle edilen sitokin salınımını baskıladığı fakat LPS ile stimüle edilen yanıtı engellemediği gösterilmiştir (60). Monosit CD200R1 aktivasyonu ile periferik kan mononükleer hücrelerinden (PBMC) tetanoz toksoidi ile olan IL5 ve IL13 sekresyonunun engellendiği gösterilmiştir (41). CD200, sitokin profilini IFN γ ve IL2'den IL4, IL10'a kaydırarak immünomodulator etki göstermektedir (61). CD200 ayrıca hedef hücrelerde TGF- β sentezini uyarır. Bu sitokin, makrofaj ve lenfositleri bloke eden potent bir inhibitördür. Ayrıca T hücrelerinin CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg dönüşümünü sağlayarak otoimmün hastalıklarda inhibitör rol oynar (2). Bu yolla tranplante organların rejeksiyonunun engellendiği ve inflamasyonun baskılandığı düşünülmektedir.

Mürine kontakt hipersensitivite modelinde haptanle ultraviyole (UV) ilişkili tolerans indüksiyonunda CD200:CD200R sinyalizasyonu ile gelişen immünregulasyonun p53'e bağlı apoptozdaki değişikliğin yansıması olduğu düşünülmüştür (25). Apoptotik hücre ölümü sırasında kabul edilen görüş, biyokimyasal olayların self proteinleri modifiye ettiği ve potansiyel otoantijenleri yarattığı ve bu otoimmüniteden korunmak için immün cevabın regülasyonunun gerektiğidir. Yapılan çalışmada, apoptoz geçiren mürine dendritik hücrelerinde CD200 ekspresyonunun arttığı ve hem p53, hem de kaspaz bağımlı yolların CD200 ekspresyonunu kontrol ettiği görülmüştür. Apoptotik dendritik hücrelerce CD200 ekspresyonunun artması in vitro self antijenlere karşı proinflamator sitokin oluşumunu azaltmıştır (25).



Şekil 2.2. CD200/CD200R ekspresyonu ve CD200/CD200R'ın immün sistem üzerinde etkileri (2).

2.2.5. CD200/CD200R fonksiyonları

CD200'ün immüno-regulator rolü ile ilgili ilk bilgiler transplant vakalarından elde edilmiştir. CD200 overekspresyonu ile azalmış graft rejeksiyonu arasında korelasyon saptanmıştır (17). Graft sağkalımındaki bu iyileşme anti-CD200 antikoruyla azaltılırken bir immünoadhesin olan CD200Fc ile de sağlanmıştır (18).

Doğal bir allograft olan fetusun sağkalımı ve büyümesinde de artmış CD200 ekspresyonunun rolü olduğu tespit edilmiştir. Spontan fetal kayıp sendromu olan mürine modellerinde, desidua ve trofoblastlarda daha az CD200 eksprese edildiğinde fetal kaybın arttığı ve bu farelere CD200Fc infüzyonu yapıldığında fetal kayıptaki artışın suprese olduğu gözlenmiştir (19). Anti-CD200 infüzyonu ise fetal kaybı arttırmaktadır. Bu çalışmalar, insanda başarılı gebelikte trofoblastlar üzerindeki CD200 ekspresyonunun rolü ile ilgili yeni çalışmalar yapılmasına zemin hazırlamıştır.

Hoek ve arkadaşları CD200 KO farelerde santral sinir sisteminde (CNS) makrofaj/myeloid hücrelerde endojen aktivasyon artışı olduğunu, CD200R⁺ hücrelerin ekspresyonunun arttığını ve otoimmün hastalıklara [deneysel otoimmün ensefalomyelit (EAE) gibi] yatkınlığın arttığını göstermiştir (62). Broderick-Dick ve arkadaşları, CD200 KO farelerde otoimmün retinit modelinde CD200'ün retinal inflamasyonun regulasyonundaki rolünü araştırmışlardır (63,64). Retinada, nöronlar ve retinal vasküler endotel üzerinde yaygın CD200 ekspresyonu mevcuttur. Bu çalışmada CD200 KO farelerde retinal mikrogliaların normal morfolojide olduğu fakat wild tip farelerle kıyaslandığında hücrelerin sayıca arttığı ve makrofaj aktivasyon markırı olan iNOS2 ekspresyonunun arttığı görülmüştür. İnterfotoresptör retinoid bağlayan proteinin üveitojenik peptidleriyle indüklenen deneysel otoimmün üveoretinitte, CD200 KO farelerde hastalığın hızlandığı, wild tip farelere kıyasla doku tahribatı artmadığı halde ganglion ve fotoresptör hücrelerin apoptozunda artış olduğu gösterilmiştir. CD200 KO farelerde myeloid hücre infiltrasyonu artmış fakat iNOS2 ekspresyonunda artış saptanmamıştır. Sonuç olarak CD200:CD200R aksı retinal mikrogliyal hücre aktivasyonunu regule etmektedir ve CD200 kaybı endojen myeloid hücre aktivasyonuna yol açarak organ spesifik otoimmüniteye yatkınlığı arttırmakta ve hastalık başlangıcını hızlandırmaktadır (63,64).

Rosenblum ve arkadaşları, mürine kontakt hipersensitivite modelinde haptanle UV ilişkili tolerans indüksiyonunda CD200'ün rolünü araştırmışlardır. CD200:CD200R sinyalizasyonu ile gelişen immünregulasyonun p53'e bağlı apoptozdaki değişikliğin yansması olduğu görülmüştür (25). Ayrıca otoimmün alopesi areatada cilt hücrelerinde endojen CD200 ekspresyonu ve bu ekspresyonun self antijene olan immünitedeki düzenleyici rolünün araştırıldığı çalışmalar yapılmıştır. CD200 KO farelerde CD200 ekspresyonu olmayan keratinosit alt gruplarının olduğu kıl folliküllerinde inflamatuvar destrüksiyon olduğu ve deride CD4⁺ ve CD8⁺ T hücre sayısının arttığı görülmüştür (65).

Bazı tümör hücrelerinde de (C1498- doğal öldürücü T hücre (NKT) lösemisi), skuamoz hücre kanseri (SCC-7), insan osteosarkom hücreleri (U20S) gibi CD200'ün yapısal veya indüklenebilir halde eksprese edildiği görülmüştür. Tümör hücrelerinde veya tümöre karşı immün yanıt oluşturan lenfoid hücre popülasyonundaki endojen CD200 ekspresyonunun blokajının anti tümör immüniteyi arttığı, CD200Fc füzyon proteininin tümör büyümesini arttırdığı, anti-CD200 mAb'nun farelerde tümör hücrelerine karşı immüniteyi arttırdığı saptanmıştır (66).

İnsanda görülen bazı solid tümörlerde CD200 ekspresyonunun kanser progresyonu ile ilişkisi saptanmıştır (67-70). İmmünokompetan farelerde, CD200 ekspresyonunun transplante edilen EMT6 fare meme kanseri hücrelerinin büyümesi sırasında arttığı görülmüştür. CD200 transgeninin overeksprese edildiği farelerde tümörü drene eden lenf nodlarında konak immün cevabının azaldığı ve tümör büyümesinin daha hızlı olduğu görülmüştür. Anti-CD200 mAb ile CD200'ün nötralizasyonu ile tümörü drene eden lenf nodlarında daha fazla anti-tümör sitotoksik immün hücrelere rastlandığı ve metastazın daha az olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle meme kanserinde artmış CD200 ekspresyonunun metataz riskini belirlemede önemli bir parametre olduğu düşünülmektedir (71). Serumdaki çözünebilir CD200 seviyesinin de in vivo tümör büyümesini takipte kullanılabileceği düşünülmektedir (72).

Hematolojik malignitelerde de (kronik lenfositik kösemi (KLL) (73), akut myeloid lösemi (AML) (74), multipl myelom (MM) (67) gibi) CD200 ekspresyonunun önemli olduğu düşünülmektedir. İnsan KLL tümör hücrelerinde hücre yüzeyinde CD200 ekspresyonunun artmasının in vitro T hücre supresyonuna yol açtığı bildirilmiştir (73). KLL'de CD200 supresyonunun CD200⁺ hücrelerin öldürülmesinde artışa ve efektör PBMC'lerden inflamatuvar sitokinler olan IFN γ ve TNF α salgılamasında artışa yol açtığı görülmüştür. Bu nedenle CD200 blokajının KLL tedavisinde yeni bir tedavi seçeneği olabileceği düşünülmektedir (75).

Fostercuevas ve arkadaşları, CD200 herpes virüs analogunun makrofaj aktivasyonunu engellediğini göstermiştir(76). Birçok herpesvirüsü ve poxvirüsünde insan CD200'ü ile %40 primer sekans benzerliği gösteren CD200 homologuna rastlanmıştır. Kaposi sarkomu ile ilişkili insan herpes virüs 8'deki CD200 homologu (K14 open reading frame_ürünü) litik fazda virüsle enfekte olan hücrelerin yüzeyinde eksprese edilmektedir. Bu molekül CD200R'a bağlanabilmektedir. Çözülebilir monomerik CD200Fc'nin yaptığı inhibisyona benzer biçimde CD200R⁺ hücreler ile CD200 veya K14 eksprese eden hücrelerin interaksyonu sonucu aktive makrofajlardan TNF α sekresyonunun suprese olduğu görülmüştür (76). Viral CD200 homologunun bu supresyon ile virüslerin konakçı immün sistemden korunmasında rolü olduğu düşünülmektedir.

Çizelge 2.1. CD200/CD200R Ekspresyonu ile sitokin, hücre grupları ve hastalıkların ilişkisi (2).

CD200/CD200R ekspresyonu	Artan		Azalan	
Sitokin, kemokin	IL10, TGF β IL4, IL5		IL1, IL2 IL6, IFN γ / α IL12	MIP-1 α MCP-1 IL8
Hücre ve adezyon molekülleri	Treg	İmmatür lökositler	CTL Lökosit ve mikrogliya aktivasyonu Adezyon Antijen sunumu	MHC I/II ICAM-1/2 VCAM-1/2 VLA-4 LFA-1
Hastalık	İnvaziv kanser ve metastazlar (solid ve hematopoetik tümörlerde)	İmmüntolerans Allograft sağkalımı Osteoblastogenez	Otoimmünite Romatoid artrit Multipl skleroz Parkinson Alzheimer Alopesi	Viral enfeksiyon Spontan fetal kayıp Alerji

2.2.6. CD200/CD200R'ın artritteki rolünü gösteren hayvan çalışmaları

CIA, insandaki RA'nın hayvan modelidir. Hoek ve arkadaşları, CD200 gen delesyonunun olduğu farelerde CD200R⁺ hücrelerin arttığını ve bu hayvanlarda CIA'ye yatkınlık olduğunu göstermiştir. Farelerde CIA patogenezinde IFN γ üreten T hücreleri ön planda iken insanda patogenezinde TNF α 'nın da önemli olduğu bilinmektedir (77,78).

Gorczyński ve arkadaşları, CD200Fc ve anti-CD200R kullanımının CIA'ye olan etkilerini araştıran bir dizi çalışma yapmışlardır (79). Anti-CD200R olarak sıçan mAb kullanılmıştır. Bir immünoadhesin olan CD200Fc ise CD200'ün ekstrasellüler domainine mürine IgG2a Fc bağlanarak oluşturulmuştur. CIA, farelerin kuyruğuna komplet Freund adjuvanında intradermal 100 mcq bovine tip II kollajen verilerek oluşturulmuştur. 18 gün sonra inkomplet Freund adjuvanında 100 mikrogram (mcq) daha kollajen enjekte edilmiştir. DBA/1 farelere kollajen immünizasyonunun 0., 15. ve 24. günlerinde CD200Fc veya anti-CD200R verilmiştir. Kontrol grubu olarak da preimmün sıçan serumu ve normal fare Ig alan fareler kullanılmıştır. Bir başka kontrol grubu da hiçbir tedavi almayan farelerden oluşmaktadır. İmmünizasyonun başlangıcında (t₀) verilen CD200Fc veya anti-CD200R ile artrit gelişimi engellenmiştir. Ayrıca CD200Fc ve anti-CD200R postimmünizasyonun 15.(t₁₅) ve 24.(t₂₄) günlerinde verildiğinde tedavi alan farelerde hastalığın kontrol grubuna göre istatistiksel olarak

anlamli iyileŖme gösterdiği saptanmıŖtır (t_0 'da $p<0,005$, t_{15} 'de $p<0,02$, t_{24} 'de $p<0,05$). Bu veriler CD200Fc ve anti-CD200R uygulanmasının sadece hastalığın baŖlangıcını değil aynı zamanda ekspresyonunu da modifiye ettiğini göstermektedir. Ayrıca bu farelerden kardiyak ponksiyon ile kan alınmıŖ ve serum TNF α ve IFN γ seviyeleri deđerlendirilmiŖtir. t_0 'da ve t_{15} 'de CD200Fc veya anti-CD200R uygulanan farelerin serumlarında TNF α ve IFN γ artışının engellendiği fakat CD200Fc veya anti-CD200R t_{24} 'de uygulandığında supresyonun minimal olduğu saptanmıŖtır.

Kollajen immünizasyonunun 35. gününde farelerden aksiller ve inguinal lenf nodu (LN) hücreleri ve dalak hücreleri alınmıŖ ve bu hücreler 20 mcq/mililitre (ml) bovine tip 2 kollajen içeren ve içermeyen mikrotitre paletlerde kültüre edilmiŖtir. Kontrol kültürler ise mitomisin C ile iŖleme tabi tutulmuŖ BALB/C allojenik dalak stim latuar hücreleri ile stimüle edilmiŖtir. İn vitro 72 saat restim lasyondan sonra 35. günde LN hücrelerinin ve dalak lenfositlerinin proliferasyonuna bakılmıŖtır. t_0 'da ve t_{15} 'de CD200Fc veya anti-CD200R verilen fare hücrelerinde kollajen ile sensitizasyonun inhibe olduğu g r lm Ŗtir (sırasıyla $p<0,02$, $p<0,05$). BALB/C sonrası proliferen olan hücrelerde ise uygulama sonrası etki g zlenmemiŖtir. Kültürlerin 40. saatinde elde edilen kültür süpernatantlarında ELİZA (enzyme linked immunosorbent assay) ve ticari spesifik mAb kullanarak TNF α ve IFN γ seviyeleri  l  lm Ŗtir. t_0 'da ve t_{15} 'de CD200Fc veya anti-CD200R uygulanması kollajen ile restim le edilmiŖ hücrelerde TNF α ve IFN γ üretimini inhibe ederken bu etki BALB/C hücrelerinde g r lmemiŖtir.

Bu farelerden postimm nizasyonun 36. gününde alınan serumda ELİZA yöntemi ile antikollajen tip II antikor izotipleri de    lm Ŗtir. Total Ig seviyelerinde bir fark görülmezken t_0 'da CD200Fc veya anti-CD200R uygulanması ile antikollajen antikor seviyesinde azalma saptanmıŖ, bu azalmanın t_{15} 'de t_0 'a göre daha az olduğu g r lm Ŗtir. t_0 'da ve t_{15} 'de CD200Fc veya anti-CD200R uygulanması ile antikollajen antikor izotip profilinin de deđiŖtiđi, IgG1 ve IgG2a azalırken IgG2b'nin kontrol farelere göre arttığı tespit edilmiŖtir. t_{24} 'deki uygulananın ise antikollajen izotip profilini deđiŖtirmedeđi saptanmıŖtır.

Sonuç olarak, Gorczynski ve arkadaşlarının yaptığı bu  alıŖmada, CD200:CD200R iliŖkisinin artrit üzerindeki olumlu etkileri g zlenmiŖtir. Serum TNF α ve IFN γ seviyelerindeki azalmanın, kollajen restim lasyonu sonrası in vitro proliferasyondaki ve TNF α ve IFN γ  retimindeki azalmanın, serumdaki antikollajen izotip profilindeki deđiŖikliđin bu olumlu etkileri sağladığı d Ŗ n lmektedir.

Simelyte ve arkadaşlarının bir çalışmasında, CD200Fc'nin CIA olan farelerin eklemesindeki proinflamatuvar sitokin ekspresyonuna etkisi değerlendirilmiştir(80). Kontrol grubu farelere IgG2a mAb veya TNFR-Fc füzyon proteinin verilmiştir. Farelerin diz eklemi sinoviyumlarında immünohistokimyasal ve flow sitometri ile CD200 ekspresyonu bakılmıştır. CD200Fc ve TNFR-Fc alan gruplarda hastalık aktivitesinde benzer şekilde azalma görülürken IgG2a mAb alan kontrol grubuna kıyasla CD200Fc alan grupta sinoviyal inflamasyonda ve kırık-dak-kemik hasarında azalma saptanmıştır. Sinoviyumda proinflamatuvar sitokinler olan IL1 β , TNF α , antiinflamatuvar sitokin olan IL10 ve MMP13 gen ekspresyonu değerlendirilmiştir. Tedavinin 10. gününde TNFR-Fc ve CD200Fc alan gruplarda IL1 β , TNF α , IL10 mRNA ekspresyonunun azaldığı, CD200Fc alan grupta ayrıca MMP13 mRNA seviyesinin de azaldığı saptanmıştır. CD200Fc'nin T ve B hücreleri üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla dalak ve lenf nodu hücreleri ve IgG seviyeleri değerlendirilmiştir. T hücre proliferasyonunun, sitokin ekspresyonunun, Foxp3⁺ Treg sayısının değişmediği ve antikollajen IgG seviyesinin de kontrol grupla benzer olduğu görülmüştür. Bu çalışmada CD200Fc'nin genel bir immünsupresif etkisi olmadığı saptanmış. Sonuç olarak CD200Fc'nin CIA tedavisinde genel bir immünsupresyona yol açmadan etkili olduğu ve bu etkinin TNFR-Fc'ye benzer olduğu gösterilmiştir.

Simelyte ve arkadaşları, CIA'de CD200R1'in artrit şiddeti ve tip II kollajene karşı olan immün yanıt üzerindeki etkilerini araştırmışlardır (81). Tip II kollajen ile immünize edilen DBA/1 farelerde artrit ve eklem ve LN'da RT-PCR ile monitorize edilen CD200/CD200R1 ekspresyonu arasındaki ilişki incelenmiştir. Ayrıca CD200R1^{-/-} fareler ile wild tip fareler CIA progresyonu ve tip II kollajene B ve T hücre yanıtı açısından karşılaştırılmıştır. DBA/1 farelerde akut artrit şiddetinin immünizasyonun 7. gününde en şiddetli olduğu ve 10. günden sonra artrit şiddetinin azaldığı saptanmıştır. CD200 ve CD200R1 seviyesinin de 5-7. günlerde en yüksek seviyeye ulaştığı ve 10. günden sonra azaldığı tespit edilmiştir. Yani CD200, CD200R1 ekspresyonu inflamatuvar yanıtla paralel seyretmektedir. CD200R1^{-/-} olan farelerde artrit wild tip farelere göre daha şiddetli seyrettiği görülmüş ve bu veride CD200R1'in artrit şiddetini sınırlayıcı etkisini bir kez daha göstermiştir. İki grup fare karşılaştırıldığında selüler ve humoral immün cevap açısından fark saptanmamıştır. Yani CD200R1'in yokluğu anti-kollajen tip II antikor yapımını ve sitokin cevabını etkilememektedir.

Çalışmalar, CIA'de CD200'ün önemli bir regülatur mekanizma olduğunu göstermiştir. CD200R1, CIA'de hastalık aktivitesinin olduğu bölgede lokal olarak etki ederek inflamasyonu suprese etmekte fakat sistemik immün yanıtı değiştirmemektedir. Bu veriler CD200/CD200R1 yolunun RA tedavisinde yeni bir hedef olabileceğini düşündürmektedir.

2.2.7. CD200/CD200R insan çalışmaları

Yapılan hayvan çalışmalarında CIA'de CD200'ün önemli bir regülatur mekanizma olduğunun gösterilmesi CD200/CD200R1 yolunun RA tedavisinde yeni bir hedef olabileceğini düşündürmüş ve bu amaçla insan çalışmaları yapılmaya başlanmıştır.

RA patogeneğinde, germinal merkezlerde olgunlaşan B hücrelerince üretilen otoantikorlar yer almaktadır. Germinal merkezlerde olgunlaşmakta olan B hücrelerinin sonu, bu hücrelerin CD4⁺ T hücre alt grubu olan folliküler yardımcı T hücrelerine (T_{FH}) antijen sunma kapasiteleri ile belirlenir (82). Bu yolla otoreaktif B hücrelerinin gelişimi engellenmektedir. T_{FH}, B hücre folikülünde CXCR5 kemokin reseptörü ekspresyonuyla belirlenir. Hayvan çalışmalarında, T_{FH} disfonksiyonunun otoantikor yapımına neden olduğu gösterilmiştir (83,84). İnsanlarda, RA ve sistemik lupus eritematozusta (SLE) T_{FH} hücre sayısının arttığı, juvenil dermatomyozitte ise T_{FH} fenotipinin değiştiği gösterilmiştir (85,86). Dolaşımdaki CXCR5 eksprese eden Th hücrelerinde dokuda yer alan T_{FH}'yle benzer fonksiyona sahip olduğu bilinmektedir.

Chakera ve arkadaşları, RA'de dolaşımdaki T_{FH}'de kalitatif ve kantitatif farklılık olup olmadığını araştırmak üzere 35 RA ve 15 kontrol kullanarak çalışma dizayn etmişlerdir (87). Seropozitif RA'da dahil olmak üzere RA ve kontrol grubu arasında T_{FH} sayısı açısından fark saptanmamıştır ($p \geq 0,4$). RA'da T_{FH} subgrupları (Th1, Th2 ve Th17) değerlendirildiğinde fark saptanmamıştır ($p > 0,65$). RA grubunda T_{FH}'de inhibitör reseptör olan CD200 ($p = 0,0079$) ve otoantikor pozitif RA grubunda hem CD200, hem de CD150 ekspresyonunun artmış olduğu görülmüştür (sırasıyla $p = 0,0045$ ve $p = 0,0088$). Otoantikor pozitifliğinden bağımsız olarak anti-TNF tedavi alan RA hastalarında T_{FH}'de CD200 seviyesi anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p = 0,0008$). CD200 ekspresyonunun, hastalık aktivite skoru28 (DAS28) C reaktif protein (CRP) ile hesaplanan hastalık aktivitesi ve ACPA titresiyle ilişkili olmadığı görülmüştür (sırasıyla $p = 0,886$ ve $p = 0,896$). Sağlıklı kontrollerden elde edilen PBMC'ler, yüksek ve düşük

titrede T_{FH} CD200 eksprese eden RA hastalarından elde edilen serum ile inkübe edilmiş ve CD200 eksprese eden T_{FH} sayısında fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Bu veride T_{FH} 'de CD200 ekspresyonunun dolaşımda bulunan faktörlerce etkilenmediğini göstermiştir. Sonuç olarak, T_{FH} 'de inhibitör reseptörlerin ekspresyonundaki fark, immün cevap gelişimi ve anti-TNF tedavi etkinliğinde önemlidir.

RA patogenezinde monosit ve makrofajların kemik ve kıkırdak destrüksiyonunda rol oynadığı, sitokin ekspresyonunda Th2'den (IL4 ve IL10) Th1'e (IL2 ve IFN γ) kayma olduğu ve inflamatuvar yanıtta Treg ve Th17 hücrelerinin etkili olduğu bilinmektedir (88). IL-17 üreten T hücre grubu Th17 olarak adlandırılmakta, bu hücrelerin artmış hastalık aktivitesiyle ilişkili olduğu, Th17 hücre gelişiminin inflamasyonda düzeyleri artan IL6 ve IL1 β ile stimüle edildiği ve Th17 gelişimini sağlayan faktörlerin Treg gelişimini inhibe ettiği bilinmektedir (89). Yapılan çalışmalarda, Th1/Th2 ve Th17/Treg imbalansının RA gelişimi ve progresyonunda etkili olduğu bildirilmiştir (90). CD200/CD200R, makrofaj fonksiyonunun inhibisyonunda ve sitokin profilinin değişmesinde etkilidir.

Gao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya, 35 RA hastası ve 17 sağlıklı kontrol dahil edilmiştir (88). RA hastalarında periferik kanda monosit derive makrofajlarda (MDM) CD200 ekspresyonunun değişmediği fakat CD200R1 ekspresyonunun azaldığı, CD200R1 ekspresyonunun DAS28 ile hesaplanan hastalık aktivitesi ($p<0,01$), eritrosit sedimentasyon hızı (ESR) ($p<0,01$), CRP ($p<0,05$), Th17 sayısı ($p<0,01$) ile negatif korelasyon gösterdiği saptanmıştır. Treg sayısı ile pozitif korelasyon mevcuttur ($p<0,05$). Aktif RA hastalarında CD200R1 ve sitokin ekspresyonu arasında korelasyon saptanmamıştır. Sonuç olarak CD200R1'in RA'de hastalık aktivasyonunda biyomarker olarak kullanılabileceği saptanmıştır.

SLE, immün tolerasta bozukluk, otoantikör gelişimi ve immün kompleks oluşumu, sitokin dengesinde değişiklik ve inflamasyon ile seyreden diğer bir otoimmün hastalıktır. Treg fonksiyonlarındaki değişikliğin SLE patogenezinde önemli olduğu bilinmektedir (91,92). SLE'de CD200/CD200R1 ekspresyonunun anormal T hücre cevabı ve dendritik hücre aktivitesi üzerine etkilerini değerlendirmek amacıyla 161 yeni tanı almış ve tedavi edilmemiş SLE hastası ve 95 sağlıklı kontrolün katıldığı bir çalışma düzenlenmiştir (93). SLE hastalarında PBMC'de CD200⁺ hücre sayısında artış saptanmıştır. Bu artış özellikle CD4⁺ T hücrelerde, plazmositoid dendritik hücrelerde ve myeloid dendritik hücrelerde mevcuttur. CD3⁺CD200⁺ hücre sayısının serum

kompleman3 (C3) düzeyi ile negatif korelasyonu gösterilmiştir ($p<0,05$). Hücre düzeyindeki artışın yanı sıra kanda da CD200 seviyesinin SLE hastalarında yüksek olduğu ve serum CD200 seviyesinin C3 düzeyi ile negatif korele olduğu saptanmıştır ($p=0,014$). SLE hastalarında CD200R1⁺ PBMC sayısı ve CD200R1 mRNA ekspresyonu ise kontrol grubuna göre daha azdır. Antagonistik anti-CD200R1, SLE hastalarında CD4⁺ T hücrelerinde artışa yol açmıştır. Bu da CD200/CD200R1'in SLE'da T hücre proliferasyonunu engellediğini göstermektedir. CD200Fc'nin SLE hastalarında Th17 sayısını azalttığı ve Treg oluşumunu arttırdığı fakat anti-CD200R1'in bu etkiyi göstermediği görülmüştür. CD200R1'deki azalmış ekspresyonun SLE'da Treg oluşumundaki bozulmadan sorumlu olacağı düşünülmüştür. SLE'da PBMC'de erken apoptotik lenfosit sayısının sağlıklı kontrollerden fazla olduğu görülmüştür. Bu apoptotik hücrelerde CD200 ekspresyonu yaşayan hücrelerdeki CD200'den fazladır ve artışın dendritik hücre tarafından bağlanma ve fagositozu azalttığı tespit edilmiştir. CD200Fc'nin dendritik hücrelerin spontan migrasyonunu azalttığı fakat bu etkinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı fakat RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) aracılı dendritik hücre migrasyonunun önemli ölçüde bloke edildiği tespit edilmiştir ($p=0,029$). Sonuç olarak SLE'da anormal CD200 ve CD200R1 ekspresyonu ve fonksiyonu mevcuttur ve bu durum otoimmün bir hastalık olan SLE'daki immünolojik anormalliklere katkıda bulunmaktadır.

Hipertrofik osteoartropati (PHO), etiyojisi bilinmeyen, hipertrofik cilt değişiklikleri, clubbing ve periostit ile seyreden nadir görülen bir hastalıktır. Nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlara ve steroid tedavisine yanıtız ağırlı sinoviyal hiperplazinin eşlik ettiğı 28 yaşında bir PHO vakası yayınlanmıştır (94). Hastanın dizinden alınan sinoviyal sıvı noninflamatuvar karakterdedir. Sinoviyal biyopside venöz dilatasyon, inflamasyonun olmadığı endotelial kalınlaşma ve hiperplazi saptanmıştır. Sağlıklı kontrol ve sinoviyal hiperplazinin eşlik etmediğı PHO vakaları ile kıyaslandığında bu vakada immünohistokimyasal boyama ile CD200⁺ ve CD200R1⁺ hücrelerin daha az sayıda olduğu saptanmıştır. Ayrıca CD200⁺ hücreler vasküler endotel bölgelerinde görülmekteyken, aynı bölgelerde CD200R1⁺ hücreler güçlükle seçilebilmektedir. Refrakter sinoviyal effüzyon ile seyreden bu PHO vakasında CD200/CD200R1'in anormal lokal ekspresyonun anormal vasküler neoformasyon ve mikroanjiopatiye neden olabileceğı ve endotel hücrelerindeki CD200 ve CD200R1'in vasküler disfonksiyone neden olarak permeabilityi arttırabileceğı düşünülmektedir.

Sonuç olarak CD200/CD200R değişik etki mekanizmaları ile otoimmün hastalıkların patogeneğinde rol oynamakta ve RA, SLE gibi romatolojik hastalıkların tedavisinde yeni bir tedavi hedefi olabileceği düşünölmektedir. Yapılacak olan yeni çalışmalarla bu molekülün hastalık etiyopatogeneğinde yeri daha net anlaşılacak ve agonistik veya antagonistik etkileri olan ilaçların üretilmesiyle tedavide yeni ajanların kullanımı gündeme gelecektir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Hastaların Belirlenmesi

Çalışmaya, 02/08/2013 tarihinden itibaren Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları ABD Romatoloji BD'na başvuran 18 yaş ve üzerinde, ACR/EULAR 2010 (95) tanı kriterlerine göre romatoid artrit tanısı almış, hastalığı aktif olan (DAS28>2,6), artrit nedeniyle diagnostik ve/veya tedavi amaçlı artrosentez yapılan 10 ardışık RA hastası alındı. Kontrol grubu olarak da aynı tarihten itibaren Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil Tıp ABD ve Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Acil Tıp BD ve Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Spor Hekimliği Bölümü'ne başvuran, travma sonrası diz ekleminde şişliği olan ve tedavi amaçlı artrosentez ihtiyacı olan 5 kişi alındı. 21/04/2014 tarihinde hedeflenen sayıda hasta ve kontrol grubunun tamamlanmasıyla çalışma sonlandırıldı. Çalışma için Akdeniz Üniversitesi Lokal Etik Kurulu'ndan onay alındı ve çalışma Helsinki İnsan Hakları Bildirgesine uygun olarak yapıldı.

Romatoid artrit hastalarının rutin poliklinik kontrolleri sırasında bakılan hemogram, ESR ve CRP değerleri ve RF, anti-CCP gibi otoantikor varlığı, hastalarının almakta olduğu tedaviler değerlendirildi. Fizik muayenede bilateral omuz, dirsek, diz, el bileği ve el küçük eklemleri olmak üzere toplam 28 eklem değerlendirilerek hastaların hassas ve şiş eklem sayıları tespit edildi. Hassas ve şiş eklem sayısı, ESR veya CRP ve görsel analog skolasına (VAS - visual analog scale) göre hasta global sağlık değerlendirmesi parametrelerini içeren DAS28-ESR ve DAS28-CRP değerleri hesaplandı. Travma ile gelen hastalarda ek başka hastalık olmaması durumunda ESR, CRP ve hemogram değerlerinin normal olması beklendiğinden klinik endikasyon halinde bu parametrelere bakılması planlandı.

Dışlama kriterleri; Hemofili ve diğer kanama diatezi olan hastalar, malignitesi olan hastalar, enfeksiyonu bulunan hastalar, romatoid artrit dışında bilinen romatolojik ve otoimmün hastalığı olan hastalar ve tedavi amaçlı artrosentez ihtiyacı olmayan hastalar çalışmaya dahil edilmedi.

3.2. Örneklerin Alınması ve Analizi

Hasta ve kontrol grubundaki bireylerden 10 ml periferik kan örneği ile aspire edilen eklem sıvısından 10 ml numune alındı. Örnekler araştırma laboratuvarında -80°C’de saklandı.

Çalışmada tedavi amacıyla alınan eklem sıvısında ve periferik kanda ELİZA yöntemi ile CD200, TNF α ve IFN γ seviyelerine bakıldı. CD200 ELİZA kitleri çalışmaya katılan Toronto Üniversitesi İmmünoloji Departmanı tarafından temin edildi. TNF α ve IFN γ kitleri ise Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi’nin katkısıyla temin edildi.

ELIZA analizleri, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Akış Sitometri Ünitesinde bulunan, BİOTEK ELx800 cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. ELIZA ile yapılacak analizler için tam kandan elde edilen plazma ve sinoviyal sıvı örnekleri kullanıldı. Kan ve sinoviyal sıvı örnekleri, vericilerden alınmalarını takiben laboratuvara ulaştırılıp BECKMAN COULTER Allegra X-22R santrifüj ile 2500 devirde 7 dakika süre ile santrifüjlendi ve ayrılan kısımları başka bir tüp içinde -80°C’de saklandı. Yeterli miktarda örnek toplandıktan sonra her biri ayrı ayrı CD200, IFN γ (R&D Systems) ve TNF α (DIA Source) ELİZA kit kullanılarak aşağıdaki protokol uygulandı. 10X Coating solüsyonu oda ısısına getirildi ve 48 mikrolitre (μ l) Ab + 12 ml (12,000 μ l) 10X coating solüsyonu konularak (1/250) kaplama antikoru hazırlandı. Her kuyucuğa 100 μ l olacak şekilde konulup üstü parafilm ile iyice kapatılarak +4°C’de gece boyu inkübe edildi. 1 gece sonra aspire edilip 300 μ l yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı. Deney sulandırma solüsyonu (10 ml 5X deney sulandırma solüsyonu + 40 ml deiyonize su) 1X olarak hazırlandı. Hazırlanan 1X deney sulandırma solüsyonundan her kuyucuğa 200 μ l konup oda ısısında 1 saat bekletildi. Aspire edilip 300 μ l yıkama solüsyonu kullanılarak 3 kez yıkandı. Standart solüsyonlar [5 μ l standart solüsyon + 10 μ l deney sulandırma solüsyonu (5X)] hazırlandı. Bu standartlardan 100 μ l uygun kuyucuklara konuldu. Yine uygun kuyucuklara da örnek kondu. Üzeri parafilmle kaplanarak oda ısısında 2 saat bekletildi. Aspire edilip 7 kez yıkandı. Detection antibody [48 μ l Ab + 12 ml 1X deney sulandırma solüsyonu (1/250)] hazırlandı. 100 μ l detection ab’dan her kuyucuğa konulup oda ısısında 1 saat bekletildi. Aspire edilip 7 kez yıkandı. Avidin-HRP [Enzim, 48 μ l avidin-HRP + 12 ml 1X deney sulandırma solüsyonu (1/250)] hazırlandı. 100 μ l/kuyucuğa hazırlanan avidin-HRP konulup üzeri parafilmle sarılarak 30 dk oda

ısısında bekletildi. Aspire edilip 7 kez yıkandı. Bu aşamada yıkama aralarında 1-2 dk beklenildi. Her kuyucuğa 100 µl substrat solüsyonu eklenip oda ısısında 15 dk bekletildi. Her kuyucuğa 50 µl durdurma solüsyonu konup 450 nm dalga boyunda okutuldu. Referans olarak 570 nm seçildi.

3.3. İstatistiksel Yöntem

Toplanan veriler istatistiksel analiz için SPSS 15.0 for Windows® (Statistical Package for the Social Sciences Inc. Chicago, Illinois, USA) programına kaydedildi.

Sürekli değişkenler ortalama±standart sapma, kategorik veriler sayı ve yüzde olarak ifade edildi. Kategorik verilerin karşılaştırılmasında Kikare testi, numerik değişkenlerin karşılaştırılmasında normal dağılıma uyanlarda Student T testi, normal dağılım göstermeyenlerde Mann Whitney-U testi kullanıldı. CD200 ve sitokinlerin klinik ve laboratuvar parametreleri ile korelasyonunun değerlendirilmesinde Spearman's testi kullanıldı. p kritik değeri 0,05 olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Hasta ve Kontrol Grubunun Demografik Özellikleri

Çalışmaya toplam 11 RA ve 5 kontrol hastası dahil edildi. Çalışmaya katılan 11 RA hastasının 8'i kadın (%73) iken, 5 kontrolün 3'ü kadın (%60) idi. Cinsiyet açısından gruplar arasında fark saptanmadı ($p=0.229$). RA hastalarının yaşlarının ortalaması $\pm$ SD 44.5 $\pm$ 14.2 yıl, ortancası (min-max) 43 (29-68) yıl; kontrol grubunun yaş ortalaması 28.8 $\pm$ 13.6 yıl, ortancası 26 (18-52) yıl olarak bulundu. Gruplar arasında ortanca değerlere göre yaş açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edildi ($p=0.027$).

RA hastalarının 6'sında (%55) RF pozitifliği. 11 RA hastasının 9'unda anti-CCP gönderilmişti. Bu hastaların 6'sında (%67) anti-CCP pozitifliği. Hastalık süresi ortalama 10.1 $\pm$ 6.6 yıldır. Hastalar, çalışmaya dahil edildiğinde şiş eklem sayısı ortancası 3 (1-22), hassas eklem sayısı ortancası 2 (1-12), ESR ortalama 31.2 $\pm$ 23.7 milimetre/saat (mm/h), CRP ortalama 4.1 $\pm$ 4.4 miligram/desilitre (mg/dl), DAS28-ESR skoru ortalama 4.4 $\pm$ 1.0, DAS28-CRP 3.8 $\pm$ 1.0 olarak saptandı.

Hastaların büyük çoğunluğu oral steroid (10 hasta, %91) ve metotreksat (9 hasta, %82) ile tedavi altındaydı. 2 (%18) hastaya daha önce diz içi steroid tedavisi uygulanmıştı. 11 hastanın 5'ine (%45) herhangi bir dönemde biyolojik tedavi başlanmıştı ve çalışmaya alındığında bu tedavileri sürmekteydi (2 rituksimab, 1 etanercept, 1 abatacept, 1 adalimumab). Hasta ve kontrol grubunun demografik özellikleri Çizelge 4.1.'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.1. RA hastaları ve kontrol grubunun demografik özellikleri.

	RA (n=11)	Kontrol (n=5)
Bayan cinsiyet (n, %)	8 (73)	3(60)
Yaş (ortalama±SD)	44.5±14.2	28.8±13.6
Hastalık süresi (yıl)	10.1±6.6	-
ESR (mm/h)	31.2±23.7	-
CRP (mg/dl)	4.1±4.4	-
RF pozitifliği (n, %)	6 (55)	-
CCP pozitifliği (n,%)*	6 (67)	-
Tedaviler (n,%)		
MTX	9 (82)	-
SLZ	8 (73)	-
LEF	4 (36)	-
HKQ	7 (64)	-
Oral Steroid	10 (91)	-
İntraartiküler Steroid	2 (18)	-
Biyolojik Tedavi	5 (45)	-

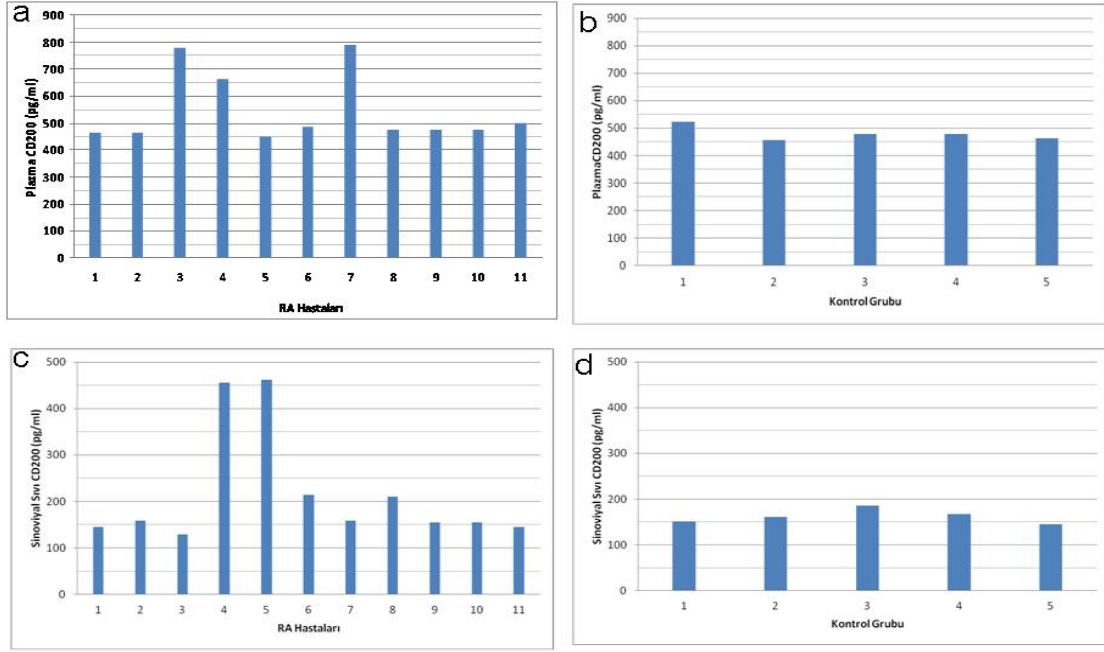
Sürekli değişkenler ortalama±standart sapma, kategorik veriler sayı ve yüzde olarak ifade edildi.

*:11 RA hastasının 9'unda CCP mevcuttur.

RA: Romatoid artrit, SD: Standart deviasyon, ESR: Eritrosit sedimentasyon zamanı, CRP: C reaktif protein, RF: Romatoid faktör, CCP: anti-siklik sitrüline peptid, MTX: Metotreksat, SLZ: Sulfasalazin, LEF: Leflunomid, HKQ: Hidroksiklorokin

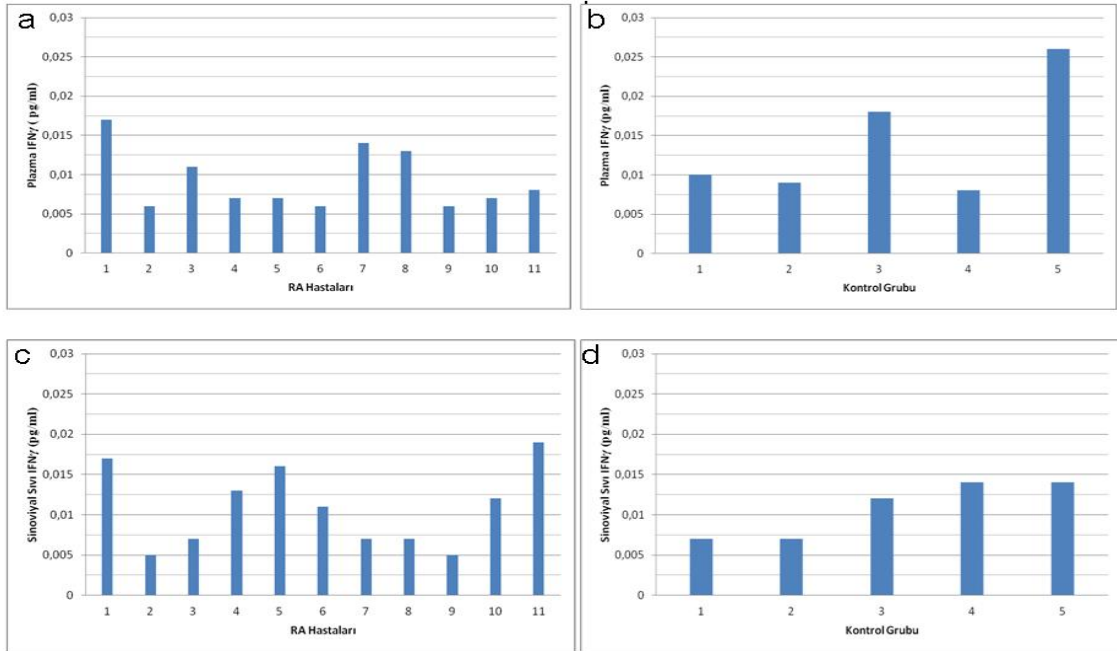
4.2. Hasta ve Kontrol Grubunun CD200, TNFα ve IFNγ Düzeyleri

Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'de sırasıyla RA hastaları ve kontrol grubunun plazma ve sinoviyal sıvı CD200, IFNγ ve TNFα düzeyleri gösterilmiştir.



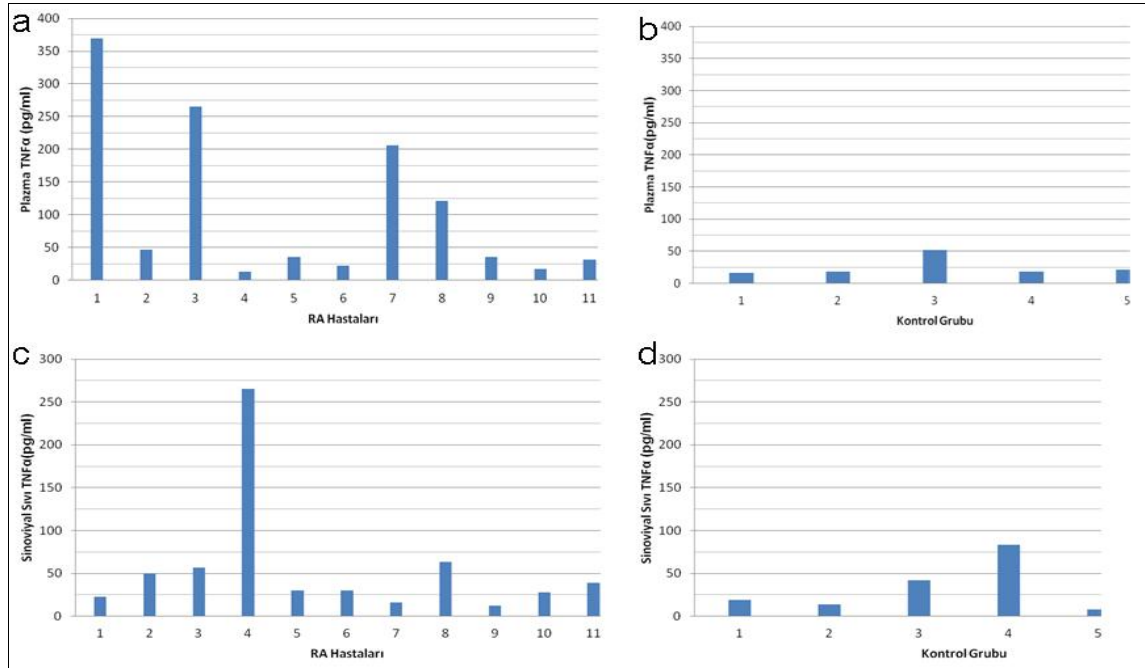
RA: Romatoid Artrit

Şekil 4.1. RA hastaları ve kontrol grubunun plazma ve sinoviyal sıvı CD200 düzeyleri
a) RA hastalarında plazma CD200 düzeyi, **b)** Kontrol grubunda plazma CD200 düzeyi,
c) RA hastalarında sinoviyal sıvı CD200 düzeyi, **d)** Kontrol grubunda sinoviyal sıvı CD200 düzeyi.



RA: Romatoid Artrit, IFN γ : İnterferon gama

Şekil 4.2. RA hastaları ve kontrol grubunun plazma ve sinoviyal sıvı IFN γ düzeyleri.
a) RA hastalarında plazma IFN γ düzeyi, **b)** Kontrol grubunda plazma IFN γ düzeyi,
c) RA hastalarında sinoviyal sıvı IFN γ düzeyi, **d)** Kontrol grubunda sinoviyal sıvı IFN γ düzeyi.



RA: Romatoid Artrit, TNFα: Tümör nekrozis faktör alfa

Şekil 4.3. RA hastaları ve kontrol grubunun plazma ve sinoviyal sıvı TNFα düzeyleri. **a)**RA hastalarında plazma TNFα düzeyi, **b)**Kontrol grubunda plazma TNFα düzeyi, **c)**RA hastalarında sinoviyal sıvı TNFα düzeyi, **d)**Kontrol grubunda sinoviyal sıvı TNFα düzeyi.

Çizelge 4.2. RA hastaları ve kontrol grubunun serum ve sinoviyal sıvıdaki CD200, TNFα ve IFNγ değerleri ve grupların birbirleriyle karşılaştırılması.

	RA (n=11)	Kontrol (n=5)	p
Serum TNFα (pg/ml)	105.7±121.5	25.7±14.9	0.157
Sinoviyal sıvı TNFα (pg/ml)	56.3±71.2	33.7±31.0	0.396
Serum CD200 (pg/ml)	546.0±131.0	479.5±25.7	0.608
Sinoviyal sıvı CD200 (pg/ml)	217.5±122.5	162.5±15.8	0.864
Serum IFNγ (pg/ml)	9.8±4 X10 ⁻⁵	15.4±8 X10 ⁻⁵	0.047
Sinoviyal sıvı IFNγ (pg/ml)	11.2±4 X10 ⁻⁵	11.5±8 X10 ⁻⁵	0.610

Değerler ortalama±standart deviasyon olarak verilmiştir.

Onbir RA hastasının 5'i biyolojik tedavi almaktaydı. Biyolojik tedavilerin TNFα, CD200, IFNγ seviyelerini etkileyebileceği düşünülerek biyolojik tedavi alan ve biyolojik tedavi almayan RA hastaları plazma ve sinoviyal sıvı TNFα, CD200, IFNγ seviyelerini açısından karşılaştırıldı. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

Biyolojik tedavi almayan RA hastaları ile kontrol grubu hastalarının plazma ve sinoviyal sıvı TNF α , CD200, IFN γ düzeyleri karşılaştırıldı. İki grup arasında plazma ve sinoviyal sıvı CD200 ve TNF α düzeyleri, sinoviyal sıvı IFN γ düzeyleri arasında fark saptanmazken kontrol grubu plazma IFN γ seviyesi biyolojik tedavi almayan RA hastalarından anlamlı olarak yüksek bulundu ($15.5 \pm 34.0 \times 10^{-5}$ 'e $8.4 \pm 11.2 \times 10^{-5}$, $p = 0.028$).

4.3. TNF α , CD200, IFN γ düzeyleri ile Diğer Parametrelerin İlişkisi

RA hastalarının sinoviyal sıvı TNF α düzeyi ile hassas eklem sayısı ($p = 0.049$, $r = -0.63$), şiş eklem sayısı ($p = 0.048$, $r = -0.636$) ve DAS28-CRP ($p = 0.038$, $r = -0.661$) arasında ters bir ilişki saptanmıştır. Sinoviyal sıvı CD200 seviyesi ile hastalık yaşı arasında ters bir ilişki mevcuttur ($p = 0.011$, $r = -0.758$). Plazma TNF α , CD200, IFN γ seviyeleri ve sinoviyal sıvı CD200 ve IFN γ seviyeleri ile ESR, CRP, hassas ve şiş eklem sayısı, DAS28- ESR, DAS28-CRP arasında bir ilişki yoktur.

RA hastalarında plazma ve sinoviyal sıvı TNF α , CD200, IFN γ düzeyleri RF pozitifliği ve negatifliğine göre değerlendirildiğinde sadece sinoviyal sıvı TNF α düzeyinin RF pozitif olan grupta RF negatif olan gruba göre anlamlı yüksek olduğu (83.5 ± 36.8 'e 23.7 ± 3.8 , $p = 0.028$), plazma ve sinoviyal sıvı CD200, IFN γ ve plazma TNF α düzeylerinde ise iki grup arasında fark olmadığı görüldü. İki hastanın anti-CCP verisinin olmaması ve sadece 3 hastanın anti-CCP'sinin negatif olmasından dolayı bu hasta grubunda istatistiksel analiz yapılamadı.

5. TARTIŞMA

RA gelişiminde etkisi olduğu düşünülen moleküllerden biri CD200'dür. Yapılan hayvan çalışmalarında, CIA fare modelinde CD200R1 KO farelerde artrit daha şiddetli seyrettiği(81), immünizasyon sırasında CD200Fc ve anti-CD200R uygulamasının bu farelerde hastalığın başlangıcını engellediği, immünizasyonun 15. ve 24. günlerinde verildiğinde ise artrit şiddetini azalttığı gösterilmiştir(79). CD200Fc ve anti-CD200R uygulaması ile serumda TNF α ve IFN γ artışı da engellenmiştir (79). Farede CD200Fc'nin eklemdeki proinflamatuvar sitokin ekspresyonuna etkisi değerlendirilmiş ve IL1 β , TNF α , IL10 mRNA ekspresyonunun azaldığı ve kırıkta yıkım enzimi olan MMP13 seviyesinin de azaldığı görülmüştür (80). Farelerde eklem ve LN'da RT-PCR ile CD200, CD200R1 ekspresyonunun değerlendirildiği bir çalışmada CD200, CD200R1 ekspresyonunun artrit şiddetini yansıtacak şekilde inflamatuvar yanıtla paralel seyrettiğini tespit edilmiştir(81). Yapılan hayvan çalışmalarında CD200/CD200R'ın artrit üzerindeki inhibitör etkilerinin görülmesiyle bu molekülün insanda RA hastalığının seyrindeki rolü araştırılmaya başlanmıştır.

Bu çalışma, literatür bilgisi eşliğinde CD200 seviyesinde aktif veya istirahat halindeki RA hastalarında bir değişiklik olup olmadığı, varsa bu değişikliklerin hastalık aktivitesi ile ilişkisi ve literatür bilgisi eşliğinde bir immünosupresif molekül olduğu düşünülen CD200 yolunun RA'daki rolü hakkında fikir edinebilmek için planlanmıştır. Bu nedenle çalışmaya, Aktif RA'ı olup dizinde effüzyon gelişen 11 hasta ile travma sonrası dizinde effüzyon gelişen 5 travma hastası (romatizmal bir hastalığı olmayan) dahil edilmiştir. Plazma ve sinoviyal sıvıda ELİZA yöntemi ile soluble CD200, TNF α ve IFN γ seviyeleri belirlenmiştir. Bu çalışmada RA hastaları ve kontrol grubu arasında plazma ve sinoviyal sıvı CD200 seviyeleri açısından fark saptanmamıştır. Plazma IFN γ düzeyinin kontrol grubunda daha yüksek olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($15.5 \pm 34.0 \times 10^{-5}$ 'e $9.8 \pm 11.3 \times 10^{-5}$, $p = 0.047$). İki grup arasında sinoviyal sıvı ve plazma TNF α düzeyleri ve sinoviyal sıvı IFN γ düzeyleri arasında fark saptanmamıştır. Ayrıca TNF α ve IFN γ seviyeleri ile CD200 seviyeleri arasında ilişki olmadığı görülmüştür.

Biyolojik tedavilerin CD200, TNF α ve IFN γ düzeylerini etkileyebileceği düşünülerek biyolojik tedavi almayan RA hastaları ile kontrol grubu karşılaştırılmıştır. Plazma ve sinoviyal sıvı CD200 ve TNF α düzeyleri, sinoviyal sıvı IFN γ düzeyleri her

iki grupta benzerken plazma IFN γ düzeyinin kontrol grubunda anlamlı olarak yüksek saptanmıştır ($15.5 \pm 34.0 \times 10^{-5}$ e $8.4 \pm 11.2 \times 10^{-5}$, $p = 0.028$). Tüm RA hastalarında ve RA hastalarının alt grubu olan biyolojik tedavi almayan RA hastalarında plazma IFN γ düzeyinin kontrole göre düşük olması ve bu farkın sinoviyal sıvı IFN γ düzeylerinde görülmemesi, sadece plazma IFN γ düzeylerini etkileyen biyolojik tedaviler dışındaki bir nedenin olabileceğini düşündürmektedir. Bu durum, hastaların oral steroid tedavisi kullanıyor olmasından kaynaklanabilir. Steroidlerin, IFN γ üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğu bilinmektedir (96). Bunun dışında travma geçiren hastalarda başka bir hastalık yokken serum IFN γ düzeylerinde artış olması travma ile yaşanan strese bağlı olabilir diye düşünülmüştür. Ancak travma ile stres altında kalan hastalardaki serum IFN γ düzeyleri bilinmediğinden bir yorum yapmak mümkün değildir.

Chakera ve arkadaşları, periferik kanda T_{FH}'de CD200 ekspresyonunu değerlendirmiş ve RA hastalarında CD200 ekspresyonunun kontrol grubuna göre arttığını saptamıştır (87). Anti-TNF tedavi alan hastalarda CD200 seviyesi anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. CD200 ekspresyonunun DAS28-CRP ve ACPA titresiyile ilişkili olmadığı görülmüştür. Bu çalışmanın aksine bizim çalışmamızda hasta ve kontrol grubu arasında ve RA hastalarında biyolojik tedavi alan ve almayan grup arasında CD200 seviyeleri arasında fark saptanmamıştır. Bu farklılık Chakera'nın çalışmasında CD200'ün hücre düzeyinde, bizim çalışmamızda ise periferik kanda ELİZA yöntemiyle bakılmasından kaynaklanmış olabilir. CD200 seviyesindeki farklılık belki de hücre düzeyinde meydana gelmekte ve bu farklılık serum düzeylerine yansımamaktadır. Bazı hastalarda soluble CD200 değerleri diğerlerinden bariz yüksek saptanmıştır, ancak bu değerler istatistiğe yansımamıştır. Hasta sayısının azlığının bu durumu etkileyebileceği düşünülmektedir.

Gao ve arkadaşları, RA'da periferik kanda MDM'larda CD200 ekspresyonunun değişmediğini, fakat CD200R1 ekspresyonunun azaldığını saptamıştır (88). CD200R1 ekspresyonunun DAS28, ESR, CRP ile ters ilişkili olduğu görülmüştür. Bizim çalışmamızda ise CD200R1 düzeyine bakılmamıştır. Hastalığın aktif olduğu dönemde CD200 ekspresyonundan ziyade CD200R1 ekspresyonundaki değişikliğin ön planda olabileceği ve bu nedenle de çalışmamızda CD200 açısından anlamlılık saptanmadığı düşünülebilir. Çalışmamızda, serum ve sinoviyal sıvı CD200 seviyeleri ile klinik olarak aktiviteyi yansıtan hassas ve şiş eklem sayısı, hastalık aktivitesini değerlendiren DAS28-ESR ve DAS28-CRP arasında da herhangi bir ilişki de tespit edilmemiştir.

RA, gelişiminde birçok faktörün yer aldığı kompleks bir patofizyolojik mekanizmaya sahiptir. Hastalık gelişiminde genetik faktörlerin, çevresel faktörlerin ve immün sistemde meydana gelen değişikliklerin rol oynadığı düşünülmektedir. Hastalığa yatkınlığı olan bireylerde genetik ve çevresel faktörlerin etkisiyle immün yanıt oluşmakta ve nasıl ve neden olduğunu tam olarak bilmediğimiz bir tetikleyici olayla sinoviyum etkilenmektedir.

Son on yıl içinde RA patogenezinin daha iyi anlaşılmasıyla birlikte tedavi seçenekleri de değişmiştir. RA tedavisinde uzun yıllar boyunca metotreksat, antimalariyal ilaçlar, sulfasalazin, leflunomid, altın, siklosporin gibi geleneksel DMARD tedavileri kullanılmış, son dönemde TNF α 'nın hastalık patogenezindeki rolünün aydınlatılmasıyla anti-TNF tedaviler gündeme gelmiştir. Anti-TNF ilaçların sayıları gün geçtikçe artmış ve bunun yanı sıra B ve T hücrelerini ve diğer sitokinleri hedef alan tedaviler kullanıma girmiştir.

T hücre aktivasyonunda kostimulatuar sinyallerin önemi anlaşılmış, uyarıcı sinyaller olduğu gibi inhibitör sinyallerin de olduğu tespit edilmiştir. Bu inhibitör sinyal molekül çiftlerinden birinin de CD200:CD200R olduğu görülmüştür. CD200:CD200R'ın lenfoid ve myeloid hücrelerin regülasyonunda ve immün tolerans gelişiminde rol oynadığı, hücrelerin diferansiasyon, adhezyon ve kemotaksisinde etkili olduğu ve mediatör ve sitokin salınımını regüle ettiği bilinmektedir (2). Bu özellikleri nedeniyle CD200, otoimmünite, organ transplantasyonu, alerjik hastalıklar ve kanser etiyopatogenezinde yer almaktadır (3). Yapılan hayvan çalışmalarında artrit seyrinde CD200/CD200R1'in önemi anlaşılmış ve CD200Fc, anti-CD200R ile olumlu sonuçlar alınmıştır. İnsanda da yapılan ilk çalışmalar olumlu sonuçlar vermiştir. Otoimmün hastalıklardan sadece RA'da değil, SLE gelişiminde de etkisinin olduğu gösterilmiştir (93). CD200, RA'da ve diğer otoimmün hastalıklarda hastalık prognozu, aktivite takibi ve tedavide kullanılabilecek yeni bir aday molekül gibi görünmektedir.

Bu çalışmanın kısıtlılıkları, çalışmaya dahil edilen hasta sayısının az olması ve CD200, CD200R pozitif hücre sayısına da bakılmamış olmasıdır. Hasta sayısının az olması nedeniyle gruplar arasında istatistiksel anlamlılık saptanmamış olabilir. Hücre düzeyinde CD200 ve CD200R'ın bakıldığı daha fazla sayıda hastanın katılacağı benzer dizaynda bir çalışma ile anlamlı sonuçlar elde edilebilir. RA'ye bağlı nedenlerle diz protezi yapılan hastaların doku materyallerinde CD200 ve CD200R1 ekspresyonu incelenip, osteoartrit nedeniyle diz protezi yapılan hastalarla bu veriler karşılaştırılabilir.

ve doku düzeyindeki CD200 ve CD200R1 ekspresyonu ile periferik kandaki seviyelerinin ilişkisinin değerlendirildiği çalışmalar planlanabilir. Ayrıca diğer otoimmün hastalıklarda da CD200/CD200R'ın etkileri araştırılmalıdır.

Sonuç olarak, bu çalışmada RA hastaları ve kontrol grubu arasında plazma ve sinoviyal sıvı CD200 seviyesi açısından fark saptanmamıştır. Bu sonuç biyolojik tedavi almayan hastalarda da değişmemiştir. CD200 seviyesi ile diğer inflamatuvar sitokinler olan TNF α ve IFN γ seviyeleri arasında ilişki saptanmamıştır.

6. SONUÇLAR

- Bu çalışmada, aktif RA hastaları ve kontrol grubu arasında plazma ve sinoviyal sıvı CD200 seviyeleri benzer saptanmıştır.
- Biyolojik tedavi alan ve biyolojik dışı diğer tedavileri alan RA hastaları karşılaştırıldığında plazma ve sinoviyal sıvı CD200 seviyeleri açısından fark yoktur.
- Biyolojik dışı diğer tedavileri alan RA hastaları ile kontrol grubu arasında plazma ve sinoviyal sıvı CD200 seviyeleri açısından fark yoktur.
- Plazma ve sinoviyal sıvı CD200 seviyeleri ile diğer inflamatuvar sitokinler olan TNF α ve IFN γ seviyeleri arasında ilişki saptanmamıştır.
- CD200 seviyeleri ile hastalık aktivitesini yansıtan ESR, CRP, DAS28-ESR ve DAS-28-CRP arasında ilişki saptanmamıştır.
- RF pozitifliği ile CD200 seviyesi arasında ilişki saptanmamıştır.
- RA hastaları ile kontrol grubu ve biyolojik dışı tedavi alan RA hastaları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında plazma IFN γ seviyesinin kontrol grubunda anlamlı olarak yüksek olduğu saptanmıştır. Bu farkın, RA hastalarının kullandığı oral steroid tedavisine bağlı olarak IFN γ seviyesinin baskılanmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.
- Hasta sayısının az olmasından dolayı CD200 seviyesinde istatistiksel anlamlılığa ulaşılamamış olabilir. Ayrıca çalışmada CD200 ve CD200R pozitif hücre sayısına bakılmamıştır. Hücre düzeyinde CD200 ve CD200R'ın bakıldığı daha fazla sayıda hastanın katılacağı benzer dizaynda bir çalışma ile anlamlı sonuçlar elde edilebilir.

7. ÖZET

ROMATOİD ARTRİT AKTİVASYONUNDA CD200'ÜN ÖNEMİ VAR MIDIR?

Romatoid artrit, sinoviyal eklemlerin inflamasyonu ile seyreden sistemik otoimmün bir hastalıktır. CD200, immün sistem üzerinde etkileri olan bir tip I transmembran glikoproteinidir. Yapılan hayvan çalışmaları, kollajen ile indüklenen artritte CD200'ün inhibitör etkilerini göstermiştir. Bu çalışma, romatoid artrit aktivasyonu nedeniyle dizinde effüzyon gelişen hastalarda plazma ve sinoviyal sıvı CD200 seviyelerinde değişme olup olmadığını saptamak amacıyla yapılmıştır.

Çalışmaya romatoid artrit aktivasyonu nedeniyle diz effüzyonu gelişmiş 11 hasta ve kontrol grubu olarak da travma sonrası diz effüzyonu gelişen 5 hasta dahil edilmiştir. Plazma ve sinoviyal sıvıda ELİZA yöntemi ile CD200, TNF α ve IFN γ seviyelerine bakılmıştır. Hastalık aktivitesi eritrosit sedimentasyon hızı (ESR), C reaktif protein (CRP), hastalık aktivite skoru 28 (DAS28)-ESR ve DAS28-CRP ile değerlendirilmiştir. Romatoid artrit ve kontrol grubu arasında plazma ve sinoviyal sıvı CD200 ve TNF α seviyeleri ve sinoviyal sıvı IFN γ seviyeleri arasında fark bulunmamıştır. Kontrol grubunda plazma IFN γ seviyesi ise istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek saptanmıştır ($p = 0.047$). Biyolojik tedavi almayan romatoid artrit hastaları ile kontrol grubu arasında plazma ve sinoviyal sıvı CD200 ve TNF α seviyeleri ve sinoviyal sıvı IFN γ seviyeleri arasında fark yokken, plazma IFN γ seviyesi kontrol grubunda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p = 0.028$).

Çalışmada, romatoid artrit hastaları ve kontrol grubu arasında plazma ve sinoviyal sıvı CD200 seviyeleri açısından fark saptanmamıştır. Romatoid artrit aktivasyonunda CD200'ün önemini belirlemek için daha fazla sayıda hastanın katılacağı çalışmalar yapılabilir.

Anahtar kelimeler: Romatoid Artrit, CD200, sinoviyal sıvı.

8. ABSTRACT

IS THERE AN IMPORTANCE OF CD200 DURING AN ACTIVATION OF RHEUMATOID ARTHRITIS?

Rheumatoid arthritis is a systemic autoimmune disease primarily affecting synovial joints. CD200 is a type I transmembrane glycoprotein that has an effects on immune system. Previous animal studies have established the inhibitory role of CD200 in collagen induced arthritis models. The goal of this study is to demonstrate whether change of plasma and synovial fluid CD200 level exist at active Rheumatoid arthritis patients with knee effusion during activation of rheumatoid arthritis.

Eleven active rheumatoid arthritis patients with knee effusion and as a control 5 patients with knee effusion due to trauma were included in this study. Plasma and synovial fluid CD200, TNF α and IFN γ levels are measured by ELISA. Disease activity was determined by erythrocyte sedimentation rate (ESR), C reactive protein (CRP), disease activity score 28 (DAS28)-ESR and DAS28-CRP respectively. There was no difference between rheumatoid arthritis patients and controls in terms of plasma and synovial fluid CD200, TNF α and synovial fluid IFN γ levels. Plasma IFN γ level was higher in control group and this was statistically significant ($p = 0.047$). Plasma and synovial fluid CD200, TNF α and synovial fluid IFN γ levels were not statistically different between biological agents treated rheumatoid arthritis patients and controls whereas plasma IFN γ level was higher in controls compare to treatment group ($p = 0.028$).

In this study, levels of plasma and synovial fluid CD200 were not found statistically different between rheumatoid arthritis patients and controls. Further studies with more patients are needed to explore the importance of CD200 role in rheumatoid arthritis.

Key words: Rheumatoid Arthritis, CD200, Synovial fluid.

9. KAYNAKLAR

- 1- Eular Textbook on Rheumatic Diseases. Editor: Johannes WJ Bijlsma 2012.
- 2- Holmannová D, Kolářková M, Kondělková K. CD200/CD200R Paired potent inhibitory molecules regulating immune and inflammatory responses; part I: CD200/CD200R structure, activation, and function. *Acta Medica (Hradec Králové)* 2012; 55: 12-7.
- 3- Gorczynski RM. Immunoregulatory molecules for use in suppression of transplant rejection and autoimmunity: A special role for reagents which manipulate CD200:CD200R interactions. *Altered Immunoregulation and Human Disease* 2005; 287-304.
- 4- Stockman A, Tait BD, Wolfe R. Clinical, laboratory and genetic markers associated with erosions and remission in patients with early inflammatory arthritis: a prospective cohort study. *Rheumatol Int* 2006; 26(6): 500-9.
- 5- Bang H, Egerer K, Gauliard A. Mutation and citrullination modifies vimentin to a novel autoantigen for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 2503-11.
- 6- Uysal H, Bockermann R, Nandakumar KS. Structure and pathogenicity of antibodies specific for citrullinated collagen type II in experimental arthritis. *J Exp Med* 2009; 206: 449-62.
- 7- Hill JA, Bell DA, Brintnell W. Arthritis induced by posttranscriptionally modified (citrullinated) fibrinogen in DR4-IE transgenic mice. *J Exp Med* 2008; 205: 967-79.
- 8- Huizinga TW, Amos CI, van der Helm-van Mil AH. Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for autoantibodies to citrullinated proteins. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 3433-8.
- 9- Klareskog L, Padyukov L, Rönnelid J. Genes, environment and immunity in the development of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Immunol* 2006; 18: 650-5.
- 10- Jorgensen C, Picot MC, Bologna C. Oral contraception, parity, breast feeding and severity of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1996; 55: 94-8.
- 11- Dörner T. Crossroads of B cell activation in autoimmunity: rationale of targeting B cells. *J Rheumatol* 2006; 77: 3-11.
- 12- Lee DM, Friend DS, Gurish MF. Mast cells: A cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis. *Science* 2002; 297: 1689-92.
- 13- Hueber AJ, Asquith DL, Miller AM. Mast cells Express IL17A in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol* 201; 184: 3336-40.
- 14- Barclay AN. Different reticular elements in rat lymphoid tissue identified by localization of Ia, Thy⁺ 1 and MRC OX 2 antigens. *Immunology* 1981; 44(4): 727-36.

- 15- Barclay AN, Ward HA. Purification and chemical characterization of membrane glycoproteins from rat thymocytes and brain, recognized by monoclonal antibody MRC OX 2. *Eur J Biochem* 1982; 129(2): 447-58.
- 16- Wright GJ, Puklavec MJ, Willis AC. Lymphoid/neuronal cell surface OX2 glycoprotein recognizes a novel receptor on macrophages implicated in the control of their function. *Immunity* 2000; 13(2): 233-42.
- 17- Gorczynski RM, Chen Z, Fu XM. Increased expression of the novel molecule OX-2 is involved in prolongation of murine renal allograft survival. *Transplantation* 1998; 65(8): 1106-14.
- 18- Gorczynski RM, Cattral MS, Chen Z. An immunoadhesin incorporating the molecule OX-2 is a potent immunosuppressant that prolongs allo- and xenograft survival. *J Immunol* 1999; 163(3): 1654-60.
- 19- Gorczynski RM, Yu K, Clark D. Receptor engagement on cells expressing a ligand for the tolerance-inducing molecule OX2 induces an immunoregulatory population that inhibits alloreactivity in vitro and in vivo. *J Immunol* 2000; 165(9): 4854-60.
- 20- Barclay AN, Wright GJ, Brooke G. CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells. *Trends Immunol* 2002; 23(6): 285-90.
- 21- Wright GJ, Jones M, Puklavec MJ. The unusual distribution of the neuronal/lymphoid cell surface CD200 (OX2) glycoprotein is conserved in humans. *Immunology* 2001; 102(2): 173-9.
- 22- Chen Z, Marsden PA, Gorczynski RM. Role of a distal enhancer in the transcriptional responsiveness of the human CD200 gene to interferon gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Mol Immunol* 2009; 46(10): 1951-63.
- 23- Chen Z, Marsden PA, Gorczynski RM. Cloning and characterization of the human CD200 promoter region. *Mol Immunol* 2006; 43(6): 579-87.
- 24- Mukhopadhyay S, Plüddemann A, Hoe JC. Immune inhibitory ligand CD200 induction by TLRs and NLRs limits macrophage activation to protect the host from meningococcal septicemia. *Cell Host Microbe* 2010; 8(3): 236-47.
- 25- Rosenblum MD, Olsz E, Woodliff JE. CD200 is a novel p53-target gene involved in apoptosis-associated immune tolerance. *Blood* 2004; 103(7): 2691-8.
- 26- Wright GJ, Cherwinski H, Foster Cuevas M. Characterization of the CD200 receptor family in mice and humans and their interactions with CD200. *J Immunol* 2003; 171(6): 3034-46.
- 27- Rijkers ES, de Ruiter T, Baridi A. The inhibitory CD200R is differentially expressed on human and mouse T and B lymphocytes. *Mol Immunol* 2008; 45(4): 1126-35.
- 28- McCaughan GW, Clark MJ, Hurst J. The gene for MRC OX-2 membrane glycoprotein is localized on human chromosome 3. *Immunogenetics* 1987; 25(2): 133-5.

- 29- Gorczynski R, Chen Z, Kai Y. CD200 is a ligand for all members of the CD200R family of immunoregulatory molecules. *J Immunol* 2004; 172(12): 7744-9.
- 30- Wright GJ, Cherwinski H, Foster-Cuevas M. Characterization of the CD200 receptor family in mice and humans and their interactions with CD200. *J Immunol* 2003; 171: 3034- 46.
- 31- Akkaya M, Barclay AN. Heterogeneity in the CD200R paired receptor family. *Immunogenetics* 2010; 62(1): 15-22.
- 32- Gorczynski RM, Chen Z, Clark DA. Structural and functional heterogeneity in the CD200R family of immunoregulatory molecules and their expression at the feto-maternal interface. *Am J Reprod Immunol* 2004; 52(2): 147-63.
- 33- Colonna M, Facchetti F. TREM-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells): a new player in acute inflammatory responses. *J Infect Dis* 2003; 187(2): 397-401.
- 34- Hatherley D, Cherwinski HM, Moshref M. Recombinant CD200 protein does not bind activating proteins closely related to CD200 receptor. *J Immunol* 2005; 175(4): 2469-74.
- 35- Voehringer D, Rosen DB, Lanier LL. CD200 receptor family members represent novel DAP 12-associated activating receptors on basophils and mast cells. *J Biol Chem* 2004; 279(52): 54117-23.
- 36- Gorczynski R, Boudakov I, Khatri. Peptides of CD200 modulate LPS induced TNF alpha induction and mortality in vivo. *J Surg Res* 2008; 145(1): 87-96.
- 37- Gorczynski R, Boudakov I, Khatri I. A comparison of the biological properties of small molecular weight agonists and antagonists of CD200:CD200R interactions. *Med Chem* 2008; 4(6): 624-31.
- 38- Chen Z, Ma X, Zhang J. Alternative splicing of CD200 is regulated by an exonic splicing enhancer and SF2/ASF. *Nucleic Acids Res* 2010; 38(19): 6684-96.
- 39- Karra L, Berent-Maoz B, Ben-Zimra M. Are we ready to down regulate mast cells? *Curr Opin Immunol* 2009; 21(6): 708-14.
- 40- Zhang S, Phillips H. Identification of tyrosine residues crucial for CD200R-mediated inhibition of mast cell activation. *J Leukoc Biol* 2006; 79(2): 363-8.
- 41- Rijkers ES, de Ruiter T, Verbrugge A. CD-200R-Mediated inhibition of FcεR induced degranulation requires at least two functional tyrosine; *Biology of Inhibitory Immune Receptors - Studies on CD200R and LAIR-1*, Chapter 3, Doctoral Study, Utrecht University 2007.
- 42- Gorczynski RM. CD200:CD200R-Mediated Regulation of Immunity. *International Scholarly Research Network ISRN Immunology* 2012; 18. Article ID 682168.
- 43- Jenmalm MC, Cherwinski H, Bowman EP. Regulation of myeloid cell function through the CD200 receptors. *J Immunol* 2006; 176(1): 191-9.

- 44- Boudakov I, Chang P, Gorczynski RM. Mechanisms involved in suppression induced by CD200:CD200R interaction. *Recent Research Developments in Immunology* 2005; 7:9- 24.
- 45- Han P, Goularte OD, Rufner K. An inhibitory Ig superfamily protein expressed by lymphocytes and APCs is also an early marker of thymocyte positive selection. *J Immunol* 2004; 172(10): 5931-9.
- 46- Gorczynski RM. Transplant tolerance modifying antibody to CD200 receptor, but not CD200, alters cytokine production profile from stimulated macrophages. *Eur J Immunol* 2001; 31(8): 2331-7.
- 47- Gorczynski RM, Chen Z, Kai Y. Induction of tolerance-inducing antigen-presenting cells in bone marrow cultures in vitro using monoclonal antibodies to CD200R. *Transplantation* 2004; 77(8): 1138-44.
- 48- Gorczynski RM, Lee L, Boudakov I. Augmented induction of CD4+CD25+ Treg using monoclonal antibodies to CD200R. *Transplantation* 2005; 79(4): 488-91.
- 49- Walker LS. CD4+ CD25+ Treg: divide and rule? *Immunology* 2004; 111(2): 129-37.
- 50- Ramsdell F. Foxp3 and natural regulatory T cells: key to a cell lineage? *Immunity* 2003; 19(2): 165-8.
- 51- Yagi H, Nomura T, Nakamura K. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol* 2004; 16(11): 1643-56.
- 52- Zheng G, Wang B, Chen A. The 4-1BB costimulation augments the proliferation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2004; 173(4): 2428-34.
- 53- Herman AE, Freeman GJ, Mathis D. CD4+CD25+ T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effectors cells in the prediabetic lesion. *J Exp Med* 2004; 199(11): 1479- 89.
- 54- Fallarino F, Asselin-Paturel C, Vacca C. Murine plasmacytoid dendritic cells initiate the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism in response to CD200 receptor engagement. *J Immunol* 2004; 173(6): 3748-54.
- 55- Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 2004; 4(10): 762-74.
- 56- Gorczynski RM, Hadidi S, Yu G. The same immunoregulatory molecules contribute to successful pregnancy and transplantation. *Am J Reprod Immunol* 2002; 48(1): 18-26.
- 57- Fallarino F, Orabona C, Vacca C. Ligand and cytokine dependence of the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism in plasmacytoid dendritic cells. *Int Immunol* 2005; 17(11): 1429-38.
- 58- Trabanelli S, Ocadlikova D, Evangelisti C. Induction of regulatory T cells by dendritic cells through indoleamine 2,3-dioxygenase: A potent mechanism of acquired peripheral tolerance. *Curr Med Chem* 2011; 18(15): 2234-9.

- 59- Penberthy WT, Tsunoda I. The importance of NAD in multiple sclerosis. *Curr Pharm Des* 2009; 15(1): 64-99.
- 60- Jenmalm MC, Cherwinski H, Bowman EP. Regulation of myeloid cell function through the CD200 receptor. *The Journal of Immunology* 2006; 176(1): 191-9.
- 61- Gorczynski R, Chen Z, Hu J. Evidence that an OX-2-positive cell can inhibit the stimulation of type 1 cytokine production by bone marrow-derived B7-1 (and B7- 2)-positive dendritic cells. *The Journal of Immunology* 1999; 162(2): 774-81.
- 62- Hoek RM, Ruuls SR, Murphy CA. Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science* 2000; 290(5497): 1768-71.
- 63- Broderick C, Hoek RM, Forrester JV. Constitutive retinal CD200 expression regulates resident microglia and activation state of inflammatory cells during experimental autoimmune uveoretinitis. *Am J Pathol* 2002; 161(5): 1669-77.
- 64- Dick AD, Carter D, Robertson M. Control of myeloid activity during retinal inflammation. *J Leukoc Biol* 2003; 74(2): 161-6.
- 65- Rosenblum MD, Olasz EB, Yancey KB. Expression of CD200 on epithelial cells of the murine hair follicle: a role in tissue-specific immune tolerance? *J Invest Dermatol* 2004; 123(5): 880-7.
- 66- Gorczynski RM, Chen Z, Hu J. Evidence of a role for CD200 in regulation of immune rejection of leukaemic tumour cells in C57BL/6 mice. *Clin Exp Immunol* 2001; 126(2): 220-9.
- 67- Moreaux J, Hose D, Reme T. CD200 is a new prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 2006; 108(13): 4194-7.
- 68- Petermann KB, Rozenberg GI, Zedek D. CD200 is induced by ERK and is a potential therapeutic target in melanoma. *J Clin Invest* 2007; 117(12): 3922-9.
- 69- Moreaux J, Veyrune JL, Reme T. CD200: a putative therapeutic target in cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 366(1): 117-22.
- 70- Siva A, Xin H, Qin F. Immune modulation by melanoma and ovarian tumor cells through expression of the immunosuppressive molecule CD200. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57(7): 987-96.
- 71- Gorczynski RM, Clark DA, Erin N. Role of CD200 expression in regulation of metastasis of EMT6 tumor cells in mice. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 130(1): 49-60.
- 72- Gorczynski RM, Chen Z, Diao J. Breast cancer cell CD200 expression regulates immune response to EMT6 tumor cells in mice. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 123(2): 405-15.
- 73- McWhirter JR, Kretz-Rommel A, Saven A. Antibodies selected from combinatorial libraries block a tumor antigen that plays a key role in immunomodulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(4): 1041-6.

- 74- Tonks A, Hills R, White P. CD200 as a prognostic factor in acute myeloid leukaemia. *Leukemia* 2007; 21(3): 566-8.
- 75- Wong KK, Khatri I, Shaha S. The role of CD200 in immunity to B cell lymphoma. *J Leukoc Biol* 2010; 88(2): 361-72.
- 76- Foster-Cuevas M, Wright GJ, Puklavec MJ. Human herpesvirus 8 K14 protein mimics CD200 in down-regulating macrophage activation through CD200 receptor. *J Virol* 2004; 78(14): 7667-76.
- 77- Moreland LW, Schiff MH, Baumgartner SW. Etanercept therapy in rheumatoid arthritis. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 1999; 130(6): 478-86.
- 78- Maini R, St Clair EW, Breedveld F. Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. ATTRACT Study Group. *Lancet* 1999; 354(9194): 1932-9.
- 79- Gorczynski RM, Chen Z, Lee L. Anti-CD200R ameliorates collagen-induced arthritis in mice. *Clin Immunol* 2002; 104(3): 256-64.
- 80- Simelyte E, Criado G, Essex D. CD200-Fc, a novel antiarthritic biologic agent that targets proinflammatory cytokine expression in the joints of mice with collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2008; 58(4): 1038-43.
- 81- Simelyte E, Alzabin S, Boudakov I. CD200R1 regulates the severity of arthritis but has minimal impact on the adaptive immune response. *Clinical and Experimental Immunology* 162: 163-8.
- 82- Schaerli P, Willmann K, Lang AB. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J of Exp Med*. 2000; 192(11): 1553-62.
- 83- Nurieva RI, Treuting P, Duong J. Inducible costimulator is essential for collagen-induced arthritis. *Journal of Clinical Investigation* 2003; 111(5): 701-6.
- 84- Vinuesa CG, Cook MC, Angelucci C. A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity. *Nature* 2005; 435(7041):452-8.
- 85- Dong W, Zhu P, Wang Y. Follicular helper T cells in systemic lupus erythematosus: a potential therapeutic target. *Autoimmunity Reviews* 2011; 10(6): 299-304.
- 86- Morita R, Schmitt N, Bentebibel SE. Human blood CXCR5+CD4+ T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity* 2011; 34(1): 108-21.
- 87- Chakera A, Bennett SC, Morteau O. The phenotype of circulating follicular-helper T cells in patients with rheumatoid arthritis defines CD200 as a potential therapeutic target. *Clinical and Developmental Immunology* 2012; 10. Article ID 948218.

- 88- Gao S, Hao B, Yang XF. Decreased CD200R expression on monocyte-derived macrophages correlates with Th17/Treg imbalance and disease activity in rheumatoid arthritis patients. *Inflamm Res* DOI 10.1007/s00011-014-0716-6.
- 89- Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 2007; 8: 639-46.
- 90- Boissier MC, Assier E, Falgarone G. Shifting the imbalance from Th1/Th2 to Th17/Treg: the changing rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2008; 75:373-5.
- 91- Sakaguchi S, Wing K, Miyara M: Regulatory T cells - a brief history and perspective. *Eur J Immunol* 2007; 37(1): 116-23.
- 92- Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 6: 345-52.
- 93- Yang L, Zhao L, Tong L. Aberrant CD200/CD200R1 expression and function in systemic lupus erythematosus contributes to abnormal T-cell responsiveness and dendritic cell activity. *Arthritis Research & Therapy* 2012; 14: 123.
- 94- Ren Y, Leng X, Yang B. Aberrant CD200/CD200R1 expression contributes to painful synovium hyperplasia in a patient with primary hypertrophic Osteoarthropathy. *Rheumatol Int* 2013; 33: 2509-12.
- 95- Kay J, Upchurch KS. ACR/EULAR 2010 Rheumatoid Arthritis Classification Criteria. *Rheumatology (Oxford)* 2012; 51(6): 5-9.
- 96- Chatham WW. Glucocorticoid effects on immune system. Uptodate 2014.

10. EKLER

Ek 1. ACR / EULAR 2010 romatoid artrit tanı kriterleri.

	Puan
Tanınması gereken hedef popülasyon	
1. Klinik olarak en az bir eklemden saptanmış sinovit (şişlik)*	
2. Başka bir hastalıkla açıklanamayan sinovit mevcudiyeti*	
Tanı: Puanlama sonucunda, skorun $\geq 6/10$ olması RA tanısı için gereklidir.*	
A. Eklem tutulumu[§]	
1 büyük eklem [¶]	0
2-10 büyük eklem	1
1-3 küçük eklem (eşlik eden büyük eklem tutulumu olsun veya olmasın) [¶]	2
4-10 küçük eklem (eşlik eden büyük eklem tutulumu olsun veya olmasın)	3
>10 eklem (en az biri küçük eklem)**	5
B. Seroloji (Sınıflama için en az bir test sonucu gereklidir)**	
Negatif RF ve negatif ACPA	0
Düşük-pozitif RF veya düşük-pozitif ACPA	2
Yüksek-pozitif RF veya yüksek-pozitif ACPA	3
C. Akut faz parametreleri (Sınıflama için en az bir test sonucu gereklidir)**	
Normal CRP veya normal ESR 0	0
Anormal CRP veya anormal ESR 1	1
D. Semptomatik süre[§]	
<6 hafta	0
≥ 6 hafta	1

*Bu kriterler yeni hasta popülasyonunu hedef almaktadır. Ek olarak, eroziv hastalığı mevcut veya tedaviyle olsun veya olmasın inaktif hastalığı mevcut, 2010 kriterlerine göre RA tanısı sınıfına giren hastalar için de geçerlidir.

*Aynı zamanda SLE, gut, psöriyatik artrit gibi hastalıklar bulunmaktadır. Yetersiz ayırtıcı tanısı bilginde romatolog tarafından konsültte edilmelidir.

*Puanlama sonucu <6/10 olan hastalar RA sınıfına girmese de, takip edilmeli; zamanla kriterleri karşılayabilir.

§Eklem tutulumu, fizik muayene sonucu ağrı veya şiş eklem saptanması veya görüntülemeler sonucu sinovitin mevcudiyeti. Distal interfalangeal eklem, 1. karpometakarpal eklem ve 1. metatarsofalangeal eklem muayene dışı tutulmuştur. Eklem tutulum sıklık ve lokasyonlarına göre değerlendirilmeye tabi tutulmuştur.

¶Büyük eklem; omuz, dirsek, kalça, diz ve ayak bileği eklemleri

¶Küçük eklem; metakarpofalangeal eklem, proksimal interfalangeal eklem, 2.'den 5.'ye kadar metatarsofalangeal eklem, baş parmak interfalangeal eklemi ve el bileği

**Bu kategoride en az 1 küçük eklem tutulumu olmalıdır. Öteki eklem büyük, küçük veya sık tutulum gözükmeyen eklemlerden oluşabilir (örneğin; temporomandibular, akromioklavikular, sternoklavikular gibi).

**Negatiflik, normalin üst limitine eşit veya altında laboratuvar değerlerini ifade eder. Düşük-pozitif, normalin üst limitinden 3 veya daha az katı yüksek; yüksek-pozitif, normalin üst limitinden 3 veya daha fazla katı yüksek durumu ifade etmektedir. Eğer Romatoid Faktör (RF) ile ilgili bilgi sadece pozitiflik veya negatifliği içeriyorsa, pozitiflik düşük-pozitif olarak değerlendirilmelidir.

**Laboratuvar standartları muhafaza normal veya anormal sonuçlar

§Semptomların süresi, tedaviden bağımsız ve şikayet (ağrı, şişlik, hassasiyet), bizzat hastanın ifadesi doğrultusunda

ACPA: Anti-sitrüline peptid antikor; ESR: Eritrosit sedimentasyon hızı; CRP: C-reaktif protein

Ek 2. DAS28-ESR/CRP hesaplayıcı.

Joint Scores	
Tender:	0
Swollen:	0
To enter joint scores, I prefer to:	
☒ Use Mannequin	
☐ Type totals	

Additional Measures	
☒ ESR:	mm/hr
☐ CRP:	mg/l
☒ Patient Global Health:	0 mm
	
0 - Best Worst - 100	

DAS28	
Calculate	