



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

**TİP 1 DIABETES MELLİTUS PROGNOZ
VE PATOGENEZİNDE DENDRİTİK
HÜCRELERİN ÖNEMİ**

TAMAY SEDA TAŞÇI

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. NİLGÜN İŞIKSAÇAN**

**İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI
İMMÜNOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
EYLÜL/2023**

BEYAN

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Mevcut tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu,
- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Mevcut tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Tamay Seda Taşçı

13/09/2023

İTHAF

“Aileme ve rahmetli Oya teyzeme ithaf ediyorum”

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: 2022/088) tarafından desteklenmiştir.

Tez çalışmam sırasında beni destekleyen, immünoloji-biyokimya alanında ve laboratuvarında bana her zaman yeni konular öğreten ve ayrıca çalıştığım yer olan İleri Analiz Laboratuvar'ını kullanmam için olanak sağlayan Sağlık Bilimleri Üniversitesi, İstanbul Bakırköy Dr. Sadi Konuk Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi, Tıbbi Biyokimya Laboratuvar idari sorumlusu olan değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Nilgün Işıksaçan'a,

Yüksek lisans öğrenimim sırasında İmmünoloji bakış açımı genişleten Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İmmünoloji Ana Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Sevgi Kalkanlı Taş'a,

Tez çalışmalarım da benden desteğini esirgemeyen ve immünfenotipleme kısmının tasarımı ve analizlerinde bana yardımcı olan İstanbul Üniversitesi DETAM MSc. İmmünolog Pınar Atar'a,

Hasta toplama ve materyal işlemlerinde bana yardımcı olan İleri Analiz Laboratuvarı'ndan çalışma arkadaşlarım olan laboratuvar teknikerleri; Sibel Şimşek, Hatice Kınalı, Biyolog Evrim Yılmaz, MSc. Mikrobiyolog Havva Kaşıkçı, hemşire Şeyma Yaman ve hemşire Fatma Doğanay'a,

Gönüllü olan hastaların toplanması için laboratuvarımıza yönlendiren Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Diyabet/Dahiliye bölümünden Sayın Uzm. Dr. Nursel Kocamaz'a,

Tez çalışmamın genetik kısmı ve analizleri için bana yardımcı olan İstanbul Üniversitesi, Çocuk Sağlığı Enstitüsü'nün Dahili Tıp Bilimler Bölümü, Pediatrik Temel Bilimleri Ana Bilim Dalı'nda, Enstitü Müdür Yardımcısı olan Sayın Prof. Dr. Asuman Gedikbaşı ve Nadir Hastalıklar Laboratuvar'ında görev alan Biyolog Suzin Tatonyan'a,

Tezimin hazırlanmasında bana koşulsuz destek veren sevgili ikizim MSc. Moleküler Biyolog Hilal Sena Taşçı'ya,

Arkadaşlarıma; Yüksek Mühendis Gülşah Sevimli, Uzm. Diyetisyen Duygu Güçlü, Msc. Moleküler Biyolog Sema Özbek Baykara, Demet Gül'e ve İmmünoloji Anabilim dalı doktora öğrencileri Aylin Uzunoglu, Merve Uzunoglu, Bengü Akçam, Elifnaz Ilgaz'a,

Ayrıca bana her zaman, her koşulda desteklerini veren canım ailem ve anneanneme,

En derin sevgilerim ve saygılarımla teşekkür ediyorum.



İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
ÖZET.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. TİP 1 DIABETES MELLİTUS.....	3
2.1.1. Epidemiyolojisi.....	4
2.1.2. Etiyopatogenezi.....	4
2.1.3. Tanı.....	5
2.1.4. Tedavi.....	7
2.2. T1DM’NİN DENDRİTİK HÜCRELER İLE DEĞERLENDİRİLMESİ.....	7
2.2.1. Plazmasitoid DH.....	10
2.2.2. Miyeloid DH.....	11
2.2.3. Akan Hücre Ölçer.....	12
2.3. T1DM İLE <i>PTPN22</i> GENİ İLİŞKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	13
2.3.1. Kantitatif Reverse Transkripsiyon PCR.....	15
2.3.2. Primer Dizaynı.....	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	18
3.1. HASTA SEÇİM KRİTERLERİ.....	18
3.2. KULLANILAN MALZEMELER.....	18
3.2.1. Kimyasallar.....	18
3.2.2. Araç ve Gereçler.....	19
3.3. BİYOKİMYASAL ÖLÇÜMLER.....	20
3.4. İMMÜN FENOTİPLEME ÇALIŞMASI.....	21
3.4.1. Yüzey Boyama Protokolü.....	21
3.5. MOLEKÜLER ÇALIŞMALAR.....	22

3.5.1.	DNA/RNA İzolasyonunun Ön Aşamaları	22
3.5.2.	RNA Saflaştırma.....	23
3.5.3.	cDNA Eldesi	24
3.5.4.	Primer Dizayn	25
3.5.5.	Gradient PCR.....	26
3.5.6.	Agaroz Jel Hazırlama.....	27
3.5.7.	RT-qPCR Aşaması.....	28
3.6.	ANALİZLER.....	30
3.6.1.	İstatistiksel Analiz.....	30
3.6.2.	DH Alt Gruplarının Analizleri.....	31
3.6.3.	Relatif Kantitatif Analiz.....	34
4.	BULGULAR.....	35
4.1.	İMMÜN FENOTİPLEME ÇALIŞMASININ BULGULARI	37
4.2.	MOLEKÜLER ÇALIŞMANIN BULGULARI.....	38
5.	TARTIŞMA	41
6.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	46
	KAYNAKLAR	47
	EKLER.....	50

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3.1: İstenilen ölçümlerin adları ve cihazlarının referans aralıkları	21
Tablo 3.2: Çalışma tüpü dizaynında kullanılan dendritik hücrelere özgün antikor listesi..	22
Tablo 3.3: cDNA kütüphanesi	24
Tablo 3.4: cDNA termal döngüsü.....	25
Tablo 3.5: <i>PTPN22</i> ve <i>GADPH</i> genlerine özel primer dizileri	29
Tablo 3.6: RT-qPCR prosedürü	29
Tablo 3.7: RT-qPCR döngü sayıları, aşamaları, sıcaklıkları ve süreleri	30
Tablo 4.1: Grupların yaş ve cinsiyet açısından değerlendirilmesi	35
Tablo 4.2: Grupların HbA1c ve C-Peptid düzeyleri açısından değerlendirilmesi	35
Tablo 4.3: İmmünofenotipleme çalışmasının demografik sonuçları	37
Tablo 4.4: Grupların HLA-DR ⁺ LIN ⁻ , mDH, mDH1, mDH2, pDH düzeyleri açısından değerlendirilmesi	37
Tablo 4.5: Grupların $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ değerleri açısından değerlendirilmesi.....	39

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: DH'lerin gelişimi	9
Şekil 2.2: Akan hücre ölçer diagramı	12
Şekil 2.3: İnsan <i>PTPN22</i> mutanıtı	14
Şekil 2.4: İnsan <i>PTPN22</i> gen lokasyonu	15
Şekil 2.5: RT-qPCR aşamaları	16
Şekil 3.1: <i>GADPH</i> geninin FASTA görüntüsü	26
Şekil 3.2: Gradient PCR termal döngüsü	27
Şekil 3.3: Agaroz Jel Tankının Hazırlanışı	28
Şekil 3.4: FMO'ya göre antikorların sınır ayarlaması	31
Şekil 3.5: DH kapılama diagramı	32
Şekil 3.6: FMO kapılama stratejisine göre sınırların kapılı ve kapısız olarak gösterimi	32
Şekil 3.7: DH kapılama strateji histogramları	33
Şekil 4.1: Gruplar arasında HbA1c düzeyleri	36
Şekil 4.2: Gruplar arasında C peptid düzeyleri	36
Şekil 4.3: Gruplar arasında mDH, mDH1, mDH2 (%) düzeyleri	38
Şekil 4.4: Gradient PCR sonuçlarının agaroz jelde görüntüsü	39
Şekil 4.5: Gruplar arasında relatif hesaplama değerleri	39
Şekil 4.6: Gruplar arasında <i>GAPDH</i> değerleri	40
Şekil 4.7: Gruplar arasında <i>PTNP22</i> değerleri	40

SİMGELER VE KISALTMALAR

Anti GAAD	: Glutamik Asit Dekarboksilaz Antikorları
ASH	: Antijen Sunan Hücre (Antigen Presenting Cells)
BDCA	: Blood Dendritic Cell Antigens (Kan Dendritik Hücre Antijenleri)
bp	: baz dizisi
β	: Beta
CD	: Cluster of Differentiation (Başkalaşım Kümesi)
cDNA	: Komplementer DNA
CDP	: Ortak Dendritik Hücre Progenitörler
CLP	: Ortak Lenfoid Progenitörler
CMP	: Ortak Miyeloid Progenitörler
Csk	: C-Terminal Src Kinaz
CTLA-4	: Sitotoksik T Lenfosit ile İlişkili Protein 4
Ct	: Eşik Siklusunun Değeri
dk.	: dakika
Δ	: Delta
DH	: Dendritik hücreler
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksinükleotid Trifosfat
DM	: Diabetes Mellitus
FS	: İleri Saçılım
FMO	: Floresan Eksi Bir (Fluorescence Minus One)
gr	: gram

GWAS	: Geniş Çaplı Genom Projesi
HbA1c	: Hemoglobin A1c
HLA	: İnsan Lökosit Antijeni (Human Leukocyte Antigen)
HSC	: Hematopoietik Kök Hücreler
IAA	: İnsülin Otoantikorları
ICA	: Adacık Hücre Antikoru
IL2RA	: IL-2 Reseptörü
INS	: İnsülin
l	: Litre
LIN	: Soy belitreci (Lineage)
LN	: Lenf Düğümleri
LYP	: Lenfoid tirozin fosfataz
mDH	: Miyeloid dendritik hücreler
MHC	: Majör Histokompatibilite Kompleksi
ml	: mililitre
µl	: Mikrolitre
NGSP	: Ulusal Glikohemoglobin Standardizasyon Programı (National Glycohemoglobin Standardization Programme)
OGTT	: Oral Glukoz Tolerans Testi
pDH	: Plazmasitoid dendritik hücreler
PRR	: Patojenleri Tanıyan Örüntü Tanıma Reseptörleri
PTP	: Protein Tirozin Fosfataz
PTPN22	: Reseptör olmayan tip 22 protein tirozin fosfataz
RNA	: Ribonükleik Asit
RT-qPCR	: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
sn.	: saniye

∞	: Sonsuzluk
SNP Polimorfizmleri)	: Single Nucleotide Polymorphism (Tek Nükleotid
SS	: Yan Saçılım
TAE	: Tris-asetat-EDTA
T1DM	: Tip 1 Diabetes Mellitus
Th	: Yardımcı T hücresi
TLR	: Toll Benzeri Reseptör (Toll like receptor)
Treg	: T hücre düzenleyici
%	: yüzde

TİP 1 DIABETES MELLITUS PROGNOZ VE PATOGENEZİNDE DENDRİTİK HÜCRELERİN ÖNEMİ

ÖZET

Amaç: Tez çalışmasının amacı, Tip 1 Diabetes Mellitus hastalığının patogenezinin aydınlatılması için hücre tiplerine ve gen ekspresyonuna bakılmasıdır. Böylelikle T1DM hastalarının prognozları ve tedavileri için yol gösterici bir adım atılması hedeflenmektedir.

Gereç ve Yöntem: Tez çalışmasındaki gruplar; yeni tanılı olanların tanısı 5 yıldan az olan hastalar, eski tanılı olanlar, 5 yıl ve üzeri süredir hastalığı olanlar ve kontrol ise hiçbir hastalığı olmayan sağlıklılardan oluşmaktadır. Toplanan 39 numune ile immünofenotipleme ve gen ekspresyonu çalışmaları yapılmıştır. İmmünofenotipleme çalışması akan hücre ölçer cihazı ile yapıldı. Dendritik hücre alt gruplarına bakıldı ve tiplendirilme analizleri ile hücrelerin bulunma yüzdeleri hesaplandı. Diğer bir çalışma olan gen ekspresyonunda kalitatif reverse transkriptaz PCR yöntemi çalışılıp, gönüllülerin immün sistem ile bağlantılı olduğu düşünülen *PTPN22* genindeki ekspresyon düzeyleri bakıldı. Ct değerlerinin ortalaması ile relatif kantitatif analizi yapıldı.

Bulgular: Yeni tanılı ve eski tanılı gruplarının HbA1c düzeyi, kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde yüksek bulundu. Yeni tanılı ve eski tanılı gruplar arasında C-peptid düzeylerinde anlamlı bir farklılık bulunmadı. Eski tanı ve yeni tanı gruplarının mDH değeri kontrol grubundan anlamlı ($p<0,05$) olarak daha düşük bulundu. Eski tanı grubunda mDH2 değeri, kontrol ve yeni tanı grubundan anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Gruplar arasındaki mDH1 ve pDH değeri anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Gruplar arasında relatif hesaplama değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Sonuç: T1DM’li olan hasta ve kontrol gruplarındaki çalışma sonuçlarına göre eski tanılı grubun dendritik hücrelerin alt grubundaki mDH ve mDH2 de anlamlı bulunmuştur. *PTPN22* geninin C1858T polimorfizmi, Türk popülasyonundaki T1DM’in anlamlandırılabilmesi için başka moleküler çalışmalar yapılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Dendritik Hücreler, Otoimmün Hastalıklar, PTPN22 Geni,
Tip 1 Diabetes Mellitus



IMPORTANCE OF DENDRITIC CELLS IN TYPE 1 DIABETES MELLITUS PROGNOSIS AND PATHOGENESIS

ABSTRACT

Aim: The aim of the thesis study is to look at cell types and gene expression to elucidate the pathogenesis of Type 1 Diabetes Mellitus disease. Thus, it is aimed to take a guiding step for the prognosis and treatment of T1DM patients.

Materials and Methods: The groups in the thesis study; newly diagnosed patients with a diagnosis of less than 5 years, those with a previous diagnosis, those with a disease for 5 years or more, and control patients with no disease. Immunophenotyping and gene expression studies were performed with 39 samples collected. The immunophenotyping study was performed with a flowing cell meter. Dendritic cell subgroups were examined and the percentages of cells were calculated by typing analysis. In another study, the qualitative reverse transcriptase PCR method was studied in gene expression, and the expression levels of the *PTPN22* gene, which is thought to be associated with the immune system of the volunteers, were examined. Relative quantitative analysis was performed with the average of the Ct values.

Results: The HbA1c levels of the newly diagnosed and previously diagnosed groups were found to be significantly higher than the control group. There was no significant difference in C-peptide levels between newly diagnosed and old-diagnosed groups. The mDH values of the old diagnosis and new diagnosis groups were found to be significantly ($p < 0.05$) lower than the control group. The mDH2 value in the old diagnosis group was found to be significantly higher than the control and newly diagnosed groups. The mDH1 and pDH values between the groups did not show a significant difference. There was no statistically significant difference between the groups in terms of relative calculation values.

Conclusion: According to the results of the study, the patient and control groups with mDH and mDH2 in the subgroup of dendritic cells of the old diagnosis group were also found to be significant. Further molecular studies should be performed to make sense of the C1858T polymorphism of the *PTPN22* gene and T1DM in the Turk population.

Key Words: Autoimmune Diseases, Dendritic Cells, *PTPN22* Gene, Type 1 Diabetes

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Otoimmün hastalıklar, öz toleransın kendisiyle çatışması sonucu ortaya çıkan türden hastalıklardır. Otoimmün hastalıkların henüz türü ya da nasıl geliştiği belli olmayan birçok hastalık çeşitleri vardır; Haşimato, Romatoid Artrit (RA), Multipl Skleroz (MS), Tip 1 Diabetes Mellitus (T1DM), Vitiligo gibi hastalıklar otoimmün hastalıklara örnektir (1). Bu hastalıkların her biri birbirini tetikleyebilen rahatsızlıklardır.

T1DM hastalığı da bunlardan birisidir. Pankreastaki kronik adacık iltihabı ile sonuçlanan kompleks bir otoimmün hastalıktır (2). Genetik ve çevresel faktörlerin etkisiyle daha kompleks bir geçmişe sahip olan bir hastalık türü olup nedeni hala bulunamamıştır. Pankreastaki langerhans adacık beta (β) hücrelerinin hasarı sonucu vücuda yeteri kadar insülin sağlanamamaktadır. Hastanın langerhans hücreleri tarafından sağlanılamayan insülin, dışarıdan enjeksiyon yardımı ile bu ihtiyacı anlık olarak giderilir. Yani, T1DM'nin bir tedavisi mevcut değildir. T1DM hastaları, hayat kalitelerini artırmak ya da düzene sokmak için çeşitli diyet, spor aktiviteleri, insülin enjektisi gibi birkaç rutin durumun içerisindeyler.

Aynı zamanda T1DM hastalığının genetik olarak aktarıldığı düşünülmektedir. Sadece T1DM için değil diğer otoimmün hastalıkların genetik olarak aktarıldığını kanıtlayan birçok çalışma yapılmıştır. Özellikle, İnsan Lökosit Antijen (*HLA*) genleri (örn. *HLA-DR3* ya da *DR4*) ile fazlaca çalışmalar yapılmış olup bu gen çeşitliliğinin dışında da özel genlerin mevcuyeti göz önünde bulundurulduğunda birçok gen grubu otoimmün hastalıkların merkezinde yer almaktadır. *İnsülin (INS)*, *Protein Tirozin Fosfatase Reseptör Olmayan tip 22 (PTPN22)*, *Sitotoksik T Lenfosit ile İlişkili Protein 4 (CTLA-4)*, *IL-2 Reseptörü (IL2RA)* genleri, T1DM'nin etyopatogenezi üzerinde en önemli etkilere sahiptir(3). Bu etkileri bulabilmek için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) adı verilen bir yöntem kullanılmaktadır. DNA, RNA, proteinlerin çoğaltılarak okumasında, hedef gen düzeylerinin ölçümü, ekspresyonu hedef genler için uygunluğu, var-yok bilgilerileri ile kalıtsal bir durumların belirlenmesi gibi işlemler için en uygun yöntemlerden birisi PCR'dir.

Doğal ve adaptif immün sistemlerinde, antijene özđü B ve T lenfositlerinin yollarının genişlemesine yol açan immün hücrelerin yolakları vardır. Bu yolaklarla gelen çeşitli hücre grupları (makrofaj, dendritik hücreler, T hücreleri gibi) T1DM'nin patogeneğine katılırlar. Adaptif immün sistemlerinin içerisinde önemli bir yeri olan Antijen Sunan Hücre (ASH)'ler vardır. ASH'lerin içerisinde de dendritik, makrofaj ve B hücrelerini bulunmaktadır. Özellikle ASH ile dendritik hücreler (DH), patojenleri yakaladıktan sonra lenfoid organlara giderler ve orada T hücre antijenleri ile biraraya gelip yollarına devam ederler (4). Bu nedenle, DH'ler, efektör T hücre soyları ve farklı sitokin paternleri üreterek immün tolerans yoluyla immün yanıtların düzenlenmesine katkıda bulunurlar (4,5). Bu hücrelerin varlığına immünfenotipleme adı verilen bir yöntem ile bakılır. Bakılması istenen hücre grubuna belirteç-antikor tanımlayarak okuması yapıldığında hücre tiplendirmesi veya alt gruplarının belirlenmesi yapılabilmektedir.

DM çeşitliliği çok olan bir hastalık türü olduğundan etiopatogeneğinde eksiklikler mevcuttur. Özellikle T1DM hastası olanlar hem otoimmünel hem de genetiksel kısımlardan keşfedilmemiş bölümlere sahiptir. Bu tez çalışmasında bu eksikliklere, Türk popülasyonundaki T1DM grubu açısından prognoz ve patogeneğe katkı sağlama amacıyla hücre çeşitliliğinin (özellikle dendritik hücreleri) ve moleküler (*PTPN22* geni) yöntemlerin olacağı bir tez çalışması planlanılmıştır.

Akan hücre ölçer ve kalitatif reverse transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) metotları kullanılarak immüno-genetik açıdan değerlendirme yapılan bir tez çalışmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

DM, vücutta pankreas adı verilen bir salgı bezinin yeterli insülin hormonunu üretememesi veya ürettiği insülin hormonunu etkin bir şekilde kullanamaması sonucu ortaya çıkan, ömür boyu süren bir hastalıktır. DM hastalığı dünya genelinde oldukça yaygın olan bir hastalık çeşididir (6). Besinlerin çoğu, özellikle karbonhidrat içerenler, vücut tarafından glukozla dönüştürülür ve enerji olarak kullanılır. Midenin arka kısmında yer alan pankreas organı, kasların ve diğer dokuların kandan glukoz alıp enerji olarak kullanılmasını sağlayan insülin adlı hormonun üretiminden sorumludur. Hücreler enerji olarak glukoz kullanır. Glukoz miktarı vücudun enerji ihtiyacını aşarsa yağ dokusunda ve karaciğerde depolanırlar (6). Glukozun buralarda depolanması ile çeşitli hastalıklar meydana gelir. Özellikle DM hastalığının çok farklı çeşitleri mevcuttur.

Tip 1 diabetes mellitus, kronik bir hastalık olup otoimmün bir diyabet türüdür. Tanısı LADA ve Tip 2 DM ile çokça karıştırılmaktadır. Erişkin latent otoimmün diyabeti (LADA), yetişkinlerde gelişen ve genellikle çocuklarda teşhis edilen tip 1 diabetes mellitustan daha geç başlayan bir tip 1 diabete mellitus şeklindedir (7) . Bu yüzden tip 1.5 DM olarak isimlendirilmektedir. Hatta hastalığın ilk evrelerinde tip 2 DM için normal oral tedavilerle tedavi olabilirler ancak kontrollü insülin kullanımı önerilmektedir. Oluşabilecek bazı komplikasyonlar için uzun süreli gözlem altında olunması gereklidir. Tip 2 DM, insüline bağımlı olmayan diabetes mellitus (NIDDM) olarak bazı kaynaklarda yer almaktadır. İnsülin direnci ve bunun sonucunda insülin eksikliği ile ilişkili yüksek kan şekeri seviyeleri ile karakterize edilen metabolik bir bozukluktur (8).

Bu çalışmada odaklanılacak DM çeşidi otoimmün bir hastalık olarak kabul gören T1DM hastalığıdır.

2.1. TİP 1 DIABETES MELLITUS

T1DM hastalığı, Diabetes mellitus (DM) hastalığının içerisinde yer alan otoimmün hastalık tipidir. İnsüline bağımlı diyabet hastalığı olarak kaynaklarda geçmektedir (8). Pankreasın β ilerleyici hasarı başlar ve β hücreleri yeteri kadar insülin salgılayamadıkları için vücuda insülin gidemez. Diyabetin klinik belirtileri, beta hücre rezervi %80-90 oranında azaldığında ortaya çıkar (6,8). Böylece T1DM hastalar, insülin ihtiyaçlarını dışarıdan karşılamak zorunda kalır.

Etiyolojik olarak T1DM otoimmün bir sınıflandırılması mevcuttur. Tip 1a DM; immün mekanizmaya bağımlı, Tip 1b DM; idiyopatik diyabet olarak geçmektedir. İmmün mekanizmaya bağlı T1DM a, insan vücudundaki insülin miktarı zamanla hızla azaldığından, insülin takviyesi gereklidir. İmmün sistemde beklenmedik bir insülin azalmasının nedeni kendi hücreleri olan beta hücrelerini yok etmesidir (9). Bu tahribatı bulabilmek içinde çeşitli kan testleri (örn. Anti İnsulin Antikor, vb.) yapılmaktadır. Otoimmün hastalık belirteçleri kullanılarak tespitleri yapılır (6,9). İdiyopatik T1DM b, otoimmün belirteçleri bulunmamaktadır (6).

2.1.1. Epidemiyolojisi

T1DM görülme sıklığı ulus, yaş, coğrafik koşullarda yaşam tarzına göre değişiklik göstermektedir.

T1DM, beyaz ırk ülkelerinde daha sık olarak görülmektedir. En yüksek insidansı olan ülke Finlandiya olarak belirlenmiş olup, 15 yaş altı çocuklar da bu oran 37-65/100.000/yıl olarak belirlenmiştir (10). Amerika Birleşik Devletleri'nde ise Meksika asıllı olmayan beyaz ve ergenlik çağında olan çocuklar da insidans oranı 23,6/100.000/yıl olarak belirlenmiş olup, diğer ırksal veya etnik gruplar önemli ölçüde daha düşük yüzdelerle sahiptir (11).

1996 yılında Türkiye'de 19 bölgeyi kapsayan çok merkezli bir araştırma, 15 yaş altı kişilerde DM insidansının yılda 100.000 kişide 2,52 olduğu bulunmuştur (12). 2013-2015 yıllarında Türkiye'nin kuzeybatısında yapılan bir başka çalışmada, 0 ila 17 yaş arası 100.000 kişide 8,99 insidans oranı bulunmuştur. Bu süre zarfında, erkeklerde ortalama 8.98/100.000 ve kızlarda 9.01/100.000 insidans ile 1.773 vaka teşhis edilmiştir (13).

2.1.2. Etiyopatogenezi

Etyolojide 3 çeşit ana unsur vardır. Ana unsurlar; çevresel, otoimmün ve genetik yatkınlık olarak sınıflandırılır.

2.1.2.1. Çevresel Faktörler: T1DM için risk artışında çevresel faktörlerin çeşitli rolleri olduğu bilinmektedir. Bu faktörler içerisinde virüsler, aşular, gıdalar, inek sütü, diyetle alınan besinler, nitratlar ve kimyasal maddeler, D vitamini etkisi ve stres yer almaktadır (14). Yetişkinlik, çocukluk, gebelik ve bebeklik dönemindeki enteroviral enfeksiyonlar, birçok popülasyonda adacık otoimmünite ve T1DM gelişimi ile ilişkilidir.

2.1.2.2. Otoimmün Faktörler: T1DM'de otoimmün süreç kademeli olarak gerçekleşir. β hücrelerinin yok edilmesi, çeşitli çevresel faktörlerin etkisi ve T hücre farklılaşmasının uyarılması sürecin aşamaları olarak adlandırılır. Pankreatik β hücre bileşenlerine karşı, çeşitli spesifik antikorlar tanımlanmıştır. Bunlar arasında insülin, glutamat dekarboksilaz 65 ve 67 izoformları (sırasıyla GAD 65 ve GAD 67) ve tirozin fosfataz benzeri bir alana sahip ve salgılanan protein IA-2 yer alır. Bu oto-antikorlar, doğrudan hasarın nedeninden daha çok otoimmün sürecin belirteçleridir (6). Tanının daha stabil hale gelebilmesi için yeni belirteçler ve yeni yöntemler geliştirilmektedir. Örneğin, Zink Taşıyıcısı 8 antikoru (Znt8) taşıyıcısı yalnızca insan pankreasında bulunur ve adacık hücreleri tarafından insülin salgılanması için önemli bir proteindir (6). Bazı virüs çeşitleri (SARS-CoV-2 gibi) immün sistemi baskılayarak T1DM gibi otoimmün hastalıkların ortaya çıkış riskini arttırabilmektedir (15). Bu enfeksiyonel hastalıkların immün sistemi baskılaması, çevresel ve otoimmün faktörlerin aslında ne kadar yakın bir ilişki de olduğunun göstergesidir.

2.1.2.3. Genetik Faktörler: T1DM'ye yatkınlık sağlayan çeşitli genlerin mevcudiyeti tek başına yeterlilik göstermemektedir. Diğer gen gruplarıyla etkileşimli bir kalıtım yolu izlenmektedir. HLA-DR3 veya DR4 antijenlerinin taşıyıcılarında 2 ila 3 kat artmış T1DM riski bulunurken, HLA-DR2 antijenlerinin taşıyıcılarında T1DM riski bulunmuştur (16). Ek olarak ailedeki DM öyküsünün olması T1DM için önemli bir unsurdur. Annesinde T1DM olan bir çocukta DM olma olasılığı %2, babasında T1DM olanlarda ise bu oran %7, T1DM hastasının kardeşinde bu riskin olasılığı %6'dır (17).

2.1.3. Tanı

T1DM'in tanısının konulmasında birçok parameter göz önünde bulundurulur. Biyokimyasal parametreler ve klasik klinik semptomlar ile tanı konulmaktadır. Ayrıca hastanın anamnezi oldukça değerli bir veridir. DM şüphesi olan hastalar, ağız kuruluğu, sık sık su içmek ve yemek yemek, kilo kaybı, idrar yolu enfeksiyonları gibi semptomlarla

belirti vermektedir. Ergenlerde ve çocuklarda diyabetin tipik semptomları polidipsi, poliüri ve kilo kaybıdır. Eğer tanı gecikirse ve tedavi edilmezse ketoasidoz, koma veya ölüme yol açabilir (11). Metabolik kontrolü değerlendirmek için ve Amerikan Diyabet Derneği (ADA) ve Uluslararası Pediatrik ve Ergen Diyabet Derneği (ISPAD)'nin önerdiği rutin laboratuvar tetkikleri yapılır (18). Diyabet; Oral Glukoz Tolerans Testi (OGTT), Hemogloblin A1c (HbA1c), idrar testleri gibi biyokimyasal testler kullanılarak tanı koyulmaktadır (6). Kontrol için HbA1c değerinin her yaş grubunda %7,5'in altında olması gerekir, ideal olanı %7'nin altında olmasıdır.

DM tanısı koyabilmek için 2010 yılında kriterler güncellenmiştir (19).

▪ Semptomlar (hiperglisemik kriz belirtileri veya tipik hiperglisemi semptomlar) + rastlantısal plazma glukozu ≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/l).

▪ Açlık plazma glukozu ≥ 126 mg/dl (7.0 mmol/l) (en az 8 saatlik açlık gerektirir),

▪ HbA1c > 6.5 ; NGSP sertifikalı laboratuvarında ölçüm yapılmalı,

▪ OGTT'den 2 saat sonra plazma glukozu ≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/l) ve

C-peptit seviyeleri insülinde 5-10 kat daha yüksektir. 8 saatlik açlıktan sonra ölçülür. Endojen insülin seviyelerini yansıtır. Düşük C-peptit seviyeleri T1DM'nin karakteristiğidir. Buna göre; (6,19)

▪ İnsülin (pm)/C-peptit oranı (pm) > 0.1

▪ İnsülin (pm)/kan şekeri oranı > 22 ,

▪ kan şekeri (%mg)/insülin oranı (Mu/ml) < 6 ,

bulunması hastada periferik insülin direncini gösterir.

Ek olarak bazı immünojenik testler, özellikle tip 1 diyabetin klinik öncesi dönemdeki tespiti için yapılmaktadır. Bu testlerdeki amaç, adacık hücrelerine karşı ve insüline karşı gelişmiş antikörlerin tespitine dayanmaktadır. Testler, ICA (Adacık Hücre Antikoru), IAA (İnsülin Otoantikörleri), Anti GAD (Glutamik Asit Dekarboksilaz Antikörleri)'dir (19). Bu otoantikörler için negatif sonuçlar, T1DM teşhisini dışlamaz. T1DM hastalarının akrabalarında veya sağlıklı bireylerde otoantikör varlığı, bu hastalığın gelişimi için önemli bir prognoz değerine sahiptir. Pozitif sonuç veren antikör sayısı arttıkça T1DM olma ihtimali o kadar yükselmektedir.

2.1.4. Tedavi

T1DM'in henüz bir tedavisi mevcut değildir. Tedavi yerine, eksik olan insülinin yerine konulması ve glukoz dengesinin sağlanabilmesi için dışarıdan bir enjeksiyon yardımıyla insulin enjekte edilip glukoz seviyesi normal düzeye getirilmektedir (6). Bununla birlikte T1DM hastalarının düzenli beslenmeleri ve düzenli egzersiz yapmaları gereklidir. DM beslenmesinde karbonhidratların tüketimi önemlidir ve karbonhidrat içeriğinin %70'inin nişasta gibi kompleks bileşiklerden oluşması önerilmektedir. Şekerden kaçınılmalı ve protein yemeklerinde kalori hesaplaması yaparak tüketilmesi uygundur (20). Aynı zamanda egzersiz yapmak metabolizmayı düzeltir, glikozun metabolizmada kullanımını artır ve hasta kendini daha iyi hisseder. Egzersiz yaparak insülinin enjeksiyon yerinden emiliminin artması da sağlanır.

DH aşuları, yeni bir terapötik strateji olarak görülmektedir. DH tabanlı immünoterapi güvenlidir. Kanser hastalarının uzun süreli hayatta kalması için anti tümörleri aktive edebilir.

Alternatif tedaviler arasında pankreas nakli, pankreas adacık hücresi nakli ve kök hücre nakli yer alır. Pankreas nakli seçeneğinden sonra insülin gerekmez (16). Ancak organ reddini önlemek için immünosupresif ilaçların kullanımı gereklidir ve bu ilaçların yan etkileri oldukça tehlikelidir. Pankreas adacık hücre nakli. Bu, pankreas adacıklarına β -hücre nakli işlemidir. Bu durumda insülinsiz geçirilebilecek sürenin sınırlı olduğu bilinmektedir. Kök hücre naklinde hastanın kendi kanından elde edilen kök hücreler kullanılmaktadır. Önemli riskler taşır, ancak uygulanabilir olarak kabul edilir (16, 21).

2.2. T1DM'İN DENDRİTİK HÜCRELER İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

T1DM, pankreası hedef alan viral enfeksiyonların bir sonucu olarak veya pankreasın yeniden şekillenmesinden sonra ortaya çıkan bir hastalıktır. Hücrelerin kendine saldırılarında, β -hücre ölümü, kendi antijenlerinin salınması ve TNF- α ve IL-12 gibi inflamatuvar sitokinlerin indüklenmesi ile sonuçlanır (22).

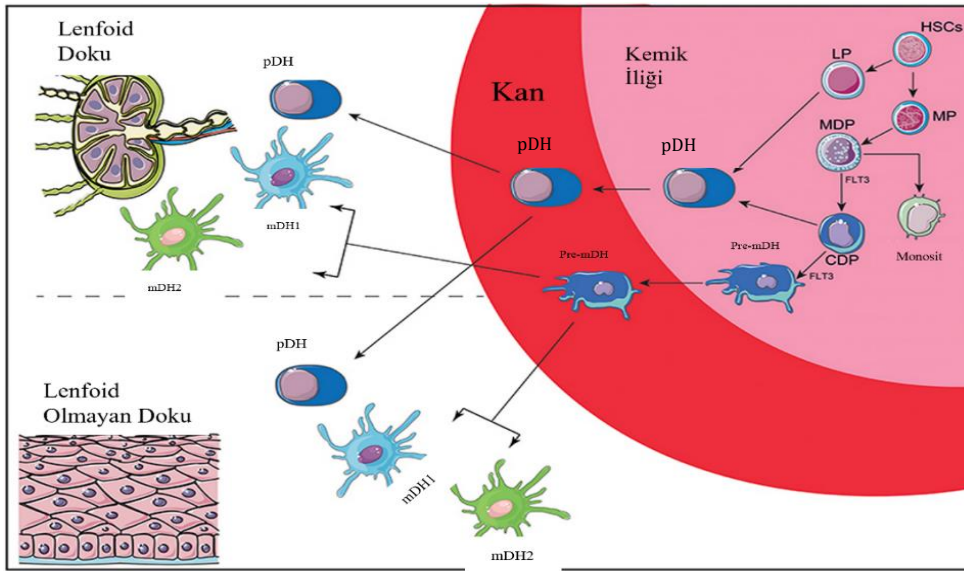
DH'ler, bağışıklık sisteminin patojenleri tanıma, yanıt verme ve ayrıca bağışıklık yanıtlarını düzenleme becerisinde kritik bir rol oynayan özel bir bağışıklık hücresi türüdür. Antijenleri yakalamak ve diğer bağışıklık hücrelerine sunmak için kullanılan ağaç benzeri çıkıntıları nedeniyle "dendritik" olarak adlandırılırlar. Antijen yakalama, antijen sunma, T hücre aktivasyonu, bağışıklık düzenlemesi, doğal bağışıklık aktivasyonu

(örnek, patojen-ilişkili moleküler motifler), kanser immünoterapiler DH'lerin temel işlevleri ve özellikleridir (23).

DH, cilt, mukozal yüzeyler ve lenf düğümleri gibi çeşitli dokularda bulunan farklı alt kümelere sahip çeşitli bir gruptur. Her alt kümenin benzersiz işlevleri mevcut ve bağışıklık yanıtlarında farklı rollere sahiptir. Bulunduğu yerlerine göre aldığı adlandırmalar da değişmektedir. Örneğin bulunma yeri deri ise Langerhans DH adını alır.

DH'lerin gelişimi, kemik iliği ve diğer hematopoietik dokulardaki öncü hücrelerden karmaşık bir farklılaşma ve olgunlaşma sürecini içerir (Şekil 2.1). Hematopoietik kök hücre farklılaşması ile DH, kemik iliğindeki hematopoietik kök hücrelerden (HSC'ler) türetilir. HSC'ler, çeşitli kan hücresi türlerine yol açabilen multipotent hücrelerdir. Spesifik büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin etkisi altında, HSC'ler ortak miyeloid progenitörlere (CMP'ler) ve ortak lenfoid progenitörlere (CLP'ler) farklılaşır. Miyeloid progenitör farklılaşmasında ise, ortak miyeloid progenitörler (CMP'ler), ayrıca ortak dendritik hücre progenitörleri (CDP'ler) olarak da bilinen DH öncülerine farklılaşır. Bu CDP'ler, DH'lerin birden çok alt kümesine farklılaşma potansiyelini korur. Dendritik hücre soyuna bağlılıkta, DH öncüleri, spesifik transkripsiyon faktörlerinin ve mikro-çevresel sinyallerin etkisi altında dendritik hücre soyuna bağlanır. Bu öncüler, dendritik hücrelerle ilişkili belirteçleri ifade eder. Buradan da periferik dokulara göç gerçekleşir. Bu göçte, olgunlaşmamış DH'ler kemik iliğini terk eder ve kan dolaşımı yoluyla periferik dokulara göç eder. Deri, mukozal yüzeyler, lenf düğümleri ve dalak dahil olmak üzere çeşitli dokularda bulunabilirler. Olgunlaşmamış dendritik hücreler, periferik dokularda, dendritik hücreler başlangıçta olgunlaşmamış durumdadır. Patojenleri tanıyan örüntü tanıma reseptörleri (PRR'ler) gibi çeşitli reseptörler aracılığıyla yüksek antijen yakalama kapasitesine sahiptirler. Antijenlerin yakalanması ve olgunlaştırma sırasında DH'ler, çevrelerinden patojen fragmanları veya hücre kalıntıları gibi antijenleri yakalar. Antijenlerle karşılaştıklarında olgunlaşma sürecinden geçerler. Bu da yardımcı uyarıcı moleküllerin (CD80, CD86), majör histokompatibilite kompleksi (MHC) moleküllerinin yukarı regülasyonunu ve ikincil lenfoid organlara göçünü içerir. Periferik dokulardaki göç işleminden sonraki diğer bir göç lenf düğümlerindedir. Olgun DH'ler, yakalanan antijenleri T hücrelerine sundukları lenf düğümleri gibi ikincil lenfoid organlara göç eder. Bu etkileşim, adaptif immün yanıtları başlatmak için çok önemlidir. Yanıtların başlatılmasında DH'ler, MHC

moleküllerini kullanarak işlenmiş antijenleri T hücrelerine sunar. Bu etkileşim, T hücrelerini aktive ederek, karşılaşılan spesifik antijene göre uyarlanmış bağışıklık tepkilerine yol açar. Böylelikle DH'ler, bağışıklık yanıtın düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynar. Bağlanmaları ve aldıkları sinyallere bağlı olarak, T hücresi aktivasyonunu, toleransını veya hafıza tepkilerini indükleyebilirler. Genel olarak, dendritik hücrelerin gelişimi, bağışıklık sisteminin düzgün çalışmasını sağlamak için sıkı bir şekilde düzenlenir. Dendritik hücrelerin farklı alt kümeleri, çeşitli patojenlere ve antijenlere karşı bağışıklık tepkilerini şekillendirmede farklı rollere sahip olabilir (22,24).



Şekil 2.1: DH'lerin gelişimi (24)

HSC: hematopoietic stem cell, LP: Lenfoid progenitör, MP: miyeloid pregenitör, CDP: common DC progenitors, pDH: plazmastoid dendritik hücre, mDH: miyeloid dendritik hücre

DH'ler ASH olarak işlev görür ve immün sisteme yardımcı hücrelerdir. Antijen işleme ve T hücrelerine sunma ile ilgilidirler. Birincil T hücresine bağımlı bağışıklık tepkilerinin üretilmesinde en etkili hücrelerdir. Dendritik hücreler çok az fagositik aktiviteye sahiptir veya hiç yoktur. Sınıf I ve sınıf II MHC moleküllerini ifade ederler, az pinositotik ve ATPaz aktivitelerine sahiptirler. Ancak peroksidaz aktivitesi yoktur ve hareketli olabilirler (15). Aynı zamanda, naif T hücrelerini aktive etmekte ve kendi kendine toleransı sürdürülmesinde kilit bir rol oynarlar. Bu sebepten T1DM otoimmün yanıtın tüm aşamalarında önemli bir rol oynar. Otoimmünitenin, immün sistemdeki

rolüne bakıldığında B hücreleri, T hücreleri, doğal öldürücü hücreler, dendritik hücreler, monosit-makrofaj bağlantıları bağlantıları yer almaktadır.

Pankreatik dendritik hücreler, salınan β hücre türevli antijenleri alır, drenaj yapan lenf düğümlerine (LN'ler) göç eder ve naif adacığa özgü CD4 ve CD8 T hücrelerini aktive ederler. DH'ler tarafından T hücrelerine iletilen sinyallere bağlı olarak T hücreleri, T yardımcı 1 (Th 1) hücreleri gibi enflamatuar efektör hücrelere, anti-enflamatuar Th2 veya düzenleyici (Treg) hücrelere farklılaşır. Aktive edilmiş adacığa özgü T hücreleri daha sonra pankreasa göç eder. Göç eden hücreler, pankreas adacıklarının etrafına sızar ve kümelenme yapar. Bu erken sızıntılarda Th2 ve Treg hücrelerinin hakimiyeti mevcuttur. Sonunda, sızıntı invaziv hale gelir ve β -hücrelerini işgal etmeye ve yok etmeye başlar, düzenleyici ve inflammatuar T-hücresi popülasyonları arasındaki dengeyi bozar. Hem kendi içerisindeki tolerans kaybına hem de invaziv insülit gelişimine neden olan kesin faktörler tam olarak anlaşılammıştır (25). Yoğun ağlar oluşturan periferik dokularda bulunurlar ve toll benzeri reseptörler (TLR'ler) gibi patojen tanıma reseptörlerini ifade ederler. Patojenlere yanıt verme yetenekleri sayesinde bağışıklık sisteminin bekçileri olarak işlev görürler.

Özetle DH'lerin işlevi, antijen tanıma ve işlemedir. Patojenlerle etkileşime girdikten sonra DH'ler aktive olur, olgunlaşır ve bölgesel lenf düğümlerine göç eder. Bu olgunlaşma MHC, CD80 ve CD86 ekspresyonunu artırır, endositozu azaltır ve kemokin reseptörlerinin ekspresyon paternini değiştirir. Drenaj lenf düğümlerinin T hücre alanına giren olgun DH'ler, saf T hücrelerine antijen sunmak için hazırlanır. Patojenlerin yokluğunda bile, periferik direnci korumak için gerekli olan, periferden lenf düğümlerine kadar DH'lerin kararlı durum göçü vardır (26).

İki ana DH sınıfı vardır: plazmasitoid DH (pDH) ve miyeloid DH (mDH).

2.2.1. Plazmasitoid DH

pDH, doğuştan gelen bağışıklık tepkisinin üyelerindedir, kanda dolaşırlar ve periferik lenfoid organlarda bulunurlar. pDH, insanlarda CD303 (BDCA-2), CD123 (IL-3R) ve CD304 (BDCA-4; neuropilin) yüzey belirteçlerini bulundurur (27).

İnsan pDH'leri CD45RA⁺, CD141 (BDCA-3) sönük, CD1c (BDCA-1) ve CD2 olarak tanımlanır. Soy belirteçlerinin (Lin) (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56)

ifadesinden yoksundurlar ve CD13 ve CD33 gibi miyeloid belirteçleri de ifade etmezler (28).

pDH'ler yüksek seviyelerde tip I IFN üretebilir. Periferik kanda, timusta ve birçok lenfoid dokuda bulunurlar (Şekil 2.1). pDH, plazmasitik bir morfoloji sergiler.

Bol miktarda endoplazmik retikulum, CD4'e ve yüksek CD123 ifade etme içeriğine sahiptirler. Büyük miktarlarda IFN- α salgırlar, ancak IL-12 salgılamazlar. Antijenleri yakalama yeteneği zayıftır. Aktivasyon üzerine, karakteristik mDH benzeri fonksiyonlar (MHC sınıf II ekspresyonu) sergilerler, ancak naif T hücrelerini daha az uyarabilirler (27).

Tüm hücre grafiklerinde CD11c varlığı DH alt gruplarını belirleme de önemlidir. Aslında CD11c ekspresyonu, birkaç makrofaj popülasyonunda, özellikle de akciğer ve bağırsak makrofajlarında, mDH öncüllerinde ve diğer lökositlerde belirgindir (27).

2.2.2. Miyeloid DH

mDH'ler yüksek fagositik aktiviteli ASH'lerdir. Görevi, yüksek oranda sitokin salgılamaktır. Bu hücreler dolaşım içerisinde döngü halindedir. Kanda dolaşarak lenfoid ve lenfoid olmayan dokulara farklılaşır. Lenf düğümlerinde T hücre cevaplarını regüle ederler ve çok miktarda IL-12 üretilen naif T hücrelerini Th1'e yönlendirilmesinden görevlidir (24). İki ana alt grubu vardır; mDH1 ve mDH2.

İnsan mDH1 alt popülasyonu kanda, lenfoid ve lenfoid olmayan dokularda bulunur (Şekil 2.1). Bu alt popülasyon, CD141 (BDCA3), kemokin reseptörü XCR1, C-tipi lektin CLEC9A, hücre adezyon molekülü CADM1'in ifadesi ile karakterize edilir. İnterlökin 12, tip I ve tip III interferonları salgıladıkları bilinmektedir ve Th1 yardımcı T hücrelerini ve doğal öldürücü tepkileri uyardıkları düşünülmektedir (24). CD11c sönük, CD123⁻, CD1c (BDCA-1)⁻ 'dir ve CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 veya CD56 gibi soy işaretleyicilerini ifade etmez. CD13 ve CD33 dahil miyeloid belirteçleri eksprese ederler ve görünüş olarak monositiktirler (29).

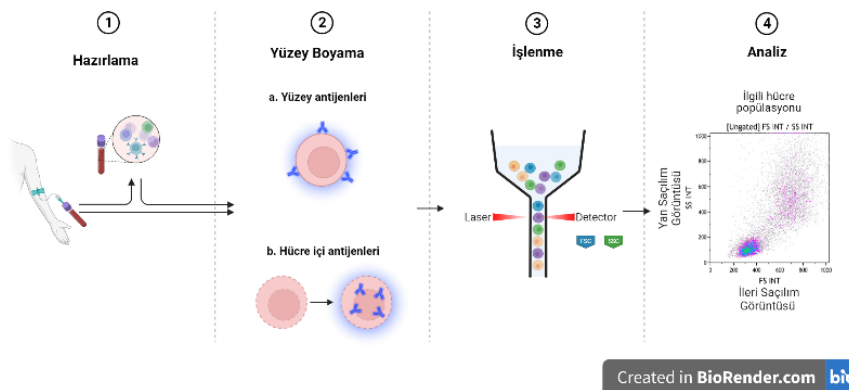
Yaygın olarak bahsedilen mDH2 işaretleri CD1c, CD207, ITGAM, SIRP α 'dır. Doğuştan gelen bağışıklık tepkilerini kontrol eden Toll benzeri reseptörler ve lektinler gibi geniş bir örüntü tanıma reseptörü repertuarını ifade ederler. Th2 ve Th17 T yardımcı hücre yanıtını uyardıkları gösterilmiştir ve CD4⁺ T hücre yanıtını uyardırma rol oynadıkları düşünülmektedir (24). CD1c antijeni spesifik olarak CD11c yüksek ve

CD123 düşük DH'lerde eksprese edilir. CD1c⁺ mDH'ler monositik morfolojiye sahiptir. CD13 ve CD33 gibi miyeloid belirteçlerin yanı sıra CD32, CD64 ve FcεRI gibi Fc reseptörlerini de eksprese eder. Ayrıca bunlar Lin (CD3, CD16, CD19, CD20, CD56)⁻, CD2⁺, CD45RO⁺, CD141 (BDCA-3) düşük, CD303 (BDCA-2)⁻ ve CD304 (BDCA-4/Neuropilin-1)⁻ 'dir (29).

Kandaki türleri dışında lenfoid olmayan dokularda yer alan DH'lerdeki mDH'ler, organa bağlı olarak doku hücrelerinin %1-5'ini temsil eder ve iki alt kümeden oluşur: CD103⁺ CD11b⁻ ve CD11b⁺ mDH'ler (30).

2.2.3. Akan Hücre Ölçer

Hücrelerin tiplendirilmesinde ve hücrelerin var ya da yok olduğunun tayin edilmesinde kullanılan en hassas inceleme yöntemlerinden biri immünofenotiplemedir. Akan hücre ölçer ile hücrelerin tayini ve tiplendirmesi yapılmaktadır. Spesifik bağışıklık sistemi hastalıklarında (örneğin, lenfoma/lösemi hastalıkları) tanıya yardımcı olması amacıyla kullanılan bir cihazdır. Akan hücre ölçer mekanizması, floresan yoğunluğunun bir fonksiyonu olarak asılı hücrelerin boyutuna ve taneciklerine dayalı olarak hücre sayısının kantitatif olarak ölçen bir sistemdir (31). Süspansiyon halindeki hücreler hava basıncıyla sıvının içine itilir. Çok hızlı sıvı akışı, hücreleri kuvars benzeri akış odasına zorlayan yüksek hidrostatik basınç oluşturur. Bu kabinin geometrisi ve sıvının laminer akışı, hücrelerin lazer kaynağının önünden tek sıra halinde geçişini sağlar (Şekil 2.2) (32).



Şekil 2.2: Akan hücre ölçer diagramı

Hücrelerin sistemde analizi için ileri saçılma (FS) dedektörleri, yan saçılma dedektörleri (SS) ve floresan dedektörleri (FL-1, FL-2, FL-3, vb.) mevcuttur. FS grafiği yaklaşık boyutu hakkında bilgi sağlarken, SS grafiği granülerliği, floresan modeli (belirli bir dalga boyu için spesifik yoğunluk) ve yaklaşık floresan artışı hakkında bilgi sağlar. Bu spesifik bağlanmalarda yüzey antijenlerinin tanımlamasında rol oynayan diğer bir terim başkalaşım kümesi (Cluster of Differentiation=CD)'dir. CD molekülleri, yalnızca bir hücre veya hücre soyu için spesifikte olabilir de olmayabilir de. Bu durum antikor antijen bağlanmasına bağlı bir süreçtir. Firmaların, belirteçler ile ilgili resmi listelerinde, her birkaç yılda bir eklenen 400'den fazla bireysel ve benzersiz belirteç tanımlamıştır (33).

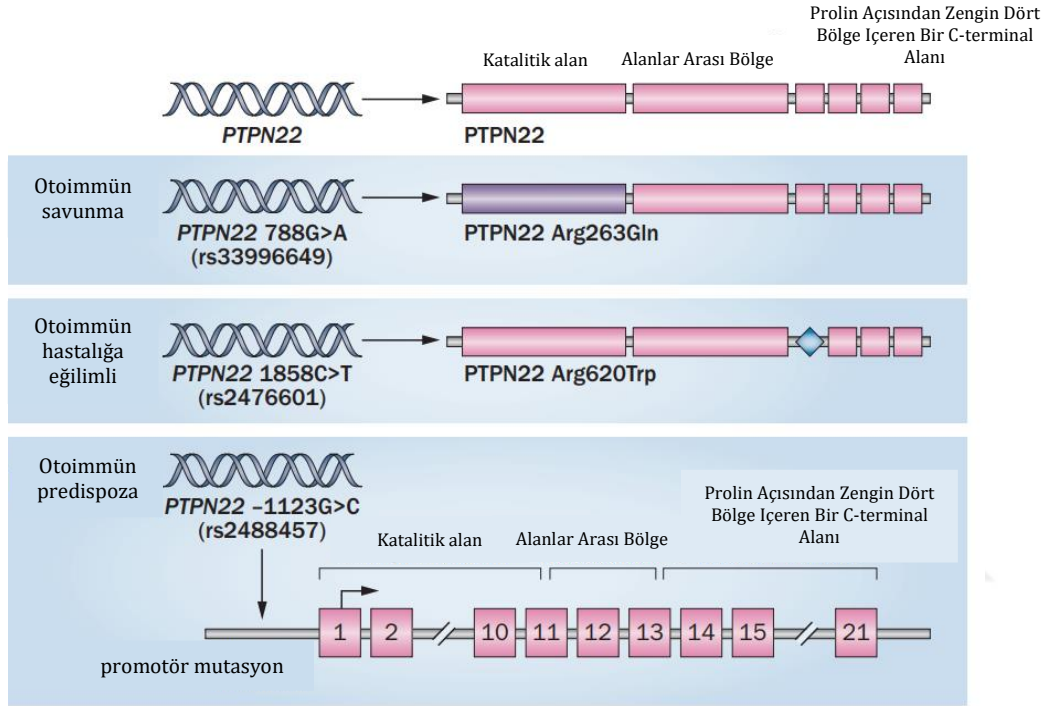
Floresan Eksi Bir (FMO) kontrolleri, çok renkli immünofloresan deneylerinde arka plan floresansı ile pozitif popülasyonlar arasındaki kesme noktasını belirlemek için kullanılır (34). Her tüpe ekspresyon seviyesinin yüksek olduğu bilinen bir antikor boyası konur ve her renk kanalında (FITC, PE, PC5, PC7, APC, APC-A700, APC-A750) sırasıyla eksiltme yapılarak yüzey boyama protokolü uygulanır. Böylelikle FMO, boyama sorunlarını, pozitif/negatif sınırlarını tanımlamada yardımcı olacaktır.

2.3. T1DM İLE *PTPN22* GENİ İLİŞKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

T1DM hastalığı, hem genetik hem de çevresel koşullara bağlı olarak gelişen multifaktöriyel bir hastalıktır. Hastalığın etiyolojisinde bir veya daha fazla genin kesin ilişkisi bildirilmemekle birlikte, farklı genlerdeki polimorfik varyantların muhtemelen hastalığın gelişimine katkıda bulunduğu bilinmektedir (35). T1DM'de, genel olarak insan lökosit antijenleri (*HLA DR, DQ* genleri gibi) ve bazı insulin ilişkili gen bölgeleri (örn. *INS, CTLA-4, PTPN22*) çalışılmıştır.

PTPN22 (OMIM*600716) (36), protein tirozin fosfatazları (PTP'ler) kodlayan bir gen ailesine aittir. Bu gendeki missense SNP R620W varyantının T1DM ile ilişkisi bildirilmiştir (OMIM %222100) (37). PTP'ler, hücre içi proteinlerdeki tirozin kalıntılarından fosfat gruplarını çıkararak tirozin fosforilasyonuna dayalı hücre sinyallemesinin düzenleyicileri olarak işlev görür (38). PTP'ler, fosfat gruplarının tirozin kalıntılarına bağlanmasını katalize eden protein tirozin kinazların doğal benzerleridir. *PTPN22*, yalnızca hematopoietik hücreler tarafından eksprese edilen reseptör olmayan bir PTP'yi kodlar. *PTPN22*, bir N-terminal PTP katalitik alanı, etki alanları arası bölge ve diğer proteinlerle etkileşim için motifler olarak işlev gören prolin açısından zengin dört bölgeye sahip bir C-terminal alanı dahil olmak üzere üç alan içerir (Şekil 2.3). Otoimmün

ilişkili SNP *PTPN22* 1858C>T, *PTPN22* proteininin prolin açısından zengin birinci motifinin 620. amino asidinde (Arg620Trp) bir arginin-triptofan değişimini kodlar (39). *PTPN22*, bağışıklık hücresi sinyallemesini düzenlemede ikili bir role sahiptir (40). *PTPN22* tarafından kodlanan proteinler, hem T hem de B hücrelerini düzenleyerek adaptif ve bağışıklık sistemlerinde önemli bir rol oynar.

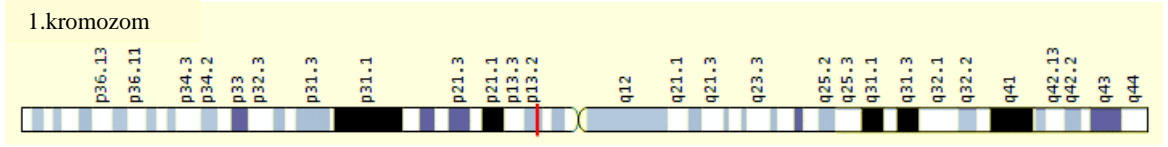


Şekil 2.3: İnsan *PTPN22* mutanları.

PTPN22, bir N-terminal katalitik alanı, bir alanlar arası bölge ve prolin açısından zengin dört bölge içeren bir C-terminal alanı olan bir tirozin fosfatazı kodlar. *PTPN22* geni içindeki birkaç SNP, otoimmün hastalıklarla ilişkilidir. Otoimmün savunma ile ilişkili 788G>A SNP (rs33996649), *PTPN22*'nin (mor) katalitik alanında bir Arg263Gln ikamesine neden olur. Otoimmün hastalığa eğilim ile ilişkili 1858C>T SNP (rs2476601), prolin açısından zengin ilk motifte (mavi dörtgen) bir Arg620Trp ikamesine neden olur. Otoimmün predispozan SNP -1123G>C (rs2488457), *PTPN22* geninin promotör bölgesinde bulunur (38).

PTPN22 geni, 1p13.3-p13.1 kromozomu üzerinde bulunmaktadır (Şekil 2.4). Lenfoid tirozin fosfataz (LYP), T lenfositlerinin aktivasyonu ve proliferasyonunun önemli bir inhibisyonudur. Oluşan bazı değişiklikler LYP ve C-Terminal Src Kinaz (Csk) kinaz ilişkisini bozar ve T hücre aktivasyonu artar. *PTPN22* geninin en yaygın

polimorfizmi, kodon 620'nin 1858 pozisyonundaki C/T arginin/triptofan değişimini bölgesindeki R620W'dir (rs2476601) (41).



şekil 2.4: İnsan *PTPN22* gen lokasyonu

Adaptif bağışıklık sisteminde *PTPN22*, T hücresi reseptörünün (TCR) aşağı akış sinyalinini kısıtlayarak T hücresi aktivasyonunu inhibe eder. Buna karşılık, doğal bağışıklık sisteminde *PTPN22*, model tanıma reseptörlerinden aşağı akış sinyalinini artırarak tip 1 miyeloid hücrelerde interferon üretimini seçici olarak arttırılmasına sebep olur (41).

T1DM etiyolojisinin anlaşılmasına katkı sağlayacak moleküler mekanizmaların aydınlanması amacıyla hem T1DM ile ilişkisi gösterilen hem de bağışıklık sisteminde rolü olan *PTPN22* geni seçilmiş, bu gende tanınlanan R620W polimorfik varyantının analizi kantitatif reverse transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle (RT-qPCR) yapılmaktadır.

2.3.1. Kantitatif Reverse Transkripsiyon PCR

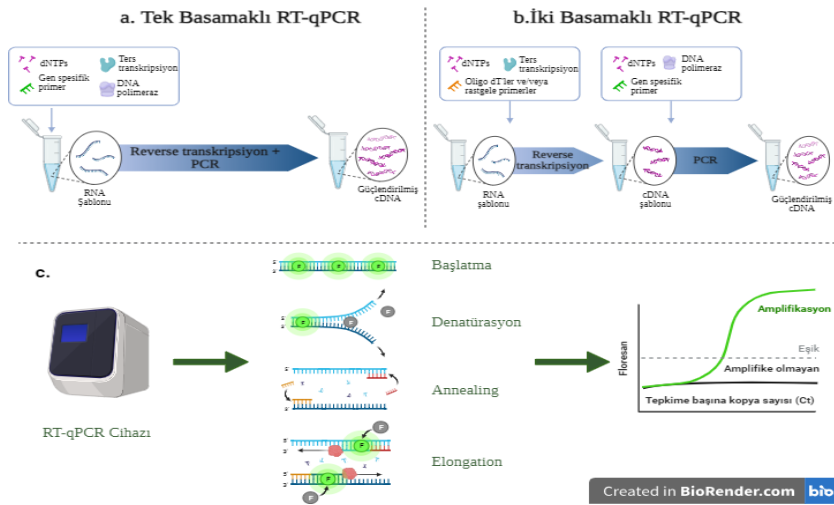
RT-qPCR, izole edilmiş RNA moleküllerinin reverse transkriptaz enzimi yardımıyla tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezini gerçekleştirmesi sonucu, gen ekspresyonu analizlerinin yapılabildiği hızlı ve hassas bir yöntemdir. Bu analizde, "SYBR Green I" olarak adlandırılan özel bir flokrom boyası kullanılır. SYBR Green I çift sarmallı DNA'ya non-spesifik olarak bağlanır. Ortaya çıkan DNA-boya kompleksi en iyi 497 nanometre mavi ışığı emer ve en iyi 520 nanometre yeşil ışık yayar. Bu ışıma gerçek zamanlı PCR cihazının optik sistemi tarafından tespit edilir. Bir qPCR reaksiyonunda, primerler ve DNA polimeraz, şablon sarmalı çoğaltırken, SYBR Green I de çift sarmallı DNA'ya oluştuğu sırada bağlanır. Bu nedenle aynı reaksiyonda birden fazla hedef genin eşzamanlı analizine izin vermez. Primer-dimerler ve spesifik olmayan amplifikasyon durumunda da floresans yayılabilir. Bu da, yapının özgülük oluşumu açısından istenmeyen bir durumdur. Çift sarmallı DNA'da, her bölgenin özgül bir erime

sıcaklığı vardır ve istenen bölge için bir erime eğrisi analizi gerçekleştirilir. PCR amplifikasyonundan sonra sıcaklık kademeli olarak artırılır ve belirli zaman aralıklarında kuyucuktaki floresan miktarı kaydedilir. Çift sarmallı DNA şeritleri ayrılmaya başladığında, floresan radyasyon miktarını azaltan bir boya (SYBR Green I) salınır (42). Erime sıcaklığı, bir erime eğrisi kullanılarak hesaplanır. Hasta numuneleri ve kontrol numuneleri kıyası yapılır. Erime sıcaklıkları aynı ise, ilgilenilen bölgenin amplifiye olduğu belirlenir. Farklıysa, amplifikasyonun spesifik olmayan ürünlere ait olduğu tespit edilir.

RT-qPCR yönteminde farklı iki genel adım mevcuttur: tek adımlı RT-qPCR ve iki adımlı RT-qPCR. Her iki durumda da, önce RNA izolasyonu yapılır sonrasında da cDNA'ya ters kopyalanır ve bu daha sonra qPCR amplifikasyonu için şablon olarak kullanılır.

Tek adımlı RT-qPCR'de, cDNA sentezi ve qPCR, ortak bir tamponda aynı reaksiyon kabında gerçekleştirilir (Şekil 2.3 a kısmı). Gene özgü primerler, belirli bir hedefin cDNA sentezini ve amplifikasyonunu yönlendirir. İki adımlı RT-qPCR'de cDNA sentezi rastgele heksamerler, oligo-dT primerleri ve/veya gene özgü primerler kullanılarak gerçekleştirilir (Şekil 2.3 b kısmı). Rastgele heksamerler veya oligo-dT primerleri kullanılan reaksiyonlar, numunedeki çeşitli RNA türlerinin bir karışımı olan cDNA'yı üretir (42,43).

2.3.1.1. RT-qPCR Adımları: Şekil 2.3 c kısmında gösterimiştir.



Şekil 2.5: RT-qPCR aşamaları

Denaturasyon (DNA Zincirinin Açılması): Kalıp DNA, 92-95 derecede 1-2 dk. tutularak çift sarmal yapıdaki DNA iplikçikleri birbirlerinden ayrılmaktadır. Bazen ön ısıtma yapılarak cihaz hazır hale getirilebilir (43).

Annealing (Primerlerin Açılan DNA Zincirlerine Bağlanması): Reaksiyon sıcaklığının, 37-65 °C düşürülerek oligonükleotid primerlerinin açılan DNA zincirlerinin kendi baz dizilerine karşılık gelen bölgeye yapışması işlemidir. Bu işlem, üretilen baz uzunluğuna bağlı olarak saniyede gerçekleşmektedir (43).

Elongation (Primer Uzaması): DNA zincirleri üzerine yapışan primerlerin DNA polimeraz enzimi (Taq DNA polimerase) vasıtasıyla uzatılmasıdır. Taq DNA polimeraz 72 °C sıcaklıkta daha iyi çalıştığı için genel olarak tüm çoğaltma işlemleri bu sıcaklıkta yapılmaktadır (43).

Başlangıçtaki DNA molekülünün baz sayısı, PCR'ın kaç döngüde uygulanacağını belirler. DNA molekülü 1-100 kopya ile başlıyorsa 20-30 döngü, 1.000-100.000 kopya ile başlıyorsa 30-45 döngü olur. Bir döngüde, n sayıda olan DNA zincirinin sayısı 2n'ye çıkar. Döngü art arda birçok kez tekrarlandığından, her döngünün ürünü bir sonraki döngü için şablon olarak kullanılır ve her döngüde gereken DNA fragmanı miktarı iki katına çıkar (43).

2.3.2. Primer Dizaynı

PCR işlemine başlamadan önce primer dizaynının yapılması gereklidir. Primerler, istenen gen bölgesinin çoğaltılması için kullanılan o bölgeye özgü oligonükleotitlerdir. Optimum 18-24 baz dizisi (bp) olacak şekilde ve belli kurallara göre dizayn edilmelidir. Düşük bp primerin özgülüğü azalır, yükseltirse de primerin kalıp DNA'ya bağlanması zorlaşır. Bu yüzden kurallara uygun ve dikkatli bir biçimde dizayn edilmesi önemlidir.

Kanonik bölgelere uyumlu olan primer dizileri tercih edilir. Polimorfik bölgelerden kaçınılmalıdır, aksi halde bağlanma zorlaşır. Gene spesifik olan primer dizileri, 180-200 bp arasında bir ampikon ürünü oluşturulması için uygundur (44).

Primer dizaynı için NCBI sayfasından gen sekmesi seçilip *PTPN22* insan seçimi ile yönergelere uygun ilerlenir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tezin bu kısmı, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP) desteği ile gerçekleştirilmiştir (Proje No: 2022/088). Gönüllüler ile yapılan bu tez çalışmasında her hastaya onam formu verilmiş olup toplanan numuneler, Helsinki Etik Bildirgesi'ne uygun koşullarda toplanmış ve çalışılmıştır. Etik Kurul onayı EK-1'de yer almaktadır (Etik Kurul Kodu: 2021/398).

3.1. HASTA SEÇİM KRİTERLERİ

18 yaşından büyük onam verebilecek gönüllülerden numuneleri alınmıştır. Toplam 39 hasta toplanılmıştır.

- Tanı koyulalı 5 yılın altında olan yeni tanılı Tip 1 diyabetli hastalar (n=13),
- Tanı koyulalı en az 5 yıl olan Tip 1 diyabetli hastalar (≥ 5 yıl) (n=18),
- Sağlıklı gönüllüler (n=8).

Gönüllülerden kriterlere uygun biçimde toplanan kanlar mor kapaklı EDTA K2 3 mL tüplere alınmıştır. EDTA'lı tüplerden HbA1c, C-Peptid testleri istenmiştir. İmmünoanaliz ve RT-qPCR aşamalarında kullanılmak üzere, hastalardan 10 ml kan alınmıştır. Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nin Diyabet kliniği ve Dahiliye kliniği ile koordineli bir biçimde, İleri Analiz Laboratuvarı'nda hastaların bilgileri ve numuneleri toplanmış ve saklanmıştır.

3.2. KULLANILAN MALZEMELER

3.2.1. Kimyasallar

- Beckman Coulter IsoFlow S1V1S1
- Beckman Coulter OptiLyse C- Eritrosit Parçalama Solüsyonu
- BeckmanCoulter- HLA-DR (PB), CD141 (FITC), CD11c (PE), CD1c (PC5), CD123 (APC-A700)
- BioLegend-CD303 (PC7), CD304 (APC-A750), LINAEGE (APC)
- Roche Cobas 8000 E602-C-peptid

- Arkray-Adams™ A1C Eluent 80A
- Arkray-Adams™ A1C Eluent 80B
- Arkray-Adams™ A1C Eluent 80CV
- Archem Diagnosis-Adams™ A1C Hemolysis Washing Solyution 80H
- DNA/RNA Shield™ Toplama Tüpü
- Quick-DNA/RNA™ Miniprep Plus Kit
- Proteinase K
- DNase 1 Uygulaması
- Etanol (%100)
- İzoproponal
- ZymoTaq™ PreMix- Taq Karışımı
- SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit
- SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit
- Sentebiolab- *PTPN22* genine özel ileri-geri primer dizileri
- Sentebiolab- *GADPH* genine özel ileri-geri primer dizileri
- 1X TAE tamponu
- Meridian Agarose BIO-41026 – Agaroz jel
- DNA Ladder Solüsyonu- Agaroz jeldeki bantlar

3.2.2. Araç ve Gereçler

- Labcon Superclear® Kültür Tüpleri
- Naive NF1200R-Soğuk santrifüj cihazı
- BeckmanCoulter Navios 10C – İmmüfenotipleme Cihazı
- ARKRAY ADAMS A1c HA-8180V
- Roche Cobas 8000-REF-03184919190, C-Peptide CalSet
- Roche Cobas 8000-REF- 05341787190, PreciControl Multimarker

- Roche Cobas 8000-REF- 03609987190, Diluent MultiAssay
- Frontier 5513-Santrifüj Cihazı
- Bio-Rad T100 Thermal Cycler-PCR cihazı
- Roche-LightCycler® 480 II -qPCR Cihazı
- Allsheng Nano400A Micro-Spectrophotometer-Nanodrop Cihazı
- Neuation-Vorteks cihazı
- BIO-RAD Elektroforez Tankı-Agaroz jel yürütme cihazı
- BIO-RAD GelDoc Go Imaging System-Agaroz jel görüntüleme
- Ohaus-1-10µl otomatik mikropipet
- Ohaus-1-10µl otomatik mikropipet
- Eppendorf-100µl-1000µl otomatik mikropipet
- Spin-Away™ Filtreli Kolon
- Zymo-Spin™ IIICG Kolon
- LightCycler® 480 II Uyumlu mikroplaka ve yapışkanlı folyo
- Microcult Mikro-santrifüj tüp- 1.5 ml ependorf tüpler
- 0.2 ml PCR ependorflar tüpler
- 1 L Beher

3.3. BİYOKİMYASAL ÖLÇÜMLER

Biyokimyasal ölçümlerden HbA1c Arkray-Adams™ A1C Eluent 80A cihazında, C-Peptid ise Roche Cobas 8000 E602-C-peptid cihazında Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nin Biyokimya Laboratuvarı'nda çalışılmıştır.

Tablo 3.1: İstenilen ölçümlerin adları ve cihazlarının referans aralıkları

ÖLÇÜM ADI	REFERANS ARALIĞI
HbA1c	4-6 %
C-Peptid	370-1470 pmol/L

3.4. İMMÜNFENOTİPLEME ÇALIŞMASI

3.4.1. Yüzey Boyama Protokolü

- Beckman Coulter Navios-10C cihazına uygun biçimde kanallar ve flokromlar seçildi.
- Akan hücre ölçer tüpüne işaretli monoklonal antikorlar firmanın önerdiği μl ile başlanılarak titrasyon yapıldı. Optimize edildikten sonra her antikor için uygun miktarlarda kondu (CD141 (FITC) 6 μl , CD11c (PE) 4 μl , CD1c (PC5) 5 μl , CD303 (PC7) 5 μl , LINAEGE (APC) 4 μl , CD123 (APC-A700) 5 μl , CD304 (APC-A750) 5 μl , HLA-DR (PB) 4 μl) ve üzerlerine 100 μl kan eklendikten sonra 15 dk. oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe edildi (Tablo 3.1).
 - Üzerlerine 0.5ml Optilyse C sıvısı kondu ve vortex yapıldıktan sonra 10 dk. oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe edildi.
 - 0.5 ml akış sıvısı eklendikten sonra ve vortex yapıldı. Sonra 10 dk. oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe edildi.
 - İnkübasyon sonrasında 2600 rpm 5 dk. santrifüj yapıldı.
 - Üstteki sıvı atıldıktan sonra, kalan hücrelerine üzerine 2ml akış sıvısı eklendi ve 2600 rpm'de 5 dk. santrifüj yapıldı.
 - Üst sıvı tekrardan atıldı.
 - Üzerine eklenen akış sıvısı ile akan hücre ölçer cihazına okuması için verildi ve hücre gruplarının yüzde değerlendirilmesi yapıldı.
 - Hücre gruplarının fenotipleri Tablo 3.2'deki gibidir.

Tablo 3.2: Çalışma tüpü dizaynında kullanılan dendritik hücelere özgün antikor listesi

FITC	PE	PC5	PC7	APC	APC- A700	APC-A750	PB
CD141	CD11c	CD1c	CD303	LINEAGE	CD123	CD304	HLA-DR

LINEAGE Karışımı: CD3⁺ CD19⁻ CD20⁻ CD56⁻

FITC: Fluorescein isothiocyanate, PE: Phycoerythrin, PC5: PerCP Cyanine 5.5, PC7: PE-Cyanine-7, APC: Allophycocianin, APC-A700: Allophycocianin Alexa fluour 700, APC-A750: Allophycocianin Alexa fluour 750, PB: Pasific blue

3.5. MOLEKÜLER ÇALIŞMALAR

3.5.1. DNA/RNA İzolasyonunun Ön Aşamaları

▪ DNA/RNA Shield™ toplama tüpüne alınan kan örnekleri oda ısısında çözüldükten sonra Zymo Research Quick-DNA/RNA™ Miniprep Plus Kit ile total RNA eldesi işleminin optimizasyonu yapıldı. Ardından tüm numuneler optimize protokole uygun olarak çalışıldı.

▪ 1.5 ml ependorf tüpün içerisine, 200 µl kan örneği ile 1:1 oranında olacak biçimde 200 µl DNA/RNA Shield™ (1X konsantre) eklendi ve iyice karıştırıldı.

▪ Her 400 µl kan karışımı için 8 µl Proteinaz K eklendi ve iyice karıştırıldı. Oda sıcaklığında (20-30°C) 30 dk. inkübe edildi.

▪ Eşit hacimde yani 408 µl izopropanol eklenip iyice karıştırıldı.

▪ Spin-Away™ filtresi yeni bir toplama tüpü içinde yerleştirilip karışım, kolona aktarıldıktan sonra santrifüjlendi.

▪ Altta kalan sıvı atılıp filtre nükleaz içermeyen bir ependorf tüpüne aktarıldı.

▪ Filtre matrisine doğrudan 200 µl DNA/RNA lizis tamponu eklendikten sonra 5 dk. beklendi. Ardından santrifüj yapıldı. Toplanan sıvı ve kolon işlem sonuna kadar saklandı. RNA Saflaştırma aşamasına geçildi.

3.5.2. RNA Saflaştırma

▪ Karışıma 1:1 oranında etanol (%100) eklenip iyice karıştırıldı. Ardından karışım yeni bir toplama tüpüne yerleştirilen Zymo-Spin™ IIICG Kolon 1'e aktarıldı ve 30 saniye (sn.) 13.000 xg'de santrifüjlendi.

▪ Toplama tüpünde kalan sıvı atıldı. Bu aşamadan sonra DNase I uygulama adımı (kolon içinde) yapıldı.

▪ **DNase I Uygulama Adımı:** RNA bağlama adımını takiben kolona 400 µl DNA/RNA yıkama tamponu eklenip, 30 sn. 13.000 xg santrifüjlendikten sonra altta toplanan sıvı atıldı. Her numune için DNase I Reaction Mix'i [DNaz I Reaksiyon Karışımı: DNaz I (sulandırılmış; 1 U/µl) 5 µl ve DNA Parçalama Tamponu 75 µl] nükleaz içermeyen bir tüpte hazırlandı ve yavaşça ters çevrilerek karıştırıldı. Doğrudan kolon matrisine 80 µl eklendi ve oda sıcaklığında (20-30°C) 15 dk. inkübe edildi.

▪ DNase I tedavi kısmından sonra, kolona 400 µl DNA/RNA Prep Buffer eklendi ve 30 sn. 13.000 xg santrifüjlendikten sonra altta toplanan sıvı atıldı.

▪ Kolona 700 µl DNA/RNA yıkama tamponu eklendi ve 30 sn. 13.000 xg santrifüjlendikten sonra altta toplanan sıvı atıldı.

▪ Kolona 400 µl DNA/RNA yıkama tamponu eklendi ve 30 sn. 13.000 xg santrifüjlendi. Yıkama tamponunun kolondan tamamen uzaklaştırılmasını sağlamak için kolon 2 dk. 15.000 xg santrifüjlendi. Ardından kolon dikkatlice nükleaz içermeyen bir tüpe aktarıldı.

▪ 100 µl DNaz/RNaz içermeyen su doğrudan kolon matrisine tüm yüzeye temas edecek şekilde eklendi ve 30 sn. 13.000 xg santrifüjlendi. Böylece nükleaz içermeyen ependorf tüpte saflaştırılmış RNA'lar elde edilmiştir. Bu aşamadan sonra filtre kolonlar atıldı.

▪ Elde edilen total RNA kalite ve miktar tayini Nanodrop Spektrofotometre ile ölçümü yapıldı. Elde edilen RNA 260/280 absorbans oranı yaklaşık olarak 2.0 ise, bu değer RNA numunesinin saf olduğunu ifade etmektedir.

▪ Ölçüm sonrasında numuneler diğer işlemler yapılana kadar -20°C'de muhafaza edildi.

3.5.3. cDNA Eldesi

▪ SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit'in protokülüne uygun biçimde çalışma yapıldı.

▪ Ana karışım (Tablo 3.3) buz üzerinde hazırlandı.

▪ Kullanmadan önce solüsyonlar vortekslenip kapakta kalan sıvıyı uzaklaştırmak için kısaca çevrildi.

▪ RNA numuneleri de eklendikten sonra pipetleme yaparak hafifçe karıştırıldı.

▪ Aşağıdaki program Bio-Rad T100 adlı termal döngü cihazına kaydedildi (Tablo 3.4).

Tablo 3.3: cDNA kütüphanesi

Toplam RNA veya mRNA (1 µg'ye kadar)	Hacim (µL)
5X RT Tamponu	4 µl
Reverse Transkriptaz Dizisi	1 µl
Saf su	20 µl'ye kadar

▪ Karışım hazırlandıktan sonra 0.2 ml PCR tüplerine örnek başına 5 µl cDNA sentez karışımı (5X RT Tamponu ve Reverse Transkriptaz enzimi) eklendi. Elde edilen RNA miktarına bağlı olarak 14 µl'ye kadar RNA eklendi ve son hacim 20 µl'ye tamamlandı.

Tablo 3.4: cDNA termal döngüsü

Aşamalar	Sıcaklık	Süre
1.Bağlanma	25°C	10 dk.
2.Reverse Transkripsiyon	42°C	15 dk.
3.Etkinleştirme	85°C	5 dk.
4.Soğuma	4°C	∞

- RT-qPCR yapılana kadar reaksiyon ürünleri olan cDNA'lar -20 °C'de saklandı.

3.5.4. Primer Dizayn

- NM_015967.8 İnsan *protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22* (PTPN22), transkriptli varyant 1, mRNA

Pozisyon: chr1:114356433-114414381

Sıra: 1p13.2

PTPN22 geni 193 bp

İleri Primer Dizi → 5'-AGGCAGACAAAACCTATCCTACA-3'

Geri Primer Dizi → 5'-TGGGTGGCAATATAAGCCTTG-3'

Ayrıca kontrol/referans geni olarak *GADPH* geni seçilip buna özgül kanonikal primerler yine aynı sayfadan, benzer koşullara sahip olan primer dizisi seçildi (44)

- NM_002046.7 İnsan *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)*, transkriptli varyant 1, mRNA

GADPH geni 197 bp

İleri Primer Dizi → 5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3'

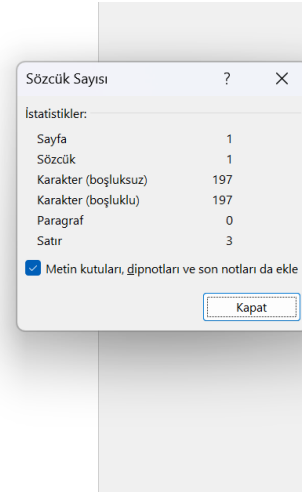
Geri Primer Dizi → 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'

Ek olarak, qPCR öncesi çalışmaya başlamadan önceki adım, dizayn edilen primer çiftlerinin hedef bölgeleri çoğaltıp başka bölgelere bağlanmadığını göstermek için ‘In Silico’ (45) kontrolü sağlanmıştır.

GADPH geninin FASTA’sından seçilen primer dizileri işaretlenerek primerlerin doğru bp aralığında olduğuna ve doğru ileri-geri primer dizilerinin alındığına emin olunmak için Şekil 3.1’deki işlemler yapıldı. Genin bp için sayı agaroz jel aşamasında önem arz etmektedir.

M_002046.7 Homo sapiens glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GADPH*), transcript variant 1, mRNA
GCTCTCTGCTCCTCCTGTTGACAGTCAGCCGCATCTTCTTTTGGCTGCCACCGGAGCCACATCGCTCA
GACACCATGGGGAAGGTGAAGTCCGGAGTCAACGGATTTGGTCTGATTGGGCGCCTGGTCACCGAGGCTG
CTTTTAACTCTGGTAAAGTGGATATTGTTGCCATCAATGACCCCTTCATTGACCTCACTACATGGTTTA
CATGTTCCAATATGATCCACCCATGGCAAATTCATGGCACCCGTCAGGCTGAGAACGGGAAGCTTGT
ATCAATGGAAATCCCATCACCATCTTCCA**GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT**CAAGTGGGGCGATGCTGGCG
CTGATACGTCCTGGAGTCCACTGGCGTCTTCAACACCATGGAGAAGGCTGGGGCTCATTGACAGGGGG
AGCCAAAAGGGTCACTATCTCTGCCCCCTCTGCTGATGCCCCCATGTTCTGTCATGGGTGTGAA**CCATGAG**
AACTATGACAACAGCCTCAAGATCATCAGCAATGCCTCCTGACCACCAACTGCTTAGCACCCCTGGCCA
AGGTCATCCATGACAACCTTTGGTATCGTGGAGGACTCATGACCACAGTCCATGCCATCACTGCCACCCA
GAAGACTGTGGATGGCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGGGCTCTCCAGAACATCATCCCT
GCCTCTACTGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAACGGGAAGCTCACTGGCATGG
CCTTCCGTGTCACCACTGCCAACGTGTGAGTGGTGGACCTGACCTGCCCTCTAGAAAAACCTGCCAAATA
TGATGACATCAAGAAGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAAGGGCATCTGGGTACACTGAG
CACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCACCTTTGACGCTGGGGCTGGCATTG
CCCTCAACGACCCTTTGTCAGCTCATTTCTGGTATGACAACGAATTTGGTACAGCAACAGGGTGGT
GGACCTCATGGCCACATGGCCTCCAAGGAGTAAGACCCCTGGACCACAGCCCGCAGCAAGAGCAAGA
GGAAGAGAGAGCCCTCACTGCTGGGAGTCCCTGCCACTCAGTCCCCACCACTGAATCTCCCT
CCTCACAGTGGCATGTAGACCCCTTGAAGAGGGGAGGGCCTAGGGAGCCGACCTTGTCTATGTACCAT
CAATAAAGTACCCCTGTGCTCAACCA

GGAGCGAGATCCCTCCAAAATCAAGTGGGGCGATGCTGGCGCTGAGTACGTCGTGGAGTCCACTGGCGTCTTCA
CACCATGGAGAAGGCTGGGGCTCATTGACGGGGGAGCCAAAAGGTCATCATCTGCCCCCTCTGCTGATGC
CCCCATGTTCTGTCATGGGTGTGAA**CCATGAGAAGTATGACAACAGCC**



Şekil 3.1: *GADPH* geninin FASTA görüntüsü

▪ CCATGAGAAGTATGACAACAGCC primer dizisinin bu kısmı geri primer olması için seçilmiş olup genetik dizileri ters çevrilir. Genetik dizinin bu hali 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3' olur ve geri primer dizisi olarak dizayn edilmiş oldu. Aynı FASTA kontrol işlemi *PTPN22* geni içinde yapılmıştır.

3.5.5. Gradient PCR

cDNA aşamasından sonra hangi bağlanma ısısının optimum sonuç vereceğini tespit edebilmek ve kontrol genin çalışmasını kontrol etmek amacıyla yapıldı.

- Rastgele seçilmiş olan kontrol grubundan bir gönüllünün numunesi çalışıldı.
- Tek örneğe ait farklı cDNA konsantrasyonları için 4 farklı ısı belirlenerek toplam 16 numune ve bir negatif kontrol olacak biçimde hazırlandı.

▪ ZymoTaq™ PreMix'ten 25µl, saf su 13µl, sulandırılmış 10µM ileri primer dizisinden 5µl, sulandırılmış 10µM geri primer dizisinden 5µl olmak üzere karışım hazırlandı.

▪ 17 tane 0.2 ml PCR tüplerine 48 µl dağıtıldıktan sonra cDNA örneklerinde 2µl olacak biçimde tüplerin içine eklenerek karıştırıldı. Böylece PCR için son hacim 50µl oldu.

▪ Bağlanma ısısı olarak tasarlanan primerlerin Tm ısılarının 3-5 °C altından başlayarak bir sıcaklık aralığı belirlenmiştir (B:60.2°C, D: 57.1°C, F: 52.9°C, H: 51°C). Şekil 3.2'de bir termal döngü cihazına hazırlanan Gradient PCR programı gösterilmiştir.

▪ Yapılan gradient PCR'ın çalışıp çalışmadığının tespiti agaroz jel de görüntülenerek tespit edildi.



Şekil 3.2: Gradient PCR termal döngüsü

3.5.6. Agaroz Jel Hazırlama

▪ Agaroz jel hazırlanırken %1'lik jel (100 ml için 1 gr agaroz) ile 500 bp'lik DNA işaretleyici merdiven kullanıldı. Agaroz jel elektroforezi sonrasında BioRad, GelDoc-Go görüntüleme sistem cihazı ile jelin ekran görüntüsü alınmış ve sonuçlar kaydedildi.

▪ Agaroz jel tankı (Şekil 3.3) ve ekipmanları hazırlandıktan sonra %1'lik agaroz jel hazırlandı.

▪ 50X Tris-asetat-EDTA (TAE)'den 20 ml alınıp bir mezür içinde son hacim 1 L olacak şekilde distile su eklendi. Böylelikle 1X konsantrasyonunda bir tampon hazırlanmıştır. Yani 50 kat sulandırılmış olundu. 1 gr toz agaroz tartılıp bir behere aktarılıp üzerine 100 ml 1X TAE tamponu eklendi. 1.30 dk. mikrodalga da ısıtıldı. Kaynayan jel hafif karıştırıldıktan sonra ılımaya bırakıldı. Sonrasında ışığa verebilmesi için floresan işaretleyici olan SYBR Safe boya karışımının içerisine eklenip hafif karıştırıldı.

▪ Yeterince soğuyan jel karışımı şekil 3.3'te hazırlanan tanka dökülüp jelin soğuması beklenildi. Bu sırada yüklemesi yapılacak olan ürünlerin hazırlığı yapıldı.



Şekil 3.3: Agaroz Jel Tankının Hazırlanışı

▪ 100 ml jel için 5µl PCR ürünlerinden, 6 µl alınıp 1 µl yükleme boyası ile karıştırıldı.

▪ *GADPH* geninin seçilen ürünlerinin yürümesi 100 voltajda 30 dk. yapıldıktan sonra BIO-RAD GelDoc Go Imaging sistemi ile görüntüsü kaydedilmiştir.

▪ *GADPH* geninin ürün bp sayısı 197 idi. Buna uygun ışığa verecek DNA merdiveni tercih edildiği için agaroz jel görüntüsünde bu bp sayısına göre bant ışması gözlemlendi (Şekil 4.1). Sonuç olarak, RT-qPCR için optimum sıcaklık 60 °C olarak belirlendi.

3.5.7. RT-qPCR Aşaması

▪ *PTPN22* geni ve kontrol geni için dizayn edilen primer sekansları Tablo 3.5'te gösterilmiştir. SensiFAST™ SYBR ® No-ROX Kit'inin protokolü takip edilmiştir.

Tablo 3.5: *PTPN22* ve *GADPH* genlerine özel primer dizileri

<i>PTPN22</i> geni	
İleri primer dizi:	5'-AGGCAGACAAAACCTATCCTACA-3'
Geri primer dizi:	5'-TGGGTGGCAATATAAGCCTTG-3'
<i>GADPH</i> geni	
İleri primer dizi:	5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3'
Geri primer dizi:	5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'

- Tablo 3.6'da verilen karışım 1.5ml ependorf tüplerde hazırlandı.
- Her kuyucuğa 18 µl karışımdan konulduktan sonra cDNA'lardan 2µl kuyucuklara eklendi. Plakanın ağzı yapışkanlı folyo dikkatlice kapatıldıktan sonra iyice bir karıştırılıp hafifçe çevrildikten sonra Roche LightCycler 480 II cihazına Tablo 3.7'deki program kaydedildikten sonra RT-qPCR işlemi başladı. RT-qPCR raporu EK.4 ve EK.5'te verilmiştir.

Tablo 3.6: RT-qPCR prosedürü

Solüsyon (Reaktif)	Hacim	Final Konsantrasyon
2x SensiFAST SYBR® No-ROX Karışımı	10 µL	1X
10 µM ileri primer	0.8 µL	400 nM
10 µM geri primer	0.8 µL	400 nM
cDNA	2 µL	-
Saf su	6.4	-
Toplam hacim	20 µl	-

Tablo 3.7: RT-qPCR döngü sayıları, aşamaları, sıcaklıkları ve süreleri

Döngü Sayısı	Aşamalar	Sıcaklık	Süre
1	Polimeraz Aktivasyonu	95°C	2 dk.
40	Denatürasyon	95°C	5 sn.
	Tavlama	60°C	10 sn.
	Uzama	72 °C	15 sn.
1	Erime Noktası	95°C	5 sn.
		65°C	1 dk.
		97°C	-
1	Soğutma	40 °C	30 sn.

3.6. ANALİZLER

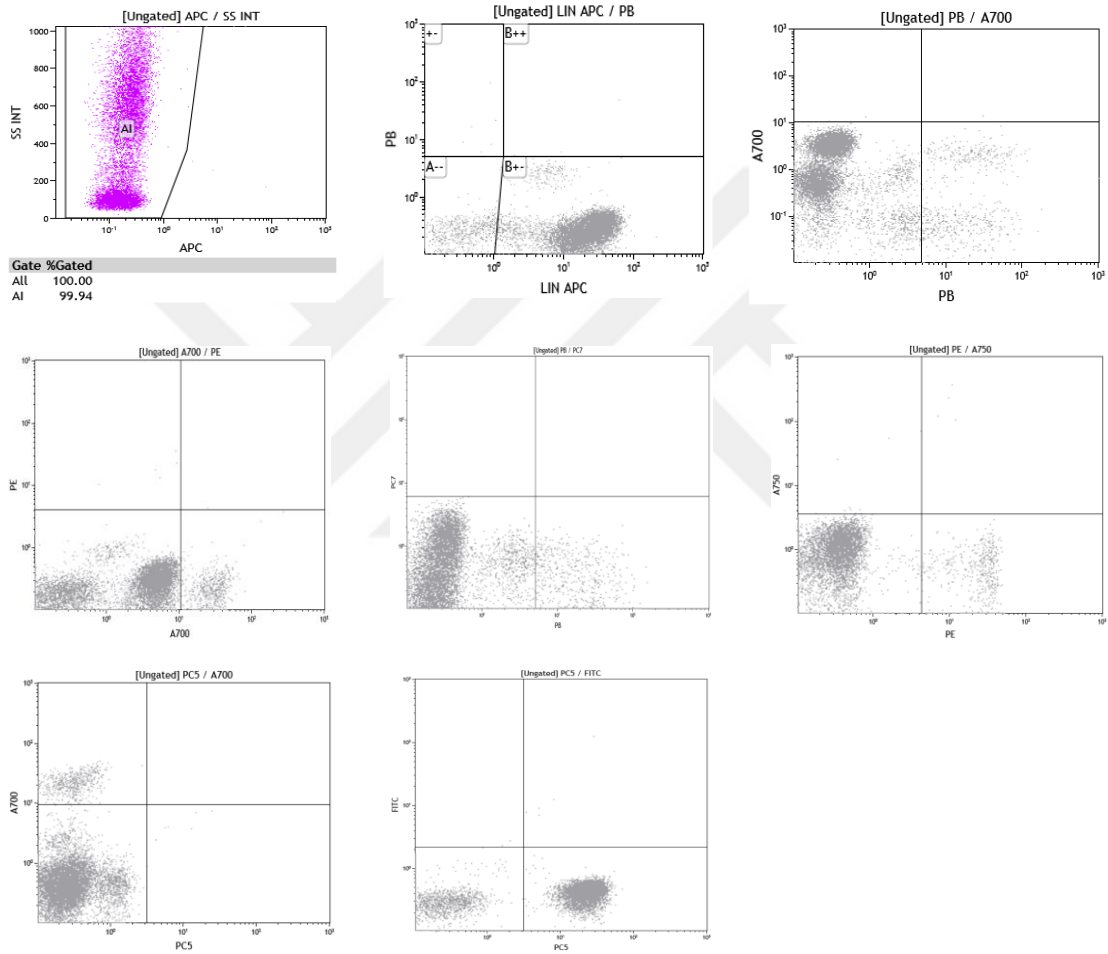
3.6.1. İstatistiksel Analiz

Çalışmada edinilen bilgilerin değerlendirilmesinde istatistiksel analiz için IBM SPSS Statistics 22 programı ve SPSS 28.0 programı kullanılmıştır. Parametrelerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro Wilks testleri ile değerlendirilmiş ve parametrelerin normal dağılım göstermediği saptanmıştır. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (ortalama, standart sapma, frekans) yanı sıra niceliksel verilerin karşılaştırılmasında parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi ve farklılığa neden çıkan grubun tespitinde Dunn's test kullanılmıştır. Nicel bağımsız verilerin alt analizlerinde mann-whitney u test kullanıldı. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise Fisher Freeman Halton Exact Ki-kare testi kullanılmıştır. Anlamlılık, $p < 0,05$ düzeyinde değerlendirilmiştir.

3.6.2. DH Alt Gruplarının Analizleri

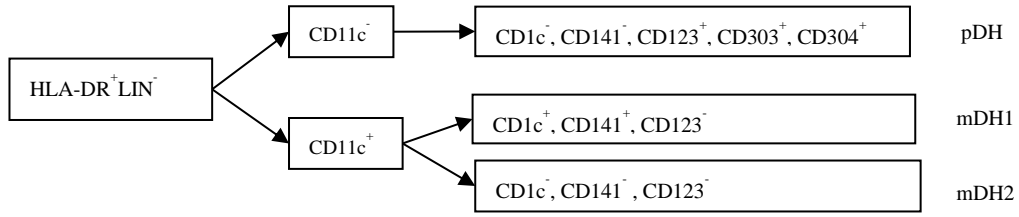
Yüzey boyama aşamasından sonra dendritik hücre alt gruplarının analizi akan hücre ölçer cihazı ile uyumlu Kaluza Analiz (Version 2.2.1) programıyla yapıldı. Rastgele bir hasta ve kontrol seçilmiş olup onun üzerinden değerlendirmesi gösterilmiştir.

Floresan Eksi Bir (FMO) ile kapılma stratejisi belirlendi.



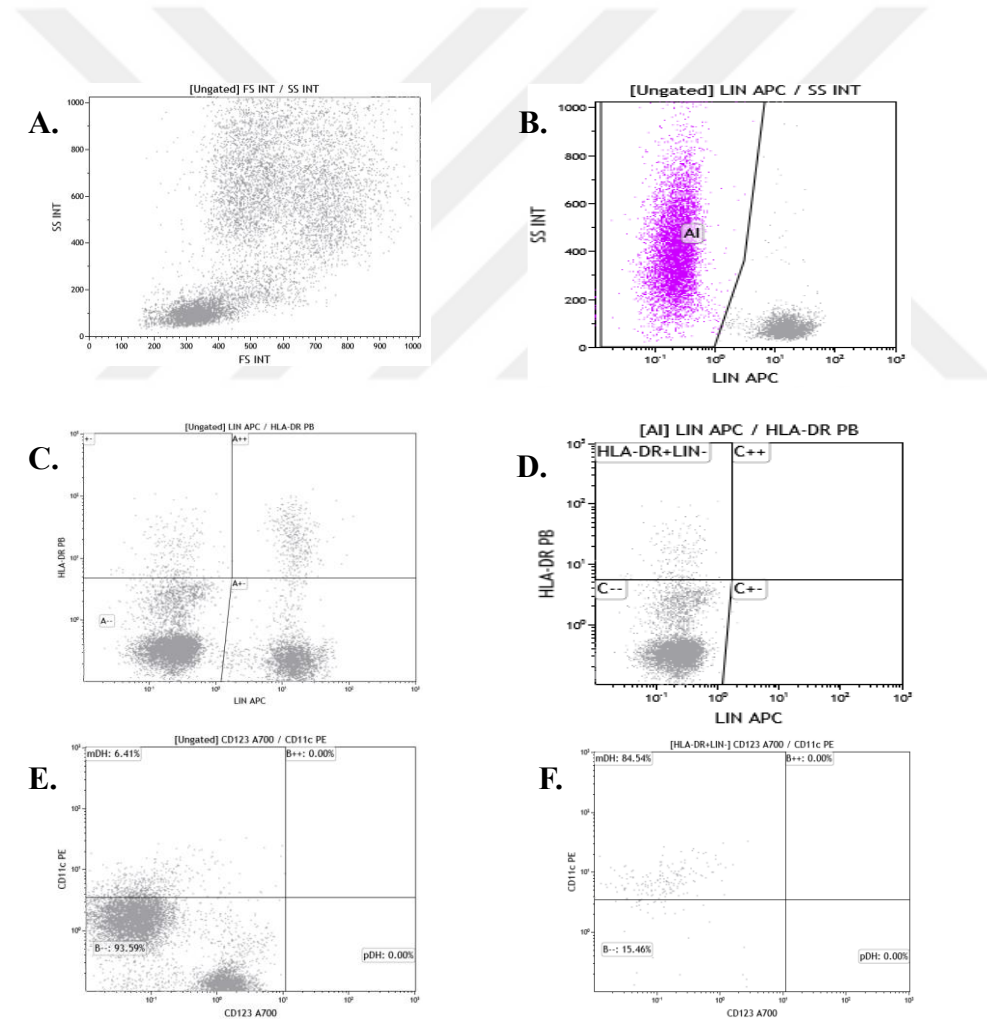
Şekil 3.4: FMO'ya göre antikorların sınır ayarlaması

Analiz için seçilen histogram görüntülerinde çalışılan hasta-kontrol numuneleri arasında rastgele olarak seçilmiştir. Şekil 3.6'daki histogram görüntüleri kontrol numunesinin analizinden alınmıştır. Şekil 3.7'deki histogram görüntüleri ise hasta grubundan rastgele seçilmiş olan bir analiz sonucundaki histogram görüntüleridir.



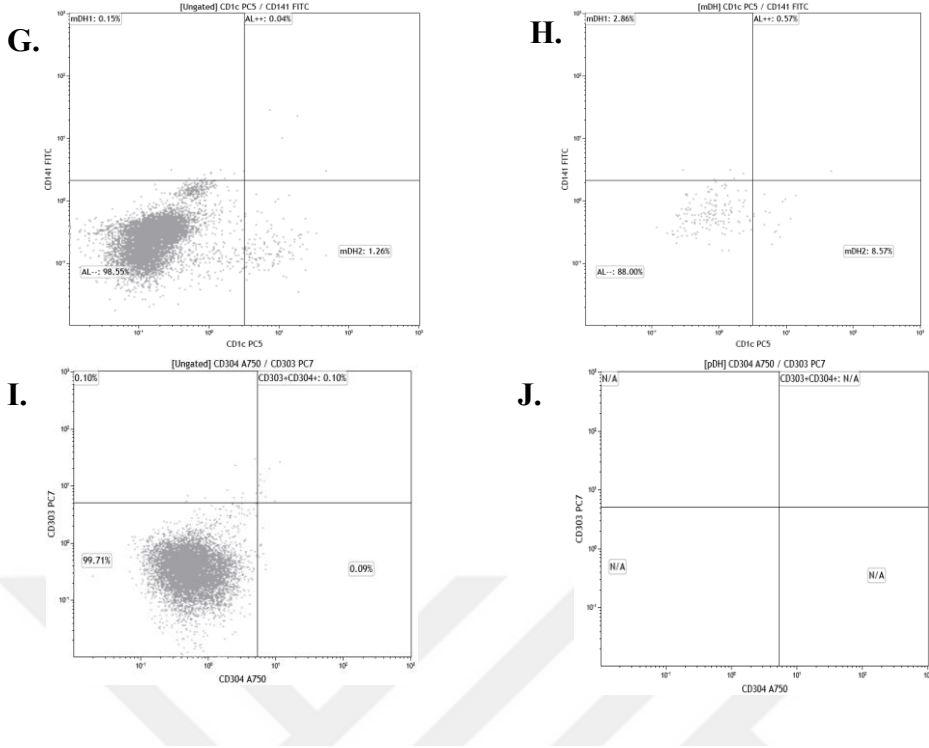
Şekil 3.5: DH kapılama diagramı

Analiz için kapılama diagramı oluşturuldu (Şekil 3.5). FMO sınırları takip edilerek DH ve DH alt gruplarının (pDH, mDH, mDH1, mDH2) analizi yapıldı.



Şekil 3.6: FMO kapılama stratejisine göre sınırların kapılı ve kapısız olarak gösterimi

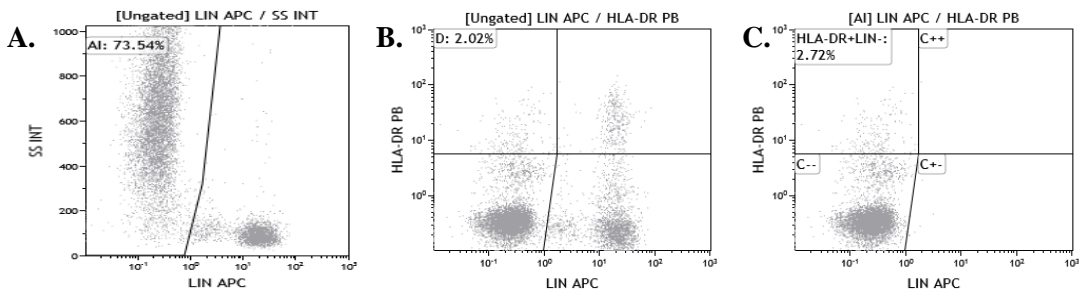
(A). FS-SS görüntüsünde tüm hücreler, (B). LIN-SS histogramında lineage pozitif hücreleri dışlama kapısı, (C-D). LIN-HLA DR kapısız ve kapılı yerleşimi, (E-F). CD123-CD11c kapısız ve kapılı yerleşimi



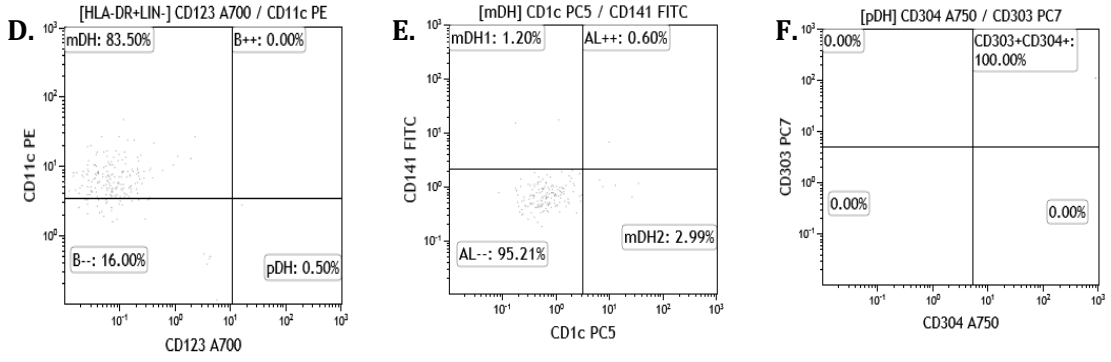
Şekil 3.6 devamı: FMO kapılama stratejisine göre sınırların kapılı ve kapısız olarak gösterimi

(G-H). CD1c-CD141 kapısız ve kapılı yerleşimi, (I-J). CD304-CD303 kapısız ve kapılı yerleşimi

Genel hatlarıyla çalışmanın analizinde (Şekil 3.5 diagramı ve Şekil 3.7) HLA-DR⁺ LIN⁻ kapısında CD11c-CD123 grafiğinde pDH % ve mDH %'sinin belirlenmesi, CD1c-CD141 grafiğinde mDH1 ve mDH2 %'sinin belirlenmesi ve CD303-CD304 grafiğinde pDH %'nin kontrolü yapılmıştır.



(A). LIN-SS, lineage pozitif hücreleri dışlama kapısı, (B). Kapısız LIN⁻HLA-DR⁺ alanını belirlenmesi, (C). Lineage pozitif hücreleri dışlama kapısında LIN⁻HLA-DR⁺ alanının oluşturulması



Şekil 3.7 devamı: DH kapılama strateji histogramları

(D). CD123-CD11c mDH ve pDH alanlarının belirlenmesi, **(E).** mDH kapısı alınarak alt gruplarının alanlarının belirlenmesi, **(F).** pDH kapısı alınarak CD304⁺CD303⁺ alandan kontrolün sağlanması

3.6.3. Relatif Kantitatif Analiz

Bu süreçte $\Delta\Delta Ct$ değerleri hesaplanarak gen ekspresyon seviyeleri belirlenir.

RT-qPCR ikili (duplike) olarak çalışılmıştır. Çıkan her iki Ct değeri aynı ya da birbirine yakın değerlerde olmak zorundadır. Bu koşullar göz önüne alınarak yapıldığında duplike sonuçların ortaması alındıktan sonra delta delta Ct hesaplamaları yapılmıştır.

Bu çalışmada *GAPDH* genini referans gen olarak kullanılmıştır. İlk olarak, test edilen her genin Ct değeri, referans genin Ct değerinden çıkarıldı, normalleştirildi ve delta Ct değeri (ΔCt) hesaplandı. Daha sonra kontrol grubunun ΔCt değeri test grubunun ΔCt değerinden çıkarılarak $\Delta\Delta Ct$ değeri elde edilmiştir.

Formülü;

$$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$$

$$\Delta\Delta Ct: [(Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{referans gen}}) - (Ct_{\text{kontrol}} - Ct_{\text{referans gen}})]$$

4. BULGULAR

Çalışma yaşları 18 ile 58 arasında değişmekte olan, 19'u (%48.7) erkek ve 20'si (%51.3) kadın olmak üzere toplam 39 olgu ile yapılmıştır. Yaş ortalaması 33.21 ± 9.97 yıldır. Olgular “Yeni T1DM tanılı” (n=13), “Eski T1DM tanılı” (n=18) ve “Kontrol” (n=8) olmak üzere üç grup altında değerlendirilmiştir. T1DM süreleri 4 ay ile 33 yıl arasında değişmekte olup, ortalaması 10.13 ± 9.90 yıl, medyan değer 7 yıldır.

Tablo 4.1: Grupların yaş ve cinsiyet açısından değerlendirilmesi

	Yeni Tanılı	Eski Tanılı	Kontrol	p
Yaş Ort±SS (medyan)	33,92±12,17 (32)	33,94±9,26 (37)	30,37±8,14 (28)	¹ 0,678
Cinsiyet n (%)				
Erkek	5 (%38,5)	12 (%66,7)	2 (%25)	² 0,103
Kadın	8 (%61,5)	6 (%33,3)	6 (%75)	

¹Kruskal Wallis Test

²Fisher Freeman Halton Exact Test

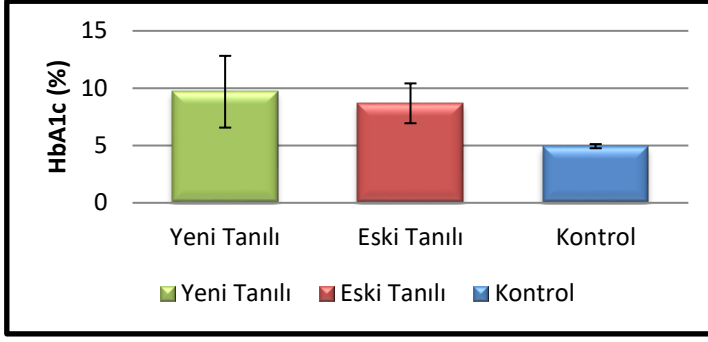
Gruplar arasında yaş ortalamaları ve cinsiyet dağılımları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p > 0,05$) (Tablo 4.1).

Tablo 4.2: Grupların HbA1c ve C-Peptid düzeyleri açısından değerlendirilmesi

	Yeni Tanılı	Eski Tanılı	Kontrol	p
	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	
HbA1c (%)	9,69±3,13 (9,2)	8,68±1,74 (8,4)	4,94±0,18 (5)	0,001*
C Peptid (186,28±201,11 (139,3)	156,89±416,23 (6,7)	904±230,4 (961)	0,001*

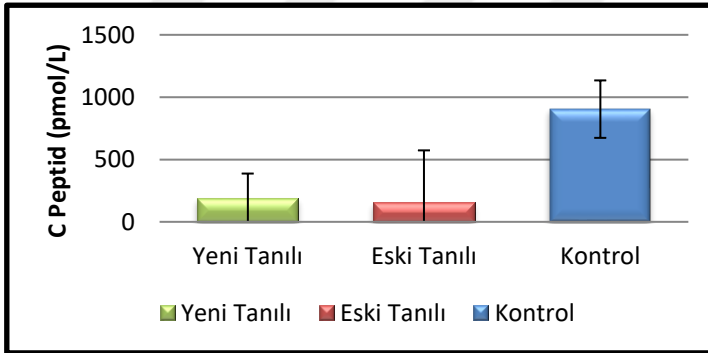
Kruskal Wallis Test

* $p < 0,05$



Şekil 4.1: Gruplar arasında HbA1c düzeyleri

Gruplar arasında HbA1c düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p=0,001$; $p<0,05$). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan post hoc Dunn's Test sonucunda; yeni tanılı ($p=0,001$) ve eski tanılı grubun ($p=0,001$) HbA1c düzeyi, kontrol grubundan anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p>0,05$). Yeni Tanılı ve Eski tanılı gruplar arasında HbA1c düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p=1,000$; $p>0,05$) (Tablo 4.2 ve Şekil 4.1).



Şekil 4.2: Gruplar arasında C peptid düzeyleri

Gruplar arasında C peptid düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p=0,001$; $p<0,05$). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan post hoc Dunn's Test sonucunda; yeni tanılı ($p=0,019$) ve eski tanılı ($p=0,001$) grupların C-peptid düzeyin kontrol grubunda anlamlı şekilde düşük bulundu ($p<0,05$). Yeni tanılı ve eski tanılı gruplar arasında C-Peptid düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p=0,844$; $p>0,05$) (Şekil 4.2).

Genel sonuçların istatistiksel analizleri dışında yöntem kısmındaki 2 ana başlıktan oluşan çalışmaların bulguları 4.1 ve 4.2 bölümleri içerisinde yer almaktadır.

4.1. İMMÜN FENOTİPLEME ÇALIŞMASININ BULGULARI

Tablo 4.3: İmmünofenotipleme çalışmasının demografik sonuçları

	Min.-Mak.			Medyan	Ort. ±ss/n-%		
HLADR+LIN-	0,56	-	10,3	3,0	3,6	±	2,1
mDH	23,6	-	91,9	69,5	68,0	±	15,2
mDH1	0,69	-	30,8	3,5	5,7	±	6,8
mDH2	3,3	-	22,5	9,3	10,1	±	4,4
pDH %	0,0	-	62,0	0,0	4,7	±	15,0
Kontrol Grubu					8		20,5%
Eski Tanı					18		46,2%
Yeni Tanı					13		33,3%

Min.-minimum, Mak. -maksimum, Ort. ±ss: ortama ve standart sapma değerleri

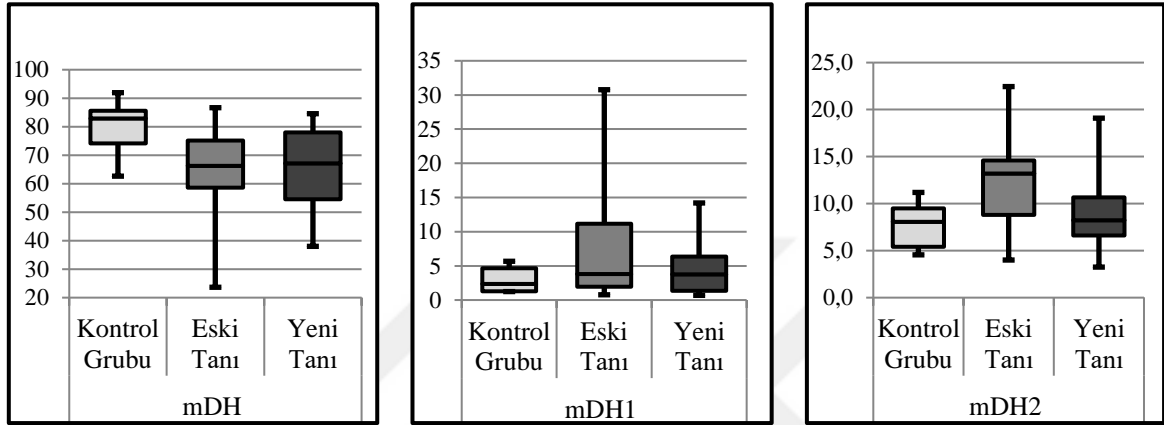
Hastaların (Eski Tanı ve Yeni Tanı) ve kontrollerin minimum-maksimum değerleri, medyan değerleri, ve ortamala değerleri Tablo 4.3'te verilmiştir. pDH bulunma mevcudiyeti çok azdır. Medyan değerlerine bakıldığında dendritik hücrelerin, pDH<HLA-DR⁺LIN⁻<mDH1<mDH2<mDH şeklinde değerleri hesaplanmıştır.

Tablo 4.4: Grupların HLA-DR⁺LIN⁻, mDH, mDH1, mDH2, pDH düzeyleri açısından değerlendirilmesi

		Kontrol Grubu ¹		Eski Tanı ²		Yeni Tanı ³		P
		Ort. ±ss/n-%	Ort. ±ss/n-%	Ort. ±ss/n-%	Ort. ±ss/n-%			
HLADR+LIN	Ort. ±ss	4,6	± 2,4	3,0	± 2,3	3,8	± 1,2	0,042 ^K
	Medyan	3,4 ²		2,2		3,8 ²		
mDH	Ort. ±ss	80,4	± 9,2	64,8	± 15,8	64,9	± 14,2	0,019 ^K
	Medyan	82,9 ²³		66,3		67,1		
mDH1	Ort. ±ss	2,8	± 1,8	7,8	± 9,0	4,7	± 4,2	0,367 ^K
	Medyan	2,4		3,8		3,8		
mDH2	Ort. ±ss	7,8	± 2,3	12,1	± 4,7	8,9	± 4,1	0,029 ^K
	Medyan	8,0 ²		13,2		8,2 ²		
pDH %	Ort. ±ss	2,8%	± 7,8%	0,0%	± 0,0%	12,5%	± 24,0%	0,107 ^K
	Medyan	0,0%		0,0%		0,0%		

K Kruskal-wallis (Mann-whitney u test), ² Eski Tanı Grubu ile fark p < 0,05 / ³Yeni Tanı Grubu ile fark p < 0,005

Eski tanı grubunda HLA-DR⁺LIN⁻ % değeri kontrol grubundan anlamlı (p<0,05) olarak daha düşük bulunmuştur. Eski tanılı hasta grubunun HLA-DR⁺LIN⁻ % değeri yeni tanı grubundan anlamlı (p<0,05) olarak daha düşük bulunmuştur. Yeni tanı ve kontrol grubu arasında HLA-DR⁺LIN⁻ % değeri (p>0,05) anlamlı farklılık göstermemiştir (Tablo 4.4).



Şekil 4.3: Gruplar arasında mDH, mDH1, mDH2 (%) düzeyleri

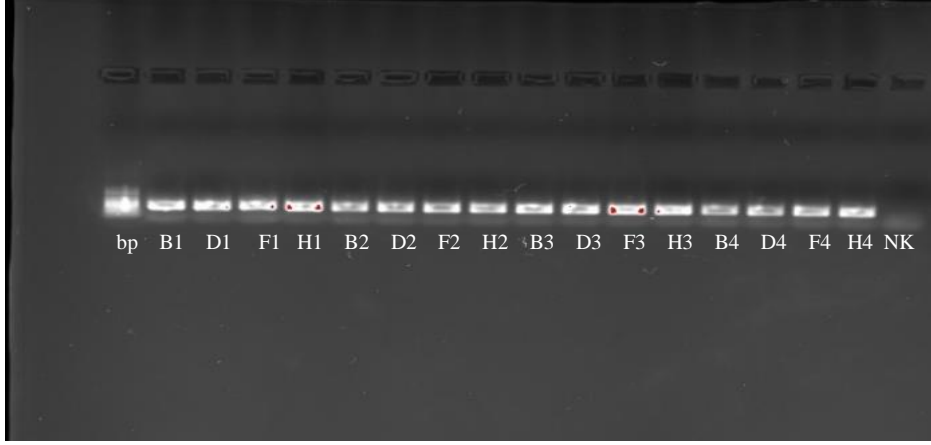
mDH % değeri eski tanı ve yeni tanı gruplarında, kontrol grubuna göre anlamlı (p<0,05) olarak daha düşük bulunmuştur. Ancak, eski tanı grubu ve yeni tanı grupları arasında mDH değeri anlamlı farklılık bulunmamıştır (Tablo 4.4). Gruplar arasında mDH1 değeri (p > 0.05) anlamlı farklılık göstermemiştir (Tablo 4.4).

Eski tanı grubunda mDH2 % değeri kontrol grubundan anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Eski tanı grubunda mDH2 % değeri yeni tanı grubundan anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (Tablo 4.4 ve Şekil 4.3). Gruplar arasında (eski tanı, yeni tanı ve kontrol grubu) pDH % değeri (p<0,05) anlamlı farklılık göstermemiştir.

4.2. MOLEKÜLER ÇALIŞMANIN BULGULARI

Gradient PCR çalışmanın agaroz jel görüntüsü Şekil 4.6'da gösterilmiştir (B:60.2°C, D: 57.1°C, F: 52.9°C, H: 51°C).

Şekil 4.4'te gradient PCR işlemindeki sonucu görebilmek amacıyla yapılan agaroz jel görüntüsü verilmiştir. Görselde kuyucuklar sırasıyla; bp merdiveni, B1, D1, F1, H1, B2, D2, F2, H2, B3, D3, D3, H3, B4, D4, F4, H4, NK.



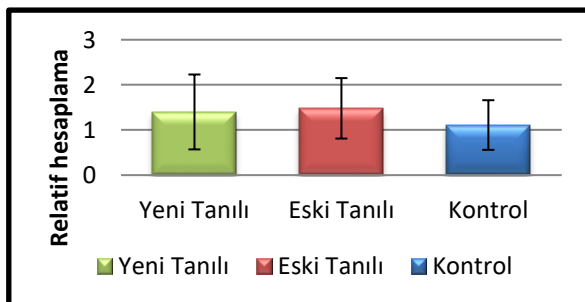
Şekil 4.4: Gradient PCR sonuçlarının agaroz jelde görüntüsü

PTPN22 ve *GADPH* genlerinin relatif kantitatif analizlerinin hesaplanması $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yapıldıktan sonra değerlendirilmesi Tablo 4.4'te oranları gösterilmiştir.

Tablo 4.5: Grupların $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri açısından değerlendirilmesi

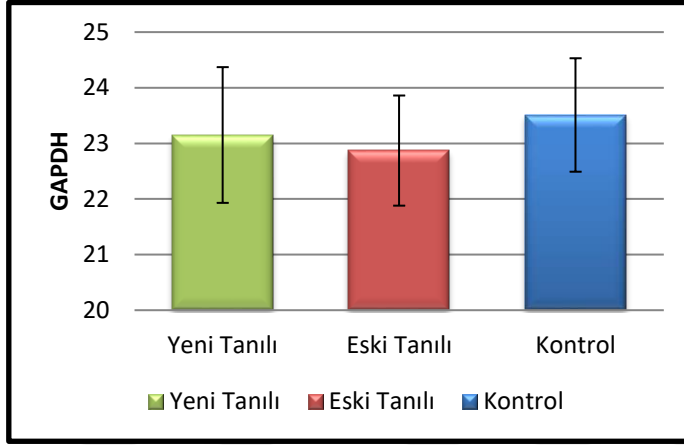
	Yeni Tanılı	Eski Tanılı	Kontrol	
	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	p
Relatif hesaplama	1,4±0,83 (1,5)	1,48±0,67 (1,5)	1,11±0,55 (0,9)	0,451
<i>GADPH</i>	23,15±1,22 (23)	22,87±0,99 (22,8)	23,51±1,02 (23,1)	0,283
<i>PTNP22</i>	27,79±2,31 (26,9)	27,22±1,05 (26,8)	28,26±0,99 (28,1)	0,086

Kruskal Wallis Test



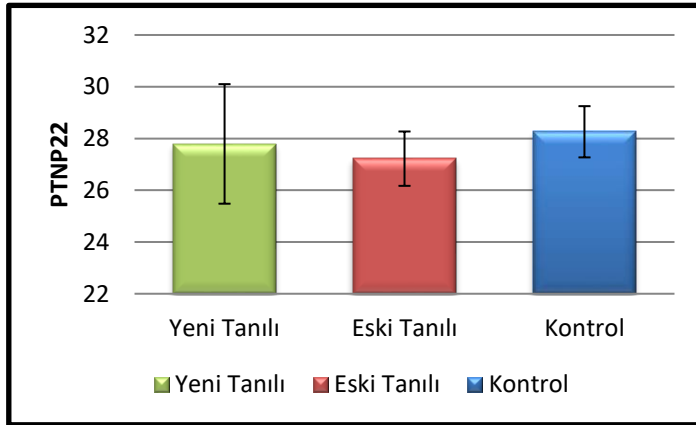
Şekil 4.5: Gruplar arasında relatif hesaplama değerleri

Gruplar arasında relatif hesaplama değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0,05$) (Şekil 4.7).



Şekil 4.6: Gruplar arasında *GAPDH* değerleri

Gruplar arasında *GAPDH* Ct değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0,05$) (Şekil 4.8).



Şekil 4.7: Gruplar arasında *PTNP22* değerleri

Gruplar arasında *PTNP22* Ct değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0,05$) (Şekil 4.9).

5. TARTIŞMA

DM tanısının ve tiplendirmesinin zor olmasının sebebi alt tiplerinin çok olmasından kaynaklanmaktadır. T1DM'nin nasıl olduğu, ne zaman veya nasıl oluştuğu sorularının cevaplanmasında yetersiz kalınan bir hastalık türüdür. Takibi sırasında oluşabilecek komplikasyonları tahmin etmek için erken belirteçlere ihtiyaç vardır. Bu çalışma, 5 yıl ve 5 yıldan uzun (n=18) ve yeni tanı almış (n=13, ≤5) olan T1DM tanısı almış 31 hastanın patogenezi ile ilişkili olabilecek faktörler incelendi.

Pankreasın langerhans adacıklarında insülin üreten β hücrelerinin immün aracılı yıkımı ile karakterize otoimmün bir hastalıktır. Bu nedenle T1DM, otoimmünel bir hastalık olarak kabul görmüştür. T1DM'nin patogenezi katkıda bulunan genetik, immünolojik, metabolik ve çevresel faktörlerle çok faktörlü bir otoimmün hastalıktır (25). Biyokimyasal testlerden HbA1c, C-peptid, oto-antikör testleri istenerek bir anamnez oluşturulur ve dışarıdan enjeksiyon ya da pompa yardımı ile diyabet tanısı alan hastanın insülin alımları başlar (6).

Kontrol grubunun HbA1c düzeyi, yeni tanı (p=0,001) ve eski tanı (p=0,001) gruplardan anlamlı şekilde düşük bulundu (p<0,05). Yeni ve eski tanı hastalar insülin enjeksiyonu yardımıyla değerlerini kontrol altında tutmaya çalıştıkları için için kontrol grubuna kıyasla değerleri biraz daha yüksektir. Gruplar arasında C peptid düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur (p=0,001; p<0,05). Kontrol grubunun C-peptid düzeyi, yeni tanı (p=0,019) ve eski tanı (p=0,001) gruplardan anlamlı şekilde yüksek bulundu (p<0,05). DM türlerindeki ayırımın en önemli testi de C-peptid değeridir. Eğer hasta T1DM ise C-peptid düzeyi zaten düşüktür (6).

Otoimmünel ilişkide önemli olarak düşündüğümüz hücre grubu olan dendritik hücreleri ve alt grupları olan pDH, mDH1, mDH2 hücre gruplarına akan hücre ölçer ile immünofenotipleme yöntemi ile bakıldı. DH'ler ASH'dir (24). Böylelikle DH'ler yardımcı hücreler olup antijenlerin işlenmesinde ve T hücrelerine sunumunda rol alırlar. Ek olarak, naif T hücrelerini aktive etmekte ve kendi kendine toleransı sürdürülmesinde önemli bir rol oynadıklarından, T1DM'de otoimmün yanıtının tüm aşamalarında önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (4, 25).

2011 yılında yayınlanan bir bölümde dendritik alt hücre grupları HLA-DR ve LIN histogramında kapısız alanda HLA-DR⁺LIN⁻ alanı belirlenmesi ile gösterilmiştir (46). Tez çalışmasında da deneysel olarak LIN⁻ dışlanarak kapılama stratejisi ile HLA-DR⁺LIN⁻ kapılama stratejisine göre DH alt gruplarının değerlendirilmesi yapılmıştır.

2006 yılında yapılan bir çalışma da dendritik hücreler için farklı kapılama stratejileri denenmiştir. Bu deneyin sonucunda LIN⁻ kapılaması yapılan alanda pDH'ın düşük seviyeli ifadesi tanımlanmış ancak bu tanımlama da CD14⁺ CD16⁻ kapısında da aynı veri alınmış (47). Yaygın olarak monosit belirteçleri olarak bilinen CD14 ve CD16 belirteçleri kullanılmadığından monositik kaynaklı olabilecek hücre gruplarının ayırımı yapılamadı.

Hücre popülasyonlarının varlığını ve oranlarını belirlemek amacıyla fare kanı, dalak ve timositlerdeki heterojen hücre popülasyonlarını kültür çalışması yöntemi kullanılarak yapılan manyetik boncuklu akan hücre ölçerli başka bir çalışma yapılmıştır. Fare kanı ve lenfoid organlarında yapılan çalışmada hem LIN⁻ hem de MHC2⁺ CD11c⁺ kapıları alınarak DH için veriler alınmıştır (48).

Eski tanı grubunda HLA-DR⁺LIN⁻ değeri yeni tanı ve kontrol grubundan anlamlı olarak daha düşük bulundu (p<0,05). Kontrol grubunun sayıları düşük olduğu için anlamlı bir istatistiksel veri alınamamıştır. Eski tanı grubunda mDH2 değeri yeni tanı ve kontrol grubundan anlamlı olarak daha yüksek bulundu (p<0,05). Bu durum prognoz için önemli bir fark oluşturabilir. Lakin yeni tanı ve kontrol grubu arasında belirgin bir fark bulunmamasından dolayı bu fark şüpheli olarak kalmaktadır. Ancak bu durumda mDH alt grupları, yeni tanı alacak hastalar için bir belirteç olarak yer alabilmesi için yeni (Monosit aracılı dendritik hücreler) antikorların eklenmesi ile bir çalışma bulunabilir.

Özellikle 2019 senesinden sonra immün sistemin baskılandığı veya tetiklendiği bir hastalık çeşidi olan COVID-19 sonrası tanı alan hastalar vardır (49). Yapılan bir çalışma da yeni tanı almış hastaların biyokimyasal testlerinin analizi yapılmış olup adacık hücrelerinin COVID-19 tarafından ne derecede hasar gördüğü ve insülin sekresyonu üzerine olumsuz etkisinin kalıcı olup olmadığı henüz net olmadığını bildirmişlerdir (49). Tez çalışmasında da COVID-19 sonrası T1DM tanısı alan 2 hastaya denk gelinmiştir. Ancak 2 hasta da yeni tanı oldukları için karşılaştırılacak yeterli veriye ulaşamamıştır.

T1DM, pankreastaki kronik adacık iltihabı ile sonuçlanan kompleks bir otoimmün hastalık olup çevresel, genetik ve otoimmün faktörlerle de kendini geliştirebilen bir hastalık çeşididir.

Giannoukakis ve ark. 2011 yılında yaptıkları klinik bir çalışmada, yetişkin T1DM hastalarında, immünsüpresif bir duruma stabilize edilmiş otolog dendritik hücrelerin güvenliği araştırmışlardır (50). Bu çalışmalarında hiçbir yan etki gözlenmeden insülin gereksinimleri, bağışıklık hücresi fenotipi ve sitokin üretimleri açısından çok az değişiklik kaydedilmiştir. Yapılan araştırmalarda, DH'nin T1DM'nin tedavisinde/önlenmesinde terapötik potansiyelini inceleyen çalışmaların çoğu NOD farelerinde yapılmıştır. Bu çalışma da duyarlılık genlerinin belirlenmesi ve hastalıktaki ilerlemenin anlaşılması için yararlı bir model olmuştur. Ancak NOD fare modellerinde başarılı olan terapötik yaklaşımlar, kliniğe pek iyi yansıtılmamıştır (51).

Birkaç çalışma da, yeni teşhis edilmiş T1DM hastalarının tam kanlarından akan hücre ölçer cihazı kullanılarak, DH alt kümelerinin varlığı açısından incelenmiştir. Tanı anında pDH'lerin arttığı (52) ya da azaldıkları (53) gösterilmiştir. Tez çalışmamdaki gruplar arasında; kontrol grubu, eski tanı ve yeni tanı grubu arasında mDH1 değeri ($p>0,05$) anlamlı farklılık göstermemiştir. Kontrol grubu ve yeni tanı grubu arasında mDH2 değeri ($p>0,05$) anlamlı farklılık göstermemiştir (Şekil 4.3). Kontrol grubu, eski tanı ve yeni tanı grubu arasında pDH % değeri ($p>0,05$) anlamlı farklılık göstermemiştir (Tablo 4.4).

2013 yılında yayınlanan bir makaleye göre, mDH'lerin ve makrofajların tanımlanmasını kolaylaştıran ek işaretleyiciler belirlenmiştir. Örneğin, tirozin kinaz reseptörü fms benzeri tirozin kinaz 3'ün ifadesi, mDH'leri makrofajlardan ayırt etmek için mükemmel bir belirteç olarak ifade edilmiştir (30). Ek olarak CD11c belirteci dışında mDH ve makrofajların tanımlanmasını kolaylaştıran ek işaretleyiciler de vardır (23, 46). Tezin immünofenotipleme kısmında bu özelliklerinden dolayı hem makrofajlar için hem de miyeloid dendritik hücrelerde gözlemlenen CD11c belirteci eklenmiştir.

Miyeloid progenitörler, alternatif olabilecek DH progenitörleri olarakta işlev gören monositler üretir. Lenfosit progenitörleri, plazmasitoid DH alt tipini (pDH) oluşturur (54). pDH'ler tipik olarak miyeloid antijenlerden yoksundur ve CD123 (IL-3R), CD303 (BDCA2), CD304 (BDCA4) ve CD45RA'nın ekspresyonu ile ayırt edilir (23). Tezin immünofenotipleme bulgularına göre kullanılan bu 3 belirteç (CD123, CD303,

CD304) için tam bir ayırım söz konusu değildir. İnsan periferik kanında, pDH'ler toplam mononükleer hücrelerin %0,2-%0,8'ini içerdiği belirtilmiştir (55). Düşük miktarda buldukları için pDH varlığı bu beklentileri karşılamıştır.

CD141 antijeni, kandaki CD1c⁺ mDH'leri, pDH'leri, monositleri ve granüositlerinde çok daha düşük seviyelerde eksprese edilir (28, 29).

PTPN22'nin mDH2'lerin genişlemesini düzenlediği göz önüne alındığında, otoimmün ilişkili varyantın benzer etkilere aracılık edip edemediğini incelenmiş olup bu çalışmayı farelerde R620W ortologu *Ptpn22* 619 W ifade eden dalaktaki mDH alt grupları sıralanmış. Otoimmün ilişkili *PTPN22* varyantının, bu bağlamda bir fonksiyon kaybı mutanti olarak çalışan mDH2 homeostazını da düzenleyebildiğini gösterilmiş (56). Bu tez çalışmasında odaklanılan gen grubu *PTPN22* genidir. *PTPN22* geni dendritik hücrenin alt grubu olan mDH2 hücre grubu ile uyumluluk gösterdiği için özellikle seçilen bir genidir (57).

Şekil 4.3'te verilen agaroz jel görüntüsünde, RNA'nın cDNA'ya çevrilmesini, *GADPH* geninin dizaynını iyi seçilmiş/yapılmış olmasını, 4 farklı derece de ve yarım hacimle de iyi ışığa verdiğini, dimerleşmenin olmadığı bir görüntü mevcuttur. Bu da buraya kadar olan aşamaların başarılı olduğunu kanıtlamaktadır.

EK-4'te verilen SYBR Green probu ile *PTPN22* geninin ışığa grafiklerinin eğriliğinin zikzaksız olması, tam bir "S" görüntüsü halinde çıkması ve Ct değerlerin birbirlerine yakın olması deneylerin başarılı olduğunu kanıtlamaktadır. Çalışma da 1 hastanın Ct değeri 30'un çok üzerinde olduğu için moleküler çalışmalar kısmından çıkartılmıştır. RNA izolasyonun bu hasta da başarılı olmadığını göstermektedir. Hedef gen ile kontrol geni ile belirlenen Ct değerlerin birbirlerine yakın olmaları başka bir gene spesifik olarak bağlanmadıklarını, yani hedef gene spesifik olarak bağlandıkları anlamına gelmektedir. EK-5'te de kontrol geni olan *GAPDH* geninin RT-qPCR raporu verilmiştir. Kontrol genindeki analizde, gruplar arasında *GAPDH* Ct değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0,05$). Bu istatistiksel sonuçta ekstra bağlanmaların olmadığı, grafik eğrilerinin koordineli olarak çalıştığı anlamına gelmektedir. Hedef gendeki analizde de, gruplar arasında *PTPN22*'nin Ct değerlerinin istatistiksel değerlendirmesinde anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$). Bu istatistiksel sonuçta hedef genin ekstra bağlanmalarının olmadığı hatta kontrol genine oranla daha iyi ekspresyon olmuştur.

2004 yılında yapılan bir çalışmada *PTPN22* genindeki R620W polimorfizminin, insüline bağımlı DM ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada *PTPN22* (C1858>T, R620W, rs2476601), T1DM dahil olmak üzere çoklu otoimmün hastalıklarla ilişkili bulunmuştur (39, 58).

2006 yılındaki diğer bir çalışma da; Asya kökenli (n=1698), T1DM hastası (n=738) ve otoimmün tiroid hastalığı (n=141) hastalarında *PTPN22* gen polimorfizmini vahşi tip homozigot 1858 C/C genotipi olarak bulunmuş ve *PTPN22* geninde bir promotör bölge tanımlanmıştır. Bu promotör bölgedeki -1123 C/G (rs2488457) polimorfizmi ile Güney Kore ve Japon popülasyonundaki T1DM hastaları arasında anlamlı bir ilişki gösterilmiştir (59).

2007 yılında yapılan diğer bir çalışmada *PTPN22* gen polimorfizmleri ile ilgili bir meta analiz yapılmış ve bu çalışmanın sonucunda Addison hastalığı, inflamatuvar barsak hastalığı, multiple skleroz, çölyak hastalıklarında *PTPN22* R620W ile arasında herhangi bağlantı saptanmamıştır (60).

Tez çalışmasına dahil edilen T1DM hasta grubunda (n=31), anamnezlerinde başka bir otoimmün rahatsızlığı olan bireye rastlanılmadı.

2010'da, Finlandiya'da yapılan bir araştırma, *IL2RA* polimorfizmlerinin T1DM başlangıcındaki hastalarda yaş ile ilişkisi bulundu (61). Son zamanlarda yapılan Geniş Çaplı Genom Projesi (GWAS) çalışmalarında T1DM'ye yatkınlık oluşturan diğer gen gruplarındaki aleller meta analiz ile araştırılmış olup SNP'ler hakkında geniş bilgi ağı oluşturmuştur (62).

PTPN22 rs2476601 1858C>T geminin nüfus frekans alellerinin olduğu sayfadan bakılana göre alel sayısı 0,9276'dır (63). Alel frekansının 1'e yakın olması her bireyde olması beklenen bir gen olduğunun göstergesidir. Çalışmanın bulgular kısmında da belirtildiği üzere spesifik gen bağlanmaları yoktur. Ancak, T1DM, *PTPN22* (rs276601) kombinasyonu için özel değildir. *PTPN22*'nin otoimmünite ile ilişkilerini 2004 yılında ilk defa Bottini ve ark. (39) göstermiştir. Günümüz 2023 senesi için *PTPN22* geni özel bir gen olma özelliğini kaybetmiştir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yapılan tezin amaçlarından biri olan prognozdeki uygulama için seçilen primer ve dendritik hücre çalışmaları yeterli olamamıştır.

Yeni tanı ile kontrol numuneleri arasında anlamlı sonuçlar elde edilememiştir. Yeni tanı alan bireylerde belirgin olan bir değer mevcut değildir. Periferik kandan mononükleer ayırma işlemi ya da DH zenginleştirme protokolleri uygulanırsa bir gelişme bulunabilir. CD14⁺ ve CD66b⁺ dahil edilirse monosit-dendritik hücreler arasındaki iletişim üzerine gidilen çalışma ile patogenezi açısından farklı değerlendirmeler elde edilebilir.

PTPN22, bağışıklık sistemindeki görev bozukluğunda ve otoimmünitenin gelişiminde önemli roller oynar. Ayrıca *PTPN22* geni, T ve B hücrelerinde ve doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinde patojenik öneme sahiptir. Yapılan çalışmalarda *PTPN22*, otoimmün hastalıklarda terapötik bir hedef olarak seçilebilir olmayı sağlayacağı düşünülmüş. Bu sebepten dolayı ile bu gen seçilmiş olup gen ekspresyon seviyesine bakabilmek için RT-qPCR çalışması yapılmıştır.

Tezin olgu-kontrol çalışmasında, T1DM'de *PTPN22* R620W (rs2476601) gen ekspresyonunun hastalığa yatkınlık sağlayan genetik faktörlerden biri olup olamayacağı araştırıldı. Türk popülasyonundaki (n=31) T1DM grupları (yeni tanı, eski tanı, kontrol) arasında *PTNP22* geninin diğer gen grupları (*CTLA-4*, *INS*, *HLA-DR4* gibi) ile kombinasyon yapıp karşılaştırılmalı bir PCR yapılmalıdır.

Seçilen genin primerlerinde ileri primer dizisi olarak 5'-AGGCAGACAAAACCTATCCTACA-3' ve geri primer dizi olarak 5'-TGGGTGGCAATATAAGCCTTG-3' seçilmişti. Yapılabilecek diğer moleküler-genetik çalışmalarda, seçilen primerlerin dizimi genin farklı bölgelerinden dizayn edilebilir.

Polimorfizm çalışmalarında 100 ve daha fazla hastalar ile çalışma yapılırsa daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi beklenmektedir.

Bu düşünceler ve çıkan analiz sonuçlarına dayanarak T1DM ve dendritik hücreler arasındaki ilişkiyi anlamak ve prognoz-patogenezinin altında yer alan immünofenotipleme ve moleküler mekanizmaların aydınlatılması adına daha uzun süreli ve daha geniş immünofenotipik ve moleküler değişiklikler içeren ileri düzey prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Atkinson MA, Eisenbarth GS. (2001). Type 1 diabetes: New perspectives on disease pathogenesis and treatment. In: *Lancet*.
2. Clark M, Kroger CJ, Tisch RM. (2017). Type 1 diabetes: a chronic anti-self-inflammatory response. *Front Immunol.* 8:1898.
3. Robertson CC, Rich SS. (2018). Genetics of type 1 diabetes. *Curr Opin Genet Dev.* 50:7–16.
4. Heath WR, Carbone FR. (2009). Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces. *Nat Immunol.* 10(12):1237–44.
5. Fucikova J, Palova-Jelinkova L, Bartunkova J, Spisek R. (2019). Induction of tolerance and immunity by dendritic cells: mechanisms and clinical applications. *Front Immunol.* 10:2393.
6. TÜRKDİAB. (2021). Diabetes Mellitus tanı, sınıflama ve izlem ilkeleri *Diabetes Tanı ve Tedavi Rehberi* - Bölüm 1.1, sayfa 14-17.
7. Stenstrom G, Gottsäter A, Bakhtadze E, Berger B, Sundkvist G. (2005). Latent autoimmune diabetes in adults: definition, prevalence, β -cell function, and treatment. *Diabetes.* 54(2): S68–72.
8. Robbins SL, Cotran RS, Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. (2010). Robbins and Cotran pathologic basis of disease. In: Robbins and Cotran pathologic basis of disease. p. 1450.
9. Devendra D, Liu E, Eisenbarth GS. (2004). Type 1 diabetes: recent developments. *Bmj.* 328(7442):750–4.
10. Harjutsalo V, Sund R, Knip M, Groop PH. Incidence of type 1 diabetes in Finland. *JAMA.* 2013;310(4):427–8.
11. Bell RA, Mayer-Davis EJ, Beyer JW, D'Agostino Jr RB, Lawrence JM, Linder B, et al. (2009). Diabetes in non-Hispanic white youth: prevalence, incidence, and clinical characteristics: the SEARCH for Diabetes in Youth Study. *Diabetes Care.* 32(2): S102–11.
12. ABACI A, Böber E, Büyükgebiz A. (2007). Tip 1 diyabet. *Güncel Pediatri.* 5(1):1–10.
13. Poyrazoğlu Ş, Bundak R, Abalı ZY, Önal H, Sarıkaya S, Akgün A, et al. (2018). Incidence of type 1 diabetes in children aged below 18 years during 2013-2015 in northwest Turkey. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 10(4):336.
14. Rewers M, Ludvigsson J. (2016). Environmental risk factors for type 1 diabetes. *The Lancet.* 387(10035):2340–8.
15. Söker S. (2005). Dendritik Hücreler. *Dicle Tıp Dergisi,* 3, 158-160.
16. Codner E, Acerini C, Craig ME, Hofer S, Maahs DM. (2018). ISPAD clinical practice consensus guidelines 2018: introduction to the limited care guidance appendix. *Pediatr Diabetes.* 19:326–7.
17. Franz MJ, Bantle JP, Beebe CA, Brunzell JD, Chiasson JL, Garg A, et al. (2002). Evidence-based nutrition principles and recommendations for the treatment and prevention of diabetes and related complications. *Diabetes Care.* 25(1):148–98.
18. Chiang JL, Kirkman MS, Laffel LMB, Peters AL. (2014). Type 1 diabetes through the life span: a position statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care.* 37(7):2034.
19. Care D. (2010). Jan: 33 Suppl. 1: S62-S69. "Diagnosis and classification of diabetes mellitus." *American Diabetes Association. Diabetes care,* 33(Supplement_1), S62-S69.
20. Visagie E. (2018). *Young adults' experience of social support in effective diabetes management* (Doctoral dissertation, North-West University).
21. Moreau A, Alliot-Licht B, Cuturi M, Blancho G. (2017). Tolerogenic dendritic cell therapy in organ transplantation. *Transplant International.* 30(8):754–64.
22. Lipscomb M. F., Wilder, J. A., & Masten, B. J. (2007). Dendritic cells and their role in linking innate and adaptive immune responses. In *The biology of dendritic cells and HIV infection* (pp. 45-84). Boston, MA: Springer US.
23. Collin M, McGovern N, Haniffa M. (2013). Human dendritic cell subsets. *Immunology.* 140(1):22–30.
24. Patente TA, Pinho MP, Oliveira AA, Evangelista GCM, Bergami-Santos PC, Barbuto JAM. (2019). Human dendritic cells: their heterogeneity and clinical application potential in cancer immunotherapy. *Front Immunol.* 9:3176.
25. Morel PA. (2013). Dendritic cell subsets in type 1 diabetes: friend or foe? *Front Immunol.* 4:415.
26. Maverakis E, Kim K, Shimoda M, Gershwin ME, Patel F, Wilken R, et al. (2015). Glycans in the immune system and the altered glycan theory of autoimmunity: a critical review. *J Autoimmun.* 57:1–13.
27. McKenna K, Beignon AS, Bhardwaj N. (2005). Plasmacytoid dendritic cells: linking innate and adaptive immunity. *J Virol.* 79(1):17–27.

28. Jongbloed SL, Kassianos AJ, McDonald KJ, Clark GJ, Ju X, Angel CE, et al. (2010). Human CD141+ (BDCA-3) + dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *Journal of Experimental Medicine*. 207(6):1247–60.
29. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood., *Blood*. American Society of Hematology. Vol. 116.
30. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. (2013). The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol*. 31:563–604.
31. Taneli F. (2007). Flow sitometri tekniği ve klinik laboratuvarlarda kullanımı. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*. 5(2):75–82.
32. Youli Z, Shahjahan M, Chang CC. (2009). Basic principles of flow cytometry. basic concepts of molecular pathology. *Molecular Pathology Library*. 2:139–46.
33. Demirel GY, Deniz G, Demiralp EE. (2010). Lenfosit immünofenotipleme için kılavuz bilgiler. *Türk İmmünoloji Derneği Akan Hücre Ölçer Alt Grubu*. 1–19.
34. Roy J. and Lucille A. Carver. University of Iowa, College of Medicine, Flow Cytometry Facility. 2023 [cited 2023 Jun 13]. Fluorescence Minus One (FMO) Controls. Available from: [[https://medicine.uiowa.edu/flowcytometry/protocolssample-prep/sample-preparation-analysis/fluorescence-minus-one-fmo-controls#:~:text=A%20Fluorescence%20Minus%20One%20\(FMO,FMO%20control%20for%20each%20fluorochrome\)](https://medicine.uiowa.edu/flowcytometry/protocolssample-prep/sample-preparation-analysis/fluorescence-minus-one-fmo-controls#:~:text=A%20Fluorescence%20Minus%20One%20(FMO,FMO%20control%20for%20each%20fluorochrome)].
35. Giza S, Goulas A, Gbandi E, Effraimidou S, Papadopoulou-Alataki E, Eboriadou M, et al. (2013). The role of PTPN22 C1858T gene polymorphism in diabetes mellitus type 1: First evaluation in greek children and adolescents. *Biomed Res Int*. 2013.
36. Johns Hopkins University. Johns Hopkins University. 2023 [cited 2023 Jul 20]. OMIM *600716. Available from: [<https://www.omim.org/entry/600716?search=%2A600716&highlight=%2A600716>]
37. Johns Hopkins University. Johns Hopkins University. 2023 [cited 2023 Jul 20]. OMIM %222100. Available from: [<https://www.omim.org/entry/222100>]
38. Stanford SM, Bottini N. (2014). PTPN22: the archetypal non-HLA autoimmunity gene. *Nat Rev Rheumatol*.10(10):602–11.
39. Bottini N, Musumeci L, Alonso A, Rahmouni S, Nika K, Rostamkhani M, et al. (2004). A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet*. 36(4):337–8.
40. Rhee I, Veillette A. (2012). Protein tyrosine phosphatases in lymphocyte activation and autoimmunity. *Nat Immunol*. 13(5):439–47.
41. Bottini N, Peterson EJ. (2014). Tyrosine phosphatase PTPN22: multifunctional regulator of immune signaling, development, and disease. *Annu Rev Immunol*. 32:83–119.
42. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. (2002). Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res*.30(6):1292–305.
43. Thermo Fisher-Scientific. Thermo Fisher-Scientific. [cited 2023 Mar 19]. Molecular Biology Spotlight Articles, Basic Principles of RT-qPCR, Thermo-Scientific. Available from: [<https://www.thermofisher.com/tr/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/spotlight-articles/basic-principles-rt-qpcr.html>]
44. Harvard Medical School, The Massachusetts General Hospital. PrimerBank PCR Primers for Gene Expression Detection and Quantification [Internet]. 2006 [cited 2023 Apr 9]. Available from: [<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>]
45. Kent J. The Regents of The University of California. 2022 [cited 2023 Apr 20]. UCSC In-Silico PCR. Available from: [<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>]
46. Lotze MT, Thomson AW. (2004). Measuring Immunity: Basic Science and Clinical Practice. *Measuring Immunity: Basic Science and Clinical Practice*.
47. Wang K, Nishimoto KP, Mehta RS, Nelson EL. (2006). An alternative flow cytometry strategy for peripheral blood dendritic cell enumeration in the setting of repetitive GM-CSF dosing. *J Transl Med*. 4:1–15.
48. Thermo Fisher-Scientific. Multiparameter analysis of murine regulatory T cells and dendritic cells with the Attune NxT Flow Cytometer, Attune NxT Flow Cytometer User Guide [Internet]. [cited 2023 Jun 9]. Available from: [<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/life-sciences/cellanalysis/Files/0415/App-Note-Attune-NxT-Mouse-10-color-with-foxp3.pdf>]

49. Doğan E, E. E., Rasulova, N., Hacışahinoğulları, H., Yenidünya Yalın, G., Soyluk Selçukbiricik, Ö., Gül, N., Kubat Üzüm, A. (2022). COVID-19 İlişkili Yeni Tani Diabetes Olgularımızın Klinik Ve Laboratuvar Özellikleri. 43. *Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Kongresi* (pp.234-235). Antalya, Turkey.
50. Giannoukakis N, Phillips B, Finegold D, Harnaha J, Trucco M. (2011). Phase I (safety) study of autologous tolerogenic dendritic cells in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care*. 34(9):2026–32.
51. Shoda LKM, Young DL, Ramanujan S, Whiting CC, Atkinson MA, Bluestone JA, et al. (2005). A comprehensive review of interventions in the NOD mouse and implications for translation. *Immunity*. 23(2):115–26.
52. Allen JS, Pang K, Skowera A, Ellis R, Rackham C, Lozanoska-Ochser B, et al. (2009). Plasmacytoid dendritic cells are proportionally expanded at diagnosis of type 1 diabetes and enhance islet autoantigen presentation to T-cells through immune complex capture. *Diabetes*. 58(1):138–45.
53. Vuckovic S, Withers G, Harris M, Khalil D, Gardiner D, Flesch I, et al. (2007). Decreased blood dendritic cell counts in type 1 diabetic children. *Clinical immunology*.123(3):281–8.
54. Liu YJ. (2001). Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell*. 106(3):259–62.
55. Li G, Cheng L, Su L. (2021). Phenotypic and Functional Study of Human Plasmacytoid Dendritic Cells. *Curr Protoc*. 1;1(4).
56. Purvis HA, Clarke F, Montgomery AB, Colas C, Bibby JA, Cornish GH, et al. (2020). Phosphatase PTPN22 Regulates Dendritic Cell Homeostasis and cDC2 Dependent T Cell Responses. *Front Immunol*. 4;11.
57. Ivashkiv LB. (2013). PTPN22 in Autoimmunity: Different Cell and Different Way. Vol. 39, *Immunity*. p. 91–3.
58. Begovich AB, Carlton VEH, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, et al. (2004). A Missense Single-Nucleotide Polymorphism in a Gene Encoding a Protein Tyrosine Phosphatase (PTPN22) Is Associated with Rheumatoid Arthritis. *Am. J. Hum. Genet*. Vol. 75.
59. Kawasaki E, Awata T, Ikegami H, Kobayashi T, Maruyama T, Nakanishi K, et al. (2006). Systematic search for single nucleotide polymorphisms in a lymphoid tyrosine phosphatase gene (PTPN22): Association between a promoter polymorphism and type 1 diabetes in Asian populations. *Am J Med Genet*. 140 A(6):586–93.
60. Lee YH, Rho YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG, Nath SK, et al. (2007). The PTPN22 C1858T functional polymorphism and autoimmune diseases - A meta-analysis. *Rheumatology*. 46(1):49–56.
61. Klinker MW, Schiller JJ, Magnuson VL, Wang T, Basken J, Veth K, et al. (2010). Single-nucleotide polymorphisms in the IL2RA gene are associated with age at diagnosis in late-onset Finnish type 1 diabetes subjects. *Immunogenetics*. 62(2):101–7.
62. Bluestone JA, Herold K, Eisenbarth G. (2010). Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. Vol. 464, *Nature*. p. 1293–300.
63. gnomAD browser [Internet]. 2014 [cited 2023 Jul 14]. Available from: https://gnomad.broadinstitute.org/variant/1-114377568-A-G?dataset=gnomad_r2_1

EK-2: Olgu Rapor Formu

Tip 1 Diabetes Mellitus Hastalarında Prognoz ve Patogenezinde Dendritik Hücrelerin Önemi

Adı Soyadı:

Tarih:

Tel:

Doğum Tarihi:

Yaş:

Cinsiyet:

Boy:

Kilo:

Hasta hangi çalışma grubuna dahil?

Olgu grubu / kontrol grubu

Tip 1 Diabetes Mellitus dışında bilinen bir hastalığı var mı?

Hayır / Evet. Varsa hangi hastalık?.....

Başka bir hastalık için tedavi alıyor mu?

Hayır / Evet

LABOROTUVAR DEĞERLERİ

İnsülin:

C-Peptid:

HbA1c:

Üre/Kreatinin:

Glukoz:

Kolesterol:

LDL:

Trigliserid:

HDL:

Anti İnsulin Antikor:

EK-3.Bilgilendirilmiş Onam Formu

Değerli katılımcı,

Bu araştırma, Sağlık Bilimleri Üniversitesi İmmünoloji anabilim dalı öğrencisi Tamay Seda Taşçı'nın yüksek lisans tezi kapsamında ve Biyokimya idari sorumlusu Prof. Dr. Nilgün Işıksaçan danışmanlığında yürütülecek olan bilimsel bir çalışmadır.

Araştırmanın içeriği Tip 1 Diabetes Mellitus hastalarındaki hücrelerinin ölçülmesi ve gen poliformizmine bakılmasını kapsamaktadır. Toplanan veriler sadece bilimsel amaçlarla kullanılacak, kimliğinizi ortaya çıkarabilecek kayıtlar gizli kalacak, elde edilen kişisel bilgiler ve uygulanacak testlere verdiğiniz cevaplar araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi saklı tutulacaktır.

Araştırma süreci boyunca sizden beklenen, yönergelere dikkatli bir şekilde uymak ve ölçekler üzerinde yer alan soruları dürüst şekilde cevaplamaktır. Hiçbir sorumluluk altından kalmadan soruların bir kısmına cevap vermeme, araştırmaya katılmayı reddetme veya araştırmadan çekilme hakkına sahip olacaksınız.

'Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen araştırmacı tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi biliyorum.'

Gönüllü Katılımcı

Araştırmacı

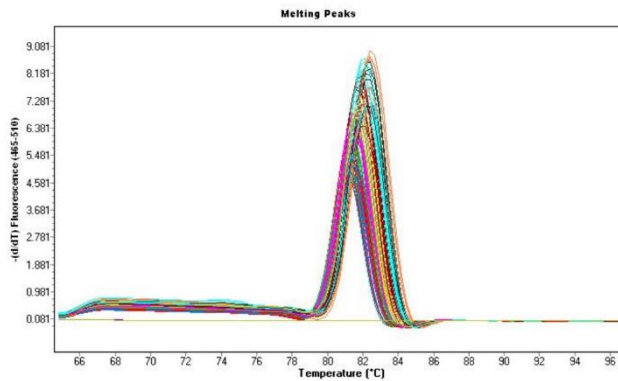
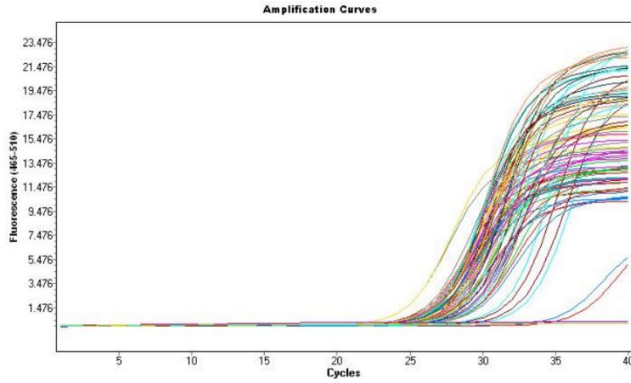
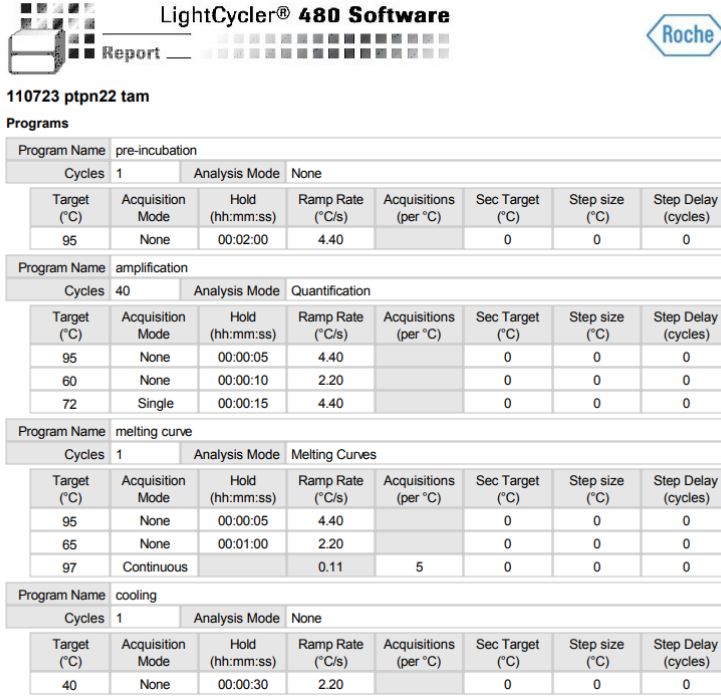
Tamay Seda Taşçı

İmza

İmza

EK-4. LightCycler 480 II, RT-qPCR *PTPN22* Geninin Çalışma Raporu, Amplifikasyon Eğrileri ve Erime Noktası Hesaplamalı Eğrisi

Başlığın sırasına göre şekiller sırasıyla verilmiştir.



EK-5. LightCycler 480 II, RT-qPCR *GADPH* Geninin Çalışma Raporu, Amplifikasyon Eğrileri

Başlığın sırasına göre şekiller sırasıyla verilmiştir.

LightCycler® 480 Software
Report

Roche

100723 gapdh tam

Programs

Program Name	Cycles	Analysis Mode
pre-incubation	1	None

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:02:00	4.40		0	0	0

Program Name amplification

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:05	4.40		0	0	0
60	None	00:00:10	2.20		0	0	0
72	Single	00:00:15	4.40		0	0	0

Program Name melting curve

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:05	4.40		0	0	0
65	None	00:01:00	2.20		0	0	0
97	Continuous		0.11	5	0	0	0

Program Name cooling

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
40	None	00:00:30	2.20		0	0	0

