

164156



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİSTEMİK LUPUS ERİTEMATOZUS'DA
CD8+CD28- SUPRESÖR T HÜCRELERİ**

AYSIN TULUNAY
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
İMMÜNOLOJİ BİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. Emel DEMİRALP

İSTANBUL-2005

ÖNSÖZ

Tezimin planlanma, yürütülme ve yazılma aşamalarında benden yardım ve desteğini esirgemeyen; bilgisi, deneyimleri ve kişiliği ile her zaman örnek aldığım danışmanım Sayın Doç Dr. Emel Ekşioğlu Demiralp'e; eğitimim süresince olduğu gibi tez aşamamda da önemli katkıları bulunan değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Haner Direskeneli ve Sayın Doç. Dr. Şule Yavuz'a; ekip arkadaşlarım Yeşim Elbir, Gözen Özilhan ve Tuba Akdeniz'e sonsuz teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Önsöz	I
İçindekiler	II
Kısaltmalar	III
Tablolar	IV
Şekiller	V
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. CD28 Molekülü ve Kostimülasyon	5
4.2. Self Toleransın Sağlanması	6
4.3. Supresör T Hücreleri	8
4.4. CD8 Supresör T Hücreleri	10
4.5. CD8+CD28- Supresör T Hücreleri	11
4.5.1. Tip 1 CD8 Supresör T Hücreleri	12
4.5.2. Tip 2 CD8 Supresör T Hücreleri	13
4.5.3. Tip 3 CD8+ Supresör T Hücreleri	13
4.6. Sistemik Lupus Eritematosus	14
5. GEREÇ VE YÖNTEM	16
5.1. Hasta Seçimi	16
5.2. Periferik Kan Mononükleer Hücre ve Polimorfonükleer Hücre İzolasyonu	16
5.2.1. Lizat ile Periferik Kan Mononükleer Hücre ve Polimorfonükleer Hücre İzolasyonu	16
5.2.2. Yoğunluk Gradyent Santrifüjü ile Periferik Kan Mononükleer Hücre İzolasyonu	16
5.3. Periferik Kan Mononükleer Hücre Yüzey Molekül Ekspresyonu Tayini	17
5.4. CD8+ Populasyonun Zenginleştirilmesi	18
5.5. Hücre İçi IL-10 ve Perforin Tayini	19

5.5.1. Hücre Yüzey Monoklonal Antikorlarının Fiksasyonu	19
5.5.2. Hücre İçi İşaretleme Metodu	19
5.5.3. Hücre İçi IL-10 Sitokin Tayini	19
5.5.4. Hücre İçi Perforin Tayini	19
5.6. Hücrelerin PHA ile Uyarılması	20
5.7. Flow Sitometrik Analiz	20
5.8. Hastalık Aktivitelerinin Tayini	20
5.9. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler	21
6. BULGULAR	22
6.1. Hücre Yüzey Molekül Ekspresyonları	22
6.1.1. CD8 ve CD28 Molekülleri Yüzey Ekspresyonları	22
6.1.2. Kostimülatör Moleküllerin Tayini	27
6.2. Hücre İçi IL-10 Sitokin Düzeyleri	28
6.3. Hücre Yüzeyi TGF- β Reseptörü Ekspresyonu	29
6.4. Hücre İçi Perforin Seviyeleri	30
6.5. PHA Uyarımı ile CD8+CD28- T Lenfosit Populasyonu	30
6.6. Hastalık Aktiviteleri	32
7. TARTIŞMA	34
8. KAYNAKLAR	38
9. ÖZGEÇMİŞ	48

KISALTMALAR

- AICD:** Activation induced cell death (Aktivasyon sonucu oluşan hücre ölümü)
- ALPS:** Autoimmune lymphoproliferative syndrome (Otoimmün lenfoproliferatif sendrom)
- ANA:** Antinükleer antikor
- anti ds-DNA:** Anti-double stranded DNA (Anti-çift sarmallı DNA)
- AS:** Ankilozan Spondilit
- BSA:** Bovine Serum Albumin
- CD40L:** CD40 Ligand
- DC2:** Plazmasitoid dendritik hücreler
- EAE:** Experimental Allergic Encephalomyelitis
- FSC:** Forward Scatter (önden saçılım)
- GM-CSF:** Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
- GVDH:** Graft Versus Host Disease
- HIGM:** X-Linked Hyper-IgM Syndrome
- IFN- γ :** Interferon gamma
- IgG:** İmmünglobulin-G
- IL:** İnterlökin
- ILT:** Immunoglobulin-Like Transcript (İmmünglobulin benzeri transkript)
- mAB:** Monoklonal Antikor
- MBP:** Myelin Basic Protein
- MHC:** Major-Histocompatibility-Complex
- MS:** Multipl Skleroz
- NK:** Natural Killer
- NKT:** Naturel Killer T
- NOD:** Non-Obese Diabetic
- PBMC:** Periferal Blood Mononuclear Cells (Periferik kan mononükleer hücre)
- PBS:** Phosphate Buffered Saline (Fosfat tampon çözeltisi)
- PHA:** Phytohemagglutinin
- PNL:** Polimorfonükleer Lökosit
- RA:** Romatoid Artirit

RBC: Red Blood Cell (Kırmızı kan hücreleri)

SLE: Sistemik Lupus Eritematosus

SLEDI: SLE Disease Activity Index (SLE hastalık aktivite indeksi)

snRNP : Small nuclear Ribonucleoprotein (Küçük nükleer ribonükleoprotein)

SSC: Side Scatter (Yandan saçılım)

TCR: T Cell Receptor (T hücre reseptörü)

TGF- β : transforming growth factor- β

Th3: T helper 3 (Th3)

TNFR: Tümör Nekrozis Faktör Reseptör

Treg: Regülatör T Hücreleri



TABLÖLAR

	<u>Sayfa</u>
Tablo I. PBMC yüzey molekül ekspresyonu tayininde kullanılan mAb'ler	18
Tablo II. SLE hastalarında ve sağlıklı bireylerin monositlerindeki CD80 ve CD86 ekspresyonu ortalamaları	27
Tablo III. CD8'ce zenginleştirilen popülasyonlarda hücre içi IL-10 sitokin düzeyleri ortalamaları	29
Tablo IV. SLEDİ skoru ve oto-antikörlara göre CD8+CD28- T hücre popülasyonları	33



ŞEKİLLER

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. Sağlıklı bireyler ve SLE hastaları arasında ortalama CD8 molekülü yüzey ekspresyonu	22
Şekil 2. Sağlıklı bireyler ve SLE hastaları arasında ortalama CD28 molekülü yüzey ekspresyonu	23
Şekil 3. Sağlıklı bireyler ve SLE, RA, AS hastaları arasında CD8+ T lenfositlerdeki ortalama CD28- populasyon dağılımı	24
Şekil 4. Sağlıklı bireyler ve SLE, RA, AS hastaları arasında CD8+ T lenfositlerdeki ortalama CD28+ populasyon dağılımı	25
Şekil 5. Sağlıklı bir bireyin ve bir SLE hastasının CD8 ve CD28 molekülleri yüzey ekspresyonlarını gösteren flow sitometri örneği	26
Şekil 6. Sağlıklı bireyler ve SLE hastaları arasında CD40 molekülü yüzey ekspresyonu ortalamaları	28
Şekil 7. Sağlıklı bireylerde CD8+CD28- ve CD8+CD28+ populasyonlarındaki, 48 saat PHA uyarımıyla ve uyarım olmaksızın perforin seviyesi ortalamaları	30
Şekil 8. Sağlıklı bireylerde, 120. saat sonunda; uyarım öncesi, 2.5, 5, 10 ve 100 µg/ml PHA uyarımıyla ortalama CD8+CD28- populasyon dağılımı eğrisi	31
Şekil 9. Sağlıklı bireylerde, 5µg/ml PHA uyarımıyla; uyarım öncesi, uyarım sonrası 72. ve 120. saatte ortalama CD8+CD28- populasyon dağılımı eğrisi	32

1. ÖZET

Sistemik Lupus Eritematosus (SLE), oto-antikor ve immün kompleks üretimiyle karakterize prototipik bir otoimmün hastalıktır. İmmün sistem hücrelerinin etkileşimlerdeki bozulmalar self-toleransın kaybına ve oto-antikor üretimine neden olmaktadır. CD8+CD28- fenotipindeki T hücre popülasyonlarının antijen sunucu hücrelerle direkt kontakla ya da anti-inflamatuvar sitokinler salgılayarak, yardımcı T hücrelerinin reaktivitelerini engelledikleri ve baskılayıcı mekanizmayı başlatarak B hücreleri tarafından oto-antikor üretiminin baskılayabilecekleri gösterilmiştir. Bu çalışmada 53 SLE hastasının periferik kan CD8+CD28- T hücre popülasyonları sağlıklı bireyler ile karşılaştırılmıştır.

SLE hastaları ve sağlıklı bireyler arasında total CD8 ve CD28 miktarlarında bir fark bulunmazken, CD8+ T hücrelerindeki CD28- popülasyon dağılımı SLE hastalarında anlamlı olarak düşük bulunmuştur (Sırası ile %44±20, %58±13; p<0.01). Bununla beraber, SLE hastalarının CD8+ T hücrelerindeki CD28+ popülasyonlarının dağılımı anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Sırası ile, %56±20, %42±3; p<0.01). SLE hastalarının monositlerindeki kostimülasyon molekülleri CD80 ve CD86 arasında fark bulunmazken SLE hastalarında sağlıklı bireylere oranla CD40 molekülünün anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır (Sırası ile, %89±9, %74±17; p<0.01). Gruplar arasında CD8+ hücrelerce zenginleştirilmiş popülasyonlardaki IL-10 seviyeleri arasında bir fark bulunmamıştır. CD8+CD28- ve CD28+CD28+ hücre popülasyonları arasında perforin seviyesinde farka rastlanmamış; farklı PHA konsantrasyonundaki uyarımlar sonucunda ve zamanla CD8+CD28- popülasyonunda miktar olarak bir değişim gözlemlenmemiştir. SLE hastalarının CD8+CD28- T hücrelerindeki azalma, T hücre baskılanmasında bir kusurun bulunduğunu ve otoreaktif B hücrelerine T hücre yardımını arttırdığını düşündürmektedir.

2. SUMMARY

CD8⁺CD28⁻, Suppressive, T Cells in Systemic Lupus Erythematosus

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a prototypic autoimmune disease characterized by the production of autoantibodies and immune complexes. Impaired interactions between immune cells including T cells, monocytes, dendritic cells and B cells lead to loss of self-tolerance and autoantibody production. Recently, it has been shown that a CD8⁺CD28⁻ phenotype of T cell population inhibits the reactivity of T helper cells either by a contact dependent mechanism or with secreting anti-inflammatory cytokines, initiating a suppressive loop which results in suppression of antibody production by B cells. In this study, we have explored the peripheral blood CD8⁺CD28⁻ T cell population in 53 patients with SLE in comparison to healthy controls.

Although no difference in total CD8 and CD28 counts has been found, the percentage of CD28⁻ cells within CD8⁺ population has been found significantly decreased in patients with SLE compared to healthy subjects (44%±20 vs 58%±13, respectively $p<0.01$). In contrast, the ratio of CD28⁺ population within CD8⁺ T cells were significantly increased in SLE group (56% ± 20 vs 42% ± 13, $p<0.01$). While there were no significant differences in the expression of co-stimulatory molecules CD80 and CD86, CD40 expression on monocytes was found significantly decreased in patients with SLE (89%±9 vs 74%±17, respectively $p<0.01$). No difference in IL-10 expressions in CD8⁺ enriched populations was observed in patients with SLE in comparison to healthy controls. Neither a discrepancy in perforin levels among CD8⁺CD28⁻ vs CD28⁺CD28⁺ populations, nor a change in frequency of CD8⁺CD28⁻ T cells has been observed after distinct concentrations of PHA stimulation and time. Decreased CD8⁺CD28⁻ T cell population may reflect the impaired T cell suppression and increased T cell help to autoreactive B cells in SLE.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

İmmün sistemin temel özellikleri arasında kendinden olan ve olmayı tanıyıp ayırt etmesi yer almaktadır. İmmün sistem hücrelerinin “self-antijen”lere yanıt vermemeleri “tolerans” ile sağlanabilmektedir. Self-toleransın kaybı otoimmün reaksiyonlar ile sonuçlanır.

Otoreaktif hücreler birçok mekanizmayla kontrol edilmektedirler. Klonal seleksiyon yoluyla timusta self-reaktif T hücrelerinin delesiyonu santral tolerans mekanizmalarının başında yer almaktadır. Neonatal timektomiden sonra otoimmün hastalıkların oluştuğunu (13, 67, 70, 73) ve periferde self-reaktif lenfositlerin bulunduğunu gösteren (46, 52, 83, 87) çeşitli çalışmalar klonal seleksiyonun otoimmüniteyi kontrol eden tek mekanizma olmadığını ortaya çıkarmıştır.

Periferde self-antijenlere reaktif hücreler anerji, yoksayma ve aktivasyon sonucu oluşan hücre ölümü (Activation Induced Cell Death: AICD) gibi birçok tolerans mekanizmasıyla kontrol altında tutulmaktadır. Supresyon (baskılama) ise bu periferel tolerans mekanizmalarından biridir.

T hücrelerinin optimal aktivasyonu için, antijenik peptidin ve major-histocompatibility-complex (MHC)’in T hücre reseptörü (T Cell Receptor: TCR) ile birleşmesinin yanı sıra kostimülatör ikinci bir sinyal gerekmektedir. CD28, T lenfositler tarafından eksprese edilen, en iyi tanımlanmış ve en etkili kostimülatör moleküldür. CD28, antijen sunucu hücreler yüzeyindeki B7-1 (CD80) ve B7-2 (CD86)’ye bağlanan 44kDa ağırlığında bir transmembran glikoproteinidir.

CD4+ supresör T hücre alt gruplarının yanında, baskılayıcı özelliği bulunan CD8+ supresör T hücre alt grupları da olduğu ve otoimmünitede rol oynadıkları bilinmektedir (42, 53, 56, 94). CD8+CD28- fenotipindeki bir CD8+ supresör T hücre alt grubu çeşitli çalışmalarda (26, 38, 40, 54, 64) tanımlanmıştır.

SLE, artmış oto-antikor üretimi ve immün kompleks oluşumu ile karakterize, multisistemik bir otoimmün hastalık prototipidir.

CD8+CD28- supresör T hücrelerinin SLE’nin patogenezinde rolü olup olmadığını değerlendirmeyi amaçladığımız bu çalışmada, bu hastalıkta görülen oto-reaktiviteye supresör T hücreleri tarafından etki eden mekanizmaları araştırarak bu

konuyla ilgili çok az sayıdaki mevcut literatür bilgilerine katkıda bulunulması hedeflenilmiştir.



4. GENEL BİLGİLER

Yaşamın temel prensiplerinden biri olan enfeksiyondan korunma, mikroorganizmalara karşı hem doğal hem de adaptif mekanizmalarla yanıt veren immün sistem aracılığı ile gerçekleşmektedir. İmmün sistemin enfeksiyon kontrolünde kullandığı efektör mekanizmalar; pro-inflamatuar sitokin ve kemokinlerin üretilmesi, enfeksiyon bölgesine inflammatuar hücrelerin toplanması, enfekte olan hücreleri lize eden sitotoksik T lenfositler ve natural killer (NK) hücrelerin aktivasyonudur (8, 66).

Bütün immün yanıtlar belirli sınırlar içinde gerçekleşmektedirler. Antijenik bir uyarımdan sonra antikor konsantrasyonu ve efektör T hücre sayısı aşamalı olarak artar, ancak kısa zamanda belli bir miktara erişerek azalmaya başlar. Başka bir deyişle, çoğu immün yanıt nicelik ve nitelik bakımından optimal bir cevap oluşturmak üzere adapte olur (11). Patojenin ortadan kaldırılmasına ya da yayılmasının yavaşlatılmasına yardımcı olan bu immün yanıt eğer etkili bir şekilde kontrol edilmezse şiddetli inflamasyona ve doku hasarlarına neden olabilmektedir. Bu hasara neden olan başka bir etken ise, patojenden gelen antijene yanıt veren immün sistem hücre ve moleküllerinin kendi antijenlerine, yani “self-antijenlere” de yanıt verebilmeleridir. Eğer immün sistemin kendine karşı bu reaktivitesi, diğer bir deyişle otoreaktivite kontrol edilmezse otoimmün hastalıklar oluşabilir (11, 100). Homeostatik işlemler ile lenfosit havuzları sabit düzeylerde tutulur ve otoimmünite kontrol altına alınır. Bunlar oldukça kompleks mekanizmaları içermekle beraber “immünregülasyon” ile sağlanmaktadır (11).

4.1. CD28 Molekülü ve Kostimülasyon

T lenfositler, çoğu immün yanıtın merkezinde yer alan hücrelerdir. T lenfositlerin belirli antijenleri tanımaları ile bu hücrelerin proliferasyonları, farklılaşmaları, efektör işlev kazanmaları ve immün sistemde rol oynayan diğer hücrelere yardım etmeleri, yani aktivasyonları için gereklidir. 1970 yılında Bretscher ve Cohn (19, 20), T lenfositlerin aktivasyonunu göstermek üzere “iki sinyal modeli”ni geliştirmişlerdir. Günümüzde de kabul edilen bu modele göre, T lenfositlerin aktivasyonları için, hücrelerin spesifik antijenik peptidleri tanımalarının, yani ilk sinyalin yanı sıra, antijenden bağımsız ikinci bir “kostimülatör sinyal”e ihtiyaç vardır. Birinci sinyal MHC-peptid kompleksinin TCR ile birleşmesiyle sağlanmaktadır. İkinci

sinyal ise, T hücreleri ve antijen sunucu hücreler yüzeyinde bulunan kostimulatör moleküller ile yollar. Bu kostimulatör sinyal, koruyucu immün yanıtın gücünü arttırırken immünolojik toleransı sağlayarak otoimmüniteyi engeller (90).

CD28, naif ve antijen ile karşılaşmış T lenfositler tarafından eksprese edilen, en iyi tanımlanmış ve en etkili kostimulatör moleküllerdendir. CD28, antijen sunucu hücreler yüzeyindeki B7-1 (CD80) ve B7-2 (CD86)'ye bağlanan 44kDa ağırlığında bir transmembran glikoproteinidir (4).

CD28 kostimülasyonu, interlökin-2 (IL-2) başta olmak üzere sitokin salınımının artmasına, hücre adezyonunun güçlenmesine, antijen sunucu hücre ile bağlandıktan sonra plazma membranının yeniden düzenlenmesine, antiapoptotik gen BCL-XL ekspresyonuna neden olarak ve germinal merkez oluşumunu destekleyerek T hücre yanıtının süresini ve gücünü belirler (22).

TCR'nin, CD28 kostimülasyonu olmaksızın, peptid-MHC kompleksi ile birleşmesi sonucunda apoptoz ya da anergi meydana gelir (4). Non-obese diabetic (NOD) fareler ile yapılan araştırmada (85), NOD farenin CD28 yetersiz fare ile melezlenmesi sonucu oluşan farelerin çok daha şiddetli ve hızlı diyabet geliştirdikleri ortaya çıkmıştır. Aynı zamanda bu farelerde, patolojik immün yanıtı koruyan regülatör T hücrelerin yetersiz olduğu gözlemlenmiştir. Dolayısıyla, CD28'in çok çeşitli mekanizmalarla otoimmüniteyi kontrol etmede rol oynadığı düşünülmektedir (1).

4.2. Self Toleransın Sağlanması

1905'de Ehrlich ve Morgenroth çalışmalarında immün sisteminin, kendinden olanı ve olmayanı ayırt etme özelliği olduğunu, "self-tolerans" ile kendinden olana yanıtız kalarak otoimmüniteyi engellediğini iddia etmişlerdir. Ehrlich'in bu fikrine dayanarak "klonal seleksiyon" hipotezi ortaya çıkmıştır (52, 83, 87). Klonal seleksiyon teorisinin modern yorumuna göre, timusta antijene spesifik reseptörler aracılığı ile antijene bağlanan T hücreleri, MHC molekülünün self-peptid'e bağlanma şekline göre seleksiyona uğrarlar. Timusta, kemik iliği prekürsörleri olan ve çeşitli aşamalarla olgun T hücrelerine dönüşen "timositler" bulunmaktadır. Self-antijenlere yüksek affinite taşıyan timositler, timik farklılaşma esnasında "negatif seleksiyon" denilen bir apoptotik mekanizma ile santral olarak elimine edilirler. Self-reaktif olma potansiyeli olan timositlerin negatif seleksiyon ile elenmeleri ile, self-toleransa sahip bir periferel T

hücre repertuarı oluşmaktadır. Self-toleransın bozulduğu durumlarda ise otoimmünite oluşmaktadır (52, 76).

Ancak, oto-reaktif T hücrelerinin timustaki klonal delesyonu toleransı açıklayan tek mekanizma değildir. Fareler ile yapılan çalışmalarda (13, 67, 70, 73), otoimmün hastalığa sahip olmayan farelerin neonatal timektomiden sonra otoimmün hastalık geliştirdikleri gözlemlenmiştir. Self-antijenlere düşük ya da orta derecede affiniteleri olan T hücreleri timustaki negatif seleksiyondan kaçarak perifere geçmektedirler. Burada, self-peptidler ile aktivasyonları sonucunda proliferasyon olarak patojenik efektör hücrelere dönüşebilirler. Dolayısıyla, bu self-reaktif hücrelerin gelişimlerini ve işlevlerini düzenleyen mekanizmalar aynı zamanda otoimmün hastalıkların oluşumlarını ve ilerleyişlerini de kontrol etmektedir. Bu fikirlerin sonucu olarak, otoimmün hastalıkların oluşma nedeni self-peptidlere yüksek affiniteli hücrelerin eliminasyonundaki yetersizliklerin yanı sıra periferdeki self-reaktif hücre klonlarıdır. Çalışmalar (46, 52, 83, 87), sağlıklı insanlarda da zararlı olma potansiyeli olan self-reaktif lenfositlerin periferde bulduklarını göstermiştir. Sağlıklı hayvanların kuvvetli adjuvantlarla beraber kendilerinden olan moleküller ile immünize edilmeleri sonucunda T hücre aracılığıyla otoimmün doku hasarları görülmüştür (53). Diğer bir araştırmada ise (75), kostimülasyon moleküllerinin ve sitokinlerin dokuya spesifik transgenik ekspresyonları ile self-reaktif T hücrelerinin, transgenleri ekspresyon eden hücrelere yanıt oluşturdukları gösterilmiştir.

Periferik tolerans çeşitli mekanizmalarla işlemektedir. Bunlardan en kolay anlaşılana self-antijenlerin yok sayılmasıdır. Bu yok saymanın nedeni self-antijenin kan ve lenf ile taşınan immün sistem hücrelerinin ulaşamayacağı yerlerde bulunmaları ya da antijenin T hücre yanıtı başlatacak eşik değerine ulaşamamasıdır (101). T hücre sinyalinin işlevsel olması TCR'nin MHC-peptid kompleksi ile bağlanma gücüne ve süresine bağlıdır. T hücrelerinin optimal aktivasyonları ve farklılaşmaları için belli bir eşik değeri gerekmesinin yanı sıra çok yüksek affiniteli TCR'ler apoptotik yolların başlamasına neden olarak AICD'ye yol açarlar (52).

Aynı zamanda, T hücreleri periferde self-antijen ile karşılaştıklarında anerjik hale dönüşebilirler. Anerji, antijen ile karşılaşmadan sonra lenfositin işlevsel olarak inaktif olması ancak yine de bu durumdayken canlılığını sürdürdüğü bir tolerans mekanizması olarak tanımlanmıştır (88). Antijen sunucu hücreler tarafından

kostimülasyonun yetersiz ya da olmadığı durumlarda, düşük affiniteli bir ligand ile TCR sinyali yollanması ile, IL-2 gibi büyüme faktörü sitokinlerin sınırlı olduğu durumlarda veya IL-10 gibi anti-inflamatuar sitokinlerin varlığında tam olarak aktive olmayan T hücreleri, antijene karşı kısmen ya da tamamen yanıtız kalmaktadırlar (88, 100). Anergjik hücrelerin aynı zamanda supresör hücrelerin oluşumunda rol oynadıkları da düşünülmektedir (81).

Bu pasif self-tolerans mekanizmalarının yanı sıra self-reaktif T hücrelerini aktif olarak baskılayan T hücre alt grupları bulunmaktadır (83).

4.3. Supresör T Hücreleri

T hücrelerinin reaktivitesinin, düzenleyici işlevleri olan farklı T hücre popülasyonları tarafından kontrol edilebileceği düşüncesi toleransın açıklanmasında büyük bir gelişmeye neden olmuştur. Supresör, başka bir deyişle regülatör T hücrelerinin iki şekilde oluştuğu düşünülmektedir. Timus tarafından sürekli üretilen, doğal olarak bulunan regülatör T hücrelerinin yanı sıra periferde “tolerojenik” hücrelerle karşılaşarak sonradan oluşan adaptif regülatör T hücreleri bulunmaktadır (66, 101).

Doğal olarak bulunan, supresör aktiviteleri bulunan CD4+CD25+ T hücreleri ilk olarak, Sakaguchi ve ark. (9, 84), T hücreleri olmayan farelerde (atimik nude fare) yaptıkları çalışmada ortaya çıkmış ve regülatör T hücreleri (Treg) olarak adlandırılmışlardır. Bu çalışmalarda (9, 84), IL-2 reseptörünün α zincirini eksprese etmeyen (CD25⁻); CD4⁺ (CD4+CD25⁻) T hücre grubu normal BALB/c farelerden 6 haftalık sinjenik atimik nude farelere transfer edildiğinde, çeşitli organlarda 3. gün timektomiden sonra görülen otoimmün hastalık paternine benzer inflammatuar lezyonlar görülmüştür. Alıcı farelerden bazılarında sistemik otoimmün hastalıklara da rastlanmıştır. CD25⁺ T hücrelerinin farelere tekrar transfer edilmeleri sonucunda otoimmünitenin engellendiği görülmüştür. Doğal olarak oluşan CD4+CD25+ T hücrelerinin varlığı, timusun periferal toleransı kontrol etmesinde klonal seleksiyon dışında da rolü olduğunu göstermiştir (87).

Shevach ve ark. (91, 98) timusta üretildikten sonra, hücrelerin periferal dokulara taşınarak antijene yanıt olarak proliferere olmak yerine, diğer T hücrelerinin proliferasyonlarını baskıladıklarını ortaya koymuşlardır. Bu baskılamanın antijen

sunucu hücrelerin modifikasyonları ya da çözünebilir faktörler aracılığıyla değil de hücre-hücre teması ile olduğu gösterilmiştir. Bu hücreler timusta üretildiklerinden self-antijenlere spesifik oldukları düşünülmektedir (17).

Timusta bu hücrelerin oluşumunu sağlayan sinyaller tam olarak bilinmemektedir. Yapılan araştırmalar (85, 96) CD28 kostimülasyonunun, doğal olarak bulunan Treg hücrelerinin hem timusta oluşumlarını hem de periferal homeostazilerini kontrol ettiğini göstermiştir.

IL-10 varlığında olgun T hücrelerinin alloantijenler ile tekrarlanan uyarımları sonucunda Tr1 olarak tanımlanan baskılayıcı özellikleri bulunan adaptif regülatör CD4+ T hücre alt grubu ortaya çıkmıştır. Doğal olarak oluşan Treg hücrelere benzer olarak bu hücreler de timusta oluşmakta ancak klasik T hücre alt gruplarından ya da timusta oluşan Treg hücrelerinden farklılaşarak meydana gelmektedirler (15, 66, 101).

Doğal olarak oluşan ve adaptif regülatör T hücreleri, mekanizmaları bakımından birbirlerinden ayrılmaktadır. Çalışmalar (55, 72), adaptif regülatör T hücrelerinin transforming growth factor- β (TGF- β) ve IL-10 gibi sitokinler üreterek immünsupresif özellik gösterdiklerini ortaya koymuştur. Bunun aksine doğal olarak oluşan Treg supresyonunun, sitokinden bağımsız bir mekanizmayla, antijen sunucu hücreler ya da diğer T hücreleri ile hücre-hücre teması ile sağlanmaktadır. Adaptif regülatör hücrelerin sitokine bağlı bir mekanizmayla baskılama yaptıkları bilinse de hücre-hücre temasının yine de immünsupresif özellik gösterebilmeleri için gerekli olabileceği düşünülmektedir (17).

Doğal olarak oluşan Treg'lerin aksine adaptif regülatör hücrelerin oluşumları ve işlevleri için kostimülasyon gerekmemektedir (17). Blazar ve ark. araştırmalarında (97), CD28 kostimülasyonu olmadan da alloantijen spesifik Tr1 hücreleri oluşturarak, CD28'den bağımsız bir yolla graft versus host disease (GVHD)'yi engellediğini göstermişlerdir.

Çeşitli otoimmün hastalıklarda, farelerde CD4+CD25+ regülatör T hücrelerin kaybını gösteren çalışmalar çok olsa da insanda bu çalışmalar sınırlı sayıdadır. Otoimmün hastalarda yapılan çalışmalarda bu hücre popülasyonlarının azaldığı ya da supresif işlevlerinin yetersiz olduğu belirlenmiştir (12). Multipl skleroz (MS) (99) ve Romatoid Artrit (RA) (34) hastalarında bu hücre popülasyonları sağlıklılarından miktarca farklı bulunmazken işlevlerinde bozulmalar olduğu bildirilmiştir. Kawasaki hastalığı

(41), tip 1 diyabet (57) ve otoimmün lenfoproliferatif sendrom (autoimmune lymphoproliferative syndrome: ALPS)'ye (16) sahip bireylerde, CD4+CD25- hücre oranının sağlıklı bireylere göre azalmış olduğu gözlemlenmiştir.

Bu regülatör CD4+ T hücre popülasyonlarına ek olarak, antijen veya oto-antijen uyarımlarıyla sonucu IL-10 ya da TGF- β salgılayan adaptif CD8+ regülatör T hücre altgrupları, T helper 3 (Th3) hücreleri, natural killer T hücreleri (NKT) ve $\gamma\delta$ T hücreleri olduğu da bilinmektedir (11, 66).

4.4. CD8 Supresör T Hücreleri

İmmünsupresif işlevleri bulunan CD8+ T hücrelerinin varlığı ilk olarak Gershon ve Kondo'nun çalışmalarında (42) gösterilmiştir. CD8 supresif T hücrelerinin, otoimmünitenin kontrolünde yabancı ve self antijenlere immün yanıtın düzenlenmesinde rol oynadıkları iddia edilmiştir (24). Ancak bunu izleyen araştırmalar, bu iddiayı doğrulayamamışlardır. CD4+CD25+ T hücrelerinin regülatör özelliklerinin anlaşılması ile, son on yılda CD8+ T hücrelerin supresör özellikleri de tekrar gündeme gelmiştir (40).

Çeşitli çalışmalarda (31, 89, 103), insan ve farelerden antijen-spesifik CD8+ supresör T hücreleri izole edilmiştir. Otoimmün bir hastalık modeli olan experimental allergic encephalomyelitis (EAE)'de bu hücrelerin otoimmün yanıtı baskılamada rol oynadığını ortaya konmuştur (53, 56, 94). Myelin basic protein (MBP) ile EAE oluşturulan farelerin ikinci bir immünizasyondan sonra EAE'nin yeniden başlamasına dayanıklı oldukları görülmüştür. İyileşen bu farelerde CD8+ T hücrelerinin çıkartılması ve MBP ile tekrar immünizasyon ile EAE'nin yeniden oluştuğu gözlemlenmiştir. Bunun yanında, EAE'nin başlangıcında, CD8+ T hücreleri çıkartılan ve normal sayıda CD8+ T hücrelerinin yeniden oluşmasına izin verilen fareler EAE'ye dirençli kalmayıp, MBP ile tekrar karşılaştıklarında yeniden EAE geliştirmişlerdir. Bu çalışmalar, in vivo olarak CD8 supresör T hücrelerinin otoimmün EAE'ye direnç sağladıklarını ve patojenik otoimmünitenin yinelenmesini engellediklerini göstermişlerdir (24).

CD8 supresör T hücreleri fenotipik olarak CD28 molekülünün olmayışıyla karakterize edilmişlerdir.

4.5. CD8+CD28- Supresör T Hücreleri

Sirkülasyon kabiliyetinin yanı sıra, T lenfosit sisteminin temel özelliklerinden bir diğeri de çevredeki internal değişikliklere yanıt olarak homeostatik değişimler geçirmeleridir. Birinci ve kostimülatör olan ikinci sinyaller ile T hücre aktivasyonu gerçekleştiği bilinmektedir. Bununla birlikte, dendritik hücreler, doku makrofajları, monositler ve aktive B hücreleri gibi profesyonel antijen sunucu hücrelerin başlıca CD4+ T hücreleri aktive ederek immün yanıt oluşturmalarının yanında, artan kanıtlar internal çevredeki sinyallerin en çok CD8+ T hücre havuzunu değiştirdiği göstermiştir. Bu gibi durumlarda en belirgin değişiklik, CD3 ζ zincirindeki değişiklikler ve CD28'in tamamen kaybolmasıdır. İnternal çevredeki değişiklikler ile CD8+ T hücrelerinin değişimlerinin moleküler temeli ve fizyolojik önemi açıklığa kavuşmamıştır. Aktive olan CD8+ T hücrelerinin, temel fizyolojik olayları düzenlediği düşünülmektedir. CD28 ekspresyonunun kaybıyla beraber CD8+CD28- T hücrelerinin oluşumunun bu düzenleyici mekanizmalar arasında çok önemli bir yeri olduğu düşünülmektedir (5).

CD28 T hücre aktivasyonunda çok önemli bir kostimülatör molekül olsa da insan periferal kanındaki T lenfositlerin büyük bir kısmında CD28 bulunmamaktadır. Sağlıklı insanlarda CD28 çoğunlukla CD4+ T hücrelerinde bulunmaktadır. CD28 eksprese eden CD8+ T hücre yüzdesi ise oldukça değişkendir. Periferal kan CD8+CD28- T hücreleri, büyük, granüllü lenfositlerdir. Diğer fenotipik özellikleri bilinmemektedir (5, 10).

Sirkülasyondaki insan CD8+CD28- T hücre havuzu 15 yıldan fazla zamandır bilinmesine rağmen enfeksiyon sırasında arttıklarının gösterilmesi ile bu popülasyona ilgi artmıştır. HIV hastalarında CD8+CD28- T hücre popülasyonunun arttığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (18, 25, 86).

Araştırmalar (44, 75), CD28-/- farelerin EAE'ye dayanıklı olduklarını göstermiştir. Najafian ve ark. (71), CD28 kostimülasyonu olmadığı durumda CD8+CD28- T hücrelerinin EAE'ye doğal dirençte rol oynadıklarını bulmuşlardır. Bu farelerden, CD8+ T hücrelerini immünizasyondan önce ve 14. günde çıkartıldıklarında hastalık yeniden oluşmaktadır. Buna göre, CD8+CD28- supresör T hücrelerinin baskılayıcı özelliklerinin hastalığın hem başlangıç hem de efektör fazında oluştuğunu göstermişlerdir. Aynı çalışmada, yaban tip farelerin CD8+CD28- T hücrelerinin in vivo ve in vitro olarak EAE'yi baskılama özellikleri bulunmuştur.

4.5.1. Tip 1 CD8 Supresör T Hücreleri

İnsanlarda işlevsel olarak üç tip CD8 supresör T hücresi belirlenmiştir. Suciufoca ve ark. (26, 54, 64), antijen spesifik CD4+ T hücre yanıtını engelleyen CD8+CD28- T hücrelerini göstermişlerdir. Bu çalışmalarda (26, 64), CD8+CD28-supresör T hücreleri, periferik kan mononükleer hücrelerin allojenik, xenojenik veya antijenle uyarılmış sinjenik antijen sunucu hücreler ile çeşitli defalar in vitro olarak uyarılmışlardır. Supresör T hücrelerinin, uyarımı yapan antijen sunucu hücreler üzerindeki MHC sınıf I-antijen kompleksini tanıyarak antijene spesifik CD4 yardımcı T lenfositlerin proliferasyonlarını sağlamalarını engelledikleri gösterilmiştir. CD8+CD28-supresör T hücrelerinin varlığında, CD4+ yardımcı T lenfositlerin anejik hale geçerek CD40 ligand (CD40L) ekspresyonlarında ve IL-2 salgılamalarında bozulmalar olduğu gözlemlenmiştir (26, 28, 63, 64).

CD8 supresör T hücrelerinin MHC sınıf I ile spesifik antijeni tanıyarak baskılayıcı özelliklerini gösterebilmeleri için dendritik hücreler ile birleşmeleri yani hücre-hücre teması gerekmektedir (23, 40). Bu birleşmenin sonucunda, CD40 aracılığı ile diğer kostimülatör moleküller olan B7-1 (CD80) ve B7-2 (CD86)'nın up-regülasyonlarının engellendiği ve dendritik hücre yüzeyinde immünglobulin benzeri transkript-3 (Immunoglobulin-like transcript 3: ILT3) ve immünglobulin benzeri transkript-4 (Immunoglobulin-like transcript 4: ILT4) ekprese edildiği gösterilmiştir (23, 65). Bu sistemde dendritik hücreler, supresör T hücreleri ve antijen spesifik CD4+ yardımcı T hücreleri arasında bir köprü görevi görmektedirler. CD8 supresör T hücrelerinin, dendritik hücrelerinin antijen sunucu özelliklerine etki etmesi ile CD4+ yardımcı T lenfositlerin proliferasyonları engellenmektedir (23, 27). Kalp transplantasyon alıcılarında yapılan çalışmada (29), CD8+CD28- supresör T hücrelerinin, allojenik hücrelerin neden olduğu CD4+ yardımcı T hücrelerinin aktivasyonu ve proliferasyonunu engellediği gösterilmiştir. Kanıtlar (23, 27, 29), transplantasyon hastalarında CD8+CD28- supresör T hücrelerinin, donör antijen sunucu hücrelerindeki CD40 kostimülasyonunu engellemesi ve ILT3 ve ILT4'ün upregülasyonunu sağlamasıyla akut rejeksiyon arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermektedir.

4.5.2. Tip 2 CD8 Supresör T Hücreleri

Diğer bir tip CD8 supresör T hücresi ise in vitro olarak sirkülasyondaki CD8+ lenfositlerin izole edilerek monositler, IL-2 ve granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) ile bir hafta inkübasyonu sonucu oluşturulmuştur (38, 40). Bu CD8 supresör T hücreler spesifik antijenler ile, anti-CD3 monoklonal antikorlarla veya mitojenler ile uyarılan T hücrelerinin proliferatif yanıtlarını engellemişlerdir(14). Aynı zamanda bu tip hücrelerin sitotoksik hücrelerin lize etme özelliklerini de baskıladığı düşünülmektedir (39). Bu tip CD8 supresör T hücre popülasyonunun mekanizması hala tam olarak anlaşılmamış olsa da, antijen sunucu hücreler ile direkt temas kurmadan çözünebilir faktörler aracılığı ile işlevlerini gösterdikleri düşünülmektedir. Hücrelerin hücre-hücre arası direkt temasını engelleyen ancak sitokin geçişine izin veren gözenekli bir membranla uyarılan T hücreleri ayrıldığında, CD8 supresör T hücrelerinin baskılayıcı özelliklerini kaybetmedikleri gösterilmiştir (38). İntrasellüler sitokin çalışmalarında ise (37, 38), interferon gamma (IFN- γ) , IL-6 ve IL-12'nin varlığı ortaya konmuştur. IFN- γ ve IL-6 bloke edildiğinde supresör etkinin tersine döndüğü gösterilmiştir. Dolayısıyla, IFN- γ ve IL-6, direkt olarak ya da diğer sitokinlerin ekspresyonlarını sağlayarak bu CD8 supresör T hücre alt grubunun T hücre proliferasyonunu baskılamasında görev yapmaktadırlar.

4.5.3. Tip 3 CD8+ Supresör T Hücreleri

Gilliet ve ark. (43), diğer bir CD8+ supresör T hücre popülasyonu tanımlamışlardır. Bu popülasyon, izole edilen naif CD8+ T hücrelerinin plazmasitoid dendritik hücreler (DC2) ile uyarılması sonucu ortaya çıkmıştır. Bu hücrelerin oluşumları DC2 'nin antijen sunumu ve IL-10 salgılamasına bağlıdır. DC2'nin uyardığı antijen ile daha fazla uyarılan supresör T hücrelerinin kendileri IL-10 salgılamaya başlamaktadır. Bu tip CD8+ supresör T hücrelerin, naif ve önceden aktive olmamış CD8+ T hücrelerine IL-10 aracılığı ile baskılayıcı özellik gösterdikleri iddia edilmektedir.

Filaci ve ark. (39) GM-CSF uyarımından sonra monositlerin IL-10 salgılamalarıyla da CD8 supresör T hücrelerinin oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Bu hücreler, in vitro olarak sirkülasyondaki CD8+CD28- T hücrelerinden oluşturulmuşlardır. Bu popülasyonun oluşumunda monositler ve CD8+CD28- T hücrelerin, hücre-hücre arası

direkt temasının rol oynamadığı, IL-10 aracılığı ile hem dendritik hücreler gibi antijen sunucu hücreleri hem de antijene spesifik T lenfositleri baskılama özellikleri bildirilmiştir.

4.6. Sistemik Lupus Eritematosus

SLE, artmış oto-antikor üretimi, immün kompleks oluşumu ve immün sistemin yönlendirdiği doku zedelenmeleri ile giden multisistemik ve inflamatuvar bir hastalıktır. Otoimmün hastalıkların prototipi olarak kabul edilen hastalıkta, doku hasarı oto-antijenlere karşı oluşan oto-antikorların direkt etkisi ile veya immün komplekslerin depolanması ile ortaya çıkar. İmmün komplekslerin damar, böbrek, santral sinir sistemine depolanması ile başlayan inflamatuvar yanıt, ikincil doku hasarına neden olmaktadır (2, 69, 77).

SLE hastalarında immün sistemin hem humoral hem hücrel yanıtında anormallikler bulunmaktadır. Bu nedenle SLE patogeneğinde hangi defektlerin esas olduğu bilinmemektedir. SLE'nin başlamasında ve devam etmesinde genetik olarak yatkın bireylerde çevresel faktörlerin rolü olduğu düşünülmektedir (2).

SLE'de T ve B hücrelerinin otoimmün yanıtları sonucu oluşan oto-antikorlar ve immün kompleks yanında otoreaktif T hücreleri de çeşitli organlarda patolojiye neden olmaktadır. Oto-antikorlar, nükleusta, sitoplazmada, hücre yüzeyinde bulunan, immünglobulin-G (IgG) gibi çözünebilir moleküller ve koagülasyon faktörleri gibi self-moleküllere karşı üretilmektedir (69, 77, 92). Nükleustaki self-moleküllere karşı üretilen antinükleer antikorlar (ANA) hastaların %95'inde bulunan en karakteristik oto-antikorlardır. Anti-çift sarmallı DNA (anti-double stranded DNA: ds-DNA) ve anti-Sm antikorlarının varlığı SLE'nin sınıflandırma kriteridir. Küçük nükleer ribonükleoprotein (Small nuclear ribonucleoprotein: snRNP) olarak belirtilen Sm antijeni, uridince zengin bir grup RNA molekülünün çekirdek proteinlerine ya da RNA ile ilişkili proteinlere bağlanmasından oluşmaktadır. Anti-Sm antikorları, snRNP çekirdek proteinlerine birleşirken anti-DNA antikorları DNA üzerinde çok bulunan bir nükleik asit determinantına bağlanır. Hastalık aktivitesi ve zamanla anti-DNA antikor titreleri değişebilmektedir (59, 69, 79).

Lupus oto-antijenlerine karşı self-toleransın kaybolmasında ve böylelikle sistemik otoimmün hastalığın patojenik işlemlerinin gerçekleşmesine neden olan immün

sistemin etkileşimleri tam olarak bilinmemektedir. Çeşitli çalışmalarda (47, 82), normal fareler ve SLE hastalığının patojenizini araştırmak için en iyi model olduğu düşünülen ve kendiliğinden insan SLE'sine benzer lupus sendromu geliştiren MRL/lpr fare soyları arasında, timustaki santral lenfosit seleksiyonunun benzer olduğu gösterilmiştir. Lupus oto-antijenlerine karşı yüksek affiniteli self-reaktif lenfositleri elimine eden santral toleransın bozulmamış olmasına rağmen normal periferal repertuvarda daha düşük affiniteli T ve B hücrelerinin olduğu bilinmektedir. Otoimmünitinin başlamasına santral toleransın değil de periferal toleranstaki kaybın neden olduğu düşünülmektedir (69, 92).

Apoptozis sırasında self-antijenlerin ortaya çıkan bazı epitoplalarının, anormal antijen işlenmesinin, uygun olmayan T hücre yardımının ya da ölçsüz kostimülasyonun SLE oluşumuna neden olabilecekleri bilinmektedir. SLE'de self-toleransın kaybında T hücre sinyali için anormal aktivasyon eşiklerinin ve AICD anormalliklerinin de rol oynadıkları düşünülmektedir (32, 48, 77, 92).

Teorik olarak, yeterli ya da uygun supresör T hücrelerinin eksikliği de SLE patojenizine katkıda bulunabilir (48). Crispin ve ark. araştırmalarında (30), supresör aktiviteleri bulunan CD4+CD25+ regülatör T hücrelerinin miktarlarının aktif SLE sırasında periferal kanda sağlıklı bireylerden ve inaktif hastalığa sahip bireylerden daha düşük olarak saptamışlardır. Ancak bu hücre populasyonunun işlevlerinin SLE'de bozulmuş olup olmadığı ve SLE'deki diğer supresör T hücre alt gruplarının rolleri henüz bilinmemektedir.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Hasta Seçimi

Çalışmamızda; SLE hastalığının patogenizinde CD8+CD28- supresör T hücrelerinin rolü olup olmadığını ve T hücrelerinin supresyon mekanizmalarını incelemek amacı ile, Marmara Üniversitesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Romatoloji Bilim Dalı'nda SLE hastalığı tanısı konmuş ve rutin muayene ile tedavilerine devam eden 53 hasta (yaş: 39±12; 40 kadın:13 erkek) çalışmaya dahil edilmiştir.

SLE hastalarını diğer romatolojik hastalıklarla karşılaştırmak için 20 RA, 10 Ankilozan Spondilit (AS) hastası, hasta kontrolleri olmak üzere çalışmaya alınmıştır.

Sağlıklı olduğu bilinen ve SLE hastalığı ile ilgili herhangi bir bulguya sahip olmayan 34 gönüllü sağlıklı kontrol grubunu oluşturmuştur.

5.2. Periferik Kan Mononükleer Hücre ve Polimorfonükleer Lökosit İzolasyonu

5.2.1. Lizat ile Periferik Kan Mononükleer Hücre ve Polimorfonükleer Lökosit İzolasyonu

Periferik kan mononükleer hücre (PBMC: Periferal Blood Mononuclear Cells) ve Polimorfonükleer Lökosit (PNL), EDTA'lı kandan amonyum bazlı bir lizat solusyonu (0.155M NH₄CL, 0.01M KHCO₃, 0.127M EDTA) kullanılarak elde edilmiştir. 5ml venöz kana 40ml lizat solusyonu ilave edilerek oda ısısında 10 dakika bekletilmiştir. 800 rpm'de, oda ısısında 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılarak pellet, fosfat tampon çözeltisi (PBS; 0.005M K₂HPO₄, 0.005M KH₂PO₄, 0.14M NaCl; pH=7.3) ile oda ısısında 1500rpm'de 10 dakika yıkanmıştır.

5.2.2. Yoğunluk Gradyent Santrifüjü ile Periferik Kan Mononükleer Hücre İzolasyonu

Kültür yapılmak üzere heparinize kandan, PBMC steril şartlarda Ficoll (d: 1077, Sigma-Aldrich Inc.) yoğunluk gradiyent santrifüjü ile ayrılmıştır. Bu amaçla her bireyden 15ml kan alınmış ve 2:1 oranında Ficoll üzerine yayılarak oda ısısında

2000rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında hücreler gradiyent farkına göre, eritrositler en dipte, PBMC'lerin bulunduğu interfaz tabakası ortada ve plazma en üstte bulunacak şekilde ayrılmıştır. İnterfazdan toplanan PBMC'lere PBS eklenerek oda ısısında 1500rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve hücre sayım cihazı ile (Counter T660, Beckman Coulter Inc.) sayımları yapılmıştır.

5.3. Periferik Kan Mononükleer Hücre Yüzey Molekül Ekspresyonu Tayini

Kontrol ve hasta gruplarından alınan kandan amonyum bazlı lizat solusyonu ile veya Ficoll yoğunluk gradiyent santrifüjü ile elde edilmiş ve kültüre edilmiş PBMC'ler, yüzey molekülü ekspresyonu için floresan işaretli monoklonal antikolarla boyanmıştır. Bu amaçla 100µl hücre süspansiyonu üzerine araştırılacak antikolar uygun dilüsyonda eklenerek oda ısısında, 15 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücrelere PBS eklenerek oda ısısında 1500rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve flow sitometri cihazı (FACScan, Becton&Dickinson Corp.) ile yüzey molekül ekspresyonu yüzde olarak saptanmıştır (Tablo I).

Tablo I. PBMC yüzey molekül ekspresyonu tayininde kullanılan mAb'ler

mAb	Spesifitesi	Kaynak
anti-IgG1	Negatif kontrol	Beckman Coulter Inc.
anti-CD45	Pan lökosit	Beckman Coulter Inc.
anti-CD14	Monosit	Beckman Coulter Inc.
anti-CD8	Sitotoksik T hücreleri	Beckman Coulter Inc.
anti-CD28	Kostimülatör molekül, Lenfosit	Beckman Coulter Inc.
anti-CD19	B hücreleri	Beckman Coulter Inc.
anti-CD13	Monosit	Beckman Coulter Inc.
anti-CD80	Kostimülatör molekül, APC	Beckman Coulter Inc.
anti-CD86	Kostimülatör molekül, APC	Beckman Coulter Inc.
anti-CD105	Endoglin, TGF- β reseptörü	Ancell Corp.
anti-CD40	Kostimülatör molekül, APC	Ancell Corp.

5.4. CD8+ Populasyonun Zenginleştirilmesi

CD8+ populasyon tam kandan, antikör tabanlı bir zenginleştirme kokteyli ile (RosetteSep, Stem Cell Thecnologies) yoğunluk gradiyent santrifüjü yoluyla zenginleştirilmiştir. RosetteSep antikör kokteyli, kırmızı kan hücreleri (RBC: Red Blood Cell) ile istenmeyen hücrelerin immünrozet oluşturacak şekilde bağlanmasını prensibine dayanmaktadır. İmmünrozet oluşturan hücrelerin yoğunlukları artmakta ve Fikol yoğunluk santrifüjü ile dibe çökmektedirler.

Hasta ve sağlıklı bireylerin heparinize tam kanlarına antikör eklenerek 20 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. İşaretlenmiş hücre süspansiyonu 2:1 oranında Ficoll üzerine yayılarak oda ısısında 2000rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında hücreler gradiyent farkına göre, RBC ve istenmeyen işaretli hücreler en dipte, CD8+ populasyonca zenginleşmiş interfaz tabakası ortada ve plazma en üstte bulunacak şekilde ayrılmıştır. İnterfazdan toplanan PBMC'lere PBS eklenerek yıkama yapılmıştır. CD8 mAB ile işaretlenerek flow sitometride saflıkları belirlenen hücrelerin yüzey molekül ekspresyonlarına ve hücre içi IL-10 seviyelerine bakılmıştır.

5.5. Hücre İçi IL-10 ve Perforin Tayini

5.5.1. Hücre Yüzey Monoklonal Antikorlarının Fiksasyonu

PBMC, yüzey molekülleri ekspresyonun tayini için monoklonal antikorlar (mAb) ile karanlıkta 15 dakika inkübe edilerek işaretlenmişlerdir. Oda ısısında 1500rpm'de 10 dakika PBS ile yıkama işleminden sonra, yüzey mAb'lerin fiksasyonu için hücrelere %2 paraformaldehit içeren PBS ilave edilerek 15 dakika oda ısısında inkübe edilmişlerdir. PBS ile hücreler tekrar yıkanarak hücre içi işaretlemeye hazır hale getirilmişlerdir.

5.5.2. Hücre İçi İşaretleme Metodu

100µl hücre süspansiyonuna, hücre geçirgenliğini arttırmak amacı ile 1:1 oranında permeabilizasyon solusyonu (FACS permeabilizing solution, Becton&Dickinson Corp.) eklenerek 10 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücreler %0.5 bovine serum albumin (BSA) ve %0.1 sodyum azit içeren PBS ile yıkanarak mAb'ler eklenmiştir. 30 dakika oda ısısında, karanlıkta bekletilen PBMC, PBS ile tekrar yıkanarak flow sitometrik analize hazır hale getirilmiştir.

5.5.3. Hücre İçi IL-10 Sitokin Tayini

Hasta ve kontrol grupları arasında CD8+CD28- supresör T hücrelerinin IL-10 sitokin ekspresyonlarını karşılaştırmak amacı ile, CD8+ T hücrelerince zenginleştirilen PBMC, yüzey mAb ile işaretlenip fikse edildikten sonra hücre içi IL-10 (eBioscience Inc.) boyaması yapılarak flow sitometrik analizleri yapılmıştır.

5.5.4. Hücre İçi Perforin Tayini

Heparinize kandan yoğunluk gradiyent santrifüjü ile elde edilen 1×10^6 hücre/ml PBMC, 5µg/ml Phytohemagglutinin (PHA, Sigma-Aldrich Inc.) ilavesi ile 48 saat boyunca 37°C, %5 CO₂'li ortamda kültür edilmiştir. Kültür edilmeden önce ve edildikten sonra PBMC, yüzey ekspresyon tayini için mAb'ler ile işaretlenip fiksasyonu sağlandıktan sonra anti-Perforin antikor (Ancell Corp.) ile hücre içi işaretlenmeleri yapılmıştır.

5.6. Hücrelerin PHA ile Uyarılması

5 sağlıklı bireyin kanından yoğunluk gradiyent santrifüjü ile izole edilen 1×10^6 hücre/ml PBMC, $2.5 \mu\text{g/ml}$, $5 \mu\text{g/ml}$, $10 \mu\text{g/ml}$ ve $100 \mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarındaki PHA titrasyonu ile uyarılarak 5 gün süresince 37°C , %5 CO_2 'li ortamda kültüre alınmışlardır. Kültürden önce ve kültürün 72. ve 120. saatlerinde CD8+CD28- T hücre popülasyonlarına bakılmak amacıyla mAb'ler ile boyanarak flow sitometrik analizleri yapılmıştır.

5.7. Flow Sitometrik Analiz

Flow sitometri, tek hücre seviyesinde, hızlı çok parametrelili analiz imkanı sağlayan bir yöntemdir. Flow sitometride temel prensip, bir süspansiyon halindeki hücre ya da partiküller lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilerek; hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilmesidir. Oluşan sinyallerin kaynağı, hücrenin büyüklük, granülarite gibi fiziksel özellikleri olabildiği gibi; hücreye bağlanan çeşitli florokromlar da olabilir.

Flow sitometride çeşitli fotodedektörler kullanılarak kompleks hücre süspansiyonunda multiparametrik analizler yapılabilmektedir. Bunlardan önden saçılım (Forward Scatter: FSC) hücrelerin büyüklüklerine göre, yandan saçılım (Side Scatter: SSC) hücrelerin granüler yapılarına göre sınıflandırılmalarını sağlar. Direkt veya indirekt metodlar kullanılarak işaretlenen örneklerin floresan yoğunlukları, elektriksel sinyallere çevrilip, amplifiye olarak analiz edilmektedir. Bu çalışmamızda, hücrelerin yüzey ekspresyonları, hücre içi sitokin ve perforin tayini, hücre proliferasyonunu incelemek amacı ile flow sitometri kullanılmıştır.

5.8. Hastalık Aktivitelerinin Tayini

SLE hastalarının SLE hastalık aktivite indeksi (SLE disease activity index: SLEDI) skorları, Marmara Üniversitesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Romatoloji Bilim Dalı'nda belirlenmiştir.

AtheNA Multi-Lyte ANA test sistemi (Luminex Corp.) ile 25 SLE hastasının ANA'ları, anti ds-DNA, anti-La, anti-Ro, anti-Sm antikorlarının pozitiflikleri ölçülmüştür.

AtheNA Multi-Lyte ANA test sistemi insan serumunda oto-antikörleri ölçmek üzere tasarlanmış çoklu sinyallerle micropartiküllerin floresan işaretlerini tayin eden bir metoddur. Bu metoda bir flow analizörü ve farklı olarak boyanmış ve ayrılabilir mikroboncuklar kullanılmaktadır. Farklı oto-antikörler kovalent olarak mikroboncuk serilerine ayrı ayrı bağlanmış olarak bulunmaktadır. Flow sitometri tabanlı cihaz, serumdaki bu mikroboncukları tanıyıp ayırmaktadır.

SLE hastalarından elde edilen 10µlt serum ve kontrol serumları 1:200 oranında seyreltilerek elde edilen örneklerden 10µlt alınarak 50µlt mikroboncuk süspansiyonu ile 30 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. 150µlt konjugat eklenerek tekrar oda ısısında 30 dakika inkübe edilen örnekler AtheNA cihazında analiz edilmişlerdir.

5.9. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

SLE hastalarından ve kontrol gruplarından elde edilen sonuçlar, her grubun aritmetik ortalaması ve her bir ortalama değerin standart sapması alınarak hesaplanmıştır. İstatistiksel analizler SPSS 11.0 programı ile yapılmış ve 0.05'ten küçük p değerleri ($p < 0.05$) istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

CD8 popülasyonlarındaki CD8+CD28- ve CD8+CD28+ T hücre dağılımları, CD8 popülasyonundaki yüzdeleri hesaplanarak elde edilmiştir. Gruplar arasındaki farklar Student-t testi kullanılarak değerlendirilmiştir.

PHA uyarımı ve hücre içi perforin seviyelerinin analizlerinde bağımsız grupların ortalamalarının farklılığı Mann Whitney-U testi ile değerlendirilmiştir. Bağımlı grupların ortalamalarının karşılaştırılmasında ise Wilcoxon eşleştirilmiş çiftler testi kullanılmıştır.

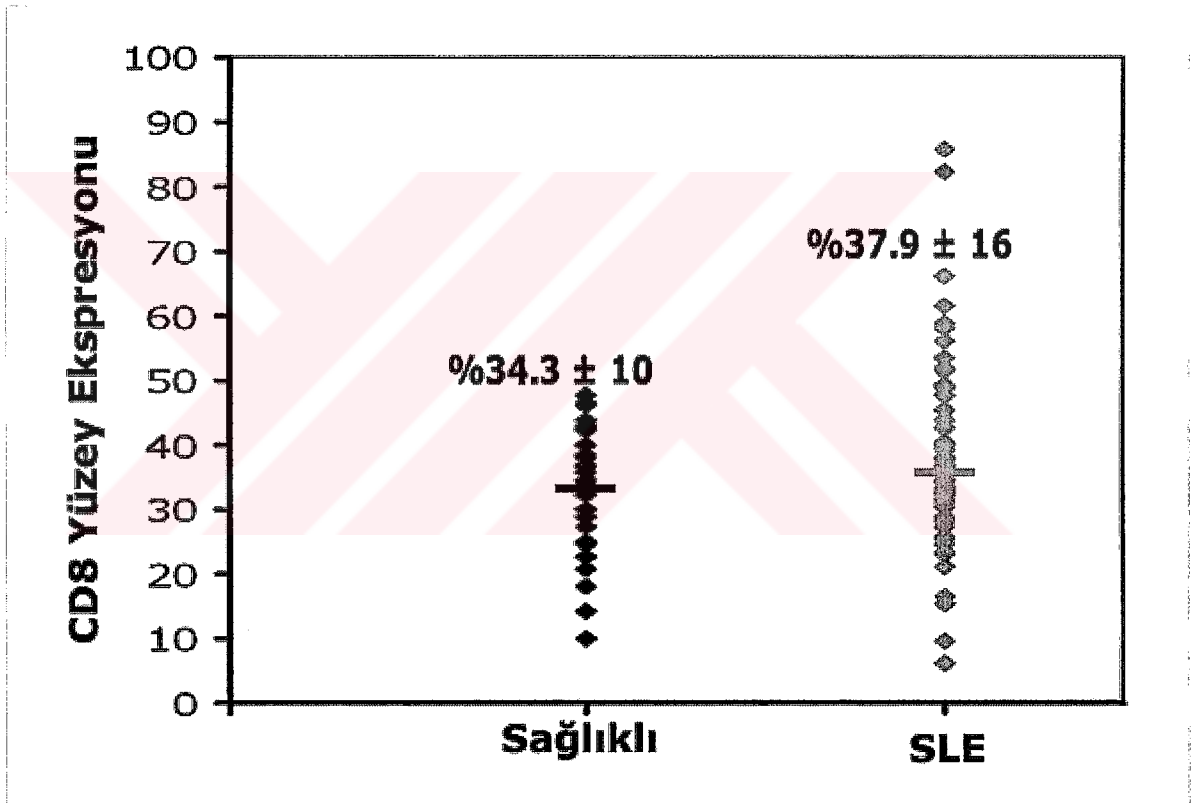
SLEDİ skoru, oto-antikörler ve CD8+CD28- T hücre popülasyonu arasındaki korelasyon Spearman ve Pearson testleri kullanılarak incelenmiştir.

6. BULGULAR

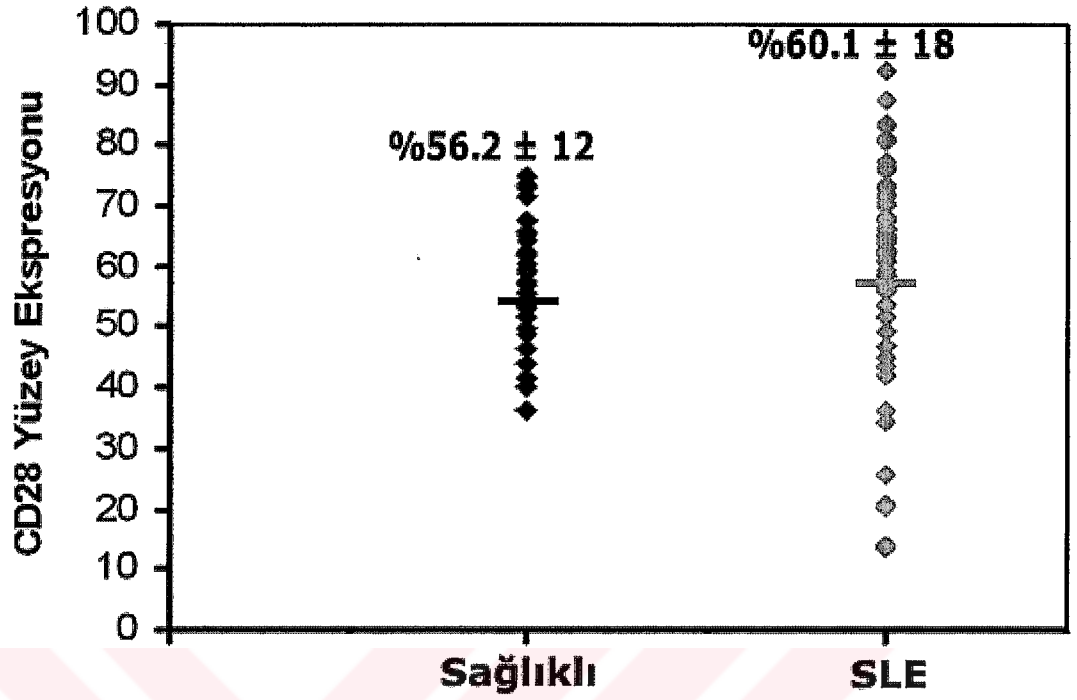
6.1. Hücre Yüzey Molekül Ekspresyonları

6.1.1. CD8 ve CD28 Molekülleri Yüzey Ekspresyonları

SLE hastaları ve diğer otoimmün hastalıklarla ilişkisi bulunmayan sağlıklı bireylerin T lenfositleri yüzeyindeki CD8 ve CD28 moleküllerinin ekspresyonları incelenmiş, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 1, 2).

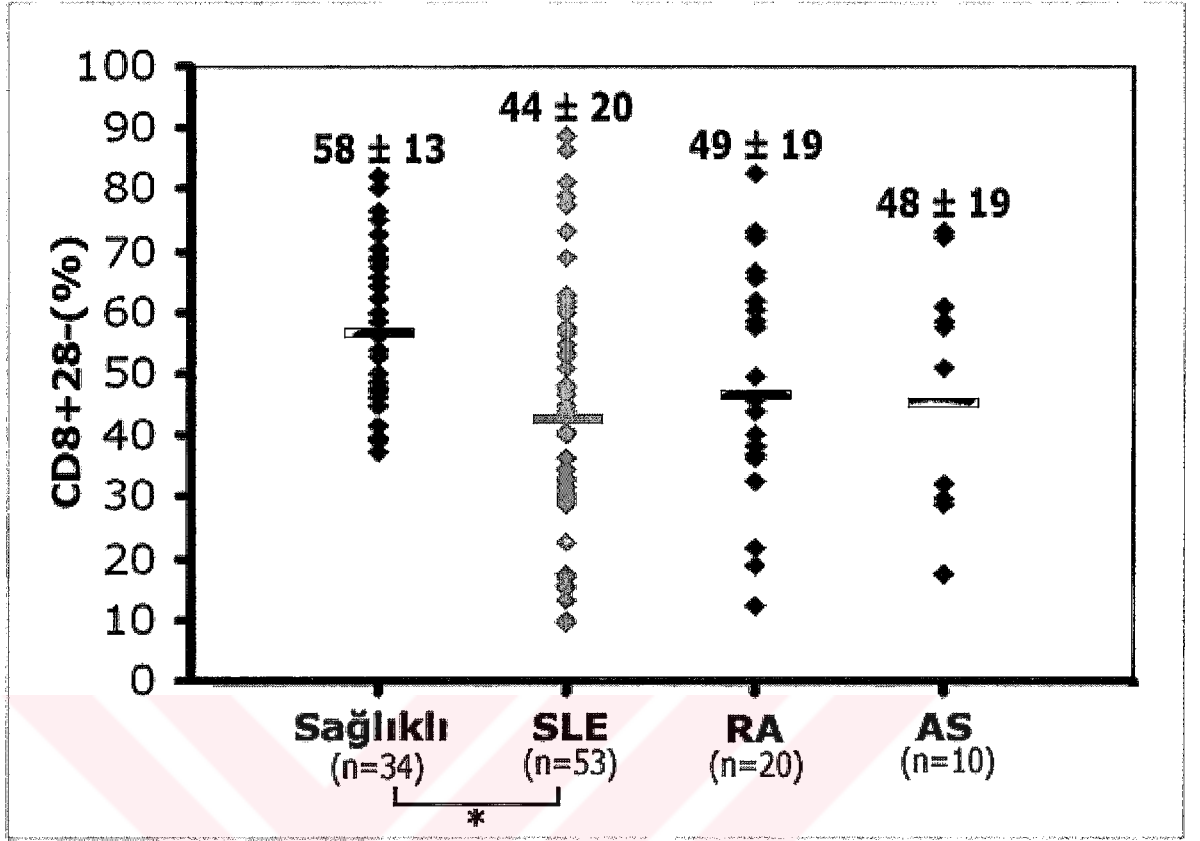


Şekil 1. Sağlıklı bireyler ve SLE hastaları arasında ortalama CD8 molekülü yüzey ekspresyonu (Veriler % cinsinden olup; \pm standart sapmayı göstermektedir).



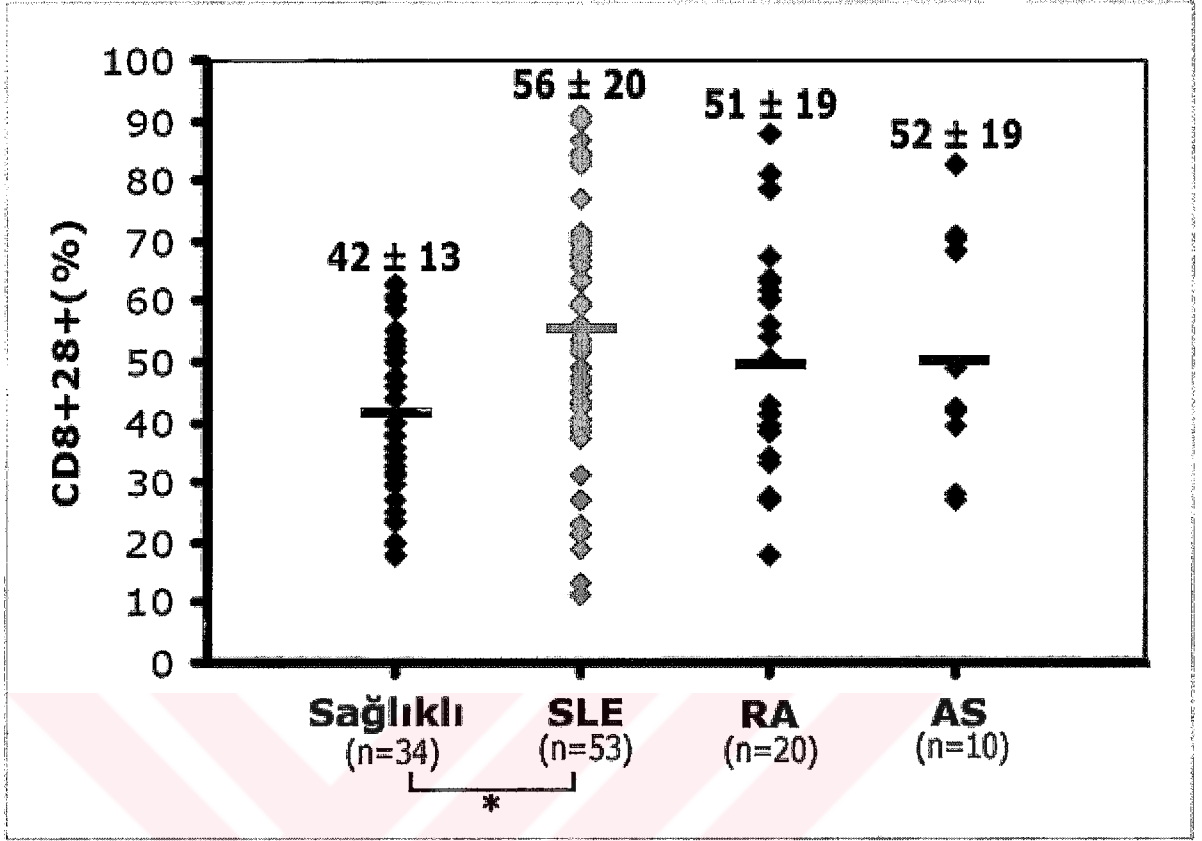
Şekil 2. Sağlıklı bireyler ve SLE hastaları arasında ortalama CD28 molekülü yüzey ekspresyonu (Veriler % cinsinden olup; \pm standart sapmayı göstermektedir).

CD8⁺ hücrelerdeki CD28⁺ ve CD28⁻ olan hücrelerin oranına bakılarak, CD8⁺CD28⁻ ve CD8⁺CD28⁺ populasyonlarının dağılımı hesaplanmıştır. SLE, RA ve AS hastalarının CD8⁺ hücrelerdeki CD28⁻ populasyonlarının oranları sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında; RA, AS hastaları ve sağlıklı bireyler arasında fark bulunmazken ($p > 0.05$), SLE hastalarının CD28 taşımayan CD8⁺ T lenfosit populasyonları sağlıklı bireylere göre anlamlı derecede düşük saptanmıştır ($p < 0.01$) (Şekil 3).

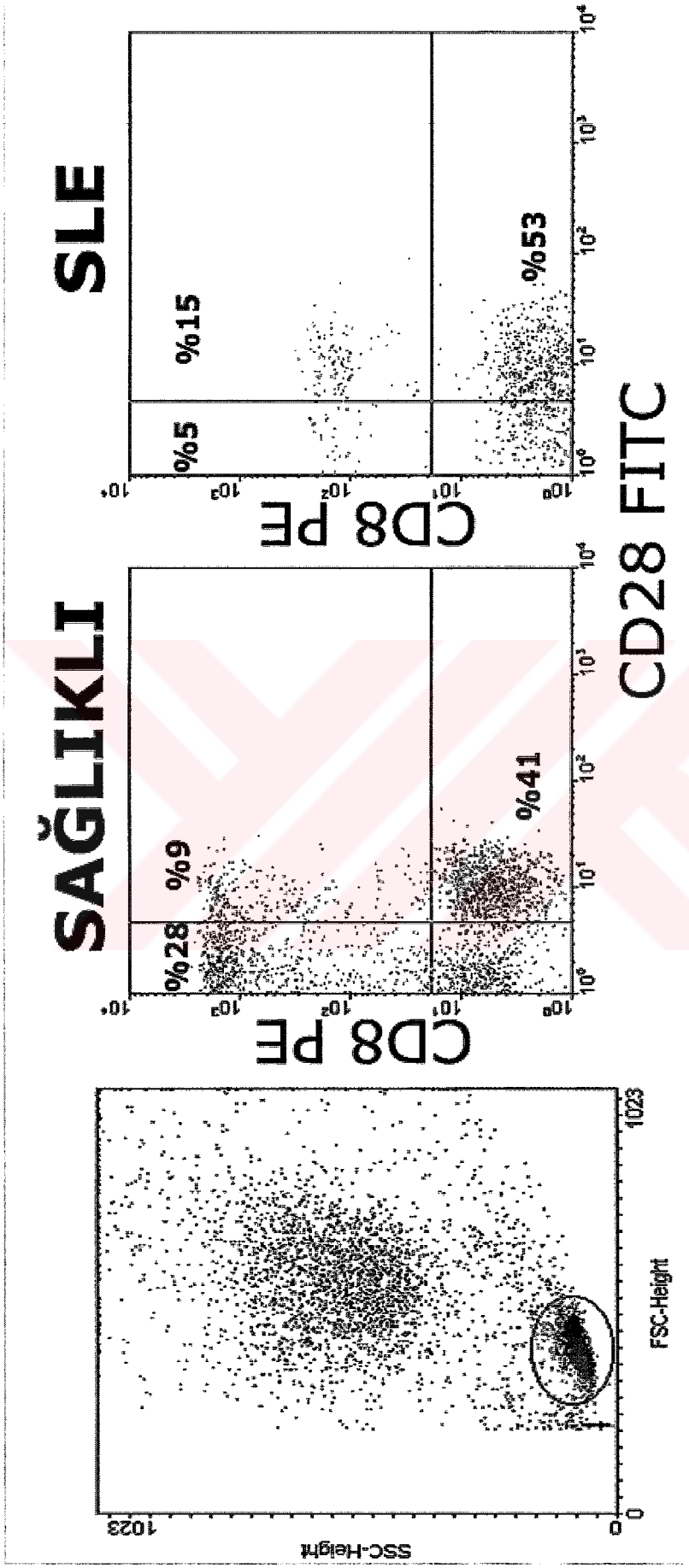


Şekil 3. Sağlıklı bireyler ve SLE, RA, AS hastaları arasında CD8+ T lenfositlerdeki ortalama CD28- populasyon dağılımı (Veriler % cinsinden olup; ± standart sapmayı, n gruplardaki birey sayısını göstermektedir). * $p < 0.01$ (Sağlıklı-SLE)

CD8+CD28- populasyonunun dağılımına uygun olarak CD8+ hücrelerdeki CD28+ populasyonlarının oranları sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında; RA, AS hastaları ve sağlıklı bireyler arasında fark bulunmazken ($p > 0.05$), SLE hastalarının CD8+CD28+ T lenfosit populasyonlarının sağlıklı bireylere göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır ($p < 0.01$) (Şekil 4).



Şekil 4. Sağlıklı bireyler ve SLE, RA, AS hastaları arasında CD8+ T lenfositlerdeki ortalama CD28+ populasyon dağılımı (Veriler % cinsinden olup; ± standart sapmayı, n gruplardaki birey sayısını göstermektedir). *p<0.01 (Sağlıklı-SLE)



Şekil 5. Sağlıklı bir bireyin ve bir SLE hastasının CD8 ve CD28 molekülleri yüzey ekspresyonlarını gösteren flow sitometri örneği (%).

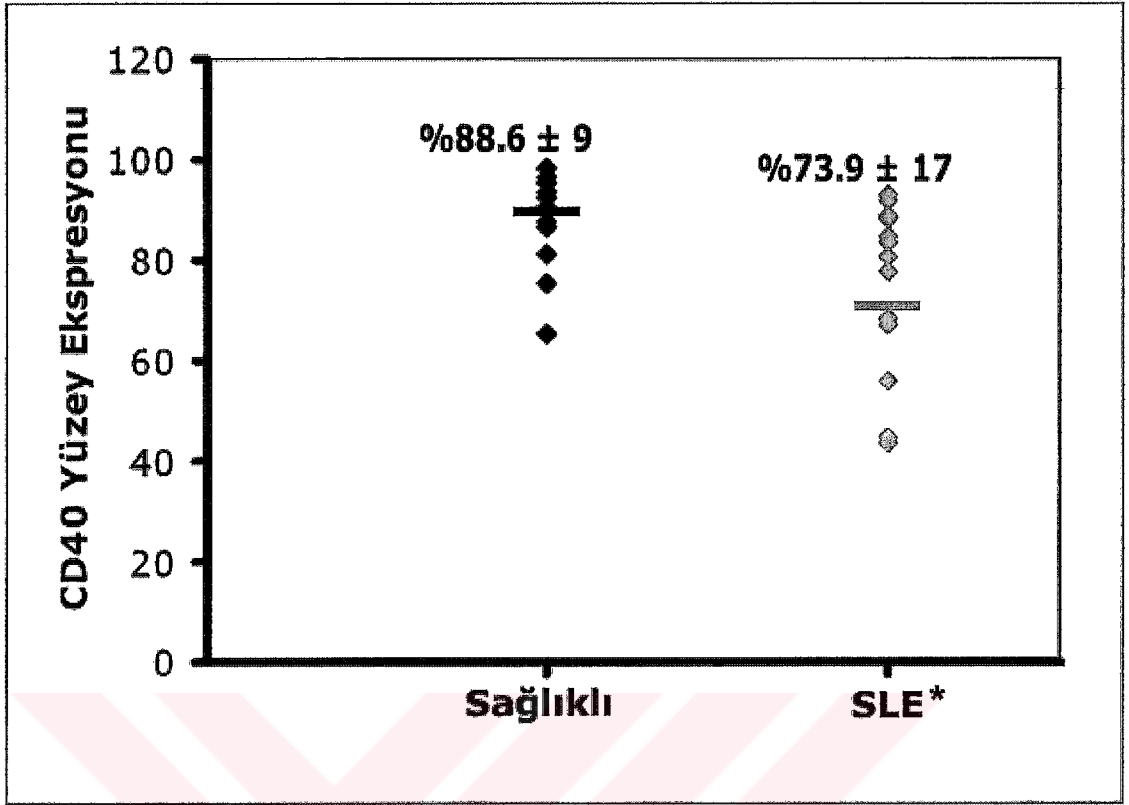
6.1.2. Kostimülatör Moleküllerin Tayini

SLE teşhisi konmuş hastaların monositlerinde kostimülatör moleküller B7.1 (CD80) ve B7.2 (CD86) ekspresyonları sağlıklı bireyler ile karşılaştırıldığında gruplar arasında arasında anlamlı bir farka rastlanmamıştır ($p>0.05$) (Tablo II).

Tablo II. SLE hastalarında ve sağlıklı bireylerin monositlerindeki CD80 ve CD86 ekspresyonu ortalamaları $p>0.05$ (Veriler % cinsinden olup, \pm standart sapmayı, n birey sayısını göstermektedir).

	CD14+CD80+ (%)	CD14+CD86+ (%)
Sağlıklı (n=9)	12 \pm 11	67 \pm 12
SLE (n=10)	23 \pm 19	77 \pm 11

Monositlerdeki diğer bir kostimülatör molekül olan CD40 ekspresyonu incelendiğinde ise SLE hastalarında, sağlıklı bireylere oranla anlamlı derecede düşük oldukları saptanmıştır ($p<0.01$) (Şekil 6).



Şekil 6. Sağlıklı bireyler ve SLE hastaları arasında CD40 molekülü yüzey ekspresyonu ortalamaları (Veriler % cinsinden olup; \pm standart sapmayı göstermektedir). * $p < 0.01$ (Sağlıklı-SLE)

6.2. Hücre İçi IL-10 Sitokin Düzeyleri

PBMC'lerindeki CD8 popülasyonları zenginleştirilen sağlıklı bireylerin ve SLE hastalarının, CD28+ ve CD28- popülasyonlardaki hücre içi IL-10 sitokin düzeyleri incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Tablo III).

Tablo III. CD8'ce zenginleştirilen popülasyonlarda hücre içi IL-10 sitokin düzeyleri ortalamaları $p>0.05$ (Veriler % cinsinden olup, \pm standart sapmayı, n birey sayısını göstermektedir).

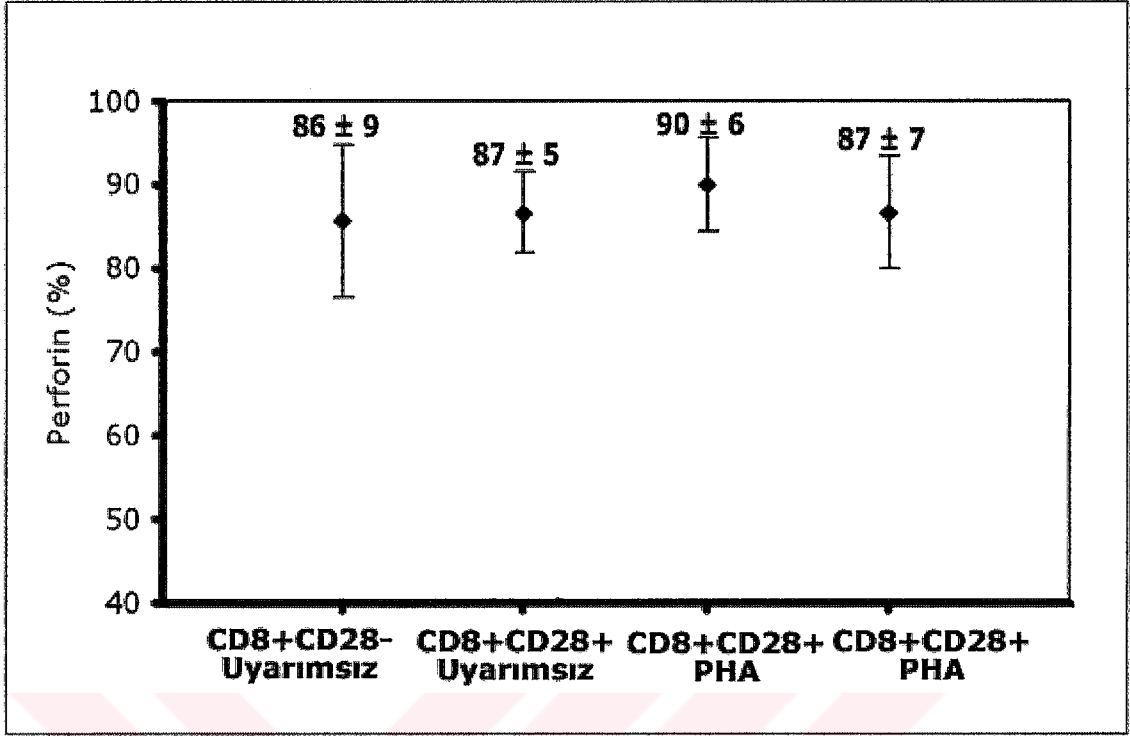
	IL-10+ CD28+ (%)	IL-10+ CD28- (%)
Sağlıklı (n=10)	34 \pm 9	49 \pm 7
SLE (n=14)	46 \pm 12	36 \pm 19

6.3. Hücre Yüzeyi TGF- β Reseptörü Ekspresyonu

SLE teşhisi konmuş hastaların ve sağlıklı bireylerin monositlerdeki TGF- β reseptörü olan CD154 (endoglin) molekülünün hücre yüzeyi ekspresyonları flow sitometri ile analiz edildiğinde gruplar arasında fark bulunmamıştır ($p>0.05$). CD14+CD154+ hücre popülasyonları 10 SLE hastasında % 62 (standart sapma, ± 10), 10 sağlıklı bireyde ise % 64 (standart sapma, ± 17) olarak tespit edilmiştir.

6.4. Hücre İçi Perforin Seviyeleri

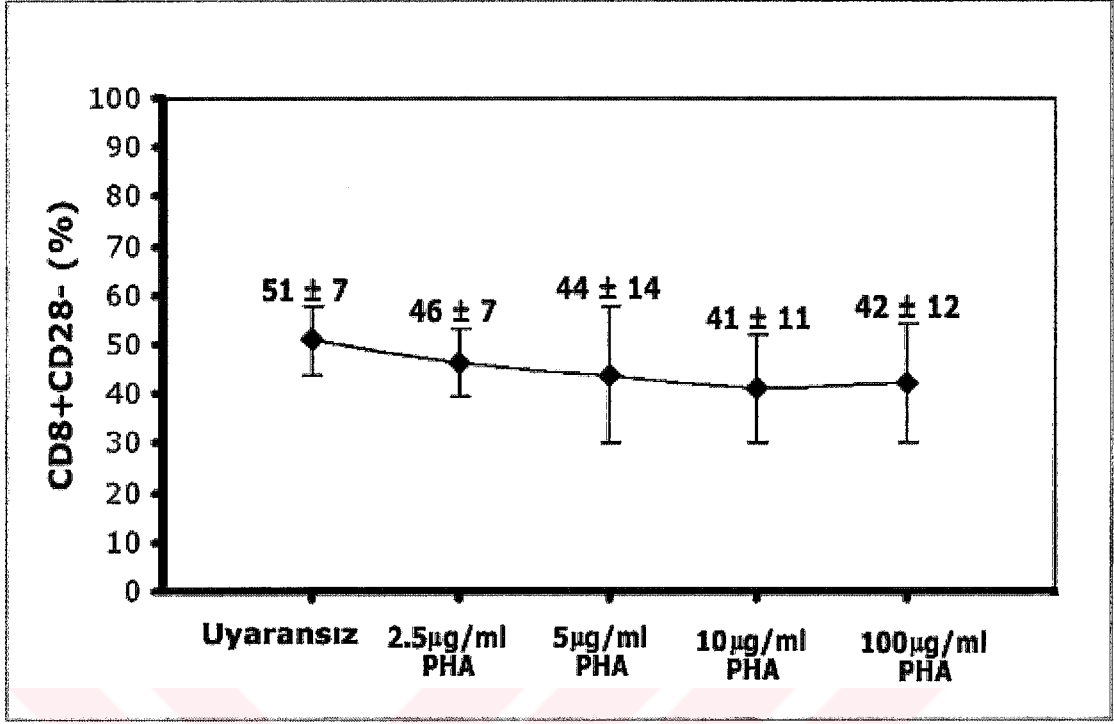
Sağlıklı bireylerde CD8+CD28- ve CD8+CD28+ T hücre popülasyonlarının CD8 T hücrelerinin sitotoksik işlevlerinde rol oynadığı bilinen perforin seviyeleri, 48 saat boyunca PHA ile uyarılarak ve uyarım olmaksızın incelenmiş, gruplar arasında farka rastlanmamıştır ($p>0.05$)(Şekil 7).



Şekil 7. Sağlıklı bireylerde CD8+CD28- ve CD8+CD28+ populasyonlarındaki, 48 saat PHA uyarımıyla ve uyarım olmaksızın perforin seviyesi ortalamaları (Veriler % cinsinden olup; ± standart sapmayı göstermektedir).

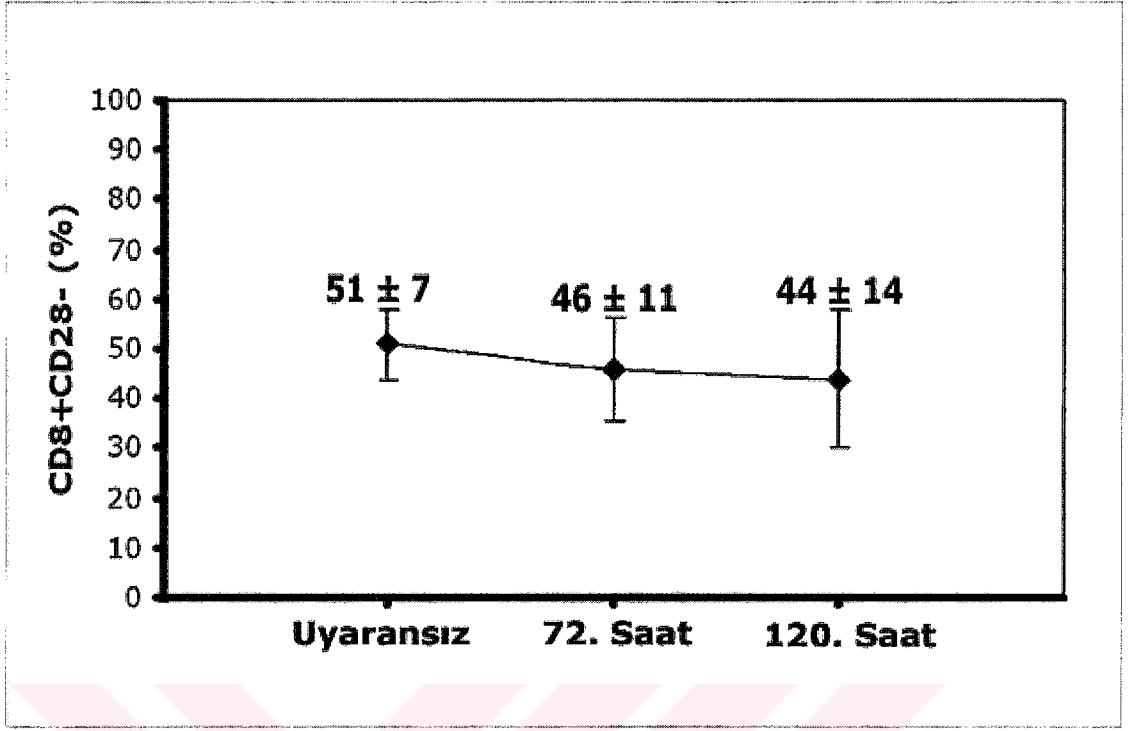
6.5. PHA Uyarımı ile CD8+CD28- T Lenfosit Populasyonu

Uyarım ve zamanla CD8+CD28- T hücre populasyonunda bir değişim bulunup bulunmadığını araştırmak amacı ile farklı konsantrasyonlardaki PHA ile uyarılan PBMC’de farklı zamanlardaki CD8+CD28- T hücre populasyonları flow sitometri ile analiz edilmiştir. Sağlıklı bireylerin PBMC’lerinin, 2.5µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml ve 100µg/ml konsantrasyonlarındaki PHA ile uyarımları sonucu, farklı zamanlarda, PHA titresine göre CD8+ T lenfositlerdeki CD28- populasyon dağılımının anlamlı bir fark göstermediği saptanmıştır ($p>0.05$) (Şekil 8).



Şekil 8. Sağlıklı bireylerde, 120. saat sonunda; uyarım öncesi, 2.5, 5, 10 ve 100 µg/ml PHA uyarımıyla ortalama CD8+CD28- populasyon dağılımı eğrisi (Veriler % cinsinden olup; ± standart sapmayı göstermektedir).

Sağlıklı bireylerin lenfositlerinin PHA uyarımdan önce, uyarım sonrası 72. saatte ve 120. saatte CD28 ekspres etmeyen CD8+ populasyonlarında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 9).



Şekil 9. Sağlıklı bireylerde, 5µg/ml PHA uyarımıyla; uyarım öncesi, uyarım sonrası 72. ve 120. saatte ortalama CD8+CD28- populasyon dağılımı eğrisi (Veriler % cinsinden olup; ± standart sapmayı göstermektedir).

6.6. Hastalık Aktiviteleri

CD8+CD28- supresör T hücrelerinin hastalık aktivitesiyle korelasyonu incelendiğinde istatistiksel bir anlamlılık bulunmamıştır (Tablo IV).

Tablo IV. SLEDİ skoru ve oto-antikorlara göre CD8+CD28- T hücre popülasyonları

	CD8+CD28- T Hücre Popülasyonu(%)
SLEDİ \geq 4	48 \pm 23
SLEDİ < 4	40 \pm 17
ANA +	42 \pm 8
ANA -	53 \pm 4
anti ds-DNA +	34 \pm 23
anti ds-DNA -	52 \pm 18
anti-La +	32 \pm 3
anti-La -	51 \pm 19
anti-Ro +	61 \pm 38
anti-Ro -	49 \pm 17
anti-Sm +	29 \pm 17
anti-Sm -	52 \pm 17

7. TARTIŞMA

SLE hastalığının patogeneğinde hangi defektlerin esas olduğu bilinmemektedir. Çalışmamızda CD8+CD28- supresör T hücrelerinin SLE'nin patogeneğindeki rollerini değerlendirmek amaçlanmıştır. Bu amaçla, SLE hastalarının periferik kanlarındaki CD8+CD28- olan CD8 T hücre popülasyonlarının miktarı sağlıklı kontrollerle karşılaştırılmış ve SLE hastalarında CD8+CD28- T hücrelerinin azalmış olduğu saptanmıştır.

SLE'de çeşitli hücrel immünite anormallikleri tanımlanmıştır (68). Supresör T hücre aktivitesindeki eksikliğin de hastalık patogeneğinde rol oynadığı düşünülmektedir (48, 49, 61). Çeşitli çalışmalarda (3, 21, 45), SLE hastalarının IL-10 ve IL-2 üretimlerinde anormallikler bulunduğu ortaya konulmuştur. Bunun yanı sıra, Crispin ve ark. araştırmalarında (30), SLE hastalarının PBMC'lerindeki, supresör aktiviteleri olan CD4+CD25+ T hücrelerinin, sağlıklı bireylerle göre düşük yüzdelerde bulunduğunu göstermişlerdir. Öte yandan diğeri bir çalışmada, CD4+ T hücrelerinin CD4+CD25+ popülasyonlarının kontrol ve hasta grubu örneklerinde benzer oldukları bildirilmiştir (60). Ancak bu hücrelerle yapılan çalışmalarda CD4+CD25+ T hücre fenotipinin hem aktif hem de regülatör hücreler tarafından eksprese edilmeleri ve bu hücrelere tam olarak spesifik, belirleyici bir molekülün bulunmaması araştırmaları zorlaştırmaktadır (30, 48). Supresör aktiviteleri olan hücrelerin, SLE'deki rolleri büyük ilgi uyandırmakta ve daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır (49).

CD4+CD25+ T hücrelerinin yanı sıra, CD8 supresör T hücrelerinin varlığı ve işlevleri hala gündemde olan bir konudur. Gershon ve Kondo'nun (42), 1971'de supresif işlevleri olan CD8 T hücrelerini tanımlamalarından sonra çeşitli çalışmalar bu hücrelerin immün regülatör özellikleri olduğu görüşünü desteklemişlerdir. İnsanlardan ve farelerden antijene ve alloantijene spesifik CD8 supresör T hücrelerinin izole edilmelerine ek olarak (27, 31, 89, 103), EAE'ye sahip farelerde otoimmün yanıtı baskılayan CD8 supresör T hücre popülasyonlarının tanımlanması ve fonksiyonel olarak karakterize edilmeleri ile bu hücrelerin supresör özellikleri olduğu ve immün yanıtı engelleyebildikleri kanıtlanmıştır (53, 94). Bu çalışmanın sonuçları ise CD8 supresör T hücrelerinin SLE hastalığının patogeneğinde rolü olabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda, SLE hastalığındaki otoreaktiviteye supresör T hücreleri tarafından etki eden mekanizmaların araştırılması hedeflenmiştir. CD8+CD28- T hücreleri için, çeşitli araştırmalarda birbirlerinden farklı supresyon mekanizmaları tanımlanmıştır. Bu mekanizmalardan biri, CD8+CD28- supresör T hücrelerinin hücre-hücre teması yolu ile immün yanıtı baskıladığı yönündedir (23, 40). Suciü-Foca ve ark.'ın (26, 54, 64, 93) tanımladıkları tip 1 CD8+CD28- supresör hücreler, MHC sınıf I-peptid kompleksini tanıyarak antijene spesifik CD4+ T hücre yanıtını baskılamaktadır. Bu tip supresör T hücreleri, antijen sunucu hücreler ile direkt temas kurmakta, antijen sunucu hücreleri köprü olarak kullanarak, kostimülatör moleküller aracılığı ile CD4+ T hücre aktivasyonunu engellemektedirler. Çalışmamızda bu mekanizmanın SLE hastalığında rolü olup olmadığını araştırmak amacı ile monositlerdeki kostimülatör moleküller B7.1 (CD80), B7.2 (CD86) ve CD40 ekspresyonları incelenmiştir. CD40 ekspresyonları SLE hastalarında, sağlıklı bireylere göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur.

CD40, tümör nekrozis faktör reseptör (TNFR) süperaillesinden bir molekül olup, birçok antijen sunucu hücrede eksprese edilmektedir. Ligandı olan CD40L (CD154) ise aktive olmuş olan T hücrelerinde eksprese edilmektedir (51, 58, 62, 95). CD40 ve CD40L kusurlu farelerde yapılan çalışmalarda (80, 102), B hücrelerindeki CD40 ile aktive T hücrelerindeki CD40L birleşmelerinin etkili bir humoral yanıt için gerekli olduğu kanıtlanmıştır. CD40L genindeki mutasyonlardan ötürü oluşan X-linked hyper-IgM syndrome (HIGM)'de otoantikor üretimi ve otoimmün hastalık gelişimi gözlemlenmiştir (35). Ancak patolojik mekanizma tam olarak bilinmemektedir.

CD40 molekülünün monositler, dendritik hücreler, fibroblastlar, keratinositler, endotelial hücreler gibi birçok antijen sunucu hücrede eksprese edilmesinden dolayı humoral immünitinin yanı sıra hücrel immünitede de önemli rol oynadığı düşünülmektedir (51, 58, 62, 95). Monosit-makrofajlardaki CD40'ın CD40L ile birleşmesinin T hücre yanıtının başlamasında büyük rolü olduğu bilinmektedir (95). Aynı zamanda monositlerdeki CD40 birleşmesinin IL-10 üretimine neden olduğu gösterilmiştir (51, 95).

Kumanogoh ve ark. çalışmalarında (58), CD40 yetersiz farelerde, IL-10 ile baskılayıcı işlev gören CD4+CD25- regülatör T hücrelerinin büyük ölçüde azaldığını gözlemlemiş ve CD40-CD40L birleşmesindeki yetersizliklerin, baskılayıcı özellikteki T

hücre oluşumunu azaltarak otoimmüniteye neden olabileceğini bildirmişlerdir. Liu ve ark. ise araştırmalarında (62), CD8+CD28- supresör T hücrelerinin antijen sunucu hücrelerle direkt teması ile CD4+ T hücre yanıtını baskıladığını gösteren bir model geliştirmişlerdir. Bu modele göre, supresör T hücreleri, antijen sunucu hücrelerdeki CD40 sinyalini engelleyerek CD4+ T hücre aktivasyonuna engel olmaktadır. Liu ve ark.'ın modelinin aksine, çalışmamızda SLE hastalarının monositlerindeki CD40 molekülü yüzey ekspresyonlarının düşük bulunması, CD40 sinyalinde bir yetersizliğin olabileceğini göstermektedir. CD40 sinyalindeki bu kusurun, CD8+CD28- supresör T hücrelerinin yeterli miktarda oluşmalarını engelleyebileceği ve böylelikle SLE hastalığında görülen otoreaktiviteye katkıda bulunabilecekleri düşünülmektedir. Aynı zamanda, monositlerdeki azalmış CD40 ekspresyonunun, IL-10 üretiminin azalmasını sağlayarak, hem IL-10 aracılığı ile oluştuğu iddia edilen tip 3 CD8+CD28- supresör T hücre oluşumlarının, hem de IL-10 ile gerçekleşen baskılayıcı işlevin yetersizliğine neden olabileceği düşünülmektedir.

CD8+CD28- supresör T hücreleri için diğer bir supresyon mekanizması ise IL-10 ve TGF- β gibi anti-inflamatuar sitokinler yoluyla baskılamadır (11, 43, 66). Bu işlevdeki CD8 supresör T hücre popülasyonu tip 3 CD8+CD28- supresör T hücreleri olarak tanımlanmışlardır. Bu mekanizmanın SLE hastalığında bir rolünün olup olmadığını araştırmak amacı ile SLE hastaları ile sağlıklı bireyler arasında hücre içi IL-10 seviyeleri ve monositlerdeki hücre yüzeyi Endoglin (TGF- β reseptörü) ekspresyonları incelenmiştir. SLE hastalarındaki CD8+CD28- popülasyonundaki IL-10 seviyelerinde istatistiksel anlamlılığa erişmeyen bir azalma saptanmıştır. Endoglin ekspresyonlarında fark bulunmamaktadır ancak reseptörde azalma olmaması tam olarak TGF- β salgılanmasında bir fark olmadığını yansıtmamaktadır. m-RNA düzeyinde TGF- β ekspresyonunun incelenmesinin mekanizmanın anlaşılmasında daha etkili bir yöntem olacağı düşünülmektedir.

Çeşitli çalışmalarda (33, 50, 74, 78) CD8+CD28- T hücrelerinin yaşla ve zamanla CD8+CD28+ T lenfositlerin senesensinden oluştukları belirtilmektedir. İlk olarak Posnett ve ark. (78), yaşlı bireylerin periferik kanlarından izole ettikleri CD8+ T hücrelerinde oligoklonal CD28- T hücre havuzlarının oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Bir başka çalışmada Effors ve ark. (33) 100 yaş üstü bireylerde ve uzun zamanlı T hücre kültürlerinde CD28+ hücrelerin azaldığını bildirmişlerdir. Yaşla birlikte bazı gruplar

CD8+CD28- T hücrelerinde artış bildirirken (36, 50, 74), diğer gruplar böyle bir korelasyon olmadığını iddia etmektedirler (6, 7). Çalışmamızda uyarım ve zamanla CD8+CD28- T hücrelerinde bir artış bulunup bulunmadığını araştırmak amacı ile farklı konsantrasyonlardaki PHA ile uyarılan lenfositlerde farklı zamanlardaki CD8+CD28- T hücre popülasyonları incelenmiş ve anlamlı bir farka rastlanmamıştır. Bu sonuç, CD8+CD28- T hücrelerinin CD8+CD28+ T hücrelerinden farklılaşmadıklarını, periferde halihazırda bulunuyor olabileceklerini yansıtmaktadır.

Bütün sonuçlar göz önüne alındığında, SLE hastalığında düşük bulunan CD8+CD28- T hücre popülasyonunun T hücre supresyonunda bir yetersizliğe neden olduğu, reaktif CD4+ T hücrelerini baskılayamamalarından dolayı B hücrelerine yardımın artmasını sağlayarak oto-antikor üretimine katkıda buldukları ve otoimmünitede etkili oldukları düşünülmektedir.



8. KAYNAKLAR

1. Abbas A.K.: The control of T cell activation vs. tolerance. *Autoimmun Rev*, 2(3): 115-8, 2003.
2. Ahmad Y.A., Bruce I.N.: Genetic epidemiology: Systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res*, 3(6): 331-6, 2001.
3. Al-Janadi M., Al-Dalaan A., Al-Balla S., Al-Humaidi M., Raziuddin S.: Interleukin-10 (IL-10) secretion in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: IL-10-dependent CD4+CD45ro+ T cell-B cell antibody synthesis. *J Clin Immunol*, 16: 198-207, Abst.: 4, 1996.
4. Alegre M.L., Frauwirth K.A., Thompson C.B.: T-cell regulation by CD28 and ctla-4. *Nat Rev Immunol*, 1(3): 220-8, 2001.
5. Arosa F.A.: CD8+CD28- T cells: Certainties and uncertainties of a prevalent human t-cell subset. *Immunol Cell Biol*, 80(1): 1-13, 2002.
6. Arosa F.A., Oliveira L., Porto G., da Silva B.M., Kruijer W., Veltman J., de Sousa M.: Anomalies of the CD8+ T cell pool in haemochromatosis: Hla-a3-linked expansions of CD8+CD28- T cells. *Clin Exp Immunol*, 107: 548-54, Abst.: 3, 1997.
7. Arosa F.A., Porto G., Cabeda J.M., Lacerda R., Resende D., Cruz E., Cardoso C., Fonseca M., Simoes C., Rodrigues P., Bravo F., Oliveira J.C., Alves H., Fraga J., Justica B., de Sousa M.: Expansions of CD8+CD28- and CD8+ctrvbeta5.2+ T cells in peripheral blood of heavy alcohol drinkers. *Alcohol Clin Exp Res*, 24(4): 519-27, 2000.
8. Artavanis-Tsakonas K., Tongren J.E., Riley E.M.: The war between the malaria parasite and the immune system: Immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clin Exp Immunol*, 133(2): 145-52, 2003.
9. Asano M., Toda M., Sakaguchi N., Sakaguchi S.: Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a t cell subpopulation. *J Exp Med*, 184(2): 387-96, 1996.
10. Azuma M., Phillips J.H., Lanier L.L.: CD28- t lymphocytes. Antigenic and functional properties. *J Immunol*, 150(4): 1147-59, 1993.

11. Bach J.F.: Regulatory t cells under scrutiny. *Nat Rev Immunol*, 3(3): 189-98, 2003.
12. Baecher-Allan C., Hafler D.A.: Suppressor t cells in human diseases. *J Exp Med*, 200(3): 273-6, 2004.
13. Bagavant H., Thompson C., Ohno K., Setiady Y., Tung K.S.: Differential effect of neonatal thymectomy on systemic and organ-specific autoimmune disease. *Int Immunol*, 14(12): 1397-406, 2002.
14. Balashov K.E., Khoury S.J., Hafler D.A., Weiner H.L.: Inhibition of t cell responses by activated human CD8+ t cells is mediated by interferon-gamma and is defective in chronic progressive multiple sclerosis. *J Clin Invest*, 95(6): 2711-9, 1995.
15. Barrat F.J., Cua D.J., Boonstra A., Richards D.F., Crain C., Savelkoul H.F., de Waal-Malefyt R., Coffman R.L., Hawrylowicz C.M., O'Garra A.: In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) t cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by t helper type 1 (th1)- and th2-inducing cytokines. *J Exp Med*, 195(5): 603-16, 2002.
16. Bleesing J.J., Brown M.R., Straus S.E., Dale J.K., Siegel R.M., Johnson M., Lenardo M.J., Puck J.M., Fleisher T.A.: Immunophenotypic profiles in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood*, 98: 2466-73, Abst.: 8, 2001.
17. Bluestone J.A., Abbas A.K.: Natural versus adaptive regulatory t cells. *Nat Rev Immunol*, 3(3): 253-7, 2003.
18. Borthwick N.J., Bofill M., Gombert W.M., Akbar A.N., Medina E., Sagawa K., Lipman M.C., Johnson M.A., Janossy G.: Lymphocyte activation in hiv-1 infection. Ii. Functional defects of CD28- t cells. *Aids*, 8: 431-41, Abst.: 4, 1994.
19. Bretscher P., Cohn M.: A theory of self-nonsel self discrimination. *Science*, 169: 1042-9, Abst.: 950, 1970.
20. Bretscher P.A.: A two-step, two-signal model for the primary activation of precursor helper t cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 185-90, Abst.: 1, 1999.
21. Capper E.R., Maskill J.K., Gordon C., Blakemore A.I.: Interleukin (il)-10, il-1ra and il-12 profiles in active and quiescent systemic lupus erythematosus: Could

- longitudinal studies reveal patient subgroups of differing pathology? *Clin Exp Immunol*, 138: 348-56, Abst.: 2, 2004.
22. Chambers C.A.: The expanding world of co-stimulation: The two-signal model revisited. *Trends Immunol*, 22(4): 217-23, 2001.
 23. Chang C.C., Ciubotariu R., Manavalan J.S., Yuan J., Colovai A.I., Piazza F., Lederman S., Colonna M., Cortesini R., Dalla-Favera R., Suci-Foca N.: Tolerization of dendritic cells by t(s) cells: The crucial role of inhibitory receptors ilt3 and ilt4. *Nat Immunol*, 3(3): 237-43, 2002.
 24. Chess L., Jiang H.: Resurrecting CD8+ suppressor t cells. *Nat Immunol*, 5(5): 469-71, 2004.
 25. Choremi-Papadopoulou H., Viglis V., Gargalianos P., Kordossis T., Iniotaki-Theodoraki A., Kosmidis J.: Downregulation of CD28 surface antigen on CD4+ and CD8+ t lymphocytes during hiv-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 7: 245-53, Abst.: 3, 1994.
 26. Ciubotariu R., Colovai A.I., Pennesi G., Liu Z., Smith D., Berlocco P., Cortesini R., Suci-Foca N.: Specific suppression of human CD4+ th cell responses to pig mhc antigens by CD8+CD28- regulatory t cells. *J Immunol*, 161(10): 5193-202, 1998.
 27. Ciubotariu R., Vasilescu R., Ho E., Cinti P., Cancedda C., Poli L., Late M., Liu Z., Berlocco P., Cortesini R., Suci-Foca Cortesini N.: Detection of t suppressor cells in patients with organ allografts. *Hum Immunol*, 62(1): 15-20, 2001.
 28. Colovai A.I., Liu Z., Ciubotariu R., Lederman S., Cortesini R., Suci-Foca N.: Induction of xenoreactive CD4+ t-cell anergy by suppressor CD8+CD28- t cells. *Transplantation*, 69(7): 1304-10, 2000.
 29. Colovai A.I., Mirza M., Vlad G., Wang S., Ho E., Cortesini R., Suci-Foca N.: Regulatory CD8+CD28- t cells in heart transplant recipients. *Hum Immunol*, 64(1): 31-7, 2003.
 30. Crispin J.C., Martinez A., Alcocer-Varela J.: Quantification of regulatory t cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun*, 21(3): 273-6, 2003.
 31. Damle N.K., Engleman E.G.: Antigen-specific suppressor t lymphocytes in man. *Clin Immunol Immunopathol*, 53: S17-24, Abst.: 2 Pt 2, 1989.

32. Dighiero G., Rose N.R.: Critical self-epitopes are key to the understanding of self-tolerance and autoimmunity. *Immunol Today*, 20(9): 423-8, 1999.
33. Effros R.B., Boucher N., Porter V., Zhu X., Spaulding C., Walford R.L., Kronenberg M., Cohen D., Schachter F.: Decline in CD28+ t cells in centenarians and in long-term t cell cultures: A possible cause for both in vivo and in vitro immunosenescence. *Exp Gerontol*, 29: 601-9, Abst.: 6, 1994.
34. Ehrenstein M.R., Evans J.G., Singh A., Moore S., Warnes G., Isenberg D.A., Mauri C.: Compromised function of regulatory t cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-tnfalpa therapy. *J Exp Med*, 200(3): 277-85, 2004.
35. Facchetti F., Appiani C., Salvi L., Levy J., Notarangelo L.D.: Immunohistologic analysis of ineffective CD40-CD40 ligand interaction in lymphoid tissues from patients with x-linked immunodeficiency with hyper-igm. Abortive germinal center cell reaction and severe depletion of follicular dendritic cells. *J Immunol*, 154: 6624-33, Abst.: 12, 1995.
36. Fagnoni F.F., Vescovini R., Mazzola M., Bologna G., Nigro E., Lavagetto G., Franceschi C., Passeri M., Sansoni P.: Expansion of cytotoxic CD8+ CD28- t cells in healthy ageing people, including centenarians. *Immunology*, 88: 501-7, Abst.: 4, 1996.
37. Filaci G., Bacilieri S., Fravega M., Monetti M., Contini P., Ghio M., Setti M., Puppo F., Indiveri F.: Impairment of CD8+ t suppressor cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *J Immunol*, 166(10): 6452-7, 2001.
38. Filaci G., Fravega M., Fenoglio D., Rizzi M., Negrini S., Viggiani R., Indiveri F.: Non-antigen specific CD8+ t suppressor lymphocytes. *Clin Exp Med*, 4(2): 86-92, 2004.
39. Filaci G., Fravega M., Negrini S., Procopio F., Fenoglio D., Rizzi M., Brenci S., Contini P., Olive D., Ghio M., Setti M., Accolla R.S., Puppo F., Indiveri F.: Nonantigen specific CD8+ t suppressor lymphocytes originate from CD8+CD28- t cells and inhibit both t-cell proliferation and ctl function. *Hum Immunol*, 65(2): 142-56, 2004.
40. Filaci G., Suci-Foca N.: CD8+ t suppressor cells are back to the game: Are they players in autoimmunity? *Autoimmun Rev*, 1(5): 279-83, 2002.

41. Furuno K., Yuge T., Kusuhara K., Takada H., Nishio H., Khajooe V., Ohno T., Hara T.: CD25+CD4+ regulatory t cells in patients with kawasaki disease. *J Pediatr*, 145: 385-90, Abst.: 3, 2004.
42. Gershon R.K., Kondo K.: Infectious immunological tolerance. *Immunology*, 21(6): 903-14, 1971.
43. Gilliet M., Liu Y.J.: Generation of human CD8 t regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med*, 195(6): 695-704, 2002.
44. Girvin A.M., Dal Canto M.C., Rhee L., Salomon B., Sharpe A., Bluestone J.A., Miller S.D.: A critical role for b7/CD28 costimulation in experimental autoimmune encephalomyelitis: A comparative study using costimulatory molecule-deficient mice and monoclonal antibody blockade. *J Immunol*, 164: 136-43, Abst.: 1, 2000.
45. Gonzalez-Amaro R., Portales-Perez D., Baranda L., Abud-Mendoza C., Llorente L., Richaud-Patin Y., Alcocer-Varela J., Alarcon-Segovia D.: Role of il-10 in the abnormalities of early cell activation events of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun*, 11: 395-402, Abst.: 5, 1998.
46. Guerder S., Picarella D.E., Linsley P.S., Flavell R.A.: Costimulator b7-1 confers antigen-presenting-cell function to parenchymal tissue and in conjunction with tumor necrosis factor alpha leads to autoimmunity in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(11): 5138-42, 1994.
47. Herron L.R., Eisenberg R.A., Roper E., Kakkanaiiah V.N., Cohen P.L., Kotzin B.L.: Selection of the t cell receptor repertoire in lpr mice. *J Immunol*, 151: 3450-9, Abst.: 7, 1993.
48. Hoffman R.W.: T cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol*, 113(1): 4-13, 2004.
49. Horwitz D.A., Gray J.D., Zheng S.G.: The potential of human regulatory t cells generated ex vivo as a treatment for lupus and other chronic inflammatory diseases. *Arthritis Res*, 4(4): 241-6, 2002.
50. Hoshino T., Yamada A., Honda J., Imai Y., Nakao M., Inoue M., Sagawa K., Yokoyama M.M., Oizumi K., Itoh K.: Tissue-specific distribution and age-

- dependent increase of human CD11b⁺ t cells. *J Immunol*, 151: 2237-46, Abst.: 4, 1993.
51. Inoue Y., Otsuka T., Niuro H., Nagano S., Arinobu Y., Ogami E., Akahoshi M., Miyake K., Ninomiya I., Shimizu S., Nakashima H., Harada M.: Novel regulatory mechanisms of CD40-induced prostanoind synthesis by il-4 and il-10 in human monocytes. *J Immunol*, 172(4): 2147-54, 2004.
 52. Jiang H., Chess L.: An integrated view of suppressor t cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest*, 114(9): 1198-208, 2004.
 53. Jiang H., Zhang S.I., Pernis B.: Role of CD8⁺ t cells in murine experimental allergic encephalomyelitis. *Science*, 256: 1213-5, Abst.: 5060, 1992.
 54. Jiang S., Tugulea S., Pennesi G., Liu Z., Mulder A., Lederman S., Harris P., Cortesini R., Suci-Foca N.: Induction of mhc-class i restricted human suppressor t cells by peptide priming in vitro. *Hum Immunol*, 59(11): 690-9, 1998.
 55. Kingsley C.I., Karim M., Bushell A.R., Wood K.J.: CD25⁺CD4⁺ regulatory t cells prevent graft rejection: Ctl-4- and il-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol*, 168(3): 1080-6, 2002.
 56. Koh D.R., Fung-Leung W.P., Ho A., Gray D., Acha-Orbea H., Mak T.W.: Less mortality but more relapses in experimental allergic encephalomyelitis in CD8^{-/-} mice. *Science*, 256: 1210-3, Abst.: 5060, 1992.
 57. Kukreja A., Cost G., Marker J., Zhang C., Sun Z., Lin-Su K., Ten S., Sanz M., Exley M., Wilson B., Porcelli S., Maclaren N.: Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest*, 109: 131-40, Abst.: 1, 2002.
 58. Kumanogoh A., Wang X., Lee I., Watanabe C., Kamanaka M., Shi W., Yoshida K., Sato T., Habu S., Itoh M., Sakaguchi N., Sakaguchi S., Kikutani H.: Increased t cell autoreactivity in the absence of CD40-CD40 ligand interactions: A role of CD40 in regulatory t cell development. *J Immunol*, 166(1): 353-60, 2001.
 59. La Cava A., Ebling F.M., Hahn B.H.: Ig-reactive CD4⁺CD25⁺ t cells from tolerized (new zealand black x new zealand white)fl mice suppress in vitro production of antibodies to DNA. *J Immunol*, 173(5): 3542-8, 2004.

60. Lana R.Y., Ansarib A.A., Liana Z.-X., Gershwin M.E.: Regulatory t cells: Development, function and role in autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*: 1-13, 2005.
61. Linker-Israeli M., Quismorio F.P., Jr., Horwitz D.A.: CD8+ lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus sustain, rather than suppress, spontaneous polyclonal ige production and synergize with CD4+ cells to support autoantibody synthesis. *Arthritis Rheum*, 33: 1216-25, Abst.: 8, 1990.
62. Liu Z., Tugulea S., Cortesini R., Lederman S., Suciufoca N.: Inhibition of CD40 signaling pathway in antigen presenting cells by t suppressor cells. *Journal*, Volume(Issue): Pages, 1999.
63. Liu Z., Tugulea S., Cortesini R., Lederman S., Suciufoca N.: Inhibition of CD40 signaling pathway in antigen presenting cells by t suppressor cells. *Hum Immunol*, 60(7): 568-74, 1999.
64. Liu Z., Tugulea S., Cortesini R., Suciufoca N.: Specific suppression of t helper alloreactivity by allo-mhc class i-restricted CD8+CD28- t cells. *Int Immunol*, 10(6): 775-83, 1998.
65. Manavalan J.S., Kim-Schulze S., Scotto L., Naiyer A.J., Vlad G., Colombo P.C., Marboe C., Mancini D., Cortesini R., Suciufoca N.: Alloantigen specific CD8+CD28- foxp3+ t suppressor cells induce ilt3+ ilt4+ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity. *Int Immunol*, 16(8): 1055-68, 2004.
66. Mills K.H.: Regulatory t cells: Friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol*, 4(11): 841-55, 2004.
67. Miyasato F., Manaligod J., Pietra G.G., Pollak V.E.: Effects of neonatal thymectomy on spontaneous murine autoimmune disease. *Proc Soc Exp Biol Med*, 125: 1180-3, Abst.: 4, 1967.
68. Mohan C., Datta S.K.: Lupus: Key pathogenic mechanisms and contributing factors. *Clin Immunol Immunopathol*, 77(3): 209-20, 1995.
69. Mok C.C., Lau C.S.: Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol*, 56(7): 481-90, 2003.
70. Myozaki M., Kamiyasu M., Miura T., Watanabe Y., Nakanishi T., Yamashita U.: Induction of autoimmune hepatitis and autoantibodies to liver antigens by neonatal thymectomy in mice. *Clin Exp Immunol*, 104: 133-43, Abst.: 1, 1996.

71. Najafian N., Chitnis T., Salama A.D., Zhu B., Benou C., Yuan X., Clarkson M.R., Sayegh M.H., Khoury S.J.: Regulatory functions of CD8+CD28- t cells in an autoimmune disease model. *J Clin Invest*, 112(7): 1037-48, 2003.
72. Nakamura K., Kitani A., Strober W.: Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory t cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med*, 194(5): 629-44, 2001.
73. Nishizuka Y., Sakakura T.: Thymus and reproduction: Sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science*, 166: 753-5, Abst.: 906, 1969.
74. Nociari M.M., Telford W., Russo C.: Postthymic development of CD28-CD8+ t cell subset: Age-associated expansion and shift from memory to naive phenotype. *J Immunol*, 162: 3327-35, Abst.: 6, 1999.
75. Oliveira-dos-Santos A.J., Ho A., Tada Y., Lafaille J.J., Tonegawa S., Mak T.W., Penninger J.M.: CD28 costimulation is crucial for the development of spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 162: 4490-5, Abst.: 8, 1999.
76. Palmer E.: Negative selection--clearing out the bad apples from the t-cell repertoire. *Nat Rev Immunol*, 3(5): 383-91, 2003.
77. Pisetsky D.S.: The immune response to cell death in sle. *Autoimmun Rev*, 3(7-8): 500-4, 2004.
78. Posnett D.N., Sinha R., Kabak S., Russo C.: Clonal populations of t cells in normal elderly humans: The t cell equivalent to "benign monoclonal gammopathy". *J Exp Med*, 179: 609-18, Abst.: 2, 1994.
79. Rekvig O.P., Kalaaji M., Nossent H.: Anti-DNA antibody subpopulations and lupus nephritis. *Autoimmun Rev*, 3(2): 1-6, 2004.
80. Renshaw B.R., Fanslow W.C., 3rd, Armitage R.J., Campbell K.A., Liggitt D., Wright B., Davison B.L., Maliszewski C.R.: Humoral immune responses in CD40 ligand-deficient mice. *J Exp Med*, 180: 1889-900, Abst.: 5, 1994.
81. Roncarolo M.G., Levings M.K.: The role of different subsets of t regulatory cells in controlling autoimmunity. *Curr Opin Immunol*, 12(6): 676-83, 2000.

82. Rubio C.F., Kench J., Russell D.M., Yawger R., Nemazee D.: Analysis of central b cell tolerance in autoimmune-prone mrl/lpr mice bearing autoantibody transgenes. *J Immunol*, 157: 65-71, Abst.: 1, 1996.
83. Sakaguchi S.: Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 22: 531-62, 2004.
84. Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., Toda M.: Immunologic self-tolerance maintained by activated t cells expressing il-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*, 155(3): 1151-64, 1995.
85. Salomon B., Lenschow D.J., Rhee L., Ashourian N., Singh B., Sharpe A., Bluestone J.A.: B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory t cells that control autoimmune diabetes. *Immunity*, 12: 431-40, Abst.: 4, 2000.
86. Saukkonen J.J., Kornfeld H., Berman J.S.: Expansion of a CD8+CD28- cell population in the blood and lung of hiv-positive patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 6: 1194-204, Abst.: 11, 1993.
87. Schwartz R.H.: Natural regulatory t cells and self-tolerance. *Nat Immunol*, 6(4): 327-30, 2005.
88. Schwartz R.H.: T cell anergy. *Annu Rev Immunol*, 21: 305-34, 2003.
89. Sercarz E., Krzych U.: The distinctive specificity of antigen-specific suppressor t cells. *Immunol Today*, 12(4): 111-8, 1991.
90. Sharpe A.H., Freeman G.J.: The b7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol*, 2(2): 116-26, 2002.
91. Shevach E.M.: Regulatory t cells in autoimmunity*. *Annu Rev Immunol*, 18: 423-49, 2000.
92. Shlomchik M.J., Craft J.E., Mamula M.J.: From t to b and back again: Positive feedback in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol*, 1(2): 147-53, 2001.
93. Suci-Foca N., Manavalan J.S., Cortesini R.: Generation and function of antigen-specific suppressor and regulatory t cells. *Transpl Immunol*, 11(3-4): 235-44, 2003.

94. Sun D., Qin Y., Chluba J., Epplen J.T., Wekerle H.: Suppression of experimentally induced autoimmune encephalomyelitis by cytolytic t-t cell interactions. *Nature*, 332: 843-5, Abst.: 6167, 1988.
95. Suttles J., Milhorn D.M., Miller R.W., Poe J.C., Wahl L.M., Stout R.D.: CD40 signaling of monocyte inflammatory cytokine synthesis through an erk1/2-dependent pathway. A target of interleukin (il)-4 and il-10 anti-inflammatory action. *J Biol Chem*, 274(9): 5835-42, 1999.
96. Tai X., Cowan M., Feigenbaum L., Singer A.: CD28 costimulation of developing thymocytes induces foxp3 expression and regulatory t cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat Immunol*, 6(2): 152-62, 2005.
97. Taylor P.A., Friedman T.M., Korngold R., Noelle R.J., Blazar B.R.: Tolerance induction of alloreactive t cells via ex vivo blockade of the CD40:CD401 costimulatory pathway results in the generation of a potent immune regulatory cell. *Blood*, 99: 4601-9, Abst.: 12, 2002.
98. Thornton A.M., Shevach E.M.: Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory t cells is antigen nonspecific. *J Immunol*, 164(1): 183-90, 2000.
99. Viglietta V., Baecher-Allan C., Weiner H.L., Hafler D.A.: Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory t cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med*, 199(7): 971-9, 2004.
100. Von Herrath M.G., Harrison L.C.: Antigen-induced regulatory t cells in autoimmunity. *Nat Rev Immunol*, 3(3): 223-32, 2003.
101. Walker L.S., Abbas A.K.: The enemy within: Keeping self-reactive t cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol*, 2(1): 11-9, 2002.
102. Xu J., Foy T.M., Laman J.D., Elliott E.A., Dunn J.J., Waldschmidt T.J., Elsemore J., Noelle R.J., Flavell R.A.: Mice deficient for the CD40 ligand. *Immunity*, 1: 423-31, Abst.: 5, 1994.
103. Yuen M.H., Protti M.P., Diethelm-Okita B., Moiola L., Howard J.F.J., Conti-Fine B.M.: Immunoregulatory CD8+ cells recognize antigen-activated CD4+ cells in myasthenia gravis patients and in healthy controls. *J Immunol*, 154(3): 1508-20, 1995.

9. ÖZGEÇMİŞ

10 Ağustos 1978'de Ankara'da doğdum. T.E.D Ankara Koleji ilköğretim okulunu bitirdim. Orta öğrenimimi aynı lisede tamamladım. 1995 yılında Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümünü kazandım ve buradaki eğitimimden 1999 yılında mezun olarak, 2002 yılında Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde İç Hastalıkları Anabilim Dalı'na bağlı bulunan İmmünoloji Bölümü Yüksek Lisans Programı'na başladım. İyi derecede İngilizce biliyorum.



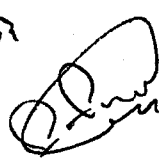
**MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ARAŞTIRMA ETİK KURULU**

Sayı : B.30.2.MAR.0.01.00.02/AEK-211
Konu:

Sayın .: Doç. Dr. Z. Emel EKŞİOĞLU
M.Ü Tıp Fakültesi Hematoloji- İmmünoloji Bölümü

MAR-YÇ-2003-0154 protokol nolu "Sistemik Lupus Eritematozus' da CD8+CD28-T supresör hücreleri" isimli projeniz Fakültemiz Araştırma Etik Kurulu tarafından incelenerek onaylanmıştır.

Prof. Dr. Haner DİRESKENELİ
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Araştırma Etik Kurul Başkanı

Datay DERHAT





SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Yüksek Lisans öğrencisi Aysin TULUNAY'ın, çalışması jürimiz tarafından İç Hastalıkları (İmmunoloji) Anabilim Dalı Yüksek Lisans tezi olarak uygun görülmüştür.

İMZA

Tez Danışmanı : Doç.Dr.Emel DEMİRALP
Üniversitesi : Marmara



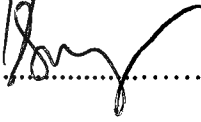
.....

Üye : Prof.Dr.Haner DİRESKENELİ
Üniversitesi : Marmara



.....

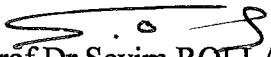
Üye : Doç.Dr.Şule YAVUZ
Üniversitesi : Marmara



.....

ONAY

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 25. / ..8... / 2005 tarih ve .29 sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof.Dr. Sevim ROLLAS
Müdür