

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları  
Anabilim Dalı**

**SJÖGREN SENDROMUNDA Treg (DÜZENLEYİCİ)  
HÜCRELERİN ROLÜ**

**Münevver SARIGÜL**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Antalya, 2008**

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları  
Anabilim Dalı**

**SJÖGREN SENDROMUNDA Treg (DÜZENLEYİCİ)  
HÜCRELERİN ROLÜ**

**Münevver SARIGÜL**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Ender TERZİOĞLU**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2006.02.0122.009).

“Kaynakça Gösterilerek Tezinden Yararlanılabilir.”

**Antalya, 2008**

## **Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne**

Bu çalışma jürimiz tarafından Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı İmmünoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.  
...../...../2008

**Tez danışmanı** : Prof. Dr. Ender TERZİOĞLU  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
İç Hastalıkları Anabilim Dalı

**Üye** : Prof. Dr. Olcay YEĞİN  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

**Üye** : Prof. Dr. Levent ÜNDAR  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
İç Hastalıkları Anabilim Dalı

**Üye** : Prof. Dr. İhsan KARADOĞAN  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
İç Hastalıkları Anabilim Dalı

**Üye** : Doç. Dr. Ayşen BİNGÖL BOZ  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

### **ONAY:**

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun ...../...../2008 tarih ve ...../..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

**Prof. Dr. Nurettin OĞUZ**

**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Sjögren sendromu (SS), gözyaşı ve tükürük bezleri başta olmak üzere ekzokrin bezlerin mononükleer hücre infiltrasyonu ile karakterize otoimmün-lenfoproliferatif bir hastalıktır. Genel popülasyonda primer sjögren sendromu prevalansı % 0.5 ile % 2.7 arasında değişir. Çoğunlukla 4. ve 5. dekatlarda ortaya çıkmaktadır. Kadınlarda erkeklerden 9 kat daha sık görülmektedir .

Öncelikle ekzokrin bezlere yönelik bu otoimmün hastalığın neden ortaya çıktığı ve neden durdurulamadığı henüz açıklığa kavuşmamıştır. Minör tükürük bezi biyopsileri histolojik tanı yöntemidir ve otoreaktif T hücrelerinin etyopatogenezinde önemli rolü olduğuna işaret etmektedir.

Yeni çalışmalar düzenleyici T ( $T_{reg}$ ) hücrelerde (Foxhead Box P3) Foxp3'ün yüksek seviyede eksprese edildiğini ve bu hücrelerin gelişim ve fonksiyonlarını düzene soktuklarını göstermektedir. Transkripsiyon faktörü olan Foxp3, doğal  $T_{reg}$  hücreleri için özel belirteçtir. Aktif süpresyon yapan  $CD4^+ CD25^{high}$   $T_{reg}$  hücreleri otoreaktif hücrelerin kontrolünde önemli rol oynadıkları hayvan modellerinde gösterilmiştir. Bu hücrelerin insan otoimmün hastalıklarında önemli rolü olduğunu gösteren veriler artmaktadır. Yeni bilgilere göre, MS (Multiple Sclerosis) hastalarından izole edilen  $T_{reg}$  hücrelerin ve sağlıklı donörlerin  $T_{reg}$  hücrelerinden daha az aktif oldukları görülmüştür. Gottenberg ve arkadaşlarının (63) yaptığı çalışmada  $CD4^+ CD25^{high}$  T hücre popülasyonunun pSS (primer sjögren sendromu) örneklerinde artış gösterdiği belirtilmiştir. Aynı çalışmada ayrıca,  $CD4^+ CD25^{high}$  hücrelerinin yaş ile de doğru orantılı bir şekilde arttığını göstermişlerdir.

Buradan yola çıkarak bizde sjögren sendromu hastalarında periferik kanda ve dokudaki  $T_{reg}$  hücre yoğunluğunu araştırmayı planladık. Amacımız Türk popülasyonunda  $T_{reg}$  hücre sayısının sadece yaş ile değil, diğer klinik bulgularla da değişip değişmediğini daha duyarlı metodlarla araştırmaktır.

**Anahtar kelimeler:** Sjögren sendromu,  $T_{reg}$ , Foxp3, PSS, SSS

## ABSTRACT

Sjogren syndrome is an autoimmune disease of exocrine glands which is characterized by infiltration of glands with monocytes and lymphocytes. Its prevalence in general population is between 0.5 to 2.7 percent. It is more common in 4th and 5 th decads. and 9 times more common in women than men.

Minor salivary gland biopsy is the diagnostic method for Sjogren syndrome.

Recent studies have shown that Foxp3 is highly expressed in T regulatory cells, regulating the function and development of these cells. Foxp3, a transcription factor, is a marker for natural T<sub>reg</sub> cells. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> T<sub>reg</sub> cells have an important role in the control of autoimmune cells. These cells have a functional role in human autoimmune diseases. According to the latest literature T<sub>reg</sub> cells can be isolated from Multiple sclerosis patients and they happen to be less active than healthy people's T<sub>reg</sub> cells. In a study done in by Gottenberg and colleques (63) they found that CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> T cells were unexpectedly high in Sjogren patients. They also showed that CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> T cells were correlated with age.

In this study we have planned to investigate the concentration of T<sub>reg</sub> cells in tissue biopsies and peripheral blood samples

Based on these literature work, we have planned to investigate the intensity of T<sub>reg</sub> cells in tissue samples and numbers in peripheral blood. Our main purpose was to seek the correlations between T<sub>reg</sub> cell numbers and cilinical disease activity scores.

**Key Words:** Sjögren sendrome, T<sub>reg</sub>, Foxp3, PSS, SSS

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezimin hazırlanışı sırasında deneyim ve yol göstericiliği ile yetişmemde emeği olan tez danışmanım, değerli hocam Prof. Dr. Ender TERZİOğLU'na ve her konuda sürekli desteğini gördüğüm sayın Prof. Dr. Olcay YEğİN'e,

Hasta grubumun oluşturulması aşamasında desteğinden dolayı Dr. Veli YAZISIZ'a ve Romatoloji Bilim dalı hemşirelerine,

İmmünohistokimyasal çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan Patoloji Anabilim Dalı çalışanlarına,

Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına ve İmmünoloji laboratuvarındaki çalışma arkadaşlarıma,

Ve tez çalışmalarım süresince manevi destekleri ile yanımda olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimle...

Münevver SARIGÜL

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

<b>ÖZET</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>v</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>vi</b>
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b>	<b>vii</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b>	<b>ix</b>
<b>TABLOLAR DİZİNİ</b>	<b>xi</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>xii</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b>	<b>xiii</b>
<b>GİRİŞ VE AMAÇ</b>	<b>1</b>
<b>GENEL BİLGİLER</b>	<b>3</b>
2.1.    Merkezi Tolerans	4
2.2.    Periferik Tolerans	5
2.3.    T Lenfosit Toleransı	5
2.3.1.  Periferik T Lenfosit Toleransı	5
2.4.    İmmün Sistem Kontrolünün Mekanizmaları ve Düzenleyici T Hücreleri	6
2.4.1.  Doğal Olarak Oluşan CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T <sub>reg</sub> Hücreleri	8
2.4.2.  Uyarılmış T <sub>reg</sub> hücreler	11
2.4.3.  Tr1 iT <sub>reg</sub> hücreler	11
2.4.4.  Th3 iT <sub>reg</sub> hücreler	11
2.4.5.  Diğer Düzenleyici T hücreler	12
2.5.    T <sub>reg</sub> Hücrelerinin IL-10 Üretimi	12
2.6.    CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T <sub>reg</sub> Hücrelerin Moleküler Karakteristikleri	12
2.6.1.  CD25	13
2.6.2.  GITR (Glucocorticoid-Induced Tumor Necrosis Factor Receptor Family-Related Gene)	13
2.6.3.  Forkhead Box P3 (FOXP3)	13
2.6.4.  İntegrin αEβ7	14
2.6.5.  Lenfosit Aktivasyon Gen-3 (LAG-3)	14
2.6.6.  Programlanmış Ölüm Reseptörü-1 (PDR-1)	14
2.6.7.  CTLA-4 (Cytotoxic T lymphocyte Associated 4 = CD 152)	14
2.6.8.  Nörofilin-1 (NrP-1)	16

2.7.	Düzenleyici T Hücrelerin Etki Mekanizmaları	16
2.8.	CD4+ CD25+ Treg Hücrelerin Otoimmün Hastalıklardaki Rolü	17
2.8.1.	İnflamatuvar Barsak Hastalığı (IBD)	17
2.8.2.	Romatoid Artrit (RA)	18
2.8.3.	Sjögren Sendromu (SS)	18
2.8.4.	Diabet (T1D)	18
2.8.5.	Transplantasyon	18
2.8.6.	Tümör İmmünitesi	19
2.9.	Sjögren Sendromu	19
2.9.1.	Tanım	19
2.9.2.	Epidemiyoloji	19
2.9.3.	Tanı Kriterleri	20
2.9.4.	Klinik Belirtiler	20
2.9.4.1.	Etiyoloji	20
2.9.4.2.	Klinik	21
<b>GERÇ VE YÖNTEM</b>		<b>23</b>
3.1.	Hastalar	23
3.2.	Akış Sitometrik analiz	24
3.3.	İmmünohistokimyasal Boyama ve Değerlendirme	25
3.4.	İstatistiksel Değerlendirme	26
<b>BULGULAR</b>		<b>27</b>
4.1.	Hastaların Genel Özellikleri	27
4.2.	Akış Sitometrisi Sonuçları	27
4.3.	İmmünohistokimya ve Akış Sitometri Sonuçları	29
4.4.	İmmünohistokimya ve İmmünfloresan Sonuçları	33
<b>TARTIŞMA</b>		<b>34</b>
<b>SONUÇLAR</b>		<b>37</b>
<b>KAYNAKLAR</b>		<b>38</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>		<b>46</b>
<b>EKLER</b>		<b>47</b>



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AMP</b>	: Adenozin Mono fosfat
<b>ANA</b>	: Anti Nucleer Antibody
<b>APC</b>	: Antigene Presenting Cells
<b>BUT</b>	: Göz yaşı kırılma zamanı
<b>CD</b>	: Cluster of Differentiation
<b>CD25</b>	: IL-2 reseptör alfa
<b>CD4</b>	: Helper T Hücre
<b>CD8</b>	: Öldürücü T Hücre
<b>CD103</b>	: E-İntegrin
<b>cDNA</b>	: Complementary Deoxyribonucleic acid
<b>CTLA-4</b>	: Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4 (CD152)
<b>Dk</b>	: Dakika
<b>DNA</b>	: Deoksiribo Nükleik Asit
<b>EBV</b>	: Epstein-Barr Virus
<b>EDTA</b>	: Etilendiamin Tetra Asetik asit
<b>FITC</b>	: Fluorescein Isothiocyanate
<b>Foxp3</b>	: Forkhead Box P3
<b>GITR</b>	: Glukokortikoidle İndüklenen Tumor Necrosis Faktör Reseptörü
<b>HCV</b>	: Hepatit C Virus
<b>HIV</b>	: Human Immunodeficiency Virus
<b>HLA</b>	: Human Leukocyte Antigen
<b>HTLV</b>	: Human T Lymphotropic Virus
<b>IBD</b>	: Inflammatory Bowel Disease
<b>IDO</b>	: Indolamin
<b>Ig</b>	: İmmünglobulin
<b>IL</b>	: Interleukin
<b>IPEX</b>	: İmmunodysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-Linked Syndrome
<b>IV</b>	: Intra Venos
<b>iTreg</b>	: İndüklenmiş Düzenleyici T Hücre
<b>KO</b>	: Knockout
<b>LAG-3</b>	: Lymphocyte Activation Gene 3
<b>MBL</b>	: Mannose Binding Lectin
<b>MHC</b>	: Major Histocompatibility Complex
<b>MI</b>	: Mililitre

<b>mRNA</b>	: Messenger ribonucleic acid
<b>MS</b>	: Multiple Scleröz
<b>NK</b>	: Natural Killer
<b>NOD</b>	: Non Obes Diabetic
<b>NrP-1</b>	: Norophilin-1
<b>OX40</b>	: CD 134
<b>PBS</b>	: Tampon solüsyonu
<b>PD</b>	: Programlanmış Ölüm
<b>PDR</b>	: Programlanmış Ölüm Reseptörü
<b>PE</b>	: Phyco Eritrin
<b>pSS</b>	: Primer Sjögren Sendromu
<b>RA</b>	: Rheumatoid Arthritis
<b>RAG-1</b>	: Recombination Activating Gene
<b>RT-PCR</b>	: Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
<b>SF</b>	: Sinovial Sıvı
<b>SLE</b>	: Sistemik Lupus Eritematosus
<b>SS</b>	: Sjögren sendromu
<b>T1D</b>	: Tip 1 Diabet
<b>TCR</b>	: T Cell Receptor
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	: Tumor Growth Factor-Beta
<b>T<sub>H</sub></b>	: T Helper
<b>TNF</b>	: Tumor Necrosis Factor
<b>TNFRSF</b>	: Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily
<b>Tr</b>	: T Regulatory
<b>T<sub>reg</sub></b>	: T Regulatory (düzenleyici)
<b><math>\mu</math>l</b>	: Mikrolitre

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
<b>2.1.</b> Regulator T lenfosit ( $T_{reg}$ ) alt grupları ve özellikleri.	<b>8</b>
<b>3.1.</b> % Boyanan alan, boyanma şiddeti ve skorun gösterilişi	<b>26</b>
<b>4.1.</b> Hastaların genel özellikleri	<b>27</b>
<b>4.2.</b> CD4+ CD25+ ve Foxp3+ hücre yüzdeleri ile Sjögren Sendromu, RA'lı kontrol ve sağlıklı kişilerin akış sitometrisi sonuçları Karşılaştırılması	<b>28</b>
<b>4.3.</b> Histopatolojik sınıflamala (Chisholm) ile periferik lenfositlerin ilişkisi	<b>29</b>
<b>4.4.</b> İmmunohistokimya ile periferik lenfosit alt gruplarının ilişkisi	<b>30</b>
<b>4.5.</b> Chisholm skorları ve yüzde Foxp3 miktarı arasındaki korelasyon ilişkisi	<b>31</b>
<b>4.6.</b> Chisholm skorları ve Foxp3 skor arasındaki korelasyon ilişkisi	<b>32</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Düzenleyici T Hücre farklılaşması	10
2.2. APC ve T hücre etkileşimi	15
4.1. İmmünohistokimya ve immünfloresan görüntüleri. A ve B şekilleri Foxp3 antikoruna ile immünohistokimyasal yöntem ile boyanmış tükrük bezi görüntüsü. C ve D Foxp3 antikoruna ile immünfloresan yöntemi ile boyanmış tükrük bezi görüntüsü.	33

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
2.1. CD4+ CD25+ düzenleyici T hücreler ve süpresyon Mekanizmaları	17
4.1. Sjögren Sendromu hasta grubundan bir olgunun akış sitometri görüntüsü	28
4.2. Tükürük bezindeki lenfosit yüzdesi ile periferik kandaki CD4+CD25+FoxP3 hücre sayıları dağılımı	29
4.3. Chisholm boyanma skoru ile dokudaki FoxP3 pozitif hücre sayıları arasındaki ilişki	30
4.4. Ortalama FoxP3 boyanma skoru ile Chisholm skoru arasında ilişki	31
4.5. FoxP3 boyanma skoru ile periferik kandaki CD4+, CD4+CD25+ ve FoxP3 pozitif hücre sayıları arasında ilişki	32

## GİRİŞ VE AMAÇ

Sjögren sendromu (SS), gözyaşı ve tükürük bezleri başta olmak üzere ekzokrin bezlerin mononükleer hücre infiltrasyonu ile karakterize, otoimmün-lenfoproliferatif bir hastalıktır. Kadınlarda erkeklere oranla 9 kat daha fazla görülmektedir. Primer (sikka kompleksi) ve romatoid artrit (RA) veya daha az sıklıkla diğer konnektif doku hastalıklarıyla beraberlik gösteren sekonder formu olmak üzere iki tipi vardır. Çoğu hastada gözyaşı ve tükürük bezlerinin lenfositik infiltrasyonu sonucu sekresyonların azalmasına bağlı olarak görülen kuru göz (kseroftalmi) ve kuru ağız (kserostomi) bulunmaktadır. (1). Genler ve patojenik mekanizmalar önderliğinde organ hasarı ile ilerleyen bu otoimmün hastalığı neyin tetiklediği açık değildir (2).

Klinik özelliklerinin tümü ekzokrin bezlerdeki fonksiyon bozukluklarına bağlı olarak gelişmektedir. Egzokrin bezlerde yoğun lenfosit infiltrasyonu oluşmaktadır (3).

Çevresel tetikleyici faktörler arasında viral enfeksiyonlar ve ağız floradaki bakteriler suçlanmıştır. Bazı incelemeler, retroviral enfeksiyonların (HIV-1, HTVL) SS'nun sebebi ya da gelişimine katkıda bulunan primer faktör olabileceğini ileri sürmektedir. Fakat retroviral enfeksiyonlar ile SS arasındaki nedensel ve etkilenim ilişkisi hala kurulamamıştır. Özellikle Epstein-Barr virüs (EBV) ile hastalık arasında ilişki olduğu, SS hastaların tükürük bezlerinde EBV genomunun olduğu iddia edilmiştir. Fakat tüm SS'lu hastalarda EBV genomu tespit edilememektedir. HCV, Herpesvirular ve enteroviruler SS etyolojisinde düşünülen ve araştırılan diğer viruslerdir. Bazı araştırmacılar ağız mukozasında mutant *streptococ* türleri ve *Candida spp* varlığı ile tükürük miktarındaki düşüklük arasında ilişki olduğunu ileri sürmüşlerdir (4, 5). Bu ajanların kronik inflamasyona, tükürük bezlerinde fonksiyon bozukluklarına ya da tükürük miktarında azalmaya neden olup olmadıkları konusu henüz tam açıklık kazanmamıştır (6).

Düzenleyici T hücreleri ( $T_{reg}$ ) otoimmün hastalıkları ve transplant rejeksiyonu gelişimini önleyen hücrelerdir.  $T_{reg}$ 'ler immün cevapta rol oynayan diğer hücrelerin fonksiyonunu inhibe ederek immün cevabı kontrol edebilirler.  $CD4^+ CD25^+ T_{reg}$  hücrelerinin özel belirleyicileri saptanmıştır. Bunlar, glukokortikoidle indüklenen TNF reseptörü (GITR) ve Foxp3'tür (7).

Düzenleyici T hücreleri başlıca iki grup altında incelenmektedir (8). Bir grup doğal  $CD4^+ CD25^+$  düzenleyici T ( $nT_{reg}$ ) hücreleri olarak adlandırılmıştır.  $nT_{reg}$ 'ler, timusta üretilip baskılayıcı T fonksiyonlarını periferde antijenle karşılaşmadan önce kazanmaktadırlar.  $nT_{reg}$ 'ler TCR pozitif seleksiyon sonrası sınıf II MHC (major histocompatibility complex) öz (self) peptidlere

kuvvetli olarak bağlanan hücre tipidir (9). Bir diğer grup ise adaptif  $T_{reg}$  olarak adlandırılan ve periferde belirli şartlar altında oluşan hücre tipidir. Daha sonra konu üzerinde yoğunlaşan çalışma ve gözlemlere diğer düzenleyici hücre tipleri belirlenmiştir. Bunlar  $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$  T, IL-10 salgılayan Tr1, TGF- $\beta$  salgılayan Tr3, Qa1-restricted CD8,  $CD8^+ CD28^-$  T,  $CD8^+ CD122^+$  T,  $\gamma\delta$  T ve doğal öldürücü T hücreleri olmak üzere birçok alt sınıfta detaylı olarak incelenmiştir (10, 11).

Regülatör hücrelerin, self tolerans ve otoimmünitede kritik rolleri, timustan toplanan  $CD4^+ CD25^+ T_{reg}$  hücrelerde net olarak kurulmuştur. Hem hayvanlarda hemde insanlarda Foxp3 mutasyonları ile  $CD4^+ CD25^+$  T hücreler timusta gelişemez ve otoimmün hastalıklara hayatın erken zamanlarında boyun eyer. Ek olarak,  $T_{reg}$  hücrelerin depleksyonu murine modellerin sonuçlarında kendiliğinden gelişen otoimmün hastalıklar görülmüştür (Kolitis, gastritis, İnsülin bağımlı otoimmün diabetler ve triotitis gibi...)

IL-2 KO (Knockout) ve IL-2R $\alpha$  KO farelere, scurfy farelerin lenf nodu hücreleri IV (intra venoz) olarak enjekte edildiğinde, tükrük üretiminin azalmasının yanısıra scurfy farelerin aksine tükrük ve gözyaşı bezlerinde inflamasyon gözlenmiştir. Aynı çalışmada yine scurfy farelerden alınan lenf nodu hücreleri RAG-1 (Recombination Activating Gene) KO farelere enjekte edildiğinde göz etrafında tipik deri değişimi ve yine tükrük üretimi azalması ile tükrük bezinde lökosit infiltrasyonu artışı görülmüştür (12).

Gottenberg ve arkadaşları (13) yaptığı çalışmada  $CD4^+ CD25^{yüksek}$  T hücre popülasyonunun, primer sjögren sendromu (pSS) örneklerinde artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Aynı çalışmada ayrıca,  $CD4^+ CD25^{yüksek}$  hücrelerinin yaş ile de doğru orantılı bir şekilde arttığını göstermişlerdir.

Buradan yola çıkarak bizde daha önce yapılan çalışma doğrultusunda sjögren sendromu hastalarında  $T_{reg}$  hücrelerin periferik kanda ve tükrük bezindeki yoğunluğunu, histolojik değişikliklerini ve yaş dışı diğer hastalık faktörleri ile olan ilişkisini araştırmayı planladık. Amacımız Türk popülasyonunda  $T_{reg}$  hücre sayısının sadece yaş ile değil, diğer klinik bulgularla da değişip değişmediğini daha duyarlı metodlarla araştırmaktır.

## GENEL BİLGİLER

Bağıışıklık sistemi enfeksiyona neden olan ve vücuda çeşitli yollardan girebilen mikroorganizmalarla savaşılabilmesi için oluşmuş bir sistemdir. Bağıışıklık sistemi algılar, tanır, öğrenir ve hatırlar. En önemli özelliği, dışardan giren saldırganlara karşı (virüs, bakteri, mantar, parazit ve diğer çok çeşitli zararlı kimyasal madde içerenler) cevap oluşturmasının dışında, kendi antijenlerine karşı da cevapsız kalmasıdır. Yani kendisinden olanı, olmayandan ayırt edebilmesidir. Genel bir deyişle bağıışıklık sistemi doğada olan veya yeni oluşan bütün antijenik özelliğe sahip maddeye, özgül yanıt geliştirebilme özelliğine sahiptir (14, 15).

Bağıışıklık sisteminin antijeni tanıması ve yanıt verebilmesi için kullandığı iki ayrı yol vardır. Bu yollardan ilki, doğal (innate = non-spesifik) bağıışıklık ile sağlanır. Bu bağıışıklık sistemi yabancıyı özgül olarak tanımaz. Bunun için bazı patern tanıyıcı reseptörler kullanır (Toll-like reseptörleri, çöpçü reseptörleri gibi). Bağıışıklık sisteminin antijeni özgüllüğüne göre tanıdığı diğer yol ise, sonradan kazanılan (adaptif) bağıışıklık sistemidir. Bu sistemde ise, özgül tanıma işlemlerini, adaptif bağıışıklık sisteminde bulunan T ve B hücrelerinin reseptörleri sağlar. Yabancı madde bu yollarla tanıldıktan sonra, ajana yönelik aktif moleküllerin yapımı ve hazırda olanların aktive edilmesi gerekir (kompleman sistemi, sitokin salınımı gibi). Daha sonra kemotaksis yolu ile bağıışıklık sisteminin diğer etkin hücreleri (nötrofiller, eozinofiller, monosit veya makrofajlar, lenfositler, doğal öldürücü hücreler) ajanın girdiği bölgede toplanır ve fagositoz, sitotoksite, apoptozis tetiklenmesi, hücre lizisi gibi yollarla etkin olurlar (14).

Çok genel bir bakışla irdelenirse bağıışıklık dizgesi 4 önemli aşamada görevini tamamlamaktadır. Bu evreler şöyle özetlenebilir:

- 1- Yabancı olanın algılanması ve tanınması. Burada antijene özgül tanımanın T ve B lenfositlerin yüzeyinde bulunan reseptörler (algaçlar) aracılığıyla olduğunu biliyoruz.
- 2- Ajana yönelik yanıtta önemli rol oynayacak aktif moleküllerin yapımı veya zaten hazır olanların aktive edilmesi. Burada, hazır olanlar için kompleman sistemini, yeni yapılanlar için antikorları, interlökinleri (IL-1, IL-2, IL-8, interferon), kemotaktik faktörler, mast hücrelerinden salınan lökotrienler ve diğer birçok aktif maddeleri sayabiliriz.
- 3- Etkin hücrelerin (nötrofiller, eozinofiller, monosit veya makrofajlar, lenfositler, öldürücü lenfositler v.b.) ajanın girdiği bölgede toplanmaları. Genel anlamıyla kemotaksis olarak tanımlayabileceğimiz



bu olayın ajanın tipine göre ayarlandığını da burada hatırlamak gerekir. Örneğin paraziter olaylarda daha çok eozinofiller bölgeye gelirken bakteriyel olaylarda nötrofillerin gelmesi gibi.

- 4- Ajanın fagositoz (nötrofiller, eozinofiller, monosit-makrofajlar), sitolizis (kompleman sistemi), hücrel toksisite (T lenfositleri, doğal öldürücü hücreler, monosit-makrofajlar) gibi mekanizmalarla yok edilmesi.

Yukarıda çok kısaca özetlediğimiz olaylar dizisindeki herhangi bir eksiklik, aksama, düzensizlik veya yanlış; tekrarlayan enfeksiyonlardan maliğnite gelişimine yatkınlığa veya otoimmüniteye kadar giden olayların gelişimine yol açmaktadır (15).

Bağışıklık sisteminin hücreleri, kemik iliğinden köken alırlar. Kemik iliğinde oluşan hücreler, gelişimlerini tamamlamak için perifere çıkarak farklı dokulara yerleşirler. Gelişimleri esnasında da bağışıklık sisteminin kendinden olanı olmayandan ayırt edebilmesi için, eğitimden geçerler. Bu sayede kendi (self) antijenlerine karşı cevapsız kalabilirler. İmmün sistemin, kendi antijenlerine karşı cevapsız kalmasına immünolojik tolerans denir. İmmünolojik toleransta rol oynayan kazanılan bağışıklık sisteminin T ve B lenfositleridir.

İmmünolojik toleransın işleyişini bilmek bazı faydalar sağlar.

- 1- Kendi antijenimize karşı tolerans oluşturabilmek
- 2- İstenmeyen immün reaksiyonları kontrol edebilmek (allerji, otoimmün hastalıklar, organ nakilleri vb.).

İki şekilde tolerans sağlanır.

- 1- Merkezi tolerans
- 2- Periferik tolerans

### **2.1. Merkezi Tolerans**

Lenfositler, primer (birincil) lenfoid organlarda (kemikiliği ve timus) oluşup olgunlaşmaya kadar geçen süre içinde kendinden olan (self) antijenlerle karşılaşabilirler. Self antijenlere karşı cevap oluşturmamak ve otoimmüniteye engel olmak için bir eğitime tabi tutulurlar. Bu nedenle gelişimlerinin erken dönemlerinde self antijenle karşılaştıklarında cevapsızlık veya apoptozis meydana gelir. Bir lenfosit, daha olgunlaşmadan self antijene reaksiyon vereceği anlaşılınca derhal ortadan kaldırılıp, çoğalıp farklılaşması engellenir. Bu olay negatif seçim veya merkezi tolerans olarak adlandırılır.

## 2.2. Periferik Tolerans

Olgunlaşmış perifere çıkan lenfositler eğitimlerine burada da devam ederler. Olgun lenfosit, yabancı antijenle karşılaşınca immün yanıt oluştururken, self antijenle karşılaşınca delesyon veya anerji gösterir, (periferik dokularda) yanıt vermez. Hem T hem de B hücrelerinde, merkezi ve periferik tolerans görülür.

## 2.3. T Lenfosit Toleransı

### 2.3.1. Periferik T Lenfosit Toleransı

Kemik iliğinde oluşup timusta olgunlaşan T lenfositler perifere çıkarlar. Periferik dokularda self antijenin tanınması ile bu antijenlere karşı bir duyarsızlık oluşur (anerji) ve apoptozis ile T hücrelerinin ortadan kaldırılması gerçekleşir. T hücrenin aktivasyonu için en az iki sinyal gerekir. MHC üzerinde sunulan peptidin algılanması, ikincil ek uyarıcı sinyallerin varlığı (CD28, CD80, CD86 birleşimi, sitokinlerin varlığı gibi...) gerekir (Şekil 2.2.). İkincil sinyali olmayan T hücresi peptidi algılasa bile etkin hale geçmeyecek ya anerjik kalacak ya da apoptozise gidecektir. Ayrıca aynı peptit tarafından tekrarlayan uyarılar alan T hücresinde aktivasyonu izleyen apoptozise (AID) yönelme düzeneği yeterli aktivasyon ve anti apoptotik sinyal alamayan T hücresinin ölümü ile sonlanacaktır (16).

Ayrıca timusta eğitimden geçen hücrelerin bir kısmı perifere çıkarken düzenleyici T hücrelerine dönüşerek çıkarlar. Bu hücreler self antijene veya saldırgan karşı oluşan T hücre aktivasyonunu sitokin yolu ile veya direkt temas yolu ile baskılayabilirler. Düzenleyici T hücreler olarak ta adlandırılan bu hücreler hem timusta hem de periferde oluşabilirler. Bu hücrelerin çoğunun CD25 (IL-2 reseptör  $\alpha$ ) molekülü gösterdikleri bilinmektedir. Bu hücrelerin bağışıklık sistemi nasıl inhibe ettiği konusunda çok az şey bilmekteyiz. Bazı düzenleyici yada baskılayıcı T hücreleri TGF- $\beta$  ve IL-10 gibi sitokinlerle makrofajların veya lenfositlerin aktivasyonunu inhibe edebilmektedir. Ayrıca direkt olarak diğer lenfositlerle ve antijen sunan hücrelerle (APC) de temas kurarak inhibitör etki yaratabilmektedirler (16).

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T hücreler diğer hücreler gibi kemik iliğinden köken alıp  $\alpha\beta$  T hücre reseptörü (TCR) eksprese edip hem timus içinde hem de timus dışında bulunabilirler. Ontogenisi diğer T hücreleri gibi açık ve net değildir. Agonist ligant birlikte ifade eden TCR-transgenik farelerdeki gözlemler, TCR transgeniklerde CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T hücre sayısının üretimini desteklemektedir (17).

Başlangıçta, kolitisin kontrolünü sağlayan hücrelerin transfer edilen CD4<sup>+</sup> CD45RB<sup>yüksek</sup> hücreler olduğu sanılıyordu. Ancak daha sonra bu hücrelerin CD25 eksprese eden CD4<sup>+</sup> CD45RB<sup>düşük</sup> hücreler olduğu anlaşılmıştır. (CD45 T ve B hücrelerinde bulunur naiflerde yüksek, aktive ve

hafıza hücrelerde düşük eksprese edilir. Hematopoietik hücrelerde ve özellikle de timositlerde eksprese edilir (18).

Baskılayıcı T hücreleri ilk defa 1970'lerin başında farelerde tespit edilmiş ve antijen spesifik baskılayıcı faktörlerin salgılanması ile süpresyona neden olduğu düşünülmüştür (19). Daha sonra ise insanlarda  $T_{reg}$  hücrelerinin non-spesifik mekanizma ile süpresyona neden olduğu tespit edilmiştir. Düzenleyici T hücrelerinin yüzey belirteçleri fazla olmadığından dolayı izolasyonlar güçtür (20).

#### **2.4. İmmün Sistem Kontrolünün Mekanizmaları ve Düzenleyici T Hücreleri**

Sakakura ve Nizhizuka 1969 yılında (21) çalışmalarında otoimmün hastalıklarda bir hücre tipinin etkinliğinden bahsetmişlerdir. Dick Gershon ise 1970 yılında (22) bu hücre tipini baskılayıcı hücre olarak adlandırmıştır. 1995 yılında Sakaguchi (13), IL-2'nin ( $\alpha$ ) alfa zinciri olarak bilinen  $CD25^+$   $CD4^+$  T hücrelerinin immünolojik toleranstaki rolünü göstererek yıllarca süren bir tartışmaya açıklık getirmiş ve araştırılması gereken yeni soruları ortaya koymuştur. Sakaguchi (23)  $CD25^+$  taşıyan fare hücrelerini ortamdan uzaklaştıran PC61 adlı monoklonal antikoru geliştirmiş ve bu antikoru BALB-c nu/+ farelerin dalak ve lenf nodlarından hazırlanan  $CD25^+$  taşıyan  $CD4^+$  T hücrelerini ortamdan uzaklaştırmak için kullanmıştır.  $CD25$  taşımayan süspansiyonu, BALB-c atimik nude (nu/nu) farelerine adoptif transfer ederek farelerin birçok otoimmün hastalık geliştirdiğini ortaya koymuştur.  $CD4^+$   $CD25^+$  T hücrelerinin aynı farelere adoptif transferi ile otoimmün hastalıkların engellendiğini göstermiştir. 2001 yılında, bu çalışma sonrası  $CD4^+$   $CD25^+$  T hücreleri "Düzenleyici T hücreleri" olarak adlandırılmış ve yeni bir T hücre alt grubu olarak ortaya konulmuştur. Baskılayıcı hücreler zaman içerisinde  $CD4^+$   $CD25^+$  düzenleyici T hücreleri ( $T_{reg}$ ) olarak anılmaya başlanmıştır (24). Düzenleyici hücreler  $CD4^+$   $CD25^+$  Foxp3<sup>+</sup> olarak timustan köken alarak gelişirler ve dolaşımda yaklaşık %8-10 civarında bulunmaktadır. Vücutta gelişen otoantijenlere karşı oluşacak immün yanıtı baskılayarak, otoimmün hastalıkları engellemektedirler. Timustan gelişerek primer lenf nodlarına ulaştıklarında tekrar otoantijenlere karşı aktive olurlar ve bölünerek antijen spesifik olarak çoğalırlar. Doğal  $CD4^+$   $CD25^+$  Foxp3<sup>+</sup> T hücrelerinin fonksiyon bozukluğunda ya da genetik olarak Foxp3'e müdahale edildiğinde IPEX (immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-Linked syndrome) meydana geldiği, bunun birçok otoimmün hastalığı ortaya çıkardığı ve şiddetli alerjik reaksiyonlara yol açtığı gözlenmiştir (25, 26).

$CD4^+CD45RB^{düşük}$  popülasyon içinde  $CD25^+$  hücrelerde düzenleyici aktiviteye sahip hücreler olarak tanımlanmıştır (17). Son günlerde  $T_{reg}$  hücrelerinin IL-10 ürettiği ve TGF- $\beta$  salgıladığı belirtilmiştir. Bu hücreler kültürde üretilmiş ve  $CD25$  eksprese etmiş hücrelerdir. IL-10  $T_{reg}$  hücreleri in vitro koşullarda naif T hücre çoğalmasını inhibe eder, lenfopenik konakçılarda in vivo koşullarda deneysel olarak otoimmüniteyi baskılar ve  $CD4^+$   $CD8^+$  T hücre sayısını kontrol eder (17, 28, 8).

Düzenleyici T hücreleri başlıca iki grup altında incelenmektedir (30). Bir grup doğal CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> düzenleyici T (nT<sub>reg</sub>) hücreleri olarak adlandırılmıştır. n T<sub>reg</sub>'ler, timusta üretilip baskılayıcı T fonksiyonlarını periferde antijenle karşılaşmadan önce kazanmaktadırlar. nT<sub>reg</sub>'ler TCR pozitif seleksiyon sonrası sınıf II MHC (major histocompatibility complex) öz (self) peptidlere kuvvetli olarak bağlanan hücre tipidir (31). Bir diğer grup ise adaptif T<sub>reg</sub> olarak adlandırılan ve periferde belirli şartlar altında oluşan hücre tipidir. Daha sonra konu üzerinde yoğunlaşan çalışma ve gözlemlere diğer düzenleyici hücre tipleri belirlenmiştir. Bunlar CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T, IL-10 salgılayan Tr1, TGF-β salgılayan Tr3, Qa1-restricted CD8, CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> T, CD8<sup>+</sup> CD122<sup>+</sup> T, γδ T ve doğal öldürücü T hücreleri olmak üzere birçok alt sınıfta detaylı olarak incelenmiştir (10, 33). (Tablo 2.1.).

CD25 hücre yüzey belirteci aktive olmuş T hücreleri ve bir çok hücre tarafından taşınmaktadır. Bu yüzden düzenleyici T hücrelerini, CD 25 taşıyan diğer hücre tiplerinden ayırmada farklı belirteçlerin varlığına ihtiyaç duyulmuştur. Bunlardan en önemlisi forkhead winged helix P3 (Foxp3) transkripsiyon faktörüdür. Foxp3<sup>-/-</sup> farelerin otoimmün hastalıkları geliştirdiği düzenleyici T hücrelerinin ortaya çıkarılmasından önce bilinmekteydi. 2003 yılında Hori ve arkadaşları (34) yaptıkları çalışmada naif T hücrelerini Foxp3'ü kodlayan geni taşıyan retrovirüslerle transdükte ettiklerinde, naif T hücrelerinin düzenleyici T hücrelerine dönüştüğünü göstermiş ve sitotoksite deneyleri ile in vivo ve in vitro etkinliklerini bildirmişlerdir. Yapılan diğer çalışmalarla T<sub>reg</sub> hücrelerini diğer hücrelerden ayırmak için kullanılan ilave belirteçler GITR, PD-1, CTLA-4, CD40, B7-H1, B7-H4, OX40, Fr-4 ortaya konulmuştur. (33, 36).

Şunu da akılda tutmak gerekir ki T<sub>reg</sub> hücreleri immün cevabın düzenlenmesinde önemli rol oynamalarına rağmen yardımcı T tip1 (T<sub>H1</sub>) ve tip2 (T<sub>H2</sub>) hücrelerinin salgıladığı sitokinler de immün sistemin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar.

**Tablo 2.1.** Reglatuvar T lenfosit ( $T_{reg}$ ) alt grupları ve özellikleri (52).

$T_{reg}$ çeşitleri	Orijini	Fenotip ekspresyonu	Foxp3	Supresyon Mekanizması
$CD25^- T_{reg}$	?	$CD4^+ CD25^-$	Var	?
Doğal Treg(nTreg)	timus, (perifer)	$CD4^+ CD25^+$	Var	Hücre hücre etkileşimi IL-10 Salınımı TGF- $\beta$ salınımı CTLA-4
iTreg Tr1-Treg	Perifer	$CD4^+$	Yok	Hücre-hücre etkileşimi IL-10 salınımı
Th3-Treg	Perifer	$CD4^+$	Yok	Hücre-hücre etkileşimi TGF- $\beta$ salınımı
$T_H1$	Perifer	$CD4^+$	Yok	IFN- $\gamma$ salınımı Bazen de IL-10 salınımı
$T_H2$	Perifer	$CD4^+$	Yok	IL-4 salınımı IL-10 salınımı IL-13 salınımı

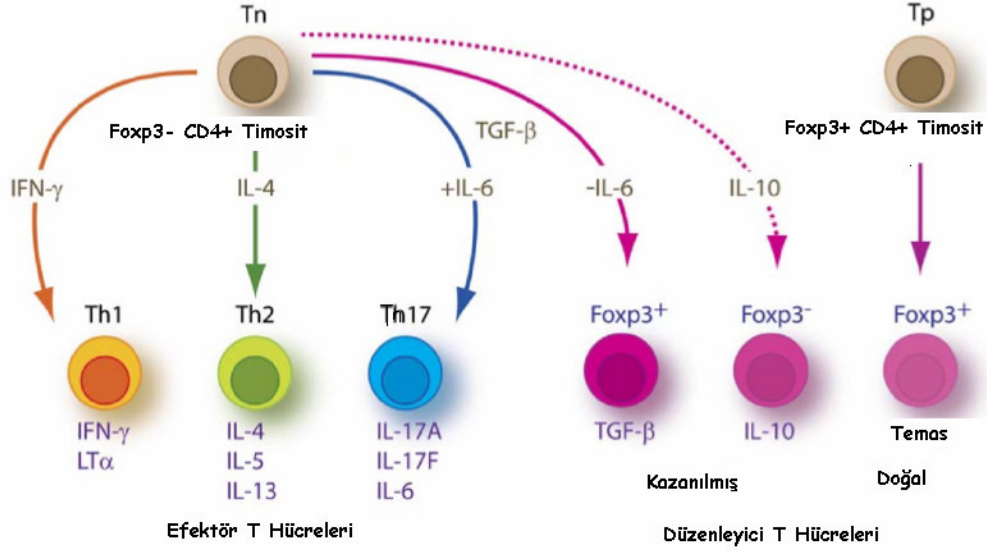
#### 2.4.1. Doğal olarak oluşan $CD4^+ CD25^+$ $T_{reg}$ hücreleri

Yeni yapılan araştırmaların bir çoğunun odağı  $CD4^+ CD25^+$  T hücre alt gruplarıdır. Bu hücreler sağlıklı yetişkin farelerde ve insanlarda  $CD4^+$  T lenfositlerinin %1-5'inde gösterilirler. Bu hücrelerin hem doğal, hem de sonradan kazanılmış bağışıklık sistemi kontrol mekanizmasında özelleşmiş bir rolü vardır (38, 39). Bu hücrelerin CTLA-4 ve GITR (glukokortikoid-tümör nekrosis faktör reseptör) içerdiği ve  $T_{reg}$  aktivasyon mekanizmasında rol aldıkları bilinmektedir (40, 41). Her iki molekül de aktivasyondan sonra düzenleyici olmayan T hücreler üzerinde yukarı çekilirler. TGF- $\beta$  ve IL-10 salınımı  $T_{reg}$  hücrelerinin bilinen genel özellikleridir (42). Ancak, ne TGF- $\beta$  ne de IL-10 salınımı  $T_{reg}$  hücrelerinin tek özelliğidir (43) (Şekil 2.1.).

Bu hücreler timusta gelişirler fakat gelişim ve olgunlaşma aşamalarındaki olaylar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. CD28, CD40 ve IL-2 gibi sitokinlerin bu hücrelerin gelişiminde kritik rolleri olduğunu gösteren fare çalışmaları vardır. Görünüş olarak diğer T lenfositlere benzemektedirler, TCR repertuarları diğer T hücreler kadar geniştir. Bu hücreler invitro olarak anerjiktir. IL-2 ve IL-15 gibi sitokinlerin uyarısı ile bu anerji ortadan kalkmaktadır. Bu hücreler  $CD4$ ,  $CD25$ , FoxP3/winged-helix transkripsiyon faktörü, CTLA-4, GITR galectin-1, CD38, CD62L, CD103,

NTFR2, TGF-BR1, CD5, L-selectin ve CD45RO gibi yüzey reseptör moleküllerini göstermektedirler. nTreg hücreleri tanımlamada en çok kullanılan belirteç CD25 molekülüdür. FoxP3, nTreg hücrelerin göreceli olarak fonksiyonel belirteçidir. FoxP3, nTreg hücrelerin fonksiyonu kadar üretiminde de gerekli olan en kritik moleküllerden biridir. FoxP3 bozukluğu gelişen farelerde bir çok organda otoimmün hastalık gelişmektedir (44, 45).

Periferik dolaşıma geçerek kendi antijenik yapılarını tanıyan T lenfositlerin (otoreaktif) fonksiyonlarını baskırlar, böylece otoimmün hastalıkların gelişimini engellemektedirler. Bu etkinin mekanizmaları henüz tam olarak bilinmemekle birlikte nT<sub>reg</sub> hücreler doğal immün sistem hücreleri kadar kazanılmış immün sistemdeki hücreleri de etkilemektedir. nT<sub>reg</sub> hücreler CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> lenfositlerden çoğalmasını ve bu hücrelerin sitokin üretimini baskılama yeteneğine sahiptirler. Doğal immün sistemin hücreleri olan dendritik hücreler ve monositler de bu hücrelerin hedefleridir. nT<sub>reg</sub> hücrelerin baskılayıcı fonksiyonlarını gerçekleştirebilmesi için nT<sub>reg</sub> hücreler ile hedef hücreler arasında HLA uyumu mutlak gerekli değildir fakat TCR ve IL-2 uyarısı gerekmektedir. Hücreler arası etkileşiminde LAG-3'ün önemli olduğu gösterilmiştir. nT<sub>reg</sub>'lerin hedef hücrelerdeki negatif sinyal molekülü olan B7'ye bağlanmayı da etkiliyor olabilir. Çünkü B7 molekülü olmayan hedef hücreler T<sub>reg</sub> baskılamasına karşı dirençlidirler. Antijen sunan hücrelerdeki kostimulatör hücrelerin aşağı çekilmesinde nT<sub>reg</sub> hücrelerin baskılayıcı etkileri için diğer bir mekanizma olabilir (45). Bütün bulgular dikkate alındığında nT<sub>reg</sub> hücrelerin immunolojik yanıtları bir çok yoldan engellemesi olasıdır. Yüzey molekülleri ile negatif sinyaller üretmesi, sitotoksik hücre ölümü, antijen sunan hücrelerin fonksiyonlarının düzenini bozulması, diğer düzenleyici hücrelerin aktivasyonu ve hücre-hücre etkileşimleri ile immün yanıtı etkileyebilir.



**Şekil 2.1.** Düzenleyici T Hücre farklılaşması (82) Tn: Naif, Tp: Timik Prekürsör

CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> hücrelerinin çatal başlı / kanatlı ve heliks yapısında, adına Foxp3 denilen bir transkripsiyon faktörü ekspres ettiği gösterilmiştir. Bu faktörü CD25<sup>-</sup> olan ama yine aynı düzenleyici aktiviteyi gösteren diğer düzenleyici hücre alt grubu da CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ekspres etmektedir (46, 47). Bu transkripsiyon faktörü T<sub>reg</sub> hücrelerinin gelişiminin ve fonksiyonlarının programlanmasında görevli ve T<sub>reg</sub> hücreleri için önemli bir gösterge olduğundan, hem farelerde hem de insanlarda bu genin mutasyonu ile birçok otoimmün hastalıklar (besin alerjisi, atopy, tiroititis, otoimmün endokrinopatoloji vb., insanlarda FOXP3 mutasyonu ile T<sub>reg</sub> eksikliğinde IPEX hastalığı) meydana gelebilir (48, 49). İnsanlarda otoimmün hastalıklar kemik iliği transplantasyonu ile biraz da olsa düzeltilebilmektedir (50). Farelerde CTLA-4 genin yokluğunda Foxp3'ün ektopik ekspresyonu belirgin anlamda hastalığın ilerlemesini durdurabilmektedir (46). Buna ek olarak, düzenleyici olmayan CD4<sup>+</sup> T hücrelerine zorunlu olarak Foxp3 ekspres ettirilirse T<sub>reg</sub> hücrelerinin karakteristik özelliklerini taşımaya başlarlar (kolitisin gastritisin inhibisyonu gibi). In vitro çalışmalarda Foxp3 CD4<sup>+</sup> T hücrelere transfer edildiğinde T hücre çoğalmasının durdurulduğu gösterilmiştir (46, 34). Foxp3 geni doğal T<sub>reg</sub> hücreleri için güvenilir bir belirteç olmasına rağmen, ekspresyonu düzenleyici aktivite gösteren bütün popülasyonlarda gösterilmemiştir.

Foxp3'ün timusta sadece spesifik periyotlarda oluşup oluşmadığı ya da periferde mi yukarı çekildiği bilinmemektedir. Son yıllarda CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T hücrelerinin TCR transgenik farelerde RAG-2 eksikliği olan farelerde CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T hücrelerine dönüşebildiği ve foxp3 ekspres edebildiği gösterilmiştir (51, 52).

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> hücreleri lenfopenik fareleri barsak hastalıkları ve diyabetten korur ve transplant atılımını engeller (53, 54). IL-10 üreten T<sub>reg</sub> hücreleri CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>düşük</sup> eksprese ederler. Bu hücreler de kolitis ve allograft atılım gibi hastalıklarda rol oynarlar (55, 56). Başlangıçta CD4<sup>+</sup> T hücrelerinde CD45RB<sup>yüksek</sup> eksprese edilmekteydi. IL-10 ve TGF-β, T<sub>reg</sub> hücrelerinin sadece kolitis değil aynı zamanda otoimmün veya patolojik alerjinin baskılanmasında önemli faktörlerdir. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> hücreleri hem in vivo hem de in vitro koşullarda naif T hücrelerinin çoğalmasını baskılamakta, buna karşılık, in vivo ortamda IL-10 otoimmünitenin baskılanmasından sorumlu iken in vitro koşullarda gastritisin ve naif T hücrelerinin çoğalmasının inhibisyonu IL-10'a bağlı değildir ve hücre-hücre etkileşimini gerektirir (57, 38, 41, 58). Bu hücre-hücre etkileşimi tam açık olmamakla birlikte aktive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>'ler üzerine TGF-β'nin membran bağlı formu olduğu ve T hücre çoğalmasını engellediği düşünülmektedir (59).

#### 2.4.2. Uyarılmış T<sub>reg</sub> hücreler

Bu hücreler antijenin tanınmasından sonra CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (naif) T lenfositler tarafından periferde üretilir. FoxP3 ve CD25 ekspresyonu yapabilirler ve baskılayıcı özellik kazanır. iT<sub>reg</sub>'lerin biyolojisi karışıktır ve nT<sub>reg</sub>'ler kadar iyi anlaşılammıştır. Ortamda belli bazı sitokinlerin varlığında uyarılan düzenleyici özellik gösteren T lenfositlerdir. iT<sub>reg</sub> hücreler, naif T lenfositlerin antijen tarafından uyarılması ve ortamda IL-10, IL-4, TGF-β gibi diğer bazı faktörlerin olması durumunda üretilir. Ağızdan ya da burundan antijen verilmesi iT<sub>reg</sub>'leri uyarır ve iT<sub>reg</sub>'ler T hücre reseptör sinyallerini değiştirir ya da antijenlerin düşük afiniteye tanınmasını sağlar. Tr1 ve Th3 iT<sub>reg</sub> olmak üzere iki alt grubu vardır (60).

#### 2.4.3. Tr1 iT<sub>reg</sub> hücreler

Fenotip olarak nT<sub>reg</sub> hücelere benzerler, IL-10 üretimi bu hücrelerin ayırt edici özelliği göstermektedirler. Ortamda IL-10 varlığında naif T lenfositlerin farklılaşması ile üretilirler ve IL-10 üretimi ile süpresyon yapmaya çalışırlar. Yüksek düzeylerde CD25 ve FoxP3 üretimi yapamazlar. Hücre-hücre ilişkisinin baskılanmasına aracılık edemezler. IL-10 ve düşük seviyelerde TGF-β ve IFN-γ üretmektedirler. Bazı çalışmalar Tr1 iT<sub>reg</sub> hücrelerin B lenfositlerden immünoglobulin yapımını baskıladığını ve dendritik hücre ve monosit gibi antijen sunan hücrelerin bu özelliklerini düzenlediğini göstermektedir (60).

#### 2.4.4. Th3 iT<sub>reg</sub> hücreler

Ortamda TGF-β varlığında naif T lenfositlerin farklılaşması ile üretilirler ve TGF-β üretimi ile süpresyon yapmaya çalışırlar. TGF-β üretimi bu hücrelerini karakteristik özelliğidir. TGF-β barsaklarda oldukça yüksek seviyede bulunan bir sitokindir. Ağızdan yabancı bir antijenin alınmasından sonra Th3 iT<sub>reg</sub>'ler oluşmaktadır. Th3 hücreler, nT<sub>reg</sub>'lere benzerler ve yüzeylerinde CTLA-4 molekülü taşırlar. FoxP3 ve CD25 üretimi Th3



hücrelerin TGF- $\beta$  ile uyarımından sonra artar.  $nT_{reg}$ 'lerin aksine etkileri TGF- $\beta$  üretimine bağımlıdır. TGF- $\beta$ , Th1 ve Th2 hücrelerin proliferasyonunu baskılar. Th3  $iT_{reg}$  hücreler, plazma hücrelerinden IgA sekresyonunu uyarmaktadırlar (60).

#### 2.4.5. Diğer Düzenleyici T hücreler

IL-10 ve TGF- $\beta$  üreten doğal öldürücü (NK) hücreler,  $\gamma\delta$  T hücreler, timustan köken alan  $CD8^+CD25^+$  T hücreler,  $CD8^+CD28^-$  düzenleyici T lenfositler,  $\alpha$ TCRs taşıyan T hücreler, bazı  $CD4^+CD28^-$  lenfositler, antiidiotip aktivitedeki T lenfositler, yaşlı  $CD4^+CD25^-$  T lenfositler ve belli bazı dendritik hücre alt gruplarının düzenleyici özellikleri vardır (60).

### 2.5. $T_{reg}$ Hücrelerinin IL-10 Üretimi

IL-10  $T_{reg}$  hücrelerinin in vivo olarak hastalıkların baskılanması ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesinin sağlayabilmesi için mutlaka IL-10 salgılayabilmesi gerekmektedir. Ancak in vitro koşullarda IL-10  $T_{reg}$  hücreleri IL-10'a bağlı değildir. Görevini yapabilmesi için hücre-hücre etkileşimine ihtiyaç duyar (57, 38).

IL-10  $T_{reg}$  ve  $CD4^+CD25^+$   $T_{reg}$  hücreleri birbirinden bağımsızdırlar. Doğal olan  $CD4^+CD25^+$   $T_{reg}$  hücreleri IL-10'un baskılama etkisine ihtiyaç duyabilir ya da duymayabilir. Yani her iki koşulda da çalışabilir. IL-10 üreten  $T_{reg}$  hücreleri ise hem in vivo hem de in vitro koşullarda antijen uyarımı ile gelişirler (57, 61, 62). Foxp3 ile transduse edildikten sonra  $CD4^+CD25^-$   $T_{reg}$  hücrelerinde IL-10mRNA'nın  $CD4^+CD25^+$   $T_{reg}$  hücreleri ile hiç transduse edilmemişlere göre kıyaslanabilir derecede attığı görülmüştür (46). Bu bulgular Foxp3'ün IL-10 üretimini yukarı çektiğini fakat bunu yaparken de IL-10 geninin uyarılması için, Foxp3'ün ekspresyonuna ek olarak, in vivo ek sinyallere ihtiyaç duyduğunu göstermiştir (58). Bu nedenle de IL-10 üretimi ile Foxp3'ün direkt bir etkileşimi söz konusu değildir. IL-10  $T_{reg}$  hücrelerinin hem in vivo hem de in vitro ortamlarda Foxp3 eksprese etmediği gösterilmiştir. Bu özelliği ile klasik  $T_{reg}$  hücrelerinden ayrılırlar. IL-10  $T_{reg}$  hücreleri Foxp3 eksprese etmedikleri halde IL-10 salgılayarak bağışıklık sistemini düzenleyebilirler. Bunu da aslında IL-2 ekspresyonunu aşağı çekerek yapmaktadırlar. Dengeyi IL-10 yönüne kaydırması için IL-10 salgısı artmış gibi görünmektedir (57, 63, 64, 65).

### 2.6. $CD4^+CD25^+$ $T_{reg}$ Hücrelerin Moleküler Karakteristikleri

$CD4^+CD25^-$   $T_{reg}$  hücreler CD25, CTLA-4, GITR, Foxp3,  $\alpha$ E $\beta$ 7, Lenfosit aktivasyon gen (LAG)-3 ve programlanmış ölüm-1 (PD-1)'i kapsayan birçok aktivasyon belirteçleri ile karakterize edilir.

### 2.6.1. CD25

Esas olarak CD25'in yüksek ekspresyonu CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> hücrelerinin özelliğidir ve CD25 erken T hücre aktivasyon belirteçidir. CD25 eksik farede kendiliğinden otoimmünite gelişir, fakat bu CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T hücrelerin aşılınması ile önlenmektedir. Önemli olarak, Foxp3 T<sub>reg</sub> hücrelerinin fonksiyon ve gelişimi için gerekli bir molekül olmasına rağmen, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> efektör T hücrelerde yoktur. Böylece CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> düzenleyici T hücreler ile CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T hücreler birbirinden ayrılabilir.

### 2.6.2. GTR (Glucocorticoid-Induced Tumor Necrosis Factor Receptor Family-Related Gene)

GTR, TNFRSF18 olarak bilinir, çoğunlukla CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> timositlerden eksprese edilir. GTR ekspresyonunun artışı naif T hücrelerde aktivasyonda araştırılmış fakat bu hücreler hiç supresif aktiviteye sahip olmadıkları anlaşılmıştır. Aksine CTLA-4, GTR, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg aracılı supresyonun azalması için gereklidir. GTR eksik farede, GTR'nin CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> yanıt veren hücrelerde sorumlu, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T hücrelerde değildir, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T hücre aracılı supresyon çalışmamaktadır. Ek olarak GTR-L, GTR ile CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> hücrelerin geri dönebilen supresyonu interaksyon halindedir.

### 2.6.3. Forkhead Box P3 (FOXP3)

CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> hücrelerin tanımlanması ve diğer T hücrelerden farklı olduğu, Treg spesifik transkripsiyon faktör Foxp3'ün keşfi sayesinde desteklenmiştir. Foxp3, Forkhead/ winged-helix ailesinin bir üyesidir. Farede hem timus hemde periferdeki CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T hücre popülasyonunda yüksek eksprese edilir ve ekspresyonu T hücre aktivasyonundan bağımsızdır. Yüksek Foxp3 ekspresyonu periferik CD4<sup>+</sup> T hücrelerinde süpresör fonksiyon ile indüklenebilir. Bu indüklenen T hücreleri hem anerjik hemde in vitro CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> yanıt veren T hücrelerinin proliferasyonunu süprese edebilir.

Foxp3, nükleer bir proteindir, in vitro CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> hücrelerin izolasyonu için kullanışlı bir belirteç olabilecek değerde limite sahiptir (66).

FoxP3, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> doğal T<sub>reg</sub> hücrelerin fonksiyonları ve gelişimlerinde özel bir rol oynamaktadır. FoxP3 periferik CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T hücreler ve CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> timositler tarafından eksprese edilir, diğer timosit, T / B lenfositler tarafından eksprese edilemez (67). Hem insanlarda hem de farelerde CD8<sup>+</sup> T hücrelerin ve CD25<sup>-</sup> T hücrelerin çok küçük gruplarının da FoxP3 ekspresyonu yapabildiği tespit edilmiştir (68, 69) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T hücreler FoxP3 ekspresyonu yaptıkları zaman hem fonksiyonel hem de fenotip olarak CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T lenfosit benzeri bir duruma dönüştükleri gösterilmiştir. Bu hücreler in vitro olarak diğer T lenfositlerin supresyonu yapabilir ve in vivo olarak otoimmün hastalıkların gelişimini inhibe edebilirler (67). FoxP3 eksikliğinde T lenfositlerde aktivasyon gelişmektedir. Scurfy fareleri ile karşılaştırıldığında FoxP3 eksikliği olan farelerde T hücrelerin hiperaktif olduğu görülmüştür (70).

#### **2.6.4. İntegrin $\alpha E\beta 7$**

$\alpha E$ - integrin (CD103)  $CD4^+$   $CD25^+$  T hücrelerde ve  $CD4^+$   $CD25^+$  murine T hücrelerde eksprese edilir.  $\alpha E^+$   $CD4^+$   $CD25^+$  T hücreler, total  $CD4^+$  T hücrelerin yaklaşık olarak %4'ü,  $CD4^+$   $CD25^+$  T hücrelerin % 25'ini oluşturduğu in-vitro deneylerde kanıtlanmıştır.

#### **2.6.5. Lenfosit Aktivasyon Gen-3 (LAG-3)**

Periferdeki  $CD4^+$   $CD25^+$   $T_{reg}$  hücrelerde eksprese edilir ve bir negatif düzenleyicidir. Antijen kullanan T hücre büyümesini farede inhibe ettiği bulunmuştur. LAG-3 eksikliği regülatör aktiviteyi inhibe eder.

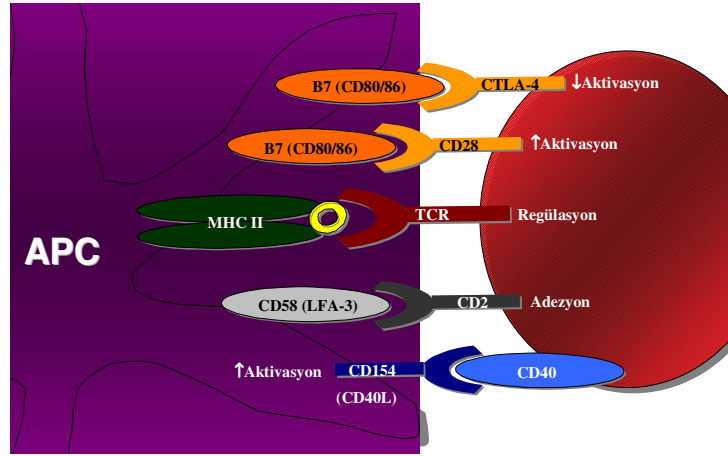
#### **2.6.6. Programlanmış Ölüm Reseptörü-1 (PDR-1)**

PD-1 CD28 ailesinin bir üyesidir, T hücrelerde eksprese edilir ve T hücre aktivitesinin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. PD-1 mRNA'sı hem  $CD4^+$   $CD25^+$   $T_{reg}$  hücrelerde hemde anejik T hücrelerde yüksek miktarda eksprese edilir. Bu nedenle PD-1 periferal tolerans ve otoimmünitenin düzenlenmesinde gerekli olabilir. PD-1 eksik fare lupus-benzeri glomerulonefritis, artrit ve otoimmün genişlemiş kardiyomiyopati geliştirmektedir. İlginç olarak PD-1 B hücrelerdede eksprese edilmektedir (66).

#### **2.6.7. CTLA-4 (Cytotoxic T lymphocyte-Associated 4 = CD 152)**

Fare ve insanlarda  $CD4^+$   $CD25^+$  T hücreler CTLA-4 eksprese etmektedirler. CTLA-4 kositimilatör molekül olan B7 için yüksek affiniteye sahiptir, immün supresyon onun bağlanma liderliğinde gerçekleşir. CTLA-4'ün blokajı T hücre aracılı immünitede, tümör immünitesi, parazit infeksiyonu ve otoimmün hastalıkları içeren bir çok model sistemde artış gösterir. Buna karşılık CTLA-4 eksik fareden türetilen  $CD4^+$   $CD25^+$  T hücreler normal gelişim ve homeostasis göstermektedir (66).

CTLA-4, aktive T hücreleri üzerinde yukarı çekilen, Ig süperailesinde yer alan ikincil sinyal moleküllerinden biridir. CTLA-4 molekülü T hücre ikincil sinyali olan CD28 molekülüne benzer bir moleküldür. Hem CD28 hem de CTLA-4 molekülleri antijen sunan hücreler üzerinde bulunan ve yine ikincil sinyal molekülleri olan B7-1 (CD80) ile B7-2 (CD86) moleküllerine bağlanır. CTLA-4 molekülü T hücrelerine inhibe edici sinyaller gönderirken bunun aksine CD28 molekülü uyarıcı sinyaller gönderir (Şekil 2.2.) (71).



**Şekil 2.2.** APC ve T hücre etkileşimi  
[www.uchsc.edu/diabetes/oxch1.html](http://www.uchsc.edu/diabetes/oxch1.html)

Darivach ve arkadaşları (72) 1988 yılında yaptıkları bir çalışmada genomik cDNA kütüphanesinde insan CTLA-4 genini izole edebilmek için fare *ctla4* probe kullanmışlardır. Sonuçta insan CTLA-4 proteini ile fare *ctla4* proteini arasında % 76 homoloji tespit edilmiştir.

Harper ve arkadaşlarının (73) 1991 yılında yaptıkları çalışmaya göre, CTLA-4 proteini bir V domeini, bir transmembran domein ve bir sitoplazmik kuyruk içermektedir. Bu domeinler ve sitoplazmik kuyruk dört ekson tarafından kodlanmaktadır. Sitoplazmik kuyruk, fosforlanmış iki potansiyel kısma sahiptir. Periferik kandaki aktif T hücrelerinde 1,8 ve 0,8 kb'lık iki CTLA-4 mRNA transkripti Northern Blot yöntemi ile tespit edilmiştir.

1995'te yapılan bir çalışmada da CTLA-4 proteininin homodimer (benzer yapıda olan iki proteininin beraber oluşturdukları yapı) yapıda olduğu ve bu yapıyı oluşturan proteinlerin birbirine disülfid bağları ile bağlı olduğu, ayrıca her bir monomerik peptidin yüksek afinitede B7-1 ve B7-2 moleküllerine bağlandığı tespit edilmiştir (74).

1999'da yapılan başka bir çalışmada hem insan hem de fare CTLA-4 proteininin sekansı yeniden yapılmıştır. İnsan proteininin 233 amino asitinin fare proteini ile yüksek homoloji gösterdiği ortaya çıkarılmıştır. Northern blot analizi ile CTLA-4 molekülü; dalakta, timusta, periferik kan lökositlerinde yüksek düzeyde, birçok dokuda, testiste, uterusu, kolonda, kalpte ve beyinde daha az düzeyde tespit edilmiştir (75).

Magistrelli ve arkadaşları (71) 1999'da eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunu (RT-PCR) kullanarak insan periferik kanında aktive olmamış T lenfositlerinin, CTLA-4 molekülünün alternatif formunu eksprese ettiğini belirlemişlerdir.

2000 yılında CTLA-4 molekülünün başka bir formu bulunmuştur. Bu form 137 aminoasit içermektedir. Daha sonra bunun çözülebilir CTLA-4 (sCTLA-4) olduğu ve moleküler CTLA-4 (CTLA-4 TM)'ün sekansı ile karşılaştırıldığında 34 sitoplazmik kuyruk yerine bunlardan sadece 22'sini içerdiği tespit edilmiştir. RT-PCR analizi ile sıçan lenf nodunda her iki formda CTLA-4 molekülü tespit edilmiştir. Ayrıca her iki form dalakta ve periferik kanda da tespit edilmiştir. Ancak sadece CTLA-4 TM yetişkin timusunda ve sadece sCTLA-4 kemik iliğinde bulunmaktadır. Lenfoid olmayan dokularda ise hiçbir formu bulunmamıştır. CD4<sup>+</sup> T hücrelerinde CTLA-4 molekülünün her iki formu eşit miktarda bulunurken , CD8<sup>+</sup> T hücrelerinde CTLA-4 TM molekülü sCTLA-4 molekülüne göre 2,5 kat daha fazla bulunur (76).

### 2.6.8. Nörofilin-1 (NrP-1)

Reverse transkripsiyon PCR'dan elde edilen sonuçlara göre CD4<sup>+</sup> T hücrelerde Foxp3 mRNA'sı nörofilin-1 (NrP-1) ekspresyonu ile koreledir. Ek olarak NrP-1 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> hücrelerin yüzeyinde yüksek miktarda eksprese edilir. Ayrıca NrP-1'in düşük seviyeleride CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T hücrelerinde eksprese edilmektedir, T hücre aktivasyonunda aşağı çekilir. Sonuç olarak NrP-1 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> hücreler, hem naif hemde aktive edilen CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> düzenleyici olmayan T hücrelerde ayırt etmek için ek bir yüzey belirteçidir.

### 2.7. Düzenleyici T Hücrelerin Etki Mekanizmaları

Düzenleyici T hücrelerinin etki mekanizmaları ile ilgili başlıca iki görüş vardır. T<sub>reg</sub>'lerin baskılayıcı fonksiyonlarını göstermek için hücre-hücre teması yaptıkları ya da IL-10 veya TGF- $\beta$  gibi sitokinleri salgılayarak uzaktaki hücreleri etkileyebildikleri gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda iki mekanizmanın da etkin olduğu bulunmuştur. Treg hücrelerin yüzey proteinleri olan PD-1 ve CTLA-4'ün antijenik uyarı ile aktive olmuş T hücrelerin aktivasyonunu inhibe ettiği etkisi zaten biliniyordu. Ayrıca, Treg hücrelerden eksprese edilen IL-10 ve TGF- $\beta$ 'nın özellikle IL-2 ve IL-12 gibi Th1 tip sitokinlerin salınımını baskıladığı gösterilmiştir. Diğer olası mekanizma ise, doğal T<sub>reg</sub>'lerin indoleamine 2,3 (IDO) veya adenosin ve siklik AMP aracılığı ile T hücre aktivasyonunu inhibe etmeleri ve T hücreleri apoptozise yönlendirmeleridir. T<sub>reg</sub>'lerin aktive T lenfositleri bu mekanizmalardan hangisi ya da hangileri ile baskıladığı tam olarak ortaya konulamamıştır (77, 34, 36, 37).

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>'ler gibi IL-10 T<sub>reg</sub> hücreleri de naif CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> hücreleri IL-10'dan bağımsız olarak IL-2 ekspresyonunu azaltarak baskılayabilmektedir (57, 38, 58). İn vitro sistemde naif T hücre çoğalmasının baskılanması regulasyonun ilk basamağı olarak tanımlanır. Doğal immün yanıt aktive olmadan baskılanmış olur.

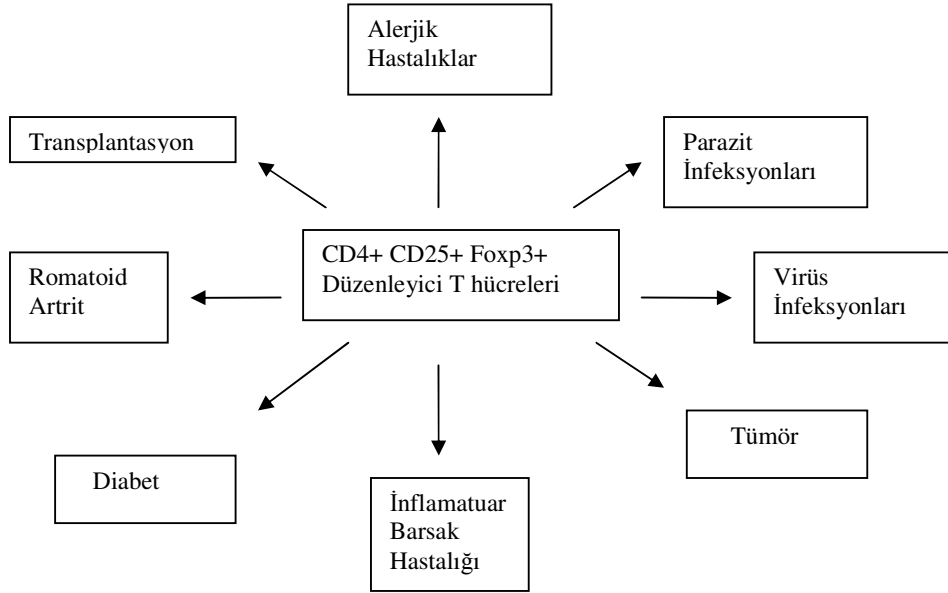
Düzenlenmenin bu basamağı IL-10 ekspresyonuna bağlı değildir. Düzenlenmenin ikinci basamağında ise IL-10 ve/veya TGF- $\beta$  üretilmesi

gereklidir. In vivo ortamda CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> tarafından T hücrelerinin çoğalmasının kontrolü IL-10 bağımlıdır ve düzenleyici sistemin kazanması için aşırı yangı ile ilişkili olarak yüksek doğal immün cevabın olması gerekir. Bu nedenle enfeksiyon ajanlarının neden olduğu durumlarda hem CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> hücreleri hem de IL-10 T<sub>reg</sub> hücreleri yangıyı IL-10 veya TGF-β bağımlı olarak inhibe eder (78).

## 2.8. CD4+ CD25+ Treg Hücrelerin Otoimmün Hastalıklardaki Rolü

Regülatör hücrelerin, self tolerans ve otoimmünitede kritik rolleri, timustan toplanan CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> hücrelerde net olarak kurulmuştur. Hem hayvanlarda hemde insanlarda Foxp3 mutasyonları ile CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T hücreler timusta gelişemez ve otoimmün hastalıklara hayatın erken zamanlarında boyun eyer. Ek olarak, T<sub>reg</sub> hücrelerin depleksyonu murine modellerin sonuçlarında kendiliğinden gelişen otoimmün hastalıklar görülmüştür (Kolitis, gastritis, İnsülin bağımlı otoimmün diabetler ve triotitis gibi...)(Çizelge 2.1).

**Çizelge 2.1.:** CD4+ CD25+ düzenleyici T hücreler ve süpresyon mekanizmaları (54).



### 2.8.1. İnflamatuvar Barsak Hastalığı (IBD)

IBD gastrointestinal sistemin tekrar nükseden idiyotipik bir inflamasyonudur. IBD patolojisi sadece CD4<sup>+</sup> T hücrelerin uygunsuz aktivasyonunun sonucu değil fakat düzenleyici T hücrelerin eksik/disfonksyonu sonucu olmayabilir. Birçok modelde CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>

hücrelerin transfer edildiği bölgede murine kolitisinin başarılı bir şekilde önlenmekte olduğu ve bunun direk olarak efektör T hücre çoğalması ve pro-inflamatuar sitokin üretimi sayesinde yaptığı gösterilmiştir.

### 2.8.2. Romatoid Artrit (RA)

RA kronik nükseden, havaaleli, CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T hücrelerin inflamasyonu tarafından, B hücreler, plazma hücreleri, nötrofiller ve makrofajlar sinovial kompartmanlar sayesinde inflamasyonlu eklem yeri ile karakterize edilen otoimmün bir hastalıktır. RA'lı hastalarda CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> GITR<sup>+</sup> T hücrelerin yüzdesi sinovial sıvıda (SF) periferik kan ile karşılaştırılınca belirgin bir şekilde artmış ve sağlıklı kontrollere oranla her ikisinde de bir artış gözlenmiştir (79).

CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> yüksek T hücreler aktif RA'lı hastalardan izole edildiğinde efektör T hücreler ve monositler sayesinde süprese edilen proinflamatuar sitokinler serbest bırakılır.

### 2.8.3. Sjögren Sendromu (SS)

Gottenberg ve arkadaşları (13) yaptıkları çalışmada CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> yüksek T hücre popülasyonunun primer sjögren sendromu (pSS) örneklerinde artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Aynı çalışmada ayrıca, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> yüksek hücrelerinin yaş ile de doğru orantılı bir şekilde arttığını göstermişlerdir.

IL-2 KO, IL-2R $\alpha$  KO ve RAG-1 KO farelere scurfy farelerden alınan lenf nodu hücrelerinin IV olarak enjeksiyonu sayesinde sjögren sendromu fare modeli oluşturulabilmiştir (12).

### 2.8.4. Diabet (T1D)

Tip 1 diabet, insülin üreten  $\beta$ -hücrelerinin yıkımı pankreasta oluşan T hücre aracılı otoimmün bir hastalıktır. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> hücrelerinin seviyesi T1D'li hastalarda değişik olup olmadığı tartışmalıdır. Bu hücrelerin in-vitro olarak T hücre proliferasyonunda baskılayıcı özellikleri, sağlıklı kontrollere kıyaslandığında belirgin olarak azalmıştır ve buda fonksiyonel bir T<sub>reg</sub> eksikliği gösteren T1D'in patogenezinde rol oynayabilir. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> hücrelerin, NOD (Non-Obese diabetic) farede yeniden yapılanması otoimmünite ve IFN- $\gamma$  üretiminin gelişimini önlediği gösterilmiştir. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T hücrelerin spesifik olarak pankreas dokusunda biriktiği ve bu hücrelerin azalan sayısı aynı bölgede diabetin hızı ile korele olduğu bulunmuştur.

### 2.8.5. Transplantasyon

Graft atılımını düzenleme, CTLA-4 ve TGF- $\beta$  bağımlıdır. Gorchynski ve arkadaşları (80) CD200'ün artırılan ekspresyonu ile portal damar preimmünizasyon ortaklığı sonrası transplant atılımının Tr1 tip immün

düzenlenmesini rapor etmişlerdir. Anti CD200R2/3 mAb'lerin eklenmesi, kemik iliği kültürlerinin dendritik hücre jenerasyonuna neden olmaktadır ve bu da CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> hücre popülasyonunu meydana getirmektedir.

### **2.8.6. Tümör İmmünitesi**

Birçok grupta yapılan çalışmalar CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> hücrelerin tümör atılımını inhibe etmede rol oynadığını göstermiştir. İnsanlarda CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> hücrelerin yüksek düzeyleri, akciğer, ovaryum, meme ve pankreatik tümör örneklerinde bulunmuştur. Bunun da indirek olarak düzenleyici T hücrelerin non-spesifik T hücre yanıtını süprese edebileceği işaret edebilir (66).

## **2.9. Sjögren Sendromu**

### **2.9.1. Tanım**

Sjögren sendromu(SS) başlıca tükürük ve gözyaşı bezleri olmak üzere ekzokrin bezlerin hasarı ile sonuçlanan, göz kuruluğu ve ağız kuruluğu ile karakterize otoimmün bir hastalıktır. Klinik özelliklerinin tümü ekzokrin bezlerdeki fonksiyon bozukluklarına bağlı olarak gelişmektedir. Ekzokrin bezlerde yoğun lenfosit infiltrasyonu oluşmaktadır. SS'nun primer ve sekonder olarak adlandırılan iki ayrı formu vardır. Primer SS'da altta yatan bir bağ doku hastalığı yoktur. Sekonder SS, romatoid artrit (RA), sistemik skleroz, sistemik lupus eritematosuz (SLE) ve polimiyozit gibi sistemik bağ doku hastalıklarıyla birlikte bulunmaktadır (81).

### **2.9.2. Epidemiyoloji**

SS klinik ve patolojik özellikleri ilk olarak 1933'de Danimarkalı bir göz uzmanı olan Henrik Sjögren tarafından tanımlanmıştır. Yıllarca, SS nispeten seyrek görülen ve çoğu kez romatoid artrit ile ilişkili, öncelikle yaşlı kadınları etkileyen bir hastalık olarak düşünülmüştür. SS'nun toplumdaki prevalansı %0.5 dir ve kadınları daha fazla etkilemektedir (Kadın erkek oranı: 9-10/1). Bu özellikleri ile SLE'ye benzer. En çok görülen üç romatizmal hastalıktan biridir. SS insidansı yaşla artar ve çocuklarda hemen hemen hiç görülmemektedir. Primer SS, 20-30 yaş arasında ve menapozdan hemen sonra (Ortalama 50 yaş) olmak üzere iki yaş dönemde artış göstermektedir. 60 yaş üzerindeki kadınların yaklaşık %2'sinde özellikle göz kuruluğu ve ağız kuruluğu gibi primer SS bulguları görülmektedir (81). SLE hastalarının %10-25 ve RA hastalarının % 30-50'inde sekonder SS bulunmaktadır. SS-A (Anti-Ro) pozitifliği olan SLE hastaları ile SS gelişimi arasında yakın bir ilişki vardır (82). RA'da sekonder SS gelişiminin HLA-DR4 varlığı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (83).



### 2.9.3. Tanı Kriterleri

Fizik muayenede aşkar ağız veya göz kuruluğu saptanan ANA ve/veya anti-Ro/anti-La antikörleri pozitif bulunan bir hastada primer SS tanısının konulması zor değildir. Bu hastalarda tedavinin planlanması ve tükrük bezi dışı organ tutulumlarının belirlenmesi daha önemlidir. Semptomları silik olan veya otoantikör pozitifliği olmayan hastalara tanı konulmasında güçlükler olmaktadır. Klinik olarak göz kuruluğunun saptanması kolay olmasına rağmen ağız kuruluğunun saptanması nispeten daha zordur. Ağız ve göz kuruluğunu gösteren klinik ve laboratuvar ölçümlere ilave olarak otoantikörler ile tükrük bezinin anatomik ve histolojik yapısını değerlendiren görüntüleme metodlarının da kullanıldığı tanı kriterleri oluşturulmuştur. Bu güne kadar bir çok tanı kriteri geliştirilmiş ve zamanla bu kriterlerde düzenlemeler yapılmıştır. En son önerilen Amerika-Avrupa konsensus grubu tarafından hazırlanan tanı kriterleridir (84)(Bkn Ek1)

### 2.9.4 Klinik Belirtiler

#### 2.9.4.1. Etiyoloji

Çok sayıda moleküler, histolojik ve klinik çalışmalar yapılmasına rağmen SS'nin patogenezi ve altta yatan sebepler henüz tam olarak bilinmemektedir. Genetik ve çevresel faktörlerin etyolojide rol oynadığı, patogenezin bir çok faktörden etkilendiği tahmin edilmektedir. Genetik olarak yatkın bireylerde bazı çevresel faktörler tarafından hastalığı başlatan mekanizmaların tetiklendiği düşünülmektedir. Hastalıkla yakın ilişkili otoantikörlerin varlığı ve dokudaki yoğun lenfosit infiltrasyonu nedeniyle patogenetik sürecin otoantikörler tarafından yürütüldüğüne inanılmaktadır (85).

Çevresel tetikleyici faktörler arasında viral enfeksiyonlar ve ağız floradaki bakteriler suçlanmıştır. Bazı incelemeler, retroviral enfeksiyonların (HIV-1, HTVL) SS'nun sebebi ya da gelişimine katkıda bulunan primer faktör olabileceğini ileri sürmektedir. Fakat retroviral enfeksiyonlar ile SS arasındaki nedensel ve etkilenim ilişkisi hala kurulamamıştır. Özellikle Epstein-Barr virüsü (EBV) ile hastalık arasında ilişki olduğu, SS hastaların tükrük bezlerinde EBV genomunun olduğu iddia edilmiştir. Fakat tüm SS'lu hastalarda EBV genomu tespit edilememektedir. HCV, Herpesvirular ve enteroviruler SS etyolojisinde düşünülen ve araştırılan diğer viruslardır. Bazı araştırmacılar ağız mukozasında mutant *streptococ* türleri ve *Candida spp* varlığı ile tükrük miktarındaki düşüklük arasında ilişki olduğunu ileri sürmüşlerdir (4, 5). Bu ajanların kronik inflamasyona, tükrük bezlerinde fonksiyon bozukluklarına ya da tükrük miktarında azalmaya neden olup olmadıkları konusu henüz tam açıklık kazanmamıştır (6).

SS'nun genetik temellerinin olduğu bilinmektedir. Tek yumurta ikizleri, hayvan modelleri ve aday genlerle yapılan çalışmalarda genetik yatkınlığı olduğu görülmüştür. Özellikle obes olmayan diabetik (NOD) farelerde yapılan çalışmalarda 1. ve 3. kromozom üzerindeki bazı aday alleller tespit edilmiştir.

İnsanlarda yapılan çalışmalarda HLA gen polimorfizmlerinin primer SS gelişimiyle ilişkili olduğu gösterilmiş ve anti-Ro/anti-La oluşumuyla spesifik HLA alleleri arasındaki ilişki tanımlanmıştır. SS'nin patogenezinde rol alan normal immun sistemin farklı evrelerinde önemli roller oynayan IL-10, IL-4R, IL6, TNF- $\alpha$ , CTLA-4 ve MBL (Mannoz bağlayıcı leptin) gibi bazı moleküllerin genlerindeki polimorfik değişikliklerin hastalık gelişimindeki etkilerini inceleyen bir çok çalışma yapılmıştır. Özellikle IL-10 ve TNF- $\alpha$  gen polimorfizmlerin hastalık patogenezinde rol oynayabileceğini gösteren dataların sayısı fazladır (75).

SS da, Ro ve La proteinlerine karşı gelişen otoantikörlerin(Anti-Ro/Anti-La)hastalık patogenezindeki rolleri tartışmalıdır. Bu proteinler normal immun sistemde self toleransa ile antijenik olarak tanınmaz iken timustan kaçan otoreaktif T lenfositler tarafından tanınması ve bunlara karşı antikörlerin sentezlenmesi olasıdır. Tükürük bezindeki apoptosuz nedeniyle oluşan aşırı hücre ölümü ve Ro proteinlerinin immun sistem tarafından tanınması bu otoantijenlerin primer immunojenik fonksiyon kazanmasına yol açabilir (86). Bununla beraber, Ro ve La antikörlerinin serum seviyesi hastalık aktivitesi ile korele değildir.

#### **2.9.4.2. Klinik**

SS kseroftalmi (göz kuruluğu) ve kserostomi (ağız kuruluğu) birlikteliği ile prezente olmaktadır. Hastaların %30-50'sinde iki semptom birlikte görülmektedir. Ağız kuruluğu sıklıkla sorgulama bulgusudur. Yutkunma zorluğu, tekrarlayan diş enfeksiyonları, tuzlu veya baharatlı yiyeceklerden sonra ağrı ve konuşma güçlüğü ağız kuruluğunu gösterir. Semptomlar sinsi gelişir ve çoğu kez birkaç yıl bu tanı düşünülmemektedir. Çünkü kuruluk şikayetleri ilaçlara (örneğin, antihistaminikler ve antidepresanlar), çevresel faktörlere veya yaşlılığa bağlanır. Bir çok hastada burun ve boğazda sıvı sekresyonu bozulur oral aftlara yatkınlık olmaktadır. Oral candidiasis ve diş çürükleri sık görülür. SS'da oluşan diş çürüklerinin tedavisi zordur ve erken tedavi edilmesi gerekmektedir.

Göz kuruluğu sonucu gözde kaşınma, kum batması hissi ve aşırı hassasiyetten görmenin bulanıklaşmasına kadar görme il ilgili çeşitli şikayetler olabilmektedir. Nadiren ciddi kuruluktan kaynaklanan korneal ülserler nedeniyle görme kaybı gelişebilir.

Sjögren sendromunda tükürük bezlerinde ağrısız büyüme olur, sıklıkla da bilateraldir. Büyüme genellikle ağrısızdır ve yavaş yavaş gelişmektedir. Tek taraflı büyümelerde lenfoma gelişimi ve tükürük bezi enfeksiyonları düşünülmelidir. SS hastalarda lenfoma insidansı artmıştır ve yaklaşık olarak hastaların % 5 inde lenfoma gelişmektedir.

Hastalıkta ekzokrin bezler dışındaki organlarında tutulumu mümkündür. Cilt belirtileri, palpabl veya nonpalpabl purpura, papüller, ürtikerial lezyonlar ve anüler lezyonlardır. Bazı hastalarda vaskülitik lezyonlar

gelişebilir. RA ve SLE'ye benzer şekilde poliartralji ve artrit gelişmektedir. Artrit kemik erozyonu yapmaz. Reynaud fenomeni SS'da görülen diğer önemli belirtidir. Fibromyaljiye benzer şekilde yaygın kas ağrılarına neden olmaktadır.

Üst ve alt solunum yollarında kuruluğa bağlı semptomlar gelişmektedir. En sık görülen semptom kuru öksürüktür. SS'de bronşektazi, interstitiel pnömoni ve fibrosiz gibi akciğer tutulumları gelişebilir. Bu hastalarda sigara içimi akciğer hastalıkları için ek majör risk faktörüdür. Mukozalardan kaynaklanan lenfomaların (MALToma) insidansı artmaktadır.

Perikardit ve pulmoner arteriel hipertansiyon gelişebilir. Hastalıkta kardiyak otonomik testler bozulmuştur ve otonomik nöropatiyi göstermektedirler. SS annelerin bebeklerinde anti-Ro ile ilişkili konjenital kalp blokları gelişebilir.

SS'da hem periferik hem de santral sinir sistemi tutulumu görülmektedir. Hastaların yaklaşık %20'sinde nörolojik bulgular vardır. Multibl skleroz ve Alzheimer benzeri santral sinir sistemi tutulumu gelişebilir. Vaskülitik etkilenimlere bağlı motor ve sensörial periferik nöropatiler oluşabilir. Böbreklerin etkilenmesi interstitiel nefrit, renal tübüler asidoz ve hipostenürik idrar şeklindedir. İnterstitiel nefrit gelişimi olabilir. Nadiren otoimmün hepatit ve pankreatit gelişebilir. SS'lu hastalarda depresyon ve anksiyete gibi psikiyatrik bozukluklar ile hipotroidi gibi endokrinolojik bozuklukların görülme sıklığı artmaktadır (81).

## GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1. Hastalar

Bu çalışmaya, Akdeniz Üniversitesi Tıp fakültesi İç Hastalıkları ve Romatoloji polikliniğine başvuran, primer sjögren sendromu düşünülen, yaşları 19 ile 77 arasında değişen 39 hasta (5 erkek, 34 kadın) alınmıştır. Sjögren sendromu tanısı için Avrupa Çalışma Grubu kriterleri kullanılmıştır (70). Sjögren sendromu sınıflama kriterleri ekte tablo olarak verilmiştir (Bkn Ek1). Hepatit C, daha önce boyuna radyasyon almış hastalar, AIDS hastaları, Sarkoidozis, antikolinerjik kullananlar, lenfoma öyküsü olanlar, gerft versus host hastalığı olanlar çalışmaya dahil edilmemiştir.

Kontrol grubu olarak yine Akdeniz Üniversitesi Tıp fakültesi İç Hastalıkları ve Romatoloji bölümünde takip ve tedavi edilen 40 Romatoid Artrit hastası (10 erkek, 30 kadın) ve 26 sağlıklı kontrol gönüllü vericiden oluşmaktadır. Tüm vericiler başlangıçta uzman bir doktor tarafından değerlendirilmiş, medikal öyküleri alınmış ve fizik muayeneleri yapılmıştır (Tablo 4.1.). Çalışmaya alınan grupların genel özellikleri görülmektedir. Çalışma için yerel etik kurul onayı alınmış, çalışmaya alınan tüm katılımcılara çalışma hakkında bilgi verilmiş, yazılı ve sözlü aydınlatılmış onam formu alındıktan sonra çalışmaya başlanmıştır.

Sjögren sendromu tanısı için poliklinikte ağız ve göz kuruluğu gibi tanısal değeri olan klinik bulguların varlığı sorgulanmış, göz kuruluğu için Shirmer ve göz yaşı kırılma zamanı (BUT) ölçümleri yapılmıştır. Sjögren sendromu düşünülen olgularda RF, ANA ve Anti-Ro\La antikoru çalışılmıştır. Tükrük bezi biyopsisi alınması planlanan hastalarla çalışma hakkında konuşulmuş; tükrük bezi biyopsisini kabul etmeyen ve tükrük bezi biyopsisi yapılmasına rağmen örneklerinden araştırma yapılmasına onay vermeyen hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir. Hasta grubunun Sjögren sendromu tanısı konma aşamasında olmaları sebebiyle tedavilerine başlanmadan biyopsileri alınmıştır. RA grubunda ise tanısı konmuş hastalar yer aldığı için tedavileri devam eden hastalardan periferik kan örnekleri alınmıştır.

Tükrük bezi biyopsisi, alt dudak iç kısmından, lokal anestezi yapılarak dudak orta kısmı ile ağız köşesindeki mesafenin 1/3 dış kısmından 0,5 cm'lik yüzeysel kesi ile yapıldı. Yeterli miktarda örnek alındıktan sonra sutur ile kapatıldı. Tükrük bezi biyopsisi alınması ile eş zamanlı olarak heparinli ve EDTA'lı tüplerine kan örneği alındı. Örneklerden otomatik kan sayım cihazı ile tam kan sayımı akış sitometrisi ile T hücre alt gruplarına bakıldı.

### 3.2. Akış Sitometrik analiz

Flow sitometrik analizler, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları ve Romatoloji A.D. Flow Sitometri Ünitesinde bulunan, Epics Altra, Beckman Coulter cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Flow sitometri ile yapılacak analizler için tam kan yöntemi kullanılmıştır. Kan örnekleri, vericilerden alınmalarını takiben en geç 10 dakikalık süre içinde laboratuvara ulaştırılmış ve 25 µl. kan örneği ile 3'er µl. monoclonal antikor kullanılarak yüzey ve stoplazmik boyamaları yapılmıştır.

- Çalışma grubu ve negatif kontrol için 25'er µl. kan örneği, 25'er µl. PBS ile test tüpünde sulandırıldı.

- Üzerine 3'er µl. monoclonal antikorlar, çalışma grubu için CD4 APC (Beckman Coulter) ve CD25PE (Beckman Coulter), izotipik kontrol için IgG2a-PE(mouse) (Beckman Coulter) ve IgG1(mouse)-FITC (Beckman Coulter) konularak karıştırıldı.

- 20 dakika (dk.) 25°C'de ve karanlıkta inkübe edildi.

- Bu süre sonrasında 100 µl. permeabilizasyon solusyonu reagent 1'den ( Fixation, intraprep, Beckman Coulter ) eklenip, iyice karıştırıldı.

- 15 dk. 25°C'de ve ışıkta bekletildi.

- Süre bitiminde 4ml. PBS ile 5 dk. 300g'de yıkama yapıldı (Beckman Coulter Allegra X-22R santrifüj). Supernatant atıldı.

- Dipte kalan hücrelerin üzerine 100 µl. permeabilizasyon solusyonu reagent 2'den ( Fixation, intraprep, Beckman Coulter ) yavaşça konup ve karıştırmadan 5 dk. ışıkta bekletildi.

- Süre bitiminde tüpler yavaşça karıştırılıp ve üzerine 3 µl. monoclonal antikor (Foxp3 AbD serotec) ve sekonderi (IgG FITC AbdD serotec) eklenerek 20 dk. 25°C'de ve karanlıkta bekletildi.

- Sonrasında 4ml. PBS ile 5 dk. 300g'de yıkama yapıldı (Beckman Coulter Allegra X-22R santrifüj). Supernatant atıldı.

- Tüpün dibinde kalan hücrelerin üzerine 1ml. PBS eklenip analize hazır hale getirildi.

Akış sitometrisi Flow-Check Fluorospheres (Beckman Coulter) ile kalibre edildikten sonra örnekler cihaza verildi. Analiz bölgesinde negative izotipik kontrolün floresansından daha yoğun floresans gösterenlerin total populasyon içerisindeki yüzdeleri (ilgili antijeni taşıyan hücre yüzdesi) saptandı.

### 3.3. İmmünohistokimyasal Boyama ve Değerlendirme

Formalin ile fikse edilip parafine gömülü bloklardan elde edilen doku örneklerine immunohistokimyasal olarak “Streptavidin-Biotin Peroksidaz” yöntemi ile immunovision uygulandı.

İmmünohistokimya uygulanacak 5 mikronluk kesitler “chromalium-gelatin adhesive” ile kaplı lamlara alınmıştır. Lamlar, 60°C’ de etüvde parafini eritilip, ksilol solüsyonunda iki kez 5’ er dakika deparafinize edildi. Daha sonra azalan derecelerde alkolden geçirilip, distile suya alınarak dehidrate edildi. Ardından kesitlere antijenin yeniden kazanılması amacıyla “antijen retrieval” işlemi uygulandı. Bu işlem, 0,01 M sitrat solüsyonu (trisodyum sitrat) içinde pH:6,0 da sıvı seviyesi lamların üzerini kapatacak ve kesitler kurumayacak şekilde 98°C’ de basmalı kaybetme modülünde 40 dakika kaynatıldı ve kesitler oda ısısında 20 dakika soğumaya bırakıldı. Ardından endojen peroksidaz enzim blokasyonu için %3’ lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonu ile kesitler 5 dakika inkübe edildi. Daha sonra preparatlar tamponlanmış fosfat solüsyonunda yıkanarak 5 dakika bekletildi. Her üç immünohistokimyasal örnekte zemin boyanmasını önlemek amacı ile kesitler 10 dakika protein blocking solüsyonunda bekletildi ve işlem sonunda üzerindeki fazla protein blocking solüsyonu döküldü. Daha sonra preparatlar üzerine primer antikorlar eklenip 2’ şer saat inkübe edildi. Daha sonra kesitler tamponlanmış fosfat solüsyonunda 5 dakika bekletildi. Primer antikor ile enzim taşıyan antikor arası bağlayıcı görev yapan Linking Reagent ile doku kesitleri 15 dakika inkübe edildi. Streptoavidin ile konjüge edilmiş “horseradish peroksidaz” ile dokular 15 dakika inkübe edildi. Chromogenic substrate (DAB) ile 5 dakika inkübe edildi. Preparatlara hemotoksilen ile zıt boyama yapıldı ve lamelle kapatıldı.

Her üç antikor için tüm inkübasyon basamakları oda sıcaklığında ve nemli ortamda gerçekleştirildi. Renklendirici olarak diaminobenzidine (DAB) kullanıldı, oluşan kahve renk pozitif olarak kabul edildi.

İmmünreaksiyonu yüzde alan ve boyanma şiddetine göre değerlendirilmiştir. Boyanma izlenmemişse 0, boyanma izlenen alan %10’ un altında ise 0, %11-19 ise 1, %20-29 ise 2, %30-39 ise 3, %40-49 ise 4, %50’ den fazla ise 5 olarak değerlendirilmiştir. Boyanma şiddetine göre değerlendirildiğinde; boyanma yok ise 0, (+) şiddette boyanma varsa 1, (++) şiddette boyanma varsa 2, (+++) şiddette boyanma varsa 3 olarak tanımlanmıştır. Hem boyanan alan hem de boyanma şiddeti dikkate alınarak skorlama yapılmıştır. Buna göre hastaların aldığı skor 0-8 arasında değişmektedir. 0 skor alanlar Foxp3 eksprese etmeyenler, 1-3 skor alanlar düşük düzeyde Foxp3 ekspresyonu yapanlar, 4-5 skor alanlar orta derecede Foxp3 eksprese edenler, 6-8 skor alanlar yüksek düzeyde Foxp3 eksprese edenler olarak gruplandırılmıştır (Tablo 3.2.).

**Tablo .3.2.** % Boyanan alan, boyanma şiddeti ve skorun gösterilişi

% Boyanan alan	Boyanma şiddeti	Skor
< %10	0	0
	1	1
	2	2
	3	3
% 10-19	0	1
	1	2
	2	3
	3	4
% 20-29	0	2
	1	3
	2	4
	3	5
% 30-39	0	3
	1	4
	2	3
	3	6
% 40-49	0	4
	1	5
	2	6
	3	7
> % 50	0	5
	1	6
	2	7
	3	8

**Skorlama;**

- Skor 0= FoxP3 eksprese etmeyen
- Skor 1-3= Düşük düzeyde FoxP3 eksprese eden
- Skor 4-5= Orta düzeyde FoxP3 eksprese eden
- Skor 6-8= Yüksek düzeyde FoxP3 eksprese eden

**3.4. İstatistiksel Değerlendirme**

Sonuçların istatistiksel testleri Windows SPSS 14.0 versiyonu kullanılarak yapıldı. Ortalama değerlendirmeler için tanımlayıcı testler, nonparametrik karşılaştırmalar için Mann Whitney-U testi, korelasyonlar için Sperman korelasyonu ve Kruskal Wallis testi kullanıldı.

## BULGULAR

### 4.1. Hastaların Genel Özellikleri

Çalışmaya alınan hasta ve kontrol (RA) gruplarına ait 39 hasta (5 erkek, 34 kadın) ve 40 Romatoid Artrit hastası (10 erkek, 30 kadın) gönüllü vericiden alınan kan örnekleri ile yapılan tetkiklerin sonuçları tablo 4.1.'de özetlenmiştir.

**Tablo 4.1.** Hastaların genel özellikleri

	SJS(39)	RA(40)	P
Yaş	47,4±12,9	48,0±10,8	0,799
Cins(E/K)	34/5	30/10	0,168
ESR	39±27	33±25	0,216
CRP	0,6±0,8	1,0±1,7	0,432
Hb	12,9±1,3	12,6±1,5	0,365
Lökosit	7602±2710	8141±2560	0,373
Mutlak Lenfosit	2170±867	2088±700	0,496
Biospi(Chisholm)			
I	5		
II	11		
III	9		
IV	14		
RF(+)	9(%23)		
ANA(+)	8(%20)		

### 4.2. Akış Sitometrisi Sonuçları

Çalışmamıza dahil ettiğimiz Sjögren Sendromu hastalarına ait akış sitometrisi sonuçları ile RA'lı ve sağlıklı kişilerden oluşturduğumuz kontrol gruplarının CD4<sup>+</sup> lenfosit ve CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> lenfosit yüzde (%) oranları arasında fark olmadığını, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> hücre % oranlarını ise farklı olduğu tespit ettik. Özellikle RA'lı hastalarda CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sayısı sağlıklı bireylerden fazlaydı. Buna karşılık Sjögren Sendromu hastaları ile sağlıklı kontrol veya RA grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Bulgular Tablo 4.2.'de gösterilmiştir.

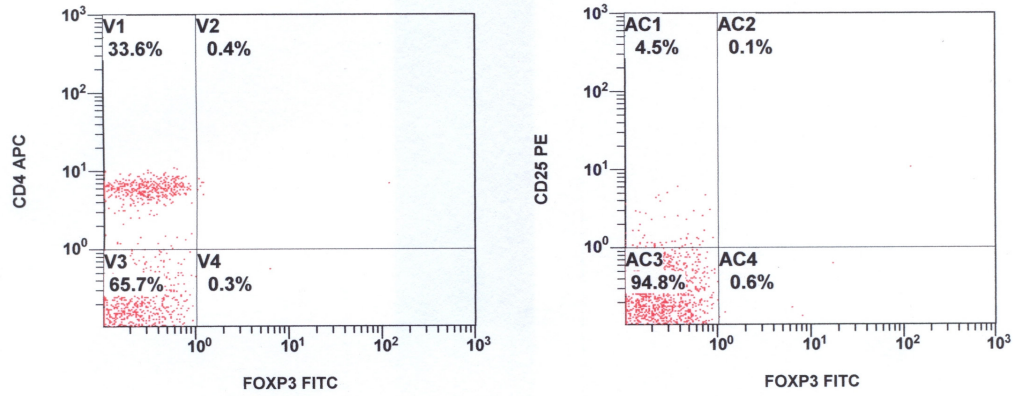


**Tablo 4.2.** CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> ve Foxp3<sup>+</sup> hücre yüzdeleri ile Sjögren Sendromu, RA'lı kontrol ve sağlıklı kişilerün akış sitometrisi sonuçları karşılaştırılması

	RA	SjS	Kontrol	P
CD4 <sup>+</sup>	46.4 ± 9.2	42.4 ± 8.7	42.5 ± 5.5	0,157
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	4.9 ± 2.9	4.0 ± 3.1	3.1 ± 2.0	0,006
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup>	0.8 ± 1.9	0.6 ± 0.7	0.5 ± 0.4	0,259

RA ile Kontrol arasında CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> hücre % oranları p= 0.001  
RA'lı hastalarda CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sayısı sağlıklı bireylerden fazla görülmektedir.  
Sjögren Sendromu hastaları ile sağlıklı kontrol veya RA grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

**Çizelge 4.1.** Sjögren Sendromu hasta grubundan bir olgunun akış sitometri görüntüsü



Bir Sjögren Sendromu hastasının CD4 APC, CD25 PE ve Foxp3 FITC ile periferik kandan üçlü boyanan hücrelerin akış sitometrisi görüntüleri Çizelge 4.1.'de gösterilmiştir.

Çizelgede CD4<sup>+</sup> hücre yüzdesi %34, CD25<sup>+</sup> hücre yüzdesi % 4.6, Foxp3<sup>+</sup> hücre yüzdesi %0,7 olarak görülmektedir.

### 4.3. İmmünohistokimya ve Akış Sitometri Sonuçları

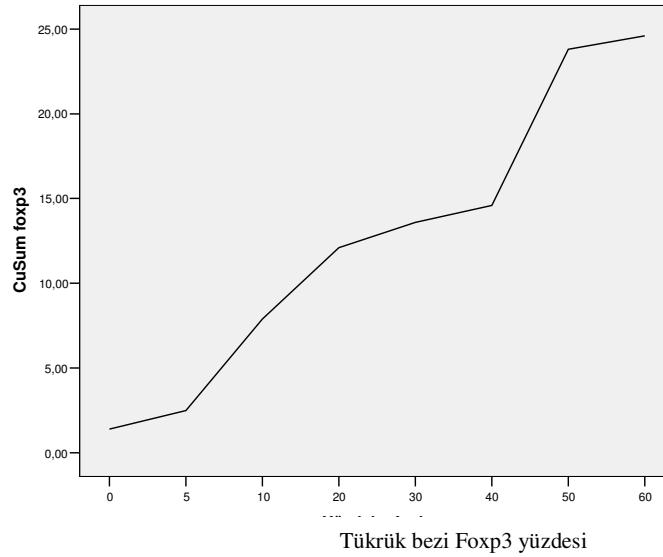
**Tablo 4.3.** Chisholm ile periferik lenfositlerin ilişkisi

Chisholm	I	II	III	IV	P
CD4 <sup>+</sup>	43,0±8,3	43,8±7,0	43,4±9,8	40,0±10,1	0,835
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	5,6±6,1	3,8±2,1	4,34±9,8	3,7±2,5	0,945
Foxp3 <sup>+</sup>	0,34±0,48	0,78±0,8	0,65±0,7	0,7±0,9	0,419

Çalışmamıza dahil edilen 39 Sjögren Sendromu hastasının tükürük bezi biyopsileri üzerinde yapılan Chisholm ile periferik kandaki CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ve FoxP3 pozitif hücre sayıları arasında ilişki (Korelasyon) bulunmadığı tablo 4.3.'de gösterilmiştir.

Dokudaki lenfosit yoğunluğu ile periferik kandaki CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> hücre sayıları arasında ilişki (korelasyon) saptanmadı. Tükürük bezindeki lenfosit yüzdesi ile periferik kandaki CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3 hücre sayıları arasında zayıf ama pozitif bir korelasyon saptandı (p=0.022, r= +0.38). Çizelge 4.2.'de gösterilmiştir. İstatistiksel değerlendirmede Spearman korelasyon testi kullanılmıştır.

**Çizelge 4.2.** Tükürük bezindeki Foxp3 yüzdesi ile periferik kandaki CD4+CD25+FoxP3 hücre sayıları dağılımı

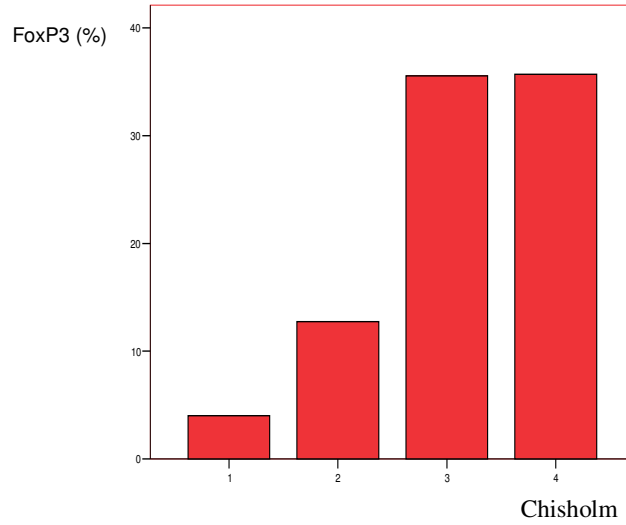


**Tablo 4.4.** İmmünohistokimya ile periferik lenfosit alt gruplarının ilişkisi

	Düşük Foxp3 Ekspresyonu	Orta Foxp3 Ekspresyonu	Yüksek Foxp3 Ekspresyonu	P
CD4 <sup>+</sup>	41,7±6,8	42,2±9,44	4,35±10,91	0,876
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	3,81±3,7	3,37±2,29	3,49±3,18	0,567
Foxp3 <sup>+</sup>	0,52±0,55	0,57±0,82	1,0±0,96	0,174

İmmünohistokimyasal incelemelerdeki dokudaki FoxP3 boyanma skoru ile periferik kandaki CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ve FoxP3 pozitif hücre sayıları arasında ilişki (Korelasyon) saptanmadığı tablo 4.4. ve çizelge 4.3'de gösterilmiştir. İstatistiksel değerlendirmede Spearman korelasyon testi kullanılmıştır.

**Çizelge 4.3.** Chisholm ile dokudaki FoxP3 pozitif hücre sayıları arasındaki ilişki



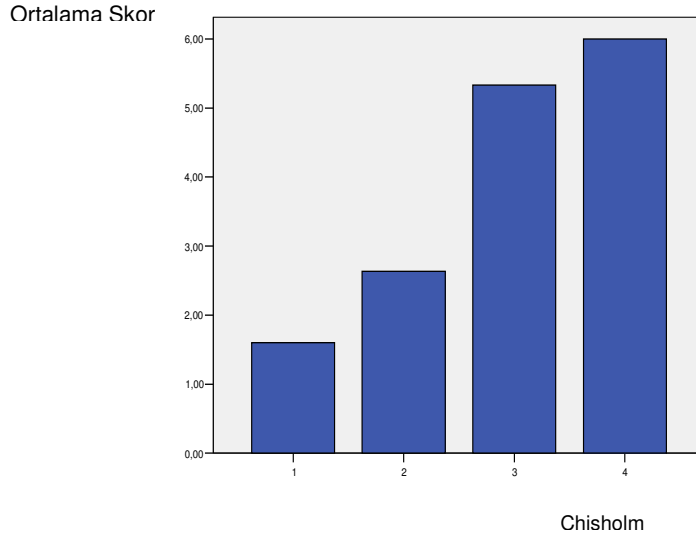
Tükrük bezi biyopsilerinde yapılan immünohistokimyasal boyamalar sonucunda bu dokuda bulunan Foxp3 pozitif olan hücreler ile Chisholm skoru korele edildiğinde Chisholm 3 ve 4 grubunda eşit ve Chisholm 1 ve 2'den fazla miktarda Foxp3 boyanması görülmektedir (Çizelge 4.3).

**Tablo 4.5.** Chisholm ve yüzde Foxp3 miktarı arasındaki korelasyon ilişkisi

Chisholm	Pearson Correlation	1	,605(**)
	P		,000
	N	40	39
Yüzde Foxp3	Pearson Correlation	,605(**)	1
	P	,000	
	N	39	39

İmmünohistokimyasal incelemelerdeki dokudaki FoxP3 boyanma skoru Chisholm ile yine dokudaki yüzde Foxp3 miktarları arasında anlamlı bir ilişki (Korelasyon) saptandığı Tablo 4.5. ve çizelge 4.3'de gösterilmiştir ( $p=0.000$ ,  $r= + 0,605$ ). İstatistiksel değerlendirmede Spearman korelasyon testi kullanılmıştır.

**Çizelge 4.4.** Ortalama FoxP3 boyanma skoru ile Chisholm arasında ilişki



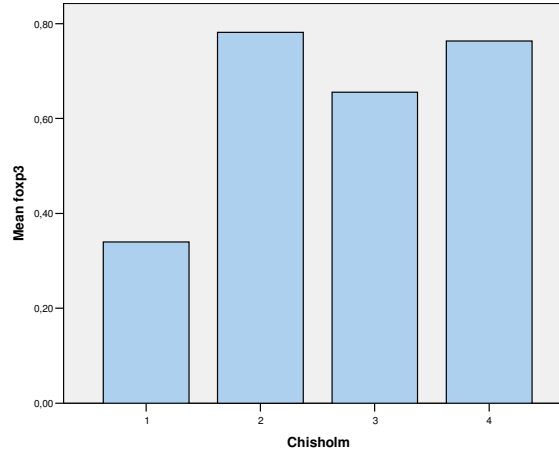
Tükrük bezi biyopsilerinde yapılan immünohistokimyasal boyamalar sonucunda bu dokuda bulunan Foxp3 pozitif olan hücrelerin yüzdeleri ve boyanma şiddetlerinden oluşturduğumuz ortalama skor ile Chisholm korele edildiğinde Chisholm 3 ve 4 grubunda Chisholm 1 ve 2'ye nazaran fazla miktarda Foxp3 boyanması görülmektedir (Çizelge 4.4).

**Tablo 4.6.** Chisholm ve Foxp3 skor arasındaki korelasyon ilişkisi

Chisholm	Pearson Correlation	1	,709(**)
	P		,000
	N	40	38
Skor	Pearson Correlation	,709(**)	1
	P	,000	
	N	38	38

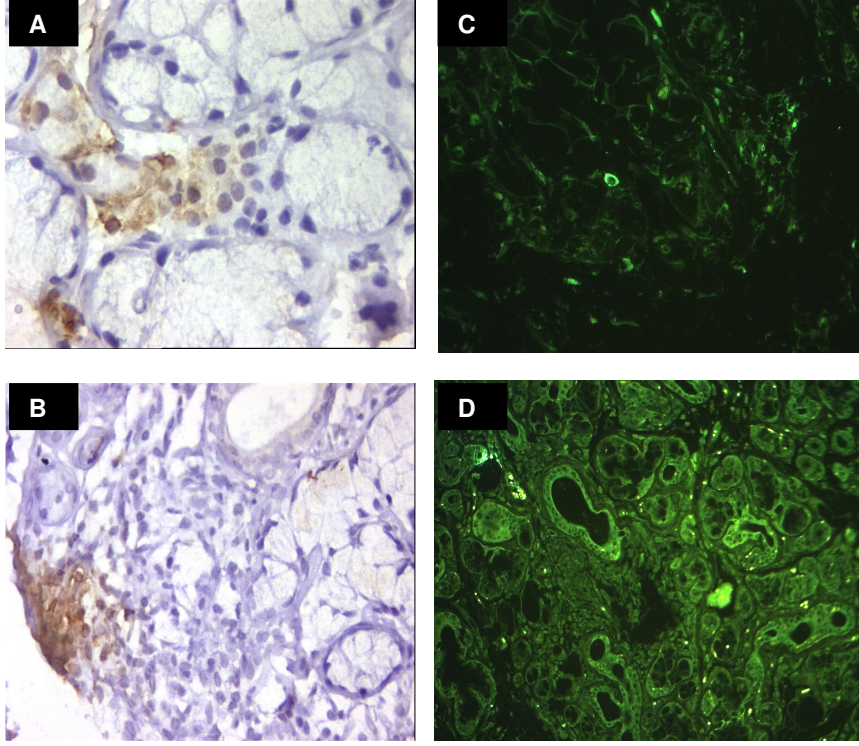
İmmünohistokimyasal incelemelerdeki dokudaki FoxP3 pozitif olan hücrelerin yüzdeleri ve boyanma şiddetlerinden oluşturduğumuz ortalama skor ile Chisholm arasında anlamlı bir ilişki (Korelasyon) saptandığı tablo 4.6. ve çizelge 4.4'de gösterilmiştir (p=0.000, r= + 0,709). İstatistiksel değerlendirmede Spearman korelasyon testi kullanılmıştır.

**Çizelge 4.5.** FoxP3 boyanma skoru ile periferik kandaki CD4+, CD4+CD25+ ve FoxP3 pozitif hücre sayıları arasında ilişki



Periferik kan örneklerinde yapılan akış sitometrisi boyamaları sonucunda bulunan Foxp3 pozitif olan hücrelerin yüzdeleri ortalaması ve Chisholm korele edildiğinde anlamlı bir korelasyon görülmemektedir (Çizelge 4.5). İstatistiksel değerlendirmede Spearman korelasyon testi kullanılmıştır.

#### 4.4. İmmünohistokimya ve İmmünfloresan Sonuçları



**Şekil 4.1.** İmmünohistokimya ve immünfloresan görüntüleri. A ve B şekilleri Foxp3 antikoru ile immünohistokimyasal yöntem ile boyanmış tükürük bezi görüntüsü. C ve D Foxp3 antikoru ile immünfloresan yöntemi ile boyanmış tükürük bezi görüntüsü.

Şekil 4.1.'de gösterilen A ve B şekillerinde Foxp3 antikoru ile immünohistokimyasal yöntem ile boyanmış tükürük bezi biyopsisi pozitif boyanan hücreleri kırmızı olarak görülmektedir. C ve D şekillerinde ise Foxp3 antikoru ile immünfloresan yöntemi ile boyanmış tükürük bezi biyopsisi pozitif boyanan hücreleri yeşil renkli olarak görülmektedir.

## TARTIŞMA

T hücrelerinin aktive olabilmesi için üzerinde bulundurduğu TCR reseptörleri ile yabancıyı tanınması gerekir. Bunun içinde APC'ler tarafından T hücrelerine MHC KlasI veya MHC KlasII yardımı ile proteinler sunulur. T hücreleri TCR yardımı ile yabancı peptidi tanır ve hemen aktivasyon reseptörlerini yukarı çeker. Böylece birinci sinyal gerçekleşmiş olur. Bu arada IL-2R (CD25) yukarı çekilir ve salınan IL-2 sitokini bu reseptöre bağlanarak T hücrelerinin antijene spesifik olarak çoğalmasını sağlar. Aktive olan T hücre yüzeyinde ikincil bir sinyal molekülü olan CD28 gösterilir.

Periferik kandaki CD4<sup>+</sup> T hücrelerinin %1-5'ini düzenleyici T hücreleri oluşturur (Düzenleyici T hücreleri, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T hücreler ya da T<sub>reg</sub> olarak da isimlendirilirler). Genel anlamda yaptıkları işin hem hayvanlarda hem de insanlarda otoimmüniteyi baskılamak olduğu bilinmektedir (78). Bugünkü yapılan araştırmaların bir çoğunun odağı CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T hücreleridir. Düzenleyici T hücrelerinin bir çok alt grubu vardır. Özellikle de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T hücreleri, Foxp3 ekspresyonuna bakılmaksızın periferik kanda tespit edilen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T hücrelerinin tamamı aktif T hücrelerini temsil etmektedir. Yani bu aktive olmuş T hücreleri içinde Foxp3<sup>+</sup> olan düzenleyici T hücreleri de vardır (37, 38).

T<sub>reg</sub> hücre düzenlenmesi eksik olan farede sıklıkla T hücre ilişkili pek çok organı etkileyen sistemik otoimmünite geliştirmektedir (12).

RA'lı hastalarda CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> GITR<sup>+</sup> T hücrelerin yüzdesi sinovial sıvıda (SF) periferik kan ile karşılaştırılınca belirgin bir şekilde artmış ve sağlıklı kontrollere oranla hem SF'da hem de periferik kan örneklerinde bir artış gözlenmiştir (79). Bizim çalışmamızda Sjögren sendromu hastalarının tükürük bezindeki yani dokudaki Foxp3<sup>+</sup> hücre yoğunluğu (T<sub>reg</sub>) bu çalışmaya benzer şekilde artarken, farklı olarak periferik kanda CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> hücre miktarında anlamlı bir artış görülmemiştir.

SLE hastalarında yapılan bir çalışmada aktif SLE'liler ile inaktif SLE'liler, kontrol grubu ve RA'lı hastalar arasında periferik kan CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> hücrelerine bakıldığında, hastalar ve kontrol arasında anlamlı bir fark bulunmamış, ancak SLE'li hastalarda CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> fonksiyonlarında anlamlı bir düşüklük olduğu saptanmıştır ki bu durum SLE de düzenleyici fonksiyonlarda bozukluk olabileceği fikrini desteklemektedir (87).

Yapılan başka bir çalışmada ise yaş ile birlikte CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> hücre miktarının periferik kan örneklerinde arttığı gösterilmiştir (84). Sjögren sendromu hastalığı ve diğer otoimmün hastalıkların da ileri yaşlarda kendini

gösterdiği düşünülürse Foxp3 pozitif ( $T_{reg}$ ) hücre sayısının artışı bizi şaşırtmamaktadır.

Sjögren sendromu(SS) başlıca tükürük ve gözyaşı bezleri olmak üzere ekzokrin bezlerin hasarı ile sonuçlanan, göz kuruluğu ve ağız kuruluğu ile karakterize otoimmün bir hastalıktır. Klinik özelliklerinin tümü ekzokrin bezlerdeki fonksiyon bozukluklarına bağlı olarak gelişmektedir. Ekzokrin bezlerde yoğun lenfosit infiltrasyonu oluşmaktadır. SS'nun primer ve sekonder olarak adlandırılan iki ayrı formu vardır. Primer SS'da altta yatan bir bağ doku hastalığı yoktur. Sekonder SS, romatoid artrit (RA), sistemik skleroz, sistemik lupus eritematosuz (SLE) ve polimiyozit gibi sistemik bağ doku hastalıklarıyla birlikte bulunmaktadır (81). Genler ve patojenik mekanizmalar önderliğinde organ hasarı ile ilerleyen otoimmün hastalığı neyin tetiklediği açık değildir (12). Sjögren Sendromu hastalığının otoimmün bir hastalık olmasından dolayı bu çalışmada, periferik kanda  $CD4^+CD25^+$  Foxp3<sup>+</sup> T hücre yüzde miktarları ve bu yüzdelerle hastalığın aktivasyonu arasındaki ilişkinin yanısıra hastalardan alınmış olan tükürük bezi biyopsilerindeki Foxp3<sup>+</sup> hücrelerin oranları araştırılmıştır.

Gottenberg ve arkadaşları (13) (2005) yaptığı çalışmada  $CD4$   $CD25^{yüksek}$  T hücre popülasyonunun, primer sjögren sendromu (pSS) örneklerinde artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Aynı çalışmada ayrıca,  $CD4$   $CD25^{yüksek}$  hücrelerinin yaş ile de doğru orantılı bir şekilde arttığını göstermişlerdir.

Gottenberg ve arkadaşlarının (13) bu çalışmalarının yapıldığı dönemde Foxp3 antikorunun olmayışı nedeniyle bu hücrelerde Foxp3 ekspresyonuna bakılamamıştır. Bizim çalışmamızda ise Foxp3 ekspresyonuna bakılabilmemesinden dolayı, elde edilen değerlerin güvenilirliği ve bu hücrelerin düzenleyici T hücresi olduğu daha kesin olarak söylenebilmektedir. Ayrıca periferik kanda ve tükürük bezi biyopsilerinde eş zamanlı olarak Foxp3 ekspresyonuna hem akış sitometrisi, hem immünohistokimya hem de immünfloresan gibi duyarlı yöntemlerin kullanılmış olması çalışmamızı daha da güvenilir kılmaktadır.

$T_{reg}$  hücrelerinin temel görevleri oluşan immün yanıtın düzenlenmesi ve bir anlamda sınırlandırılmasıdır (66, 12). Bununla birlikte  $T_{reg}$  hücrelerinin şu an itibarı ile bilinmeyen başka düzenleyici görevleri de bulunabilir. Doku örneklerinde  $T_{reg}$  hücrelerin çeşitli otoimmün hastalıklarda yoğunluğunu gösteren sınırlı sayıda çalışma vardır. Miyara ve arkadaşlarının (85) çalışmasında aktif SLE'li hastalarda böbrekte  $T_{reg}$  birikimi olmadığı saptanmıştır. Keza başka bir çalışmada primer biliyer sirozlu hastalarda karaciğerde Foxp3 pozitif hücrelerin yoğunluğunun az olduğu bulunmuştur (44). Yakın zamanda Sjögren sendromlu hastalarda yapılan çalışmada tükürük bezi biyopsilerinde  $T_{reg}$  hücre yoğunluğunun kontrol grubuna göre daha az olduğu saptanmıştır. (86) Keza bu çalışmada Foxp3 ifade eden  $T_{reg}$  hücrelerin yoğunluğunun parotiti olan hastalara göre de dokuda azaldığı gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda bu çalışmanın aksine doku örneklerinde



hastalık şiddeti arttıkça Chisholm klasifikasyonunun ileri safhalarında artmış  $T_{reg}$  hücre yoğunluğu saptanmıştır (tablo 4.5.-4.6. ve çizelge 4.3.- .4.4). Bu durum birden fazla şekilde yorumlanabilir. Bunlardan birisi artmış olan immün aktivasyonu suprese etme veya regüle etme çabaları nedeni ile sayısal artış olarak yorumlanabilir.  $T_{reg}$  hücrelerin en önemli görevi süpresyon olduğu için bu olasılık oldukça güçlüdür. Kaldı ki Sjögren sendromlu hastalarda dokuda infiltre olmuş olan düzenleyici T hücrelerin fonksiyonlarının bozulmadığı yapılan çalışmadan anlaşılmaktadır (86). Keza yapılan başka bir çalışmada RA'lı hastaların sinovial dokularında düzenleyici hücre sayısında anlamlı bir artış olduğunu gösterilmiştir ki bu çalışma bizim çalışmamıza paralel olarak hastalığın primer olarak olduğu doku seviyesinde düzenleyici hücrelerin sayısal artış göstererek muhtemel inflamasyonu suprese etme çabaları olarak yorumlanabilir (87). Çünkü Romatoid Artritte esas tutulan organ, eklemler ve burada yer alan sinoviyal, Sjögren sendromunda ise ekzokrin bezler olup buralardaki patolojiler hastalığın etyopatolojisi için özellikle önem arz etmektedir. Bir diğer neden  $T_{reg}$  hücrelerin tanımlanan fonksiyonları dışı bir nedenle hastalığın patolojik ilerleyen aşamalarında doku yoğunluklarının artması olabilir. Keza periferik kanda sayısal bir değişiklik yokken hücre sayılarının dokuda artmış olması bu hücrelerin hastalık alanına homing ve migrasyonları olarak düşünülebilir. Bu durumda  $T_{reg}$  hücrelerinin Sjögren sendromunda dokuda önemli bir görev üstlenip, hastalık patolojisinde rol oynadıkları akla gelmektedir. Bizim çalışmamızda özellikle patolojik klasifikasyonların ileri safhalarında düzenleyici T hücrelerde göreceli ve istatistiksel anlamlı artış olması bu hücrelerin immün inflamasyonu baskılama çabalarından kaynaklanabilir. Bu durum literatürdeki çalışma ile çelişiyor görünse bile o çalışmada alınan doku örnekleri ileri evre hastalardan alındığı için iyice hasara uğramış dokuda hücre yoğunluklarının azalması nedeni ile  $T_{reg}$  hücrelerde azalma söz konusu olabilir. Bizim çalışmamızda  $T_{reg}$  hücre yoğunluğu Chisholm klasifikasyonu artıkça artmaktadır. Bu artış daha ileri safhalarda azalma ile kendini gösterebilir. Buda bezdeki hasara paralel olarak gelişebilir.

Bu nedenlerle  $T_{reg}$  hücrelerinin Sjögren sendromundaki rolleri daha fazla yapılacak araştırmalarla irdelenmelidir.

Ayrıca çalışmamız hem periferik kan örnekleri hemde tükürük bezi örneklerinde Foxp3 ile boyama yapılması ve değerlendirilmesi açısından literatürde ilktir. Buna ilaveten tükürük bezi üzerinde yapılan İmmünohistokimyasal değerlendirmeler sonucunda istatistiksel değerlendirmeleri yapabilmek amacıyla oluşturduğumuz skorlama açısından da benzer bir çalışma bulunmamaktadır.

## SONUÇLAR

Bu çalışmada Türk populasyonundaki Sjögren Sendromu hastalarının tükürük bezi biyopsilerinde Foxp3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> hücrelerin varlığı ve periferik kanda CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> hücrelerin yoğunluğuna ve yine aynı hastaların patolojik skorları belirlenip, karşılaştırma yapılarak çalışılmış ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

1. Çalışmamıza dahil ettiğimiz Sjögren Sendromu hastalarına ait akış sitometrisi sonuçları ile RA'lı ve sağlıklı kişilerden oluşturduğumuz kontrol grublarının CD4<sup>+</sup> ve CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> hücre sayıları arasında fark olmadığını, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> hücre sayılarının Özellikle RA'lı hastalarda fazla olduğunu
2. Sjögren Sendromu hastasının tükürük bezi biyopsileri üzerinde yapılan Chisholm skoru ile periferik kandaki CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ve FoxP3<sup>+</sup> hücre sayıları arasında ilişki (Korelasyon) bulunmadığı
3. Dokudaki lenfosit yoğunluğu ile periferik kandaki CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> hücre sayıları arasında ilişki (korelasyon) saptanmadığı ve. tükürük bezindeki lenfosit yüzdesi ile periferik kandaki CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> hücre sayıları arasında zayıf ama pozitif bir korelasyon saptandığı
4. İmmünohistokimyasal incelemelerdeki dokudaki FoxP3 boyanma skoru ile periferik kandaki CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ve FoxP3<sup>+</sup> hücre sayıları arasında ilişki (Korelasyon) saptanmadığı
5. Tükürük bezi biyopsilerinden alınan kesitlerde iki farklı yöntemle Foxp3<sup>+</sup> hücrelerin yoğunluğu gösterilerek Sjögren Sendromu hastalarının lenfosit yoğunluğuna paralel olarak T<sub>reg</sub> hücre yoğunluğunun da arttığı tespit edilmiştir.
6. En önemli bulgu olarak tükürük bezi biyopsi örneklerindeki patolojik sınıflama olan Chisholm sınıflamasına paralel olarak biyopsi örneklerinde Foxp3<sup>+</sup> hücrelerdeki artış oranları istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bulunmuştur. Bu bulgu özellikle Chisholm 3-4 gibi lenfosit zenginliğinin arttığı ve hastalık şiddetinin patolojik olarak ilerlediği durumlarda dokularda T<sub>reg</sub> hücre oranlarında da belirgin artış olduğunu göstermektedir.

## KAYNAKLAR

1. Özlem Deren, Şehim Kutlay, Sjögren Sendromu, Romatizma, 2003; Cilt:18, Sayı: 1.
2. Youinou P, Pers JO, Saraux A, Pennec YL. Viruses contribute to the development of Sjogren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 2005;141:19-20.
3. Fox RI. Sjögren's syndrome. *Lancet*. 2005 Jul 23-29;366(9482):321-31.
4. Almstahl IA, Wikstrom M, Stenberg I, Jakobsson A, Fagerberg-Mohlin B. Oral microbiota associated with hyposalivation of different origins. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:1-8.
5. Torres SR, Peixoto CB, Caldas DM, Silva EB, Akiti T, Nucci M, et al. Relationship between salivary flow rates and Candida counts in subjects with xerostomia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;93:149-154
6. García-Carrasco M, Fuentes-Alexandro S, Escárcega RO, Salgado G, Riebeling C, Cervera R. Pathophysiology of Sjögren's syndrome. *Arch Med Res*. 2006 Nov;37(8):921-32
7. Walker MR, Kasprovicz DJ, Gersuk VH, Benard A, Van Landeghen M, Buckner JH, Ziegler SF.: Induction of Foxp3 and Acquisition of T Regulatory Activity by Stimulated Human CD4+ CD25- T Cells. *J Clin Invest*. 2003; 112;1437-43.
8. Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2003;3;253-7.
9. Sakaguchi S et al. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 2006;212;8-27.
10. Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4+ T cells. *Adv Immunol* 2003;81; 331-71.
11. Chess L. The birth of functionally distinct T cell subsets. *J Immunol* 2006;176;3859-60.
12. Sharma R, Zheng L, Guo X, Fu S.M, Ju T, Jarcour W.N. Novel animal models for sjogren syndrome: Expression and transfer of salivary gland

dysfunction from regulatory T cell-deficient mice. *Journal of Autoimmunity* 2006; 289-296.

13. Gottenberg JE, Laviea F, Abbed K, Gasnaultb J, Le Nevot E, Delfraissy JF, Taoufik Y, Mariette X. CD4 CD25<sup>high</sup> regulatory T cells are not impaired in patients with primary Sjögren's syndrome *Journal of Autoimmunity* 24, 2005; 235-242.
14. Yeğın, O. 1990. Temel İmmünoloji Notları. Akdeniz Üniversitesi Basımevi, Antalya.
15. Yeğın, O. 1991. Temel İmmünoloji ve İmmün Eksiklik Hastalıkları. Akdeniz Üniversitesi Basımevi, Antalya.
16. Abbas, A. K., and A. H. Lichtman. 2004. *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*. Saunders, Philadelphia.
17. Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J. E. de Vries, and M. G. Roncarolo. A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997; 389:737.
18. Powrie, F., R. Correa-Oliveira, S. Mauze, and R. L. Coffman. Regulatory interactions between CD45<sup>RBhigh</sup> and CD45<sup>RBlow</sup> CD4<sup>+</sup> T cells are important for the balance between protective and pathogenic cell-mediated immunity. *J Exp Med* 1994; 179:589.
19. Gershon, R. K. A disquisition on suppressor T cells. *Transplant Rev* 1975; 26:170.
20. Kanof, M. E., W. Strober, W. C. Kwan, N. A. O'Connell, and S. P. James. CD4<sup>+</sup> Leu-8<sup>+</sup> T cell supernatant activity that inhibits Ig production. *J Immunol* 1991; 147:155.
21. Nizhizuka Y, Sakakura T. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* 1969;166;753-5.
22. Gershon RK, Kondo K. Cellinteractions in the induction of tolerance: the rol of thymiclymphocytes. *Immunology* 1970;18;723-37.
23. Sakaguchi S, Sakaguchi N,Asano M, Itoh M,Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995: 155; 1151-64.

24. Sakaguchi S et al. Immunologic tolerance maintained by CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 2001;182:18-32.
25. Ohata J et al. Enhanced efficacy of regulatory T cell transfer against increasing resistance, by elevated Foxp3 expression induced in arthritic murine hosts. *Arthritis rheum* 2007; 56:2947-56.
26. Umetsu DT. Understanding the immunological basis of asthma; immunotherapy and regulatory T cells. *Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M*, 2006: 211-4; discussion 215-6.
27. Roncarolo, M. G., R. Bacchetta, C. Bordignon, S. Narula, and M. K. Levings. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev* 2001; 182:68.
28. Oida, T., X. Zhang, M. Goto, S. Hachimura, M. Totsuka, S. Kaminogawa, and H. L. Weiner. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells that express latency-associated peptide on the surface suppress CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup>-induced colitis by a TGF-beta-dependent mechanism. *J Immunol* 2003; 170:2516.
29. Sakaguchi S et al. Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 2006:212;8-27.
30. Chess L. The birth of functionally distinct T cell subsets. *J Immunol* 2006:176;3859-60.
31. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299: 1057-61
32. Bluestone JA, Tang Q. How do CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control autoimmunity? *Curr Opin Immunol* 2005; 17; 638-42
33. Jiang H, Chess L. Regulation of immune responses by T cells. *N Engl J Med* 2006; 354; 1166-76.
34. Maloy, K. J., L. Salaun, R. Cahill, G. Dougan, N. J. Saunders, and F. Powrie. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J Exp Med*. 2003; 197:111.
35. Shevach, E. M. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2:389.
36. Shimizu, J., S. Yamazaki, T. Takahashi, Y. Ishida, and S. Sakaguchi. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol*. 2002; 3:135.

37. McHugh, R. S., M. J. Whitters, C. A. Piccirillo, D. A. Young, E. M. Shevach, M. Collins, and M. C. Byrne. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002; 16:311.
38. Suri-Payer, E., and H. Cantor. Differential cytokine requirements for regulation of autoimmune gastritis and colitis by CD4(+)CD25(+) T cells. *J Autoimmun* 2001; 16:115.
38. Maloy, K. J., and F. Powrie. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2001; 2:816.
39. Fontenot, J. D., M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4:330.
40. Lan RY, Ansari AA, Lian ZX, Gershwin ME. Regulatory T cells: development, function and role in autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2005 Jul;4(6):351-63.
41. Sarkar S, Fox DA. Regulatory T cell defects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2007 Mar;56(3):710-3
42. Fontenot, J. D., M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4:330.
43. Khattri, R., T. Cox, S. A. Yasayko, and F. Ramsdell. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 2003; 4:337.
44. Ramsdell, F. Foxp3 and natural regulatory T cells: key to a cell lineage? *Immunity* 2003; 19:165.
45. O'Garra, A., and P. Vieira. Twenty-first century Foxp3. *Nat Immunol* 2003; 4:304.
46. Baud, O., O. Goulet, D. Canioni, F. Le Deist, I. Radford, D. Rieu, S. Dupuis-Girod, N. Cerf-Bensussan, M. Cavazzana-Calvo, N. Brousse, A. Fischer, and J. L. Casanova. Treatment of the immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) by allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 2001; 344:1758.
47. Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, and S. M. Wahl. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003; 198:1875.

48. Apostolou, I., and H. von Boehmer. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med* 2004; 199:1401
49. Green, E. A., Y. Choi, and R. A. Flavell. Pancreatic lymph node-derived CD4(+)CD25(+) Treg cells: highly potent regulators of diabetes that require TRANCE-RANK signals. *Immunity* 2002; 16:183.
50. Kingsley, C. I., M. Karim, A. R. Bushell, and K. J. Wood. CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol* 2002; 168:1080.
51. Hara, M., C. I. Kingsley, M. Niimi, S. Read, S. E. Turvey, A. R. Bushell, P. J. Morris, F. Powrie, and K. J. Wood. IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. *J Immunol* 2001; 166:3789.
52. Asseman, C., S. Mauze, M. W. Leach, R. L. Coffman, and F. Powrie. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 1999; 190:995.
53. Sundstedt, A., E. J. O'Neill, K. S. Nicolson, and D. C. Wraith. Role for IL-10 in suppression mediated by peptide-induced regulatory T cells in vivo. *J Immunol* 2003; 170:1240.
54. Vieira, P. L., J. R. Christensen, S. Minaee, E. J. O'Neill, F. J. Barrat, A. Boonstra, T. Barthlott, B. Stockinger, D. C. Wraith, and A. O'Garra. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2004;172:5986.
55. Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 2001; 194:629.
56. Sarkar S, Fox DA. Regulatory T cell defects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2007 Mar;56(3):710-3
57. Burkhart, C., G. Y. Liu, S. M. Anderton, B. Metzler, and D. C. Wraith. Peptide-induced T cell regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis: a role for IL-10. *Int Immunol* 1999; 11:1625.
58. Pontoux, C., A. Banz, and M. Papiernik. Natural CD4 CD25(+) regulatory T cells control the burst of superantigen-induced cytokine production: the role of IL-10. *Int Immunol* 2002; 14:233.

59. Barrat, F. J., D. J. Cua, A. Boonstra, D. F. Richards, C. Crain, H. F. Savelkoul, R. de Waal-Malefyt, R. L. Coffman, C. M. Hawrylowicz, and A. O'Garra. 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* 2002; 195:603.
60. Miller, C., J. A. Rageb, and R. H. Schwartz. Anergy and cytokine-mediated suppression as distinct superantigen-induced tolerance mechanisms in vivo. *J Exp Med* 1999; 190:53.
61. Apostolou, I., A. Sarukhan, L. Klein, and H. von Boehmer. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol* 2002; 3:756.
62. Haiying Liu and Bernard P Leung, CD4+ CD25+ Regulatory T cells in Health and Disease, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2006; 33: 519-524.
63. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, Shimizu J, Takahashi T, Nomura T. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev.* 2006 Aug;212:8-27
64. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity.* 2005 Mar;22(3):329-41.
65. Roncador G, Brown PJ, Maestre L, Hue S, Martínez-Torrecuadrada JL, Ling KL, Pratap S, Toms C, Fox BC, Cerundolo V, Powrie F, Banham AH. Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur J Immunol.* 2005 Jun;35(6):1681-91.
66. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003 Apr;4(4):330-6.
67. Magistrelli, G., P. Jeannin, N. Herbault, A. Benoit De Coignac, J. F. Gauchat, J. Y. Bonnefoy, and Y. Delneste. A soluble form of CTLA-4 generated by alternative splicing is expressed by nonstimulated human T cells. *Eur J Immunol* 1999; 29:3596
68. Dariavach, P., M. G. Mattei, P. Golstein, and M. P. Lefranc. Human Ig superfamily CTLA-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains. *Eur J Immunol* 1988; 18:1901



69. Harper, K., C. Balzano, E. Rouvier, M. G. Mattei, M. F. Luciani, and P. Golstein. CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. *J Immunol* 1991;147:1037.
70. Linsley, P. S., S. G. Nadler, J. Bajorath, R. Peach, H. T. Leung, J. Rogers, J. Bradshaw, M. Stebbins, G. Leytze, W. Brady, and et al. Binding stoichiometry of the cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 (CTLA-4). A disulfide-linked homodimer binds two CD86 molecules. *J Biol Chem* 1995; 270:15417.
71. Ling, V., P. W. Wu, H. F. Finnerty, A. H. Sharpe, G. S. Gray, and M. Collins. Complete sequence determination of the mouse and human CTLA4 gene loci: cross-species DNA sequence similarity beyond exon borders. *Genomics* 1999; 60:341.
72. Oaks, M. K., K. M. Hallett, R. T. Penwell, E. C. Stauber, S. J. Warren, and A. J. Tector. A native soluble form of CTLA-4. *Cell Immunol* 2000; 201:144.
73. Makoto Miyaral and Shimon Sakaguchi, Natural Regulatory T Cells: Mekhanisms of suppression. *TRENDS in Molekuler Medicine* 2007; 13:3 108-15.
74. O'Garra, A., and P. Vieira. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med* 2004; 10:801.
75. Jocea M.R. Van Amelsfort, Kim M.G. Jacobs, Johannes W.J. Bijlsma, Floris P.J.G. Lafeber, and Leonie S. Taams. CD4+ CD25+ Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis and Rheumatism*. 2004;50:2775-2785.
76. Reginald M. Gorczynski, Lydia Lee, and Ivo Boudakov. Augmented Induction of CD4+ CD25+ Treg using Monoclonal Antibodies to CD200R. *Transplantation* Volume 79, Number 9, may 15, 2005.
77. Fox RI. Sjögren's syndrome. *Lancet*. 2005 Jul 23-29;366(9482):321-31.
78. Manoussakis MN, Georgopoulou C, Zintzaras E, et al. Sjögren's syndrome associated with systemic lupus erythematosus: clinical and laboratory profiles and comparison with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 882–91.
79. Uhlig T, Kvien TK, Jensen JL, Ax T II. Sicca symptoms, saliva and tear production, and disease variables in 636 patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1999; 58: 415–22.

80. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, Daniels TE, Fox PC, Fox RI, Kassan SS, Pillemer SR, Talal N, Weisman MH; European Study Group on Classification Criteria for Sjögren's Syndrome. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis*. 2002 Jun;61(6):554-8
81. Dörner T, Lipsky PE. Abnormalities of B cell phenotype, immunoglobulin gene expression and the emergence of autoimmunity in Sjögren's syndrome. *Arthritis Res* 2002;4:360-371
82. Ramos-Casals M, Font J. Primary Sjögren's syndrome: current and emergent aetiopathogenic concepts. *Rheumatology (Oxford)*. 2005 Nov;44(11):1354-6
83. Sanchez B.A, Castro B.H, Perez D.P, Baranda L, Espinosa E.L, Mendoza C.A, Tejeda C.A, Amaro R.G. Regulatory T Cells in Patients With Systemic Lupus Erythematosus. *J Autoimmun*. 2006;27:110-118.
84. Gregg R, Smith CM, Clark FJ, Dunnion D, Khan N, Chakraverty R, Nayak L, Moss PA. The Number of Human Peripheral Blood CD4+ CD25 high Regulatory T Cells increases With Age. *Clinical and Experimental Immunology*. 2005;140:540-546.
85. Miyara M, Amoura Z, Parizot C, et al. Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2005;175:8392-400.
86. Li X, Li X, Qian L, Wang G, Zhang H, Wang X, Chen K, Zhai Z, Li Q, Wang Y, and Haris D.C.H. T Regulatory Cells Are Markedly Diminished in Diseased Salivary Glands of Patients With Primary Sjögren's Syndrome. *J Rheumatology*. 2007;34:12.
87. Jocea M.R. Van Amelsfort, Kim M.G. Jacobs, Johannes W.J. Bijlsma, Floris P.J.G. Lafeber, and Leonie S. Taams. CD4+ CD25+ Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis and Rheumatism*. 2004;50:2775-2785.

## ÖZGEÇMİŞ

01/10/1980 tarihinde Konya'da doğdu. İlkokul öğretimini Isparta Cumhuriyet İlkokulun'da, ortaokul öğretimini Isparta Hilmi Dilmen Ortaokulu ve lise öğretimini Isparta Gazi lise'sinde tamamladı. 2002 yılında Süleyman Demirel Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden mezun olarak lisans eğitimini tamamladı. 2003-2005 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde Tezsiz Yüksek Lisans Programını başarıyla tamamladı. 2005-2006 öğretim yılının bahar döneminde Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalına bağlı İmmünoloji Yüksek Lisans eğitimine başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Araştırma Görevlisi kadrosunda çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizcedir. Ulusal kongrelerde 4, uluslar arası kongrelerde yayınlanmış 1 kongre bildirisi bulunmaktadır.

**EKLER**

Sjögren Sendromu Sınıflama Kriterleri (American-European Consensus Group) Tablosu

- I. Göz semptomları: seçilen üç sorudan en az birine pozitif cevap;
1. 3 aydan daha uzun süre her gün, devamlı, sıkıcı göz kuruluğu oldu mu ?
  2. Gözlerinizde tekrarlayan kum ya da çakıl hissi var mı ?
  3. Günde üç kereden daha fazla gözyaşı damlası kullandınız mı?
- II. Oral semptomlar: seçilen üç sorudan en az birine pozitif cevap;
1. Ağız kuruluğunu 3 aydan daha uzun süre, her gün hissettiniz mi?
  2. Erişkin dönemde tekrarlayan ya da devamlı tükürük bezlerinde büyüme oldu mu?
  3. Kuru yiyecekleri yutmaya yardımcı olması için sıklıkla sıvı içiyor musunuz ?
- III. Göz bulguları: Aşağıdaki iki testten en az birinin pozitif olması göz tutulumunun objektif kanıtıdır;
1. Schirmer test, anestezi yapılmadan (5 dakikada  $\leq 5$  mm)\*
  2. Rose Bengal Scorü (van Bijsterveld's skorlamaya göre  $\geq 4$ )
- IV. Histopatoloji:Minör tükürük bezi biopsisinde focus skoru  $\geq 1$ .(Focus tanımı, agglomerasyonda en az 50 mononükleer hücre; focus skor tanımı, bez dokusunda  $4 \text{ mm}^2$  de focus sayısıdır.)
- V. Tükürük bezi tutulumu:Aşağıdaki üç tanısal testten en az birinin pozitif olması tükürük bezi tutulumunun objektif kanıtıdır;
- 1.Sintigrafide geçikmiş uptake, konsantrasyon azalması ve/veya sekresyon fonksiyonlarında gecikmenin görülmesi
  - 2.Sialografide ana kanalda obstruksiyon olmaksızın diffüz sialoektazinin görülmesi
  - 3.Stimulasyon yapılmadan tükürük akımı ölçümü (15 dakikada  $\leq 1.5$  mL)
- VI. Otoantikolar:Aşağıdaki otoantikoların serumda görülmesi;
- 1.Anti Ro(SS-A) yada Anti-La(SS-B) , ya da her ikisi

**Sınıflama kuralları:**

**Primer SS için;**

- Hastalarda hastalıkla ilişkili potansiyel durumlar olmaksızın,
- 1)IV (Histopatoloji) ya da VI (Seroloji) dan biri pozitif ise altı kriterden herhangi dördünün varlığı,
  - 2)III, IV, V, VI bu dört kriterden üçünün olması

**Sekonder SS için;**

İyi tanımlanmış bir bağ doku hastalığı gibi potansiyel ilişkili bir hastalığın varlığında I ya da II'ye ilave olarak III,IV ve V'den iki tanesinin pozitif olması sekonder SS 'nin göstergesi olarak düşünülebilir.

\*\***Dışlama kriterleri:** Baş-boyun bölgesine radyoterapi alınmış olması, HCV, AIDS, Tanı konulmuş lenfoma, sarkoidoz, grawt-versus-host hastalığı ve antikolinerjik ilaç kullanımı.