

**T.C**  
**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**İç Hastalıkları Anabilim Dalı**

**REKOMBİNANT İNTERLÖKİN-16'NİN**  
**T REGÜLATÖR HÜCRELER ÜZERİNE**  
**ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Durmuş BURGUCU**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Antalya – 2007**

**T.C**  
**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**İç Hastalıkları Anabilim Dalı**

**REKOMBİNANT İNTERLÖKİN-16'NİN**  
**T REGÜLATÖR HÜCRELER ÜZERİNE**  
**ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Durmuş BURGUCU**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı**  
**Prof.Dr.Levent ÜNDAR**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu Tarafından Desteklenmiştir  
(Proje No: 2006.02.0122.012)

“Tezimden Kaynakça Gösterilerek Yararlanılabilir”

Antalya-2007

Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma, jürimiz tarafından İç Hastalıkları Anabilim Dalı'na bağlı İmmünohematoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

25/12/2007

- Tez Danışmanı : Prof. Dr. Levent ÜNDAR  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
İç Hastalıkları Anabilim Dalı
- Üye : Prof. Dr. M. Ender TERZİOĞLU  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
İç Hastalıkları Anabilim Dalı
- Üye : Prof. Dr. İhsan KARADOĞAN  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
İç Hastalıkları Anabilim Dalı
- Üye : Prof. Dr. Burhan SAVAŞ  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
İç Hastalıkları Anabilim Dalı
- Üye : Prof. Dr. Olcay YEĞİN  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

ONAY

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirtilen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından Uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun ...../...../..... tarih ve .....sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nurettin OĞUZ  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

İnterlökin-16 (IL-16), CD4+ T lenfositleri üzerindeki spesifik etkileri gösterilmiş, bir çok immün ve immün olmayan hücrelerden salınan bir proteindir. Regülatör T hücreleri (Treg'ler) otoimmün hastalıkları ve transplant rejeksiyonu gelişimini önleyen hücrelerdir. Allerji ve astım gelişiminde de rol oynayabilecekleri düşünülmektedir. Treg'ler immün cevapta rol oynayan diğer hücrelerin fonksiyonunu inhibe ederek immün cevabı kontrol edebilirler. FoxP3 Treg'lerin aktivasyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Amacımız IL-16'nın CD4(+)CD25(+) Treg hücrelerinin aktivasyon markerı olan FoxP3 ekspresyonu, hücre apoptosisi ve hücre ölümü üzerine etkilerini araştırmak ve serum IL-16 düzeyleri ile FoxP3 ekspresyonu arasında bir korelasyon olup olmadığını saptamaktır. Bu amaçla 30 sağlıklı gönüllü bireyden elde edilen periferik mononükleer hücreler in vitro ortamda IL-16 ile muamele edilmiş ve FoxP3 düzeylerinin arttığı flow sitometrik olarak gözlenmiştir. IL-16'nın Treg hücreleri üzerine herhangi bir apoptotik veya öldürücü etkisi gözlenmezken, lenfositlerin yaklaşık %1'lik bir kısmının apoptozunu indüklediği saptanmıştır. Ayrıca lenfositlerin %3'lük bir kısmını öldürmüştür. Serum IL-16 ve FoxP3 ekspresyonu arasında pozitif bir korelasyon da gözlenmiştir. Literatürle uyumlu olarak Treg hücrelerinin CD25 ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. IL-16'nın artan konsantrasyonlarında FoxP3 ekspresyonunun da arttığı bulunmuştur. Sonuç olarak, bildiğimiz kadarıyla bu çalışma IL-16'nın FoxP3 ekspresyonu üzerinde pozitif bir etkisi olduğunu in vivo ortamda gösteren ilk çalışmadır. IL-16'nın yüksek serum düzeylerinde gözlendiği atopi, allerji ve otoimmünite gibi immün sistemin eksik ya da hatalı çalıştığı hastalık gruplarında incelenmesi IL-16-hastalık ilişkisinin anlaşılabilirliğine katkıda bulunabilir ve Treg-IL-16 arasındaki ilişkiye açıklık getirebilir.

**Anahtar kelimeler : T reg, FoxP3, IL-16, CD4**

## ABSTRACT

Interleukin-16 (IL-16) is a protein secreted from a lot of immune and non-immune cells and its specific effects on CD4+ T lymphocytes have been shown. Regulatory T cells (Tregs) are cells which prevent autoimmune diseases and the development of transplant rejections. They are also thought to have a role in the development of allergy and asthma. Tregs may control immune response by inhibiting the function of the other cells which have role in immune response. FoxP3 is a transcription factor which regulates the activation of Tregs. Our aim is to investigate the effects of IL-16 on the expression of FoxP3 which is the activation marker of Treg cells, cell apoptosis and cell death and to determine if there is a correlation between serum IL-16 levels and FoxP3 expression. For this purpose peripheral mononuclear cells obtained from 30 healthy individuals were treated with IL-16 in vitro and FoxP3 levels shown to be increased by flow cytometric analysis. It has been also shown that IL-16 has no apoptotic or killing effect on Treg cells. On the other hand, apoptosis of 1% and death of 3% (approximately) of lymphocytes have been induced by IL-16. A positive correlation between serum IL-16 levels and Fox-P3 expression was found. In agreement with the literature, CD25 expression of Treg cells have shown to be increased. FoxP3 expression was found to be increased in the increased concentrations of IL-16. In conclusion this is the first in vivo study which shows the positive effect of IL-16 on FoxP3 expression. Investigation of IL-16 in diseases like atopy, allergy and autoimmunity in which immune system is insufficient or defected may contribute to the understanding of IL-16-disease and Treg-IL-16 relations.

**Key Words: T reg, FoxP3, IL-16, CD4**

## **TEŞEKKÜR**

Yüksek lisans eğitimim ve tezimin hazırlanmasında hiçbir zaman desteğini esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Levent ÜNDAR'a, her konuda sürekli desteğini gördüğüm sayın Prof. Dr. İhsan KARADOĞAN'a, araştırmalarımındaki desteğinden dolayı bilim dalı başkanı sayın Prof. Dr. Ayşen TİMURAĞAOĞLU'na, tezimin gerçekleşmesinde maddi olarak sağlayan Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne, çalışmalarım boyunca her türlü yardımları için sayın Dr.Süreyya BİLMEN SARIKÇIOĞLU, Uzm.Mesut COŞKUN, Uzm.Nilgün SALLAKÇI, Uzm.Oğuz ÖZTÜRK, Ecz.Yeşim GÖÇMEN'e, Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına, istatistiksel analizlerdeki desteğinden dolayı sayın Araş. Gör. Deniz ÖZEL'e, her zaman yanımda olan sayın Gizem BELET'e ve sevgili Annem'e teşekkürü borç bilirim.

Durmuş BURGUCU

## **İÇİNDEKİLER**

	SAYFA
<b>ÖZET</b>	iv
<b>ABSTRACT</b>	v
<b>TEŞEKKÜR</b>	vi
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b>	vii
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b>	viii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	ix
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b>	x
<b>GİRİŞ ve AMAÇ</b>	1-2
<b>GENEL BİLGİLER</b>	3-15
2.1. İmmünolojik Tolerans	4
2.1.2. T Hücrelerinde Merkezi (Santral) Tolerans	4-5
2.2. Periferik T Lenfosit Toleransı	5
2.2.1. T Hücre Anergisi	5-6
2.2.2. Silinme (Aktivasyona Bağlı Hücre Ölümü)	6-7
2.3. B Lenfosit Toleransı	7
2.3.1. Merkezi B Lenfosit Toleransı	7
2.3.2. Periferik B Lenfosit Toleransı	8
2.4. Enfeksiyonların Otoimmünitedeki Yeri	8
2.5. Otoimmünitede Genetik Etmenler	8-9
2.6. Düzenleyici T Hücreleri ve Öz Tolerans	9
2.6.1. Düzenleyici T hücreleri ve İmmün Sistemi Kontrol Mekanizmaları	9-10
2.6.2. Düzenleyici T Hücrelerin Etki Mekanizmaları	10-11
2.6.3. Düzenleyici T Hücrelerin Enfeksiyonlardaki Rolü	12
2.6.4. Alerjik Hastalıklarda T reg Hücrelerinin Rolü	12-13
2.7. CD4 antijeni	13-14
2.8. İnterlökin 16 (IL-16)	14-15
<b>GEREÇ ve YÖNTEM</b>	16-19
3.1. Çalışma Grubu	16
3.2. Kan Örnekleri	16
3.3. Tam Kan Sayımı	16
3.4. Periferik Kan Mononükleer Hücre Hazırlanması	16
3.5. Hücre Kültürü ve Rekombinant IL-16 Doz Ayarlaması	16-17
3.6. İnkübasyon Sonrası Hücrelerin Monoklonal Antikorlarla İşaretlenmesi	17
3.7. Flow Sitometrik Analiz	17
3.8. İnkübasyon Sonrası Hücrelerde Canlılık ve Apoptoz Tayini	18
3.9. Serum IL-16 Düzeylerinin Tayini	18-19
3.10. İstatistik	19
<b>BULGULAR</b>	20-29
<b>TARTIŞMA</b>	30-32
<b>SONUÇLAR</b>	33
<b>KAYNAKLAR</b>	34-36
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	37

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

IL	:	İnterlökin
MHC	:	Major Histocompatibility Complex
T reg	:	Regülatör T hücreleri
TNF	:	Tümör nekrozis faktör
FoxP3	:	Forkhead winged helix P3
TGF-b	:	Transforming growth faktor beta
Ig	:	İmmünglobulin
ASH	:	Antijen sunan hücre
AIRE	:	Otoimmün düzenleyici
APECED	:	Otoimmün poliendokrinopati
CTLA-4	:	Sitotoksik T lenfosit ilişkili protein-4
FasL	:	Fas Ligandı
SLE	:	Sistemik Lupus Eritematozus
HLA	:	Human leucocyte antigen
Tr1	:	T regülatuvar tip 1
Tr3	:	T regülatuvar tip 1
NKT	:	Doğal öldürücü T hücreleri
IFN- $\gamma$	:	İnterferon gamma
GITR	:	Gukokortikoid-indükte tümör nekrosis faktör reseptör
PD-1	:	Programmed cell death-1
IDO	:	İndoleamine
AMP	:	Adenozin mono fosfat
TH1	:	Yardımcı t hücre tip 1
TH2	:	Yardımcı t hücre tip 2
Kd	:	Kilo dalton
HIV	:	Human immunodeficiency Virus
THR	:	T hücre reseptörü
dk	:	Dakika
PBS	:	Fosfat tuz solusyonu
PE	:	Phycoerythrin
FITC	:	Fluorescein isothiocyate
APC	:	Allophycocyanin
PI	:	Propidium iodide
HRP	:	Horse radish peroksidaz
FCS	:	Fetal calf serum



## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>Şekil 2.1.</b> ASH- T hücre ilişkisi	<b>6</b>
<b>Şekil 2.2.</b> Treg'lerin etki mekanizmaları	<b>11</b>
<b>Şekil 2. 3.</b> CD4 – IL-16 bağlantısı	<b>14</b>
<b>Şekil 2. 4.</b> IL-16' nın immün sistem üzerine etkileri özet	<b>15</b>
<b>Şekil 3.1.</b> IL-16 ELISA standart grafiği	<b>19</b>
<b>Şekil 4.1.</b> İlk andaki CD4+CD25+FoxP3+ hücrelerin FoxP3 MFI ile serum IL-16 seviyelerinin karşılaştırılması	<b>20</b>
<b>Şekil 4.2.</b> CD4+ CD25+ FoxP3+ hücrelerin 4 farklı konsantrasyondaki IL-16 'lı ortamdaki oranları.	<b>21</b>
<b>Şekil 4.3.</b> CD4+ CD25+ hücrelerin 4 farklı konsantrasyondaki IL-16 'lı ortamdaki oranları	<b>22</b>
<b>Şekil 4.4.</b> CD4+ CD25+ hücre popülasyonunun Flow sitometri histogramı	<b>23</b>
<b>Şekil 4. 5.</b> CD4+ CD25+ FoxP3+ hücrelerin 4 farklı konsantrasyonda IL-16 içeren ortamdaki FoxP3 ekspresyonu (MFI)	<b>24</b>
<b>Şekil 4. 6.</b> FoxP3+ hücreler ile izotipik kontrol üst üste getirilmiş flow sitometri histogramı	<b>24</b>
<b>Şekil 4.7.</b> FoxP3+ hücrelerin noktasal flow sitometri histogramı	<b>25</b>
<b>Şekil 4. 8.</b> CD4+ CD25+ hücre popülasyonlarında CD25 ekspresyonunun ortalama kanal yoğunluğunun kontrol ve 1400 pg/ml yoğunluğunda IL-16 bulunan ortamlardaki ekspresyonunun karşılaştırması.	<b>26</b>
<b>Şekil 4. 9.</b> Lenfosit popülasyonunda, 3 farklı yoğunluktaki IL-16'lı ortamdaki apoptoz sonuçları	<b>27</b>
<b>Şekil 4. 10.</b> Lenfosit popülasyonunda, 3 farklı yoğunluktaki IL-16'lı ortamdaki ölü hücre sonuçları	<b>28</b>
<b>Şekil 4. 11.</b> Kontrol tüpündeki hücrelerin Apoptoz ve Ölü hücre oranlarının Flow sitometrik histogramı	<b>28</b>
<b>Şekil 4. 12.</b> 1400 pg/ml yoğunluğunda IL-16 bulunan tüpün Apoptoz ve Ölü hücrelerin Flow sitometrik histogramı	<b>29</b>

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
<b>Tablo 2.1.</b> Treg tipleri özet tablo	<b>10</b>
<b>Tablo.3.1.</b> Tüplere konulan moAb renk ve miktarları	<b>17</b>
<b>Tablo 4.1.</b> CD4+ CD25+ FoxP3+ hücrelerin ilk andaki (T0) ve 4 farklı konsantrasyonda IL-16 içeren ortamdaki oranları	<b>21</b>
<b>Tablo 4.2.</b> CD4+ CD25+ hücrelerin ilk andaki (T0) ve 4 farklı konsantrasyonda IL-16 içeren ortamdaki oranları	<b>22</b>
<b>Tablo 4.3.</b> CD4+ CD25+ FoxP3+ hücrelerin ilk andaki (T0) ve 4 farklı konsantrasyonda IL-16 içeren ortamdaki FoxP3 ekspresyonu (MFI)	<b>23</b>
<b>Tablo 4.4.</b> CD25 ekspresyonu ortalama floresan yoğunluğu	<b>25</b>
<b>Tablo 4.5.</b> Apoptoz oranları	<b>26</b>
<b>Tablo 4.6.</b> Ölü hücre oranları	<b>27</b>

## GİRİŞ ve AMAÇ

İnterlökin-16 (IL-16); periferal kan mononükleer hücrelerinin mitojen ile uyarılmasıyla T lenfositlerinin kemotaktik aktivitesini artırmasının sonucu olarak 1982 yılında tanımlanmıştır. IL-16'nın, mast hücrelerinden, eozinofillerden, dendritik hücrelerden, T lenfositlerden ve yangı cevabı sırasında belirli stromal hücrelerden salınımı olmaktadır. IL-16 daha önce lenfosit kemotaktik faktör olarak bilinirken, bugün CD4+ T lenfositleri üzerindeki özgül etkileri gösterilen bir sitokin, özellikle de CD8+ T lenfositlerinden histamin ve serotonin uyarımı sonucu salınan bir sitokin olduğu gösterilmiştir. IL-16'nın immün sistemde iki öncül görevi vardır: 1) CD4+ hücrelerin (CD4+ T lenfositler, CD4+ monositler ve CD4+ eosinofiller) kemoatraktanıdır. 2) TH2 tipi sitokinlerin (IL-4, IL-5, IL-13) antijenik uyarım sonucu salınımını baskılayıp IFN-gamma yapımını artırmasıdır (1, 2). Ayrıca IL-16 selektif olarak kemokin uyarımının durdurulmasında ve istirahat halindeki CD4+ T hücrelerinin IL-2R ve MHC sınıf-II gösteriminde rol alır. IL-16'nın, astım hastalarında yangı yanıtını azaltıcı veya durdurucu olarak rol oynadığı gösterilmiştir. IL-16 knock-out farelerde deneysel akciğer değişimlerine aşırı cevap ve inflamasyonda artış görülürken, normal farelere parenteral veya aerosol olarak IL-16 uygulanması akciğer aşırı cevabını, goblet hücre hiperplazisini ve inflamasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (3). IL-16'nın, astım, romatoid artrit, sistemik lupus, eritromatöz, kolit, atopik dermatit ve multipl skleroz hastalıklarında gözlenen yangı yanıtı ile ilişkili olduğu bulunmuştur (4, 5). IL-16'nın CD4+ T hücrelerinin fonksiyonlarını etkilemesi ve bu hücrelerde IL-2R gösterimine neden olması, inflamasyonda immün regülatuar bir sitokin olduğunu düşündürmektedir.

Regülatör T hücreleri (Treg); Treg'ler otoimmün hastalıkları ve transplant rejeksiyonu gelişimini önleyen hücrelerdir. Treg'ler immün cevapta rol oynayan diğer hücrelerin fonksiyonunu inhibe ederek immün cevabı kontrol edebilen hücrelerdir. CD4+ CD25+ Treg hücrelerinin spesifik belirleyicileri saptanmıştır. Bunlar glukokortikoidle indüklenen TNF reseptörü ve FoxP3'tür (6). Atopik hastalıklarda Treg yetersizliği olabileceği öne sürülmüştür, çünkü havayoluna giren antijen replike olmayan ve non patojen bir antijendir. Bu nedenle bu antijenin aktif immüniteden çok immün tolerans veya cevapsızlık oluşturması beklenir. TGF-beta, IL-10 gibi yangı yanıtını baskılayan sitokinleri salan hücrelerin burada önemli role sahip olmaları beklenir. CD4+ CD25+ Treg defektif hastalar aynı zamanda ekzema, besin allerjisi, yüksek IgE düzeyleri ve eosinofiliye neden olmaktadır.

Normal şartlarda immün sistem antijene veya allerjene karşı kontrollü bir şekilde reaksiyon geliştirir. İmmün reaksiyonun çok azını bildiğimiz veya henüz bilemediğimiz mekanizmalar ile antijenin özelliğine bağlı olarak ilk aşamada veya son aşamasında aşağı çekilmesi gerekir. Bu regulasyonun bozulduğu durumlarda aşırı reaksiyonlarla ve bunun sonucu olarakta, bazı durumlarda oto-immun hastalıklarla karşılaşılır. Bu nedenle Treg hücrelerin aktivasyonunun ilk aşamalarından itibaren reaksiyon bölgesinde, yeterli sayıda ve fonksiyonel olarak bulunması gerektiği düşüncesi akla yakın görünmektedir.

Bu projede CD4+ T hücreleri üzerine kemotaksis etkisi gösteren IL-16'nın aynı zamanda CD4+ CD25+ Treg hücrelerinin aktivasyon belirteci olan FoxP3 ekspresyonuna etkisi olup olmadığı araştırılacaktır. Amacımız IL-16'nın, CD4+ CD25+ FoxP3+ Treg hücrelerinin fonksiyonlarını uyarıcı veya artırıcı rolü olup olmadığını tespit etmektir. Ayrıca hücre kültürü ortamında uygulayacağımız farklı konsantrasyondaki IL-16'nın canlı ölü ve apoptoza giden hücre oranlarına da bakılacaktır ve serum IL-16 seviyeleri ile periferik Treg hücre oranları arasında herhangi bir korelasyon olup olmadığı da incelenecektir. Bu amaçla serum IL-16 seviyeleri de ölçülecektir.

## GENEL BİLGİLER

İmmün sistemin ileri derecede karmaşık ve uyum gösterebilen bir savunma mekanizması haline gelmesi çok uzun bir süre almıştır. Ana işlevi, bizi yabancı ve zararlı maddelerden, mikroorganizmalardan, toksinlerden ve malign hücrelerden korumaktır. Dış ve iç ortamlardan kaynaklanan etkenlere karşı yaşayan organizmaların korunması, immün sistemin ancak devamlı bir gelişim halinde olması ile sağlanabilmektedir. Böylece immün sistem, endojen maddelere karşı yıkıcı cevapları inaktif hale getirmeyi ve komşu dokularda gelişebilecek hasarları önlemeyi öğrenmiştir. Bir çok immün cevap sınırlı bir süre devam eder ve aşırı reaksiyonların önlenmesi için düzenleyici mekanizmalarla kısıtlanır.

Tarihsel olarak, eski konjenital savunma mekanizmaları etkili patojenlerden bağımsız olarak geliştiklerinden nonspesifik olarak tanımlanır. Spesifik gelişmeleri için hiçbir bireysel hücre klonu gerekemediğinden bunlara nonklonal savunma mekanizmaları adı da verilir. Örnek olarak derinin asid tabakası, epidermis, kompleman sistemi, antimikrobik enzim sistemleri ile interferonlar ve interlökinler gibi nonspesifik mediatörler sayılabilir. Hücresel düzeydeki örnekler ise granülositler, monosit-makrofaj sistemi ve doğal öldürücü hücrelerdir. Bu son hücre grubu spesifik ve nonspesifik immün sistemler arası etkileşimi temsil eder.

Yangı cevabı, çözünür ve hücresel bileşenlerin karmaşık etkileşimi ile olay yerinde savunucu güçlerin konsantrasyonlarının artmasını sağlar; bu nonspesifik bir savunma mekanizmasıdır. Bu olaydaki ilk basamak kan damarlarının dilatasyonunu sağlayarak kapiller geçirgenliğini arttıran mediatör salınımıdır. İnfeksiyon bölgesi daha sonra granülositler tarafından infiltrate edilir ve reaksiyonun ileri aşamasında ise makrofajlar granülositlerin yerini alır. Granülositler patojenlerin çoğunun ortadan kaldırıldığı "ilk defans basamağını" oluştururlar. Geri kalan patojenler ile ilk defans basamağının artıkları makrofajlarca fagosite edilir.

Böyle bir immün cevap spesifik immün cevaba zemin hazırlar. Spesifik bir sitokin ortamında, vücut humoral yada hücresel bir savunma çizgisine mi doğru ilerleyeceğine karar verir. Antijen sunan hücrelerin (ASH) lenfoid organlara göçü sistemik immün cevabın ilk tetikleyicisidir. Bundan T ve B lenfositlerden oluşan spesifik immün sistem sorumludur. Bu hücre sistemleri antijenlere karşı ileri derecede özgül reaksiyonlar meydana getirerek klonal genişleme ile adı geçen antijenlere yönelik çok etkin bir cevap ve bellek oluştururlar.

İmmün sistemin esas görevi tehlikeli etkileri yararlı olanlardan ayırmasıdır. İmmün sistemin kendine karşı yıkıcı olaylardan kaçınması tolerans olarak adlandırılır. (7.)

### 2.1. İmmünolojik Tolerans

Normal bir immün sistemin belirgin özelliklerinden biri, birçok antijene yanıt oluştururken bireyin öz antijenlerine yanıt vermemesi olarak tanımlanabilir. Bir antijene özgül algacı (reseptör) olan lenfosit o antijenle karşılaştığında üç farklı durum gelişebilir 1)Lenfosit etkili konuma geçer ve immün yanıt gelişir; bu yanıtı açan antijen immünojenik olarak tanımlanır. 2)Lenfositler işlevsel olarak etkisiz kılınır veya öldürülürler ve sonuçta o antijene tolerans gelişir; bu tip yanıtı açan antijen tolerojenik olarak tanımlanır. 3)Antijene özgül lenfositler antijeni yok sayarlar, antijen yokmuş gibi davranırlar.

Aktivasyon, tolerans yada yok sayma yanıtı, antijene özgül lenfositin tipi, antijenin yapısı, immün sisteme nasıl sunulduğuna göre değişmektedir. İmmün tolerans farklı öz antijenlerle organlarda daha lenfositler oluşurken sağlanabileceği gibi (santral tolerans), olgun lenfositlerin periferik organlarda öz antijenlerle karşılaşmasının sonucu da oluşturulabilmektedir (periferik tolerans).

Santral tolerans lenfosit yapımından sorumlu olan, kemik iliği ve timusta bulunan, sadece öz antijenlere tolerans düzeneğidir. Bu organlarda bulunmayan öz antijenler için tolerans periferik düzeneklerle sağlanır ve sürdürülür. İmmün sistem tarafından hangi veya kaç öz antijenlerimize merkezi veya periferik tolerans, yada yok sayma yanıtı geliştiği henüz bilinmemektedir.(8)

### **2.1.2. T Hücrelerinde Merkezi (Santral)Tolerans**

Timusta henüz olgunlaşmamış T hücresi öz antijenleri yüksek avidite ile tanır ve lenfosit, apoptoz ile ölür. Timusta gelişen T hücreleri öz veya yabancı birçok tip antijeni tanıyabilen algaçlara sahiptir. Olgunlaşmamış lenfositler MHC'ye (Major Histocompatibility Complex) bağlı olarak sunulan kendi antijenlerimizle, kuvvetle etkileşime girerse bu lenfositler apoptozu tetikleyen sinyal alır ve olgunlaşmasını tamamlayamadan ölür. Bu olay negatif seçim yada elenme şeklinde tanımlanır ve bu durum merkezi toleransın başlıca düzeneğini oluşturur. Henüz olgunlaşmamış T lenfositleri bir antijenle iki nedenle kuvvetli etkileşime girebilir; ya o antijen timusta yüksek yoğunlukta bulunmaktadır ya da lenfositin algacı antijene yüksek afinite ile bağlanmaktadır.

Negatif seçime yol açan antijenler , plazma proteinleri ve sık rastlanan hücre proteinleri gibi, genellikle timusta pozitif seçime yol açan antijenlerden daha yüksek konsantrasyonda bulunan antijenlerdir. İlginç olarak genelde veya sadece periferik doku ve organlarda gösterildiği sanılan bir çok öz proteinin timus epitel hücrelerinde bulunduğu gözlenmiştir. Bundan dolayı , olgunlaşmamış T hücrelerine yönelik negatif seçim, bir çok öz proteine karşı otoimmün yanıtın korunmaması yönünde önemli bir düzenek olabilir. Öz antijenlerle kuvvetli etkileşime giren T hücreleri silinmekte, böylece periferik öz antijenlere karşı tepkiler engellenmektedir.AIRE (otoimmün düzenleyici) olarak tanımlanan transkripsiyon faktörünün timusta öz proteinlerin hücre yüzeyinde ekspresyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bu gendeki mutasyonların nadir bir otoimmün hastalık olan ektodermal displazi ve kandidiazisle giden otoimmün polienodokrinopati hastalığına yol açtığı gösterilmiştir (APECED). Timusta negatif seçimden kurtulan lenfositler, olgunlaşmasını sürdürür ve öze tepkili lenfositlerden arındırılır.

Merkezi tolerans işleminden, hem antijenik peptidi MHC sınıf I antijenleri üzerinde algılayan öze tepkili CD8+ hemde MHC sınıf II antijenleri üzerinde algılayan öze tepkili CD4+ T hücreleri etkilenir. Timusta öz antijeni yüksek afinite ile tanıyan T hücrelerini apoptoza hangi sinyallerin yönelttiği bilinmemektedir.

Timusta öz antijenleri tanıyan bazı olgunlaşmamış T hücreleri düzenleyici (regulatory) hücre niteliği kazanarak periferik dokulara girerler. Düzenleyici T hücrelerin işlevleri ve özellikleri ileride detaylı olarak tartışılacaktır. Öz antijene bağlanan olgunlaşmamış T hücrelerinin negatif seçim ile silinmesini veya düzenleyici hücre olmasını neyin belirlediği henüz bilinmemektedir.

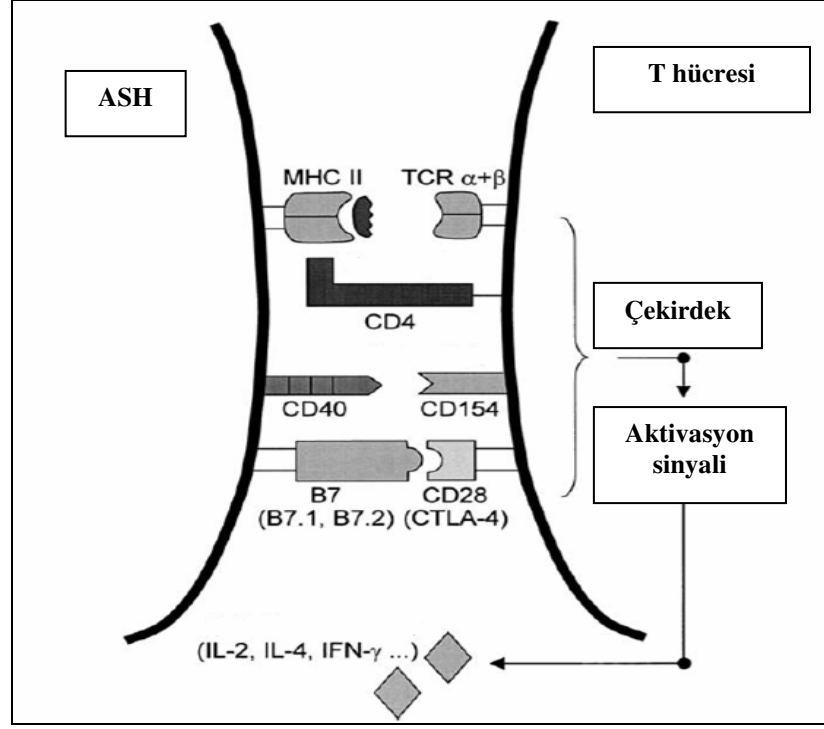
## **2.2. Periferik T Lenfosit Toleransı**

Periferik Tolerans, olgun T hücresi periferde öz antijenleri tanıdığı anda oluşur, sonuçta işlevsel yanıtsızlık (anergi) veya ölüme yol açar veya düzenleyici T hücreler tarafından öze tepkili lenfositler baskılanır. Periferik tolerans timusta olmayıp, temelde periferik dokularda olan, öz antijenlere T hücre yanıtının önlenmesinde önemlidir. Ayrıca bu olay otoimmüniteyi engellemede merkezi toleransın tamamlayıcısı olarak düşünülebilir.

### **2.2.1. T Hücre Anergisi**

Anerji, T hücresinin bir antijenle karşılaşmasından sonra işlevsel inaktivasyonu tanımlar. Bu durum genellikle T hücresinin tam aktivasyonu için gerekli olan ikinci eş uyaran yokluğuna bağlıdır. T hücrelerinin tam aktivasyonu için (çoğalma ve farklılaşma ile etkin hücrelere dönüşmesi) iki uyarıya gerek vardır, birincisi her zaman antijendir, ikinci uyarı ise antijen sunan hücrelerden (ASH) gelir ve bu ikinci sinyalin oluşu mikroorganizmalara yanıt olarak gelişmektedir. Genel inaniş, doku ve lenfoid organlarda bulunan ve uyarılmamış ASH'lerin B7 gibi ikincil sinyalleri çok az yada hiç göstermedikleri şeklindedir. ASH sürekli olarak dokularda bulunan öz antijenleri işleyip sunmaktadırlar. Öz antijenleri için algacı bulunan T lenfositleri bu antijenleri görmektedir ve böylece antijen algacından sinyalleri alırlar(sinyal-1) fakat gerekli ikinci sinyalleri T hücreleri almaz.

Sinyal-1, uygun sinyal-2 yokluğunda uzun süreli yaşayan T hücre anergisine yol açıyor olabilir. Bazı durumlarda, öz antijenle karşılaşan T hücresi sitotoksik T lenfosit ilişkili protein-4 (CTLA-4) olarak adlandırılan bir molekülüne eksprese eder, bu molekül B7 molekülünün yüksek afiniteli bağlacıdır ve T hücresine yanıtı engelleyici bir ileti gönderir. Özetle ASH üzerinde öz antijeni gören T hücresi CTLA-4 ile B7 'ye bağlanır ve sonuç olarak T hücre inaktivasyonu oluşur.(şekil 2.1.).



Şekil 2.1. ASH- T hücre ilişkisi (8)

Burada CD28 'in B7 molekülüne bağlanan ve aktivasyonu sağlayan ikinci sinyalin temel moleküllerinden olduğunu anımsamak gerekir. T hücrenin aynı B7 molekülüne bağlanmak için aktivatör CD28 ile baskılayıcı CTLA-4 arasında nasıl seçim yaptığı bilinmemektedir.

Bazı deneysel modeller, T hücre anerjisinin öz toleransın sürdürülmesinde önemli olduğunu desteklemektedir. Sıçanlarda yapay olarak bir dokuya yüksek düzeyde B7 gösterimi sağlanırsa, o dokudaki antijenlere yönelik otoimmün reaksiyon geliştiği gözlenmiştir. Bu gözlemlerden yola çıkarak, yapay olarak ikinci sinyallerin sağlanması T hücre anerjisini kırmakta ve öze tepkili T hücreleri aktive etmektedir. Eğer CTLA-4 molekülü engellenir yada genin susturulması yada yok edilmesiyle (knock out) etkisiz kılınırsa sıçan bir çok dokuyu içine alan yaygın otoimmün hastalık geliştirmektedir.

Bu sonuç inaktive edici bir reseptör olan CTLA-4'ün sürekli olarak işlevsel olduğu ve öze tepkili T hücrelerini kontrol altında tuttuğunu düşündürmektedir.

### 2.2.2 Silinme (Aktivasyona Bağlı Hücre Ölümü)

Olgun T hücrelerinin öz antijenlerle tekrarlayan uyarımı ya da öz antijenin ikincil sinyal olmadan tanınması apoptoz yolağını tetikleyerek, öze tepkili bu lenfositlerin silinmesi ile sonuçlanır. Bu işlem aktivasyonun uyardığı hücre ölümü olarak tanımlanır. Burda iki olası mekanizma vardır: Birincisi, CD4+ T hücreleri tekrarlayan aktivasyonlarda bir ölüm algacı olan Fas (CD95) ve onun bağlacı Fas Ligandını (FasL) birlikte göstermeye başlar, Fas'ın aynı hücrede veya yakın hücrelerde FasL ile bağlanması Fas ölüm algacı tarafından hücre içine iletilir,



kaspazların ve sitolitik enzimlerin aktivasyonu ile apoptoz gelişir. Böylece tekrarlayan aktivasyon durumunda T hücresi kendi iç ölüm programını aktive eder ve sürekli bir immün aktivasyonu engeller. Öz antijenler onlara özgül olan T hücrelerin yok olmasına neden olabilirler, çünkü bu antijenler yaşam boyu varlığını sürdürür ve lenfositleri tekrar tekrar uyarır. Buna karşıt olarak mikroorganizmaların çoğu bağışıklık yanıtı ile yok edilir, böylece onlara özgül lenfositlere tekrarlayan uyarılar verme olasılığı azdır. T hücre büyüme etmeni olan IL-2 (interlökin -2) Fas kaynaklı apoptozu artırır, yani aynı sitokin hem T hücre yanıtının başlamasında hemde sonlandırılmasında etkindir. Bu iki karşıt etkinin nasıl dengede tutulduğu bilinmemektedir.

Aktivasyonla oluşturulan hücre ölümü için ileri sürülen ikinci mekanizma ise, antijenle uyarılan T hücresinde öncül apoptotik proteinlerin oluşması temeline dayanır. T hücresi mikroorganizmalarla uyarılmışsa özellikle doğal immün yanıt sırasında oluşan ve antiapoptotik proteinler bu etkiyi engellemekte, eğer uyarıcı öz antijene bu antiapoptotik moleküller oluşmamakta ve hücre apoptoza gitmektedir. Böylece öz antijenlere yönelik aktive olan T hücresi apoptozla yok edilmektedir. Bu yolda Fas ölüm reseptörlerinin rolü yoktur.

Fas yolağına dayanan apoptozun öz toleransta önemli olduğunu gösteren en önemli kanıt; Fas yada FasL genlerinde mutasyon olan fareler ve Fas geninde mutasyon olan çocuklarda lenfosit birikimi ile otoimmün hastalıkların geliştiği gözlenmiştir.

### **2.3. B Lenfosit Toleransı**

Öz polisakkaritler, lipitler ve nükleik asitler T hücrelerinin tanımadığı T bağımsız antijenlerdir. Otoantikor yapımının engellenmesi için bu antijenlerin B lenfosit toleransı oluşturmaları gerekir.

#### **2.3.1. Merkezi B Lenfosit Toleransı**

Olgunlaşmamış B lenfositleri kemik iliğinde öz antijenlere kuvvetle bağlanırsa negatif seçim yoluyla öldürülür veya algaçlarının özgüllüğünü değiştirirler. Silinme süreci olgunlaşmamış T hücrelerin negatif seçimine benzer. T hücrelerinde olduğu gibi, B hücrelerinin negatif seçim mekanizması, yaygın olarak eksprese edilen hücre zarı veya çözünür öz antijenlere yüksek afiniteli algaçlarla bağlanan, olgunlaşmamış B hücrelerin elenmesiyle sonuçlanır.

B hücreleri kemik iliğinde öz antijenleri tanıdığında, immünglobülin (Ig) genleri yeniden düzenlenerek yeni bir Ig hafif zinciri yapabilirler. Böylece bu yeni hafif zincir daha önceden düzenlenmiş ağır zincirle birleşerek önceki öz antijene özgül olmayan yeni bir algaca dönüşebilir. Algaç özgüllüğünün değişmesine yeniden düzeltilme adı verilir. Kemik iliğinde bulunan öz antijenlerin kaçının veya hangisinin apoptoza veya algaçtaki özgüllük değişimine yol açtığı ve öze tepkili B lenfositlerin bu iki yoldan birini seçme kararını nasıl verdiği bilinmemektedir.

### **2.3.2. Periferik B Lenfosit Toleransı**

Periferik dokularda yüksek yoğunlukta öz antijenlerle karşılaşan B hücresi anerjik duruma geçer ve o antijene bir daha yanıt vermez. Bir varsayıma göre eğer B lenfositleri bir antijeni tanır ancak T hücresinden gerekli yardım iletilmesi olmazsa anerjik duruma geçer. T bağımsız antijenlerse büyük olasılıkla ancak kuvvetli uyarım yaptıkları zaman B lenfositlerini etkin duruma getirebilmektedir. Anergik B lenfositleri lenfoid folikülleri terk edebilir veya sonradan lenfoid follikülden dışlanırlar. Bu dışlanan B hücreleri yaşamlarını sürdürmek için gerekli uyarıyı alamadıkları için ölürler. Otoantikor oluşumuyla seyreden SLE (Sistemik Lupus Eritematozus) gibi hastalıkların hem B lenfositleri hemde yardımcı T lenfositlerindeki tolerans hatalarından kaynaklandığından kuşulanılmaktadır.

Otoimmünitinin gelişmesi lenfosit hatalarına ek olarak bir çok değişik etmenin bir araya gelmesinin sonucu olarak oluşmaktadır, bu etmenlerin en önemlileri genetik etmenler ve enfeksiyonlardır.

### **2.4. Enfeksiyonların Otoimmünitadaki Yeri**

Enfeksiyonlar öze yönelik lenfositleri aktive edebilir ve otoimmün hastalıkların gelişimine yol açabilirler. Klinisyenler yıllardan beri, otoimmün hastalıkların belirtilerinin enfeksiyon hastalıklarının başlangıç dönemlerinde ortaya çıktığı veya arttığını gözlemlemişlerdir. Enfeksiyonlarla otoimmün doku zedelenmesindeki birliktelik hayvan modellerinde de gösterilmiştir. Enfeksiyonlar birçok yolla otoimmünitinin gelişimine katkıda bulunabilirler. Bir dokunun enfeksiyonu o bölgede doğan immünitinin etkin hale geçmesi, böylece ASH'de eş-uyaran iletilerinin ve sitokinlerin ekspresyon ve yapımının artmasına yol açar. Bunun sonucu olarak etkin duruma geçen ASH'ler o dokuda öze tepkili T hücreleride uyarılmış olur. Diğer bir deyişle enfeksiyonlar T hücre anerjisini kırarak öze tepkili lenfositlerin yaşamını sürdürmesine ve etkin hale geçmesine yol açabilir. Bazı mikroorganizmalar bizim antijenlerimize çok benzeyen veya çapraz reaksiyon veren peptitler içerir veya üretirler. Bu durumda bu peptite yönelik bağışıklık yanıtı ve saldırısı öze yönelmiş olacaktır. Mikroorganizma peptitleriyle antijenlerimiz arasındaki bu çapraz reaksiyon olayı "moleküler benzeşme" olarak tanımlanmaktadır. Moleküler benzeşme olayının otoimmün hastalıkların gelişimindeki gerçek rolü bilinmemektedir.

### **2.5. Otoimmünitada Genetik Etmenler**

Birçok gen otoimmün hastalığa yatkınlığa neden olur, ama bunlardan en önemlileri MHC genleridir. Otoimmünitada genetik etmenlerin önemli rolü ikizlerle yapılan çalışmalarda dikkati çekmiştir. İkizlerden birinde bir otoimmün hastalık geliştiğinde diğerinde gelişme olasılığı toplumda beklenenden çok daha fazladır. Dahası bu artmış sıklık tek yumurta ikizlerinde çift yumurta ikizlerinden daha fazladır.

İnsan ve eş-soyly hayvanlardaki pek çok otoimmün hastalık belli MHC alelleri ile ilişkilidir. HLA(Human leucocyte antigen) alelleri ile otoimmün hastalıkları arası ilişki çok eskiden beri bilinmektedir ve bu bilgi T hücrelerinin de bu hastalıklarda önemli rolü olduğu konusunda birinci derece kanıt olarak algılanmıştır(çünkü MHC moleküllerinin temel görevi peptit antijenleri T hücrelerine sunmaktır). Bazı otoimmün hastalıkların sıklığı belirli bir HLA allelini

taşıyanlarda taşımayanlara oranla çok daha yüksek olarak gözlenmektedir. Bu artmış sıklık HLA-hastalık ilişkisinde “göreceli risk” olarak tanımlanmaktadır. Burada belirli bir HLA alleli taşımanın o otoimmün hastalığın gelişme riskini arttırdığı, ancak allelin kendisinin hastalık nedeni olmadığını unutmamak gerekir. Belirli MHC antijenleri otoimmünitenin gelişmesine şu yollarla neden olabilir: öz antijenleri etkili olarak sunamama, hatalı negatif seçime yol açma bu MHC’lerle sunulan peptidin,düzenleyici T hücrelerin gelişimini uyarmaması.(8)

## **2.6. Düzenleyici T Hücreleri ve Öz Tolerans**

Sonradan kazanılan immün sistem yabancı organizmaya özgül cevap vermek üzere özelleşmiş geniş bir algaç dağarcığına sahiptir. Bu özelliği ile antijene özgül olarak çoğalır ve etkin hücrelere dönüşerek yabancı antijeni yok eder. İmmün sistem bu görevi yerine getirmek için kendinden olanı tanıyarak yabancıya önceden, rastgele oluşturduğu algaçları ile yanıt oluşturur .Öz tolerans iç hücrelerle, yani otoreaktif hücrelerin inaktivasyonu veya silinmesi ile oluşmaktadır. Buna resesif tolerans denir. Bununla birlikte dominant toleransın dış formunu da CD4+ düzenleyici T hücrelerin oluşturduğu gösterilmiştir.(9)

### **2.6.1. Düzenleyici T hücreleri ve İmmün Sistemi Kontrol Mekanizmaları**

Düzenleyici T hücreleri başlıca iki grup altında incelenmektedir.Bir grup doğal (natural) CD4+ CD25+ düzenleyici T (n Treg) hücreleri olarak adlandırılmıştır. n Treg’ler, Timusda üretilip baskılayıcı T fonksiyonlarını periferde antijenle karşılaşmadan önce kazanmaktadırlar. n Treg’ler T hücre reseptörü (THR) pozitif seçim sonrası sınıf II MHC öz peptidlere kuvvetli olarak bağlanan hücre tipidir. Yapılan çalışmalarla n Treg’lerin antijen uyarımı sonrasında proinflamatuvar sitokinleri salgılamadıkları gösterilmiştir.

Bir diğer grup ise adaptif T reg olarak adlandırılan ve periferde belirli şartlar altında oluşan hücre tipidir, konu üzerinde yoğunlaşan çalışma ve gözlemler diğer düzenleyici hücre tiplerini belirlemiştir. Bunlar CD4+ CD25+ FoxP3+ T, IL-10 salgılayan Tr1, TGF-b salgılayan Tr3, CD8+ CD28- T, CD8+ CD122+ T,  $\gamma\delta$  T ve doğal öldürücü T (NKT) hücreleri olmak üzere detaylı olarak incelenmiştir (10)(Tablo 2.1).

**Tablo 2.1.** Treg tipleri özet tablo (11)

<b>T reg çeşidi</b>	<b>Orijini</b>	<b>Fenotip</b>	<b>FoxP3</b>	<b>Görevi</b>
CD25-	Bilinmiyor	CD4+CD25-	Var	Bilinmiyor
Doğal oluşan CD4+ CD25+	Timus(belki perifer)	CD4+CD25+ CD45RB Low	Var	Hücre-hücre etkileşimi Membran veya TGF- $\beta$ ve IL-10 salınımı
IL-10 T reg	Perifer	CD4+	Yok	Hücre-hücre etkileşimi IL-10 salınımı
TH1	Perifer	CD4+	Yok	IFN- $\gamma$ salınımı bazende IL-10 salınımı
TH2	Perifer	CD4+	Yok	IL-4 salınımı IL-10 salınımı IL-13 salınımı

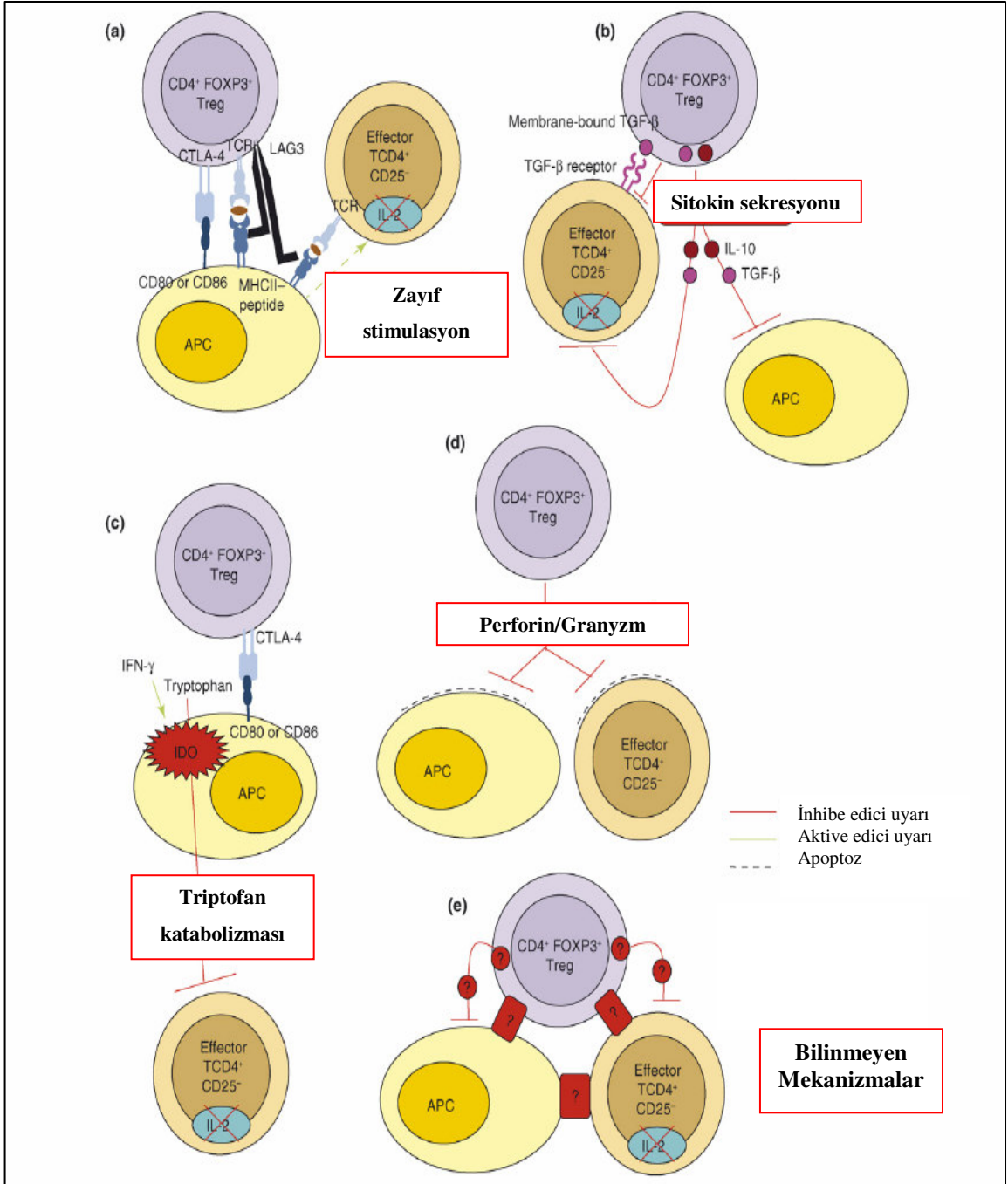
CD25 hücre yüzey belirteci, aktive olmuş T hücreleri ve bir çok hücre tarafından taşınmaktadır. Bu yüzden T reg'leri CD25 taşıyan diğer hücre tiplerinden ayırmada farklı belirteçlerin varlığına ihtiyaç duyuldu. Bunlardan en önemlisi forkhead winged helix P3 (FoxP3) transkripsiyon faktörüdür. FoxP3 -/- farelerin otoimmün hastalıkları geliştirdiği T reg hücrelerinin ortaya çıkarılmasından önce bilinmekteydi. 2003 yılında Hori ve arkadaşları yaptıkları çalışmada naif T hücrelerini FoxP3'ü kodlayan geni taşıyan retrovirüslerle transdükte ettiklerinde, naif T hücrelerinin T reg hücrelerine dönüştüğünü gösterdiler ve sitotoksite deneyleri ile in vivo ve in vitro etkinliklerini bildirdiler.(12)

T reg hücrelerini diğer hücrelerden ayırmak için kullanılan ilave belirteçler glukokortikoid-indükte tümör nekrosis faktör reseptör (GITR), PD-1, CTLA-4, CD40, B7-H1, B7-H4 olarak ortaya konuldu.

### **2.6.2. Düzenleyici T Hücrelerin Etki Mekanizmaları**

T reg'ler üzerindeki diğer tartışma konusu ise etki mekanizması üzerindedir. Başlıca iki görüş vardır.T reg'lerin baskılayıcı fonksiyonlarını göstermek için hücre-hücre teması yaptıkları yada IL-10 veya transforming growth faktor (TGF-b) gibi sitokinleri salgılayarak uzaktaki hücreleri dahi etkileyebildiği düşünülmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar iki mekanizmanında doğru olduğunu gösterdi. PD-1 ve CTLA-4'nun T hücreleri aktivasyondaki inhibe edici etkisi zaten bilinmektedir. Bununla birlikte IL-10 ve TGF-b'nin TH1 tip sitokinleri özellikle IL-2 ve IL-12 'nin ekspresyonunu baskılamaktadır. Diğer mekanizmalar ise, doğal T reg'lerin indoleamine 2,3(IDO) veya adozin ve siklik AMP ile T hücre aktivasyonunu inhibe ettikleri ve T hücre apoptozunu uyarmaları ile ortaya çıkan etkidir.

Bununla beraber T reg'lerin baskılayıcı mekanizmalarını tam olarak nasıl gösterdikleri ortaya konulamadı (13) (Şekil 2.2.).



**Şekil 2.2.** Treg'lerin etki mekanizmaları (13)

- a) CTLA-4'ün inhibe edici etkisi, IL-2'nin inhibisyonu b) IL-10 ve TGF-β sitokin sekresyonu c) IDO'nun inhibe edici etkisi d) henüz tanımlanamayan mekanizmalar.

### **2.6.3.Düzenleyici T Hücrelerin Enfeksiyonlardaki Rolü**

T reg'lerin enfeksiyonlardaki rolü otoimmün hastalılar üzerine yapılan gözlemlere dayanmaktadır. Enfeksiyonlar TH1 yada TH2 tipi olarak gelişmektedir. Genel kabul olarak hücre içi mikroorganizmalar yada antijenler TH1 yanıtı geliştirirken , hücre dışı mikroorganizmalar yada antijenlere karşı TH2 tip yanıt gelişmektedir. Sitotoksite deneyleri ile T reg'lerin IL-10, TGF-b gibi TH2 tip sitokinlerle TH1 yanıtı baskıladıkları gösterildi. Bu bilgiler ışığında mikroorganizmalara karşı gelişen eksik yada fazla yanıt sonucu oluşan patolojik durumların T reg'ler ile bir ilişkisi var mıdır? Bu soru için ilk yanıt Yasmine Belkaid ve arkadaşları tarafından Leishmania major enfeksiyon modelinde gösterildi. Yapılan çalışmalarda CD4+ T hücre aracılı hafıza yanıtın sağlanması için antijen sürekliliğinin önemi anlaşıldı. Leshmania ile kronik enfekte fareler L.major enfeksiyonlarına karşı korunurken, birincil Leshmania enfeksiyonunda parazitleri tamamen temizleyen fareler, ikincil Leshmania enfeksiyonlarına karşı immün yanıt geliştirmede yetersizdiler. Lezyon bölgesinde parazitlerin sürekliliği L.majora karşı kazanılmış bağışıklığın korunmasındaki zorunluluğu ortaya koydu. Belkaid ve arkadaşları, doğal T reg'ler tarafından üretilen IL-10'un lezyon bölgesinde parazitlerin devamlı kalmasını sağladığı ve lezyon bölgesinde bulunan antijene özgü T reg'lerin varlığını gösterdi.(14)

Doğal T reg'lerin Hepatit B virüsü enfeksiyonlarında CD8+ ve CD4+ T hücre cevabının dengelenmesinde hastalığın klinik seyir ve patolojisinde önemli rol aldıkları görüldü. Listeria ve Bordetella persistan enfeksiyonlarında ve bir çok bakteriyel enfeksiyonda T reg'lerin adoptif transferi sonrası TH1 immün yanıtın baskılandığı ve bakteriyel yükün arttığı bildirilmiştir.(15)

Düzenleyici T hücreleri, bağışıklıkta gerek birincil yanıtın gerekse hafıza yanıtının oluşmasında önemli rol oynamaktadır. T reg'lerdeki azalma TH1 yanıtı arttırırken, sayısal artış immün dengeyi TH2'ye doğru yöneltmektedir. Böylece oluşan patogenezi, klinik seyir ve T reg'ler arasındaki ilişki enfeksiyonun çeşidine hatta etkenin vucuda giriş yerlerine göre farklılık göstermektedir.

### **2.6.4. Alerjik Hastalıklarda T reg Hücrelerinin Rolü**

Allerjik hastalara uygulanan başarılı immünoterapi çalışmalarında ve sağlıklı kişilerin doğal yollarla yüksek miktarlarda antijenle karşılaştıklarında, antijene gösterdikleri immünolojik cevapların benzer oldukları gösterilmiştir. Yüksek dozda antijenle karşılaştıktan sonra immün cevaplar izlendiğinde, allerjen-spesifik efektör T hücrelerinin sayılarında azalma ve buna karşılık T regülatör hücrelerin sayılarında artışla ortaya çıkan immün deviasyonun varlığı gözlenmektedir. Yüksek dozda antijenle karşılaşma, doğal immün sistemi uyarmayacak, yani immün sistem için tehlikeli olmayacak koşullarda olmalıdır. T regülatör hücrelerin baskılayıcı fonksiyonları sadece spesifik oldukları antijene karşıdır ve diğer antijenik cevaplar bu baskılamada etkilenmez. Bu baskılama spesifik antijene karşı T hücre çoğalmasının olmaması ve hem T yardımcı I hem de II tipi sitokinlerin salgılamasındaki azalma ile karakterizedir. T regülatör hücrelerin fonksiyonlarında birçok baskılayıcı faktörle beraber hücre kontaktı gerektiren veya gerektirmeyen mekanizmalar rol almakla birlikte interlökin 10 (IL-10) ve transforming growth

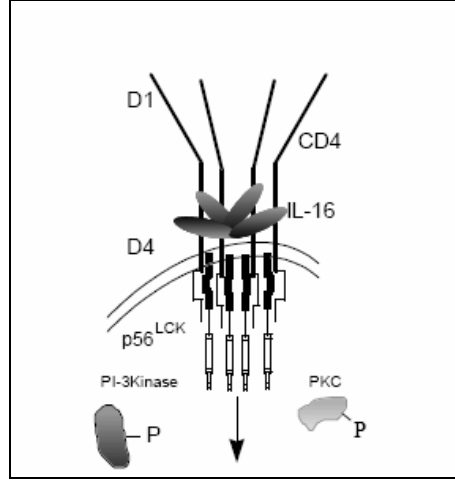
faktör-beta (TGF- b ) temel rol oynamaktadır.IL-10 ve TGF- b salgılayan allerjen-spesifik T hücrelerinin CD4 + CD25 + T hücre popülasyonu içinde yer aldığı ve bu hücrelerle zenginleştirilmiş hücre kültürlerinde özellikle terapinin uyardığı allerjen-spesifik T hücre baskılanmasının arttığı gösterilmiştir.

Bunlara ilave olarak, allerjik inflamasyonun mediatörlerinden özellikle histaminin dendritik hücre üzerine direkt etkisi ile naif hücrelerin IL-10 yapan T hücrelerine dönüşümünü indüklediği ve histaminin direkt olarak Th2 tipi hücreleri, histamin 2 reseptörü üzerinden baskıladığı gösterilmiştir. Allerjen-spesifik immünoterapi sırasında T regülatör hücrelere doğru gözlenen immün deviasyon, aynı zamanda allerjen-spesifik antikör izotiplerini de düzenlemektedir. T regülatör hücrelerden yüksek miktarlarda salgılanan IL-10 ve TGF- b B hücrelerinden yapılan IgE'yi baskılayan, düzenli olarak IgG4 ve IgA yapımını arttırır.(16) Bu izotip dönüşümü, antijenle doğal yolla karşılaşan bireylerde de görülmektedir. Örneğin; periferik toleransı IL-10 aracılı olan pekçok kez arı ile sokulan arıcılar ve kronik helmint infeksiyonu olan hastalarda antijen-spesifik IgG4 miktarları 100-1000 kat artmış olarak saptanmıştır.(17)

Bu bulgulara ek olarak allerjik inflamasyonda rol oynayan efektör hücrelerin, mast hücreleri, bazofil ve eozinofillerin fonksiyonlarını yerine getirmeleri, dönüşümleri ve yaşamaları için bir takım T hücre sitokinlerine ihtiyaçları vardır. Bununla birlikte, allerjen-spesifik immünoterapi sırasında indüklenen T regülatör hücreler baskılayıcı özellikleri nedeni ile bu sitokinlerin salgılanmasını ve dolaylı olarak allerjik inflamasyonun efektör hücrelerini de baskılayacaktır. Sonuç olarak, allerjenlere allerjik ya da sağlıklı immün yanıtı, “allerjen-spesifik T regülatör” hücrelerle allerjen-spesifik Th2 tipi hücreler arasındaki denge belirlemektedir. Eğer immün deviasyon T regülatör hücrelere doğru ise, Th2 tipi hücrelerden salgılanan pro-inflamatuar sitokinler baskılanmakta, allerjen-spesifik IgG4 ve IgA tipi antikör yapımı uyarılmakta ve allerjide rol alan efektör hücreler de baskılanmaktadır.(18)

## **2.7. CD4 antijeni**

CD4 antijeni; T hücre gelişimi ve aktivasyonunda farklı fonksiyonu vardır. CD4+ yardımcı T hücrelerinin, antijen sunan hücrelerin MHC sınıf-II antijeni ile sunulan peptid antijenlere cevapta önemli rolü bulunmaktadır, ayrıca adezyon ve kemotaktik reseptör gibi işlev görür. CD4 antijeni 58 kd ağırlığında bir transmembran glikoproteindir. İmmüoglobülin (Ig) ailesi reseptörlerinden birisidir. 370 aminoasitten oluşan ekstrasellüler bir kısma sahiptir. Bu kısım 4 bölgeden (D1-D4) oluşur. Bu bölgeler farklı proteinler ile etkileşerek farklı fonksiyonlar gösterir. Örneğin T hücre reseptörü, MHC sınıf-II ve IL-16 D4 bölgesi ile etkileşirken, HIV gp120 D1 bölgesi ile etkileşir. CD4 antijeninin sitoplazmik uzantısı Lck ile nonkovalan olarak etkileşime girer. Lck, Src-ailesinden olan bir tirozin kinazdır. IL-16 ile CD4 antijeninin ligasyonu sonucu Lck tirozininin fosforilasyonu ve arkadan gelen diğer proteinlerin tirozinlerinin fosforilasyonu gerçekleşir. Bu tirozin fosforilasyonu olayları hücresel aktivasyon ve fonksiyonel cevabın gerçekleşmesinde rol oynar (Şekil 2.3.)(19).



Şekil 2. 3. CD4 – IL-16 bağlantısı (19)

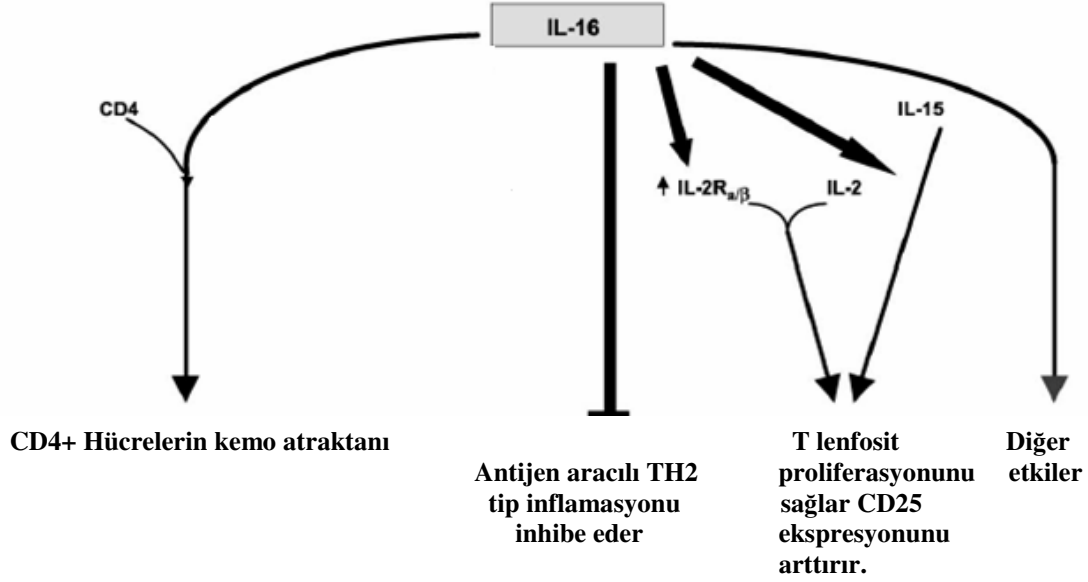
## 2.8. İnterlökin 16 (IL-16)

IL-16; 1982 yılında periferik kan mononükleer hücrelerin mitojen ile uyarımı sonucunda T lenfositlerinin kemotaktik aktivitesini artırması sonucu tanımlanmıştır. Mast hücrelerinden, eozinofillerden, dendritik hücrelerden, T lenfositlerden ve inflamatuvar cevap sırasında belirli stromal hücrelerden salınımı olmaktadır. IL-16 daha önce lenfosit kemotaktik faktör olarak bilinirken, bugün CD4+ T lenfositleri üzerindeki spesifik etkileri gösterilen bir sitokin, özellikle de CD8+ T lenfositlerinden histamin ve serotonin uyarımı sonucu salınan bir sitokin olduğu gösterilmiştir. IL-16'nın immün sistemde iki öncül görevi vardır: 1) CD4+ hücrelerin (CD4+ T lenfositler, CD4+ monositler ve CD4+ eosinofiller) kemoatraktandır. 2) TH2 tipi sitokinlerin (IL-4, IL-5, IL-13) antijenik uyarım sonucu salınımını baskılayıp IFN-gamma yapımını artırmasıdır (1,2). Ayrıca IL-16 selektif olarak kemokin uyarımının durdurulmasında ve istirahat halindeki CD4+ T hücrelerinin IL-2R ve MHC sınıf-II gösteriminde rol alır. IL-16'nın, astım hastalarında yangı yanıtını azaltıcı veya durdurucu olarak rol oynadığı gösterilmiştir. IL-16 Knockout farelerde deneysel akciğer değişimlerine aşırı cevap ve inflamasyonda artış görülürken, normal farelere parenteral veya aerosol olarak IL-16 uygulanması akciğer aşırı cevabını, goblet hücre hiperplazisini ve inflamasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (3). IL-16'nın, astım, romatoid artrit, sistemik lupus, eritromatöz, kolit, atopik dermatit ve multipl skleroz hastalıklarında gözlenen yangı yanıtı ile ilişkili olduğu bulunmuştur (4,5). IL-16'nın CD4+ T hücrelerinin fonksiyonlarını etkilemesi ve bu hücrelerde IL-2R gösterimine neden olması, inflamasyonda immün regülatuar bir sitokin olduğunu düşündürmektedir.

IL-16'nın T hücre aktivasyonunu ve proliferasyonunu etkilediği gösterilmiştir. IL-16, kendinden salınan veya prekürsör formu olan proteinleri aracılığıyla hücre aktivasyonunu ve gelişimini etkileyen ikinci sitokindir. IL-16 doğrudan büyüme üzerine etki eder, T hücre reseptörü (THR) aracılığıyla T hücre aktivasyon ve apoptozunu düzenlerken Human immunodeficiency virus (HIV) replikasyonunu da etkiler ve nükleer pro IL-16 T hücre siklusunu indükler. Her ne kadar IL-16 T hücre büyümesini ve aktivasyonunu değiştiriyorsa da diğer hücreleri de etkilemektedir. Eozinofiller yanında (20), dendritik hücreler (21),



B lenfositler (22), havayolu epitelyumu (23), mast hücreleri , fibroblastlar ve sinir hücreleri de IL-16 sekrete eder. IL-16 hücre aktivasyonu ve hücre siklusu üzerine etkisi T lenfositlerde belirtilmişse de, benzer etki diğer hücre tiplerinde de var olabilir.



Şekil 2. 4. IL-16' nın immün sistem üzerine etkileri özet (25)

## GEREÇ ve YÖNTEM

### 3.1.Çalışma Grubu

Çalışmaya yaşları 19 ile 35 arasında değişen (ortanca 24) 17 erkek, 13 bayan toplam 30 sağlıklı kişi dahil edildi. Katılımcılar allerji ve otoimmünite öyküleri ve son 10 gün içinde herhangi bir enfeksiyon geçirip geçirmediği açısından dikkatle değerlendirildi. Tüm katılımcıların tam kan sayımları normaldi. Katılımcılar projeye katılmadan önce detaylı olarak bilgilendirildi ve aydınlatılmış onam formları imzalatıldı.

### 3.2. Kan Örnekleri

Kanlar ön kol üzerinde uygun çapta bir vene girilerek, vakuteiner düz tüpe 2ml, vakuteiner heparinli tüpe 10 ml ve vakuteiner EDTA içeren tüpe 3ml olmak üzere steril olarak alındı. EDTA içeren tüplere alınan kanlardan tam kansayımı yapıldı, heparinli kanlardan mononükleer hücre hazırlandı. Düz tüplere alınan kanlardan serum ayrıştırıldı ve daha sonra IL-16 düzeyine bakmak için  $-80^{\circ}$  C de saklandı.

### 3.3. Tam Kan Sayımı

Tam kan sayımı Akdeniz Üniversitesi Kan Merkezinde bulunan Coulter (Coulter Electronics Ltd., England) marka otomatik tam kan sayımı cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

### 3.4. Periferik Kan Mononükleer Hücre Hazırlanması

Yetişkin sağlıklı gönüllü 30 katılımcının, vakuteiner heparinli tüplere alınan 10'ar ml'lik kanları steril olarak çalışıldı. Mononükleer hücreler steril 15 ml'lik tüplere 3 ml ficol-isopaque (spesifik gravitesi 1,077 g/ml) üzerine yavaş yavaş 5 ml periferik kan eklenerek (Ficol ve kanın karışmamasına dikkat edildi) 400 G de 30 dk santrifuj edilmesi ile elde edildi. Santrifuj sonucu tüpün en altında eritrositler, onun üzerinde ficol, ficolün üzerinde beyaz bir halka şeklinde mononükleer hücreler, mononükleer hücrelerin üzerinde de plazma bulunmaktadır. Tüplerde oluşan beyaz halkaların ikisi bir tüpte olmak üzere steril bir tüpde toplandı ve üzerlerine % 5 lik FCS, % 1lik antibiyotik-antimikotik solüsyonu içeren steril RPMI 1640 besiyerlerinden 4 er ml eklenerek pipet yardımıyla yavaşca karıştırıldı. Tüpler 400g de 7 dk santrifuj edildi. Supernatan steril pipetle çekilip atıldı. Peletler 4ml steril RPMI 1640 besiyerlerinde çözünüp, tekrar 400 g de 7 dk santrifuj edildi. Bu işlem 2 kez daha tekrarlanarak mononükleer hücreler yıkandı.

### 3.5. Hücre Kültürü ve Rekombinant IL-16 Doz Ayarlaması

Hazırlanan mononükleer hücreler otomatik kan sayım cihazında sayılarak her bir tüpde ml de  $1 \times 10^6$  hücre olacak şekilde 4 adet steril hücre kültürü tüplerine alındı. Üzerlerine ml de 0 pg/ml (kontrol), 100 pg/ml, 700 pg/ml, 1400pg/ml olmak üzere 4 farklı konsantrasyonda Rekombinant IL-16 bulunduran %1 L-glutamin, % 5

lik FCS, % 1 lik antibiyotik-antimikotik solüsyonu içeren steril RPMI 1640 besiyerinden 2'şer ml eklenerek pipet yardımıyla yavaşça karıştırıldı. % 5 CO<sub>2</sub>, %95 nemli hava, 37<sup>0</sup> C deki inkübatörde in vitro 24 saat inkübe edildi.

### 3.6. İnkübasyon Sonrası Hücrelerin Monoklonal Antikorlarla İşaretlenmesi

İnkübasyon sonunda hücreler 2 defa 400 g de 7 dk santrifuj edilerek PBS ile yıkandı. Hücreler önce anti-CD4 FITC BD (Becton Dickinson) ve anti-CD25 PE (BD) monoklonal antikorları ile yüzey boyaması gerçekleştirildi. Flow sitometri tüplerine alınan hücreler 10 µl anti- CD4 FITC, 10 µl anti-CD25 PE monoklonal antikorları(moAb) ile 20 dk 25<sup>0</sup> C de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 2 defa 400 g de 7 dk santrifuj edilerek PBS ile yıkandı ve sitoplazmik boyamaya geçmeden fiksasyon solüsyonu (eBioscience) ile fiske edildi. Aynı işlemler antikorların izotiplerinin bulunduğu ikinci bir tüpe de uygulandı. Hazırlanan tüplerdeki antikor renk ve miktarları tablo halinde aşağıda belirtilmiştir (Tablo 3.1).

**Tablo.3.1.** Tüplere konulan moAb renk ve miktarları

1.tüp	2.tüp
anti-IgG1-FITC 10 µl	anti-CD4-FITC 10 µl
anti-IgG2-PE 10 µl	anti-CD25-PE 10 µl
anti-IgG1-APC 10 µl	anti-FoxP3-APC 10 µl

Sitoplazmik boyama için aşağıdaki basamaklar izlendi.

1-2 ml permeabilization solüsyonu (eBioscience) eklendi +4<sup>0</sup> C de 30 dk inkübe edildi.

2-2 defa 400 g de 7 dk santrifuj edilerek PBS ile yıkandı.

3-2ml permeabilizasyon solüsyonu eklendi.

4-2 defa 400 g de 7 dk santrifuj edildi supernatan uzaklaştırıldı.

5-10 µl anti-Fox-p3 (eBioscience) APC monoklonal antikor eklendi.

6- +4 C de 30 dk +4<sup>0</sup> C de 30 dk inkübe edildi.

7-2 ml permeabilizasyon solüsyonu eklendi santrifuj edilip supernatan uzaklaştırıldı, bu işlem iki defa tekrar edildi.

8- 0,2 ml soğuk PBS ile sulandırılıp flow sitometri cihazında analiz edildi.

### 3.7. Flow Sitometrik Analiz

Analizler Akdeniz Üniversitesi Merkez Laboratuvarında bulunan flow sitometri cihazı Becton Dickinson (FACS calibur) kullanılarak gerçekleştirildi. Parçalanmış hücre artıkları ve elektronik kirlilik ön saçınım( forward scatter) üzerinden ayarlama yapılarak uzaklaştırıldı.Öncelikle hücreler büyüklük ve granüleritelerine göre hücrelerin dağılımlarını gösteren ön (forward) ve yan 90<sup>0</sup> lik yan (side) saçınım histogramı ile lenfositler kapılanarak bu bölge üzerinden analizler gerçekleştirildi. İlgili monoklonal antikorun ekspresyonunu saptamak için analiz bölgesindeki partiküllerden, negatif izotipik kontrolün floresanından daha yoğun floresan gösteren bölgeler belirlendi. Analiz yaparken hedef hücrelerin tüm popülasyondaki yüzdesi ve ortalama floresan yoğunluğu ayrı ayrı değerlendirildi. Analizler CellQuest yazılımı ile yapıldı.

### 3.8. İnkübasyon Sonrası Hücrelerde Canlılık ve Apoptoz Tayini

Apoptozisin erken döneminde hücre membranı bütünlüğünü korumaktadır, ancak membrandaki fosfolipid asimetrisi kaybolmakta, normal hücrede plazma membranının iç kısmında bulunan fosfatidil serin hücre yüzeyine çıkmaktadır. Kalsiyum ve fosfolipid bağlayan bir protein olan Annexin V seçici olarak hücre yüzeyindeki fosfatidil serine bağlanmaktadır.

Propidium iodide (PI) DNA yada çift sarmal RNA ya bağlandığında kırmızı floresan veren bir boyadır. Plazma membran bütünlüğünü koruyan hücrelerin içine geçemediği için floresan özelliğini canlı yada erken apoptotik hücrelerde gösteremez.(24)

Hücrelerin canlılık ve apoptoz oranlarına Biovision Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (apoptoz tarama kiti) kullanılarak bakıldı. Kitte tarif edildiği gibi aşağıdaki basamaklar uygulandı (26).

- 1-Hücreler inkübasyon sonrası 2 defa 400 g de 7 dk santrifuj edilerek PBS ile yıkandı
- 2-Flow sitometri tüplerine alınan hücrelerin üzerine 0,5 ml tampon, 5µl Annexin -V 5µl PI eklendi
- 3-15 dk karanlıkta 25<sup>0</sup> C de inkübe edildi
- 4-Nazik bir şekilde vortekslendi ve flow sitometrik analiz gerçekleştirildi.

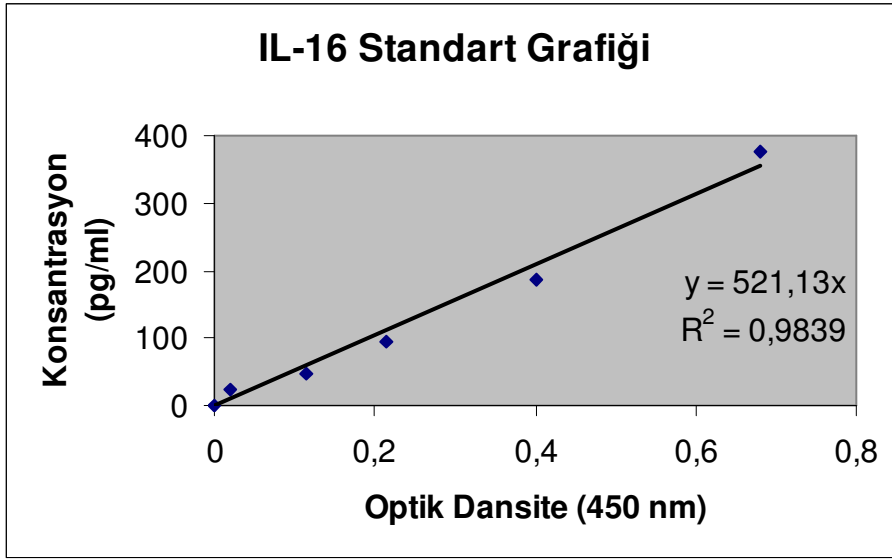
### 3.9. Serum IL-16 Düzeylerinin Tayini

-80<sup>0</sup> C de saklanan serumlar oda ısısında çözüldükten sonra IL-16 ELISA Kiti (Biosource Human IL-16 ELISA) kullanılarak aşağıdaki basamaklar takip edildi.

- 1- 100 µL standard, serum kontroller kuyucuklara eklendi.
- 2- 50 µL antijen-spesifik Biotin Konjugatı üzerine ilave edildi.
- 3- Kuyucuklar 25°C’de 3 saat inkübe edildi.
- 4- İnkübasyon sonunda kuyucuklar boşaltılıp 4 defa yıkama tamponuyla yıkandı
- 5- 100 µL Streptavidin-HRP konjugatı her kuyucuğa eklendi.
- 6- 25°C’de 30 dakika inkübe edildi.
- 7- Kuyucuklardaki sıvı boşaltılıp 4 defa yıkama tamponuyla yıkandı.
- 8- 100 µL stabilize kromojen her kuyucuğa eklendi.
- 9- Kuyucuklardaki sıvı boşaltılıp 4 defa yıkama tamponuyla yıkandı.
- 10- 25°C’de 30 dakika karanlıkta inkübe edildi.
- 11- 100 µL stop çözeltisi eklendi.
- 12- Abzorbans 450 nm de okundu.

Tüm bu basamaklardan sonra standard grafiği oluşturuldu ve sonuçlar değerlendirildi (Şekil 3.1).

Mononükleer hücrelerin hazırlanması, hücre kültürü, hücrelerin monoklonal antikolarla işaretlenmesi ve serum IL-16 düzeylerinin ELISA ile belirlenmesi işlemlerinin tümü Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi bünyesinde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. IL-16 ELISA standart grafiği

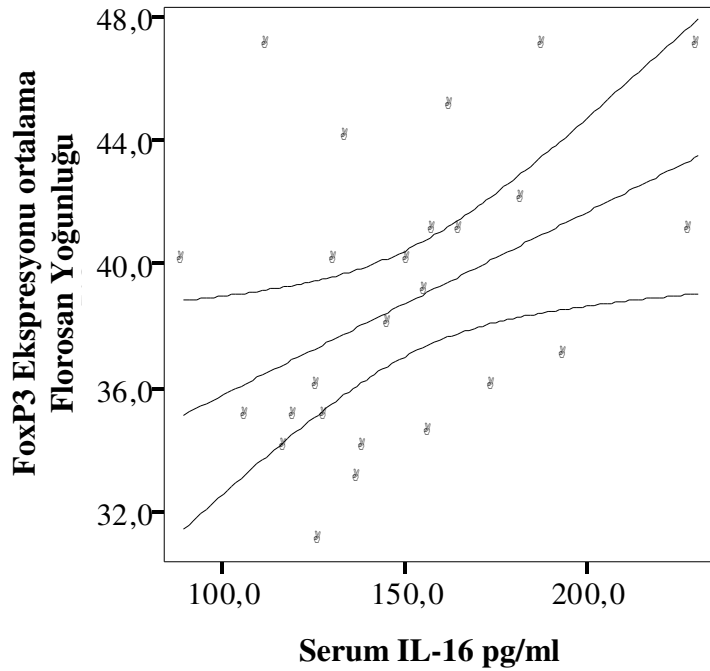
### 3.10. İstatistik

İstatistik analizler SPSS hazır istatistik paket programı (SPSS 15.0 for Windows Evaluation Version) kullanılarak gerçekleştirildi. 4 grup karşılaştırılmalarında Friedman ve Tekrarlı ölçümler testi, ikili grup karşılaştırmalarında Bonferonni düzeltmeli Wilcoxon eşli sıra testi yapıldı. İki ortalama fark testi için eşli örneklem t-testi yapıldı. 0,05'den küçük 'p' değeri anlamlı kabul edildi. Serum IL-16 ile FoxP3 Ekspresyonu MFI arasındaki ilişkiye Spearman korelasyon testi ile bakıldı. Metin içerisinde, tablo ve şekillerdeki değerler ortalama, SD, min-max (minimum-maximum) olarak verildi.

## BULGULAR

### 4.1. Serum IL-16 Düzeyleri ile İlk Andaki (T0) CD4+ CD25+ FoxP3+ Hücre Populasyonunun FoxP3 Ortalama Floresan Yoğunluğunun (MFI) karşılaştırılması

Serum IL-16 düzeyleri ortalama 151,9 pg/ml (89,4-230,6) olarak bulundu ve ilk andaki (T0) ölçtüğümüz CD4+ CD25+ FoxP3+ hücre populasyonunun FoxP3 ortalama floresan yoğunluğu arasında (MFI) istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı ( $p < 0,05$ ). Bu sonuç bize yüksek serum IL-16 seviyesine sahip bireylerde CD4+ CD25+ FoxP3+ hücre populasyonunun, FoxP3 ekspresyonunun ortalama Floresan yoğunluğunun yüksek olduğunu göstermektedir.



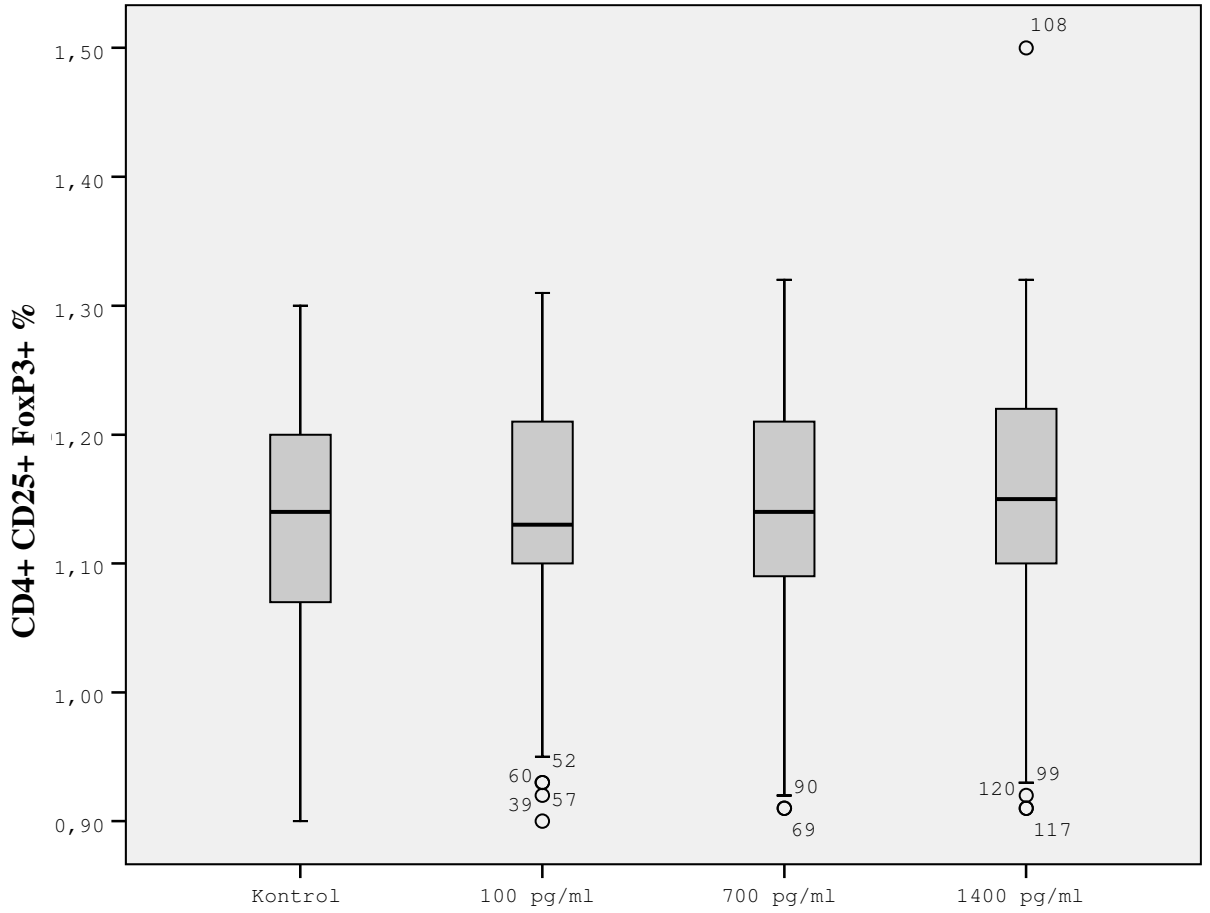
Şekil 4.1. İlk andaki CD4+CD25+FoxP3+ hücrelerin FoxP3 MFI ile serum IL-16 seviyelerinin karşılaştırılması ( $p < 0,05$ ).

### 4.2. CD4+ CD25+ FoxP3+ Hücre Oranları

Otuz farklı sağlıklı bireyden hazırlanan hücreler, kontrol (0 pg/ml), 100 pg/ml, 700 pg/ml ve 1400 pg/ml olmak üzere 4 farklı konsantrasyonda IL-16 içeren tüplerde 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, CD4+ CD25+ FoxP3+ hücre populasyonunun oranına flow sitometrik olarak bakıldı. Gruplar birbirleri ile karşılaştırıldığında kontrol ile 100 pg/ml, kontrol ile 700 pg/ml ve kontrol ile 1400 pg/ml arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ( $p > 0,05$ ). (Tablo 4.1. ve Şekil 4.2.).

**Tablo 4.1.** CD4+ CD25+ FoxP3+ hücrelerin ilk andaki (T0) ve 4 farklı konsantrasyonda IL-16 içeren ortamdaki oranları

	Min % (n =30)	Max % (n =30)	Ortalama % (n =30)	SD
T0	0,9	1,3	1,1	0,135
Kontrol	0,9	1,3	1,1	0,122
100 pg/ml	0,9	1,3	1,2	0,121
700 pg/ml	0,9	1,3	1,1	0,116
1400 pg/ml	0,9	1,5	1,1	0,130



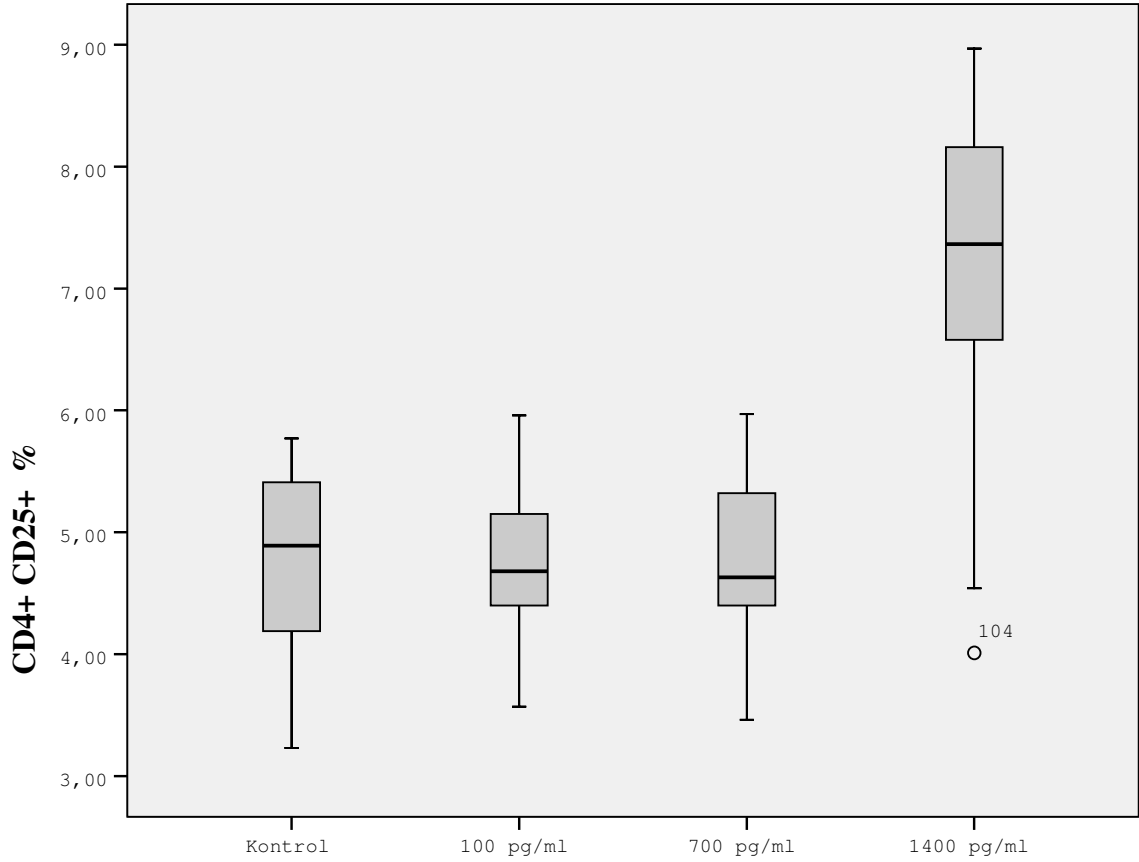
**Şekil 4.2.** CD4+ CD25+ FoxP3+ hücrelerin 4 farklı konsantrasyondaki IL-16 'lı ortamdaki oranları. (p> 0,05)

### 4.3. CD4+ CD25+ Hücre Oranları

CD4+ CD25+ hücre popülasyonunun oranına flow sitometrik olarak bakıldı (Şekil 4.4.) Gruplar birbirleri ile karşılaştırıldı. Kontrol, 100 pg/ml, 700 pg/ml grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi. 1400 pg/ml IL-16 içeren grup istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde diğer 3 gruptan farklıdır. ( $p < 0,05$ ). 1400 pg/ml IL-16 bulunan tüpteki CD4+ CD25+ hücrelerinin oranında artış saptanmıştır. (Tablo 4.2. ve Şekil 4.3)

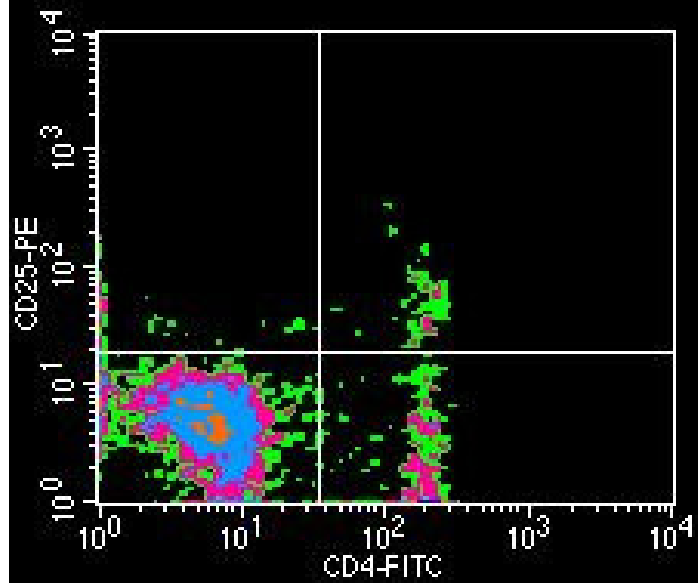
**Tablo 4.2.** CD4+ CD25+ hücrelerin ilk andaki (T0) ve 4 farklı konsantrasyonda IL-16 içeren ortamdaki oranları

	Min % (n =30)	Max % (n =30)	Ortalama % (n =30)	SD
TO	3,1	5,9	4,7	0,662
Kontrol	3,2	5,7	4,7	0,654
100 pg/ml	3,5	5,9	4,7	0,618
700 pg/ml	3,4	5,9	4,8	0,679
1400 pg/ml	4,0	8,9	7,2	1,118



**Şekil 4.3.** CD4+ CD25+ hücrelerin 4 farklı konsantrasyondaki IL-16 'lı ortamdaki oranları ( $p < 0,05$ ).





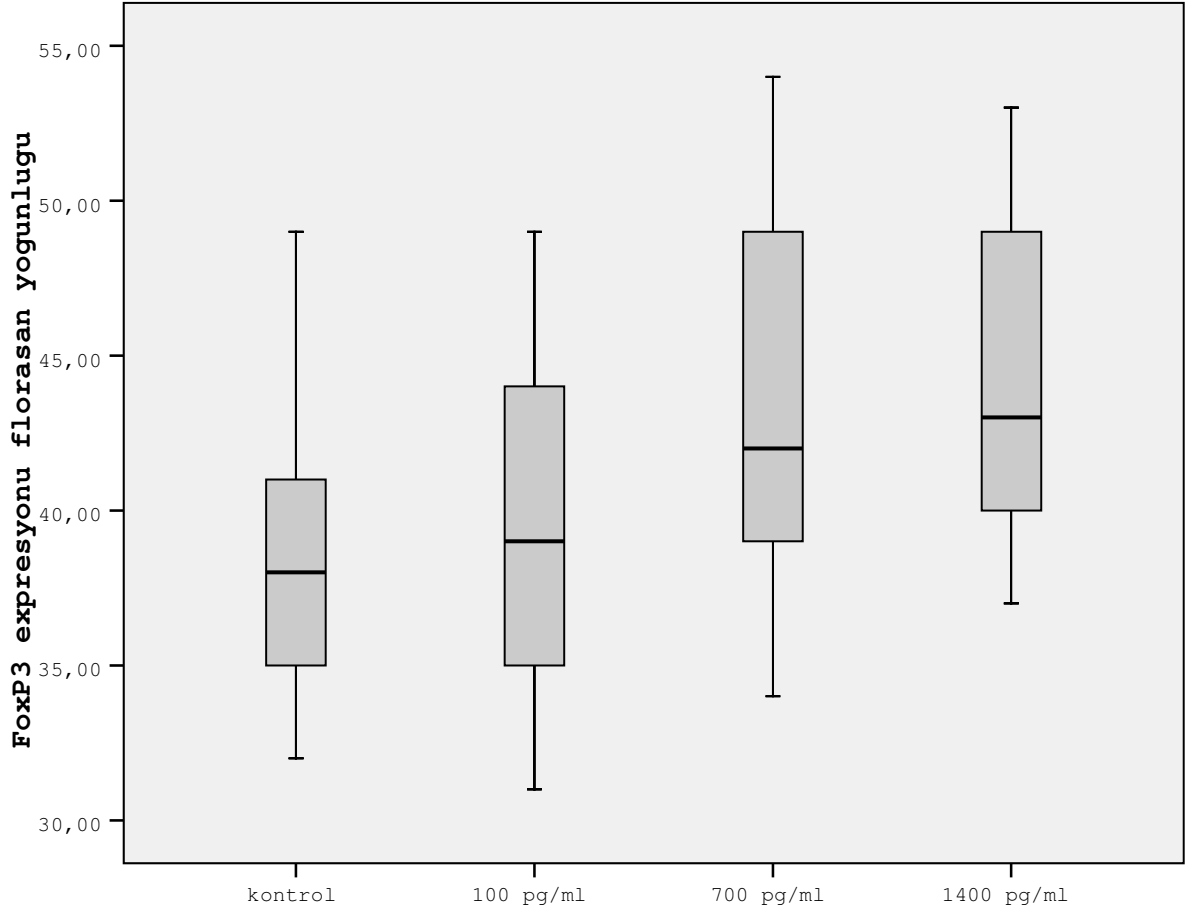
Şekil 4.4. CD4+ CD25+ hücre popülasyonunun Flow sitometri histogramı

#### 4.4. CD4+ CD25+ FoxP3+ Hücrelerinde FoxP3 Ekspresyonu Ortalama Florosan Yoğunluğu (MFI)

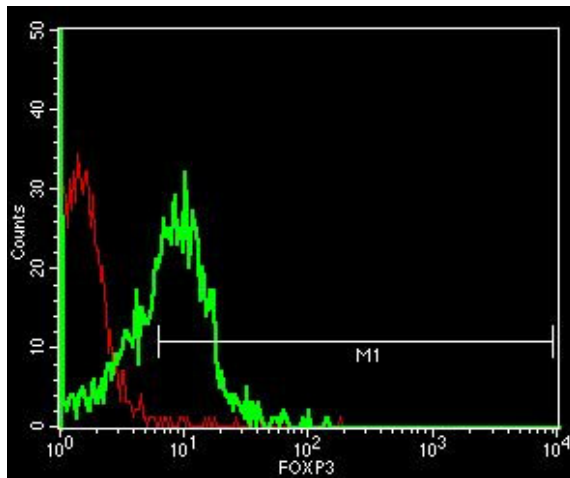
CD4+ CD25+ FoxP3+ hücrelerin FoxP3 ekspresyonu ortalama Florosan yoğunluğuna (MFI) bakıldı (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7.) Kontrol ve 100 pg/ml IL-16 içeren gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ( $p > 0,05$ ). 700 ve 1400 pg/ml IL-16 içeren gruplar da FoxP3 ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır ( $p < 0,05$ ). (Tablo 4.3. ve Şekil 4.5)

**Tablo 4.3.** CD4+ CD25+ FoxP3+ hücrelerin ilk andaki (T0) ve 4 farklı konsantrasyonda IL-16 içeren ortamdaki FoxP3 ekspresyonu (MFI) ( $p < 0,05$ ).

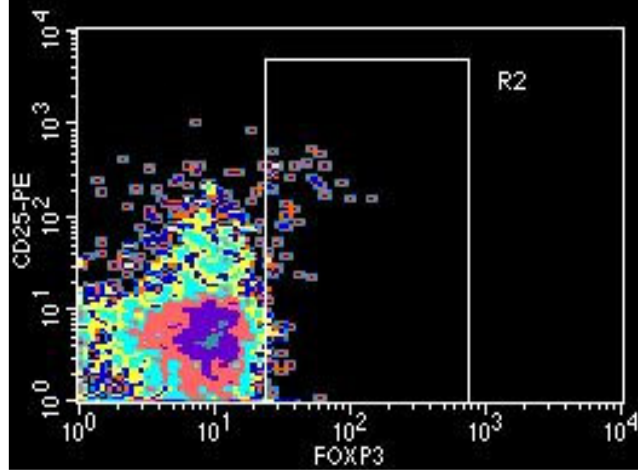
	Min MFI (n =30)	Max MFI (n =30)	Ortalama MFI (n =30)	SD
TO	31	50	38,8	4,913
Kontrol	32	49	38,6	4,874
100 pg/ml	31	49	39,3	5,371
700 pg/ml	34	54	43,4	5,089
1400 pg/ml	37	53	44,5	5,035



**Şekil 4. 5.** CD4+ CD25+ FoxP3+ hücrelerin 4 farklı konsantrasyonda IL-16 içeren ortamdaki FoxP3 ekspresyonu (MFI) ( $p < 0,05$ ).



**Şekil 4. 6.** FoxP3+ hücreler ile izotipik kontrol üst üste getirilmiş flow sitometri histogramı (CD4+ CD25+ gate)



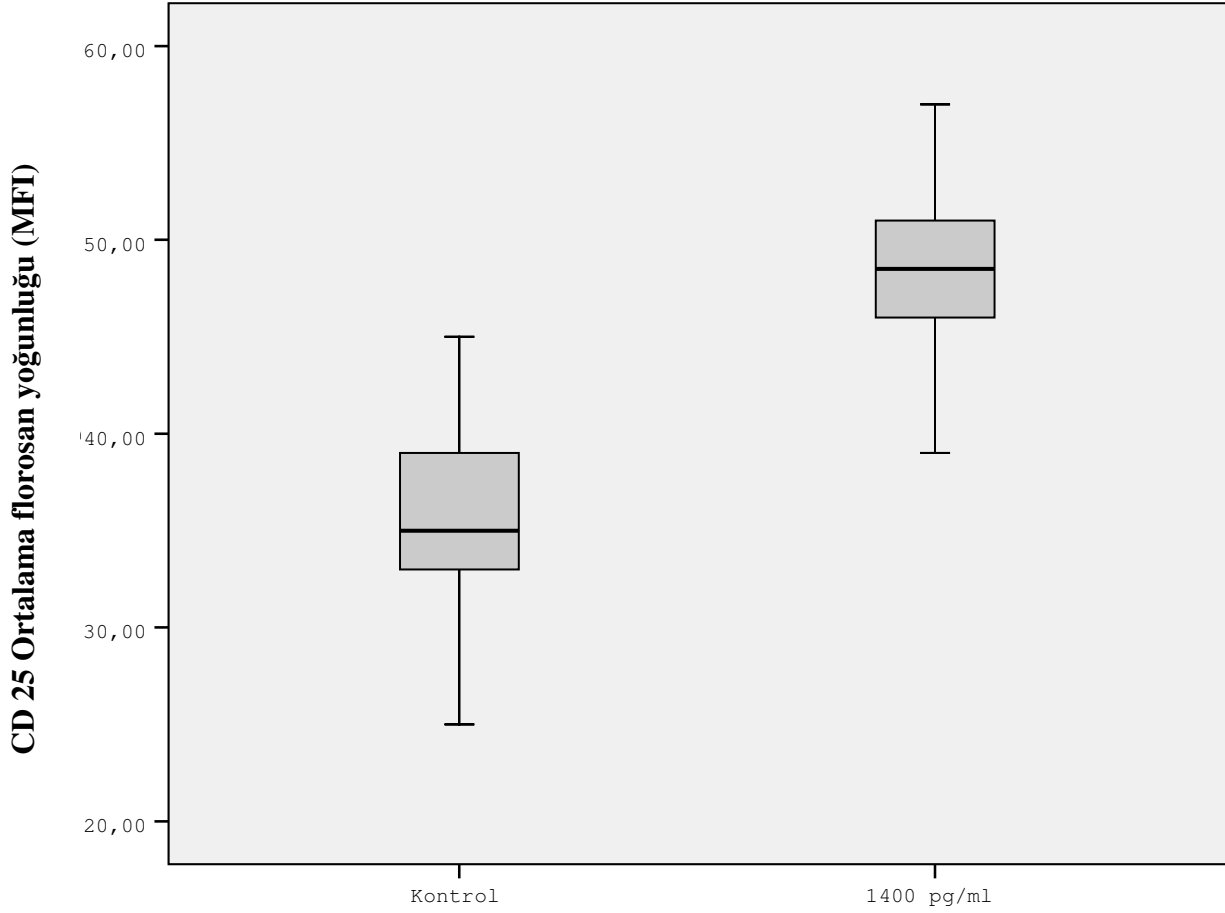
Şekil 4.7. FoxP3+ hücrelerin noktasal flow sitometri histogramı (CD4+ gate)

#### 4. 5. CD4+ CD25+ Hücrelerinde CD25 Ekspresyonu Ortalama Floresan Yoğunluğu (MFI)

CD4+ CD25+ hücrelerde CD25 ekspresyonu ortalama floresan yoğunluğu (MFI) flow sitometrik olarak değerlendirildi. Kontrol, 100 pg/ml ve 700 pg/ml IL-16 içeren grupta istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ( $p > 0,05$ ). 1400 pg/ml IL-16 içeren grup, diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde artış gözlemlendi ( $p < 0,05$ ). (Tablo 4.4. ve Şekil 4.8.)

Tablo 4.4. CD25 ekspresyonu ortalama floresan yoğunluğu

	Min MFI (n =30)	Max MFI (n =30)	Ortalama MFI (n =30)	SD
Kontrol	25	45	35,6	4,0
1400 pg/ml	39	57	48,1	3,6



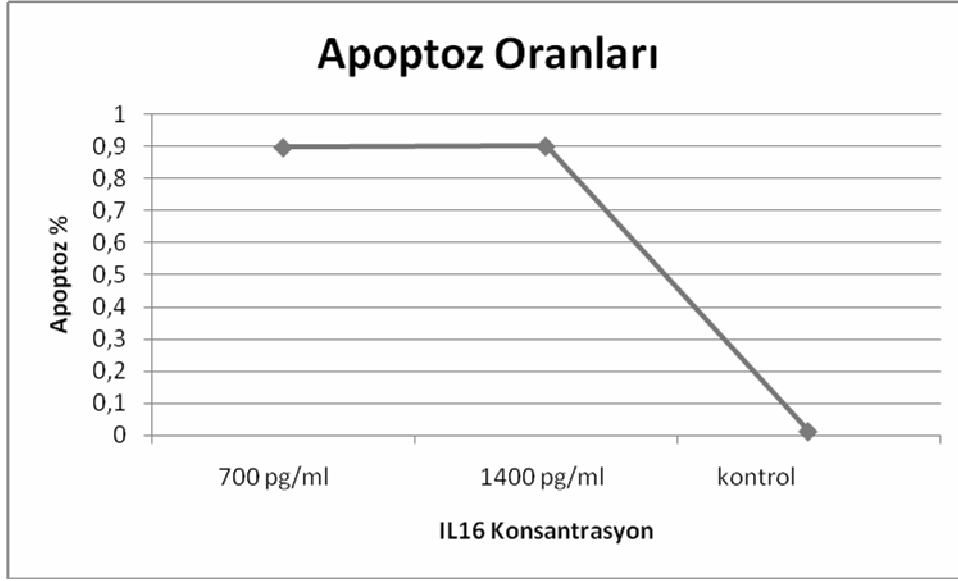
**Şekil 4. 8.** CD4+ CD25+ hücre populasyonlarında CD25 ekspresyonunun ortalama kanal yoğunluğunun kontrol ve 1400 pg/ml yoğunluğunda IL-16 bulunan ortamlardaki ekspresyonunun karşılaştırması. ( $p < 0,05$ )

#### 4. 6. Apoptoz Oranları

Tüm lenfosit populasyonu kapılarak (seçilerek) kontrol, 100 pg/ml, 700 pg/ml ve 1400 pg/ml IL-16 içeren gruplar apoptoz deneyi yapıldı. Kontrol ve 100 pg/ml IL-16 bulunan gruplar arasında apoptoz gözlenmedi. 700 pg/ml ve 1400 pg/ml gruplarında kontrol ve 100 pg/ml grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış bulunmuştur.(Tablo 4.5. ve Şekil 4. 9.)

**Tablo 4.5.** Apoptoz oranları

	Min % (n =30)	Max % (n =30)	Ortalama % (n =30)	SD
Kontrol	0,01	0,01	0,01	0,000
100 pg/ml	0,01	0,01	0,01	0,000
700 pg/ml	0,8	0,9	0,8	0,027
1400 pg/ml	0,8	0,9	0,9	0,020



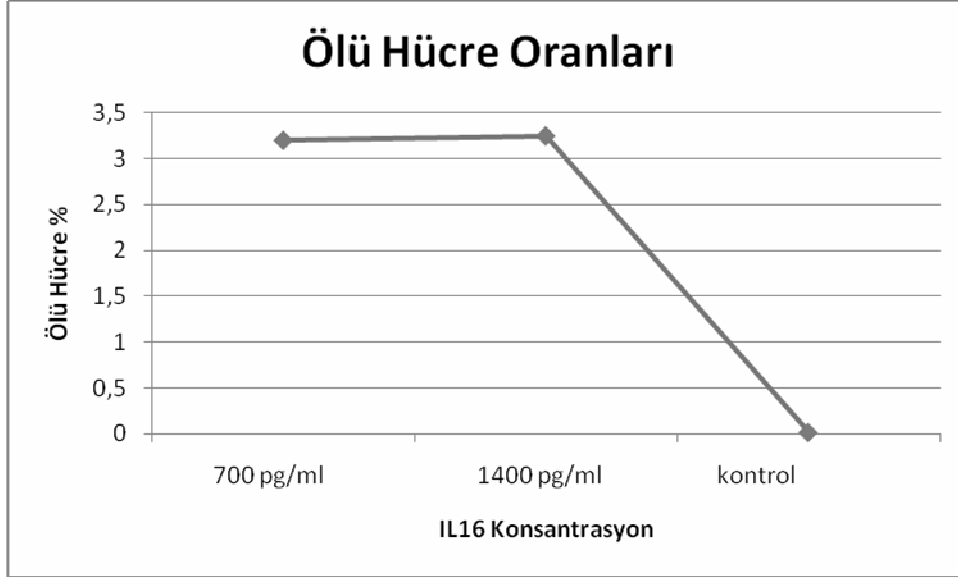
Şekil 4. 9. Lenfosit popülasyonunda, 3 farklı yoğunluktaki IL-16'lı ortamdaki apoptoz sonuçları. ( $p < 0,05$ )

#### 4. 7. Ölü Hücre Oranları

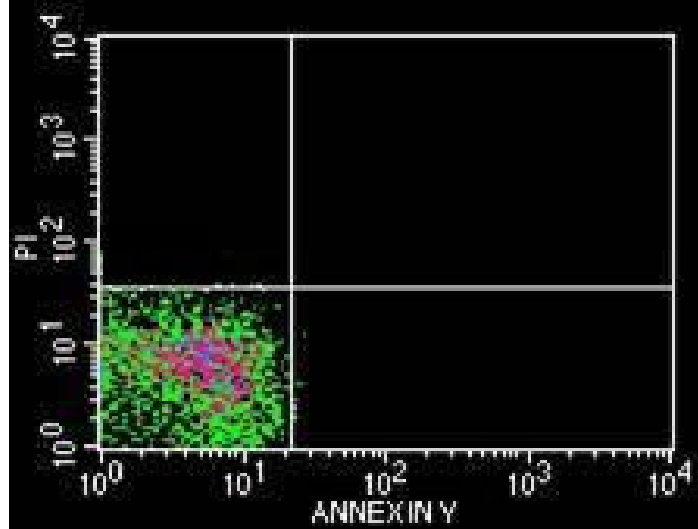
Tüm lenfosit popülasyonu kapılanarak (seçilerek) kontrol, 100 pg/ml, 700 pg/ml ve 1400 pg/ml IL-16 içeren grupların ölü hücre oranlarına bakıldı. Kontrol ve 100 pg/ml IL-16 bulunan gruplar arasında ölü hücre gözlenmedi. 700 pg/ml ve 1400 pg/ml gruplarında kontrol ve 100 pg/ml grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış ölü hücre oran bulunmuştur. (Tablo 4.6. ve Şekil 4. 10. Şekil 4. 11. Şekil 4. 12)

Tablo 4.6. Ölü hücre oranları

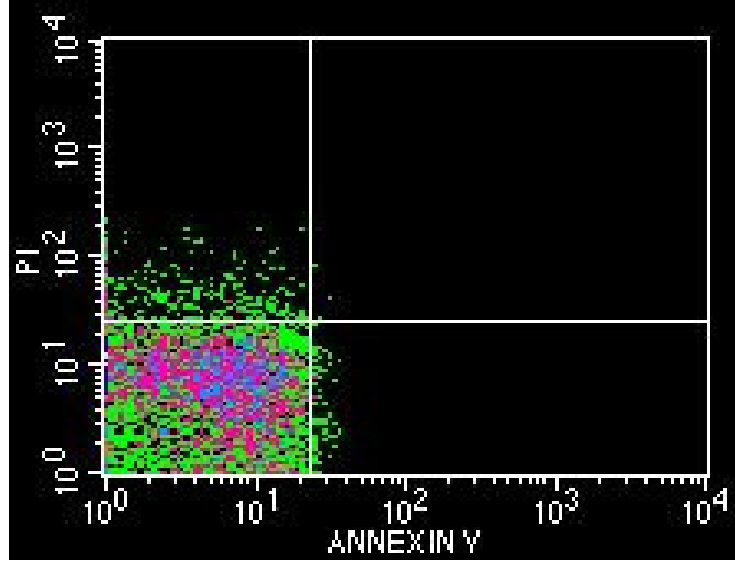
	Min % (n =30)	Max % (n =30)	Ortalama % (n =30)	SD
Kontrol	0,01	0,01	0,01	0,00
100 pg/ml	0,01	0,01	0,01	0,00
700 pg/ml	2,5	3,6	3,1	0,2
1400 pg/ml	2,5	3,7	3,2	0,2



**Şekil 4. 10.** Lenfosit populasyonunda, 3 farklı yoğunluktaki IL-16'lı ortamdaki ölü hücre sonuçları. ( $p < 0,05$ )



**Şekil 4. 11.** Kontrol tüpündeki hücrelerin Apoptoz ve Ölü hücre oranlarının Flow sitometrik histogramı



**Şekil 4. 12.** 1400 pg/ml yoğunluğunda IL-16 bulunan tüpün Apoptoz ve Ölü hücrelerin Flow sitometrik histogramı

## TARTIŞMA

İnterlökin-16 (IL-16) CD4'ün doğal ligandı olan bir sitokindir. Hem hayvan hem de insan havayolu epitelinde ve bronkoalveoler lavaj örneklerinde allerjik inflamasyon bölgelerinde tanımlanmıştır. CD4+ lenfositler, monositler, eozinofiller ve dendritik hücreler için bilinen bir kemoatraktandır ve CD4+ hücrelerin Th1 alt grubu için seçici bir kemoatraktan aktivite sergiler. Ayrıca CD4+ hücreler üzerindeki CD25 (IL-2R) ekspresyonunu da artırır. In vivo çalışmalar, IL-16 uygulamasının inflamasyon ve havayolu hiperaktivitesinde azalma ile sonuçlandığını önermektedir. İnflamasyon üzerindeki bu düzenleyici etkinin mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (29).

IL-16'nın allerjik rinit gibi immün / inflamatuvar hastalıkların patogeneğinde CD4+ T hücrelerine etkisi üzerinden önemli bir rol oynadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur. Bazı araştırmacılar IL-16'nın aynı zamanda nazal rinit, astım, romatoid artrit, sistemik lupus eritromatöz, kolit, atopik dermatit, multipl skleroz gibi hastalıkların patogeneğine de eşlik edebileceğini rapor etmişlerdir (4, 5, 30-33)

Regülatör T hücreleri (Treg'ler) immün cevapta rol oynayan diğer hücrelerin fonksiyonunu inhibe ederek immün cevabı kontrol ederler. Başlıca iki grupta incelenirler. Bir grup doğal (natural) CD4+ CD25+ düzenleyici T (n Treg) hücreleri olarak adlandırılmıştır. Bir diğer grup ise adaptif Treg olarak adlandırılan ve periferde belirli şartlar altında oluşan hücre tipidir (10).

FoxP3, Treg'lerin spesifik belirteçidir. Hem insan hem de FoxP3 fonksiyonundan yoksun fareler üzerinde yapılan çalışmalar, bu transkripsiyon faktörünün T hücre fonksiyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir (34)

Bu çalışmada CD4+ T hücreleri üzerine kemotaksis etkisi gösteren IL-16'nın, aynı zamanda CD4+ CD25+ T reg hücrelerinin aktivasyon belirteci olan FoxP3 ekspresyonu üzerine etkisine bakıldı. Mononükleer hücreler 4 farklı konsantrasyonda (0, 100, 700, 1400 pg/ml) IL-16 içeren hücre kültürü ortamında 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda CD4+ CD25+ ve CD4+ CD25+ FoxP3+ hücrelerin oranlarına ve hücre başına düşen FoxP3 miktarının dolaylı göstergesi olan ortalama floresan yoğunluğa (mean fluorescence intensity, MFI) bakıldı. İnkübasyon sonunda ortamdaki hücrelerin apoptoz ve ölüm oranları da değerlendirildi. Ayrıca ilk anda ölçülen CD4+ CD25+FoxP3+ hücrelerindeki FoxP3 ekspresyonu MFI değerleri ile serum IL-16 seviyeleri arasında ilişki olup olmadığı da araştırıldı.

Otuz sağlıklı birey ile yaptığımız çalışmada serum IL-16 seviyesi ortalama 151,9 pg/ml (SD:33,4 Min:89,4 Max:230) olarak bulundu ve ilk andaki CD4+ CD25+ FoxP3+ hücrelerindeki FoxP3 MFI ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı (p< 0,05). Serum IL-16 seviyeleri yüksek olan bireylerde FoxP3 MFI



yüksek bulundu. Bildiğimiz kadarıyla, bu sonuç IL-16'nın T reg'lerdeki aktivasyon belirteci olan FoxP3'ün üzerine pozitif yönde etki ettiğini gösteren ilk in vivo rapordur. Otuz sağlıklı birey üzerinde yapılan bu çalışmanın, serum IL-16'nın yüksek düzeylerde gözlemlendiği atopi, allerji ve otoimmünite (30-33) gibi immün sistemin eksik yada hatalı çalıştığı hastalık gruplarında da incelenmesi IL-16 hastalık ilişkisine ve T reg IL-16 arasındaki ilişkisinin anlaşılmasına yardımcı olabilir.

Çalışmada, mononükleer hücreler 4 farklı IL-16 konsantrasyonunda kültüre edilip CD4+ CD25+ hücrelerin oranlarındaki değişikliğe bakıldığında 0, 100 ve 700 pg/ml IL-16 içeren ortamlarda herhangi bir değişiklik gözlenmedi. 1400 pg/ml içeren ortamda CD4+ CD25+ hücrelerin oranında artış gözlemlendi ( $p < 0,05$ ). Kontrol tüpünde CD4+ CD25+ hücre oranı ortalama % 4,7 (SD:0,6) iken 1400 pg/ml IL-16'lı ortamda ortalama % 7,2 olarak tesbit edilmiştir. Bu sonuca göre 1400 pg/ml IL-16 seviyesi CD4+ CD25+ hücrelerin sayısını arttırmıştır.

CD4+ CD25+ FoxP3+ hücreler üzerinde yapılan gözlemlerde kontrol grubuna göre oransal olarak bir fark saptanmadı. Bu hücre grubunda FoxP3 ekspresyonunun MFI değerleri incelendiğinde 700 ve 1400 pg/ml IL-16 içeren ortamda artmış olduğu bulundu ( $p < 0,05$ ). Bu sonuç bize IL-16'nın in vitro olarak T reg hücrelerin immün sistemi düzenlemesinde çok önemli bir rolü olan FoxP3'ün ekspresyonunu arttırdığını göstermektedir. Çok yakın bir zamanda Cruishank ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, farklı dozlardaki IL-16'nın CD4+ CD25+ FoxP3+ hücre popülasyonu üzerine proliferatif etki gösterdiği rapor edilmiştir (29). Bu çalışmada CD4+ CD25+ FoxP3+ hücrelerinin 48 saat sonunda ilk andakinin 4 katı oranında arttığı gösterilmiştir. İnkübasyon süresini 24 saat olarak belirlediğimiz çalışmamızda CD4+ CD25+ hücre popülasyonu artarken, CD4+ CD25+ FoxP3+ hücrelerinde oransal olarak bir fark gözlenmedi. IL-16 uyarımı sonucu ortamdaki CD4+ CD25+ FoxP3- hücreler CD4+ CD25+ FoxP3+ hücrelerine dönüşmedi ve CD4+ CD25+ FoxP3+ hücrelerin sayısında bir artış gözlenmedi. İki çalışma arasında gözlenen bu fark inkübasyon süreleri arasındaki farktan kaynaklanıyor olabilir CD4+ CD25+ hücreleri artarken, CD4+ CD25+ FoxP3+ hücrelerinin oransal olarak artmaması bu hücrelerin daha uzun süre IL-16 ile uyarımına gerek olduğunu işaret edebilir.

Çalışmamızda ayrıca IL-16'nın ortamdaki hücreler üzerine olan etkileri, hücrelerin apoptoza gitmesi ve ölü hücre oranı açısından da incelenmiştir. Flow sitometrik analizlerde tüm lenfosit popülasyonu kapılarak yapılan apoptoz deneyinde, kontrol grubu ile 700 pg/ml ve 1400 pg/ml konsantrasyonlarında IL-16 ile muamele edilen hücreler karşılaştırıldı. Apoptoz oranında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ( $p < 0,05$ ). Yine bu 3 grup arasında yapılan karşılaştırmada ölü hücre oranında da anlamlı bir artış gözlemlendi ( $p < 0,05$ ). İlginç olarak CD4+ CD25+ FoxP3+ ve CD4+ CD25+ hücre popülasyonlarında herhangi bir azalma gözlenmezken 700 ve 1400 pg/ml IL-16 bulunan tüplerde ortalama %0,9 (SD:0,02) apoptoz, ortalama %3,2'e (SD:0,2) varan ölü hücre oranı tesbit edildi. Bu sonuç bize IL-16'nın T reg hücreler üzerine pozitif bir etki yaparken, diğer lenfositler üzerine öldürücü ve apoptozu indükleyici bir etkisi olabileceğini göstermektedir. Ancak çalışmamızda hangi lenfosit alt gruplarının IL-16 aracılı ölüme ve apoptoza gittiği belirlenmemiştir. Bu hücrelerin tesbit edilmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak IL-16 T reg hücrelerin immün sistemi düzenlemede çok önemli bir rolü olan FoxP3'ün ekspresyonunu artırır ve serum IL-16 ile FoxP3 ekspresyonu arasında pozitif bir korelasyon vardır. Çalışmamızın atopi, allerji ve otoimmünite gibi immün sistemin eksik yada hatalı çalıştığı hastalıkların patofizyolojisine ve IL-16'nın immün cevaptaki henüz aydınlatılmamış mekanizmasının anlaşılmasına katkıda bulunabileceği kanaatindeyiz.

## SONUÇLAR

- 1- IL-16'nın T reg hücrelerinin transkripsiyon faktörü olan FoxP3 ekspresyonunu arttırdığı bulunmuştur.
- 2- Serum IL-16 seviyesi ile Treg hücrelerinin FoxP3 ekspresyonu arasında pozitif bir kolerasyon vardır.
- 3- IL-16, T reg hücreleri üzerine pozitif yönde etki gösterirken ortamdaki diğer lenfositler üzerine düşük bir oranda apoptoz ve öldürücü bir etki göstermektedir.
- 4- IL-16, T reg'lerdeki CD25 ekspresyonunu arttırmaktadır, literatürde bu sonucu desteklemektedir.
- 5- IL-16, CD4+ CD25+ hücrelerin çoğalmasını sağlamaktadır.

Sonuç olarak IL-16, T regülatör hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli rolü olan transkripsiyon faktörü FoxP3'ün ekspresyonunu arttırmaktadır. İmmün sistemin hatalı yada eksik çalıştığı hastalıklarda T reg – IL-16 ilişkisinin araştırılması bu mekanizmanın daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

## KAYNAKLAR

- 1- [Pinsonneault S](#), [El Bassam S](#), [Mazer B](#), [Cruikshank WW](#), [Laberge S](#). :IL-16 inhibits IL-5 production by antigen-stimulated T cells in atopic subjects. J Allergy Clin Immunol. 2001; 107; 477-82
- 2- Gantner F, Sakai K, Tusche MW, Cruikshank WW, Center DM, Bacon KB.: Histamine H4 and H2 receptors control Histamine-Induced Interleukin-16 release from Human CD8+ T cells. J Pharma and Exper Therap. 2002; 303; 300-7.
- 3- De Bie JJ, Jonker EH, Henricks PA, Hoevenaars J, Little FF, Cruikshank WW, Nijkamp FP, Van Oosterhout AJ.: Exogenous IL-16 inhibits antigen-induced airway hyperreactivity, eosinophilia and Th2-type cytokine production in mice. Clin. Exp. Allergy. 2002; 32; 1651-8.
- 4- Bellini A, Yoshimura H, Vittori E, Marini M, Mattoli S.:Bronchial epithelial cells. of patients with asthma release chemoattractant factors for T lymphocytes. J Allergy Clin Immunol. 1993 Sep;92(3):412-24
- 5- Biddison WE, Taub DD, Cruikshank WW, Center DM, Connor EW, Honma K.:Chemokine and matrix metalloproteinase secretion by myelin proteolipid protein-specific CD8+ T cells: potential roles in inflammation. J Immunol. 1997;1;158;3046-53.
- 6- 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.
- 7- G Burmerster, A Pezzutto, J Wirth:2006 Renkli imm noloji atlası Nobel Tıp Basımevi, İstanbul
- 8- Abul K.Abbas, Andrew H. Lichtman İmm n sistemin işlev ve bozuklukları. 2007 İstanbul medikal yayıncılık
- 9- Schwartz,R.H. Natural regulatory T cells and self Tolerance Nat. İmmunology 2005 6:327.
- 10- A.K. Bozkurt 19.Ulusal imm noloji kongresi kongre kitabı 2007 40-42
- 11- Anne O, Paulo Vieira Regulatory T cells and mechanisms of immune system control Nat Med 2004 10:8 801-5
- 12- Hori S, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by transcription factor Foxp3.Science 2003:299;1057-61.

- 13-** Makoto Miyara<sup>1</sup> and Shimon Sakaguchi Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *TRENDS in Molecular Medicine* 2007;13:3 108-115
- 14-** Belkaid Y, Piccirillo C A, Mendez S, Shevach DL. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control *Leishmania* major persistence and immunity. *Nature* 2002;420:502-7
- 15-** Belkaid Y. Regulatory T cells and infections: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol* 2007; 7; 875-88
- 16-** Akdis CA, Blaser K: Bypassing IgE and targeting T cells for specific immunotherapy of allergy. *Trends Immunol* 2001;22:175-178.
- 17-** Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wu<sup>1</sup> thrich B, Blaser K: Role of IL-10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest* 1998, 102:98-106.
- 18-** Akdis M, Verhagen J, Taylor A, Karamloo F, Karagiannidis C, Cramer R, Thunberg S, Deniz G, Valenta R, Fiebig H et al.: Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med* 2004, 199:1567-1575
- 19-** Center, D.M., H. Kornfeld and W.W. Cruikshank. Interleukin 16 and its function as a CD4 ligand. *Immunol. Today* 1996;17:476-480.
- 20-** Lim, K.G., Wan, H.C., Bozza, P.T., Resnick, M.B., Wong, .T., Cruikshank, W.W., Kornfeld, H., Center, D.M. and Weller, P.F. Human eosinophils elaborate the lymphocyte chemoattractants. IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) and RANTES", *J. Immunol.* 1996, 156: 2566–2570
- 21-** Kaser, A., Dunzendorfer, S., Offner, F.A., Ryan, T., Schwabegger, A., Cruikshank, W.W., Wiedermann, C.J. and Tilg, H. A role for IL-16 in the cross-talk between dendritic cells and T cells *J. Immunol.* 1999 162, 3232–3238
- 22-** Sharma, V., Sparks, J.L. and Vail, J.D. (2000) "Human B-cell lines constitutively express and secrete interleukin-16", *Immunology* 99, 266–271.
- 23-** Little, F.F., Cruikshank, W.W. and Center, D.M. (2001) "IL-9 stimulates release of chemotactic factors from human bronchial epithelial cells", *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25, 347–352.
- 24-** G Deniz, T Yilmazer, G Yillar. Flow sitometri ve tıpta kullanımı 2004 Bilmedya Basımevi. İstanbul
- 25-** Kevin C. Wilson, David M. Center and W. W. Cruikshank The Effect of Interleukin-16 and its Precursor on T Lymphocyte Activation and Growth Growth Factors 2004 Vol. 22 (2)97–104

- 26-** Ozturk OH, Bozcuk H, Burgucu D, Ekinçi D, Ozdogan M, Akca S, Yildiz M. Cisplatin cytotoxicity is enhanced with Zoledronic acid in A549 lung cancer cell line: preliminary results of an *in vitro* study, *Cell Biology International* 31 (2007) 1069-1071
- 27-** Keates, A. C., I. Castagliuolo, W. W. Cruikshank, B. Qiu, K. O. Arseneau, W. Brazer, and C. P. Kelly. 2000. Interleukin 16 is up-regulated in Crohn's disease and participates in TNBS colitis in mice. *Gastroenterology* 119: 972–982.
- 28-** M.Karaki, H. Dobashi, R.Kobayashi, M. Tokuda, T Ishida, N.Mori Expression of Interleukin-16 in Allergic Rhinitis *Int Arch Allergy Immunol* 2005;138:67–72
- 29-** C. McFadden, R. Morgan, S. Rahangdale, D. Green, H. Yamasaki, D. Center, W. Cruikshank Preferential Migration of T Regulatory Cells Induced by IL-16 *The Journal of Immunology*, 2007, 179: 6439–6445.
- 30-** Conti P, Kempuraj D, Theoharides TC Interleukin-16 network in inflammation and allergy. *Allergy Asthma Proc* 2002; 23: 103–108
- 31-** Pullerits T, Linden A, Lotvall J Effect of seasonal allergen exposure on mucosal IL-16 and CD4+ cells in patients with allergic rhinitis. *Allergy* 2001; 56: 871–877.
- 32-** Kramer M, Ostertag P, Rasp G Nasal IL-16 and MIP-1 $\alpha$  in late-phase allergic response. *Allergy Asthma Proc* 2001; 22: 127–132.
- 33-** Laberge S, Durham S, Hamid Q Expression of IL-16 in allergen-induced late-phase nasal responses and relation to topical glucocorticoid treatment. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100: 569–574.
- 34-** Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057–1061 (2003)

## ÖZGEÇMİŞ

11.06.1979 tarihinde Sivas'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Sivas'da tamamladı. 2000 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Tıbbi Laboratuvar bölümünden mezun oldu. 2000-2005 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Merkezinde çalıştı. 2004 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden mezun oldu. 2005 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İç Hastalıkları Anabilim Dalı İmmünohematoloji yüksek lisans programına başladı, halen aynı enstitüde araştırma görevlisi olarak çalışmalarına devam etmektedir.