

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

**SİSTEMİK LUPUS ERİTEMATOZUS'LU  
HASTALARDA CTLA-4 GEN  
POLİMORFİZMİNİN PCR-RFLP YÖNTEMİ İLE  
BELİRLENMESİ**

**Mehtap ÜLKER**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Antalya, 2006**

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

**SİSTEMİK LUPUS ERİTEMATOZUS'LU  
HASTALARDA CTLA-4 GEN  
POLİMORFİZMİNİN PCR-RFLP YÖNTEMİ İLE  
BELİRLENMESİ**

**Mehtap ÜLKER**

**Yüksek Lisans Tezi**

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

Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2004.02.0122.013)

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir.”

**Antalya, 2006**

**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. 24 / 02 / 2006

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 : Doç. Dr. Ayşen UĞUZ  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

Üye : Yrd. Doç. Dr. Nuray ERİN  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
İç Hastalıkları Anabilim Dalı

**ONAY:** Bu tez Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun ...../...../2006 tarih ve ...../..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

**Prof. Dr. Nurettin OĞUZ**  
**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Sistemik lupus eritematozus (SLE), humoral ve hücreyel birçok immünolojik anormallikle karakterize, kronik, yangısal, multisistemik otoimmün bir hastalıktır. Otoreaktif B hücrelerinin uygun olmayan T hücrelerine bağılı olarak çoğalmasında ve patojenik otoantikörlerin oluşumunda rol aldığı düşünölmektedir.

T hücre aktivasyonu için iki sinyal gerekmektedir. Birinci sinyal T hücre reseptörlerinden (TCR), ikinci sinyal ise ikincil sinyal molekülleri olarak bilinen ikincil uyarıcı moleküllerden sağlanır. CD28 ikincil uyarıcı bir moleküldür. Antijen sunan hücre yüzeyinde CD80/CD86 ligantları ile bağlanır ve T hücrelerini aktive edici sinyal üretir. Bu nedenle pozitif düzenleyici olarak da adlandırılır. Sitotoksik T lenfosit antijen 4 (CTLA-4) molekülü de ikincil uyarıcı bir moleküldür ve CD28 molekülü ile homologtur. CTLA-4 molekülü CD28 gibi antijen sunan hücre (APC) yüzeyinde CD80 / CD86'nın ligantları ile bağlanır. CTLA-4 molekülü CD28'in aksine inhibe edici sinyaller gönderen bir moleküldür. Bu özelliğı ile periferik toleransta önemli rol oynar. CD28 ve CTLA-4 molekülleri, antijen spesifik T hücre aktivasyonunun kontrolü ile self ve yabancı antijene karşı immun sistemi düzenlerler.

İnsanda SLE için şüpheli bölge 2q33 bölgesidir ve CTLA-4 molekülü bu bölgede yer almaktadır. CTLA-4 molekülü T hücre aktivasyonunda inhibitör etki gösterdiği için, SLE oluşumuna neden olabilecek bir gen olduğu düşünölmektedir.

CTLA-4 molekülü T hücre aktivasyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar ve yangı şartlarına uygun olarak T hücre cevabını sınırlandırabilir. CTLA-4'deki genetik çeşitliliğın birçok otoimmün hastalıkların gelişmesinde rol oynayabileceğini gösteren birçok çalışmalar vardır. Bu gende tanımlanan polimorfizmlerden Exon I (+49 A/G) dimorfizminin Japon ırkında hastalığa duyarlılığı arttırdığı bildirilmiştir. Fakat Çin gibi bazı ırklarda bu polimorfizm ile SLE arasında bir ilişki bulunamamıştır. Biz de bu çalışmada CTLA-4 Exon I (+49 A/G) polimorfizminin Türk populasyonunda SLE gelişimi ve hastalık aktivasyonu ile bir ilişkisi olup olmadığını göstermeyi amaçladık.

**Anahtar kelimeler:** SLE, CTLA-4, PCR-RFLP, exon I +49 A/G, polimorfizm, ikincil sinyal molekülleri

## ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic, inflammatory and multisystemic autoimmune disease characterized by many cellular and humoral immunological abnormalities. Inappropriate, T cell dependent, expansion of autoreactive B cells is considered to play a role in the production of pathogenic autoantibodies.

Two signals are required for T cell activation. The first signal is from T cell receptor (TCR) and the second is from co-stimulatory molecules known as secondary stimulatory molecules. CD28 is a co-stimulatory molecule. It binds to CD80/CD86 on antigen-presenting cells and produce the signal to activate the T cell. Therefore, it is also called positive regulatory molecule. Cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4 (CTLA-4) is also a co-stimulator molecule and homologous to CD28. CTLA-4 interact with CD80 /CD86 on antigen presenting cell (APC) like CD28. On the contrary the CD28, CTLA-4 is a molecule produces which inhibitory signals. Hence it plays an important role in development of peripheral tolerance. CD28 and CTLA-4 molecules regulate immune response against self and non -self antigens by contrary activation of antigen specific T cells.

2q33 region is susceptibility loci for human SLE and CTLA-4 molecule is placed in this region. Because of showing inhibitory effect on T cell activation CTLA-4 molecule is a candidate gene, which may predispose to SLE disease.

CTLA-4 plays an important role in regulating T cell activation and may help to limit T cell response under inflammatory conditions. Genetic variation in CTLA-4 causes many autoimmune diseases. It is reported that Exon I (+49 A/G) dimorphism, one of the polymorphisms in this gene, increases the disease sensitivity in Japanese population. Unfortunately in some population like Chinese no relationship between this polymorphism and SLE have been described. In this study we aimed to detect whether there is any relationship between CTLA-4 Exon I (+49 A/G) polymorphism and SLE disease and its activation in Turkish population.

**Key words:** SLE, CTLA-4, PCR-RFLP, exon I +49 A/G, polymorphism, co-stimulatory molecules

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim ve tez çalışmalarım süresince bilgileri ve hayat görüşü ile yoluma ışık tutan değerli hocam Romatoloji-İmmünoloji Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ender TERZİOĞLU'na,

Tezimin gerçekleşmesi için her türlü imkan ve desteği sağlayan sayın hocam Prof. Dr. Olcay YEĞİN'e,

Tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Salih Şanlıoğlu'na,

Tezimin Klinik çalışmalarında her türlü desteği sağlayan Dr. Veli YAZISIZ'a,

İhtiyacım olduğunda yardımlarını esirgemeyerek her zaman destek olan İmmünoloji Bilim Dalı'nın tüm çalışanlarına,

Tezimin istatistiksel değerlendirmelerinde bana yardımcı olan Araştırma Görevlisi Özgür TOSUN'a,

Yardımları ile her zaman yanımda olan Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değerli çalışanlarına,

Sınırsız desteği için sevgili eşim Bahadır Murat DEMİREL'e ve manevi destekleri için sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii

### GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER

1.1.	Merkezi Tölerans	2
1.2.	Periferik Tölerans	2
1.3.	T Lenfosit Töleransı	2
1.3.1.	Periferik T Lenfosit Töleransı	2
1.3.2.	Merkezi T Lenfosit Töleransı	3
1.4.	B Lenfosit Töleransı	3
1.4.1.	Merkezi B Lenfosit Töleransı	3
1.4.2.	Periferik B Lenfosit Töleransı	3
1.5.	T Hücrelerinin Aktivasyonu	4
1.6.	Doğal Düzenleyici T hücreleri ve Self Tölerans	5
1.7.	İmmün Sistem Kontrolünün Mekanizmaları ve Düzenleyici T hücreleri	6
1.7.1.	Doğal Olarak Oluşan CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T <sub>reg</sub> Hücreleri	8
1.7.2.	T <sub>reg</sub> Hücrelerinin IL-10 Üretimi	9
1.7.3.	T <sub>reg</sub> Hücrelerinin Yaptığı İşin Mekanizması Nedir?	9
1.8.	CTLA-4 (Cytotoxic T lymphocyte-associated 4 = CD 152)	10
1.8.1.	CTLA-4'ün Gen Yapısı	11
1.8.2.	CTLA-4'ün Biyokimyasal Özellikleri	11
1.8.3.	CTLA-4'ün Gen Fonksiyonu	12
1.9.	Sistemik Lupus Eritematozus	12
1.9.1.	Etiyolojisi	12
1.9.1.1.	Çevresel Faktörler	12
1.9.1.2.	Hormonal Faktörler	13
1.9.1.3.	Genetik Faktörler	13
1.9.2.	Patogenezi	13

1.9.3.	SLE'de Yapılan Deneysel Hayvan Modelleri	14
<b>MATERYAL VE METOD</b>		
2.1.	PCR-RFLP	16
2.1.1.	DNA İzolasyonu	16
2.1.2.	PCR İçin Kullanılan Malzemeler	17
2.1.3.	Fenol-Kloroform Ekstraksiyonu	18
2.1.4.	Kesim Reaksiyonu için Kullanılan Malzemeler	18
2.2.	Akış Sitometri için Mononükleer Hücre Ayrımı	19
2.2.1.	Mononükleer Hücrelerin Boyanması	20
<b>BULGULAR</b>		
3.1.	PCR-RFLP Sonuçları	21
3.2.	SLE-DAI Skor Sonuçları	22
3.3.	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T Hücre Sonuçları	24
<b>TARTIŞMA</b>		
<b>SONUÇLAR</b>		
<b>KAYNAKLAR</b>		
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>		
<b>EKLER</b>		
Ek:1	Sistemik Lupus Eritematozus Sınıflandırma Kriterleri	
Ek:2	Sistemik Lupus Eritematozus Aktivite İndeksi(SLE-DAI)	



## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>Amp.</b>	: Amplifikasyon
<b>ANA</b>	: Anti-nükleer antikor (Anti-Nucleer Antibody)
<b>APC</b>	: Antijen sunan hücre (Antijen-Presenting Cell)
<b>°C</b>	: Santigrad derece
<b>cc</b>	: Santiküp ( Canticup)
<b>CD</b>	: Cluster of differantiation
<b>CD4</b>	: Yardımcı T hücre (Helper T cell)
<b>CD8</b>	: Öldürücü T hücre (cytotoxic T cell)
<b>CD25</b>	: İnterlökin 2 reseptör alfa
<b>CD152</b>	: CTLA-4
<b>cDNA</b>	: Tamamlayıcı (complementary) DNA
<b>CpG-DNA</b>	: Metillenmemiş DNA
<b>CTLA-4</b>	: Sitotoksik T lenfosit antijen 4 (Cytotoxic T lymphocyte Antigen associated-4)
<b>CTLA-4 TM</b>	: Moleküler CTLA-4
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	: Distile su
<b>dk.</b>	: Dakika
<b>DNA</b>	: Deoksiribo Nükleik Asit
<b>EBV</b>	: Ebstein-Barr Virüsünün
<b>FasL</b>	: Fas Ligantı
<b>Fc</b>	: İmmünglobulin molekülünün konstant bölgesinin karboksil ucu
<b>FITC</b>	: Floresans izotiyosiyonat (fluorescein isothiocynate)
<b>Foxp3:</b>	Transkripsiyon faktörü (Düzenleyici T hücre molekülü)
<b>GITR</b>	: Glukokortikoid-tümör nekrosis faktör reseptör
<b>HLA</b>	: İnsan lökosit antijeni (Human Leucocyte Antigen)
<b>IFN-γ</b>	: İnterferon gama
<b>Ig</b>	: İmmünglobülin
<b>IL</b>	: İnterlökin
<b>IPEX</b>	: İpex hastalığı (İmmune mediated Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked)
<b>kb</b>	: Kilobaz
<b>KDa</b>	: Kilodalton
<b>M</b>	: Marker
<b>Mgcl<sub>2</sub></b>	: Magnezyum klorür

<b>MHC</b>	: HLA
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>mmol</b>	: Milimol
<b>ml</b>	: MiliLitre
<b>mRNA</b>	: Haberci (messenger) RiboNükleik Asit
<b>MSS</b>	: Merkezi Sinir Sistemi
<b>µg</b>	: Mikrogram
<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>NH<sub>4</sub></b>	: Amonyum asetat
<b>PCR</b>	: Polimeraz Chain Reaksiyonu
<b>PE</b>	: Fiko Eritrin
<b>pmol</b>	: Pikomol
<b>RAG-2</b>	: Recombination-Activating Genes-2
<b>RFLP</b>	: Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>RT-PCR</b>	: Eş zamanlı (Real Time) Polimeraz Zincir Reaksiyonunu
<b>sCTLA-4</b>	: Çözülebilir (soluble) CTLA-4
<b>SLE</b>	: Sistemik Lupus Eritematosus
<b>SLE-DAI</b>	: Sistemik Lupus Eritematosus-Disease Activation Index
<b>sn</b>	: Saniye
<b>TCR</b>	: T hücre reseptörü (T Cell Receptor)
<b>TGF- β</b>	: Transforming Growth Factor Beta
<b>T<sub>H</sub>1</b>	: Yardımcı T hücre tip 1 (T Helper type 1)
<b>T<sub>H</sub>2</b>	: Yardımcı T hücre tip 2 (T Helper type 2)
<b>TLR</b>	: Toll-Like Reseptörler
<b>T<sub>reg</sub></b>	: Reglatuvar(düzenleyici) T hücre
<b>UV</b>	: Ultraviyole

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
1.1.	Lenfosit aktivasyonunun sinyal modeli	4
1.2.	APC ve T hücre etkileşimi	5
2.1.	PCR-RFLP ile elde edilen jel görüntüsü	19

## TABLolar DİZİNİ

Tablo		Sayfa
1.1.	Düzenleyici T hücre ( $T_{reg}$ ) popülasyonu	7
2.1.	PCR reaksiyonu için kullanılan malzemeler ve miktarları	17
2.2.	Akış sitometri antikoları	20
3.1.	CTLA-4 Exon I +49 genotipinin SLE hastalarında ve kontrollerdeki dağılımı	21
3.2.	Homozigot A/A taşıyan ve taşımayan hasta ve kontrol grubu sayıları	22
3.3.	Hasta ve kontrollerde sadece G/G haplotipi taşıyan ve taşımayanların dağılımı	22
3.4.	Hasta ve kontrollerde A ve G genotipine ait allel frekanslarının dağılımı	22
3.5.	Exon I +49'da SLE hastalarının genotip dağılımlarına göre SLE-DAI skorları ve yüzde dağılımları	23
3.6.	SLE-DAI skoruna göre hastaların genotip dağılımları	23
3.7.	SLE-DAI skoruna göre hastaların genotip dağılımları	23
3.8.	SLE-DAI skoruna göre hastaların A ve G genotipine ait allel frekans dağılımları	24
3.9.	SLE hastalarında $\%CD4^+CD25^+$ T hücre değerleri ve SLE-DAI skor sonuçları	24
3.10.	CD3, CD4, CD8 ve $CD4^+CD25^+$ T hücrelerine ait periferik kandaki yüzde değerlerinin ortalamaları ve standart sapmaları.	25
3.11.	SLE-DAI skoru $\geq 5$ ve SLE-DAI $< 5$ olanlarda $CD4^+CD25^+$ T hücre değerlerinin ortalaması	25

## GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

Enfeksiyona neden olan ve vücuda çeşitli yollardan girebilen mikroorganizmalarla savaşabilmemiz için bir bağışıklık sistemimiz vardır. Bağışıklık sistemimiz 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 cevapsız kalmasıdır. Yani kendisinden olanı, olmayandan ayırt edebilmesidir. Genel bir deyişle bağışıklık sistemimiz doğada olan veya yeni yaratılan bütün antijenik özelliğe sahip maddeye, özgül yanıt geliştirebilme özelliğine sahiptir.

Bağışıklık sisteminin antijeni tanıması ve yanıt verebilmesi için kullandığı iki ayrı yol vardır. Bu yollardan biri, doğal (innate = non-spesifik) bağışıklık ile sağlanır. Bu bağışıklık sistemi yabancıyı özgül olarak tanımaz. Bunun için bazı patern tanıyıcı reseptörler kullanır (Toll-like reseptörleri, çöpçü reseptörleri gibi). Bağışıklık sisteminin antijeni özgüllüğüne göre tanıdığı diğer yol ise, sonradan kazanılan (adaptif) bağışıklık sistemidir. Bu sistemde ise, özgül tanıma işlemlerini, adaptif bağışıklık 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 bağışıklık sisteminin diğer etkin hücreleri (nötrofiller, eozinofiller, monosit veya makrofajlar, lenfositler, doğal öldürücü hücreler) ajanın girdiği bölgede toplanır ve fagositoz, apoptozisin tetiklenmesi gibi yollarla saldırgan yok edilir (1).

Yukarıda çok kısaca anlatılan olaylar dizisindeki bağışıklık sisteminin hücreleri, kemik iliğinden köken alırlar. Kemik iliğinde oluşan hücreler, gelişimlerini tamamlamak için periferik 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.

Lenfositlerin, yukarıya çekilen reseptörleri yardımıyla yabancı antijenleri tanıyıp tepki vermesi üç mekanizma ile gerçekleşir.

- Lenfosit yabancı antijeni reseptörleri ile tanıyıp aktive olabilir. Bu durumda bu antijene immünojenik antijen adı verilir. Bağışıklık sistemi antijene karşı derhal yanıt oluşturarak lenfositlerin çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlar.

- Timusta antijen lenfosit tarafından algılanmaz ya da uyarılmazsa negatif seçim meydana gelir. Bu durumda lenfosit apoptozis ile ortadan kaldırılır. Bağışıklık sisteminin fonksiyonel bir cevapsızlık gösterdiği bu olaya anerji, bu tip antijenlere de tolerojenik antijen adı verilir.
- Bazı durumda da antijene spesifik lenfosit hiçbir yolla antijene yanıt vermez. Bu olay da antijeni görmezden gelmesi ile açıklanabilir. Bu nedenle bu antijenlere de non-immünojenik antijen adı verilir.

Bu yolların hangisinin gerçekleşeceği antijene ve antijen-spesifik lenfositlere bağlıdır. Bazen aynı antijen hem aktivasyon hem de tolerans sağlayabilir.

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

### **1.1. Merkezi tolerans**

Lenfositler, primer (birincil) lenfoid organlarda (kemik iliği 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 self antijenle karşılaştıklarında cevapsızlık veya apoptozis meydana gelir. Bir lenfosit, daha olgunlaşmadan self antijenle karşılaşır derhal ortadan kaldırılıp, çoğalıp farklılaşması engellenir. Bu olay negatif seçim veya merkezi tolerans olarak adlandırılır. Seçilime uğramadan periferik çıkan bir hücre grubu vardır ki bunlar düzenleyici T hücre dediğimiz T regülatuar hücrelerdir.

### **1.2. Periferik Tolerans**

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

### **1.3. T Lenfosit Toleransı**

#### **1.3.1. Periferik T Lenfosit Toleransı**

Kemik iliğinde oluşup timusta olgunlaşmış T lenfositler periferik dokulara çıkarlar. Periferik dokularda self antijenin tanınması ile bu antijenlere karşı bir

duyarsızlık oluşur (anergi) ve apoptozis ile T hücrelerinin ortadan kaldırılması gerçekleşir. Ya da T regülatuar dediğimiz düzenleyici T hücreleri, yardımcı T hücrelerini baskılayarak fonksiyon dışı bırakılırlar. Periferik tolerans timusta gerçekleşmez.

Self antijenle olgun T lenfositlerin yeniden aktivasyonu veya self antijenin ikincil sinyal molekülleri yokluğunda tanınması ile apoptozis yolu tetiklenir ve self reaktif lenfositlerin eliminasyonu (delesyonu) gerçekleşir. Bu oluşum, aktivasyonla tetiklenen hücre ölümü adını alır. Aktivasyonla tetiklenen hücre ölümünün gerçekleşmesi için iki mekanizma çalışır. İlki; tekrarlayan aktivasyonlarda CD4<sup>+</sup> T hücrelerinde ölüm reseptörü olarak adlandırılan Fas ve FasL reseptörleri yukarı çekilir. Bu reseptörler gerek aynı lenfositte gerekse farklı iki lenfositte birleştiklerinde, kaspazlar ve hücrel enzimler aktive olarak apoptozisi gerçekleştirirler. Bu esnada IL-2 (T hücre büyüme faktörü) sitokini de apoptoziste görev alır. Aynı sitokin T hücrelerinin aktive olup çoğalmasında da görev almaktadır. Aynı sitokinin iki farklı görevi yapması şaşırtıcıdır ve bu dengeyi nasıl sağladığı bilinmemektedir. Aktivasyonla tetiklenmiş hücre ölümünde ikinci mekanizma, T hücre üzerinde bulunan pro-apoptotik proteinlerdir. İkincil sinyallerin ve doğal immünitinin olmadığı koşullarda pro-apoptotik proteinler ifade edilir (2).

### **1.3.2. Merkezi T Lenfosit Toleransı**

Timusta ve kemik iliğinde oluşan ve olgunlaşma sırasında eğitilen lenfositler, henüz olgunlaşmamışken self antijenle karşılaşarak çok sıkı bir şekilde bağlanıp immün reaksiyon gösterirse, negatif seçim gerçekleşir ve lenfositler çoğalmadan apoptoz ile ortadan kaldırılır. Böylece self antijene kuvvetli reaksiyon gösteren lenfositler ortadan kaldırılmış olur.

### **1.4. B Lenfosit Toleransı**

Self polisakkaritler, lipitler ve nükleik asitler, T hücreleri tarafından tanınmazlar. Bu antijenlere karşı otoantikör oluşumunu B hücreleri engeller. B hücrelerinde de tolerans bir merkezi, bir de periferik olmak üzere iki mekanizma ile sağlanır ve bu mekanizmaların işleyişi de aynen T hücrelerin tolerans mekanizması gibidir.

#### **1.4.1. Merkezi B Lenfosit Toleransı**

Henüz olgunlaşmamış B hücreleri, kemik iliğinde, self antijenle karşılaşarsa aynen T hücrelerinde olduğu gibi çok kuvvetli bağlananlar negatif seçim ile öldürülürler. Ya da bu hücrelerin T hücrelerinden farklı olarak reseptörlerini değiştirebilme özellikleri vardır. Reseptörleri ile self antijene çok kuvvetli bağlananlar, immunoglobulin (Ig) hafif zincirini değiştirerek yeni kombinasyonda bir B hücresi reseptörü oluşturmuş olurlar.

#### **1.4.2. Periferik B Lenfosit Toleransı**

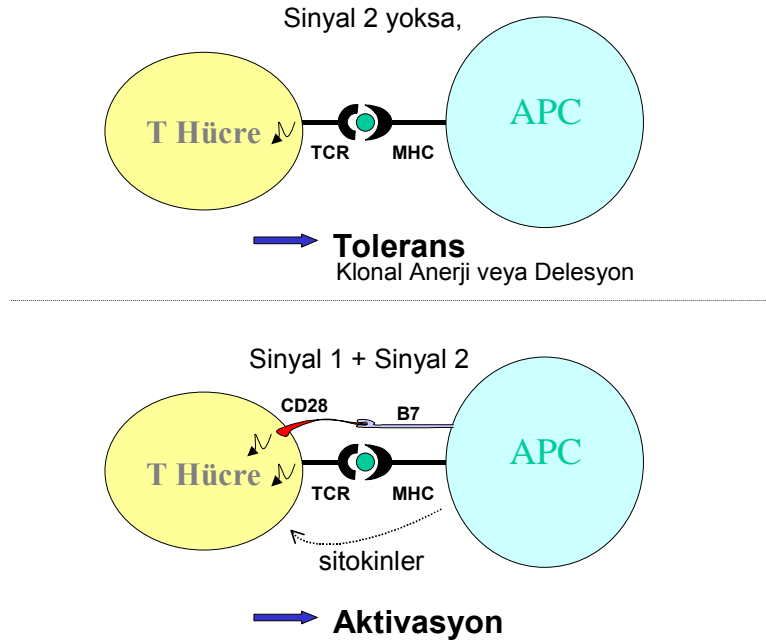
Olgunlaşan B hücreleri periferik lenfoid organlarda self antijenle karşılaşarsa, aynı T hücrelerindeki gibi anergik duruma geçerler. Bu hücreler T hücrelerinin yardımı olmadan uyarılırlar. Çünkü; selfe duyarlı T hücreleri daha önceden delesyona uğratılmışlardır. Anergik duruma geçen B hücreleri lenfoid

folikülden çıkarılırlar ve yaşamsal sinyaller alamadıkları için ölürler. B hücrelerinin tolerans eksikliğinde otoantikor üretimi olduğu sanılmaktadır. Otoimmün bir hastalık olan SLE hastalığında hem yardımcı T, hem de B hücrelerinde tolerans eksikliğinin gerçekleştiği düşünülmektedir.

### 1.5. T Hücrelerinin Aktivasyonu

T lenfositlerin antijenle karşılaşp aktive olmalarından sonra ko-stimulator dediğimiz ikincil uyarıcı sinyallerle yeteri kadar uyarılamaması ile anerji oluşur.

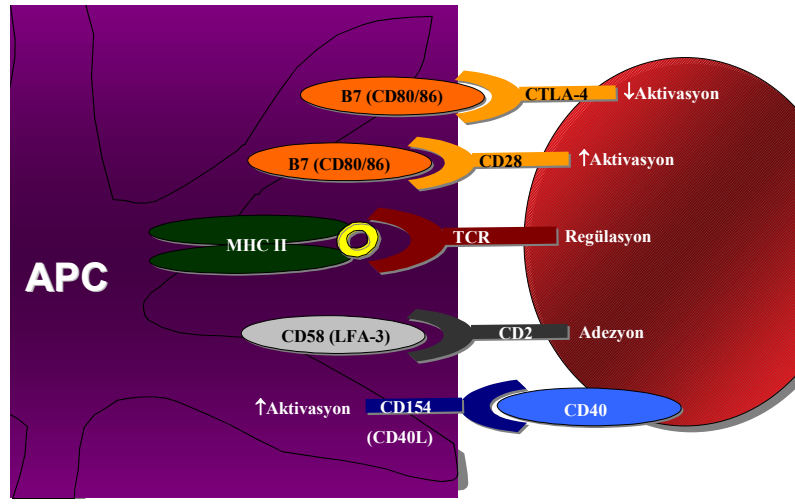
T hücrelerinin çoğalabilmesi ve farklılaşp fonksiyonel hücrelere dönüşebilmesi için en az iki sinyale ihtiyacı vardır. Sinyal I; her zaman antijenle, T hücre üzerinde bulunan T hücre reseptörünün birleşmesi ile gerçekleşirken, sinyal II; antijen sunan hücre (APC) üzerinde bulunan ikincil uyarıcı moleküllerin varlığı ile gerçekleşir. Dokularda ve lenfoid organlarda bulunan antijen sunan hücre, uyarıcı olmadığı sürece dinlenme halindedir. Yani üzerinde B7 gibi ikincil uyarıcı molekülleri yukarı çekmez. T lenfositler self antijeni birinci sinyalle tanırlar. Yani T hücre reseptörü (TCR) ile self antijen bağlanarak ilk sinyal oluşur. Ancak bu antijenin yabancı olmadığı durumda, ikincil sinyal molekülleri APC üzerinde gösterilmez. Böylece anerji gerçekleşmiş olur (Şekil 1.1.).



Şekil 1.1. Lenfosit aktivasyonunun sinyal modeli  
[www.uchsc.edu/misc/diabetes/oxch1.html](http://www.uchsc.edu/misc/diabetes/oxch1.html)



Bazı durumlarda, self antijenle karşılaşan T hücre üzerinde, B7 molekülüne yüksek bağlanma gücü ile bağlanan ve inhibitör sinyal göndererek T hücrelerini sessiz hale getiren CTLA-4 (CD152) gösterilir. T hücreleri APC üzerinde self antijen gördüklerinde, T hücre üzerinde yukarı çekilen CTLA-4 molekülü, APC üzerindeki B7 ikincil sinyal molekülüne bağlanarak T hücrelerini inhibe ederler. CD28 molekülü de ikincil sinyal molekülüdür ve B7 molekülüne bağlanarak T hücrelerini aktive eder. Fakat T hücrelerinin hangi molekülünü (CD28, CTLA4) öncelikle B7 molekülüne bağladığı ve nasıl seçtiği bilinmemektedir (Şekil 1.2.).



Şekil 1.2. APC ve T hücre etkileşimi

[www.uchsc.edu/misc/diabetes/oxch1.html](http://www.uchsc.edu/misc/diabetes/oxch1.html)

Ayrıca timusta eğitimden geçen hücrelerin bir kısmı perifere çıkarken düzenleyici T hücrelerine dönüşerek çıkarlar. Bu hücreler self antijene veya saldırganına 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 APC'lerle de temas kurarak inhibitör etki yaratabilmektedirler (2).

### 1.6. Doğal Düzenleyici T Hücreleri ve Self Tolerans

Sonradan kazanılan bağışıklık sistemi yabancı organizmaya spesifik olarak cevap vermek üzere özelleşmiş geniş bir reseptör repertuarına sahiptir. Bu özelliği ile antijene spesifik olarak klonal çoğalır ve efektör hücrelere dönüşerek yabancı antijeni yok eder. Bağışıklık sistemi bu görevi yerine getirmek için, daha önceden de anlatıldığı gibi kendinden olanı

tanılarak yabancıya önceden, rastgele oluşturduğu reseptörleri ile yanıt oluşturur. Self tolerans problemi iç hücrelerle, yani otoreaktif hücrelerin inaktivasyonu veya delesyonu ile çözülmektedir. Buna resesif tolerans denir. Bununla birlikte dominant toleransın dış formunu da  $CD4^+$   $T_{reg}$  hücre formunun oluşturduğu gösterilmiştir (3).

1905'te Ehrlich ve Morgenroth ilk deneyi kurmuşlar ve bu deney sonunda kendi dokularımıza karşı yanıt oluşturmamamızın hiç kolay olmadığını vurgulamışlardır (4). 1953 yılında Bilingham, Brent ve Medawar ilk laboratuvar deneyini gerçekleştirmişler ve immünolojik toleransın hücresel temelini ortaya çıkarmışlardır. Bu çalışmada, yeni doğmuş farelere genetik olarak farklı bir fareden alınan hematopoietik hücreler enjekte etmişler ve yeni doğanın daha sonra aynı vericiden alınan transplantı reddetmediğini göstermişlerdir. Bu deneyleri ile 1960 yılında NOBEL ödülü kazanmışlardır. Ancak daha sonra Ridge ve ark. Medawar'ın deneylerini biraz değiştirerek tekrarladıklarında şaşırtıcı biçimde farklı sonuçlar bulmuşlardır. Medawar yeni doğan fare erişkinlerini tolerans yapmaya yetecek kadar (50 milyon) hematopoietik hücre enjekte etmişti. Ridge ve ark. ise erişkin alıcı fareye 500 milyon hücre enjekte ettiklerinde, bu dozun erişkin farede, verici transplantına karşı tolerans oluşturduğunu gösterdiler. Bu deneyler, Burnet ve Medawar'ın vardığı sonuçların aksine, antijenin dozlarını ve profesyonel APC sayılarını değiştirerek, yeni doğanlarda bağışıklık, erişkinlerde ise tolerans oluşturmamanın mümkün olabileceğini, yani yeni doğanların T hücreleri ile erişkinlerin virjin T hücreleri ile aynı opsiyonlara sahip bulunduğunu göstermektedir (5).

Burnet'a göre bağışıklık sistemi self-nonsel self ayrımı yapabilmekteydi. Bu hipoteze göre, timusta gelişim sırasında kendi (self) antijenlerine güçlü bağlanma kapasitesi gösteren timositler apoptoz ile elimine edilerek ortadan kaldırılmakta (Klonal delesyon), klonların varlığına izin verilmemektedir. Dolaşıma geçebilen az sayıda otoreaktif T hücresi ise periferde antijenle indüklenabilen apoptoz aracılığı ile ortadan kaldırılır (6).

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

$CD4^+CD25^+$  T hücreler diğer hücreler gibi kemik iliğinden köken alıp  $\alpha\beta$  TCR ekspresine 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  $CD4^+CD25^+$  T hücre sayısının üretimini desteklemektedir (7).

$T_{reg}$  hücreleri in vivo koşullarda otoimmün hastalıkları veya immunopatolojiyi inhibe edebilen  $CD4^+$  T hücreleri olarak tanımlanabilirler. Yada  $T_{reg}$  hücreleri, diğer hücre fonksiyonlarını aktif olarak kontrol eden veya baskılayan hücrelerdir.  $T_{reg}$  hücreleri özellikle, in vitro koşullarda naif T hücre çoğalmasını baskılayan, in vivo koşullarda da  $CD4^+$  T ve  $CD8^+$  T hücre sayısını kontrol ederler.  $T_{reg}$  hücrelerinin başlıca iki büyük hücre grubu

tanımlanmıştır. Bunlardan biri doğal Treg hücreleri, diğeri ise IL-10 salgılayan T<sub>reg</sub> hücreleridir.

Başlangıçta, kolitisin kontrolünü sağlayan hücrelerin transfer edilen CD4<sup>+</sup> CD45RB<sup>high</sup> hücreler olduğu sanılıyordu. Ancak daha sonra bu hücrelerin CD25 eksprese eden CD4<sup>+</sup> CD45RB<sup>low</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) (8). Bu hücreler kendiliğinden oluşmuş doğal Treg hücreleridir. CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> populasyon içinde CD25<sup>-</sup> hücrelerde regülör aktiviteye sahip hücreler olarak tanımlanmıştır. (7)

Son günlerde Treg hücrelerinin IL-10 ürettiği ve TGF-β salgıladığı belirtilmiştir (7, 9-12). Bu hücreler kültürde üretilmiş ve CD25 eksprese etmiş hücrelerdir. IL-10 Treg hücreleri in vitro koşullarda naif T hücre çoğalmasını inhibe eder, lenfopenik konakçılarda in vivo koşullarda deneysel olarak otoimmunitiyi baskılar ve CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T hücre sayısını kontrol eder (7, 9-12). Şunu da akılda tutmak gerekir ki Treg hücreleri immün cevabın düzenlenmesinde önemli rol oynamalarına rağmen yardımcı T tip1 (T<sub>H</sub>1) ve tip2 (T<sub>H</sub>2) hücrelerinin salgıladığı sitokinler de immün sistemin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (Tablo 1.1.).

**Tablo 1.1.** Düzenleyici T hücre (T<sub>reg</sub>) populasyonu (13).

T <sub>reg</sub> çeşitleri	Orijini	Fenotip ekspresyonu	Foxp3	Görevi
CD25 <sup>-</sup> T <sub>reg</sub>	?	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup>	Var	?
Doğal oluşan CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	timus, (belki perifer)	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD45RB <sup>low</sup>	Var	Hücre hücre etkileşimi? Membran veya çözünebilir TGF-β ve IL-10 salınımı
IL-10 T <sub>reg</sub>	Perifer	CD4 <sup>+</sup>	Yok	Hücre-hücre etkileşimi IL-10 salınımı
T <sub>H</sub> 1	Perifer	CD4 <sup>+</sup>	Yok	IFN-γ salınımı Bazen de IL-10 salınımı
T <sub>H</sub> 2	Perifer	CD4 <sup>+</sup>	Yok	IL-4 salınımı IL-10 salınımı IL-13 salınımı

Baskılayıcı T hücreleri ilk defa 1970'lerin başında farelerde tespit edilmiş ve antijen spesifik baskılayıcı faktörlerin salgılanması ile süpresyona neden olduğu düşünülmüştür (14). Daha sonra ise insanlarda T<sub>reg</sub> hücrelerinin non-spesifik mekanizma ile süpresyona neden olduğu tespit edilmiştir. Düzenleyici T hücrelerinin yüzey belirteçleri fazla olmadığından dolayı izolasyonlar güçtür (15).

### 1.7.1. Doğal olarak oluşan CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> hücreleri

Bugünkü yapılan araştırmaların bir çoğunun odağı CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T hücre alt gruplarıdır. Bu hücreler sağlıklı yetişkin farelerde ve insanlarda CD4<sup>+</sup>T lenfositlerinin %1-5'inde gösterilirler. Ve bu hücrelerin hem doğal, hem de sonradan kazanılmış bağışıklık sistemi kontrol mekanizmasında spesifikleşmiş bir rolü vardır (16-18). Bu hücrelerin CTLA-4 ve glukokortikoid-tümör nekrosis faktör reseptör (GITR) içerdiği ve T<sub>reg</sub> aktivasyon mekanizmasında rol aldıkları bilinmektedir (19, 20). Her iki molekül de aktivasyondan sonra düzenleyici olmayan T hücreler üzerinde yukarı çekilirler. TGF-β ve IL-10 salınımı T<sub>reg</sub> hücrelerinin bilinen genel özellikleridir (21). Ancak, ne TGF-β ne de IL-10 salınımı T<sub>reg</sub> hücrelerinin tek özelliğidir (22).

CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> hücrelerinin çatal başlı / kanatlı ve heliks yapısında, adına foxp3 denilen bir transkripsiyon faktörü eksprese 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> eksprese etmektedir (23-25). 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, tiroitit, otoimmün endokrinopatoloji vb., insanlarda FOXP3 mutasyonu ile T<sub>reg</sub> eksikliğinde IPEX hastalığı oluşur) meydana gelebilir (26, 27). İnsanlarda otoimmün hastalıklar kemik iliği transplantasyonu ile biraz da olsa düzeltilebilmektedir (28). Farelerde CTLA-4 genin yokluğunda Foxp3'ün ektopik ekspresyonu belirgin anlamda hastalığın ilerlemesini durdurabilir (23). Buna ek olarak, düzenleyici olmayan CD4<sup>+</sup> T hücrelerine zorunlu olarak Foxp3 eksprese 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 (23, 24). Foxp3 geni doğal T<sub>reg</sub> hücreleri için güvenilir bir marker 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 eksprese edebildiği gösterilmiştir (29-31).

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> hücreleri lenfopenik fareleri barsak hastalıkları ve diyabetten korur ve transplant atılımını engeller (32-35). IL-10 üreten T<sub>reg</sub> hücreleri CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> eksprese ederler. Bu hücreler de kolitis ve allograft atılım gibi hastalıklarda rol oynarlar (34-36). Başlangıçta CD4<sup>+</sup> T hücrelerinde CD45RB<sup>high</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 (10, 18, 21, 37). 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 (38).

### 1.7.2. T<sub>reg</sub> Hücrelerinin IL-10 Üretimi

IL-10 T<sub>reg</sub> hücrelerinin in vivo olarak hastalıkların baskılanması ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesinin sağlayabilmesi için mutlaka IL-10 salgılayabilmesi gerekir. Ancak in vitro koşullarda IL-10 T<sub>reg</sub> hücreleri IL-10'a bağlı değildir. Görevini yapabilmesi için hücre-hücre etkileşimine ihtiyaç duyar (10, 18).

IL-10 T<sub>reg</sub> ve CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> hücreleri birbirinden bağımsızdırlar. Doğal olan CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> hücreleri IL-10'un baskılama etkisine ihtiyaç duyabilir yada duymayabilir. Yani her iki koşulda da çalışabilir. IL-10 üreten T<sub>reg</sub> hücreleri ise hem in vivo hem de in vitro koşullarda antijen uyarımı ile gelişirler (10, 39-41). Foxp3 ile transduse edildikten sonra CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> hücrelerinde IL-10mRNA'nın CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> hücreleri ile hiç transduse edilmemişlere göre kıyaslanabilir derecede attığı görülmüştür (23). 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 (37). Bu nedenle IL-10 üretimi ile Foxp3'ün direkt bir etkileşimi söz konusu değildir. IL-10 T<sub>reg</sub> hücrelerinin hem in vivo hem de in vitro ortamlarda Foxp3 eksprese etmediği gösterilmiştir. Bu özelliği ile klasik T<sub>reg</sub> hücrelerinden ayrılırlar. IL-10 T<sub>reg</sub> hücreleri Foxp3 eksprese etmedikleri halde IL-10 salgılayarak bağışıklık sistemini düzenleyebilir. Bunu da aslında IL-2 ekspresyonunu aşağı çekerek yapar. Dengeyi IL-10 yönüne kaydıracağı için IL-10 salgısı artmış gibi görünür (10, 11, 42-44).

### 1.7.3. T<sub>reg</sub> Hücrelerinin Yaptığı İşin Mekanizması Nedir?

T<sub>reg</sub> hücrelerinin, inhibisyonu hücre-hücre etkileşimiyle mi yaptığı tam olarak net değildir. Fakat doğal T<sub>reg</sub>'lerin membran bağlı TGF-β aracılığı ile inhibisyonu gerçekleştirdiği bilinmektedir (38).

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'a bağlı olmaksızın ve IL-2 (ekspresyonun aşağı çekerek?) yardımı ile baskılayabilmektedir (10, 18, 37). In vitro sistemde naif T hücre çoğalmasının baskılanması regülasyonun ilk basamağı olarak tanımlanır. Doğal immün cevap aktive olmadan baskılanmış olur. Düzenlenmenin bu basamağı IL-10 ekspresyonuna bağlı değildir. Burada bir yarışa bağlı düzenleyici aktivite söz konusudur. Yarışın seviyesi APC veya hayatta kalma faktörü ile ilgilidir. Gastritin inhibisyonu Foxp3 eksprese etmeyen T<sub>reg</sub> hücreleri ile sağlanır ve IL-10 bağımlı değildir. Düzenlenmenin ikinci basamağında ise IL-10 ve/veya TGF-β 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 (13).

Buraya kadar anlatılan bilgiler ışığında, bağışıklık sisteminin çok önemli bir mekanizması olan toleransta görev alan, T hücrelerinin ve alt gruplarının da üzerinde gösterdiği CTLA-4 molekülü ve onun üzerindeki değişiklikler savunma sistemimiz için çok önemlidir.

### **1.8. CTLA-4 (Cytotoxic T lymphocyte-associated 4 = CD 152)**

Cytotoxic T lymphocyte-associated 4 (CTLA-4), aktive T hücreleri üzerinde yukarı çekilen, Ig süperailesinde yer alan ikincil sinyal moleküllerinden biridir. CTLA-4 molekülü T hücre ikincil sinyali olan CD-28 molekülüne benzer bir moleküldür. Hem CD28 hem de CTLA-4 molekülleri antijen sunan hücreler üzerinde bulunan ve yine ikincil sinyal molekülleri olan B7-1 (CD 80) ile B7-2 (CD86) moleküllerine bağlanır. CTLA-4 molekülü T hücrelerine inhibe edici sinyaller gönderirken bunun aksine CD-28 molekülü uyarıcı sinyaller gönderir (45).

Darivach ve arkadaşları 1988 yılında yaptıkları bir çalışmada genomik cDNA kütüphanesinde insan CTLA-4 genini izole edebilmek için fare *ctla4* probu kullanmışlardır. Sonuçta insan CTLA-4 proteini ile fare *ctla4* proteini arasında % 76 homoloji tespit edilmiştir (46).

Harper ve arkadaşlarının 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 (47).

Linsley ve arkadaşlarının 1995'te yaptıkları 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 afiniteye B7-1 ve B7-2 moleküllerine bağlandığı tespit edilmiştir (48).

Ling ve arkadaşlarının 1999'da yaptığı 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 (49).

Magistrelli ve arkadaşları 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. Bu form ekson 2 tarafından kodlanan transmembran bölgenin delesyonuna neden olur. Bu sonuçla moleküler ağırlığı 23 kilodalton olan bu molekülün çözülebilir formu üretilir. Membran CTLA-4 molekülünün moleküler ağırlığı 45 kilodaltondur. Bu da çözülebilir formunun monomerik yapıda olduğunu gösterir. Fonksiyonel çalışmalar, çözülebilir CTLA-4 molekülünün T hücre aktivasyonu ile aşağı çekildiğini, buna karşılık membran CTLA molekülünün T hücre aktivasyonu ile yukarı çekildiğini göstermiştir (45).

Oaks ve arkadaşları 2000 yılında CTLA-4 molekülünün başka bir formunu bulmuşlardır. 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 (50).

### **1.8.1. CTLA-4'ün Gen Yapısı**

Harper ve arkadaşları 1991 yılında, Ling ve arkadaşları 1999 yılında CTLA-4 molekülünün 4 ekson içerdiğini göstermişlerdir (47, 49). Dariavach ve arkadaşları CTLA-4'ün ikinci kromozomun uzun kolunun 33. bölgesinde (2q33) bulunduğunu işaret etmişlerdir (46). Buonavista ve arkadaşları ise, maya yapay kromozomları ile yaptıkları çalışmada insan CD28 ve CTLA-4 moleküllerinin geninin aynı parçasında bulunduğunu göstermişlerdir. Bu genlerin arasında 25'ten 150 kilobaza kadar CpG'lerin de bulunduğunu ayrıca belirtmişlerdir (46).

Harper ve arkadaşları çalışmalarında fare CTLA-4 molekülünün Kromozom 1'e yakın bir bölgede yerleştiğini göstermişlerdir. Ayrıca bu çalışmada CTLA-4 molekülünün CD28 ile yakın geçiş gösterdiği de belirtilerek, sonuçta CD28 ile CTLA-4 moleküllerinin Ig süperailisinin yakın üyeleri olabileceği düşüncesine varılmıştır (47).

### **1.8.2. CTLA-4'ün Biyokimyasal Özellikleri**

CTLA-4 molekülü B7 moleküllerinin izoformlarına CD28 molekülünden 10-100 kat daha fazla çekim ve güç ile bağlanır. Ostrov ve arkadaşları mürın ctla-4'ünün, hücre dışı parçasının kristal yapısının 2 angström çözünürlükte olduğunu belirtmişlerdir (51). Stamper ve arkadaşları 2001 yılında insan CTLA-4 / B7-1 ikincil sinyal molekülleri kompleksinin kristal yapısının 3 angström çözünürlükte olduğunu göstermişlerdir. Bu oldukça küçük kompleksin inanılmaz derecede yüksek tamamlayıcı bir şeklinin olduğunu belirtmişlerdir (52). Schwartz ve arkadaşları 2001 yılında yaptığı bir çalışmada insan CTLA-4 molekülü disülfid bağları ile bağlanan yine insan B7-

2 molekülünün oluşturduğu homodimer yapının çözünürlüğünün 3,2 angström olduğunu vurgulamışlardır (53).

### **1.8.3. CTLA-4'ün Gen Fonksiyonu**

CTLA-4Ig çözünebilir kimerik bir proteindir. Hücre dışı domeinler içerir ve insan IgG1'in Fc kısmının bir parçasıdır. Antijen sunun hücreler üzerinde bulunan B7-1 ve B7-2 gibi ikincil uyarıcı moleküllere bağlanır ve T hücre aktivasyonunu sağlayan CD28 molekülünü inhibe eder. CTLA-4Ig molekülünün biyolojik aktivitesi birçok hayvan modellerinde, özellikle de transplantasyon ve otoimmünite çalışmalarında gösterilmiştir (54).

Özetle; İmmün sistem kendinden olanı kendinden olmayandan ayırt edebilmek için kullandığı mekanizmalardan herhangi birinde bir başarısızlık yaşadığında, kendi doku ve hücrelerine karşı reaksiyon gösterir. Bu reaksiyonlara otoimmünite, bu reaksiyonlardan dolayı oluşan hastalıklara da otoimmün hastalıklar denir.

Bir çok deneysel model T hücrelerinin self antijenlerine karşı anergi oluşturduklarını desteklemektedir. Farelerde yüksek düzeyde B7 molekülü eksprese ettirilirse bu farenin otoimmün reaksiyon geliştirildiği gösterilmiştir. Eğer ikincil sinyallerin gösterilmesine izin verilirse ve anergi ortadan kaldırılırsa otoreaktif T hücrelerinin aktive olduğu gösterilmiştir.yine farelerde CTLA-4 molekülünün bloke edilmesi veya ortadan kaldırılması ile farenin kendi dokularına karşı hızlı bir şekilde otoimmünite geliştirdiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar inhibitör bir reseptör olarak çalışan CTLA-4 molekülünün otoreaktif T hücrelerinin kontrolünde görevli olduğunu işaret etmektedir. İkincil sinyal moleküllerinin veya CTLA-4 moleküllerinin anormallikleri ile ilgili insanda gelişen birçok otoimmün hastalıklar gösterilmiştir. Bu hastalıklardan biri de Sistemik Lupus Eritematozudur (SLE).

## **1.9. Sistemik Lupus Eritematozus (SLE)**

Sistemik lupus eritematozus (SLE), humoral ve hücrel birçok immünolojik anormallikle karakterize, kronik, yangısal ve multisistemik bir hastalıktır. Her yaşta başlayabilirse de en sık 15-40 yaşları arasında başlar. Hastaların %90'dan fazlası kadındır. Kadınlarda 8-10 kat daha sık görülür. Gelişmiş batı ülkelerinde hastalığın prevalansının 100 binde 15-50, insidansının ise 4.8-7.6 olduğu bildirilmiştir. Bazı ırklarda (zenciler, sarı ırk, Asyalılar) daha siktir. Zenci SLE'li hastalarda Sm ve RNP antikorları, diskoid cilt lezyonları ve serozit daha sık görülür.

### **1.9.1. Etiyolojisi**

SLE etiyolojisinde çevresel, hormonal ve genetik faktörlerin rolü vardır. Uygun genetik zemine rağmen genetik faktörlerle birlikte uygun çevresel ve hormonal koşullar hastalığın ortaya çıkmasını sağlamaktadır.

#### **1.9.1.1. Çevresel Faktörler**

**a) Güneş Işınları:** SLE etiyolojisinde ve alevlenmelerinin ortaya çıkmasında UV-B bazen de UV-A bilinen faktörlerdir. Hastaların %70'inde ışığa duyarlılık



vardır. Ultraviyole (UV) SLE'de deri lezyonlarını ve belli oranlarda da hastalığı aktive ettiği bilinmektedir. UV, dermoepidermal yapıyı etkilemekte, DNA'nın antijenik yapısını değiştirmekte, keratonisitler de apoptozu arttırmakta ve sitoplazmik antijenlerin hücre yüzeyine transfer olmaları ile zararlı etkileri ortaya çıkarabilmektedir.

**b) Enfeksiyonlar:** SLE'de hiçbir spesifik infeksiyöz ajan izole edilememesine rağmen, enfeksiyonların hastalık tablosunu ağırlaştırdığı veya alevlenmeye yol açtığı bilinmektedir. Enfeksiyonlardaki mekanizmalar, non-spesifik olarak T hücre popülasyonu düzenleme  $T_H1$ - $T_H2$  dengesini  $T_H2$  yönüne kaydırıp otoimmünite için uygun ortam hazırlama veya molekül taklidi yolu ile genlerini aktive etme ile açıklanabilir.

**c) Diyetel Faktörler:** L-Canavanine, makak cinsi hayvanlarda, SLE benzeri hastalık tablosuna yol açmakta, insanlarda ise SLE tablosunu ağırlaştırmaktadır.

**d) Kimyasal Ajanlar ve ilaçlar:** Lupusa yol açan sayıları 70'i aşan ilaç bilinmektedir. Hidralazin, Prokainamid vb.

**e) Psikolojik Stres veya Fiziksel Travma:** Olguların %15'inde hastalık alevlenmesinde tetikleyici faktördür. İmmün sistemi etkileyerek bunu sağlamaktadır.

#### 1.9.1.2. Hormonal Faktörler

SLE'de doğurganlık yaşındaki bayanlarda erkeklere oranla hastalık 7-9 kat daha sık görülmektedir. Gebelik ve postpartum dönemlerde alevlenmektedir. Östrojenler, B-hücrelerinin antikor yapımını T-hücrelerin antijenik uyarıya yanıtını artırmakta, dolaşan immün komplekslerin klirensini azaltmaktadır. İmmün yanıtı  $T_H2$  tipine çevirerek SLE için karakteristik yanıtı oluşturur. Androjenler ise hem  $T_H1$ , hem  $T_H2$  immün yanıtı baskırlarlar.

#### 1.9.1.3 Genetik Faktörler

Genetik yatkınlığı gösteren en önemli kanıtlardan biri hastalığın tek yumurta ikizlerinde, çift yumurta ikizlerinden çok daha sık görülmesidir. SLE'li hastaların yakınlarında hastalığın normal popülasyondan daha sık görülmesi de genetik yatkınlık hipotezini desteklemektedir. HLA çalışmalarında HLA B8, DR3, DQW2 ve C4AQO'nun SLE'li hastalarda normal popülasyondan daha sık görüldüğü saptanmıştır.

#### 1.9.2. Patogenezi

SLE'de patojenik otoantikorlar ile immün kompleksler doku hasarına neden olur. Otoantikor aracılı hasarın direkt etkisi vardır.hastalıkla özellikle etkileyen otoantikorlar şunlardır; ANA, Anti-DNA Antikorları, Antihiston Antikorları, Anti-Ku (Ki/nükleer faktör 4) antikor, Anti-PCNA (SİKLİN) Antikor, Anti RNA, Anti -Sm, Anti- RNP ve Anti U1- RNA, Anti-Ro ve Anti-La, Anti-ribozomal Antikorlar. Ayrıca hücre membran komponentlerine karşı gelişen

antikorlar da vardır. Kan hücrelerine karşı antikorlar, Antinöronal antikorlar, Antifosfolipid antikorlar.

Hücre membranlarına bağlanan otoantikorlar hücreleri ya kompleman aracılı lizis veya mononükleer fagosit sistemin fagositoz etkisinin değiştirerek hasara uğrattırır. Doku hasarını açıklayan mekanizmalardan biri de antijen-antikor kompleksinin depolanmasıdır. Hücre içi protein ve nükleik asitlere karşı gelişen otoantikorlar dolaşımda ölü hücrelerden salınan antijenleri bağlanır ve damarlarda (vaskülitte neden olan) veya böbreklerde (glomerülonefrite yol açar) depolanır. SLE' deki bir çok otoantikor için, hastalığa yol açmayı sağlayan direkt patojenik etki ve mekanizmaları henüz kesin olarak kanıtlamayı beklemektedir.

Hücreyel immün bozuklukların çoğu intrensek bozukluklarından ziyade otoimmün olaya ikincil olarak gelişmektedir. Çünkü daha çok hastalık alevlenme döneminde görülmektedirler ve hastalık remisyonda iken saptanamamaktadır. SLE'lu hastalarda genel T lenfosit sayımı ve özellikle T hücre sayısı muhtemelen T hücre reaktif otoantikorların etkilerine bağlı olarak azalabilir. Ayrıca T hücre fonksiyonları da bozulur.

SLE'de B lenfosit fonksiyonu çoğunlukla hiperaktif olarak bulunmuştur. Periferik B hücrelerinin büyük bir kısmı morfolojik kriter tarafından aktive edilmiştir. SLE'da B hücreleri in vitro olarak, geleneksel hiç bir mitojen eklenmeden kendiliğinden antikor salgılayan hücrelere karşı çoğalır ve farklılaşır. Zayıf T hücre çoğalma yeteneği yanında makrofajların T hücrelerini aktive etme kapasiteleri de bozulabilir.

SLE'de serum kompleman düzeyleri genellikle azalır. Azalmanın derecesi hastalığın aktivitesi ile ilişkilidir. Nefritli hastalarda hipokomplementemi belirgin görülmesine rağmen, der ve SSS bulguları olan hastalarda daha azdır.

Hastaların %90'dan fazlasının kadın olması, hastalığın genellikle 15-45 yaş grubunda başlaması ve hormonal tedavilerin SLE riskini artırması, etiopatogeneizde hormonal faktörlerin rol oynadığını göstermektedir. SLE gelişiminde bazı çevresel faktörlerin de rolü olduğu düşünülmektedir.

SLE'de hastalığı yol açan direkt patojenik faktör ve etki mekanizması henüz kesinlik kazanmamıştır.

### **1.9.3. SLE'de Yapılan Deneysel Hayvan Modelleri**

İnsanda SLE ile ilgili araştırmalar klinik bulguların ve hastalık fenotipinin çeşitliliği, değişken çevresel etkiler, tedaviye bağlı değişiklikler, patolojik değişikliklerin olduğu dokuların elde edilmesindeki zorluklar etik problemler nedeni ile güçlükler içermektedir. Son 40 yılda SLE deneysel hayvan modelleri üzerinde yapılan araştırmalar, hastalığın gelişmesinde etkili mekanizmalar konusunda çok önemli bilgiler sağlamanın yanında genel olarak otoimmünite ile ilgili bilgilerimizin artmasını sağlamıştır. SLE benzeri

hastalıklar köpek, kedi, kobay, domuz ve maymunda da görülür fakat araştırmalar fare modellerinde yoğunlaşmıştır (55).

SLE modeli olarak geliştirilen fare ırklarında birçok immünolojik bozukluk tarif edilmiştir. SLE modeli ırkların otoimmün hastalığı olamayan farelerden temel farkları B hücrelerinin sayıca artmış ve aktif olmasıdır (56, 57). Bu B hücreleri tarafından içerisinde SLE için özgül kabul edilen anti-dsDNA' da olan birçok otoantikor üretilmektedir. Fare modelleri tarafından üretilen anti-ds DNA antikorlarını azaltmaya yönelik tedaviler bazı modellerde başarılı olmakta ve bu durum klinik bulgularda iyileşmeye de yol açmaktadır (58, 59). B hücrelerinin hastalık patogenezinde otoantikor üretimi dışında da katkıları olabileceğine dair verilerde yine hayvan modeli kaynaklıdır (60).

SLE patogenezinde virüslerin rolü özellikle de Epstein-Barr virüsünün (EBV) nükleer antijenlerden bir peptid dizini ile Sm antijeni arasındaki benzerlikten yola çıkan çalışmalarda farelerde EBV' ye ait peptid dizini ile yapılan aşılamanın epitop yayılımı mekanizması ile otoimmün hastalık oluşturduğu gösterilmiştir (59).

Epitop yayılımı ile otoantikor gelişmesi her zaman otoimmün hastalığa yol açmamaktadır (61). SLE patogenezinde T hücrelerinin ve sitokinlerin önemli rolleri, B ve T hücrelerinde poliklonal aktivasyon bulunmasına karşın otoantikor cevabının antijen uyarısına bağımlılığı deneysel hayvan modellerinden elde edilen bulgular ile ortaya konmuştur (57, 62).

İnsanda SLE genetik olarak karmaşık özellikler göstermektedir. Hastalar arasında klinik ve genetik farkların yanında çevresel faktörlerin etkileşimleri, insanda hastalığa yatkınlık bölgelerinin ortaya konmasını zorlaştırmaktadır (63). Fare ırklarında ise bu çalışmalar daha kolay yapılabilmektedir. Lupusa yatkın fareler üzerinde yapılan çalışmalar birinci kromozomda hastalığın nefrit ve anti-DNA üretimi gibi önemli özelliklerine uygun bir yatkınlık bölgesinin bulunduğu sonucunu vermiştir. Araştırmacılar insan ve fareden önemli ortak yatkınlık genlerinin korunmuş olabileceği hipotezine dayanarak insanda birinci kromozomdaki homolog bölgeyi (1q21-1q42) incelemiş ve her etnik grupta kanıtlanamamış olmakla birlikte bu bölgedeki bazı allellerin SLE ile ilişkili bulunduğu bildirilmiştir.

Sonuç olarak başta çeşitli fare ırkları olmakla birlikte deneysel hayvan modellerinin genetik ve çevresel faktörlerin karmaşık ve çeşitli etkileşimleri sonucu ortaya çıkan SLE'nin patogenezinin aydınlatmada önemli bir işlevi vardır. Bu modellerden elde edilen bilgiler immün sistemi yaygın olarak baskılayan ilaçlar yerine özgül immün bozukluklara yönelik yeni ve etkili tedavilerin bulunmasını sağlayabilir. Deneysel modellerden elde edilen bilgilerin yorumlanmasında bu modellerin insanda görülen hastalığın sadece belirli yönleri ile benzeştiği dikkate alınmalıdır.

## MATERYAL VE METOD

Çalışmamamıza Akdeniz Üniversitesi Tıp fakültesi Romatoloji-İmmünoloji bilim dalına gelen ve ACR 1982 SLE sınıflama kriterlerinden (11 parametreden) 4 veya daha fazlasının bulunması ile sistemik lupus eritematozus tanısı alan hastalar dahil edildi. SLE sınıflama kriterleri ekte tablo olarak verilmiştir (Bkn.Ek1). Dışlanma kriteri olarak Hepatit C, AIDS hastaları, Sarkoidozis, antikolinerjik kullananlar, Lenfoma öyküsü olanlar, greft versus host hastalığı olanlar çalışmadan çıkarılma kriteri olarak belirlendi. Hastalar İç Hastalıkları Romatoloji kliniğinde takip edilen remisyon-indüksiyon veya idame tedavi almakta olan hastalardı. Çalışma nedeniyle hastalarda herhangi bir tedavi değişikliği yapılmadı. Hastaların büyük çoğunluğu düşük doz (4-8 mg/gün) oral steroid ve hidroklorokin, alırken küçük bir grup azothiopurin ve mycophenolate mofetil gibi immünosüpresif tedaviler almaktaydı.

Bu çalışma için hastalardan aydınlatılmış onam alındıktan sonra 5 cc EDTA'lı 5 cc heparinli kan alındı. Hastalık aktivitesi için SLE DAI skorları hastalardaki klinik bulgulara göre toplam 105 puan üzerinden hesaplandı. SLE DAI hesaplama çizelgesi (64) ekte tablo olarak verilmiştir (Bkn.Ek2)

Polimorfizm çalışmasında genotiplendirme için PCR-RFLP tekniği kullanılırken, hastalığın aktivasyonu için SLE-DAI skorları ve T hücre aktivasyonu için akış sitometride CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T hücreleri belirlendi. Genotiplendirme için 47 hasta ve 100 sağlıklı kişiden oluşan kontrol grubu kullanıldı. Çalışmaya alınan 47 hastanın 40 tanesi bayan 7 tanesi erkekti. Kontrol grubu olarak da daha önce Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezinde behçet hastalarında, CTLA-4 Ekson I +49 (A/G) bölgesinde yapılan polimorfizm çalışmasında belirlenen sonuçlar kullanıldı(65). Akış sitometrisinde CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T hücre için ayrıca kontrol grubu kullanılmadı. Sonuçlar literatüre göre değerlendirildi.

Hastalardan polimorfizm çalışması için DNA, akış sitometrisi deneyi için de hücre ayrıldı.

### 2.1. PCR-RFLP

Sistemik Lupus Eritematozus'lu hastalarda Exon I pozisyon 49 (kodon17)'da trioninin alanine dönüşüp dönüşmediği PCR-RFLP tekniği ile tespit edildi. Bunun için önce DNA ayrılıp, aradığımız bölge uygun primerler ve malzemeler kullanılarak çoğaltıldı.

#### 2.1.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu 2 cc EDTA'lı kandan yapıldı. İzolasyon için GENTRA marka DNA izolasyon kitindeki yöntem kullanıldı.

- 300 µl kan + 900 µl lizis solüsyonu ile 15 dk. inkübe edildi (lizis solüsyonu kanın üç katı olacak şekilde ayarlandı).
- Oda ısısında 1750g'de Heraeus marka santrifüjde 20 sn çevrildi.
- Üstteki dökelti atılıp, dipteki çökelti üzerine 300 µl hücre lizis solüsyonu konulup pipetaj ile hücre parçalandı.
- Parçalanmış hücre üzerine 100 µl presipitasyon sıvısı konulup 20 sn kadar karıştırıcı ile karıştırıldı.
- Oda ısısında 1750g'de 1 dk santrifüj edildi.
- Oluşan dökelti daha önceden içine 300 µl izopropanol konulan ependorflara aktarıldı.
- Ependorf tüpleri aşağı yukarı çevrilerek DNA görünür hale getirildi.
- 1750g'de 1dk santrifüj edildi.
- Oluşan dökelti atılarak DNA'nın kurumaması beklenildi.
- DNA kuruduktan sonra soğuk %70'lik alkol ile DNA'lar yıkandı.
- Yeniden 1750g'de 1 dk santrifüj edilip dökelti uzaklaştırılarak DNA'lar kurumaya bırakıldı.
- Kuruyan DNA'ların üzerine 200 µl DNA dehidratasyon sıvısı eklenerek 65°C'de 20 dk *Thermomix B.Braun Biotech International* marka sıcak su banyosunda çözdürüldü.

### 2.1.2. PCR İçin Kullanılan Malzemeler

- 1) Distile su
- 2) Mgcl<sub>2</sub> ( Fermentas)
- 3) 10x PCR tamponu (Fermentas)
- 4) Primer I (Forward): 5'...GCT CTA CTT CCT GAA GAC CT...3'
- 5) Primer II (Reverse): 5'...AGT CTC ACT CAC CTT TGC AG...3'
- 6) Taq polimeraz enzimi (Fermentas)
- 7) Genomik DNA

İstenilen bölgenin çoğaltılması için önce PCR reaksiyonu kuruldu. Her hasta için bir adet 0,5'lik ependorf tüpü kullanıldı.

**Tablo 2.1.** PCR Reaksiyonu için kullanılan malzemeler ve miktarları.

dH <sub>2</sub> O	22,6 µl
Mgcl <sub>2</sub>	1,5 mmol
10X Taq buffer	5 µl
Primer I (Forward)	20 pmol
Primer II (Reverse)	20 pmol
Taq polimeraz enzimi	0,4 µl (5 U)
Genomik DNA	~ 0,2 µg

Tablo 2.1.'de verilen miktarlarda PCR malzemeleri, 0,5 ml'lik ependorf tüplerine konularak vorteks yardımı ile karıştırıldı. Daha sonra bu tüpler istenilen bölgenin çoğaltılmasını sağlayan *Perkin Elmer* markalı DNA Thermal Cycler cihazına yerleştirilip aşağıdaki şartlarda ayarlandı.

95 °C	4 dk	}	1 siklus
95 °C	1 dk.	}	35 siklus
55 °C	1 dk.		
72 °C	1 dk		
72 °C	4 dk.	}	1 siklus

Makineden çıkan PCR ürünleri %2'lik jele yüklenerek istenilen bölge olup olmadıkları kontrol edildi. Sonuçta PCR ürünü olarak 162 bp'lik ürün elde edildi. Elde edilen PCR ürünleri genotiplendirilmeden önce Fenol-Kloroform ekstraksiyonu ile fazla tuzlarından uzaklaştırıldı. Böylece kesimi engelleyebilecek tuzlar uzaklaştırılmış oldu.

### 2.1.3. Fenol-Kloroform Ekstraksiyonu

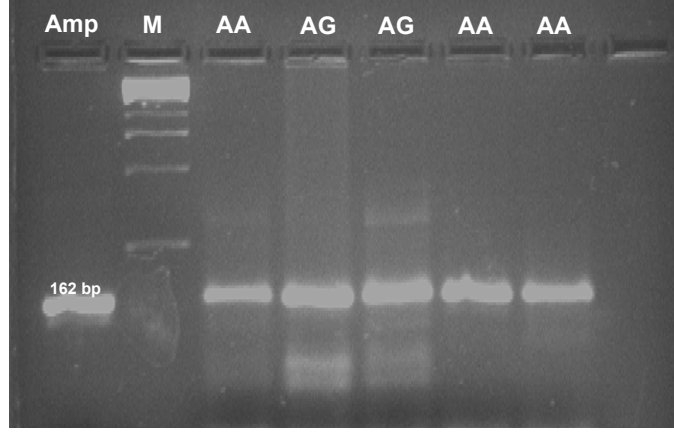
- 0,2'lik ependorf tüplerine 50 µl PCR ürünü + 50 µl eşit miktarlarda karıştırılmış fenol-kloroform konuldu.
- Karıştırıcı ile iyice karıştırılıp 1750g'de 2 dk. çevrildi.
- İki faza ayrılan tüpün üstündeki faz başka bir 0,5'lik ependorf tüpüne aktarıldı.
- Üzerine 10M 5 µl NH<sub>4</sub> asetat (amonyum asetat) eklendi.
- Son hacmin 2-2,5 katı kadar (yaklaşık 120 µl) saf soğuk alkol eklenerek -70 °C'de 30 dk. bekletildi.
- 30 dakika sonunda 1750g'de 15 dk. santrifüj edildi.
- Üstteki dökelti atılıp kurutuldu.
- Üzerine %70'lik soğuk alkol konularak yine 1750g'de 2 dk. santrifüj edilerek dökelti atılıp DNA'lar kurumaya bırakıldı.
- Kuruyan DNA'lar 20 µl distile su ile sulandırılarak kesime hazır hale getirildi.

### 2.1.4. Kesim Reaksiyonu İçin Kullanılan Malzemeler

1. BbvI Kesim Enzimi (3ünite/ µl; Fermentas)
2. Enzim buffer (10X)
3. PCR ürünü
4. Distile su

Her bir hasta için 6 µl distile su, 2 µl 10X buffer, 10 µl PCR ürünü ve 6 ünite (2µl ) BbvI kesim enzimi 0,5'lik ependorfa konularak 20 µl'lik bir kesim reaksiyonu kuruldu. Kurulun reaksiyon tüpleri 65 °C'de 4 saat inkübe edildi. 4

saat sonunda sonuçlar % 3'lük agaroz jele yüklenerek genotiplendirme yapıldı.



**Şekil 2.1.** PCR-PFLP yöntemi sonucunda elde edilen jel görüntüsü.

Kesim sonucunda, kesim olanlar polimorfik, kesim olmayanlar ise normal olarak değerlendirildi. Her iki allelde de kesim varsa G/G olarak genotiplendirildi ve 162 bp'lik PCR ürünü tam olarak 88/72 olarak ikiye ayrıldı. Allellerden sadece birinde kesim olmuşsa A/G olarak genotiplendirildi ve hala 162bp'lik kesilmeyen PCR ürünü *2UV<sup>TM</sup> Transilluminater* ile jelde görüntülendi. PCR ürünü 162 bp olarak hiç kesilmeden kalanlar ise homozigot normal (A/A) olarak değerlendirildi.

## **2.2. Akış Sitometri İçin Mononükleer Hücre Ayrımı**

Mononükleer hücrelerin izolasyonu için Ficoll-hypaque yöntemi kullanıldı.

- 10 cc heparinli kan 1/1 oranında PBS ile sulandırıldı.
- 10 cc'lik boş tüplere 3 cc histopak 1077 konulup, üzerine 1/1 oranında sulandırılan kan yüklendi.
- 400g'de 20 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj edilen tüplerin orta kısmında toplanan mononükleer hücreler başka bir tüpe aktarıldı.
- Üzerlerine 3 cc PBS konularak 400g'de 7 dk çevrilerek yıkama işlemi yapıldı. Bu işlem 2 kere tekrarlandı.
- Yıkama sonunda hücreler 700 µl Fax-Flow ile sulandırıldı.

### 2.2.1. Mononükleer Hücrelerin Boyanması

Her hasta için 5 tüp boyama yapıldı.

Tablo 2.2. Akış sitometri antikorları

I. TÜP	IgG1 FITC / IgG2a PE
II. TÜP	CD3 FITC / CD8 PE
III. TÜP	CD3 FITC / CD4 PE
IV. TÜP	CD25 FITC / CD4 PE
V. TÜP	CD25 FITC / CD8 PE

Histopak yöntemi ile ayrılan hücreler, her tüp için Tablo 2.2.'de belirtilen flow antikorları ile boyanarak değerlendirildi.



## BULGULAR

### 3.1. PCR-RFLP Sonuçları

Çalışmaya alınan hasta ve kontrol grubuna ait CTLA-4 molekülünün, Exon I pozisyon 49 da (kodon 17) belirtilen gen polimorfizmine ait sonuçları Tablo 3.1.'de özetlenmiştir. Bu tabloya göre kontrol grubundaki 100 kişinin 47'si A/A, 46'sı A/G ve 7 tanesi G/G olarak tespit edildi. Çalışılan 47 hastanın da 33'ü A/A, 10 tanesi A/G ve 4 tanesi G/G olarak tespit edildi. Çalışmaya alınan 47 hastanın 7'si erkek 40 tanesi bayandır ve yaş ortalamaları 37'dir.

İstatistiksel değerlendirmeler <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl> web adresi kullanılarak hesaplandı.

**Tablo 3.1.** CTLA-4 Exon I +49 genotipinin SLE hastalarında ve kontrollerdeki dağılımı.

Grup genotip tablosu			Genotip			Toplam
			AA	AG	GG	
Grup	Kontrol	Sayı	47	46	7	100
		Grup içi yüzde oranları	%47,0	%46,0	%7,0	%100,0
	Hasta	Sayı	33	10	4	47
		Grup içi yüzde oranları	%70,2	%21,3	%8,5	%100,0
Toplam		Sayı	80	56	11	147
		Grup içi yüzde oranları	%54,4	%38,1	%7,5	%100,0

Çalışmamıza dahil ettiğimiz SLE hastalarına ait polimorfizm sonuçları gen dağılımı ile sağlıklı kişilerden oluşturduğumuz kontrol grubu gen dağılımı arasında fark olup olmadığını Pearson ki-kare testi ile kontrol ettiğimizde her iki grup arasında gen dağılımı açısından istatistiksel anlamda fark olduğunu tespit ettik ( $P=0.032$ ). Ayrıca kontrol ve hasta grubunun Hardy-Weinberg dağılımına uyup uymadığına baktığımızda kontrol grubunun uyduğunu ancak hasta grubunun genotip dağılımının Hardy-Weinberg dağılımına uymadığını gördük. Odds ratio değerini de 1,8 olarak tespit ettik. Farkı yaratanın hangi genotip grubuna ait olduğunu görebilmek için de, genotipler ile gen frekanslarını tek tek değerlendirdik.

**A)** Sadece homozigot A haplotipini taşıyıp taşımadıklarına göre değerlendirdiğimizde Tablo 3.2.'deki sonuçları elde ettik.

**Tablo 3.2.** Homozigot A/A taşıyan ve taşımayan hasta ve kontrol grubu sayıları

	<b>A/A</b>	<b>A/G+G/G</b>
<b>Kontrol</b>	47	53
<b>Hasta</b>	33	14

İstatistiksel değerlendirmede Pearson ki-kare testi uygulandı ve P=0.008 bulunarak homozigot A genini taşıyanların, homozigot A genini taşımayanlara göre anlamlı derecede farklı olduğu tespit edildi.

**B)** Sadece homozigot G haplotipini taşıyıp taşımadıklarına göre değerlendirdiğimizde Tablo 3.3.'deki sonuçları elde ettik.

**Tablo 3.3.** Hasta ve kontrollerde sadece G/G haplotipi taşıyan ve taşımayanların dağılımı

	<b>A/A+A/G</b>	<b>G/G</b>
<b>Kontrol</b>	93	7
<b>Hasta</b>	43	4

İstatistiksel değerlendirmede Fisher-Kesin Ki-Kare testi uygulandı ve P=0.74 bulunarak homozigot G genini taşıyanların, homozigot G genini taşımayanlara göre istatistiksel olarak anlamsız olduğu bulundu.

**C)** A ve G geni taşıyanların gen frekansları arasında anlamlı bir fark olup olmadığına bakıldı. Buna göre hasta ve kontrollerdeki A ve G genotipine ait allel frekanslarının dağılımı Tablo 3.4.'de verildi. Yapılan istatistiksel hesaplamada Pearson-Ki-Kare testi kullanıldı ve P=0.05 bulundu.

**Tablo3.4.** Hasta ve kontrollerde A ve G genotipine ait allel frekanslarının dağılımı

	<b>A</b>	<b>G</b>
<b>Kontrol</b>	140	60
<b>Hasta</b>	76	18

### **3.2. SLE-DAI Skor Sonuçları**

Çalışmamıza dahil ettiğimiz SLE hastaları için ayrıca hastalık aktivasyonları hakkında bilgi almak üzere SLE-DAI skorları da hesaplandı. Hasta grubuna ait 47 kişiden 3'ünün hastanemize düzenli gelmemesinden dolayı dosyalarına ulaşılamadı. Ayrıca SLE-DAI skoru hesaplanan bir hastanın kan örneği alınamadığından dolayı genotiplendirilmesi yapılamadı. SLE-DAI skor kriteri 5 olarak seçildi ve bu skorun altında ve üstünde olan A/A, A/G ve G/G genotiplerine ait hasta sayıları ve yüzdeleri de Tablo 3.5.'de verildi.

**Tablo.3.5.** Exon I +49'da SLE hastalarının genotip dağılımlarına göre SLE-DAI skorları ve yüzde dağılımları

	<b>A/A</b>	<b>A/G</b>	<b>G/G</b>
<b>SLE-DAI &gt;5</b>	13	4	3
<b>SLE-DAI &lt;5</b>	16	6	1

SLE-DAI skorları ile yine sadece A haplotipi taşıyanlar ve sadece G haplotipi taşıyanlar ile her iki gene ait allel frekansları hesaplanan gruplarda karşılaştırma yapıldığında aşağıdaki sonuçlar elde edildi.

**A)** SLE-DAI skoru 5 ve 5'ten büyük olanlarla 5'ten küçük olan hastaların sadece homozigot A genotipine sahip olmalarına ait sonuçları Tablo 3.6.'da verilmiştir. Bu tabloya göre değerlendirilme yapılırken Pearson Ki-Kare testi uygulanmış ve sonuçta  $P= 0,93$  bulunmuştur. İstatistiksel anlamda SLE-DAI  $\geq 5$  ve  $>5$  arasında sadece homozigot A genotipi taşıyanlarla taşımayanlar arasında istatistiksel bir fark bulunamamıştır.

**Tablo.3.6.** SLE-DAI skoruna göre hastaların genotip dağılımları

	<b>SLE-DAI &lt;5</b>	<b>SLE-DAI <math>\geq 5</math></b>
<b>A/A</b>	17	13
<b>A/G+G/G</b>	7	7

**B)** SLE-DAI skoru 5 ve 5'ten büyük olanlarla 5'ten küçük olan hastaların sadece homozigot G genotipine sahip olanların sonuçları Tablo 3.7.'de verilmiştir.

**Tablo. 3.7.** SLE-DAI skoruna göre hastaların genotip dağılımları

	<b>SLE-DAI &lt;5</b>	<b>SLE-DAI <math>\geq 5</math></b>
<b>A/A</b>	23	17
<b>A/G+G/G</b>	1	3

Bu tabloya göre Fisher Ki-Kare Testi uygulandığında  $P=0,31$  bulunarak istatistiksel bir anlama ulaşılamamıştır.

**C)** SLE-DAI  $\geq 5$  ve SLE-DAI  $<5$ 'e göre A ve G genotiplerine ait allel frekansları hesaplandığında Tablo.3.8 elde edilmiştir.

**Tablo.3.8.** SLE-DAI skoruna göre hastaların A ve G genotipine ait allel frekans dağılımları

	<b>SLE-DAI &lt;5</b>	<b>SLE-DAI &gt;=5</b>
<b>A</b>	42	30
<b>G</b>	8	10

Allel frekanslarının istatistiksel olarak bir anlam ifade edip etmediği Pearson Ki-Kare Testi uygulanarak tespit edilmiş olup P= 0,43 değeri bulunmuştur.bu değere göre istatistiksel olarak fark yoktur.

Yukarıda uygulanan istatistiksel testlere göre ve her bir durum için ayrı ayrı hesaplanan P değerine göre SLE-DAI skoru ne A genotipi taşıyıp taşımamakla ne G genotipi taşıyıp taşımamakla ne de her iki geninde allel frekansları ile istatistiksel anlamda ilişkili değildir.

### **3.3. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T hücre Sonuçları**

Hastalardan alınan periferik kandan yüzde değerleri tespit edilen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T hücre değerleri de Tablo 3.9.'da belirtilmiştir. Ayrıca CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T hücre yüzde değerleri ile SLE-DAI skorları karşılaştırılmış ve Tablo 3.9.'da belirtilmiştir.

**Tablo.3.9.** SLE hastalarında %CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T hücre değerleri ve SLE-DAI skor sonuçları.

<b>SLE hastaları</b>	<b>%CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T hücre</b>	<b>SLE-DAI</b>
1. Hasta	2	6
2. Hasta	13,5	16
3. Hasta	8	0
4. Hasta	4	0
5. Hasta	3	0
6. Hasta	7,3	4
7. Hasta	13	10
8. Hasta	7	0
9. Hasta	1	4
10.Hasta	10	0
11.Hasta	26	0
12.Hasta	23	10
13.Hasta	1,5	0
14.Hasta	0,5	10
15.Hasta	1	-
16.Hasta	3	-

Hastalardan alınan periferik kan örneklerinden CD3, CD4, CD8 ve CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T hücre değerleri ve ortalama sonuçları ile standart sapmaları Tablo 3.10.'de gösterilmiştir.

**Tablo.3.10.** CD3, CD4, CD8 ve CD4+CD25+ T hücrelerine ait periferik kandaki yüzde değerlerinin ortalamaları ve standart sapmaları.

	<b>%CD3</b>	<b>%CD4</b>	<b>%CD8</b>	<b>%CD4+CD25+T hücre</b>
<b>Ortalama</b>	56	32	31	7,7
<b>Standart Sapma</b>	16	13.5	12	7.8

Toplam 14 hastanın aynı anda hem %CD4+CD25+ T hücre hem de SLE –DAI skor sonuçları ile genotipleri vardır. Tablo4.9'a göre istatistiksel hesaplamalar yapıldığında SLE-DAI skoru ile CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T hücreleri arasında bir fark olup olmadığı Fisher ki-Kare testi ile kontrol edilmiş olup sonuç anlamsız bulunmuştur (P=1). SLE-DAI skoru 5'ten büyük ve 5'e eşit olanlarla, 5'ten küçük olanların ortalaması alınarak karşılaştırıldığında bir fark olmadığı görülmüş, dolayısı ile de periferik kandaki aktif T hücre yüzde değerlerinin hastalığın aktivasyonu ile ilişkili olmadığı görülmüştür (Tablo.3.11).

**Tablo 3.11.** SLE-DAI skoru $\geq$ 5 ve SLE-DAI $<$ 5 olanlarda CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T hücre değerlerinin ortalaması.

	<b>Ortalama %CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T hücre</b>
<b>SLE-DAI<math>\geq</math>5</b>	6,4
<b>SLE-DAI<math>&lt;</math>5</b>	6,5

## TARTIŞMA

SLE'nin patogeneğinde birçok genetik ve çevresel faktörler rol almaktadır. Bu faktörler, MHC Class II molekülü, komplement bileşenleri, Fc reseptör II ve III, sitokinler, apoptoz ve T hücre reseptörlerini içermektedir (66).

CTLA-4, aktiflenmiş T hücreleri üzerinde yer alır ve immün sistemin cevap oluştururken gösterdiği ikincil sinyallerden biridir. T hücrelerinin aktive olabilmesi için üzerinde bulundurduğu TCR reseptörleri ile yabancıyı tanınması gerekir. Bunun içinde APC ler tarafından T hücrelerine MHC Klas I veya MHC Klas II 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. CTLA-4 molekülünün aksine CD28 molekülü T hücrelerini aktive etmektedir. İmmün sistemin yabancıyı yok ettikten sonra, cavabı baskılayabilmesi ve aktivasyonun sonlandırabilmesi için frenleyici ya da inhibe edici sinyallere ihtiyacı vardır. Bu sinyallerden birinin de CTLA-4 molekülü olduğu bilinmektedir. Bu molekül, hem hayvanlarda hem de insanlarda T hücre aktivasyonunu negatif yönde düzenlemektedir. Yapılan deney hayvanları modellerinde CD28 ve CTLA-4 moleküllerinin otoimmün hastalıklar ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (67-69).

Hem CTLA-4 molekülü hem de CD28 molekülü insanda kromozom üzerinde 2q33 bölgesine yerleşmiştir. Yapılan çalışmalar bu bölgenin SLE hastalığına yatkınlığı arttırabileceği ihtimalini akla getirmektedir (70-72). Bu nedenle birçok çalışmada farklı populasyonlarda CTLA-4 molekülünün polimorfizmlerine bakılmıştır. Bu molekül için dört farklı bölge çalışılmıştır. Exon I +49 'da A'dan G'ye değişim, -1722 promotör bölgesinde T'den C'ye değişim, -319 promotör bölgesinde C'den T'ye değişim ve Exon 3' deki 3' kodlanmayan bölgesindeki değişimdir. Bu dört farklı bölgeden otoimmün hastalıklarda en fazla çalışılan Exon I +49' da A'dan G'ye dönüşümdür.

Bizim çalışmamızda CTLA-4 molekülünün Exon I +49'da SLE'li hastalarda A'dan G'ye dönüşümüne yani, Trioninin Alenine dönüşümüne bakıldı. Daha önce yapılan çalışmalarda, Japon populasyonunda Exon I (+49 A/G) polimorfizminin hastalığın oluşumu ile ilişkisi tespit edilmiştir (72). Ancak İspanyollarda, Afrika kökenli Amerikalılarda, beyaz ırkta, Korelilerde ve diğer birçok populasyonlarda, bu polimorfizm ile SLE arasında istatistiksel anlamda bir fark bulunamamıştır (73, 74). Yapılan çalışmalarda da olduğu gibi polimorfizm sonuçları ırklara göre farklılık göstermektedir. Genelde belirtilen çalışmalarda SLE hastalığına yatkınlığın homozigot GG genotipine sahip

olmakla bir ilişkisi olduğu belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda 47 SLE hasta grubu ve 100 sağlıklı kişiden oluşturduğumuz kontrol grubunu karşılaştırdık. Ayrıca genotiplerini PCR-RFLP tekniği ile belirlediğimiz hastaların hastalık aktivasyonunu belirleyen SLE-DAI skorlarını da hesaplandı. Bulduğumuz hasta polimorfizm sonuçları ile kontrol grubu polimorfizmlerini karşılaştırdığımızda her iki gruptaki genotip dağılımlarının istatistiksel anlamda farklı olduğu tespit edildi. Özellikle de homozigot AA genotipine sahip olanların sayısının, kontrol grubundaki homozigot AA genotipine sahip olanların sayısından yaklaşık iki kat daha fazla olduğu görüldü. Sadece A genotipi taşıyanlar taşımayanlarla, sadece G genotipi taşıyanlar taşımayanlarla ya da A ve G genlerine ait genotip frekansları karşılaştırıldığında sadece A genotipi taşıyanlarda istatistiksel anlamda fark olduğu görüldü ( $p=0,008$ ). A genotipine ait gen frekansları hesaplandığında da anlamlı bir değer gözlemlendi ( $P=0,05$ ). Ancak, SLE-DAI skoru ile hasta grubu genotip dağılımını karşılaştırıldığında istatistiksel bir fark bulunamadı. SLE-DAI skoru hesaplanan hasta sayısının az olmasından dolayı güvenli bir istatistiksel sonuca ulaşılamamıştır. Alleller tek tek SLE-DAI skoru ile karşılaştırıldığında da hasta sayısının yetersizliği nedeniyle fark bulunamamıştır. Bu sonuçlardan yola çıkarak Türk populasyonunda homozigot AA genotipine sahip insanların SLE hastalığına yatkınlığının daha yüksek olabileceği (odds ratio=1,81), bu hasta grubunun SLE-DAI skorları hesaplanıp, genotip dağılımı ile karşılaştırıldığında hastalık aktivasyonunun hastalardaki AA, AG veya GG genotipine sahip olmakla ilişkili olmadığı söylenebilir.

Otoimmün bir hastalık olan SLE’de ikincil sinyal molekülleri ve diğer birçok moleküllerdeki değişimlerin dışında etkili olan bir hücre dizisi vardır ki bunlar, periferik kandaki  $CD4^+$  T hücrelerinin %1-5’ini oluşturan düzenleyici T hücreleridir. Düzenleyici T hücreleri,  $CD4^+$   $CD25^+$  T hücreler ya da  $T_{reg}$  olarak da isimlendirilirler. Genel anlamda yaptıkları işin hem hayvanlarda hem de insanlarda otoimmüniteyi baskılamak olduğu bilinmektedir (13). Bugünkü yapılan araştırmaların bir çoğunun odağı  $CD4^+$  $CD25^+$  T hücreleridir. Düzenleyici T hücrelerinin bir çok alt grubu vardır. Özellikle de  $CD4^+$  $CD25^+$  T hücreleri, Foxp3 ekspresyonuna bakılmaksızın periferik kanda tespit edilen  $CD4^+$  $CD25^+$  T hücrelerinin tamamı aktif T hücrelerini temsil etmektedir. Yani bu aktive olmuş T hücreleri içinde Foxp3<sup>+</sup> olan düzenleyici T hücreleri de vardır. SLE hastalığının otoimmün bir hastalık olmasından dolayı bu çalışmada, periferik kanda  $CD4^+$  $CD25^+$  T hücre yüzde miktarları ve bu yüzdelerle hastalığın aktivasyonu (SLE-DAI) arasındaki ilişki araştırılmıştır. SLE-DAI skoru ile periferik kanda bulunan  $CD4^+$   $CD25^+$  T hücre yüzde değerleri karşılaştırıldığında yine anlamlı değerlere ulaşılamamıştır ( $P=1$ ).  $CD4^+$   $CD25^+$  T hücre yüzde değerleri ile ayrı ayrı, sadece A genotipi taşıyanlar taşımayanlarla, sadece G genotipi taşıyanlar taşımayanlarla karşılaştırılmıştır. Ayrıca her iki allele ait gen frekansları  $CD4^+$   $CD25^+$  T hücre yüzde değerleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel bir fark bulunamamıştır.

SLE'li çocuk hastalarda düzenleyici T hücrelerinin CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sayılarının kontrollere göre anlamlı derecede düşük bulunduğu ve bu düşüklük ile hastalık aktivasyonunun ilişkili olduğu yakın zamanda yapılan çalışmalarda da gösterilmiştir (75). Ancak bizim çalışmaya başladığımız zaman içerisinde Foxp3 antikorunun olmayışı nedeniyle bu hücrelerde Foxp3 ekspresyonuna bakılamamıştır. Foxp3 ekspresyonuna bakılmadığından dolayı, elde edilen değerler bu hücrelerin düzenleyici T hücresi olduğunu tam olarak söylenememekle beraber normalde periferik kandan ölçülen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T hücre %1-2 üzerinde olmaması gerekirken ulaşılan değerler aktif T hücrelerinin varlığını göstermektedir. Bu bulgular da hastalığın klinik olarak aktif olmasa da laboratuvar olarak hücresel düzeyde aktivasyonunun devam ettiğini akla getirmektedir.

CTLA-4 molekülünün rolü pek çok otoimmün hastalıkta araştırılmaktadır. Özellikle SLE gibi T ve B hücre aktivasyonunun ön planda olduğu ve yoğun otoantikor sentezinin olduğu bir hastalıkta sıklıkla inhibitör molekül olarak bilinen CTLA-4 molekülünün önemi büyüktür. Çönünebilir CTLA-4 özellikle SLE li hastalarda periferik kanda yüksek bulunmuş ve hatta hastalık aktivasyon belirleyicisi olabileceği dahi ima edilmiştir (76). CTLA-4 polimorfizmi acaba SLE hastalığı ile ilişkilimidir sorusuna cevap arayan bir metaanaliz özellikle CTLA-4 exon 1 +49 bölgede GG fenotipi ile SLE arası ilişkiyi Odds Ratio : 1.293, ( 95% CI=1.031–1.620, P=0.026) olarak tanımlamıştır (77).

Bu çalışma en azında asya irkinda CTLA4 exon-1 49+ bölgesi ile SLE arası ilişkiyi desteklemektedir. Ancak başka bir çalışma SLE ile CTLA-4 exon 1 49+ bölgesi arası ilişkiyi desteklememiştir (78). CTLA-4 exon1 +49 bölgesinde polimorfizmin hastalık oluşumuna etkisi nasıl gerçekleşmektedir. Bu cevabı zor bir sorudur. Bizim çalışmamızda sonuç olarak; Türk popülasyonunda AA genotipe sahip olmak ile SLE hastalığı arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır ( odds ratio:1,8). Bu genotip ile hastalık aktivasyonu arasında direk bir ilişki saptanmamış olup, hastalık aktif olmasının genotip ile ilişkisi olmadığını düşündürmüştür. Literatüre bakıldığında GG genotipi ile CTLA-4 inhibitöre fonksiyonunda azalma görülmektedir (65). Bu durum Th1 immün yanıtında artışla beraber olabilmektedir. Buna karşın AA homozigot genotipinde CTLA-4 mRNA proteininde artış ve fonksiyonda artış olmaktadır (65). Buda genellikle Th1 azalmasına ve Th2 tip immün yanıtta artışa sebep olabilir. SLE hastalığının ise TH2 tip sitokinlerde artışla kötü seyrediyor olması, ve genelde Th2 ağırlıklı olması (IL-10) bizim çalışmamızda gösterilen AA genotip artışının açıklamalarından biri olabilir (79). Kaldı ki yakın zamanda Behçetli hastalarda yapılan bir çalışmada da genel literatürün aksine AA genotipi CTLA-4 exon 1 +49 bölgesinde daha sık görülmüştür (65). Ancak genede bu tür hipotetik yaklaşımlar, nedeni daha göstermeye yönelik çalışmalarla desteklenmelidir. Keza CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T hücrelerin tüm bakılabilen SLE'li hastalarda sağlıklı kişilere göre (80) yüksek bulunması düzenleyici+aktif T hücrelerinin SLE hastalığı oluşumu subklinik aktivasyonunda rol oynayabileceği ihtimalini akla getirmektedir. Bu çalışmada gösterilen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T hücrelerinin düzenleyici T hücre olup olmadıkları ve



SLE hastalığı ile ilişkisi Foxp3 ekspresyonuna bakılarak karar verilebilir. Bu nedenle daha sonra yapılmak üzere düşünülen çalışmada hasta sayısı arttırılıp ve Foxp3 antikoru temin edilerek hastaların düzenleyici T hücre değerleri ve bunun genotiplendirme ve SLE-DAI skoru ile karşılaştırılması planlanmaktadır.

## SONUÇLAR

Bu çalışmada Türk popülasyonunda SLE hastalarında Exon I +49 (A/G) polimorfizmi, polimorfizmleri çalışılan hataların SLE-DAI skorları ve yine aynı hastaların periferik kandaki T hücrelerinin aktif olup olmadığı çalışılmış ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

1. Türk popülasyonunda SLE hastalarında Exon I +49 (A/G) polimorfizmi toplumda bulunan sağlıklı kişilerle karşılaştırıldığında homozigot A/A olanların hastalığa yakınlığının daha fazla olduğu diğer haplotiplerle bir ilişki olmadığı
2. Elde edilen genotip değerlerinin homozigot A/A, homozigot G/G veya heterozigot A/G olması ile hastalığın aktivasyonu arasında bir ilişki göstermediği
3. Elde edilen genotip değerleri ile periferik kanda bulunan CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T hücrelerinin bir ilişkisi olmadığı ancak, bu hücrelerin varlığı aktiflenmiş T hücrelerinin varlığını gösterdiğinden ve tüm hastalarda da yüksek bulunduğu dolayısıyla SLE hastalığı subklinik veya klinik aktivasyonda rol oynayabileceği
4. Periferik kandan elde edilen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T hücrelerinin ortalamaları SLE-DAI<5 ve SLE-DAI≥5 'e göre bakıldığında arada bir fark olmadığı ve periferik kanda bulunan aktif T hücrelerinin de SLE-DAI indeksi ile ilişki göstermediği tespit edilmiştir.

## KAYNAKLAR

1. Yeğın, O. 1990. *Temel İmmünoloji Notları*. Akdeniz Üniversitesi Basımevi, Antalya.
2. Abbas, A. K., and A. H. Lichtman. 2004. *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*. Saunders, Philadelphia.
3. Schwartz, R. H. 2005. Natural regulatory T cells and self tolerance. *Nat Immunol* 6:327.
4. Ehrlich, P., and J. Morgenroth. 1957. On haemolysins: third and fifth communications. *in The Collected Papers of Paul Ehrlich* 2:205.
5. Billingham, R. E., L. Brent, and P. B. Medawar. 1953. Activity acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 172:603.
6. Surh, C. D., and J. Sprent. 1994. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 372:100.
7. Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J. E. de Vries, and M. G. Roncarolo. 1997. A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389:737.
8. Powrie, F., R. Correa-Oliveira, S. Mauze, and R. L. Coffman. 1994. Regulatory interactions between CD45RB<sup>high</sup> and CD45RB<sup>low</sup> CD4<sup>+</sup> T cells are important for the balance between protective and pathogenic cell-mediated immunity. *J Exp Med* 179:589.
9. Roncarolo, M. G., R. Bacchetta, C. Bordignon, S. Narula, and M. K. Levings. 2001. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev* 182:68.
10. Sundstedt, A., E. J. O'Neill, K. S. Nicolson, and D. C. Wraith. 2003. Role for IL-10 in suppression mediated by peptide-induced regulatory T cells in vivo. *J Immunol* 170:1240.
11. 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. 2002. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med* 195:603.

12. Oida, T., X. Zhang, M. Goto, S. Hachimura, M. Totsuka, S. Kaminogawa, and H. L. Weiner. 2003. CD4+CD25- T cells that express latency-associated peptide on the surface suppress CD4+CD45RBhigh-induced colitis by a TGF-beta-dependent mechanism. *J Immunol* 170:2516.
13. O'Garra, A., and P. Vieira. 2004. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med* 10:801.
14. Gershon, R. K. 1975. A disquisition on suppressor T cells. *Transplant Rev* 26:170.
15. Kanof, M. E., W. Strober, W. C. Kwan, N. A. O'Connell, and S. P. James. 1991. CD4+ Leu-8+ T cell supernatant activity that inhibits Ig production. *J Immunol* 147:155.
16. Maloy, K. J., L. Salaun, R. Cahill, G. Dougan, N. J. Saunders, and F. Powrie. 2003. CD4+CD25+ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J Exp Med* 197:111.
17. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, J. Shimizu, S. Yamazaki, T. Sakihama, M. Itoh, Y. Kuniyasu, T. Nomura, M. Toda, and T. Takahashi. 2001. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 182:18.
18. Shevach, E. M. 2002. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2:389.
19. Shimizu, J., S. Yamazaki, T. Takahashi, Y. Ishida, and S. Sakaguchi. 2002. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 3:135.
20. McHugh, R. S., M. J. Whitters, C. A. Piccirillo, D. A. Young, E. M. Shevach, M. Collins, and M. C. Byrne. 2002. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 16:311.
21. Suri-Payer, E., and H. Cantor. 2001. Differential cytokine requirements for regulation of autoimmune gastritis and colitis by CD4(+)CD25(+) T cells. *J Autoimmun* 16:115.
22. Maloy, K. J., and F. Powrie. 2001. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2:816.
23. Fontenot, J. D., M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4:330.

24. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057.
25. Khattri, R., T. Cox, S. A. Yasayko, and F. Ramsdell. 2003. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 4:337.
26. Ramsdell, F. 2003. Foxp3 and natural regulatory T cells: key to a cell lineage? *Immunity* 19:165.
27. O'Garra, A., and P. Vieira. 2003. Twenty-first century Foxp3. *Nat Immunol* 4:304.
28. 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. 2001. Treatment of the immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) by allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 344:1758.
29. Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, and S. M. Wahl. 2003. 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* 198:1875.
30. Walker, M. R., D. J. Kasprovicz, V. H. Gersuk, A. Benard, M. Van Landeghen, J. H. Buckner, and S. F. Ziegler. 2003. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest* 112:1437.
31. Apostolou, I., and H. von Boehmer. 2004. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med* 199:1401.
32. Green, E. A., Y. Choi, and R. A. Flavell. 2002. Pancreatic lymph node-derived CD4(+)CD25(+) Treg cells: highly potent regulators of diabetes that require TRANCE-RANK signals. *Immunity* 16:183.
33. Salomon, B., D. J. Lenschow, L. Rhee, N. Ashourian, B. Singh, A. Sharpe, and J. A. Bluestone. 2000. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12:431.
34. Hara, M., C. I. Kingsley, M. Niimi, S. Read, S. E. Turvey, A. R. Bushell, P. J. Morris, F. Powrie, and K. J. Wood. 2001. IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. *J Immunol* 166:3789.
35. Kingsley, C. I., M. Karim, A. R. Bushell, and K. J. Wood. 2002. CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol* 168:1080.

36. Asseman, C., S. Mauze, M. W. Leach, R. L. Coffman, and F. Powrie. 1999. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 190:995.
37. 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. 2004. 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* 172:5986.
38. Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober. 2001. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 194:629.
39. Burkhart, C., G. Y. Liu, S. M. Anderton, B. Metzler, and D. C. Wraith. 1999. Peptide-induced T cell regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis: a role for IL-10. *Int Immunol* 11:1625.
40. Buer, J., A. Lanoue, A. Franzke, C. Garcia, H. von Boehmer, and A. Sarukhan. 1998. Interleukin 10 secretion and impaired effector function of major histocompatibility complex class II-restricted T cells anergized in vivo. *J Exp Med* 187:177.
41. Pontoux, C., A. Banz, and M. Papiernik. 2002. Natural CD4 CD25(+) regulatory T cells control the burst of superantigen-induced cytokine production: the role of IL-10. *Int Immunol* 14:233.
42. Miller, C., J. A. Ragheb, and R. H. Schwartz. 1999. Anergy and cytokine-mediated suppression as distinct superantigen-induced tolerance mechanisms in vivo. *J Exp Med* 190:53.
43. Taams, L. S., J. Smith, M. H. Rustin, M. Salmon, L. W. Poulter, and A. N. Akbar. 2001. Human anergic/suppressive CD4(+)CD25(+) T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. *Eur J Immunol* 31:1122.
44. Apostolou, I., A. Sarukhan, L. Klein, and H. von Boehmer. 2002. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol* 3:756.
45. Magistrelli, G., P. Jeannin, N. Herbault, A. Benoit De Coignac, J. F. Gauchat, J. Y. Bonnefoy, and Y. Delneste. 1999. A soluble form of CTLA-4 generated by alternative splicing is expressed by nonstimulated human T cells. *Eur J Immunol* 29:3596.

46. Dariavach, P., M. G. Mattei, P. Golstein, and M. P. Lefranc. 1988. Human Ig superfamily CTLA-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains. *Eur J Immunol* 18:1901.
47. Harper, K., C. Balzano, E. Rouvier, M. G. Mattei, M. F. Luciani, and P. Golstein. 1991. 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* 147:1037.
48. 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. 1995. Binding stoichiometry of the cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 (CTLA-4). A disulfide-linked homodimer binds two CD86 molecules. *J Biol Chem* 270:15417.
49. Ling, V., P. W. Wu, H. F. Finnerty, A. H. Sharpe, G. S. Gray, and M. Collins. 1999. Complete sequence determination of the mouse and human CTLA4 gene loci: cross-species DNA sequence similarity beyond exon borders. *Genomics* 60:341.
50. Oaks, M. K., K. M. Hallett, R. T. Penwell, E. C. Stauber, S. J. Warren, and A. J. Tector. 2000. A native soluble form of CTLA-4. *Cell Immunol* 201:144.
51. Ostrov, D. A., W. Shi, J. C. Schwartz, S. C. Almo, and S. G. Nathenson. 2000. Structure of murine CTLA-4 and its role in modulating T cell responsiveness. *Science* 290:816.
52. Stamper, C. C., Y. Zhang, J. F. Tobin, D. V. Erbe, S. Ikemizu, S. J. Davis, M. L. Stahl, J. Seehra, W. S. Somers, and L. Mosyak. 2001. Crystal structure of the B7-1/CTLA-4 complex that inhibits human immune responses. *Nature* 410:608.
53. Schwartz, J. C., X. Zhang, A. A. Fedorov, S. G. Nathenson, and S. C. Almo. 2001. Structural basis for co-stimulation by the human CTLA-4/B7-2 complex. *Nature* 410:604.
54. Sayegh, M. H., and L. A. Turka. 1998. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N Engl J Med* 338:1813.
55. Deniz, G., and S. Badur. 2001. *İmmünolojide Gelişmeler - III*. Erka Matbaacılık, Kastamonu.
56. Hahn, B. H. 1997. *Animal models of systemic lupus erythematosus*. Williams and Wilkins, Baltimore.
57. Stoll, M. L., and J. Gavalchin. 2000. Systemic lupus erythematosus-messages from experimental models. *Rheumatology (Oxford)* 39:18.

58. Weisman, M. H., H. G. Bluestein, C. M. Berner, and H. A. de Haan. 1997. Reduction in circulating dsDNA antibody titer after administration of LJP 394. *J Rheumatol* 24:314.
59. James, J. A., T. Gross, R. H. Scofield, and J. B. Harley. 1995. Immunoglobulin epitope spreading and autoimmune disease after peptide immunization: Sm B/B'-derived PPPGMRPP and PPPGIRGP induce spliceosome autoimmunity. *J Exp Med* 181:453.
60. Chan, O. T., L. G. Hannum, A. M. Haberman, M. P. Madaio, and M. J. Shlomchik. 1999. A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus. *J Exp Med* 189:1639.
61. Mason, L. J., L. M. Timothy, D. A. Isenberg, and J. K. Kalsi. 1999. Immunization with a peptide of Sm B/B' results in limited epitope spreading but not autoimmune disease. *J Immunol* 162:5099.
62. Radic, M. Z., and M. Weigert. 1994. Genetic and structural evidence for antigen selection of anti-DNA antibodies. *Annu Rev Immunol* 12:487.
63. Kono, D. H., and A. N. Theofilopoulos. 1996. Genetic contributions to SLE. *J Autoimmun* 9:437.
64. Bombardier, C., D. D. Gladman, M. B. Urowitz, D. Caron, and C. H. Chang. 1992. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum* 35:630.
65. Sallakçı, N., A. Bacanlı, M. Coşkun, U. Yavuzer, E. Alpsoy, and O. Yeğın. 2005. CTLA-4 gene 49A/G polymorphism in Turkish patients with Behçet's disease. *Experimental Dermatology* 30:546.
66. Vyse, T. J., and B. L. Kotzin. 1998. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Annu Rev Immunol* 16:261.
67. Tivol, E. A., F. Borriello, A. N. Schweitzer, W. P. Lynch, J. A. Bluestone, and A. H. Sharpe. 1995. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3:541.
68. Waterhouse, P., J. M. Penninger, E. Timms, A. Wakeham, A. Shahinian, K. P. Lee, C. B. Thompson, H. Griesser, and T. W. Mak. 1995. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl-4. *Science* 270:985.
69. Herold, K. C., V. Vezys, A. Koons, D. Lenschow, C. Thompson, and J. A. Bluestone. 1997. CD28/B7 costimulation regulates autoimmune diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin. *J Immunol* 158:984.



70. Moser, K. L., B. R. Neas, J. E. Salmon, H. Yu, C. Gray-McGuire, N. Asundi, G. R. Bruner, J. Fox, J. Kelly, S. Henshall, D. Bacino, M. Dietz, R. Hogue, G. Koelsch, L. Nightingale, T. Shaver, N. I. Abdou, D. A. Albert, C. Carson, M. Petri, E. L. Treadwell, J. A. James, and J. B. Harley. 1998. Genome scan of human systemic lupus erythematosus: evidence for linkage on chromosome 1q in African-American pedigrees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14869.
71. Gaffney, P. M., G. M. Kearns, K. B. Shark, W. A. Ortmann, S. A. Selby, M. L. Malmgren, K. E. Rohlf, T. C. Ockenden, R. P. Messner, R. A. King, S. S. Rich, and T. W. Behrens. 1998. A genome-wide search for susceptibility genes in human systemic lupus erythematosus sib-pair families. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14875.
72. Ahmed, S., K. Ihara, S. Kanemitsu, H. Nakashima, T. Otsuka, K. Tsuzaka, T. Takeuchi, and T. Hara. 2001. Association of CTLA-4 but not CD28 gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus in the Japanese population. *Rheumatology (Oxford)* 40:662.
73. Aguilar, F., B. Torres, J. Sanchez-Roman, A. Nunez-Roldan, and M. F. Gonzalez-Escribano. 2003. CTLA4 polymorphism in Spanish patients with systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol* 64:936.
74. Hudson, L. L., K. Rocca, Y. W. Song, and J. P. Pandey. 2002. CTLA-4 gene polymorphisms in systemic lupus erythematosus: a highly significant association with a determinant in the promoter region. *Hum Genet* 111:452.
75. Lee, J. H., L. C. Wang, Y. T. Lin, Y. H. Yang, D. T. Lin, and B. L. Chiang. 2006. Inverse correlation between CD4+ regulatory T-cell population and autoantibody levels in paediatric patients with systemic lupus erythematosus. *Immunology* 117:280.
76. Wong, C. K., L. C. Lit, L. S. Tam, E. K. Li, and C. W. Lam. 2005. Aberrant production of soluble costimulatory molecules CTLA-4, CD28, CD80 and CD86 in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 44:989.
77. Lee, Y. H., J. B. Harley, and S. K. Nath. 2005. CTLA-4 polymorphisms and systemic lupus erythematosus (SLE): a meta-analysis. *Hum Genet* 116:361.
78. Parks, C. G., L. L. Hudson, G. S. Cooper, M. A. Dooley, E. L. Treadwell, E. W. St Clair, G. S. Gilkeson, and J. P. Pandey. 2004. CTLA-4 gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus in a population-based study of whites and African-Americans in the southeastern United States. *Lupus* 13:784.

79. Gomez, D., P. A. Correa, L. M. Gomez, J. Cadena, J. F. Molina, and J. M. Anaya. 2004. Th1/Th2 cytokines in patients with systemic lupus erythematosus: is tumor necrosis factor alpha protective? *Semin Arthritis Rheum* 33:404.
80. Gunduz, K., G. Ozturk, E. Terzioglu, and F. Sebik. 2004. T cell subpopulations and IL-2R in vitiligo. *J Dermatol* 31:94.

## ÖZGEÇMİŞ

16-06-1978 tarihinde Darende'de doğdu. İlk öğretimini Tarsus Atatürk ilkokulu, orta öğretimini Malatya Hacı Ahmet Akıncı Lisesinde tamamladı. Lisans eğitimini 2002 yılında Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'den mezun olarak tamamladı. 2002-2003 Eğitim-Öğretim yılının bahar döneminde Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'na bağlı İmmünoloji Yüksek Lisans Programına başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Araştırma Görevlisi kadrosunda çalışmaktadır. Mehtap Ülker İngilizce bilmektedir. Ulusal kongrelerde 4, uluslararası kongrelerde yayınlanmış 1 kongre bildirisi bulunmaktadır.

# **EKLER**

## SİSTEMİK LUPUS ERİTEMATOSUZ SINIFLANDIRMA KRİTERLERİ

Kriter	Tanımlama
1. Malar rash	Yanağı kapsayan, nasolabial olukların korunma eğiliminde olan düzgün ya da kabarık sabit eritem
2. Diskoid rash	Keratotik skarlar ve foliküler tıkaçlar gösteren deriden kabarık eritematöz plaklar, eski lezyonlarda atrofik scarlar gelişir
3. Fotosensitivite	
4. Oral ülserler	Oral yada nazofarengeal ülserasyon, genellikle ağrısı muayenede görülür
5. Artrit	İki veya daha fazla eklemden erozyon oluşturmayan artrit gelişir ağrılı, şiş veya efüzyonludur
6. Serozit	a. Plörit- plöritik ağrı öyküsü veya muayenede sürtünme sesi veya plevral efüzyon bulguları VEYA b. Perikardit-Perikardial sürtünme sesi veya EKG de perikardit bulguları
7. Renal tutulum	a. Günde 0.5 gramın üzerinde veya 3 pozitiften fazla persistan proteinüri VEYA b. Eritrosit, hemoglobin, granüller, tübüler veya karışık hücre silendirlerin varlığı
8. Nörolojik tutulum	a. Konvülsiyonlar-ilaçlar veya üremi, ketoasidoz ve elektrolit bozuklukları gibi metabolik bozukluklara bağlı olmamalı VEYA b. Psikoz- ilaçlar veya üremi, ketoasidoz ve elektrolit bozuklukları gibi metabolik bozukluklara bağlı olmamalı
9. Hematolojik tutulum	a. Hemolitik anemi, retikülosis ile birlikte VEYA b. Lökopeni: iki veya daha fazla ölçümde total $<4000 /\text{mm}^3$ c. Lenfopeni: iki veya daha fazla ölçümde total $<1500 /\text{mm}^3$ VEYA d. Trombositopeni: $<100\ 000 /\text{mm}^3$ ilaca bağlı olmamalı
10. Immunolojik tutulum	a. Anti-(ds)DNA: Native DNA ya karşı anormal titrelerde antikor VEYA b. Anti-Sm: Sm nükleer antijenine antikorların varlığı VEYA c. Antifosfolipid antikorlarının pozitif bulunması (1) IgM veya IgG tipi antikardiolipin antikorlarının seviyeleri (2) Standart metod ile lupus antikoagülanın pozitif olması (3) 6 aydan beri devam eden sifiliz testlerinde yalancı pozitiflik
11. Antinükleer Antikor	İmmunfloresan boyama ile veya eşdeğer ölçümlerde anormal titrelerde antinükleer antikor pozitifliği (ilaçlara bağlı lupus sendromuyla ilişkili ilaçlar olmamalı)

## SİSTEMİK LUPUS ERİTEMATOZUS AKTİVİTE İNDEKSİ (SLE-DAI)

SLE-DAI Skoru	Tanımlama	Tanım
8	Nöbet	Yakında başlamış. Metabolik, enfeksiyon veya ilaç ilgili nedenler hariç
8	Psikoz	Halisünasyonlar, enkoherans, mantığa aykırı düşünce, katatoni. Üremi veya ilaçlar gibi nedenler olmayacak.
8	Organik Beyin Sendromu	Mental fonksiyonda azalma, oryantasyon ve bellekte azalma, kliniğin hızlı ilerlemesi, uykusuzluk, psiko-motor aktivitede artma veya azalma. Metabolik, enfeksiyon ve ilaçla ilgili nedenlerin dışlanması.
8	Görme	SLE'deki retinal değişiklikler; sitoid cisimciği, retinal hemoraji, koroidde eksüda veya hemoraji, optik nörit (HT, ilaçlar veya enfeksiyona bağlı olmayacak)
8	Kraniyal Sinir	Yeni başlamış sensoriyal veya motor nöropati, kraniyal sinir tutulumuna bağlı
8	Lupus baş ağrısı	Ciddi, persistan baş ağrısı, narkotik analjeziklere yanıt yok
8	Serebrovasküler	Yeni sendrom Atheroskleroz olmayacak
8	Vaskülit	Ülserasyon, gangren, parmaklarda nodül, periunguinal infarktüs, splinter hemoraji
4	Artrit	İkiden fazla eklem ağrı ve inflamatuvar bulgular (kızarıklık, şişlik veya effüzyon)
4	Myozit	Proksimal kas ağrı veya güçsüzlük ile beraber kreatinin fosfokinaz / aldolaz, ↑ EGM değişikliği veya kas biyopsisi ile gösterilmiş myozit
4	Silendir	Granül veya eritrosit
4	Hematüri	Sahada >5 eritrosit. Diğer nedenler olmayacak ( Taş, enfeksiyon)
4	Proteinüri	24 saatlik idrarda > 0,5 gr. yeni başlamış veya giderek artarak > 0,5gr / 24 saat
4	Piüri	Sahada > 5 lökosit. Enfeksiyon olmayacak.
2	Yeni malar rash	Yeni başlamış veya rekürren inflamatuvar tip malar rash
2	Alopesi	Yeni veya rekürren parsiyel veya diffüz alopesi
2	Mukozal membran	Yeni başlamış veya rekürren oral veya nazal ülser
2	Plörezi	Plöretik ağrı ile plevral sürtünme veya effüzyon veya plevral kalınlaşma
2	Perikardit	Perikardiyel ağrı ile en azından biri olacak; sürtünme sesi effüzyon EKG veya EKO ile konfirme edilmiş.
2	Kompleman ↓	CH <sub>50</sub> , C3 veya C4 seviyesi ↓ (Lab. Normal sınırların alt sınırından düşük olacak)
2	Artmış DNA binding	Binding %25'den fazla olacak Farr assay ( Lab. Üst sınırından fazla olacak Örn;25)
1	Ateş	Ateş > 38 °C , enfeksiyon olmayacak
1	Trombositopeni	Trombosit sayısı > 100.000/ mm <sup>3</sup>
1	Lökopeni	Lökosit sayısı < 3000/ mm <sup>3</sup> ( ilaç kullanımı esnasında değil)
<b>Toplam Skor:</b>		